

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14553

研究課題名(和文)ミトコンドリアを中心とした植物の新しいカルシウム制御ネットワーク

研究課題名(英文)Novel calcium signaling network mediated by mitochondria in plant cells

研究代表者

椎名 隆 (Shiina, Takashi)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10206039

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)：ミトコンドリアは酸化呼吸のみならず、アポトーシスや老化など様々な細胞機能で重要な役割を果たしている。動物細胞では、それらの制御にカルシウムイオンシグナリングが深く関係している。本研究では、植物細胞のミトコンドリアの多様な機能を解析し、次の事実を明らかにした。(1)ミトコンドリア内膜に機械受容チャンネルMSL1が存在し、気孔応答を制御する重要な働きをしている。(2)ミトコンドリア電子伝達の抑制によって生じる細胞質カルシウムシグナルを介して、ミトコンドリアが免疫遺伝子発現を制御している。これらの研究から、ミトコンドリアが植物機能を制御する新しいメカニズムが見えてきた。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria play important roles in not only aerobic respiration, but also a range of cellular functions, including apoptosis and cellular senescence in animal cells. It should be noted that calcium signaling is involved in the cellular responses mediated by mitochondria. In this study, novel mitochondrial functions are characterized in plant cells. (1) A novel mechanical channel, MSL1 in the inner membrane of plant mitochondria plays a critical role in the regulation of stomatal aperture. (2) Mitochondrial dysfunction mediated cytosolic calcium signals acts as a retrograde signal to activate the expression of nuclear-encoded defense-related genes. These findings would open novel insights into the role of mitochondria in the regulation of cellular functions in plant cells.

研究分野：植物生理学

キーワード：ミトコンドリア カルシウム レトログレードシグナル 機械受容チャンネル 気孔

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは酸化呼吸のみならず、アポトーシス・酸化ストレス・老化など様々な細胞機能で重要な役割を果たしている。アポトーシスや老化を制御するミトコンドリア依存経路において、Ca²⁺は中心的に働くキー因子である。例えば、アポトーシスは細胞質からミトコンドリアに流入する Ca²⁺が PTP の開口を誘導することで起動する。2010 年に動物のミトコンドリア Ca²⁺流入機構が初めて明らかになり、ミトコンドリアを介した細胞機能制御の新しい研究が急展開している。一方、研究開始時点で、植物細胞におけるミトコンドリアと Ca²⁺シグナリングの関係はほとんど分かっておらず、植物ミトコンドリアの Ca²⁺制御機構やその細胞応答における役割は全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

動物細胞では、ミトコンドリアが細胞質 Ca²⁺ホメオスタシスの制御で重要な働きをしているばかりでなく、アポトーシス制御におけるミトコンドリア Ca²⁺の役割などが明らかになり、ミトコンドリア Ca²⁺の役割と Ca²⁺輸送の分子機構が注目されている。一方、研究代表者は Ca²⁺流入チャネル候補 2 種が植物ミトコンドリアに局在することを明らかにしている。本研究では、2 種の Ca²⁺制御システム (MCU/MICUCa²⁺ユニポーターと MSL1 機械受容チャネル) に注目し、それらの生理機能を明らかにするとともに、ミトコンドリアによる細胞質ゾル Ca²⁺制御機構についても研究を進めた。植物の多様な細胞応答を統御するミトコンドリア Ca²⁺を中心とした新しい制御ネットワークを提案することを目的に研究を進めた。

3. 研究の方法

(1)ミトコンドリア機械受容チャネル MSL 1 の細胞機能制御における役割

MSL1 の特異抗体を作成し、ミトコンドリア局在解析を行った。また、機械受容チャネル欠損大腸菌を用い、MSL1 による相補性解析を行った。植物細胞における MSL1 機能を解析するために、MSL1 ノックダウン植物、MSL1 過剰発現植物、MSL1 遺伝子の T-DNA 挿入ノックアウト変異体を作成した。気孔の開閉解析は、剥離表皮切片を用いて行った。

(2)ミトコンドリア Ca²⁺ユニポーター制御因子 MICU1 の機能解析

MICU1 の特異抗体を作成し、ミトコンドリア局在解析を行った。また、MICU1 遺伝子の T-DNA 挿入ノックアウト変異体を作成し、植物細胞における MICU1 の機能解析を行った。

(3)ミトコンドリア機能障害が誘導する細胞質ゾル Ca²⁺応答と核コード遺伝子発現制御

DBMIB による遺伝子発現誘導は、根または葉のトータル RNA を用い、qRT-PCR 法で解析

した。発現コントロールとしては、UBQ10 遺伝子を用いた。また、細胞質ゾル Ca²⁺シグナルの測定には、細胞質で Ca²⁺センサータンパク質のイクオリンを発現する形質転換植物を用い、ルミノメータによって発光を定量した。RNAseq 解析はイルミナ NextSeq を用いて行った。

4. 研究成果

(1)ミトコンドリア機械受容チャネル MSL 1 の細胞機能制御における役割

植物ゲノムは、バクテリアの低コンダクタンス機械受容チャネル MscS のホモログを複数有するが、その機能解析は十分に進んでいない。シロイヌナズナは、MscS の植物ホモログ MSL を 10 種もち (MSL1~MSL10)、それぞれ異なった組織や細胞内機関で特有の機能を持つと考えられている。系統解析から、植物 MSL は MSL1 グループ (グループ 1)、MSL2/3 グループ (グループ 2)、それ以外の MSL4-10 が属するグループ 3 に分類される。本研究の開始時点で、グループ 2 の MSL2 と MSL3 は葉緑体に、MSL3 グループの多くは細胞膜に局在することが分かっていたが、グループ 1 の MSL1 の細胞内局在や機能は分かっていた。

(1)-i MSL1 はミトコンドリア内膜に局在する

研究代表者は、本研究の開始時点で MSL1 がミトコンドリアに局在する可能性を見出していた。GFP 融合タンパク質の細胞内局在解析、MSL1 抗体を用いたミトコンドリア内局在解析を行い、MSL1 がミトコンドリア内膜に局在するタンパク質であることを明らかにした。

(1)-ii MSL1 ノックダウンおよび過剰発現変異体の作成と解析

まず、MSL1 が機械受容チャネル活性を有する可能性について、大腸菌の機械受容チャネル変異体の相補性解析で評価し、機械受容チャネル機能を有する可能性を示した。

発現解析から、MSL1 はすべての組織で発現していることが分かった。そこで、植物細胞における MSL1 の機能解析を進めるために、MSL1 のノックダウン植物と過剰発現植物を解析し、ミトコンドリア機能や成長への影響を幅広く評価した。しかし、MSL1 ノックダウン植物 / 過剰発現植物共に、ミトコンドリアの膜電位や呼吸活性に大きな変化を示さなかった。また、顕著な成長表現型も見られず、その機能は不明のままであった。同様な表現型は、2016 年にアメリカのグループからも報告されている。

(1)-iii MSL1 は葉の気孔の開閉制御に関係する

大腸菌の MscS は細胞の浸透圧調節に、葉緑体に局在する MSL2 と MSL3 も葉緑体の浸透

圧調節に関係している。同様に、MSL1もミトコンドリアの浸透圧調節に関係している可能性がかんがえられた。一方、MSL1は成熟種子や気孔の孔辺細胞で強く発現していることから、発芽時の吸水に伴う急激な細胞内浸透圧変化や、気孔の開閉に伴う孔辺細胞の浸透圧変化時に、ミトコンドリア機能を保持するために働いている可能性が考えられる。そこで、MSL1のノックダウン及びノックアウト変異体の発芽特性や気孔応答を解析し、MSL1が気孔の海兵制御に関係することが分かった。気孔は光によって開口し、アブシジン酸によって閉口する。MSL1ノックダウン変異体では、ABAによる気孔閉口が怒らないことが分かった。さらに、*msl1*ノックアウト変異体では、光による開口が抑制され、ABA応答も見られなかった。これらの結果は、ミトコンドリアに局在する機械受容チャネルのMSL1が気孔の開閉制御に重要な役割を果たしていることを示唆している。バクテリアのMscSはCa²⁺透過性を持つことが知られている。本研究は、ミトコンドリアMscSによる細胞内Ca²⁺制御など、ミトコンドリアによる植物細胞機能制御の新しい姿の解明につながると期待される。

(2)ミトコンドリアCa²⁺ユニポーター制御因子MICU1の機能解析

ミトコンドリアのCa²⁺ユニポーターとしてMCUとその制御因子MICU1が知られている。本研究では、シロイヌナズナMICU1ホモログの解析を行い、ミトコンドリアに局在することを明らかにした。また、ノックアウト変異体による機能解析を行ったが、現時点で顕著な表現型は見いだせていない。今後、ミトコンドリアCa²⁺恒常性における役割などを解析していく必要がある。

(3)ミトコンドリア機能阻害が誘導する細胞質ゾルCa²⁺応答と核コード遺伝子発現制御

電子伝達阻害剤のDBMIBは、葉緑体チラコイド膜の光化学系Iへの電子伝達を阻害する光合成阻害剤として広く用いられている。プラストキノンプールの過還元を引き起こすことから、強光阻害を引き起こす阻害剤として生理実験にも広く用いられている。葉のDBMIB処理は、フラジェリン応答遺伝子などの免疫関係遺伝子群の発現を誘導することから、DBMIB処理により葉緑体レトログレードシグナルが発信され、核の遺伝子発現を制御すると考えられている。しかし、そのシグナルの実体や生理的な意義については、明らかになっていなかった。

一方、研究代表者は、DBMIBによる遺伝子発現誘導が明暗に関係なく起こることを見出し、この遺伝子発現応答に葉緑体の光合成が関与していないことを見出した。そこで、ミトコンドリア電子伝達阻害が核コード遺伝子発現を制御している可能性について検討を進めた。

(3)-i DBMIBは根のミトコンドリア電子伝達を阻害し、免疫関係遺伝子発現を誘導するDBMIBは葉緑体電子伝達ばかりでなく、ミトコンドリアの複合体IIへの電子伝達を強く阻害することが知られている。DBMIBのミトコンドリアへの作用を解析するために、根の遺伝子発現へのDBMIBの影響を調べた。まず、DBMIB処理によってミトコンドリア膜電位が消失することから、根の細胞におけるDBMIBの主要な作用点がミトコンドリアであることを確認した。一方、根をDBMIBで処理することで、核ゲノムにコードされた免疫関係遺伝子の発現が一過的に誘導されることを見出した。DBMIBと同じ作用点を持つ電子伝達阻害剤のアンチマイシンAも免疫関係遺伝子の発現を同様に促進したことから、ミトコンドリア電子伝達活性の阻害によって、未知のミトコンドリアレトログレードシグナルが発信され、核コードの免疫関係遺伝子の発現を得意的に活性化する機構が存在することが示された。

(3)-ii DBMIBは細胞質ゾルの一過的Ca²⁺濃度上昇を引き起こす

DBMIBが誘導する免疫関係遺伝子の多くのプロモータに「Ca²⁺制御遺伝子のプロモータにみられるCAM-box (AGCGCT)やABRE配列が存在することから、ミトコンドリアレトログレードシグナルとしてCa²⁺が関与している可能性が考えられた。そこで、Ca²⁺センサータンパク質イクオリンを細胞質ゾルで発現する形質転換植物を作成し、DBMIBに対するCa²⁺応答を調べた。その結果、DBMIB処理によって、1-2分のタイムラグを経て十数分継続する細胞質ゾルでの一過的Ca²⁺濃度上昇が生じることを見出した。このCa²⁺応答は、細胞外Ca²⁺キレート剤のBAPTA処理により消失することから、細胞外からのCa²⁺流入によって生じていることが分かった。一方、ミトコンドリアや小胞体からのCa²⁺放出を阻害するルテニウムレッドによってもCa²⁺応答が抑えられたことから、細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺放出も関係している可能性も考えられた。同様な細胞質ゾルCa²⁺応答は、他のミトコンドリア電子伝達阻害剤やミトコンドリアアンカプラーによっても生じたことから、電子伝達阻害などのミトコンドリア機能阻害が根の細胞で細胞質ゾルのCa²⁺応答を引き起こすことが明らかになった。

(3)-iii DBMIBは細胞質Ca²⁺応答を介して免疫応答遺伝子発現を制御する

DBMIBが引き起こす細胞質ゾルCa²⁺濃度上昇が、核での免疫関係遺伝子発現に関係している可能性を検討するために、Ca²⁺応答を抑制するBAPTA存在下での遺伝子発現を解析した。その結果、免疫関係遺伝子群の一部で、BAPTA存在下でDBMIBによる発現誘導が大きく抑制されることを明らかにした。この結果は、DBMIBによるミトコンドリア電子伝達阻

害が引き起こす細胞質ゾルでの Ca^{2+} 応答が、レトログレードシグナルとして働き、核コードの遺伝子発現を誘導している可能性を強く示唆した。

そこで、RNAseq を用いた網羅的遺伝子発現解析をお行い、 Ca^{2+} シグナルによって制御されている DBMIB 遺伝子の解析を行った。その結果、DBMIB が誘導する 990 遺伝子のうちの 25% 以上の遺伝子の発現が BAPTA 存在下で誘導されなくなることをみいだした。これらの Ca^{2+} 依存性遺伝子のプロモータには、CAM-Box が見られた。

以上の結果から、ミトコンドリア機能障害が細胞質ゾルの Ca^{2+} 応答を引き起こし、 Ca^{2+} シグナルがレトログレードシグナルとして、免疫関係遺伝子の発現誘導を制御していることが明らかになった。根におけるミトコンドリアレトログレードシグナルによる免疫遺伝子群の発現制御系の存在は、嫌気性病原体の感染防御に関係している可能性が考えられる。今後、ミトコンドリア機能障害が Ca^{2+} シグナルを生じる分子機構を明らかにするとともに、その生理機能の解析を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Shimmura S., Nozoe, M., Kitora, S., Kin S., Matsutani, S., Ishizaki, Y., Nakahira, Y. and Shiina, T. (2017) Comparative analysis of chloroplast *psbD* promoters in terrestrial plants, *Front. in Plant Sci.* 8, 1186 (査読あり)

doi: 10.3389/fpls.2017.01186

Kitajima, S., Imamura, T., Iibushi, J., Ikenaga, M., Tachibana, Y., Andoh, N., Oyabu, H., Hirooka, K., Shiina, T., Ishizaki, Y. (2017) Ferritin 2 domain-containing protein found in lacquer tree (*Toxicodendron vernicifluum*) sap has negative effects on laccase and peroxidase reactions. *BBB* 81, 1165-1175 (査読あり)

doi: 10.1080/09168451.2017.1289814.

Nomura H., Shiina, T. (2016) Plant endosymbiotic organelles calcium signaling under biotic and abiotic stresses. *J. Plant Physiol. Pathol.* 4, 1-5 (査読あり)

doi:10.4172/2329-955X.1000145

Nozue S, Mukuno A, Tsuda Y, Shiina T, Terazima M, Kumazaki S. (2016) Characterization of thylakoid membrane in a heterocystous cyanobacterium and green alga with dual-detector fluorescence lifetime imaging microscopy with a systematic change of incident laser power.

Biochim Biophys Acta. 1857, 46-59 (査読あり)

<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.10.003>

〔学会発表〕(計 30 件)

1. 田川翔大, 山岡征矢, 渡辺拓也, 椎名隆 機械刺激に対する局所的な防御遺伝子の発現におけるオキシダーゼの役割 第 59 回日本植物生理学会 2018 年 3 月 札幌
2. 村田 鷹規, 岩城 宇律, 下谷 講司, 小谷 美穂, 山崎 加奈子, 佐野 智, 椎名 隆 Ca^{2+} 依存のミトコンドリアから核への レトログレードシグナルは防御関連応答の制御 第 59 回日本植物生理学会 2018 年 3 月 札幌
3. 久保有沙, 小谷美穂, 村田鷹規, 椎名隆 Ca^{2+} による葉緑体機能制御の検討 第 59 回日本植物生理学会 2018 年 3 月 札幌
4. 水野公貴, 上村優奈, 小谷美穂, 椎名隆 flg22 誘導の気孔閉口における葉緑体タンパク質の役割 第 59 回日本植物生理学会 2018 年 3 月 札幌
5. Yuna Uemura, Masaki Mizuno, Koji Shimotani, Kanako Yamasaki, Yoko Ishizaki, Takashi Shiina Possible role of phosphorylation of chloroplast Ca^{2+} binding protein CAS in the regulation of stomatal opening. TJPB2017, 2017 年 11 月台北
6. Takaki Murata, Takanori Iwaki, Koji Shimotani, Miho Kotani, Kanako Yamasaki Satoshi Sano, Takashi Shiina Organelle electron transfer inhibition and gene expression response. TJPB2017 2017 年 11 月台北
7. Souta Izumida, Saki Yomogihara, Akitoshi Hamatani and Takashi Shiina THE ROLE OF MITOCHONDRIAL MECHANOSENSITIVE RECEPTOR CHANNEL MSL1 IN SEED GERMINATION IN ARABIDOPSIS THALIANA. TJPB2017 2017 年 11 月台北
8. 村田 鷹規, 下谷 講司, 岩城 宇律, 小谷 美穂, 山崎 加奈子, 佐野 智, 椎名 隆 オルガネラ電子伝達障害と遺伝子発現応答 第 81 回日本植物学会 2017 年 9 月 千葉
9. 田川 翔大, 山岡 征矢, 渡辺 拓也, 椎名 隆 シロイヌナズナの機械刺激応答時における Rboh の役割 第 81 回日本植物学会 2017 年 9 月 千葉
10. 水野 公貴, 小谷 美穂, 上村 優奈, 椎名 隆 葉緑体タンパク質 CAS による細胞内 Ca^{2+} 応答の制御 第 81 回日本植物学会 2017 年 9 月 千葉
11. 上村 優奈 水野 公貴, 下谷 紘司, 山崎 加奈子, 椎名 隆 葉緑体 Ca^{2+} 結合

- タンパク質 CAS のリン酸化と気孔開閉制御 第 81 回日本植物学会 2017 年 9 月 千葉
12. 泉田 颯太, 艾原 佐紀, 濱谷 昭寿, 椎名 隆 シロイヌナズナにおけるミトコンドリア機械刺激受容チャネル MSL 1 の解析 第 81 回日本植物学会 2017 年 9 月 千葉
 13. 久保 有沙, 小谷 美穂, 上村 優奈, 椎名 隆 シロイヌナズナの葉緑体カルシウムの役割 第 81 回日本植物学会 2017 年 9 月 千葉
 14. 小谷美穂、渡辺拓也、山岡征矢、下谷紘司、山崎加奈子、佐野智、椎名隆 フラジェリンペプチドが誘導する細胞質ゾル Ca²⁺シグナル制御における葉緑体 Ca²⁺結合タンパク質 CAS の役割 第 58 回日本植物生理学会 2017 年 3 月 16 日-18 日 鹿児島
 15. 上村優奈、下谷紘司、山崎加奈子、椎名隆 葉緑体カルシウム結合タンパク質 CAS のリン酸化修飾の解析 第 58 回日本植物生理学会 2017 年 3 月 16 日-18 日 鹿児島
 16. 高尾実波、石崎陽子、北島佐紀人、椎名隆 マイハギ小葉の自発的旋回運動とトランスクリプトーム解析 第 58 回日本植物生理学会 2017 年 3 月 16 日-18 日 鹿児島
 17. 村田鷹規、岩城宇律、下谷紘司、小谷美穂、山崎加奈子、石崎陽子、佐野智、椎名隆 葉緑体とミトコンドリアによる成長と防御遺伝子発現のトレードオフ制御 第 58 回日本植物生理学会 2017 年 3 月 16 日-18 日 鹿児島
 18. 渡辺拓也、山岡征矢、小谷美穂、石崎陽子、椎名隆 シロイヌナズナの機械刺激応答におけるカルシウムシグナルの解析 日本植物学会第 80 回大会 2016 年 9 月 16 日-19 日 宜野湾
 19. 山岡征矢、岩城宇律、村田鷹規、小谷美穂、渡辺拓也、山崎加奈子、田中志整、下谷紘司、石崎陽子、椎名隆 シロイヌナズナにおける接触刺激応答とオルガネラレトログレードシグナル 日本植物学会第 80 回大会 2016 年 9 月 16 日-19 日 宜野湾
 20. 小谷美穂、岩城宇律、村田鷹規、渡辺拓也、山崎加奈子、椎名隆 細胞内カルシウムシグナリングにおけるオルガネラの役割 日本植物学会第 80 回大会 2016 年 9 月 16 日-19 日 宜野湾
 21. 小谷美穂、椎名隆 ストレスに対する色素体及び細胞質 Ca²⁺応答 日本分子生物学会第 38 回大会 2015 年 12 月 1 日-4 日 神戸
 22. 中平洋一、小川敦司、戸澤謙、椎名隆 テオフィリン依存型人工リボスイッチを用いた葉緑体遺伝子発現誘導系の開発 第 57 回日本植物生理学会 2016 年 3 月

- 18 日-20 日 盛岡
23. 泉田颯太、艾原佐紀、濱谷昭寿、山本洋子、椎名隆 シロイヌナズナにおけるミトコンドリア Ca²⁺制御因子の解析 第 57 回日本植物生理学会 2016 年 3 月 18 日-20 日 盛岡
 24. 小谷美穂、岩城宇律、椎名隆 葉の葉緑体と根の白色体におけるストレス誘導 Ca²⁺シグナル 第 57 回日本植物生理学会 2016 年 3 月 18 日-20 日 盛岡
 25. 山岡征矢、石崎陽子、下谷紘司、田中志整、椎名隆 シロイヌナズナにおける機械刺激と防御応答遺伝子発現の関係 第 57 回日本植物生理学会 2016 年 3 月 18 日-20 日 盛岡
 26. 田中志整、下谷紘司、山岡征矢、石崎陽子、椎名隆 シロイヌナズナにおける防御遺伝子発現応答の循環的電子伝達の関与の可能性 第 57 回日本植物生理学会 2016 年 3 月 18 日-20 日 盛岡
 27. 岩城宇律、山崎加奈子、石崎陽子、下谷紘司、椎名隆 光合成阻害剤 DBMIB の遺伝子発現パターンへの影響 第 57 回日本植物生理学会 2016 年 3 月 18 日-20 日 盛岡
 28. 福田真士、安原咲希、伊福健太郎、椎名隆、山崎加奈子、寺嶋正秀、佐藤文彦、熊崎茂一 蛍光寿命画像化顕微鏡を用いた系統的な励起光強度依存性の測定による植物種間葉緑体機能差の解析 第 57 回日本植物生理学会 2016 年 3 月 18 日-20 日 盛岡
 29. Shiina, T., Shimotani, K., Kotani, M., Yamaoka, S., Yomogihara, S., Yamasaki, K. and Ishizaki, Y. 2ns FEBS workshop on Plant Organellar Signaling 2015 年 9 月 クロアチア
 30. 山岡征矢、田中志整、下谷紘司、石崎陽子、椎名隆 シロイヌナズナにおける機械刺激に応答した遺伝子発現応答の解析 日本植物学会第 79 回大会 2015 年 9 月 6 日-8 日 新潟

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎名隆 (SHIINA Takashi)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号: 10206039