

論文の内容の要旨

論文題目 ゼニゴケにおける葉緑体膜脂質代謝に関する
脂質輸送タンパク質の解析

氏名 平嶋 孝志

<序論>

酸素発生型光合成はシアノバクテリアおよび葉緑体に存在するチラコイド膜において行われる。チラコイド膜は MGDG、DGDG、SQDG、PG という四種類のグリセロ脂質によって構成されており、これはシアノバクテリアから植物まで保存された特徴である。各脂質クラスは光合成および葉緑体機能においてそれぞれ異なった役割を果たしており、チラコイド脂質合成の適切な制御は光合成膜の構造および機能を維持するために重要である。植物細胞においては、糖脂質、すなわち MGDG、DGDG、および SQDG は色素体経路（原核経路とも呼ばれる）および小胞体経路（真核経路とも呼ばれる）という 2 つの経路によって合成される。色素体経路においては、色素体内において合成された脂肪酸がグリセロール骨格に直接取り込まれてジアシルグリセロールが生じ、糖脂質合成の前駆体となる。一方、小胞体経路においては、色素体において合成された脂肪酸は細胞質へと排出され、小胞体における脂質合成に利用される。小胞体で合成された脂質の一部は色素体へと送り戻されてジアシルグリセロールに変換され、色素体における糖脂質合成の基質となる。

小胞体から色素体への脂質輸送のメカニズムはよく分かっていないが、この過程に関与するタンパク質がいくつか同定されている。シロイヌナズナにおいては、TRIGALACTOCYLDIACYLGLYCEROL1, 2, 3, 4, 5 (TGD1, 2, 3, 4, 5) タンパク質が葉緑体包膜において複合体を形成し、小胞体経路において合成された脂質の葉緑体への取り込みに関与している。TGD 遺伝子の破壊は植物の生育や種子形成、気孔孔辺細胞での葉緑体形成

に影響することが明らかになっており、このことは小胞体から葉緑体への脂質輸送が葉緑体の正常な機能に必要であることを示唆している。

生体膜間で脂質輸送を媒介するタンパク質ドメインはこれまでに複数発見されている。その中で、Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer (START) ドメインは植物を含む真核生物に最も保存されている脂質輸送ドメインのひとつである。動物細胞において、START ドメインを有するタンパク質はリン脂質やスフィンゴ脂質、ステロールを含むさまざまな脂質のオルガネラ間での輸送に必要であることが知られている。植物にも動物の START タンパク質と相同なタンパク質が存在しており、植物細胞における細胞内脂質輸送に関与している可能性が考えられるが、これらのタンパク質の機能についての報告はこれまでなかった。

本研究では、植物細胞において小胞体-葉緑体間脂質輸送を媒介しているタンパク質とその機能を明らかにするため、遺伝的冗長性の低い基部陸上植物ゼニゴケにおいて、START ドメインタンパク質の細胞内局在解析および変異体を用いた機能解析を行った。

<結果および考察>

1. ゼニゴケ STAR2 タンパク質は葉緑体包膜上に点状の構造体として局在する

系統解析の結果、植物に存在する START タンパク質のうち動物の脂質輸送タンパク質と相同なものは3つのクレードに分類され、それらはコケ植物、シダ植物および被子植物にそれぞれホモログが保存されていることがわかった。シロイヌナズナなどの多くの植物には多数のホモログが存在していたが、ゼニゴケは各クレードに1つずつホモログが存在していたことから、遺伝子重複によって生じる機能解析の困難さを避けるため、ゼニゴケにおいて解析を行うことにした。

ゼニゴケに存在するホモログを STAR1, STAR2, STAR3 と命名し、それぞれを TagRFP 融合タンパク質として発現するコンストラクトを作製し、ゼニゴケ幼葉状体に一過的に発現させ、共焦点顕微鏡により細胞内局在を観察した。STAR1-TagRFP および STAR3-TagRFP の蛍光は細胞周縁部に観察されたことから、これらは細胞膜に局在すると考えられた。一方、STAR2-TagRFP の蛍光は葉緑体周辺にドット状のパターンとして観察された。葉緑体外包膜に局在する mCitrine と共発現させたところ、STAR2-TagRFP の蛍光は mCitrine の蛍光と重なった。これらの結果から、STAR2 は葉緑体包膜上に点状の構造体として局在していることが示唆された。STAR2 のアミノ酸配列には葉緑体内部への輸送に必要な移行シグナル配列が含まれていないことから、STAR2 はトランスロコンに依存しない経路によって葉緑体外包膜へ輸送されると推測された。

STAR2-TagRFP が示したドット状の局在パターンは小胞体-ミトコンドリア間コンタクトサイトを形成するタンパク質のパターンに類似しており、STAR2 は葉緑体と他のオルガネラの間の膜コンタクトサイトに局在している可能性がある。膜コンタクトサイトは膜間の脂質輸送に関与している例が多数報告されていることから、STAR2 は葉緑体と他のオルガ

ネラとの間で脂質を輸送している可能性が考えられた。

2. STAR2 は小胞体に由来する脂肪酸の葉緑体脂質への取り込みに必要である

STAR2 の機能を明らかにするため、CRISPR-Cas9 システムを用いて *STAR2* 遺伝子にフレームシフト変異を生じた変異体 *star2-1* を作出した。*star2-1* 変異体はリン十分条件 (1 mM) においては形態や生育において異常を示さなかったが、リン欠乏条件 (20 μ M) において生育させた場合、野生型より生重量が減少した。また、*EF1 α* プロモーターによって STAR2-TagRFP を過剰発現させると *star2-1* 変異によって引き起こされる生育遅延はレスキューされた。これらの結果より、STAR2 はリン欠乏条件での最適な生育に必要であること、および相補ラインにおいて発現した STAR2-TagRFP は正しく機能していることが示唆された。相補ラインの顕微鏡観察において、STAR2-TagRFP の蛍光は一過的に発現させた場合と同様のパターンを示したことから、STAR2 が葉緑体包膜上に点状の構造体として局在していることが確かめられた。

リン十分条件およびリン欠乏条件において生育させたゼニゴケ葉状体の脂質分析を行ったところ、どちらの条件においても野生型と *star2-1* 変異体との間で脂質クラスの組成に大きな差は見られなかったが、葉緑体糖脂質の脂肪酸組成に変化が見られた。野生型においては糖脂質に含まれる C₂₀ 脂肪酸の割合がリン欠乏に応答して 4 倍程度に増加したのに対し、*star2-1* 変異体ではリン欠乏に応答した C₂₀ 脂肪酸の増加が見られず、むしろ減少した。STAR2-TagRFP を過剰発現した相補ラインにおいては、リン欠乏時の糖脂質の C₂₀ 脂肪酸の割合は野生型と同等であり、またリン十分条件における糖脂質の C₂₀ 脂肪酸の割合が野生型の 1.5 倍程度に増加した。葉緑体リン脂質である PG においてはリンの有無による C₂₀ 脂肪酸含量の変化は見られなかった。葉緑体外の脂質に含まれる C₂₀ 脂肪酸の割合は *star2-1* 変異体においても変化がなかったことから、葉緑体脂質において見られた C₂₀ 脂肪酸の割合の変化はこれらの脂肪酸の量そのものが変化したためではないことが示された。これらの結果は、STAR2 がリン欠乏に応答した C₂₀ 脂肪酸の葉緑体糖脂質への取り込みに必要であることを示している。コケ植物において C₂₀ 脂肪酸は小胞体のみにおいて合成されることが知られており、実際ゼニゴケにおいても葉緑体外の膜を構成する脂質において高い割合で含まれていたことから、STAR2 は小胞体に由来する脂肪酸の葉緑体への取り込みに関与していると考えられる。

オルガネラ間の脂肪酸の輸送は、脂質に結合した状態か、あるいは遊離脂肪酸の形で行われる。葉緑体脂質合成の小胞体経路においては、脂肪酸はグリセロ脂質の一部として小胞体から葉緑体へと輸送されと考えられている。動物の START ドメインタンパク質にはオルガネラ間でグリセロ脂質を輸送するものが存在することから、STAR2 は小胞体-葉緑体間のグリセロ脂質輸送体として小胞体経路に関与している可能性がある。PG は色素体経路によってのみ合成されることから、リン欠乏に応答した C₂₀ 脂肪酸の増加が PG において見られなかったことも、STAR2 によって媒介されている脂肪酸の輸送が小胞体経路の一部であ

ることを支持している。

<総括>

本研究により、葉緑体脂質合成の小胞体経路における小胞体-葉緑体間の脂質輸送を直接媒介している可能性があるタンパク質が同定された。葉緑体包膜上に点状の構造体として局在する START ドメインタンパク質である STAR2 は、リン欠乏に応じた小胞体由来脂肪酸の葉緑体糖脂質への取り込みに必要であり、またリン欠乏条件下での最適な生育にも必要であった。STAR2 のホモログはシロイヌナズナなど陸上植物に保存されており、同様に小胞体経路における脂質輸送に関与している可能性がある。STAR2 の解析は、小胞体経路を通じた葉緑体膜脂質合成の制御機構とその生理的意義の解明につながるものと期待される。