

三村 徹郎

神戸大学大学院理学研究科・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、概要

液胞 (Vacuole) は植物やカビに普遍的なオルガネラで、細胞体積の 80-90% を占め、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、様々な生理機能に深く関わっている。

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から、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。ことを目指している。本研究は、液胞の機能を、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム解析を組み合わせることで明らかにし、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や、それによる細胞質代謝制御方法を検討する。

2. 研究進捗状況、研究成果

三村 G では、モデル植物であるシロイヌナズナ培養細胞、および植物体からインタクト液胞を単離し、各種クロマト-質量分析法を組み合わせることで、液胞内物質のメタボローム解析とプロテオーム解析を進め、それについて詳細を検討中である。山崎グループでは、液胞をめぐる二次代謝産物の生産と蓄積について、二次代謝関連遺伝子の過剰発現ならびに遺伝子抑制変異株のトランスクリプトーム解析とメタボローム解析を行って液胞機能の解明を進めている。青木 G、杉山 G では、三村 G から提供された液胞サンプルについて、それぞれ FT-ICR-MS を利用した解析を進めている。既に相当数の化合物を見出し、そのいくつかについて組成式の同定を終えた。また、三村 G と青木 G では、シロイヌナズナ培養細胞、植物体について、複数の形質転換系の確立に

成功した。これらの形質転換系から液胞を単離し、予備的な測定を始めた。

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るために、液胞内物質の網羅的同定を始めたが、個々の化合物の同定には困難が多く、まだ時間がかかりそうである。現在標準物質の存在する代謝産物を中心にその同定を進めている。膜タンパク質に加えて、液胞内タンパク質の網羅的同定も行い、液胞機能を輸送・代謝の両方の側面から解析できるようになってきた。今後は、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ことを目指している。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(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

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内物質のメタボローム、プロテオーム解析

昨年度に引き続きシロイヌナズナ培養細胞 Deep 株および植物体から単離したインタクト液胞について、代謝産物とタンパク質の解析を FT-ICR-MS, CE-MS, nanoLC-MS を用いて行った。

昨年度見出したこれまで液胞での存在が知られていなかった複数の代謝化合物(主に有機リン化合物)についてさらに測定を行い、その存在と量を確定するとともに、液胞内タンパク質(分解系酵素)との関連について検討した(図1)。また、液胞内液を細胞質の混入ナシで解析可能な材料としてシャジクモ液胞について理研との共同研究を進めている。

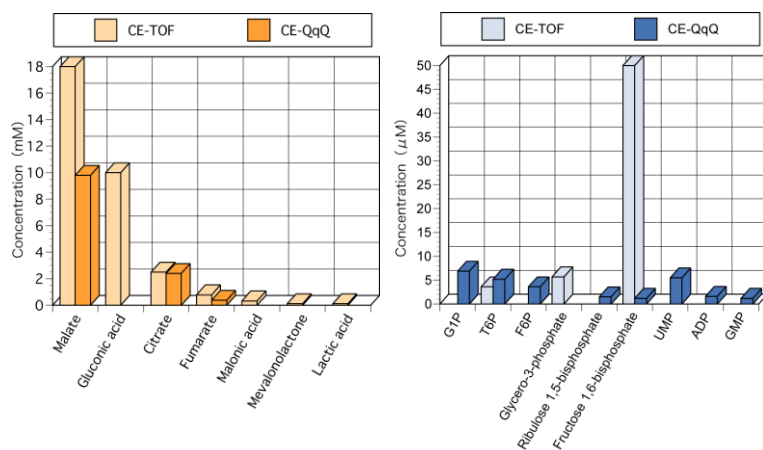


図1:シロイヌナズナ培養細胞 Deep 株から単離した液胞のメタボローム解析結果(CE-TOF 及び CE-QqQ で測定してある)

液胞に蓄積することが知られている有機リン酸化合物のイノシトール-6-リン酸の生合成と輸送過程の研究を進め、細胞内代謝だけでなく、組織間の生合成中間体の輸送が重要な役割を果たしていることを見いだした(文献 1)。

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、複数の形質転換系統の確立に成功した(図2)。これらの形質転換細胞からの液胞単離にも成功し、現在予備的な解析を始めている。

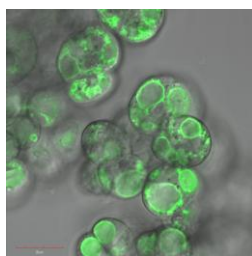


図2: 液胞膜タンパク質を形質転換した培養細胞

2-2. 山崎グループ(千葉大学)

研究の目的・方法

植物液胞をめぐる多様な二次代謝について、生合成・代謝経路とその発現制御メカニズムおよび細胞内物質輸送メカニズムを包括的に理解し、物質生産制御に応用可能な基礎的知見を得ることを目的とする。方法として、二次代謝が変異した成分変種あるいは培養組織を用いてトランスクリプトーム解析とメタボローム解析を行う。さらに二次代謝にリンクして特異的に発現する遺伝子についてそれぞれの機能解析を行う。

本年度の研究結果・進捗状況

シロイヌナズナにおいてアントシアニン生産を制御する MYB 転写因子遺伝子 *PAP1* の過剰発現体のトランスクリプトーム解析、及びそこから見出した遺伝子のノックアウト変異体についてメタボローム解析を行い、GST ホモログ遺伝子(TT19)がアントシアニン生合成遺伝子に関連していることが明らかになった(文献 2)。また、同様に *PAP1* の過剰発現体において発現上昇するカルコンイソメラーゼ(CHI)ホモログ遺伝子についても、組換えタンパク質を用いた解析から CHI 酵素活性を有することを明らかにした(文献 4)。

強力なトポイソメラーゼ I 阻害剤で抗がん剤原料として有用なカンプトテシンを生産する植物について、その自己耐性メカニズムを調べ、トポイソメラーゼ I のアミノ酸配列に変異を見出し、カンプトテシン生産能と自己耐性が共進化したことが示唆された(文献 3)。

2-3. 杉山グループ(兵庫県立大学)

研究の目的・方法

シロイヌナズナ培養細胞 Deep 株、植物体から単離したインタクト液胞内容物試料を FT-ICR-MS を用いて分析する。また、前処理法の改良を検討するため、同じ試料を C₁₈ 固相抽出

および活性炭抽出し、質量分析の結果を比較する。

本年度の研究結果・進捗状況

シロイヌナズナ培養細胞 Deep 株、植物体から単離したインタクト液胞内容物試料を Old Dominion University (USA) 所有の FT-ICR-MS を用いて分析した。

Deep 株試料および植物体試料を 1. 酸性で C₁₈ 固相抽出, 2. 酸性で活性炭抽出の 2 種類の前処理を行い、ESI-FT-ICR MS で測定したところ、ポジティブモードでは S/N>4 の条件で、それぞれ、Deep: 1. 1547; 2. 1899, Plant: 1. 2017; 2. 1375 のピークが、ネガティブモードでは Deep: 1. 1709; 2. 1321, Plant: 1. 1886; 2. 919 のピークが検出された。一方、二つのサンプルで一致したピークの数には、ポジティブモードでそれぞれ 1. 89 ; 2. 44, ネガティブモードで 1. 161 ; 2. 318 と全体のピーク数から考えるとごく少数であった。一致したピークについて、分子式を決め、既存データベースと照合を進めている。

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-FT-ICR/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. シロイヌナズナ培養細胞からの単離液胞における包括的代謝物アノテーションの充実。

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 株標準単離液胞ならびに全細胞から検出される代謝物についてそれぞれ3反復の LC-FT-ICR-MS データ解析作業を実施し、代謝物アノテーションの高精度化を行なった。代謝物液胞画分は兵庫県立大で電気透析法により前処理することで検出ピークの増加が見られた。単離液胞と全細胞の間で液胞相当量を同一にするため、液胞マーカー酵素マンノシダーゼの活性を一定にする工夫を行なった。最終的に単離液胞からは ESI ポジティブモードで 736、ESI ネガティブモードで 713 個の代謝物が、全細胞からは ESI ポジティブモードで 876、ESI ネガティブモードで 989 個の代謝物が検出された。両者の比較から、液胞と全細胞では代謝物の m/z 値の分布に差が見られ、アミノ酸・核酸に属する代謝物種の偏った蓄積が見出された (図3)。

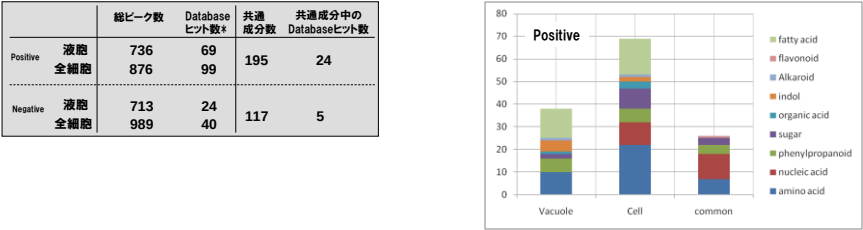


図3: DEEP 培養細胞の単離液胞および全細胞からの代謝物のアノテーションに基づく代謝物組成比較。アミノ酸関連化合物・核酸関連化合物に蓄積の偏りが見られる。

2. 液胞膜タンパク質形質転換体の作製と維持。

液胞膜タンパク質形質転換による代謝物変化の再現性を確認するため、かずさDNA 研では同じシロイヌナズナ培養細胞の別系統である T87 系統を用いて、同一遺伝子について形質転換細胞の作製および維持を進めた。さらに、シロイヌナズナ植物での形質転換体も作製・維持している。GFP 融合タンパク質の液胞膜局在を確認した(図4)。

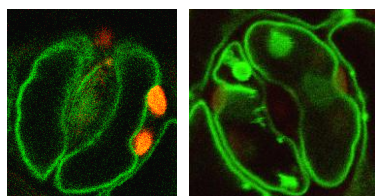


図4:シロイヌナズナ孔辺細胞での GFP-Atlg75220(左)GFP-At3g21690(右)の液胞膜局在。

T87 培養細胞の Atlg75220 過剰発現系統および At3g21690 過剰発現系統を用いて、全細胞での代謝物蓄積をコントロール系統(非形質転換 T87 細胞)と比較解析した。Atlg75220 過剰発現系統では、非形質転換 T87 細胞と比べてチロシン・フェニルアラニン・トリプトファンが2-3 倍に増加していたほか、8 倍以上蓄積している未同定代謝物 3 種が見出された。At3g21690 過剰発現系統では、非形質転換 T87 細胞と比べてチロシン・トリプトファンが 2-3 倍に増加していたほか、ケンフェロール配糖体 3 種が 6 倍以上に増加していた。

3. カンプトテシン代謝関連遺伝子発現抑制系統の代謝物分析。

千葉大学との協同で、チャボイナモリ毛状根においてカンプトテシン生合成関連遺伝子サイレンシングした系統等の LC-TOF-MS による代謝物分析を実施した。

4. シロイヌナズナ培養細胞・植物体を用いてカンプトテシン生合成関連遺伝子の過剰発現。

千葉大学との協同で、カンプトテシン生合成関連の4つの遺伝子(*STR*, *SLS*, *TDC*, *G10H*)を同時発現する T87 形質転換株ならびにシロイヌナズナ植物体の作製を行なった。多重導入した遺伝子の過剰発現の確認を行ない、T87 培養細胞全細胞ならびに細胞外培養液の代謝物分析を実施した。T87 培養細胞ではカンプトテシンやその生合成中間体の蓄積は見られなかったが、過剰発現株においてコントロール株とは異なる代謝物ピークが検出され、現在それらの構造推定を進めている。

5. 大量の植物体サンプルが容易に得られるトマトを材料とした代謝物の単離精製。

液胞局在が期待される植物二次代謝物1種の精製が終了した。

3. 研究実施体制

(1)「三村徹郎」グループ

①研究分担グループ長： 三村 徹郎(神戸大学大学院、教授)

②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、プロテオーム解析

(2)「山崎真巳」グループ

①研究分担グループ長： 山崎 真巳(千葉大学大学院、准教授)

②研究項目

二次代謝関連タンパク過剰発現体の培養

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」グループ

① 研究分担グループ長： 杉山 裕子(兵庫県立大学、助教)

② 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」グループ

① 研究分担グループ長： 青木 考(かずさ DNA 研究所、室長代理)

② 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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Mitsuhashi N., Kondo M., Nakaune S., Ohnishi M., Hayashi M., Hara-Nishimura I., Richardson A., Fukaki H., Nishimura M., Mimura T. (2008) Localization of *myo*-inositol-1-phosphate synthase to the endosperm in developing seeds of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3069-3076.
2. Wangwattana B., Koyama Y., Nishiyama Y., Kitayama M., Yamazaki M., Saito K. (2008) Characterization of *PAP1*-upregulated glutathione *S*-transferase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotech.*, **25**, 191-196.
3. Sirikantaramas S., Yamazaki M., Saito K. (2008) Mutations in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer alkaloid camptothecin in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **105**, 6782-6786.
4. Yamazaki M., Shibata M., Nishiyama Y., Springob K., Kitayama M., Shimada N., Aoki T., Ayabe S., Saito K. (2008) Differential gene expression profiles of red and green forms of *Perilla frutescens* leading to comprehensive identification of anthocyanin biosynthetic genes. *FEBS J.*, **275**, 3494-3502.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：0 件 (CREST 研究期間累積件数：0 件)