

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570036

研究課題名 (和文) 高等植物の細胞核の形作りとその機能を支える分子機構

研究課題名 (英文) MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING THE REGULATION OF NUCLEAR STRUCTURE IN PLANTS

研究代表者

田村 謙太郎 (TAMURA KENTARO)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：40378609

研究成果の概要 (和文)：高等植物の細胞核の形作りを担う分子機構を明らかにする目的で、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて研究を行った。まず最初に、インタラクティブプロテオミクス的手法を用いて、細胞核の重要な機能を担う核膜孔複合体の構成要素を明らかにした。次に、分子遺伝学的手法により細胞核の形態不全変異体を多数単離し、その詳細な解析を行った。

研究成果の概要 (英文)：The nuclear pore complex (NPC) is important multiprotein complex that mediate nucleus-cytoplasm trafficking in eukaryotic cells. To identify the components of NPC in *Arabidopsis*, we employed interactive proteomic approach. In this analysis, we successfully identified 30 nucleoproteins, 22 of which were not annotated previously. To understand how plants build their nuclei, we isolated several lines of mutant that has defect in nuclear morphology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：植物分子細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：細胞核、シロイヌナズナ、GFP、プロテオミクス、突然変異体

## 1. 研究開始当初の背景

細胞核は構造と機能が密接に関わり合ったダイナミックなオルガネラである。細胞核の機能発現のためには、細胞核の高次構造が重要な役割を持っていると考えられる。高等植物を特徴づける細胞レベルでの分化能力は、細胞核の機能、すなわち遺伝情報の機能発現によるところが大きい。従って、細胞核の形成・構造維持の機構を明らかにすることは、植物の生き様を理解する上で非常に重要な基盤になる。しかしながら、高等植物にお

る細胞核の構造形成に関する知見は皆無であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物の細胞核の形作りと機能を決定する分子の同定を目的とする。未だ共通理解が得られていない植物の細胞核構造の形成・維持の機構を分子レベルで明らかにする。最終年度までに以下の点を明らかにする。(1) プロテオミクス解析により、細胞核および核膜孔の構造に関与すると予想されるタンパク質の網羅的な同定とカタログ化を行

う。(2)核構造が異常になった変異体を多数単離し、表現型解析と原因遺伝子の解析により、細胞核の構造と植物体の高次機能との因果関係を明らかにする。植物が持つ分化全能性や、柔軟な環境応答能力の一端を「細胞核の機能」という面から明らかにする。

### 3. 研究の方法

細胞核の形作りと機能を決定する因子の同定のために、

(1)。「プロテオミクスによる細胞核および核膜孔の形成に必要なタンパク質の同定と解析」

(2)。「順遺伝学による核の形状が異常になった変異体の探索」の二つの手法によって研究を進めた。

### 4. 研究成果

(1). プロテオミクスによる細胞核および核膜孔の形成に必要なタンパク質の同定と解析。

①最初に、シロイヌナズナ培養細胞から高濃度ショ糖緩衝液を用いて高純度な細胞核の精製方法を確立した(図1)。

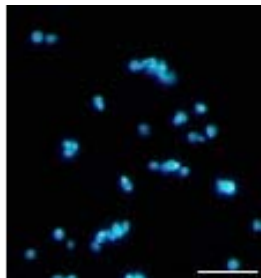


図1. シロイヌナズナ培養細胞から単離した細胞核のDAPI染色画像. スケールバーは50 μm.

得られた細胞核画分を塩、アルカリ、種々の界面活性剤を含む緩衝液で洗浄してタンパク質を抽出した。これらの処理で可溶化されなかったタンパク質はグアニジン塩酸およびギ酸を用いて可溶化した。抽出したサンプルはショットガン方式(質量分析装置はLTQ-Orbitrapを使用)または、SDS-PAGEで分離した後、MALDI-TOF-MSによりタンパク質を同定した。

同定されたタンパク質の内訳を図2に示す。総計1800種類のタンパク質を同定することができた。この数は既知の植物核タンパク質プロテオミクスと比較して桁違いに多い。従って、機能未知の植物核タンパク質を多く含んでいることが予想される。同定されたタンパク質の中から新規タンパク質に関しては、GFP融合タンパク質をプロトプラストで一過的に発現させて、その細胞内局在を解析した。その結果、30種類の新規核タンパク質を同定することに成功した。

今後は機能未知の3種類の核膜タンパク質に注目して、これらタンパク質をコードしている遺伝子破壊株の解析を行う予定である。

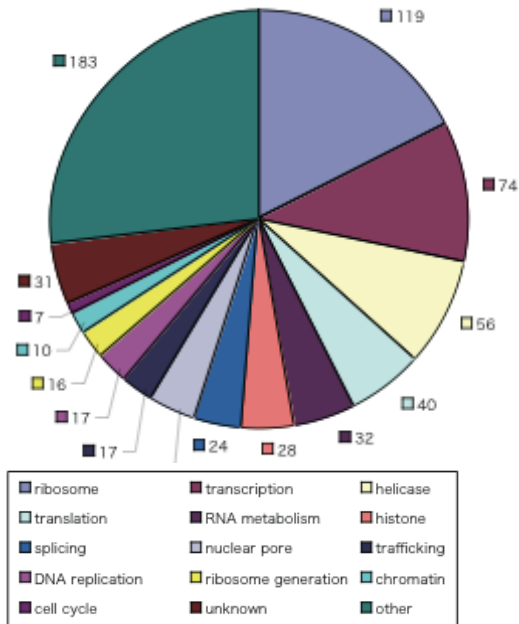


図2. シロイヌナズナ培養細胞から単離した核タンパク質のプロテオミクス。

②核膜孔は細胞質と核質の唯一の通り道で、両者の物質輸送の重要な場を提供している。核膜孔は核膜孔複合体とよばれる巨大タンパク質複合体からなることが知られており、脊椎動物および酵母による研究から約30種類のヌクレオポリンタンパク質が同定解析されてきた。一方、高等植物のヌクレオポリンタンパク質はほとんど同定されておらず、核膜孔複合体の分子実体は不明のままであった。そこで、高等植物の核膜孔複合体の構成成分を明らかにする目的でシロイヌナズナを用いたタンパク質間相互作用を利用したインタラクティブプロテオミクスを行った。

最初に、既知のヌクレオポリンであるRAE1にGFPを融合させたタンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナを作製した。このシロイヌナズナから得た抽出液を用いてGFP抗体による免疫沈降を行い、その免疫沈降産物を質量分析器(LTQ-Orbitrap)に供した。同定されたタンパク質に関しては、GFP融合タンパク質として細胞内局在を確認した後、さらに同様の免疫沈降を行って相互作用するタンパク質の同定を進めた。その結果、30種類のシロイヌナズナのヌクレオポリンを同定することができた。現在までに高等植物では8種類のヌクレオポリンしか知られていなかった。本研究により、植物細胞の核膜孔複合体の全貌を明らかにすることができ

た。

同定されたヌクレオポリンのなかに、動物や酵母とは配列の相同性をもたない分子量 136 k のヌクレオポリンが存在していた。このヌクレオポリンを Nup136 と命名してさらなる解析を行った。その結果、Nup136 は高等植物にのみ保存されたヌクレオポリンであるが、その機能は他生物の Nup153/Nup1 と類似していることが示唆された。Nup136 遺伝子を欠く変異体では生殖成長過程に顕著な異常が見られた。以上の結果から、Nup136 は他生物との共通機能に加えて、植物特有の役割をもつタンパク質だと考えられる。

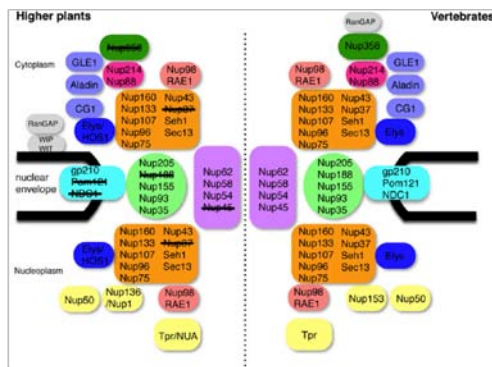


図 3. 高等植物 (左側) と脊椎動物 (右側) の核膜孔複合体の比較。

(2). 順遺伝学による核の形状が異常になった変異体の探索。

細胞核を GFP により可視化したシロイヌナズナを親株として、これを EMS による突然変異誘起処理を行った。蛍光顕微鏡下で細胞核の形状および細胞内配置が異常になった変異体をスクリーニングして数ライン単離した。得られた変異体を *kaku* 変異体と名付けて解析を行った。

野生型のシロイヌナズナ表皮細胞では核は紡錘形である。単離した *kaku* 変異体では、球状に変形したライン、巨大化した核を持つライン、細胞内における配置が異常になったラインが得られた。今後、原因遺伝子の同定と解析を進めていく予定である。

## 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 11 件)

1. Kentaro Tamura and I. Hara-Nishimura Involvement of the nuclear pore complex in morphology of the plant nucleus *Nucleus* (2011) in press. 査読有

2. Kentaro Tamura, Y. Fukao, M. Iwamoto, T. Haraguchi, I. Hara-Nishimura Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana*.

*Plant Cell* (2010) 12, 4084-4097. 査読有

3. H. Takahashi, Kentaro Tamura, J. Takagi, Y. Koumoto, I. Hara-Nishimura, T. Shimada MAG4/Atpl15 is a golgi-localized tethering factor that mediates efficient anterograde transport in *Arabidopsis*.

*Plant Cell Physiol.* (2010) 51, 1777-1787. 査読有

4. L. Marti, G. Stefano, Kentaro Tamura, C. Hawes, L. Renna, M. A. Held, and F. Brandizzi

A missense mutation in the vacuolar protein GOLD36 causes organizational defects in the ER and aberrant protein trafficking in the plant secretory pathway *Plant J.* (2010) 63, 901-913. 査読有

5. H. Ueda, E. Yokota, N. Kutsuna, T. Shimada, Kentaro Tamura, T. Shimmen, S. Hasezawa, V.V Dolja, and I. Hara-Nishimura Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* (2010) 107, 6894-6899. 査読有

6. C. Faso\*, Y. Chen\*, Kentaro Tamura\*, M. Held, S. Zemelis, L. Marti, R. Saravanan, E. Hummel, L. Kung, E. Miller, C. Hawes and F. Brandizzi

**\* these authors equally contributed to the work.**

A missense mutation in the *Arabidopsis* COPII coat protein Sec24A induces the formation of clusters of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus

*Plant Cell* (2009) 21, 3655-3671. 査読有

7. R. T. Nakano, R. Matsushima, H. Ueda, Kentaro Tamura, T. Shimada, L. Li, Y. Hayashi, M. Kondo, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura

ERM01/GNL1 and ERM02/SEC24a are required for maintenance of ER morphology in *Arabidopsis thaliana*

*Plant Cell* (2009) 21, 3672-3685. 査読有

8. N. Hatsugai, S. Iwasaki, Kentaro Tamura, M. Kondo, K. Fuji, K. Ogasawara, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura

A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens

Genes Dev. (2009) 23, 2496-2506. 査読有

9. E. Yokota, S. Ueda, Kentaro Tamura, H. Orii, S. Uchi, S. Sonobe, I. Hara-Nishimura, and T. Shimmen

An isoform of myosin xi is responsible for the translocation of endoplasmic reticulum in tobacco cultured BY-2 cells  
J. Exp. Bot. (2009) 49, 197-212. 査読有

10. M. Nishikawa, K. Hosokawa, M. Ishiguro, H. Minamioka, Kentaro Tamura, I. Hara-Nishimura, Y. Takahashi, K. Shimazaki and H. Imai

Degradation of sphingoid long-chain base 1-phosphates (LCB-1PS): functional characterization and expression of ATDPL1 encoding LCB-1P lyase involved in the dehydration stress response in Arabidopsis for the translocation of endoplasmic reticulum in tobacco cultured BY-2 cells

Plant and Cell Physiol. (2008) 49, 1758-1763. 査読有

11. M. Yamazaki, T. Shimada, H. Takahashi, Kentaro Tamura, M. Kondo, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura

Arabidopsis VPS35, a retromer component, is required for vacuolar protein sorting and involved in plant growth and leaf senescence

Plant Cell Physiol. (2008) 49 (2): 142-156. 査読有

[学会発表] (計4件)

1. 田村謙太郎, 岩濤功誠, 深尾陽一朗, 岡本圭史, 西村いくこ シロイヌナズナ KAKU1 は細胞核の形態に寄与するミオシンである 日本植物生理学会 2011年3月20日 東北大学

2. 田村謙太郎 プロテオミクスで植物の細胞核を知る 日本植物生理学会 2010年3月19日 熊本大学

3. 田村謙太郎, 深尾陽一朗, 岩本政明, 原口徳子, 西村いくこ 高等植物における核膜孔複合体の動態解析 日本植物生理学会 2009年3月21日 名古屋大学

4. 田村謙太郎, 西村いくこ 高等植物における細胞核の形作りの分子機構 第11回オルガネラワークショップ 2009年3月20日 名古屋大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

[http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/4\\_saibou.html](http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/4_saibou.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 謙太郎 (KENTARO TAMURA)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 40378609

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

