

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05371

研究課題名（和文）植物の膜脂質転換が担う栄養欠乏ストレス耐性メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of nutrient-starvation tolerance mediated by membrane lipid remodeling in plants

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、特に種子植物シロイヌナズナとコケ植物ゼニゴケを用いて、リン欠乏時の膜脂質転換に寄与する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（PAH）に着目して膜脂質転換機構の解析を行った。シロイヌナズナでは、リン欠乏時のリン脂質分解酵素とされていた非特異的ホスホリパーゼC5は、PAHと比較するとその寄与は小さく、他に未知のリン脂質分解酵素が存在していることが明らかになった。また、ゼニゴケのPAHは、生育に必須で寄与する脂質代謝経路もシロイヌナズナと同様であるが、植物体全体のリン脂質分解にはほとんど寄与しておらず、別のリン脂質分解酵素の存在が必須であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物における栄養欠乏ストレス耐性を膜脂質の観点から明らかにする点で基礎研究としても重要であるが、将来的には、本研究結果を利用して栄養欠乏に強い作物の開発につなげることで農業的な実用化も期待できる。そのため、本研究結果は、国内外を問わず広く一般の方々の興味を引く内容であり、国内だけでなく海外に向けた東工大からのプレスリリース、国内外マスコミへの情報提供で十分アピールでき、波及効果が高いと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the mechanism of membrane lipid remodeling using the seed plant *Arabidopsis thaliana* and the liverwort *Marchantia polymorpha*, focusing on the phospholipid-degrading enzyme phosphatidic acid phosphohydrolase (PAH), which contributes to membrane lipid remodeling during phosphate deficiency. In *Arabidopsis*, the contribution of non-specific phospholipase C5, which is thought to be one of the phospholipid-degrading enzymes during phosphate deficiency, was found to be smaller than that of PAH, revealing the existence of other unknown phospholipid-degrading enzymes. In addition, *Marchantia* PAH was found to be essential for growth and contribute to lipid metabolic pathways similar to those of *Arabidopsis*. However, the contribution to membrane lipid remodeling was smaller than that of *Arabidopsis* PAH, indicating that there are other unknown enzyme for phospholipid degradation during phosphate deficiency in *Marchantia*.

研究分野：植物生理学

キーワード：リン酸 窒素 膜脂質転換

1. 研究開始当初の背景

窒素やリンは植物生育における必須栄養素である。そのため、それらが欠乏すると植物は様々な応答機構でストレスを回避しようとする。例えば、植物はリン欠乏にさらされると、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、これまでに当該研究者らの研究によりその制御機構が分子レベルで明らかになっている (Shimajima et al. 2013 Front. Plant Sci., Yuzawa et al. 2012 DNA Res., Okazaki, Shimajima et al. 2009 Plant Cell)。

当該研究者らは以前、リン欠乏時の膜脂質転換においてリン脂質分解を担う酵素ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ (PAH1, PAH2) をシロイヌナズナで発見した (Nakamura et al. 2009 PNAS)。この PAH1, PAH2 のシロイヌナズナ二重欠損変異体 *pah1 pah2* は、野生株に比べて著しくリン欠乏耐性が低下することがわかった (Nakamura et al. 2009 PNAS)。しかし当該研究者らの最近の研究により、この *pah1 pah2* 変異体はリン欠乏だけでなく、窒素欠乏にも弱いこと、また PAH1 または PAH2 の過剰発現体では、いずれも窒素欠乏に強くなることがわかった (Yoshitake et al. 2017 Front. Plant Sci.)。また、*pah1 pah2* 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ため、窒素欠乏時の各植物葉の葉緑体の様子、特に光合成膜の状態を、透過型電子顕微鏡で比較観察した。その結果、通常生育時では植物間で大きな差がみられなかったが、窒素欠乏時では、欠損変異体の光合成膜の崩壊が、野生株や相補体と比べて著しく進んでいることがわかった。これらの結果から、リン脂質分解酵素 PAH1、PAH2 を介した膜脂質転換は、リン欠乏時だけでなく窒素欠乏時の植物生育にも必須であり、窒素欠乏時に起こる葉緑体光合成膜の崩壊を抑制し、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 (Yoshitake et al. 2017 Front. Plant Sci.)。しかし、これまでに知られているリン欠乏時の膜脂質転換に寄与することが知られている脂質代謝酵素が、PAH と同様の役割を持つのか、また特にそれらと葉緑体脂質代謝酵素との間に連携機構は存在するのかなどについては明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

当該研究では特に、PAH と同様に膜脂質転換の活性化に大きく寄与する脂質代謝酵素または制御因子の探索を進めることで、リンや窒素など栄養ストレス下の植物生育における膜脂質転換活性化を介した葉緑体膜の崩壊抑制の分子メカニズムとその制御機構を明らかにし、さらには膜脂質に着目した新しい栄養ストレス耐性植物開発の基盤構築を目的とした。なお当該研究者らの近年の研究結果から、モデル種子植物シロイヌナズナの *pah1 pah2* 変異体は、生育培地中のリンや窒素の欠乏に対する耐性は野生株と比べて著しく低い、凍結ストレスや乾燥ストレスに対する耐性は向上することが示唆されている。すなわち、植物は膜脂質転換を巧妙に制御することで、自然環境下の種々のストレスに適応している可能性が高いと考えられる。そこで当該研究では、栄養欠乏だけでなく多様な環境ストレス下における脂質転換を介した新しい応答機構の分子メカニズムの解明につなげるための基礎的知見を得ることを目指した。また、シロイヌナズナに加えて、ゼニゴケを用いた解析を平行して行い比較することで、植物種に広く保存された膜脂質転換制御メカニズムの存在について明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膜脂質転換を担う PAH 以外のリン脂質分解酵素の探索

リン脂質分解においては、PAH の他に非特異的ホスホリパーゼ C5 (NPC5) がリン欠乏時の膜脂質転換が起こる際のリン脂質分解に寄与していることが知られている (Gaude et al. 2008 Plant J.)。しかし、PAH1, PAH2, NPC5 のリン脂質分解への寄与の度合い、また、これら3酵素以外のリン脂質分解酵素が存在しているかどうかについては不明であった。そこでまず、シロイヌナズナの *pah1 pah2* 変異体に対して NPC5 が機能欠損するように *NPC5* 遺伝子のゲノム編集を行い、*pah1 pah2 npc5* 三重欠損変異体を作成した。作成した三重欠損変異体について、リン欠乏時の生育、膜脂質組成、脂肪酸組成の解析を行い、同様に生育させた野生株および二重変異体 *pah1 pah2* の解析結果と比較した。

(2) コケ植物ゼニゴケを用いたリン欠乏時の膜脂質転換機構の解析

ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* は遺伝子冗長性が低く、特に脂質代謝に関わる遺伝子数はシロイヌナズナと比べて半分程度であることがそのゲノム DNA 配列から予測されている。そこで、ゼニゴケを用いてシロイヌナズナと同様に解析を進めることで、植物種間で保存された膜脂質転換に関わる因子の同定や制御機構の解明につなげることを期待した。ゼニゴケでは PAH は1遺伝子のみ存在するため、ゲノム編集法を用いて PAH 欠損変異体を作成し、野生株と PAH 変異体とでリン欠乏時、窒素欠乏時の生育や脂質組成の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 膜脂質転換におけるリン脂質分解を担う PAH 以外の酵素の探索

pah1 pah2 npc5 三重欠損変異体は、リン十分および欠乏生育条件いずれの場合においても、*pah1 pah2* 変異体と生育、膜脂質組成について大きな差はみられなかった。従って、NPC5 の膜脂質転換への寄与は、PAH1 および PAH2 と比較すると非常に小さいことがわかった。一方で、*pah1 pah2 npc5* 三重欠損変異体と *pah1 pah2* 変異体では、リン脂質の分子種には若干だが有意な差が認められ、そのため、これらのリン脂質分解酵素については基質特異性に違いがあることが示唆された。*pah1 pah2* 変異体では、リン十分・欠乏の両条件においてもリン脂質の分解が抑制されているが、*pah1 pah2 npc5* 三重欠損変異体についても同様の結果が得られたことから、リン欠乏時のリン脂質分解に寄与する PAH 及び NPC5 以外に未知のリン脂質分解酵素が存在していることが明らかになった。

(2) コケ植物ゼニゴケを用いたリン欠乏時の膜脂質転換における PAH の機能解析

シロイヌナズナの *pah1 pah2* 二重欠損変異体は、通常生育条件では野生株と同様の表現型を示すが、リン欠乏条件下では著しい生育抑制がみられる。ゼニゴケ MpPAH 変異体で同様に生育への影響がみられるか調べるため、通常条件とリン欠乏条件において、WT と MpPAH 変異体の生育を比較した。リン欠乏条件下において野生株では、仮根の数と長さが通常条件よりも増加する。MpPAH 変異体でも仮根は発達したが、長さは野生株よりもやや短い傾向がみられた。生重量を比較したところ、MpPAH 変異体は通常条件でも野生株より生重量が低下していた。リンまたは窒素欠乏条件では、野生株、MpPAH 変異体ともに生重量が減少したが、MpPAH 変異体の方が野生株よりも顕著に生重量が低いことがわかった。MpPAH は、葉状体全体の生重量、仮根の発達になんらかの影響を与えていると考えられた。

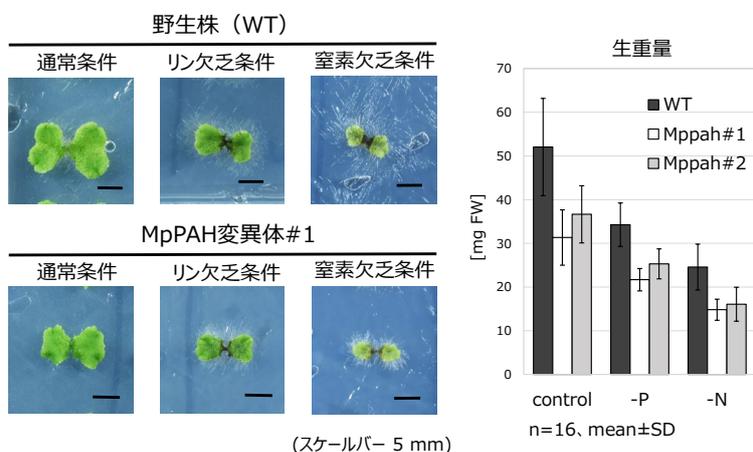


図1 栄養欠乏条件下における野生株およびMpPAH変異体の生育の様子と生重量
通常条件、リン欠乏条件、窒素欠乏条件の全てにおいて、MpPAH変異体の生重量は野生株よりも低下した。窒素欠乏条件では特に、仮根の伸長抑制が顕著にみられた。

リン欠乏条件における野生株では、脂質合成に関わる酵素のうち、ベタイン脂質合成酵素 MpBTA1 の発現量はリン欠乏条件で約 6 倍に上昇した。このことから、ベタイン脂質合成系はリン欠乏条件において合成酵素遺伝子の転写レベルで大きく増強されることが示された。藻類を含め広く植物で、葉緑体のホスファチジルグリセロールの代替を考えると考えられている SQDG 合成酵素の SQD1 と SQD2 は、シロイヌナズナと同様、ゼニゴケでもリン欠乏条件で MpSQD2 の発現が顕著に増加した。よってゼニゴケにおいても SQDG 合成は合成酵素遺伝子の転写レベルで促進されることが示された。一方、糖脂質合成酵素については、モノガラクトシルジアシルグリセロールを合成する MpMGD がリン欠乏条件で通常条件の発現量の約 20% まで減少した。また、ジガラクトシルジアシルグリセロール MpDGD の発現はほとんど変化がみられなかった。リン欠乏時に野生型ではジガラクトシルジアシルグリセロールが増加するが、転写レベルでの制御ではないことが示唆された。なお、リン欠乏条件では、いずれの脂質代謝関連遺伝子についても MpPAH 変異体と野生株の間で大きな発現量の違いがみられなかった。このことから、MpPAH は少なくともリン欠乏条件では、膜脂質転換関連遺伝子の発現制御に影響を与えないことがわかった。

野生株と MpPAH 変異体の膜脂質組成比較を、リン十分・欠乏条件で生育した植物体を用いて解析を行ったところ、葉状体全体において脂質組成には大きな違いがみられなかった。しかし、脂質種ごとに脂肪酸組成を比較したところ、MpPAH 変異体では 2 つ存在する脂質代謝経路への依存度が野生株とは異なり、シロイヌナズナと同様の脂質代謝経路においてリン脂質分解酵素として機能していること、またシロイヌナズナと同様、リンや窒素の欠乏条件下での生育に特に大きな負の影響が出るが、ゼニゴケについては栄養十分である通常条件においても顕著な生育抑制がみられることがわかった。これらのことから、植物種および器官によって PAH を介したリン脂質分解経路への依存度が異なること、ゼニゴケではリン欠乏時の膜脂質転換の際のリン脂質分解酵素が他に存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshitake Yushi, Nakamura Sakuya, Shinozaki Daiki, Izumi Masanori, Yoshimoto Kohki, Ohta Hiroyuki, Shimojima Mie	4. 巻 185
2. 論文標題 RCB-mediated chlorophagy caused by oversupply of nitrogen suppresses phosphate-starvation stress in plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 318-330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiaa030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshitake Yushi, Ohta Hiroyuki, Shimojima Mie	4. 巻 10
2. 論文標題 Autophagy-Mediated Regulation of Lipid Metabolism and Its Impact on the Growth in Algae and Seed Plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 709
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2019.00709	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murakawa Masato, Ohta Hiroyuki, Shimojima Mie	4. 巻 101
2. 論文標題 Lipid remodeling under acidic conditions and its interplay with low Pi stress in Arabidopsis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 81~93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11103-019-00891-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murakami H, Nobusawa T, Hori K, Shimojima M, Ohta H	4. 巻 177
2. 論文標題 Betaine lipid is crucial for adapting to low temperature and phosphate deficiency in Nannochloropsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 181-193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.17.01573.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 金谷貴広, 井原雄太, 太田啓之, 下嶋美恵
2. 発表標題 シロイヌナズナ葉におけるオキシリピンOPDA含有油脂生産のための基盤研究
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金谷貴広, 井原雄太, 若松孝幸, 蛭谷裕輝, 太田啓之, 下嶋美恵
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける葉緑体外OPDA生産系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度 京都大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤寛康, 井原雄太, 太田啓之, 下嶋美恵
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるリン欠乏時のホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼの局在解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊帆南, 井原雄太, 吉竹悠宇志, 太田啓之, 下嶋美恵
2. 発表標題 シロイヌナズナのリン欠乏時の膜脂質転換におけるnon-specific phospholipase C5の機能解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下嶋美恵
2. 発表標題 植物における小胞体 葉緑体間脂質輸送を介した栄養応答
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimojima, M, Murakawa, M., Ohta, H.
2. 発表標題 Lipid remodeling under acidic conditions and its interplay with low Pi stress in Arabidopsis.
3. 学会等名 9th European Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimojima, M, Murakawa, M., Ohta, H
2. 発表標題 Lipid remodeling under acidic conditions and its interplay with low Pi stress in Arabidopsis
3. 学会等名 8th Asian-Oceanian Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimojo, M., Nakamura, M., Kitaura, G., Sasaki-Sekimoto, Y., Shimizu, S., Hori, KI., Iwai, M., Ohta, H., Ishizaki, K., Shimojima, M.
2. 発表標題 Lipid remodeling under phosphate starvation in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名 8th Asian-Oceanian Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下城彩、中村将、北浦銀河、佐々木 関本結子、清水信介、堀孝一、岩井雅子、太田啓之、石崎公庸、下嶋美恵
2. 発表標題 ゼニゴケにおけるホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼPAHの役割
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rina Ihaya, Yushi Yoshitake, Kousuke Shimazaki, Yukiko Kurosawa, Hiroyuki Ohta, Mie Shimojima
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるhydroxysteroid dehydrogenase 1 (HSD1)の機能解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eiki Yoshida, Hiroyuki Ohta, Mie Shimojima
2. 発表標題 シロイヌナズナを用いた植物葉における油脂含量増大のための基盤研究
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下嶋美恵
2. 発表標題 植物における栄養欠乏ストレス時の脂質転換機構
3. 学会等名 第4回植物の栄養研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉竹悠宇志、太田啓之、下嶋美恵
2. 発表標題 植物のリン酸欠乏時における過剰な窒素施肥の効果
3. 学会等名 第4回植物の栄養研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉竹悠宇志、太田啓之、下嶋美恵
2. 発表標題 植物の複合的栄養ストレス応答におけるオートファジーの役割
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yushi Yoshitake, Kaoru Katoh, Ryoichi Sato, Yuka Madoka, Keiko Ikeda, Masato Murakawa, Ko Suruga, Daisuke Sugiura, Ko Noguchi, Hiroyuki Ohta, Mie Shimojima
2. 発表標題 Differential localization of Arabidopsis phosphatidic acid phosphohydrolases under phosphate starvation
3. 学会等名 Gordon Research Conference Plant Lipids: Structure, Metabolism and Function (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉竹悠宇志、中村咲耶、泉正範、太田啓之、下嶋美恵
2. 発表標題 窒素過剰施肥によるオートファジーを介したリン酸欠乏応答の抑制
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧村草汰、吉竹悠宇志、太田啓之、下嶋美恵
2. 発表標題 シロイヌナズナのホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼのリン酸欠乏に応答した細胞内局在変化の解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------