

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13087

研究課題名(和文)脂溶性物質の細胞外分泌に関わる「脂質のバルク輸送」の解明

研究課題名(英文)Studies on bulk transport involved in the secretion of lipophilic metabolites from plants

研究代表者

矢崎 一史(Yazaki, Kazufumi)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号：00191099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂質が膜系に包まれた形で細胞外に分泌される「脂質のバルク輸送」という分泌機構を想定し、その仮説の検証に挑戦した。ムラサキ細胞のシコニン生産系を脂溶性物質の細胞外分泌のモデルとして用い、シコニンが包まれた脂質一重膜のオイル・ドロップレットの分泌機構の解明に取り組み、生化学、細胞生物学両面から解析を進めた。

阻害剤実験から、シコニンの分泌は、アクチン繊維依存的事であること、小胞体からの出芽に関する ARF/GEF が関与することを示した。また、疎水性と結晶性が高いシコニンが安定に細胞外に分泌されるために、トリアシルグリセロールがマトリックス脂質として細胞外に分泌されることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：A challenge was made to characterize the 'bulk transport' system involved in the secretion of lipophilic metabolites. Plants secrete many different lipophilic compounds, like wax, cutin and suberins, while secondary metabolic lipids of smaller molecular weight are also often secreted out of plant cells. However, the molecular basis of the secretion, how lipophilic metabolites go across the plasma membrane, is still largely unknown.

In this study, cultured cells and hairy roots of *Lithospermum erythrorhizon* have been used as a model of lipid secretion system, in which lipophilic naphthoquinone pigments, shikonin derivatives, are secreted out of the cells. It has been shown by inhibitor experiments that the secretion process of shikonin, actin filaments and ARF/GEF are involved in a similar way as membrane trafficking of secretory vesicles. Secreted lipid molecules out of shikonin derivatives have been also analyzed by LC-MS and GC-MS.

研究分野：植物生化学、分子生物学

キーワード：二次代謝 脂質分泌 植物細胞

1. 研究開始当初の背景

高等植物の生産する天然の機能性低分子は、医薬品、色素、香料等多方面で利用されるが、それらは特定の組織やオルガネラに貯まる。特にステロール類やモノテルペンなど、脂溶性物質の多くはアポプラストに分泌されて高含量で蓄積するものが多い。しかし、脂質は一般にオイルボディーとして細胞内に蓄積されるものとされ、細胞外に分泌される「脂質の分泌機構」に関しては全く科学のメスが入られていない。しかも、水に不溶のこれら脂質の細胞分泌を、薬剤排出ポンプのような一分子ずつ排出する輸送体が担っているとは考えづらい。

応募者は、分泌性脂質の好適モデルであるシコニン生産系を研究してきた過程で、脂溶性物質は輸送体で1分子ずつ運ばれるのではなく、従前全く知られていない脂質一重膜を介した膜ダイナミクスによるマシナリーで運ばれているという知見を得るに至った。本研究ではこの輸送形態を「脂質のバルク輸送」と定義して、その実態解明に挑むこととした。

2. 研究の目的

本研究では、脂質分泌のモデル系としてムラサキの組織培養系を用い、A)シコニンと共に細胞外に分泌される脂質分子の同定；B)脂質分泌時における膜のダイナミクスの解明；C)バルク輸送に必要な小胞の形成と細胞膜との融合に必要なタンパク群の同定；D)さらにシコニンの自家蛍光を利用して輸送膜系を蛍光ラベルしたライブイメージング系の構築をし、このユニークな脂質一重膜小胞を介した「脂質のバルク輸送系」の実態解明に向けた最初のブレイクスルーを提供することに挑む。

脂質の輸送小胞は、形成時はオイルボディーと同じ脂質一重膜であり、定義上はオイル・ドロップレットである。それが細胞内を一方方向に移動して細胞膜と融合し、細胞外に脂質を分泌するプロセスは極めてユニークである。脂質一重膜がそのまま細胞膜と融合すると、脂質二重膜としての構造が壊れるはずだが、細胞当たり10%という大量の脂質を放出しながら細胞は生育を続けられることから、膜のダメージを避ける未解明の機構があるに違いない。こうした分泌は腺鱗や油腺など、特殊な細胞群のみが担う植物ならではの特殊機能であり、ここが明らかにされると、植物細胞のもつ新たな能力に脚光が当たることとなり、新しい研究分野として発展することが期待される。

3. 研究の方法

シコニンは細胞内ではオイルボディーに似た膜ベシクルに局在し、細胞外に分泌されてから多数の赤色顆粒となる。この脂質一重膜ベシクルの分泌がARF/GEFの阻害剤brefeldin Aやアクチン重合阻害剤

cytochalasin Dで特異的に抑制されることを利用し、抑制解除時に始まるシコニン小胞の分泌を蛍光で追跡する実験系を立ち上げ、その動的解析を行うことを試みた。分泌小胞の可視化には内膜系蛋白質LeD12と生合成系の膜結合性酵素であるLePGTのGFP融合蛋白を用いた。また、RNA-Seqによりカタログ化した「脂質のバルク輸送」に關与する候補遺伝子のうち、Sec、Sypなど優先順位の高いものから順に、独自に開発した透過ペプチド・リポソームによるムラサキ毛状根一過的形質転換系を用い、その遺伝子の機能を評価することを試みた。平行して、電子顕微鏡による膜系の観察を行なった。具体的には以下の通りである。

- ・シコニンの分泌は、他の一般的な脂質分泌の機構を利用していると考えられ、シコニンと共に分泌される一般的な脂質分子の同定を行った。細胞の画分を、培地、細胞表面(CHCl₃-MeOHでウォッシュ)細胞内に分け、シコニン誘導体を除いた非極性画分と膜脂質が集まる極性脂質画分に分けた。その脂質に関して、LC-MSならびにGC-MSを用いて脂質分子の同定を行った。
- ・脂質のバルク輸送に伴う膜の微細構造変化は、連携研究者で電子顕微鏡の専門家である豊岡博士の協力のもと、化学固定並びに高圧凍結固定によりムラサキの細胞と毛状根で観察を行った。
- ・シコニン分泌の暗黒下誘導性を利用して、RNA-Seqによるトランスクリプトーム解析を行い、脂質のバルク輸送に必要なと見なされる遺伝子リストを作成した。ゲイトウエイベクター-pGW812を用いて遺伝子発現抑制コンストラクト(RNAi)を作成した。これを、*Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834株によりムラサキ毛状根に導入した。
- ・連携研究者で、植物細胞の微細構造の顕微鏡解析やライブイメージングに詳しい京都大学化学研究所の青山博士の協力のもと、シコニンの自家蛍光を利用し、共焦点顕微鏡でシコニン含有顆粒や小胞のイメージングを行った。

4. 研究成果

本研究では、脂質は膜系に包まれた形で、バルクの状態で細胞外に分泌される、すなわち「脂質のバルク輸送」という輸送機構があるのではないかと想定し、その仮説の検証に挑戦した。研究材料として、脂溶性物質の細胞外集積のモデルとして好適な、ムラサキ細胞のシコニン生産系を用い、シコニンが包まれた脂質一重膜のオイル・ドロップレットがどのようにして細胞外に内容物を放出できるか、その機構を明らかにすることに挑んだ。さらに実験材料としても、培養細胞だけでなく、毛状根も使うことができるため、組織分化と分泌機能分化の観点からも解析を進め

た。

初年度は、阻害剤に感受性の高いムラサキ毛状根を材料に、作用機構の異なる様々な小胞輸送阻害剤を用い、シコニンの分泌に与える影響を調べた。まず、毛状根において、シコニンが細胞外に赤色の顆粒として分泌されることを光学顕微鏡で確認した。その上で、組織内のシコニン量と培地から回収されるシコニン量とを比較し、培養細胞で知られるようにシコニンは培地からより多く回収されることを確認した。この材料を用いて、アクチン重合阻害剤の cytochalasin D (cytD) や小胞形成のシグナル伝達に關与するタンパク質 ARF/GEF を阻害する brefeldin A (BFA) で処理すると、根端で著しい赤色素の蓄積が認められた。この色素が実際にシコニン誘導体であるかを調べるため、シコニンがアルカリ処理で青くなることを利用し、2.5% KOH をスプレーした。その結果、根毛や毛状根基部で元々生産していたシコニンと同様、根端で新たに生成した赤色素も青色に変色した。さらに万全を期すため、cytD や BFA で処理した毛状根の根端を各処理区から 50 本ずつ集め、アセトンで抽出した後 TLC 分析により、実際にシコニン誘導体であることを示した。

そこで、新たにシコニンの生合成が誘導された根端を使って、横断ならびに縦断切片を作成し、顕微鏡で観察したところ、新たに根端で生合成されたシコニンは、細胞内に蓄積しており、細胞外の分泌が強く阻害されていることが認められた。さらに、シコニンが自家蛍光を持つことを利用して、共焦点レーザー顕微鏡にて根端細胞内の蓄積パターンを調べた。その結果、cytD では細胞内全体で強いシコニンの蛍光が認められたのに対し、BFA 処理においては、多数の細胞において細胞内に BFA body と思われる大きなオルガネラ状の構造体にシコニンの蛍光が集積している状態が観察された。なお、これら阻害剤による根端でのシコニン蓄積は、毛状根を光照射かに置いた場合には認められないことも確認した。以上を総合して、シコニンは、アクチン繊維依存的に、少なくとも一部はエキソサイトーシスと共通の機構を利用して分泌されることが示唆された。

2年目は、どのようなマトリックス脂質がシコニンと共にムラサキの細胞から分泌されているのかについて解析した。その結果、ムラサキの細胞は貯蔵脂質として細胞内にオイルボディーの形態で蓄積するトリグリセライドを細胞外に相当量分泌することを見出した。さらに、トリグリセライドの構造の差により細胞内に貯蔵されるものと、細胞外に分泌されるものがあることを見いだした。また人工のリポソーム形成実験により、シコニンとトリグリセライドの共存を実際に示すことができた。

さらに、細胞外に分泌されるシコニンの顆粒がどのような形態を取っているのかを詳

細に明らかにするため、透過型電子顕微鏡解析を行った。培養細胞外のシコニン顆粒の透過型電子顕微鏡写真に関しては、1984年 (Tsukada and Tabata) の先行研究があるが、この古い論文では当時のスタンダードな技術であった化学固定による電子顕微鏡画像が報告されていた。そこで本研究では、まずその化学固定法による顕微鏡画像の再現性を取った上で、現在の技術である高圧凍結法で細胞を固定し、より自然に近い状態の細胞で、シコニンとマトリックス脂質を含む顆粒が細胞の表面にどのような形態で存在しているのかを比較観察した。その結果、グルタルアルデヒドを使った化学固定法によって、先行研究で観察されたものと同じサイズ・形態の顆粒が、電子密度の高い物質を含んだ状態で細胞外に多数付着している画像が得られた。また繊維状のデブリも多数細胞外に付着している様子が観察され、Tsukada らの報告の再現性が確認できた。そこで同じフラスコ由来の細胞を用い、液体窒素を使った高圧凍結法で固定して超薄切片を作成し、透過画像を得てみると、化学固定法とは大きく異なり、細胞外には、内部が中空で球状の膜構造が数多く観察された。また細胞間隙には房状に集合した形態をとった空洞の構造物が数多く観察された。これは、高圧凍結法では、急速凍結した細胞を、オスミウム酸を含んだアセトンに落とすことで細胞を固定するという手法をとるため、アセトンに極めて易溶のシコニンが抜けた状態になった膜構造を観察しているものと考えられた。もう一つ大きな違いとしては、化学固定では数多く観察された繊維状のデブリに相当する構造物が、高圧凍結固定では認められなかったことである。こうした繊維状のデブリは、脂質を分泌する細胞ではしばしば観察されると言われてきたが、化学固定によるアーティファクトである可能性も否定できない。この点に関しては、さらに検討が必要であると考えられる。

細胞表面の観察にとっては走査型電子顕微鏡も威力を発揮する。そこで Field Emission (FE)-SEM の観察を行った。この観察手法では、化学固定と同様に脱水操作を伴うため、化学固定で観察した透過型電顕画像に相当する表面構造を観察することとなるが、情報量としては多い。実験に使用した細胞は、シコニンを生産していない LS 培地中の白色細胞を対照とし、シコニン生産中の赤色細胞を観察した。その結果、数 10 nm 程度の小さな顆粒状構造が、細胞の表面に無数に付着していることが認められ、それらが糸状の構造物に絡まっている状態が観察された。この顆粒構造のサイズは化学固定で認められた細胞外の高電子密度の顆粒と同一であり、その出現頻度も TEM および FE-SEM とで整合性が取れていた。こうした微細な顆粒は白色の対照細胞では観察されなかった。従って、少なくともエタノール脱水という操作を

経ることで、こうした小さな顆粒構造が無数に細胞外に認められること、すなわち膜を持った顆粒としてシコニンと脂質が細胞外に分泌されて細胞表面に付着しているものと考えられる。これに対し、光学顕微鏡で認められる赤色顆粒は数 100 nm~1 μm 前後で、電子顕微鏡で見られた顆粒よりははるかに大きい。しかしその密度は一細胞あたり数 100 個と、明らかに微細顆粒より低いことから、微細顆粒が細胞外で融合して大きな赤色顆粒となって可視化される過程の存在が新たに示唆された結果となった。

これらの成果を取りまとめ、現在論文を執筆中である。

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 5 件)

Tatsumi, K., Yano, M., Sugiyama, A., Sato, M., Toyooka, K., Aoyama, T., Sato, F., Yazaki, K., Characterization of shikonin derivative secretion in *Lithospermum erythrorhizon* hairy roots as a model of lipid-soluble metabolite secretion from plants, *Frontiers Plant Sci.*, 7, Article 1066 (2016). doi: 10.3389/fpls.2016.01066.

Yazaki, K., *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures: Present and future aspects, *Plant Biotech.*, 34: 131-142 (2017). doi: 10.5511/plantbiotechnology.17.0823a.

Iijima, M., Munakata, R., Takahashi, H., Kenmoku, H., Nakagawa, R., Kodama, T., Asakawa, Y., Abe, I., Yazaki, K., Kurosaki, F., Taura, F., Identification and characterization of daurichromenic acid synthase active in anti-HIV biosynthesis, *Plant Physiol.*, 174 (4): 2213-2230 (2017). doi: 10.1104/pp.17.00586.

Yazaki, K., Arimura, G., Ohnishi, T., "Hidden" terpenoids in plants: Their biosynthesis, localisation and ecological roles, *Plant Cell Physiol.*, 58(10): 1615-1621 (2017). doi: 10.1093/pcp/pcx123. Bowman, J.L., Kohchi, T., Yamato, K.T., (omitted), Yazaki, K., Yokoyama, R., Yoshitake, Y., Yotsui, I., Zachgo, S., Schmutz, J., Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome, *Cell*, 171(2): 287-304.e15 (2017). doi: 10.1016/j.cell.2017.09.030.

[学会発表](計 8 件)

巽 奏、岡咲洋三、斉藤和季、矢崎一史、ムラサキ培養細胞のシコニン生産時における脂質の解析、第 34 回植物細胞分子生物学会、9 月 2016 年
巽 奏、岡咲洋三、斉藤和季、青山卓史、

杉山暁史、矢崎一史、薬用植物ムラサキを用いたシコニン分泌機構の解析、第 11 回トランスポーター研究会、7 月 2016 年
巽 奏、岡咲洋三、斉藤和季、矢崎一史、ムラサキ培養細胞のシコニン生産系を用いた分泌脂質の解析、第 29 回植物脂質シンポジウム、11 月 2016 年

Tatsumi, K., Kaminade, K., Takanashi, K., Aoyama, T., Sato, M., Toyooka, K., Yazaki, K., Biochemical analysis of shikonin transport machinery using hairy roots of *Lithospermum erythrorhizon*, Asia Research Node Symposium on Humanosphere Science, February, 2017

巽 奏、上撫健太、高梨功次郎、佐藤繭子、豊岡公德、青山卓史、矢崎一史、ムラサキ毛状根の表皮細胞におけるシコニン分泌機構の解析、第 58 回植物生理学会、3 月 2017 年

巽 奏、井坂夏海、岡咲洋三、佐藤繭子、豊岡公德、梶川昌孝、福澤秀哉、斉藤和季、矢崎一史、シコニン分泌系を用いた細胞外分泌脂質の解析、第 35 回日本植物細胞分子生物学会、8 月 2017 年

巽 奏、井坂夏海、岡咲洋三、佐藤繭子、豊岡公德、梶川昌孝、福澤秀哉、斉藤和季、矢崎一史、薬用植物ムラサキのシコニン分泌系を用いた細胞外分泌脂質の解析、第 30 回植物脂質科学シンポジウム、9 月 2017 年

巽 奏、岡咲洋三、梶川昌孝、市育代、市野琢爾、斉藤和季、福澤秀哉、矢崎一史、ムラサキ培養細胞における脂質の細胞外分泌とシコニンとの関わり、第 59 回日本植物生理学会、3 月 2018 年

[図書](計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

該当なし

[その他]

ホームページ

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢崎一史 (YAZAKI, Kazufumi)
京都大学・生存圏研究所・教授
研究者番号: 00191099

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

青山卓史 (AOYAMA, Takashi)
京都大学・化学研究所・教授
研究者番号: 80202498

豊岡 公德 (TOYOOKA, Kiminori)
理化学研究所・顕微鏡解析ユニット・
上級研究員
研究者番号：10360596

(4)研究協力者
該当なし