

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06284

研究課題名(和文) 発芽時のショ糖合成に関わる膜交通系の解明

研究課題名(英文) Analysis of membrane trafficking in sucrose-dependent seedling establishment

研究代表者

嶋田 知生 (Shimada, Tomoo)

京都大学・理学研究科・講師

研究者番号：20281587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナkam2変異体をショ糖を含まない固形培地で発芽させると、ある割合で子葉の展開後に本葉が出ずに成長できなくなる個体が現れる(この表現型をショ糖要求性とよぶ)。本研究により、このkam2変異体の表現型は、野生型よりも体内に過剰な水分を蓄積して生育停止に陥りやすく(いわゆるガラス化)、見かけ上のショ糖要求性を示していたことが明らかとなった。培地へのショ糖の添加は、kam2の輸送異常による不具合を補償してしまう作用があると考えられる。見かけ上のショ糖要求性は野生型シロイヌナズナでも観察され、好ましくない環境で発芽した植物が一時的に生育を停止する環境応答である可能性を考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物細胞における膜交通の分子基盤は、動物細胞や酵母など他の真核生物のそれとは大きくは変わらない。一方で、植物は固有の発生や生理、環境応答に対応して独自の膜交通システムを発展させていることが知られている。本研究では、kam2変異体をショ糖を含まない培地で育てることにより、輸送異常による細胞内の恒常性の破綻が観察できることが明らかとなった。発芽成長という植物固有の発生や生理に対応して、植物が独自に発展させてきた膜交通の役割の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：When Arabidopsis kam2 mutants are germinated on a sucrose-free solid medium, a certain percentage of individuals fail to develop true leaves after cotyledon expansion (this phenotype is called sucrose-requiring). This study revealed that the kam2 mutant phenotype was more prone to accumulation of excess water in the body and growth arrest (so-called vitrification) than the wild type, indicating an apparent sucrose requirement. The addition of sucrose to the medium may act to compensate for the defects caused by abnormal transport in kam2. Apparent sucrose requirement was also observed in wild-type Arabidopsis, suggesting that it may be an environmental response in which plants germinated in an unfavorable environment temporarily stop growing.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：膜交通 液胞輸送 シロイヌナズナ kam2変異体 ショ糖

1. 研究開始当初の背景

小胞輸送に代表される「膜交通」は、小胞体やゴルジ体、液胞などの内膜系オルガネラ間でタンパク質をはじめとする物質輸送を支える基本的な仕組みである。植物細胞における膜交通の分子基盤は、動物細胞や酵母など他の真核生物のそれとは大きくは変わらない。一方で、植物における膜交通は、植物固有の発生や生理、環境応答に対応して独自のシステムを発展させていることが知られている (Shimada et al., 2018)。

申請者らはこれまで液胞タンパク質の細胞内輸送の分子機構を解析してきた。独自のスクリーニング法を考案することにより、モデル植物シロイヌナズナを用いて多数の液胞輸送変異体を取得・解析してきた (Shimada et al. 2006, Fuji et al. 2007)。本研究は申請者らが単離した液胞輸送変異体 *katamari2(kam2)* (Tamura et al., 2007) が発芽成長時にシヨ糖要求性を示すという想定外の表現型に端を発している。発芽時のシヨ糖合成にはオイルボディ、ペルオキシソーム、ミトコンドリアが関与することが知られている。しかし、膜交通に関わるオルガネラとシヨ糖合成に関わるオルガネラの間には接点はなく、膜交通とシヨ糖合成の間には密接な関係は想定されていない。膜交通因子である *KAM2* の欠損により、なぜシヨ糖要求性を示すようになるのかはまったく不明であった。膜交通変異体 *kam2* のシヨ糖要求性の原因の解明は、植物細胞の「膜交通」の新たな役割につながることを期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膜交通変異体 *kam2* が発芽成長時にシヨ糖要求性を示すことに着目し、膜交通因子がどのようにシヨ糖代謝に関係しているのかを解明する。このことにより、発芽成長という植物固有の発生や生理に対応して、植物が独自に発展させてきた膜交通の一端を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) *kam2* 変異体のシヨ糖要求性を緩和する条件の検討
- (2) *kam2* 以外の輸送変異体のシヨ糖要求性の確認
- (3) 野生型シロイヌナズナがシヨ糖要求性を示す条件の検討

4. 研究成果

シロイヌナズナ *kam2* 変異体をシヨ糖を含まない固形培地で発芽させると、ある割合で子葉の展開後に本葉が出ずに成長できなくなる個体が現れる (この表現型をシヨ糖要求性とよぶ)。一方、シヨ糖を含む培地では、*kam2* 変異体は野生型植物と同様に本葉を展開して成長することができる。

(1) *kam2* 変異体のシヨ糖要求性の割合が、発芽成長時の光強度や固形培地の硬さに応じて変化することが判明した。このことは、*kam2* 変異体のシヨ糖要求性が遺伝的な要因だけでなく、環境要因によっても左右されることを意味している。高い光強度ほどシヨ糖要求性の割合が減少することから、光合成によるエネルギー産生がシヨ糖添加の代替になっていることが示唆された。また興味深いことに、シヨ糖欠乏培地で生育阻害を起こした個体をシヨ糖含有培地に移すと、成長が再開することが判明した。このことより、シヨ糖欠乏培地で *kam2* 変異体は枯死しているのではなく、一時的に生育を停止する環境応答である可能性が示唆された。生育停止した *kam2* 変異体はいわゆるガラス化しており、生育停止を引き起こす要因として植物体に過剰な水分が蓄積していることが想定された。ガラス化の主な原因は培地と植物体との接触であることが予想される。そこで、培地と植物体の接触をプラスチックシートで遮断したところ、シヨ糖欠乏培地でも *kam2* の生育率が著しく回復することが判明した。よって、これまで観察してきた表現型は真のシヨ糖要求性ではなく、培地との接触で成長停止してガラス化する割合がシヨ糖の有無で変化していたことが判明した。

(2) kam2 変異体以外にもいくつかの膜交通変異体で発芽成長時のショ糖要求性が報告されている (Thazar-Poulot et al., 2015)。申請者らは、そのうちレトロマー因子の vps29 変異体と snx1 変異体のショ糖要求性を確認することができた。レトロマー複合体は KAM2 と同じ液胞前区画 PVC に存在し、PVC からの逆行輸送に関わる。このことから、PVC の機能不全が見かけ上のショ糖要求性とリンクしていることが示唆された。これらの変異体のショ糖要求性もプラスチックシートによって回復することから、kam2 と同様の応答が引き起こされていることが判明した。

(3) 膜交通変異体のショ糖要求性がプラスチックシートによって回復することから、野生型のシロイヌナズナでも培地との接触により生育停止が引き起こされるか検討した。培地との接触を起こりやすくするために、通常より柔らかい固形培地を使用することとした。野生型のシロイヌナズナを通常よりも柔らかい固形培地で発芽させると、kam2 変異体と同様に一部の個体がガラス化してショ糖要求性を示した。このことから、ショ糖要求性とよんでいた表現型は、野生型シロイヌナズナでも見られる反応であることが明らかとなった。

以上のことから、kam2 変異体はショ糖を含まない固形培地上で、野生型植物よりもガラス化しやすく生育停止に陥りやすいため、見かけ上のショ糖要求性を示していたことが明らかとなった。ショ糖を含む培地上ではこのような表現型は見られないが、本来ショ糖を含む培地は自然の状態とはいええない。ショ糖の添加は、輸送異常による細胞の不具合を補償してしまう作用があると考えられる。ショ糖を含まない培地で育てることにより、輸送異常による細胞内の恒常性の破綻が観察できることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroki Yagi, Atsushi J Nagano, Jaewook Kim, Kentaro Tamura, Nobuyoshi Mochizuki, Akira Nagatani, Tomonao Matsushita, Tomoo Shimada	4. 巻 72
2. 論文標題 Fluorescent protein-based imaging and tissue-specific RNA-seq analysis of Arabidopsis hydathodes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Exp. Bot.	6. 最初と最後の頁 1260-1270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/eraa519	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細川智佳, 田村謙太郎, 岡義人, 松下智直, 嶋田知生
2. 発表標題 液胞輸送変異体kam2における 発芽後の成長阻害の解析
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 細川智佳, 田村謙太郎, 嶋田知生
2. 発表標題 液胞輸送変異体 kam2の芽生えにおけるシヨ糖要求性の表現型解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------	---------