

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03692

研究課題名(和文) 脂質の多様な機能を司るオルガネラ間相互作用と脂質輸送メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of lipid transfer mechanism and organelle interactions required for multifunction of lipids

研究代表者

和田 元 (Hajime, Wada)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：60167202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物細胞での脂質輸送に関わっているオルガネラ間のコンタクトサイトや脂質輸送タンパク質(LTP)の実体を明らかにするために、バイオインフォマティクスや合成脂質分子プローブを用いた生化学・分子生物学的な解析を行った。その結果、ホウレンソウから単離した葉緑体の包膜に、ホスファチジルコリン(PC)の輸送に関わっている可能性のある複数のPC結合タンパク質を検出することに成功した。また、ゼニゴケのゲノムに見出したSTARTドメインを持つタンパク質のうちの1つが、小胞体と葉緑体のコンタクトサイトに局在し、小胞体から葉緑体へのPC輸送を担っている可能性があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物細胞において脂質輸送に関わっているオルガネラ間のコンタクトサイトやLTPの実体は殆どわかっていない。本研究によって得られた成果は、脂質輸送における「オルガネラ間の相互作用と輸送メカニズム」を解き明かす端緒となるであろう。また、得られた知見に基づいて、将来的には脂質輸送システムを人為的に制御することが可能となり、細胞内に分配される各脂質分子の部位特異的な機能の解明に大きく貢献するものと考えられる。さらに、輸送システムを人為的に制御することにより、輸送の生理的意義の解明および多様なストレスに適応する植物の作出にも貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)： In this study, we have performed bioinformatic analysis and biochemical-molecular biological analysis with chemically synthesized lipid probes to identify proteins and organelle contact sites involved in lipid transfer in plant cells. We succeeded to detect many proteins, which bind to phosphatidylcholine (PC), in envelope membranes of chloroplasts isolated from spinach leaves. Some of the proteins might be involved in PC transfer from ER to chloroplasts. We also identified 7 and 3 proteins containing START domains in the Arabidopsis and liverwort genomes, respectively, as candidates for PC transfer proteins. One of the liverwort proteins is localized in the contact sites between chloroplasts and ER, and its mutant strain showed different lipid composition compared to that of wild-type strain, suggesting that it is involved in PC transfer from ER to chloroplasts.

研究分野：植物生理学

キーワード：脂質 脂質輸送タンパク質 ホスファチジルコリン コンタクトサイト シロイヌナズナ ゼニゴケ  
葉緑体 小胞体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜の主成分である脂質には分子構造の異なる多様な分子が存在し、それらの脂質分子は生体膜の流動性や小胞輸送、ラッフリング、オートファジーなどに見られる膜のダイナミックな動きを制御するだけでなく、受容体、チャネル、呼吸や光合成に関わる超分子複合体などの機能も制御しており、極めて重要な働きを担っている。植物細胞では、脂質のうち、ホスファチジルコリン (PC) などのリン脂質の殆どは小胞体で合成され、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) などの糖脂質とリン脂質の一種であるホスファチジルグリセロール (PG) は色素体で合成される。また、ミトコンドリアでも PG とカルジオリピン (CL) が合成される。各オルガネラで合成された脂質分子は、細胞内の所定の場所に運ばれて、多様な機能を発揮する。したがって、合成の場と機能を発揮する場とは必ずしも一致せず、また、細胞内での分配のされ方は脂質ごとに異なり、各脂質分子が多様な機能を発揮するためにはオルガネラ間の相互作用 (接触部位) や脂質輸送タンパク質 (Lipid transfer protein, LTP) を介した脂質輸送システムが必要である。しかし、植物ではオルガネラ間の接触部位や LTP の実体は殆どわかっておらず、ホスファチジン酸 (PA) の輸送体であると考えられている TGD 複合体が同定されているにすぎない (Xu et al., 2005; Wang et al., 2012; Fan et al., 2015; LaBrant et al., 2018)。

### 2. 研究の目的

植物細胞における脂質の合成は、小胞体、色素体、ミトコンドリアの3つのオルガネラでおこり、それぞれのオルガネラで合成された脂質は細胞内の特定の部位に輸送されて多様な機能を発揮することができる。しかし、脂質輸送に関わっているオルガネラ間のコンタクトサイト (接触部位) や LTP の実体は殆どわかっていない。本研究では、バイオインフォマティクスや合成脂質プローブ分子を用いた斬新でユニークな生化学・分子生物学的な解析によって脂質輸送体の同定および機能解析を行い、脂質の輸送メカニズムを解明することを最終的な目的として研究を進めた。

### 3. 研究の方法

#### (1) バイオインフォマティクス

動物や酵母において、小胞体とミトコンドリアのコンタクトサイトに存在する複合体が同定され、それを介してホスファチジルセリン (PS) やホスファチジルエタノールアミン (PE) の輸送が起こることが明らかになっている。また、PC、PA、PS、セラミドなどの輸送に関わっている LTP の遺伝子や候補遺伝子もいくつか同定され、それらの一部は植物でも保存されていることが報告されている。そこで、葉緑体と小胞体のコンタクトサイトにおいて PC の輸送に関わっているタンパク質を同定するために、シロイヌナズナとゼニゴケのゲノムからヒトの PC 輸送タンパク質と相同なタンパク質をコードした遺伝子を検索した。

#### (2) 合成脂質プローブ分子を用いた方法

タンパク質と光架橋させるためのタグとその後のクリック反応をおこさせるためのタグをともに導入した PC プローブ分子を化学的に合成し、それを利用して PC と特異的に相互作用するタンパク質を探索した。タグ付き PC プローブ分子を単離した葉緑体の包膜に取り込ませた後、光を照射して脂質と相互作用しているタンパク質を光架橋させ、その後、クリック部位をビオチン化して脂質と架橋したタンパク質のアフィニティー精製を行なった。

#### (3) タンパク質の機能解析

バイオインフォマティクスによってゼニゴケのゲノムから PC 輸送タンパク質の候補として見出したタンパク質について、GFP との融合タンパク質をゼニゴケで発現させて細胞内局在性を解析した。また、それらのタンパク質を大腸菌あるいは *in vitro* 翻訳系で発現させ、発現タンパク質と脂質との結合について調べた。さらに、CRISPER/Cas9 システムを用いたゲノム編集によって、遺伝子が破壊されたゼニゴケを作出し、変異体の脂質組成や表現型を調べ、タンパク質の機能について解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) バイオインフォマティクス

LTP の中で最も解析が進んでいるファミリーのひとつである START ドメインタンパク質は、哺乳類においてリン脂質やセラミド、コレステロールなどをオルガネラ間で輸送することが知

られている (Balla et al., 2019)。その中にはPC輸送を担っていることが知られているタンパク質も含まれており、植物においてもホモログが存在し、それらのタンパク質がPCの輸送に関与している可能性がある。モデル植物であるシロイヌナズナのゲノムを検索したところ、35個のSTARTドメインタンパク質が存在し、そのうち7個がPC輸送に関わっていると予想され、植物全体に保存されていることがわかった。シロイヌナズナのそれらのタンパク質について機能解析を進めることも考えられたが、タンパク質間で機能が重複している可能性があり、遺伝子を破壊した変異体を作成して機能を解析することは難しいと考え、ゲノムの冗長性が低い基部陸上植物ゼニゴケに着目し、機能解析を行うことにした。ゼニゴケに存在するSTARTドメインタンパク質のうち、3つの遺伝子にコードされたタンパク質は、ドメイン構成から脂質輸送に関与していることが推定された。そこで、これらの3つのタンパク質に注目して解析を行なった。まず、タンパク質の細胞内局在性を調べるために、蛍光タンパク質と融合させたタンパク質をゼニゴケで発現させた。3つのうち、2つのタンパク質はサイトゾルあるいは小胞体全体への局在を示したが、残りの1つであるMpSTAR2は葉緑体近傍にドット状の構造体として観察された(図1)。次に、CRISPR/Cas9システムを用いてMpSTAR2遺伝子の変異体を作成した。作成したMpstar2欠損変異体は、通常の生育条件では顕著な表現型を示さなかったものの、リン欠乏条件において生育遅延を示した(図2)。

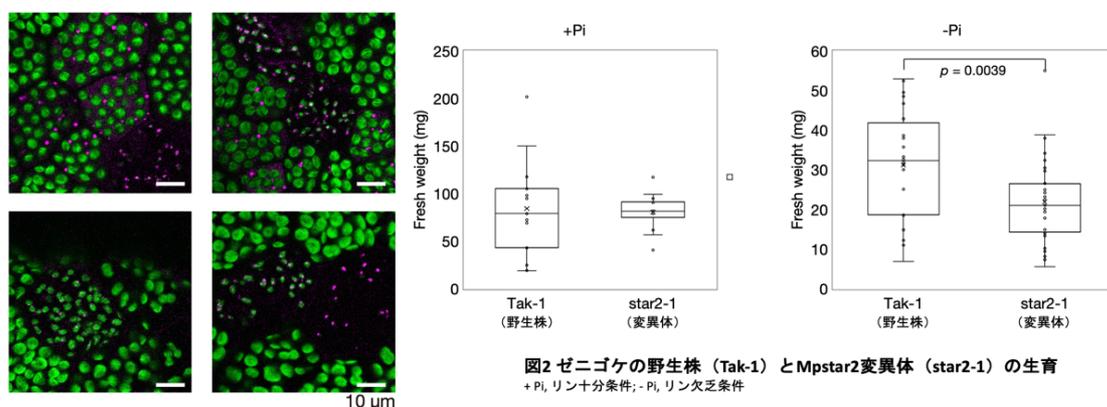


図1 MpSTAR2の細胞内局在性  
緑、クロロフィル; マゼンタ, MpSTAR2-GFP

脂質分析を行ったところ、脂質組成には大きな変化は見られなかったが、Mpstar2欠損変異体はリン欠乏時に葉緑体膜脂質およびPCの脂肪酸組成に異常を示すことが明らかとなった。藻類や植物では、リン欠乏条件においてPCをはじめとするリン脂質が減少し、その代わりにジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)をはじめとする糖脂質が増加するという現象が知られている。これは、欠乏したリンをリン脂質を分解することで補い、また、減少したリン脂質を非リン脂質である糖脂質で置き換えるというリン欠乏に対する応答現象である。ゼニゴケにおいても、リン欠乏条件においてPCをはじめとするリン脂質が減少し、糖脂質が増加することでリン脂質を糖脂質で置換する応答が見られたが、Mpstar2欠損変異体では、リン欠乏時に葉緑体膜脂質およびPCの脂肪酸組成に異常を示した。観察された脂肪酸組成の変化は、小胞体から葉緑体へのガラクト脂質前駆体の輸送が停止するシロイヌナズナ *tgd* 変異体において観察される変化と類似していた。MpSTAR2は葉緑体近傍にドット状の構造体として存在することが観察され、リン欠乏時に葉緑体膜脂質およびPCの脂肪酸組成に異常を示すことから、MpSTAR2はリン欠乏条件下での膜脂質転換プロセス、特に小胞体から葉緑体への脂質輸送に関与している可能性が考えられる。今後は、大腸菌で発現させたタンパク質や *in vitro* 翻訳系を使って合成したタンパク質を用いて、MpSTAR2がPCと特異的に結合し、PC輸送活性を有することを確認する必要がある。また、葉緑体のコンタクトサイトにおいてこのタンパク質と一緒に働いているタンパク質の同定も進め、PC輸送のメカニズムを解析していく必要がある。

## (2) 合成脂質プローブ分子を用いた方法

PC 分子プローブを化学的に合成して PC 輸送タンパク質の精製を行なった (図 3)。

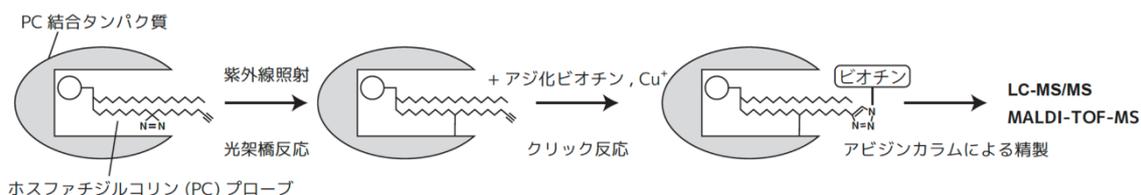


図3 PC分子プローブを用いたPC輸送タンパク質の同定

まず、膜脂質を非特異的に輸送する活性を有する BSA をモデルタンパク質として、合成した PC 分子プローブとの光架橋反応およびクリック反応の条件検討を行った。その結果、PC 分子プローブを含むリポソームと BSA をインキュベートし、光架橋反応、その後、クリック反応を起こさせることで BSA のビオチン標識が可能となることがわかった。さらに、ストレプトアビジンビーズを用いることで PC 分子プローブによりビオチン標識された BSA が効率的に生成されることを確認した。PC の輸送を担っているのは葉緑体表面に存在するタンパク質であると推定されることから、ホウレンソウより葉緑体包膜画分を単離し、PC 分子プローブを含むリポソームと混合して反応させたところ、ビオチン標識された複数のタンパク質が検出された。単離された無傷葉緑体を用いて反応を行った場合にも同様の結果が得られており、確かに葉緑体表面に存在するタンパク質がビオチン標識を受けていることが確認された。ストレプトアビジンビーズを用いて標識されたタンパク質の精製を行ったところ、精製はされるものの、純度および収量が低く、これまで質量分析によるタンパク質の同定には至っていない。現在、さらなる条件検討とスケールアップにより、目的タンパク質の同定を目指している。

#### <引用文献>

- Xu, C., Fan, J., Froehlich, J. E., Awai, K. and Benning, C. (2005) *Plant Cell* 17:3094–3110.
- Wang, Z., Xu, C. and Benning, C. (2012) *Plant J.* 70:614–623.
- Fan, J., Zhai, Z., Yan, C. and Xu, C. (2015) *Plant Cell* 27:2941-2955.
- LaBrant, E., Barnes, A. C. and Roston, R. L. (2018) *Photosynth. Res.* 138:345–360.
- Balla, T., Kim, Y. J., Alvarez-Prats, A. and Pemberton, J. (2019) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 35:85-109.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yonghua Li-Beisson and Hajime Wada	4. 巻 60
2. 論文標題 Plant and algal lipids set sail for new horizons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1161-1163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1093/pcp/pcz092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 平嶋孝志、神保晴彦、小林康一、和田元
2. 発表標題 ゼニゴケの葉緑体膜脂質代謝に関する脂質輸送タンパク質の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平嶋孝志、神保晴彦、小林康一、和田元
2. 発表標題 START ドメインをもつ脂質輸送タンパク質のゼニゴケにおける機能解析
3. 学会等名 日本植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichi Kobayashi
2. 発表標題 Roles of MGDG and DGDG in etioplasts of dark-grown Arabidopsis
3. 学会等名 International Symposium on Plant Lipids (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Abe
2. 発表標題 Organic synthesis of phosphatidylglycerol analogues and their effects on the growth of pgA mutant of PCC 6803
3. 学会等名 International Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hajime Wada
2. 発表標題 Crucial importance of chain length of fatty acids bound to phosphatidylglycerol for growth and photosynthesis
3. 学会等名 The 7th Asian Symposium on Plant Lipids (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koichi Kobayashi
2. 発表標題 Distinct and overlapped roles of MGDG and DGDG in etioplasts of dark-grown Arabidopsis
3. 学会等名 The 7th Asian Symposium on Plant Lipids (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Sho Fujii, Koichi Kobayashi, Hajime Wada	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 341-365
3. 書名 Plastids	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 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
研究分担者	三芳 秀人  (Miyoshi Hideo)  (20190829)	京都大学・農学研究科・教授    (14301)	
研究分担者	安部 真人  (Abe Masato)  (30543425)	愛媛大学・農学研究科・准教授    (16301)	
研究分担者	小林 康一  (Kobayashi Koichi)  (40587945)	大阪府立大学・高等教育推進機構・准教授    (24403)	