

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2009

課題番号：17078009

研究課題名（和文） 膜輸送体の生合成・細胞内局在と分解の制御機構

研究課題名（英文） Regulation mechanism of biosynthesis, intracellular localization and degradation of membrane transporters

研究代表者

松岡 健 (MATSUOKA KEN)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：40222294

研究成果の概要（和文）：タバコ培養細胞の発現系を用いて、オートファジーによる分解系の解析と共に、輸送体のエスコートタンパク質である、タバコの SCAMP と、複数のショ糖輸送体及び、シロイヌナズナのホウ酸輸送体の細胞内局在と分解について解析した。その結果、SCAMP の局在する新規細胞内構造体を同定すると共に、ショ糖輸送体とホウ素輸送体の栄養条件に依存した分解の制御に関する新たな知見を得た。

研究成果の概要（英文）： We investigated the regulation of autophagic degradation as well as the intracellular localization and degradation of tobacco SCAMP, which is known as an escort protein of membrane transporters, as well as sucrose transporters from tobacco and a borate transporter from Arabidopsis. We found a novel intracellular structure through the analysis of the SCAMP. We also got novel mechanistic insights on the nutritional regulation of the degradation of both sucrose transporters and the borate transporter.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	15800000	0	15800000
2006 年度	15800000	0	15800000
2007 年度	15800000	0	15800000
2008 年度	14800000	0	14800000
2009 年度	14800000	0	14800000
総計	77000000	0	77000000

研究分野：分子細胞生物学・植物生化学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

植物の養分吸収を高めるためには、根からの取り込みと細胞内蓄積能力を共に増強することが必要である。そのためには、植物細胞中で物質蓄積機能を担うオルガネラである液胞へと、養分の輸送体を効率良く安定的

に局在させる手法の開発が必須である。また、養分とともに誤って取り込まれる、カドミウムやヒ素等の毒性物質を植物から排出するためには、他種生物で見いだされてきているこれらの排出ポンプを細胞膜へと局在させる必要がある。すなわち、これらのように

植物の性質を人工的に改変させるためには、目的の物質に対応する輸送体の同定と共に、これらの輸送体を分泌経路における仕分オルガネラであるゴルジ装置での仕分け機構を用いて、細胞膜または液胞膜など特定の膜系に安定的に局在させる技術が必要となる。しかし、現在までに植物細胞において得られている、膜蛋白質の局在機構に関する知見は、非常に乏しく、一回膜貫通領域を持つ蛋白質についての解析例が、我々の報告を含めて数例報告されているにすぎなかった。

2. 研究の目的

本研究では、タバコ培養細胞への遺伝子導入系や、電子顕微鏡を用いた細胞内膜系の超微細解析等を用い、植物細胞中での複数膜貫通蛋白質等の膜タンパク質の分泌系オルガネラにおける局在部位の決定機構と、また、それらの合成と分解の制御機構を明らかにすることを目的とする。

具体的には、まず、小胞体膜局在タンパク質である Cytb5 と RFP の融合体の発現により生じた、膜系を含むと考えられるこの凝集体をモデルとして、この凝集体の分解系誘導に関する研究を行う。この研究では、栄養飢餓における分解系誘導機構の理解を図ることを目的としている。

同時に、輸送体のエスコートタンパク質として知られている、SCAMP のタバコオルソログの細胞内局在の解析を行う。この解析では、植物細胞における分泌系細胞内小器官の構造と機能には未だ未知の点が多いので、この細胞内構造系の深い理解を図ることを目的としている。

また、栄養状態の変化に応じて存在量や存在位置が変化する輸送体の制御機構の解析を進める。この研究では、輸送体の制御から溶質の移動に関する新規な知見を得ることを目的とする。

併せて、主な研究材料として用いるタバコ培養細胞の遺伝子発現情報を基にした、共同研究を実施した。この研究では、輸送体や溶質等の動態と、遺伝子発現の関連性を検討することを目的としている。これと平行して、免疫電子顕微鏡法等の電子顕微鏡観察を駆使した共同研究を実施している。この研究においては、輸送体等の各種の膜蛋白質の細胞内局在部位を、順次明らかにすることを目的

としている。

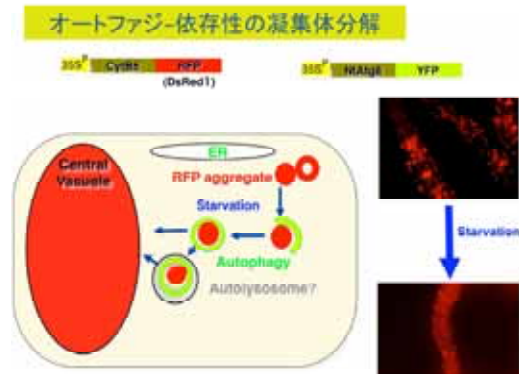
3. 研究の方法

本研究では、EST 情報等による膜蛋白質候補の同定と、その情報を用いた細胞内タンパク質局在解析、タバコ培養細胞への遺伝子導入系や、電子顕微鏡を用いた細胞内膜系の超微細解析、タバコの EST を用いた cDNA アレイ解析による遺伝子情報の網羅的所得等の研究方法を用いた。

4. 研究成果

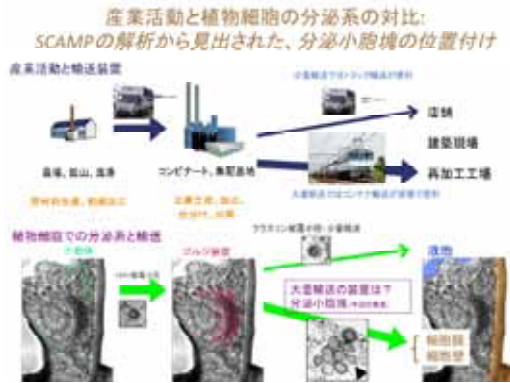
本研究では、タバコ培養細胞への遺伝子導入系や、電子顕微鏡を用いた細胞内膜系の超微細解析等を用い、植物細胞中での複数膜貫通蛋白質等の膜タンパク質の分泌系オルガネラにおける局在部位の決定機構と、また、それらの合成と分解の制御機構を明らかにすることを目的とする。

具体的には、まず、小胞体膜局在タンパク質である Cytb5 と RFP の融合体の発現により生じた、膜系を含むと考えられるこの凝集体の分解機構を進め、この凝集体が栄養飢餓の際にオートファジーで分解されることを明らかにした（下図）。



同時に、輸送体のエスコートタンパク質として知られている、SCAMP のタバコオルソログの細胞内局在の解析を、免疫電子顕微鏡、共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡等を用いた細胞内構造の解析と、細胞分画を始めとして生化学的解析を進めた。その結果、SCAMP がトランスゴルジ網から細胞膜へ輸送される過程において、我々が分泌小胞塊 (SVC) と名付けた構造体を経由すること、その構造体はペクチン等の細胞壁多糖を、分泌タンパク

質と共に含むこと、この構造体は分裂期の細胞では細胞板に輸送されること等を見出した。また、この構造体の分泌系での位置付けは、産業活動におけるコンテナ輸送に例えられると考えられた(下図)。



これらの研究と平行して、栄養状態の変化に応じて存在量や存在位置が変化する輸送体の制御機構等を、ホウ素輸送体とシヨ糖輸送体に注目して進めた。その結果、ホウ素輸送体に関しては、阻害剤を用いた解析から、分解に関わる装置の一端を推定することが出来た。また、シヨ糖輸送体については、解析対象とした2種の輸送体のうち、1種の分解に、オートファジーが関わる可能性を見出した。

併せて、主な研究材料として用いるタバコ培養細胞の遺伝子発現情報を基にした、共同研究の実施と、免疫電子顕微鏡法等の電子顕微鏡観察を駆使した共同研究を実施し、植物における輸送体や溶質の動態制御に関して、新たな知見を得た。

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 18件)

- ①. Toyooka, K., Takeuchi, M., Moriyasu, Y., Fukuda, H. and Matsuoka, K. (2006) Protein aggregates are transported to vacuoles by macroautophagic mechanism in nutrient-starved plant cells. *Autophagy*, 2: 91-106.
- ②. Gális, I., Šimek, P., Narisawa, T., Sasaki, M., Horiguchi, T., Fukuda, H. and Matsuoka, K. (2006) A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco *Plant J.* 46:573-592.

- ③. Kasukabe, N., Watanabe Sugimoto, M., Matsuoka, K., Okuma, E., Obi, I., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y., Kakutani, K. (2006) Expression and Ca²⁺ Dependency of Plasma Membrane K⁺ Channels of Tobacco Suspension Cells Adapted to Salt Stress *Plant Cell Physiol.* 47: 1674-1677.
- ④. Shinya, T., Hanai, K., Suzuki, K., Matsuoka, K., Matsuoka, H., Saito, M. (2007) Characterization of NtChitIV, a class IV chitinase induced by β -D, 3-, 1,6-glucan elicitor from *Alternaria alternata* 102: Antagonistic effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the induction of NtChitIV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353:311-317.
- ⑤. Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Goto, E., Aoki, M., MitōYoshida, M., Uematsu, M., Hasegawa, T., Koseki, H., Ohara, O., Nakayama, M., Toyooka, K., Matsuoka, K., Hotta, H., Yamamoto, A. and Ishido S. (2007) Novel regulation of MHC class II function in B cells. *EMBO J.* 26:846-854.
- ⑥. Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., Kimura, T. (2007) Development of the series of gateway binary vectors, pGWB, realize efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* 104:34-41.
- ⑦. Shinya, T., Gális, I., Narisawa, T., Sasaki, M., Fukuda, H., Matsuoka, H., Saito, M., and Matsuoka, K. (2007) Comprehensive analysis of glucan elicitor-regulated gene expression in tobacco BY-2 cells reveals a novel MYB transcription factor involved in the regulation of phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell Physiol.* 48:1404-1413.
- ⑧. Ukitsu, H., Kuromori, T., Toyooka, K., Goto, Y., Matsuoka, K., Sakuradani, E., Shimizu, S., Kamiya, A., Imura, Y., Yuguchi, M., Wada, T., Hirayama, T., Shinozaki, K. (2007) Molecular and Biochemical Analysis of COF1, an Arabidopsis Mutant of an ABC Transporter Gene. *Plant Cell Physiol.* 48:1524-1533.

- ⑨. Hamamoto, S., Marui, J., Matsuoka, K., Higashi, K., Igarashi, K., Nakagawa, T., Mori, Y., Murata, Y., Nakanishi, Y., Maeshima, M., Yabe, I., Uozumi, N. (2008) Characterization of a Tobacco TPK-type K⁺ Channel as a Novel Tonoplast K⁺ Channel Using Yeast Tonoplasts. *J. Biol. Chem.* 283:1911-1920.
- ⑩. Banu, M. N., Hoque, M. A., Watanabe-Sugimoto, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y. (2009) Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *J Plant Physiol.* 166:146-156.
- ⑪. Shoji, T., Inai, K., Yazaki, Y., Sato, Y., Takase, H., Shitan, N., Yazaki, K., Goto, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., and Hashimoto, T. (2009) MATE-type Transporters Implicated in Vacuolar Sequestration of Nicotine in Tobacco Roots. *Plant Physiol* 149:708-718.
- ⑫. Suzuki, S., Galis, I., Kato, K., Araki, S., Demura, T., Criqui, M-C., Potuschak, T., Genschik, P., Matsuoka, K., and Ito, M. (2009) Preferential up-regulation of G2/M phasespecific genes by overexpression of hyperactive form of NtmybA2 lacking its negative regulation domain in tobacco BY2 cells. *Plant Physiol.* 149:1945-1957.
- ⑬. Tsunekawa K, Shijuku T, Hayashimoto M, Kojima Y, Onai K, Morishita M, Ishiura M, Kuroda T, Nakamura T, Kobayashi H, Sato M, Toyooka K., Matsuoka K., Omata T, Uozumi N. (2009) Identification and characterization of the Na⁺/H⁺ antiporter NHAS3 from the thylakoid membrane of synechocystis SP. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 284:16513-16521.
- ⑭. Toyooka, K., Goto, Y., Asatsuma, S., Koizumi, M., Mitsui, T. and Matsuoka, K. (2009) A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the Golgi to plant cell exterior. *Plant Cell*, 21: 1212-1229.
- ⑮. Kitajima, A., Asatsuma, S., Okada, H., Hamada, Y., Kaneko, K., Nanjo, Y., Kawagoe, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Takeuchi, M., Nakano, A. and Mitsui, T. (2009) Plastid targeting of α -amylase glycoprotein from the Golgi apparatus through the secretory pathway. *Plant Cell*, 21:2844-2858.
- ⑯. Toyooka, K. and Matsuoka, K. (2009) Exo- and Endocytotic trafficking of SCAMP2. *Plant Signaling and Behavior* 4: 1196-1198.
- ⑰. Sasaki, T., Mori, I., Furuichi, T., Munemasa, S., Toyooka, K., Matsuoka, K., Murata, Y. Yamamoto, Y. Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter. (2010) *Plant Cell Physiol.* 51:354-365.
- ⑱. Klionsky et al., (226人中 127番目) (2008) Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy in Higher Eukaryotes. *Autophagy*, 4:151-175.
- [学会発表] (計 26件)
- ①. Matsuoka, K., Toyooka, K., Goto, Y., Asatsuma, S. Characterization of a tobacco secretory carrier membrane protein 2 in tobacco BY-2 cells reveals a novel exocytotic mobile unit, secretory vesicle cluster. XIVth International Workshop on Plant Membrane Biology. Valencia, Spain. (2007)
- ②. Matsuoka, K. Transcriptomic and cell biological analyses of tobacco cell line BY-2. Japan-Germany International Cooperative Project on Education and Research Workshop "Multi-functionality and Sustainability of Land Use in SE. and E. Asia". Fukuoka, Japan (2007)
- ③. Matsuoka, K. Localization and trafficking of multispinning membrane proteins at the transGolgi network and subsequent secretory organelle., International Symposium on Plant Membrane Transport. Tokyo (2010)
- ④. 松岡 健 "輸送体の局在変化による養分吸収・分配の制御と養分欠乏が誘導する分解系" 九州大学農学研究院植物資源科学部門 第1回専攻セミナー 福岡 (2006)
- ⑤. 松岡 健 "蛍光モデルタンパク質とタバコ cDNA マイクロアレイを用いた植物細胞の窒素欠乏応答の解析" 2007年度土壌肥料学会九州支部春期例会特別講演 福岡(2007)
- ⑥. 松岡 健 "植物分泌系における4回膜貫通タンパク質の輸送と局在" 公開シンポジウム「植物膜輸送」の最前線 東京 (2007)
- ⑦. Ken Matsuoka "Secretory vesicle cluster: a Golgi-to-plasma membrane transport

- compartment containing SCAMP2 in tobacco cell- “ Invited Seminar at Chinese University of Hong Kong. Hong Kong (2008)
- ⑧. 松岡 健, 豊岡公德, 浅妻 悟, 後藤友美, 三ツ井敏明 “Secretory Vesicle Cluster : トランスゴルジネットワーク由来の分泌系後期で働く新奇構造体” 第 49 回日本植物生理学会シンポジウム「小胞輸送研究の新展開: 構造・動きと局在制御の分子機構」 札幌 (2008)
- ⑨. 松岡 健, 豊岡公德, 浅妻 悟, 森口 亮, ゴルジ装置と細胞増殖: 細胞壁成分合成系の局在と細胞外への大量輸送装置, 第 82 回日本生化学会大会 シンポジウム 2Sa14a 植物の成長生理とメンブレントラフィック, 神戸 (2009)
- ⑩. 佐藤繭子, 後藤友美, 豊岡公德, 松岡 健, 植物細胞における液胞形成機構の細胞生物学的解析, 第 51 回日本植物生理学会年会, 熊本 (2010) .
- ⑪. 赤井政郎, 小内清, 森下めぐみ, 草野都, 佐藤繭子, Henning Redesting 小林誠, 大槻瞳, 豊岡公德, 松岡 健, 斎藤和季, 石浦正寛, 魚住信之, 光混合栄養生長に必要な *Synechocystis* sp PCC6803 アクアポリンの解析, 第 51 回日本植物生理学会年会, 熊本 (2010) .
- ⑫. 林恭子, 平田励, 浅妻 悟, 豊岡公德, 松岡 健, 後期分泌系構造体 Secretory Vesicle Cluster に含まれる蛋白質の解析, 第 51 回日本植物生理学会年会, 熊本 (2010) .
- ⑬. 浅妻 悟, 豊岡公德, 後藤友美, 松岡 健, タバコ培養細胞におけるショ糖輸送体の局在と分解, 第 51 回日本植物生理学会年会 熊本 (2010) .
- ⑭. 豊岡公德, 後藤友美, 佐藤繭子, 松岡 健, 高圧凍結技法による単膜系オルガネラの網羅的解析: 根冠組織, 第 51 回日本植物生理学会年会, 熊本 (2010) .
- ⑮. 浅妻悟, 豊岡公德, 後藤友美, 松岡 健, タバコ培養細胞におけるショ糖輸送体の細胞内局在と栄養飢餓による分解制御の解析, 日本農芸化学会 2009 年度大会 福岡(2009)
- ⑯. 平田励, 浅妻悟, 豊岡公德, 松岡 健, 後期分泌系構造体 Secretory Vesicle Cluster の単離と含まれる蛋白質の解析, 日本農芸化学会 2009 年度大会 福岡(2009)
- ⑰. 加藤貴一, Ivan Galis, 鈴木しをり, 松岡 健, 伊藤正樹, R1R2R3-Myb 転写活性化因子を過剰発現する ZBY2 細胞のトランスクリプトーム解析, 日本植物生理学会創立 50 周年記念年会 名古屋(2009).
- ⑱. 豊岡公德, 後藤友美, 佐藤繭子, 黒森崇, 吉本光希, 前島正義, 松岡健, 高圧凍結技法を用いた液胞形成機構の免疫組織化学的解析, 日本植物生理学会創立 50 周年記念年会名古屋(2009).
- ⑲. 北島彩, 岡田久夫, 浜田侑紀, 豊岡公德, 浅妻 悟, 松岡 健, 中野明彦, 三ツ井敏明, イネ糖タンパク質 α -アミラーゼ I-1 のゴルジ体-プラスチド間輸送に関する研究, BMB 2008 (第 31 回日本分子生物学会 第 81 回日本生化学会 合同大会) 神戸 (2008).
- ⑳. 松岡 健, 後藤友美, 豊岡公德, 浅妻 悟, タバコ細胞における分泌系オルガネラ解析の為に複数回膜貫通蛋白質の局在と動態の解析, BMB 2008 (第 31 回日本分子生物学会 第 81 回日本生化学会 合同大会)
21. 豊岡公德, 後藤友美, 佐藤繭子, 松岡 健, Secretory vesicle cluster を介した分泌機構の解析, 第 49 回日本植物生理学会年会, 2008. 03.
22. 浅妻 悟, 後藤友美, 豊岡公德, 松岡 健, タバコ培養細胞の糖処理におけるショ糖輸送体の細胞内局在と発現調節, 第 49 回日本植物生理学会年会, 札幌 (2008)
23. 佐藤繭子, 後藤友美, 松岡 健, 篠崎一雄, 豊岡公德, 植物組織凍結超薄ライブライリーの作製とその免疫電子顕微鏡観察法の検討, 第 49 回日本植物生理学会年会, 札幌 (2008).
24. 北嶋 彩, 唐橋あゆみ, 高田 頌, 豊岡公德, 浅妻 悟, 松岡 健, 中野明彦, 三ツ井敏明, イネ糖タンパク質 α -アミラーゼ I-1 のプラスチドターゲティング: ゴルジ-プラスチド間輸送の解析, 第 49 回日本植物生理学会年会 札幌 (2008).
25. Mst. Nasrin Akhter BANU, Md. Anamul HOQUE, Megumi WATANABE-SUGIMOTO, Ken MATSUOKA, Yoshimasa NAKAMURA, Yasuaki SHIMOISHI, Yoshiyuki MURATA, Protective roles of proline and glycinebetaine in NaCl-induced cell death in cultured tobacco cells, 日本農芸化学会 2008 年度大会 名古屋 (2008)
26. Shin Hamamoto, Junichiro Marui, Ken Matsuoka, Tetsuro Mimura, Tsuyoshi Nakagawa, Yoshiyuki Murata, Yoichi Nakanishi, Masayoshi Maeshima, Isamu Yabe, Nobuyuki Uozumi, Functional expression of tobacco K⁺ channels in yeast tonoplast, XIV International workshop on plant membrane biology. Valencia, Spain. (2007)

[図書] (計 5 件)

- ①. Aniento, F., Matsuoka, K. and Robinson, D.

- G. (2006) “ER-to-Golgi Transport: The COPII-Pathway” in: “The Plant Endoplasmic Reticulum, Plant Cell Monographs, Vol. 4” pp 99-124. Ed. D. G. Robinson. Springer-Verlag, (Heidelberg).
- ②. Tobacco BY-2 Cells: From Cellular Dynamics to Omics. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 58. Eds. Toshiyuki Nagata, Ken Matsuoka and Dirk Inzé. Springer Verlag. (2006)
- ③. Toyooka, K. and Matsuoka, K. (2006) “Autophagy and non-classical vacuolar targeting in tobacco BY-2 cells” in “Tobacco BY-2 Cells: From Cellular Dynamics to Omics” pp.167-180. Eds. T. Nagata, K. Matsuoka and D. Inze. Springer-Verlag (Heidelberg).
- ④. Matsuoka, K. and Galis, I. (2006) “EST and microarray analysis of tobacco BY-2 cells” in “Tobacco BY-2 Cells: From Cellular Dynamics to Omics” pp.293-311. Eds. T. Nagata, K. Matsuoka and D. Inze. Springer-Verlag (Heidelberg).
- ⑤. Matsuoka, H., Yamada, Y., Matsuoka, K., Saito. M. (2006) “High throughput microinjection technology for the single-cell analysis of BY-2 *in vivo*” in “Tobacco BY-2 Cells: From Cellular Dynamics to Omics” pp.339-346. Eds. T. Nagata, K. Matsuoka and D. Inze. Springer-Verlag (Heidelberg).
- ⑥. Matsuoka, K., (2009) Chimeric Fluorescent Fusion Proteins to Monitor Autophagy in Plants” in Meth. Enzymol Vol. 451. Autophagy: Lower eukaryotes and non-mammalian systems. pp. 541-555. Ed. D. Klionsky, Elsevier Scientific Publishers.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 健 (MATSUOKA KEN)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号：40222294

(2) 研究分担者

豊岡 公德 (TOYOOKA KIMINORI)
独立行政法人理化学研究所・
機能開発研究グループ・研究員
研究者番号：10360596

(3) 連携研究者

()

研究者番号：