

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840108

研究課題名(和文)植物ミトコンドリアの形態を維持する新奇メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of a novel regulatory mechanism of mitochondrial morphology in plants

研究代表者

山岡 尚平 (Yamaoka, Shohei)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00378770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの形態はその機能と密接な関係にあり、その制御は植物における細胞の生理機能および個体の発生・環境応答にとって必要不可欠である。本研究では、ミトコンドリア外膜局在型GTPaseであるMIR01が、voltage-dependent anion channel (VDAC)をはじめとするミトコンドリア外膜局在タンパク質と相互作用していることを明らかにした。MIR01の発現抑制株およびVDACの挿入変異株ではミトコンドリアの形態・植物の発生に異常が見られたことから、これらの相互作用はミトコンドリアの形態維持に重要な役割をもつことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial morphology and motility are tightly linked to their functions, and their regulation is critical for many aspects of cellular functions and plant growth and development. In this study, we demonstrated that Arabidopsis MIR01, an evolutionarily conserved mitochondrial GTPase, physically interact with mitochondrial outer-membrane proteins including voltage-dependent anion channel (VDAC). Reduced expression of MIR01 and insertional mutation of the VDAC genes led to abnormal mitochondrial morphology and impaired plant development. Our observations suggest that MIR01-VDAC interaction plays a vital role in the maintenance of mitochondrial morphology in plants.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア ライブイメージング Miro シロイヌナズナ

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアはその形態と運動を頻繁に変化させるオルガネラである。近年、ヒトをはじめとする哺乳動物・昆虫などの後生動物あるいは酵母など他の真核生物での研究から、ミトコンドリアのダイナミクスを制御するタンパク質が多数同定されてきた。例えば、ミトコンドリアの分裂と融合は、いずれもダイナミン・ファミリーに属する GTPase が中心的な役割を果たす。また最近では、Miro と呼ばれるミトコンドリア外膜局在型 GTPase が、ミトコンドリアの運動の制御に重要な役割を果たしていることが示唆されている。これらの制御タンパク質は、後生動物と酵母でよく保存されているが、興味深いことに、植物においては、ミトコンドリア分裂を担うダイナミン GTPase と、Miro GTPase 以外の因子については、そのほとんど全てのホモログがゲノムに存在しない。このことから、植物ではミトコンドリア・ダイナミクスを制御する分子メカニズムが他の生物と大きく異なることが考えられる。

研究代表者らのこれまでの研究により、ミトコンドリア・ダイナミクスは植物の発生に大きく寄与することが明らかとなった。例えば、ミトコンドリア分裂の GTPase である DRP3 の欠失は、植物体の矮小化をもたらす。研究代表者らはこれまで、植物の Miro ホモログである MIRO1 の欠失が、花粉管の発芽・伸長を抑制し、胚発生の極めて初期の段階で致死をもたらすことを示した(Yamaoka and Leaver, Plant Cell 2008)。ミトコンドリア・ダイナミクスの制御機構の解明は、植物の発生・生理を知る上で重要なテーマのひとつであるといえる。

後生動物において、ミトコンドリアは主に微小管に結合して  $Ca^{2+}$  依存的に運動していることが知られている。このとき Miro は細胞内の局所的な  $Ca^{2+}$  濃度を感知し、微小管との結合性を調節することで、ミトコンドリアの運動を制御していることが示唆されている。一方、研究代表者らは、シロイヌナズナでの MIRO1 遺伝子の欠失は、ミトコンドリアの異常な肥大化をもたらすことを明らかにし、MIRO1 の主要な役割は植物ミトコンドリアの形態維持であることを示唆した(Yamaoka and Leaver, Plant Cell 2008; Yamaoka et al. Plant Cell Rep 2011)。植物では、ミトコンドリアの運動はアクチン繊維依存的であり、また後生動物において Miro の相互作用因子とされるタンパク質のホモログがほとんど存在しない。さらに、Miro はミトコンドリアをもつほぼ全ての真核細胞に存在している。出芽酵母では、Miro はミトコンドリアの形態維持に関わるとされる。細胞性粘菌では微小管依存的なミトコンドリアの運動に Miro は関わっていない。こうしたことから、Miro の機能は本来全ての真核細胞に共通するものであり、後生動物で見られる Miro のミトコンドリアの運動に関わる

機能は種特異的であると考えられる。植物ミトコンドリアにおける MIRO1 の役割を明らかにすることで、全真核生物に共通する Miro の分子機能を明らかにすることができるかと期待される。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、シロイヌナズナをモデルとして、MIRO1 の関与する分子機構を明らかにし、ミトコンドリアの形態維持との関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 人工マイクロ RNA による MIRO1 ノックダウン植物の解析: MIRO1 に対する人工マイクロ RNA を導入した植物を作成し、定量 PCR により MIRO1 発現量を調べる。また MIRO1 に対する抗体を作成し、タンパク質蓄積量についても調べる。発現低下のみられた植物について、ミトコンドリア局在型蛍光タンパク質(mtGFP)を導入し、ミトコンドリアの形態を可視化・解析する。また表現型を明らかにする。(2) 酵母 2 ハイブリッド(Y2H)法による MIRO1 相互作用タンパク質の探索と検証: MIRO1 タンパク質の C 末端膜貫通領域を除いた細胞質ドメインを bait として、シロイヌナズナ均一化 cDNA ライブラリーに対してスクリーニングを行う。得られたクローンから MIRO1 相互作用タンパク質候補を同定する。さらに MIRO1 にエピトープ・タグを付与した融合タンパク質を発現する植物を用いて免疫沈降とウェスタン解析を行い、相互作用を検証する。(3) MIRO1 相互作用タンパク質の植物における機能の解析: 得られた MIRO1 相互作用タンパク質の遺伝子について、シロイヌナズナ T-DNA 挿入変異株を取得し、mtGFP を導入してミトコンドリアの形態を明らかにするとともに、その表現型を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) 人工マイクロ RNA による MIRO1 ノックダウン植物の解析: MIRO1 の欠失は胚性致死となるため、胚発生後の発生過程での解析が不可能である。そこで本研究では MIRO1 ノックダウン株の作成を試みた。MIRO1 に対する人工マイクロ RNA を 3 種類作成し過剰発現株を得たところ、1 種類の配列では T1 植物が全て枯死したが、2 種類では T1 植物の一部で継代が可能であった。これらの株で定量 PCR を行い野生株と発現量を比較したところ、MIRO1 の発現量が著しく低下していた。次に MIRO1 の細胞質ドメインの全長を大腸菌で発現させてタンパク質を精製し、これを抗原として抗体を作成した。GFP-MIRO1 植物を用いて評価したところ、この抗体は MIRO1 を特異的に検出できた。この抗体を用いて MIRO1 人工マイクロ RNA 発現株のウェスタン解析を行ったところ、MIRO1 タンパク質の蓄積が著しく低

下していた。これらのことから、これらの株で *MIRO1* はノックダウンされていることが示された。

*MIRO1* ノックダウン株は、芽生えは比較的正常に成長するが、成長が進むにつれ植物体が著しく矮小化し、ロゼット葉が萎縮し、成長の早い段階での黄化と一部の組織での自発的な細胞死が見られた。mtGFP によりミトコンドリアを可視化したところ、野生株ではミトコンドリアは主に長粒状であったが、*MIRO1* ノックアウト株では球状であり、またやや肥大化しているものが多く見られた。*MIRO1* の欠失では植物は胚性致死となり、ミトコンドリアはより肥大化し、細胞内に1~数個の異常ミトコンドリアをもつのみとなる(Yamaoka and Leaver, *Plant Cell* 2008; Yamaoka et al. *Plant Cell Rep* 2011)。このことから、*MIRO1* は発現量依存的にミトコンドリアの形態と植物の生育に影響することが示唆された。

(2) Y2H 法による *MIRO1* 相互作用タンパク質の探索と検証: *MIRO1* 相互作用タンパク質を明らかにするため、*MIRO1* 細胞質ドメインを bait として Y2H 法によりシロイヌナズナ cDNA ライブラリをスクリーニングした。その結果、複数の陽性クローンが得られた。これらのクローンの大多数は、ミトコンドリア外膜のチャネルタンパク質である *VDAC* をコードしていた。また一部のクローンは2種類の機能未知のタンパク質をコードしていた。そこで、GFP-*MIRO1* 植物を用いて抗 GFP 抗体により免疫沈降を行い、*VDAC* の抗体を用いてウェスタン解析を行ったところ、*MIRO1* 特異的に *VDAC* が検出された。これらのことから、*MIRO1* は *VDAC* と相互作用している可能性が示唆された。また、2種類の機能未知タンパク質について GFP 融合タンパク質を発現する植物を作成し共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、これらのタンパク質はミトコンドリア外膜に局在することが示唆された。以上のことから、*MIRO1* はミトコンドリアの外膜局在タンパク質と相互作用していることが示唆された。

(3) *MIRO1* 相互作用タンパク質の植物における機能の解析: *VDAC* のミトコンドリア形態および植物の発生・生理における役割を調べるために、*VDAC* の T-DNA 挿入変異体を単離した。これらの植物では、成熟植物体で早期黄化・ロゼット葉の萎縮・一部組織での細胞死・稔性の低下がみられた。また mtGFP によりミトコンドリアを可視化したところ、ミトコンドリアの球状化・若干の肥大化が観察された。これらの表現型は *MIRO1* ノックダウン株と相似であった。これらのことから、*VDAC* は *MIRO1* と同一の経路でミトコンドリアの形態と植物の発生に寄与していることが示唆された。*VDAC* はミトコンドリア外膜において ATP をはじめとする低分子化合物の透過性に寄与してい

るとされている。本研究により、Miro はミトコンドリア外膜において *VDAC* と相互作用することにより、ミトコンドリア-細胞質間での低分子化合物の輸送に寄与しており、Miro もしくは *VDAC* の欠失あるいは発現量の低下はミトコンドリアの機能を著しく低下させ、その結果ミトコンドリア形態が異常を示すという可能性が示された。

#### <引用文献>

Yamaoka, S. and Leaver, C. J. (2008) "EMB2473/*MIRO1*, an *Arabidopsis* Miro GTPase, is required for embryogenesis and influences mitochondrial morphology in pollen." *Plant Cell* 20: 589-601.

Yamaoka, S., Nakajima, M., Fujimoto, M., Tsutsumi, N. (2011) "MIRO1 influences the morphology and intracellular distribution of mitochondria during embryonic cell division in *Arabidopsis*." *Plant Cell Rep.* 30: 239-244.

#### 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. Yamaoka, S., Hara-Nishimura, I. (2014) "The mitochondrial Ras-related GTPase Miro: views from inside and outside the metazoan kingdom." *Front. Plant Sci.* 5:350. doi: 10.3389/fpls.2014.00350

2. Yamaoka, S., Shimono, Y., Shirakawa, M., Fukao, Y., Kawase, T., Hatsugai, N., Tamura, K., Shimada, T., Hara-Nishimura, I. (2013) "Identification and dynamics of *Arabidopsis* adaptor protein-2 complex and its involvement in floral organ development." *Plant Cell* 25: 2958-2969. doi: 10.1105/tpc.113.114082

[学会発表](計10件)

1. 山岡尚平、友金寛和、西浜竜一、山口勝司、重信秀治、石崎公庸、大和勝幸、河内孝之「転写因子 *BONOB* は苔類ゼニゴケの有性生殖器官形成を制御する」第56回日本植物生理学会年会 2015年3月18日 東京農業大学(東京都世田谷区)

2. 加藤大貴、鈴木秀政、山岡尚平、西浜竜一、石崎公庸、河内孝之「苔類ゼニゴケにおけるオーキシン受容メカニズムの解析」第56回日本植物生理学会年会 2015年3月18日 東京農業大学(東京都世田谷区)

3. Yuya Sato, Yutaka Kodama, Shohei Yamaoka, Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi, Yuko Inoue, Yuji Moriyasu

“Isolation of a mutant showing accelerated senescence in darkness in *Marchantia polymorpha* L.” 第56回日本植物生理学会年会 2015年3月17日 東京農業大学(東京都世田谷区)

4. 鈴木秀政、加藤大貴、**山岡尚平**、西浜竜一、河内孝之「苔類ゼニゴケにおけるオーキシン受容体 MpTIR1 の生理機能の解析」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(東京都世田谷区)

5. 門脇千穂、高木純平、**山岡尚平**、白川一、上田晴子、田村謙太郎、小嶋美紀子、榊原均、嶋田知生、西村いくこ「シロイヌナズナ AP-2 複合体の生理機能の解明」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(東京都世田谷区)

6. **Shohei Yamaoka**, Hirokazu Tomogane, Ryuichi Nishihama, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Kimitsune Ishizaki, Katsuyuki T. Yamato, Takayuki Kohchi “The transcription factor BONOBO regulates sexual organ development in the liverwort *Marchantia polymorpha*.” The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing 2015年3月13-15日 産業技術総合研究所(東京都江東区)

7. **Shohei Yamaoka**, Kimitsune Ishizaki, Katsuyuki T. Yamato, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi (2014) “The transcription factor BONOBO appears to regulate gametangiophore formation in *Marchantia polymorpha*.” *Marchantia Workshop 2014* 2014年12月9日 神戸大学(神戸市)(招待講演)

8. **Shohei Yamaoka**, Yuki Shimono, Makoto Shirakawa, Yoichiro Fukao, Takashi Kawase, Noriyuki Hatsugai, Kentaro Tamura, Tomoo Shimada, Ikuko Hara-Nishimura (2014) “Molecular dynamics of *Arabidopsis* AP-2 complex and its involvement in floral organ development.” East Asia Cell Biology Conference 2014 2014年4月4日 POSTECH Biotech Center 浦項市(韓国)

9. **山岡尚平**、下野裕貴、白川一、深尾陽一朗、川瀬貴士、初谷紀幸、田村謙太郎、嶋田知生、西村いくこ「シロイヌナズナ AP-2 アダプター複合体のダイナミクス」第55回日本植物生理学会年会 2014年3月19日 富山大学(富山市)

10. **Yamaoka, S.**, Nakajima, M., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Leaver, C.J., Hara-Nishimura, I. “A Miro GTPase

influences mitochondrial morphology in *Arabidopsis*.” The 4<sup>th</sup> International Symposium on Dynamics of Mitochondria (DynaMito 2013) 2013年10月30日 沖縄残波岬口イザルホテル(沖縄県読谷村)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山岡 尚平 (YAMAOKA, SHOHEI)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号: 00378770

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし