

令和元年6月11日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07388

研究課題名(和文)植物の小胞体ストレス応答における脂質シグナリングとGタンパク質による制御機構

研究課題名(英文) A study on molecular mechanisms of lipid signaling and G protein function in plant endoplasmic reticulum stress response

研究代表者

金原 和江 (Kanehara, Kazue)

室蘭工業大学・大学院工学研究科・その他(客員准教授)

研究者番号：30587746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は様々なストレスに晒されながら、その恒常性を維持し生命の営みを休むことなく続けている。近年の研究により、気温の上昇や塩濃度などの変化によってもたらされる環境ストレスの影響が、植物の細胞レベル特に細胞内小器官のひとつである小胞体レベルで明らかになりつつある。本研究では、高等植物の小胞体ストレス応答を可視化できる形質転換植物の構築に成功するとともに、脂肪酸不飽和化酵素の一つが小胞体ストレス耐性に重要であることを明らかにした。これらの成果を2報の原著論文として英文の国際誌に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の品質管理に焦点をあてた小胞体ストレス応答の分子メカニズムは、主に動物細胞を用いた研究からその全容が明らかになりつつあるが、高等植物における知見は未だ限られてる。本研究で得られた成果は、植物の小胞体ストレス応答における理解を通じて、高ストレス耐性植物の分子育種に新たな方法を提示し植物バイオマスの増産に貢献する方法論を拓く可能性があるため、生物学的意義だけでなく、農産業的にも極めて意義深い。

研究成果の概要(英文)：Living cells always need to maintain cellular homeostasis while they continuously suffered from various stresses. Recent studies have revealed molecular mechanisms of stress responses at the endoplasmic reticulum in higher plants that are exposed to high temperature or salinity.

In our research project, we successfully established Arabidopsis transgenic lines that allow us to visualize the endoplasmic stress response in vivo. In addition, we found that one of fatty acid desaturases is important in endoplasmic reticulum stress tolerance. We published two original articles in international journals that report these results.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス Gタンパク質 脂質シグナリング シロイヌナズナ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトゲノムには、三量体 G タンパク質複合体を構成する各サブユニットが複数コードされている。例えば、G α 、G β 、G γ をコードする遺伝子は、それぞれ 23、5、12 ずつあり、これらが多岐に渡る細胞内シグナル伝達経路に関与することが知られている。ほ乳類細胞のそれらと比較し、高等植物シロイヌナズナのゲノムにおいては、唯一の G α 、G β 及び、3つの G γ のみが、研究開始当初までに報告されていた。このように G タンパク質をコードする遺伝数がシロイヌナズナではヒトゲノムと比較し格段に少ないにもかかわらず、小胞体ストレス応答や各種環境適応、発生過程などに G タンパク質シグナル伝達系が関与する例が多数報告されていた。ほ乳類細胞においては、G $\beta\gamma$ 複合体は PLC β を活性化し、セカンドメッセンジャーとして機能する IP $_3$ 及び DAG を産生する。植物では、薬理実験により PLC 活性が病原菌感染や高温ストレスに関与することが報告されており、その上流のシグナル伝達経路に G タンパク質の関与が議論されてはいたが、ノックアウト体などを用いた分子生物学的研究には至っていなかった。また、PLC 活性がシロイヌナズナの根の発達に必須だが、PLC 活性を担う遺伝子は未同定であった。

(2) 当研究グループは先行研究「高等植物の小胞体ストレス耐性に関わる G タンパク質及び PLC シグナル伝達系の解明」科研費基盤研究 C（平成 25-27 年度）により下記の成果をあげ、2 報の原著論文を 2015 年に発表した。

1) 9つの PLC アイソフォームのうち AtPLC2 がシロイヌナズナ芽生えの発生に必須であり、PLC 活性を担う主要な遺伝子であることを遺伝学的手法と脂質プロファイリングなどから明らかにした。さらに、AtPLC2 の欠失植物体が小胞体ストレスに脆弱であることを示し、小胞体ストレス応答にフォスホイノシタイドシグナリングが関与する例を初めて報告した。これらの成果を *PLOS Genetics* に発表した [Kanehara *et al.*, 2015, 11(9):e1005511]。2) シロイヌナズナ三量体 G タンパク質複合体の G β サブユニットをコードする唯一の遺伝子 AGB1 が、小胞体ストレス応答に必須であることを明らかにした。これに対して、G α と G γ サブユニットをコードするそれぞれの欠失植物体では、野生型と比較して差がないことを見出し、三量体 G タンパク質複合体の各サブユニットが小胞体ストレス応答時に異なる働きをすることを示唆した。これらの成果を *Plant Signaling & Behavior* に発表した [Y. Cho *et al.*, 2015, 10(10):e1061162]。

2. 研究の目的

高等植物シロイヌナズナにおいて、病原菌感染や高温、高塩などの各種ストレスが、小胞体ストレス応答を惹起することが知られているが、その分子機構に関する知見は限られている。本研究では、当研究グループの先行研究である科研費基盤研究 C（平成 25-27 年度）[課題番号 25440123]で得られた成果を発展させ、小胞体ストレス応答における脂質シグナリングと G タンパク質による制御機構に注目し、環境ストレス耐性機構を小胞体の恒常性維持の観点から理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレス応答が可視化可能なシロイヌナズナを構築するため、はじめに、シロイヌナズナのゲノムがコードする BiP3 遺伝子に注目した。通常生育条件下において、BiP3 の発現レベルは極めて低い、小胞体ストレスに晒されるとその発現レベルは急上昇する。そこで、BiP3 遺伝子の発現の上昇を小胞体ストレス応答のマーカーとして可視化するため、遺伝子組換

え技術を用いて、蛍光タンパク質 (Venus 及び mRFP) を融合した BiP3 を構築し、野生型のシロイヌナズナに形質転換した。構築した形質転換植物体を小胞体ストレス誘導物質であるツニカマイシンで処理し、BiP3 に融合した蛍光タンパク質を共焦点レーザー顕微鏡により観察し、記述した。さらに、BiP3 抗体を作成し、BiP3 タンパク質を生化学的に検出した。詳細な方法は、原著論文として 2017 年に報告した [Cho and Kanehara (2017) *Front. Plant Sci.* 8:144. DOI: 10.3389/fpls.2017.00144]。

(2) 上述 (1) と同様の方法を用いて、AGB1 に蛍光タンパク質 (Venus) を融合し、AGB1 の植物体内での挙動を観察した。さらに、構築した形質転換植物を用いて、Venus タンパク質を融合した AGB1 の相互因子を、GFP 抗体を用いたプルダウンアッセイにより共沈降した。共沈降したタンパク質の同定は LC-MS/MS により行った。相互作用を確認するため、シロイヌナズナの葉より調整したプロトプラストを用いて BiFC 実験を行った。

(3) 逆遺伝学的手法により、脂肪酸不飽和化酵素を欠失した植物体の小胞体ストレス耐性を調べた。はじめに、脂肪酸不飽和化酵素を欠失した植物のホモ接合体の確立のため、T-DNA 挿入形質転換植物の単離を行った。単離後、変異植物体の小胞体ストレス耐性を、ツニカマイシンを含んだ培地で植物を育てることにより調べたところ、*Fatty Acid Desaturase 2 (FAD2)* を単独で欠失した植物体でのみ、ストレスに脆弱になることが明らかとなった。そのため、さらに FAD2-GUS と FAD2-Venus を発現する植物体を構築し、組織特異的な発現と細胞内局在をそれぞれ明らかにした。また、植物体より糖脂質を抽出し、TLC により展開したのち、各糖脂質の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより測定した。これらの詳細な方法については、原著論文として報告した [Nguyen et al, (2019) *Plant J. in press*]。

4. 研究成果

(1) 小胞体ストレス応答が可視化可能なシロイヌナズナの形質転換植物体の構築に成功し、その組織特異性を記述し、原著論文として 2017 年に報告した [Cho and Kanehara (2017) *Front. Plant Sci.* 8:144. DOI: 10.3389/fpls.2017.00144]。

[1-1] *BiP3* のプロモーターに蛍光タンパク質 *mRFP* 遺伝子を融合したプラスミドを構築し、シロイヌナズナの野生型植物に形質転換し、スクリーニングを行った。その結果、発芽後 7 日目の植物体の根において、小胞体ストレスに応答する蛍光タンパク質の観察に成功した (図 1)。ツニカマイシンにより、小胞体ストレスを誘導し、5 時間後のサンプルを共焦点レーザー顕微鏡により観察した。根の全体でシグナルが

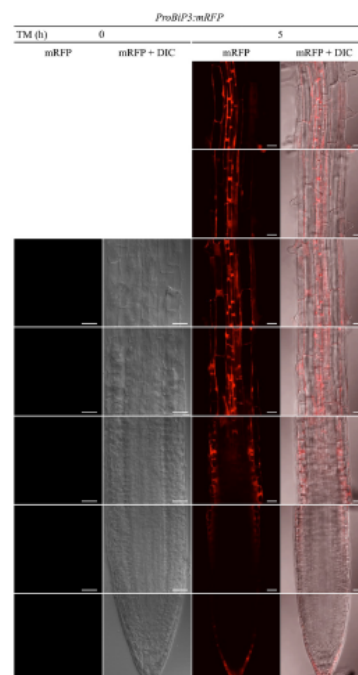
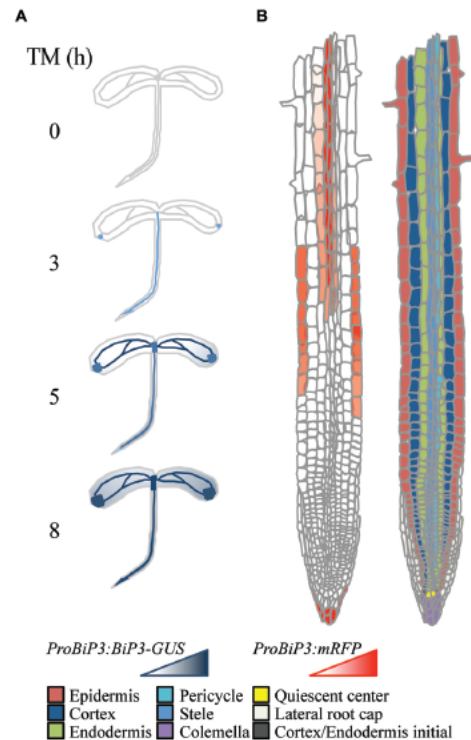


図 1, 発芽後 7 日目の *ProBiP3:mRFP* 芽生えをツニカマイシンで 5 時間処理し、mRFP 蛍光シグナルを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Scale bars, 10 μ m.

検出されるのではなく、図 1 及び図 2 B 左に示すように、主に 3 つの領域で小胞体ストレス応答が強く検出された。

[1-2] 上述の *ProBiP3:mRFP* 植物体に加え、
ProBoP3:BiP3-GUS を発現する形質転換植
 物体の構築に成功した。シロイヌナズナの芽
 生えをツニカマイシンで0、3、5、8時間
 と処理し、GUS 染色を行った。その結果、図
 2に示すように、特異的な部位でシグナルを
 観察した。これらの結果より、シロイヌナズ
 ナは小胞体ストレスに対して、組織特異的に
 応答している可能性が示唆された。

図2 シロイヌナズナの根における組織特異的な小胞体ス
 トレス応答：(A) 発芽後7日目の *ProBiP3:BiP3-GUS* をツニカマ
 イシンで0,3,5,8時間処理した時の発現パターンの模式図。(B)
 根における *ProBiPB:mRFP* の小胞体ストレス応答時の発現パ
 ターンの模式図 (左)。細胞タイプの模式図 (右)。



(2) 蛍光タンパク質を融合した AGB1 を構築し、AGB1 のシロイヌナズナ内での挙動をモニ
 ターすることに成功した。さらに、構築した植物体を用いて、AGB1 と相互作用する転写因子を
 見出した。現在、詳細な分子メカニズムの解明に向け、実験結果に基づく幾つかの仮説について
 検証中である。

(3) 脂質シグナリングの関わりに関して、逆遺伝学的手法により脂肪酸不飽和化酵素の一つが
 小胞体ストレス耐性に重要であることを見出し、その内容を原著論文としてまとめた [Nguyen
 et al, (2019) *Plant J. in press*]. その成果の一部を下記に示す。

[3-1] 膜糖脂質の脂肪酸組成が小胞体ストレス耐性に関与するかどうかを調べるため、シロイヌ
 ナズナゲノムがコードする8つの *Fatty Acid Desaturase (FAD)* に注目した(図3 a)。はじめに、
 それぞれの遺伝子を単独で欠失する植物体の単離を行い、小胞体ストレス耐性を調べた。その結
 果、*fad2* 植物体が野生型と比べてストレスに対して脆弱になることを見出した (図3 b, c)。

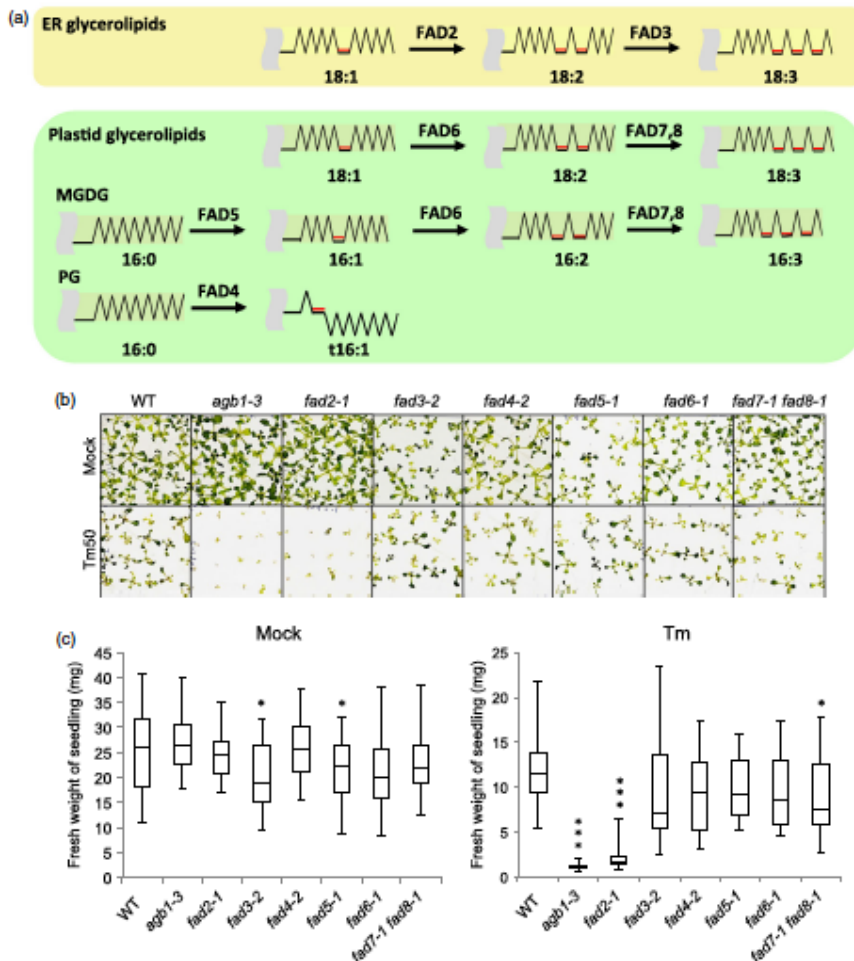
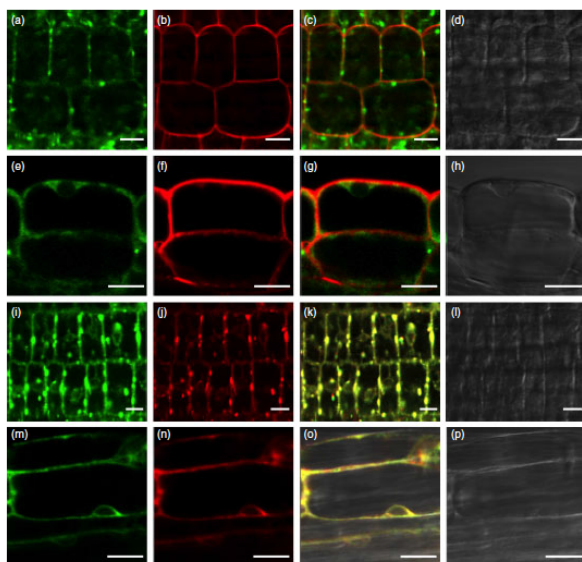


図3 シロイヌナズナがコードする8つの脂肪酸不飽和化酵素 (Fatty Acid Desaturase: FAD)

[3-2] 上述の実験結果 (図3) より、FAD2 遺伝子に注目して研究を進めた。FAD2 は小胞体にある



膜糖脂質の脂肪酸を基質とするため、FAD2 自身も小胞体に局在する酵素であることが予想されるが、それを証明する実験データは報告されていなかった。そこで我々は、FAD2 タンパク質の C 末端に蛍光タンパク質 (Venus) を融合し、FAD2 自身のプロモーターにより遺伝子発現が制御される系を構築し、*fad2-1* 植物体を形質転換した。その結果、FAD2-Venus タンパク質は *fad2-1* が示す小胞体ストレス耐性のフェノタイプを野生型と同程度までに回復させた。このことより、FAD2-Venus タンパク質がシロイヌナズナ内で機能的であることが明らかとなった。この FAD2-Venus を発現する形質転換植物体の根を用いて、FAD2 の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により調べた (図4)。

図4 FAD2-Venus の細胞内局在。発芽後5日目の *ProFAD2:FAD2-Venus fad2-1* の根を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。(a-h) Venus 蛍光シグナル (a, e), FM-64 染色 (細胞膜マーカー) (b, f) マージイメージ (c, g) DIC イメージ (d, h). (i-p) (a-h) と同様に観察したイメージであるが、(i, n) は小胞体を ER-Tracker Red により染色したイメージである。Bars=40 μ m.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yueh Cho and Kazue Kanehara, Endoplasmic reticulum stress response in Arabidopsis roots. *Frontiers in Plant Science* 査読有、Vol. 8、2017、pp. 1-10、doi: 10.3389/fpls.2017.00144
- ② Van Cam Nguyen, Yuki Nakamura and Kazue Kanehara, Membrane lipid polyunsaturation mediated by *FATTY ACID DESATURASE 2 (FAD2)* is involved in endoplasmic reticulum stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 査読有、2019、*in press*

[学会発表] (計 6 件)

- ① Yueh Cho, Tatsuo Iwasa, Markus R Wenk, Kazue Kanehara, Arabidopsis phosphoinositide-specific phospholipase C2, AtPLC2, involved in the endoplasmic reticulum stress tolerance. 57th International Conference on the Bioscience of Lipids, 2016
- ② Kazue Kanehara, Chao-Yuan Yu, Markus R Wenk, Tatsuo Iwasa, Phosphoinositide signaling involved in the endoplasmic reticulum stress response in higher plants. EMBO conference: Structure and function of the endoplasmic reticulum, 2016
- ③ Yueh Cho, Kazue Kanehara, Endoplasmic reticulum stress response in Arabidopsis root. EMBO Workshop: Intercellular communication in development and disease, 2017
- ④ Kazue Kanehara, The link between endoplasmic reticulum stress response and phosphoinositide signaling in higher plants. IoC-IPMB-ITbM Joint Symposium on New Frontiers by Fusing Chemistry and Biology, 2017
- ⑤ Yueh Cho, Tatsuo Iwasa, Kazue Kanehara, Arabidopsis, AGB1 in endoplasmic reticulum stress response, The 7th Asian Symposium on Plant Lipid, 2017
- ⑥ Kazue Kanehara, Yueh Cho, Tatsuo Iwasa, The heterotrimeric G protein contributes to endoplasmic reticulum stress tolerance in Arabidopsis. EMBO Workshop: Membrane contact sites in health and disease, 2018

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：岩佐達郎

ローマ字氏名：IWASA, Tatu

所属研究機関名：室蘭工業大学

部局名：工学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：00133926

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。