

三村徹郎

神戸大学理学研究科・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

神戸大、かずさDNA研究所、千葉大学の各グループがそれぞれ手分けして行っていた形質転換細胞株、及び植物体の多数が、昨年度から確立され始めた(植物では、形質転換株の確立に相当の時間が必要)。三村グループでは、野生株を含めそれぞれの培養細胞、植物体からインタクト液胞を単離する作業を集中的に行い、青木グループ(かずさDNA研究所)、杉山グループ(兵庫県立大学)に供給するとともに、神戸大学を含めたそれぞれの測定装置を利用して、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。現在、シロイヌナズナの三つの遺伝子 1) At1g75220 (Identical to Sugar transporter)、2) At3g21690 (MATE efflux family protein)、3) At3g62700 (ABC transporter ATMRP14) と

シソの機能未知遺伝子に注目して、野生株と形質転換系について比較検討を進めている。青木グループ、杉山グループでは、三村グループ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。これまでに、既知の代謝産物の他に、液胞に含まれていると想定されていなかった化合物を見出しつつある。

山崎グループでは、この作業とは別に、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。

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。標準物質の存在する代謝産物を中心とした同定はかなり進んだが、ノンターゲット解析において、物質の絞り込みは簡単ではない。一方で、杉山グループが使用している世界最高性能(磁場 12T)の FT-ICR-MS のデータから、モデル植物であるシロイヌナズナが持つ代謝産物分子量の網羅的高精度データが蓄積され始めた。これを使って、いくつかの物質の存在を推定できるようになっている。現在、このデータを公開するべく準備を進めている。

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. 研究実施体制

(1)「三村徹郎」グループ(神戸大学)

①. 研究分担グループ長:三村 徹郎 (神戸大学理学研究科、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(千葉大学)

①. 研究分担グループ長: 山崎真巳 (千葉大学大学院薬学研究院、准教授) (主たる共同研究者)

②. 研究項目

- ・二次代謝の異なる品種および培養組織のトランスクリプトーム解析
- ・二次代謝の異なる品種および培養組織のメタボローム解析
- ・二次代謝関連遺伝子導入による代謝エンジニアリング

(3)「杉山裕子」グループ(兵庫県立大学)

①. 研究分担グループ長: 杉山 裕子 (兵庫県立大学環境人間学部、准教授) (主たる共同研究者)

②. 研究項目

・シロイヌナズナ培養細胞 Deep 株、T87 過剰発現体、植物体(Shoot)から単離したインタクト液胞内容物試料、および植物細胞(Shoot、Root)抽出物試料を FT-ICR-MS を用いて分析する。

(4)「青木考」グループ(かずさDNA研究所)

①. 研究分担グループ長: 青木 考 (かずさDNA研究所生体機能応用研究室、室長) (主たる共同研究者)

②. 研究項目

- ・LC-FTICR-MS、GC-TOF-MS を用いた代謝物分析
- ・形質転換体作製維持
- ・形質転換体におけるトランスクリプトーム解析

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

3-1. 「三村徹郎」グループ

① 研究目的

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。

② 研究実施方法

1. シロイヌナズナ培養細胞、植物体葉肉細胞から単離したインタクト液胞を用いて、液胞内代謝産物、液胞膜・液胞内タンパク質の網羅的解析を行う。
2. 機能未知の液胞膜タンパク質を形質転換した植物細胞を作成し、そこからインタクト液胞を単離するとともに、液胞内代謝産物の解析を行う。
3. 液胞膜輸送体の機能に基づく、植物細胞代謝の新奇制御機構を検討する。

③ 結果

1. インタクト液胞の単離と各研究グループへの供給

シロイヌナズナ培養細胞 Deep 株、T87 過剰発現体・植物体(Shoot)からインタクト液胞を単離し、各研究グループへ供給した。

昨年度までも行っていた作業だが、今年度ようやく神戸大学、かずさ DNA 研究所、千葉大学から、各グループが手分けして行っていた形質転換細胞株、及び植物体の多数が確立され始め、それぞれの培養細胞、植物体からインタクト液胞を単離する作業を集中的に行い、分析のために各グループに戻す作業を行った。表1で液胞単離が可能な細胞から、全ての単離作業を行った。

表1. シロイヌナズナ形質転換系統

シロイヌナズナ 培養細胞	Deep 株				T87 株		
	過剰発現	液胞単離	プロテオーム解析	メタボローム解析	過剰発現	液胞単離	メタボローム解析
Control 細胞		○	○	○		○	○
AT3G21690 MATE efflux family protein	△	○		△	○	○	○
AT1G75220 Identical to Sugar transporter	△	○		△	○	○	○
AT3G62700 ABCtransporter (ATMRP14)	○	○		○			
シロイヌナズナ植物体	T-DNA 挿入	RNAi	microRNA	過剰発現	液胞単離	プロテオーム解析	メタボローム解析
植物体全体						○	○
葉肉細胞					○	○	○
AT3G21690 MATE efflux family protein	○		△	○			
AT1G75220 Identical to Sugar transporter	○			○			
AT3G62700 ABCtransporter (ATMRP14)	○				○		
SR6 シソ・色素関連遺伝子				○	○		
Anm1 シソ・色素関連遺伝子		○					

2. シロイヌナズナインタクト液胞内物質の質量分析器による同定、定量の進展。

神戸大学での CE-Q/TOF を稼働させることにより細胞、単離液胞に含まれる既知代謝産物のターゲット分析を行うとともに、かずさ DNA 研究所と共同で、内容物のノーターゲット分析を開始した。現在、AT3g62700 過剰発現株から単離した液胞を中心に解析を進めている。

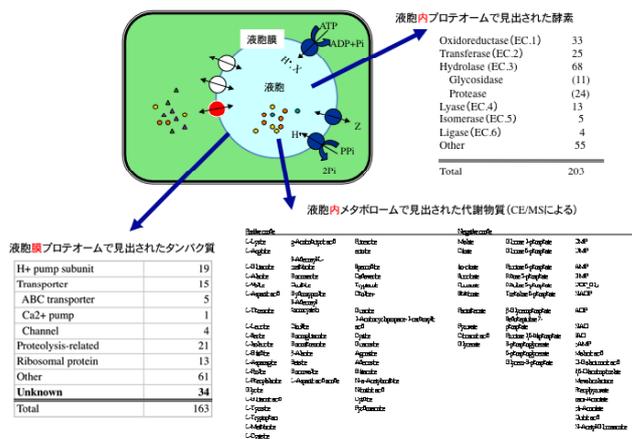


図1. 液胞のプロテオーム、メタボローム解析

照しながら液胞内の有機リン酸化合物分解活性を測定し、液胞には有機リン酸化合物分解十分な分解活性が存在するが、それ以上のリン酸化合物が持ち込まれていることが明らかになっている。有機リン酸化合物輸送に関与する可能性のある *At3g62700* を過剰発現した液胞のメタボローム解析を進めるとともに、*At3g62700* 遺伝子の膜輸送活性を検討するために単離遺伝子の *Xenopus* 卵での発現解析を行う準備を進めた。

3-2. 「山崎真巳」グループ

① 研究目的

植物液胞は、多様な二次代謝産物の主要な蓄積の場である。二次代謝産物には、ユニークな生理活性をもつものが多く有用物質資源として有用である。山崎グループでは、二次代謝と液胞機能の関係を明らかにすることにより、植物細胞による物質生産制御のための基盤情報を得ることを目的とする。特にアミノ酸に由来するフラボノイド類およびカンプトテシンおよびキノリチジナルカロイド等のアルカロイド類の生合成・代謝経路とその発現制御、細胞内物質輸送メカニズムさらには二次代謝と一次代謝あるいは異なる二次代謝間の関係をトランスクリプトームならびにメタボローム解析等により包括的に解析することにより、物質生産制御に応用展開が可能な基礎的知見を得ることを目的とする。

② 研究実施方法

二次代謝の異なる変異体あるいは成分変種を実験材料として、トランスクリプトームならびにメタボロームの包括的解析を行い、これらを統合解析することによりメタボローム変動に関連する遺伝子群をプロファイリングする。さらに代謝制御の候補遺伝子について、次のように機能解析を進める。まず転写制御因子に関しては過剰発現体および遺伝子抑制体を作成してこれらの変異体におけるメタボロームならびにトランスクリプトーム変動を解析することにより導入遺伝子の代謝制御機能と標的遺伝子群を明らかにする。触媒酵素遺伝子については組換えタンパク質を用いた *in vitro* 機能解析ならびに遺伝子組換え植物における *in vivo* 機能解析を行った。

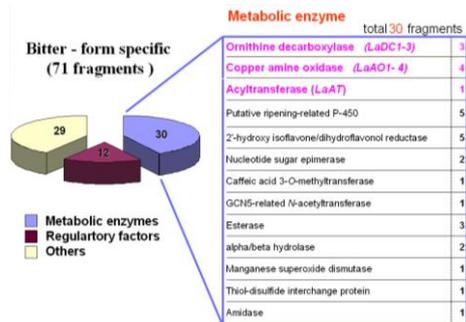
また、液胞膜と同様に、液胞内タンパク質についてプロテオーム解析を進め、液胞が含有するタンパク質と代謝産物の関係について検討を行うためのデータ収集を進めた(図1)。

3. 液胞への有機リン酸蓄積機構の解析

これまでの研究で明らかになった液胞内に糖リン酸が存在することを検証するため、プロテオーム解析結果を参

③ 結果

ホソバルピナス(*Lupinus angustifolius*)においてキノリチジナルカロイドを含有する「ビター品種」とアルカロイド非含有「スイート品種」を用いて、PCR-select cDNA subtraction 法によりビター品種特異的に発現する遺伝子をプロファイリングした。その結果、ビター品種特異的にアルカロイド生産への関与が推測される、オルニチン脱炭酸酵素、アミン酸化酵素、アシル転移酵素遺伝子ホモログ遺伝子が発現していることが明らかになった(図2)。次にプロファイルされた配列をもとに全長cDNA(*LaDC*, *LaAO*, *LaAT*)を単離した。



LaDC を大腸菌で発現させた組換え酵素は、*in vitro* で高いリジン脱炭酸活性を示した。真核生物のオルニチン脱炭酸酵素は副反応としてオルニチンより炭素数が一つ多いリジンをわずかながら脱炭酸することが知られているが、それらに比べて*LaDC*は高いリジン活性を示し、ルピナスではその脱炭酸酵素反応によりキノリチジナルカロイド前駆体であるカダベリンが供給されることが示唆された。また、カダベリンは一般的にマメ科に多く含まれるポリアミンであり、カダベリン高含有もリジン脱炭酸酵素によるものと考えられる。今後、*LaDC* を過剰発現させた組換え植物におけるメタボローム変動を解析する予定である。

LaAT 遺伝子は、ビター品種とスイート品種の若い葉、展開葉、子葉、胚軸、根から抽出した mRNA について半定量的 RT-PCR を行ったところ、アルカロイド生産のみられるビター品種の若い葉において特異的に発現することが明らかになった(図3)。*LaAT* は、BAHDファミリーの中でもシロイヌナズナのポリアミンアシル転移酵素と最も相同性が高いことから、*LaAT* は、*LaDC* により過剰に生成するカダベリンの代謝に関与することが推測された(図4)(原著論文1)。

今後、*LaAO* の機能解析を行う予定である。今後は、これらの酵素を異なる植物種で発現させることにより代謝エンジニアを行うことを予定している。

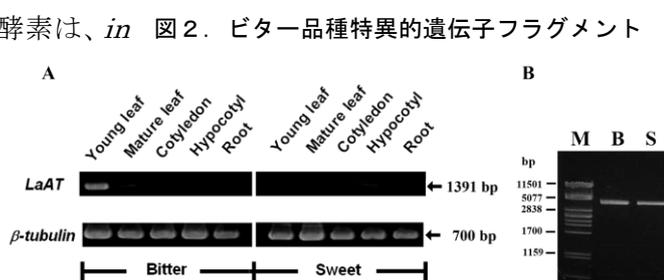


図3 *LaAT* のビター品種特異的発現(A)とゲノムPCR(B)

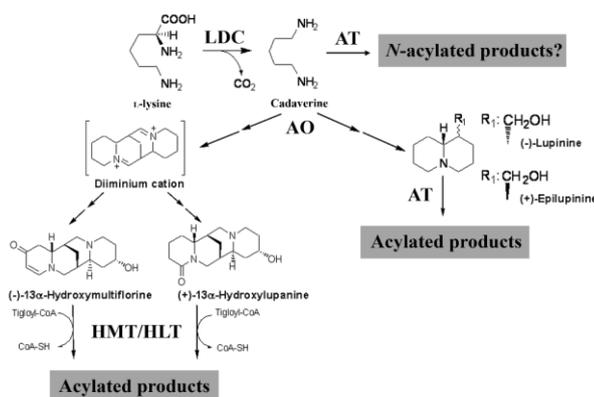


図4 キノリチジナルカロイドの生合成と代謝

今後、*LaAO* の機能解析を行う予定である。今後は、これらの酵素を異なる植物種で発現させることにより代謝エンジニアを行うことを予定している。

3-3. 「杉山裕子」グループ

① 研究目的

シロイヌナズナ培養細胞 Deep 株・T87 過剰発現体・植物体(Shoot)から単離したインタクト液胞内容物試料、および植物細胞(Shoot、Root)抽出物試料を FT-ICR-MS を用いて分析し、液胞に含まれる低分子有機化合物の同定を行う。

② 研究実施方法

神戸大学から供給されたシロイヌナズナ培養細胞 Deep 株・T87 過剰発現体・植物体(Shoot)から単離したインタクト液胞内容物試料、Deep・T87 細胞抽出試料、および植物体抽出物試料(ShootとRoot)を、Old Dominion 大学(USA)の 12T FT-ICR-MS を用いて、infusion 分析を行った。

③ 結果

培養(試薬)ブランク試料の測定の結果、ネガティブ分析で 331-380(Deep), 395-447(T87), 448-492(shoot)、ポジティブ分析で 735-799(Deep), 799-839(T87), 767-868(shoot)など、多数の質量ピークが検出されたが、ネガティブ分析結果について、バックグラウンドの混入を除くことで、サンプル由来のピークを求めることが可能である。さらに、サンプル由来のマスリストから液胞試料と細胞試料の両方で検出されるものの存在を検索したところ、Deep 液胞試料と細胞抽出試料で 126 の、T87 過剰発現体液胞試料と細胞抽出試料で 53 のピークが抽出された($m/z > 450$)。それらの一覧を表2・3に示す。

表2(左). Deep株細胞と液胞に共通する代謝産物例 ($m/z < 450$)。

表3(右). T87株細胞と液胞に共通する代謝産物例 ($m/z < 450$)

Obsvd m/z	Expected formula	Theor m/z	error(ppm)	DBE	annotation
267.05415	C11H12N2O4 P1	267.054017	0.5	8	
299.20164	C20H27O2	299.201654	0	8	Retinoic Acid
301.21733	C20H29O2	301.217304	0.1	7	
364.09413					
369.14026	C14H25O11	369.140235	0.1	3	
379.06487	C10H20O13P1	379.064701	0.4	2	
385.07285	C13H22O9S1P1	385.072763	0.2	4	
385.17861	C19H30O6P1	385.178549	0.2	6	
386.07619					
401.04682					
401.07579	C13H21O12S1	401.07592	-0.3	4	
402.0791	C12H21O12S1 13C1	402.079275	-0.4	4	
407.05484					
411.16021	C27H23O4	411.160183	0.1	17	
417.26788	C14H37N6O8	417.267836	0.1	0	
423.02883					
423.05493					
423.05777	C19H19O7S2	423.057768	0	11	
423.11204	C20H23O8S1	423.111912	0.3	10	
425.06546					
429.06286	C14H22O11S1P1	429.062592	0.6	5	
433.33248	C27H45O4	433.332334	0.3	6	
439.03172	C11H20O14S1P1	439.031686	0.1	3	
442.20643	C18H32N7O2S2	442.206438	0	7	
445.08279					
445.09409					
446.15175	C15H28N1O14	446.151528	0.5	3	
447.04746					
449.15036					

Obsvd m/z	Expected formula	Theor m/z	error(ppm)	DBE	annotation
228.20493	C13H27O2 13C1	228.205009	-0.3	2	myristate
239.20160	C15H27O2	239.201654	-0.2	3	
242.22067	C14H29O2 13C1	242.220659	0	2	
402.07896	C14H16N3O11	402.079032	-0.2	9	
430.15672					
439.08583					
441.20318					
445.15620	C16H29O14	445.156279	-0.2	3	
446.15164	C15H28N1O14	446.151528	0.3	3	

また、既知化合物の理論 m/z 値から、マスリスト内のピークを検索し、検出分子と合致するものを検索することも試みた。青木グループの LC-FT MS により検出が確認されている数種のグルコシレート化合物を、Shoot 液胞・Shoot 細胞・Root 細胞抽出試料のマスリストから検索したところ、1ppm 以内の誤差で検出されるものが多数見つかった(表4)。この方法は、精密 m/z

値からだけでは分子式の特定が難しい高分子化合物を検索するのに有効であると考えられる。

表4. Glucosinolates found in the vacuole and cell extracts from the Arabidopsis samples.

Theoretical m/z	Compound name	Molecular Formula	Detection		
			Shoot Vacuole	Shoot Cell	Root Cell
422.025482	3-Methylsulfinylpropyl glucosinolate	C11H21NO10S3	○	○	×
436.041132	4-Methylsulfinylbutyl glucosinolate	C12H23NO10S3	○	○	○
464.072432	6-Methylsulfinyl-n-hexyl-glucosinolate	C14H27NO10S3	×	○	×
478.088082	7-Methylsulfinyl-n-heptyl-glucosinolate	C15H29NO10S3	○	○	×
92.103732	8-Methylsulfinyloctyl glucosinolate	C16H31NO10S	○	○	○
422.025482	3-Methylsulfinyl-n-propyl-glucosinolate	C11H21NO10S3	○	○	×
450.056782	5-Methylsulfinyl-n-pentyl-glucosinolate	C13H25NO10S3	○	○	×

今後は、分子式の予想を自動で行うプログラムの完成を目指すとともに、既知物質の検索プログラムを作成し、検出された有機物質の同定をさらに進める予定である。

3-4. 「青木考」グループ

① 研究目的

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-細胞質間トランスポール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。

② 研究実施方法

三村グループの液胞膜プロテオーム解析から液胞膜上に局在することが確認されたトランスポータータンパク質の中から、MATE efflux family に属する At3g21690 および糖トランスポーターと相同性の高い At1g75220 を標的とし、これらの遺伝子を過剰発現・発現抑制した培養細胞と植物体を作製する。全細胞画分と単離液胞画分のメタボローム解析を行ない、代謝物プロフィールを比較し、遺伝子発現変化に応じて蓄積量が変化している代謝物の選抜を行ない、これらを機能未知トランスポーター基質候補として解析を行なう。

③ 結果

1. 液胞膜タンパク質形質転換体の作製
解析標的遺伝子 At3g21690 と At1g75220 をサイレンシングした T87 培養細胞系統ならびにシロイヌナズナ植物体を作製した(図 5)。また、研究進行過程で生じた、At3g21690 タンパク質はグルコシノレートを送送基質とする、との仮説を検証するために、At5g61420(Myb28)過剰発現 T87 培養細胞系統とシロイヌナズナ植物体を作製した。

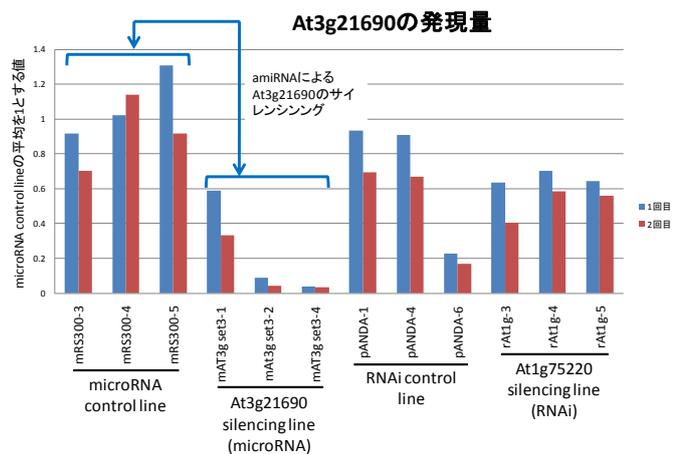


図 5. T87 培養細胞 At3g21690 サイレncing 系統。

2. 液胞膜タンパク質形質転換培養細胞由来の単離液胞代謝物の解析

At3g21690(MATE efflux family)の基質探索を目的として、T87 細胞からの単離液胞中の代謝物を LC-FTICR-MS により分析した。基質候補選抜のため①At3g21690 過剰発現系統液胞で、コントロール液胞および At1g75220 過剰発現系統液胞の両者に比べて 2 倍以上増加している代謝物②かつ At3g21690 過剰発現系統全細胞画分にも検出される代謝物、という基準で選抜を行なった。これによりグアノシンならびに2つの未知代謝物 m/z218.102, m/z387.941 が選抜された(図 6)。逆に At3g21690 過剰発現系統液胞で減少している代謝物として4つの未知代謝物 m/z500.157, m/z225.062, m/z878.289, m/z536.167 が見出された。同様な解析を GC-TOF-MS により検出された代謝物に対しても実施し、At3g21690 過剰発現系統液胞で増加している代謝物としてグルタチオンが、減少している代謝物としてリジン・トリプトファン・チロシンが見出された。

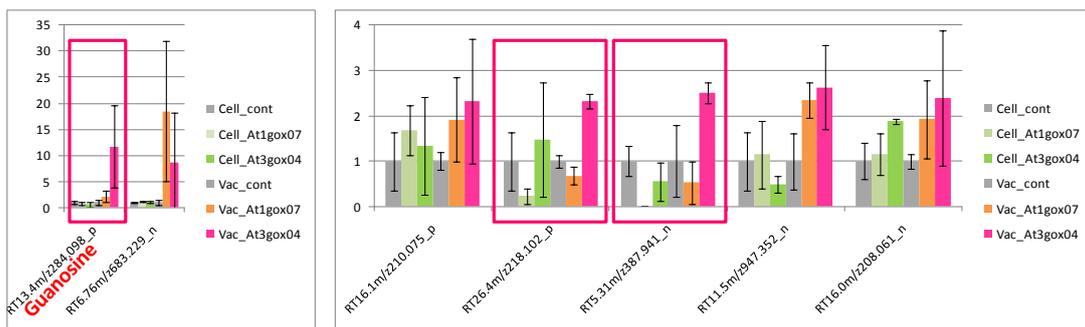


図 6. At3g21690 過剰発現 T87 細胞の単離液胞で、過剰発現による増加が見られた代謝物。

さらに以下に述べるように、At3g21690 過剰発現植物葉ではグルコシノレート・イソチオシアネートの増加が見られ、At3g21690 がグルコシノレートの輸送体であるとの作業仮説が得られた。しかしながら T87 培養細胞はグルコシノレートを生産しない。そこでグルコシノレート合成を正に制御する転写因子 Myb28 を過剰発現する T87 形質転換細胞を確立し、代謝物分析に向けての液相単離を三村グループと共同で進めている。

3. 液相膜タンパク質形質転換植物体の代謝物解析

T87 細胞からの単離液相中の代謝物の場合と同様な基準で、At3g21690 過剰発現シロイヌナズナ植物体ロゼット葉で増加・減少している代謝物の探索を LC-FTICR-MS と GC-TOF-MS を用いて実施した。増加している代謝物として、6-メチルスルフィニルヘキシルグルコシノレート・8-メチルスルフィニルオクチルグルコシノレートおよびそれらのイソチオシアネート派生物が同定された(図7)。これらは杉山グループによる植物体由来液相中からも検出されることが明らかとなった。これらグルコシノレート・イソチオシアネートピークの増加は若い3週齢の葉では観察されなかったが、より成熟した5週齢の葉では再現性よく観察された。さらに GABA・クエン酸・グルコース・フルクトース、未知代謝物 m/z467.189, m/z511.145 の増加が見出された。減少している化合物としてトレオニン・シキミ酸が同定され、加えて有意に減少している8つの未知代謝物が検出された。

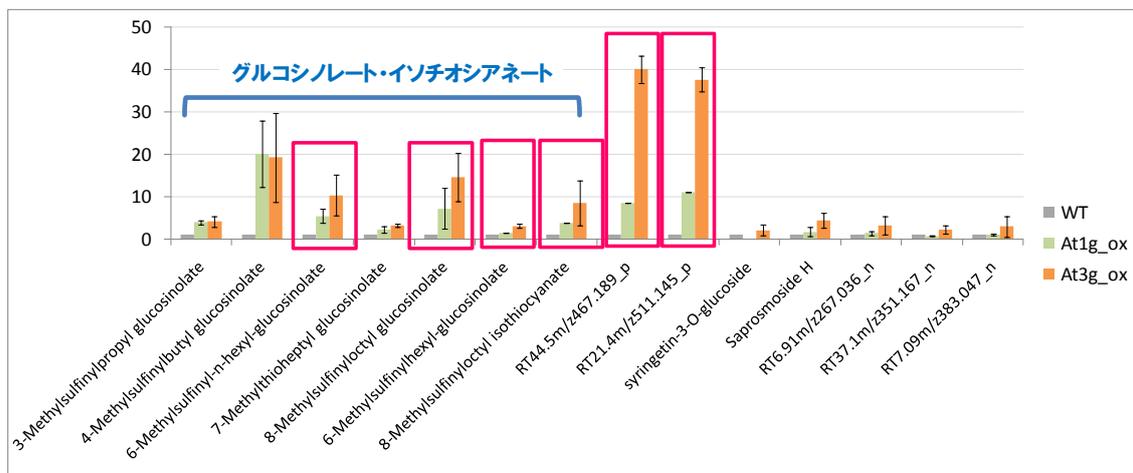


図7. At3g21690 過剰発現植物体ロゼット葉 (5 週) で増加している代謝物。

そこで次に At3g21690 遺伝子をサイレンシングするシロイヌナズナ植物形質転換体を作製し、これらの代謝物蓄積に変化が見られるかどうかの調査に向けて、サイレンシング系統の確立と代謝物分析用のサンプリングを終了した。また三村グループと共同で、At3g21690 過剰発現ならびにサイレンシングの3週齢葉からの単離液相画分の調製を進めている。

4. 液相膜タンパク質形質転換培養細胞および植物体での遺伝子発現解析

作製された形質転換培養細胞とシロイヌナズナ植物体に於いて、導入遺伝子の発現量の確認を実施し、実際に過剰発現性を示す系統を選抜した。

5. カンプトテシン合成関連遺伝子群を操作したチャボイナモリ毛状根・シロイヌナズナ培養細

胞の代謝物解析

千葉大学と協力して、カンプトテシン生合成関連遺伝子を抑制したチャボイナモリ毛状根ならびに過剰発現したシロイヌナズナ培養細胞・植物体の代謝物解析を実施した。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Bunsupa A., Okada T., Saito K., Yamazaki M.: An acyltransferase - like gene obtained by differential gene expression profiles of quinolizidine alkaloid-producing and nonproducing cultivars of *Lupinus angustifolius*. Plant Biotechnology, in press