

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07457

研究課題名(和文)植物ペルオキシソームの多様性と適応性の獲得機構

研究課題名(英文) Mechanism on diversity and adaptability of plant peroxisome

研究代表者

真野 昌二 (Mano, Shoji)

基礎生物学研究所・オルガネラ制御研究室・准教授

研究者番号：20321606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナ *apem* (aberrant peroxisome morphology) 変異体の解析を進め、ペルオキシソームタンパク質輸送やペルオキシソーム膜脂質に関する分子機構を明らかにした。シロイヌナズナのペルオキシソーム関連因子をコードする遺伝子が、ゼニゴケやギンリョウソウに存在することを明らかにした。タンパク質輸送については、陸上植物で使用されているPTS (Peroxisome targeting signal) 1とPTS2輸送系が、ゼニゴケにも存在することが明らかとなり、植物の陸上化の初期に獲得されていたことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペルオキシソーム形成や機能発現の制御機構の解析は、これまでシロイヌナズナを中心に進められてきたが、このシロイヌナズナの知見が植物に共通なものなのかは明らかにされていなかった。本研究成果から、ペルオキシソームタンパク質の輸送機構については共通性が高いこと、進化の過程で遺伝子重複により機能の多様性を獲得していったことが明らかとなった。ペルオキシソームは、植物のみならず動物や酵母の細胞においても必須のオルガネラであることから、本研究成果は、真核生物におけるペルオキシソーム形成や機能発現の共通原理の理解における知見として意義がある。

研究成果の概要(英文)：To better understand molecular mechanism(s) on diversity and adaptation of plant peroxisomes, we searched for peroxisomal genes in *Marchantia polymorpha* genome, which were homologous to *Arabidopsis* peroxisomal genes. The results using *Marchantia polymorpha* showed that PTS (Peroxisome Targeting Signal) 1 and PTS2 pathways, which were used in vascular land plants, were present in *Marchantia polymorpha*, indicating that these pathways were acquired at the earlier evolutionary history for land plants. In addition, we identified some *Arabidopsis* APEM (Aberrant PEROxisome Morphology) genes, whose defects affected peroxisome biogenesis including protein transport, and characterized their gene-products.

As a research tool, we generated various Gateway technology-compatible destination vectors that were dedicated for *Marchantia polymorpha* research. These vectors are provided to researchers at home and abroad free of cost.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ペルオキシソーム 多様性 シロイヌナズナ *apem*変異体 タンパク質輸送 ゼニゴケ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームは、酵母や動物、植物など真核細胞に存在するオルガネラで、脂肪酸代謝や活性酸素の除去といった共通の機能をもつ。それら共通の機能に加え、酵母ではアルコール発酵、動物では胆汁酸の生合成、植物では光呼吸など生物種に特化した機能が存在する。また、形成機構においても共通性と多様性があり、例えば、ペルオキシソームへのタンパク質輸送では、共通の Peroxin (PEX) タンパク質が関与しているものの、その使われ方は生物種によって異なっていることが明らかとなっていた。申請者は、ペルオキシソームの形態や大きさ、数、細胞内分布、タンパク質輸送に異常を示すシロイヌナズナ *apem* (*aberrant peroxisome morphology*) 変異体を多数単離して、ペルオキシソーム形成機構の解析を進めてきた。これまでに、*APEM1*、*APEM2*、*APEM3*、*APEM4*、*APEM9*、*APEM10* 遺伝子の同定とそれら遺伝子産物の機能について明らかにしている。また、基部陸上植物として位置づけられている、ゼニゴケのゲノム解読が終了し、加えて、次世代シーケンズ技術の発展により、非モデル植物のペルオキシソーム遺伝子にもアプローチできるようになったことから、シロイヌナズナやゼニゴケといったモデル植物から得られた知見が、他の植物にも当てはまるのか、あるいは特異性があるのかを解析できるようになった。

2. 研究の目的

本研究は、シロイヌナズナ *apem* 変異体の解析を進め、ペルオキシソームの新たな制御機構を解明するとともに、ゼニゴケのバイオインフォマティクス解析から得られたシロイヌナズナのペルオキシソーム因子のホモログを同定し、それらの機能解析から共通性あるいは特異性を明らかにすることを計画した。

また、非モデル植物として、シロイヌナズナとは異なる生活様式をもつツツジ科の菌従属栄養植物のギンリョウソウとハマウツボ科のオロバンキにおける、ペルオキシソーム因子の同定を行い、植物ペルオキシソームの適応性についても検証する計画を立てた。

3. 研究の方法

(1) *APEM7* 遺伝子がコードするタンパク質はユビキチン結合活性をもつタンパク質と相同性を示すことが明らかとなったため、ユビキチン結合能を *in vitro* ubiquitination アッセイにより検討した。

(2) *APEM7*、*APEM8* 遺伝子がコードするタンパク質の機能解析を行うため、特異抗体を作製するとともに、*APEM7* とペルオキシソーム機能との関係を明らかにするために、ショ糖要求性、4-(2,4-dichlorophenoxy)butyric acid 耐性との検討を行った。

(3) *APEM7* プロモーターの下流に *GUS* 遺伝子をつないだ融合遺伝子を導入したシロイヌナズナを用いて、*APEM7* 遺伝子発現の解析を行った。

(4) *apem6* 変異体は機能未知のタンパク質をコードしているが、3次元モデル予測から、脂質結合タンパク質と相同性があることが示されたので、脂質結合能の検討を行った。

(5) 細胞内局在性を明らかにするために、*APEM6*、*APEM7* と *GFP* との融合遺伝子を作製し、パーティクルガンあるいは Agro-infiltration 法により、タマネギの表皮細胞あるいはタバコの細胞で一過的に発現させた。また、*APEM7* 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察による、超微細観察を行った。

(6) ゼニゴケにおけるペルオキシソームタンパク質輸送系の知見を得るために、PTS1 あるいは PTS2 を付加した蛍光タンパク質を導入した。また、ゼニゴケの形質転換系を構築するための Gateway 技術による Destination vector を開発した。

(7) バイオインフォマティクスにより明らかにしたゼニゴケのペルオキシソーム遺伝子のいくつかを Crispr/Cas9 法によるゲノム編集に破壊し、その影響を検討した。

(8) ギンリョウソウとオロバンキの RNA-seq 解析を行い、両植物におけるペルオキシソーム遺伝子の同定と解析を試みた。

4. 研究成果

(1) *APEM7* 遺伝子は、酵母 Peroxin 4 (PEX4) と相同性を示すタンパク質をコードしている。酵母の PEX4 は Ubiquitin-conjugating (UBC) enzyme として機能することが報告されているが、多細胞生物での PEX4 ホモログの同定、およびそれらの UBC 活性は報告されていない。そこで、ウサギ網状赤血球ライセートを用いた無細胞翻訳系による検出を行ったところ、非還元条件下では PEX4 の大きさに相当する約 17 kD のタンパク質に加え、ユビキチン 1 分子に相当する大きさの約 27 kD のタンパク質が検出された。この 27 kD のタンパク質は還元条件下で消失し、17 kD タンパク質の量が増加することが明らかとなった。また、ユビキチンが結合すると想定されたシステインをアラニンに置換した場合には、非還元条件下でも 27 kD タンパク質は検出されないことから、PEX4 がユビキチンを結合する活性を有していることが明らかとなった。

(2) *APEM7/PEX4* および *APEM8* の部分長を大腸菌で発現させて抗原とし、ウサギを免疫して特異抗体を作製した。両抗体とも推定分子量に相当する大きさのポリペプチドを認識した。PEX4 抗体は、野生型では非還元条件下は 17 kD と 27 kD のポリペプチド、還元条件下では 17 kD のポリペプチドのみを認識したが、*apem7* 変異体では還元条件下においても一部の 27 kD のポリペプチド検出されたことから、*apem7* 変異体では還元剤の影響を受けないアミノ酸にユビキチンが結合するという異常なユビキチン化が起きていると考えられた。

また、*apem7* のシヨ糖要求性と 4-(2,4-dichlorophenoxy)butyric acid (2,4-DB) 耐性を調べるために、シヨ糖を含まない培地と 2,4-DB を含む培地での発芽試験を行ったところ、野生型に比べるとシヨ糖を含まない培地での発芽は著しく低下し、2,4-DB 培地においては少し耐性を示したことから、脂肪酸酸化系が *apem7* において低下していることが明らかとなった。

(3) *apem7* の発現時期や発現組織を明らかにするために、*PEX4* プロモーター下で GUS を発現する形質転換シロイヌナズナを作製し、GUS 染色実験を行った。*PEX4* 遺伝子は、葉や花弁の維管束、雌しべの柱頭で発現するほか、老化が始まった古い葉で発現が高いことが明らかとなった。

(4) *APEM6* は、一次アミノ酸配列からは相同性のあるタンパク質の情報得不到機能未知の新規タンパク質をコードしているが、三次元構造の予測モデルから脂質結合能をもつタンパク質と相同性の部位を持つことがあきらかとなった。そこで、種々の脂質がプロットされたメンブレンを用いた結合解析を行ったところ、実際に脂質結合活性をもつことが明らかとなった。

(5) *APEM6* あるいは *APEM7/PEX4* と GFP との融合遺伝子を用いて一過的な発現実験を行ったところ、*APEM6* はペルオキシソームだけでなくミトコンドリアや葉緑体、小胞体といった複数のオルガネラに局在することが明らかとなった。*APEM7/PEX4* はペルオキシソームに局在することが明らかとなった。また、作製した PEX4 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察から、*APEM7/PEX4* はペルオキシソームの膜に存在することが示された。

(6) PTS2-Citrine-PTS1 と mRFP-PTS1 を同時に発現する形質転換ゼニゴケを作製したところ、両蛍光がドット状の構造として観察された。免疫電子顕微鏡観察から、このドット状の構造がペルオキシソームであることが明らかとなり、ゼニゴケに PTS1 輸送系と PTS2 輸送系が存在することが明らかとなった。

また、形質転換ゼニゴケの作製を簡便に行うために、40 個の R4pMpGWB ベクターと 32 個の R4L1pMpGWB ベクターを開発した。これらは Gateway 技術を用いた Destination ベクターであり、R4pMpGWB シリーズは、任意のプロモーター下で任意の遺伝子とタグ/マーカー遺伝子との融合遺伝子の作製、R4L1pMpGWB シリーズは任意のプロモーター下でのタグ/マーカー遺伝子の発現用融合遺伝子を容易に作製できる。既に、国内・国外からの研究者の要望に応じて配布を進めている。

(7) バイオインフォマティクス解析により、同定したゼニゴケゲノムにおけるペルオキシソーム関連遺伝子のうち、まず 5 つについて Crispr/Cas9 法によるゲノム編集を行い、遺伝子破壊を試みたところ、1 つ (*ATG2*) を除いて遺伝子破壊株は得られなかった。*ATG2* の破壊株は、シロイヌナズナの *agt2* 変異体で観察される著しい早老性を示した。

(8) 既に行っていたギンリョウソウとオロバンキの RNA-seq 解析を進め、ギンリョウソウではタンパク質輸送や増殖などの形成に関わる遺伝子や脂肪酸代謝などの遺伝子は発現しているものの、光呼吸に関連する遺伝子は発現していないことが明らかとなった。オロバンキについては、現在 GO 解析等を進めている。

以上のように、当初計画していたシロイヌナズナを用いたペルオキシソームの新規制御機構について、ユビキチン系を介したタンパク質輸送、オルガネラ間の膜脂質のリモデリングなどの知見を得ることができ、現在論文を執筆中である。APEM8 については、今後詳細な解析を進めて行く。他にも原因遺伝子が未同定な *apem* 変異体があるため、順次、原因遺伝子を明らかにしていきたい。

このシロイヌナズナで明らかにされたペルオキシソームの機能発現や形成機構については、少なくともタンパク質輸送についてはゼニゴケにおいても保存されていることが明らかとなり、進化過程におけるゼニゴケの位置づけを考えると、陸上化の初期の過程で既にペルオキシソームへのタンパク質輸送系が獲得されていたことが示された。今後は分裂や増殖の仕組みについても解析していく予定である。Crispr/Cas9 法による遺伝子破壊実験は、一部の遺伝子の破壊株しか得られなかったが、これはゼニゴケの葉状体がハプロイドであり、細胞におけるペルオキシソーム機能の重要性を考えると、遺伝子破壊された株が致死になってしまっている可能性がある。今後は RNAi 等の機能抑制株による解析を進めて行く必要がある。

次世代シーケンサーの発達により非モデル植物における解析も可能となったことから、菌従属植物のギンリョウソウと絶対寄生植物のオロバンキという生存戦略が、シロイヌナズナやゼニゴケと全く異なる植物におけるペルオキシソーム機能の解析を試みた。菌従属性の獲得により光合成を欠失したギンリョウソウでは、ペルオキシソーム機能のうち光呼吸という光合成機能を支える代謝系の遺伝子発現が見られず、植物の生活様式に対応したペルオキシソーム機能の存在が明らかとなった。今後はオロバンキの詳細な解析を進めて、論文としてまとめて行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kozuka, T., Sawada, Y., Imai, H., Kanai, M., Yokota-Hirai, M., Mano, S., Uemura, M., Nishimura, M., Kusaba, M., and Nagatani, A.	4. 巻 182
2. 論文標題 Regulation of sugar and storage oil metabolism by phytochrome during de-etiolation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1114-1129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.19.00535	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Goto-Yamada, S., Oikawa, K., Bizan, J., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Mano, S., Hayashi, M., Ueda, H., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., and Yamada, K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Sucrose starvation induces microautophagy in plant root cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamauchi, S., Mano, S., Oikawa, K., Hikino, K., Teshima, M.K., Kimori, Y., Nishimura, M., Shimazaki, K., and Takemiya, A.	4. 巻 116
2. 論文標題 Autophagy controls reactive oxygen species homeostasis in guard cells that is essential for stomatal opening	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 19187-19192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1910886116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sultana, M.M., Dutta, A.K., Tanaka, Y., Aboulela, M., Nishimura, K., Sugiura, S., Niwa, T., Maeo, K., Goto-Yamada, S., Kimura, T., Ishiguro, S., Mano, S., and Nakagawa, T.	4. 巻 297
2. 論文標題 Gateway binary vectors with organelle-targeted fluorescent proteins for highly sensitive reporter assay in gene expression analysis of plants.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biotechnology	6. 最初と最後の頁 19-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiotec.2019.03.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mano, S., Nishihama, R., Ishida, S., Hikino, K., Kondo, M., Nishimura, M., Yamato, T.K., Kohchi, K., and Nakagawa, T.	4. 巻 3
2. 論文標題 Novel gateway binary vectors for rapid tripartite DNA assembly and promoter analysis with various reporters and tags in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0204964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0204964	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujikawa, Y., Suekawa, M., Endo, S., Fukami, Y., Mano, S., Nishimura, M., and Esaka, M.	4. 巻 83
2. 論文標題 Effect of mutation of C-terminal and heme binding region of Arabidopsis catalase on the import to peroxisomes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 322-325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1530094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aboulela, M., Tanaka, Y., Nishimura, K., Mano, S., Kimura, T., and Nakagawa, T.	4. 巻 92
2. 論文標題 A dual-site gateway cloning system for simultaneous cloning of two genes for plant transformation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plasmid	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plasmid.2017.05.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aboulela, M., Tanaka, Y., Nishimura, K., Mano, S., Nishimura, M., Ishiguro, S., Kimura, T., and Nakagawa, T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of an R4 dual-site (R4DS) gateway cloning system enabling the efficient simultaneous cloning of two desired sets of promoters and open reading frames in a binary vector for plant research.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0177889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0177889.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanai, M., Mano, S., and Nishimura, M.	4. 巻 119
2. 論文標題 An efficient method for the isolation of highly purified RNA from seeds for use in quantitative transcriptome analysis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Vis. Exp.	6. 最初と最後の頁 e55008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/55008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 神垣あかね、西村幹夫、真野昌二
2. 発表標題 ペルオキシソーム形成に関わるシロイヌナズナAPEM6様タンパク質の機能比較
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石本聖絵、鈴木雅晴、杉木愛、木寄暁子、真野昌二、野坂(高橋)実鈴、鈴木俊哉、タキムニユン、志水(佐藤)佐江、豊田敦、鈴木孝征、田畑亮、櫻井望、澤進一郎、長戸康郎、マッカーティードナルド、佐藤豊
2. 発表標題 水溶性ビタミンを介した母体による胚と胚乳の発生制御
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神垣あかね、西村幹夫、真野昌二
2. 発表標題 オルガネラ形成に関わるシロイヌナズナAPEM6ホモログの機能解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内翔太、真野昌二、及川和聡、曳野和美、手島康介、木森義隆、西村幹生、島崎研一郎、武宮淳史
2. 発表標題 オートファジーは孔辺細胞ROSホメオスタシスを制御することで青色光依存の気孔開口を可能にする
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真野昌二
2. 発表標題 植物細胞を覗く ~ミクロの世界の探索~
3. 学会等名 大学共同利用機関シンポジウム2018 ~最先端研究大集合~ (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神垣あかね、西村幹夫、真野昌二
2. 発表標題 ペルオキシソーム形成に関わる新規因子APEM6の機能と局在制御
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mano, S., Goto-Yamada, S., Oikawa, K., and Nishimura, M.
2. 発表標題 Identification and characterization of molecular players for peroxisome biogenesis and functions based on imaging-based approach
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mano, S., Nishihama, R., Ishida, S., Kazumi, H., Kondo, M., Yamato, K., Kohchi, T., and Nakagawa, T.
2. 発表標題 Development of two Gateway binary vector series for the assembly of three DNA fragments and promoter analysis in Marchantia polymorpha
3. 学会等名 The 65th NIBB Conference Marchantia Workshop 2017 Renaissance of Marchantia polymorpha -the genome and beyond (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 真野昌二
2. 発表標題 イメージング技術を用いた植物ペルオキシソーム研究
3. 学会等名 第1回プラントバイオイメージング研究会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Goto-Yamada, S., Mano, S., Oikawa, K., and Nishimura, M.
2. 発表標題 Roles of LON protease and autophagy in the peroxisome quality control.
3. 学会等名 EUROBIOTEC 2017 EXPO (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 真野昌二、及川和聡、後藤-山田志野、Cui Songkui、林誠、西村幹夫
2. 発表標題 植物の高次機能を支えるペルオキシソーム機能発現と形成機構
3. 学会等名 ConBio2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Goto-Yamada, S., Hikino, K., Nishimura, M., Nakagawa, T., and Mano, S.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer.	5. 総ページ数 355
3. 書名 Methods in Molecular Biology. Two-Hybrid Systems. Methods and Protocol	

〔産業財産権〕

〔その他〕

オルガネラ制御研究室 http://www.nibb.ac.jp/plantorganelles/

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------