

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840101

研究課題名(和文) オーキシン排出トランスポーターPINの偏在化制御機構解明へ向けた多角的アプローチ

研究課題名(英文) Multiple approach on Study on the mechanism of polar localization of auxin efflux carrier PIN protein

研究代表者

榎本 悟史 (NARAMOTO, SATOSHI)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：30612022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物細胞の極性形成機構を明らかにするために、細胞において偏在化するPINタンパク質の細胞膜における局在様式を解析した。その結果、PINタンパク質は細胞膜上でドット状のクラスター構造を作るとともに、その構造は移動・拡散しない安定な構造であることが明らかになった。さらにはその構造は細胞壁および分子機能未知タンパク質MAB4により形成されることを明らかにした。また、PINの局在制御機構の更なる理解にむけ、葉脈パターンが異常になるvan変異体の解析を行った結果、PINの極性局在には生体膜の脂質成分の適切な合成が必須であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism of cell polarity establishment in plants, I analyzed the detailed distribution of PIN proteins at plasma membranes (PM)s. I identified that PIN proteins formed dot-like clusters at PMs and they are stable cellular compartments that do not diffuse across PMs. I also identified that PIN clusters are established or maintained by the cell wall components as well as the unknown function protein MAB4. Furthermore, I analyzed the van2, van5 and van6 mutants that are defective in vein development, related to polar auxin transport. Based on whole genome sequence analysis, I identified several candidates of responsible genes for van2, van5 and van6 mutants. Within them, I identified that responsible gene of van5 mutants is involved in sterol biosynthesis, which further confirms that appropriate lipid compositions of membranes are critical to establish cell polarity.

研究分野：生物学

キーワード：オーキシン 細胞極性 小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

オーキシンの極性輸送は植物個体の発生・形態形成において重要な役割を果たすことが知られている。オーキシンの極性輸送はオーキシン排出担体 PIN の細胞における偏在化(極性局在)により制御されていることがこれまでに明らかにされている。これまでに植物細胞における PIN の極性局在において小胞輸送が重要な役割を果たすことが知られており、PIN の局在化における研究は小胞輸送に注目したものが中心であった。一方で、私は最近、Kleine-vehn らとの共同研究により、小胞輸送に加え、細胞膜上での PIN の拡散性(側方拡散)制御が PIN の偏在化において、重要な役割を果たすことを数理モデルにより明らかにした。さらには、私は PIN2 が細胞膜上で多量体様のドット構造(以下、PIN2)クラスターを形成することを見出した。

2. 研究の目的

本研究は、植物個体の形態形成の基盤となる、植物細胞の極性形成機構を明らかにすることを目的としている。特に、細胞膜における PIN クラスター形成と PIN タンパク質の拡散性を制御する機構の関連に注目した解析を行う。さらには、PIN の局在化機構の理解を促進すべく、新規の極性制御因子の単離・同定を行う。

3. 研究の方法

(1) PIN が形成する細胞膜ドメインの挙動と形成機構の解析

PIN2-GFP 発現体の根の表皮細胞・および根冠の細胞を顕微鏡を用いて詳細に観察する。なお、この際には、タイムラプス観察および、細胞骨格等の阻害剤処理を行う。また免疫沈降法を用いて、PIN2 クラスターを構成するタンパク質複合体の単離を行う。

(2) 細胞壁関連タンパク質による PIN の極性局在制御機構の解析

細胞壁修飾酵素 PME1 発現体や細胞壁の阻害剤処理を行い、PIN2-GFP の細胞膜における局在様式・挙動を詳細に観察する。

(3) PIN と類似した局在パターンを示す MAB4 と PIN の分子的关系性の解析

PIN と MAB4 の共局在解析や、mab4 変異体における PIN の局在様式を細胞生物学的に解析する。

(4) 葉脈パターンが異常になる van 変異体を用いた新規極性制御因子の単離と機能解析

葉脈パターンはオーキシン極性輸送により制御されることが知られている。これまでに私が有する葉脈パターンが異常になる van 変異体の原因遺伝子の同定・機能解析を行うことで、新規の PIN の偏在化制御機構の理解をすすめる。

4. 研究成果

(1) PIN が形成する細胞膜ドメインの挙動と形成機構の解析

PIN2 クラスターは細胞膜上で 4 時間にわたって、拡散移動せず、静的な構造体であることが明らかになった。またアクチン、微小管の細胞骨格阻害剤添加下では、PIN2 クラスターの配向は影響を受けないことが明らかになった。さらには、PIN2-GFP の免疫沈降を行う系を確立した。現在、PIN クラスター構成複合タンパク質の同定に向けた解析を行っており、予備実験ながら複数の候補タンパク質を得ることに成功した。

(2) 細胞壁関連タンパク質による PIN の極性局在制御機構の解析

PME1 過剰発現体では PIN2 の発現量が低下し、PIN2 クラスターが減少することが明らかになった。また様々な細胞壁合成阻害剤を添加し、細胞壁成分のペクチンが PIN の局在化に重要な役割を果たすことが示唆された。

(3) PIN と類似した局在パターンを示す MAB4 と PIN の分子的关系性の解析

mab4 変異体では PIN2 クラスターが消失することが明らかになるとともに、PIN2 と MAB4 は共局在することが明らかになった。現在、相互作用の有無を検証すべく、実験条件の検討を行っている。

(4) 葉脈パターンが異常になる van 変異体を用いた新規極性制御因子の単離と機能解析

van2, van5, van6 変異体の原因遺伝子同定にむけ、次世代シーケンス解析により、候補突然変異を複数見出した。それらの突然変異体の T-DNA 挿入変異体の原因遺伝子の表現型解析を行い、van2, 5, 6 との類似性を比較した結果、van5 はステロール合成遺伝子に変異が生じていることが確認でき、実際に相補性試験にも成功した。一方、他変異体においては、類似の表現型を示す変異は同定できなかった。現在、van2, van6 変異体の原因遺伝子同定にむけ、本解析を継続中である。

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 6件)

① Satoshi Naramoto, Tomoko Dainobu, Hiroki Tokunaga, Junko Kozuka and Hiroo Fukuda.

Cellular and Developmental function of ACAP type ARF-GAP proteins are diverged in plant cells.

Plant Biotechnol. 査読有り in press
10.5511/plantbiotechnology.16.0309a

② Satoshi Naramoto, Tomoko Dainobu and Marisa Otegui.

A bioimaging pipeline to show membrane trafficking regulators localized to Golgi apparatus and other organelles.

Bioprotocol 査読有り 5巻 2015年 e1583

③ Satoshi Naramoto, Marisa Otegui, Natsumaro Kutsuna, Riet de Rycke, Tomoko Dainobu, Michael Karampelias, Masaru Fujimoto, Elena Feraru, Daisuke Miki, Hiroo Fukuda, Akihiko Nakano and Jiri Friml.

Insights into the localization and function of the membrane trafficking regulator GNOM ARF-GEF at the Golgi apparatus in Arabidopsis.

The Plant Cell 査読有り 26巻 2014年 3062-3076

doi: 10.1105/tpc.114.125880.

④ Satoshi Naramoto, Tomasz Nodzynski, Tomoko Dainobu, Hiroto Takatsuka, Teruyo Okada, Jiri Friml, Hiroo Fukuda.

VAN4 encodes a putative TRS120 that is required for normal cell growth and vein development in Arabidopsis.

Plant and Cell Physiol. 査読有り 55巻 2014年 750-763

doi: 10.1093/pcp/pcu012.

⑤ Aihara Kohei, Satoshi Naramoto, Hara Miyuki, Mizoguchi Tsuyoshi.

Increase in vascular pattern complexity caused by mutations in LHY and CCA1 in Arabidopsis thaliana under continuous light.

Plant Biotechnol. 査読有り 31巻 2014年 43-47

<http://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.13.1015a>

⑥ Takeshi Inoue, Yuki Kondo, Satoshi Naramoto, Akihiko Nakano, Takashi Ueda.

RAB5 activation is required for multiple steps in Arabidopsis thaliana root

development.

Plant and Cell Physiol. 査読有り 54巻 2013年 1648-1659

doi: 10.1093/pcp/pct109.

[学会発表] (計 5件)

① 榎本悟史, 小胞輸送制御因子とオーキシン排出担体 PIN による植物細胞の極性形成機構
東北植物学会 2015年12月19日 福島大学 (福島県・福島市)

② 榎本悟史, 小胞輸送制御因子とオーキシン排出担体 PIN による植物細胞の極性形成機構
東北育種研究会 2015年11月14日 東北大学 (宮城県・仙台市)

③ Satoshi Naramoto, Insights into the localization and function of GNOM ARF-GEF at the Golgi apparatus in Arabidopsis, 日本植物生理学会 2015年3月9日 東京農業大学 (東京都世田谷区)

④ Satoshi Naramoto, Insights into the localization and function of GNOM ARF-GEF at the Golgi apparatus in Arabidopsis, 日本植物学会 2014年9月1日 明治大学 (神奈川県・川崎市)

⑤ 榎本悟史, 細胞膜タンパク質の極性局在様式と祖メイン構造 日本植物学会 2013年8月20日 北海道大学 (北海道・札幌市)

[図書] (計 0件)

[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:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/a_naramoto/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 悟史 (NARAMOTO SATOSHI)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：30612022

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：