

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07335

研究課題名(和文)リン欠乏時の膜脂質転換はなぜ窒素欠乏でも重要か？

研究課題名(英文) Why is the phosphate-starvation induced lipid remodeling important for growth under nitrogen starvation?

研究代表者

下嶋 美恵 (Shimajima, Mie)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：90401562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物はリン欠乏にさらされると、生体膜を構成するリン脂質の大半を分解し、生成されたリンを細胞内に供給すると同時に、脂質・脂肪酸は糖脂質合成の基質として利用し、生成された糖脂質を失われたリン脂質の代替として利用する”リン欠乏時の膜脂質転換”という機構を持っている。本研究では、リン欠乏時の膜脂質転換においてホスファチジン酸の分解に関わるホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼPAH1およびPAH2の解析をシロイヌナズナを用いて行った。その結果、PAHは窒素欠乏時の葉緑体光合成膜の分解抑制および光合成活性の維持に寄与しており、窒素欠乏時の生育に重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The Arabidopsis phosphatidic acid phosphohydrolases, PAH1 and PAH2, are involved in the phospholipid biosynthesis and are essential for growth under phosphate starvation. In this study, we showed that PAH1 and PAH2 are also essential for growth under nitrogen starvation. Comparison of photosynthetic activities and membrane structures among wild type, pah1pah2 knock-out mutant, and PAH1 or PAH2-overexpressing pah1pah2 indicated that PAH is involved in maintaining chloroplast membrane structure and is required for growth under nitrogen-depleted conditions.

研究分野：植物生理学

キーワード：リン欠乏 窒素欠乏 植物脂質

## 1. 研究開始当初の背景

植物の生長には、3大栄養素である窒素、リン、カリウムが必須である。そのため、これらの栄養素が生育環境から欠乏すると、植物は様々な戦略でこれらを獲得しようとする事が知られている。そのうちリンは、土壌中ではしばしばアルミニウムや鉄と錯体を形成し、植物には摂取されない形で存在するため、多くのリン肥料を与えても、実際に植物に取り込まれるリンは少量であることが知られている。その結果、植物に取り込まれなかったリンは土壌汚染を引き起こすなど、近年リンに関する深刻な問題が広く話題になっている (Kochian 2012 Nature)。植物はリン欠乏にさらされた場合、細胞膜やミトコンドリア膜に存在するリン脂質の大部分を糖脂質に転換し、膜中に蓄積されていたリンをより重要な生体内の代謝系に利用することが知られている。この事象は“リン欠乏時の膜脂質転換”と呼ばれており、これまでに申請者らの研究により植物に特有のリン欠乏下における生長戦略であることが分子レベルでも明らかになっているが、その中でも近年、新たに発見されたのが、脂質合成の鍵となるリン脂質ホスファチジン酸 (PA) の代謝酵素である PA ホスホヒドロラーゼ (PAH1, PAH2) の寄与である (Shimojima et al. 2013 Front. Plant Sci., Yuzawa et al. 2012 DNA Res., Okazaki, Shimojima et al. 2009 Plant Cell, Nakamura et al. 2009 PNAS)。この PAH1, PAH2 のシロイヌナズナ二重欠損変異体 pah1pah2 は、野生株に比べて著しくリン欠乏耐性が低下しており、それは膜中でリンのプールとしても機能しているリン脂質を分解できず、リンを放出できないためであることが示唆された (Nakamura et al. 2009 PNAS)。しかし、最近の申請者らの研究により、この pah1pah2 変異体はリン欠乏だけでなく、窒素欠乏耐性も著しく低下していること、またこれらの過剰発現体では逆に、窒素欠乏耐性が向上していることがわかった (図 1)。さらに、野生株、変異体、PAH1/PAH2 各過剰発現体の地上部に含まれる遊離のリン含量、窒素含量を測定したところ、通常生育時には大きな差が見られなかったが、窒素欠乏生育時には、過剰発現体においてリン含量が高いだけでなく、窒素含量も野生株に比べて高いことが分かった (図 2)。これらの申請者らの研究結果は、リン欠乏と窒素欠乏が植物に与える影響には相関関係があることを示唆している。本研究開始当初、リン欠乏応答と窒素欠乏応答のクロストークについてはトランスポーターの研究により少しずつ明らかになってきているが (Park et al. 2014 Plant Cell) どのようなメカニズムで植物がこれらの複合的な栄養欠乏ストレスに応答しているのかということについて詳細はわかっていなかった。申請者らの当時得た研究結果は、植物におけるリン欠乏時の膜脂質転換は、リン欠乏耐性だけでなく窒素欠

乏耐性にも寄与していること、すなわち植物のリン欠乏および窒素欠乏への応答には膜脂質転換が深く寄与していることを示唆していた。

## 2. 研究の目的

植物はリン欠乏にさらされると、生体膜を構成するリン脂質の大半を糖脂質に転換し、膜中のリンをより重要な生体内の代謝系に利用する。これはリン欠乏に順応すべく植物が持っている膜脂質転換機構であることが申請者らのこれまでの研究により明らかになっている。しかし申請者らの研究により、リン欠乏時の膜脂質転換を欠損した植物体では、想定されていたリン欠乏ストレス耐性の低下だけでなく、窒素欠乏ストレス耐性も低下することがわかってきた。本研究は、シロイヌナズナのリン欠乏時の膜脂質転換に関わる変異体や過剰発現体を用いて、植物がどのような脂質転換戦略によりリン欠乏および窒素欠乏ストレスを克服して生長を可能にするのか、そのメカニズムを明らかにすることを目的として行った。

## 3. 研究の方法

シロイヌナズナの野生株 (WT)、リン欠乏時の膜脂質転換を欠損したリン脂質分解酵素欠損変異体 (pah1pah2) と、pah1pah2 バックグラウンドで PAH1 または PAH2 を過剰発現させた形質転換体 (PAH1OE, PAH2OE) を用いて、窒素欠乏ストレス下における表現型、光合成活性、クロロフィル含量などを野生株と比較しながら解析を行った。また、PAH は小胞体から葉緑体への脂質輸送にも寄与していることが考えられたため、通常時および窒素欠乏時の各植物体の葉の葉緑体の膜構造を、電子顕微鏡を用いて観察した。

## 4. 研究成果

シロイヌナズナのリン脂質分解酵素 (ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ: PAH1, PAH2) の欠損変異体 pah1pah2 は、窒素欠乏条件下では生育が著しく阻害されることを発見した (図 1A, B)。また、欠損変異体では、窒素欠乏時のみクロロフィル含量および光合成活性が顕著に低下することがわかった (図 1C, D)。その一方で、PAH の相補体かつ過剰発現体においては、窒素欠乏時のクロロフィル含量が野生株 (WT) よりも多く、光合成活性も顕著に高いことが明らかになった (図 1C, D)。しかし、野生株 (WT) と PAH1OE, PAH2OE の膜脂質組成は、通常生育時、窒素欠乏時共に大きな違いは見られなかった。そこで、アイソトープラベルされた酢酸を用いて、脂質のパルスチェイスラベリング実験を行い、膜脂質全般のターンオーバーに違いが見られないかどうかを解析した。その結果、窒素欠乏時の脂質のターンオーバーは解析したいずれの植物体においてもあまり大きな動きの違いが見られなかったが、

窒素欠乏条件下では、葉緑体チラコイド膜を構成するリン脂質で、光合成能に大きな影響を与えることが知られているホスファチジルグリセロールのラベリング率が通常条件に比べて非常に高いことが明らかになった。

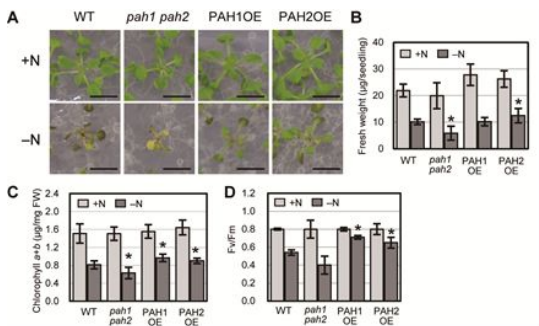


図 1 シロイヌナズナ各植物体の窒素欠乏下での生育の様子

- A、通常生育および窒素欠乏下での植物の生育比較
- B、植物体地上部の重量（新鮮重量）
- C、植物体地上部のクロロフィル含量
- D、光化学系 II の最大量子収率（Fv/Fm）

+N：通常生育条件、-N：窒素欠乏条件

WT：野生株、pah1pah2：PAH1/PAH2 欠損変異体、PAH1OE は PAH1 相補体、PAH2OE は PAH2 相補体

そこで、光合成活性の違いが光合成膜の状態の違いに起因するのかどうかを調べるために、通常生育時および窒素欠乏時の各植物葉の葉緑体の様子を、透過型電子顕微鏡で観察した（図 2）。その結果、pah1pah2 欠損変異体は通常生育時には、野生株や PAH1OE 相補体と葉緑体の様子に違いは見られないが、窒素欠乏時には顕著に葉緑体内部の膜構造、特に光合成の場であるチラコイド膜の崩壊が著しく進んでいることがわかった（図 2B）。

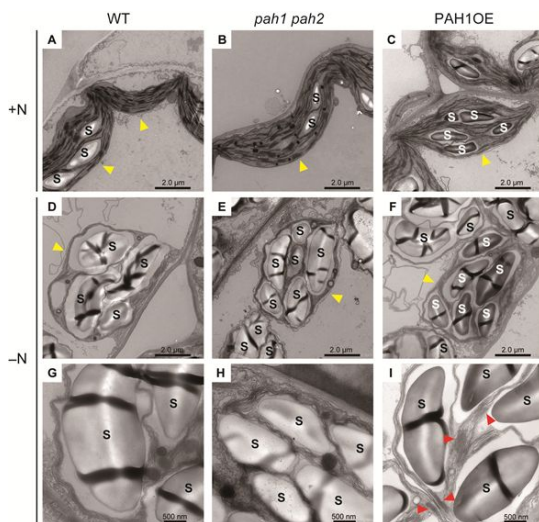


図 2 通常生育条件および窒素欠乏生育条件下におけるシロイヌナズナ各植物体の葉の

細胞の電子顕微鏡写真

A は通常生育条件における野生株、B は PAH1/PAH2 欠損変異体、C は PAH1 相補体、D と G は窒素欠乏生育条件における野生株、E と H は PAH1/PAH2 欠損変異体、F と I は PAH1 相補体

赤矢印は葉緑体チラコイド膜のグラナ-ラメラ構造、黄矢印は葉緑体で S はデンプン粒

これらの結果から、リン脂質分解酵素 PAH1、PAH2 は、窒素欠乏時の植物生育に必須であり、窒素欠乏時の葉緑体のチラコイド膜崩壊の抑制および光合成活性の維持に寄与していることが明らかになった。

また以上のことから、PAH は細胞質に局在し、通常条件での生育においては大きな役割は担っていないが、少なくとも窒素欠乏生育条件下での小胞体や葉緑体の膜のホメオスタシスに寄与しており、その欠損は窒素欠乏時の生育に致命的であることが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

〔研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線〕

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoshitake Y, Sato R, Madoka Y, Ikeda K, Murakawa M, Suruga K, Sugiura D, Noguchi K, Ohta H, Shimojima M. (2017) Arabidopsis phosphatidic acid phosphohydrolases are essential for growth under nitrogen-depleted conditions. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1847. doi: 10.3389/fpls.2017.01847 査読有り

〔学会発表〕(計 19 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下嶋 美恵 (Shimojima, Mie)  
東京工業大学・生命理工学院・准教授  
研究者番号：90401562

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

太田 啓之 (Ohta, Hiroyuki)  
東京工業大学・生命理工学院・教授  
研究者番号：20233140

(4) 研究協力者

( )