

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」

平成 18 年度採択研究代表者

三村 徹郎

(神戸大学 教授)

「液胞膜エンジニアリングによる植物代謝システム制御」

1. 研究実施の概要

1. 研究のねらい

液胞 (Vacuole) は植物、及びカビに普遍的なオルガネラで、細胞体積の 80-90% を占める。近年、植物細胞における空間充填、有用物質の貯蔵、細胞質の解毒・調節、代謝回転における分解機能など、様々な機能にこのオルガネラが深く関わっていることが明らかとなっている。

合成、小胞輸送過程を含めて多彩な研究が行われてきた液胞貯蔵タンパク質に比べ、代謝制御に直結する低分子の貯蔵機能、細胞質環境の維持に重要な液胞膜輸送体、受容体タンパク質については、分子レベルでの解析はあまり進んでいない。本課題では、1) 植物の各器官で多彩に分化した液胞内にどのような低分子が蓄積されているかを明らかにすることで、オルガネラメタボロームのための基礎データを確立する。2) 液胞膜に存在する機能未知タンパク質を網羅的に改変する液胞膜エンジニアリングを進め、同時に、液胞と細胞質に含まれる代謝産物の網羅的解析を合わせて行うことで、境界膜としての液胞膜輸送体の変動が引き起こす代謝産物変化を、膜の両側で調べ、輸送機能の分子同定と解析を試みる。3) 液胞膜の輸送機能を人為的に調節することで、細胞質で働く代謝機能を形質転換することなく代謝制御する可能性を探る。

2. 研究の概要

真核生物の機能解析を分子レベルで網羅的に進めるために、ポストゲノム解析として、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームが精力的に行われている。本研究は、これを特定のオルガネラ、液胞に絞って行おうとする。液胞は、植物細胞最大のオルガネラであり、細胞内環境のホメオスタシス、代謝活性の維持に必須の働きをしている。液胞の機能を代謝過程と代謝産物の解析から明らかにすることで、基礎植物科学としての液胞研究を進めるとともに、人類に有用な物質を蓄積する液胞機能の改変方法を検討する。さらに液胞機能を制御することで、細胞質代謝関連分子そのものは改変することなく、代謝を制御する可能性を探る。

3. 将来展望

液胞は、現在の技術を持ってすれば、高純度で、かつ多量に単離できるオルガネラの一つである。オルガネラにターゲットしたポストゲノム解析として、膜タンパク質の機能同定を進め、さらに液胞機能の改変を進めることで、有用物質生産において大きな可能性を与える。膜輸送活性を改変することで代謝を制御する可能性が見出せれば、代謝制御機構の新しい手法として、大きなインパクトを与えられる。

2. 研究実施内容

2-1. 三村グループ(神戸大学)

研究の目的・方法

植物における液胞機能を明らかにするために、植物細胞からインタクト液胞を単離するとともに、そのメタボローム解析を進める。また、液胞膜輸送系タンパク質を形質転換することで、機能未知タンパク質の働きを明らかにするとともに、液胞機能の向上と改良の可能性を探る。

本年度の研究結果・進捗状況

1. 植物細胞からの液胞単離と液胞単離技術の改良

シロイヌナズナ培養細胞 Deep 株からインタクト液胞を単離し、その内容物の解析を FT-ICR-MS, CE-MS を用いて解析を行った。

2. 液胞膜機能未知輸送体形質転換体の作成と液胞の単離

シロイヌナズナ培養細胞液胞膜プロテオーム解析から見出された機能未知タンパク質の複数について、Deep 株への形質転換を試みている。

2-2. 山崎グループ(千葉大学)

研究の目的・方法

二次代謝を中心とした液胞機能を明らかにするために、二次代謝関連遺伝子の変異体植物についてトランスクリプトーム解析と液胞のメタボローム解析を進める。また、液胞膜局在の機能未知タンパク質の働きを明らかにするとともに、液胞機能の改変と有用物質生産の可能性を探る。

本年度の研究結果・進捗状況

アカジソにおいてアントシアニン生産と同調して発現誘導される機能未知の液胞膜タンパク質について、シロイヌナズナにおけるホモログ遺伝子の同定を行い、これらについて過剰発現体、アンチセンス遺伝子抑制体を作成した。今後、これらの液胞のメタボローム解析を行い、機能未知タンパク質の機能を解明する。また、カンプトテシン生合成経路について、生合成経路および代謝産物の液胞内外への輸送に小胞輸送が関与することが明らかになった。

2-3. 杉山グループ(兵庫県立大学)

研究の目的・方法

植物細胞から単離された液胞内物質、細胞質代謝物質の網羅的解析を世界最高性能の FT-ICR-MS により進める。また、その準備段階として、既存の LC-MS/MS を用いたサンプル分析を行い、サンプル条件決定、植物細胞が含有する物質同定を進める。

本年度の研究結果・進捗状況

シロイヌナズナおよびタバコ細胞から単離された液胞中及び細胞質の低分子化合物を Old Dominion University (USA) 所有の FT-ICR-MS を用いて分析した。分析は ESI ポジティブおよびネガティブで行った。ESI ポジティブ分析の結果、タバコ培養細胞液胞 (At3g21690 過剰発現体) において、コントロールの 10 倍以上の強度を示すようになったピークが 59 本発見された。逆に 1/10 以下に減少したピークは 1 本であった。現在各種データベースを参考にしながらこれらのピークの解析を進め、同定作業を行っているところである。

2-4. 青木グループ(かずさ DNA 研究所)

研究の目的・方法

液胞膜タンパク質遺伝子形質転換体細胞または植物体から得られた、単離液胞および細胞質画分に見られる代謝産物を超高分解能質量分析装置 (LC-FTICR/MS、GC-TOF/MS) を用いて網羅的に解析することで、導入遺伝子に起因すると推測される代謝変動を検出する。この解析をもとに、液胞-細胞質間トラフィックにおける液胞膜タンパク質の機能同定・細胞内代謝制御に関わる液胞の役割の解明に貢献する。

本年度の研究結果・進捗状況

1. 共同研究機関から提供されたシロイヌナズナ培養細胞抽出物および単離液胞抽出物の LC-FTICR/MS による網羅的代謝物解析の開始。

神戸大学三村グループより提供されたシロイヌナズナ培養細胞 Deep 株全細胞抽出物を LC-FTICR/MS を用いて、ポジティブイオン ESI モード・ネガティブイオン ESI モードによる分析を行なった。ポジティブイオン ESI モード測定データに基づき、Deep 株全細胞から検出された延べ約 10 万のピークを、確実に代謝物を示している 209 個のピークグループにクラスター化した。そのうえで化学組成式の推定を行い、209 代謝物中 113 ピークグループについて単一の組成式を推定した。ネガティブイオン ESI モードでのデータについても同様の解析を進行中である。また Deep 株非形質転換株からの単離液胞の分析にも着手した。

2. 出発材料の異なる液胞間での代謝物の差異を検出する方法の検討。

今年度由来の異なる液胞の提供がなかったため、Deep 株全細胞抽出物対 Deep 株単離液胞間での代謝物比較に、1. での解析結果に基づいて着手している。

3. 液胞代謝物データに関する杉山グループ (FTICR/MS, 12 テスラ) とのデータの比較。

標準単離液胞ではなく At3g21690 過剰発現細胞単離液胞を共通サンプルとして用いて、各々の

FTICR/MSで分析を実施した。磁場強度の他にLCの有無などの差もあり、各プラットフォームで検出できるピークに差異があること、また杉山グループによる測定が当研究機関での測定(7テスラのLC-FTICR/MS)に比較して一桁測定精度が高いこと、などを相互確認できた。これを踏まえてお互いのデータをいかに代謝物推測に活用していくかの協議を開始した。

3. 研究実施体制

(1) 三村徹郎(神戸大学)グループ

研究項目

- ・ 植物細胞からの液胞単離と液胞単離技術の改良
- ・ 液胞膜機能未知輸送体形質転換体の作成と液胞の単離
- ・ 液胞内容物のメタボローム解析

(2) 山崎真巳(千葉大学)グループ

研究項目

- ・ 二次代謝関連液胞膜タンパク質の過剰発現株の作出
- ・ 変異体におけるメタボローム解析
- ・ 変異体におけるトランスクリプトーム解析

(3) 杉山裕子(兵庫県立大学)グループ

研究項目

- ・ 超高分解能質量分析装置を用いた液胞代謝産物解析

(4) 青木 考(かずさDNA研究所)グループ

研究項目

- ・ 超高分解能質量分析装置を用いた、植物細胞メタボローム解析