

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2009～2011

課題番号：21200065

研究課題名（和文）原形質流動を支える小胞体運動の評価法の開発とその分子機構の解明

研究課題名（英文）Quantitative characterization and molecular mechanism of endoplasmic reticulum dynamics

研究代表者

上田 晴子 (UEDA HARUKO)

京都大学・大学院理学研究科・特定准教授（特別推進研究）

研究者番号：90402776

研究成果の概要（和文）：植物細胞は原形質流動することが知られているが、その仕組みは未解明な部分が多い。本研究では、細胞内で最大の表面積を持つ小胞体に着目し、小胞体運動の定量的な解析法を確立した。その結果、小胞体と細胞質ゾルの流動パターンは酷似しており、原形質流動に小胞体が大きく寄与することが示唆された。一方、モータータンパク質に加えて、小胞体運動に関わる新たな因子の同定にも成功し、その分子機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Plants exhibit an ultimate case of the intracellular motility involving rapid organelle trafficking and continuous streaming of the endoplasmic reticulum (ER). To comprehensively analyze the ER movement, we developed software to generate a detailed velocity-distribution map. Streaming pattern of cytosolic GFP was similar to that of the ER-localized GFP, suggesting that a correlation and a causative relationship between the streaming of ER and cytosol. Furthermore, we elucidated a part of the molecular mechanisms of the ER streaming by analyzing ER-associated proteins responsible for ER streaming.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：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：原形質流動・小胞体・アクチン・ミオシン・オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

原形質流動は、古くから知られる有名な植物細胞内運動である。シャジクモ節間細胞の原形質は、80 $\mu\text{m}/\text{sec}$ という驚くべき速度で流動する。50年以上前に日本人によって「すべり説」が提唱されていたが、この現象に関わる分子が近年になって単離・同定され

始めたことから、モータータンパク質であるミオシンがアクチンに沿ってオルガネラを運ぶことにより原形質流動が起こることが分かって来た。植物ミオシンは独自のクラス（VIII および XI）を進化させ、その中のミオシン XI がオルガネラの運搬を担うことが示唆されていた。ゲノム解読により、シロイ

ヌナズナは13種類、イネは12種類というように、植物は多くのミオシン XI アイソフォームをコードしていることが明らかとなり、植物における重要性が推察された。細胞内可視化技術の発達により、植物ミオシンとオルガネラの関わりが注目され始めたが、原形質流動の維持に関する具体的な分子機構はほとんど未解明であった。

2. 研究の目的

様々なオルガネラ動態の観察から、小胞体の流動のみが細胞質ゾルの絶え間ない流動と非常に良く似た特徴を示すことを見出した。小胞体は細胞中に張り巡らされた最大の表面積をもつ構造体であることから、大量のミオシンと相互作用して絶え間ない流動を維持するのに有利である。これらの知見から、「小胞体が原形質流動の原動力である」というモデル考案した。従来のオルガネラの動態解析は顆粒状オルガネラに偏っており、小胞体については例がなかった。小胞体の複雑な膜系ネットワーク構造(図1)と流動に伴う形態変化が小胞体の動態解析を阻んできたためである。本研究では、バイオイメーjingと流体力学を組み合わせる小胞体の流動パターンを時間的・空間的に評価する方法の開発を目指した。一方、原形質流動の原動力となるためには、小胞体が能動的に運動することが必要である。そこで、小胞体運動に関わる因子の解析を通じて分子機構を明らかにすることを目的とした。

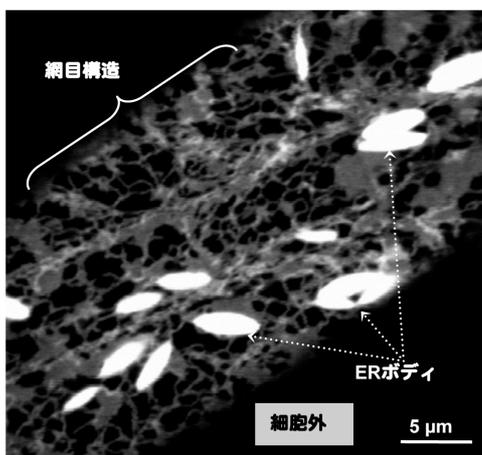


図1: 蛍光タンパク質で標識した小胞体
シロイヌナズナ幼植物体の葉柄細胞。葉柄細胞の長径は200 μm近いものもあり、写真はその一部分を示す。小胞体は、チューブ状やシート状の部分から成る網目構造に加え、小胞体由来の構造体(ERボディ)など複雑な膜系ネットワークを持つオルガネラである。

3. 研究の方法

本研究では、モデル植物シロイヌナズナを用いて、下記の方法で研究を進めた。

1) 小胞体運動の評価法の開発

optical flow analysis を応用した小胞体運動計測ソフト KbiFlow の開発と細胞質ゾルの流動解析への応用

2) 小胞体運動の分子機構の解析

- ①上記ソフトと遺伝学・生化学的解析による小胞体を駆動するミオシンの同定
- ②小胞体流動が抑制される変異体とその原因因子の解析

4. 研究成果

1) 小胞体運動の評価法の開発

緑色蛍光タンパク質(GFP)で蛍光標識した小胞体を高速カメラで撮影し、得られた時系列画像から本研究で開発したソフト KbiFlow を用いて流速分布地図を作成した(図2)。この地図から、小胞体は主に長軸方向に沿って高速で流動しているが、細胞内には様々な速度成分をもつ小胞体が三次元的に分布していることが明らかになった。

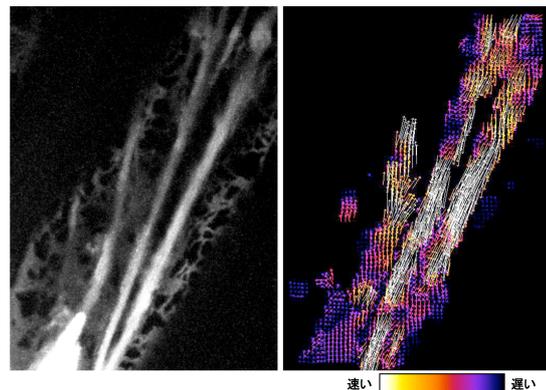


図2: 植物細胞の小胞体の流速分布地図
小胞体局在型GFPの蛍光像(左)と本研究で開発した小胞体運動計測ソフトKbiFlowで作成した小胞体の流速分布地図(右)。矢印は流れの方向を示す。主に長軸方向に向かって、高速で流動する小胞体が川のような筋を作る。

さらに、本ソフトを細胞質型 GFP の流動計測にも応用し、小胞体運動の計測結果と比較した(図3)。その結果、小胞体と細胞質型 GFP の流動パターンは酷似しており、流速もほぼ一致した。細胞質型 GFP は細胞質ゾルの動きを反映していると考えられることから、小胞体運動が原形質流動に寄与していることが示唆された。

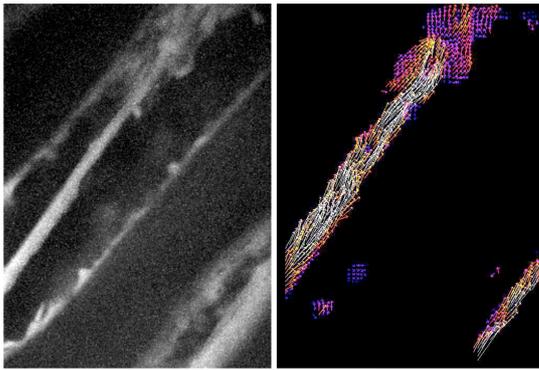


図3: 植物細胞の細胞質の流速分布地図
細胞質型GFPの蛍光画像(左)とKbiFlowで作成した細胞質の流速分布地図(右). 小胞体と同様に、高速で流動する細胞質が長軸方向に沿って筋状に存在する。

2) 小胞体運動の分子機構の解析

①小胞体を駆動するミオシンを同定するために、さまざまなミオシン XI アイソフォームの変異体における小胞体運動を KbiFlow によって計測した。その結果、恒常的に発現量が高いミオシン XI-K 欠損変異体で顕著な運動抑制が示された。オルガネラ分画によって XI-K が小胞体画分に濃縮されたことから、小胞体を駆動する主要な分子モーターはミオシン XI-K であることが示された。

さらに、ミオシン XI-1 および XI-2 の二重欠損変異体においても、わずかではあるが有意に小胞体の運動抑制がみられた。この抑制は観察のみでは見出せず、KbiFlow による詳細な速度計測によって明らかとなったことから、本ソフトの有用性が示された。ミオシン XI-K, XI-1 および XI-2 の三重欠損変異体を作成したところ、XI-K 単独変異体よりもさらに顕著な運動抑制がみられたことから、ミオシン XI-1 および XI-2 も部分的に小胞体運動に寄与することが明らかとなった。

②小胞体運動には、モーター分子以外にも多くの因子が関与していることが予想された。そのような因子を探索するために、小胞体運動が抑制される新たな変異体を単離した。この変異体では、小胞体の運動性のみではなく、小胞体の形態にも異常が観察された。すなわち、小胞体が核の周辺で大きな凝集体を形成しており、さまざまなオルガネラがこの凝集体に巻き込まれていた。原因となるタンパク質はオルガネラ分画によって小胞体画分に濃縮され、GFP との融合タンパク質は小胞体パターンを示した。また、このタンパク質は界面活性剤で処理した場合にのみ可溶化されたことから、小胞体膜タンパク質であると

考えられた。以上の結果から、小胞体膜タンパク質の異常が、小胞体のみならず他のオルガネラの細胞内分布にまで影響を及ぼすことが示され、小胞体が細胞内環境に重要な役割を果たすことが考えられた。

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 9 件)

① Yokota, E., Ueda, H., Hashimoto, K., Orie, H., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., and Shimmen, T., Myosin XI-dependent formation of tubular structures from endoplasmic reticulum isolated from tobacco cultured BY-2 cells. *Plant Physiol.* (2011) 156, 129-143. 査読あり
DOI: 10.1104/pp.111.175018

② Hashimoto, K., Yokota, E., Shimmen, T., and Yoshida, M., The myosin ATPase inhibitor, 2,3-butanedione 2-monoxime, prevents protein secretion by the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Biotechnol. Lett.* (2011) 33, 769-775. 査読あり
DOI: 10.1007/s10529-010-0497-0

③ Shirakawa, M., Ueda, H., Shimada, T., Koumoto, Y., Shimada, T. L., Kondo, M., Takahashi, T., Okuyama, Y., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I., Arabidopsis Qa-SNARE SYP2 proteins localized to different subcellular regions function redundantly in vacuolar protein sorting and plant development. *Plant J.* (2010) 64, 924-935. 査読あり
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04394.x

④ Ueda, H., Yokota, E., Kutsuna, N., Shimada, T., Tamura, K., Shimmen, T., Hasezawa, S., Dolja, V. V., and Hara-Nishimura, I., Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2010) 107, 6894-6899. 査読あり
DOI: 10.1073/pnas.0911482107

⑤ Shirakawa, M.* , Ueda, H.*, Shimada, T., Nishiyama, C., and Hara-Nishimura, I., Vacuolar SNAREs function in the formation of the leaf vascular network by regulating auxin distribution. *Plant Cell Physiol.* (2009) 50, 1319-1328. 査読あり
DOI: 10.1093/pcp/pcp076

*These authors contributed equally.

⑥ Nakano, R. T., Matsushima, R., Ueda, H., Tamura, K., Shimada, T., Li, L., Hayashi, Y., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I., GNOM-LIKE1/ERMO1 and SEC24a/ERMO2 are required for maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* (2009) 21, 3672-3685. 査読あり
DOI: 10.1105/tpc.109.068270

⑦ Hamada, T., Igarashi, H., Taguchi, R., Fujiwara, M., Fukao, Y., Shimmen, T., Yokota, E., and Sonobe, S., The putative RNA-processing protein, THO2, is a microtubule-associated protein in tobacco. *Plant Cell Physiol.* (2009) 50, 801-811. 査読あり
DOI: 10.1093/pcp/pcp024

⑧ Yokota, E., Ueda, S., Tamura, K., Orii, H., Uchi, S., Sonobe, S., Hara-Nishimura, I., and Shimmen, T., An isoform of myosin XI is responsible for the translocation of endoplasmic reticulum in tobacco cultured BY-2 cells. *J. Exp. Bot.* (2009) 60, 197-212. 査読あり
DOI: 10.1093/jxp/ern280

⑨ Karahara, I., Suda, J., Tahara, H., Yokota, E., Shimmen, T., Misaki, K., Yonemura, S., Murata, T., Staehelin, L. A., and Mineyuki, Y., The preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis in late prophase cells of the onion cotyledon epidermis. *Plant J.* (2009) 57, 819-831. 査読あり
DOI: 10.1111/j.1365-318X.2008.03725.x

〔学会発表〕(計 19 件)

① 上田晴子・他, 植物細胞における小胞体ダイナミクス, 第 14 回オルガネラワークショップ, 2012 年 3 月 15 日, 京都大学

② 上田晴子・他, 植物細胞におけるミオシン依存的な小胞体流動とアクチン繊維束の組織化, 第 84 回日本生化学会大会 (シンポジウム: アクチンとミオシンの意外なしくみとはたらき) 2011 年 9 月 21 日, 京都国際会館

③ Ueda, H. et al., Myosin XI drives endoplasmic reticulum motility and organizes F-actin orientations, 18th International Botanical Congress (Symposium: Cellular Dynamics), Jul 26, 2011, Melbourne, Australia

④ 上田晴子・他, 小胞体流動に異常を示す変異体の解析, 第 52 回日本植物生理学会年会, 2011 年 3 月 20-22 日, 東北大学

⑤ 上田晴子・他, 植物細胞における小胞体流動メカニズムとその意義, 日本植物学会近畿

支部大会, 2010 年 11 月 20 日, 京都大学

⑥ Ueda, H. et al., ER motility and F-actin organization mediated by plant-specific myosins, The 2010 Cold Spring Harbor Asia Conference, Oct 25-29, 2010, Suzhou, China

⑦ 上田晴子・他, 植物細胞における小胞体流動メカニズムとその意義, 第 74 回日本植物学会大会 (シンポジウム: 画像情報から植物を定量的に捉える) 2010 年 9 月 9 日, 中部大学 (春日井市)

⑧ Ueda, H. et al., ER motility and F-actin organization mediated by plant-specific myosins, 21st International Conference on Arabidopsis Research, June 6-10, 2010, Pacifico Yokohama, Japan

⑨ 上田晴子・他, 植物細胞における小胞体流動～定量解析と生理学的意義～, 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010 年 3 月 21 日, 熊本大学

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2009/100323_1.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 晴子 (UEDA HARUKO)

京都大学・大学院理学研究科・特定准教授 (特別推進研究)

研究者番号: 90402776

(2) 研究分担者

横田 悦雄 (YOKOTA ETSUO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教
研究者番号: 80212299