

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440132

研究課題名(和文) 原形質流動における小胞体運動の役割～小胞体膜タンパク質に着目した解析～

研究課題名(英文) Analysis of ER membrane proteins in ER dynamics

研究代表者

上田 晴子 (Ueda, Haruko)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90402776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：原形質流動は植物の細胞内運動であるが、その分子機構については不明な点が多い。われわれは「小胞体運動が原形質流動の原動力である」という仮説を立て、小胞体運動において全く未知である小胞体側の機構を解明することを目的とし、小胞体膜タンパク質RHD3 (Root Hair Defective3) に着目して解析を行ってきた。本研究では、RHD3が小胞体の膜融合を担うことを明らかにした。また、*rh3*変異体では、かさ高い小胞体ネットワークの運動は抑制されるものの、断片化した小胞体は流動できることを見出した。RHD3の小胞体膜融合能と運動性の関係を明らかにすることが、今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：The endoplasmic reticulum (ER) is the organelle with the largest membrane surface area in eukaryotic cells. The ER membrane is physically continuous and extends throughout the cytoplasm. A striking feature of the plant ER is the active streaming driven by plant-specific class XI myosins. We found that the ER streaming was suppressed in root hair defective (*rh3*) mutants. RHD3 is a membrane-associated dynamin-like GTPase. A deficiency of RHD3 caused a defect in the interconnection of the membranes, resulting in the occurrence of many ER fragments in the *rh3* cells. In addition, the ER network is RHD3-dependently reconstituted from the cytosol and microsome fraction of tobacco cultured cells by exogenously adding GTP, ATP, and F-actin. These results indicate that RHD3 functions as an ER membrane fusogen in plants. The fusogenic activity of RHD3 may contribute to the smooth movement of the ER.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：小胞体 原形質流動 膜融合

1. 研究開始当初の背景

原形質流動は200年以上前から知られる植物に特徴的な現象で、アクチン-ミオシンを駆動力とするオルガネラ運動によって生じる。しかし、あらゆるオルガネラが活発に動くため、どのオルガネラが原動力であるかははっきりしなかった。われわれは、最大表面積を持つ小胞体の絶え間ない流動の様子から、「小胞体運動が原形質流動の原動力である」という仮説を立て、検証を進めてきた。これまでの小胞体運動を駆動するミオシンの解析では、仮説を支持する知見を得ている。

小胞体を駆動するモーターについては情報が得られたが、運動を支える小胞体側の機構は全く未知である。そこで、小胞体運動に異常を示す変異体を探索した結果、小胞体膜に局在するタンパク質 ROOT HAIR DEFECTIVE 3 (RHD3) の変異体で運動が顕著に抑制されることを見出した。*rhd3* は根毛形成不全変異体として知られ、1997年に原因遺伝子が同定されたものの、その分子機能は不明なままであった。

2. 研究の目的

われわれは、RHD3が小胞体膜に局在するGTP結合タンパク質であることを明らかにした。*rhd3*変異体の小胞体は、運動性のみならず形態にも異常を示した。興味深いことに、小胞体が細胞内で大きな凝集体を形成し、他のオルガネラもこの凝集体中に巻き込まれて動きが抑制されている様子が観察された。以上の知見から、小胞体の異常によって他のオルガネラの運動性も影響を受けることが強く示唆される。そこで本研究では、RHD3の機能解析を中心として、小胞体膜に局在する因子がどのように小胞体運動に寄与するかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、シロイヌナズナおよびタバコ培養細胞を用いて、下記の方法で研究を進めた。

1) タバコ培養細胞を用いた小胞体ネットワーク *in vitro* 再構成系、およびシロイヌナズナ *rhd3* 変異体の表現型解析から、RHD3の分子機能を明らかにする。

2) RHD3相互作用因子を探索し、局在解析や変異体における小胞体の表現型などからその機能を検証する。

4. 研究成果

1) RHD3の分子機能解析

単離した小胞体を用いたネットワーク *in vitro* 再構成系では、小胞の融合による肥大化→アクチン・ミオシン依存的なチューブ伸長→チューブ同士の融合を経て、ネットワークが形

成されていく様子を観察できる。*rhd3*変異体はネットワーク構造にも異常を示したため、*in vitro*再構成系を利用してRHD3が関与するステップを解析した。その結果、RHD3の機能を阻害すると小胞の肥大化が起こらなかったため(図1)、RHD3が小胞体膜融合に関与することが明らかとなった。

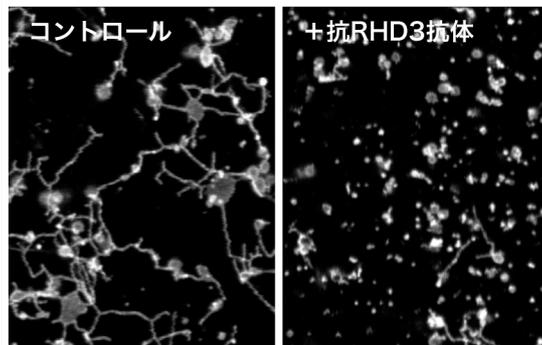


図1 小胞体ネットワークの *in vitro* 再構築系

タバコ培養細胞から抽出した細胞質ゾルとマイクロソームにGTP, ATP, アクチン繊維を加え、スライドガラス上で再構築した小胞体ネットワーク。抗RHD3抗体を加えてRHD3の機能を阻害すると、ネットワークが形成されない(右)。

一方、*rhd3*変異体における小胞体運動の詳細な観察から、細胞内全体で流動する典型的な小胞体運動は抑制されているものの、局所的に原形質流動に匹敵する速度で素早く運動する小胞体ドメインが存在することを見出した。このドメインを Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) により解析したところ、褪色した蛍光シグナルが復活せず、ネットワークから物理的に切り離された小胞体断片であることがわかった(図2)。従って、*rhd3*変異体でも小胞体運動を担うアクチン・ミオシンの装置は維持されており、断片化した小胞体なら駆動することができるが、大きな小胞体ネットワークの流動性が低下していると考えられた。

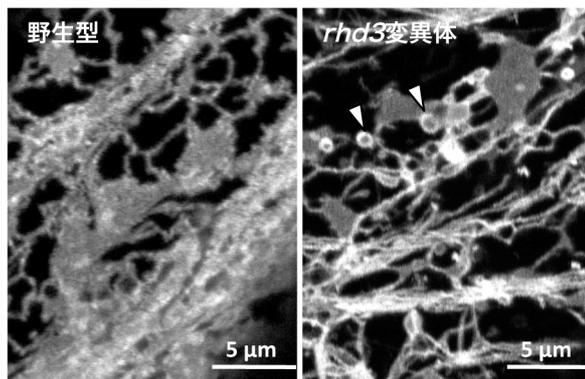


図2 *rhd3*変異体の小胞体は断片化している

GFPで可視化したシロイヌナズナの小胞体。チューブとシート状構造から成る。*rhd3*変異体ではシート状構造が少なく、異常な小胞体断片が観察される(矢尻)。

2) RHD3相互作用因子の探索と解析

RHD3免疫沈降画分のプロテオーム解析から、RHD3と相互作用する候補タンパク質

を見出した。この中から「小胞体局在」かつ「膜貫通ドメイン」を持つことが予測される機能未知のタンパク質ファミリーに焦点を当てて解析を進めた。蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現させて細胞内局在の解析を行った結果、これらのタンパク質は小胞体膜上に局在することが確認された。そこで、これらタンパク質の欠損変異体を確立し、小胞体を可視化して運動性と形態・分布を解析した。その結果、二重および三重変異体における運動性には異常が認められなかったが、アミノ酸配列に高い相同性をもつホモログ同士の二重変異体では、小胞体ネットワークの形態と分布に異常を示すことが明らかとなった。メンバー間でアミノ酸配列の相同性が非常に高く、冗長性が高いことが考えられるため、今後全てのメンバーを欠損した変異体で解析を行い、小胞体運動性への関与を検証する必要がある。

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 Shirakawa, M., Ueda, H., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I. Myosin cells are differentiated directly from ground meristem cells and are developmentally independent of the vasculature in Arabidopsis leaves. *Plant Signal. Behav.* (2016) 11, e1150403. doi: 10.1080/15592324.2016.1150403. 査読有
- ② *Ueda, H., *Yokota, E., Kuwata, K., Kutsuna, N., Mano, S., Shimada, T., Tamura, K., Stefano, G., Fukao, Y., Brandizzi, F., Shimmen, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. Phosphorylation of the C terminus of RHD3 has a critical role in homotypic ER membrane Fusion in Arabidopsis. *Plant Physiol.* (2016) 170, 867-880. doi: 10.1104/pp.15.01172. 査読有
*These authors contributed equally to this work.
- ③ Ueda, H., Tamura, K., and Hara-Nishimura, I. Functions of plant-specific myosin XI: from intracellular motility to plant postures. *Curr. Opin. Plant Biol.* (2015) 28, 30-38. doi: 10.1016/j.pbi.2015.08.006. 査読有
- ④ *Okamoto, K., *Ueda, H., Shimada, T., Tamura, K., Kato, T., Tasaka, M., Morita, M. T., and Hara-Nishimura, I. Regulation of organ straightening and plant posture by an actin-myosin XI cytoskeleton. *Nat. Plants* (2015) 1, 15031. doi: 10.1038/nplants.2015.31. 査読有
*These authors contributed equally to this work.
- ⑤ *Okamoto, K., *Ueda, H., Shimada, T., Tamura, K., Koumoto, Y., Tasaka, M., Morita, M. T., and Hara-Nishimura, I. An ABC transporter B family protein, ABCB19, is required for

cytoplasmic streaming and gravitropism of the inflorescence stems. *Plant Signal. Behav.* (2016) 11, e1010947. doi:

10.1080/15592324.2015.1010947. 査読有

*These authors contributed equally to this work.

- ⑥ Hamada, T., Ueda, H., Kawase, T., and Hara-Nishimura, I. Microtubules contribute to tubule elongation and anchoring of endoplasmic reticulum, resulting in high network complexity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* (2014) 166, 1869-1876. doi: 10.1104/pp.114.252320. 査読有
 - ⑦ Shirakawa, M., Ueda, H., Shimada, T., Kohchi, T., and Hara-Nishimura, I. Myosin cell development is regulated by endocytosis machinery and PIN1 polarity in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* (2014) 26, 4448-4061. doi: 10.1105/tpc.114.131441. 査読有
 - ⑧ Shirakawa, M., Ueda, H., Nagano, A.J., Shimada, T., Kohchi, T., and Hara-Nishimura, I. FAMA is an essential component for differentiations of two distinct cell types, myosin cell and guard cell in Arabidopsis. *Plant Cell* (2014) 26, 4039-4052. doi: 10.1105/tpc.114.129874. 査読有
 - ⑨ Ichino, T., Fuji, K., Ueda, H., Takahashi, H., Koumoto, Y., Takagi, J., Tamura, K., Sasaki, R., Aoki, K., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I. GFS9/TT9 contributes to intracellular membrane trafficking and flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* (2014) 80, 410-423. doi: 10.1111/tpj.12637 査読有
 - ⑩ Shirakawa, M., Ueda, H., Koumoto, Y., Fuji, K., Nishiyama, C., Kohchi, T., Hara-Nishimura, I., and Shimada, T. CONTINUOUS VASCULAR RING (COV1) is a trans-Golgi network-localized membrane protein required for Golgi morphology and vacuolar protein sorting. *Plant Cell Physiol.* (2014) 55, 764-772. doi: 10.1093/pcp/pct195. 査読有
 - ⑪ Tamura, K., Iwabuchi, K., Fukao, Y., Kondo, M., Okamoto, K., Ueda, H., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. Myosin XI-i links the nuclear membrane to the cytoskeleton to control nuclear movement and shape in Arabidopsis. *Curr. Biol.* (2013) 23, 1776-1781. doi: 10.1016/j.cub.2013.07.035. 査読有
- [学会発表] (計 9 件)
- ① ○上田晴子, 横田悦雄, 朽名夏磨, 西村いくこ, 植物の細胞内ダイナミクス, 第23回日本バイオイメージング学会 公開講座, 2014年9月6日, 吹田(招待講演)
 - ② ○Ueda, H., Yokota, E., Kutsuna, N., Shimada, T., Tamura, K., and Hara-Nishimura, I.

Quantitative analysis and intracellular machineries for streaming of endoplasmic reticulum in *Arabidopsis thaliana*. 第38回内藤コンファレンス, 2014年10月7日～10月10日, 札幌 (ポスター発表)

③ ○Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., Shirakawa, M., Ueda, H., and Shimada, T. Endomembrane-mediated plant defense strategies against pathogens and herbivores. 第38回内藤コンファレンス, 2014年10月7日～10月10日, 札幌 (招待講演)

④ ○西村いくこ, 初谷紀幸, 白川一, 上田晴子, 嶋田知生, 植物の細胞内膜系が支える生体防御戦略, 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日～11月27日, 横浜 (招待講演)

⑤ ○太田奈津美, 上田晴子, 他9名, シロイヌナズナにおける小胞体に異常を示す変異体の解析, 第56回日本植物生理学会年会, 2015年3月16日～3月18日, 東京 (口頭発表)

⑥ ○Ueda, H., and Yokota, E. Active movements and network formation of the endoplasmic reticulum in plant cells. 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月4日, 神戸 (招待講演)

⑦ ○Ueda, H., Shimada, T., Tamura, K., Morita, MT., and Hara-Nishimura, I. An actin-myosin XI cytoskeleton determines plant posture by regulating organ straightening. 8th Plant Biomechanics International Conference, 2015年11月30日, 名古屋 (口頭発表)

⑧ ○上田晴子, 他7名, アクチン・ミオシンXI依存的なストレートニング機構の役割, 第57回日本植物生理学会年会, 2016年3月19日, 盛岡 (口頭発表)

⑨ 上田晴子, ○横田悦雄, 他8名, リン酸化を介した小胞体膜融合因子RHD3の活性調節, 第57回日本植物生理学会年会, 2016年3月20日, 盛岡 (口頭発表)

〔図書〕 (計1件)

① Ueda, H., Yokota, E., and Hara-Nishimura, I. Endoplasmic reticulum throughout the cytoplasm in “Atlas of Plant Cell Structure”, Springer. (2014)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2014/150324_1.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

上田 晴子 (UEDA HARUKO)