

植物細胞の脂質分泌の鍵をにぎるバルク輸送マシナリーの分子基盤

Molecular basis of bulk transport machinery playing key roles in lipid secretion in plant cells

課題番号：19H05638

矢崎 一史 (YAZAKI Kazufumi)

京都大学・生存圏研究所・教授



研究の概要（4行以内）

本研究では、脂溶性で生理活性の高い数多くの二次代謝産物を特定の細胞から細胞外に分泌し、アポプラスト（細胞外スペース）に蓄積する現象に着目し、モデル系としてムラサキの培養細胞におけるシコニン分泌系を用い、植物細胞からの脂質のバルク輸送を司る輸送マシナリーの構成メンバーの同定と、輸送メカニズムの分子機構を明らかにすることを目的とする。

研究分野：植物科学、二次代謝、輸送生化学、分子生物学

キーワード：脂質分泌、植物細胞、バルク輸送、二次代謝、シコニン

1. 研究開始当初の背景

植物は、表皮細胞から細胞外に分泌するワックスやスベリンといった脂溶性ポリマーだけでなく、モノテルペン類やタキソールなど、脂溶性で生理活性の高い数多くの二次代謝産物を特定の細胞から細胞外に分泌し、アポプラスト（細胞外スペース）に蓄積する。しかし、水に溶けない物質を含有した脂質-重膜の油滴が、どのようなメカニズムで水を主とするサイトゾルを細胞膜に向けて移動し、細胞を殺すことなく分泌されるのか、その分子メカニズムは依然として未知のままである。本研究でこれを学術的「問い」として中心に据え、その分子機構の解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究では、ムラサキの培養細胞におけるシコニン分泌系をモデル系として用い、植物細胞からの脂質のバルク輸送を司る輸送マシナリーの構成メンバーの同定と、輸送メカニズムの分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

まずオミックス研究からリストアップされた脂質輸送関連遺伝子とそれぞれの遺伝子産物の細胞内膜局在の解析から、脂質分泌に深く関与する有力候補を絞り込み、一過的遺伝子抑制系である virus-induced gene silencing (VIGS) 系において個々の遺伝子の解析を行い、優先順位をつけ、順次毛状根に

よる安定形質転換体系によるゲノム編集ライオンを作成する。電子顕微鏡を用いて、シコニン分泌阻害時の細胞内膜構造の解析を行う。これと並行して、蛍光タンパク質を用いた膜タンパク質とシコニン分子のダイナミクスを追跡し、脂質の細胞外分泌過程に関与する分子の働きを明らかにする。さらに、各タンパク質同士の相互作用解析を行い、輸送マシナリーの全体像の解明を目指す。

4. これまでの成果

A: 膜ダイナミクスに関わるメンバー絞り込み：マルチオミックスを利用して、ムラサキ細胞からの脂質分泌に関わると期待される候補遺伝子を8個までに絞り込んだ。各遺伝子に関して GFP 融合タンパクとし、*Nicotiana benthamiana* の系で細胞内局在を調べ、各遺伝子産物の細胞内マップを作成した。いずれも膜局在型のタンパク質であり、2つが細胞膜局在型の膜輸送体で、うち1つは ABC-G タイプのタンパク質であった。

B: ウイルス誘導性遺伝子サイレンシング (VIGS)：VIGS に関しては、種々検討した結果、リンゴ小球形潜在ウイルス (ALSV) を利用したベクター系を確立することとした。本ウイルスの利点は、国産でありリソースの共有が簡便であること、また感染によるシコニンへの影響が認められないことである。*Phytoene desaturase (PDS)* 遺伝子を用い、サイレンシングを行なったところ、本ウイルスベクターで VIGS が可能であることを示した。



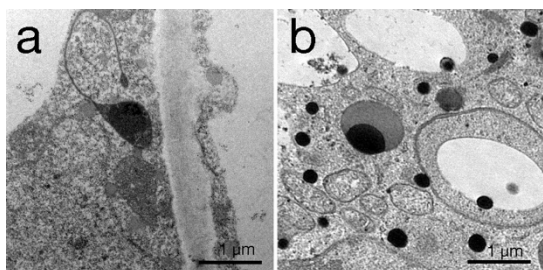
ムラサキPDS遺伝子のサイレンシング

C: 毛状根形質転換系の改良:各遺伝子の脂質分泌に関する機能を効率良く評価するため、遺伝子導入系の改善を行なった。国産の *Agrobacterium rhizogenes* A13 株を用いて詳細な実験条件の検討を行った結果、遺伝子導入効率を 50~70% と飛躍的に上昇させることに成功した。

D: 脂質分泌時の膜ダイナミクス解析: シコニン分泌に関するタンパク質として報告されている LeDI2 に関して、部位特異的突然変異導入による膜局在性に対する影響と、ポーラーリピッドとの直接相互作用に関して解析をし、タンパク質としての特性に関する知見を得た。

E: タンパク質間の相互作用の解析: GFP と HA タグとの融合タンパク質として各候補遺伝子を *N. benthamiana* にて発現させ、免疫沈降による各タンパク質同士の相互作用を調べた。

F: 高圧凍結置換固定法
シコニンおよびその分泌に関する細胞内膜構造の電子顕微鏡観察にあたり、通常の化学固定法では試料調製過程でシコニンが流出してしまう。そこで脂質固定の向上を目指して固定法の改良を試みた。通常の化学固定法に固定剤の拡散を防ぎ安定化する試薬を添加することにより、シコニンを細胞中に保持できただけでなく、細胞内膜構造の明瞭化も達成することができた。



ムラサキ培養細胞の TEM 像
a: 通常の化学固定、b: 改良法

5. 今後の計画

輸送カーゴに関わる候補遺伝子 8 種について、VIGS による KD と、安定形質転換毛状根による KD および KO クローンを作成し、分泌を阻害された際の細胞内膜構造の変化を電子顕微鏡により、蓄積/分泌化合物の変化を高分解能 LC-MS により解析する。一方、脂質分泌の際に特異的に形成される「足場」のスベリン様物質の解析も進める。また膜マーカーを用いて、8 種の候補タンパク質の輸送過程をライブイメージングで追跡する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- Munakata, R., (18 人略), *Hehn, A., *Yazaki, K., Parallel evolution of UbiA superfamily proteins into aromatic *O*-prenyltransferases in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
- Yamamoto, H., Tsukahara, M., Yamano, Y., Wada, A., *Yazaki, K., Alcohol dehydrogenase activity converts 3"-hydroxygeranylhydroquinone to an aldehyde intermediate for shikonin and benzoquinone derivatives in *Lithospermum erythrorhizon*, *Plant Cell Physiol.*, 61(10), 1798-1806 (2020).
- Izuishi, Y., (9 人略), H., Yazaki, K., Apple latent spherical virus (ALSV)-induced gene silencing in a medicinal plant, *Lithospermum erythrorhizon*, *Sci. Rep.*, 10 (1), 13555 (2020).
- Oshikiri, H., Watanabe, B., Yamamoto, H., Yazaki, K., *Takanashi, K., Two BAHD acyltransferases catalyze the last step in the shikonin/alkannin biosynthetic pathway, *Plant Physiol.*, 184 (2), 753-761 (2020).
- Ueoka, H., (9 人略), *Yazaki, K., A cytosol-localized geranyl diphosphate synthase from *Lithospermum erythrorhizon* and its molecular evolution, *Plant Physiol.*, 182 (4), 1933-1945 (2020)
- Tatsumi, K., Ichino, T., Onishi, N., Shimomura, K., *Yazaki, K., Highly efficient method of *Lithospermum erythrorhizon* transformation using domestic *Rhizobium rhizogenes* strain A13, *Plant Biotech.*, 37 (1), 39-46 (2020).
- Takanashi, K., Nakagawa, Y., Aburaya, S., Kaminade, K., Aoki, W., Saida-Munakata, Y., Sugiyama, A., Ueda, M., *Yazaki, K., Comparative proteomic analysis of *Lithospermum erythrorhizon* reveals regulation of a variety of metabolic enzymes leading to comprehensive understanding of the shikonin biosynthetic pathway, *Plant Cell Physiol.*, 60 (1): 19-28 (2019).

7. ホームページ等

<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/lpge/index.html>