

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440146

研究課題名(和文)植物小胞体の可塑性とERボディ形成を可能にする分子装置

研究課題名(英文)Molecular mechanisms underlining the formation of endoplasmic reticulum (ER) bodies in plants

研究代表者

山田 健志 (Kenji, Yamada)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00360339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナを含むアブラナ目の植物には、ERボディと名付けた小胞体由来の構造物が出る。ERボディには、新規タンパク質であるNAI2と β -グルコシダーゼであるPYK10が蓄積する。そこで、本研究ではこれらのタンパク質の役割を調べ、ERボディの形成と機能に関して新しい知見を得た。NAI2とPYK10がERボディ形成に必要なかつ十分であること、PYK10はグルコシノレートを経質とするミロシナーゼであり、ダンゴムシの食害を防ぐために働くことが明らかとなった。これらのことより、ERボディは虫害や病害に対する防御のための構造物であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：ER bodies are organelles derived from the endoplasmic reticulum in plants of the Brassicales order, including *Arabidopsis thaliana*. A unique protein NAI2 and a β -glucosidase PYK10 are accumulated in ER bodies in *A. thaliana*. In this study, we investigated the role of these proteins and obtained new information for the ER body formation and function. We found that NAI2 and PYK10 were necessary and sufficient for the ER body formation. PYK10 was a myrosinase to hydrolyze glucosinolates, and it prevented the feeding damage by woodlice. These findings suggest that ER bodies are responsible for the protection against pests and pathogens.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：小胞体 ERボディ シロイヌナズナ β -グルコシダーゼ 食害 傷害 膜タンパク質 グルコシノレート

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナ実生の表皮細胞に小胞体由来の細長いオルガネラが形成されることを発見し、このオルガネラを ER ボディと名付けた。ER ボディには抗菌物質を生産するグルコシダーゼ、PYK10 が蓄積することから、病虫害に対する抵抗性を獲得するためのオルガネラであると考えられた。ER ボディはシロイヌナズナを含むアブラナ目以外の植物には存在せず、アブラナ目の植物が特異的に発達させた防御機構と思われた。研究開始当初は、bHLH 型転写制御因子、NAI1 が PYK10 遺伝子と NAI2 遺伝子の発現に必要であること、ER ボディの成分、NAI2 が ER ボディ形成と PYK10 の大量蓄積に必須であることや膜タンパク質、MEB1、MEB2 が ER ボディ特異的に蓄積することが明らかとなっていた。さらに、ER ボディが病原菌の感染とともに減少するという現象を見いだしていた。PYK10 が液胞へ輸送されたために、ER ボディが消失したと考えられた。ER ボディの形成と機能を調べることは、植物の柔軟かつ斬新な小胞体の機能分化機構を明らかにすることにつながると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ER ボディ形成の理解を通して植物特異的な小胞体の分化機構を解明するとともに ER ボディを利用した小胞体の植物特異的な新規機能を調べることである。ER ボディは PYK10 を大量蓄積するために発達した。そこで、ER ボディ形成に関わる巧妙な仕組みを調べる。さらに、PYK10 の局在の変化や ER ボディの消失を促す因子を同定することにより、植物がもつ防御応答による物質輸送系のダイナミックな変動を理解する。ER ボディ欠損変異体の病虫害に対する抵抗性を調べることで ER ボディが病虫害に関与することを直接示すと同時に、ER ボディをもたない植物に ER ボディ合成に関わる遺伝子を導入し、ER ボディ形成による糖化合物の代謝の変動を理解する。

3. 研究の方法

(1) ER ボディ形成における NAI2 タンパク質の機能解析

ER ボディを作らないタマネギ (*Allium cepa*) に NAI2 と PYK10 を発現し ER ボディ形成を調べる。PYK10 以外に、小胞体でアグリゲートを形成するプロテアーゼ (SH-EP) や貯蔵タンパク質 (12S グロブリン) と NAI2 を発現し、ER ボディ形成能を調べ、アグリゲートと ER ボディ形成の関係を調べる。免疫沈降によって NAI2 と PYK10 の結合を調べ、ER ボディの形成時に両者の複合体が形成されるか調べる。

(2) ER ボディ消失に関わる因子の単離

ER ボディは菌の接種とともに速やかに消失する。この機構に迫るため、菌側の因子の

同定を試みる。

(3) ER ボディ形成不全変異体の病虫害抵抗性の解析

ER ボディの機能を調べるため、ER ボディを形成しない *nai1* 変異体や ER ボディのグルコシダーゼを欠損している *pyk10 bglu21* 二重変異体を用い、病原菌や虫害に対する応答を調べる。

(4) ER ボディをもたない植物への ER ボディ関連遺伝子の導入による影響

ER ボディをもたないタバコ培養細胞 (BY-2) に NAI2 と PYK10 を導入し ER ボディを形成させる。さらに、PYK10 の基質を導入し、ER ボディ形成が基質の代謝にどのように影響するかを調べる。

4. 研究成果

(1) ER ボディ形成における NAI2 タンパク質の機能解析

NAI2 は ER ボディに局在する ER ボディの形成因子であり、シロイヌナズナの *nai2* 変異体では実生や根の ER ボディが形成されない。NAI2 のホモログはシロイヌナズナを含むアブラナ目に属する植物のみにみられるため、これらの植物が特異的に NAI2 遺伝子を獲得し、ER ボディの形成を発達させたと考えられた。そこで、まず NAI2 の ER ボディ形成における働きを調べるため、NAI2 を ER ボディの主要な成分である PYK10 とともにタマネギ表皮細胞に発現させた。その結果、NAI2 または

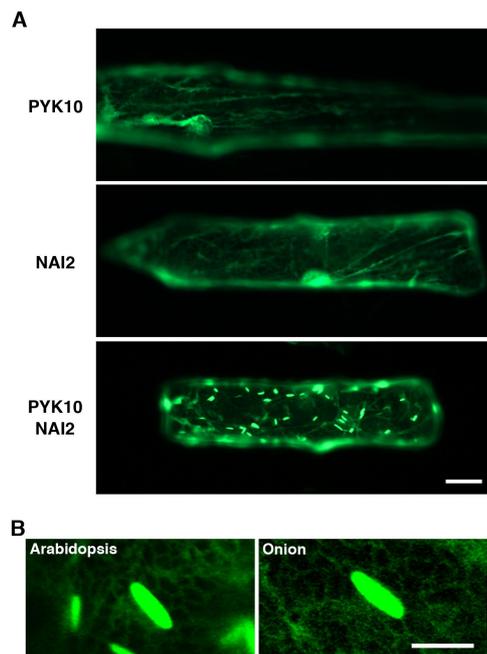


図 1. PYK10 と NAI2 の共発現による ER ボディの形成。

(A) PYK10 (上段)、NAI2 (中段)、PYK10 と NAI2 の両方(下段)を小胞体マーカー、GFP-HDEL と共にタマネギ表皮細胞に導入した。スケールバーは 50 μm 。(B) シロイヌナズナの内在性の ER ボディ(左)とタマネギに作らせた ER ボディ(右)の拡大写真。スケールバーは 10 μm 。

PYK10のみを発現させた場合はER ボディが形成されないのに対し,NAI2 と PYK10 を共発現させた場合はタマネギ表皮細胞に ER ボディが形成されることを見いだした(図1)。これらのことから ER ボディの形成には NAI2 と PYK10 が必要かつ十分であることが示された。この結果より,NAI2 と PYK10 が複合体を形成し ER ボディを形成している可能性が考えられた。そこで,NAI2 と PYK10 を共発現しているタバコ培養細胞の抽出液を用い免疫沈降により NAI2 と PYK10 の結合を調べた。その結果,NAI2 と PYK10 は複合体を形成していることが明らかとなった。小胞体でアグリゲートを形成するプロテアーゼ(SH-EP)や貯蔵タンパク質(12S グロブリン)と NAI2 を過剰発現し,ER ボディ形成能を調べた。その結果,これらのタンパク質は NAI2 と共発現させても ER ボディを形成しないことがわかった。

(2) ER ボディ消失に関わる因子の単離

ER ボディ消失に関わる菌の因子を調べるためフザリウム病菌 *Fusarium oxysporum* の抽出液をシロイヌナズナに処理し,ER ボディを観察した。その結果 ER ボディを消失させるフザリウム病菌の因子は 10kDa 以下の熱に強い分子であることがわかった。このことから,熱に強い低分子化合物である T2-toxin などの毒素が関与する可能性が考えられた。

(3) ER ボディ形成不全変異体の病虫害抵抗性の解析

ER ボディを形成しない *nai1* 変異体や ER ボディの グルコシダーゼを欠損している *pyk10 bglu21* 二重変異体を用い,ER ボディの欠損が病虫害の抵抗性にどのように関わ

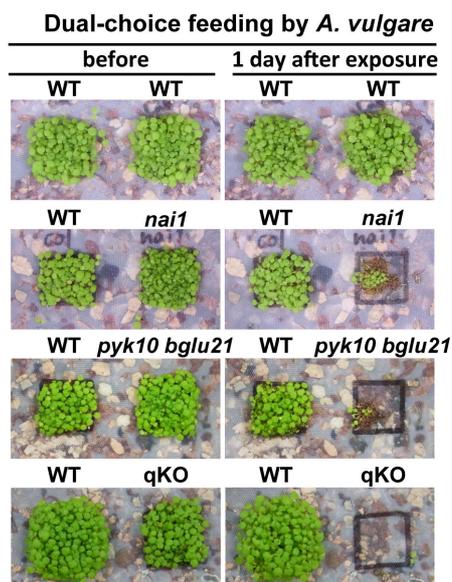


図2. ER ボディはダンゴムシの食害防御に働く。野生株と変異体の実生を用い食害の二択実験を行った。変異体は ER ボディを形成しない *nai1*, ER ボディの グルコシダーゼを欠損した *pyk10 bglu21*, グルコシノレートを作らない *qKO* を用いた。実験前(左)と実験後(右)の写真を示す。

るかを調べた。子葉は地面に近いところに位置するため,地を這う虫が良いと考え,ダンゴムシ(*Armadillidium vulgare*)を用い食害実験を行った(図2)。ダンゴムシは腐食食性でありシロイヌナズナの実生をほとんど食さない。ところが *nai1* 変異体や *pyk10 bglu21* 二重変異体はダンゴムシの食害を受けることが明らかとなり,ER ボディは食害防御に働くことが示された。アブラナ科の植物にはグルコシノレートと呼ばれる含硫配糖体が存在し,これらは生体防御に効くことが知られている。そこでグルコシノレートを合成できない *myb28 myb29 cyp79b2 cyp79b3* 四重変異体 (*qKO*) を食害実験に供したところ,*qKO* 変異体はダンゴムシの食害を受けることが明らかとなり,グルコシノレートが実生の食害防御に働くことが示された。また,実生を用いたメタボローム解析より *pyk10 bglu21* 二重変異体ではグルコシノレートの分解が野生株より低いことがわかった。これらのことから ER ボディの グルコシダーゼがグルコシノレートを基質とする酵素,すなわちミロシナーゼであり,グルコシノレートをを用いた生体防御に働くこと示唆された。

(4) ER ボディをもたない植物への ER ボディ関連遺伝子の導入による影響

タバコ培養細胞(BY-2)に PYK10 と緑色蛍光タンパク質(GFP)の融合タンパク質, PYK10-GFP や NAI2 を導入した。PYK10-GFPのみを発現させたタバコ培養細胞は ER ボディを形成せず, PYK10-GFP は小胞体と液胞に蓄積した。NAI2 と PYK10-GFP の両方を発現させたタバコ培養細胞では,ER ボディが形成され, PYK10-GFP は ER ボディのみに蓄積した。これらのことから,ER ボディが形成されない場合には PYK10 は液胞に漏れることが示された。青色蛍光をもつ糖化合物,スコポリンは グルコシダーゼにより脱糖されてスコポレチンに変換する。タバコ培養細胞にスコポレチンを与えたところ,これらの物質はスコポリンとして液胞に蓄積した。そこで, PYK10-GFP を発現させたタバコ培養細胞にスコポレチンを与えたところ,液胞にはスコポリンとともにスコポレチンも蓄積し,液胞に漏れ出した PYK10-GFP によりスコポリンが脱糖されていることがわかった。NAI2 と PYK10-GFP を発現させ,ER ボディを形成しているタバコ培養細胞では,液胞に蓄積しているスコポリンは脱糖されなかった。これらのことから,ER ボディが形成されない場合には, PYK10 が液胞へ漏れ出ることにより糖化合物の蓄積と代謝に異常が起きることが示唆された。

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9件)

K. Oikawa, S. Matsunaga, S. Mano, M.

Kondo, K. Yamada, M. Hayashi, T. Kagawa, A. Kadota, W. Sakamoto, S. Higashi, M. Watanabe, T. Mitsui, A. Shigemasa, T. Iino, Y. Hosokawa and M. Nishimura
Physical interaction between peroxisomes and chloroplasts elucidated by in situ laser analysis.
Nat. Plant (2015) 1(4): 15035.
DOI: 10.1038/nplants.2015.35 (査読有)
S. Goto-Yamada, S. Mano, K. Yamada, K. Oikawa, Y. Hosokawa, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura
Dynamics of the light-dependent transition of plant peroxisomes.
Plant Cell Physiol. (2015) 56(7): 1264-1271.
DOI: 10.1093/pcp/pcv081 (査読有)
N. Hatsugai, K. Yamada, S. Goto-Yamada, I. Hara-Nishimura
Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death.
Front. Plant Sci. (2015) 6: 234.
DOI: 10.3389/fpls.2015.00234 (査読有)
R. T. Nakano, K. Yamada, P. Bednarek, M. Nishimura, I. Hara-Nishimura
ER bodies in plants of the Brassicales order: Biogenesis and association with innate immunity.
Front. Plant Sci. (2014) 5: 73.
DOI: 10.3389/fpls.2014.00073 (査読有)
M. Shibata, K. Oikawa, K. Yoshimoto, S. Goto-Yamada, S. Mano, K. Yamada, M. Kondo, M. Hayashi, W. Sakamoto, Y. Ohsumi, M. Nishimura
Plant autophagy is responsible for peroxisomal transition and plays an important role in the maintenance of peroxisomal quality.
Autophagy (2014) 10(5): 936-937.
DOI: 10.4161/auto.28529 (査読無)
S. Cui, S. Mano, K. Yamada, M. Hayashi, M. Nishimura
Novel proteins interacting with peroxisomal protein receptor PEX7 in *Arabidopsis thaliana*.
Plant Signal. Behav. (2013) 10(8): e26829.
DOI: 10.4161/psb.26829 (査読有)
M. Shibata, K. Oikawa, K. Yoshimoto, M. Kondo, S. Mano, K. Yamada, M. Hayashi, W. Sakamoto, Y. Ohsumi, M. Nishimura
Highly oxidized peroxisomes are selectively degraded via autophagy in *Arabidopsis thaliana*.
Plant Cell (2013) 25(12): 4967-4983.
DOI: 10.1105/tpc.113.116947 (査読有)
S. Cui, Y. Fukao, S. Mano, K. Yamada, M. Hayashi, M. Nishimura
Proteomic analysis reveals that the Rab GTPase RabE1c is involved in the degradation of the peroxisomal protein

receptor PEX7 (Peroxin 7).
J. Biol. Chem. (2013) 288(8): 6014-6023.
DOI: 10.1074/jbc.M112.438143 (査読有)
K. Yamada, A. J. Nagano, M. Nishina, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura
Identification of two novel endoplasmic reticulum body-specific integral membrane proteins.
Plant Physiol. (2013) 161(1): 108-120.
DOI: 10.1104/pp.112.207654 (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

K. Yamada

Mechanism of ER body formation and function in *Arabidopsis thaliana*.
The 5th NIBB-MPIZ-TLL Joint Symposium, November 24-26, 2014, Cologne (Germany)

山田健志

シロイヌナズナの ER ボディの形成と機能について

第3回植物エンドメンブレンミーティング, 2014年9月29-30日, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)

山田健志, 永野惇, 西村いくこ, 西村幹夫

ER ボディの膜特異的に局在するMEBタンパク質の解析

第55回日本植物生理学会年会, 2014年3月18-20日, 富山大学(富山県・富山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 健志 (YAMADA, KENJI)
京都大学・理学研究科・研究員
研究者番号: 00360339

(2) 研究分担者

該当せず

(3) 連携研究者

西村 幹夫 (NISHIMURA, MIKIO)
基礎生物学研究所・
高次細胞機構研究部門・教授
研究者番号: 80093061

西村 いくこ (NISHIMURA, IKUKO)
京都大学・理学研究科・教授
研究者番号: 00241232