

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570064

研究課題名(和文)植物の液胞膜上に生じるサブドメイン様構造の機能，形成過程，分子基盤の解明に向けて

研究課題名(英文)Analysis of the "vacuolar bulb", -its biogenesis, function, and molecular basis-

## 研究代表者

齊藤 知恵子 (Chieko, Saito)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：10321762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物の液胞は，成熟した細胞ではその体積の9割以上を占める，巨大な単膜の細胞小器官である．多くの教科書で，液胞はスムーズな表面を持つ水風船様に多くの教科書で描かれているが，実際は原形質系などの複雑な構造を持つ．私たちは発芽初期に生じる球状の構造bulbを発見し，その生物学的意義、分子基盤、形成過程を明らかにすべく研究を行ってきた．本研究では、高圧急速凍結凍結置換法を適用し、透過型電子顕微鏡観察を行ってbulbの形成過程を詳細に観察した．bulbが極端に少ない変異体と野生型を比較し，bulb形成には小さい分解性液胞が大型の貯蔵性の液胞に取り囲まれることが必要であることを示唆する結果を得た．

研究成果の概要(英文)：Plant vacuole is a single-membrane-bound organelle, that occupy more than 90% volume in matured cell. Although the vacuole is often illustrated in many textbooks as a water-balloon-like shape with smooth surface, it has complex three-dimensional configuration actually. Typical examples of such complex shape in vacuolar membrane are transvacuolar strands or "(vacuolar) bulbs" we previously found. I analyzed the biosynthesis pathway of this "(vacuolar) bulb" by transmission electron microscopy using rapid-freeze fixation/freeze substitution. In wild-type cotyledon, the engulfment of the small electron lucent vacuole by large electron dense vacuole is often observed. Two mutants, *sgr2-1* and *zig-1/vti11*, that we previously reported as "(vacuolar) bulb-less" mutants, lacked this engulfment event. These results suggest that the engulfment of small vacuole by big vacuole will make spherical shape and two membranes closely attached, those are typical characters of "(vacuolar) bulbs".

研究分野：植物形態学

キーワード：液胞

## 1. 研究開始当初の背景

植物の液胞は巨大なオルガネラで、その機能は植物の生活環のなかで、細胞伸張、低コストな空間充填、貯蔵、分解、解毒、など多岐にわたる。私は、液胞膜のマーカータンパク質 $\gamma$ -TIP と緑色蛍光タンパク質 (GFP) の融合分子を発現する形質転換シロイヌナズナの子葉の表皮を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、通常の液胞膜の輪郭に加えて、強い蛍光を発する球状の構造があることを見出した。この球状の構造“(vacuolar) bulb”は、上記の液胞マーカー蛍光タンパク質を発現していない非形質転換体のシロイヌナズナにおいても存在することを、液体ヘリウムを用いた金属圧着固定による透過型電子顕微鏡観察により確かめた (Saito et al. 2002 Plant Journal)。液胞膜は教科書的には丸くスムーズな表面を持つ水風船のようなものとしてしばしば描かれるが、時として複雑な形態をとることがあることを明らかにした。

その後、花茎の重力屈性の変異体の一部では液胞膜の形態に異常が生じることを明らかにし (Morita-Terao, 2002 Plant Cell)、それらの変異体では、重力を感知するアミロプラストが、液胞膜で形成される原形質系の中をスムーズに動けないことを明らかにした (Saito et al. 2005 Plant Cell)。さらに、前述の液胞膜の形態に異常を生じる花茎重力変異体では、子葉表皮での“(vacuolar) bulb”の形成頻度が激減していることを明らかにした (Saito et al. 2011 Plant Journal)。以上の経緯により、従来スムーズな表面を持ち均一な成分で構成されていると考えられている液胞膜には、一部で特殊化した性質や機能を持つ領域が存在するのではないかという作業仮説を立てるに至った。

## 2. 研究の目的

これまでほとんど知見のない、“(vacuolar) bulb”の生合成過程、分子的基盤を明らかにし、液胞膜に生じる複雑な立体構造を持つサブ領域様の領域の持つ機能および生物学的意義を明らかにすることを目指す。

## 3. 研究の方法

以下に述べる、(1) 遺伝学、(2) 生化学、(3) 形態学からの多面的なアプローチで“(vacuolar) bulb”の生物学的意義と分子基盤に迫ることを試みた。

(1) 遺伝学：液胞膜を GFP マーカーで可視化した形質転換シロイヌナズナを親株に、エチルメタンスルホン酸を用いて変異原処理を施し、変異体プールを作成した。“(vacuolar) bulb”が激減する既知の変異体と似た巨視的な表現型を持つものを選抜し、共焦点レーザー顕微鏡で液胞膜の形態異常を確認するスクリーニング法、また、直接変異体プールを蛍光顕微鏡観察して選抜するスクリーニング法により、変異体候補を探索した。ラフマッピングと次世代シーケン

サー解析により、候補遺伝子を絞り込み、さらに原因遺伝子であることの確認作業を行った。

(2) 生化学：“(vacuolar) bulb”が高頻度で出現するステージで、大量に液胞膜を取得する系の構築を試みた。

(3) 形態学：“(vacuolar) bulb”の生合成過程を透過型電子顕微鏡により詳細に解析するための方法を確立し、野生型とこれまで得られている“(vacuolar) bulb”の変異体と比較することで、その生合成過程を推測した。

## 4. 研究成果

(1) 遺伝学：これまでのスクリーニングで得られた液胞形態の変異体について、候補遺伝子が見出された#64 については、別のアレルでも同様に液胞の形態異常が起こっていることを明らかにし、原因遺伝子を特定するに至った。

(2) 生化学：bulb を高頻度で含むと想定されるステージのシロイヌナズナ子葉から液胞膜を取得する系の確立を試みたが、大量に取得することができなかった。

(3) 形態学：

液体ヘリウムを用いた金属圧着による急速凍結：理研の他部署で保管してあった装置を用い、製造メーカーのサポートを受けつつ再稼働を試みたが、温度センサーの不調により自動駆動シャッターの部分が凍結してしまふという事態に見舞われ、回避方法も見出せず、断念した。

高圧急速急速凍結：液体ヘリウムを用いた金属圧着よりもより簡便な高圧急速凍結に切り替えた。液胞膜はダイナミックで壊れやすいため、液体ヘリウム金属圧着では良好な固定が得られていたサンプルでも、高圧急速急速凍結で試料を作成すると、細胞内が微小氷晶により破壊され、観察したい表皮の部分では全く観察に耐えない状態であった。そこで、別の共同研究で用いている非常に良好な観察像が得られていた培養方法 (糖を高濃度を含む培地を用いた水耕振とう培養) を適用した。この培養方法でも、蛍光マーカーを発現させた植物では“(vacuolar) bulb”は形成されていることを確認した上で、高圧急速凍結/凍結置換法で調製した試料を透過型電子顕微鏡で観察したところ、子葉の表皮でも液胞膜の形態が良好に維持されることを見出した。“(vacuolar) bulb”が多数観察されるステージの野生型の子葉では、大きな貯蔵性の液胞が、小さな分解性の液胞を取り囲むイベントが高頻度で観察された。これまで報告した“(vacuolar) bulb”が著しく減っている2つの変異体では、大きな貯蔵性の液胞が小さな分解性の液胞を取り囲むイベントが激減していることを明らかにした。以上から、子葉の発達過程で生じる“(vacuolar) bulb”は、異なる性質の液胞どうして起こる取り囲みと融合のイベントが必要であることを示唆する結果を得た。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4件)

A unique heat repeat-containing protein SHOOT GRAVITROPISM6 is involved in membrane dynamics in gravity-sensing cells of Arabidopsis inflorescence stem. Yasuko Hashiguchi, Daisuke Yano, Takehide Kato, Chieko Saito, Tomohiro Uemura, Takashi Ueda, Akihiko Nakano, Masao Tasaka, Morita-Terao Miyo Plant Cell Physiology 55, 812-822 (2014) (査読あり)

Ultrastructural analysis of single-membrane-bound organelles in plant cells –comparison between high-pressure freezing method and chemical fixation– Chieko Saito Plant Morphology 25, 11-14 (2012) (査読あり)

Qa-SNAREs localized to the trans-Golgi network regulate multiple transport pathways and extracellular disease in plants. Tomohiro Uemura, Hyeran Kim, Chieko Saito, Kazuo Ebine, Takashi Ueda, Paul Schulze-Lefert, Akihiko Nakano Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 109, 17845-1789 (2012) (査読あり)

High-curvature domains of the ER are important for the organization of ER exit sites in Saccharomyces cerevisiae. Michiyuki Okamoto, Kazuo Kurokawa, Kumi Mitsuura-Tokita, Chieko Saito, Ryogo Hirata, Akihiko Nakano Journal of Cell Science, 125 3412-3420 (2012) (査読あり)

〔学会発表〕(計 5件)

齊藤知恵子、榎本悟史、遠藤暁詩、坂本智昭、倉田哲也、中野明彦、福田裕穂 「液胞膜の形態に異常を示す変異体の単離と表現型解析」 日本植物学会第76回大会(2014 9/12-9/14) 明治大学

近藤侑貴、齊藤知恵子、藤田貴志、杉山宗隆、福田裕穂 「シロイヌナズナ葉ディスクを用いた木部・篩部分化系の確立」 日本植物生理学会年会 (2014 3/18-3/20) 富山大学

齊藤知恵子、榎本悟史、遠藤暁詩、坂本智昭、倉田哲也、中野明彦、福田裕穂 「液胞膜上の複雑な膜構造の形態に異常を示す変異体の単離と表現型解析」 日本植物学会第76回大会(2013 9/13-9/15) 北海道大学

齊藤知恵子、木内玲子、中野雄司、榎本悟史、植村知博、粟井千絵、山上あゆみ、坂本智昭、倉田哲也、安部弘、上田貴志、中野明彦 「液胞と bulb の形態に異常をきたす変

異体候補#64の原因遺伝子同定と解析」 日本植物学会代76回大会(2012 9/15-9/17) 兵庫県立大学

齊藤知恵子 「植物単膜系オルガネラはどう見えるか -凍結固定と化学固定の比較-」 日本植物学会代76回大会(2012 9/15-9/17) 兵庫県立大学

〔図書〕(計 2件)

Noguchi, T, Kawano, S, Tsukaya, H, Matsunaga, S, Sakai, A, Karahara I, Hayashi, Y (Eds.)

Atlas of Plant Cell Structure (2014) (担当総ページ数8)

齊藤知恵子、福田裕穂 「植物 CO2 資源化研究拠点ネットワーク (NC-CARP)」プロジェクトへの招待 化学と生物 2012 (担当総ページ6)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

ReaD Researchmap

<http://researchmap.jp/chiekosaito/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 知恵子 (SAITO, Chieko) 東京大学・大学院理学系研究科・特任准教授

研究者番号：10320762

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：