様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２４年　5月　24日現在

機関番号：１７１０２
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2009～2011
課題番号：２１３８０２０８
研究課題名（和文）　遺伝子組換え植物を用いた物質生産の基礎となる蛋白質の安定化と分解の制御機構の解析
研究課題名（英文）　Analysis of the regulation mechanism of protein stabilzation and degradation on the basis of recombinant material production in transgenic plants.
研究代表者
松岡　健（MATSUOKA KEN）
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号：40222294

研究成果の概要（和文）：
植物細胞に発現させた外来蛋白質の蓄積と分解の機構について研究を進め、以下の成果を得た。蛍光変換蛋白質を用いて、新生蛋白質と既存蛋白質を区別して解析する方法を開発した。蛋白質凝集体の栄養飢餓により誘導されるオートファジーによる分解の情報伝達機構は、リン飢餓と糖や窒素飢餓で異なり、リン飢餓の情報は亜リン酸により特異的に阻害される事を見出した。また、凝集体以外の蛋白質の分解においては亜リン酸で阻害されないものも存在することも見出した。
研究成果の概要（英文）：
Based on the study on the mechanism of accumulation and degradation of foreign protein expressed in plant cells, we got the following results.　Using color conversible fluorescenct protein fluorescence conversion, we have developed a method to distinguish between pre-existed and nascent proteins.　Using this system we found that induction of the degradation of intracellular protein aggregates by autophagy by phosphate starvation was specifically inhibited by phosphite and this inhibition was not observed in nitrogen and sugar starvation conditions. We also found that phosphite dependent inhibition of the degradation under phosphate-limitation condition depends on proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００９年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
２０１０年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
２０１１年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総　計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：応用分子細胞生物学・植物分子生物学
科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学
キーワード：オートファジー，栄養欠乏、分解、遺伝子組換植物、蛋白質生産、亜リン酸、情報伝達、蛍光変換蛋白質

１．研究開始当初の背景

植物を宿主とする有用物質の組換え生産は、その生育に要するコストが動物、微生物と比較して安価なこと、植物は移動せず収穫も容易であること等から、今後普及する技術として注目されている。特に、近年の再生医療技術の開発に必須である増殖因子や、ミサイル療法のために用いられるヒト型抗体等の、有用蛋白質の安価な供給が求められ,これらをターゲットとした植物での生産系の開発が進行中である[1]。これらの蛋白質の殆どは、小胞

体上での生合成と小胞輸送系での輸送の過程で、糖鎖修飾等の各種の修飾を受けながら細胞外へと分泌される。また、植物の代謝系を改変して有用な新規化合物を作らせる試みも始まっているが、これらの場合は、目的とする代謝産物を合成する場、例えばチトクローム P450 やチトクローム b5 ドメインを持つ蛋白質の場合は小胞体に局在させる必要がある。更に、ワクチン用の蛋白質としての細菌毒素やウイルス表面蛋白質の合成を行う場合は、効率良く細胞内に蓄積させることが必要である。

この目的で各種の蛋白質の植物中の生産が試みられているが、かなりの蛋白質は殆ど植物細胞で蓄積しないなど、蛋白質によってその植物細胞での安定性が異なっている[1]。同様に我々は、基礎及び応用を目的として各種の蛋白質を植物体や植物培養細胞で発現させてきているが、その中で目的の蛋白質が予想される部位に発現・局在する頻度は、余り高くないとの経験を持つ。例えば、動物由来の有用蛋白質への植物型糖鎖付加を解析する目的で、付加モチーフを持つ複数の蛋白質を緑色蛍光蛋白質との融合体として植物分泌系に発現させ、分泌生産することを試みているが、これらの過程で約 3 割の蛋白質は液胞へと輸送され分解され、また、膜輸送体の局在解析のために緑色蛍光蛋白質等との融合蛋白質を発現させた場合には、かなりの頻度で発現産物による蛍光が観察されないという結果を得ている。また、チトクローム b5 と赤色蛍光蛋白質の融合蛋白質を発現させると細胞内にこの蛋白質の凝集体が生じて蓄積する。一方、分泌蛋白質と単量体赤色蛍光蛋白質の融合体を発現させた場合や、mRFP を分泌系に導入した場合は、これらの融合蛋白質が分泌されること無く液胞へと輸送され分解される。

これらの分解や蓄積は、植物中での蛋白質の安定化と分解機構の性質を反映していると考えられるが、動物や酵母での研究とは異なり、植物細胞における蛋白質の安定化と分解の機構に関して、系統的な研究は乏しい。すなわち、どのような蛋白質がどのような機構で細胞内や、細胞内小器官やの分泌系などの輸送系において安定に蓄積するか，またどのような刺激によりどのような情報伝達経路を経て蛋白質の分解が誘導されるかについての知見は蓄積しておらず、間接的に関連する機構の研究として、バルクの分解に関与するオルガネラである液胞への分泌系からの仕分け機構、オートファジーによる分解機構、エンドサイトーシスやエキソサイトーシス等について、タバコ培養細胞やシロイヌナズナを材料に研究は進みつつあるに過ぎなかった。

２．研究の目的

本研究では、植物細胞に発現させた外来蛋白質の細胞質への凝集体としての蓄積の機構と、分泌系に導入した外来蛋白質の液胞への輸送による分解機構について、蛍光蛋白質をレポーターとして用いて生細胞の可視化技術を利用しながら解析することにより、植物細胞での蛋白質の蓄積と分解の機構について新規な知見を得ることを目的とした。

３．研究の方法

以前から見出していた、４量体赤色蛍光蛋白質とチトクローム b５の融合体が凝集大を細胞内で形成すること、この凝集体は細胞を栄養飢餓にさらすと分解される事を基本に、研究をすすめた。まず、植物細胞において、蛋白質の合成と分解を区別して解析するための実験系を、蛍光変換蛋白質を利用することにより開発した。次いで、このシステムを用いて、凝集体の分解誘導と蛋白質合成の関係、及びその制御機構について解析を進めた。また併せて、これ以外の蛍光標識した蛋白質を発現している細胞を用いて、凝集体の分解誘導条件における細胞内の他の構造体の生合成、細胞内輸送、分解についても解析を進めた。

また、分泌系に導入した蛍光蛋白質の安定化機構を探るために、液胞に輸送されて分解されない蛍光蛋白質の作製を試みた。

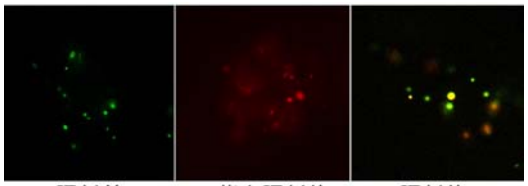
４．研究成果

液胞に輸送されて分解されない蛍光蛋白質の作製については、各種の変異導入で試みたが、目的のものは得られなかった。一方、蛍光変換タンパク質等を用いた分解系等の解析については、以下の結果を得ることが出来た。

まず、４両体の蛍光変換タンパク質とチトクローム ｂ５の融合蛋白質をタバコ培養細胞で発現させた。その結果、細胞内に緑色蛍光を発する凝集体が観察された（次ページ図左)。そこで、この細胞の懸濁培養に紫色の光を照射する装置を作製し、その装置を用いて 100ml 以上の懸濁培養された細胞中の蛍光変換タンパク質の蛍光色を一括して変換する方法を開発した。その結果、凝集体の発する蛍光を、数時間の紫光照射で全て赤に変換する条件を決定した（次ページ図中)。次いで、この蛍光変換後の蛋白質凝集体を持つ細胞を、２４時間培養した所、緑色、黄色、オレンジ色、赤色等の異なった色を示す凝集体を細胞が蓄積していた（次ページ図右)。

そこで、この蛍光変換後に細胞を窒素、リン酸又は糖といった植物細胞培養の際の主要なの栄養分を欠落させた培地に移して培養した所，赤色蛍光蛋白質の分解と共に、緑

色蛍光蛋白質の分解も認められた。このことは、細胞を栄養飢餓状態にさらしても、蛋白質の合成は継続的に起っており、合成と共に蛋白質の分解が同時に進行している事を示していた。



次いで、リン酸関連のシグナル伝達について阻害効果を示す亜リン酸を、この栄養欠乏条件に加えた所、リン酸欠乏に依存した分解が特異的に抑えられた。そこで、この亜リン酸の効果は凝集体に特異的かを検討したところ、検討したもののうち多くの蛋白質の分解は亜リン酸により抑制されるが、一部の蛋白質の分解は亜リン酸により抑制されない事を見出した。このことから、植物細胞において、リン酸欠乏に依存した蛋白質の分解系として、亜リン酸により阻害されるものと、阻害されないものの少なくとも２種の経路が存在していると結論付けた。

これと平行して、蛍光蛋白質で標識した各種の蛋白質の栄養欠乏による分解の検討を進めた。その結果、ある種の SNARE 蛋白質が局在している、ある分泌系オルガネラに認められる部分構造が、特異的にある種の栄養欠乏により分解される事を見出した。この分解は、その SNARE のみならず、そこに局在する別の膜蛋白質でも認められたので、この分解は SNARE 分子特異的なものではなく、その構造体の分解が起っていると結論した。

またこれらの解析と共に、上記の我々が確立した蛍光変換蛋白質を用いた実験手法を応用し、植物細胞や植物組織における、各種の蛋白質や細胞内構造体の生合成機構、安定化と分解の機構の解析を進めた。その結果として、プロリン水酸化酵素とゴルジ装置の動態、アラビノガラクタン蛋白質の動態、豆科植物に感染する根粒菌の動態等に関する新規な知見を得る事ができた。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　1　件）

Toyooka, K. and Matsuoka, K. (2009) Exo- and Endocytotic trafficking of SCAMP2. ***Plant Signaling and Behavior***, 4: 1196 - 1198.

〔学会発表〕（計 13 件）

①. 津野 雄平、松岡 健, 植物細胞におけるアラビノガラクタンタンパク質（AGP）の翻訳後修飾の解析,日本農芸化学会 2012 年度大会,2012.03.24.（京都）
②. 長山 江理子、陶山 明子、松岡 健, タバコ細胞における１型プロリン水酸化酵素を含む複合体の解析,日本農芸化学会 2012 年度大会,2012.03.24.（京都）
③. 鳥井 健次、川口 正代司、松岡 健, 色変換蛍光蛋白質 kikume green red を用いた共生過程における根粒菌の動態解析,日本農芸化学会 2012 年度大会,2012.03.23.（京都）
④. 松岡　健, 豊岡　公徳, 小胞輸送系での物質合成・輸送関連タンパク質と脂質膜ドメイン,日本植物生理学会第 53 回大会　シンポジウム 2 生化学と細胞生物学の融合による低分子集積生物学の構築に向けて,2012.03.17.（京都）
⑤. Moses Olabiyi Abiodun , Ken Matsuoka , Golgi apparatus in BY-2 cells are not uniform,日本植物生理学会第 53 回大会,2012.03.17.（京都）
⑥. Ken Matsuoka, Ryo Moriguchi, Yukiko Ohsawa, Akiko Suyama,Mechanism of cis-Golgi retention of type 2 prolyl 4-hydroxylase in plant cell: Possible linkage of plant-specific O-glycosylation and GPI-anchor lipid remodeling,日本生化学会　第 84 回大会　シンポジウム　4S13p Conservation and divergence of vesicular transport system over species,2011.09.24.(京都)
⑦. Matsuoka, K. cis-Golgi localization mechanism of type 2 prolyl 4-hydroxylases; targeting domain and possible partner, International Botanical Congress 2011, Symposium 046: Using molecular genetics and bioinformatics to elucidate cell wall proteins and their biosynthesis. 2011.7.(Melbourne)
⑧. 陶山明子, 松岡 健, 植物を宿主とした異種蛋白質生産における植物特異的糖鎖付加の抑制,日本農芸化学会 2011 年度大会,2011.03.（京都）
⑨. 田﨑麻衣子,　浅妻悟,　松岡 健, 蛍光波長変換タンパク質‘Kikume’を用いたオートファジー分解系の解析,第 52 回　日本植物生理学

会　,2011.03.20.（仙台）

⑩. 松岡　健, 栄養欠乏に応答した植物細胞内の分解系の解析,第52回　日本植物生理学会　シンポジウム　「ベールを脱ぎ始めた植物オートファジー」,2011.03.22（仙台）

⑪. 松岡　健, 植物の高度利用のための植物細胞分泌系の解析と改変の試み, 日本農芸化学会西日本支部　第一回若手シンポジウム,2010.10.23（仙台）

⑫. 田崎麻衣子、浅妻　悟、松岡　健, 蛍光波長変換タンパク質 kikume を用いたオートファジー分解系の解析,第51 回日本植物生理学会年会,2010.03.（熊本）

⑬. 松岡　健、豊岡公徳、浅妻　悟、森口亮, ゴルジ装置と細胞増殖：細胞壁成分合成系の局在と細胞外への大量輸送装置,第82回日本生化学会大会　シンポジウム 2Sa14a　植物の成長生理とメンブレントラフィック,2009.10.01.（神戸）

６．研究組織

(1)研究代表者

松岡　健（MATSUOKA KEN）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：40222294