

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14538

研究課題名(和文)単膜系オルガネラが担う葉緑体機能の発現・維持機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of functional link between the trans-Golgi network and chloroplast

研究代表者

植村 知博(Uemura, Tomohiro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：90415092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：syp4変異体では、うどんこ病原感染時に葉緑体の機能維持が出来なくなっているため、うどんこ病原感染後にTGNを観察したところプロストグロビュールと呼ばれる葉緑体内の構造体が肥大化していることを明らかにした。また、syp4変異体の種子を変異誘導剤であるエチルメタンサルホン酸(EMS)で処理したM2種子から葉緑体の表現型が抑圧された変異体を単離した。

研究成果の概要(英文)：To understand how the TGN regulate the Chloroplast maintenance, we developed the system for observing Chloroplast dynamics after SA treatment. As the results, we obtained preliminary data of functional link between TGN and Chloroplast.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：葉緑体 TGN

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞内には、さまざまな種類のオルガネラが存在している。葉緑体やミトコンドリアといった二重の膜で囲まれたオルガネラは、細菌の細胞内共生により生じたものであり、それぞれが独立して機能していると考えられている。一方で、小胞体やゴルジ体、液胞などは一重の膜で形成される単膜系オルガネラであり、膜小胞や細管を介して相互に内容物をやりとりしている。この仕組みは「膜交通」とよばれ、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る。膜交通は、真核生物に保存された普遍的な生命活動であり、細胞機能を維持するうえで重要な役割を果たしている。例えば、ほ乳動物では、神経伝達物質の放出や免疫細胞における抗原の細胞表面提示が膜交通に依存して行われている。神経や免疫細胞を有さない植物においても、膜交通は、形態形成や自然免疫、環境ストレス応答など様々な現象に関与することが我々のグループを含む世界中のグループにより明らかになりつつある。

我々はこれまでに、ゴルジ体に隣接して存在する網目状の構造体で、ゴルジ体を通じ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、トランスゴルジ網(TGN)と呼ばれるポストゴルジ膜交通において重要なオルガネラに注目して研究を行ってきた。TGNの生理機能を明らかにする過程で、TGNに局在するSNARE分子であるシロイヌナズナ SYP4の変異体(syp4)では、シロイヌナズナの野生型で増殖可能なうどんこ病菌(*Golovinomyces orontii*)を感染させた場合にサリチル酸に依存した葉の黄化が観察され、葉緑体の機能が損なわれていることを発見した(Uemura et al, 2012, *Proc Natl Acad Sci U S A*)。また、高濃度の塩ストレスを与えた場合にも、syp4変異体の顕著な葉の白化が観察された。これ

らの結果から、病原菌感染時や塩ストレスなどの過酷な環境ストレスのもとでは、「TGNが葉緑体の機能発現を制御している」のではないかという着想に至った。

## 2. 研究の目的

葉緑体やミトコンドリアのような二重の膜で囲まれたオルガネラと小胞体やゴルジ体などの一重の膜で形成されるオルガネラ(単膜系オルガネラ)は、それぞれ独立して機能していると考えられてきた。しかし、申請者によるシロイヌナズナを用いた研究の結果から、トランスゴルジ網(TGN)と呼ばれるゴルジ体に隣接して存在する網目状の構造体で、ゴルジ体を通じ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オルガネラが、環境ストレス下で葉緑体の機能維持に関与することが明らかとなったが、その分子機構や高次機能は未解明である。本申請課題では、“単膜系オルガネラが担う新規の葉緑体機能の発現・維持機構を分子レベルで解明する”ことを目的とし、植物細胞生物学に新たな概念を提唱する。

## 3. 研究の方法

単膜系オルガネラが担う新規の葉緑体機能の発現・維持機構を分子レベルで解明するため、以下の具体的な研究をおこなう。(1) TGNを含む単膜系オルガネラと葉緑体を異なる蛍光タンパク質で可視化し、超解像ライブイメージングにより「生きた細胞の中でどのようにオルガネラ間がコミュニケーションを取っているか」について明らかにする。(2) 生化学的な手法により、TGNの制御下で実際に葉緑体において機能している実行因子とTGNと葉緑体とのコミュニケーションを担っている因子の単離し機能解析を行う。(3) 分子遺伝学的手法により、TGNが担う環境ストレス下での葉緑体機能の発現維持

機構を解明する。これらの研究結果を統合することで、TGN を含む単膜系オルガネラが制御する葉緑体の発現機構の分子基盤を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

TGN と葉緑体を異なる蛍光タンパク質で標識した形質転換体を当研究室で開発された超解像ライブイメージング顕微鏡 (SCLIM) で観察したが、葉緑体の自家蛍光が強いため綺麗な画像を得ることができなかったが、TGN 変異体において葉緑体を観察し、プラストグロビュール形成にTGNが関与していることが示唆された。

*syp4* 変異体では、環境ストレス下で葉緑体の機能維持が出来なくなっているため、その表現型を実験系として確立するため、サリチル酸処理による変異体の応答を観察した。その結果、サリチル酸処理によってTGNを介した葉緑体維持機構を示唆する予備的な結果を得ることができた。また、*syp4* 変異体の種子を変異誘導剤であるエチルメタンサルホン酸 (EMS) で処理した M2 種子から葉緑体の表現型が抑圧された変異体の原因遺伝子を同定するための準備をすすめている。

#### 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 8 件) (すべて査読有り)

1. Takagi, J and \*Uemura, T. (2018) Use of brefeldin A and wortmannin to dissect post-Golgi organelles related to vacuolar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Methods in Molecular Biology*, in press.
2. Tanabashi, S., Shoda, K., Saito, C., Sakamoto, T., Kurata, T., Uemura, T., Nakano, A. (2018) A Missense Mutation in the NSF Gene Causes Abnormal Golgi Morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Struct Funct*,

43:41-51. doi: 10.1247/csf.17026.

3. \*Ito, Y., Uemura, T. and Nakano, A. (2018) Golgi Entry Core Compartment functions as the COPII-independent scaffold for ER-Golgi transport in plant cells. *J. Cell Sci.* 131. pii: jcs203893. doi: 10.1242/jcs.203893.
4. Yamagami, A., Saito, C., Nakazawa, M., Fujioka, S., Uemura, T., Matsui, M., Sakuta, M., Shinozaki, K., Osada, H., Nakano, A., Asami, T. and \*Nakano, T. (2017) Evolutionarily conserved BIL4 suppresses the degradation of brassinosteroid receptor BRI1 that regulates cell elongation. *Sci. Rep.* 7:6650.
5. Ito, Y., Toyooka, K., Fujimoto, M., Ueda, T., \*Uemura, T. and Nakano, A. (2017) The trans-Golgi network and the Golgi stacks behave independently during regeneration after Brefeldin A treatment in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.*, 58:811-821. doi: 10.1093/pcp/pcx028.
6. Sharma, SS., Yamamoto, K., Hamaji, K., Ohnishi, M., Anegawa, A., Sharma, S., Thakur, S., Kumar, V., Uemura, T., Nakano, A., \*Mimura, T. (2017) Cadmium-induced changes in vacuolar aspects of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.*, 114:29-37. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.02.017
7. Ito, E., Uemura, T., Ueda, T. and Nakano, A. (2016) Distribution of RAB5-positive multivesicular endosomes and the trans-Golgi network in root meristematic cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology*, 33:281-286.
8. Kanazawa, T., Era, A., Minamino, N., Shikano, Y., Fujimoto, M., Uemura, T., Nishihama, R., Yamato, KT., Ishizaki, K., Nishiyama, T., Kohchi, T., Nakano, A., Ueda, T. (2016) SNARE Molecules in *Marchantia*

polymorpha: Unique and Conserved Features of the Membrane Fusion Machinery. *Plant Cell Physiol.*, 57:307-24. doi: 10.1093/pcp/pcv076

〔学会発表〕(計7件)

1. 清水優太郎、小松大和、伊藤容子、高木純平、海老根一生、上田貴志、黒川量雄、**植村知博**、中野明彦 “Unique features of TGN in Arabidopsis revealed by super-resolution live cell imaging” 第69回日本細胞生物学会大会(2017年06月15日)、仙台国際センター(宮城県・仙台市)
2. Yutaro Shimizu, Yamato Komatsu, Yoko Ito, Junpei Takagi, Kazuo Ebine, Takashi Ueda, Kazuo Kurokawa, **Tomohiro Uemura**, Akihiko Nakano “Functional zones and dynamics of trans-Golgi network in Arabidopsis” 20th European Network for Plant Endomembrane Research meeting, Prague, Czech Republic. (September 12-15, 2017)
3. **植村知博** “超解像ライブイメージング観察による植物オルガネの動態と構造” 異分野融合ワークショップ『細胞外から受ける情報のイメージングとそれを支える解析技術の最前線』(2017年3月28日、奈良先端大、奈良県生駒市)
4. **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、東京)
5. 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)
6. **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)

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)

〔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

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

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )