

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：34504

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23734

研究課題名(和文) 葉緑体タンパク質由来ペプチドによるシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Resolving a possible signaling mechanism involving proteolytic peptides from chloroplasts

研究代表者

西村 健司 (Nishimura, Kenji)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：70840544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質分解は、役目を終えたタンパク質から分解産物(ペプチド)という新たな分子に再生する過程とも言える。本研究ではこうしたタンパク質分解由来ペプチドがその後迎える運命や果たす役割について解析を行った。その結果、葉緑体プロテアーゼにより分解されたタンパク質のペプチド断片は植物免疫関連受容体タンパク質により認識されることが、そして葉緑体からのペプチド放出が核遺伝子発現に影響する可能性が新たに見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オルガネラのタンパク質分解由来ペプチドの関与するシグナル伝達系自体前例は極めて少ない。線虫ミトコンドリアの例に関しても、放出されたペプチドの作用機序や情報伝達系の全貌は未だ不明である。本研究では、細菌由来の共生オルガネラから放出される分解産物ペプチドが細胞内の免疫系受容体により異物認識されうることを見出した。これは15億年の細胞内共生進化を経てなお、細菌由来オルガネラと宿主細胞の関係性が自己・非自己の認識に基づく免疫システムにより管理・統制されている可能性を想像させる。

研究成果の概要(英文)：Protein degradation in particular processive proteolysis may be considered as a process of repurposing unwanted or dysfunctional proteins for generating functional molecules namely proteolytic peptides. This study investigated the fate and function of the peptides generated through proteolysis within chloroplasts. The results may suggest that peptides generated by chloroplast processive protease might be recognized by a plant immune receptor protein and that peptide release from chloroplasts could influence nuclear transcriptome.

研究分野：葉緑体生物学

キーワード：葉緑体 タンパク質分解 ペプチド ABCトランスポーター レセプター

1. 研究開始当初の背景

葉緑体は古代真核細胞に共生した原始光合成細菌を起源とするオルガネラである。葉緑体タンパク質が細胞内外の環境変化や機能損傷等の結果その使命を終えると、プロテアーゼにより分解される。特に細菌由来の AAA+型プロテアーゼである Clp や FtsH は、26S プロテアソームと同様、ATP 依存的に数十アミノ酸のペプチド断片を生成する。

タンパク質分解は、一般には役目を終えたあるいは正常でないタンパク質を除去する反応であるが、一方でそうした不要タンパク質が短鎖ペプチドという新たな分子種として再生あるいは再目的化する過程と捉え直すこともできる。実際、分解産物の生理作用に関しては動物において数例報告がある。例えばヒト適応免疫では、ウイルス等に感染した細胞内の病原体由来異物タンパク質が細胞質で 26S プロテアソームにより分解されるが、その分解産物が小胞体-ゴルジ体を経て細胞表層に輸送後、抗原として提示されることで CD8⁺T 細胞が感染細胞を破壊する。また線虫ミトコンドリアのタンパク質恒常性が損なわれると、マトリックスタンパク質が凝集・分解され、そのペプチド断片が何らかのシグナルとして細胞質側へ放出されることで核コードのシャペロン群が発現誘導される。しかし、植物葉緑体では不要タンパク質が分解制御を受けることは広く知られているものの、その結果生じる分解産物が辿る運命や果たす役割についてはほとんど解析されていなかった。

2. 研究の目的

ヒト小胞体や線虫ミトコンドリア内包膜上にはタンパク質分解由来のペプチドを輸送するトランスポーターが存在し、これらはいずれも ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターである。研究開始時点において、研究代表者の生化学的解析から、そのホモログがシロイヌナズナ葉緑体内包膜上に TAP1 など少なくとも 3 種類存在することを見出していた。このうち 2 つのペプチドトランスポーター様 ABC トランスポーターそれぞれの遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析を行ったところ、いずれも核遺伝子の発現に異常が観察された。また両者は異なる遺伝子発現パターンを示すが、唯一共通して発現低下している遺伝子が見出された。この遺伝子は TIR-NBS 型病害応答性受容体タンパク質をコードしており、葉緑体由来ペプチドを異物として認識するレセプターである可能性が予想された。さらに同遺伝子は Clp/FtsH の下流で働くオリゴペプチダーゼの欠損株では逆に発現上昇することが報告されていた。

以上のことから、本研究ではこれら ABC トランスポーターと TIR-NBS タンパク質を介して葉緑体由来ペプチドがシグナル分子として核遺伝子を制御するメカニズムの存在を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、上述した葉緑体内包膜 ABC トランスポーター及び受容体タンパク質に着目し、シロイヌナズナを用いたこれらタンパク質の機能解析を通じて、葉緑体タンパク質由来ペプチドを介したシグナル経路及び核遺伝子発現への関与を検証した。

2 種類の ABC トランスポーターの解析では、これら欠損株の二重変異体の RNAseq 解析を行い、各単独変異体のトランスクリプトームとの比較解析を行った。また研究代表者のこれまでの解析から、これらトランスポーターの一方は約 1 MDa の巨大複合体を形成することが分かっているため、特異抗体を用いて免疫共沈降法により複合体を回収し、MS/MS 解析により構成タンパク質の同定を試みた。もう一方のトランスポーターに関しては抗体の特異性が低いため、新たな抗体の作製を試みた。

TIR-NBS 型受容体タンパク質の解析では、まず特異抗体を作成して生体内での挙動を生化学的に検証した。また組換え体タンパク質を発現精製し、上記オリゴペプチダーゼ変異体において蓄積することが知られる葉緑体タンパク質の断片(分解産物)のアミノ酸配列情報をもとに合成したペプチドとの物理的相互作用をアフィニティー精製法にて検証した。さらに T-DNA 挿入変異体の選抜および過剰発現体の作出を行い、単純生育比較や病害関連因子としての性質を考慮してエフェクター分子による生育への影響についても解析した。

またこれら解析に加えて、葉緑体由来ペプチドの生成を担うプロテアーゼのひとつであるチラコイド膜局在 FtsH の基質タンパク質の探索を目的として、タンパク質分解を駆動する熱スト

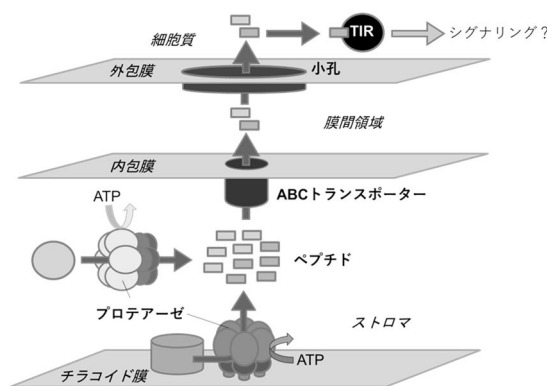


図1. ペプチドシグナル伝達モデル

レス前後の野生株と FtsH 欠損変異体から回収したチラコイド膜画分の比較プロテオーム解析を行った。さらに、研究代表者は以前に FtsH 欠損表現型が上記 TAP1 の機能欠損により抑圧されることを見出していたことから、当該プロテアーゼの単独変異体と TAP1 欠損株との二重変異体の比較トランスクリプトーム解析も行った。

4. 研究成果

2 種類の ABC トランスポーターのうち一方は、一群の小胞体ストレス関連シャペロン遺伝子等の発現に影響を及ぼすことを見出していたが、作出した抗体の特異性が低いため、細胞内局在以外の生化学的特性は決定できていない。そこで本年度は抗原となる組換え体タンパク質の発現・精製を行い、抗体を再度作出した。しかし今回作出した抗体に関しても特異性の向上には至らなかった。またこれまでの解析から、もう 1 つの ABC トランスポーターについては約 1 MDa の巨大複合体を形成することを見出しているが、その複合体構成成分や機能は不明である。そのため野生株と当該トランスポーターの T-DNA 挿入変異体から葉緑体を単離し、これと特異抗体を用いた免疫共沈降法により上記複合体を精製後、LC-MS/MS 解析により構成因子の特定を試みた。その結果、葉緑体内包膜に局在する既知のタンパク質が多数同定されたものの、非特異的なタンパク質相互作用等の影響が大きく、複合体構成因子の特定には更なる解析が必要と考えられる。

前者の ABC トランスポーターの変異体は、上述したようにシャペロン遺伝子等の発現低下がみられていたが、両トランスポーターの二重変異体ではこのような影響は観察されなかった。これは当該シャペロン遺伝子の発現を抑制することが知られている GASA (GA-stimulated Arabidopsis) ファミリー遺伝子の発現が二重欠損株で低下していることと関連していると考えられる。また当該二重変異体における遺伝子発現の変動レベルは両単独変異体に比べてむしろ小さく、両トランスポーターの複雑な機能的関係性が推察された。加えて上述したオリゴペプチダーゼ変異体では細胞内でのペプチド蓄積とともに、病害応答関連遺伝子の発現変動が報告されているが、同二重変異体及び両単独変異体ではこれが観察されなかった。

受容体タンパク質については、まず発現・精製した N 末端 TIR ドメインの組換え体タンパク質を抗原として特異抗体を作成した。抗原を用いて抗体精製後ウェスタン解析を行った結果、精製抗体は抗原を高感度に認識できることが確認され、また当該受容体タンパク質は植物体内では不安定、あるいは存在量が極微量である可能性が示唆された。検出された受容体タンパク質の分子量は全長サイズに相当することから、恐らくその蓄積は葉緑体移行シグナルの切断を伴わないものと推察される。これは GFP 融合タンパク質の一過発現系を用いた過去の報告から同タンパク質が細胞質または核で検出されることと矛盾しない。また光化学系 II 反応中心 D1 タンパク質の部分長短鎖ペプチド配列を EDC にて担体に架橋し、これに全長 TIR-NBS タンパク質を作させたところ、同受容体タンパク質がペプチド結合能を示したことからペプチド受容体である可能性が示唆された。一方、過去の報告から当該受容体遺伝子の過剰発現は胚性致死を引き起こす可能性が予想されたため、エストラジオール誘導型過剰発現体の作出も行ったが、外観は T-DNA 挿入変異体と同様に野生型植物と同等であった。また TIR-NBS タンパク質は病害応答性を示すことから、エリシターペプチド存在下での生育を比較したが、T-DNA 挿入株と過剰発現株ともに野生株と顕著な差は観察されなかった。今後はこれら変異体のトランスクリプトーム解析等により詳細な分子レベルの表現型を探索し、核遺伝子発現制御への関与を評価する必要がある。

上記受容体タンパク質が D1 ペプチド断片に結合したことから、D1 を断片化するチラコイド膜局在型 FtsH プロテアーゼの解析も行った。FtsH を欠損した *var2* 変異体を用いて、葉緑体タンパク質分解を駆動する熱ストレス前後でのチラコイド膜タンパク質のプロテオーム解析を行ったところ、カルボニル化したストロマタンパク質も FtsH の標的となりうることが分かった。また FtsH による分解が抑制されると葉緑体内でストレス顆粒の形成が促される可能性があること、そして熱ストレスとの複合的なタンパク質恒常性異常により細胞質やミトコンドリアなど葉緑体外においてもストレス応答機構が駆動される可能性も新たに見出された。一方、FtsH 単独変異体と TAP1 変異体との二重変異体の RNAseq 解析を行ったところ、二重変異体において病害関連および成長関連の各核コード遺伝子群が特徴的に発現変動していることを見出された。研究代表者らが過去に行った野生株と TAP1 単独変異体間の比較トランスクリプトーム解析ではこのような発現変動は観察されなかったことから、プロテアーゼ依存のタンパク質分解と TAP1 によるペプチド放出に関連する核遺伝子発現制御メカニズムの存在が示唆された。今後はこれらプロテアーゼとトランスポーター、そしてレセプターの関係性を明らかにすることで、葉緑体由来ペプチドによるシグナル伝達機構の解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamamoto M, Nishimura K, Kitashiba H, Sakamoto W, Nishio T.	4. 巻 70
2. 論文標題 High Temperature Causes Breakdown of S Haplotype-Dependent Stigmatic Self-Incompatibility in Self-Incompatible Arabidopsis Thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 5745-5751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/erz343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishimura K, Nakagawa R, Hachisuga C, Nakajima Munekage Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Deciphering the Proteotoxic Stress Responses Triggered by the Perturbed Thylakoid Proteostasis in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10030519	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 西村健司	4. 巻 12
2. 論文標題 葉緑体プロテアーゼによるオルガネラ恒常性と細胞内情報伝達の制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植物科学の最前線 (BSJ-Review)	6. 最初と最後の頁 52-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24480/bsj-review.12a7.00200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kenji Nishimura
2. 発表標題 Chloroplast envelope ABC transporters and organellar homeostasis
3. 学会等名 20th Young Researchers Seminar of Japanese Society of Photosynthesis Research
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村健司
2. 発表標題 葉緑体ペプチドエクスポーターとオルガネラホメオスタシス
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村健司
2. 発表標題 葉緑体ABCトランスポーターとトランスオルガネラホメオスタシス
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Kenji Nishimura - Google Scholar Citations https://scholar.google.co.jp/citations?user=ZA8THGMAAAAJ</p>
--

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