

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15825

研究課題名(和文)新規オルガネラ形成過程における膜交通ダイナミクスとその分子機構の解析

研究課題名(英文) Dynamics of the membrane traffic and the molecular mechanisms in the process of the formation of lineage-specific 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)：真核生物の各々の系統において、独自のオルガネラ獲得があったと考えられており、新規オルガネラ獲得に伴った新規膜交通経路の開拓があったと考えられる。本課題では、ゼニゴケの油体を新規獲得オルガネラのモデルとして、油体形成時における膜交通ダイナミクスの解明を目指した。苔類ゼニゴケの油体は、細胞外への輸送経路である分泌経路を細胞内へ方向転換することにより形成されること、単一の転写因子 MpERF13によりその形成が制御されることが明らかになった (Kanazawa et al., 2020)。また、油体形成時における微小管の再編成および初期分泌経路が正常な油体発生に重要な役割を担うことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内膜系オルガネラの進化と多様化は、膜交通の実行因子が遺伝子重複とその後の変異の蓄積を繰り返すことで機能分化および新規機能獲得を果たし、新規内膜系オルガネラの誕生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。本研究結果により、陸上植物の細胞質分裂時の「細胞板」とコケ植物苔類の「油体」が、共通の膜交通経路の転用により形成されており、パラロガスなオルガネラであることを示した。上述の仮説を実験的な証拠を持って強く支持しており、内膜系オルガネラの新規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、油体形成の仕組みの理解は、有用特化代謝産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)：Some lineages of eukaryotes are reported to have acquired lineage-specific organelles accompanied by the development of new membrane trafficking pathways, however the molecular mechanisms and the subcellular dynamics are elusive. I studied the oil body in a liverwort *Marchantia polymorpha*, as a model of newly-acquired organelles in specific lineages during evolution. I revealed that the liverwort oil body is formed by the periodic redirection of the secretory pathway, and a master transcription factor, MpERF13, regulates the oil body development (Kanazawa et al., 2020). I found that the re-organization of microtubules and the early secretory trafficking pathway played pivotal roles in the normal development of the oil body.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：膜交通 分泌経路 オルガネラ 油体 細胞骨格 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

真核細胞に存在する単膜系オルガネラへの正確な物質輸送・局在化の仕組みは「膜交通」と呼ばれる。膜交通の実行因子である Rab GTPase や SNARE タンパク質、被覆複合体は真核生物間において高度に保存されている一方、真核生物の各々の系統において、独自のオルガネラ獲得とそれに伴う新規膜交通経路の開拓があったと考えられている。内膜系オルガネラの進化と多様化は、膜交通の実行因子が遺伝子重複とその後の変異の蓄積を繰り返すことで機能分化および新規機能獲得を果たし、新規内膜系オルガネラの誕生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。

コケ植物苔類は、油体と呼ばれるオルガネラを有しており、他の系統には同様のオルガネラが見られないことから、苔類の共有派生形質であると考えられている。180年以上前の文献に記述が見られるものの、油体形成の分子機構やその生物学的意義については不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

新規オルガネラの獲得は、そのオルガネラを発着する膜交通経路の開拓を伴うと考えられる。本研究では、陸上植物における新規オルガネラ獲得とそれに伴う膜交通経路の開拓の分子機構と膜交通ダイナミクスの解明を目指し、ゼニゴケの油体を新規獲得の内膜系オルガネラのモデルとして解析を行った。油体形成過程におけるオルガネラ動態解析を行うとともに、輸送に関わる細胞骨格の役割および分子機構解析を行う。また、油体形成異常のスクリーニングにより、油体形成と分泌経路の転用の意義について、知見の獲得を目指す。

3. 研究の方法

(3-1) 長時間タイムラプス観察

ゼニゴケにおいて油体を含む油体細胞は葉状体細胞中の 0.5~1%程度しか存在せず、低頻度の油体発生イベントを捉える観察系が必要である。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輸送される。MpSYP12B はゼニゴケの油体細胞特異的に発現し、油体膜に局在する SNARE タンパク質である。MpSYP12B の発現と局在を指標とし、20分または30分間隔で約30時間のタイムラプス観察を行った。

(3-2) 油体誘導系の確立

これまでの解析から、MpERF13 が油体発生のマスター転写因子であることが強く示唆されていた。MpERF13 の発現をエストラジオール処理により誘導する系を立ち上げ、単一の転写因子の誘導で油体形成が誘導可能であるかを検証する。エストラジオール処理後、経時的にサンプリングを行い、下流遺伝子である MpSYP12B の発現上昇を qRT-PCR で定量するとともに、油体形成の膜交通および細胞骨格ダイナミクスについてタイムラプス観察を行う。また、膜交通および細胞骨格阻害剤処理の影響を検証する。

(3-3) 油体形成異常の変異体スクリーニングと原因遺伝子の解析

T-DNA を用いた変異体スクリーニングにより油体形成異常変異体を単離、解析する。特に、膜交通関連因子を優先して解析を行う。原因遺伝子の同定および機能解析を通し、油体形成における分泌経路の転用の意義について知見を得る。

4. 研究成果

(4-1) 油体は、細胞外への輸送経路である分泌経路を細胞内へ方向転換することで形成される。SYP1 は主に細胞膜に局在し、分泌小胞と細胞膜の融合を実行する。一方で MpSYP12B は細胞内のオルガネラである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。プロモーターを入れ替えたキメラコンストラクトを用いた局在化への影響を検証した結果、分泌カーゴの油体への局在化には、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、油体は分泌小胞が細胞内で融合することにより形成されることが明らかになった。細胞板も同様に分泌小胞が細胞内で融合することにより形成されることから、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、2)。

(4-2) 油体発生は単一マスター転写因子 MpERF13 の発現で制御される。

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、その原因遺伝子は転写因子 MpERF13 だった(引用文献 1)。Mperf13 機能欠損変異体は油体が全く形成されず、またこの転写因子の誘導系を用いたタイムラプス観察により異所的な油体形成が誘発されることから、MpERF13 は油体形成のマスター転写因子であることが明らかになった。またこの油体誘導条件

下において、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ること、微小管重合阻害剤により正常な油体形成が阻害されることから、油体形成期における微小管の再編成が油体発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(4-3) 初期分泌経路が正常な油体発生に重要である。

変異体スクリーニングにより油体形態異常を示す変異体も単離している。COPI 被覆複合体のサブユニットの一つである MpSEC28 が原因遺伝子であった。同様の油体形態異常の表現型は他の COPI サブユニットのロックダウン変異体で見られることから、COPI を介した初期分泌経路が油体の正常な発達に重要であることが強く示唆された。また、Mpsec28 変異体は葉状体が脆くなるという表現型も示しており、COPI 被覆小胞は油体へ機械的強度を付与する物質の輸送に関与していることが考えられる。

<引用文献>

- 1) Kanazawa T, Morinaka H, Ebine K, Shimada TL, Ishida S, Minamino N, Yamaguchi K, Shigenobu S, Kohchi T, Nakano A, and Ueda T “The liverwort oil body is formed by redirection of the secretory pathway”, *Nat Commun.* 2020, 11: 6152. A selected paper on the editor’s highlights page “Plants and agriculture”.
- 2) 金澤建彦, 上田貴志. 苔類の「油体」から探る植物のオルガネラ進化 オルガネラ獲得への道程 . *化学と生物* . 2022, 60 (1): 5-7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

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 ., 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

1. 著者名 金澤 建彦, 上田 貴志	4. 巻 60
2. 論文標題 苔類の「油体」から探る植物のオルガネラ進化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 5-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

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

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過程における細胞骨格再編成
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takehiko Kanazawa, Takashi Ueda
2. 発表標題 Secretory activity is required for normal morphogenesis of the oil body in <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名 From Cellular Dynamics to Morphology II (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金澤建彦, 上田貴志
2. 発表標題 ゼニゴケ油体形成における分泌輸送の役割の解明
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金澤建彦
2. 発表標題 膜交通の観点から, オルガネラ誕生を考える.
3. 学会等名 第24 回植物オルガネラワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金澤建彦
2. 発表標題 植物のオルガネラ機能の多様性 特化代謝産物を蓄積するゼニゴケ油体の形成メカニズム
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ゼニゴケの油体は分泌経路の方向転換によりつくられる
<https://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2020/12/01.html>

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