

植物タンパク質の小胞輸送におけるホスファチジル イノシトールリン脂質の役割の解析

[1] 組織

代表者：西村 浩二

(島根大学研究・学術情報機構)

対応者：粟井 光一郎

(静岡大学電子工学研究所)

[2] 研究経過

真核生物は、細胞内に多様な細胞内膜系を持つ。生体機能を維持するためには、細胞内で合成されたタンパク質は複雑な内膜系を間違えることなく、秩序だった手段により適切な場所に輸送される必要がある。また細胞外から糖、脂質やミネラルなどの栄養源を取り込む場合や、病原微生物の攻撃や環境ストレスといった細胞外情報を取得するために働く細胞膜タンパク質を細胞内に適切に取り込む必要がある。このような細胞内のタンパク質の輸送の多くは、膜輸送小胞が担っており、真核生物には膜輸送小胞による多様で秩序だった輸送システムが発達している。具体的には、小胞体から始まる *de novo* 合成されたタンパク質の輸送経路はゴルジ体、トランスゴルジ網 (TGN) へと進み、TGN 以降は細胞膜へ分泌される経路と、細胞内のリソソームや液胞に向かう経路をたどる。さらに細胞膜から細胞内へのエンドサイトーシスを担う経路を合わせたものが、真核生物の主要な膜輸送小胞輸送経路として知られる。この複雑な輸送網における膜輸送小胞は、特定の被覆タンパク質と呼ばれる一群のタンパク質複合体により、細胞膜や内膜の各所から出芽過程を経て形成される。その際、膜輸送小胞で運ばれるタンパク質 (積荷タンパク質) は、膜輸送小胞の被覆タンパク質成分である積荷認識タンパク質により特異的に選抜されなければならない。しかし通常、積荷認識タンパク質は細胞質局在の可溶性タンパク質であり、単独で積荷タンパク質が局在する特定の膜に集まることができない。そのため酵母や哺乳動物では、特定のホスファチジルイノシトールリン脂質 (PIP) に結合するタンパク質 (ANTH や ENTH と呼ばれるアダプタータンパク質) が介在することにより、積荷認識タンパク質が特定の膜に集まることが可能になる。その結果、特定の積荷タンパク質が、特異的な輸送小胞に組み込まれて、小胞が出芽・遊離し、目的の細胞内区画に輸送されると

考えられている。アダプタータンパク質の足場となる PIP はイノシトール部分のリン酸基の数と位置の異なる複数の分子種があり、その細胞内局在性も異なることが知られ、酵母や哺乳動物では、PIP の局在性はタンパク質の膜輸送経路の特異性に寄与することが知られている。植物においても、哺乳動物の PIP と結合するアダプタータンパク質のオーソログが幾つか存在しているが、各 PIP との相互作用に関しては十分理解されているとは言い難い。植物におけるタンパク質の膜輸送経路の研究は、植物の病害応答機構に基づく農作物の生産性向上や、貯蔵タンパク質の輸送機構に基づく農作物におけるワクチン・医薬品や生理活性物質などの有用物質生産の開発に欠くことのできないものであり、植物タンパク質の膜輸送機構の研究は、近年ますますその重要性を増している。そこで、本研究では、このような応用面に関わりが深く、酵母や哺乳動物とは異なる植物独自の系統進化が進んだ TGN 以降 (ポストゴルジ) の植物タンパク質の膜輸送経路、特に液胞輸送経路とエンドサイトーシス経路に関わるクラスリン輸送経路に注目して、PIP の膜輸送経路に対する特異性を解析することを目的として研究を行った。

これまでに、クラスリン被覆小胞の液胞輸送経路とエンドサイトーシス経路に関わるものが予想されるアダプタータンパク質はそれぞれ異なるものであり、膜表在性の PIP に対する結合特異性が異なることが想定されてきているが、その詳細は明らかではなかった。ENTH アダプタータンパク質の MTV1 はクラスリンと相互作用し、液胞タンパク質の輸送に関わることが報告されている。また、ANTH アダプタータンパク質である ECA4 は細胞膜に局在し、細胞膜タンパク質のエンドサイトーシス経路への関与が想定されている。しかし、MTV1 と ECA4 の PIP 結合特異性は明らかではない。そこで、本プロジェクトでは、MTV1 と ECA4 の PIP 結合特異性について評価し、PIP の細胞内局在性と比較することにより、植物の膜輸送小胞における PIP の役割を解明することを計画した。

まず、MTV1 と ECA4 の PIP に対する結合特異性を評価するために、双方のタンパク質の PIP 結合領域と想定される部分のクローニングを行った。クローニングには多様な精製タグの付加が可能な Gateway クロー

ニングシステムを採用した。MTV1 と ECA4 の PIP 結合領域(それぞれ MTV1-ENTH、ECA4-ANTH と命名)を Gateway エントリーベクターの中に BP 反応によりクローニングし、エントリークロンを作成した。

次に、可溶性精製タグとして評価の高いマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として発現させるために専用の Destination ベクターとエントリークロンとを LR 反応により組換え、MTV1-ENTH と ECA4-ANTH を MBP 融合タンパク質として発現させるベクターの構築を行った。この発現ベクターは、大腸菌の生育温度を通常の 37°C から 15°C の低温に下げ、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加すると、コールドショックタンパク質発現プロモーターにより標的遺伝子を発現誘導するシステムとなっている。この発現ベクターを用いて、大腸菌を用いた MBP-MTV1-ENTH および MBP-ECA4-ANTH 組換えタンパク質の生成を試みた。15°C で 0.1mM IPTG を処理して低温発現誘導を行い、48 時間培養したのち、大腸菌を回収した。回収した大腸菌の細胞懸濁液に超音波処理を施して細胞を破碎し、遠心分離により無細胞抽出液を調製した。次に、無細胞抽出液から MBP 融合タンパク質を精製するために MBP とアフィニティーの高いアミロースレジンを用いた。無細胞抽出液にアミロースレジン混ぜて、MBP 融合タンパク質をアミロースレジンに吸着させた。アミロースレジン洗浄した後、10 mM マルトースを加えて、アミロースレジンから MBP 融合タンパク質を溶出させた。溶出させた MBP 融合タンパク質に対して、抗 MBP 抗体を用いたウエスタン解析を行った結果、MBP-MTV1-ENTH と MBP-ECA4-ANTH タンパク質が検出されたが、その収量は極めて低いものであった。大腸菌の培養に用いる培地に関しては、通常の LB 培地に加え、不溶化しやすい組換えタンパク質の生産に良好と言われている M9 最小培地を用いた場合も試みたが、同様の結果であった。本研究では、両タンパク質の PIP 結合領域だけの発現を試みたために、得られた組換えタンパク質が疎水性に富み、不溶化しやすいことが考えられた。さらに、発現誘導した MBP 融合タンパク質の産生量自体が少ないことも考えられた。そのため、今後 *gluthione-S-transferase* (GST) などの他の精製タグの利用や、使用する遺伝子配列のコードン改変を行うことで、発現タンパク質の収量向上が期待される。MBP-MTV1-ENTH と MBP-ECA4-ANTH タンパク質の精製標品が相当量得られたのち、これらのタンパク質と PIP との結合特異性を、抗タグ抗体を用いた Lipid overlay assay により詳細に評価したい。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

MTV1、ECA4 を含む ENTH/ANTH アダプタータンパク質は大腸菌での組換えタンパク質の発現量が低く、調製が非常に難しいことがわかった。両タンパク質の PIP 結合特異性を評価するために PIP 結合に関わる領域だけの発現を試みた結果、得られた組換えタンパク質が疎水性に富み、不溶化しやすいことが考えられたが、生成量自体も少ないことが最も大きな問題と考えられた。今後は、精製に用いるタグを GST などの別のものにするこことやコードン改変を行うことを検討し、MTV1-ENTH と ECA4-ANTH の組換えタンパク質の精製標品の収量を高め、PIP 結合特異性解析を Lipid overlay assay により行いたい。

(3-2) 波及効果と発展性など

本プロジェクトは、これまでほとんど調べられていなかった植物タンパク質のクラスリン輸送に関わる ENTH および ANTH アダプタータンパク質の PIP 結合特異性について生化学的解析を試みた。しかし、MTV1-ENTH と ECA4-ANTH の組換えタンパク質の精製標品が十分得られなかったため、両タンパク質の PIP に対する結合特異性を詳細に評価することができなかった。MTV1 と ECA4 は二つの異なるクラスリン輸送経路 (液胞輸送経路とエンドサイトーシス経路) にそれぞれが関わるので、両タンパク質の PIP に対する結合特異性に関する情報は、PIP がクラスリン輸送経路の選別に対する役割を理解する上で非常に重要である。今後、組換えタンパク質の調製方法の改良を試み、MTV1-ENTH と ECA4-ANTH の精製標品を相当量得たのち、両タンパク質の PIP に対する結合特異性を評価し、クラスリン輸送経路の液胞輸送経路とエンドサイトーシス輸送経路の選別機構を明らかにしたい。そこから得られる知見に基づいてアダプタータンパク質の PIP 結合特異性を改変することが可能となれば、植物タンパク質の輸送経路を人為的にデザインし、農作物におけるワクチン・医薬品や生理活性物質などの有用物質の効率的な生産・蓄積への応用利用へと展開したい。

出張報告（共同研究プロジェクトの予算を使用した場合について、全員分記載して下さい。）

氏名：西村 浩二

所属：島根大学研究・学術情報機構

期間：平成28年12月26日～28日

用務先：静岡大学理学部生物科学科 粟井研究室

用務内容：共同研究（平成28年度電子工学研究所機能強化経費共同研究）の実施

主たる対応者：粟井 光一郎