

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380184

研究課題名(和文)植物のミトコンドリアはなぜ小さくて数が多いのか？

研究課題名(英文)Analysis of the morphology and number of plant mitochondria

研究代表者

有村 慎一 (ARIMURA, Shin-ichi)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：00396938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞のエネルギー生産を担うミトコンドリアは、細胞内で融合・分裂を繰り返しながらダイナミックに形を変える。動物のミトコンドリアと比較して、粒状で数が多い植物ミトコンドリアが、なぜそのような形態なのか、その制御機構を探るとともに生物学的意義の考察に挑んだ。具体的にはミトコンドリアを蛍光可視化したシロイヌナズナを材料として、その形態が変化した突然変異体を多数単離し、その原因遺伝子を同定、細胞内での作用機序などを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plant mitochondria are small and numerous in comparison to those of animals. They move around and undergo frequent fission and fusion. To understand why they have such peculiar characters, I screened several Arabidopsis mutants with aberrant morphology, distribution, and number of mitochondria. Some responsible genes were identified and Their molecular mechanisms were analyzed.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：ミトコンドリア 植物オルガネラ ミトコンドリア分裂 ミトコンドリア融合

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞呼吸によるエネルギー生産を行う必須のオルガネラである。植物のミトコンドリアは、動物のものとの相同器官としてのみ語られることが多いが、しかしながら、その形態は、小型で粒状、ひとつの細胞内に数千個から数万個が存在しており、それらは DNA を持ったり持たなかったりしている。また、動物のミトコンドリアよりも 10 倍程度速い速度で細胞内を動きまわっており、分裂と融合を行って内容物を共有している。このようにダイナミックで特徴的な植物ミトコンドリアについて、一部動物と共通の遺伝子が見出されているが、植物ミトコンドリアの不思議な形態的特徴を支える遺伝子群は、ごく一部の発見にとどまっている。

2. 研究の目的

植物のミトコンドリアが、動物と異なった小粒多数の形状をとることには、何らかの生物学的な意義が存在すると考えられる。そこで、植物ミトコンドリア形態を司る遺伝子群を単離し、その分子メカニズムを追い、またこれらの遺伝子破壊による形態破綻の突然変異体について、その生育表現型などを詳細解析することで、生物学的な意義のヒントを得て考察することを目的とした。

ミトコンドリアの形態を決定する大きな要素の一つが、ミトコンドリアの分裂と融合、そのバランスである。植物ミトコンドリアの分裂因子は我々が同定した二つと、別グループの同定した二つの計四遺伝子が発表されているが、植物ミトコンドリアの融合因子はまだ明らかにされていない。この植物ミトコンドリア融合の因子同定も目的とした。

3. 研究の方法

シロイヌナズナを材料にして、植物ミトコンドリアを蛍光可視化した形質転換植物体を作製し、これにさらに EMS 等で突然変異原処理した集団後代について、そのミトコンドリア形態の変化を指標にして、突然変異体を選抜した。また、既に得られていたミトコンドリア分裂突然変異体を材料にして、その二重変異体（抑制変異体と促進変異体）の選抜を行った。得られた突然変異体について、常法に従い、原因遺伝子を同定した。

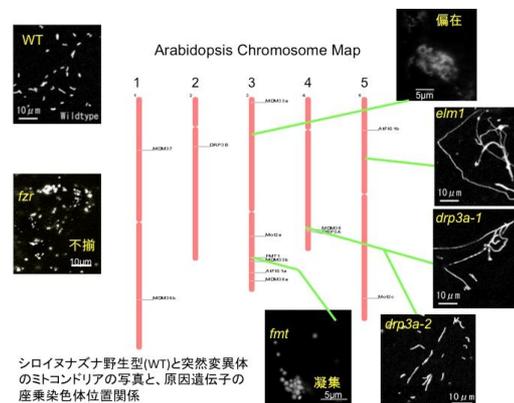
原因遺伝子を得たものについては、分子遺伝学的手法に基づき、その遺伝子産物の細胞内局在、発現解析、遺伝子産物間の機能的相互作用などを解析した。

4. 研究成果

ミトコンドリア形態に変化が見られた突然変異体が多数単離され、ミトコンドリアが長大化するミトコンドリア分裂突然変異体 (*drp3*, *elm1*) のほか、細胞内分布の変化した

もの (*rh3*)、凝集を起こすもの (*friendly*)、一つの細胞内でもミトコンドリア形態がまばらなもの (*fuzoroi*) 等、多様なカテゴリーに属する変異体がそれぞれ複数個体見つかった。これらの一部は既知の突然変異体であり、またその原因遺伝子も同様のものアレル変異体であった。5 つの新規突然変異体について、通常のマッピング法と次世代シーケンスを用いた解析によって、原因遺伝子同定に成功した。それぞれの原因遺伝子について、GFP 融合発現ベクターを作製し、それぞれの細胞内局在などを検討した。FMT は細胞内凝集を引き起こすが、一部が細胞質、一部がミトコンドリア上に点在していた。RHD3 は、不思議なことにミトコンドリア上には局在せず、小胞体に強く局在していた。Rhd3 突然変態では、小胞体の形態が変化し、その網目状構造が粗なものとなり、原形質流動がおち、またミトコンドリアを含めたいくつかのオルガネラの細胞内配置と動きの両方に影響していたことがわかった。

ミトコンドリアの形態が不揃いな突然変異体 *fzr* の責任遺伝子は、なんらかの酵素を



コードしていることがわかった。その N 末端配列を用いた GFP 発現解析から、この遺伝子産物がミトコンドリアへ局在することが明らかとなった。また、遺伝子系統解析、質量分析の結果から、脂質の代謝酵素をコードしていることがあきらかとなった。

ミトコンドリア分裂突然変異体を材料に、さらに突然変異原処理を行い、未同定の、ミトコンドリア融合実行因子同定を目論んだ。これは、ミトコンドリア融合の変異は、他の生物・動物では極めて重篤な変異となるが、分裂と融合の二重変異体は野生型類似のマイルドなフェノタイプをしめすことから、植物においても、抑制型二重変異体をつくることで、通常突然変異選抜で得られなかったミトコンドリア融合突然変異体を選抜しようという試みである。ミトコンドリア分裂突然変異体では、ミトコンドリアが十倍以上に長大化しているが、抑制型二重変異株として、野生型の様に小型粒状多数の形態に戻った株がとれた。しかし、残念ながら、この個体は、ミトコンドリア分裂因子 DRP3A の中に再度新たな突然変異を持つものであり、これによってミトコンドリア分裂が促進された変

異体であることが推測された。これにより、DRP3A の予測立体構造の中の、活性化に關与する新たなアミノ酸残基部位が明らかになった。

シロイヌナズナで得られた知見が、どれくら広い種類の植物に一般化できるか検討するために、近年モデル植物としてよく使用されるようになった初期陸上植物・苔類ゼニゴケを用いて、その相同遺伝子を探索した。シロイヌナズナで明らかにしたミトコンドリア分裂の遺伝子四つのうち、三つについては相同遺伝子が予測され、これらの破壊株を共同研究によって作製し、この解析を行った。その結果、我々が報告してきた二つの遺伝子の相同遺伝子は、ゼニゴケでも同様にミトコンドリア分裂に機能を担うことがわかったが、その他の二つのうち一つは、バラ科の一部植物にのみ存在すること、もう一つは、遺伝子は似ているが、その機能はミトコンドリア分裂にはほとんど寄与しないことがあきらかとなった。後者については、シロイヌナズナに立ち返り、検証実験を行っている。これらの結果から、ミトコンドリア形態を担う分子因子とメカニズムについて、陸上植物での普遍性と多様性を探ることができた。

これらの研究によって、植物ミトコンドリアの特徴的な形態を司る遺伝子群とその働き的一端を明らかにすることができた。これらの破壊の多くは植物生育に大きな影響を引き起こすものも多かった。また、別の研究課題から、環境変動への応答に異常が見られることなどが明らかになっている。今後さらに多面的な発達生育・環境応答などの植物の頑健性とミトコンドリア形態との関わりについて、将来的にさらなる解明に寄与できる知見と材料を蓄積することができたと考えている。

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6件)

1. Yamashita A, Fujimoto M, Katayama K, Yamaoka S, Tsutsumi N and **Arimura S** (2016) Formation of Mitochondrial Outer Membrane Derived Protrusions and Vesicles in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS ONE** 11(1): e0146717. doi:10.1371/journal.pone.0146717.
2. Yamashita A, Fujimoto M, Katayama K, Tsutsumi N and **Arimura S** (2016) Mitochondrial outer membrane forms bridge between two mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Signaling and Behavior**, in press
3. Huang J, Fujimoto M, Fujiwara M,

Fukao Y, **Arimura S**, Tsutsumi N. *Arabidopsis* dynamin-related proteins, DRP2A and DRP2B, function coordinately in post-Golgi trafficking. **Biochem Biophys Res Commun**. Biochemical and Biophysical Research Communications 456 (2015) 238–244

4. Matsuo Y, **Arimura S**, and Tsutsumi N (2013) Distribution of cellulosic wall in the anthers of *Arabidopsis* during microsporogenesis. **Plant Cell Rep**, 32(11):1743-50.
5. Shoji K, Kiuchi T, Hara K, Kawamoto M, Kawaoka S, **Arimura S**, Tsutsumi N, Sugano S, Suzuki Y, Shimada T, Katsuma S. (2013) Characterization of a novel chromodomain-containing gene from the silkworm, *Bombyx mori*. **Gene**. 2013 Sep 25;527(2):649-54.
6. Wang F, Liu P, Zhang Q, Zhu J, Chen T, **Arimura S**, Tsutsumi N, Lin J. Phosphorylation and ubiquitination of Dynamin related proteins (AtDRP3A/3B) synergically regulate mitochondrial proliferation during mitosis. **Plant J**. 2012 72(1):43-56

[学会発表](計26件)

A novel type of mitochondrial fission induced by cold treatment depends on DRP3 without ELM1 in *Arabidopsis thaliana*. Shin-ichi Arimura, Kenta Katayama and Nobuhiro Tsutsumi, ICAR2014, Vancouver Canada July 2014

A comparative study of molecular mechanisms underlying mitochondrial fission in *Arabidopsis thaliana* and a model liverwort, *Marchantia polymorpha*. Nagaoka N., Kurisu R., Katayama K., Ishizaki K., Kohchi T., Tsutsumi N., Arimura S., ICPMB2015, Poland

A lipid metabolism required for the constant mitochondrial shape in *Arabidopsis thaliana*. Kenta Katayama, Tomoki Kiyose, Masaaki Demura, Yozo Okazaki, Kazuki Saito, Hajime Wada, Nobuhiro Tsutsumi and *Shin-ichi Arimura 植物生理学会年会シンポジウム 2015/3/18 東京農業大学

Dynamic aspects of plant mitochondria

and their genome. Kenta Katayama,
Narumi Kawai, Akihiro Yamashita,
Nobuhiro Tsutsumi, *Shin-ichi Arimura
植物生理学会年会シンポジウム 2016/3/24
岩手大学
ほか

〔図書〕(計2件)

Shin-ichi Arimura and Nobuhiro Tsutsumi,
(2016) Mitochondrial and peroxisomal
division, *Molecular Cell Biology of the
Growth and Differentiation of Plant Cells*, in
press, CRC press (分筆)

Shin-ichi Arimura, Mitochondria, (2014)
Atlas of Plant Cell Structure, 2014 Springer
(分筆)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/pmg/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

有村慎一 (ARIMURA, Shin-ichi)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号: 00396938

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし