

平成22年 5月 26日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16085203

研究課題名（和文） 傷害による新規オルガネラの誘導機構の解明

研究課題名（英文） Induction mechanism of endoplasmic-reticulum-derived organelle

研究代表者

西村 いくこ (HARA-NISHIMURA, IKUKO)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00241232

研究成果の概要（和文）：傷害により小胞体から派生するオルガネラ（ER ボディと命名）の分化誘導とその生理学的意義の解明を行った。ER ボディは、NAI1 転写因子の制御下で小胞体から形成された。ER ボディの形成には、b-glucosidase PYK10 と凝集因子 NAI2 の2つが必要かつ十分であった。食害や傷害により細胞が破壊された際に、ER ボディ内の PYK10 が JAL1 により活性化され、病害虫に対する忌避物質を生産するという新しい生体防御系の存在が見えてきた。

研究成果の概要（英文）：We identified a distinct type of ER-derived structure as a new organelle in *Arabidopsis*, which we have designated the ER body. The spindle-shaped, 5–10 μm long ER bodies are easily detected in *Arabidopsis* expressing ER-targeted GFP. ER bodies are uniformly distributed throughout the epidermis of cotyledons and hypocotyls in young seedlings. Interestingly, wounding or treatment with the wound hormone jasmonate induces the accumulation of ER bodies in adult leaves. This suggests that the ER body is involved in pest/pathogen resistance in *Arabidopsis*. The ER bodies in *Arabidopsis* seedlings accumulate PYK10 protein, which bears the ER retention signal KDEL. The *Arabidopsis nail* mutant lacks ER bodies. The *NAI1* gene encodes a basic helix-loop-helix-type transcription factor. *NAI1* regulates the expression of *PYK10*, *JAL22*, *JAL23*, *JAL31*, *JAL33*, *PBP1/JAL30*, *GLL2* and *GLL25*. *PYK10* forms a large complex with *JALs* and *GLLs* in cells that are disrupted. *JALs* and *GLLs* regulate the size of the *PYK10* complex and may regulate its substrate specificity. As *NAI1* deficiency causes the loss of ER bodies, *NAI1* may regulate unknown factors that are responsible for the formation of the ER body.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	12,900,000	0	12,900,000
2005年度	12,900,000	0	12,900,000
2006年度	19,700,000	0	19,700,000
2007年度	19,700,000	0	19,700,000
2008年度	19,700,000	0	19,700,000
総計	84,900,000	0	84,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物学・生理学

キーワード：シロイヌナズナ, ER ボディ, 傷害応答, 小胞体, b グルコシダーゼ, PYK10, NAI1, NAI2

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物の特徴ともいえる環境適応能力は植物細胞内のオルガネラの機能分化能力によって支えられている。小胞体 (endoplasmic reticulum) は動植物細胞で最大の表面積を持ち、タンパク質合成の場として知られている。私達の研究から、植物細胞は成長の段階や環境変化に応じて特殊化した機能を持つオルガネラを小胞体から形成する能力をもつことが分かった。

(2) 本研究では、私達が見出した新規オルガネラERボディに注目した。ERボディは周辺にリボソームが付着した大きなオルガネラで、長径は10 μmに達する。ERボディは、アブラナ科を含むフウチョウソウ目にみられるオルガネラで、有名な教科書「Essential Cell Biology」ではプロプラスチドと紹介されていたが、私達の解析からプロプラスチドではなく小胞体由来のオルガネラであることが判明した。ERボディのように傷害によって誘導されるオルガネラはこれまでに知られていなかった。

## 2. 研究の目的

小胞体局在型緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現させたシロイヌナズナでは、強い蛍光を示すオルガネラとして容易に可視化できる。小胞体局在型GFP (green fluorescent protein) をシロイヌナズナで発現させると蛍光顕微鏡下で容易に観察できる。ERボディはアブラナ科植物の幼植物体 (芽生え) 全身の表皮に存在するが、植物体の成熟葉には存在しないという特徴を持つ。しかし、成熟葉に虫害や人為的な傷害を与えるとERボディが誘導されてくる。環境ストレスに弱い幼植物体は予めERボディを準備しており、一方、成長した植物体の場合は、多少の傷害やストレスは個体の生死に関わらないため、傷害を受けてから周囲の細胞にERボディを誘導すると考えられる。ERボディは外敵や環境変化に対処するために植物体が備えている全く新しい生体防御機構の一つとみなすことができる。本課題では、小胞体に焦点を当て、ERボディの分化誘導機構を分子レベルで明らかにし、傷害や環境に応じた植物のオルガネラの誘導機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) ERボディを小胞体型GFPで可視化したシロイヌナズナ形質転換体 (GFP-h) を用いて、GFP蛍光パターンの変化を指標として、小胞体やそれを含む細胞内膜系の維持機構に異常を示す変異体を単離し、原因遺伝子から小胞体の動態を解析する。

(2) GFP-h を変異原処理した株から ER ボディの形成・誘導不全の変異体 (*nai*) を選抜する。得られた変異体のそれぞれについて、変異の原因遺伝子を同定する。

(3) ER ボディの構成成分を同定する。

(4) ER ボディ形成関連遺伝子群の発現プロファイルからこれらと共発現する遺伝子を選抜し、ER ボディ形成との関連を解析する。

(5) 上記で得られた成果を基にして、植物の生体防御における ER ボディの働きを解析する。

## 4. 研究成果

小胞体をGFPで可視化した形質転換シロイヌナズナを親として、ERボディ形成不全変異体 *nai1* (Matsushima et al., *Plant Cell*, 2004) と *nai2* (Yamada et al., *Plant Cell*, 2008; 新聞報道)、ERボディが凝集する *katamari* 変異体 *kam1* (Tamura et al., *Plant Cell*, 2005) と *kam2* (Tamura et al., *Plant Cell*, 2007)、小胞体の形態不全を示す *er morphology* 変異体 *ermo1* と *ermo2* (Nakano et al., *Plant Cell*, 2009) を単離し、それぞれの原因遺伝子を同定して、ERボディの誘導や小胞体の機能解析を行なった。

ER ボディは、幼植物体全身の表皮に存在するが、成熟葉には存在しないという特徴を持つ。しかし、食害を受けた成熟葉にはERボディが誘導される。このことは、ERボディが食植昆虫や病原体から身を守るために働くオルガネラであることを示唆している。ER ボディが形成できない *nai1* の原因遺伝子は、basic-helix-loop-helix (bHLH) 型の転写制御因子であった。*nai1* 変異体と野生型との比較プロテオーム解析とDNAアレイ解析の結果、ERボディの主要構成成分が

$\beta$ -glucosidase PYK10であることが分かった。PYK10は、細胞が傷害を受けて破壊されると、細胞質ゾルに局在している Jacalin-like lectins (JALs と命名)の作用を受けて巨大な不溶性の複合体を形成し、酵素活性が増大することが判明した (Nagano et al., *Plant Cell Physiol.*, 2005)。

活性型 PYK10 複合体を精製・解析した結果、複合体には PYK10 の他に、そのホモログである (BGLU21 と BGLU22) と JAL ホモログ 5 種類と GDSL-lipase-like protein (GLL22)が含まれていた。それぞれの構成成分の遺伝子破壊株を確立し、活性型 PYK10 複合体の形成過程を解析した結果、JAL ホモログが複合体のサイズ制御因子として機能することが分かった。興味深いことは、JAL ホモログが拮抗的に働きながら複合体のサイズを調節していたことである。即ち、正のサイズ制御因子(JAL23 と JAL31)と負の制御因子(JAL22 と JAL30)が存在していた。JAL22 と JAL23 同士は類似性が高く、一方 JAL30 と JAL31 同士は類似性が高いということ considering すると、進化の過程で遺伝子重複による新しい機能の獲得

(neo-functionalization) が起こった可能性を示唆している (Nagano et al., *Plant Cell Physiol.*, 2008)。

生化学的な手法の他に分子遺伝学的方法からも、ER ボディ形成機構の解明を行なった。ER ボディの形成不全を示す変異体 *nai2* を単離の原因遺伝子は *At3g15950* であった。NAI2 は ER ボディに局在し、de novo 合成された PYK10 を集合させることにより ER ボディを形成するという機構がみえてきた

(Yamada et al., *Plant Signal Behav.*, 2009)。上記のように蛍光イメージから変異体を取得する手法は、ER ボディの形成や形態維持機構に関わる因子の同定に大いに役立ったが、微妙な形態変化を示す変異体を見逃す危険性がある。そこで、ER ボディの形状や密度分布を自動的に定量化にできる解析システムを構築した (Nagano et al., *Plant Cell Physiol.*, 2010)。このシステムを利用して、ER ボディ長径が大きくなる変異体 *long er body (leb1)* の解析を行なった。*leb1* 変異体では、ER ボディの主要成分 PYK10 の cysteine-29 が tyrosine に変異していた。以上の結果より、NAI1 転写因子の制御下で、小胞体内で合成される PYK10 とそれを凝集させる NAI2 の働きで、ER ボディが形成されることが明らかになってきた。また、病害虫による食害を受けた組織では、細胞が破

壊されることにより、ER ボディ内に蓄積されていた  $\beta$ -glucosidase PYK10 が JAL1 の作用により活性化し、配糖体を基質として、病害虫に対する忌避物質を生産するという新しい生体防御系の存在が見えてきた。

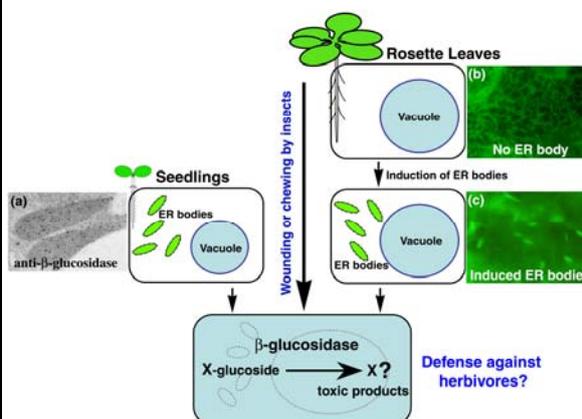


図1. ER ボディは、小胞体由来の大型のオルガネラで、幼植物体全身の表皮に存在し、内部に PYK10 ( $\beta$ -glucosidase)を集積している。健全な成熟葉には ER ボディは存在しないが、食害を受けると ER ボディが誘導される。ER ボディシステムは、傷害により活性化された PYK10 が病害虫に対する忌避物質を生産するという新しい生体防御系と考えられる

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 50 件)

- ① Hatsugai N., Iwasaki S., Tamura K., Kondo M., Fuji K., Ogasawara K., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2009) A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes Dev.* 23. 2496-2506. (査読有)
- ② Nakano RT., Matsushima R., Ueda H., Tamura K., Shimada T., Li L., Hayashi Y., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2009) GNOM-LIKE1/ERMO1 and SEC24a/ERMO2 Are Required for Maintenance of Endoplasmic Reticulum Morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 21 3672-3685. (査読有)
- ③ Nagano AJ., Maekawa A., Nakano RT., Miyahara M., Higaki T., Kutsuna N., Hasezawa S., Hara-Nishimura I. (2009) Quantitative Analysis of ER Body Morphology in an *Arabidopsis* Mutant. *Plant Cell Physiol.* 50 2015-2022 (査読有)
- ④ Nagano AJ., Fukao Y., Fujiwara M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2008) Antagonistic jacalin-related lectins regulate

- the size of ER body-type beta-glucosidase complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 49, 969-980. (査読有)
- ⑤ Nagano AJ., Fukazawa M., Hayashi M., Ikeuchi M., Tsukaya H., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (2008) AtMap1: a DNA microarray for genomic deletion mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 56, 1058-1065. (査読有)
- ⑥ Tamura, K., Takahashi, H., Kunieda, T., Fuji, K., Shimada, T. and Hara-Nishimura, I. (2007). *Arabidopsis* KAM2/GRV2 Is required for proper endosome formation and functions in vacuolar sorting and determination of the embryo growth axis. *Plant Cell* 19, 320-332. (査読有)
- ⑦ Ueda, H., Nishiyama, C., Shimada, T., Koumoto, Y., Hayashi, Y., Kondo, M., Takahashi, T., Ohtomo, I., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2006) AtVAM3 is required for normal specification of idioblasts, myrosin cells. *Plant Cell Physiol.* 47, 164-175. (査読有)
- ⑧ Li, L., Shimada, T., Takahashi, H., Ueda, H., Fukao, Y., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2006). MAIGO2 is involved in exit of seed storage proteins from the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18, 3535-3547. (査読有)
- ⑨ Tamura, K., Shimada, T., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2005) KATAMARI1/MUR3 is a novel Golgi membrane protein that is required for endomembrane organization in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17, 1764-1776. (査読有)
- ⑩ Yamada, K., Fuji, K., Shimada, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2005) Endosomal proteases facilitate the fusion of endosomes with vacuoles at the final step of the endocytotic pathway. *Plant J.* 41, 888-898. (査読有)
- ⑪ Nagano AJ, Matsushima R, Hara-Nishimura I. (2005) Activation of an ER-body-localized beta-glucosidase via a cytosolic binding partner in damaged tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 46, 1140-1148. (査読有)
- ⑫ Hara-Nishimura, I., Matsushima, R., Shimada, T., and Nishimura, M. (2004). Diversity and functions of ER-derived compartments in plants: Are these compartments specific to plant cells? *Plant Physiol.* 136, 3435-3439. (査読有)
- ⑬ Matsushima, R., Fukao, Y., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2004). *NAIL* gene that encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of a novel ER-derived structure, the ER body. *Plant Cell* 16, 1536-1549. (査読有)
- ⑭ Tamura, K., Yamada, K., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I. (2004). Endoplasmic reticulum-resident proteins are constitutively transported to vacuoles for degradation. *Plant J.* 39, 393-402. (査読有)
- その他  
36件
- [学会発表] (計 139件)
- ① Hara-Nishimura, I. Plant Defense Strategies Using Vacuoles and Endomembranes. Premium International Symposium "Perspectives of Plant Science in the 21st Century" In Celebration of the 50th Anniversary Meeting of JSPF. Nagoya University, Nagoya, Japan, March 23, 2009.
- ② 永野惇：オルガネラ定量解析システムによるERボディ形態異常変異の解析. 第50回日本植物生理学会年会, 名古屋大学, 名古屋市, 2009年3月23日
- ③ 中野亮平：小胞体の形態と細胞内分布に異常を示す *endoplasmic reticulum morphology (ermo)* 変異体の解析. 第50回日本植物生理学会年会, 名古屋大学, 名古屋市, 2009年3月21日.
- ④ 上田晴子：小胞体の流動機構の解明～ミオシンに着目して～. 第50回日本植物生理学会年会, 名古屋大学, 名古屋市, 2009年3月21日.
- ⑤ 運天修：シロイヌナズナの病害抵抗性における細胞内輸送の関与. 第50回日本植物生理学会年会, 名古屋大学, 名古屋市, 2009年3月21日
- ⑥ 田村謙太郎：高等植物における細胞核の形作りの分子機構. 第11回植物オルガネラワークショップ, 名古屋大学, 名古屋市, 2009年3月20日
- ⑦ Ryohei Thomas Nakano: *endoplasmic reticulum morphology (ermo)* mutants of *Arabidopsis thaliana* develop a number of novel ER-derived structures in the cells. 第31回日本分子生物学会年会, ポートピアホテル, 神戸市, 2008年12月11日
- ⑧ Hara-Nishimura, I.: Plant Vacuoles as a Key Player of Two Defense Strategies against Invading Viral and Bacterial Pathogens. 第31回日本分子生物学会年会 シンポジウム「オルガネラダイナミクスー形成・分解と機能制御」, ポートピアホテル, 神戸市, 2008年12月9日
- ⑨ 永野惇：遺伝子発現量多型と全ゲノム関連解析, 第40回種生物学シンポジウム, デュ

- ーブレックスセミナーホテル, 守谷市, 2008年12月7日
- ⑩ Tamura K. : Dynamic Nuclear Envelope in Arabidopsis. XI European Endomembrane Meeting, Hotel President, Lecce, Italy, September 22, 2009.
- ⑪ Hara-Nishimura, I.: Two different types of vacuole-mediated defense strategies against virus and bacterial pathogens. 植物微生物研究会・第18回研究交流会, 奈良女子大学, 奈良市, 2008年9月18日.
- ⑫ Hara-Nishimura, I.: Different Vacuole-Mediated-Defense Strategies Against Invading Viral and Bacterial Pathogens. The 55th NIBB Conference "Frontiers of Plant Science in the 21st Century". Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan, September, 13, 2008.
- ⑬ 永野惇: オルガネラ定量解析から見えることーER body を例にして. 第72回日本植物学会大会, 高知大学, 高知市, 2008年9月26日.
- ⑭ 初谷紀幸: 植物の感染防御機構における細胞内輸送系の関与. 第49回日本植物生理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌市, 2008年3月20日.
- ⑮ 西村いくこ: 植物の液胞選別輸送の分子機構. 日本分子生物学会ワークショップ「タンパク質の品質管理とオルガネラダイナミクス」, パシフィコ横浜, 横浜市, 2007年12月12日.
- ⑯ 田村謙太郎: 高等植物における細胞核の機能解析. 第7回核ダイナミクス研究会, 北海道大学, 札幌, 2007年9月26日.
- ⑰ Hara-Nishimura, I.: Vacuolar sorting and vacuolar processing systems in higher plants. Plant Cell Biology Conference, Max-Planck-Institute, Cologne, Germany, Sept. 4-6, 2007.
- ⑱ Tamura, K.: Molecular analyses of endomembrane organisation using *Arabidopsis* mutants. European Endomembrane Club-2007 Meeting, Oxford, UK, August 29-31, 2007.
- ⑲ Hara-Nishimura, I.: Vacuolar sorting mechanism in plants. 19th FAOBMB Conference, Seoul, Korea, May 28-30, 2007.
- ⑳ 永野惇: Jacalin related lectin と GDSL lipase like protein は ER ボディ局在  $\beta$ -グルコシダーゼ複合体のサイズを制御する, 第48回日本植物生理学会年会, 松山大学, 松山市, 2007年3月28日.
- Ⓛ Hara-Nishimura, I.: Vacuolar processing enzyme responsible for programmed cell death in plants. The NAIST COE Symposium "Frontiers in Plant Immunity Research". Nara Institute of Science and Technology, Nara, June 24, 2006.
- Ⓛ Hara-Nishimura, I.: Vacuolar processing enzyme (VPE): an executor of vacuole-mediated cell death in plants. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Symposium "Plant Development and Cell Death: View from Cell Biology". Kyoto International Conference Center, Kyoto, June 18-23, 2006.
- Ⓛ Hara-Nishimura, I.: Involvement of vacuolar processing enzyme (VPE) in plant cell death. The 53rd NIBB Conference "Dynamic Organelles in Plants". Okazaki Conference Center, Okazaki, June 14-17, 2006.
- Ⓛ 上田晴子: シロイヌナズナ AtVAM3 (SNARE タンパク質 VAM3 ホモログ) はミロシン細胞の分化に関与する, 第47回日本植物生理学会年会, 筑波大学, つくば市, 2006年3月21日.
- Ⓛ 永野惇: ER ボディ局在  $\beta$ -グルコシダーゼの活性に影響を与えるサイトゾル型 Jacalin like lectin の探索, 第47回日本植物生理学会年会, 筑波大学, つくば市, 2006年3月20日.
- Ⓛ 前川晃徳: シロイヌナズナに存在する ER body の形成過程の解析, 第47回日本植物生理学会年会, 筑波大学, つくば市, 2006年3月20日.
- Ⓛ 西村いくこ: 植物の生体防御とオルガネラ分化. 第46回日本植物生理学会年会シンポジウム「植物の環境適応戦略としてのオルガネラ分化」. 新潟コンベンションセンター, 新潟市, 2005年3月26日.
- Ⓛ 西村いくこ: 植物のプログラム細胞死を制御する液胞プロセッシング酵素 VPE. 第46回日本植物生理学会年会シンポジウム「植物の防御機構と過敏反応シグナル伝達」. 新潟コンベンションセンター, 新潟市, 2005年3月26日.
- Ⓛ 永野惇: ER ボディに局在する  $\beta$ -グルコシダーゼ PYK10 の解析. 第46回日本植物生理学会年会. 新潟コンベンションセンター, 新潟市, 2005年3月24日.
- Ⓛ 田村謙太郎: シロイヌナズナ *katamaril* 変異体では細胞内膜系の構造が異常になるー細胞内膜系の構造異常を示すシロイヌナズナ *katamaril* 変異体, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸ポートピアホテル, 神戸市, 2004年12月9日.
- Ⓛ Hara-Nishimura, I.: Vacuolar processing enzymes involved in plant programmed cell death. Gordon Research Conference "Plant Senescence and cell death", Mt. Holyoke, USA, June 26-July 3, 2004.
- その他  
108件
- 〔図書〕 (計6件)

- ① 松島良, 嶋田知生, 西村いくこ: 植物の小胞体由来の構造体「プラントミメティックスー植物に学ぶ」(NTS, 東京, 2006年) 甲斐昌一他監修, pp. 293-298.
- ② 田村謙太郎, 西村いくこ: 液胞の可視化と細胞内膜系異常を示す変異体の単離. 植物細胞工学シリーズ 22「新版 植物の細胞を観る実験プロトコール」福田裕穂他監修 (秀潤社, 東京, 2006年) 221-224
- ③ Hara-Nishimura, I., Shimada, T. The Plant Endoplasmic Reticulum. Ed. By D. Robinson (Springer Verlag, 2006), pp. 141-154.
- ④ 松島良, 西村いくこ: ジヤスモン酸により誘導される小胞体由来の新規構造体. 細胞工学別冊, 植物細胞工学シリーズ 20「新版 植物ホルモンのシグナル伝達」(秀潤社, 東京, 2004年) pp. 209-212.

その他

2件

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ER ボディ形成能を有する遺伝子およびその利用

発明者: 山田健志, 西村幹夫, 西村いくこ

権利者: 基礎生物学研究所, 京都大学

番号: 特願 2010-068055

出願年月日: 2010年3月24日

国内外の別: 国内

[その他]

報道関連情報

① 朝日新聞「細胞小器官に必須遺伝子」2008年11月7日

② 日経産業新聞「防虫力つける遺伝子」2008年10月23日

③ 科学新聞「植物の新規細胞小器官“ER ボディ”の形成機構」2008年10月3日

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 いくこ

(HARA-NISHIMURA, IKUKO)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 00241232

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし