

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18570047
 研究課題名（和文）高等植物細胞の極性確立におけるタンパク質小胞輸送系の役割の
 解明
 研究課題名（英文）Role of membrane trafficking on the establishment of cell polarity
 in higher plants.
 研究代表者
 佐藤 雅彦（Sato Masahiko）
 京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授
 研究者番号：20283575

研究成果の概要：高等植物細胞の極性確立におけるタンパク質小胞輸送系の役割を解明するために、9種類のシロイヌナズナの細胞膜型 SNARE(SYP111, SYP112, SYP121, SYP122, SYP123, SYP124, SYP125, SYP131, SYP132)の植物体の発達時における発現パターンと細胞膜上における局在パターンの解析を行った。その結果、それぞれの SNARE 分子は、発達段階によって異なる発現パターンと局在パターンを示すことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	1,500,000	0	1,500,000
19年度	1,400,000	420,000	1,820,000
20年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	630,000	4,230,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：SNARE, 細胞内小胞輸送、極性輸送、極性確立、シロイヌナズナ, GFP

1. 研究開始当初の背景

本研究開始当初は、我々グループを中心とした専攻研究によって、シロイヌナズナゲノム中に存在する SNARE 遺伝子 54 種類の産物の細胞内局在が決定された状況であった。これらの研究によって、細胞膜上には、Qa-SNARE が 9 種類、Qb-SNARE が 3 種類、R-SNARE が 5 種類発見され、他のオルガネラ膜に比べて細胞膜では非常の多くの SNARE 分子が存在することが明らかとなっていた。しかしながら、細胞膜に存在する個々の SNARE 分子の機能については、一部分の分子の解析が行われているのみで、その他の大部分についての機能は未知のまま

あった。

2. 研究の目的

(1) 極性輸送に関与する SNARE 分子の解析

本研究計画では、細胞極性に関与する SNARE 分子の更なる探索、既に同定された極性輸送に関係する SNARE の局在メカニズムの解析、極性輸送に関わる SNARE 分子と相互作用する分子群の探索などを行う。更に、植物細胞の極性確立に係る細胞内小胞輸送系と、その際に起こるエキソサイトーシスおよびエンドサイトーシスに関連するオルガネラの動態を各種のオルガネラマーカーを同時に用いてリアルタイム観察を行い、

細胞の極性確立時におけるオルガネラとオルガネラ間をつなぐ輸送システムのダイナミズムを詳細に解析する。これらの解析を通じて、植物細胞の極性確立がどのようなメカニズムで行われているか、更に、オルガネラの動的な挙動が極性確立にどのように関与しているかを分子生物学的に解析し、最終的には細胞内小胞輸送系のダイナミズムが、植物細胞の極性確立、植物の形態形成および生理応答にどのように機能しているかについて分子レベルで理解することを目的としている。

(2) 小胞体膜と細胞膜に同時に局在する植物特異的 SNARE 分子 SYP7 の解析

我々の先行研究によって、植物特異的 Qc-SNARE、SYP7 は小胞体に局在することが明らかとなっていた。しかしながら、細胞膜には、Qb-SNARE、NPSN に対応する Qc-SNARE が存在せず、他のグループによって SYP7 が細胞膜に存在する可能性も示唆されていた。我々は、SYP7 の細胞膜上の局在を目的として、形質転換植物を作成し、各種解析を行った。

(3) SNARE 分子を利用した細胞内タンパク質輸送制御技術の開発

細菌の重金属輸送体などの機能性膜タンパク質を植物細胞などの真核生物の細胞に発現させた場合、どのオルガネラに局在するかは、不明である。我々は、細菌の機能性膜タンパク質のオルガネラ局在を制御するために、各種オルガネラに局在することが明らかとなっている SNARE 分子を輸送制御タグとして利用する技術を開発することを旨とした研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 極性輸送に関与する SNARE 分子の解析

シロイヌナズナ植物体の発達段階における各細胞膜型 Qa-SNARE 分子の発現パターンおよび細胞膜上での局在パターンを調べるために、各 Qa-SNARE 遺伝子の上流プロモーター領域 3kb の直下に GFP 遺伝子および各 SNARE 分子をインフレームで結合したコンストラクトを TT-PCR 法を用いて pGWB1 バイナリーベクター上へ作成した。その後、これらのコンストラクトを用いて、アグロバクテリア法により各 GFP 融合型 SNARE 分子を発現する形質転換シロイヌナズナを作成した。それらの形質転換体を用いて、共焦点レーザー顕微鏡により、発達段階における各 SNARE 分子の発現パターンと差相棒膜上での局在パターンを詳細に観察した。

(2) 小胞体膜と細胞膜に同時に局在する植物特異的 SNARE 分子 SYP7 の解析

植物体での SYP7 の細胞内局在を調べるために、抗 SYP7 抗体を作成し、ショ糖密度勾配遠心法により、SYP7 が局在するオルガネラ

膜を同定した。さらに SYP71, SYP72, SYP73 の自己プロモーター下で GUS 遺伝子を発現する形質転換シロイヌナズナと自己プロモーター下で GFP-SYP71 形質転換シロイヌナズナをそれぞれ作成し、SYP7 ファミリーの発現パターンと SYP71 の植物細胞におけるオルガネラ局在パターンを解析した。

(3) SNARE 分子を利用した細胞内タンパク質輸送制御技術の開発

SNARE 分子が外来膜タンパク質の輸送タグとして機能するか調べるために、水銀耐性菌 *Shigella flexneri* の水銀輸送タンパク質 MerC の N 末端に GFP、C 末端に液胞膜 SNARE、AtVam3 または細胞膜型 SNARE、SYP121 を結合した融合タンパク質をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの制御化で発現するコンストラクトを作成し、それらをシロイヌナズナ培養細胞に発現させ、細胞内における局在性を観察した。

4. 研究成果

(1) 極性輸送に関与する SNARE 分子の解析

(a) シロイヌナズナの発達段階における SNARE の発現パターン

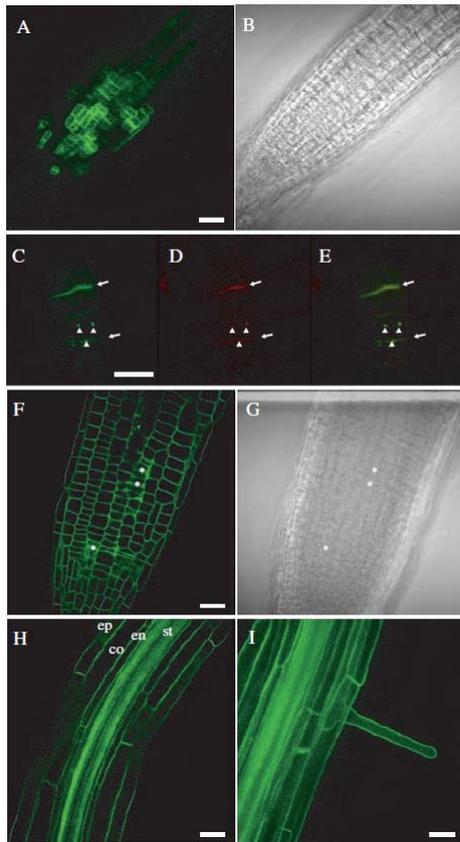
シロイヌナズナの細胞膜上には、Qa-SNARE が 9 種類 (SYP111, SYP112, SYP121, SYP122, SYP123, SYP124, SYP125, SYP131, SYP132) 存在していることが、われわれの先行研究によって明らかにされている。今回の研究では、これらの SNARE を自己プロモーターの制御化で GFP 融合タンパク質の形で発現できる形質転換シロイヌナズナを作成して、様々な発達段階における発現パターンと細胞膜上における局在性を解析した。

その結果、根においては、SYP111 は根端の分裂組織のみに発現しており、さらに分裂中の細胞の細胞板に局在することがあきらかとなった。この発現パターンは、既に SYP111 抗体を用いて報告されている発現および局在パターンと同一であり、このことは、我々の自己プロモーター解析システムが正確な発現・局在パターンを示していることを表していると考えられた。

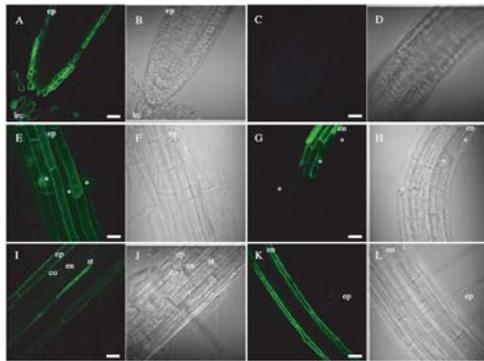
一方、SYP132 は、植物体全体で発現し、発現している細胞の細胞膜に均一に局在していることが明らかとなった (図 1)。SYP121 は、根端では、表皮細胞とコルメラ細胞のみで発現しているが、SYP122 は、根端での発現は観察されなかった。伸長部では、SYP121 は表皮細胞のみで発現しているのに対し、SYP122 は、内皮細胞のみで発現が観察された (図 2)。

根において最も、特徴的な発現パターンを示した SNARE 分子は、SYP123 である。SYP123 は、根毛細胞のみで発現を示し、さらに根毛の先端部分に集中的に偏在していることが明らかとなった。これらの結果より、SYP123

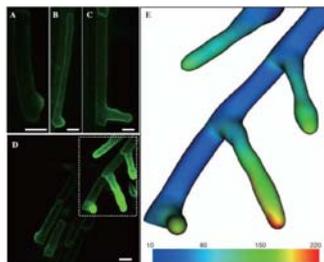
は、根毛の伸長に参与している SNARE 分子である可能性が示唆された (図 3)。



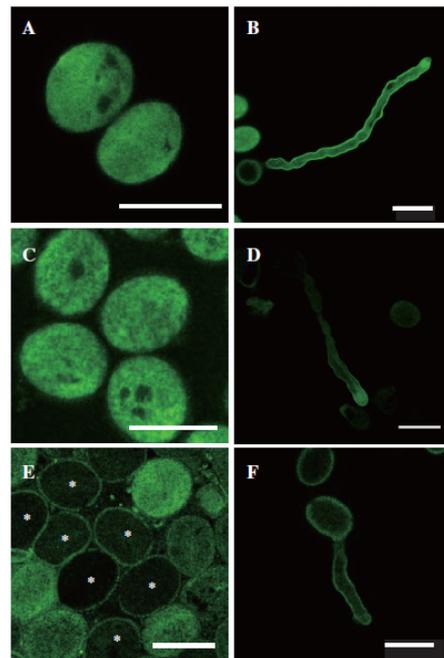
(図 1) 根における SYP111, SYP132 の発現パターン。A; SYP111, B; SYP111 DIC-image, C; SYP111, D; FM4-64, E; Merge, F-I; SYP132



(図 2) 根における SYP121, SYP122 の発現パターン。A, B, E, F, I, J ; SYP121, C, D, G, H, K, L; SYP122



(図 3) 根における SYP123 の発現パターン。



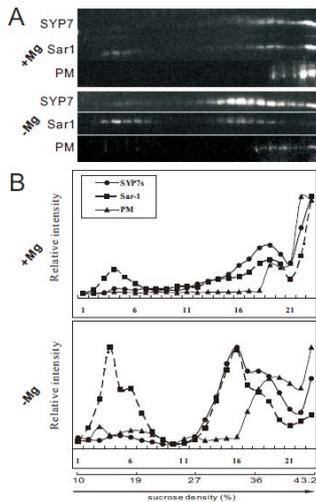
(図 4) 花粉における SYP124, SYP125, SYP131 の発現パターン。A, B; SYP124, C, D; SYP125, E, F; SYP131

地上部において、特徴的な発現パターンを示す SNARE は、花粉においてのみ発現している SYP124, SYP125, SYP131 である。SYP124, SYP125 は、発芽していない花粉粒本体では、細胞質中に散在しているが、花粉管が発芽すると花粉管の先端に局在ようになる。このことは、花粉管の伸長に SYP124, SYP125 が関与していることを表している。それに対して SYP131 は花粉管において明確な先端部分への局在は示さなかった (図 4)。

(2) 小胞体膜と細胞膜に同時に局在する植物特異的 SNARE 分子 SYP7 の解析

高等植物には、他の真核生物に存在しない SNARE-family として SYP7-family (SYP71, SYP72, SYP73) がある。シロイヌナズナ培養細胞を用いた一過性発現系での解析では SYP7 は小胞膜に存在していたが、今回、SYP7 の細胞内局在を確認するために形質転換体を用いた解析および SYP7 に特異的な抗体を用いた解析を行った。

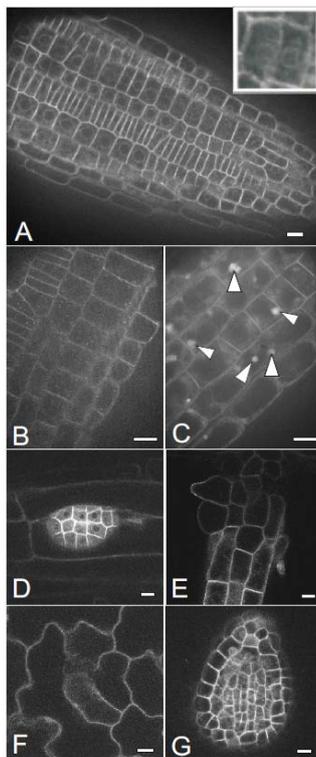
ショ糖密度勾配遠心法によって、シロイヌナズナのミクロソームを分画後、抗 SYP7 抗体を用いて、SYP7 タンパク質が存在する画分を解析した。その結果、SYP7 は、小胞体と細胞膜の両方の膜に存在することが明らかとなった。



(図5) ショ糖密度勾配遠心法による SYP7 の局在解析

また、自己プロモーターの制御下で GFP-SYP71 を発現する形質転換シロイヌナズナを用いた解析によると、GFP-SYP71 は大部分の細胞で、細胞膜に局在するが、分裂中の細胞では、細胞膜に加えて、小胞体にも局在することが明らかとなった (図6)。

これらの結果より、SYP7 は、シロイヌナズナにおいて、小胞体と細胞膜に同時に局在することが明らかとなった。この局在パターンは、小胞体と細胞膜との間に、ゴルジ体を介さない直接的な輸送経路がある可能性を示唆するものである。



(図6) 自己プロモーターにより発現した GFP-SYP71 の様々な組織における局在パターン。A, B; 根の先端部分の表皮細胞, C; BFA 処理後, D; 側根の原基, E; 根の基部, F; ロゼッタ葉の表皮細胞, G; 発達中の種子

(3) SNARE 分子を利用した細胞内タンパク質輸送制御技術の開発

本研究では、種々の重金属トランスポーターと AtVAM3 をそれぞれ植物ベクター CaMV35S-sGFP(S65T)-NOS3'に組換え、*gfp* 遺伝子を 5'末端に融合させ、シロイヌナズナ培養細胞における GFP の緑色蛍光から細胞内局在について検討した。重金属トランスポーター遺伝子の植物ベクターへの組換えプラスミドの構築については、PCR 法に従い、各重金属トランスポーター遺伝子を増幅させた。増幅した *merC* はベクター CaMV35S-sGFP (S65T)-NOS3'の *Bgl*II と *Kpn*I サイトに組換え、それぞれプラスミド pGC3 及び pGB4 と命名した。*merC*, *cadA*, *cadD*または *arsB*遺伝子は AtVAM3 をもつベクター CaMV35S-sGFP (S65T)-NOS3'の *Bsp* EI サイトに組換えた。

上述した各組換えプラスミドは、常法に従ってシロイヌナズナ培養細胞内に形質転換した。各組換えプラスミドをもつシロイヌナズナ培養細胞内における GFP の蛍光観察を行った。

図7に示すように、GFP-MerC の大部分はゴルジ体に移行し、一部分は小胞体にとどまっている様子が観察された。そこで、次はこれらの膜タンパク質を標的器官にソーティングするためのシグナル因子として、液胞膜への移行を目的として AtVAM3 (SYP22) 分子を重金属トランスポーターにそれぞれ融合させたタンパク質をエンジニアリングし、培養細胞内における細胞内局在を調べた。その結果、MerC に AtVAM3 分子を融合した場合、液胞膜が強く特異的に染色されており、液胞膜への移行が観察された。一方、MerC に細胞膜の SNARE である SYP121 を結合した場合には、細胞膜上に MerC の局在が観察された。このようにバクテリアのタンパク質に SNARE 分子を結合することによって、シロイヌナズナの培養細胞においてある程度、細胞内輸送を制御できることが明らかとなった。

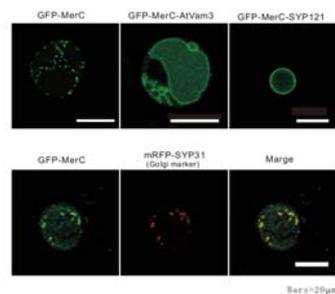


図7 シロイヌナズナ培養細胞における GFP-MerC と GFP-MerC-AtVam3 と GFP-MerC-SYP121 の局在

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) Kazuhiko Enami, Mie Ichikawa, Tomohiro Uemura, Ntsumaro Kutsuna, Seiichiro Hasezawa, Tsuyoshi Nakagawa, Akihiko Nakano, Masa H. Sato, “ Differential expression control and polarized distribution of plasma membrane-resident SYP11 SNAREs in *Arabidopsis thaliana*.” *Plant Cell Physiol.*, (2009) **50**, 280-289
- (2) 清野正子、曾根有香、中條麻澄、佐藤雅彦、松居彩、中村亮介、坂部貢、細菌の金属トランスポーターを利用したファイトレメディエーションのためのバイオエンジニアリング “、臨床環境医学 (2008), 17, 108-117
- (3) Suwastika I Nengah, Tomohiro Uemura, Takashi Shiina, Masa H. Sato, Kunio Takeyasu, “SYP71, a Plant-specific plasma membrane and the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*.” *Cell Struct. Funct.* (2008) **33**, 185-192
- (4) Tsuyoshi Asakura, Shota Hirose, Hiroki Katamine, Aya Kitajima, HIdetaka Hori, Masa H. Sato, Masayuki Fujiwara, Ko Shimamoto, Toshiaki Mitsui “Isolation and proteomic analysis of rice membranes: cis-Golgi membranes labeled with GFP-SYP31.” *Plant Biotech.* (2006) **23**, 475-485

[学会発表] (計21件)

- (1) 第50回日本植物生理学会年会 2009年度年会 平成21年3月21日～24日 名古屋大学 東山キャンパス 「重金属のファイトレメディエーションのためのエンジニアリング」 清野正子、岡由美子、佐藤雅彦、芳生秀光、曾根有香、中村亮介、坂部貢
- (2) 第50回日本植物生理学会年会 2009年度年会 平成21年3月21日～24日 名古屋大学 東山キャンパス 「シロイヌナズナ根毛細胞の先端成長に関わる小胞輸送経路の解明」 江波和彦、井田貴之、西谷亜依子、藤川諭吉、加藤直洋、佐藤雅彦
- (3) 第50回日本植物生理学会年会 2009年度年会 平成21年3月21日～24日 名古屋大学 東山キャンパス 「花成制御に関わるフィトクロム相互作用因子 VOZ の細胞内局在解析」 安居祐季子、硯亮太、西谷亜依子、向川佳

子、佐藤雅彦、河内孝之

- (4) 第50回日本植物生理学会年会 2009年度年会 平成21年3月21日～24日 名古屋大学 東山キャンパス 「陸上植物特異的 DNA 結合タンパク質 VOZ は低温ストレス応答に関与する」 中井勇介、佐藤雅彦、河内孝之、中平洋一
- (5) 19th International conference on Arabidopsis Research Montreal Canada July 23-27, 2008 “Analysis of SNARE localization in pollen grains and elongating pollen tubes” Mie Ichikawa, Kazuhiko Enami, Tomohiro Uemura, Ntsumaro Kutsuna, Seiichiro Hasezawa Masa H. Sato
- (6) 19th International conference on Arabidopsis Research Montreal Canada July 23-27, 2008 “Research on the dynamics of root-hair specific Qa-SNARE and searching of its interacting molecules” Kazuhiko Enami,, Aiko Nishitani, Yukichi Fujikawa, Naohiro Kato, Masa H. Sato
- (7) 日本植物生理学会 2008年度年会 平成20年3月20日～22日 札幌コンベンションセンター 「花粉伸長時における SNARE の局在解析」 市川美恵、江波和彦、植村知博、朽名夏麿、馳沢盛一朗、佐藤雅彦
- (8) 日本植物生理学会 2008年度年会 平成20年3月20日～22日 札幌コンベンションセンター 「シロイヌナズナ細胞膜局在型 SNARE に相互作用するタンパク質の解析」 西谷亜依子、江波和彦、藤川諭吉、加藤直洋、植村知博、佐藤雅彦
- (9) 日本植物生理学会 2008年度年会 平成20年3月20日～22日 札幌コンベンションセンター 「植物特異的転写因子 VOZ の相互作用因子の探索」 中井勇介、高橋紀衣、河内孝之、加藤直洋、佐藤雅彦、中平洋一
- (10) 日本植物生理学会 2008年度年会 平成20年3月20日～22日 札幌コンベンションセンター 「シロイヌナズナ転写因子 VOZ を介した花成制御機構の解析」 安居祐季子、硯亮太、向川佳子、佐藤雅彦、河内孝之

- (11) 日本植物生理学会 2008年度年会 平成
20年3月20日～22日
札幌コンベンションセンター,
「TGNの高次生命現象における機能とダイナ
ミクスの解析」
植村知博、庄田恵子、海老根一生、佐藤雅彦、
上田貴志、中野明彦
- (12) 日本植物生理学会 2008年度年会 平成
20年3月20日～22日
札幌コンベンションセンター、「葉緑体形質転
換法を利用した有機水銀浄化植物作出の試
み」馬場友哉、清野正子、椎名隆、中平洋一、
芳生秀光、佐藤雅彦
- (13) 18th International Conference on
Arabidopsis Research
Beijing, China June 20-23, 2007
“Analysis of trans-Golgi network(TGN)
dynamics in plants.”
Tomohiro Uemura, Keiko Shoda, Takashi
Ueda, Masa H. Sato, Akihiko Nakano
- (14) 18th International Conference on
Arabidopsis Research
Beijing, China June 20-23, 2007
“Expression profiles and intracellular
dynamics of SYP1s;
Plasma-membrane localized Qa-SNARE
family in Arabidopsis.”
Kazuhiko Enami, Tomohiro Uemura,
Masa H. Sato
- (15) 日本植物生理学会 2007年度年会 平成
19年3月28日～30日
愛媛大学 城北キャンパス
「花粉特異的に機能する SNARE 分子の探索」
市川 美恵、江波 和彦、佐藤 雅彦
- (16) 日本植物生理学会 2007年度年会 平成
19年3月28日～30日
愛媛大学 城北キャンパス
「シロイヌナズナの花成制御における VOZ 遺
伝子の機能解析」
硯 亮太、向川 佳子、秋山 昌子、光田 展
隆、佐藤 雅彦、河内 孝之
- (17) 日本植物生理学会 2007年度年会 平成
19年3月28日～30日
愛媛大学 城北キャンパス
「新規転写因子 VOZ 変異体のトランスクリプ
トーム解析」
秋山 昌子、向川 佳子、硯 亮太、光田 展
隆、河内 孝之、佐藤 雅彦
- (18) 日本植物生理学会 2007年度年会 平成
19年3月28日～30日

愛媛大学 城北キャンパス
「シロイヌナズナ根毛細胞特異的発現 SNARE
の細胞内動態および機能解析」
江波 和彦、植村 知博、佐藤 雅彦

- (19) 日本植物生理学会 2007年度年会 平成
19年3月28日～30日
愛媛大学 城北キャンパス
「高等植物におけるトランスゴルジネットワ
ーク(TGN)のダイナミクスの解析」
植村 知博、庄田 恵子、佐藤 雅彦、上田
貴志、中野 明彦
- (20) 日本植物生理学会 2006年度年会 平成
18年3月19日～21日
筑波大学 「小胞輸送から見た植物細胞の極
性確立機構の解析」
江波 和彦、植村 知博、佐藤 雅彦
- (21) 日本植物生理学会 2006年度年会 平成
18年3月19日～21日、筑波大学 「イ
ネゴルジ複合体プロテオーム:GFP-SYP31 標
識シスゴルジ膜画分の解析」朝倉 剛、廣瀬
将太、片峰 拓紀、佐藤 雅彦、藤原 正幸、
島本 功、縁 秀隆、三ツ井 敏明

〔図書〕(計1件)

椎名 隆、佐藤 雅彦、角山 雄一
「スタートアップ生化学～わかる“生命”のしくみ
～」 化学同人 2008

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 重金属高蓄積性の形質転換体および
重金属汚染の浄化法

発明者: 清野正子、佐藤雅彦

権利者: 北里大学

種類: 特許

番号: 2008-209309

出願年月日: 2008

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://mei.kpu.ac.jp/~mhsato/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 雅彦 (Masa H. Sato)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究
科・准教授

研究者番号: 20283575