

高次細胞機構研究部門の10年

西 村 幹 夫

高次細胞機構研究部門のこの10年間は細胞から高次細胞機能に向かう時期としてとらえられます。スタッフは林誠氏が東北大学大学院農学研究科助教授に、西村いくこ氏が京都大学大学院理学研究科教授に昇任し、嶋田知生助手が京都大学同研究科に転任しました。その後任として、助教授として林誠氏が返り咲き、助手として真野昌二氏及び山田健志氏が着任し、現在に至っています。

本部門はこの10年間植物オルガネラの機能分化を中心に研究を進めてきました。オルガネラとしては単膜系のオルガネラであるペルオキシソームと液胞を中心に研究を進めてきました。その中で特徴的な点を記したいと思います。

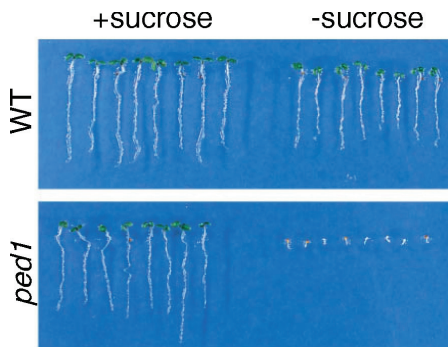


図1. *ped1* 変異株のショ糖要求性

野生型シロイヌナズナは培地にショ糖を添加しても、しなくても正常に発芽する。一方、*ped1* 変異株は、種子貯蔵脂肪から糖新生ができないため、培地にショ糖を添加しないと発芽できない。

株がショ糖が存在しないと発芽できないことを明らかにしました(図1)。シロイヌナズナなどの脂肪性種子において、脂肪酸の β -酸化系が種子発芽において必須の役割を果たしていることを初めて示したのです。

細胞生物学的手法からは種子の貯蔵タンパク質輸送においてゴルジ体を経由せずに輸送される経路の存在を示したことです。従来液胞に局在するタンパク質 rER で合成された後、ゴルジ体経由の小胞輸送で液胞に運ばれ蓄積されると考えられていましたが、登熟期の種子細胞で合成される種子貯蔵タンパク質はゴルジ体を経由せずに PAC 小胞 (Precursor accumulating vesicle) を介して液胞へ輸送されることを示しました(図2)。この研究は京都大学理学研究科に転任した西村いくこ氏と共同で研究が進められており、その後研究は種子タンパク質輸送レセプターをはじめとする各種の輸送因子の同定につながっています。

私達は従来生化学、細胞生物学、分子生物学と多種の方法を用いて研究を進めてきました。それらに加えて遺伝学的手法を導入しました。シロイヌナズナを用いた変異株のスクリーニング及びその原因遺伝子の同定は、植物オルガネラの機能を明らかにする重要な方法です。

変異株を得やすいシロイヌナズナを導入し、2,4-DB という除草剤に耐性を示す植物体をスクリーニングしました。この2,4-DB 耐性の *ped* 変異株 (peroxisome defective mutant) は脂肪酸 β -酸化に欠損があることを明らかにするとともに、この変異

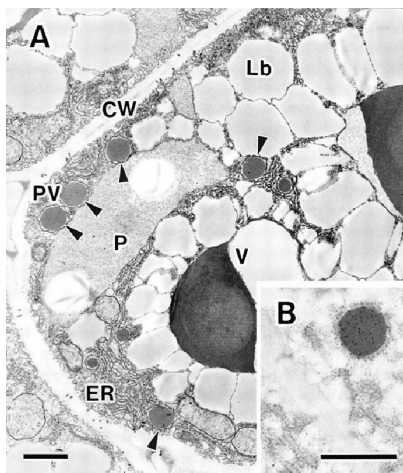


図 2. カボチャ種子登熟期の電子顕微鏡写真

A) 直径 300-400nm の PAC 小胞 (PV, 矢頭) が数多く観察される。B) 種子貯蔵タンパク質 2S アルブミンの存在を示す金粒子のシグナルは PAC 小胞に見られ、PAC 小胞の内部には (2S アルブミン) の前駆体が蓄積していることを示している。ER は小胞体、V はタンパク質貯蔵液胞、CW は細胞壁、Lb はリポドボディ、P はプラスチド、Mt はミトコンドリアを示す。バーは 500nm。

でも明確になりつつあり、現在特定領域研究「植物の環境適応戦略としてのオルガネラ分化」をたちあげています。私達はこの特定領域研究を植物のポストゲノム解析の拠点と位置づけ、オルガネラに特化したプロテオーム、トランスクリプトーム解析を推進しています。こうした研究の中から、ペルオキシソーム機能は恒常的に発現しているペルオキシソーム遺伝子に加えて、各々の組織で特異的に発現しているペルオキシソーム遺伝子の発現により特徴づけられているというペルオキシソーム機能分化の様式が明らかになってきています。

ここ 10 年の間に大きな流れとして生体イメージング解析の重要性を特筆したいと思います。GFP を初めとする蛍光タンパク質を発現させることにより、生体内のオルガネラ観察が可能となってきています。小胞体残留シグナルをつけた GFP を植物体で発現させることにより、新規のオルガネラ ER ボディが発現されました。ER ボディは内部に β -グルコシダーゼを多量に含み、植物が傷害を受けると誘導されてくるオルガネラで、植物の病害虫に対する抵抗

こうした研究の中から新たに見えてきたことは植物オルガネラが植物の生活環において環境変化に対して柔軟に変動すること、さらにこのオルガネラの変動が植物の高次機能に大きく関わっていることでした。植物の防御機構として知られているプログラム細胞死に液胞がかかわっていることを明らかにしたこと、さらにその鍵酵素として液胞プログラム酵素を同定したことはその典型です (図 3)。この液胞プロセシング酵素は液胞の機能分化を担う因子であり、機能の異なる液胞に各々対応する液胞プロセシング酵素の存在が証明されつつあります。

また、ペルオキシソームの機能欠損が種子形成に大きく関わること等、オルガネラ動態から植物高次機能への流れは他のオルガネラにおい

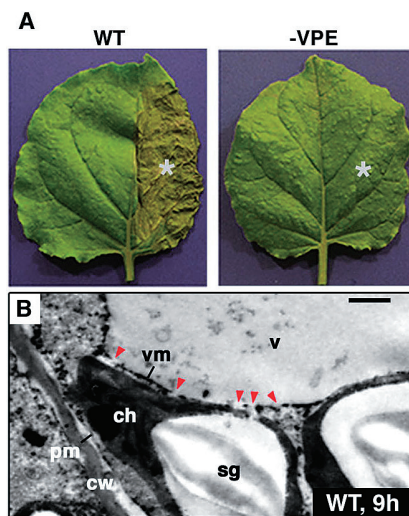


図 3. プログラム細胞死の鍵酵素である液胞プロセシング酵素

A) タバコ (*Nicotiana benthamiana*) 葉の右半分はタバコモザイクウイルスを接種し、プログラム細胞死誘導後 24 時間目の写真。非サイレンス葉 (WT) では病斑が形成されるが、遺伝子液胞プロセシング酵素: VPE (Vacuolar Processing Enzyme) をサイレンスした葉 (-VPE) では病斑形成が抑えられている。アステリクスはウイルス接種部位を示す。B) 野生株に TMV を感染させ 9 時間後の電子顕微鏡像。赤の矢印は液胞膜が無くなっている部分を示す。バーは 1mm。v は液胞、vm は液胞膜、pm は細胞膜、ch は葉緑体、sg はデンプン粒、cw は細胞壁を示す。

性を与える免疫システムとして考えられています。植物においては個々の細胞にこのような免疫システムを作動させる能力を保持しているのです。現在特定領域研究の一環として植物オルガネラデータベースを作成し、一般に公開しています。このデータベースは可視化したオルガネラの画像を集めた“Organelome Database” とオルガネラの動態を解析するプロトコル集である Functional Analysis Database からなり、基生研のホームページ (<http://www.nibb.ac.jp/organelles/>) にリンクされています。このデータベースを充実させていくとともに植物オルガネラ研究の推進をはかっています。こうしたオルガネラ可視化技術を用いて、各オルガネラの可視化、及びその環境に対する変動を生きたままの状態で調べることができます。この可視化技術からわかってきたことは、環境変化により植物オ

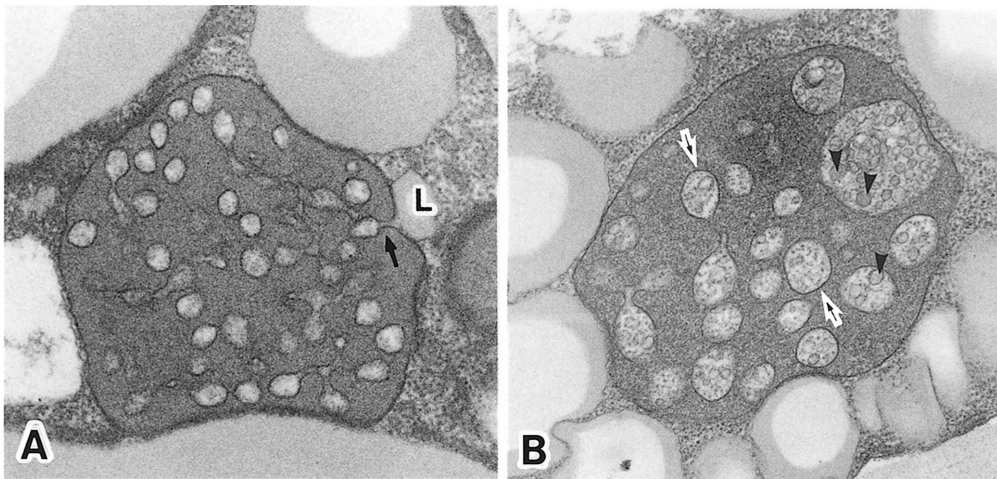


図 4. 発芽時の ped1 変異株におけるペルオキシソームの電子顕微鏡像

A) ped1 変異株のペルオキシソーム膜はリピッドボディ (L) と接する位置 (矢印) から陥入し、枝分かれしたチューブ状の構造を形成している。この写真はペルオキシソームがリピッドボディと直接的な相互作用をしていることを示している。B) チューブ状の構造を取り囲む膜 (矢印) はペルオキシソーム膜、チューブ状構造の内部に見える小胞 (矢頭) はリピッドボディ膜である。

ルガネラの機能、形、局在が大きく変化すること、更に細胞内でオルガネラ同士が直接的に相互作用していることです。種子発芽の際のペルオキシソーム観察は、脂肪酸分解においてオルガネラレベルの相互作用が重要であり、ペルオキシソームとリピッドボディが直接的に結合し、代謝を営んでいることを示しています (図 4)。今後、生体の中でのオルガネラ動態をより詳しく追求していくことにより、植物の新たな動的な生命像をうちたてていきたいと考えています。

参考文献

1. Mano, S., Nakamori, C., Nito, K., Kondo, M. and Nishimura, M. (2006). The Arabidopsis pex12 and pex13 mutants are defective in both PTS1 and PTS-2dependent transport to peroxisomes. *Plant J.* 47, 604-618.
2. Hayashi, M., Nito, K., Yagi, M., Kamada, T. and Nishimura, M. (2005). Differential contribution of two peroxisomal protein receptors to the maintenance of peroxisomal functions in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 280, 14829-14835.
3. Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-

- Nishimura, I. (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305, 855-858.
4. Kamada, T., Nito, K., Hayashi, H., Mano, S., Hayashi, M. and Nishimura, M. (2003). Functional differentiation of peroxisomes revealed by expression profiles of peroxisomal genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 44, 1275-1289.
 5. Hayashi, H., De Bellis, L., Kato, A., Hayashi, Y., Nito, K., Hayashi, M., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M. (2002). Molecular characterization of an *Arabidopsis* acyl CoA synthetase localized on glyoxysomal membranes. *Plant Physiol.* 130, 2019-2026.
 6. Koumoto, K., Shimada, T., Kondo, M., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M. (2001). Chloroplasts have a novel Cpn10 in addition to Cpn20 as co-chaperonins in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276, 29688-29694.
 7. Hayashi, M., Nito, K., Toriyama-Kato, K., Kondo, M., Yamaya, T. and Nishimura, M. (2000). AtPex14 maintains peroxisomal functions by determining protein targeting to three kinds of plant peroxisomes. *EMBO J.* 19, 5701-5710.
 8. Hayashi, H., De Bellis, L., Ciurli, A., Kondo, M., Hayashi, M. and Nishimura, M. (1999). A novel oxidase that catalyzes oxidation of short-chain acyl CoA in plant peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 274, 12715-12721.
 9. Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y. and Nishimura, M. (1998). Transport of storage proteins to protein-storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell* 10, 825-836.
 10. Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M. and Nishimura, M. (1998). 2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of *Arabidopsis* have defects on glyoxysomal β -oxidation. *Plant Cell* 10, 183-195.
 11. Esaka, M., Yamada, N., Kitabayashi, M., Setoguchi, Y., Tsugeki, R., Kondo, M. and Nishimura, M. (1997). cDNA cloning and differential gene expression of three catalases in pumpkin. *Plant Mol. Biol.* 33, 141-155.
 12. Kato, A., Hayashi, M., Kondo, M. and Nishimura, M. (1996). Targeting and processing of a chimeric protein with the amino-terminal presequence of the precursor to glyoxysomal citrate synthase. *Plant Cell* 8, 1601-1611.

