

研究終了報告書

「オルガネラ間接着から紐解く新たな環境応答機構」

研究期間：2021年10月～2024年3月

研究者：坂本 勇貴

1. 研究のねらい

植物細胞においてオルガネラは他のオルガネラと相互作用を行うことで、生体反応を効率的に制御している。例えば、葉緑体とミトコンドリアとペルオキシソームは互いに接着し光障害を防ぐための光呼吸という代謝経路を形成する。植物細胞には多くのオルガネラがあるが、それらの相互作用機構は不明な点が多い。私はこれまでの研究で植物細胞核の形態制御機構の研究を行ってきた。細胞内の核を観察すると、高頻度で葉緑体や色素体(未発達な葉緑体)と隣接していることに気がついた。また核を細胞外に取り出すと、高頻度で核の周りに葉緑体が接着したまま単離される。これらのことから、細胞内で核と葉緑体はただ隣接しているのではなく、比較的強い力で結合しているのではないかと考えるようになった。

以前より細胞内で核と葉緑体が隣接していることはシダ植物から被子植物まで多くの植物種で報告されていたが、葉緑体がたまたま核の周りにいるのか、能動的に核に接着しているか判別できなかった (Selga et al., 2010)。近年、タバコモザイクウイルスの遺伝子産物の一部をベンサミアナタバコに発現させ人為的に免疫反応を引き起こすと、誘導前と比較して多くの葉緑体が核に隣接することが報告された (Caplan et al., 2015; Kumar et al., 2018)。この実験から、葉緑体は外部環境に応答して核の周りに能動的に集まることがあると示された。では、オルガネラはどのように接着しているのであろうか。最近、解糖系の代謝酵素が、葉緑体とミトコンドリアを物理的につなぐタンパク質複合体として機能することが報告された (Zhang et al., 2020)。また、動物や酵母を用いた研究では、オルガネラ間を物理的につなぐタンパク質が多数発見されている (Eisenberg-Bord et al., 2016)。以上の研究から、核と葉緑体をつなぐタンパク質が存在する可能性が高いが、未だ発見されていない。

本研究は、核と葉緑体をつなぐ繫留タンパク質を同定し、核と葉緑体の接着の意義を明らかにすることを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

核と葉緑体をつなぐ繫留タンパク質の有力な候補を特定することができた。はじめに Split-BioIDと質量分析を用いて核と葉緑体の接着面に濃縮されているタンパク質群をリストアップした。候補タンパク質に蛍光タンパク質をつなげて過剰発現させることで、その細胞内局在様式を観察した。さらに、候補タンパク質、核局在蛍光タンパク質、葉緑体局在蛍光タンパク質を同時に発現させることで、過剰発現によって核と葉緑体の接着頻度が上昇するタンパク質を同定した。当初の一番の目的であった繫留タンパク質の同定という大きな目的を達成する目前まで到達できた。一方で、核と葉緑体の接着の生理学的意義を解明するという目的は達成できなかった。

(2) 詳細

研究テーマ 1「核と葉緑体の動態解析」

核と葉緑体がどのように接着しているかを観察するために、ベンサミアナタバコに核局在蛍光タンパク質および葉緑体局在蛍光タンパク質を発現させてタイムラプス観察を行った。すると、核の周りに接着した葉緑体は1時間以上接着し続け、核が移動しても葉緑体は接着したまま維持される様子が観察された。この観察結果から、核と葉緑体の接着は非常に安定した接着であり、長期間の接着を可能としていることが明らかになった。

研究テーマ 2「オルガネラ間接着因子を特定する基盤技術の確立」

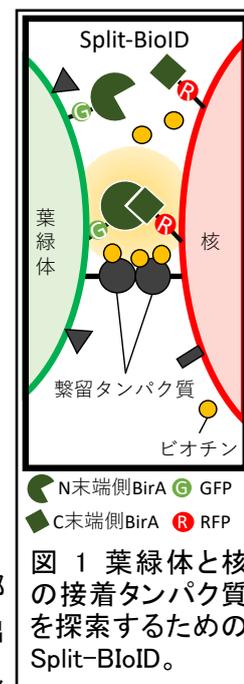
核と葉緑体の接着を担う繫留タンパク質を同定するために Split-BioID を用いた。BioID とは、大腸菌由来のビオチンリガーゼ BirA を標的タンパク質とつなげ細胞に発現させる。基質であるビオチンを加えることで、標的タンパク質の近傍約 10 nm 以内にあるタンパク質がビオチン標識されるという手法である。BirA は N 末端側(N-BirA)と C 末端側(C-BirA)に分割することができる。N-BirA と C-BirA それぞれはビオチンリガーゼとしての活性を持たないが、両者が非常に近い距離に存在する場合、BirA が再構成されビオチンリガーゼとして機能する(Split-BioID)。この手法を用いて繫留タンパク質を同定する。ベンサミアナタバコを用いて、葉緑体外膜と核膜外膜の細胞質側に N-BirA と C-BirA を局在させ、そこにビオチンを加えることで、核と葉緑体の接着面に局在するタンパク質を特異的にビオチン化できると考えた(図 1)。

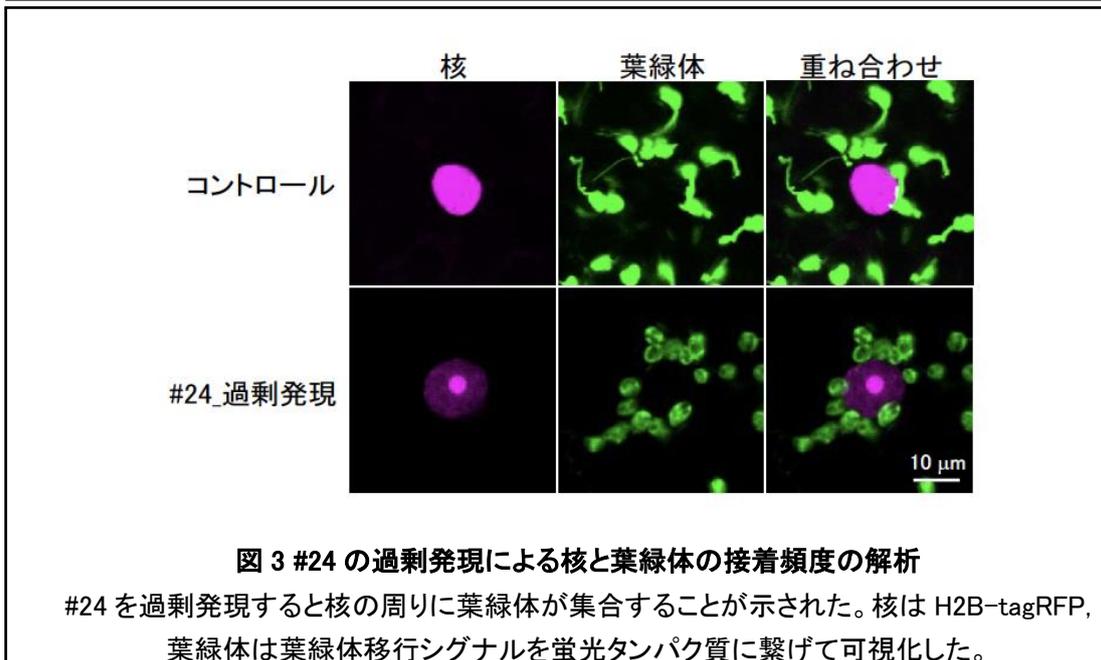
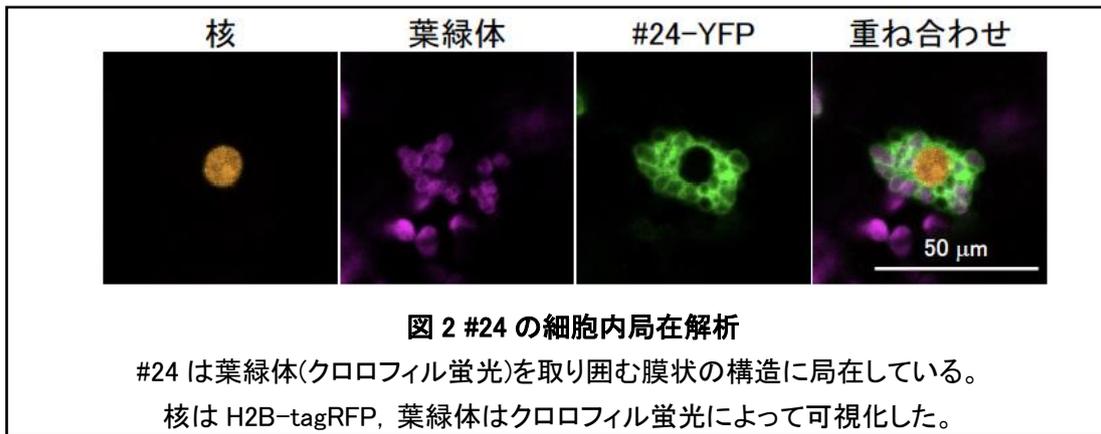
本実験を推進すると、N-BirA および C-BirA がそれぞれ葉緑体・核周縁部に局在すること、ビオチン添加によってビオチン標識されたタンパク質が検出できることが示され、本実験系が当初の狙い通り機能していると期待された。

次に Split-BioID、ビオチン化タンパク質の精製、質量分析の一連の実験を行った。その結果、本手法では非特異的なビオチン化タンパク質が多数検出されることが明らかとなったことから、実験条件を変えた複数のネガティブコントロールサンプルを用意し(Split-BioID、ビオチンなし[ネガコン 1]、タグなしの BioID、ビオチンあり[ネガコン 2])、効率的に候補タンパク質を絞り込む方法を考案した。それにより、当初検出された 3000 個近くのタンパク質から 31 個の候補タンパク質を絞り込むことに成功した。

研究テーマ 3「核と葉緑体をつなぐ繫留タンパク質の同定」

候補タンパク質に蛍光タンパク質を繋げてベンサミアナタバコに一過的に発現させ、それぞれの細胞内局在パターンと、過剰発現によって引き起こされる核と葉緑体の接着頻度の解析を行なった。これまでに 25 個の候補タンパク質の局在観察を行い、10 個が小胞体に、4 個が核内に、1 個が核膜に、5 個が葉緑体に、5 個が細胞質中に局在することが明らかになった。その中でも葉緑体に局在した#24-YFP を過剰発現すると核の周りに多数の葉緑体が集まっていた(図 2)。#24 に YFP をつなげたことが葉緑体の集合に影響した可能性を考慮し、核局在蛍光タンパク質、葉緑体局在蛍光タンパク質をタグをつなげていない#24 と共に発現させると、核の周りに多数の葉緑体が集合していた(図 3)。以上より、#24 が繫留タンパク質の有力な候補として同定された。ただし、#24 が繫留タンパク質であることを確定するためには、電子顕微鏡等による詳細な局在解析や核に局在する結合パートナーの同定が必要であると考えている。





質量分析による解析は 2012 年に報告されたベンサミアナタバコのドラフトゲノム情報をもとに行っていたが、2023 年にベンサミアナタバコの最新のゲノム情報がアップデートされ、それに伴い、候補タンパク質に変更が生じた。新たに同定された 11 個の候補タンパク質のクローニングも進めたが、解析までは到達しなかった。

研究テーマ 4「核と葉緑体の接着の生理学的意義の解明」

本研究では、繫留タンパク質を同定後、核と葉緑体の接着頻度が異なる植物を用いて、遺伝子発現解析、病原菌およびウイルスに対する抵抗性の解析、光合成活性の解析を行う計画であった。現在、#24 の過剰発現により核と葉緑体の接着頻度を上昇させた植物は得られているものの、発現抑制に着手できなかったため接着頻度を低下させた植物は得られておらず、本研究テーマは未達成となった。

3. 今後の展開

・核に局在する繫留タンパク質の同定

今後は#24 が核と葉緑体を接着する仕組みを解明する。最も重要なのは葉緑体に局在する#24

が核と結合する方法である。#24 が核膜に局在するタンパク質と相互作用することで核と繋がると考えており、現在取り組んでいる以下の手法でそのタンパク質を探索する。すなわち、Split-BioID および質量分析によってリストアップされた候補タンパク質のうち、局在解析と過剰発現による葉緑体の接着頻度の解析をさらに進め、核に局在する繫留タンパク質を見つけたいと考えている。一方で、#24 と結合する核側のパートナーを#24 を bait として用いた共免疫沈降—質量分析で探索することを考えている。

・#24 の発現抑制による表現型解析

#24 の過剰発現によって核の周りに葉緑体が集合したことから、#24 の発現抑制時に核の周りに葉緑体が集合しなくなるかを検証する。ベンサミアナタバコを用いて一過的な発現抑制により核と葉緑体の接着頻度を解析する。ベンサミアナタバコは#24 のパラログ遺伝子を持つため発現抑制の効果がでない可能性がある。そのため、シロイヌナズナの#24 ホモログの T-DNA 挿入遺伝子破壊株を用いて同様の解析を行うことも計画している。

・#24 の詳細な局在解析

#24 が葉緑体膜上に局在していることは明らかになったが、核と葉緑体の接着面でどのような局在様式を示すかは不明である。そこで、免疫電子顕微鏡法により接着面における詳細な局在様式を解析する。

上記3つの研究が進展し、核と葉緑体をつなぐタンパク質複合体の全体像とその存在意義が明らかになると期待している。核と葉緑体接着の意義が明らかになれば、繫留タンパク質を人工的に操作し接着頻度を変えることで、特定の環境ストレスに抵抗性の高い植物や葉緑体の発達を促進した栄養価の高い作物の作出を進めたいと考えている。

4. 自己評価

目標到達状況

当初の大きな目的である繫留タンパク質の特定に関しては、達成直前の段階にある。Split-BioID と質量分析を組み合わせた、オルガネラ間の繫留タンパク質の特定手法を開発できたことも非常に大きい。一方、2つ目の目標である核と葉緑体の接着の意義の解明には着手できなかったことが残念であった。

研究の進め方

1年目で Split-BioID と質量分析を用いた実験系を確立できた。2,3年目には候補タンパク質のコンストラクションやイメージング解析を進めた。2年目までは私一人で研究を遂行したが、3年目は学生1名と共に研究を遂行した。

Split-BioID と質量分析に関しては、共同研究者である名古屋大学の三城博士と連携して進めることで、三城博士と協力体制を築くことができた。

研究費に関しては、本 ACT-X 研究に不可欠なイメージング解析に必要な顕微鏡用カメラおよび制御ソフトウェアの購入、遺伝子のクローニングのための分子遺伝学試薬や質量分析の委託費に使用した。また、本成果を発表するための学会発表のための旅費にも使用した。全て、本研究を遂行する上で必要な経費であったと考えている。

研究成果の科学技術および社会・経済への波及効果

本研究で用いた Split-BioID と質量分析による接着領域特異的タンパク質の特定手法は、今後、オルガネラ間だけでなく、異種の細胞間、組織間にあるタンパク質の同定に利用されると考えられる。例えば、がん細胞と正常細胞の接触面のタンパク質や、微生物間のコミュニケーションに関わるタンパク質の研究に利用でき、医療や物質生産の発展に寄与すると考えられる。

核と葉緑体の接着の意義が明らかになれば、環境ストレスに耐性を持つ作物の作出などにつながると期待していたが、意義の解明に到達できなかったことは非常に残念であった。一方で #24 の同定の結果、将来的に環境ストレスに抵抗性の高い植物や栄養価の高い作物の作出が可能となると考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0件(特許公開前のものを含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. 土田康太, 高木慎吾, 坂本勇貴 “暗黒下における植物細胞核の動態解析” 第 65 回日本植物生理学会年会, 神戸, 2024 年 3 月
2. 土田康太, 高木慎吾, 坂本勇貴 “暗黒下におけるオルガネラの動態解析に向けた実験系の開発” 第 64 回日本植物生理学会年会, 仙台, 2023 年 3 月
3. 坂本勇貴, 高木慎吾 “核と葉緑体の接着に関わるタンパク質の探索” 第 64 回日本植物生理学会年会, 仙台, 2023 年 3 月
4. 坂本勇貴 “植物の細胞核を支える核ラミナの機能” 第 25 回植物オルガネラワークショップ, 仙台, 2023 年 3 月

受賞

1. 2023 年 9 月, 2023 年度日本植物学会奨励賞