

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24日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570049

研究課題名（和文）小胞体ネットワークにおけるチューブ伸長機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of tubular elongation in the network of endoplasmic reticulum.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：シロイヌナズナ培養細胞 MM2d を用いて、小胞体チューブ形成に関与すると考えられているレティキュロン様タンパク質（AtRTN）とアトラスチン GTPase のホモログである RHD3 が、植物細胞においても小胞体チューブ形成に関与していることを明らかにした。そして、RHD3 が GTP に結合すること。チューブ形成条件下で、会合体を形成することを示した。またタンパク質リン酸化によって、チューブ形成が調節される知見を得た。

研究成果の概要（英文）：In the cultured cell of Arabidopsis, MM2d, it was shown that reticulon-like proteins (AtRTN) and RHD3, a homologue of atlastin GTPase, are involved in the tubular formation of endoplasmic reticulum (ER), as is case of yeast and animal cells. The RHD3 was able to bind to GTP, and form the oligomer under the conditions in which ER tubules were organized. Furthermore, ER tubule formation was suggested to be regulated by the phosphorylation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：小胞体、レティキュロン、RHD3、プロテインキナーゼ、タンパク質リン酸化、ダイナソー

1. 研究開始当初の背景

タンパク質合成の場である小胞体は、存在する部位によって特徴的な構造を保持している。細胞表層では、チューブ状あるいは袋状の形態をなし、それらが互いに融合して網目状ネットワークを形成している。そしてチューブ形成や維持には、細胞骨格系の関与が示されてきた (Voeltz et al. (2002) EMBO reports 3; 944-950)。しかし、動物細胞や酵母では、近年小胞体膜タンパク質であるレ

ティキュロン (RTN) やアトラスチン GTPase が膜の曲率を変化させることにより、チューブ形成が起り維持されていることが明らかになりつつある (Voeltz et al. (2006) Cell 124; 573-586; Hu et al. (2009) Cell 138; 549-561)。植物細胞、特にシロイヌナズナでは 20 種類以上のレティキュロン様タンパク質 (AtRTN) が存在しており (Nziengui et al. (2007) FEBS Lett. 581; 3356-3362)、アトラスチンのホモログである RHD3 が同定され

ている(Hu et al. (2009) Cell 138; 549-561)。そして、本研究者はタバコ培養細胞 BY-2 から単離した小胞体に GTP を加えることによって、チューブ形成が誘発される現象を見出していた。また、シロイヌナズナのいくつかの AtRTN アイソフォームと反応する抗体を作製していた。このような背景に基づき研究を行っていった。

2. 研究の目的

シロイヌナズナ培養細胞 MM2d を主な実験材料として、AtRTN や RHD3 の小胞体ネットワーク構造、中でもチューブ形成における役割を解明することを目的とした。特に RHD3 の GTP 結合能や、チューブ形成時における挙動を解析することによって、より詳細なチューブ形成機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) in vitro チューブ再構成系

MM2d 細胞からショ糖密度勾配超遠心により、小胞体を単離した(Yokota et al. (2009) J. Exp. Bot. 60; 197-212)。これに GTP、ATP と更に小胞体の染色剤である ER tracker (Invitrogen) を加え、25 度で加温して 40 分から 50 分後に蛍光顕微鏡で観察を行った。抗体や阻害剤の効果を解析する場合には、更にこれらを添加して加温した。

(2) GTP 結合活性

単離した小胞体を、界面活性剤を含む溶液で抽出し、GTP-ビーズ(Sigma)と混合して結合成分を、抗 RHD3 抗体によるイムノブロットにより解析した。コントロールとして ATP-ビーズ(Sigma)を用いた。

(3) GFP ラベルした AtRTN の細胞内発現

AtRTN の N 端に GFP を結合させたプラスミドを、MM2d 細胞あるいは BY-2 細胞に、ポリエチレングリコール法により導入した。室温で一晩インキュベートした後、蛍光顕微鏡で観察した。

(4) 免疫染色法

MM2d 細胞を固定後、抗 AtRTN 抗体あるいは抗 RHD3 抗体処理し、更に蛍光 2 次抗体と反応後、観察を行った。なお RHD3 の GTP 結合部位に対する抗体は、京都大学、上田晴子博士より供与していただいた。

(5) 化学架橋剤処理

GTP 処理あるいは未処理の単離小胞体を、化学架橋剤 EGS (Merck-Calbiochem) と反応させた。そして界面活性剤を含む溶液で可溶後、抗 RHD3 抗体を用いたイムノブロットにより架橋された RHD3 を検出した。

4. 研究成果

(1) AtRTN と RHD3 の細胞内局在

用いた抗 AtRTN 抗体は、AtRTN1, 3, 4, 5, 6 と反応する。免疫染色法により、これらの AtRTN

は細胞表層のメッシュ構造(図 1、Cortical)や細胞質糸に存在するが(図 1、Inside)、核膜には局在しない(図 1、Around nucleus の N)。また別のアイソフォームである AtRTN17 に対する抗体による免疫染色でも同様な局在パターンを示し、発現させた GFP-AtRTN17 のシグナルもメッシュ構造上に存在していた(図 1、GFP-RTN17)。このようなパターンは、小胞体のそれと一致している。AtRTN と同様、RHD3 も免疫染色法により小胞体局在を示した。

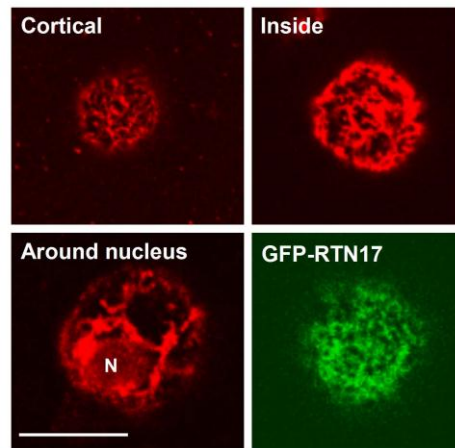


図 1. AtRTN の細胞内局在

(2) 抗体によるチューブ形成阻害

MM2d 細胞から単離した小胞体に GTP を加え、溶液の流れなどの力を加えることによって(カバーガラスをかけることによって生じる溶液の流れ)、チューブ形成を誘発させることができる(図 2)。この系(in vitro チューブ再構成系)を用いて、各成分に対する

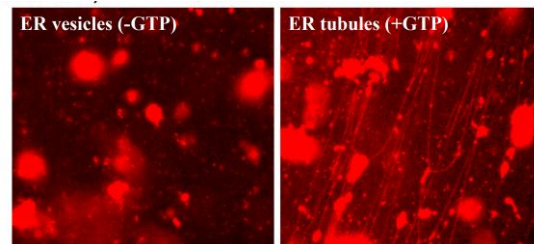


図 2. in vitro で形成した小胞体チューブ

抗体の効果を検討した。抗 RHD3 抗体、抗 AtRTN 抗体ともにチューブ形成を阻害した。抗 RHD3 抗体に関しては、GTP 結合部位に対する抗体はチューブ形成を阻害したが、新たに作製した N 末端部に対する抗体では阻害は起らなかった。以上の結果から、両成分ともに小胞体ネットワーク構造、特にチューブ伸長に重要な役割を担っていることが明らかになった。AtRTN のチューブ形成における重要性は 2008 年(Tolley et al. traffic 9; 94-102)、2009 年(Sparkes et al. Plant Cell 21; 3937-3949)に示唆されていたが、RHD3 のチューブ形成への関与を直接示したのは本研

究が最初である。

(3) RHD3 の GTP 結合活性

単離した小胞体を可溶化して、GTP-ビーズと混合すると、RHD3 がビーズに結合した。しかし、ATP-ビーズには結合しなかった。また結合成分中に、AtRTN は検出されなかった。この結果は、RHD3 が GTP 結合活性を有することを示す。in vitro チューブ形成において GTP の加水分解を伴うことを既に報告していたが、(1)(2)の結果もふまえ、この GTP 加水分解活性は RHD3 由来であることが示唆された。

(4) RHD3 複合体の形成

本研究を進めている途中、動物のアトラスチン GTPase は、GTP が存在すると 2 量体を形成することが報告された (Moss et al. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108; 11133-11138)。RHD3 も GTP 存在下で複合体形成が起るのかを、化学架橋剤 EGS を用いて検証した。単離小胞体を GTP で処理後、EGS と反応させ抗 RHD3 抗体によるイムノブロットにより分子量変化を解析した。その結果、モノマーである 89-kDa 成分 (図 3 矢じり) の他に、約 400-kDa の成分 (図 3 B 矢印) が検出された。このような高分子量架橋成分は、GTP 未処理 (図 3 A) あるいは ATP 処理 (図 3 C) では検出されなかった。またおもしろい

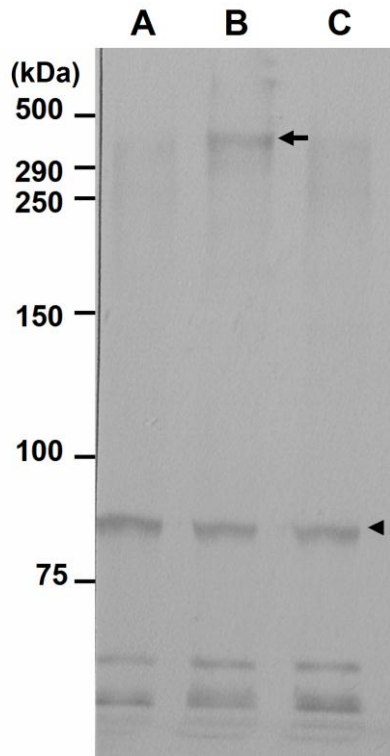


図 3. EGS による RHD3 化学架橋

ことに、GTP 非加水分解アナログである GTP γ S で処理しても高分子量架橋成分が形成された。従って、GTP 存在下、つまりチューブ伸長時に RHD3 は複合体を形成するが、その

形成に GTP の加水分解は必要でないことがわかった。そして、高分子量架橋成分の分子量約 400-kDa は、RHD3 2 量体に相当する分子量約 180-kDa とは大きく異なること。またホモな 3 量体や 4 量体との分子量とも一致しないことから、他の成分とも複合体を形成している可能性が示唆された。現在高分子量架橋成分に含まれるタンパク質の同定を試みている。

(5) 阻害剤ダイナソールの効果

アトラスチン GTPase はダイナミン GTPase に属するタンパク質であり、ダイナミンの GTPase 活性阻害剤としてダイナソールが知られている。この阻害剤の小胞体チューブ形成における効果を検討した。in vitro における単離小胞体のチューブ伸長は、50 μ M 以上の濃度のダイナソールにより著しく阻害された。ダイナミン GTPase 活性の 50% 阻害に必要なダイナソール濃度は 15 μ M であることから、この濃度はそれほどかけ離れた値ではない。また、伸長時に観察される GTP 加水分解も抑制された。そして BY-2 細胞の表層小胞体ネットワーク構造は、ダイナソールで処理することによって大きな袋状構造に変化した。これらの結果から、ダイナソールは RHD3 活性を抑制し、小胞体チューブ形成あるいはネットワーク構造形成を阻害する可能性が示唆された。従ってこの阻害剤は、植物細胞における小胞体ネットワーク形成における RHD3 の役割を解析するためのツールとして、使用可能であると思われる。

(6) リン酸化を介した小胞体ネットワーク形成の調節

BY-2 細胞の表層小胞体ネットワーク構造は、タマネギ鱗片葉細胞のそれと同様 (Quader (1990) Protoplasma 155; 166-175)、カルシウム・カルシウムイオノフォア A23187 で処理すると大きな袋状構造に変化する。この現象は可逆的であり、試薬を除くことによってネットワーク構造は回復する。興味あることに、回復時にキナーゼの阻害剤であるスタウロスポリンや K252a が存在すると、著しくネットワークの再構築が抑制されることを見出した。そこで in vitro 小胞体チューブ形成系を用いて、市販されているキナーゼであるカゼインキナーゼ II (Merck-Calbiochem) の効果を調べたところ、チューブ形成を促進した。従ってリン酸化による調節機構の存在が示唆された。小胞体チューブ形成に関与する成分、RTN やアトラスチン GTPase やそのホモログである RHD3 などの同定や機能については、本研究も含めいくつかの報告がなされているが、リン酸化による調節機構の存在を示唆したのは本研究が初めてである。現在リン酸化ターゲット成分の同定を試みているところである。

(7) 今後の展望

細胞内小胞体のネットワーク形成、特にチューブ構造形成や伸長は、膜タンパク質であるRTNやアトラスチンGTPaseなどの“Shaper”成分と、誘起・誘発に必要な細胞骨格系が互いに協調しながら起る現象である。in vitro小胞体チューブ再構成系を用いた本研究により、Shaper成分の調節にリン酸化が関与することが示唆された。今後どのような成分がリン酸化のターゲットであるのか、また関与しているキナーゼを同定することによって、より詳細な調節機構の解明が期待される。またShaper成分と細胞骨格系がどのような機構によってリンクされ、チューブ伸長や形成が起っているのかを解明することは、細胞内で起っているネットワーク形成機構を明らかにする上で必要不可欠である。

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6件)

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

②K. Hashimoto, E. Yokota, T. Shimmen, M. Yoshida Effect of myosin ATPase inhibitor 2,3-butanedione 2-monoxime on protein secretion of basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Biotechnology Letters* 査読有 2011, 33, 769-775. DOI/10.1007/s10529-010-0497-0

③H. Ueda, E. Yokota, N. Kutsuna, T. Shimada, K. Tamura, T. Shimmen, S. Hasezawa, V.V. Dolja, I. Hara-Nishimura. Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読 2010, 107, 6894-6899. DOI/10.1073/pnas.0911482107

④T. Hamada, H. Igarashi, R. Taguchi, M. Fujiwara, Y. Fukao, T. Shimmen, E. Yokota, S. Sonobe. The putative RNA-processing protein, THO2, is a microtubule-associated protein in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 査読有 2009, 50, 801-811. DOI/10.1093/pcp/pcp024

⑤E. Yokota, S. Ueda, K. Tamura, H. Orii, S. Uchi, S. Sonobe, I. Hara-Nishimura, T. Shimmen. An isoform of myosin XI is responsible for the translocation of endoplasmic reticulum in tobacco cultured BY-2 cells. *J. Exp. Bot.* 査読有 2009, 60, 197-212. DOI/10.1093/jxp/ern280

⑥I. Karahara, J. Suda, H. Tahara, E. Yokota, T. Shimmen, K. Misaki, S. Yonemura, T. Murata, L. A. Staehelin, Y. Mineyuki. The preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis in late prophase cells of the onion cotyledon epidermis. *Plant J.* 査読有 2009, 57; 819-831.

DOI/10.1111/j.1365-318X.2008.03725.x

[学会発表] (計7件)

①上田晴子。植物細胞における小胞体ダイナミクス。第14回植物オルガネラワークショップ、2012年3月15日、京都大益川ホール(京都府)

②上田晴子。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。日本生化学会第84回大会、2011年9月21日、京都国際会館(京都府)

③横田悦雄。接合菌類ヒゲカビの原形質流動を担うミオシンの同定。日本植物学会第75回大会、2011年9月18日、東京大学駒場キャンパス(東京都)

④H. Ueda. Myosin XI drives endoplasmic reticulum motility and organizes F-actin organizations. International Botanical Congress 2011年7月26日、メルボルン(オーストラリア)

⑤上田晴子。植物細胞における小胞体流動～定量解析と生理学的意義～。日本植物学会第74回大会、2010年9月9日、中部大学(愛知県)

⑥上田晴子。アクチン繊維束の細胞内配向におけるミオシンXIの役割。日本植物生理学会第51回年会、2010年3月21日、熊本大学(熊本県)

⑦横田悦雄。小胞体チューブ状構造形成におけるアクチン系細胞骨格の役割。日本植物学会第73回大会、2009年9月19日、山形大学(山形県)

[図書] (計1件)

E. Yokota, T. Shimmen (2010) Springer. *Plant myosins*. In: *The Plant Cytoskeletons*. pp. 33-56.

[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.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biomecha/index-jhtml>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：