

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26650088

研究課題名(和文)葉緑体イソプレノイド合成の中間体測定法開発による代謝経路の局在の解明

研究課題名(英文)Development of a new method for the quantification of isoprenoid intermediates and analysis of the localization of the isoprenoid metabolic pathways in chloroplasts

研究代表者

田中 亮一(Tanaka, Ryouichi)

北海道大学・低温科学研究所・准教授

研究者番号：20311516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではゲラニルゲラニル2リン酸(GGDP)およびフィチル2リン酸(PDP)が局在の量力体内での局在を明らかにするため、GGDP、PDPの定量法の確立を目指した。とくにgeranylgeranyl transferaseの活性を利用して、GGDP、PDPをダンシル化ペプチドと結合させ、これらの化合物を検出することを目指したが、この方法では、GGDPの検出には成功したものの、PDPを検出することはできなかった。そこで、クロロフィル合成酵素の活性を利用するため、まず、クロロフィル合成酵素の発現を大腸菌、昆虫培養細胞、無細胞発現系で試みたが、成功しなかった。

研究成果の概要(英文)：We aimed at the development of a method to quantify geranylgeranyl-diphosphate (GGDP) and phytyl-diphosphate (PDP) in this study. First, we have tested whether geranylgeranyl transferase can conjugate GGDP and PDP to a dansylated peptide, which can be easily detected by a liquid chromatography system according to the method of Tong et al. 2013. However, this method only detect GGDP-conjugated peptide. Then, we attempted to use chlorophyll synthase activity to detect GGDP- or PDP-conjugate to chlorophyllide. However, we failed to overexpress this enzyme by an E. coli system, cultured insect cells (Sf9), and the MembraneMax cell-free expression system.

研究分野：植物生理学

キーワード：葉緑体

1. 研究開始当初の背景

一般的に代謝経路の制御には、その代謝に関わる酵素の活性、基質特異性、局在が重要であると考えられている。植物の葉緑体は、「代謝の工場」ともいわれ、植物細胞の代謝において重要な役割を果たしている。葉緑体における代謝制御については、さまざまな酵素の活性調節、基質特異性などの研究が伝統的に盛んに行われている。しかしながら、細胞内の酵素の局在が代謝経路によって、どのように異なるのか、という点は、プロテオミクス関連技術の進歩によって、近年ようやく明らかになってきたところである。

葉緑体の代謝経路の中でも、イソプレノイドの代謝経路はとくに重要な役割を果たしているといえる。ゲラニルゲラニル2リン酸 (Geranylgeranyl diphosphate: GGDP) やフィチル2リン酸 (Phytyl diphosphate: PDP) など炭素数20のイソプレノイド化合物は、さまざまな化合物の前駆体として利用されている。たとえば、GGDP はカロチノイド、植物ホルモン (ストリゴラクトンやアブシジン酸)、PDP はクロロフィル、トコフェロール、フィロキノンなどの前駆体として利用されている。

近年のプロテオーム解析によって、カロチノイド代謝経路は主に葉緑体の包膜に、クロロフィル代謝経路 (とくに代謝経路の後半部分) は主に葉緑体のチラコイド膜に局在することが示唆された (Joyard et al., 2009)。この結果は初めて包括的に葉緑体内の代謝経路の局在を明らかにした。

申請者を含む研究チームはこれまでに、Light-harvesting-like protein 3 (LIL3) というタンパク質の研究をすすめて、このタンパク質が GGDP から PDP を合成する活性をもつ、Geranylgeranyl 還元酵素 (GGR) を葉緑体のチラコイド膜につなぎとめる機能をもつこ

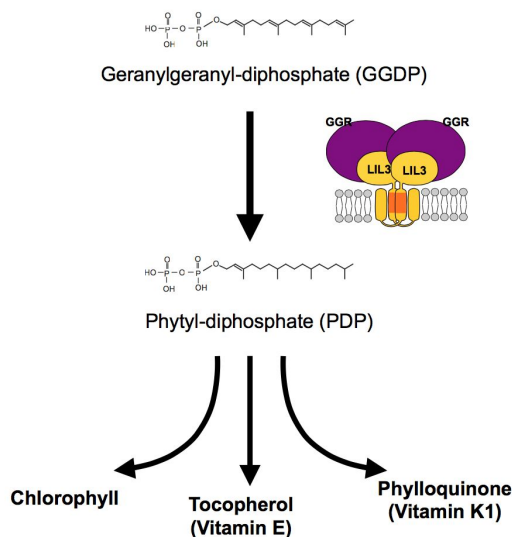


図1 GGR-LIL3 複合体による GGDP から PDP の合成および PDP 代謝の模式図

とを明らかにした (Tanaka et al., 2010, Takahashi et al., 2014、図1参照)。これらの結果と先行研究をあわせて、申請者らは、LIL3がGGRをチラコイド膜につなぎとめることで、チラコイド膜がPDPを高濃度の含み、残ったGGDPが包膜に存在するという仮説をたてた。この仮説をさらにすすめると、このようなイソプレノイド基質の局在が葉緑体内のカロチノイド、植物ホルモン、クロロフィル、トコフェロール、フィロキノンなどの代謝の鍵になっているのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

上記の仮説を検証するためには、チラコイド膜と包膜におけるGGDPとPDPの局在を明らかにすることが重要である。しかしながら、植物において、細胞内のGGDP、PDPを定量する方法は、申請者の知る限り確立されていない。本研究の目的は、GGDP、PDPのチラコイド膜、包膜における濃度を測定する方法を確立することである。

3. 研究の方法

一般的に、リン酸基のないイソプレノイドは、ガスクロマトグラフィー (GC)-質量分析 (MS) によって測定される。植物においても、アルカリ処理によって、GGDP、PDPのリン酸基を外し、イソプレノイド部分を測定することは可能であるが、この方法を用いると、GGやPhytolが結合している他の基質 (クロロフィルや脂質) などからのGG、Phytolの混入は避けられない。そこで、本研究ではアルカリ処理を行わず、直接GGDP、PDPを測定する方法の開発を目指した。

- (1) 最初の方法は質量分析 (LC-MS) である。
- (2) 次の方法は geranylgeranyl transferase (GGT) を用いて GGDP や PDP を蛍光物質に結合させ、この蛍光物質を液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離し、蛍光検出器で検出する方法である。
- (3) 最後の方法は、chlorophyll synthase を用いて、GGDP や PDP を chlorophyllide に結合させ、chlorophyll の形で HPLC で分離し、吸光光度計で検出する方法である。

4. 研究成果

(1) LC-MS による GGDP、PDP の検出
C18 (InterSustain, 1.0mm ID x 100 mm, GLscience) を用いて、LTQ Orbitrap XL (ThermoScientific) により、アセトニトリル、ギ酸を使用した溶媒によって、GGDP の分離と検出を試みた (図2)。しかし、検出感度、および再現性、分離度が悪く、この方法、および類似の方法による GGDP、PDP の分離検出は断念した。

(2) GT を用いて、ダンシル化したペプチドと GGDP、PDP を反応させ、HPLC により、検出する。この方法は、Tong ら (2008, 2013) が哺乳

類細胞の GGDP の検出について報告している。本研究では同じ方法を GGDP, PDP の両方に関して、植物の葉の抽出物を材料にして試してみた。

その結果、ダンシル化したペプチドと GGDP の結合体を HPLC にて、検出することができた (図 2)。

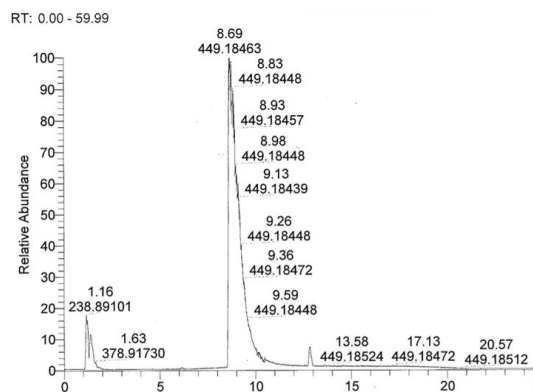


図 2 LC-MS による GGDP の検出例
横軸は検出時間 (分)。縦軸は検出強度 (目盛りは任意)。

しかしながら、条件を変えて検討したにもかかわらず、PDP を検出することはできなかった。また、植物の抽出液のかわりに、標準品の PDP と GGT を反応させたが、半農産物は検出されなかった。

(3) そこで、クロロフィル合成酵素の活性を利用して、Chlorophyllide と GGDP, あるいは PDP を結合させ、産物を検出する方法をめざした。

まず、シロイヌナズナと好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* のクロロフィル合成酵素を大腸菌で発現させることを試みた。*T. elongatus* を用いたのは、この生物のもつタンパク質の多くが安定な構造を持つことが知られているからである。しかし、いずれの場合も組み替えタンパク質の発現を検出することはできなかった。これは、クロロフィル合成酵素が 9 回膜貫通領域をもつ膜貫通型タンパク質であり、大腸菌での発現に適さないためではないかと考えられた。

そこで、昆虫由来培養細胞 Sf9 を用いて、発現を試みた。しかし、イムノブロッティングで確認した限りではどちらの生物のクロロフィル合成酵素も発現させることはできなかった。

次に、無細胞タンパク質発現系である、MembraneMax Expression Kit (Life Technologies) を用いて、クロロフィル合成酵素の発現を試みたが、やはりイムノブロッティングで確認した限りではクロロフィル合成酵素を発現することはできなかった。また、PDP と GGDP, Chlorophyllide を基質として活性の検出を試みたが、活性を検出するこ

とはできなかった。

最終的に PDP, GGDP の定量法を確立することはできなかったが、今後、シロイヌナズナや *Synechocystis* 以外の生物のクロロフィル合成酵素を用いたり、また、他の発現系を用いることで、この方法を確立することは原理的に可能と考えている。一方で、LC-MS を用いた方法に関しても、さらなる条件検討の可能性があると考えている。

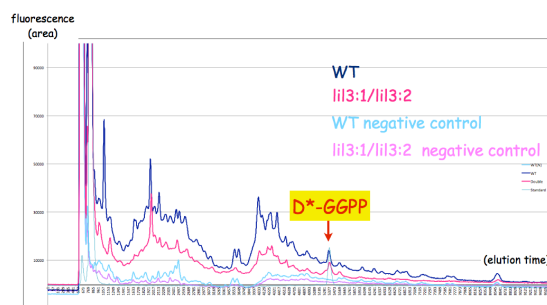


図 3 植物の葉 野生型と PDP を欠失する株) のメタノール抽出液を一度乾固し、抽出物を GGT およびダンシル化ペプチドと反応させ、HPLC で分離し、蛍光分光器で検出したところ、GGDP (図中では D*-GGPP と表記) の検出に成功した。

<引用文献>

- Joyard, J., Ferro, M., Masselon, C., Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Garin, J., & Rolland, N. (2009). Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Molecular Plant*, 2(6), 1154-1180.
- Tanaka, R., Rothbart, M., Oka, S., Takabayashi, A., Takahashi, K., Shibata, M., et al. (2010). LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(38), 16721-16725.
- Takahashi, K., Takabayashi, A., Tanaka, A., & Tanaka, R. (2014). Functional Analysis of Light-harvesting-like Protein 3 (LIL3) and Its Light-harvesting Chlorophyll-binding Motif in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(2), 987-999.
- Tong, H., Wiemer, A. J., Neighbors, J. D., & Hohl, R. J. (2008). Quantitative determination of farnesyl and geranylgeranyl diphosphate levels in mammalian tissue. *Analytical Biochemistry*, 378(2), 138-143.

Tong, H., Kuder, C. H., Wasko, B. M., & Hohl, R. J. (2013). Quantitative determination of isopentenyl diphosphate in cultured mammalian cells. *Anal Biochem*, 433(1), 36-42.

研究者番号：

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/plantadapt/>

<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/soshiki/photosynthesis.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中亮一 (TANAKA, Ryouichi)

北海道大学・低温科学研究所・准教授

研究者番号：20311516

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()