

博士論文（要約）

Genetic and molecular approach to the function of phosphatidylglycerol in
Arabidopsis thaliana

(シロイヌナズナを用いたホスファチジルグリセロールの機能に関する研究)

田上 遼

TANOUE RYO

東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻

生体膜は細胞の内外を隔てる障壁として生物に必須の構造物であることに加えて、真核生物においては様々な独自の生理機能を有する細胞小器官を区画化し、生命の恒常性を維持する上で欠くことのできない構造物である。生体膜は主に脂質とタンパク質から構成されているが、膜の基本構造は両親媒性を持つ脂質が二層となった脂質二重層により形成されている。膜は単一の脂質分子により形成することができるが、生体膜を形成する膜脂質は、その結合する脂肪酸と極性分子の違いにより、様々な種類があることが知られている。そのように、多様な膜脂質が存在していることの意義について、その全容はいまだ明らかにされていない。

本研究は膜を構成する膜脂質のうちホスファチジルグリセロール(PG)の生理機能について、植物のモデル生物であるシロイヌナズナを用いて遺伝学と分子生物学的解析を通して研究したものである。PGは植物の細胞内では、色素体、小胞体とミトコンドリアにおいて合成されることが、単離した細胞小器官を用いた生化学的な解析によって示されている。PG分子の生合成反応は途中段階まで他の膜脂質の生合成反応と共通の反応により行われている。ホスファチジルグリセロリン酸(PGP)合成酵素がPG分子特異的な生合成反応を触媒し、PGPが脱リン酸化されることによりPGが合成される。そのため、PGの生理機能を明らかにするためには、PGPを合成する反応、もしくはそれ以後の反応を触媒する代謝酵素をコードする遺伝子が破壊された変異株を同定、比較し、その異常を解析することが望ましいと考えられる。PGP合成酵素として、シロイヌナズナでは、蛍光タンパク質と融合させたタンパク質を発現させて観察した結果から、色素体とミトコンドリアに局在することが示されているPGP1と、酵母で発現させたときにマイクロソームに局在するPGP2とが同定されている。PGP1が破壊された*pgp1*変異株の葉の細胞における微細構造を観察した結果から、PGP1は葉緑体のチラコイド膜の形成に必要であることが明らかとされている。また、PGP1はミトコンドリアのPGP合成に必要であることが、*pgp1*変異株から単離したミトコンドリアのPGP合成活性を調べた生化学的解析により明らかにされた。しかしながら、その*pgp1*変異株においてミトコンドリアの形態、そして呼吸活性などに異常が観察されなかった。これは、その*pgp1*変異株において、PGP2により小胞体で合成されたPGPもしくはPGがミトコンドリアへと輸送されることにより、ミトコンドリアでのPGP合成の欠損とその欠損から生じるミトコンドリアへの影響が相補されているものと考えられた。しかしながら、いまだPGP2が破壊された*pgp2*変異株をもちいた研究の報告はなく、PGP2により生合成されるPGの機能については不明であった。

PGP合成変異株の同定と解析

*pgp1*変異株、*pgp2*変異株と*pgp1 pgp2*二重変異株における植物の生育、生体膜構造、PGの生合成量とPGPの合成活性に与える影響を比較、解析した。まず、本研究では*pgp2*変異株

を新たに取得した。その取得した *pgp2* 変異株と *pgp1* 変異株を交配することにより、*pgp1 pgp2* 二重変異株を作製した。(1) 植物に与える影響。*PGP2* を破壊しても、植物の成長に異常が見られなかったが、*PGP1* と *PGP2* の両方を破壊すると、胚の発生が遅れて発芽率が大きく減少することから、*PGP1* と *PGP2* が合成する PG は胚の正常な発生に必要であることが明らかとなった。(2) 生体膜の構造に与える影響。変異株の胚の細胞における微細構造を電子顕微鏡により観察したところ、*PGP1* が破壊されると、葉と同様に葉緑体のチラコイド膜の形成が起こらなかったが、葉と異なり巨大化したミトコンドリアが一部観察された。ミトコンドリアに特徴的な膜脂質カルジオリピン (CL) は PG から CL 合成酵素 (CLS) により合成されるが、CLS に変異が起こると、同様にミトコンドリアが巨大化することが報告されている。そのため、今回胚の細胞内微細構造を解析することによって、*PGP1* により合成される PG が CL の合成に利用されており、*PGP1* がミトコンドリアの形態の維持をするために必要な役割を果たしていることを示すことができた。*pgp1 pgp2* 二重変異株では *pgp1* 変異株よりも巨大なミトコンドリアが観察された。そのため、葉と同様に *PGP2* により生合成される PG が胚でも *pgp1* 変異によるミトコンドリアでの PGP 合成欠損のミトコンドリアの巨大化を部分的に相補しているものと考えられた。さらに、*pgp1* 変異株と *pgp1 pgp2* 二重変異株を観察、比較したところ、*pgp1* 変異株と比べて *pgp1 pgp2* 二重変異株はクロロフィルの蓄積が少なかった。そのため、*pgp1* 変異株において *PGP2* が合成する PG が葉緑体へと輸送され、クロロフィルの蓄積に関与しているということが考えられた。(3) PG の生合成量に与える影響。2 つの PGP 合成酵素が PG の生合成にどれだけ寄与しているかを調べるために、変異株の胚におけるリン脂質を [³²P] リン酸で放射性標識して脂質を抽出して分析した。その結果、胚においては *PGP2* が *PGP1* より多くの PG を合成していることが示された。葉では *PGP1* が主に PG の合成に関わっているという過去の報告と合わせて考えると、*pgp1* 変異株のミトコンドリアに葉では異常が見られなかったものの、胚では異常が見られたという現象は、胚において *PGP2* が合成する PG はミトコンドリアへと十分に供給されずに、小胞体において固有の機能を持つ可能性がある。また、*pgp1 pgp2* 二重変異株においてほぼ PG の合成が検出されなかったことから、胚における PG の合成には *PGP1* と *PGP2* を介する経路が主要経路であると考えられた。(4) PGP 合成反応に与える影響。加えて、それぞれの変異株の胚での PGP 合成活性を調べるために、胚の細胞抽出物に PGP 合成反応の前駆物質を加えて、反応生成物を調べた。その結果、*pgp1 pgp2* 二重変異株では PGP 合成活性を失っていることが明らかとなった。そのため、シロイヌナズナの胚での PGP 合成反応は、*PGP1* と *PGP2* に依存しているものと考えられた。以上の結果から、シロイヌナズナの胚では、PG 生合成は *PGP1* と *PGP2* により触媒される PGP 合成反応を介していることが明らかとなり、その PG 生合成は葉緑体の発達、ミトコンドリアの正常な形態の維持、そして正常な胚発生と発芽に必要であることが明らかとなった。

PGP 合成酵素の局在と発現

(5) PGP2 の細胞内局在。PGP2 の植物の細胞内での局在が明らかとなっていなかったため、PGP2 の C 末端に蛍光タンパク質を融合させ、植物の細胞に一過的に過剰発現させた。その結果、PGP2 は植物の細胞では小胞体に局在していることが示唆された。また、PGP1 と PGP2 の発現をプロモーターGUS アッセイと、公開されているマイクロアレイデータベースを用いて比較、解析した。その結果、PGP1 と PGP2 は多くの組織に発現しており、公開されたマイクロアレイデータベースから、PGP2 は PGP1 と比較して種子の発達が進むにつれて発現が増加していることが示された。これは放射性標識により調べた変異株の胚では PGP2 が PGP1 より PG の生合成に寄与しているという結果と整合性がとれており、胚では PGP2 の発現が増加して、PG の生合成が活性化するものと考えられた。

なお、本論文のうち *pgp2* 変異株と *pgp1 pgp2* 変異株の同定、変異株の胚発生 (1)、変異株の胚における細胞内微細構造の観察 (2)、変異株における PG の生合成量 (3)、PGP2 の細胞内局在 (5) の解析は、小林恵・片山健太・永田典子・和田元との共同研究により行われ、論文として発表された (FEBS Letter, vol. 588, 1680-1685)。共同研究者から、インターネットによる本文全体を公開することへの同意を得ることができなかつたため、内容の要約をもって本文全体の代わりに公開する。