

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440157

研究課題名(和文)ペルオキシソームタンパク質輸送における分子ネットワークの解明

研究課題名(英文)Analysis on molecular mechanism of protein transport to peroxisomes

研究代表者

真野 昌二 (Mano, Shoji)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・准教授

研究者番号：20321606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： イメージング解析および免疫電子顕微鏡法によって、ゼニゴケにおけるPTS1 (Peroxisome targeting signal 1) およびPTS2輸送の存在を明らかにした。インフォマティクス解析により、ゼニゴケペルオキシソーム因子を同定し、シロイヌナズナではファミリーを形成している遺伝子群がゼニゴケでは少ないことが明らかとなった。

シロイヌナズナのapem (aberrant peroxisome morphology) 変異体の解析から、ペルオキシソームタンパク質輸送にユビキチン系を介したシグナリングが必要であり、この欠損により脂肪酸代謝や光呼吸が異常となることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： From imaging analysis using transgenic *Marchantia polymorpha* expressing PTS1 (Peroxisome targeting signal 1)- or PTS2-Citrine and immunoelectron microscopic analysis revealed the presence of PTS1- and PTS2-dependent protein transport in *M. polymorpha*. Bioinformatics analysis identified the orthologous genes in *M. polymorpha* genome. Using this information, we succeeded in generation of some mutants whose peroxisomal genes were disrupted by the CRISPR/Cas9 method. In addition, we generated the Gateway technology-compatible binary vectors, and these vectors functioned in *M. polymorpha* cells.

From the analysis of one of *Arabidopsis apem* (aberrant peroxisome morphology), the ubiquitin signaling pathway is involved in protein transport to peroxisomes, and that the defective of ubiquitin-dependent protein transport causes normal peroxisome functions, such as lipid metabolism and photorespiration.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ペルオキシソーム シロイヌナズナ apem変異体 タンパク質輸送 Peroxin (PEX) GFP オルガネラ  
ゼニゴケ

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞に存在するペルオキシソームは、脂肪酸代謝や活性酸素除去、光呼吸など様々な機能をもっている。ペルオキシソームは独自のゲノムをもたないため、全てのペルオキシソームタンパク質は核遺伝子にコードされており、それら遺伝子産物のペルオキシソームへの正確な輸送が、様々なペルオキシソーム機能を支えている。しかしながら、そのタンパク質輸送の分子機構は、関与する因子の同定も含め十分には理解されていない状況であった。

申請者は、ペルオキシソームが緑色蛍光タンパク質 (GFP) で可視化された形質転換シロイヌナズナを親株として変異処理を行い、GFP の蛍光を指標にペルオキシソームの形態や大きさ、数、タンパク質輸送に異常を示す *apem* (*aberrant peroxisome morphology*) 変異体や、ペルオキシソームと葉緑体の位置関係が異常となる *peup* (*peroxisome unusual positioning*) 変異体を多数単離して、ペルオキシソーム形成機構の解析を進めていた。

また、シロイヌナズナ以外の植物におけるペルオキシソーム輸送と形成機構の解明を目的として、基部陸上植物のゼニゴケにおけるペルオキシソーム遺伝子の同定と機能解析を開始した。

## 2. 研究の目的

ペルオキシソーム機能の発現は、遺伝子発現やタンパク質輸送、オートファジーによるペルオキシソーム分解など様々な段階で調節されているが、本研究ではタンパク質輸送に焦点を絞って解析を進めた。シロイヌナズナ *apem* 変異体のうち、ペルオキシソームへのタンパク質輸送に異常を示す変異体を材料として、ペルオキシソーム遺伝子産物の機能解析を行う計画をたてた。特に、ペルオキシソーム膜上に存在するタンパク質輸送装置を介した、ペルオキシソーム内部へのタンパク質輸送、輸送後に起こると予想されているペルオキシソームからサイトソルへのレセプターの輸送に、ユビキチンを介したシグナリングが必要であるという予備データを得ているので、その解明を明らかにしたいと考えた。

加えて、新たなモデル植物となりつつあったゼニゴケを用いた解析から、ペルオキシソームタンパク質輸送の分子機構の一般性、あるいは種特異性についての知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 新規ペルオキシソーム変異体の原因遺伝子の同定

未同定の *apem* 変異体および *peup* 変異体の原因遺伝子の同定を試みた。マッピングのためのバッククロスおよび他の *accession* との掛け合わせを行い、ラフマッピングによる座

乗染色体を決定後、次世代シーケンサーを用いて迅速に塩基置換を検出した。

(2) ユビキチン系に依存したタンパク質輸送の解析

これまでの *apem* 変異体の解析から、ユビキチン系において E2 酵素として働く Ubiquitin conjugating enzyme (UBC) 活性をもつタンパク質、および E3 酵素として働く RING finger 部位をもつタンパク質を同定している。酵母と動物細胞では、輸送レセプターである PEX5 が、ペルオキシソームからサイトソルへリサイクルする際に、モノユビキチン化されることが報告されている。植物におけるペルオキシソーム膜上でのユビキチン化の調節機構は明らかにされておらず、ユビキチン化された PEX5 も検出されていない。そこで、ユビキチン再構成系を用いて、ユビキチン化の調節機構の解明を試みた。

また、ユビキチン系に依存したペルオキシソームタンパク質輸送系が、いつ、どこで必要とされるのかも明らかにされていない。ペルオキシソームの機能は、組織や成長段階で異なるため、これらユビキチン関連遺伝子発現パターンの解析を行った。

(3) 植物個体への影響の評価

*apem* 変異体におけるショ糖要求性、光呼吸活性などのペルオキシソーム機能と共に、個体への影響を調べる。また、電子顕微鏡観察により、ペルオキシソームを含む細胞内の構造物の超微細構造の解明を試みた。

(4) ゼニゴケにおけるペルオキシソームタンパク質輸送系の解明

ゼニゴケに PTS1 および PTS2 輸送経路があるのか明らかにするために、PTS1 と PTS2 を融合させた蛍光タンパク質を発現する形質転換ゼニゴケの作製を試みた。

(5) ゼニゴケにおけるペルオキシソーム機能の解析

ゼニゴケのペルオキシソームにどのような機能が存在するか、これまでに報告されている代謝系酵素の検出を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 原因遺伝子が未同定な *peup* 変異体の一つを用いて、次世代シーケンサーでゲノム配列の解析を行ったところ、オートファジー関連遺伝子に塩基置換を検出した。

(2) E2 酵素をコードする *APEM* 遺伝子の発現解析を行うために、*GUS* 遺伝子の upstream プロモーターをつなげた融合遺伝子を作製し、それを導入した形質転換シロイヌナズナを用いて *GUS* 染色を行ったところ、この *APEM* 遺伝子は植物個体全体で発現しており、組織レベルでは維管束系において強いことが明らかとなった。また、成長が進み老化した組

織においても遺伝子発現が高くなることが明らかとなった。

この遺伝子の活性中心と考えられるシステムに変異を導入し、E2 酵素としての機能を欠損したシロイヌナズナを作製したところ、*apem* 変異体と同様の表現型を示したことから、この E2 酵素としての活性がペルオキシソームタンパク質輸送に必須であることが明らかとなった。

(3) E2 酵素の機能が低下した *apem* 変異体では、当研究室において報告した *ped1* (*peroxisome defective 1*) や *ped2* ほど著しくないものの、ペルオキシソーム機能の一つである脂肪酸代謝系の活性、及び光呼吸活性が低下していることが明らかとなった。

(4) 蛍光タンパク質の Citrine および mRFP1 に PTS1 との融合遺伝子を、恒常のプロモーターの下流につなげた融合遺伝子を用いて、ゼニゴケを形質転換した。シロイヌナズナと同様に、粒状の構造物が観察されたため、それらがペルオキシソームを検証するために、ペルオキシソーム酵素のカタラーゼと蛍光タンパク質の抗体を用いた二重免疫電子顕微鏡観察を行ったところ、Citrine および mRFP1 で可視化された粒状の構造物はペルオキシソームであることが明らかとなった。

また、形質転換ゼニゴケを作製するにあたり、Gateway 技術を用いたゼニゴケ用のバイナリーベクターを作製した。任意のプロモーターと cDNA およびレポーター遺伝子を一度の LR 反応で融合させる R4pMpGWB シリーズのベクターを 44 個、プロモーター解析用の R4pMpGWB シリーズを 32 個作製し、それらがゼニゴケ細胞で機能することを明らかにした。

(5) ゼニゴケより抽出した総タンパク質に対して、様々なペルオキシソーム抗体を用いたイムノブロット解析を行ったところ、脂肪酸β酸化、グリオキシル酸回路、光呼吸系、過酸化水素除去系の酵素が存在することが明らかとなった。

また、シロイヌナズナにおいて、これまで同定した約 300 個のペルオキシソーム関連遺伝子を使って、ゼニゴケゲノムに対して相同遺伝子の検索を行ったところ、シロイヌナズナでは複数存在する遺伝子が、ゼニゴケでは少ないことが明らかとなった。

以上のように、本研究課題をとおして、シロイヌナズナにおけるペルオキシソームタンパク質輸送におけるユビキチンシグナリングについての知見を得ることができた(現在、論文作成中)。また、これまでにタンパク質輸送に異常を示す *apem* 変異体のいくつか、生殖過程にも影響を及ぼすことを見いだし、特に脂肪酸代謝系と活性酸素の濃度制御を、花粉および花粉管のペルオキシソーム

が担っていることが予想されていたが、過酸化水素濃度をモニターする系を構築し、実際に *apem* 変異体では、濃度が低下していることを検証できた。

ゼニゴケについては、ペルオキシソームの可視化に成功し、PTS1、PTS2 輸送経路が共通して存在することが示された。インフォマティクス解析より、シロイヌナズナではファミリーを形成している遺伝子が、ゼニゴケではほとんど1つしか存在しないことが明らかとなった。この結果は、コケから被子植物への進化の過程で、遺伝子重複などにより遺伝子数が増え、それらが新たな機能を獲得していったものと予測された。現在、可視化された形質転換体を親株として、インフォマティクス解析により得られた候補遺伝子の機能解析を進めている。

このゼニゴケを用いた研究のために、Gateway 法を導入した新たなバイナリーベクターを合計 76 個作製し、ゼニゴケ研究者に配付を開始している。このベクターについては、論文を投稿中である。

## 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 16 件)

Aboulela, M., Tanaka, Y., Nishimura, K., Mano, S., Kimura, T., and Nakagawa, T. (2017). A dual-site gateway cloning system for simultaneous cloning of two genes for plant transformation. *Plasmid* 91, 1-11. 査読有り 10.1016/j.plasmid.2017.05.001

Aboulela, M., Tanaka, Y., Nishimura, K., Mano, S., Nishimura, M., Ishiguro, S., Kimura, T., and Nakagawa, T. (2017). Development of an R4 dual-site (R4DS) gateway cloning system enabling the efficient simultaneous cloning of two desired sets of promoters and open reading frames in a binary vector for plant research. *PLOS ONE* 12(5), e0177889. 査読有り 10.1371/journal.pone.0177889

Kanai, M., Mano, S., and Nishimura, M. (2017). An efficient method for the isolation of highly purified RNA from seeds for use in quantitative transcriptome analysis. *J. Vis. Exp.* 119, e55008. 査読有り 10.3791/55008

Oikawa, K., Mano, S., Hosokawa, Y., and Nishimura, M. (2016). Analysis of physical interaction between peroxisomes and chloroplast induced by dynamic morphological changes of peroxisomes using femtosecond laser impulsive force. *Plant Morphol.* 28, 29-34. 査読有り 10.5685/plmorphol.28.29

Cui, S., Hayashi, Y., Otomo, M., Mano, S., Oikawa, K., Hayashi, M., and Nishimura, M. (2016). Sucrose production mediated by lipid metabolism suppresses physical interaction of peroxisomes and oil bodies during

germination of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 291, 19734-19745. 査読有り 10.1074/jbc.M116.748814

Hosokawa, Y., Iino, T., Oikawa, K., Mano, S., Yamada, K., and Nishimura, M. (2016). Quantification of the adhesion strength between peroxisomes and chloroplasts by femtosecond laser technology. *Bio-Protoc.* 6, e1834. 査読有り 10.21769/BioProtoc.1834

Kamigaki, A., Nito, K., Hikino, K., Goto-Yamada, S., Nishimura, M., Nakagawa, T., and Mano, S. (2016). Gateway vectors for simultaneous detection of multiple protein-protein interactions in plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *PLOS ONE* 11(8), e0160717. 査読有り 10.1371/journal.pone.0160717

Kimori, Y., Hikino, K., Nishimura, M., and Mano, S. (2016). Quantifying morphological features of actin cytoskeletal filaments in plant cells based on mathematical morphology. *J. Theor. Biol.* 389, 123-131. 査読有り 10.1016/j.jtbi.2015.10.031

Oikawa, K., Mano, S., Yamada, K., Hosokawa, Y., and Nishimura, M. (2016). Measuring the interactions between peroxisomes and chloroplasts by in situ laser analysis. *Bio-Protoc.* 6, e1790. 査読有り 10.21769/BioProtoc.1790

Kanai, M., Mano, S., Kondo, M., Hayashi, M., and Nishimura, M. (2015). Extension of oil biosynthesis during the mid-phase of seed development enhances oil content in *Arabidopsis* seeds. *Plant Biotechnol. J.* 14, 1241-1250. 査読有り 10.1111/pbi.12489

Goto-Yamada, S., Mano, S., Yamada, K., Oikawa, K., Hosokawa, Y., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M. (2015). Dynamics of the light-dependent transition of plant peroxisomes. *Plant Cell Physiol.* 56(7), 1252-1263. 査読有り 10.1093/pcp/pcv081

Oikawa, K., Matsunaga, S., Mano, S., Kondo, M., Yamada, K., Hayashi, M., Kagawa, T., Kadota, A., Sakamoto, W., Higashi, S., Watanabe, M., Mitsui, T., Shigemasa, A., Iino, T., Hosokawa, Y., and Nishimura, M. (2015). Physical interaction between peroxisomes and chloroplasts elucidated by in situ laser analysis. *Nature Plants* 1(4), 15035. 査読有り 10.1038/nplants.2015.35

Shibata, M., Oikawa, K., Mano, S., and Nishimura, M. (2014). Measurement of the number of peroxisomes. *Bio-Protoc.* 4, e1284. 査読有り 10.21769/BioProtoc.1284

Goto-Yamada, S., Mano, S., and Nishimura, M. (2014). Interaction between chaperone and protease functions of LON2, and autophagy during the functional transition of peroxisomes. *Plant Signal. Behav.* 9, e28838. 査読有り 10.4161/psb.28838

Shibata, M., Oikawa, K., Yoshimoto, K., Goto-Yamada, S., Mano, S., Yamada, K., Kondo, M., Hayashi, M., Sakamoto, W., Ohsumi, Y., and Nishimura, M. (2014). Plant autophagy is responsible for peroxisomal transition and plays an important role in the maintenance of peroxisomal quality. *Autophagy* 10(5), 936-937. 査読有り 10.4161/auto.28529

Goto-Yamada, S., Mano, S., Nakamori, C., Kondo, M., Yamawaki, R., Kato, A., and Nishimura, M. (2014). Chaperone and protease functions of LON protease 2 modulate the peroxisomal transition and degradation with autophagy. *Plant Cell Physiol.* 55(3), 482-496. 査読有り 10.1093/pcp/pcu017

[学会発表](計15件)

真野昌二「イメージング技術を用いた植物ペルオキシソーム研究」第1回プラントバイオイメージング研究会、2017年

Mano, S., Nishihama, R., Ishida, S., Kazumi, H., Kondo, M., Yamato, K., Kohchi, T., and Nakagawa, T. “Development and application of new Gateway vectors for *Marchantia polymorpha*”, The 65th NIBB Conference Marchantia Workshop 2017 Renaissance of *Marchantia polymorpha* –the genome and beyond、2017年

真野昌二、及川和聡、後藤-山田志野、Cui Songkui、林誠、西村幹夫「植物の高次機能を支えるペルオキシソーム機能発現と形成機構」ConBio2017、2017年

Mano, S., Goto-Yamada, S., Oikawa, K., and Nishimura, M. “Identification and characterization of molecular players for peroxisome biogenesis and functions based on imaging-based approach” Taiwan-Japan Plant Biology 2017、2017年

神垣あかね、真野昌二、西村幹夫「ペルオキシソーム形成に関わる新規因子 APEM6の局在とその機能」第58回日本植物生理学会年会、2017年

真野昌二、西浜竜一、石田咲子、曳野和美、近藤真紀、西村幹夫、大和勝幸、河内孝之、中川強「ゼニゴケにおけるプロモータースワップ用 Gateway ベクター R4pMpGWB, およびプロモーター解析用 Gateway ベクターR4L1pMpGWB の開発」第58回日本植物生理学会年会、2017年

Mano, S., Hikino, K., Kato, K., and Goto-Yamada, S. “What are roles of peroxisomes in plant reproduction?” 日本動物学会第87回沖縄大会 2016、2016年

Goto-Yamada, S., Mano, S., Nakamori, C., Kondo, M., Yamawaki, R., Kato, A., and Nishimura, M. “Chaperone and protease functions of LON protease 2 modulate the

peroxisomal transition and degradation with autophagy” 57 回日本植物生理学会年会、2016 年

Mano, S., Oikawa, K., Goto-Yamada, S., Shibata, M., Cui, S., Hayashi, M., and Nishimura, M. “Dynamics of peroxisomes and oil bodies based on imaging approach: Molecular players, mechanisms, and roles in metabolisms” 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年

真野昌二、山口千波、曳野和美、加藤恭子、西村幹夫「受精を支える植物ペルオキシソームの形成と機能の意義」BMB2015、2015 年

及川和聡、真野昌二、近藤真紀、坂本亘、三ツ井敏明、飯野敬矩、細川陽一郎、西村幹夫「形態変化を伴ったオルガネラ間相互作用の解析～オルガネラ間接着剤測定を試み～」日本植物学会第 79 回大会シンポジウム、2015 年

神垣あかね、真野昌二、西村幹夫「ペルオキシソーム形成に関わる新規因子 APEM6 の解析」第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年

Oikawa, K., Matsunaga, S., Mano, S., Kondo, M., Hayashi, M., Sakamoto, W., Mitsui, T., Iino, T., Hosokawa, Y., and Nishimura, M. “Photosynthesis-dependent physical interaction between peroxisomes and chloroplasts elucidated by in situ laser analysis” The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing、2015 年

Mano, S., Kanai, M., Nakagawa, T., Kimura, T., and Nishimura, M. “Development and application of new Gateway vectors for plants” Tree and Crop Technology for Improving Quality and Productivity of Food and Biomaterials: Toward Achieving Another Green Revolution, “Glutathione Agriculture”、2015 年

後藤(山田)志野、真野昌二、中森ちひろ、近藤真紀、山脇隆一、加藤朗、西村いくこ、西村幹夫「植物ペルオキシソームの機能転換におけるプロテアーゼ、シャペロン、オートファジーの協調的作用」第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年

#### 〔図書〕(計 2 件)

Goto-Yamada, S., Mano, S., and Nishimura, M. (2014) The role of peroxisomes in plant reproductive processes. In Sexual reproduction in animals and plants. – Edited by Sawada, H., Inoue, N., and Iwano, M. Springer Japan, pp.419-429.

真野昌二、後藤志野、坂本亘 (2014) 18 章 受精とオルガネラ -ミトコンドリア、プラスチド、ペルオキシソーム、DOJIN BIOSCIENCE SERIES 「動植物の受精学」(化学同人、監修：澤田均)、pp.301-317

#### 〔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.nibb.ac.jp/plantorganelles/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

真野 昌二 (MANO SHOJI)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・  
准教授

研究者番号：20321606

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

西村 幹夫 (NISHIMURA MIKIO)

基礎生物学研究所・名誉教授

研究者番号：80093061

金井 雅武 (KANAI MASATAKE)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・  
NIBB リサーチフェロー

研究者番号：30611488

及川 和聡 (OIKAWA KAZUSATO)

理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：70508457

神垣 あかね (KAMIGAKI AKANE)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・  
特別協力研究員

研究者番号：30399315

##### (4) 研究協力者

近藤 真紀 (KONDO MAKI)

後藤 志野 (GOTO SHINO)  
曳野 和美 (HIKINO KAZUMI)  
永田 恭子 (NAGATA KYOKO)  
山口 千波 (YAMAGUCHI CHINAMI)  
中川 強 (NAKAGAWA TSUYOSHI)  
河内 孝之 (KOUCHI TAKAYUKI)  
西浜 竜一 (NISHIHAMA RYUICHI)  
大和 勝幸 (YAMATO KATSUYUKI)