

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12月20日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21248002

研究課題名（和文） エンドサイトーシスによる糖蓄積機構解明とその育種利用

研究課題名（英文） Mechanism and function of endocytosis in sucrose accumulation of plant cells

研究代表者

堤 伸浩（TSUTSUMI NOBUHIRO）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：00202185

研究成果の概要（和文）：

シロイヌナズナ培養細胞の実験から、ショ糖によりエンドサイトーシスが誘導されることを示した。その後、ダイナミン様タンパク質 DRP1 と DRP2 のそれぞれが、シロイヌナズナの細胞表面にクラスリンと共局在することから、高等植物のエンドサイトーシスのマシナリーとして DRP1 と DRP2 の両方が利用されていることを明らかにした。さらに、エンドサイトーシスの小胞形成の際に細胞膜近傍に DRP1 がリング状に集合し、GTPase 活性を利用した機械化学的な方法でピットの切り離しが行われていることを明らかにした。また、シロイヌナズナの遺伝学的な解析から、DRP2 が雌性配偶体と雄性配偶体の双方の形成に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Endocytosis performs a wide range of functions in animals and plants. Clathrin-coated vesicle (CCV) formation is an initial step of endocytosis, and in animal cells is largely achieved by dynamins. However, little is known of its molecular mechanisms in plant cells. To identify dynamin-related proteins (DRPs) involved in endocytic CCV formation in plant cells, we compared the behaviors of two structurally different *Arabidopsis* DRPs, DRP2B and DRP1A. DRP2B and DRP1A colocalized and assembled/disassembled together at the plasma membrane in *Arabidopsis* cells. DRP2B and DRP1A participate together in endocytic CCV formation in *Arabidopsis* cells despite the difference of their molecular properties.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	16,900,000	5,070,000	21,970,000
2010年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
総計	33,300,000	9,990,000	43,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：DRP1, DRP2A, DRP2B エンドサイトーシス, クラスリン, ダイナミン様タンパク質, 全反射蛍光顕微鏡, 小胞輸送, 配偶体致死

1. 研究開始当初の背景

作物収量の向上はソースおよびシンク能の増加によってもたらされてきた。しかし、そのバランスは最適化されておらず、改善の余地が大きく残されている。これまでソース能の強化に関しては、ショ糖リン酸合成酵素遺伝子の高発現によるショ糖合成能の改善などいくつか成功例が報告されている。一方で、シンク器官の機能強化を実現するアプローチについては未だ成功例がない。

エンドサイトーシスは、真核細胞が外部から物質を取り込むためのもっとも基本的な機構のひとつである。エンドサイトーシスの過程では、まず細胞膜が標的分子を認識したあと、細胞膜表面が細胞質側に陥入しクラスリンと呼ばれるタンパク質で覆われた小胞を形成する。動物細胞においては、エンドサイトーシスの最終段階でダイナミンが機能していることが明らかになっていた。植物においては、エンドサイトーシスの存在そのものが過去数十年にわたって議論の対象となっていた。したがって植物に細胞におけるエンドサイトーシスのメカニズムはほとんど解明されてこなかった。近年、植物細胞においてはクラスリンに依存的な経路がエンドサイトーシスの大半を担うことが示された (Dhonukshe et al. *Curr. Biol.* 2007)。クラスリンは細胞質側に湾曲した膜上に重合し、その形状変化を誘導するタンパク質である。また、柑橘類のショ糖蓄積に機能するエンドサイトーシスはクラスリン依存性であることが報告されている (Etxeberria et al. *J. Hort. Sci. Biotech.* 2007)。

2. 研究の目的

作物の収量・品質やバイオマスの利用効率向上にとって、細胞の糖蓄積能は非常に重要な形質である。近年、エンドサイトーシスが作物のシンク器官における糖蓄積に従来の予想を超えた大きな寄与を果たす可能性が示された。そこで本研究では、目的の器官に効率よく同化産物(糖・デンプン)を蓄積する手法の基盤となる植物細胞におけるエンドサイトーシスの分子メカニズムを解明し、その人為的な制御を目指すこととした。

3. 研究の方法

シロイヌナズナの16種のダイナミン様タンパク質のうちDRP2BとDRP1A、およびクラスリン軽鎖についてそれぞれ蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現させ、全反射蛍光顕微鏡を用いて細胞膜表面でのこれらのタンパク質の挙動を調べた。

DRP2グループを構成するDRP2AとDRP2Bについて、これら2種のタンパク質の機能分化を調べるために、DRP2AおよびDRP2B(以下2A, 2Bとする)にT-DNAが挿入されている遺伝子破壊系統の分譲を受け、これらの系統を交配してその後代における表現型を調べることで、2A, 2B遺伝子座における遺伝子型と表現型の関係を調べた。

4. 研究成果

シロイヌナズナの16種のダイナミン様タンパク質のうちDRP2BとDRP1A、およびクラスリン軽鎖についてそれぞれ蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現させ、全反射蛍光顕微鏡を用いて細胞膜表面でのこれらのタンパク質の挙動を調べた。

その結果、クラスリン軽鎖の細胞膜上でスポット状に出現し消滅するのとほぼ同期して、DRP1A, DRP2Bが同じ場所で出現・消滅することが明らかになった。さらに、*yesat two hybrid*法により、DRP1AとDRP2B

が相互作用することもわかった。また、クラスリンが関与するエンドサイトーシスの阻害剤である tyrphostin A23 を処理したところ、DRP1A の局在が阻害され、DRP2B の局在は影響を受けなかった。このことから、DRP1A と DRP2B は、エンドサイトーシスにそれぞれ別の役割を持っていることが示唆された。以上の結果から、DRP2B と DRP1A は互いに異なる機能ドメインを持つタンパク質であるが、協調してエンドサイトーシスにおけるクラスリン被覆小胞形成に寄与していると考えられた (Fig. 1)

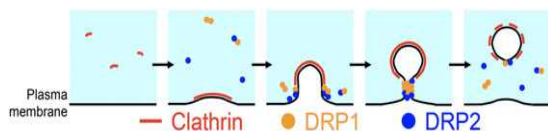


Fig.1. Schematic of the proposed roles of DRP2B, DRP1A, and clathrin in endocytic vesicle formation in *Arabidopsis*. These schematics represent the putative process of endocytic vesicle formation in *Arabidopsis*. The light-blue background represents the cytosol. Black and red lines represent the plasma membrane and the clathrin coat, respectively. Orange and dark-blue dots represent DRP1 and DRP2 proteins, respectively. The behaviors of DRP2, DRP1, and clathrin are depicted on the basis of the results from our time-lapse VIAFM analysis.

Dynamamin-Related Protein (DRP) 遺伝子はシロイヌナズナゲノム中に 16 個存在し、分子構造から DRP1~6 という 6 種に分類されている。このうち、DRP1 と DRP2 がエンドサイトーシスに関与することが本研究の結果から示された。シロイヌナズナの DRP2 グループには、DRP2A と DRP2B の 2 遺伝子が存在し、コードされているアミノ酸配列は互いに高い相同性 (92%) を持っている。本研究では DRP2A と DRP2B の機能、発現部位、細胞内局在の解析と生理的意義の解明を行った。まず、DRP2A および DRP2B (以下 2A, 2B とする) に T-DNA が挿入されている遺伝子破壊システムを用いて植物体生育における表

現型の探索を行った。2A, 2B それぞれの T-DNA 挿入ホモ系統についてその表現型を観察したが、野生株との間で生育や種子形成に明確な差異は見られなかった。そこで、2a2b 二重変異系統の作出を目指したが、そのような個体は得られず、遺伝子型が Aabb や aaBb となっているものも得られなかった。2A および 2B 座への T-DNA 挿入が共にヘテロとなっている変異株(AaBb)と野生株との間で正逆交雑をした結果、変異株を雌雄どちらの親株として用いても、遺伝子型が AaBb となるような個体は得られなかった。さらに、ヘテロ変異株 (AaBb)の花粉および胚のうを観察したところ、それぞれ約 4 分の 1 の配偶体において形態形成が途中の段階で停止していたことから、雌雄両配偶体において遺伝子型が ab になると致死となることが判明した。次に、GUS レポーター遺伝子導入個体を観察し 2A と 2B の発現部位をそれぞれ解析した。2A および 2B が配偶体だけでなく植物体全体において機能していることが示唆された。また、特に根、茎頂分裂組織、シリークなどで強い発現が見られたことから、これらの器官においてはさらに重要な役割を果たしていることが示唆された。

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 16 件)

- 1) Ebine K, Fujimoto M, Okatani Y, Nishiyama T, Goh T, Ito E, Dainobu T, Nishitani A, Uemura T, Sato M, Thordal-Christensen H, Tsutsumi N, Nakano A, Ueda T, (2011) A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nature Cell Biol.*, 13, 853.
- 2) Bashir K, Ishimaru Y, Shimo H, Nagasaka S, Fujimoto M, Takanashi H, Tsutsumi N, An G, Nakanishi H, Nishizawa N, (2011) The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. *Nature Comm.*, 2,

- 3) Ohnishi T, Takanashi H, Mogi M, Takahashi H, Kikuchi S, Yano K, Okamoto T, Fujita M, Kurata N, Tsutsumi N, (2011) Distinct gene expression profiles in egg and synergid cells of rice as revealed by cell type-specific microarrays. *Plant Physiol.*, 155, 881.
- 4) Rajhi I, Yamauchi T, Takahashi H, Nishiuchi S, Shiono K, Watanabe R, Mliki A, Nagamura Y, Tsutsumi N, Nishizawa NK, Nakazono M, (2011) Identification of genes expressed in maize root cortical cells during lysigenous aerenchyma formation using laser microdissection and microarray analyses. *New Phytol.* 190, 351-368.
- 5) Roy S, Ueda M, Kadowaki K, Tsutsumi N, (2010) Different status of the gene for ribosomal protein S16 in the chloroplast genome during evolution of the genus *Arabidopsis* and closely related species. *Genes Genet Syst.* 85, 319-26.
- 6) Zhang D, Kato Y, Zhang L, Fujimoto M, Tsutsumi N, Sodmergen, Sakamoto W, (2010) The FtsH protease heterocomplex in *Arabidopsis*: dispensability of type-B protease activity for proper chloroplast development. *Plant Cell*, 22, 3710-25.
- 7) Fujita M, Horiuchi Y, Ueda Y, Mizuta Y, Kubo T, Yano K, Yamaki S, Tsuda K, Nagata T, Niihama M, Kato H, Kikuchi S, Hamada K, Mochizuki T, Ishimizu T, Iwai H, Tsutsumi N, Kurata N, (2010) Rice expression atlas in reproductive development. *Plant Cell Physiol.*, 51, 2060-81.
- 8) Yamaoka S, Nakajima M, Fujimoto M, Tsutsumi N. (2010) MIRO1 influences the morphology and intracellular distribution of mitochondria during embryonic cell division in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 30, 239-44.
- 9) Wakamatsu K, Fujimoto M, Nakazono M, Arimura S, Tsutsumi N, (2010) Fusion of mitochondria in tobacco suspension cultured cells is dependent on the cellular ATP level but not on actin polymerization. *Plant Cell Rep.* 29, 1139-45.
- 10) Hu Z, Yan H, Yang J, Yamaguchi S, Maekawa M, Takamure I, Tsutsumi N, Kyojuka J, Nakazono M, (2010) Strigolactones negatively regulate mesocotyl elongation in rice during germination and growth in darkness. *Plant Cell Physiol.* 51, 1136-42.
- 11) Fujimoto M, Arimura S, Ueda T, Takanashi H, Hayashi Y, Nakano A, Tsutsumi N, (2010) *Arabidopsis* dynamin-related proteins DRP2B and DRP1A participate together in clathrin-coated vesicle formation during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107, 6094-9.
- 12) Doniwa Y, Ueda M, Ueta M, Wada A, Kadowaki K, Tsutsumi N, (2010) The involvement of a PPR protein of the P subfamily in partial RNA editing of an *Arabidopsis* mitochondrial transcript. *Gene* 454, 39-46.
- 13) Takanashi H, Ohnishi T, Mogi M, Okamoto T, Arimura S, Tsutsumi N (2010) Studies of mitochondrial morphology and DNA amount in the rice egg cell. *Curr Genet.* 56, 33-41.
- 14) Ishimaru Y, Bashir K, Fujimoto M, An G, Itai RN, Tsutsumi N, Nakanishi H, Nishizawa NK. (2009) Rice-specific mitochondrial iron-regulated gene (MIR) plays an important role in iron homeostasis. *Mol Plant.* 2, 1059-66.
- 15) Fujimoto M, Arimura S, Mano S, Kondo M, Saito C, Ueda T, Nakazono M, Nakano A, Nishimura M, Tsutsumi N. (2009) *Arabidopsis* dynamin-related proteins DRP3A and DRP3B are functionally redundant in mitochondrial fission, but have distinct roles in peroxisomal fission. *Plant J.* 58, 388-400.
- 16) Nagano M, Ihara-Ohori Y, Imai H, Inada N, Fujimoto M, Tsutsumi N, Uchimiyama H, Kawai-Yamada M (2009) Functional association of cell death suppressor, *Arabidopsis* Bax inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome b. *Plant J.* 58, 122-34.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 伸浩 (TSUTSUMI NOBUHIRO)
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
 研究者番号：00202185

(2) 連携研究者

中園幹生 (NAKAZONO MIKIO)
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
 研究者番号：70282697
 (2009-2010)

有村慎一 (ARIMURA SHIN-ICHI)
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
 研究者番号：00396938