

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：液胞膜エンジニアリングによる植物代謝システム制御

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

三村 徹郎 (神戸大学大学院理学研究科 教授)

主たる共同研究者

山崎 真巳 (千葉大学大学院薬学研究院 准教授)

杉山 裕子 (兵庫県立大学環境人間学部 准教授)

青木 考 ((財)かずさDNA研究所 特別客員研究員)

3. 研究実施概要

液胞 (Vacuole) は植物、やカビに普遍的なオルガネラで、細胞体積の 80-90% を占め、空間充填、有用物質の貯蔵、細胞質の解毒・調節、代謝回転における分解機能など、様々な生理機能に深く関わっている。

本課題では、

1) 植物の各器官で多彩に分化した液胞内にどのような低分子が蓄積されているかを明らかにすることで、オルガネラメタボロームのための基礎データを確立する。

2) 液胞膜機能未知タンパク質を網羅的に改変する液胞膜エンジニアリングを進め、同時に、液胞と細胞質に含まれる代謝産物の網羅的解析を合わせて行うことで、境界膜としての液胞膜輸送体の変動が引き起こす代謝産物変化から、輸送機能の分子同定と解析を試みる。

3) 液胞膜の輸送機能を人為的に調節することで、細胞質で働く代謝機能を形質転換することなく代謝制御する可能性を探る。

ことを目指した。本研究は、植物細胞最大のオルガネラである液胞の機能を、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム解析を組み合わせることで明らかにし、基礎植物科学としての液胞研究を進めるとともに、人類に有用な物質を蓄積する液胞機能の改変や、それによる細胞質代謝制御方法を検討する。

5年半の研究期間中に以下の成果を得ることが出来た。

1. シロイヌナズナ培養細胞から単離したインタクト液胞を用いて、液胞を構成する液胞内タンパク質 (プロテオーム解析)、液胞内物質 (メタボローム解析) の網羅的測定を行った。

既に行っていた液胞膜プロテオーム解析から多数の機能未知タンパク質を見出していたが、液胞内タンパク質のプロテオーム解析からも、機能未知タンパク質を見出すとともに、酸化還元反応や転移反応を司る酵素が存在することから、新しい代謝経路が存在する可能性を見出した (三村グループ)。

CE-MS や LC-FT-ICR-MS を用いたメタボローム解析から、液胞に含まれる代謝物質を多数見出すことに成功した。特にこれまで液胞内には存在しないと想定されていた有機リン酸化合物等の一次代謝物質の存在を明らかにした (三村グループ、青木グループ)。

2. 単一細胞として巨大液胞を持つシヤジクモ節間細胞を用いてメタボローム解析を行い、シロイヌナズナ液胞含有物との比較解析を進め、多数の一次代謝物質の存在を確認するとともに、その動態を明らかにした (三村グループ)。

3. 超高感度 12 テスラ FT-ICR-MS を用いた液胞内物質のノンターゲット解析から、分解産物も含め 3000 を超える物質が液胞内に存在することを見出した。また、これら物質の精密質量から、標準物質を用いずに複数の物質を同定することに成功した (三村グループ、杉山グループ、青木グループ)。

4. 薬用植物チャボイナモリを用い、液胞内に存在するとされるカンプトテシン生合成系の解析を進め、新し

い中間代謝物質を同定した(山崎グループ、青木グループ)。

5. 機能未知液胞膜タンパク質の内、液胞膜輸送に関与すると想定される三つの輸送体(MATE 輸送体 (At3g21690)、糖輸送体類似タンパク質(At1g75220)、ABC トランスポーター (At3g62700))について、過剰発現やノックダウンによる形質転換体を作成し、それぞれの単離液胞を用いたメタボローム解析を行うことで、各輸送体の基質探索を進めた。

液胞膜輸送体の形質転換では、二倍以上濃度が変わる代謝物質はごく少数であること、それにも関わらず濃度が大きく変動する物質が複数見出された。これらの中に輸送基質となり得るものが存在するかどうかは今後の検討による(三村グループ、青木グループ、杉山グループ)。

6. 液胞膜の機能未知の形質転換細胞のトランスクリプトーム解析を行うことで、輸送体の遺伝子発現変動が、細胞質の代謝過程にどのような影響を及ぼすかを検討し、一部代謝過程に変動が生じることを見出した。今後は、両者の関連を明らかにする必要がある(青木グループ、三村グループ)。

7. シソ・アントシアニン代謝系に属し、液胞膜タンパク質として知られる機能未知タンパク質の形質転換体からインタクト液胞を単離し、メタボローム解析を進め、機能同定を試みた(山崎グループ、三村グループ)。

8. 超高感度 12 テスラ FT-ICR-MS を用いて、モデル植物シロイヌナズナ植物体の代謝物質を網羅的に解析した。

本装置を用いることで、1ppm 以下の精度で各代謝物質の精密質量を決めることができることから、現在、シロイヌナズナ含有物質の精密質量データベースを公開するためのデータ整理を進めている(三村グループ、杉山グループ、青木グループ)。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

液胞の精製方法を確立し、液胞でのメタボローム解析とプロテオーム解析を行い、これまで液胞内で存在が確認されていなかった有機リン酸化合物や代謝関連酵素等を多数見出し、従来の液胞の機能に関する概念を書き換える成果を挙げるなど、当初の目標を大筋達成した。しかし、現時点では、液胞の機能に関する具体的な知見を示す段階にまでは至っていない。また、液胞エンジニアリングによる有用産物の生産に結びつく研究も今後の課題として残されている。

現段階では研究代表者の論文発表が遅れているが、最先端のメタボローム解析システムの導入し、プロテオーム解析との統合など興味ある成果が得られており、これらの成果が質の高い論文に発表されることを期待する。特許に繋がるような成果は出ていないが、液胞機能と植物の環境適応などの成果が得られれば知財に結びつく可能性もある。

##### 4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

本研究は、液胞のメタボローム研究に真正面から取り組むものであり、最高水準の質量分析機器の導入もを行い、戦略目標に大きな貢献をしている。液胞機能の解明をメタボロームとプロテオーム解析の両面から攻める研究は、国内では例のない独創的なものであり、科学的インパクトは大きなものがある。細胞内オルガネラのメタボローム研究の先導的なものとしても重要な意義を有する。液胞の研究は植物利用の観点からも重要なテーマであり、今後も着実に研究が進めば社会的にもインパクトあるものとなる。12 テスラの FT-ICR-MS の利用により、シロイヌナズナ含有物質の精密質量データが得られ、今後データベースの構築と公開がなされれば、植物研究全体にとって大きなインパクトを与える。

##### 4-3. 総合的評価

本研究課題は、領域の目標であるメタボローム解析に正面から取り組んでオルガネラでの代謝機能解析に

挑戦したものであり評価できる。研究チームの共同研究体制を整備し、プロテオーム解析ならびにメタボローム解析等の実験と解析技術を確立し、それらを十分に駆使して、液胞のたんぱく質と代謝物質について多方面からアプローチを試み、液胞に有機リン酸化合物が存在することなどを発見した点は高く評価できる。また、動物細胞に比べて代謝がより複雑であり、その中心にある液胞コンパートメントの理解には地道なデータの蓄積が必要であり、その一歩として評価に値する。しかし、目標とした液胞の生物学的機能にまで踏み込んだ解析・成果が得られる所までは進むことができていない。全体として、研究は道半ばの状況であり、質の高い論文発表と共に、今後の発展に期待したい。