

令和 4 年 4 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05809

研究課題名(和文)植物ステロール代謝に関わる新奇制御因子HISE1の機能解明

研究課題名(英文)Analysis of a novel regulator for sterol biosynthesis, HISE1

研究代表者

島田 貴士 (Shimada, Takashi)

千葉大学・大学院園芸学研究院・助教

研究者番号：10713828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ステロールは植物にとって必須の脂質である。しかし、ステロール量を制御する分子機構はこれまでほとんど明らかになっていない。本研究では、ステロール合成の新規制御因子であるHISE1タンパク質に着目し、モデル植物であるシロイヌナズナを用いた解析を行った。HISE1の欠損により起こるステロール合成の異常により、植物は様々な生育異常を引き起こすことが明らかになった。HISE1はステロール合成の律速酵素であるHMGRのタンパク質量を負に制御することも示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ステロール合成の制御因子であるHISE1の分子メカニズムの一端を解明することに成功した。本研究の成果は、これまで注目されていなかった植物におけるステロール代謝制御の重要性を示すことにつながったと考えている。本研究を発展させることにより、植物脂質の増産や、脂質成分の改良といった応用分野への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Sterols are essential for plant growth; however, the molecular mechanisms for regulating sterol biosynthesis are poorly known. In this study, we focused on a novel regulator of sterol biosynthesis, HISE1 and used a model plant, Arabidopsis thaliana. HISE1 deficiency caused an abnormality of sterol biosynthesis, which resulted in various growth defects. Our data suggested that HISE1 negatively regulated the contents of HMGR proteins, which are the rate-limiting enzymes for sterol biosynthesis.

研究分野：植物生理学

キーワード：シロイヌナズナ オイルボディ HISE1 HMGR ステロール

1. 研究開始当初の背景

植物にとってステロールは欠かすことのできない必須の脂質である。ステロールは欠乏、過剰いずれにおいても重篤な生育障害を引き起こすため、その量は厳密に制御される必要がある。しかし、ステロール量を制御する因子は、植物では発見されていなかった。

モデル植物であるシロイヌナズナにおいて、過剰に合成されたステロールは、ステロールエステルに変換され、脂質を貯蔵する細胞小器官であるオイルボディに蓄えられる。ステロールからステロールエステルを合成する酵素として、シロイヌナズナでは Phospholipid sterol acyltransferase 1 (PSAT1) が知られている。

シロイヌナズナの若い葉においては、オイルボディはほとんど観察されない。そこで私は、葉にオイルボディを過剰蓄積するシロイヌナズナ変異体として、*high sterol ester 1 (hise1)* 変異体の単離を行った。脂質解析の結果より、*hise1* 変異体の葉にはステロールエステルが過剰蓄積していることが明らかになっている。このことから、*hise1* 変異体の葉では、ステロール合成が活性化していることが考えられる。*hise1* 変異体の原因遺伝子は、植物では機能未知のタンパク質 (HISE1 タンパク質) をコードしていた。このことから、HISE1 の機能解析により、これまで謎であったステロール代謝制御の一端が解明できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、HISE1 タンパク質の分子機能を探ることにより、植物におけるステロール代謝制御の分子機構の一端を明らかにすることを目的とする。具体的には以下の目的を設定した。

(1) HISE1 によるステロール合成制御の分子機構の解明

hise1 変異体の葉において、ステロールエステルが過剰蓄積しており、ステロール合成が活性化している可能性が考えられる。この原因として、ステロール合成に関わる酵素が過剰発現していることが考えられる。本研究では、*hise1* 変異体の葉におけるステロール合成酵素の量を解析するとともに、葉におけるステロール合成活性を測定することを目指した。これらを通して、HISE1 タンパク質が関わるステロール代謝制御機構の分子基盤の一端を明らかにする。

(2) PSAT1 は HISE1 と強調してステロール過剰蓄積を抑制する

hise1 変異体の葉におけるステロールエステルの蓄積には、PSAT1 が関与していることが考えられる。そこで、*hise1 psat1* 二重変異体を作成し、その表現型を探る。これにより、ステロールエステルの合成ができなくなった状態で、ステロール合成が活性化した場合の影響を解析することが可能になる。これらを通して、HISE1 および PSAT1 を介したステロール代謝制御の実態を明らかにする。

(3) 新規のオイルボディ (SE ボディ) タンパク質の発見

通常のオイルボディは、トリアシルグリセロールを主成分とし、ステロールエステル含量は少ない。一方、*hise1* 変異体の葉に蓄積するオイルボディは、ステロールエステルを主成分とすることが明らかになっている。そこで、*hise1* 変異体の葉に蓄積するオイルボディを SE (ステロールエステル) ボディと名付けた。しかし、SE ボディに局在するタンパク質の実態は明らかになっていない。本研究では SE ボディに局在するタンパク質を明らかにして、ステロール代謝に関わる新たな因子の発見を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、断りの無い限り、シロイヌナズナを材料として用いて解析を行った。

(1) ステロール合成に関わる酵素は、小胞体膜に局在すると考えられている。*hise1* 変異体の葉におけるステロール合成酵素の量を解析するために、本研究ではシロイヌナズナの葉のマイクロソーム画分に含まれるタンパク質について、定量プロテオミクスを行った。これにより、ステロール合成酵素の同定と定量を行い、*hise1* 変異体において量が増加しているタンパク質が存在しないかを解析した。さらに、量が増加した酵素については、野生型と *hise1* 変異体での酵素活性を測定した。また、これらの酵素が増減する条件に付いて、植物ホルモン処理やストレス処理を行い、解析した。

(2) シロイヌナズナにおいて、*hise1* 変異体と *psat1* 変異体のかけあわせにより、*hise1 psat1* 二重変異体を作成し、その表現型解析 (種子および栄養成長段階) やトランスクリプトミクス、脂質分析 (ステロールやステロールエステル) を行った。

(3) 新規の SE ボディ局在タンパク質の発見のために、*hise1* 変異体の葉から SE ボディを単離し、プロテオミクスを行った。これにより、SE ボディに局在するタンパク質候補を同定した。これらのタンパク質について、それぞれに緑色蛍光タンパク質 (GFP) を付加した融合タンパク質を発現するベクターコンストラクトを作製した。これらをベンサミアナタバコの一過的発現系を用いて、蛍光顕微鏡により SE ボディに局在するかを解析した。ベンサミアナタバコの葉における SE ボディは、メパロン酸処理を行うことにより誘導した。

4. 研究成果

(1) 定量プロテオミクスの結果、5,000 前後のタンパク質を同定、かつ定量することに成功した。この中から、野生型と *hise1* 変異体において、タンパク質量に 10 倍以上の差が見られるものを探索した。その結果、HMG-CoA レダクターゼ (HMGR1 および HMGR2) の量が、*hise1* 変異体の葉のマイクロソーム画分において、野生型の 100 倍以上多く蓄積していることが明らかになった。そのほかのタンパク質については、顕著な増減が見られるものは存在しなかった。HMGR は、動物、植物含めて、ステロール合成およびイソプレノイド合成の律速酵素と言われており、様々な研究において注目されている酵素である。一方、野生型と *hise1* 変異体において、HMGR1 および HMGR2 遺伝子の発現量に違いは見られなかった。これらの結果より、HISE1 は HMGR のタンパク質量を負に制御する因子であることが示唆された。

次に、野生型と *hise1* 変異体の葉において、HMGR の比活性を測定した。その結果、*hise1* 変異体の葉では野生型の 10 倍以上、HMGR 比活性が高いことが明らかになった。さらに、ステロールエステルの合成活性についても、*hise1* 変異体の葉では野生型よりも高いことを明らかにした。これらの結果より、*hise1* 変異体では、HMGR の過剰蓄積により、酵素活性も上昇していることが示唆された。

また、HMGR1 に GFP を融合したタンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナを作製した。この形質転換体を蛍光観察したところ、根の先端において強い HMGR1-GFP 蛍光が観察された。さらにこの蛍光は、栄養欠乏処理を行うことにより消失することが明らかになった。また、*hise1* 変異体背景において HMGR1-GFP を発現する形質転換シロイヌナズナを作製し、同様の栄養欠乏処理を行ったところ、HMGR1-GFP 蛍光の消失は見られなかった。これらの結果より、根の先端では、栄養欠乏処理により HMGR 量が低下すること、さらにこの低下には HISE1 が関与することが示唆された。

これらの結果より、HISE1 は HMGR 量を低く保つことで、ステロール合成を抑制していることが示唆された。

(2) 脂質分析の結果、*hise1 psat1* 二重変異体では野生型に比べて、ステロールエステル含量が低下していたが、ステロール含量は 1.5 倍に増加していることが明らかになった。このことは、HISE1 欠損によりステロール合成が活性化され、PSAT1 も欠損していることにより、過剰なステロールをステロールエステルに変換することができなくなり、ステロールが蓄積したと考えられる。このことの裏付けとして、*hise1 psat1* 二重変異体では *hise1* 変異体と異なり、オイルボディが観察されなくなった。*hise1 psat1* 二重変異体では、早期老化や根の伸長異常が見られ、植物の生育に異常が現れることが明らかになった。一方で、*hise1* 変異体はステロールの蓄積は見られず、植物体の生育も正常であった。このことから、ステロールの過剰蓄積により、植物は様々な生育異常が現れることが明らかになった。*hise1 psat1* 二重変異体は種子においても、形態異常や吸水異常、発芽異常が現れることから、ステロールの過剰蓄積は様々な発生段階において影響を与えることが示唆された。

トランスクリプトミクスにより、*hise1 psat1* 二重変異体の葉では、野生型に比べて、ストレス応答遺伝子の発現が高くなることが明らかになった。このことから、ステロールの過剰蓄積により、ストレス応答遺伝子の発現が誘導されることが示唆された。ステロールの量的制御はストレス耐性において重要な役割を果たしていることが示唆された。

(3) SE ボディのプロテオミクスにより、これまでに 100 以上の新規 SE ボディ局在タンパク質候補を発見することに成功した。本研究ではこのうち、50 種類のタンパク質について局在解析を行い、6 つの新規 SE ボディ局在タンパク質を発見することに成功した。本研究の成果により、SE ボディの新たな生理機能の解明につながると期待している。

(4) 本研究により、シロイヌナズナは HISE1 と PSAT1 による二段階のフェイルセーフシステムにより、ステロール量を適切に制御していることが示唆された。第一段階では、HISE1 により HMGR 量を負に制御することで、ステロールの過剰な合成を抑制している。もし第一段階に異常が生じた場合、第二段階では、PSAT1 により過剰なステロールをステロールエステルに変換して SE ボディに隔離することにより、無毒化している。第一段階、第二段階ともに異常が生じると、ステロールが過剰蓄積することで、植物に重篤な成長阻害が現れる。本研究により、植物のステロール代謝制御機構の一端が解明された。これらの研究を利用することで、植物脂質の増産や、脂質成分の機能改変など、様々な応用展開が期待できる。

<引用文献>

1. Takashi L. Shimada, Tomoo Shimada, Yozo Okazaki, Yasuhiro Higashi, Kazuki Saito, Keiko Kuwata, Kaori Oyama, Misako Kato, Haruko Ueda, Akihiko Nakano, Takashi Ueda, Yoshitaka Takano and Ikuko Hara-Nishimura, HIGH STEROL ESTER 1 is a key factor in plant sterol homeostasis, *Nature Plants*, 5, (11) 1154–1166 (2019)
2. Takashi L. Shimada, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Hiro Takahashi, Masataka Murase, Shuichi Fukuyoshi and Ikuko Hara-Nishimura, Excess sterols disrupt plant cellular activity by inducing stress-responsive gene expression, *Journal of Plant Research*, 133, (3) 383-392 (2020)
3. Takashi L. Shimada, Takashi Ueda and Ikuko Hara-Nishimura, Excess sterol accumulation affects seed morphology and physiology in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Signaling & Behavior*, 15, 1872217 (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimada Takashi L., Ueda Takashi, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 16
2. 論文標題 Excess sterol accumulation affects seed morphology and physiology in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1872217 ~ 1872217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2021.1872217	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 -

1. 著者名 Shimada Takashi L., Shimada Tomoo, Okazaki Yozo, Higashi Yasuhiro, Saito Kazuki, Kuwata Keiko, Oyama Kaori, Kato Misako, Ueda Haruko, Nakano Akihiko, Ueda Takashi, Takano Yoshitaka, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 5
2. 論文標題 HIGH STEROL ESTER 1 is a key factor in plant sterol homeostasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 1154 ~ 1166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-019-0537-2	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 -

1. 著者名 Iwabuchi Kosei, Shimada Takashi L., Yamada Tetsuya, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 15
2. 論文標題 A space-saving visual screening method, Glycine max FAST, for generating transgenic soybean	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1722911 ~ 1722911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2020.1722911	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 -

1. 著者名 Shimada Takashi L, Yamaguchi Katsuki, Shigenobu Shuji, Takahashi Hiro, Murase Masataka, Fukuyoshi Shuichi, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 in press
2. 論文標題 Excess sterols disrupt plant cellular activity by inducing stress-responsive gene expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-020-01181-4	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 島田貴士
2. 発表標題 小胞体における植物ステロールの合成制御機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会「植物の小胞体の多彩な能力」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田貴士
2. 発表標題 植物ステロール量を制御する分子機構の解明
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会「植物の環境適応を支える細胞膜機能研究の新基軸」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田 貴士, 重信 秀治, 山口 勝司, 高橋 広夫, 福吉 修一, 上田 貴志, 西村 いくこ
2. 発表標題 過剰なステロールはシロイヌナズナの種子、葉、根の生理機能に悪影響を与える
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 萌, 重信 秀治, 山口 勝司, 高橋 広夫, 福吉 修一, 東 泰弘, 斉藤 和季, 桑田 啓子, 西村いくこ, 島田 貴士
2. 発表標題 シロイヌナズナの新規葉緑体局在タンパク質LIPID RICH 1は脂質合成の負の制御因子である
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島田貴士、嶋田知生、岡咲洋三、東泰弘、斉藤和季、桑田啓子、小山香梨、加藤美砂子、高野義孝、上田貴志、中野明彦、上田晴子、西村いくこ
2. 発表標題 メバロン酸経路の負の制御因子HIGH STEROL ESTER1の解析
3. 学会等名 第2回天然ゴム研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田貴士、重信秀治、山口勝司、高橋広夫、福吉修一、上田貴志、西村いくこ
2. 発表標題 植物ステロール過剰蓄積が及ぼす植物体への影響
3. 学会等名 第32回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口萌、重信秀治、山口勝司、高橋広夫、福吉修一、島田貴士
2. 発表標題 葉にオイルボディを過剰蓄積するシロイヌナズナ変異体lipid rich 1の解析
3. 学会等名 第32回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimada Takashi L., Shimada Tomoo, Okazaki Yozo, Higashi Yasuhiro, Saito Kazuki, Kuwata Keiko, Oyama Kaori, Kato Misako, Ueda Haruko, Nakano Akihiko, Ueda Takashi, Takano Yoshitaka, Hara-Nishimura Ikuko
2. 発表標題 HIGH STEROL ESTER 1 is a key regulator in plant sterol biosynthesis
3. 学会等名 8th Asian-Oceanian Symposium on Plant Lipids (ASPL2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田貴士、重信秀治、山口勝司、高橋広夫、福吉修一、上田 貴志、西村 いくこ
2. 発表標題 過剰なステロール蓄積が植物の生理機能に与える影響
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口 萌、重信 秀治、山口 勝司、高橋 広夫、福吉 修一、東 泰弘、斉藤 和季、桑田 啓子、西村いくこ、島田 貴士
2. 発表標題 葉緑体タンパク質LIPID RICH 1による脂質代謝制御
3. 学会等名 第33回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾亦 雄斗、江面 健太郎、菅野 茂夫、庄司 翼、高野 耕司、岡咲 洋三、斉藤 和季、上田 晴子、西村 いくこ、島田 貴士
2. 発表標題 トマトにおける HISE1 のステロール代謝制御機構は生存に必須である
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 磯部 一樹、米谷 友里、島田 貴士、西村 いくこ、太田 大策
2. 発表標題 植物ステロールの細胞内における生合成及び貯蔵部位の探索
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

島田研究室情報
<https://researchmap.jp/yuzurin/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------