

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：34506
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K14736
研究課題名(和文)ペルオキシソーム膜タンパク質の選別輸送機構

研究課題名(英文)Analysis of peroxisomal membrane proteins

研究代表者

高木 純平 (Junpei, Takagi)

甲南大学・理工学部・特任研究助教

研究者番号：80740331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ペルオキシソームは重要な代謝機能を担うオルガネラである。しかしながら、植物におけるペルオキシソーム膜タンパク質の選別輸送機構については十分な知見がない。本研究では、様々なペルオキシソーム膜タンパク質に着目して、ライブセルイメージング解析を推進した。その結果、ペルオキシソーム前駆体様構造の内腔にペルオキシソーム内腔タンパク質が徐々に蓄積していくことで、成熟したペルオキシソームが形成されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペルオキシソームは環境変化に応じて、分裂、増殖したり、逆に分解を受けたりすることが知られている。植物においてペルオキシソームの分裂機構や分解機構については明らかになっている一方で、ペルオキシソームの成長・新規形成機構についてはほとんど明らかになっていない。本研究によってペルオキシソーム形成機構の一端に迫ることができた。将来的には、本研究の成果を環境変化に応答したペルオキシソームのダイナミクスの解明につなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：Peroxisomes are organelles that is involved in various metabolic reactions. Peroxisome membrane proteins are responsible for maintaining peroxisome homeostasis. However, in plants, the selective transport mechanism of peroxisomal membrane proteins is not well understood. In this study, we performed live cell imaging analysis of various peroxisomal membrane proteins and found that peroxisomal matrix proteins are gradually accumulated in the lumen of preperoxisomal compartment-like structure to form mature peroxisomes.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：ペルオキシソーム オルガネラ 選別輸送 シロイヌナズナ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームは真核生物に広く保存されるオルガネラで、様々な重要な代謝機能を担っており、環境変化に応じて増殖したり分解を受けたりする。植物においてペルオキシソームの分裂機構については明らかになっているが、分裂後ペルオキシソームがどのように成長するのかについてはあまり明らかになっていない。

ペルオキシソームの代謝機能を担う酵素などをペルオキシソーム内腔へ取り込むのに重要な役割を果たしているのが、ペルオキシソーム膜タンパク質である。様々な研究から、これらのペルオキシソーム膜タンパク質はいったん小胞体に取り込まれたのちに、ペルオキシソームへと輸送されることが示唆されている。in vitro 実験の結果から、小胞体からペルオキシソーム膜タンパク質を含んだ輸送小胞が形成・出芽する可能性が示唆されているものの、小胞体-ペルオキシソーム間の輸送において、輸送小胞と標的オルガネラの融合を担う分子などはこれまで同定されておらず、いかにしてペルオキシソーム膜タンパク質が小胞体からペルオキシソームへと正確に輸送されるのか、その仕組みはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では様々なペルオキシソーム膜タンパク質に着目して解析を進めることで、ペルオキシソーム膜タンパク質のペルオキシソームへの選別輸送モデルを構築すること、また、ペルオキシソームの成長過程を明らかにすることを目指した。

一方、小胞体-ゴルジ体間の選別輸送も輸送小胞によって担われている。これまでの小胞体-ゴルジ体間の選別輸送研究から、標的オルガネラと輸送小胞形成ドメインの相互作用が、正確かつ効率的な物質輸送に重要であることを見出している。そこで、小胞体-ペルオキシソーム間の相互作用を担う因子を探索・同定することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、下記の2点について研究を行った。

(1) ペルオキシソーム内腔タンパク質の取り込みに関わる因子を中心に、様々なペルオキシソーム膜タンパク質を可視化したシロイヌナズナ形質転換体を作成し、蛍光顕微鏡(Axioscope 5)を用いて評価・選別を行ったのち、共焦点レーザー顕微鏡(LSM800)を用いて観察を行った。また、長時間のタイムラプス観察系を確立し、経時的変化についての解析も行った。

(2) 一過的発現系を用いて、小胞体-ペルオキシソーム間の相互作用を担うと考えられる候補因子とペルオキシソーム内腔タンパク質を同時に可視化し、ペルオキシソームと共局在を示す因子の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 様々なペルオキシソーム膜タンパク質とペルオキシソーム内腔タンパク質を同時に可視化したシロイヌナズナ形質転換体を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、ペルオキシソーム膜タンパク質がペルオキシソーム内腔タンパク質と共局在を示した。すなわち、これらのペルオキシソーム膜タンパク質が成熟型のペルオキシソームに局在していることが確認できた。興味深いことに、ペルオキシソーム膜タンパク質の一部に関しては、ペルオキシソーム内腔タンパク質のシグナルを欠き、ペルオキシソーム膜タンパク質でのみ標識されるペルオキシソーム前駆体様の構造にも局在していることを見出した。長時間のタイムラプス観察系を確立し、ペルオキシソーム前駆体様構造の経時的変化について解析を行った。その結果、ペルオキシソーム前駆体様構造の内腔にペルオキシソーム内腔タンパク質が徐々に蓄積していく様子が見られた(図1)。

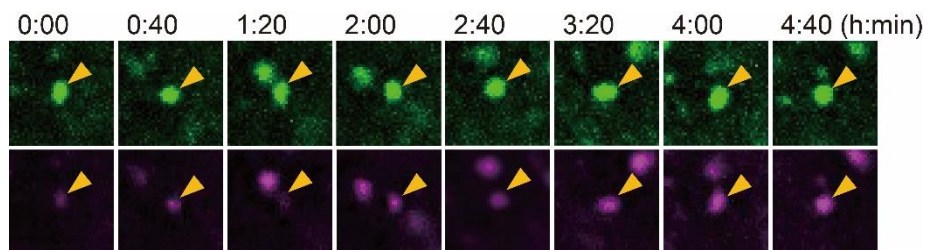


図1. ペルオキシソーム内腔タンパク質の蓄積。
GFPを融合したペルオキシソーム膜タンパク質(上段)およびmCherryを融合したペルオキシソーム内腔タンパク質(下段)を共発現するシロイヌナズナ形質転換体を共焦点レーザー顕微鏡を用いた経時観察に供した。時間が経つにつれ、ペルオキシソーム内腔タンパク質が徐々にペルオキシソーム膜タンパク質で標識される構造の内腔に蓄積していく様子が見られた。

植物において、ペルオキシソーム膜タンパク質を含むペルオキシソーム前駆体が形成されたのちにペルオキシソーム内腔タンパク質が取り込まれることで、成熟したペルオキシソームが新しく生じる可能性が示唆される。今後は、ペルオキシソーム前駆体様の構造がどのオルガネラからどのように形成されるか、ペルオキシソーム前駆体様の構造にどのような因子が含まれるかなどについて検討していく必要がある。

(2) 小胞体-ペルオキシソーム間の相互作用を担う可能性のある候補因子とペルオキシソーム内腔タンパク質を同時に可視化し、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。その結果、2つの候補因子を見出した。1つはペルオキシソームと共局在を示しただけでなく、一部小胞体にも局在していることが観察された。もう1つは、ペルオキシソームと部分的に共局在を示した。以上の結果から、これら2つの因子が小胞体とペルオキシソームの相互作用に関与している可能性が示唆される。また、上述のペルオキシソーム膜タンパク質の解析を通じて、一部のペルオキシソーム膜タンパク質を過剰発現すると、ペルオキシソームの凝集や巨大化が引き起こされることを見出した。すなわち、これらのペルオキシソーム膜タンパク質がオルガネラ同士の相互作用や、ペルオキシソーム形成の制御に関わっている可能性が示唆される。今後、これらの因子について、変異体の表現型解析や機能解析を重ねることで、小胞体-ペルオキシソーム間の相互作用を担っているかどうか検討するとともに、ペルオキシソーム膜タンパク質のペルオキシソームへの選別輸送やペルオキシソームの形成にどのように関与するのかについても解析していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugano Shigeo S., Nishihama Ryuichi, Shirakawa Makoto, Takagi Junpei, Matsuda Yoriko, Ishida Sakiko, Shimada Tomoo, Hara-Nishimura Ikuko, Osakabe Keishi, Kohchi Takayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0205117 ~ 0205117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1371/journal.pone.0205117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Uemura Tomohiro, Nakano Ryohei Thomas, Takagi Junpei, Wang Yiming, Kramer Katharina, Finkemeier Iris, Nakagami Hirofumi, Tsuda Kenichi, Ueda Takashi, Schulze-Lefert Paul, Nakano Akihiko	4. 巻 179
2. 論文標題 A Golgi-Released Subpopulation of the Trans-Golgi Network Mediates Protein Secretion in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 519 ~ 532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1104/pp.18.01228	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高木純平, 木森義隆, 嶋田知生, 西村いくこ
2. 発表標題 COPII小胞形成ドメインERESはゴルジ体と接触・解離を繰り返す
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水穂そまれ, 前田徹, 上尾達也, 高木純平, 國枝正, 山田健志, 尾崎まみこ, 西村いくこ
2. 発表標題 アブラナ科が獲得した化学防御：昆虫の摂食行動を抑制するERボディ系
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高木純平, 嶋田知生, 西村いくこ
2. 発表標題 小胞体からの選別輸送機構の解析
3. 学会等名 第83回日本植物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木純平
2. 発表標題 COPII小胞形成ドメインER exit siteの動態解析
3. 学会等名 第8回植物エンドメンブレンミーティング
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木純平, 嶋田知生, 西村いくこ
2. 発表標題 COPII小胞形成ドメインERESとゴルジ体の関係
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水穂そまれ, 前田徹, 高木純平, 國枝正, 山田健志, 尾崎まみこ, 西村いくこ
2. 発表標題 ER bodyは昆虫の摂食行動を抑制するにの生産に關与する
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木純平
2. 発表標題 MAG3は小胞体とゴルジ体の境界においてタンパク質の輸送に関わる
3. 学会等名 第7回植物エンドメンブレンミーティング
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junpei Takagi
2. 発表標題 Analysis of maigo mutants defective in protein transport between the ER and Golgi
3. 学会等名 Jagiellonian University-Konan University Bilateral Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

(1) アウトリーチ活動情報(計4件) ひらめき ときめき サイエンス「ミクロの忍術使い「細胞」の秘密をさぐる」(日本学術振興会) . 2019年 . 国際生物学オリンピック日本代表生徒に対する個別教育(国際生物学オリンピック日本委員会) . 2019年 . ひらめき ときめき サイエンス「ミクロの忍術使い「細胞」の秘密をさぐる」(日本学術振興会) . 2018年 . 国際生物学オリンピック日本代表生徒に対する個別教育(国際生物学オリンピック日本委員会) . 2018年 .

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考