

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 25 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870039

研究課題名（和文）最先端のイメージング技術とシーケンス技術を駆使した植物細胞極性形成機構の研究

研究課題名（英文）Study of plant cell polarity establishment by using advanced imaging and sequencing technology

研究代表者

榎本 悟史（NARAMOTO SATOSHI）

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教

研究者番号：30612022

研究成果の概要（和文）：

植物細胞の極性形成機構の解明を目的として、小胞輸送制御因子である GNOM と VAN3 の詳細な細胞内局在解析およびシロイヌナズナ突然変異体を用いた新規極性制御因子の探索を行った。その結果、GNOM と VAN3 は細胞膜上で共局在するのに対し、細胞内で独立の挙動を示し、GNOM はエンドソームとは異なるオルガネラに局在することを見出した。また、次世代シーケンスによる突然変異体のゲノム解析を行うことで、複数の新規極性形成遺伝子候補を見出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the mechanism of plant cell polarity establishment, subcellular localization analysis of GNOM and VAN3, vesicle transport regulators, and genetic analysis using *arabidopsis* mutants were performed. Whereas GNOM and VAN3 colocalized at PMs, they showed differential localization intracellularly. Interestingly, GNOM localization at non-endosomal compartments was also observed. Additionally, some mutation that supposed to be involved in cell polarity establishment was identified by next generation sequencing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	770,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子・生理科学

キーワード：オーキシン，細胞極性，小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンであるオーキシンは、植物体内を極性輸送され、特定の流路や濃度勾配を形成することで、個体軸を形成する作用を持つ。

極性輸送の方向は、オーキシン排出トランスポーターである PIN が、特定の細胞膜領域へ局在することにより規定される。PIN の細胞内局在の制御には、エンドソーム-細胞膜間における極性を持った小胞輸送が重要な役

割を果たすことが知られている。

しかしながら、この小胞輸送機構は未解明な点が多く残されている。極性形成における重要性から最も注目されている、輸送小胞の形成と積み荷の選別を制御する ARF-GEF をコードする GNOM ですら、遺伝学的証拠や生理学的実験から、PIN 1 の細胞基部側へのリサイクリングを担うという知見が得られているのみであり、実際にどの ARF GTPase や ARF-GAP と共同して作用するか等の分子的作用機序は不明であり、さらには、既知のエンドソームタンパク質と GNOM が共局在しないことから、GNOM が局在し、細胞極性形成に重要な役割を果たすと考えられる、リサイクリングエンドソームの存在についてすら、未だ想定の外を出ていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、植物個体の形態形成の基盤となる、植物細胞の極性形成機構を明らかにすることを目的としている。この機構に重要な役割を果たすと報告されている、小胞輸送制御因子 GNOM ARF-GEF と VAN3 ARF-GAP に着目し、詳細な細胞生物学的解析を行うことで、これらがどのようにして、協調的に働き、細胞極性形成に寄与するのかを明らかにしたい。さらに、この解析を通して、GNOMが局在すると言われるものの、実態がこれまで不明な、リサイクリングエンドソームについて、明確な細胞生物学的知見を得たい。一方で、PINの細胞内局在に異常を来す *van2*, *5*, *6* 変異体の原因遺伝子の同定と機能解析を行い、新規の極性制御因子を明らかにしたい。以上の二つのアプローチを通して、新しい細胞極性形成機構の概念を提唱したい

3. 研究の方法

植物細胞の極性形成機構の解明へ向け、以下のアプローチを行った。

- (1) 高解像度共焦点レーザー顕微鏡を用いた GNOM の細胞内局在解析
GNOM が生体内で機能、局在する細胞内小器官を明らかにするために、様々なオルガネラマーカールとの二重染色観察を行う。なお、この際には、理化学研究所中野生体膜研究室が開発した超解像共焦点レーザー顕微鏡を用い、詳細な観察を行う。
- (2) 抗 GNOM 抗体作成および免疫染色
GNOM の生体内局在解析を証明するためには、抗体を用いた局在解析が重要であると考えられる。そこで抗 GNOM 抗体の作成に着手する。抗 GNOM 抗体作成が完

了後、共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡レベルで免疫局在解析を行う。

- (3) 次世代シーケンサーを用いた *van2*, *van5*, *van6* 変異体のゲノム解析
これまでに *van2*, *van5*, *van6* 変異体に関しては、ラフマッピングがなされているのみで、原因遺伝子の同定はなされていない。近年、次世代シーケンスが開発され、様々な生物の全ゲノムを短時間で解析可能となっている。そこでこの技術を用いて、*van2*, *van5*, *van6* 変異体の全ゲノム解析を行い、原因遺伝子の同定を試みる。

- (4) 全反射顕微鏡による VAN3 と GNOM の観察

これまでに、申請者は、GNOM と VAN3 は細胞膜でエンドサイトーシスを制御することを明らかにした (Naramoto et al., 2010)。しかしながら、①エンドサイトーシスの際、GNOM と VAN3 は時空間的にどのようなタイミングで機能し合うのか？②異なるタイミングで機能する場合、GNOM, VAN3 と PIN の三者はどのように協調して働きエンドサイトーシスに関わるのか？等の重要な課題が残っている。この点を解明するため、細胞膜近傍を詳細に観察することができる全反射顕微鏡を用いて、細胞膜上の三者の挙動を観察する。加えて、クラスリン、ダイナミンなどのエンドサイトーシスで機能する因子との関係も観察により明らかにする

4. 研究成果

- (1) 高解像度共焦点レーザー顕微鏡を用いた GNOM の細胞内局在解析
GNOM-GFP と様々なオルガネラマーカール RFP タンパク質の二重染色観察を行ったところ、GNOM はエンドソームには局在せず、主にゴルジ体に局在することが明らかになった。また、GNOM は主に、ゴルジ体の *cis* cisternae に局在することが明らかになった。一方、GNOM のホモログである GNL1 も同様の解析を行った所、GNL1 も *cis* cisternae に局在することが明らかになった。興味深いことに GNOM と GNL1 は両者とも *cis* Golgi cisternae に局在しているにも関わらず、両者は *cis* Golgi cisternae の異なる領域に局在することが明らかになった。これまでに GNOM はリサイクリングエンドソームに局在すると広く認知されていたのに対して、本研究は一石を投じることになる

と予想される。本研究は植物生理学、細胞生物学・発生学の幅広い研究者に対して多大なるインパクトを与えるkと予想される。

- (2) 抗 GNOM 抗体作成および免疫染色
GNOM の生体内局在に関して決定的情報を得るために、抗 GNOM 抗体の作成に着手した。合計 8 個のペプチド抗体を作成した。Western blot 解析を行った所、二つのものについては、GNOM タンパク質を特異的に認識することが明らかになった。しかしながら、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、免疫染色を行った所、無処理の状況では、顕著なシグナルを得ることが出来なかった。一方、BFA 処理後にはこれまでに GNOM-GFP を用いた解析と同様に、TGN と共局在することを見出した。現在、BFA 無処理の条件での、GNOM の細胞内局在を明らかにすべく、免疫染色の条件検討を行っている段階である。
- (3) 次世代シーケンサーを用いた *van2*, *van5*, *van6* 変異体のゲノム解析
熊本大学・澤進一郎教授との共同研究により、*van2*, *van5*, *van6* 変異体の次世代シーケンス解析を行った。それぞれ候補変異が 10 数個見出された。現在、それらの候補変異に相当する T-DNA 挿入変異体の単離・解析を行って原因遺伝子の同定を試みている。これまでに、それらのうちで、*van5* 変異体に関しては、有望な変異が見出されている。具体的には、*van5* 変異体では、ステロール合成の遺伝子に変異があることが見出されたが、実際にこの遺伝子に TDNA 挿入が導入された植物体の表現型を解析したところ、*van5* 変異体と類似の表現型が見出されている。現在、アレリズムテストを行い、*van5* 変異体の原因遺伝子がステロール合成関連遺伝子であるかどうかを検証している。これまでに、植物細胞の極性形成に関与する遺伝子として知られているものは、あまり多くは無かった。*van2*, *van5*, *van6* 変異いずれも、これまでに知られている極性形成に関与する遺伝子には変異は見出されなかったことから、これらの原因遺伝子は新規極性制御因子である可能性が高く、今後の研究の進展が待たれる。
- (4) 全反射顕微鏡による VAN3 と GNOM 観察
全反射顕微鏡を用いて VAN3-ARF-GAP と GNOM-ARF-GEF の細胞膜近傍における動態を詳細に解析した。VAN3 は素速く動く小さいドット状の局在様式を示し、一定

の頻度でクラスリンと共局在することを見出した。一方 GNOMは、リング状の構造体およびクラスリン様のドット状構造に局在することを見出した。ドット状構造は、静止しており、クラスリンと高頻度で共局在することも明らかになった。また、リング状の構造体は原形質流動のり移動していることも明らかになった。2重染色の結果、このリング状構造体は、ゴルジ体であることが明らかになった。この結果は、上記の私自身の研究結果と良く合致するものである。

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 1 件)

- ① Xu Chen, Satoshi Naramoto, Stephanie Robert, Ricardo Tejos, Christian Löffke, Deshu Lin, Zhenbiao Yang, Jiri Friml, ABP1 and Rop6 GTPase regulate clathrin-mediated endocytosis in Arabidopsis roots, *Current Biology*, 査読有, 22 巻, 2012, 1326-1332
DOI:10.1016/j.cub.2012.05.020

[学会発表] (計 4 件)

- ① 榎本悟史, 細胞極性を司る ARF GTPase 制御因子の解析, 日本植物生理学会, 2012 年, 3 月 17 日, 京都産業大学
② 榎本悟史, 植物細胞の極性形成機構の解明へ向けたアプローチ, 特定領域研究植物メリステム若手ワークショップ, 2011 年 10 月 13 日, 白浜荘 (高島市)
③ 榎本悟史, 細胞極性制御に関わる ARF TPase regulator の解析, 植物学会, 2011 年 9 月 17 日, 東京大学
④ 榎本悟史, 小胞輸送から探る植物細胞の極性形成機構, 阿蘇フォロンティアサミット植物の形作りの明日を語る, 2011 年 8 月 23 日, 阿蘇市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 悟史 (NARAMOTO SATOSHI)
東京大学・大学院理学系研究科・特任助教
研究者番号：30612022

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：