

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770147

研究課題名(和文)植物の表皮における細胞極性の制御機構の研究

研究課題名(英文)Study on cell polarity regulation in plant epidermis

研究代表者

田中 博和 (Tanaka, Hirokazu)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10589922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物の発生や成長において、さまざまな機能性蛋白質が細胞膜上で偏って分布し、重要な働きを担っている。クチクラの形成に関わる PEL1蛋白質は細胞膜上で外側の面に偏って局在しているが、その非対称局在に関わる制御因子は同定されていない。本研究ではPEL1蛋白質の局在制御に関わるメカニズムに関する知見を得ることを目標とし、PEL1-GFP 融合蛋白質を発現するシロイヌナズナを変異原処理し、変異体のスクリーニングを行った。その結果、クチクラの形成に異常を示し、かつPEL1-GFP の分布が野生型と異なる変異体を単離した。今後、得られた変異体を解析することで新規の制御因子が見つかることが期待される。

研究成果の概要(英文)：During plant growth and development, various functional proteins exhibit asymmetric localization at the plasma membrane and play critical roles in regulating cellular communications and cell function. PEL1 protein asymmetrically localizes preferentially at the outer sides of shoot epidermal cells and is involved in cuticle formation. However, very little is known about the regulatory mechanisms underlying the polar localization. We aimed to reveal the regulatory mechanism underlying this process and performed a forward genetic mutant screen using an EMS-mutagenized PEL1-GFP population. We have identified several candidate mutants, which were defective in cuticle-related defect. We expect that, by characterizing PEL1-GFP localization in these mutants, novel mutants with epidermal polarity defect might be identified.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：植物 細胞・組織 発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

近年の分子遺伝学的研究により、高等植物の種々の細胞のアイデンティティや、器官の形成などに関わる遺伝子が同定されてきている。また、植物の発生制御や細胞機能にとってトランスポーターなどの膜タンパク質が、適切に配置することも重要であることが明らかになりつつある。異なる膜タンパク質を細胞膜の異なる領域に配置するためには、何らかの位置情報に従って、異なる膜タンパク質を選別し、選択的に特定の細胞膜領域に輸送したり、あるいは特定の細胞膜領域から排除するような分子機構が必要であると想像される。しかしながら、そのような位置情報や、機能分子の選択的輸送制御機構は十分に理解されていないのが現状である。

高等植物のクチクラは地上部の器官の最外部に形成され、水分の保持や外敵に対する防御、器官の形態形成などにとって重要な機能を持つ。植物のクチクラは脂肪酸派生物であるクチンやワックスを成分としており、クチクラ形成に関わる多数の合成酵素がこれまでに同定されている。脂肪酸の合成はプラスチドで行われると考えられており、クチクラの形成に関わる脂肪酸伸長反応は小胞体で行われると考えられている。実際に、脂肪酸伸長酵素は小胞体に局在することも明らかになっている。ワックスの成分や、クチンの前駆体は、ある段階で細胞の外に排出され、細胞壁の最外部を覆うように配置される必要がある。しかし、クチクラを個体の‘最外部’に形成させるための分子メカニズムについての知見はほとんどない。

クチクラの形成に異常を示す変異体として我々が単離した *permeable leaves1* (*pell*) 変異体では、クチクラの形成が阻害されており、水溶性の色素であるトルイジンブルーが葉の表面を透過しやすいことがわかっている。また、*pell* 変異体では、クチクラの欠損に伴い、高頻度に地上部の器官が張り付き(合着)、稔性はなくなることがわかっている。*pell* 変異体の原因遺伝子は ABC トランスポーターをコードすることも明らかにされている。興味深いことに、PEL1-GFP 融合蛋白質は、表皮細胞の外界側の細胞膜に多く分布する傾向が見られた。PEL1 をこのように外側の細胞膜に偏って局在させる分子機構については不明であり、この局在様式を阻害する薬剤や、遺伝子変異についての情報も皆無であった。

## 2. 研究の目的

PEL1 のような外界側に偏った非対称局在をするタンパク質が、どのような分子メカニズムにより細胞膜上に配置されているのかについては知見が得られていなかった。また、細胞の極性や、細胞レベルのタンパク質の非対称局在が、クチクラ形成に与える影響についても、それを解析する実験材料が整っていない状況であった。本研究では、クチクラの形成と PEL1-GFP の局在を指標として、阻害剤と変異体のスクリーニングを行い、表皮細胞が認識する位置情報や、表皮細胞に置ける機能分子の選択的輸送機構に関わる新規の因子を同定するための研究基盤を整備することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) PEL1 の局在に異常を示す変異体の順遺伝学的スクリーニング

変異体のスクリーニングのために、アルキル化剤であるエチルメタンスルホン酸 (EMS) により PEL1-GFP を持つ形質転換シロイヌナズナ系統を変異原処理し、M2 種子を得た。PEL1 の機能が阻害されると植物は不稔になるため、不稔の変異体でも維持できるように、数個体の M1 植物ごとに別々に M2 種子を収穫した。約 1000 プールの M2 集団を確立し、以下のスクリーニングに用いた。

PEL1 の機能はクチクラの形成に必須であるので、PEL1 の局在に異常を示す変異体ではクチクラの機能に異常が生じる可能性がある。そこで、変異集団の M2 種子をマルチウエルプレートで発芽させ、実生をトルイジンブルー水溶液 (0.05%) に浸すことによりクチクラの透過性の異常を調べ (トルイジンブルー法)、1 次スクリーニングを行った。クチクラの透過性に異常が見られたプールについて、PEL1-GFP の局在を蛍光顕微鏡で解析した。

### (2) クチクラの形成に関わる輸送制御因子の逆遺伝学的探索

膜輸送因子の変異体と、表皮分化に異常を示す変異体に、掛け合せと形質転換により、*PEL1-GFP* 遺伝子を導入した。

表皮で優先的に発現する輸送関連因子は、公開されているマイクロアレイデータを参考に探索し、T-DNA 挿入系統を単離した。

### (3) クチクラの形成を阻害する化合物のスクリーニング

クチクラの形成を阻害する化合物を同定するために、野生型シロイヌナズナ (エコタイプ Col-0) の種子を2日間、低温処理し、21度の育成室で3日間、発芽・生育させた。この実生をそれぞれの薬剤で2日間処理し、トルイジンブルー法により染色した。コントロールとしては、薬剤を溶かす溶媒として用いた DMSO を含む培地を用いて、それと比較して染色度合いを強める薬剤を選抜した。

## 4. 研究成果

### (1) PEL1 の局在に異常を示す変異体の順遺伝学的スクリーニング

PEL1-GFP を発現する形質転換シロイヌナズナを用いて作製した EMS 変異集団の M2 世代の約 9600 個体の実生をトルイジンブルー法によりスクリーニングした。その結果、239 プールからトルイジンブルーに染まる個体が出現した (図 1)。

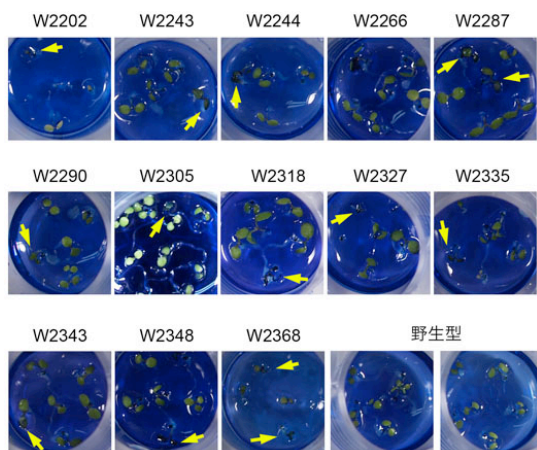


図 1. 1 次スクリーニングで得られた変異体の候補。数字はプールの番号を示す。黄色い矢印で示した個体がトルイジンブルーで良く染まっている。

1 次スクリーニングにおいてトルイジンブルーで染まる個体が出現したプールのうち

の 92 プールについて、PEL1-GFP のパターンを蛍光顕微鏡観察により解析した。その結果、6 個のプールからは、GFP シグナルが弱く、本葉が張り付いた個体が出現した。本葉が張り付く表現型は、クチクラ形成に強い異常を持つ変異体の典型的な表現型である。このことから、トルイジンブルーを用いた今回の 1 次スクリーニングにより、クチクラ不全変異体を適切に濃縮できていると考えられた。また、12 個のプールからは細胞内にドット状の GFP シグナルがある個体が出現した。これらの植物では、PEL1 の細胞内輸送がうまくいかず、それによりクチクラの形成に異常が生じている可能性が考えられる。

これらについて今後、遺伝様式を確認し、表現型の解析を進める。変異の原因遺伝子のクローニングを進めることで、PEL1 の局在制御に関わる新規の因子が同定できると期待される。

### (2) クチクラの形成に関わる輸送制御因子の逆遺伝学的探索

ARF GEF をコードする BEN1 と、Sec1/Munc18 タンパク質 をコードする BEN2、および ARF ファミリーの低分子 G タンパク質をコードする BEX1 は、PIN1 などの膜蛋白質の細胞内輸送に関わることが示唆されていた。これらの因子の変異体はもともと PIN1-GFP 融合蛋白質をコードするトランスジーンを持っていたため、遺伝的な掛け合せにより PIN1-GFP を取り除き、PEL1-GFP を導入し、変異体を確立した。bex1 変異は ARF1 のアミノ酸置換 (L34F) を引き起こす優性変異であったため、その変異を持つ変異体 arf1 遺伝子を野生型植物に導入し、強い形態異常を示すことを確認した。また、表皮の分化に異常を示す abnormal leaf shape1 (ale1) 変異体、ale2 変異体、(arabidopsis crinkly4) acr4 変異体に、PEL1-GFP を形質転換により導入した。今後、これらの変異体における PEL1-GFP の局在様式を解析予定である。

表皮で優先的に発現する遺伝子の候補の中から、低分子 G タンパク質や、膜輸送関連のドメインを持つタンパク質を計 6 個選定し、T-DNA 挿入変異体を単離した。今後、これらの変異体がクチクラの形成に異常を示すかを調べ、興味深い物があれば PEL1-GFP の局在解析を進めることで、新規の制御因子が見つかる期待される。

(3) クチクラの形成を阻害する化合物のスクリーニング

クチクラの形成を阻害する新規の阻害剤を単離するために、シロイヌナズナの実生に投与した場合にクチクラの透過性を上昇させる薬剤のスクリーニングを行った。ChemBridge社の多様性化合物ライブラリーをスクリーニングし、39個の化合物がトリイジンブルーによる植物の染色度合いを強めることが明らかになった。今後、これらの化合物が、PEL1-GFPの局在にどのような影響を与えるかを調べることにより、細胞極性に関わる新規の阻害剤が得られると期待される。

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 2 件)

- ① Tanaka, H., Nodzynski, T., Kitakura, S., Feraru, M. I., Sasabe, M., Ishikawa, T., Kleine-Vehn, J., Kakimoto, T., Friml, J. (2014) BEX1/ARF1A1C is required for BFA-sensitive recycling of PIN auxin transporters and auxin-mediated development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, 55, 737-749. DOI: 10.1093/pcp/pct196. 査読あり
- ② Tanaka, H., Kitakura, S., Rakusova, H., Uemura, T., Feraru, M. I., De Ricke, R., Robert, S., Kakimoto, T., Friml, J. (2013) Cell polarity and patterning by PIN trafficking through early endosomal compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 9, e1003540. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003540. 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- ① 田中博和、Tomasz Nodzynski、北倉左恵子、石川朋美、柿本辰男、Jiri Friml: シロイヌナズナの BEX1/ARF1A1C はオーキシン排出タンパク質 PIN の細胞膜へのリサイクリングと発生制御に必要である。第55回 植物生理学会年会 2014年3月18日。富山大学(富山県)
- ② 田中博和、北倉左恵子、Hana Rakusova、植村知博、柿本辰男、Jiri Friml: シロ

イヌナズナの Sec1/Munc18 タンパク質である VPS45 は細胞極性の制御に関与する。第36回分子生物学会年会。2013年12月3日。神戸ポートアイランド(兵庫県)(ポスター発表)

- ③ 石川朋美、柿本辰男、田中博和: シロイヌナズナの ARF1 と ARF GEF 変異体の遺伝学的解析。第36回分子生物学会年会。2013年12月3日。神戸ポートアイランド(兵庫県)(ポスター発表)
- ④ 田中博和、北倉左恵子、Hana Rakusová, Riet De Rycke, Stéphanie Robert、柿本辰男、Jiří Friml: 初期エンドソームに局在する輸送因子の細胞極性と発生パターンにおける役割。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)
- ⑤ Hirokazu Tanaka, Saeko Kitakura, Hana Rakusová, Tomohiro Uemura, Mugurel I. Feraru, Riet De Rycke, Stéphanie Robert, Tatsuo Kakimoto, Jiří Friml. Early endosomal components are required for polar PIN protein localization and plant architecture in *Arabidopsis*. 22th International Conference on *Arabidopsis Research*. Sydney, Australia, 24 June 2013. (poster presentation)
- ⑥ Hirokazu Tanaka: Developmental roles of early endosomal components in *Arabidopsis*. The 4th NIBB-MPIPZ-TLL Symposium "Arabidopsis and Emerging Model Systems" Okazaki, Japan, 20 November 2012. (poster presentation)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~hiroказu.tanaka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 博和 (TANAKA, Hirokazu)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 10589922