

図3

(A) 粘菌走化性運動に対する DIF-1 と DIF-2 の効果. 図2のアッセイ系を利用して, 発生初期の(走化性運動能を有する)粘菌野生株細胞の走化性運動に対する DIF の効果を調べた (10 nM の DIF-1 あるいは DIF-2 存在下で, 10^{-10} ~ 10^{-7} M の cAMP に対する走化性の有無を調べた). その結果, 比較的高濃度の cAMP (10^{-8} ~ 10^{-7} M) に対する走化性運動は, DIF の存在に関係なく 100% のドロップ中で観察されたが, 低濃度 cAMP (10^{-10} ~ 10^{-9} M) に対する走化性運動は, DIF-1 によって有意に抑制され, 逆に, DIF-2 によって有意に促進された. この結果は, DIF-1 と DIF-2 が走化性運動の「負」と「正」の制御因子 (modulators) であることを示している. *regA* (cAMP 分解酵素) 欠損株では, DIF-2 による走化性促進効果が破綻 (DIF-1 による抑制効果は見られる), *gpbB* (cGMP 分解酵素) 欠損株では, DIF-1 による走化性抑制効果が破綻していることがわかった. * $P < 0.05$ vs Control. ns; not significant.

註) cAMP で刺激された粘菌細胞は, 新たに cAMP を生成し細胞外に放出する. 放出された cAMP が別の細胞を刺激し, 新たな cAMP が生成, 放出される. 自然界では, このような「cAMP リレー (relay)」によって, 多数の粘菌細胞が効率よく集合をする. しかし, このような cAMP リレーは解析結果を複雑にするため, 今回の実験は, すべてカフェイン (粘菌 cAMP 生成の阻害剤) 存在下で行われている.

(B) 粘菌野生株, *regA* 欠損株, *gpbB* 欠損株の細胞内 cGMP 濃度変化. 粘菌野生株, *regA* 欠損株, *gpbB* 欠損株を三角フラスコ中で浸透培養し, cAMP 刺激後の細胞内 cGMP 濃度変化を調べた. 野生株においては, cAMP 刺激後, 細胞内 cGMP は一過性に上昇するが, DIF-1 存在下では cGMP 上昇が抑制され, DIF-2 存在下では cGMP 濃度はより高く上昇した. ところが, *regA* 欠損株においては, DIF-2 は cGMP 濃度上昇に影響せず, それとは対照的に, *gpbB* 欠損株においては, DIF-1 は cGMP 濃度に影響しなかった.

(C) 粘菌走化性運動に対する DIF の作用機序モデル. 今回の実験結果から, DIF-1 と DIF-2 による走化性制御の機序は以下のように推測される. 図1Bのように, 通常の走化性運動においては, まず, 細胞外の cAMP が細胞膜上の受容体 (cAR1) に結合し, 細胞内のグアニリルシクラーゼ (GCase), PI3-キナーゼ, PLC などが活性化される. そして, 細胞内の cGMP やカルシウム濃度, PIP3 量が増加し, 走化性運動が引き起こされる. DIF-1 は, 何らかの機序で GbpB を活性化し, 細胞内 cGMP 濃度上昇を抑えることによって, 走化性運動を抑制する. 一方, DIF-2 は RegA を介した何らかの機序で, 細胞内 cGMP 濃度を上昇させ, 走化性運動を促進する. したがって, *regA* 欠損株, *gpbB* 欠損株においては, それぞれ DIF-2 と DIF-1 の効果が消失する. (文献1の一部改変)

ronmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba 305-8572, Japan)

高等植物ホスファチジン酸ホスファターゼの膜脂質合成, シグナリングにおける機能

1. はじめに

生体膜の構成成分がリン脂質を主要とするグリセロ脂質であることはバクテリアからヒトに至るまで広く共通して見られることだが, その生合成の鍵段階を触媒する酵素ホスファチジン酸ホスファターゼの高等植物における実体が分子レベルで分かってきたのは最近である. 本稿では, 近年分かってきた高等植物ホスファチジン酸ホスファターゼの分子生物学的知見について, その膜脂質合成およびシグナリングに果たす機能を中心に俯瞰することを試みる.

2. ホスファチジン酸ホスファターゼとは

ホスファチジン酸ホスファターゼ (PAP; EC 3.1.3.4) はホスファチジン酸 (PA) のリン酸基部位を脱リン酸化することでジアシルグリセロール (DAG) を生成する反応を触媒する酵素である (図1). 生体膜を構成するグリセロ脂質は, 解糖系から分岐して生じるグリセロール 3-リン酸を出発物質として, 2回の連続するアシル化反応を経

て PA となる (ケネディ経路)¹⁾. 高等植物においても動物と同様, 一部のグリセロ脂質 (ホスファチジルグリセロール, ホスファチジリンシトールおよびカルジオリピン) の生合成を除いて, 生成した PA は PAP により DAG に代謝され, これが主要なリン脂質, 糖脂質およびトリグリセリドの生合成の共通の基質となる. それゆえ, PAP の触媒する代謝段階は膜脂質代謝全体の鍵段階であるといえる (図1)²⁾. PAP には, 可溶性と膜結合性の二つの活性が知られており, 前者は脂質代謝に, 後者はシグナリングに関与すると一般に考えられている. また, それらの活性は脂質合成の場である小胞体, 葉緑体およびサイトゾルに局在する. 筆者らは近年, モデル植物のシロイヌナズナから各々のタイプに属する遺伝子ファミリーを相次いで単離, 解析している^{3,4)}. 以下, これら二つのタイプの PAP に関する知見をまとめてみる.

3. 膜結合性 PAP

膜結合性 PAP は分子量 20-40 kDa 程度のタンパク質で, 複数の膜貫通領域をもつ. ヒトや酵母での解析から, このタイプの PAP は PA 以外にも末端にリン酸基を有する脂質種 (たとえば, リゾホスファチジン酸, ジアシルグリセロールピロリン酸 (DGPP), スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P), セラミド 1-リン酸など) を広く基質とすることが知られており, それゆえに脂質ホスファターゼ (lipid phosphate phosphatase; LPP) と呼ばれている⁵⁾. シロイヌナズナには哺乳類 PAP のホモログが四つ知られている^{6,7)}. こ

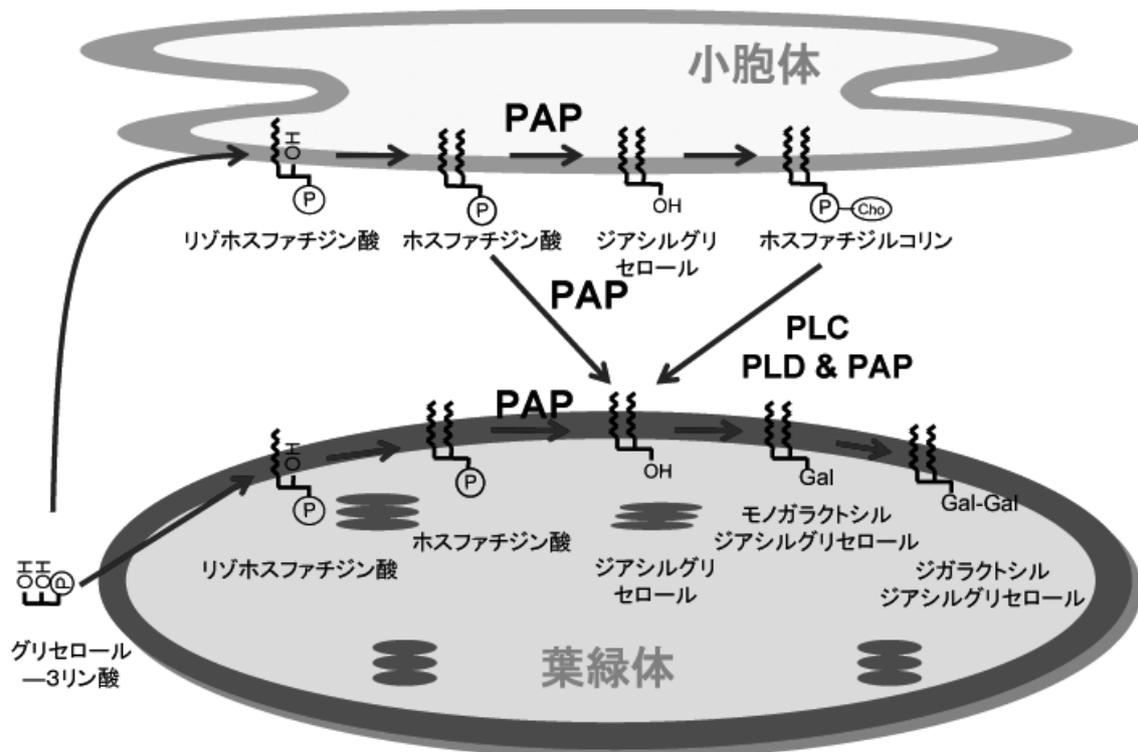


図1 高等植物の脂質合成経路とホスファチジン酸ホスファターゼ

高等植物においては、生体膜を構成するグリセロ脂質は、葉緑体および小胞体で合成される。PAPは、いずれのオルガネラにおける脂質合成にも中心的な役割を果たす。

のうち、LPP α 1は最初、植物をガンマ線または紫外線 (UV-B) 照射した際に一過的に発現が上昇するLPPとして単離された⁶⁾。LPP α 1はマストバランなどのエリシター (防御応答を誘引する因子) によっても発現が誘導されるため、ストレス応答に関わっていると考えられる。in vitroではLPP α 1はPAとDGPPの両方を基質とする⁶⁾。しかしながら、機能欠損株の単離が報告されていないので、in vivoにおけるLPP α 1の機能はまだ不明である。一方、LPP α 2はストレスやエリシター処理では誘導されないものの、種子発芽時のアブシシン酸 (植物ホルモンの一種) シグナリングに関与していることが報告されている^{6,7)}。LPP α 2の機能欠損体では内在のPA量が増加しており、アブシシン酸や塩処理などに過敏反応 (すなわち発芽率が低下するという表現型) を示す。種々の二重変異体の作成と解析により、LPP α 2はアブシシン酸シグナル伝達のメディエーターである abscisic acid insensitive4 (ABI4; 欠損するとアブシシン酸非感受性になる原因タンパク質のひとつ) の抑制的制御因子であることが分かった⁷⁾。LPP α 3およびLPP α 4に関する知見はまだほとんど得られていない

が、以上のように哺乳類LPPのホモログであるLPP α アイソフォームは主にシグナリングに関与しているようである。

一方我々は、これらの四つのLPPの中には葉緑体移行シグナルをもつものがないため、PAP活性の主要な局在場所である葉緑体内包膜のPAP活性を担う未知のPAPがまだ存在していると予想した。まず我々は、葉緑体の祖先と考えられるシアノバクテリアに哺乳類PAPのホモログが見つからないことに着目し、シアノバクテリアでは哺乳類とは異なるタイプのPAPが存在し、そのホモログがシロイヌナズナで葉緑体のPAPとして機能しているという仮説を立てた。そして、両タイプの共通の祖先と考えられるPAPを、全ゲノムが解読されている最古の生物のひとつである光合成細菌 *Chlorobium* において見つけ、そこから相同性検索により上述の仮説通り、活性部位は高度に保存されているが既知のPAPとは全長のアミノ酸配列が大きく異なる遺伝子グループをシアノバクテリアやシロイヌナズナで見出した。これらはいずれもPAP活性を有していたため、新たなPAPファミリー (原核型PAP) である

ことが分かった³⁾。シロイヌナズナの候補について抗体を作成して局在を調べたところ、三つ (LPP γ , ϵ 1, ϵ 2) がすべて葉緑体に局在することが明らかとなり、三つの葉緑体 PAP を単離することに成功した³⁾。これら三つの酵素学的特性を、シロイヌナズナの単離葉緑体をもつ PAP 活性と比較すると、LPP γ の特性のみが単離葉緑体のそれに極めて近いことが分かった。そこで、これらのノックアウト変異体を取得して解析したところ、LPP ϵ 1, LPP ϵ 2 の単独破壊株および二重破壊株は脂質の含量に変化を示さなかったが、 γ 変異体のみはホモ体が単離できなかった。このことは、LPP γ の欠損が植物に致命的な影響を与える可能性を示唆している。このように、葉緑体には少なくとも三つの PAP が存在し、LPP γ は主たる PAP 活性を担う一方、LPP ϵ 1, LPP ϵ 2 はともに何か付加的な役割をもつアイソザイムであると考えられる。なお、原核型 LPP には上記以外に LPP β と LPP δ があるが、後者は最近、スフィンゴシン-1-リン酸ホスファターゼ活性を有しており、気孔の開閉に関与していることが分かった (Imai et al., personal communication)。

4. 可溶性 PAP の脂質代謝およびリン欠乏応答における機能

可溶性 PAP の実体は、脂質研究が進んでいる哺乳類や酵母においても長らく未知であり、はじめて単離されたのは 2006 年のことである⁸⁾。Han らは出芽酵母において可溶性 PAP の精製を行ったところ、分子量 100 kDa 強のタンパク質を得た。配列解析の結果、このタンパク質はヒトやマウスにおいてリピン (lipin) と呼ばれ、グリセロ脂質代謝の調節に関わることが古くから知られていた機能未知因子の、酵母におけるホモログであった⁸⁾。そこで、我々はシロイヌナズナにおいてもリピン様タンパク質をコードする遺伝子が存在するかを探索したところ、二つを見出し、phosphatidate phosphohydrolase 1 および 2 (PAH1, PAH2) と名づけた。まず、これら二つを出芽酵母のリピン欠損株に導入したところ、二つとも欠損株のもつ温度感受性表現型および PAP 活性の低下を相補することができた。次にこれらの欠損株を取得して解析したところ、それぞれの単独欠損体では何も表現型が見られなかったが、二重欠損体では PA 含量が増加し、糖脂質含量の減少とリン脂質含量の増加が見られた。また、放射性同位体で標識した酢酸およびグリセロールを用いたパルスチェイス実験により、PAH1 および PAH2 はともに小胞体由来の PA を DAG に変換して葉緑体における糖脂質合成に基質を供給している

ことが分かった。葉緑体膜は細胞膜やミトコンドリア膜と異なり、ガラクト糖脂質を主成分としており、この糖脂質の存在がチラコイド膜で行われる光合成の電子伝達反応に必須であると考えられている⁹⁾。通常条件での糖脂質合成は葉緑体の内包膜で主に行われるため PAH1/2 は小胞体から内包膜への DAG の供給に関わっていると考えられる。

さて、膜脂質代謝のホメオスタシスは植物がリン欠乏条件下に曝されるとダイナミックに変化し、膜のリン脂質を積極的に分解する一方で、それを通常葉緑体にしかほとんど見られないガラクト糖脂質に変換して膜の機能維持をしつつ、細胞のより必要な部分へとリンを供給している¹⁰⁾。こうしたリン欠乏時の膜脂質リモデリングは、植物が不断に曝されるリン欠乏への巧みな適応戦略であると考えられているが、この代謝転換における鍵酵素が見つかっていなかったため、このリモデリングの生理学的意義は不明であった。実際、我々や海外のグループにより、リン欠乏時のリン脂質分解にかかわるホスホリパーゼ群が報告されていたが、そのいずれもが機能欠損体でも植物のリン欠乏耐性にそれほど重篤な影響を与えなかった¹¹⁻¹⁴⁾。そこで、PAH1 と PAH2 の二重欠損体をリン欠乏にしてみると、地上部の生長はほとんど停止し、リン欠乏で促進される根の生長も野生型の半分ほどに減少した。脂質を分析したところ、通常条件の二重欠損体で見られた脂質組成の変化はさらに亢進されていた。以上のことから、PAH1 と PAH2 は通常条件のみならず、リン欠乏時においても膜脂質代謝における中心的役割を果たす PAP であることが分かった。

5. おわりに

表 1 は、これまでにシロイヌナズナで報告された PAP の一覧である。近年の国内外の研究成果により、大半の PAP 遺伝子候補は出揃った感がある。いくつかのアイソフォームについては、すでにより詳細な解析がなされており、PAP の機能の解明に大きな前進を与えている。しかしながら、次なる課題もいくらか見えてきているのが現状である。まず、脂質代謝の主要な部分を担っていると考えられてきた可溶性 PAP の二重欠損体にも、まだかなりの PAP 活性が残存している⁴⁾。これは、少なくとも九つ単離されている膜結合型 LPP によるものであるとも考えられるが、出芽酵母の解析によれば、リピン欠損体の可溶性画分にもまだ可溶性 PAP 活性が残存している⁸⁾。このことは、リピンホモログ以外にも可溶性 PAP 活性を担う未知の酵素タンパク質が存在していることを示唆する。こうしたタンパク質の単離と解析により、まだ不明点の少なくな

表1 シロイヌナズナで見出された膜結合型および可溶性ホスファチジン酸ホスファターゼ

遺伝子名	分子量 (kDa)	AGIコード	基質	発現レベルの高い組織*	機能	文献
膜結合型						
真核型						
<i>LPPα1</i>	36.6	At2g01180	PA, DGPP	ロゼット葉	UV照射, エリシターにより発現応答	6
<i>LPPα2</i>	32.7	At1g15080	PA, DGPP	茎頂, 胚軸	発芽時のABAシグナリングに関与	6, 7
<i>LPPα3</i>	40.8	At3g02600	?	花卉, 心皮	?	6, 7
<i>LPPα4</i>	35.1	At3g18220	?	花粉	?	5, 7
原核型						
<i>LPPβ</i>	23.4	At4g22550	?	?	?	3, 5
<i>LPPγ</i>	25.7	At3g03830	PA	ロゼット葉, おしべ, 小花柄	葉緑体の主要なPAPを担う	3
<i>LPPδ</i>	46.2	At3g58490	S1P	?	気孔の開閉	3, 5
<i>LPPε1</i>	30.6	At3g50920	PA	植物体全体	葉緑体に局在	3
<i>LPPε2</i>	31.5	At5g66450	PA	?	葉緑体に局在	3
可溶性						
<i>PAH1</i>	101.0	At3g09560	PA	乾燥種子	膜脂質代謝に主要に関わるPAP	4
<i>PAH2</i>	101.2	At5g42870	PA	乾燥種子	膜脂質代謝に主要に関わるPAP	4

*Arabidopsis eFP Browser 15) による

いPAPの膜脂質代謝における機能の全容が解明に向かうものと思われる。一方で、LPP酵素ファミリーのシグナリングに果たす役割も今後の解析が待たれる。PAは植物における代表的な2次メッセンジャーであるが、PAの産生に関わる酵素群（ホスホリパーゼDやホスホリパーゼCとジアシルグリセロールキナーゼ）の研究に比べるとPAシグナルを弱める働きとしてのPAPの研究はまだまだ始まったばかりである¹⁵⁾。機能未知のアイソフォームの解析と併せて、すでに解析のなされているアイソフォームの更なる解析を通して、こうした機能の詳細が見えてくるものと期待する。

謝辞

筆者らは本稿執筆にあたり、今井博之博士（甲南大学）より未発表の結果をご提供いただいた。ここに感謝申し上げます。また、図の作成にあたり土屋摩珠氏の助力を頂いたこととお礼申し上げます。本稿で議論されている研究成果の一部は文部科学省特定領域研究（課題番号18056007および20053005）および日本学術振興会海外特別研究員制度（受領者：中村友輝）による研究期間において行われた。また、本稿の執筆はフンボルト財団リサーチフェローシップ（受領者：中村友輝）の受給期間に行われた。

- 1) Kennedy, E.P. (1957) *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.*, 16, 853-855.
- 2) Xu, C., Fan, J., Froehlich, J.E., Awai, K., & Benning, C.

- (2005) *Plant Cell*, 17, 3094-3110.
- 3) Nakamura, Y., Tsuchiya, M., & Ohta, H. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 29013-29021.
- 4) Nakamura, Y., Koizumi, R., Shui, G., Shimojima, M., Wenk, M.R., Ito, T., & Ohta, H. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106, 20978-20983.
- 5) Nakamura, Y. & Ohta, H. (2010) in *Lipid Signaling in Plants* (Munnik, T. ed.), pp. 131-141, Springer-Verlag, Berlin & Heiderberg.
- 6) Pierrugues, O., Brutusco, C., Oshiro, J., Gouy, M., Deveaux, Y., Carman, G.M., Thuriaux, P., & Kazmaier, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 20300-20308.
- 7) Katagiri, T., Ishiyama, K., Kato, T., Tabata, S., Kobayashi, M., & Shinozaki, K. (2005) *Plant J.*, 43, 107-117.
- 8) Han, G-S., Wu, W-L., & Carman, G.M. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 9210-9218.
- 9) Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M., & Ohta, H. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104, 17216-17221.
- 10) Benning, C. & Ohta, H. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 2397-2400.
- 11) Nakamura, Y., Awai, K., Masuda, T., Yoshioka, Y., Takamiya, K., & Ohta, H. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 7469-7476.
- 12) Gaude, N., Nakamura, Y., Scheible, W.-R., Ohta, H., & Dörmann, P. (2008) *Plant J.*, 56, 28-39.
- 13) Cruz-Ramírez, A., Oropeza-Aburto, A., Razo-Hernández, F., Ramírez-Chávez, E., & Herrera-Estrella, R. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103, 6765-6770.
- 14) Li, M., Welti, R., & Wang, X. (2006) *Plant Physiol.*, 142, 750-761.
- 15) Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., & Provant, N.J. (2007) *PLoS One*, 2, e718.
- 16) Wang, X. (2004) *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, 329-336.

中村 友輝^{1,2}, 太田 啓之³

¹Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research,

²Institute for Molecular Physiology and

Biotechnology of Plants, University of Bonn,

³東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター)

Phosphatidic acid phosphatases in seed plants~Involvement in membrane lipid biosynthesis and signal transduction

Yuki Nakamura^{1,2} and Hiroyuki Ohta³ (¹Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Köln, Germany; ²Institute for Molecular Physiology and Biotechnology of Plants, University of Bonn, Karlrobert-Kreiten-Str. 13, 53115 Bonn, Germany; ³Center for Biological Resources and Informatics, Tokyo Institute of Technology, 4259-B-65, Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan)

DNA, RNA の末端および内部に対する 化学修飾法の開発

1. はじめに

PCR, マイクロアレイ, 高速シークエンサーなど, 現在バイオ研究において頻繁に用いられている様々な遺伝子解析技術には, 多くの核酸化学の手法が用いられている. 同様に, アンチセンス, デコイ, アプタマーをはじめ siRNA, microRNA など, 核酸は最近になって医薬品としても再度注目を浴び, それらの生体内への導入効率や持続性を向上させるためにも, 化学的手法は不可欠になっている¹⁾. また, 二本鎖 DNA が電導性を示すといった新たな性質も見出され²⁾, 今後は工学的技術の発展とも融合し, より広範な領域において核酸が活用される可能性が高い. これらの核酸の可能性を引き出して有効に応用するには,

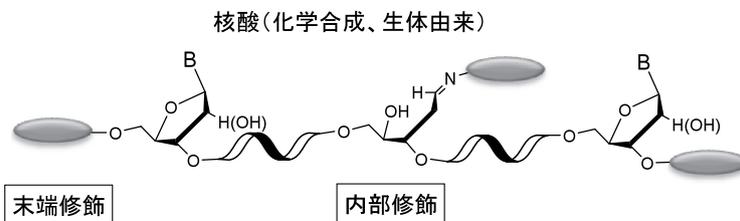
核酸を任意に修飾して取り扱う化学的技術が必須であり, 今後はこれまで以上にそうした修飾技術の必要性が増すことは間違いない.

DNA, RNA への多くの化学的修飾法の中でも, それらに対する機能性分子の導入や, 固体表面への固定化に用いられる技術が, 将来的にも重要で汎用性のある修飾技術の一つになると考え (図 1), 我々は「核酸の末端および内部に対する化学修飾技術」に関する開発を行ってきた. その結果, DNA, RNA の末端および内部修飾に対し, これまでに用いられてきた修飾試薬よりも高い性能を有する新しい化学試薬を開発し, その一部は実用化されるに至った. 本稿ではそれら一連の化学修飾の中で, 初めに合成核酸の 5'末端への化学修飾に必要なリンカーの開発について述べ, 続いて核酸の鎖内ならびに 3'末端に対する修飾法に関して記述する.

2. オリゴヌクレオチドの 5'末端修飾に利用する アミノリンカーの開発

遺伝子の検出や解析には, DNA, RNA を蛍光標識し, あるいは固相表面上に固定化する反応が必要になる^{3,4)}. そのような反応は, プローブと標的遺伝子の相補的な結合が阻害されないようにオリゴの末端部位に反応性のリンカーを介して行われ, 幾種類かのリンカーが用途に応じて使い分けられている. 中でも化学的に安定で, 応用範囲も広い “アミノリンカー” が, 最も頻繁に用いられている (図 2a).

このアミノリンカーには, 直鎖の炭素鎖に一級アミノ基が結合した構造が, 全世界で広く用いられてきた (図 2a 従来型 (C6) リンカー)^{5,6)}. 5'末端にアミノ基が結合したオリゴ (以下アミノ化オリゴ) は, オリゴ合成の最終段階にアミノ化試薬をオリゴ末端に結合させて合成される. その際, アミノリンカーの導入に失敗したオリゴが生成する場合があります, それら “不良オリゴ” は, アミノ化オリゴの



目的: 固定化, 機能性分子の導入, 安定化, 標識 (検出)

図 1 DNA, RNA の修飾部位と目的
内部修飾として DNA 中の脱塩基部位への修飾を記載