

令和元年9月5日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07397

研究課題名(和文)植物細胞の小胞体運動メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of the ER streaming in plant cells

研究代表者

上田 晴子(Ueda, Haruko)

甲南大学・理工学部・特任研究准教授

研究者番号：90402776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物細胞の中で小胞体は活発に運動している。これは、ミオシンXIが小胞体を掴んでアクチン繊維上を滑ることによって起こることがわかっているが、この運動を支える小胞体側のしくみはほとんどわかっていない。本研究では、小胞体運動が抑制される変異体に着目し、その原因を調べた。その結果、モータータンパク質の運搬能力に加えて、小胞体運動には小胞体自体の運動性も重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物細胞は動物細胞に比べてはるかに大きいので、細胞内で効率的に物質を運搬するために原形質流動というシステムを発達させている。細胞内に膜構造を網目状に張り巡らせている小胞体の運動は、細胞内を攪拌するための原動力となると考えられる。また、小胞体運動が抑制された変異体は植物体の成長も悪く、その重要性が示唆される。本研究から、小胞体運動を支えるしくみに対する手がかりが得られたため、今後の研究で詳細なメカニズムを明らかにしたい。

研究成果の概要(英文)：Plant cells are much larger than animal cells, so the cells have a system called cytoplasmic streaming to transport substances efficiently in cells. Streaming of the endoplasmic reticulum (ER) is considered to be the driving force for stirring the cells, because the ER develops a membranous network in the cells. However, the mechanism of the ER streaming in plant cells are largely unknown. In this study, we analyzed mutants of the ER membrane proteins and found that ER flexibility, in addition to the function of the motor proteins, may contribute to the bulk flow of the ER.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：小胞体 シロイヌナズナ アクチン ミオシンXI

1. 研究開始当初の背景

植物の細胞内は高速で流動している。この現象は原形質流動と呼ばれ、酵母や動物と比較して巨大な細胞をもつ植物にとって、その発達に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。原形質流動は、オルガネラをつかんだミオシン XI がアクチン繊維上を滑ることによって引き起こされると考えられているが、どのオルガネラが関わっているのかははっきりしなかった。われわれは、シロイヌナズナ栄養組織で原形質流動に中心的な役割を果たすのが Myosin XIk であり、小胞体に結合することを見出した [1]。小胞体は、チューブやシートが複雑に組合わさった網目状構造として細胞中に張り巡らされ、細胞内で最大の膜表面積をもつ。この小胞体が活発に流動する様子から、原形質流動の原動力として最適であると考えて研究を進めてきた。

2. 研究の目的

小胞体を牽引するモータータンパク質は明らかになったものの、その運動を支える小胞体側の因子はほとんど分かっていない。これまでに、ROOT HAIR DEFECTIVE 3 (RHD3) のシロイヌナズナ変異体で小胞体運動が抑制されることを見出した [2]。RHD3 は小胞体膜に局在する dynamin-like GTPase で、小胞体膜融合を担うため、ひとつづきの小胞体ネットワークを形成するために必須な因子である。しかし、RHD3 が小胞体運動とどのように関わるかは不明である。そこで、酵母の小胞体形態形成において、Sey1p (酵母の RHD3 ホモログ) と拮抗的にはたらくことが報告された LUNAPARK (LNP) に着目した。LNP は小胞体膜タンパク質で、シロイヌナズナにも 2 つの遺伝子が保存されているが、植物細胞における機能はまだ解析されていない。そこで本研究では、RHD3 および LNP の解析を通じて、小胞体の運動メカニズムを探ることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、主にシロイヌナズナを用いて、下記のように研究を進めた。

- 1) *rhd3* 変異体における Myosin XIk の分布の解析。
- 2) *lnp* 変異体における小胞体の形態および運動性の解析。

4. 研究成果

1) *rhd3* 変異体における Myosin XIk の分布

細胞内における小胞体の分布は一様ではなく、Myosin XI が小胞体を掴んだ状態でアクチン繊維に結合することによって、アクチン繊維束上に小胞体が筋状に寄せ集められる。これを ER strands とよんでいる。*rhd3* 変異体では野生型に比べて太い ER strands が発達することから、Myosin XIk の分布を観察した。その結果、Myosin XIk が ER strands に沿って分布していたことから、*rhd3* 変異体の小胞体にも Myosin XIk が結合することが示唆された。したがって、*rhd3* 変異体における小胞体運動の抑制は、小胞体自体の異常に起因する可能性が考えられた。

2) *lnp* 変異体における小胞体の形態および運動性

lnp 二重変異体の小胞体は、シート状構造が顕著に減少してチューブが大部分を占める粗い網目構造をもち、野生型では観察されない大きな凝集体も観察された。*lnp* 変異体ではシート状構造を形成できない可能性が考えられたため、アクチン重合阻害剤で処理してミオシン XI 依存的なチューブ形成を阻害したところ、チューブが消失してシート構造が形成された (図 1)。このことから、*lnp* 変異体ではシート形成能力はあるが、凝集体を形成した分だけ細胞内に分布する小胞体が少ないためにネットワークが粗くなった

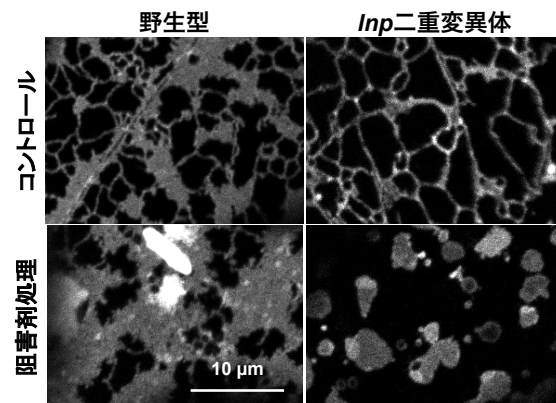


図1 *lnp*二重変異体でもアクチン重合阻害剤処理により小胞体シートが形成された

蛍光タンパク質GFPで可視化した小胞体の共焦点レーザー顕微鏡画像、シロイヌナズナ子葉 (7日目)。 *lnp*二重変異体ではシート状構造が少なく、ネットワーク (網目構造) が粗い。アクチン重合阻害剤で処理するとシートが形成されるが、野生型と比べると量が小胞体の領域が少ない。

と考えられた。このような異常にも関わらず、*Inp* 変異体の小胞体は活発な運動を示した。なかでも、細胞が成長してネットワークが非常に粗くなったために断片化した小胞体は、周囲の小胞体に比べて高速で運動していた(図2)。興味深いことに、同様の現象は *rhd3* 変異体の小胞体でも観察されており、細胞内全体の大きな流れは顕著に抑制されるものの、小さな断片は方向性をもって動き回っていた。したがって、断片化した小胞体はミオシン XI によって運ばれやすく、細胞内でひと続きに繋がった小胞体はその運動性が制限されていると考えられる。

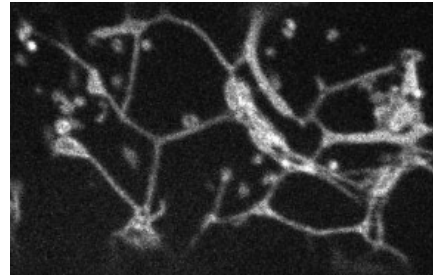


図2 *Inp*二重変異体の断片化した小胞体
*Inp*二重変異体の黄化胚軸(3日目)の小胞体の蛍光像。断片化した小胞体が活発に運動していた。

以上の結果から、小胞体運動では、モータータンパク質の運搬能力に加えて、小胞体自体の運動性も重要であることが示唆された。今後、この運動性がどのような分子機構で維持されているのかを明らかにしていきたい。

<引用文献>

- [1] Ueda, H., Yokota, E., Kutsuna, N., Shimada, T., Tamura, K., Shimmen, T., Hasezawa, S., Dolja, V.V., and Hara-Nishimura, I. Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* (2010) 107, 6894-6899.
- [2] Ueda, H., Yokota, E., Kuwata, K., Kutsuna, N., Mano, S., Shimada, T., Tamura, K., Stefano, G., Fukao, Y., Brandizzi, F., Shimmen, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. Phosphorylation of the C Terminus of RHD3 Has a Critical Role in Homotypic ER Membrane Fusion in Arabidopsis. *Plant Physiol.* (2016) 170, 867-880.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- ① Ueda, H. and Hara-Nishimura, I. How to Investigate the Role of the Actin-Myosin Cytoskeleton in Organ Straightening. *Methods Mol. Biol.* (2019) 1924, 215-221. 10.1007/978-1-4939-9015-3_18. 査読有
- ② Inoue, S., Morita, R., Kuwata, K., Kunieda, T., Ueda, H., Hara-Nishimura, I., and Minami, Y. Tissue-specific and intracellular localization of indican synthase from *Polygonum tinctorium*. *Plant Physiol. Biochem.* (2018) 132, 138-144. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.08.034. 査読有
- ③ Ishikawa, K., Tamura, K., Ueda, H., Ito, Y., Nakano, A., Hara-Nishimura, I., and Shimada, T. Synaptotagmin-Associated Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Contact Sites Are Localized to Immobile ER Tubules. *Plant Physiol.* (2018) 178, 641-653. doi: 10.1104/pp.18.00498. 査読有
- ④ Shimada, T., Kunieda, T., Sumi, S., Koumoto, Y., Tamura, K., Hatano, K., Ueda, H., and Hara-Nishimura, I. The AP-1 Complex is Required for Proper Mucilage Formation in Arabidopsis Seeds. *Plant Cell Physiol.* (2018) 59, 2331-2338. doi: 10.1093/pcp/pey158. 査読有
- ⑤ Ueda, H., Ohta, N., Kimori, Y., Uchida, T., Shimada, T., Tamura, K., and Hara-Nishimura, I. *Plant Cell Physiol.* (2018) 59, 1931-1941. doi: 10.1093/pcp/pey137. 査読有
- ⑥ Shirakawa, M., Ueda, H., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I. FAMA: A Molecular Link between Stomata and Myrosin Cells. *Trends Plant Sci.* (2016) 21, 861-871. doi: 10.1016/j.tplants.2016.07.003. 査読有

〔学会発表〕(計15件)

- ① 上田晴子, 西村いくこ, 植物の器官屈曲と復元力による姿勢制御機構, 第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月, 名古屋(招待講演)
- ② 島田貴士, 嶋田知生, 岡咲洋三, 東泰弘, 斎藤和季, 桑田啓子, 小山香梨, 加藤美砂子, 高野義孝, 上田貴志, 中野明彦, 上田晴子, 西村いくこ, 小胞体タンパク質 HIGH STEROL ESTER 1 によるステロール恒常性維持機構, 第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月, 名古屋(口頭発表)
- ③ 上田晴子, 植物のさまざまな運動とアクチン・ミオシン XI 細胞骨格, 第7回近畿植物学会講演会, 2018年11月, 京都(招待講演)

- ④ 上田晴子, 植物の姿勢とアクチンの配向制御, 植物細胞骨格研究会 2018, 2018年11月, 奈良 (口頭発表)
- ⑤ 上田晴子, LUNAPARK 依存的な小胞体の形態形成機構, 第7回植物エンドメンブレンミーティング, 2018年9月, 京都 (口頭発表)
- ⑥ Ueda, H., Functions of an actin-myosin XI cytoskeleton in intracellular motility and plant postures. Jagiellonian University-Konon University Bilateral Meeting, 2018年8月, Kraków (口頭発表)
- ⑦ 石川一也, 田村謙太郎, 上田晴子, 伊藤容子, 中野明彦, 西村いくこ, 嶋田知生, 細胞膜接着部位に着目した小胞体の4次元構造解析, 第59回日本植物生理学会年会, 2018年3月, 札幌 (口頭発表)
- ⑧ Junpei Takagi, Hideyuki Takahashi, Minoru Nagano, Masayuki Fujiwara, Yoichiro Fukao, Haruko Ueda, Kentaro Tamura, Akihiko Nakano, Tomoo Shimada, Ikuko Hara-Nishimura, The coiled-coil protein MAG3 is involved in protein transport at the endoplasmic reticulum-Golgi interface., Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 2017年11月, 台湾 (口頭発表)
- ⑨ 上田晴子, 小胞体膜タンパク質の機能解析, 第9回植物細胞研究会, 2017年8月, 大阪 (口頭発表)
- ⑩ 上田晴子, 西村いくこ, 植物の器官屈曲を抑制する復元機構, 第58回日本植物生理学会年会, 2017年3月, 鹿児島 (招待講演)
- ⑪ 上田晴子, 西村いくこ, アクチン・ミオシン XI はストレートニング機構を介して植物の姿勢を決定する, 生体運動研究合同班会議, 2017年1月, 神戸 (口頭発表)
- ⑫ 上田晴子, RHD3 依存的な膜融合による小胞体ネットワーク形成, 植物細胞骨格研究会 2016, 2016年11月, 東京 (ポスター発表)
- ⑬ 上田晴子, 重力・光刺激に応答した植物の器官屈曲とストレートニング機構, 日本宇宙生物科学会第30回大会, 2016年10月, 愛知 (招待講演)
- ⑭ Ueda, H. and Hara-Nishimura, I. Functions of an actin-myosin XI cytoskeleton ~ from intracellular motility to plant organ movement ~. Front Lines of Plant Cell Wall Research and Beyond, 2016年10月, 熱海 (招待講演)
- ⑮ 上田晴子, 植物のストレートニング機構の解析, 第7回植物細胞研究会, 2016年8月, 三島 (口頭発表)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし