

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23247009

研究課題名(和文)植物細胞内における小胞体の形態形成と機能分化

研究課題名(英文)The morphogenesis and functional differentiation of endoplasmic reticulum in plant cells

研究代表者

新免 輝男(Shimmen, Teruo)

兵庫県立大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80114510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物小胞体膜融合の機構を解明するため、アトラスチンGTPaseの植物ホモログであるRHD3に着目して研究を行った。シロイヌナズナ植物体や培養細胞から単離した小胞体膜の融合や、その結果生じるチューブ構造形成の解析、RHD3欠損株の小胞体形態や融合の観察結果などから、GTPに依存した小胞体膜融合にRHD3が寄与していることが明らかになった。また、化学架橋剤を用いた解析により、GTP結合によるRHD3のオリゴマー形成を介して小胞体膜融合が進行することも示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of RHD3, a plant homologue of atlastin GTPase, on the membrane fusion of endoplasmic reticulum. Based on analyses of the membrane fusion and the tubular formation in vitro of endoplasmic reticulum isolated from Arabidopsis seedling or cultured cell, RHD3 was revealed to be involved in GTP-dependent membrane fusion of endoplasmic reticulum. Furthermore, the biochemical approach with the chemical cross-linkers showed that the membrane fusion of endoplasmic reticulum was progressed through the formation of RHD3 oligomer by the association with GTP.

研究分野：植物生理学

キーワード：小胞体 RHD3 GTP シロイヌナズナ ミオシン

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体は細胞質全体に広がる巨大な構造であり、ダイナミックに変化する。表面にはチューブや小嚢からなる網目構造があり、たえず構造変化が起こっている。そして原形質内質や原形質系内には、活発に流動しているストランド小胞体が存在する。また細胞分裂時にはフラグモプラストに集積して、原形質連絡の前駆体を形成する。小胞体の運動や輸送は、多くの場合植物特異的なミオシン XI によって行われている (Ueda et al. 2010. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107; 6894-6899)。しかし、小胞体の形態形成、特にチューブ形成や融合の機構はわかっていない。動物細胞や酵母では、小胞体膜タンパク質であり膜に曲率を与えることによりチューブ構造形成に關与するレティキュロンタンパク質や (Yang and Strittmatter. 2007. Genome Biol. 8; 234)、GTP 依存的な小胞体膜融合に關与するダイナミン GTPase に属するアトラスチンや Sey1p (Hu et al. 2009. Cell 138; 549-561) が同定されている。植物にもレティキュロン様タンパク質が存在しており、その変異体や細胞内局在などの解析により、小胞体のチューブ状構造形成に關与していることが示唆されていた (Nziengui and Schoefs. 2009. Cell Mol. Life Sci. 66; 584-595)。またアトラスチンのホモログである RHD3 (root hair defective 3) が存在するため (Wang et al. 2009. Genes Dev. 11; 799-811; Hu et al. 2009. Cell)、GTP に依存した膜融合への關与が示唆されていた。しかし、RHD3 が小胞体膜融合に寄与している証明はなされていなかった。我々の研究グループは、タバコ培養細胞 BY-2 から単離した小胞体が、GTP 依存的に融合して、外部から流れなどの力を加えることにより、チューブ状構造を形成することを見出していた (Yokota et al. 2011. Plant Physiol. 156; 129-143)。しかし、この現象に關与している成分、特に GTP が作用する成分の同定には至っていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、動物や酵母で既に報告されているアトラスチンや Sey1p の植物ホモログである RHD3 の小胞体の形態形成や分化における役割、特に GTP に依存した膜融合やチューブ形成における關与を検討するとともに、RHD3 と相互作用する因子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

RHD3 欠損変異株は、連携研究者である京都大学西村いくこ教授の研究グループから供与して頂いた。

RHD3 に対する抗体は、GTP 結合部位に対する抗体 (抗 RHD3G 抗体) は、西村いくこ教授の研究グループから供与していただき、N 末端 15 アミノ酸残基 (抗 RHD3N 抗体) あるいは C 末端 15 アミノ酸残基に対する抗体 (抗 RHD3C 抗

体) は、それぞれの合成ペプチドをマウスに免疫することにより作製した。なおペプチド合成と KLH とのコンジュゲーションは、オペロンバイオテクノロジー社に外注した。

シロイヌナズナ植物体や培養細胞 MM2d の小胞体は、Yokota らの方法 (Yokota et al. (2011) Plant Physiol.) に従い、ショ糖密度勾配遠心法によって単離した。小胞体膜融合は、次の方法により評価した。エクオリンの発光強度変化をルミノメーターで測定する Hu らの方法 (Hu et al. 2009. Cell)。ER トラッカーにより小胞体膜を染色し、構造変化を蛍光顕微鏡により観察する Yokota らの方法 (Yokota et al. 2011. Plant Physiol.)。また、流れを起こすことにより誘発される小胞体チューブ状構造の形成も、膜融合の指標とした。

RHD3 の状態変化は、MM2d 細胞から単離した小胞体膜を様々なヌクレオチドで処理後、更に化学架橋剤である EGS (ethyleneglycol-bis(succinimidylsuccinate)) あるいは DSP (3,3'-dithio-bis(sulfosuccinimidyl)propionate) で処理し、抗 RHD3G 抗体によるイムノプロットにより解析した。また RHD3 と相互作用している成分は、DSP 処理した小胞体を SDS-ゲル電気泳動にかけ、架橋産物のバンドをゲルから切り出し質量分析により同定した。質量分析は日本プロテオミクスに依頼した。

阻害剤などを用いた薬理学的解析には、GFP でラベルされた小胞体を発現しているタバコ培養細胞 BY-2 (Mitsunishi et al. 2000. Plant Cell Physiol. 41; 203-212) を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) エクオリン発光強度測定法による小胞体膜融合解析

小胞体膜融合過程や程度は、融合時に放出されるカルシウムイオンをエクオリンの発光により検出する方法によって定量的に評価した。MM2d 細胞から単離した小胞体は、GTP を加えることによって融合し、大きな袋状構造に変化する。この時、エクオリンの発光強度は上昇した。この上昇は、ATP や GTP の非加水分解化合物である GTP S では起こらず、袋状の構造も観察されないことから、発光強度変化は小胞体膜融合を反映した現象であることが示された。

### (2) RHD3 の小胞体膜融合における役割

まず、GFP でラベルされた小胞体が発現している RHD3 欠損株の小胞体形態を観察した。既に報告されていたように (Stefano et al. 2012. Plant J.) 野生株とは異なり、枝分かれが非常に少ない太い小胞体ストランドが観察され、それと同時に断片化された小胞体チューブ状の構造も多数観察された。そしてこれらの構造の輸送や運動速度、表面小胞体ネットワークにおけるチューブ融合頻度は、野生種と比較し 2/3 以下に減少していた。しかし、小胞体膜融合が完全に阻害されていた

わけではない。

次に小胞体膜融合に及ぼす RHD3 に対する抗体の効果を検討した。抗 RHD3N 抗体あるいは抗 RHD3C 抗体は、GTP 依存的な小胞体膜融合や、流れによるチューブ構造形成は阻害しなかった。一方 GTP 結合部位に対する抗 RHD3G 抗体は融合を阻害し、更にチューブ構造の形成も抑制した。

そして RHD3 欠損株から単離した小胞体は、野生種から単離した小胞体と異なり、GTP 依存的なチューブ形成能が失われていた。

これらの結果は、RHD3 が GTP 依存的な小胞体膜融合に寄与していること。そして GTP 分解活性がその過程に必要であることを示している。また RHD3 変異体の小胞体膜融合頻度の解析結果から、全ての小胞体膜融合が RHD3 により起こっているわけではない、つまり別の機構が存在する可能性を示唆している。

アトラスチンの活性は、ダイナミン GTPase の阻害剤であるダイナソーにより阻害されることが報告されている (Muriel et al. 2009. *J. Neurochem.* 110; 1607-1616)。タバコあるいはシロイヌナズナ培養細胞から単離した小胞体の膜融合やチューブ構造形成も、この阻害剤により抑制された。また阻害効果、あるいは 50% 阻害に必要な濃度もアトラスチンと同程度であった。この結果も植物の小胞体膜融合には RHD3 が寄与しており、アトラスチンと類似した反応機構によって融合が起こることを示唆している。

(3)GTP による RHD3 の状態変化と相互作用成分の同定

GTP によりアトラスチンと同じように RHD3 も会合体を形成するのかどうか、化学架橋剤 EGS あるいは DPS を用いて検討した。小胞体膜融合が誘発される条件、GTP 存在下で架橋剤処理すると、RHD3 はオリゴマーを形成し分子量約 240kDa の架橋産物が検出された。おもしろいことに、GTP S 存在下では小胞体膜融合が誘発されないにもかかわらず、RHD3 のオリゴマー形成が起こった。このことはアトラスチン同様 (Morin-Leisk et al. 2011. *J. Cell Biol.* 195; 605-615)、RHD3 も GTP あるいは GTP S が結合しただけで、別の膜に存在している RHD3 と連結して会合体は形成するが、GTP S の場合加水分解によるエネルギー供給が生じないため RHD3 の構造変化が起こらず、融合することが不可能であることを示唆している。

RHD3 単量体の分子量は約 90kDa であり、架橋産物、つまりオリゴマーの分子量は約 240kDa である。従って、単純に RHD3 だけで 3 量体などのオリゴマーを形成している可能性は低い。そこでこのオリゴマーに含まれる成分、つまり RHD3 と相互作用する成分の同定を試みた。GTP 存在下で単離小胞体を化学架橋剤 DSP で処理し、電気泳動後架橋産物のバンドを切り出し、質量分析によりバンドに含まれる成分を解析した。その結果、RHD3

の他に、スコア は低い HSP90 が検出された。そこでこの成分の小胞体膜融合や形態形成における役割を、ゲラダマイシンなどの阻害剤を用いた薬理的解析により調べた。阻害剤存在下でも GTP に依存した単離小胞体膜の融合やチューブ構造形成は起こり、また細胞内の小胞体の形態、特に表層小胞体ネットワークの形態に変化は見られなかった。今後別の方法により、本当に HSP90 が RHD3 と相互作用し、その機能に関与しているのか検討する必要がある。

(4)まとめと今後の課題

本研究により、GTP に依存した植物小胞体膜の融合に、アトラスチンのホモログである RHD3 が関与していることが明らかになった。そして化学架橋実験などから、GTP 結合による RHD3 オリゴマー形成、その後の GTP 加水分解による RHD3 構造変化といった過程を通して、小胞体膜融合が起こることも示唆された。今後、細胞内における小胞体膜融合の調節機構を理解するためにも、本研究で明らかにできなかった RHD3 と相互作用する成分の同定を行っていく必要がある。

RHD3 欠損株において、小胞体膜融合は完全には抑制されていなかった。また表層の小胞体ネットワークも、不完全ではあるが残っていた。これらの観察は、RHD3 以外の成分が関与する小胞体膜融合機構の存在を示唆している。RHD3 の他に 2 種の RHD3 様タンパク質の存在が知られており、組織や器官によりそれらが RHD3 と相補的に機能することも報告されている (Lee et al. 2012. *New Phytol.* 197; 481-489; Zhang et al. 2013. *Front. Plant Sci.* 4; 514)。従って本研究で用いた RHD3 欠損株においても、それらのタンパク質が小胞体膜融合に寄与した可能性が考えられる。また酵母ではスネアタンパク質の小胞体膜融合への関与が報告されている (Anwar et al. 2012. *J. Cell Biol.* 197; 209-217)。植物においても RHD3 あるいは類似因子による GTP に依存した小胞体膜の融合機構だけではなく、他の機構の存在も十分考えられる。

そして RHD3 欠損株の小胞体の流動や運動速度は、野生種と比較すると大きく減少していた。この結果から膜融合を介した柔軟性、フレキシビリティが流動されやすさに関与しているように思われる。また *in vitro* での単離小胞体からのチューブ形成は流れなどの力を加えることで誘発させたが、細胞内ではアクチン-ミオシン系、特にミオシン XI によりチューブ伸長や形成が起こっていると考えられている (Yokota et al. 2011. *Plant Physiol.*)。そしてシロイヌナズナでは、小胞体の輸送や運動に主にミオシン XI-K が関与することが報告されている (Ueda et al. 2010. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*)。本研究において、西村いくこ教授の研究グループが作製した各ミオシン XI アイソフォーム欠損株から調製した小胞体画分を用いて、小胞体ネットワーク形成を解析することに

より、この現象に關与するミオシン XI アイソフォームの同定を試みた。しかしはっきりとした結果が得られなかった。今後植物小胞体の形態形成を明らかにするためには、融合に關与する機構の解明だけではなく、その輸送や運動そしてチューブ伸長に寄与するアクチン系細胞骨格の役割にも着目する必要がある。

#### 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. Tominaga M, Kimura A, Yokota E, Haraguchi T, Shimmen T, Yamamoto K, Nakano A, Ito K. Cytoplasmic streaming velocity as a plant size determinant. *Developmental Cell* 27; 2013. 345-352. 査読有。doi: 10.1016/j.devcel.2013.10.005.
2. Nishigami Y, Ichikawa M, Kazama T, Kobayashi R, Shimmen T, Yoshikawa K, Sonobe S. Reconstruction of active regular motion in amoeba extract: dynamic cooperation between sol and gel states. *PLoS One*. 5;8(8); 2013. e70317. 査読有。doi:10.1371/journal.pone.0070317. Print 2013.
3. Yoshida K, Ohnishi M, Fukao Y, Okazaki Y, Fujiwara M, Song C, Nakanishi Y, Saito K, Shimmen T, Suzaki T, Hayashi F, Fukaki H, Maeshima M, Mimura T. Studies on vacuolar membrane microdomains isolated from Arabidopsis suspension-cultured cells: local distribution of vacuolar membrane proteins. *Plant Cell Physiology*. 54(10); 2013. 1571-1584. 査読有。doi: 10.1093/pcp/pct107. Epub 2013 Jul 31.
4. Nagai M, Ohnishi M, Uehara T, Yamagami M, Miura E, Kamakura M, Kitamura A, Sakaguchi S, Sakamoto W, Shimmen T, Fukaki H, Reid RJ, Furukawa A, Mimura T. Ion gradients in xylem exudate and guttation fluid related to tissue ion levels along primary leaves of barley. *Plant Cell Environ*. 36(10); 2013. 1826-1837. 査読有。doi: 10.1111/pce.12090. Epub 2013 Apr 8.
5. Shimmen T, Ogata K. Transduction of pressure signal to electrical signal upon sudden increase in turgor pressure in *Chara corallina*. *Journal of Plant Research*. 126(3); 2013. 439-446. 査読有。doi: 10.1007/s10265-012-0537-z. Epub 2012 Nov 16.
6. Tominaga M, Kojima H, Yokota E, Nakamori R, Anson M, Shimmen T, Oiwa K. Calcium-induced mechanical change in the neck domain alters the activity of plant myosin XI. *Journal of Biological Chemistry* 287; 2012. 30711-30718. 査読有。doi:10.1074/jbc.M112.34668

7. Shimmen T. Further electrophysiological studies on cellular effect of herbicide, bromoxynil, using characean cells. *Journal of Plant Research* 125 (6); 2012. 査読有。749-754. doi: 10.1007/s10265-012-0487-5
8. Ikegaya H, Nakase T, Iwata K, Tsuchida H, Sonobe S, Shimmen T. Studies on conjugation of Spirogyra using monoclonal culture. *Journal of Plant Research* 125 (3); 2012. 457-464. 査読有。doi: 10.1007/s10265-011-0457-3
9. Shimmen T. Involvement of protein synthesis in recovery from refractory period of electrical depolarization induced by osmotic stimulation in *Chara corallina*. *Journal of Plant Research* 124; 2011. 639-644. 査読有。doi: 10.1007/s10265-010-0391-9
10. Yokota E, Ueda H, Hashimoto K, Orii H, Shimada T, Hara-Nishimura I, Shimmen T. Myosin XI-dependent formation of tubular structures from endoplasmic reticulum isolated from tobacco cultured cells, BY-2. *Plant Physiology* 156; 2011. 129-143. 査読有。doi: 10.1104/pp.111.175018
11. Hashimoto K, Yokota E, Shimmen T, Yoshida M. The myosin ATPase inhibitor, 2,3-butanedione 2-monoxime, prevents protein secretion by the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Biotechnological Letter* 33; 2011. 769-775. 査読有。doi: 10.1007/s10529-010-0497-0

[学会発表](計15件)

1. 横田悦雄、織井秀文、田原寛、森安裕二、新免輝男、高木慎吾「アクチン結合タンパク質ピリンの活性はリン脂質により修飾される」第56回日本植物生理学会年会 2015年3月16日 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区)
2. 新免輝男「オオシヤジクモにおける圧容機構」日本植物学会第78回大会 2014年9月12日 明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)
3. 富永基樹、伊藤光二、原田武士、横田悦雄、新免輝男、山本啓一、中野明彦「速度改變型キメラミオシン XI の発現により明らかになってきた原形質流動の機構と制御」第55回日本生理学会年会 2014年3月18日 富山大学五福キャンパス(富山県富山市)
4. 富永基樹、伊藤光二、原口武士、横田悦雄、新免輝男、山本啓一、中野明彦「植物サイズ制御における原形質流動の機能およびミオシン XI メンバーの役割分担」日本植物学会第77回大会 2013年9月15日 北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市)
5. 富永基樹、木村篤司、横田悦雄、原口武士、新免輝男、山本啓一、中野明彦、伊藤光二「速度改變型キメラミオシン XI による

原形質流動速度変化が植物サイズに及ぼす影響」日本細胞生物学会第 65 回大会 2013 年 6 月 19 日～6 月 21 日 ウィンクあいち(愛知県名古屋市)

6. Teruo Shimmen “Characeae as a model system for electrophysiological studies on intercellular communication” Annual Meeting of the Society of Plant Signaling and Behavior 2013年7月8日～7月10日 バンクーバー(カナダ)

7. 上田晴子、横田悦雄、朽名夏磨、真野昌二、嶋田知生、田村謙太郎、新免輝男、西村幹夫、西村いくこ「小胞体運動に関わる小胞体タンパク質の解析」第54回日本植物生理学会年会 2013年3月22日 岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

8. 横田悦雄、上田晴子、西村いくこ、新免輝男「タバコ培養細胞における小胞体輸送を担うミオシン」日本植物学会第76回大会 2012年9月16日 兵庫県立大学書写キャンパス(兵庫県姫路市)

9. 上田晴子、横田悦雄、朽名夏磨、嶋田知生、田村謙太郎、新免輝男、西村いくこ「小胞体運動の解析から見えてきたミオシンとアクチンの意外な関係」日本植物学会第76回大会 2012年9月16日 兵庫県立大学書写キャンパス(兵庫県姫路市)

10. 富永基樹、伊藤光二、小嶋寛明、横田悦雄、山本啓一、新免輝男、大岩和弘、中野明彦「分子レベルから眺める原形質流動」日本植物学会第76回大会 2012年9月16日 兵庫県立大学書写キャンパス(兵庫県姫路市)

11. 堀川千尋、岩田和佳、新免輝男「アオミドロの障害における細胞質の集積機構」日本植物学会第76回大会2012年9月15日 兵庫県立大学書写キャンパス(兵庫県姫路市)

12. 新免輝男「オオシャジクモにおける圧シグナルの電気シグナルへの変換」日本植物学会第76回大会 2012年9月15日 兵庫県立大学書写キャンパス(兵庫県姫路市)

13. 新免輝男「オオシャジクモにおける酸化的リン酸化脱共役剤の脱分極作用」2011年日本植物学会近畿支部大会 2011年12月24日 キャンパスプラザ京都(京都府京都市)

14. 上田晴子、横田悦雄、朽名夏磨、嶋田知生、田村謙太郎、馳沢盛一郎、新免輝男、西村いくこ「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(京都府京都市)

15. 横田悦雄、中須加由希、坪本知子、新免輝男「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(東京都目黒区)

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・分子機械学講座ホームページ  
<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biomecha/index-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

新免輝男(兵庫県立大学・生命理学研究科・教授)

研究者番号：80114510

(2)研究分担者

横田悦雄(兵庫県立大学・生命理学研究科・助教)

研究者番号：80212299

(3)連携研究者

西村いくこ(京都大学・理学研究科・教授)

研究者番号：00241232

(4)連携研究者

園部誠司(兵庫県立大学・生命理学研究科・准教授)

研究者番号：30197024