

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570053

研究課題名（和文）PEX16による植物ペルオキシソームの形成機構

研究課題名（英文）Biogenesis of plant peroxisomes mediated by PEX16

研究代表者

林 誠（HAYASHI MAKOTO）

基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・准教授

研究者番号：50212155

研究成果の概要（和文）：植物のペルオキシソームは脂質分解や光呼吸などの代謝を担う重要なオルガネラである。申請者は、これまでに植物ペルオキシソームの形成を担う PEX タンパク質群を同定してきた。本申請では、これら PEX タンパク質群と協調的に働くタンパク質の同定を行った。その結果、PEX7 と結合するタンパク質として PEX12, PEX13 および RabE1c を見いだした。PEX16 に結合するタンパク質も複数同定することに成功しており、現在その機能を解析中である。さらに GFP-PEX16 過剰発現株よりサプレッサー変異体を単離する方法を確立した。

研究成果の概要（英文）：Plant peroxisome is an organelle involved in important metabolisms such as lipid breakdown and photorespiration. I have identified many peroxins that regulate biogenesis of plant peroxisome. Here I tried to identify proteins cooperatively work together with these peroxins. As the results, I found PEX12, PEX13 and RabE1c as binding partners with PEX7. I also found several proteins bind with PEX16, and am keep analyzing function of these proteins. In addition, method to screen suppressor mutants from GFP-PEX16 overexpression line was established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：ペルオキシソーム、グリオキシソーム、脂質分解、光呼吸

## 1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームは、広く真核生物の細胞に存在する直径約 1  $\mu$ m のオルガネラである。植物のペルオキシソームは脂質の分解や光呼吸などの重要な代謝に関与する。申請者は、分子遺伝学的な解析からペルオキシソームの形成に関与する PEX タンパク質群の同定に成功した。これらタンパク質の機能を解析

するためのツールとして GFP-PEX16 や GFP-PEX7 を含む GFP 融合型 PEX タンパク質を過剰発現する形質転換シロイヌナズナを作成した。上述の形質転換体のうち、特に GFP-PEX16 過剰発現株は細胞内のすべてのペルオキシソームがひとかたまりに凝集するという特異な表現型を示した。作成した GFP 融合型 PEX タンパク質の過剰発現株は、植物

におけるペルオキシソームの形成機構を解析する上で優れた実験系を提供すると考えられた。

## 2. 研究の目的

これまで分子遺伝学的な解析から、さまざまな PEX 遺伝子群を同定したが、それらの機能は不明な点が多い。そこで、PEX16 をはじめとする GFP 融合型 PEX タンパク質過剰発現株を用いることで、PEX タンパク質と協調的に働くタンパク質の同定をめざした。

## 3. 研究の方法

本研究は以下の3つの方法によって推進した。

(1) BiFC 法によるタンパク質間相互作用の解析

申請者がこれまでに同定した多数の PEX タンパク質同士の結合活性を測定した。測定には、split YFP をベースにしたパーティクルボンバートメントによる BiFC 法を用いた。

(2) 免疫沈降-MS 解析による新規結合タンパク質の探索

GFP-PEX16 や GFP-PEX7 過剰発現株から得たタンパク質粗抽出液に抗 GFP 抗体を加え、ProteinA をコートした磁気ビーズを用いることで、GFP 融合型 PEX タンパク質を精製した。この操作によって PEX タンパク質と共沈殿したタンパク質を質量分析機によって同定した。

(3) GFP-PEX16 過剰発現株のサプレッサー変異体スクリーニング

GFP-PEX16 過剰発現株を再度変異源処理し、この過剰発現株に特徴的な表現型を失ったサプレッサー変異体を単離、解析することで PEX16 と協調的に働く遺伝子の同定を試みた。

## 4. 研究成果

BiFC 法によるタンパク質間相互作用の解析からは、PEX7 が PTS2 と呼ばれるペルオキシソームタンパク質と結合すること、ペルオキシソーム膜タンパク質である PEX12 および PEX13 と結合することを示すことができ、論文発表 (Plant J.) した。

免疫沈殿-MS 解析では、PEX7 および PEX16 と結合する複数の新規タンパク質を同定した。これらのうち、PEX7 に結合するタンパク質 RabE1c は PEX7 がペルオキシソームタンパク質の輸送を行った後、再利用されるか、分解消去されるかを定める上で重要な役割を果たしていることが示し、論文発表 (J. Biol. Chem.) した。PEX16 結合タンパク質については、引き続き機能解析を継続する必要がある。

GFP-PEX16 過剰発現株のサプレッサー変異体スクリーニングについては、変異源処理後

の植物の生育が極端に悪いことが判明し、当初の予定から大きく遅れた。発芽条件の検討を行った結果、助成期間の後半になってスクリーニングを開始することが可能となった。すでに、複数の変異体候補を同定している。これらのうちには、GFP-PEX16 過剰発現株に見られたペルオキシソームの凝集が消失し、野生型に近い表現型を示すものも含まれている。今後ともスクリーニングを継続し、分子遺伝学的な解析を行う必要がある。

## 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 7 件)

- ① Cui, S., Fukao, Y., Mano, S., Yamada, K., Hayashi, M. and Nishimura, M. (2013) Proteomic analysis reveals that the Rab GTPase RabE1c is involved in the degradation of the peroxisomal protein receptor PEROXIN 7. *J. Biol. Chem.* 査読有, 288, 6014-6023.
- ② Hayashi, M., Nanba, C., Saito M., Kondo, M., Takeda, A., Watanabe Y. and Nishimura, M. (2012) Loss of XRN4 Function Can Trigger Cosuppression in a Sequence-dependent Manner. *Plant Cell Physiol.* 査読有, 53, 1310-1321.
- ③ Kanai, M., Nishimura, M. and Hayashi, M. (2010) A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by inducing pectin degradation under the control of *ABI5*. *Plant J.* 査読有, 62, 936-947.
- ④ Singh, T., Hayashi, M., Mano, S., Arai, Y. and Nishimura, M. (2009) Molecular components required for the targeting of PEX7 to peroxisomes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 査読有, 60, 488-498.
- ⑤ Corpas, F. J., Hayashi, M., Mano, S., Nishimura, M. and Barroso, J. B. (2009) Peroxisomes are required for *in vivo* nitric oxide (NO) accumulation in the cytosol following salinity stress of

Arabidopsis plants. *Plant Physiol.* 査読有, 151 2083-2094.

- ⑥ Kamigaki, A., Kondo, M., Mano, S., Hayashi, M. and Nishimura, M. (2009) Suppression of peroxisome biogenesis factor 10 reduces cuticular wax accumulation by disrupting the ER network in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 査読有, 50, 2034-2046.
- ⑦ 林 誠, 西村幹夫 (2009) 植物ペルオキシソームの機能多様性とその制御 *Plant Morphology* 査読無, 21, 41-46.

[学会発表] (計 19 件)

- ① 中井篤、林 誠、深尾陽一郎、吉瀬 (新井) 祐子、西村幹夫: ペルオキシソーム局在型 benzoyltransferase はベンゼノイド産生を触媒する、第 5 4 回日本植物生理学会年会、岡山、2013 年 3 月 21-23 日
- ② Soungkui Cui, Yoichiro Fukao, Shoji Mano, Kenji Yamada, Makoto Hayashi and Mikio Nishimura: Identification and functional characterization of novel factors regulating peroxisomal protein receptor PEX7、第 5 4 回日本植物生理学会年会、岡山、2013 年 3 月 21-23 日
- ③ 及川和聡、柴田美智太郎、近藤真紀、真野昌二、林 誠、吉本光希、大隅良典、西村幹夫: ペルオキシソーム局在異常変異体 peup4 の解析、第 5 4 回日本植物生理学会年会、岡山、2013 年 3 月 21-23 日
- ④ 中井篤、林 誠、深尾陽一郎、吉瀬 (新井) 祐子、西村幹夫: 定量プロテオミクスを用いたダイズ子葉のペルオキシソーム機能転換の解析、第 5 3 回日本植物生理学会年会、京都、2012 年 3 月 21-23 日
- ⑤ Soungkui Cui, Yoichiro Fukao, Makoto Hayashi and Mikio Nishimura: Identification of novel peroxisomal biogenesis factors binding to PEX7、第

5 3 回日本植物生理学会年会、京都、2012 年 3 月 21-23 日

- ⑥ 金井雅武、林 誠、西村幹夫: HS3 は葉緑体ゲノムの転写制御により種子の貯蔵脂質合成に関与する、第 5 2 回日本植物生理学会年会、仙台、2011 年 3 月 20-22 日
- ⑦ 中井 篤、林 誠、深尾陽一郎、吉瀬 (新井) 祐子、西村幹夫: 定量プロテオミクスを用いたダイズ子葉のペルオキシソームタンパク質の網羅的解析、第 5 2 回日本植物生理学会年会、仙台、2011 年 3 月 20-22 日
- ⑧ 及川和聡、柴田美智太郎、近藤真紀、吉本光希、真野昌二、林 誠、大隅良典、西村幹夫: ペルオキシソーム局在異常変異体 peup2 と peup4 の解析、第 5 2 回日本植物生理学会年会、仙台、2011 年 3 月 20-22 日
- ⑨ Songkui C., Fukao, Y., Hayashi, M. and Nishimura, M.: Proteomic identification of novel peroxisome biogenesis factors, 第 5 1 回日本植物生理学会年会、熊本、2010 年 3 月 18-21 日
- ⑩ 及川和聡、松永茂、真野昌二、林 誠、近藤真紀、香川貴俊、坂本亘、東正一、渡辺正勝、西村幹夫: 光に依存したペルオキシソームとミトコンドリア、葉緑体との接着機構は光合成により制御される、第 5 1 回日本植物生理学会年会、熊本、2010 年 3 月 18-21 日
- ⑪ 中井篤、林 誠、深尾陽一郎、吉瀬 (新井) 祐子、西村幹夫: ダイズ子葉のペルオキシソーム機能変換におけるペルオキシソームタンパク質の網羅的解析、第 5 1 回日本植物生理学会年会、熊本、2010 年 3 月 18-21 日
- ⑫ 金井雅武、西村幹夫、林 誠: PED3 は ABI5 を介して種子発芽を制御する、第 5 1 回日本植物生理学会年会、熊本、2010 年 3 月 18-21 日
- ⑬ Hayashi, M., Singh, T., Mano, S., Arai, Y., Goto, S. and Nishimura, M.:

Peroxisomal targeting of PEX7, a receptor for PTS2-containing proteins, to peroxisomes, International conference on Arabidopsis research, Edingurgh, UK, June 30-July 4, 2009

- ⑭ Kanai, M., Nishimura, M. and Hayashi, M., *PED3* is required for process of breaking dormancy, International conference on Arabidopsis research, Edingurgh, UK, June 30-July 4, 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/~celmech/jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 誠 (HAYASHI MAKOTO)

基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・  
准教授

研究者番号：50212155

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：