

博士論文（要約）

ゼニゴケにおける葉緑体膜脂質代謝に
関与する脂質輸送タンパク質の解析

平嶋 孝志

目次

略語	3
第 1 章 序論	4
1.1 葉緑体を構成する膜脂質	4
1.2 葉緑体脂質の合成経路	5
1.3 小胞体経路において行われるオルガネラ間脂質輸送	7
1.4 植物に存在する START ドメイン含有タンパク質	8
1.5 新しいモデル生物ゼニゴケ	10
1.6 本研究の目的	11
第 2 章 材料と方法	12
2.1 分子系統解析	12
2.2 植物材料および生育条件	12
2.3 プラスミド作製	13
2.4 パーティクルガンによる遺伝子導入	14
2.5 アグロバクテリウムによる遺伝子導入	14
2.6 <i>STAR2</i> 破壊株の作製	15
2.7 <i>star2-1</i> 相補株の作製	15
2.8 共焦点顕微鏡観察	16
2.9 クロロフィル定量	16
2.10 パルス変調クロロフィル蛍光測定	16
2.11 定量的 RT-PCR	16
2.12 脂質分析	17
2.13 パルス・チェイス [^{14}C] 標識実験	18
第 3 章 結果	19
3.1 植物 START 単独タンパク質の分子系統解析	19
3.2 ゼニゴケ START 単独タンパク質のドメイン構造	20
3.3 ゼニゴケ START 単独タンパク質の細胞内局在	20

3.4	CRISPR-Cas9 システムによる <i>STAR2</i> 欠損変異体の作出	21
3.5	<i>STAR2</i> のリン欠乏条件での生育における機能	22
3.6	<i>STAR2</i> の欠損が葉緑体機能に与える影響	23
3.7	<i>STAR2</i> のリン酸濃度による転写産物レベル制御	23
3.8	<i>STAR2</i> の欠損が脂質組成に与える影響	24
3.9	<i>STAR2</i> の欠損が脂質代謝フラックスに与える影響	25
第 4 章	考察	26
4.1	ゼニゴケは植物に共通する <i>START</i> 単独タンパク質の最小セットを有している . . .	26
4.2	ゼニゴケ <i>STAR2</i> は葉緑体包膜上に点状の構造として存在する	26
4.3	<i>STAR2</i> はリン欠乏条件における最適な生育に必要である	27
4.4	<i>STAR2</i> はリン欠乏条件における小胞体由来脂肪酸の葉緑体脂質への取り込みに必要である	28
4.5	<i>STAR2</i> の欠損はリン欠乏条件において PC から MGDG への脂肪酸の移行を阻害する	29
4.6	葉緑体脂質合成における小胞体経路の普遍性	29
4.7	まとめと今後の展望	30
	参考文献	32
	図表	43
	謝辞	68

略語

ACP：アシルキャリアータンパク質
CDP-DAG：シチジン二リン酸-ジアシルグリセロール
DAG：ジアシルグリセロール
EF1 α ：伸長因子 1 アルファ
DGDG：ジガラクトシルジアシルグリセロール
DGTS：ジアシルグリセリルトリメチルホモセリン
HD：ホメオドメイン
MGDG：モノガラクトシルジアシルグリセロール
PA：ホスファチジン酸
PC：ホスファチジルコリン
PE：ホスファチジルエタノールアミン
PG：ホスファチジルグリセロール
PI：ホスファチジルイノシトール
PSII：光化学系 II
RT-PCR：逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SQDG：スルホキノボシルジアシルグリセロール
TLC：薄層クロマトグラフィー

脂肪酸の表記

本論文では、脂肪酸の炭素数 X および二重結合の数 Y を用いて $X:Y$ の形で表記する。

第1章 序論

1.1 葉緑体を構成する膜脂質

葉緑体は植物細胞を特徴づけるオルガネラである。植物細胞においてはアミノ酸合成や脂肪酸合成などの重要な代謝経路が葉緑体に局在し、酸素発生型光合成に必要な光化学反応および電子伝達反応、ATP 合成を行うタンパク質複合体は葉緑体内部のチラコイド膜に存在している。チラコイド膜はモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG)、スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG)、ホスファチジルグリセロール (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 [1]。MGDG と DGDG、SQDG は極性頭部に糖をもつグリセロ糖脂質であり、PG は極性頭部にリン酸基をもつグリセロリン脂質である。MGDG と DGDG はそれぞれ一つあるいは二つのガラクトース分子を含んでおり、まとめてガラクト脂質と呼ばれる。葉緑体包膜もチラコイド膜と同じ四種類のグリセロ脂質によって構成されているが、外包膜のみホスファチジルコリン (PC) を含んでいる。

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。例えば、PG 合成に必要な酵素の欠損は、シアノバクテリアとシロイヌナズナの両方において、光合成能の喪失を引き起こす [2,3]。MGDG や DGDG の合成量の低下は葉緑体形成やチラコイド膜の形態に異常を引き起こし、核での遺伝子発現にも影響を与える [4-6]。SQDG 合成酵素の欠損は、リン十分条

件では顕著な異常をもたらさないが、リン欠乏条件での生育遅延を引き起こす [7]。

1.2 葉緑体脂質の合成経路

葉緑体脂質の合成はジアシルグリセロール (DAG) またはシチジン二リン酸-ジアシルグリセロール (CDP-DAG) を基質として葉緑体包膜において行われる [1]。糖脂質、すなわち MGDG、DGDG、および SQDG は DAG を基質とし、PG は CDG-DAG を基質として合成される。植物細胞において、脂肪酸の新規合成は葉緑体においてのみ行われるが、DAG および CDG-DAG の前駆体であるホスファチジン酸 (PA) の合成は葉緑体と小胞体の両方において行われる。葉緑体脂質合成に用いられる PA 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 (図 1) [1]。色素体経路においては PA 合成が葉緑体内部で完結しているのに対し、小胞体経路では小胞体で合成された PA が葉緑体脂質の前駆体となる。

色素体経路では、アシル-ACP: グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (ATS1) によるグリセロール-3-リン酸のアシル化と、アシル-ACP:LPA アシルトランスフェラーゼ (ATS2) によるリゾ PA へのアシル基転移を介して PA が合成され、PA ホスファターゼによって PA を脱リン酸化して得られた DAG が糖脂質合成に利用される (図 1)。ATS1 および ATS2 は、それぞれ 16:0-ACP および 18:1-ACP に特異的であるため、色素体経路においては、18:1 (*sn*-1)-16:0 (*sn*-2)-PA が主として生成する [8]。*sn*-1 に C₁₈ 脂肪酸、*sn*-2 に C₁₆ 脂肪酸という立体化学的配置がシアノバクテリアの脂質と類似していることから、色素体経路は当初原核経路と命名された [9]。複数の脂肪酸デサチュラーゼによって葉緑体脂質に結合した脂肪酸に二重結合が導入されることで、16:0 および 18:1 の大部分はそれぞれ 16:3 および 18:2 または 18:3 に変換され、結果として色素体経路によって合成された糖脂質は 18:3-16:0 または 18:3-16:3 というジアシルグリセロール骨格を有することになる (図 1)。

葉緑体で合成されたアシル-アシルキャリアタンパク質 (ACP) の一部は色素体経路に利用されず、アシル-ACP チオエステラーゼによって加水分解されて遊離脂肪酸に変換されたのち、細胞

質へ排出される。脂肪酸が葉緑体外へ輸送される過程は未知の部分が多いが、内包膜に局在する FAX1 タンパク質がこの過程に関与していることが示唆されている [10]。葉緑体から排出された脂肪酸はアシル-CoA シンテターゼによってアシル-CoA に変換され、小胞体に局在するアシル-CoA:グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼおよびアシル-CoA:LPA アシルトランスフェラーゼによって PA 合成に利用される。小胞体のアシルトランスフェラーゼは葉緑体と基質特異性が異なり、小胞体経路においては 16:0-18:1-PA および 18:1-18:1-PA が主として生成する。したがって、色素体経路においては *sn*-2 に C₁₆ 脂肪酸が結合した脂質が合成されるのに対し、小胞体経路においては *sn*-2 に C₁₈ 脂肪酸が結合した脂質が合成される (図 1)。小胞体において PA から生成した DAG および CDP-DAG は PC などのリン脂質合成の基質として利用される。PC に結合した 18:1 は、さらに脂肪酸デサチュラーゼによって 18:2 および 18:3 に不飽和化され、16:0-18:3-PC または 18:3-18:3-PC が合成される。葉緑体において 18:1 を不飽和化するデサチュラーゼが欠損しても葉緑体脂質に 18:3 が蓄積することから [11]、小胞体経路において葉緑体脂質合成の前駆体は一度 PC として不飽和化を受けたのち葉緑体に輸送されていると考えられる。

PG は色素体経路によってのみ合成されるが、糖脂質の合成は植物種によって色素体経路と小胞体経路の両方を利用する場合と小胞体経路のみに依存する場合の二通りが存在している [12]。糖脂質に結合している脂肪酸の種類から、糖脂質の合成に色素体経路と小胞体経路の両方を利用する植物 (シロイヌナズナなど) は 16:3 植物と呼ばれ、小胞体経路のみを利用する植物 (エンドウなど) は 18:3 植物と呼ばれる。16:3 植物においては糖脂質の *sn*-2 に C₁₆ 脂肪酸と C₁₈ 脂肪酸が含まれるが、18:3 植物においては C₁₈ 脂肪酸しか含まれない。各経路が合成に寄与する割合は脂質クラスによって異なっており、シロイヌナズナにおいては MGDG の約半分が色素体経路によって合成されるのに対し、DGDG はほとんどが小胞体経路によって合成される (図 1) [13]。

1.3 小胞体経路において行われるオルガネラ間脂質輸送

真核経路において小胞体から葉緑体へ輸送される脂質の実体は明らかになっていない。葉緑体外包膜の外葉（脂質二重層の細胞質側）には PC が含まれているが、葉緑体は PC 合成に必要な CDP-コリン:DAG ホスホコリントランスフェラーゼ活性を欠いているため、葉緑体への PC または PC に関連する代謝産物の輸送が必要であると考えられる。外包膜に存在する PC が葉緑体脂質の前駆体である証拠はないが、外包膜において DAG が生成されれば葉緑体脂質合成の基質となること [14]、単離葉緑体に取り込ませた PC は細胞質成分の添加により MGDG に変換されること [15] から、外包膜上の PC が細胞質に局在するホスホリパーゼによって PA または DAG に変換されて葉緑体脂質合成に利用されるという仮説が考えられる。実際に葉緑体に PC が輸送されているかは明らかではないが、単離葉緑体が人工リボソームから PC を特異的に取り込む活性を有しており、サーモライシン処理によってその活性が低下することから、PC を葉緑体へ輸送するタンパク質が葉緑体外包膜上に存在することが示唆されている [16]。

一方、放射性同位体を用いた代謝実験よりリゾ PC が葉緑体に輸送されることが示唆されており [17]、また葉緑体包膜にはリゾ PC を PC に変換するアシル-CoA: リゾ PC アシルトランスフェラーゼ活性が検出される [18]。また、小胞体 (LACS4) および葉緑体包膜 (LACS9) に局在するアシル CoA シンテターゼの二重変異体 *lacs4 lacs9* は小胞体経路に由来する葉緑体脂質の割合が減少する [19]。これらの事実から、小胞体から輸送されたリゾ PC が葉緑体において再アシル化されて葉緑体脂質の前駆体となっている可能性が考えられるが、葉緑体のリゾ PC アシルトランスフェラーゼ活性が 80% 以上減少した *lpcat1 lpcat2* 二重変異体において葉緑体脂質の合成にほとんど影響が見られないことから [20]、このサイクルは異なる代謝経路に寄与している可能性が高い。その他、小胞体から DAG が輸送されているとする仮説や PA が輸送されているとする仮説が提唱されているが、いずれも決定的な証拠はない。

葉緑体包膜には、変異体においてオリゴガラクト脂質であるトリガラクトシルジアシルグリセロールが蓄積することから TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL (TGD) と名付けられた脂質輸

送複合体が存在している。TGD 複合体は 5 つのタンパク質 (TGD1, TGD2, TGD3, TGD4, TGD5) によって構成され、葉緑体内外包膜にまたがって存在している。いずれのサブユニットの欠損も小胞体経路に由来する葉緑体脂質の著しい減少をもたらすことから [21–25]、TGD 複合体は小胞体経路に不可欠な機能を果たしていると考えられる。TGD1 はパーミアーゼ様タンパク質、TGD3 は ATPase、TGD2 は PA 結合タンパク質であり、これらは細菌に存在する脂質輸送体 ABC トランスポーターのコンポーネントとそれぞれ相同である [23]。TGD1, TGD2, TGD3 は内包膜において複合体を形成するが、TGD4 は外包膜においてホモダイマーを形成する バレル型タンパク質であり、PA 結合能を有している [26,27]。TGD5 タンパク質は TGD1、TGD2、TGD3 および TGD4 と物理的に相互作用しており、TGD4 を TGD1、TGD2 および TGD3 と橋渡しして超複合体を形成することで内外包膜間領域を通過する脂質輸送を促進することが示唆されている [25]。TGD 複合体によって輸送される脂質は不明であるが、PA が最も可能性の高い候補である。*tgd4* 欠損変異体において PA の蓄積が見られ [26]、葉緑体膜脂質に占める PC の含有量が上昇することから [24]、TGD 複合体は葉緑体外包膜に輸送された PC がホスホリパーゼによって PA に変換された後に内包膜へ輸送するために必要である可能性がある。

小胞体と葉緑体はコンタクトサイトを通して物理的に相互作用していることが観察されている [28]。このようなコンタクトサイトは葉緑体から小胞体への脂肪酸の輸送や小胞体から葉緑体への脂質の輸送に関与していることが示唆されているが、小胞体と葉緑体とのコンタクトサイトがどのように形成されているかはまだ明らかにされていない。

1.4 植物に存在する START ドメイン含有タンパク質

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全体に幅広く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。

シロイヌナズナでは 35 の START タンパク質のうち 26 が追加のドメインを含んでいる (図 2) [29]。マルチドメイン START タンパク質の大半 (21/26) はホメオドメインロイシンジッパー (HD-Zip) を含んでおり、それ以外のグループ (4/26) は PH ドメインと機能未知ドメイン 1336 (DUF1336) を含んでいる。また、PH ドメインを欠く START-DUF1336 タンパク質も 1 つ存在している。START ドメインのアミノ酸配列に基づく系統関係はドメイン構造に基づくグループ分けと対応しており、これはドメインシャッフリングによって新しい構造の START タンパク質が誕生した後に遺伝子重複と分子進化が起きたことを示唆している。

シロイヌナズナの HD-Zip-START ドメイン含有転写因子はクラス III およびクラス IV の HD-Zip ファミリーに属しており、発生における細胞分化やパターン形成に重要な役割を果たしていることが示されている。クラス III の HD-Zip ファミリーには、維管束系、分裂組織の形成、または器官の極性に関与する 5 つのタンパク質が含まれている [30]。クラス IV の HD-Zip ファミリーは細胞の運命決定に関与する 16 のタンパク質から構成されており [31]、シュートの表皮細胞の運命決定に必要な ATML1 および PDF2 [32] や表皮細胞のトライコームなどへの特殊化を制御する GL2 [33] が含まれている。START-DUF1336 型タンパク質についての報告は少ないが、そのうちのひとつ EDR2 は病害抵抗性の制御におけるホルモンスIGNAL伝達に関与していることが示されている [34,35]。マルチドメイン START タンパク質における START ドメインの存在は、それぞれのタンパク質の活性が脂質によって制御される可能性を示唆している。すなわち、脂質結合によって誘導された構造変化を介して、DNA 結合能やタンパク質の安定性、核への輸送などに変化させることで、タンパク質の活性を制御できると考えられる。実際、HD-Zip-START 型タンパク質ならびに START-DUF1336 型タンパク質と相同な動物の START タンパク質はチオエステラーゼドメインをもっており [29]、この START ドメインは脂質との結合によってチオエステラーゼ活性をアロステリックに制御するという機能を果たしている [36]。これらのことから、植物に存在するマルチドメイン START タンパク質が細胞内脂質輸送に関与している可能性は低いと考えられる。

START ドメイン以外の機能ドメインを持たない START 単独タンパク質は、動物細胞において

細胞内脂質輸送を媒介する START タンパク質と相同であり [29]、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高いが、これらのタンパク質の機能についての報告はこれまでにない。上記のように、シロイヌナズナに存在する START タンパク質は遺伝子数が多く、START 単独タンパク質も 7 遺伝子が存在していることも機能解析を困難にしている一因であると考えられる (図 2)。

1.5 新しいモデル生物ゼニゴケ

陸上植物系統の基部に位置する苔類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) は、近年急速に実験手法やツールが整備されてきており、新たなモデル植物として注目されている。ゼニゴケは、陸上植物に共通している遺伝子の多くを保有しつつ、それらの冗長性が非常に低いことが明らかになっている [37]。シロイヌナズナなどの被子植物と比較した際のコケ植物の膜脂質の特徴として、ベタイン脂質 DGTS が存在する点と多量の C₂₀ 脂肪酸が含まれる点が挙げられる。DGTS は S-アデノシルメチオニンと DAG を前駆体として合成される糖とリン酸のどちらも含まないグリセロ脂質であり、緑藻・コケ植物・シダ植物に広く保存されている [38]。コケ植物において C₂₀ 脂肪酸は小胞体において合成されることが知られており [39]、ゼニゴケにおいては C₂₀ 脂肪酸の合成に関与する酵素が同定されている [40–42]。ゼニゴケにおける膜脂質代謝についてはこれまでにほとんど調べられていないが、ゼニゴケ培養細胞において存在する脂質クラスの組成および脂質クラスごとに sn-1,2 のそれぞれに結合している脂肪酸の組成が報告されている [43]。MGDG の sn-2 に結合している脂肪酸は約 90% が C₁₆ 脂肪酸であるが、残りの約 10% は C₁₈ および C₂₀ 脂肪酸によって構成されている [43]。小胞体で合成される脂質である PC および DGTS においては、sn-1 に結合している脂肪酸の 80–90% 程度が C₁₆ 脂肪酸によって構成され、sn-2 に結合している脂肪酸は約 90% が C₁₈ および C₂₀ 脂肪酸である [43]。

1.6 本研究の目的

前述のように、葉緑体の構造および機能を正常に保つためには葉緑体膜脂質の合成を適切に制御することが必要であると考えられる。葉緑体膜脂質合成においては小胞体経路が主要な経路としてはたらいっているが、その重要なステップである小胞体から葉緑体への脂質輸送過程については輸送される脂質分子の実体やそれに関与するタンパク質など不明な点が多く残されている。そこで本研究では、小胞体から葉緑体への脂質輸送を媒介するタンパク質を明らかにするため、脂質輸送活性をもつ START ドメインをもつタンパク質がこの過程に関与しているかを検討した。まず、遺伝学的冗長性の低い基部陸上植物ゼニゴケを用いて、脂質輸送への関与が考えられる START 単独タンパク質 3 種の細胞内局在を解析した。葉緑体包膜への局在を示した STAR2 タンパク質の機能を明らかにするため、欠損変異体を作成し、STAR2 の欠損が生育や葉緑体機能、脂質代謝等に与える影響を解析した。これらの解析により、STAR2 タンパク質が葉緑体脂質代謝において担っている役割の解明を目指した。

第2章 材料と方法

2.1 分子系統解析

Chlamydomonas reinhardtii, *Ostreococcus tauri*, *Ostreococcus lucimarinus*, *Klebsormidium flaccidum*, *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii*, *Arabidopsis thaliana* および *Oryza sativa* に存在する START 単独タンパク質のアミノ酸配列を Gclust サーバーより取得した（クラスター 2189 および 17097、"Gclust2012_42" データセット）[44]。ゼニゴケ *M. polymorpha* に存在する START 単独タンパク質のアミノ酸配列を Marpolbase (<https://marchantia.info/>) より取得した。アミノ酸配列のアラインメントを MAFFT (L-INS-i アルゴリズム、ver. 7.408) によって作成した [45]。アミノ酸配列アラインメントに基づき、PhyML (LG+G+I+F モデル、ver. 20120412) を用いて最尤系統樹の作成を行った [46]。

2.2 植物材料および生育条件

本研究の全体を通してゼニゴケ *M. polymorpha* の雄株である Takaragaike-1 (Tak-1) [47] を用いた。ゼニゴケ植物体は、オートクレーブ滅菌したセロハン (PT#300) を敷いた 5 mM MES-KOH (pH 5.7) および 1% (w/v) 寒天を含む half-strength Gamborg's B5 培地 [48] のプレート上において、22 °C、連続光 ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) のインキュベータ内で生育させた。リン欠乏条件下での生育のため、 NaH_2PO_4 の濃度を各所で示したとおりに調整した。脂質分析の際には、植物体を通常の B5 寒天培地上で 7 日間生育した後、 NaH_2PO_4 を含むあるいは含まない B5 寒天培地に移

してさらに 7 日間生育させた。

2.3 プラスミド作製

蛍光タンパク質を融合したタンパク質をゼニゴケに発現させるため、*EFl α* プロモーターをもつ発現ベクターである pMpGWB327 [49] を用い、タンパク質の C 末端に TagRFP を融合させた。STAR1 (Mp4g23140.1) および STAR2 (Mp8g16400.1)、STAR3 (Mp3g08750.1) の CDS 配列を、それぞれプライマーセット oTH77・83 および oTH79・80、oTH81・82 を用いた RT-PCR によって Tak-1 mRNA から増幅し、pENTR/D-TOPO ベクター (Thermo Fisher Scientific) にクローニングした。得られたコンストラクトを Gateway LR 反応によって pMpGWB327 ベクターに導入し、それぞれ pTH34 および pTH35、pTH36 を作製した。

葉緑体包膜に局在する蛍光タンパク質を発現させるため、*EFl α* プロモーター配列および NOS ターミネーター配列を伴った mCitrine の CDS 配列をそれぞれプライマーセット oTH301・306 および oTH302・303 を用いて pMpGWB350 ベクター [49] から PCR によって増幅し、*HindIII* および *EcoRI* によって切断した pUC19 ベクターに NEBuilder HiFi DNA Assembly (NEB) によってクローニングした。得られたプラスミドを pTH84 と命名した。ゼニゴケ SFR2 の葉緑体局在化配列 (Mp2g15680.1 の 1-40 コドン) をプライマーセット oTH311・312 を用いた RT-PCR によって Tak-1 mRNA から増幅し、*AfeI* によって切断した pTH84 に NEBuilder HiFi DNA Assembly によって導入し、pTH87 プラスミドを作製した。

STAR2 遺伝子を標的とする CRISPR ベクターを作製するため、pMpGE010 ベクター [50] を利用した。oTH73・74 をアニーリングさせたオリゴ DNA を *BsaI* によって切断した pMpGE_En03 ベクター [50] にライゲーション反応によって導入した。得られたコンストラクトを LR 反応によって pMpGE010 に導入し、pTH25 プラスミドを作製した。

2.4 パーティクルガンによる遺伝子導入

パーティクルガン (PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System, Bio Rad) を用いてゼニゴケへの遺伝子導入を行った。直径60 μm の金粒子0.6 mgに600 ngのプラスミドを含む水溶液10 μL を加えて超音波洗浄機により懸濁し、さらに2.5 M CaCl_2 10 μL および0.1 M spermidine 4 μL を加えて混和して30分間静置した。スピンドウンして上清を捨て、70% エタノール100 μL を加えて超音波洗浄機により懸濁し、再びスピンドウンして上清を捨てた。金粒子に100% エタノール15 μL を加えて超音波洗浄機により懸濁し、全量をマクロキャリアーに滴下した。エタノールを揮発させたマクロキャリアーを遺伝子導入に用いた。

Half-strength Gamborg's B5 培地において3-4日間生育させたTak-1 幼葉状体をPDS-1000に設置し、DNA-金粒子の射出を行った。射出時の条件はヘリウムガス圧900 psi、マクロキャリアーからサンプルまでの距離10 cm、減圧25 inch Hg。射出されたサンプルを22 $^{\circ}\text{C}$ 暗所で一晩静置したのち、共焦点顕微鏡による観察に用いた。

2.5 アグロバクテリウムによる遺伝子導入

G-AgarTap 法 [51] によりゼニゴケへの遺伝子導入を行った。導入するプラスミドを *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 株に形質転換し、LB 培地に懸濁して28 $^{\circ}\text{C}$ で3日間振盪培養を行った。アグロバクテリウムを集菌し、 $\text{OD}_{600} = 0.3$ となるよう形質転換バッファー (10 mM MgCl_2 , 10 mM MES-NaOH (pH 5.7), 0.15 mM acetosyringone, 0.01% Triton X-100) に懸濁して共培養液を作製した。

直径6 cm のシャーレに作製した1% ショ糖を含む10 mL の half-strength Gamborg's B5 培地上に20-30の無性芽を植え、2日間前培養したのち、共培養液1 mL をシャーレ上に広げて1分間静置した。シャーレを傾けて共培養液を除いたあと、シャーレにパラフィルムを巻いて22 $^{\circ}\text{C}$ 暗所で3日間共培養を行った。共培養後、培地表面のアグロバクテリウムを滅菌水で2回洗浄し、1 mg/mL

cefotaxime および終濃度の 10 倍の適当な抗生物質を含む滅菌水を 1 mL 注ぎ、サージカルテープを巻いて明所で培養した。抗生物質耐性をもつゼニゴケが現れたら、直径 9 cm のシャーレに作製した 100 µg/mL cefotaxime および適当な抗生物質を含む half-strength Gamborg's B5 培地に移し、さらに培養を続けた。この個体から得られた無性芽を同様に抗生物質を含む培地において選抜し、生存したものを形質転換株として用いた。最初の選抜において異なる無性芽から得られたものを独立した形質転換株とした。

2.6 STAR2 破壊株の作製

STAR2 遺伝子に変異を生じた株を作出するため、アグロバクテリウム法で pTH25 プラスミドを Tak-1 に導入した。形質転換体は 10 mg/L hygromycin B を含む B5 培地上で選抜した。

得られた形質転換体について、3 mm × 3 mm 程度の葉状体断片を 100 µL の DNA 抽出バッファ（100 mM Tris, 1 M KCl, 10 mM EDTA, pH 9.5）中で破碎し、95 °C で 10 分間加熱して DNA を抽出した。DNA 抽出液を蒸留水で 10 倍に希釈し、これを鋳型としてプライマーセット oTH158・159 を用いた PCR により CRISPR-Cas9 標的部位を含む領域を増幅した。PCR 酵素は MightyAmp DNA polymerase（東洋紡）を用いた。各形質転換体の増幅産物について oTH160 をプライマーとするサンガーシーケンシングを行い、CRISPR-Cas9 標的部位近傍の配列を決定した。STAR2 の第 3 エキソンに 2 塩基の欠損が導入された形質転換体を *star2-1* として実験に用いた。

2.7 star2-1 相補株の作製

star2-1 に由来する相補株を作出するため、アグロバクテリウム法で pTH35 プラスミドを *star2-1* 株に導入した。形質転換体は 0.5 µM chlorsulfuron を含む B5 培地上で選抜した。得られた形質転換体について、共焦点顕微鏡観察により STAR2-TagRFP の発現が確認されたものを実験に用いた。

2.8 共焦点顕微鏡観察

Nikon C2⁺ 共焦点顕微鏡 (Nikon) で観察を行った。mCitrine の蛍光シグナルは 488 nm 励起、500-550 nm フィルターで取得し、TagRFP の蛍光シグナルは 561 nm 励起、575-615 nm フィルターで取得し、クロロフィルの蛍光シグナルは 637 nm 励起、662-691 nm フィルターで取得した。

2.9 クロロフィル定量

クロロフィルを抽出するため、ゼニゴケ葉状体を 1 mL のジメチルホルムアミドに浸して 4℃ 暗所で一晩静置した。抽出液中のクロロフィル量は、Porra の方法 [52] に従い、V-370 BIO (JASCO) 吸光光度計によって 663.8 nm および 646.8 nm の吸光度を測定することで決定した。

2.10 パルス変調クロロフィル蛍光測定

IMAGING-PAM MAXI (WALZ) を用いて光合成量子収率を測定した。測定前に寒天培地上のゼニゴケ葉状体を室温で 15 分間暗順応させた。暗所において最小クロロフィル蛍光 (F_0) を測定したのち、飽和光パルス光照射によって最大クロロフィル蛍光 (F_m) を測定した。その後、定常蛍光 (F) を測定しながら励起光を 5 分間照射し、励起光の照射下で飽和光パルス光を照射して最大蛍光 (F_m') を測定した。励起光の強度を徐々に上昇させ、55, 110, 185, 280, 395, 530 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ において測定を行った。光化学系 II の実行量子収率は $Y(\text{II}) = (F_m' - F)/F_m'$ によって算出した [53]。IMAGING-PAM の測定パラメータは次の通り：measuring light intensity = 1, measuring light frequency = 2, damping = 2, gain = 1, saturation pulse intensity = 12。

2.11 定量的 RT-PCR

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いてゼニゴケ葉状体から全 RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent kit with gDNA eraser (タカラバイオ) によってゲノム DNA の除去と逆転写反応を行った。

Thunderbird SYBR qPCR Mix（東洋紡）を用いて、95 °C10 秒間の初期変性ののち95 °C5 秒間の変性と60 °C30 秒間の伸長のサイクルを 40 回繰り返して、cDNA を増幅した。PCR 反応と増幅産物の検出、解析は MiniOpticon（Bio Rad）を用いて各サンプルに対してデュプリケートで行った。転写産物レベルは発現レベルの安定性が確認されているアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ APT（Mp3g25140.1）およびアクチン ACT2（Mp6g11010.1）をレファレンス遺伝子として標準化した [54,55]。定量的 RT-PCR に用いたプライマーの配列は表 2 に示した。

2.12 脂質分析

200–500 mg のゼニゴケ葉状体から Bligh-Dyer 法により総脂質を抽出した [56]。葉状体を液体窒素により凍結させた状態で乳棒と乳鉢により破碎し、クロロホルム-メタノール（1:2）6 mL および 1 % KCl 1.2 mL を加えて脂質を抽出した。脂質抽出液にクロロホルム 2 mL と 1 % KCl 2 mL を加え、脂質を含む下層を回収して減圧遠心（30 °C、50 mm Hg）で揮発させた。乾固した脂質の重量を測定し、脂質が 10 mg/mL の濃度となるようクロロホルム-メタノール（2:1）を加えて溶解し、–20 °C で保存した。

脂質抽出液 50 μ L をシリカゲル 60 プレート（20 cm \times 20 cm）にアプライし、アセトン-ベンゼン-メタノール-水（8:3:2:1）を一次元目、クロロホルム-アセトン-メタノール-酢酸-水（10:4:2:3:1）を二次元目の展開溶媒とする二次元薄層クロマトグラフィーによって脂質を分離した [38]。展開後のプレートに 0.01 %（w/v）プリムリンを含む 80 %（v/v）アセトンを噴霧して 365 nm の紫外線照射下で脂質スポットを可視化し、シリカゲルを掻き取った。スポットのシリカゲルに 1 mM ペンタデカン酸ナトリウム（15:0）を含むトルエン 100 μ L と濃塩酸-メタノール（3:97）900 μ L を加え、45 °C で一晩静置して脂肪酸をメチルエステル化した [57]。反応後の液に蒸留水 100 μ L とヘキサン 1 mL を加え、脂肪酸メチルエステルを含むヘキサン層を回収した。窒素を吹き付けてヘキサン層を乾固させ、ヘキサン 20 μ L に再溶解し、うち 1 μ L をガスクロマトグラフでの分析に用いた。

脂肪酸メチルエステルは水素炎イオン化検出器とキャピラリーカラム（ULBON HR-SS-10、50 m

× 0.25 mm、Shinwa Chemical Co.) を装着したガスクロマトグラフ (GC-2014、島津製作所) を用いて分析した。カラム温度は180℃で 20 分間保持した後3℃/minの速度で210℃まで上昇させた。キャリアガスにはヘリウムを用い、線速度は3 cm/sとした。各ピークの同定は脂肪酸メチルエステル標準品 F.A.M.E.Mix C4-C24 (Sigma) との保持時間の比較により行い、内部標準として加えた 15:0 に基づいて定量を行った。

2.13 パルス・チェイス [¹⁴C] 標識実験

通常の B5 寒天培地上で 7 日間生育した後NaH₂PO₄ を含まない B5 寒天培地に移してさらに 7 日間生育させたゼニゴケ葉状体をNaH₂PO₄ を含まない B5 液体培地 (10 mM MES-KOH, pH 5.7) 25 mLに浸し、22℃、50 mol photons m⁻² s⁻¹ の白色光照射下で 30 分間振盪した。1 mCi/mL[2-¹⁴C] 酢酸ナトリウム (59 mCi/mmol、パーキンエルマー) を25 μLずつ加え (1 μCi/mL、17 μM)、15 分間振盪してパルス標識を行った。15 分後、コールドの5 M酢酸カリウムを25 μL加え (5 mM)、[2-¹⁴C] 酢酸を希釈してチェイスを開始した。チェイス開始から 0, 4, 8, 16, 24 時間後、それぞれ葉状体 1 個体を培地から取り出し、液体窒素で凍結させてからバイオマッシャー II (ニッピ) によって破碎し、Bligh-Dyer 法による脂質抽出を行った。抽出された脂質を濃縮ゾーン付きシリカゲルプレート (Merck) にアプライし、酢酸メチル-イソプロパノール-クロロホルム-メタノール-0.25 % KCl (25:25:20:10:4) で展開した [58]。標識された脂質のスポットをイメージングアナライザー BAS 2500 (富士フイルム) によって可視化した。展開後のプレートに 0.01% (w/v) プリムリンを含む80 % (v/v) アセトンを噴霧して 365 nm の紫外線照射下で脂質スポットを可視化し、スポットを掻き取って液体シンチレーションカウンター Tri-Carb 3180 TR/SL によって放射線量の定量を行った。

第3章 結果

3.1 植物 START 単独タンパク質の分子系統解析

植物に存在する START 単独タンパク質の冗長性を明らかにするため、緑色植物系統の START 単独タンパク質について、最尤法による分子系統解析を行った。その結果、緑藻 (*Chlamydomonas*, *Ostreococcus*) および基部ストレプト植物 (*Klebsormidium*) を除くと、植物の START 単独タンパク質は 3 つのクレード (clade 1-3) によって構成されていることが示された (図 3)。3 つのクレードのいずれについても、コケ植物 (*Physcomitrella*, *Marchantia*) およびシダ植物 (*Selaginella*)、被子植物 (*Arabidopsis*, *Oryza*) のホモログが含まれていた。クレード内部での系統関係は進化的な系統関係とおおよそ対応していることから、これらは共通祖先から継承されたものであると考えられた。これらのことは、3 つのクレードが陸上植物の共通祖先において生じたパラログであり、クレードによって異なる機能を持っていることを示唆している。緑藻のホモログは clade 1 と clade 2 の中間に位置し、これらは機能分化する前の祖先的な START 単独タンパク質であると考えられる。

シロイヌナズナの場合、ホモログは clade 1 に 2 遺伝子、clade 2 に 4 遺伝子、clade 3 に 1 遺伝子が存在するのに対し、ゼニゴケのホモログは各クレードに 1 遺伝子ずつ (*MpSTART1-3*) 存在していた (図 3)。クレード内部にホモログが複数存在するシロイヌナズナの場合、遺伝学的冗長性により機能解析が困難になる可能性が考えられることから、本研究ではゼニゴケを用いて解析を行うことにした。

3.2 ゼニゴケ START 単独タンパク質のドメイン構造

ゼニゴケに存在する 3 つの START 単独タンパク質を MpSTAR1 (Mp4g23140.1) および MpSTAR2 (Mp8g16400.1)、MpSTAR3 (Mp3g08750.1) と命名した。MpSTAR1-3 はそれぞれ系統樹の clade 1-3 に属している (図 3)。アミノ酸配列を見ると、MpSTAR3 はほぼ全長が START ドメインのみによって構成されているのに対して、MpSTAR1 および MpSTAR2 は START ドメインの N 末端側と C 末端側に機能ドメインを含まない延長配列が存在し、N 末端側には膜貫通領域が存在していた (図 4)。このようなドメイン構造は同じクレードに属する他の植物 START 単独タンパク質と共通しており、陸上植物においてクレードごとに機能が保存されていることが示唆された。TargetP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/cite.php>) [59] によって N 末端に局在化シグナル配列が存在するか調べたところ、MpSTAR1-3 のいずれにも明確な局在化シグナル配列は検出されなかった。

3.3 ゼニゴケ START 単独タンパク質の細胞内局在

オルガネラ間で脂質輸送を行うタンパク質の大半は、膜貫通領域によるアンカーや脂質結合ドメインによる膜との相互作用、膜タンパク質との相互作用などによって輸送対象の膜に局在しており、二つのオルガネラ膜のコンタクトサイトに局在するものも多い [60]。動物に存在する START ドメインタンパク質においても、小胞体とゴルジ体の間でセラミドを輸送する CERT はそれらのコンタクトサイトに局在しており [61]、小胞体とエンドソームの間でステロールを輸送する STARD3 についても同様である [62]。したがって、脂質輸送タンパク質の細胞内局在はその機能と密接な関係があると考えられる。

ゼニゴケの START 単独タンパク質が機能する細胞内コンパートメントを明らかにするため、蛍光タンパク質である TagRFP を C 末端に融合した MpSTAR タンパク質を発現するコンストラクトを作製し、パーティクルガンによってゼニゴケに導入して一過的に発現させ、共焦点顕微鏡によ

り蛍光シグナルを観察した。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 (図 5、図 7)。一方、STAR2-TagRFP の蛍光はクロロフィル蛍光の周辺にドット状のパターンとして観察された (図 6)。STAR2-TagRFP が葉緑体包膜に局在するか調べるため、ゼニゴケ SFR2 (Mp2g15680.1) の N 末端 40 アミノ酸を mCitrine と融合させたコンストラクトを作製し、STAR2-TagRFP 発現コンストラクトと同時に導入して観察を行った。SFR2 は葉緑体外包膜に局在するタンパク質であり、シロイヌナズナにおいて包膜へのターゲッティングには N 末端の 31 アミノ酸のみで十分であることが報告されている [63]。共発現した細胞を観察したところ、STAR2-TagRFP の蛍光は SFR2(1-40)-mCitrine の蛍光の一部と重なっていた (図 8)。これらの結果から、MpSTAR2 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。

以上の結果より、ゼニゴケ STAR2 が葉緑体と他のオルガネラの間での脂質輸送に関与している可能性が考えられたため、STAR2 の葉緑体脂質代謝における機能を解析することとした。

3.4 CRISPR-Cas9 システムによる *STAR2* 欠損変異体の作出

ゼニゴケ STAR2 の機能を明らかにするため、*STAR2* 遺伝子第 3 エキソンを標的とする CRISPR-Cas9 コンストラクトを作製し、Tak-1 に導入して形質転換体を作出した。得られた形質転換体の *STAR2* 遺伝子領域を PCR により増幅し、標的部位付近の配列をサンガーシーケンシングにより解析したところ、形質転換体 5 ラインのうち 2 ラインに変異が検出された (図 9)。検出された変異はともに同一箇所における 2 塩基の欠損であり、これによってリボソームの読み枠が変化した結果、第 3 エキソン内部に未成熟終止コドンが出現していた。この変異型アリルを *star2-1* と命名し、片方のライン (#3) を *star2-1* 株として解析することとした。この変異型遺伝子から翻訳される STAR2 タンパク質は START ドメインの半分以上をもたないことから、正常な機能を喪失していると考えられる。

3.5 STAR2 のリン欠乏条件での生育における機能

star2-1 株は通常の条件で生育させたとき形態や生育において顕著な異常を示さなかった (図 10)。シロイヌナズナなどの被子植物ではリン欠乏時に細胞内の脂質代謝が大きく変動することが知られており、葉緑体の脂質代謝に関係する酵素の変異体にもリン欠乏時にのみ異常を示すものが報告されている [7, 64]。ゼニゴケ野生株を 0–1.000 μM のリン酸を含む培地において生育させたところ、培地中のリン酸濃度が 100 μM を下回ると強い生育抑制が見られ、培地中のリン酸濃度がゼロである場合にはほとんど生育が見られなかった (図 11)。この結果を踏まえ、リン欠乏条件における STAR2 の機能を調べるため、野生株および *star2-1* 株を 1 mM あるいは 20 μM のリン酸を含む培地において生育させたところ、培地中のリン酸濃度が 1 mM の場合には生重量に差は見られなかったが、20 μM の場合には *star2-1* 株の生重量が有意に減少した (図 11)。これが *star2-1* 変異によって引き起こされたものであるか確かめるため、*EFL1* α プロモーターによって STAR2-TagRFP を発現するコンストラクトを *star2-1* 株に導入して相補株を作製した。*star2-1* 株のゲノムには CRISPR-Cas9 コンストラクトが残存しているが、ガイド RNA の標的を第 2 イントロンが第 3 エキソンにまたがるように設計しているため、STAR2 の cDNA 配列を利用したこのコンストラクトは切断対象とはならないと考えられた。顕微鏡観察によって STAR2-TagRFP の発現が確認された 2 つの相補株は、培地中のリン酸濃度が 20 μM の場合でも野生株に対して生重量の減少を示さなかった (図 11)。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、および相補株において発現した STAR2-TagRFP は正しく機能していることが示唆された。相補株を共焦点顕微鏡によって観察したところ、STAR2-TagRFP の蛍光は、パーティクルによって一過的に発現させた場合と同様、クロロフィル蛍光の周辺にドット状のパターンとして観察された (図 13)。

3.6 STAR2 の欠損が葉緑体機能に与える影響

star2-1 株がリン欠乏時に示した生育の遅延が葉緑体機能の異常によって引き起こされているかを明らかにするため、野生株および *star2-1* 株、2つの相補株をリン十分条件およびリン欠乏条件において生育させ、クロロフィルの定量と光合成量子収率の測定を行った。リン十分条件とリン欠乏条件の両方において、野生株と *star2-1* 株のあいだに総クロロフィル量およびクロロフィル *a/b* 比の差は見られなかった (図 14)。また、同様に、リン十分条件とリン欠乏条件の両方において、野生株と比較して *star2-1* 株の光化学系 II 実行量子収率は低下していなかった (図 15)。これらの結果より、*star2-1* 変異はリン欠乏時に葉緑体形成や光合成電子伝達系の機能にほとんど影響を与えないことが示された。

3.7 STAR2 のリン酸濃度による転写産物レベル制御

STAR2 の発現がリン欠乏時によって誘導されるかを明らかにするため、ゼニゴケ野生株を 1000 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 0 μ M のリン酸を含む培地において生育させ、定量的 RT-PCR により転写産物レベルを測定した。先行研究 [54] において報告されていた通り、構成的に発現している *EFl α* の転写産物レベルは培地中のリン酸濃度に影響されないのに対し、リン酸トランスポーター *PHT1.1* の転写産物レベルは培地中のリン酸濃度が低下するにつれて大きく上昇した (図 16)。一方、*STAR2* の転写産物レベルは培地中のリン酸濃度に影響されず一定であった (図 16)。リン欠乏時に活性化され膜脂質転換に寄与することが知られている DGTS 合成酵素 *BTAIL* [65] および SQDG 合成酵素 *SQD2* [7] は、リン酸濃度 1000 μ M と 100 μ M のあいだで転写産物レベルはあまり変化しなかったが、リン酸濃度 10 μ M 以下では著しい転写産物レベルの上昇を示した (図 16)。これらの結果から、リン欠乏に応答した膜脂質転換が誘導されるような生育環境においても *STAR2* の転写産物レベルは上昇せず、*STAR2* は構成的に発現していることが示された。

3.8 STAR2 の欠損が脂質組成に与える影響

STAR2 の欠損が脂質代謝に与える影響を明らかにするため、野生株および *star2-1* 株、相補株をリン十分条件およびリン欠乏条件において生育させ、脂質分析を行った。リン酸を含まない培地で生育させると、他の植物や藻類において観察されるのと同様に [66]、リン脂質の割合が低下し、リンを含まない脂質である DGDG、SQDG および DGTS の割合が上昇した (図 17)。リン欠乏条件において SQDG および DGTS の割合が上昇したことは、リン欠乏時にこれらの脂質の合成酵素をコードする遺伝子の転写産物レベルが大きく上昇したと整合している (図 16)。*star2-1* 株はリン十分条件とリン欠乏条件の両方において野生株と大きく変わらない脂質組成を示したが、相補株ではリン欠乏に応答した DGTS の増加と PC の減少が阻害されていた (図 17)。

脂質クラスごとの脂肪酸組成を見ると、野生型において、リン十分条件においては葉緑体糖脂質には 20:4 および 20:5 脂肪酸がほとんど含まれないが、リン欠乏条件においてはその割合が上昇していた (図 18)。脂肪酸の炭素数ごとの組成で表すと、C₂₀ 脂肪酸が糖脂質において占める割合はリン十分条件では 0–1 mol% であるのに対し、リン欠乏条件では 4 倍程度 (MGDG および DGDG では約 5 mol%、SQDG では約 1 mol%) に上昇していた (図 19)。C₂₀ 脂肪酸の割合の上昇は PG においては見られず、どちらの条件においてもほとんど含まれていなかった (図 18、図 19)。一方、*star2-1* 株において C₂₀ 脂肪酸が糖脂質に占める割合はリン十分条件では野生型と変わらないのに対し、リン欠乏条件では上昇が見られず、むしろ 0 mol% 程度にまで低下していた (図 19)。また、*star2-1* 株はリン欠乏時に DGDG において 16:0 の割合が上昇し、代わりに 18:3 の割合が低下していた (図 18)。STAR2-TagRFP を発現する相補株の脂肪酸組成は野生株とほとんど同じであったが、リン十分条件において MGDG および DGDG に占める C₂₀ 脂肪酸の割合が野生株の 1.5 倍程度に上昇していた (図 18、図 19)。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蓄積に必要であることを示している。また、相補株はリン欠乏条件において PG に占める 18:3 の割合が上昇し、18:0 および 18:2 の割合が低下していた (図 18)。葉緑体外の膜脂質における脂肪酸組成はリン十分条件とリン欠乏条件のどちらにおいても株間で大きな差は見られなかつ

た（図 20、図 21）。

3.9 STAR2 の欠損が脂質代謝フラックスに与える影響

本節の内容については、後日の出版を予定しているため省略する。

第4章 考察

4.1 ゼニゴケは植物に共通する START 単独タンパク質の最小セットを有している

分子系統解析の結果より、陸上植物の START 単独タンパク質は 3 つのグループに分類され、かつそれぞれのグループのホモログがコケ植物から被子植物まで保存されていることが示された (図 3)。ゼニゴケは 3 つのグループに 1 つずつホモログをもっていることから、START 単独タンパク質の機能解析に適していると考えられた。clade 1 と clade 2 の START 単独タンパク質のはアミノ酸配列の構造が類似しており、N 末端に膜貫通ドメインをもつのに対し、系統的に遠い clade 3 は START ドメインのみによって全長が構成されていた (4)。これら 3 つのグループのホモログが異なる機能を有しているかは不明であるが、少なくともゼニゴケにおいては STAR2 (clade 2) は他の 2 つとは異なる細胞内局在を示したことから機能的にも差があると考えられ、また STAR1 と STAR3 についてもそのドメイン構造の違いから異なる機能をもっている可能性が高いと考えられる。

4.2 ゼニゴケ STAR2 は葉緑体包膜上に点状の構造として存在する

パーティクルガンによって TagRFP 融合タンパク質として一過的に発現させて観察を行った結果、MpSTAR1 および MpSTAR3 の細胞膜に局在し、MpSTAR2 は葉緑体包膜上に点状の構造として存在することが示唆された (5-8)。前述のように、MpSTAR タンパク質はいずれも葉緑体移行シグナル配列を含んでいないことから、MpSTAR2 は葉緑体移行シグナルに依存しない経路で葉緑

体包膜へ輸送されているか、他のオルガネラ膜に輸送され、葉緑体外包膜上のタンパク質との相互作用によって葉緑体外包膜に局在していると考えられる。葉緑体移行シグナルに依存しない経路で葉緑体包膜に輸送される場合には内包膜ではなく外包膜へとターゲティングされることから、いずれの場合でも MpSTAR2 は外包膜上に存在していると推測される。葉緑体移行シグナル配列をもたないタンパク質が葉緑体外包膜にターゲティングされる機構として、N 末端の膜貫通領域が認識されるシグナルアンカー型と、C 末端の膜貫通領域が認識されるテイルアンカー型が知られている [67]。MpSTAR2 は N 末端に膜貫通領域をもつことから、MpSTAR2 はシグナルアンカー型タンパク質として葉緑体外包膜に輸送されている可能性がある。

MpSTAR2-TagRFP が示した点状の局在パターンは、小胞体-ミトコンドリア間のコンタクトサイトを形成する ERMES 複合体のような、オルガネラ間コンタクトサイトに局在するタンパク質のパターンに類似していた [68]。このことは、MpSTAR2 が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脂質輸送を行っている可能性を示唆している。脂質輸送タンパク質は膜と接触することで脂質輸送を行うため、2 つの異なる膜が近接した領域に局在することで輸送速度を向上させることができると考えられている。

4.3 STAR2 はリン欠乏条件における最適な生育に必要である

star2-1 株はリン十分条件では野生株と同様に生育するにも関わらず、リン欠乏条件では野生株より生育が阻害されることから、STAR2 はリン欠乏条件における最適な生育に必要であることが示された (図 10, 図 12)。生育阻害の原因として葉緑体機能異常の可能性が考えられたが、クロロフィル測定およびクロロフィル蛍光測定の結果より、葉緑体形成や光合成電子伝達系には大きな異常がないことが示唆された (図 14、図 15)。このことから、*star2-1* 株がリン欠乏時に示した生育阻害の原因は光合成能力の低下ではないと考えられるが、葉緑体における代謝など他の葉緑体機能に異常が生じている可能性は排除されていない。*star2-1* 株は脂質クラス組成において異常を示さなかったが (図 17)、リン欠乏時に葉緑体糖脂質の脂肪酸組成が C₂₀ 脂肪酸が蓄積しないという表

現型を示した（図 19）ことから、これが生育阻害の原因である可能性が考えられる。しかしながら、糖脂質の C₂₀ 脂肪酸は野生株においても 5% 程度しか存在しておらず、またリン十分条件においてはほとんど含まれていないことから、その変化が葉緑体の膜形成などに大きく影響を与えようとは考えにくい。

また、STAR2 の転写産物レベルが培地中のリン酸濃度の影響を受けなかったことから、STAR2 はリン欠乏に対する応答として転写活性化を受けるわけではないことが示された（図 16）。

4.4 STAR2 はリン欠乏条件における小胞体由来脂肪酸の葉緑体脂質への取り込みに必要である

star2-1 株の葉緑体糖脂質において C₂₀ 脂肪酸が占める割合が低下した原因としては、C₂₀ 脂肪酸の合成そのものの抑制か、合成された C₂₀ 脂肪酸の葉緑体脂質への取り込みの低下のどちらかが考えられるが、葉緑体外脂質において C₂₀ 脂肪酸の減少は観察されなかったことから、葉緑体脂質への取り込みが低下していることが示唆される。ゼニゴケにおいて C₂₀ 脂肪酸は小胞体においてのみ合成されると考えられており [39]、PC や PE といった葉緑体外の膜を構成する脂質において高い割合を占めている（図 21）。したがって、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。また、*star2-1* 株はリン欠乏時に DGDG の C₁₆ 脂肪酸（16:0）が減少し C₁₈ 脂肪酸（18:3）が増加したが（図 19）、このような変化は小胞体経路が阻害されるシロイヌナズナ *tgd* 変異体においても観察されている [21–23]。これらのことから、STAR2 を必要とする脂肪酸の取り込みは葉緑体脂質合成の小胞体経路に関与している可能性が考えられる。葉緑体経路のみによって合成され则认为られている PG の脂肪酸組成に *star2-1* 変異が影響を与えなかったこと（図 18）もこの仮説を支持している。

小胞体に由来する脂肪酸の葉緑体への取り込みはどのように行われているのだろうか？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よう。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

れると考えられている。動物の START ドメインタンパク質にはグリセロ脂質を輸送するものが存在することから [69]、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。また、*star2-1* 株ではリン欠乏条件においては葉緑体糖脂質に C₂₀ 脂肪酸がほとんど蓄積しないものの、リン十分条件においては全体の1%程度ではあるが野生株と同等の蓄積を示した (図 19)。このことは、小胞体から葉緑体へ脂肪酸を輸送する経路が複数存在することを示唆している。すなわち、リン十分条件においては主として STAR2 に依存しない経路によって輸送されているため *star2-1* 株においても差は見られず、リン欠乏条件においては STAR2 に依存する経路によって輸送されるために *star2-1* 株において糖脂質内の C₂₀ 脂肪酸の減少が見られるのだと考えられる。

4.5 STAR2 の欠損はリン欠乏条件において PC から MGDG への脂肪酸の移行を阻害する

本節の内容については、後日の出版を予定しているため省略する。

4.6 葉緑体脂質合成における小胞体経路の普遍性

被子植物においては、葉緑体脂質が色素体経路と小胞体経路のどちらによって合成されたかはグリセロール骨格の *sn*-2 に結合した脂肪酸の炭素数によって区別できる。すなわち、C₁₆ であれば色素体経路、C₁₈ であれば小胞体経路に、それぞれ由来する。ゼニゴケにおいては、MGDG の *sn*-2 のほとんどは C₁₆ 脂肪酸に占められているものの、割合は小さいが C₁₈ 脂肪酸および C₂₀ 脂肪酸も含まれており [43]、MGDG の一部は小胞体経路によって合成されていることが示唆されていた。本研究において得られた結果もゼニゴケにおける小胞体経路の存在を支持した。緑藻 *C. reinhardtii* がもつ MGDG の *sn*-2 は C₁₆ 脂肪酸しか含んでいないことから、緑藻には小胞体経路が存在しないと考えられてきた。しかし近年の研究により、*C. reinhardtii* においては小胞体で合成されたグリセロ脂質の一部は *sn*-2 に C₁₆ 脂肪酸を含んでおり、これが葉緑体に輸送されていることを示唆し

ている [70,71]。さらに、紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* においても葉緑体脂質合成に色素体経路と小胞体経路の両方を利用している可能性が高いと報告されている [72,73]。これらの研究は、葉緑体脂質合成における小胞体経路がコケ植物を含むアーケプラスチダ系統において広く保存されたものであることを示唆している。

4.7 まとめと今後の展望

本研究では、小胞体から葉緑体への脂質輸送を媒介するタンパク質を明らかにするため、脂質輸送活性をもつ START ドメインを有するタンパク質がこの過程に関与しているかを検討した。細胞内脂質輸送に関与していると予想された START 単独タンパク質について分子系統解析を行い、植物の START 単独タンパク質が 3 グループに別れており、それぞれのホモログが陸上植物全体において保存されていることを明らかにした。各グループに 1 遺伝子ずつしかホモログをもたないゼニゴケを用いて、それぞれのタンパク質の細胞内局在を解析したところ、そのうちのひとつである STAR2 が葉緑体包膜上に点状の構造として存在していることが明らかとなった。このような局在はオルガネラ間脂質輸送に関与するタンパク質にしばしば見られるものであったことから、STAR2 タンパク質の葉緑体脂質代謝における機能を解析することにした。STAR2 欠損変異体は通常条件においては大きな異常を示さなかったが、リン欠乏条件において生育遅延を示した。STAR2 欠損変異体はクロロフィルの蓄積や光合成電子伝達に異常が見られなかったため、葉緑体の機能が大きく損なわれているわけではないことが示された。脂質分析を行ったところ、野生株においては、リン欠乏に応答して、小胞体において合成される C₂₀ 脂肪酸が葉緑体糖脂質に蓄積する現象が見られたが、STAR2 欠損変異体ではこの応答が全く見られなかった。このことから、STAR2 はリン欠乏時に小胞体由来の脂質が葉緑体に取り込まれるのに必要であることが示唆された。また、脂肪酸のパルス・チェイス標識実験により、STAR2 欠損変異体では小胞体経路が反映されと考えられる時間帯において野生株より MGDG への放射能の取り込みが低下し、逆に PC において野生株より高い放射能の蓄積が観察された。このことから、STAR2 欠損変異体においては PC に取り込

まれた脂肪酸が MGDG に移行する小胞体経路が阻害されていることが示唆された。

以上の結果より、リン欠乏条件におかれたゼニゴケにおいて、STAR2 は PC 分子を小胞体から葉緑体包膜へ輸送することで小胞体経路を成立させているという仮説が考えられた (図 22)。動物の START タンパク質には PC 輸送活性を持つものが複数報告されていることから [69,74]、ゼニゴケ STAR2 が PC 輸送活性をもつ可能性は十分に考えられる。この仮説を検証するためには、STAR2 の START ドメインが結合する脂質の同定や、*in vitro* での脂質輸送活性の測定が必要になると考えられる。また、STAR2 の膜貫通ドメインはいかなる膜にアンカーされているのか、葉緑体包膜上でドット状に分布するメカニズムは何かなど、STAR2 の細胞内局在についても不明な点は多い。

遺伝子の欠損により小胞体経路に異常を引き起こす因子はこれまでに複数発見されているが、その中で実際に脂質輸送活性を有していることが示されたタンパク質はこれまでに報告されていない。STAR2 が媒介する脂質輸送を解析することで、小胞体経路のメカニズムや生理的意義の解明に近づくことができると期待される。

参考文献

- [1] Georg Hölzl and Peter Dörmann. Chloroplast lipids and their biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 70(1):51–81, 4 2019.
- [2] Miki Hagio, Zoltán Gombos, Zsuzsanna Várkonyi, Kazumori Masamoto, Norihiro Sato, Mikio Tsuzuki, and Hajime Wada. Direct evidence for requirement of phosphatidylglycerol in photosystem II of photosynthesis. *Plant Physiology*, 124(2):795–804, 10 2000.
- [3] Miki Hagio, Isamu Sakurai, Shusei Sato, Tomohiko Kato, Satoshi Tabata, and Hajime Wada. Phosphatidylglycerol is essential for the development of thylakoid membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 43(12):1456–1464, 12 2002.
- [4] Sho Fujii, Koichi Kobayashi, Noriko Nagata, Tatsuru Masuda, and Hajime Wada. Monogalactosyldiacylglycerol facilitates synthesis of photoactive protochlorophyllide in etioplasts. *Plant Physiology*, 174(4):2183–198, 8 2017.
- [5] Sho Fujii, Koichi Kobayashi, Noriko Nagata, Tatsuru Masuda, and Hajime Wada. Digalactosyldiacylglycerol is essential for organization of the membrane structure in etioplasts. *Plant Physiology*, 177(4):1487–1497, 8 2018.
- [6] Sho Fujii, Noriko Nagata, Tatsuru Masuda, Hajime Wada, and Koichi Kobayashi. Galactolipids are essential for internal membrane transformation during etioplast-to-chloroplast differentiation. *Plant and Cell Physiology*, 60(6):1224–1238, 6 2019.
- [7] Bin Yu, Changcheng Xu, and Christoph Benning. *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding

- sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8):5732–5737, 2002.
- [8] Margrit Frentzen, Ernst Heinz, Thomas A. McKeon, and Paul K. Stumpf. Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*, 129(3):629–636, 3 2005.
 - [9] Grattan Roughan and Roger Slack. Glycerolipid synthesis in leaves. *Trends in Biochemical Sciences*, 9(9):383–386, 9 1984.
 - [10] Nannan Li, Irene Luise Gügel, Patrick Giavalisco, Viktoria Zeisler, Lukas Schreiber, Jürgen Soll, and Katrin Philippar. FAX1, a novel membrane protein mediating plastid fatty acid export. *PLOS Biology*, 13(2):e1002053, 2 2015.
 - [11] John Browse, Ljerka Kunst, Shawn Anderson, Suzanne Hugly, and Chris Somerville. A mutant of *Arabidopsis* deficient in the chloroplast 16:1/18:1 desaturase. *Plant Physiology*, 90(2):522–529, 6 1989.
 - [12] Sébastien Mongrand, Jean Jacques Bessoule, Francis Cabantous, and Claude Cassagne. The C(16:3)/C(18:3) fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry*, 49(4):1049–1064, 1998.
 - [13] John Browse and Chris Somerville. Glycerolipid synthesis: Biochemistry and regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1):467–506, 6 1991.
 - [14] A. Oursel, A. Escoffier, J.C. Kader, J.P. Dubacq, and A. Trémolières. Last step in the cooperative pathway for galactolipid synthesis in spinach leaves: Formation of monogalactosyldiacylglycerol with C18 polyunsaturated acyl groups at both carbon atoms of the glycerol. *FEBS Letters*, 219(2):393–399, 7 1987.
 - [15] Mats X. Andersson, J.Magnus Kjellberg, and Anna Stina Sandelius. The involvement of cytosolic lipases in converting phosphatidyl choline to substrate for galactolipid synthesis in the chloroplast envelope. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1684(1-

3):46–53, 8 2004.

- [16] Congfei Yin, Mats X. Andersson, Hongsheng Zhang, and Henrik Aronsson. Phosphatidylcholine is transferred from chemically-defined liposomes to chloroplasts through proteins of the chloroplast outer envelope membrane. *FEBS Letters*, 589(1):177–181, 2015.
- [17] Sébastien Mongrand, Claude Cassagne, and Jean-Jacques Bessoule. Import of lyso-phosphatidylcholine into chloroplasts likely at the origin of eukaryotic plastidial lipids. *Plant Physiology*, 122(3):845–852, 3 2000.
- [18] J.Magnus Kjellberg, Marc Trimborn, Mats Andersson, and Anna Stina Sandelius. Acyl-CoA dependent acylation of phospholipids in the chloroplast envelope. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1485(2-3):100–110, 5 2000.
- [19] Dirk Jessen, Charlotte Roth, Marcel Wiermer, and Martin Fulda. Two activities of long-chain acyl-coenzyme A synthetase are involved in lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 167(2):351–366, 2014.
- [20] Nischal Karki, Brandon S. Johnson, and Philip David Bates. Metabolically distinct pools of phosphatidylcholine are involved in trafficking of fatty acids out of and into the chloroplast for membrane production. *The Plant Cell*, 31(11):tpc.00121.2019, 9 2019.
- [21] Changcheng Xu, Jilian Fan, Wayne Riekhof, John E Froehlich, and Christoph Benning. A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in *Arabidopsis*. *The EMBO journal*, 22(10):2370–9, 5 2003.
- [22] K. Awai, C. Xu, B. Tamot, and C. Benning. A phosphatidic acid-binding protein of the chloroplast inner envelope membrane involved in lipid trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(28):10817–10822, 7 2006.
- [23] Binbin Lu, Changcheng Xu, Koichiro Awai, A. Daniel Jones, and Christoph Benning. A small ATPase protein of *Arabidopsis*, TGD3, involved in chloroplast lipid import. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49):35945–35953, 2007.

- [24] Changcheng Xu, Jilian Fan, Adam J Cornish, and Christoph Benning. Lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in *Arabidopsis* requires the extraplastidic TGD4 protein. *The Plant Cell*, 20(8):2190–2204, 8 2008.
- [25] J Fan, Z Zhai, C Yan, and C Xu. *Arabidopsis* TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL5 Interacts with TGD1, TGD2, and TGD4 to facilitate lipid transfer from the endoplasmic reticulum to plastids. *Plant Cell*, 27(10):2941–2955, 2015.
- [26] Zhen Wang, Changcheng Xu, and Christoph Benning. TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein. *Plant Journal*, 70(4):614–623, 2012.
- [27] Zhen Wang, Nicholas Scott Anderson, and Christoph Benning. The phosphatidic acid binding site of the arabidopsis trigalactosyldiacylglycerol 4 (TGD4) protein required for lipid import into chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 288(7):4763–4771, 2013.
- [28] Mats X. Andersson, Mattias Goksör, and Anna Stina Sandelius. Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2):1170–1174, 2007.
- [29] Kathrin Schrick, Diana Nguyen, Wojciech M Karlowski, and Klaus F X Mayer. START lipid/sterol-binding domains are amplified in plants and are predominantly associated with homeodomain transcription factors. *Genome Biology*, 5(6):R41, 2004.
- [30] Michael J Prigge, Denichiro Otsuga, José M Alonso, Joseph R Ecker, Gary N Drews, and Steven E Clark. Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 17(1):61–76, 2005.
- [31] Miyuki Nakamura, Hiroshi Katsumata, Mitsutomo Abe, Naoto Yabe, Yoshibumi Komeda, Kotaro T Yamamoto, and Taku Takahashi. Characterization of the class IV homeodomain-Leucine zipper gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141(4):1363–1375, 2006.
- [32] Mitsutomo Abe, Hiroshi Katsumata, Yoshibumi Komeda, and Taku Takahashi. Regulation of

- shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in *Arabidopsis*, 2003.
- [33] William G Rerie, Kenneth A Feldmann, and M David Marks. The GLABRA2 gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 8(12):1388–1399, 1994.
- [34] Dingzhong Tang, Jules Ade, Catherine A. Frye, and Roger W. Innes. Regulation of plant defense responses in *Arabidopsis* by EDR2, a PH and START domain-containing protein. *Plant Journal*, 44(2):245–257, 2005.
- [35] Sonja Vorwerke, Celine Schiff, Marjorie Santamaria, Serry Koh, Marc Nishimura, John Vogel, Chris Somerville, and Shauna Somerville. EDR2 negatively regulates salicylic acid-based defenses and cell death during powdery mildew infections of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 7(1):35, 2007.
- [36] Matthew C Tillman, Norihiro Imai, Yue Li, Manoj Khadka, C Denise Okafor, Puneet Juneja, Akshitha Adhiyaman, Susan J Hagen, David E Cohen, and Eric A Ortlund. Allosteric regulation of thioesterase superfamily member 1 by lipid sensor domain binding fatty acids and lysophosphatidylcholine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(36):22080–22089, 2020.
- [37] John L. Bowman, Takayuki Kohchi, Katsuyuki T. Yamato, Jerry Jenkins, Shengqiang Shu, Kimitsune Ishizaki, Shohei Yamaoka, Ryuichi Nishihama, Yasukazu Nakamura, Frédéric Berger, Catherine Adam, Shiori Sugamata Aki, Felix Althoff, Takashi Araki, Mario A. Arteaga-Vazquez, Sureshkumar Balasubramanian, Kerrie Barry, Diane Bauer, Christian R. Boehm, Liam Briginshaw, Juan Caballero-Perez, Bruno Catarino, Feng Chen, Shota Chiyoda, Mansi Chovatia, Kevin M. Davies, Mihails Delmans, Taku Demura, Tom Dierschke, Liam Dolan, Ana E. Dorantes-Acosta, D. Magnus Eklund, Stevie N. Florent, Eduardo Flores-Sandoval, Asao Fujiyama, Hideya Fukuzawa, Bence Galik, Daniel Grimanelli, Jane Grimwood, Ueli Grossniklaus, Takahiro Hamada, Jim Haseloff, Alexander J. Hetherington, Asuka Higo, Yuki Hirakawa, Hope N. Hund-

- ley, Yoko Ikeda, Keisuke Inoue, Shin-ichiro Inoue, Sakiko Ishida, Qidong Jia, Mitsuru Kakita, Takehiko Kanazawa, Yosuke Kawai, Tomokazu Kawashima, Megan Kennedy, Keita Kinose, Toshinori Kinoshita, Yuji Kohara, Eri Koide, Kenji Komatsu, Sarah Kopischke, Minoru Kubo, Junko Kyoizuka, Ulf Lagercrantz, Shih-Shun Lin, Erika Lindquist, Anna M. Lipzen, Chia-Wei Lu, Efraín De Luna, Robert A. Martienssen, Naoki Minamino, Masaharu Mizutani, Miya Mizutani, Nobuyoshi Mochizuki, Isabel Monte, Rebecca Mosher, Hideki Nagasaki, Hirofumi Nakagami, Satoshi Naramoto, Kazuhiko Nishitani, Misato Ohtani, Takashi Okamoto, Masaki Okumura, Jeremy Phillips, Bernardo Pollak, Anke Reinders, Moritz Rövekamp, Ryosuke Sano, Shinichiro Sawa, Marc W. Schmid, Makoto Shirakawa, Roberto Solano, Alexander Spunde, Noriyuki Suet-sugu, Sumio Sugano, Akifumi Sugiyama, Rui Sun, Yutaka Suzuki, Mizuki Takenaka, Daisuke Takezawa, Hirokazu Tomogane, Masayuki Tsuzuki, Takashi Ueda, Masaaki Umeda, John M. Ward, Yuichiro Watanabe, Kazufumi Yazaki, Ryusuke Yokoyama, Yoshihiro Yoshitake, Izumi Yotsui, Sabine Zachgo, and Jeremy Schmutz. Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell*, 171(2):287–304, 10 2017.
- [38] Naoki Sato and Masaki Furuya. Distribution of diacylglyceryltrimethylhomoserine and phosphatidylcholine in non-vascular green plants. *Plant Science*, 38(2):81–85, 3 1985.
- [39] Lu, Eiriksson, Thorsteinsdóttir, and Simonsen. Valuable fatty acids in bryophytes—production, biosynthesis, analysis and applications. *Plants*, 8(11):524, 11 2019.
- [40] Masataka Kajikawa, Katsuyuki T Yamato, Yoshito Kohzu, Masutoshi Nojiri, Eiji Sakuradani, Sakayu Shimizu, Yasuyoshi Sakai, Hideya Fukuzawa, and Kanji Ohyama. Isolation and characterization of delta(6)-desaturase, an ELO-like enzyme and delta(5)-desaturase from the liverwort *Marchantia polymorpha* and production of arachidonic and eicosapentaenoic acids in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Plant Mol. Biol.*, 54(3):335–352, 2004.
- [41] Masataka Kajikawa, Katsuyuki T Yamato, Yasuyoshi Sakai, Hideya Fukuzawa, Kanji Ohyama, and Takayuki Kohchi. Isolation and functional characterization of fatty acid $\Delta 5$ -elongase gene

- from the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *FEBS Letters*, 580(1):149–154, 1 2006.
- [42] Masataka Kajikawa, Matsui Keisuke, Misa Ochiai, Yoshikazu Tanaka, Yoichi Kita, Masao Ishimoto, Yoshito Kohzu, Shin-ichiro Shoji, Katsuyuki T Yamato, Kanji Ohyama, Hideya Fukuzawa, and Takayuki Kohchi. Production of arachidonic and eicosapentaenoic acids in plants using bryophyte fatty acid $\Delta 6$ -desaturase, $\Delta 6$ -elongase, and $\Delta 5$ -desaturase Genes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(2):435–444, 2 2008.
- [43] Naoki Sato and Kenji Kato. Analysis and biosynthesis of diacylglycerol-*N,N,N*-trimethylhomoserine in the cells of *Marchantia* in suspension culture. *Plant Science*, 55(1):21–25, 1 1988.
- [44] Naoki Sato. Gclust: Trans-kingdom classification of proteins using automatic individual threshold setting. *Bioinformatics*, 25(5):599–605, 2009.
- [45] Kazutaka Katoh and Daron M. Standley. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4):772–780, 2013.
- [46] Stéphane Guindon, Jean-François Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, and Olivier Gascuel. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3):307–321, 3 2010.
- [47] Kimitsune Ishizaki, Shota Chiyoda, Katsuyuki T Yamato, and Takayuki Kohchi. *Agrobacterium*-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. *Plant and Cell Physiology*, 49(7):1084–1091, 7 2008.
- [48] O.L. Gamborg, R.A. Miller, and K Ojima. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1):151–158, 4 1968.
- [49] Kimitsune Ishizaki, Ryuichi Nishihama, Minoru Ueda, Keisuke Inoue, Sakiko Ishida, Yoshiki Nishimura, Toshiharu Shikanai, and Takayuki Kohchi. Development of gateway binary vector series with four different selection markers for the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLoS ONE*,

10(9):e0138876, 9 2015.

- [50] Shigeo S Sugano, Ryuichi Nishihama, Makoto Shirakawa, Junpei Takagi, Yoriko Matsuda, Sakiko Ishida, Tomoo Shimada, Ikuko Hara-Nishimura, Keishi Osakabe, and Takayuki Kohchi. Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*. *PLOS ONE*, 13(10):e0205117, 10 2018.
- [51] Shoko Tsuboyama, Satoko Nonaka, Hiroshi Ezura, and Yutaka Kodama. Improved G-AgarTrap: A highly efficient transformation method for intact gemmalings of the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Scientific Reports*, 8(1):10800, 2018.
- [52] R.J. Porra, W.A. Thompson, and P.E. Kriedemann. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 975(3):384–394, 8 1989.
- [53] David M. Kramer, Giles Johnson, Olavi Kiiirats, and Gerald E. Edwards. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*, 79(2):209–218, 2004.
- [54] Denis Saint-Marcoux, Hélène Proust, Liam Dolan, and Jane A Langdale. Identification of reference genes for real-time quantitative PCR experiments in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLoS ONE*, 10(3):e0118678, 2015.
- [55] Jo Vandesompele, Katleen De Preter, ilip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, Anne De Paepe, and rank Speleman. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(711):34–1, 2002.
- [56] E. G. Bligh and W. J. Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8):911–917, 8 1959.
- [57] Ken’ichi Ichihara and Yumeto Fukubayashi. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*, 51(3):635–640, 3 2010.

- [58] Astrid Vieler, Christian Wilhelm, Reimund Goss, Rosmarie Süss, and Jürgen Schiller. The lipid composition of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the diatom *Cyclotella meneghiniana* investigated by MALDI-TOF MS and TLC. *Chemistry and Physics of Lipids*, 150(2):143–55, 12 2007.
- [59] Jose Juan Almagro Armenteros, Marco Salvatore, Olof Emanuelsson, Ole Winther, Gunnar Von Heijne, Arne Elofsson, and Henrik Nielsen. Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Science Alliance*, 2(5), 2019.
- [60] Louise H Wong, Alberto T Gatta, and Tim P Levine. Lipid transfer proteins: the lipid commute via shuttles, bridges and tubes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(2):85–101, 2019.
- [61] Miyuki Kawano, Keigo Kumagai, Masahiro Nishijima, and Kentaro Hanada. Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *Journal of Biological Chemistry*, 281(40):30279–30288, 2006.
- [62] Fabien Alpy, Adrien Rousseau, Yannick Schwab, François Legueux, Isabelle Stoll, Corinne Wendling, Coralie Spiegelhalter, Pascal Kessler, Carole Mathelin, Marie Christine Rio, Timothy P Levine, and Catherine Tomasetto. STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *Journal of Cell Science*, 126(23):5500–5512, 2013.
- [63] Nicolas Fourrier, Jocelyn Bédard, Enrique Lopez-Juez, Adrian Barbrook, John Bowyer, Paul Jarvis, Gareth Warren, and Glenn Thorlby. A role for SENSITIVE to FREEZING2 in protecting chloroplasts against freeze-induced damage in Arabidopsis. *Plant Journal*, 55(5):734–745, 9 2008.
- [64] Y. Nakamura, R. Koizumi, G. Shui, M. Shimojima, M. R. Wenk, T. Ito, and H. Ohta. *Arabidopsis* lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(49):20978–20983, 2009.
- [65] Hiroki Murakami, Takashi Nobusawa, Koichi Hori, Mie Shimojima, and Hiroyuki Ohta. Betaine

- lipid is crucial for adapting to low temperature and phosphate deficiency in nannochloropsis. *Plant Physiology*, 177(1):181–193, 2018.
- [66] Barbara Kalisch, Peter Dörmann, and Georg Hölzl. DGDG and glycolipids in plants and algae. In Yuki Nakamura and Yonghua Li-Beisson, editors, *Lipids in Plant and Algae Development. Subcellular Biochemistry*, vol 86, pages 51–83. Springer International Publishing, Cham, 2016.
- [67] Junho Lee, Dae Heon Kim, and Inhwan Hwang. Specific targeting of proteins to outer envelope membranes of endosymbiotic organelles, chloroplasts, and mitochondria, 2014.
- [68] Benoît Kornmann, Erin Currie, Sean R Collins, Maya Schuldiner, Jodi Nunnari, Jonathan S Weissman, and Peter Walter. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*, 325(5939):477–481, 7 2009.
- [69] Yasuhiro Horibata and Hiroyuki Sugimoto. StarD7 mediates the intracellular trafficking of phosphatidylcholine to mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10):7358–7365, 2010.
- [70] Jaruswan Warakanont, Chia-Hong Tsai, Elena J. S. Michel, George R. Murphy, Peter Y. Hsueh, Rebecca L. Roston, Barbara B. Sears, and Christoph Benning. Chloroplast lipid transfer processes in *Chlamydomonas reinhardtii* involving a TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL 2 (TGD2) orthologue. *The Plant Journal*, 84(5):1005–1020, 12 2015.
- [71] Yeongho Kim, Ee Leng Terng, Wayne R Riekhof, Edgar B Cahoon, and Heriberto Cerutti. Endoplasmic reticulum acyltransferase with prokaryotic substrate preference contributes to triacylglycerol assembly in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(7):1652–1657, 2 2018.
- [72] Naoki Sato and Takashi Moriyama. Genomic and biochemical analysis of lipid biosynthesis in the unicellular rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae*: Lack of a plastidic desaturation pathway results in the coupled pathway of galactolipid synthesis. *Eukaryotic Cell*, 6(6):1006–1017, 6 2007.
- [73] Natsumi Mori, Takashi Moriyama, and Naoki Sato. Uncommon properties of lipid biosynthesis of

- isolated plastids in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *FEBS Open Bio*, 9(1):114–128, 1 2019.
- [74] Steven L Roderick, Wayne W Chan, Diana S Agate, Laurence R Olsen, Matt W Vetting, K.R. Rajashankar, and David E Cohen. Structure of human phosphatidylcholine transfer protein in complex with its ligand. *Nature Structural Biology*, 9(7):507–511, 6 2002.
- [75] Anders Krogh, Björn Larsson, Gunnar Von Heijne, and Erik L L Sonnhammer. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3):567–580, 2001.

图表

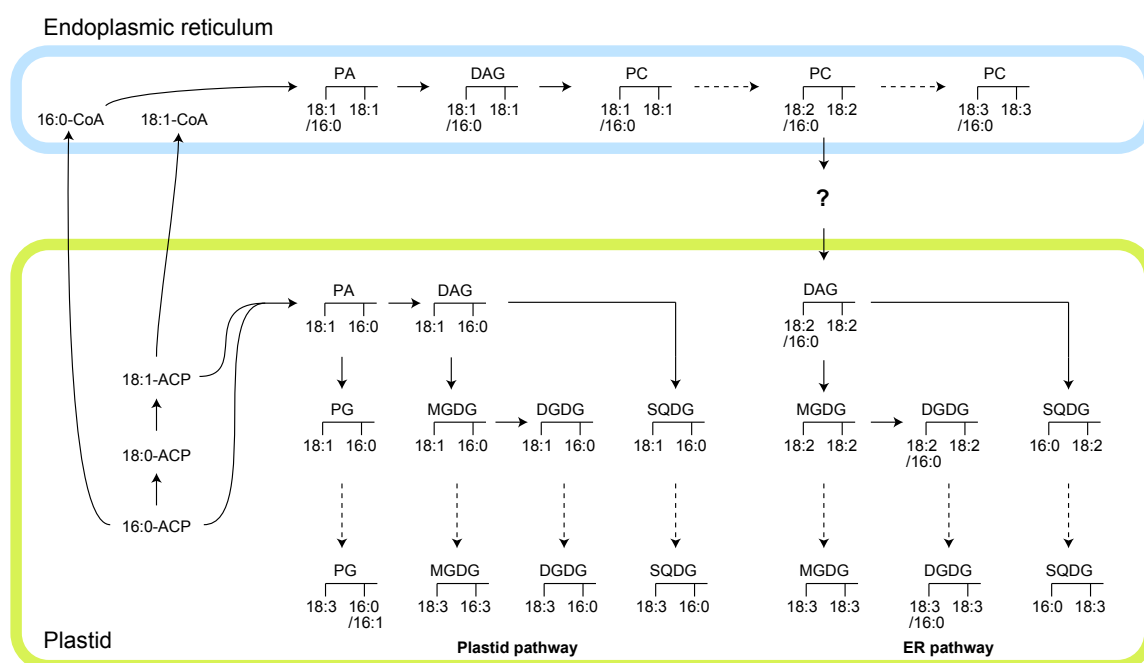


図1 シロイヌナズナの葉におけるグリセロ脂質合成の概略図 (Ohlrogge と Browse による論文の Fig. 5 を改変して作成 [13])

各脂質の脂肪酸は左側が *sn*-1 位、右側が *sn*-2 位に結合したものを示す。点線は脂肪酸不飽和化反応を示す。

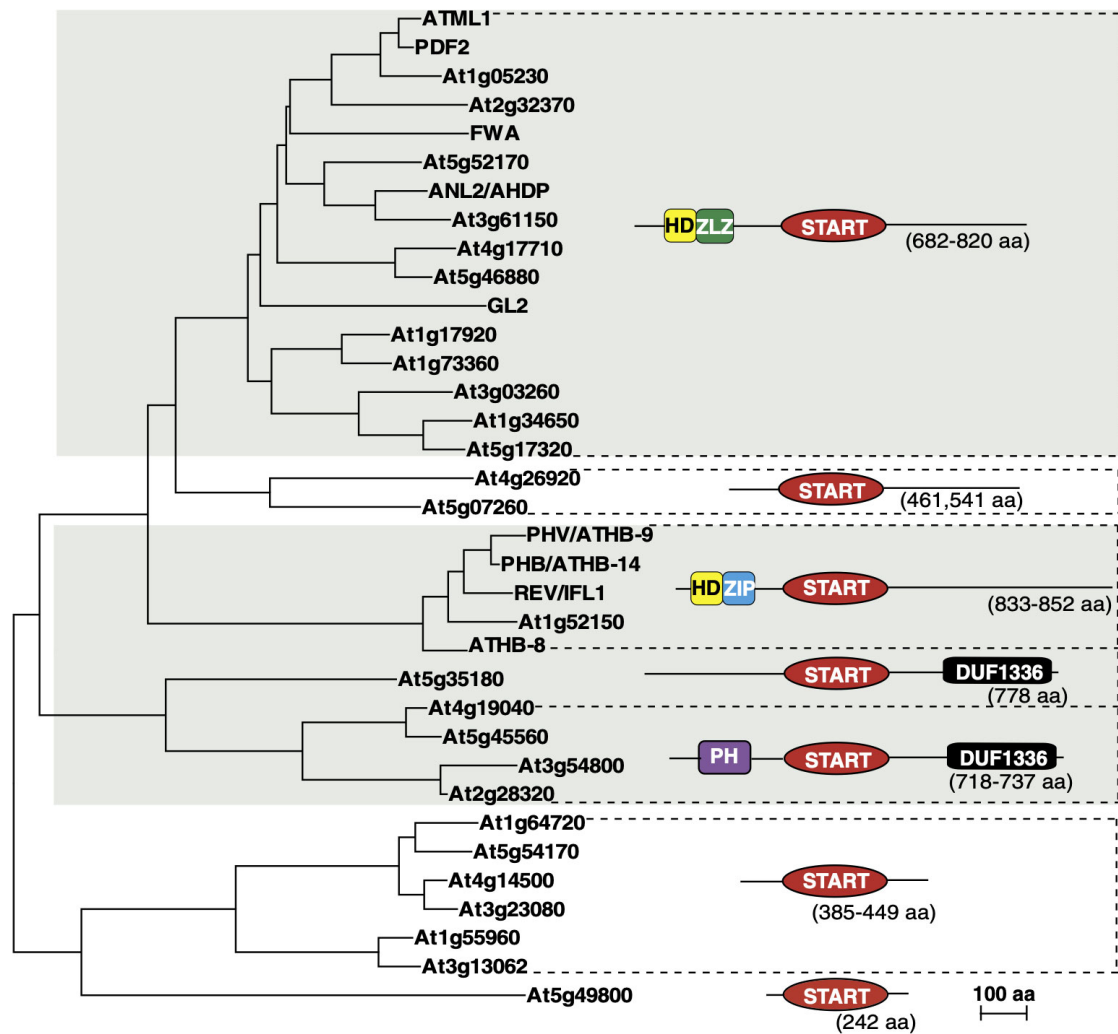


図2 シロイヌナズナに存在する START ドメインタンパク質の系統関係 (Schirick らの論文の Fig. 2A より引用 [29])

シロイヌナズナに存在する 35 の START タンパク質の START ドメイン配列の近隣結合系統樹。HD：ホメオドメイン、ZIP：ロイシンジッパーモチーフ、ZLZ：ジッパー-ループ-ジッパーモチーフ。PH：PH ドメイン。

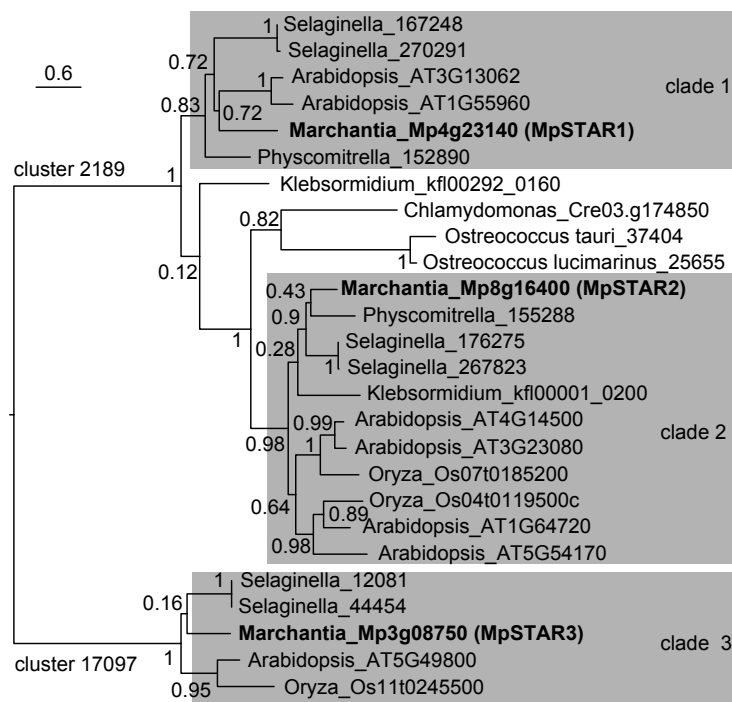


図3 植物 START 単独タンパク質の系統樹

Arabidopsis thaliana (シロイヌナズナ) および *Oryza sativa* (イネ)、*Selaginella moellendorffii* (イヌカタヒバ)、*Marchantia polymorpha* (ゼニゴケ)、*Physcomitrella patens* (ヒメツリガネゴケ)、*Klebsormidium nitens* (クレブソルミディウム)、*Chlamydomonas reinhardtii* (クラミドモナス)、*Ostreococcus tauri*、*Ostreococcus lucimarinus* (オストレオコッカス) に存在する START 単独タンパク質のアミノ酸配列に基づいて系統解析を行った。系統樹は最尤法により推定されたもので、各分岐の数字は分岐の信頼度を表している。左上のバーは進化距離のスケール。

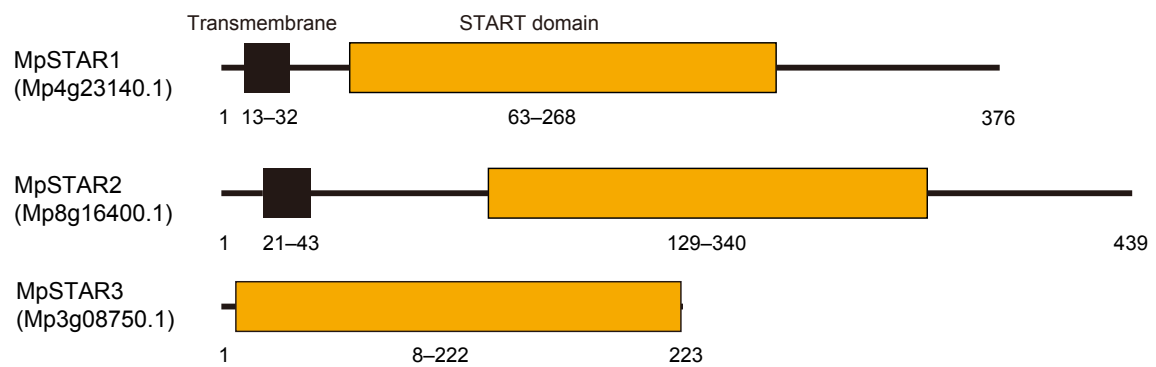


図4 ゼニゴケ START 単独タンパク質のドメイン構造

ゼニゴケに存在する3つのSTART単独タンパク質について、STARTドメインと膜貫通領域を示した。STARTドメイン領域は Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) によって推定し、膜貫通領域は TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) [75] によって予測した。

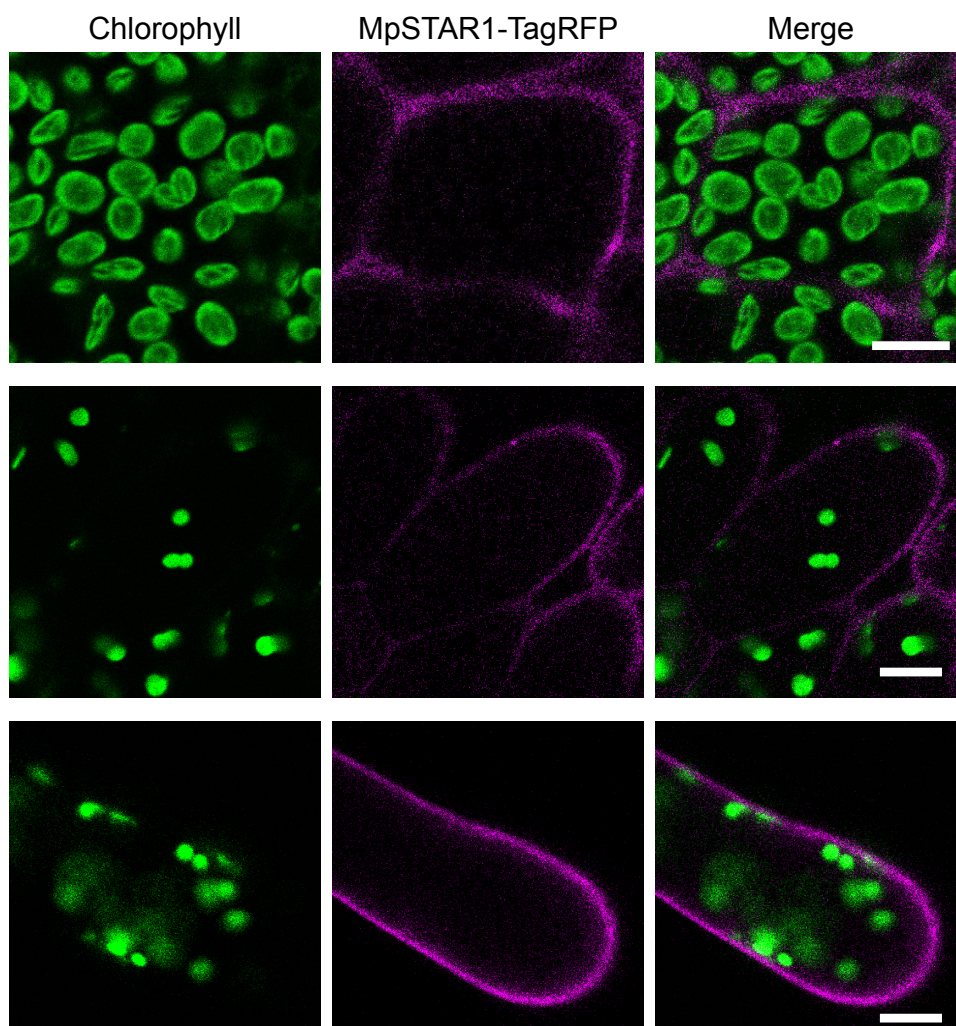


図5 MpSTAR1-TagRFP のゼニゴケにおける細胞内局在
 左のパネルはクロロフィルの自家蛍光を、中央のパネルは MpSTAR1-TagRFP の蛍光を、右のパネルはそれらを結合した画像を示している。バーはいずれも10 μ m。

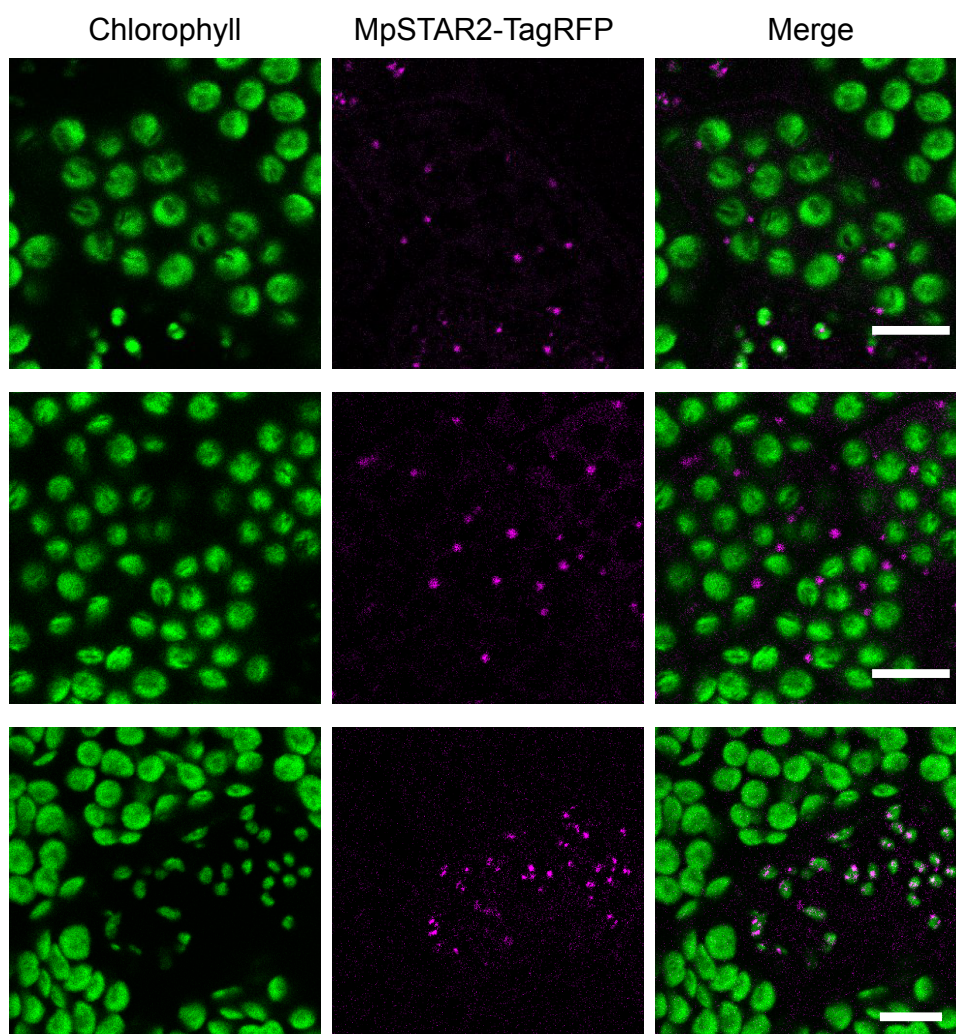


図6 MpSTAR2-TagRFP のゼニゴケにおける細胞内局在
 左のパネルはクロロフィルの自家蛍光を、中央のパネルは MpSTAR2-TagRFP の蛍光を、右のパネルはそれらを結合した画像を示している。バーはいずれも10 μ m。

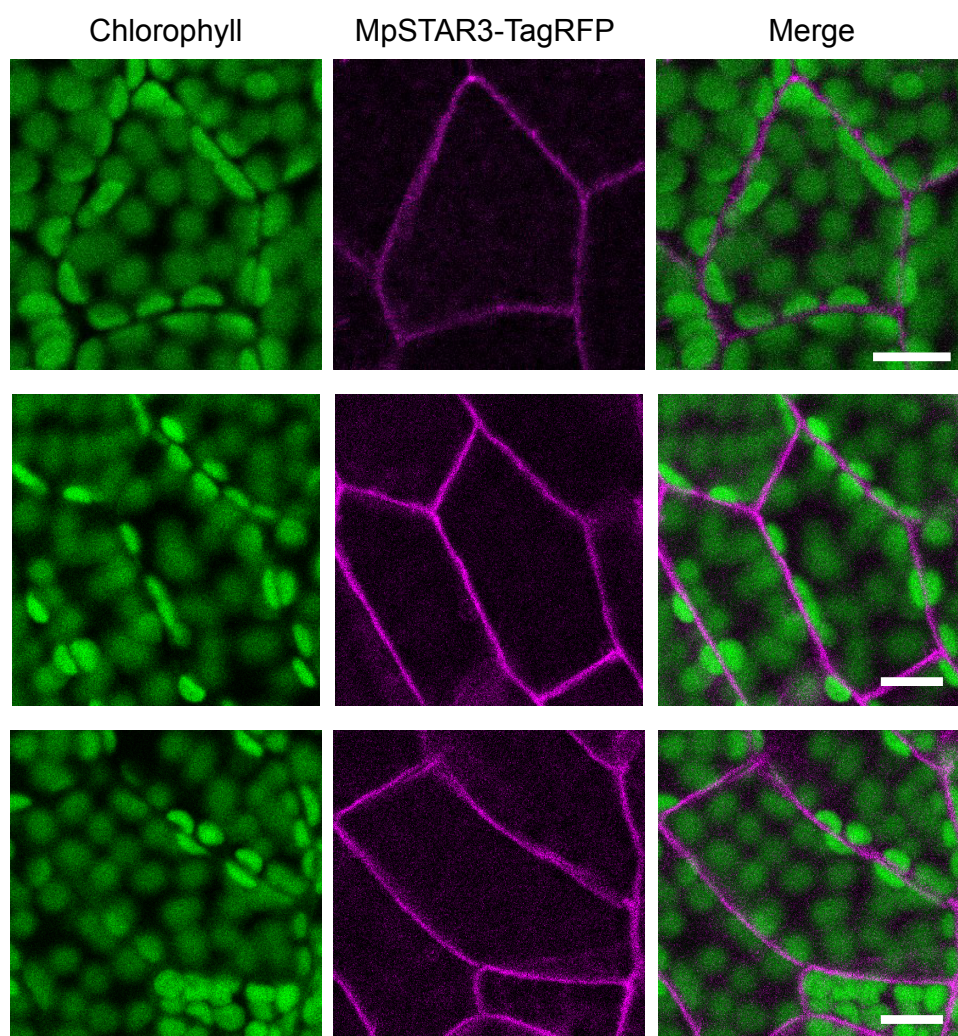


図7 MpSTAR3-TagRFP のゼニゴケにおける細胞内局在
 左のパネルはクロロフィルの自家蛍光を、中央のパネルは MpSTAR3-TagRFP の蛍光を、右のパネルはそれらを結合した画像を示している。バーはいずれも10 μ m。

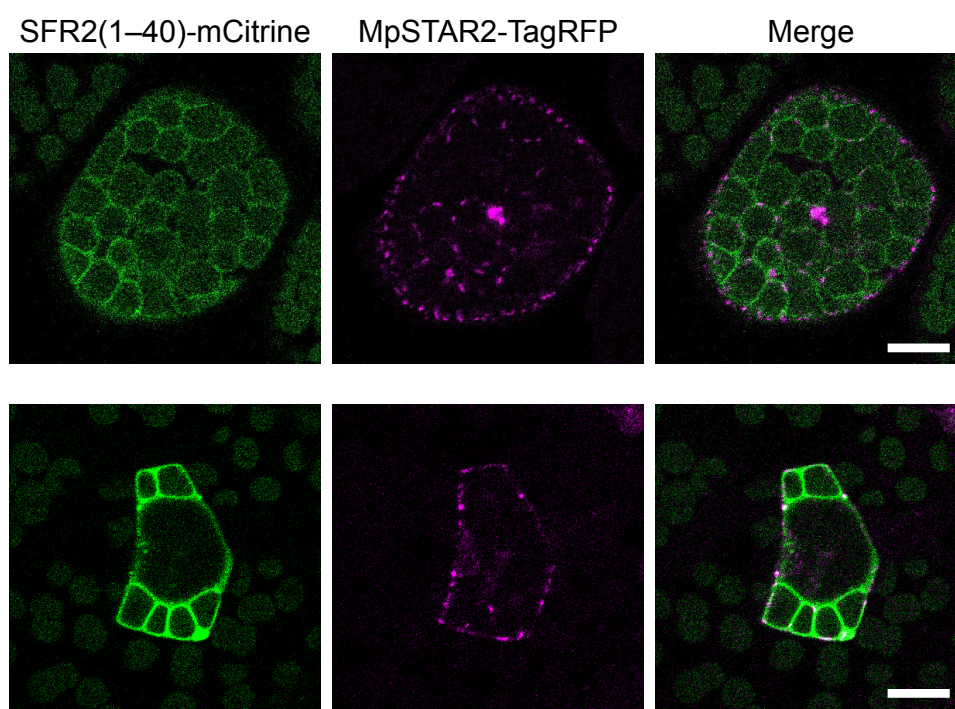


図8 MpSTAR2-TagRFP の葉緑体包膜への局在
 左のパネルは SFR2(1-40)-mCitrine (葉緑体外包膜のマーカー) の蛍光を、中央のパネルは MpSTAR2-TagRFP の蛍光を、右のパネルはそれらを結合した画像を示している。バーはいずれも10 μ m。

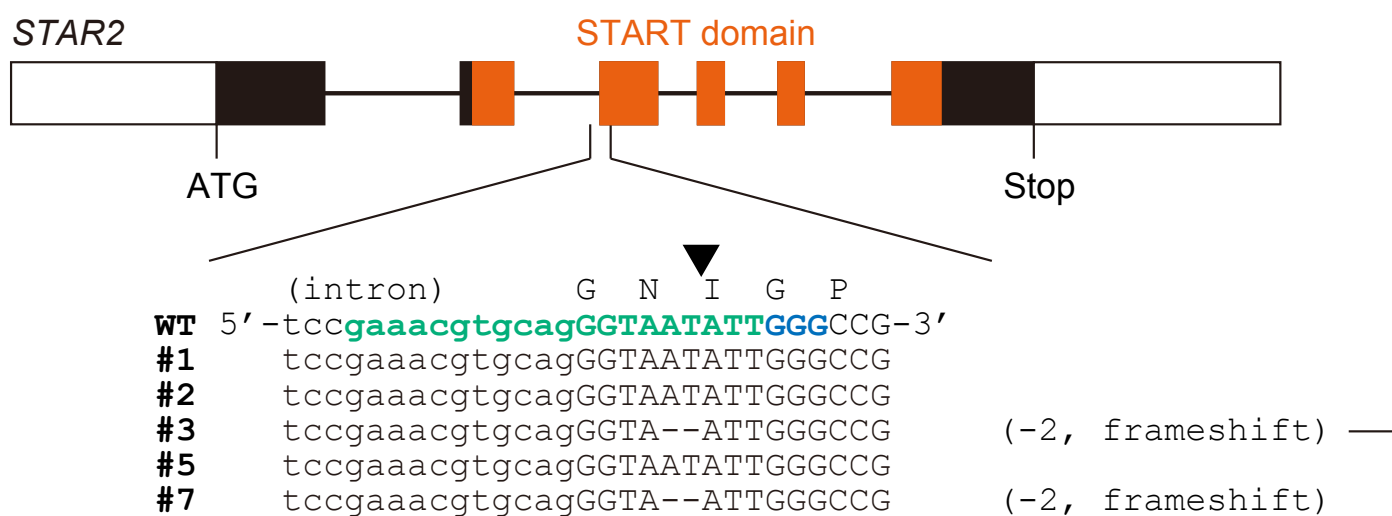


図9 ゼニゴケ *STAR2* 遺伝子モデルと CRISPR-Cas9 により導入された変異

遺伝子モデルの箱と線はそれぞれエキソンとイントロンを示している。野生型の塩基配列について、ガイド RNA の標的配列を緑色で、protospacer adjacent motif を青色で示し、Cas9 により切断される箇所を矢じりで示した。*STAR2* にコードされるアミノ酸配列を野生型の塩基配列の上に示した。#1-7 は本研究で得られた形質転換体の配列を示している。

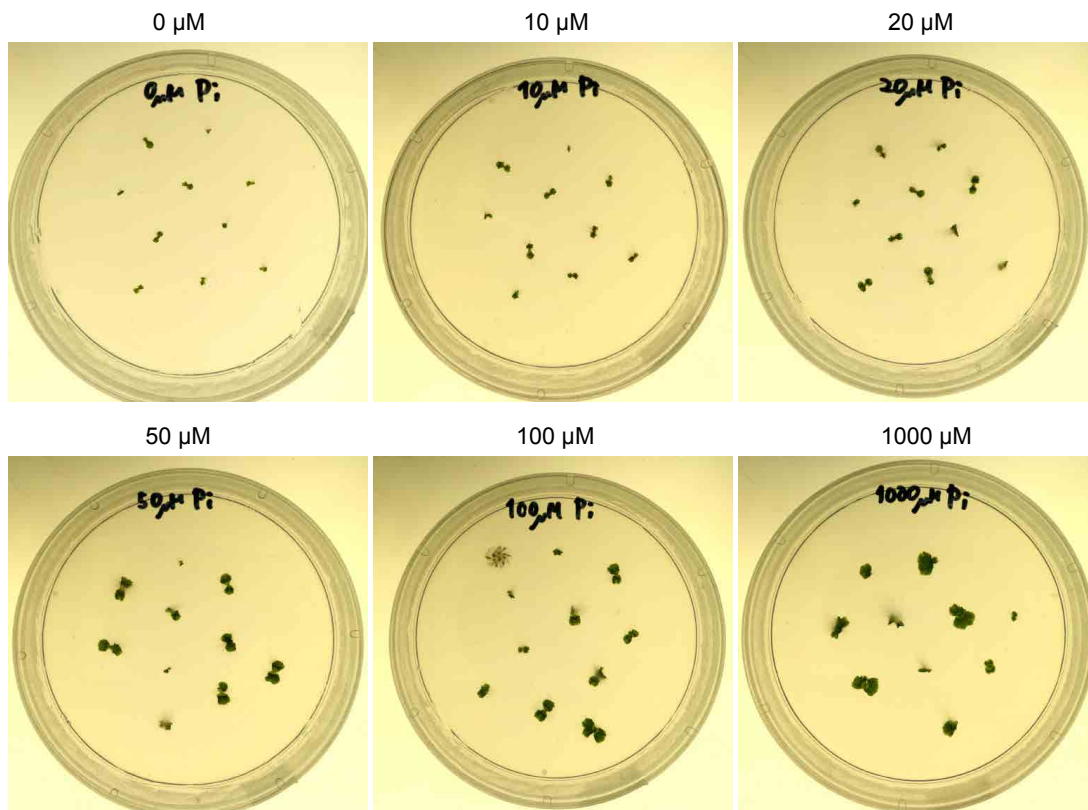


図10 ゼニゴケ野生株および *star2-1* 変異株の葉状体の写真

Gamborg' s B5 寒天培地に無性芽を植え、連続光で 10 日間生育させた葉状体を実体顕微鏡によって撮影した。バーは1 cmを示している。

(A)

[Pi]



(B)

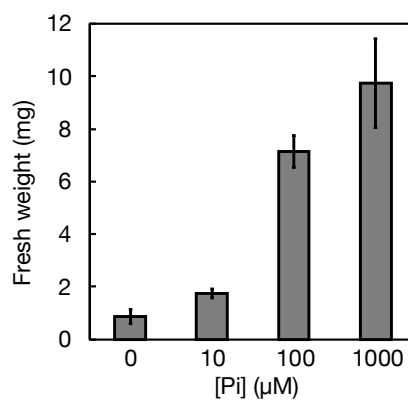


図11 培地中のリン酸濃度がゼニゴケの生育に与える影響

(A) さまざまなリン酸濃度で生育させたゼニゴケ野生株葉状体の写真。リン酸濃度を 0, 10, 20, 50, 100, 1000 μM に調整した Gamborg's B5 寒天培地に Tak-1 の無性芽を植えて 10 日間生育させ、プレートを撮影した。(B) さまざまなリン酸濃度で生育させたゼニゴケ葉状体の生重量。リン酸濃度を 0, 10, 100, 1000 μM に調整した Gamborg's B5 寒天培地に Tak-1 の無性芽を植えて 10 日間生育させ、生重量を測定した。データは 3 回の独立した試行から得られた測定値の平均値 \pm 標準誤差を示す。

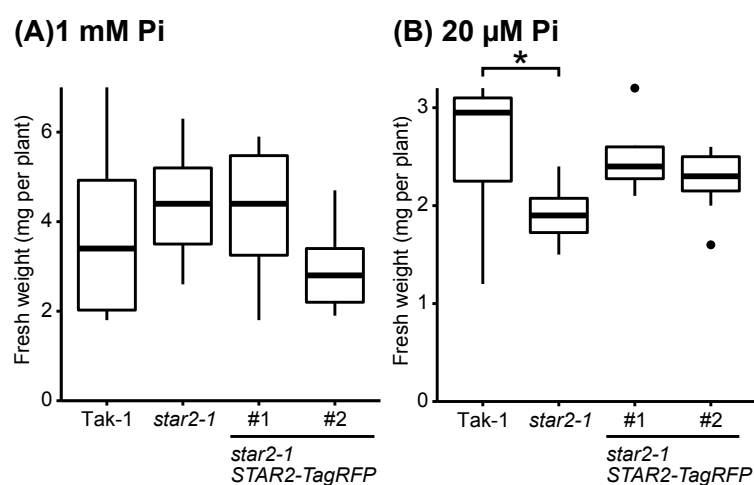


図12 *star2-1* 変異体のリン十分・欠乏条件での生育

1 mM (A) あるいは20 μM (B) のリン酸を含む Gamborg's B5 寒天培地上で7日間生育させたゼニゴケ葉状体の生重量。箱内部の水平線は中央値、箱の上端と下端はそれぞれ第一四分位点と第三四分位点を示す。上側/下側のひげは箱の上端/下端から $1.5 \times$ 四分位範囲を超えない範囲の最大/最小の点を示す。ひげより外側のデータは個別にプロットした。データはそれぞれの株について8-10個の葉状体から測定した。アスタリスクは Tak-1 との有意差 ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test) を示す。

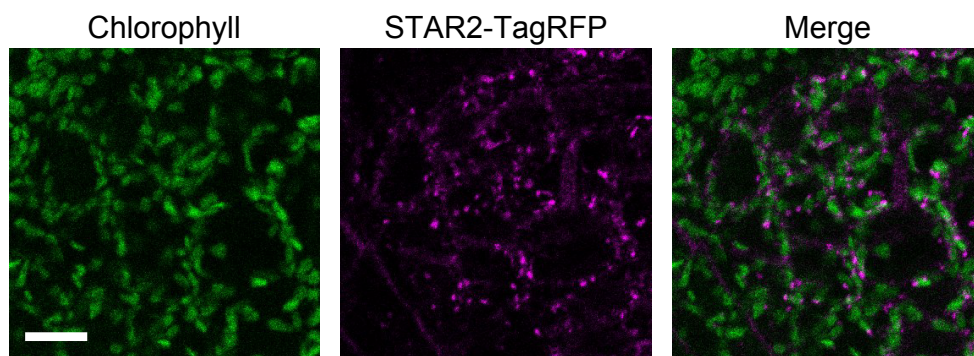


図13 MpSTAR2-TagRFP の *star2-1* 相補株における細胞内局在

左のパネルはクロロフィルの自家蛍光を、中央のパネルは MpSTAR2-TagRFP の蛍光を、右のパネルはそれらを結合した画像を示している。バーは10 μ m。

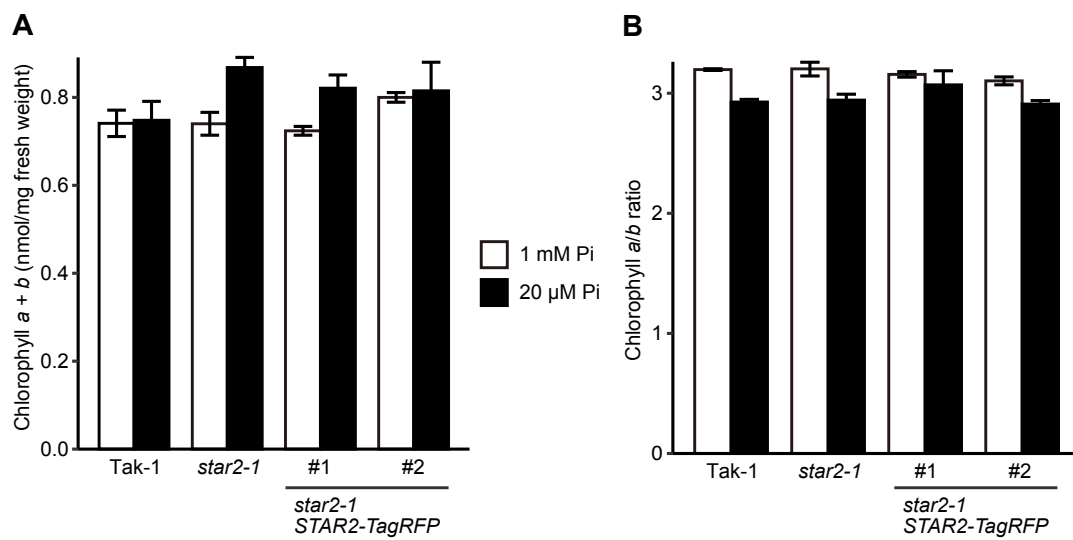


図14 *star2-1* 変異体のリン十分・欠乏条件でのクロロフィル蓄積

1 mM (白いバー) あるいは20 μM (黒いバー) のリン酸を含む Gamborg's B5 寒天培地上で7日間生育させたゼニゴケ葉状体の生重量あたりの総クロロフィル量 (A) およびクロロフィル *a/b* 比 (B)。データは3回の独立した試行から得られた測定値の平均値 ± 標準誤差を示す。

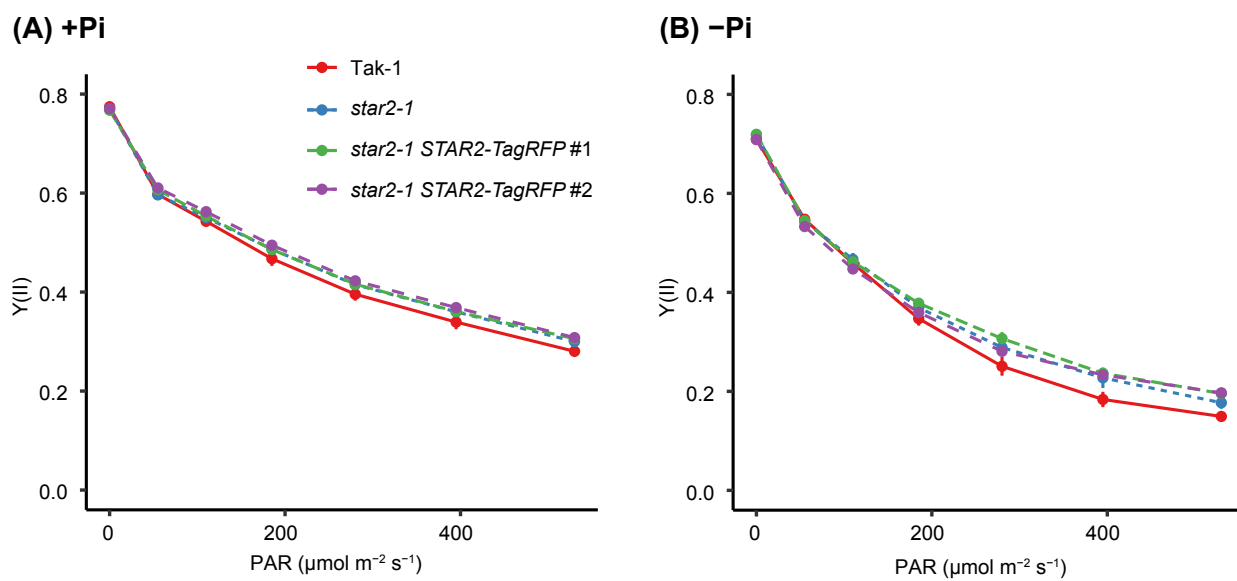


図15 *star2-1* 変異体のリン十分・欠乏条件での光合成量子収率

ゼニゴケ葉状体を通常の B5 寒天培地上で 3 日間生育した後、リン酸を含む (A) あるいは含まない (B) B5 寒天培地に移してさらに 7 日間生育させたのち、IMAGING-PAM MAXI を用いて光化学系 II の実行量子収率を測定した。PAR: photosynthetically active radiation (光合成有効放射)。データは 3 回の独立した試行から得られた測定値の平均値 \pm 標準誤差を示す。

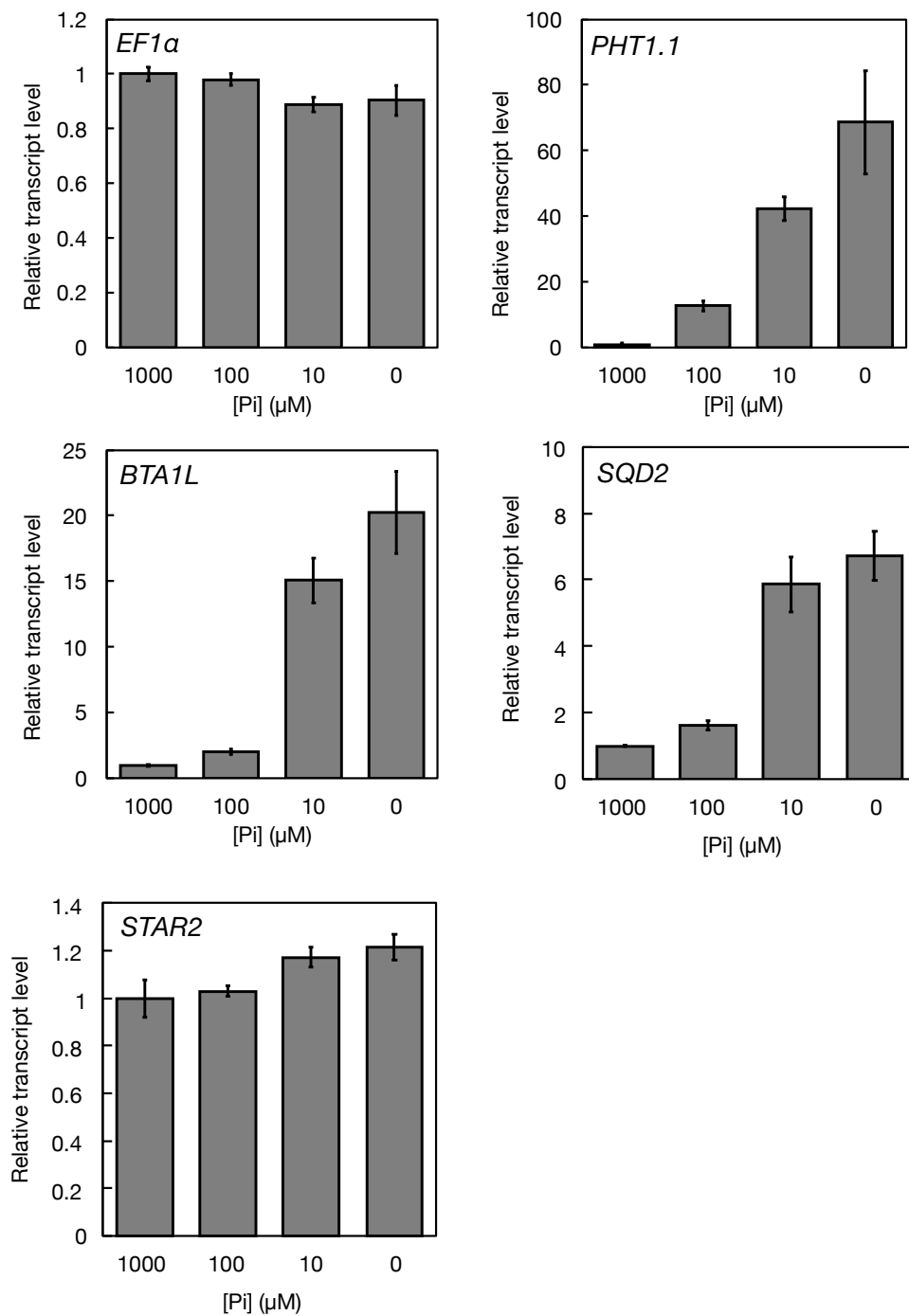


図16 培地中のリン濃度による遺伝子発現の変動

各濃度のリン酸を含む B5 培地上で 10 日間生育させた Tak-1 葉状体から全 RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を行った。転写産物レベルは *APT* および *ACT2* をレファレンス遺伝子として標準化し、[Pi] = 1000 μM に対する相対値として算出した。データは 3 回の独立した試行から得られた測定値の平均値 ± 標準誤差を示す。

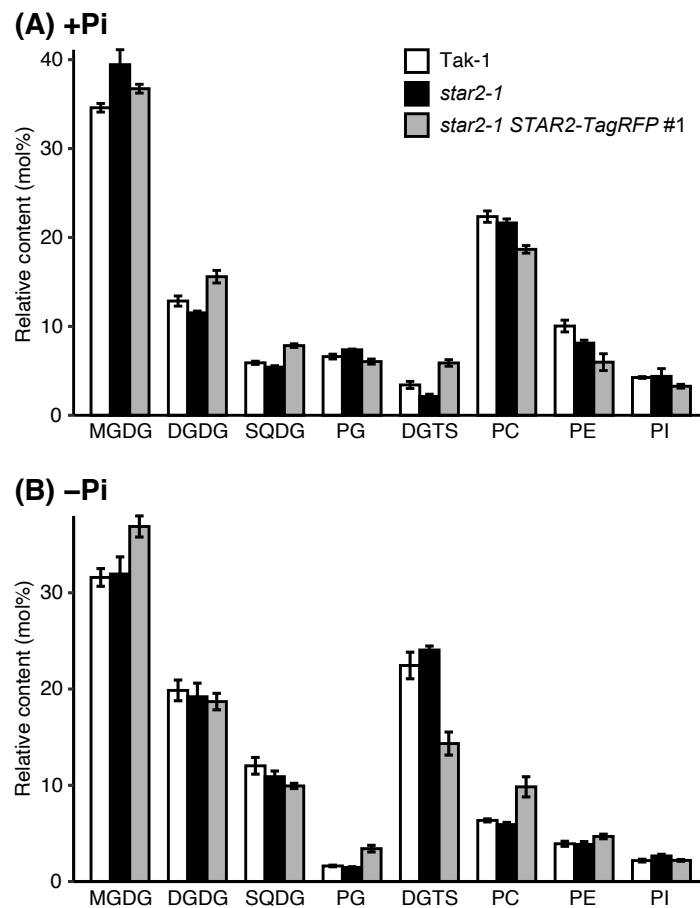


図17 ゼニゴケ葉状体の脂質クラス組成

Tak-1 (野生株)、*star2-1* および *star2-1* STAR2-TagRFP (相補株) を B5 培地上で 7 日間生育させたのち、リン酸を含む (A) あるいは含まない (B) B5 培地上に移し、さらに 7 日間生育させた。データは 3 回の独立した試行から得られた測定値の平均値 \pm 標準誤差を示す。

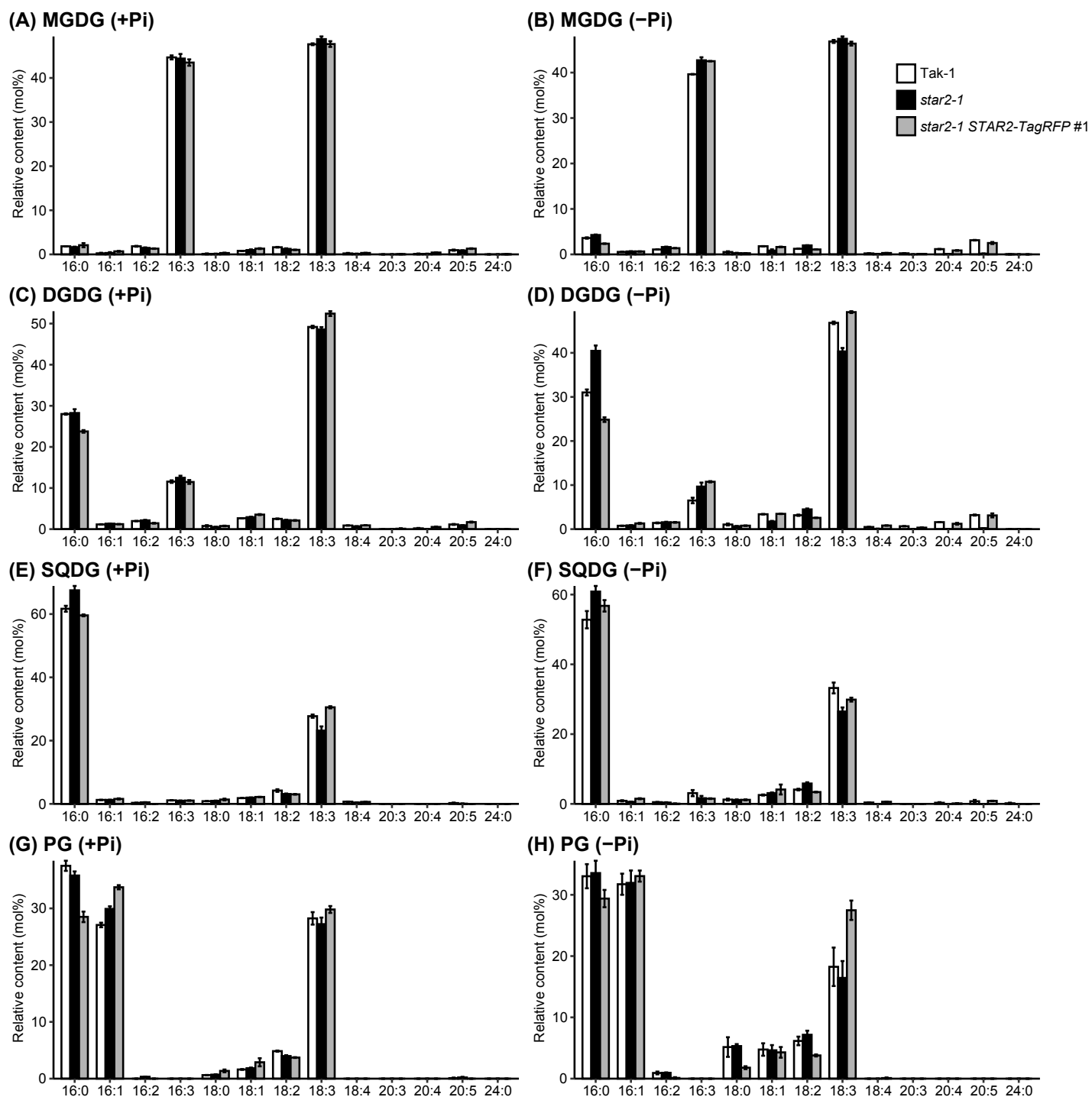


図18 ゼニゴケ葉状体の葉緑体脂質の脂肪酸組成

Tak-1 (野生株)、*star2-1* および *star2-1 STAR2-TagRFP* (相補株) を B5 培地上で 7 日間生育させたのち、リン酸を含む (A, C, E, G) あるいは含まない (B, D, F, H) B5 培地上に移し、さらに 7 日間生育させた。データは 3 回の独立した試行から得られた測定値の平均値 \pm 標準誤差を示す。

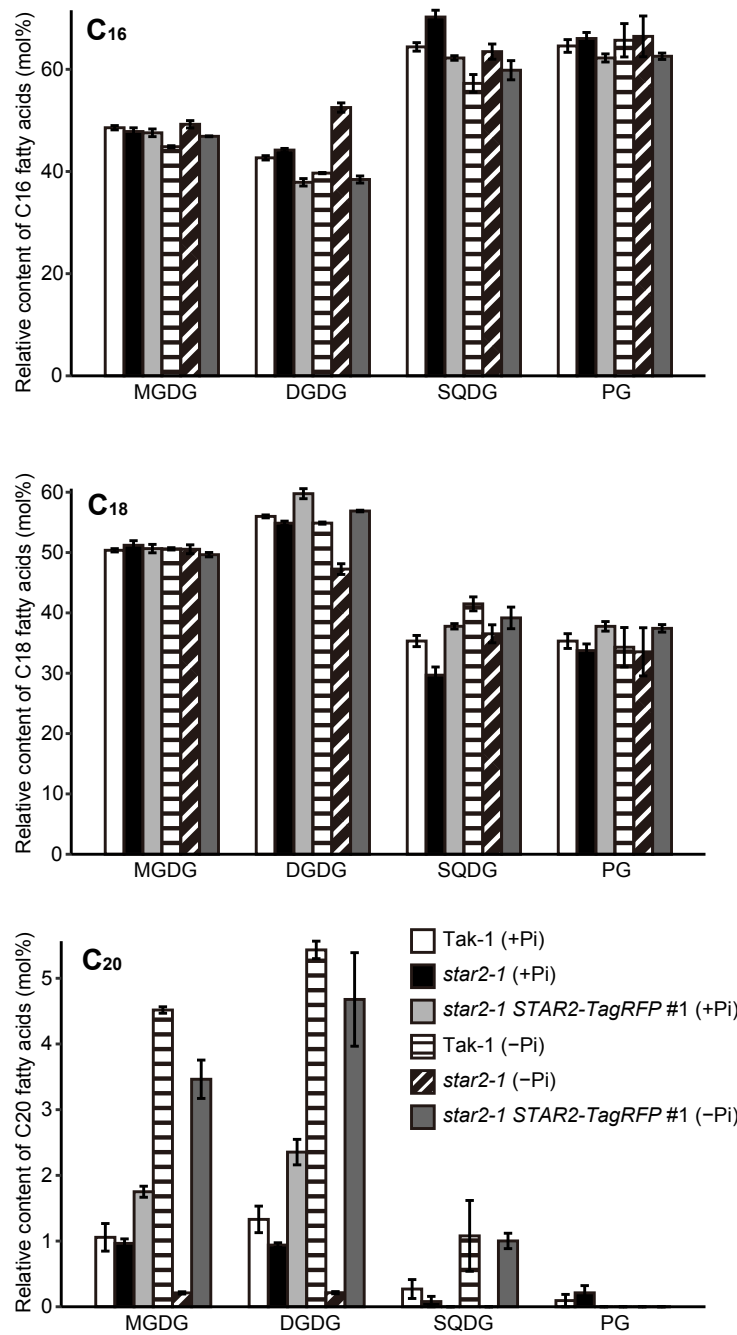


図19 ゼニゴケ葉状体の葉緑体脂質の脂肪酸鎖長組成

Tak-1 (野生株)、*star2-1* および *star2-1 STAR2-TagRFP* (相補株) を B5 培地上で 7 日間生育させたのち、リン酸を含むあるいは含まない B5 培地上に移し、さらに 7 日間生育させた。データは 3 回の独立した試行から得られた測定値の平均値 ± 標準誤差を示す。

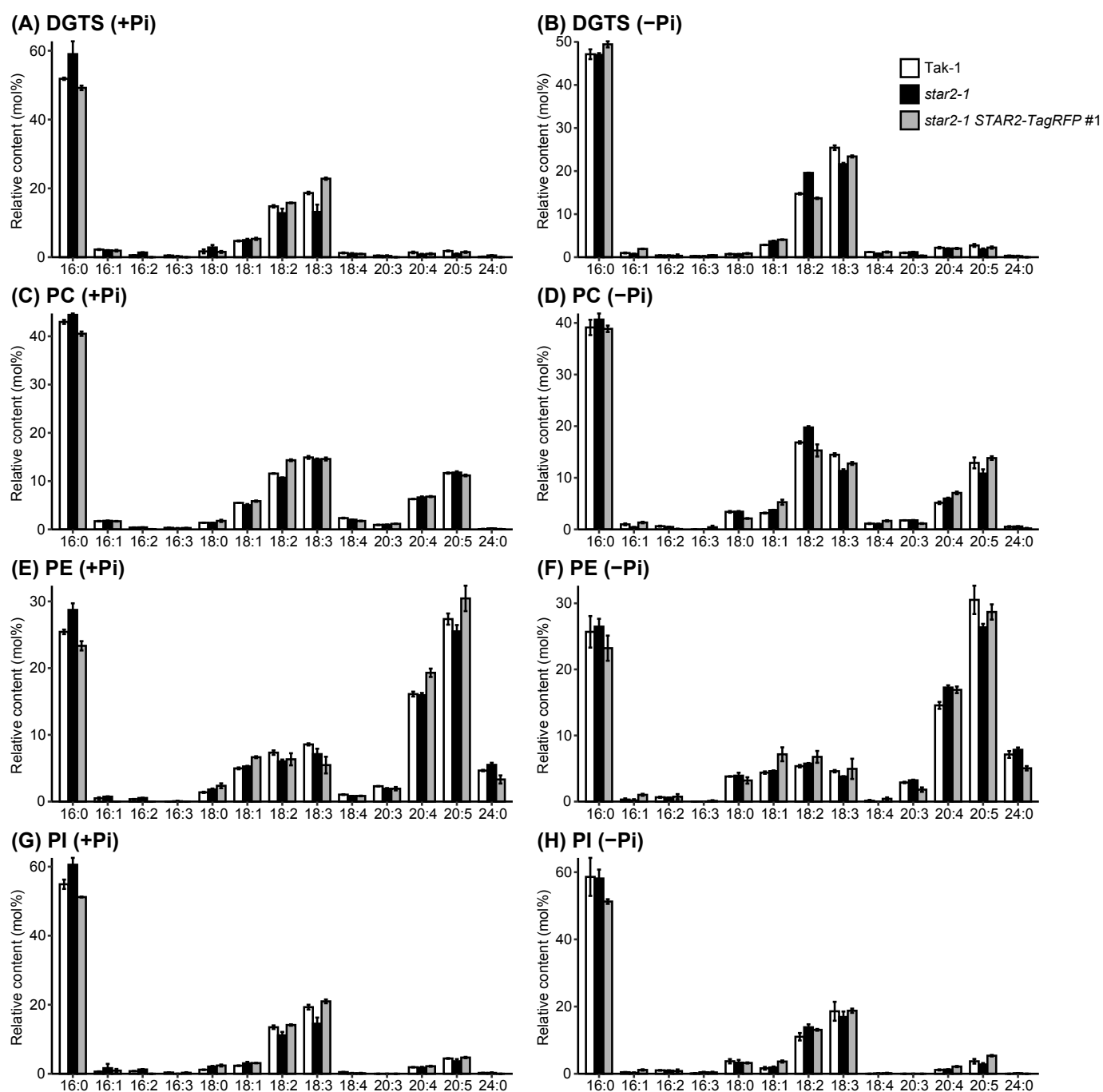


図20 ゼニゴケ葉状体の葉緑体外脂質の脂肪酸組成

Tak-1 (野生株)、*star2-1* および *star2-1 STAR2-TagRFP* (相補株) を B5 培地上で 7 日間生育させたのち、リン酸を含む (A, C, E, G) あるいは含まない (B, D, F, H) B5 培地上に移し、さらに 7 日間生育させた。データは 3 回の独立した試行から得られた測定値の平均値 ± 標準誤差を示す。

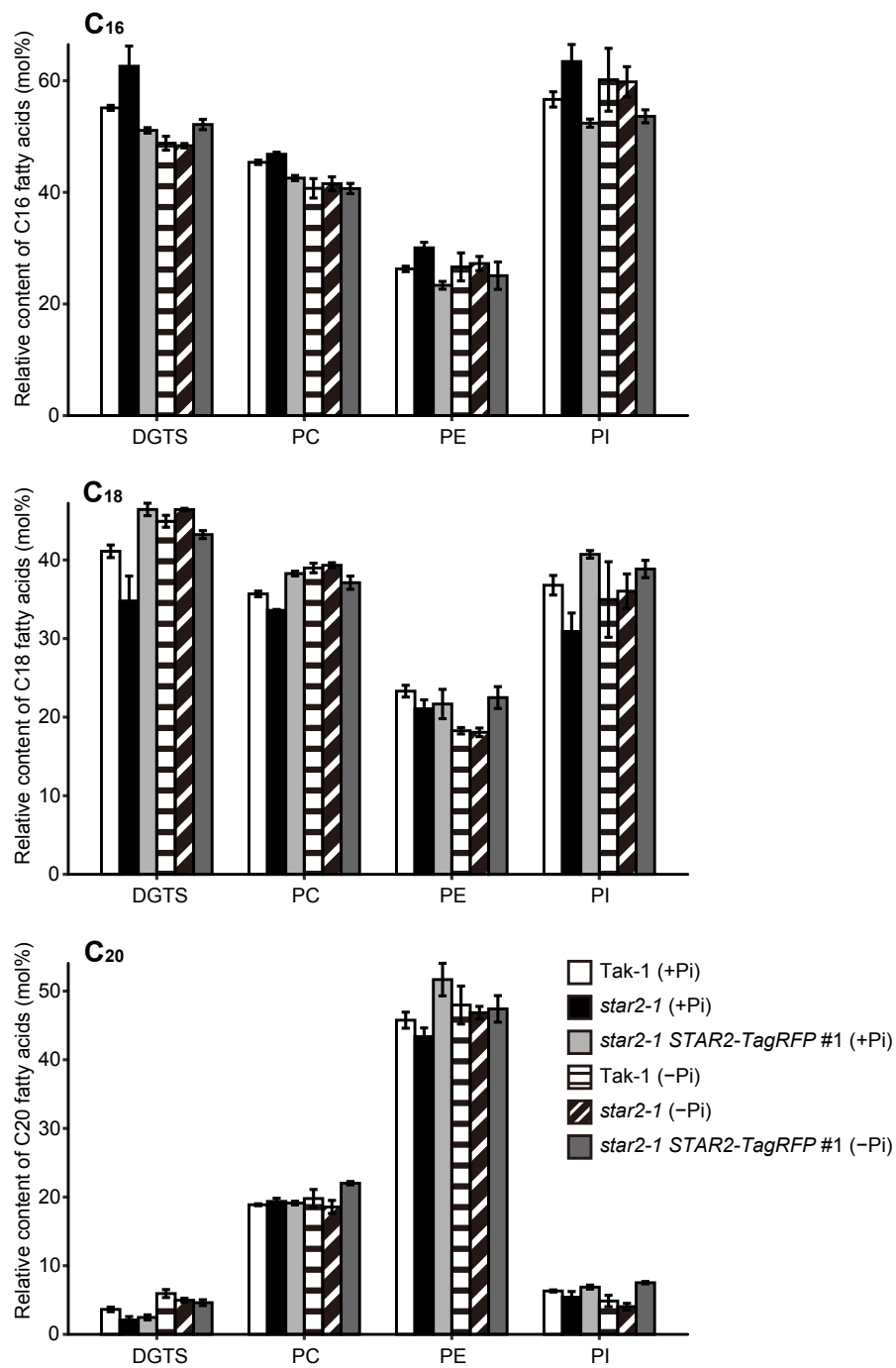


図21 ゼニゴケ葉状体の葉緑体外脂質の脂肪酸鎖長組成

Tak-1 (野生株)、*star2-1* および *star2-1* STAR2-TagRFP (相補株) を B5 培地上で 7 日間生育させたのち、リン酸を含むあるいは含まない B5 培地上に移し、さらに 7 日間生育させた。データは 3 回の独立した試行から得られた測定値の平均値 ± 標準誤差を示す。

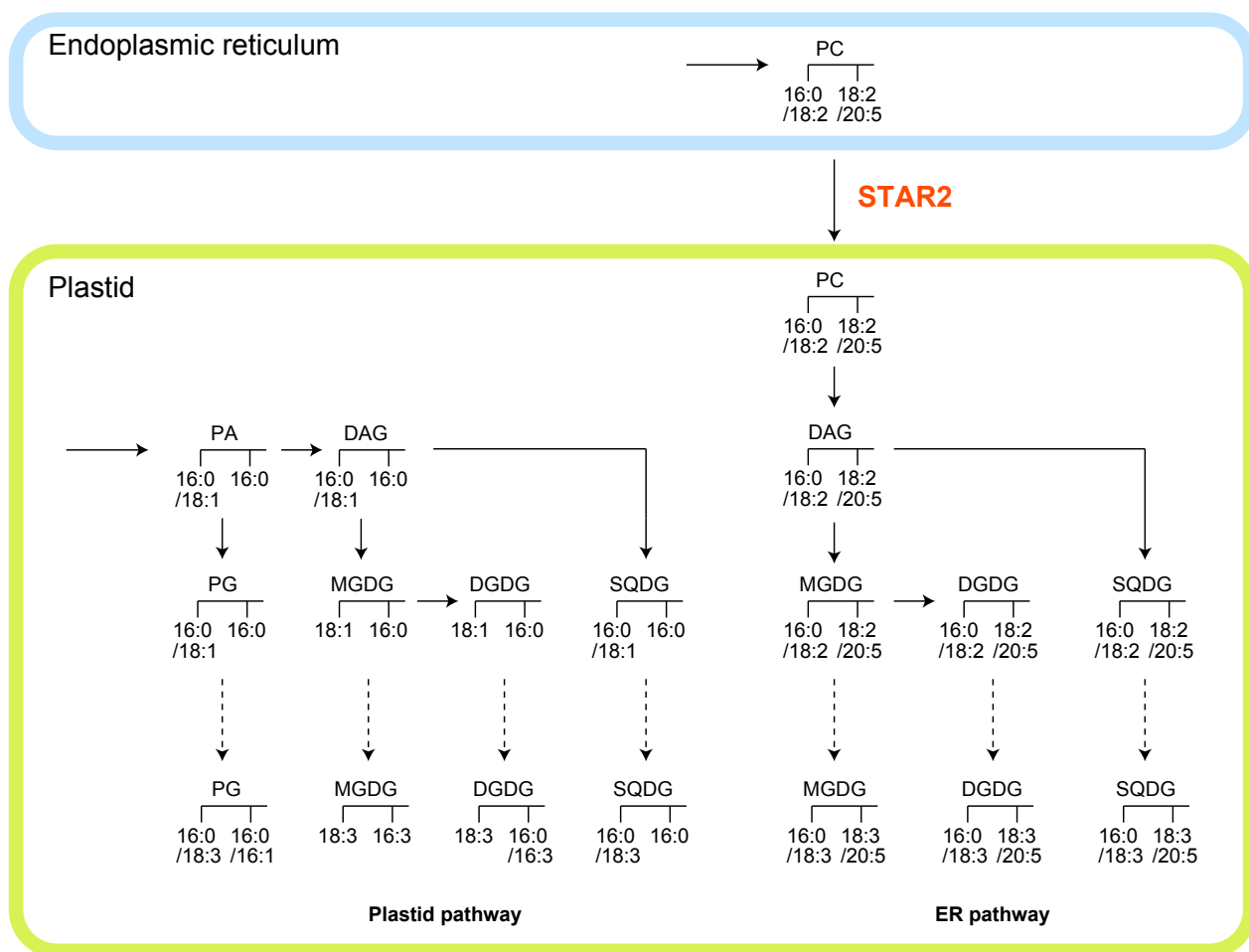


図22 ゼニゴケの葉緑体脂質合成における STAR2 の予想される機能

各脂質の脂肪酸は左側が *sn*-1 位、右側が *sn*-2 位に結合したものを示す。点線は脂肪酸不飽和化反応を示す。

表1 本研究に用いたプライマーのリスト

プライマー名	配列 (5'→3')
oTH73	CTCGGAAACGTGCAGGGTAATATT
oTH74	AAACAATATTACCCTGCACGTTTC
oTH77	CACCATGATATCAGGGGAGGAATGG
oTH79	CACCATGGACATGATGGGGAAGC
oTH80	GTATGTTACAATTTCCGCTTTGC
oTH81	CACCATGGCTTTGAGTCACAGGATC
oTH82	CTTGAAGCTCTGAGCAAGCC
oTH83	TAAGGATTTAGATGGAGATCTGCG
oTH158	GTTCCACAGACGGGATGTTT
oTH159	TAAGATCCCTCGTCCACGTC
oTH160	GATGTACCCTTGGAGGACGA
oTH301	CCAGCGCTCAACCTTTCTGCAGGCACATCA
oTH302	AAGGTTGAGCGCTGGAGGCTCCG
oTH303	AAACGACGGCCAGTGGATCTAGTAACATAGATGACACCGCGC
oTH306	ACCATGATTACGCCACAAATGAGTCACACACATTGTTGAG
oTH311	GCAGAAAGGTTGAGCATGGCGCCGTTTTTGTTC
oTH312	ACCGGAGCCTCCAGCGAATGGAGTTAAATTCCGCTTTCG

表2 定量的 RT-PCR に用いたプライマーのリスト

遺伝子	Transcript ID	フォワードプライマー (5'→3')	リバースプライマー (5'→3')
<i>APT</i>	Mp3g25140.1	AACCGGGGTACACTTGCTG	GCTCGATCAAGCAGGCACAC
<i>ACT2</i>	Mp6g11010.1	AGATGAGGCCAGTCCAAGC	GCTCTTCAGGTGCAACTCGC
<i>EF1α</i>	Mp3g23400.1	TTTACTCGAGGCTCTGCCCCG	TGGCAGGGTCGTTCTTGGAG
<i>PHT1</i>	Mp2g20600.1	TTCAGTTGCGATTGGCCTGC	CATGAACCAGCACACCGTGG
<i>STAR2</i>	Mp8g16400.1	GAAGACTGGGTCGCAAAGCG	AAGTCGTTCCGCTTGCTTGC
<i>SQD2</i>	Mp2g10160.1	TGTGCGCAGCAGAACAGTTG	ACAAATAAGGCGATGCGGCG
<i>BTA1L</i>	Mp2g11200.1	AGCCCGACATCGACACTCTG	GCCTTCTCGATGCACTTGGC

謝辞

本研究の遂行にあたりご指導をいただきました、東京大学の和田元教授ならびに小林康一助教(現 大阪府立大学 准教授)、神保晴彦助教に心より感謝申し上げます。京都大学の河内孝之先生ならびに西浜竜一先生にはゼニゴケ野生株およびプラスミドを提供していただき、実験技術についてご助言をいただきました。また、和田研究室メンバーにはさまざまな点でご協力いただきました。この場を借りて御礼申し上げます。本研究は日本学術振興会の特別研究員奨励費(課題番号18J10304)の助成を受けて行われました。