

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0151

研究課題名(和文)植物細胞における小胞体の自己組織化による形態形成機構

研究課題名(英文)Morphogenesis of endoplasmic reticulum through self-organization in plant cells

研究代表者

上田 晴子 (Haruko, Ueda)

甲南大学・理工学部・特任研究准教授

研究者番号：90402776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体は、チューブ状構造とシート状構造が複雑に組み合わさり、細胞内でひと続きのネットワークを形成している。この特徴的なネットワークは真核生物に広く保存されており、小胞体の多機能が形態と密接に関連していると考えられる。小胞体の形態形成のしくみは、酵母や動物の研究を中心として徐々に明らかになり始めているが、植物細胞における分子機構は未解明な部分が多かった。本研究では、小胞体膜に同在して植物細胞の小胞体の形態形成に関わる新規タンパク質ファミリーを2種類同定した。これらの因子は、細胞内で小胞体を適切に分布させるために必要であると考えられるが、その作用機構を明らかにすることが今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：The endoplasmic reticulum (ER) is a membrane-enclosed organelle in eukaryotes. The ER develops a continuous network composed of interconnected membrane tubules and flat cisternae called ER sheets in the cell periphery. The network structure is widely conserved in eukaryotes. The multifunctionality of the ER is thought to be closely related to its morphology. However, the mechanism of the ER morphogenesis in plant cells are largely unknown. In this study, we identified two ER membrane protein families, which are required for the ER morphogenesis in plant cells.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：小胞体 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

小胞体は、チューブ状構造とシート状構造が複雑に組み合わせられ、細胞内でひと続きのネットワークを形成している。この特徴的なネットワークは真核生物に広く保存されており、これに異常を持つ植物は細胞伸長が悪く、植物の小型化や稔性の低下を示すものが多い。さらに、ヒトの神経疾患である遺伝性痙性対麻痺 (Hereditary Spastic Paraplegia: HSP) の原因の約 60%は、小胞体の形態形成に関わる因子の変異である。これらの事実から、タンパク質・脂質の合成、代謝、およびカルシウム貯蔵など生命の根幹を担う小胞体の多機能性は、その形態と密接に関連していると考えられる。小胞体ネットワーク構造は、細胞内で常に再構築を繰り返している。興味深いことに、細胞から単離した断片化小胞体を用いても、*in vitro* で同様のネットワークを再構築できる。このことから、小胞体は自己組織化能力が高いオルガネラであると考えられるが、そのメカニズムはまだほとんど未解明である。

2. 研究の目的

小胞体の形態形成に関わる因子は、酵母や動物の研究を中心として徐々に明らかになり始めている。しかし、小胞体シート状構造の形成に関わる因子など、動物細胞で重要な因子が植物細胞には保存されていない例がいくつか知られている。さらに、植物細胞ではアクチン・ミオシン XI 依存的に小胞体が活発に運動することも、他の生物とは異なる大きな特徴である。そこで本研究では、植物細胞における小胞体の形態形成機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

2つのタンパク質ファミリーERMP1 および ERMP2 に着目し、これらの因子の小胞体ネットワーク形成における関わりを、主にシロイヌナズナ欠損変異体の表現型解析を中心として進めた。

4. 研究成果

1) ERMP1 の解析

ERMP1 は植物特異的なタンパク質ファミリーで、シロイヌナズナでは複数のメンバーから構成される。各メンバーについて、蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現させて局在解析を行った結果、いずれも小胞体膜タンパク質であることが明らかとなった。各メンバーの単独欠損変異体では、小胞体の形態に目立った異常はみとめられなかった。しかし、全てのメンバーを欠損する多重変異体は小胞体ネットワークのところどころに小胞体由来と考えられる凝集体が形成された。植物細胞の小胞体はアクチン・ミオシン XI 細

胞骨格を介して活発に運動しており、運動性の損なわれた変異体では小胞体が細胞内で正常に分布することができず凝集する例が知られている。*ermp1* 多重変異体では野生型と同様の小胞体運動が観察されたことから、凝集体は別の要因により形成されたと考えられた。

2) ERMP2 の解析

ERMP2 は真核生物で保存されたタンパク質ファミリーで、シロイヌナズナでは2つのホモログ (ERMP2A および ERMP2B) で構成される。蛍光タンパク質との融合タンパク質を用いて細胞内局在解析を行った結果、これらのタンパク質は小胞体ネットワーク全体に分布する小胞体膜タンパク質であることが明らかとなった (図1)。また、免疫沈降実験から、ERMP2A と ERMP2B は互いに相互作用することがわかった。

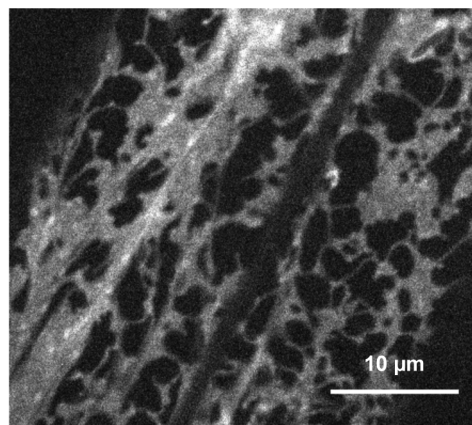


図1 ERMP2は小胞体全体に分布する

蛍光タンパク質GFPとERMP2Aの融合タンパク質の共焦点レーザー顕微鏡像。シロイヌナズナ暗所芽生え (6日目) の胚軸上部。小胞体のチューブ状構造とシート状構造が可視化されている。

ERMP2A の単独欠損変異体では稔性の有意な低下がみとめられた。ERMP2A と ERMP2B を同時に欠損させた *ermp2* 二重変異体では稔性低下がさらに激化し、植物体も矮小化した (図2)。

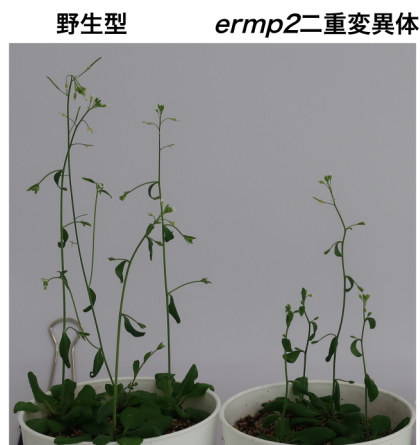


図2 *ermp2*二重変異体は矮小化する
シロイヌナズナ植物体 (31日目) の様子。

ermp2 二重変異体では小胞体ネットワーク構造が粗い様子が観察された (図3). 定量解析の結果, *ermp2* 二重変異体の小胞体はシート領域の割合が野生型の半分に減少しており, 逆に, 空隙領域の大きさが3倍に増大していることが明らかとなった. さらに, *ermp2* 二重変異体では野生型にはない異常な凝集体が形成され, この凝集体には小胞体内腔マーカーが蓄積されていた (図3, 矢尻). この凝集体は, 観察する組織によってさまざまな大きさを示したが, 成熟した細胞ほど大きい傾向があった.

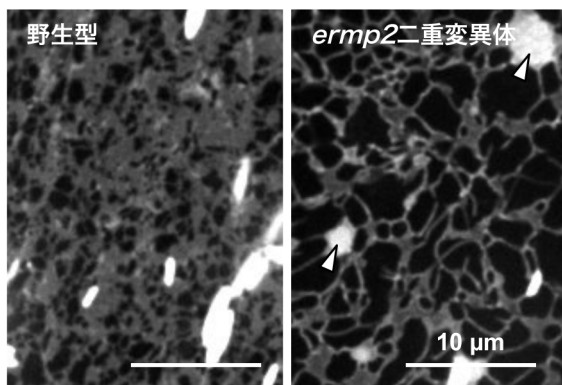


図3 *ermp2*二重変異体では小胞体ネットワークが粗い

蛍光タンパク質で可視化した小胞体の共焦点レーザー顕微鏡画像. シロイヌナズナ子葉葉柄 (8日目). チューブ状構造とシート状構造から構成されるネットワーク (網目構造) を形成する. *ermp2*二重変異体ではシート状構造が少なく, 異常な凝集体が形成される (矢尻).

本研究から, 植物細胞の小胞体の形態形成に関わる新たなタンパク質ファミリーを2種類同定した. いずれも小胞体膜に局在し, 非常に大きな体積をもつ植物体内で小胞体を適切に分布させる機能をもつことが考えられるが, そのメカニズムについてはさらなる解析が必要である.

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4件)

- ① Shirakawa, M., Ueda, H., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I. FAMA: A Molecular Link between Stomata and Myrosin Cells. *Trends Plant Sci.* (2016) 21, 861-871. doi: 10.1016/j.tplants.2016.07.003. 査読有
- ② Shirakawa, M., Ueda, H., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I. Myrosin cells are differentiated directly from ground meristem cells and are developmentally independent of the vasculature in Arabidopsis leaves. *Plant Signal. Behav.* (2016) 11, e1150403. doi: 10.1080/15592324.2016.1150403. 査読有
- ③ *Ueda, H., *Yokota, E., Kuwata, K., Kutsuna, N., Mano, S., Shimada, T., Tamura, K., Stefano,

G., Fukao, Y., Brandizzi, F., Shimmen, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. Phosphorylation of the C terminus of RHD3 has a critical role in homotypic ER membrane Fusion in Arabidopsis. *Plant Physiol.* (2016) 170, 867-880. doi: 10.1104/pp.15.01172. 査読有
*These authors contributed equally to this work.

- ④ Ueda, H., Tamura, K., and Hara-Nishimura, I. Functions of plant-specific myosin XI: from intracellular motility to plant postures. *Curr. Opin. Plant Biol.* (2015) 28, 30-38. doi: 10.1016/j.pbi.2015.08.006. 査読有

[学会発表] (計13件)

- ① ○上田晴子, ミオシン XI の新しい機能 ~ 植物の“姿勢”を決めるアクチン・ミオシン細胞骨格の役割~, 第7回植物細胞研究会, 2015年8月26日, 宇都宮 (口頭発表)
- ② ○Ueda, H. and Yokota, E. Active movements and network formation of the endoplasmic reticulum in plant cells. 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月4日, 神戸 (招待講演)
- ③ ○Ueda, H., Shimada, T., Tamura, K., Morita, MT., and Hara-Nishimura, I. An actin-myosin XI cytoskeleton determines plant posture by regulating organ straightening. 8th Plant Biomechanics International Conference, 2015年11月30日, 名古屋 (口頭発表)
- ④ ○上田晴子, 植物の形態におけるミオシン XI の役割, 植物細胞骨格研究会 2015, 2015年11月27日, 三島 (口頭発表)
- ⑤ ○上田晴子, 他7名, アクチン・ミオシン XI 依存的なストレートニング機構の役割, 第57回日本植物生理学会年会, 2016年3月19日, 盛岡 (口頭発表)
- ⑥ 上田晴子, ○横田悦雄, 他8名, リン酸化を介した小胞体膜融合因子 RHD3 の活性調節, 第57回日本植物生理学会年会, 2016年3月20日, 盛岡 (口頭発表)
- ⑦ ○上田晴子, 植物のストレートニング機構の解析, 第7回植物細胞研究会, 2016年8月25日, 三島 (口頭発表)
- ⑧ ○Ueda, H. and Hara-Nishimura, I. Functions of an actin-myosin XI cytoskeleton ~ from intracellular motility to plant organ movement ~. Front Lines of Plant Cell Wall Research and Beyond, 2016年10月4日, 熱海 (招待講演)
- ⑨ ○上田晴子, 重力・光刺激に応答した植物の器官屈曲とストレートニング機構, 日本宇宙生物科学会第30回大会, 2016年10月14日, 愛知 (招待講演)
- ⑩ ○上田晴子, RHD3 依存的な膜融合による小胞体ネットワーク形成, 植物細胞骨格研究会 2016, 2016年11月18日, 東京 (ポスタ

一発表)

⑪ ○上田晴子, 西村いくこ, アクチン・ミオシン XI はストレートニング機構を介して植物の姿勢を決定する, 生体運動研究合同班会議, 2017年1月8日, 神戸 (口頭発表)

⑫ ○上田晴子, 西村いくこ, 植物の器官屈曲を抑制する復元機構, 第58回日本植物生理学会年会, 2017年3月17日, 鹿児島 (招待講演)

⑬ ○上田晴子, 小胞体膜タンパク質の機能解析, 第9回植物細胞研究会, 2017年8月29日, 大阪 (口頭発表)

6. 研究組織

(1)研究代表者

上田 晴子 (UEDA HARUKO)

京都大学・大学院理学研究科・特定研究員

(2015年度)

甲南大学・理工学部・特任研究准教授

(2016~2017年度)

研究者番号: 90402776