

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840100

研究課題名(和文)未知なるオルガネラ“トランスゴルジ網(TGN)”の動的解析と生理学的意義の解明

研究課題名(英文)Analysis of the physiological roles and dynamics of TGN in plant cell

研究代表者

植村 知博(Uemura, Tomohiro)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90415092

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文):植物細胞ではTGNは分泌経路と液胞輸送経路の分岐点となるコンパートメントだけでなく、初期エンドソームとして機能する。しかしながらこのような分岐点としてのTGNの動態については全く明らかにされていなかった。そこで超解像ライブイメージング顕微鏡を用いてシロイヌナズナの根のTGNの動態の観察を行った結果、TGNにはゴルジ体のトランス槽側に存在するGA-TGNとゴルジ体とは独立して存在するGI-TGNの2種類が存在することを発見した。また、GI-TGNはGA-TGNの一部が解離することによって形成されること、GA-TGNとGI-TGNの数は植物の組織によって大きく異なることを発見した。

研究成果の概要(英文):The trans-Golgi network (TGN) functions as a sorting station that directs cargo proteins to a variety of destinations including post-Golgi compartments and the extracellular space. However, the functions and dynamics of the TGN in plant cells have remained unknown. To reveal the dynamics of the plant TGN, transgenic plants expressing GFP-SYP43 as a TGN marker was observed. Observations revealed that there are two types of TGN in Arabidopsis root: the GA-TGNs (Golgi-associated TGNs), located on the trans-side of the Golgi apparatus, and the GI-TGNs (Golgi-released independent TGNs), located away from the Golgi apparatus and behaving independently. The GI-TGNs is segregated from the GA-TGNs. I also found that the number of the GI-TGNs are different among observed tissues.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：オルガネラ TGN ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞内で合成された多種多様なタンパク質は、状況に応じてその局在場所を変化させつつ、それぞれの機能を果たしている。このようなタンパク質の挙動は、オルガネラ間を膜小胞や細管を介してダイナミックに結ぶ「膜交通(メンブレントラフィック)」により厳密に制御されている。膜交通は、タンパク質などの物質を細胞内の正しい場所へ輸送するために必須であり、細胞機能を維持するうえで重要な役割を果たしている。トランスゴルジ網(TGN)は、ゴルジ体のトランス槽の外側に存在する網目状の構造体で、ゴルジ体を通過したタンパク質が機能すべき場所に正しく輸送されるための選別を行う、ポストゴルジ膜交通の玄関口にあたるオルガネラである。植物細胞では、TGNは初期エンドソームとしても機能するという報告もあり(Dettmer et al., (2008) Plant Cell)。植物はポストゴルジ膜交通網やオルガネラ機能を動物や酵母とは独立して発達させてきたと考えられている(図1)。そのため、植物のTGNの構造・機能を理解することは、植物細胞生物学分野において非常に重要な課題の一つである。

2. 研究の目的

トランスゴルジ網(TGN)は、ゴルジ体のトランス槽の外側に存在する網目状の構造体で、積荷タンパク質の選別を行う、ポストゴルジ膜交通の玄関にあたるオルガネラであると考えられている。研究代表者は、植物のTGNは、組織・細胞の種類によってゴルジ体と解離すること、環境ストレス応答によってダイナミックにその挙動を変化させ機能していることを見いだしている。しかし、その分子機構や高次機能は未解明であり、TGNは未知なるオルガネラとして注目を集めている。本研究課題では、ライブセルイメージングと分子遺伝学的手法によりTGNのダイナミクス・構造とその分子基盤を明らかにし、高次生命現象におけるTGNの生理学的意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

研究目的である“TGNのダイナミクス・構造とその分子基盤を明らかにし、高次生命現象におけるTGNの生理学的意義を解明すること”を達成するため、以下の具体的な研究をおこなう。

(1)ゴルジ体、TGN、エンドソームを異なる蛍光タンパク質で可視化し、ライブイメージングにより「どのようにTGNが形成されているのか」について明らかにする。

(2)環境ストレス条件下でのプロテオミクス解析や抑圧変異体の単離によりTGNを介した環境ストレス応答に関与する因子を同定し、その機能解析を行うことで「TGNが関与するストレス応答の分子基盤」を解明する。

(3)「環境ストレス応答におけるTGNダイナ

ミクス」を明らかにする。(1)-(3)の結果を統合し、“TGNの新たな概念”を提唱する。

4. 研究成果

(1) TGN マーカーとゴルジ体マーカーを異なる蛍光タンパク質で標識したシロイヌナズナの根の組織を詳細に観察し、植物にはゴルジ体に近接するGA-TGNとゴルジ体とは独立して機能するGI-TGNが存在することを発見した。次に超解像ライブイメージング顕微鏡を用いてTGNの動態の観察を行った結果、GI-TGNはGA-TGNの一部が解離することによって形成されること、GA-TGNとGI-TGNの数は植物の組織によって大きく異なることを発見した。

(2) TGNに局在するSNARE分子であるSYP4のsyp4の変異体解析から、SYP4は分泌経路、液胞輸送経路を制御し、病原菌応答、高塩ストレス応答、C/N栄養ストレス応答など様々なストレス応答において重要な役割を果たしていることを既に報告していた。そこでは、病原菌感染時における野生型とsyp4変異体からアポプラスを単離し比較プロテオミクスを行うことで、膜交通によって制御される病原菌応答の「実行因子」の単離を試みた。その結果、約2000種類の分泌タンパク質を同定した。そのうち1000種類は膜交通に依存しないタンパク質であるのに対して、約1000種類は膜交通に依存したタンパク質であった。

(3) 共焦点レーザー顕微鏡の観察から、病原菌に感染された細胞ではTGNが病原菌侵入部位に集まることで、病原菌に対する抵抗性を発揮することを発見した。興味深いことに、GI-TGNは分泌経路で機能し、GI-TGNの数はシロイヌナズナには感染できないような菌(Blumeria graminis f. sp. Hordei)の感染の前後によって大きく変化していることから、おそらく病原菌応答によって膜交通に依存して分泌されるタンパク質はGI-TGNによって運ばれていることが示唆された。

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12件)(すべて査読有)

- Kim, H., O'Connell, R., Maekawa-Yoshikawa, M., Uemura, T., Neumann, U., Schulze-Lefert P. (2014) The powdery mildew resistance protein RPW8.2 is carried on VAMP721/722 vesicles to the extrahaustorial membrane of haustorial complexes. *Plant J.*, 79:835-847. doi: 10.1111/tpj.12591.

2. Ebine, K., Inoue, T., Ito, J., Ito, E., Uemura, T., Goh, T., Abe, H., Sato, K., Nakano, A. and Ueda, T. (2014) Plant vacuolar trafficking occurs through distinctly regulated pathways. *Curr. Biol.*, 24:1375-1382. doi: 10.1016/j.cub.2014.05.004
3. Kawai-Toyooka, H., Mori, T., Hamaji, T., Suzuki, M., Olson, B.J., Uemura, T., Ueda, T., Nakano, A., Toyoda, A., Fujiyama, A. and Nozaki, H. (2014) Sex-specific Post-translational Regulation of the Gamete Fusogen GCS1 in the Isogamous Volvocine Alga *Gonium pectorale*. *Eukaryot Cell*, 13:648-656. DOI: 10.1128/EC.00330-13.
4. *Uemura, T., Suda, Y., Ueda, T. and Nakano, A. (2014) Dynamic behavior of the trans-Golgi network in root tissues of *Arabidopsis* revealed by super-resolution live imaging. *Plant Cell Physiol.*, 55:694-703. DOI:10.1093/pcp/pcu010.
5. Hashiguchi, Y., Yano, D., Nagafusa, K., Kato, T., Saito, C., Uemura, T., Ueda, T., Nakano, A., Tasaka, M and *Morita, MT. (2014) A unique HEAT repeat-containing protein SHOOT GRAVITROPISM6 is involved in vacuolar membrane dynamics in gravity sensing cells of *Arabidopsis* inflorescence stem. *Plant Cell Physiol.*, 55:811-822. DOI: 10.1093/pcp/pcu020.
6. Katsiarimpa, A., Muñoz, A., Kalinowska, K., Uemura, T., Rojo, E. and Isono, E. (2014) The ESCRT-III interacting deubiquitinating enzyme AMSH3 is essential for degradation of ubiquitinated membrane proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 55:727-736. DOI: 10.1093/pcp/pcu019
7. Fujiwara, M., Uemura, T., Ebine, K., Nishimori, Y., Ueda, T., Nakano, A., Sato, MH. and *Fukao, Y. (2014) Interactomics of Qa-SNARE in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 55:781-789. DOI: 10.1093/pcp/pcu038.
8. Asaoka, R., Uemura, T., Nishida, S., Fujiwara, T., Ueda, T. and *Nakano, A. (2013) New insights into the role of *Arabidopsis* RABA1 GTPases in salinity stress tolerance. *Plant Signal Behav.* 8:e25377. DOI: 10.4161/psb.25377.
9. *Tanaka, H., Kitakura, S., Rakusová, H., Uemura, T., Feraru, MI., Rycke, RD, Robert, S., Kakimoto, T. and *Friml, J. (2013) Cell polarity and patterning by PIN trafficking through early endosomal compartments in *Arabidopsis*. *PLOS Genetics*, 9:e1003540. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003540.
10. Choi, S., Tamaki, T., Ebine, K., Uemura, T., Robatzek, S., *Ueda, T. and Nakano, A. (2013) RABA members act in distinct steps of subcellular trafficking of the FLAGELLIN SENSING 2 receptor. *Plant Cell.*, 25:1174-1187. DOI: 10.1105/tpc.112.108803.
11. Asaoka, R., Uemura, T., Ito, J., Fujimoto, M., Ito, E., Ueda, T and *Nakano, A. (2013) *Arabidopsis* RABA1 GTPases are involved in transport between the trans-Golgi network and the plasma membrane, and are required for salinity stress tolerance. *Plant J.*, 73:240-249. DOI:

10.1111/tpj.12023.

12. Takeda, S., Iwasaki, A., Matsumoto, N., Uemura, T., Tatematsu, K. and *Okada, K. (2013) Physical interaction of floral organs controls petal morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 161:1242-1250. DOI: 10.1104/pp.112.212084.

[学会発表](計 15 件)

国内学会

1. 植村知博(ワークショップオーガナイザー) “植物におけるトランスゴルジネットワーク(TGN)の動態と生理機能” 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会(2015 年 12 月 2 日, 神戸ポートアイランド(兵庫・神戸))
2. 植村知博(selected speaker)、中野明彦 “植物における TGN の動態と生理機能” 第 67 回日本細胞生物学会大会(2015 年 6 月 30 日, タワーホール船堀(東京・江戸川区))
3. 植村知博(invited speaker) “ポストゴルジオルガネラが担う環境ストレス応答” 第 17 回植物オルガネラワークショップ(2015 年 3 月 15 日, 東京大学(東京・渋谷区))
4. 植村知博(ワークショップオーガナイザー), 中野明彦 “植物におけるトランスゴルジネットワーク(TGN)の動態” 第 37 回日本分子生物学会年会(2014 年 11 月 27 日, パシフィコ横浜(神奈川・横浜))
5. 植村知博 “植物におけるポストゴルジオルガネラの動態と生理機能の研究” 日本植物学会第 78 回大会(2014 年 9 月 13 日, 明治大学(神奈川・川崎市))
6. Tomohiro Uemura, Yasuyuki Suda, Takashi Ueda and Akihiko Nakano. The dynamics of *trans*-Golgi network (TGN) in plants.

第 62 回日本細胞生物学会大会(2014 年 6 月 12 日, 奈良県新公会堂(奈良・奈良))

国際学会

7. Tomohiro Uemura (invited speaker) (2016). The dynamics and physiological roles of the TGN in plants. Progress100: Second international symposium: Protein Trafficking and Intracellular Signaling of Plant and Fungal Cells (Feb 8 - 9, 2016, Hakata, Japan)
8. Tomohiro Uemura, Takashi Ueda, and Akihiko Nakano. The dynamics of trans-Golgi network (TGN) in plants. 26th International Conference on Arabidopsis Research (July 5 - 9, 2015, Paris, France)
9. Tomohiro Uemura and Akihiko Nakano. The dynamics of *trans*-Golgi network (TGN) in plants. The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing (13-15 March 2015, Tokyo, Japan)
10. Tomohiro Uemura and Akihiko Nakano. The dynamics of *trans*-Golgi network (TGN) in plants. 38th Naito Conference on Molecule-based biological systems (7-10 October 2014, Sapporo, Japan)
11. Tomohiro Uemura, Takashi Ueda, Akihiko Nakano. The dynamics of *trans*-Golgi network (TGN) in plants. 17th European Network for plant Endomembrane Research Meeting (8-11 September 2014, Lecce, Italy)
12. Tomohiro Uemura, Takashi Shimada, Takashi Ueda, Akihiko Nakano. (2014) The dynamics and functions of Qa-SNAREs localized on the *trans*-Golgi network on response to *Colletotrichum gloeosporioides*.

IS-MPMI 2014 XVI International
Congress (6-10 July 2014, Rhodes,
Greece)

13. **Tomohiro Uemura (invited speaker)**
(2014). The Physiological Functions
and Dynamics of Trans-Golgi Network
(TGN) in Plants. Symposium: Three
Domains of Life “from molecules to
organism” (March 2014, Kyoto, Japan)
14. **Tomohiro Uemura** (invited lecturer)
(2013). The dynamics of *trans*-Golgi
network (TGN) in plants. Golgi
Apparatus Symposium (September 2013.
Bad Ischl, Austria)
15. **Tomohiro Uemura**, Takashi Ueda, Akihiko
Nakano. The physiological functions
and dynamics of trans-Golgi network
(TGN) in plants. 16th European Network
for plant Endomembrane Research
Meeting (August 2013, Ghent, Belgium)

〔図書〕(計0件)

〔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://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/hasseipl/HP/japanese/member/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植村 知博 (UEMURA, Tomohiro)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：90415092

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし