

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770043
 研究課題名(和文) 植物オルガネラ間相互作用におけるミトコンドリア・ダイナミクスの役割の解明
 研究課題名(英文) The role of mitochondrial dynamics in the interactions between organelles in plants
 研究代表者
 山岡 尚平 (YAMAOKA SHOHEI)
 京都大学・大学院理学研究科・特定助教
 研究者番号：00378770

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアを介したオルガネラ間相互作用は、植物のさまざまな生理機能にとって必要不可欠である。本研究では、カルボキシル化および脱炭酸反応のコファクターであり、胚発生など植物の発生過程に必須の因子であるビオチンの生合成に、ミトコンドリアとペルオキシソームにわたる代謝反応が必要であり、それが植物と菌類で進化的に保存されていることを明らかにした。また、植物細胞において、ミトコンドリアと他のオルガネラとの物理的接触の役割を明らかにするため、ミトコンドリア動態制御因子 *MIRO1* に対する人工マイクロ RNA を発現させることで、ミトコンドリアの細胞内分布を変化させた形質転換植物の作成を行った。

研究成果の概要(英文)：Interactions between mitochondria and the other organelles play vital roles in developmental and physiological functions in plants. Biotin, an essential cofactor for carboxylation and decarboxylation reactions, is required for various developmental processes including embryogenesis in plants. In this study, we revealed that biosynthesis of biotin requires the metabolic interaction between mitochondria and peroxisomes, which is evolutionarily conserved in plants and fungi. We have also investigated the role of physical contact between mitochondria and the other organelles in plants. *MIRO1* is a mitochondrial GTPase involved in the regulation of mitochondrial morphology and distribution. We generated transgenic lines exhibiting abnormal intracellular distribution of mitochondria by expressing the artificial micro RNA targeting the *MIRO1* sequence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ミトコンドリア・オルガネラ・ビオチン・ペルオキシソーム

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは他のオルガネラと相互作用し、光呼吸・種子発芽時の脂肪酸代謝において大きく寄与することが知られている。またミトコンドリアは非常に動的なオルガネラであり、しばしば他のオルガネラと物理

的に近接することが知られている。しかし、ミトコンドリアを介したオルガネラ間相互作用のその他の生理的役割や、その際のミトコンドリアの動態の意義については、これまでほとんど明らかになっていない。

ビオチンはビタミンの一種であり、脂肪

酸・アミノ酸代謝に必要なカルボキシル化反応・脱炭酸反応におけるコファクターとして生体にとって必要不可欠な因子である。植物においてビオチンの欠乏は、胚性致死などの重篤な障害をもたらすことが知られている。従来、ビオチンの生合成は主にミトコンドリアと細胞質で行われるとされ、このうち生合成の一段階を担う 7-keto-8-amino-pelargonic acid (KAPA) 合成酵素は細胞質に存在するとされてきた。しかし、我々の研究から、KAPA 合成酵素には進化的に保存されたペルオキシソーム局在化シグナル (PTS) が存在することが明らかとなり、ビオチン生合成におけるペルオキシソームの関与が予想された。

また、オルガネラ間相互作用において、ミトコンドリアの動態がどのように寄与しているかは明らかになっていない。その理由のひとつとして、植物のミトコンドリアの動態を制御するメカニズムそのものがほとんど明らかにされていないことが挙げられる。我々はこれまで、進化的に保存されたミトコンドリア局在型 GTPase である MIRO1 がミトコンドリアの形態と細胞内分布の制御に寄与し、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* の胚発生と花粉管伸張に必要であることを明らかにした (Yamaoka & Leaver, *Plant Cell* 2008; Yamaoka et al. *Plant Cell Rep.* 2011)。本研究ではこれらの研究に基づいて、ミトコンドリアの細胞内分布を変化させた植物の作成を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、(1) KAPA 合成酵素の細胞内局在性を明らかにし、ビオチン生合成におけるミトコンドリアを介したオルガネラ間相互作用の役割を明らかにする。(2) また *MIRO1* 遺伝子の発現を抑制した (ノックダウン) 植物を作成することで、ミトコンドリアと他のオルガネラとの物理的近接の生理的意義の解明の端緒を開く。

3. 研究の方法

(1) ビオチン生合成におけるミトコンドリアを介したオルガネラ間相互作用の役割の解明：シロイヌナズナおよびニホンコウジカビ *Aspergillus oryzae* の KAPA 合成酵素 BioF (AtBioF および AoBioF) における PTS 配列を同定し、植物・菌類における同酵素の局在を明らかにする。またニホンコウジカビにおいて *AoBioF* および PTS 受容体遺伝子の破壊株を作成し、これらの遺伝子のビオチン生合成における寄与を明らかにする。さらに植物における *BioF* 遺伝子の系統関係を明らかにし、ミトコンドリア-ペルオキシソーム間相互作用の普遍性について明らかにする。

(2) *MIRO1* 遺伝子発現抑制によるミトコ

ンドリア細胞内分布異常株の作成：*MIRO1* に対する人工マイクロ RNA 配列を過剰発現する形質転換植物を作成し、*MIRO1* 遺伝子のノックダウンを行う。同時に蛍光タンパク質によるミトコンドリアの可視化を行い、*MIRO1* ノックダウンによるミトコンドリアの動態異常を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ビオチン生合成におけるミトコンドリアを介したオルガネラ間相互作用の役割の解明

ペルオキシソーム局在化シグナルのひとつ PTS1 は (S/A)(K/R)(L/M) の 3 アミノ酸残基からなることが知られている。シロイヌナズナおよびニホンコウジカビの BioF の C 末端には、PKL, ARL という配列の PTS1 が保存されていた。シロイヌナズナ AtBioF 全長の N 末端側に GFP を付与した融合タンパク質 (GFP-AtBioF) はペルオキシソームに局在し、PTS1 を欠失した変異タンパク質 (GFP-AtBioF Δ PKL) は細胞質に蓄積した。また従来報告にあるように AtBioF 全長の C 末端側に GFP を付与した融合タンパク質 (AtBioF-GFP) は細胞質に局在したが、これは GFP が PTS1 をマスクしている可能性が考えられた (図 1)。同様の結果はニホンコウジカビ AoBioF においても得られた。これらのことから、植物および菌類の BioF の局在は、従来報告にあるように細胞質ではなく、ペルオキシソームであることを明らかにした。

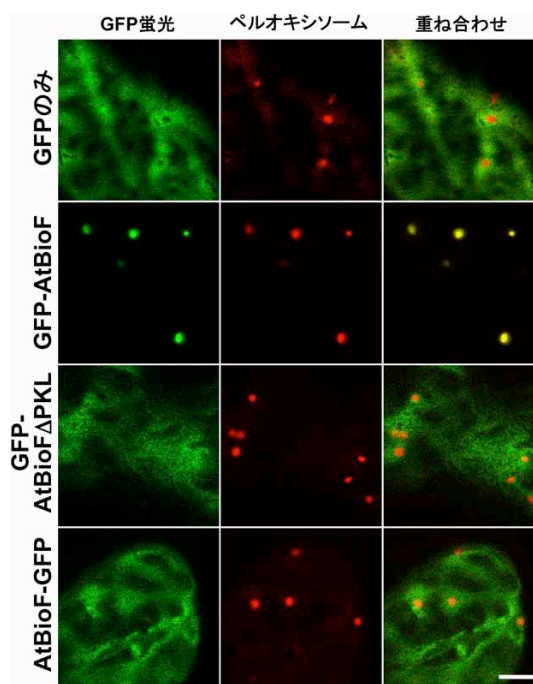


図1 シロイヌナズナ KAPA 合成酵素 AtBioF は PTS1 依存的にペルオキシソームに局在する。バーは 5 μ m。(発表論文 2 より改変)

次に、ニホンコウジカビにおいて AoBioF の PTS1 を欠損させた変異株、および PTS1 受容体の欠損株を作成したところ、いずれの株も最少培地における生育が著しく抑制された。これらの株におけるビオチン要求性を調べたところ、ビオチンとその生合成前駆物質の添加により生育が回復した。これらのことから、BioF のペルオキシソーム局在が、ビオチン生合成に必要であることを明らかにした。

ビオチンの生合成はβ酸化にはじまり、BioF によって pimeloyl-CoA から KAPA が合成され、これがミトコンドリアに輸送されたのち、複数の反応を経て完了するとされている (図2)。

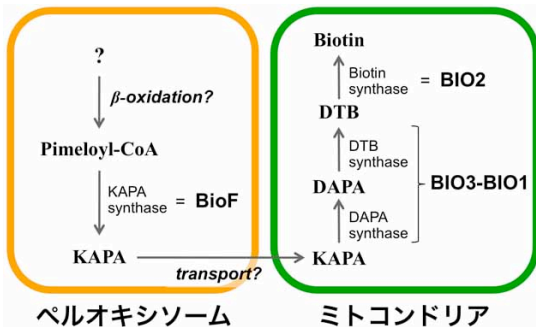


図2 ビオチン生合成経路とミトコンドリアおよびペルオキシソームにおける代謝産物と酵素の局在性 (発表論文1より改変)

本研究により、BioF のペルオキシソーム局在の必要性が示されたことから、ビオチン生合成はミトコンドリア-ペルオキシソーム間の相互作用を必要とすることが明らかとなった。ビオチンは植物の胚発生に必須であり、また BioF の PTS1 配列はほぼ全ての陸上植物で保持されている (図3) ことから、本研究により、ミトコンドリア-ペルオキシソーム間相互作用が植物界において重要な生理的意義を持つことが明らかとなった。

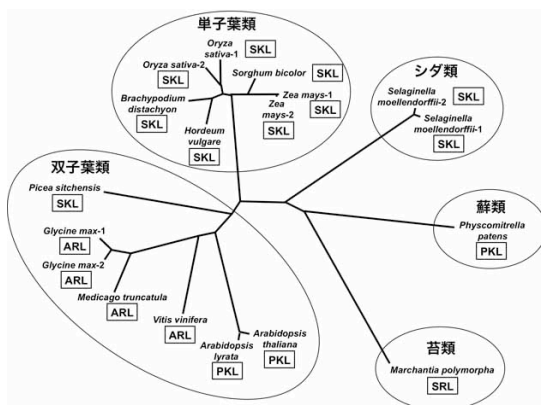


図3 植物界における KAPA 合成酵素 (BioF) の進化系統樹。各植物種名の下にペルオキシソーム局在シグナル PTS1 のアミノ酸配列を示す (発表論文1より改変)

(2) MIRO1 遺伝子発現抑制によるミトコンドリア細胞内分布異常株の作成

我々はこれまで、MIRO1 遺伝子の欠失 (ノックアウト) がミトコンドリアの異常な肥大化を引き起こし、胚性致死をもたらすことを明らかにした。このことから MIRO1 はミトコンドリア動態制御の重要な因子のひとつと考えられるが、一方でノックアウト株では植物胚発生後の MIRO1 の機能解析ひいてはこれを用いたオルガネラ間相互作用の解析が不可能であった。

そこで本研究では、人工マイクロ RNA 法により、MIRO1 のノックダウン株を作成した。人工マイクロ RNA 配列を導入した複数の系統を得たところ、その多くが T1 世代で枯死したが、一部は継代が可能であった。これらの株では植物体の矮小化、組織の縮れ、早期の黄化などの表現型が見られた (図4A)。またこれらの継代可能株にミトコンドリア局在型蛍光タンパク質を導入したところ、ミトコンドリアの異常な肥大化が見られた (図4B)。こうしたことから、MIRO1 のノックダウンにより、胚発生後の発生の諸過程およびミトコンドリアの形態に重篤な障害をもたらされることが示唆された。本研究における MIRO1 ノックダウン系統の確立は、今後の植物オルガネラ間相互作用の研究に大きく貢献すると期待される。

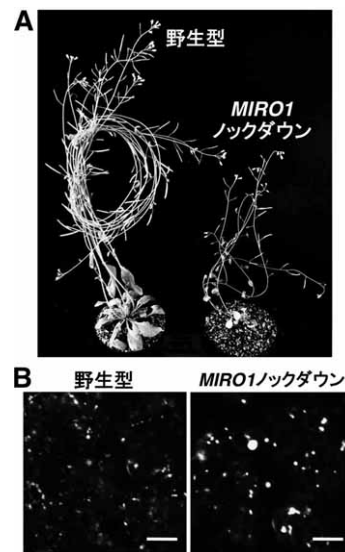


図4 シロイヌナズナ MIRO1 遺伝子ノックダウン株の作成。MIRO1 ノックダウン株は植物体が矮小化し (A)、ミトコンドリアの異常な肥大化が見られた (B)。バーは 10 μm。

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2件)

1) Maruyama JI, Yamaoka S, Matsuo I,

Tsutsumi N, Kitamoto K. (2012) A newly discovered function of peroxisomes: Involvement in biotin biosynthesis. *Plant Signal. Behav.* 7: 1589-1593. 査読有り
DOI: 10.4161/psb.22405

2) Tanabe Y, Maruyama JI, Yamaoka S, Yahagi D, Matsuo I, Tsutsumi N, Kitamoto K. (2011) Peroxisomes Are Involved in Biotin Biosynthesis in *Aspergillus* and *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 286: 30455-30461. 査読有り
DOI: 10.1074/jbc.M111.247338

〔学会発表〕 (計 4 件)

1) 山岡尚平、下野裕貴、白川一、深尾陽一朗、初谷 紀幸、田村謙太郎、嶋田知生、西村いくこ 「シロイヌナズナ AP-2 アダプチン複合体は花器官形成に関与する」 第 54 回日本植物生理学会年会 2013 年 3 月 22 日 岡山大学 (岡山市)

2) Yamaoka S, Hara-Nishimura I. "An *Arabidopsis* Miro GTPase maintains mitochondrial morphology during pollen tube growth and embryogenesis." The 4th NIBB-MPIPZ-TLL Symposium "Arabidopsis and Emerging Model Systems" 2012 年 11 月 19 日～21 日 岡崎コンファレンスセンター (岡崎市)

3) 山岡尚平、中島将貴、藤本優、Christopher J. Leaver、堤伸浩 「シロイヌナズナの胚発生と花粉管伸張におけるミトコンドリア・ダイナミクス」 日本遺伝学会第 84 回大会 (招待講演) 2012 年 9 月 24 日 九州大学医学部百年講堂 (福岡市)

4) 山岡尚平、中島将貴、藤本優、Christopher J. Leaver、堤伸浩 「植物の発生におけるミトコンドリア・ダイナミクス」 第 84 回日本生化学会大会 (招待講演) 2011 年 9 月 21 日 国立京都国際会館 (京都市)

〔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.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2011/20110829-1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 尚平 (YAMAOKA SHOHEI)
京都大学・大学院理学研究科・特定助教
研究者番号 : 00378770

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :