

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14738

研究課題名(和文)オルガネラ獲得に伴う膜交通経路の再配向機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of the redirection of the secretory pathway to form lineage-unique organelles

研究代表者

金澤 建彦 (Kanazawa, Takehiko)

基礎生物学研究所・細胞動態研究部門・助教

研究者番号：60802783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膜交通は単膜系オルガネラへ正確に物質を輸送・局在化させる仕組みである。真核生物のいくつかの系統では独自に獲得された単膜系オルガネラが報告されているが、その過程で新規膜交通経路がどのように開拓されたのかは、不明である。

陸上植物の分裂細胞の細胞板や、苔類の油体をモデルとし、コケ植物ゼニゴケを研究材料とし、植物の単膜系オルガネラ獲得の分子機構の解析を行った。細胞板や油体形成時に、細胞外への輸送経路である分泌経路が一時的に細胞内方向に方向転換すること、その過程で細胞骨格の再編成が行われるが明らかになった。また、油体発生のマスター転写因子MpERF13を単離、その下流遺伝子を網羅的に同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単膜系オルガネラの進化と多様化は、膜交通の鍵因子の遺伝子重複による数の増加とその後の機能分化が新しいオルガネラの獲得に繋がるというオルガネラパラロジー仮説が提唱されているが、この仮説を支持する実験的な証拠はほとんど示されていない。

全く機能の異なる細胞板と油体が、共通の膜交通経路の転用により形成されるという発見は、上述の仮説を強く支持しており、単膜系オルガネラの獲得原理の理解に向けた基礎生物学的な重要な知見が得られた。

また、苔類の油体は、生理活性の高い様々な化合物を蓄積しており、本研究で明らかになった油体形成の仕組みを活用することで、有用化合物の効率的な産生への貢献も期待される。

研究成果の概要(英文)：The membrane traffic is the fundamental system to correctly localized the molecules via membrane-bounded intermediates. Although some lineages of eukaryotes are reported to have acquired lineage-specific organelles, the molecular mechanisms to pioneer the novel membrane trafficking pathways are unclear.

As a model of newly-acquired organelles, I analyzed the cell plates in dividing cells and the liverwort-specific oil body in *Marchantia polymorpha*. I identified that these organelles are formed by periodic redirection of the secretory pathway, which responsible for the transport to the extracellular space. The cytoskeleton is also re-organized in each process as well. By the mutant screening of the oil body biogenesis, MpERF13 was isolated as a master transcription factor to form oil bodies and to re-organize the cytoskeleton.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：油体 細胞板 オルガネラ 細胞骨格 膜交通 分泌経路 ゼニゴケ

1. 研究開始当初の背景

膜交通は、小胞や細管状の輸送中間体を介して単膜系オルガネラへタンパク質や脂質、多糖類などを輸送・局在化させる仕組みである。膜交通の鍵因子である Rab GTPase や SNARE タンパク質は、小胞と標的膜の繫留、膜融合を実行する因子であり、真核生物の系統間でも高度に保存されている。一方で、真核生物のいくつかの系統では、独自のオルガネラの獲得が報告されており、オルガネラの誕生に伴い、そのオルガネラへの輸送経路の開拓あったと考えられる。膜交通とオルガネラの進化と多様化は、膜交通の鍵因子の遺伝子重複とそれらの機能分化、新規機能獲得を繰り返すことで、新しいオルガネラ獲得に繋がったというオルガネラパラロジー仮説が提唱されているが、実験的な証明をもってこの仮説を支持する例はほとんど示されていない。細胞板は、細胞質分裂時に出現するオルガネラであり、陸上植物のイノベーションであると考えられている。また、コケ植物苔類は、油体と呼ばれる系統独自に獲得したオルガネラを有している。油体は、180 年以上前から文献に記述が見られるものの、油体の形成機構、油体への膜交通経路の制御機構や生物学的意義については不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

新規オルガネラの獲得は、そのオルガネラへの膜交通経路の開拓を伴うと考えられる。本研究では、細胞板と油体を、植物が独自に獲得したオルガネラのモデルと考え、これらのオルガネラへの輸送経路とその制御メカニズムの解明を目指した。特に苔類の油体は、起源となったオルガネラや、形成における細胞骨格の関与、発生過程の詳細、オルガネラの生物学的機能など、ほとんど知見がないため、観察系の構築、関連遺伝子の網羅的な同定を行う。得られた知見から、オルガネラ獲得進化のイベントに膜交通とその鍵因子がどのような役割を果たしているのかについて考察する。

3. 研究の方法

(1) オルガネラおよび細胞骨格動態の解析

膜交通の膜融合実行因子である SNARE は、それ自身が輸送のカーゴとして適切なオルガネラへと輸送される。すなわち、SNARE の局在性は、オルガネラの特徴・膜交通経路の目的地を反映していると考えられる。既に作製したゼニゴケの全ての内膜系オルガネラマーカーおよび細胞骨格マーカーを用いて、オルガネラ動態、細胞骨格動態について詳細な観察を行う。また、特定のオルガネラへの局在化には、局在化シグナルが存在すると考えられている。局在化シグナルの有無を検証するために、SNARE タンパク質間で、ドメインをスワップさせたキメラコンストラクト、プロモーター領域をスワップさせた発現キメラコンストラクトを用いてオルガネラ局在化に関与するシグナルの同定を試みる。

(2) 変異体スクリーニングによる油体形成異常変異体の同定と解析

油体は、コケ植物の形態分類学や化学分類学に用いられるものの、形成に関与する分子についての知見はほとんどない。そこで、変異体スクリーニングにより油体形成異常の変異体スクリーニングを行い、油体形成に関与する変異体とその原因遺伝子の単離・同定、機能解析を行う。

(3) RNA-Seq. による油体形成に関与する遺伝子群の網羅的同定と解析

上述の変異体スクリーニングにより得られた変異体群の中から、油体形成が亢進する変異体、油体形成不全の変異体を用いて RNA-Seq. 解析を行い、油体形成に関与する遺伝子群の網羅的な同定を行う。SNARE タンパク質の 1 つである MpSYP12B がゼニゴケの油体細胞特異的に発現することが既に明らかになっており、これを指標にして、多群間比較解析から変異体間で有意に変動が見られる遺伝子 (DEGs) を抽出する。DEGs の中から、膜交通に関連する遺伝子群をさらに選定し、レポーターアッセイおよびそれらの候補遺伝子の遺伝子破壊株、過剰発現株を作出し、油体形成における役割について検証を行う。

4. 研究成果

(1) ゼニゴケは、SYP1 遺伝子を 4 つ持つが、シロイヌナズナの SYP111 のように細胞質分裂時特異的に発現するものは存在しない (引用文献 1)。FM4-64 により細胞板を可視化し、ゼニゴケ葉状体細胞の分裂期の細胞を経時的に観察した。4 つの SYP1 メンバーのうち、MpSYP12A のみ細胞板への局在化が見られ、ゲノム編集を用いた *Mpsyp12a* 機能欠損変異体では、細胞質分裂異常の表現型を示した。一方で、MpSYP12A のパラログである MpSYP12B は、油体細胞特異的に発現し、油体膜に局在した。ゴルジ体や液胞膜マーカーは、油体膜への局在化は見られなかったが、細胞板と同様に油体膜上でクラスリン被覆小胞の形成が観察された。これらの結果から、細胞板と油体にはそれぞれ特異的な SYP1 メンバーがリクルートされていること、細胞膜と共通の性質を有していることが、示唆された。

(2) SYP1 ファミリーは、動物の Syntaxin-1 のホモログであり、主に細胞膜に局在し、分泌小胞と細胞膜の膜融合の実行因子であると考えられている。一方、MpSYP12A および MpSYP12B はそれぞれ、細胞内のコンパートメントである細胞板と油体に局在することから、特異的な局在化制御

があると考えられた。SNARE タンパク質のドメインおよび発現制御領域（プロモーター配列）の入れ替えたキメラコンストラクトを用いて、局在化への影響を検証した結果、SYP1 メンバーの細胞板局在には、G2/M 期での発現が重要であり、同メンバーの油体膜局在には、MpSYP12B の発現がオンになるフェーズでの発現が重要であること、すなわち、転写発現制御が局在化に重要であることが明らかになった。特に油体膜局在のフェーズの切り替えを、細胞質分裂の細胞周期に因み、「油体周期」と、MpSYP12B の発現がオンになるフェーズを「油体期」と命名した。

(3) 変異体スクリーニングにより、油体形成が亢進する変異体を単離し、これは MpERF13 の過剰発現に起因した。ゲノム編集により作出した Mper13 機能欠損変異体は、油体を全く形成せず、また、MpERF13 の薬剤誘導発現系により、異所的に油体形成が起こることから、MpERF13 が油体発生のマスター転写因子であることが明らかになった。

Mper13 の過剰発現変異体および機能欠損変異体を用いて RNA-Seq. 解析を行い、136 遺伝子が MpERF13 により正に制御されていた。これらの中から任意に抽出した遺伝子について、プロモーター・レポーターアッセイを行った結果、いずれも油体細胞特異的に発現したことから、MpERF13 が油体形成のマスター転写因子であり、油体周期の油体期を駆動する重要な因子であることが示唆された。

(4) 陸上植物の細胞質分裂時には、植物細胞特異的な微小管構造であるフラグモプラストを形成することが知られている。細胞骨格可視化植物を用いて、油体形成時における細胞骨格ダイナミクスを解析した。形成中の油体を中心として放射状に微小管が再編成され、微小管重合阻害剤処理により、正常な油体形成が阻害された。また、この微小管の再編成も MpERF13 の制御下にあることが明らかになった。このことから、油体形成期に再編成される新規微小管構造が、正常な油体発身に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(5) 油体には生理活性が高い多くの化合物が含まれているものの（引用文献 2）、その生物学的な意義は未解明であった。そこで、Mper13 過剰発現変異体、機能欠損変異体とオカダンゴムシ (*Armadillidium vulgare*) を用いて被食アッセイを行った。野生型および油体過剰生産株はほとんど無傷のまま残るのに対し、油体を欠損する変異体は多く被食された。同様な結果は、油体形成不全を引き起こす Mpc1hdz 変異体でもみられることから（引用文献 3）、油体は、節足動物などの捕食者からの防御に関与することが示された。

これらの結果から、陸上植物では、細胞状態特異的に分泌経路を細胞内方向へ方向転換させることで、系統特異的に獲得されたオルガネラへの膜交通経路の開拓がなされたことが強く示唆された。

<引用文献>

1) Kanazawa T et al. (2016) SNARE Molecules in *Marchantia polymorpha*: Unique and Conserved Features of the Membrane Fusion Machinery. *Plant Cell Physiol.* 57:307-324.

2) Asakawa et al. (2013) Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry* 91:52-80.

3) Romani et al. (2020) Oil body formation in *Marchantia polymorpha* is controlled by MpC1HDZ and serves as a defense against arthropod herbivores. *Curr Biol.* 30:2815-2828.e8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Norizuki T., Kanazawa T., Minamino N., Tsukaya H., Ueda T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Marchantia polymorpha, a New Model Plant for Autophagy Studies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 10:935
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2019.00935	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 Hiwatashi T., Goh H., Yasui Y., Koh L.Q., Takami H., Kajikawa M., Kirita H., Kanazawa T., Minamino N., Togawa T., Sato M., Wakazaki M., Yamaguchi K., Shigenobu S., Fukaki H., Mimura T., Toyooka K., Sawa S., Yamato K.T., Ueda T., Urano D., Kohchi T., Ishizaki K.	4. 巻 29
2. 論文標題 The RopGEF KARAPPO Is Essential for the Initiation of Vegetative Reproduction in Marchantia polymorpha	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3525 ~ 3531.e7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2019.08.071	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 Minamino, N., Kanazawa, T., Era, A., Ebine, K., Nakano, A., Ueda, T.	4. 巻 59
2. 論文標題 RAB GTPases in the basal land plant Marchantia polymorpha	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 845-856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcy027	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 Kanazawa T., Morinaka H., Ebine K., Shimada T.L., Ishida S., Minamino N., Yamaguchi K., Shigenobu S., Kohchi T., Nakano A., Ueda T.	4. 巻 11
2. 論文標題 The liverwort oil body is formed by redirection of the secretory pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-19978-1	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 Lupanga U., Rohrich R., Askani J., Hilmer S., Kiefer C., Krebs M., Kanazawa T., Ueda T., Schumacher K.	4. 巻 9
2. 論文標題 The Arabidopsis V-ATPase is localized to the TGN/EE via a seed plant-specific motif	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e60568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.60568	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 Duan Z., Tanaka M., Kanazawa T., Haraguchi T., Takyu A., Era A., Ueda T., Ito K., Tominaga M.	4. 巻 104
2. 論文標題 Characterization of ancestral myosin XI from Marchantia polymorpha by heterologous expression in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 460 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14937	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 Romani F., Banic E., Florent S.N., Kanazawa T., Goodger J.Q.D., Mentink R.A., Dierschke T., Zachgo S., Ueda T., Bowman J.L., Tsiantis M., Moreno J.E.	4. 巻 30
2. 論文標題 Oil Body Formation in Marchantia polymorpha Is Controlled by MpC1HDZ and Serves as a Defense against Arthropod Herbivores	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2815 ~ 2828.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2020.05.081	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

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 金澤建彦, 上田貴志
2. 発表標題 新規獲得オルガネラへの膜交通経路の開拓と制御機構
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金澤建彦
2. 発表標題 光らない蛍光タンパク質 から学んだ教訓
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会・関連集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takehiko Kanazawa, Takashi Ueda
2. 発表標題 Biogenesis and Morphogenesis of Oil Body
3. 学会等名 Marchantia Workchop 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金澤建彦, 上田貴志
2. 発表標題 ゼニゴケの油体形成および輸送に関わる因子の探索
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 Takehiko Kanazawa, Takashi Ueda
2. 発表標題 A common strategy for organelle acquisition during plant evolution
3. 学会等名 EMBO Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takehiko Kanazawa, Takashi Ueda
2. 発表標題 A shared framework of organelle acquisition during land plant evolution
3. 学会等名 21st ENPER meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金澤建彦、上田貴志
2. 発表標題 膜交通から探るゼニゴケ油体形成機構
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 Takehiko Kanazawa, Takashi Ueda
2. 発表標題 Regulatory Mechanisms of Biogenesis of the Oil Body in <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名 Japan-Taiwan Plant Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金澤建彦、上田貴志
2. 発表標題 苔類ゼニゴケの油体発生に伴う分泌経路の方向転換制御機構
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 金澤建彦, 上田貴志
2. 発表標題 植物の新規オルガネラ獲得に伴う膜交通経路の制御機構
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
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
---------	---------