

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292194

研究課題名(和文)植物バイオマス生産制御の基盤となる植物小胞輸送系の解析と機能増強

研究課題名(英文) Analysis and function enhancement of plant vesicle transport system as the basis of plant biomass production control

研究代表者

松岡 健 (Matsuoka, Ken)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40222294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：主要な植物バイオマスとして、ペクチン等の細胞壁多糖が知られる。これらは、細胞内においてゴルジ装置で合成され、トランスゴルジネットワーク(TGN)等の小胞輸送系構造体を経て細胞外に輸送されるが、その詳細とそれらの機能が栄養により制御されるかは明らかでなかった。

そこでゴルジ装置の機能解析を、糖蛋白質の修飾を中心に検討すると共に、TGNの糖欠乏による構造変換機構の解析を進めた。また、TGN以降の小胞輸送系の一つである分泌小胞塊に存在すると推定された蛋白質の局在と膜配向性の解析を進めた。これらの解析により、植物のゴルジ装置の機能とその制御に関する知見の集積を深化させた。

研究成果の概要(英文)： Cell wall polysaccharides such as pectin are known as major plant biomass. These are synthesized at the Golgi apparatus in the cell and are transported outside the cell via a vesicular transport system structure such as trans Golgi network (TGN). However the functional details and whether their function is controlled by nutrition had not been clarified.

Therefore, functional analysis of the Golgi apparatus was conducted mainly about the modification of glycoprotein. Analysis of structural transformation mechanism by TGN under sugar deficiency was also promoted. We also analyzed the localization and membrane orientation of proteins found in isolated fraction enriched with secretory vesicle cluster, which is one of the vesicular transport systems after TGN. These analyzes have deepened the accumulation of knowledge concerning the functions and control of the Golgi apparatus in plant cells.

研究分野：分子細胞生物学、応用植物生化学

キーワード：ゴルジ装置 高等植物 小胞輸送 機能変換 形質転換植物 栄養欠乏

1. 研究開始当初の背景

非食糧系の主要植物バイオマスとして、ヘミセルロース、ペクチン、セルロース等の細胞壁多糖が知られる。これらバイオマス多糖の合成は、植物細胞の生長分化に密接に関わっている。機能分化した細胞の形は細胞壁により規定され、細胞壁形成には小胞輸送系細胞内小器官の一つであるゴルジ装置におけるヘミセルロースやペクチンの合成(図1)と、細胞膜上でのセルロースの合成が必須である。

従って、細胞の増殖や分化の過程において、ゴルジ装置及びそれ以降の小胞輸送系構造体の質が変化すると共に量・数も細胞増殖に呼応して増減すると考えられるが、それらの機構に関しては、我々のゴルジ装置の増殖に関する報告など、限られた報告があるに過ぎない。また、これらの小胞輸送系が細胞外環境や栄養条件の変化にどのように呼応して制御されているかを始めとして、植物の後期分泌系に関しては未解明の点が多い(図1)。更に、栄養制限による植物の生長抑制は良く知られる現象ではあるが、その過程での細胞壁合成系制御については解析されていない。またゴルジ装置からの細胞壁への小胞による輸送に関しては、ペクチンの輸送装置として代表者が報告した分泌小胞塊(SVC)及びセルロース合成酵素を輸送する構造であるMASC以外には同定されておらず、その全体像の理解は未だ程遠い状況にあった。

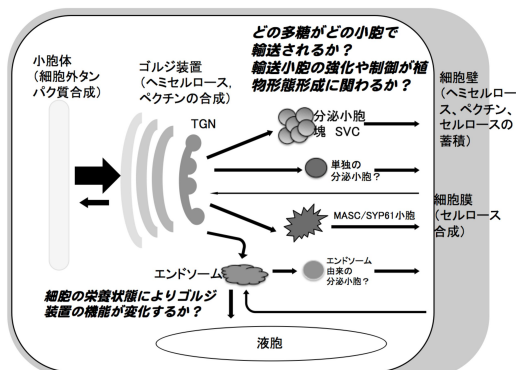


図1 植物細胞における小胞輸送系の概念図と未解決問題

2. 研究の目的

植物の後期小胞輸送系のうち、我々が2009年に同定した分泌小胞塊(SVC)の機能解析、ゴルジ装置の栄養状態に応じた機能変換を始めとした植物ゴルジ装置に関する研究を進めることで、植物の小胞輸送系の理解を深める。また、SVC関与の小胞輸送系を増強することで、植物バイオマス増大が認められるかについて検討を進める。具体的には、次の4項目についてそれぞれ表記の目標を定めて研究を遂行することで、植物の小胞輸送系の理解の深化と機能増強による影響の理解を深めることを目的とした。

(1) 細胞栄養環境によるゴルジ装置及びポストゴルジ系の構造機能変換

タバコ培養細胞を栄養欠乏に曝した際のゴルジ装置の機能について、多糖の合成・分泌、液胞への蛋白質仕分け等を指標に解析すると共に、その際のゴルジ装置・TGN及びSVCの細胞内存在量や、微細構造を解析し、植物細胞における後期小胞輸送系機能の栄養による変換機構の理解を深める。併せて、ゴルジ装置における植物特異的な糖蛋白質の糖鎖修飾の機能と、その栄養制御についても解析を進めることで、植物ゴルジ装置の機能の理解を深める。

(2) SCAMP2の植物形態形成に果たす役割の解析

シロイヌナズナのNtSCAMP2オルソログとYFPの融合体を発現している植物における植物体増大に関する解析を、形態学的及び生化学的に進める。またこの遺伝子の破壊株等の表現型の解析を進めることで、SCAMP2/SVC系の植物生長に果たす役割の理解を深める。

(3) タバコSCAMP1関連輸送小胞の同定

タバコのSCAMP1と蛍光蛋白質の融合体が局在する細胞内構造体について、超解像蛍光顕微鏡を用いて可視化を図ると共に、細胞分画により単離することで、SVCと異なる輸送小胞を同定し、植物の後期小胞輸送系において存在が想定される複数の輸送系路の解明を進める。

(4) SVC含有蛋白質の解析を通じたSVC機能の理解

既に細胞分画法によりSVCに富む画分を調製し、その画分に含まれる、ヘミセルロース合成に関与する等の機能の推定が為されている複数の蛋白質を見出している。そこでそれらがSVCに存在するかについての解析を進めることで、SVCの機能の理解を深める。

3. 研究の方法

(1) 細胞栄養環境によるゴルジ装置及びポストゴルジ系の構造機能変換

タバコ細胞において、ショ糖欠乏条件において見出しているNtSUT2-GFPの減少と同様な減少が、他のTGN局在蛋白質にも認められるかを検討するため、既にTGNとSVCに局在することを見出しているSYP41-YFPについてNtSUT2-GFPと同様の検討を行う。減少が認められた場合には、それが分解の促進によるものかを、蛍光変換蛋白質を用いて解析する。併せて、内在性のNtSUT2、SYP41もこの欠乏状態において減少するかを確認するために、これらに対しての特異抗体を作製し、ショ糖欠乏条件下での存在量の変化についての解析を進める。

ゴルジ装置で合成され、細胞壁に蓄積する多糖であるペクチン及びヘミセルロースは、細胞の懸濁培養細胞系においては培地中に分泌される。そこでタバコ培養細胞を、シヨ糖欠乏等の条件に曝し、培地中に分泌される多糖量について解析する。

ゴルジ装置における植物特異的な糖鎖修飾機能については、プロリン水酸化酵素の解析をシロイヌナズナ等で進めると共に、アラビノガラクトタン蛋白質 (AGP) を材料とし、またコントロールとして AGP と同様に GPI-アンカーが付加される Cobra 蛋白質も用いながら、タバコ培養細胞とミヤコグサを用いて解析を進め、その経路がほぼ明らかとなった後に、飢餓による影響の解析を行う。

(2) SCAMP2 の植物形態形成に果たす役割の解析

シロイヌナズナの NtSCAMP2 オルソログである At1g32050 と YFP の融合体を発現させたシロイヌナズナ植物のうち解析を行った 1 系統について、茎の太さや重量等の解析から、植物個体が大きくなるという結果を得ている。また、この系統と共に獲得した複数の形質転換体においても、ロゼットの大きさが非形質転換体比べて大きいという結果を得ている。そこでこれらにおいても、茎の太さや植物体の重量等の複数のパラメータの検討を進めると、この解析のためのコントロール植物である YFP の単独発現系統を作成し解析することで、At1g32050-YFP の過剰発現が植物の増大を引き起こすかについて解析を行う。

この植物体の増大が、At1g32050 の発現増大に依存していることを確認するため、この蛋白質を単独で構成的なプロモーター下に発現させた形質転換植物体を作成する。また、At1g32050 の遺伝子破壊株の形質についても検討するため、その破壊株の種子を公共種子バンクから入手し、その植物についても、表現型の解析を進める。

(3) タバコ SCAMP 1 関連輸送小胞の同定

既に、NtSCAMP2 とは構造が異なるタバコの SCAMP として、NtSCAMP1 と NtSCAMP3 と名付けた 2 種の蛋白質に対する cDNA を単離している。また、タバコ細胞中で、このうち NtSCAMP1 と赤色蛍光蛋白質 (RFP) との融合体 (NtSCAMP1-RFP) を発現させた場合の蛍光は NtSCAMP2 のものと異なり、共焦点顕微鏡による観察において、細胞膜と細胞質中に不明瞭なシグナルとして検出される。

NtSCAMP1 は膜貫通蛋白質であることから、この細胞質中の不明瞭なシグナルは、NtSCAMP1-RFP が通常の蛍光顕微鏡の分解能である 200-300 nm より小さい細胞内構造に存在していることを示唆している。そこで分

解能が一般的な輸送小胞の大きさより小さい 50 nm であり、ライブイメージングが可能な超解像蛍光顕微鏡 (Leica TCS-SP8 STED) を用い、この構造体の可視化を図る。

(4) SVC 含有蛋白質の解析を通じた SVC 機能の理解

タバコ培養細胞から、SCV に富む画分を調製することで SVC 存在蛋白質の候補を複数同定している。そのうち UDP-アラビノース合成酵素であり、ヘミセルロース合成に関与する可能性が考えられる、UP-グルクロン酸デカルボキシラーゼ 3 (UDP-GD3) について現在解析を進めており、この蛋白質と RFP の融合体をタバコ細胞で発現させると蛍光が細胞内で点状の分布を示すことを見出している。そこでゴルジ装置の異なる領域に分布する蛍光蛋白質融合体や SVC 以外の小胞輸送系構造体に分布する蛍光蛋白質融合体、及び特異抗体を用いた局在の解析により、UDP-GD3 が SVC に存在するかを解析する。同時に、この蛋白質以外の SVC 画分に見出された蛋白質についても同様の解析を行う。

4. 研究成果

(1) 細胞栄養環境によるゴルジ装置及びポストゴルジ系の構造機能変換

SYP41-YFP についても、NtSUT2-GFP と同様にシヨ糖飢餓の際に減少することを見いだした。次いで蛍光変換蛋白質 mKikGR と SYP41 との融合体 SYP41-mKikGR を用い、蛍光変換後シヨ糖飢餓に曝すことでこの減少が分解の促進によるものかを解析した。その結果、シヨ糖飢餓条件で分解が促進されることを見いだした。

また、ペクチンの簡易定量系を確立し、それを用いて飢餓状態でのペクチンの分泌について解析した。その結果、シヨ糖飢餓によりペクチンの分泌が抑えられることを見いだした。一方、分泌性蛋白質の分泌は、シヨ糖飢餓条件でも抑えられないことを見いだした。

糖鎖付加関連の解析においては、シロイヌナズナのプロリン水酸化酵素の役割とイソフォーム間の関係について論文発表をおこなった。また、GPI-アンカーの付加が効率的な糖鎖付加に必要であると考えられる結果を得た。

(2) SCAMP2 の植物形態形成に果たす役割の解析

複数の At1g32050-YFP 発現系統が、野生型に比べて大きくなることを確認した。一方、コントロールとして作成した、YFP 単独発現系統も野生型より大きくなったが、At1g32050 単独の発現系統では増大は認められず、At1g32050 遺伝子破壊株でも大きさに変化は認められなかった。従って、YFP の発現が何らかの理由でシロイヌナズナの増大

を引き起こしたと考えられた。

(3) タバコSCAMP1 関連輸送小胞の同定

超解像顕微鏡を用いて NtSCAMP1 の存在する小胞の同定を試みたが、蛍光が微弱過ぎて、小胞を観察することが出来なかった。そこで、緑色蛍光を発する低分子膜プローブを細胞に取り込ませて輸送小胞の同定を試みた。その結果、ノイズの倍程度のシグナルが膜プローブを取り込ませた細胞において観察されたが、ノイズとシグナルを明確に区別する条件を見いだす迄には至らなかった。

(4) SVC 含有蛋白質の解析を通じた SVC 機能の理解

UDP-GD3 と、SVC 画分に検出されたメチル化酵素の 1 種 (GLMT1 と命名) の局在解析を進めた。蛍光蛋白質融合体は共にゴルジ装置に蛍光が見いだされた。次いで内在性のこれら蛋白質を検出する目的で、特異抗体の調製を進めた。抗体が順調に作成された GLMT1 について、局在や膜配向性を検討した結果、内在性蛋白質もゴルジ装置に局在すること、またメチル化転移酵素ドメインが細胞質側に向いている、これ迄知られたメチル転移酵素と異なる配向性の蛋白質であることをみだし、これらをまとめて論文として発表した。

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)

- Abiodun MO & Matsuoka, K., (2017) Using photoconvertible and extractable fluorescent proteins to study autophagy in plants. *Meth. Enzymol.* 588: 515-526. (査読有)
- Toyooka K, Sato M, Wakazaki M, Matsuoka, K., (2016) Morphological and quantitative changes in mitochondria, plastids, and peroxisomes during the log-to-stationary transition of the growth phase in cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Signaling & Behavior* 11: relocation ID: e1149669, DOI: 10.1080/15592324.2016.1149669. (査読有)
- Liu J, Hayashi K, Matsuoka K., (2015) Membrane topology of Golgi-localized probable S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 79:2007-2013. (査読有)
- Velasquez SM, Ricardi MM, Poulsen CP, Oikawa A, Dilokpimoladil A, Halim A, Mangano S, Silvina Juarez PD, Marzol E, Salter JDS, Dorosz JG, Borassi C,

Moller SR, Buono R, Ohsawa Y, Matsuoka K., Otegui MS, Scheller HV, Geshi N, Petersen BL, Iusem ND, *Estevez JM. (2015) Complex Regulation of Prolyl-4-Hydroxylases Impacts Root Hair Expansion. *Mol. Plant* 8: 734-746. doi: 10.1016/j.molp.2014.11.017 (査読有)

[学会発表](計 19 件)

- 杉田 優斗, 津野 雄平, 松岡 健, アラビノガラクタンタンパク質前駆体の輸送と成熟に果たす GPI- アンカー付加の役割, 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017.03.18. 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県・鹿児島市)
- 小田 大和人, 浅妻 悟, 仲宗根 弘晃, Moses O. Abiodun, 豊岡 公德, 松岡 健, タバコ細胞におけるショ糖飢餓に依存した TGN 局在タンパク質の減少とゴルジ装置の機能変換, 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017.03.16. 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県・鹿児島市)
- 松岡 健, 蛍光イメージングを用いた植物の小胞輸送系の解析, 第 3 4 7 回 細胞工学研究会講演会, 第 1 0 回 島根大学バイオイメージング研究会講演会, 第 2 2 6 回 遺伝子機能解析部門セミナー, 第 8 回 正立型共焦点レーザー蛍光顕微鏡セミナー, 2017.02.06. 島根大学松江キャンパス (島根県・松江市)
- Yamato Oda, Ken Matsuoka, Overexpression of enhanced yellow fluorescent protein in Arabidopsis thaliana retards development, The 27th International Conference on Arabidopsis Research, 2016.07.02. 慶州市 (大韓民国)
- Ken Matsuoka, Yuto Sugita, Yuhei Tsuno, Role of the glycosyl-phosphatidylinositol-anchoring on the glycosylation and transport of arabinogalactan protein precursor, XIV Cell Wall Meeting, 2016.06.13. Chania (Greece)
- 菅沼 智淑, 鳥井 健次, 川口 正代司, 松岡 健, マメ科モデル植物であるミヤコグサを用いた根粒菌との共生の初期過程の解析, 日本農芸化学会 2 0 1 6 年度大会, 2016.03.30. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- 小田 大和人, 浅妻 悟, 仲宗根 弘晃, 豊岡 公德, 松岡 健, タバコ細胞におけるショ糖飢餓に依存した TGN 局在タンパク質の減少とゴルジ装置の機能変換, 日本農芸化学会 2 0 1 6 年度大会, 2016.03.29. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- 杉田 雄斗, 津野 雄平, 松岡 健, アラビノガラクタンタンパク質前駆体に存

在する GPI アンカー付加シグナルの意義, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016.03.29. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

Moses O. Abiodun, 松岡 健, Dynamics of Golgi Apparatus under Sucrose Starvation, 第 57 回日本植物生理学会年会, 2016.03.20. 岩手大学 上田キャンパス (岩手県・盛岡市)

Ken Matsuoka, Yamato Oda, Hiroaki Nakasone, Moses O. Abiodun, Kiminori Toyooka, Satoru Asatsuma, Proliferation and starvation-induced degradation of Golgi apparatus and TGN in tobacco BY-2 cells, Progress 100: Second International Symposium "Protein Trafficking and Intracellular Signaling of Plant and Fungal Cells", 2016.02.08.九州大学コラボステーション | 視聴覚ホール (福岡県・福岡市)

浅妻悟, Moses O. Abiodun, 仲宗根弘晃, 豊岡公德, 松岡健, タバコ細胞中に存在が示唆された TGN-phagy, 第 67 回日本細胞生物学会大会, 2015.07.02. タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)

松岡 健 植物ゴルジ装置の構造・機能とその変換: 多糖・糖タンパク質の生合成・修飾系とそれらの制御を中心に, 日本農芸化学会 中部支部 第 173 回例会シンポジウム「小胞輸送研究: 分子機構から高次機能・応用への展開」, 2015.6.20 名古屋大学農学部 (愛知県・名古屋市)

小田大和人, 豊岡公德, 松岡 健, Analysis of the Arabidopsis Ortholog of Tobacco Secretory Carrier Membrane Protein 2, 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015.03.16. 東京農業大学世田谷キャンパス (東京都・世田谷区)

豊岡公德, 佐藤繭子, 若崎真由美, 朽名夏磨, 永田典子, 松岡健, 対数増殖期および定常状態期におけるタバコ培養細胞内オルガネラの超微形態変化, 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015.03.16. 東京農業大学世田谷キャンパス (東京都・世田谷区)

才所遼平, 陶山 明子, 松岡 健, Localization and structure of peptidyl serine O-galactosyltransferase in tobacco BY-2 cell, 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015.03.16. 東京農業大学世田谷キャンパス (東京都・世田谷区)

田崎麻衣子, Moses O. Abiodun, 浅妻悟, 松岡健, 蛍光変換蛋白質のバルク蛍光変換法を用いた細胞内構造体の合成と分解機構の解析, 第 32 回日本植物細胞分子生物学会大会, 2014.08.22. アイナ (岩手県・盛岡市)

Ken Matsuoka, Monitoring mechanisms of Golgi proliferation in plant cells using photoconvertible fluorescence markers and a bulk conversion system, Schekman Symposium -38 years of SECs-, 2014.08.01. Berkeley (USA)

Ken Matsuoka, Monitoring turnover of intracellular structures using photo-convertible fluorescent protein markers and a bulk photo-conversion protocol, Pre-symposium of the Annual meeting of Japan Society of Cell Biology, 2014.06.10. 東大寺総合文化センタ (奈良県・奈良市)

Ken Matsuoka, Monitoring Golgi biogenesis and phosphate limitation-dependent autophagic degradation using photo-convertible fluorescent fusion proteins and a bulk fluorescence-conversion apparatus, 2014 East Asia Cell Biology Conference, 2014.04.04. 浦項市 (大韓民国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 健 (MATSUOKA, Ken)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号: 40222294

(4) 研究協力者

豊岡 公德 (TOYOOKA, Kiminori)