

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06691

研究課題名(和文)植物の葉緑体分化に果たす多様な脂質分子種の機能解明

研究課題名(英文)Elucidation of the roles of diverse lipid molecular species in plant chloroplast differentiation

研究代表者

小林 康一 (Kobayashi, Koichi)

大阪公立大学・大学院理学研究科 准教授

研究者番号：40587945

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)：葉緑体のチラコイド膜は光合成の光化学・電子伝達反応やATP合成反応を担っており、その機能は植物の成長や繁栄、生産性に深く関わる。チラコイド膜は、脂質二重層を基本とし、そこを足場に光合成タンパク質と色素の複合体が適切に組み立てられることで、正常な光合成膜として機能する。光合成膜の構築や葉緑体の発達過程における膜脂質の役割を明らかにするために、本研究では、葉緑体に特徴的な酸性脂質の合成欠損変異体を様々な角度から解析した。その結果、酸性リン脂質であるPGが、葉緑体や、葉緑体の前駆体であるエチオプラストの発達に重要であること、酸性糖脂質のSQDGがその役割を一部相補することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体膜を構成する極性脂質には数千を超える分子種が存在するが、脂質分子を対象とした研究の困難さから、生物がこれほどまでに多様な脂質分子を利用する意義はほとんど分かっていない。本研究では、地球上の生命を支える光合成反応の場であり、光合成生物において最も豊富に存在する生体膜であるチラコイド膜やその前駆体の形成過程に注目し、それらの主要な構成因子である脂質分子が担う役割の解明を目指した。その結果、チラコイド膜に特徴的な酸性リン脂質が特別な機能を持つこと、その機能を酸性糖脂質が一部相補することを明らかにした。本研究は、生体膜において多種多様な脂質分子が担う役割について、新たな視点を生み出すものである。

研究成果の概要(英文)：The thylakoid membrane of chloroplasts is responsible for the photochemical and electron transfer reactions of photosynthesis, as well as ATP synthesis reactions, and its function is deeply involved in plant growth, prosperity, and productivity. Lipids are main constituents of the thylakoid membrane bilayer, which provides the fluid matrix for the photosynthetic protein-pigment complexes and hydrophobic electron carriers. In order to elucidate the role of membrane lipids in the construction of the photosynthetic membrane and the development of chloroplasts, this study investigated mutants defective in the biosynthesis of plastid-specific anionic lipids. Our analyses revealed that the anionic phospholipid PG is crucial for the development of chloroplasts and their precursors known as etioplasts, whereas the anionic glycolipid SQDG partially complements the role of PG.

研究分野：植物生理学

キーワード：脂質 葉緑体 光合成 チラコイド膜 植物 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

葉緑体のチラコイド膜は光合成の光化学・電子伝達反応や ATP 合成反応を担っており、その機能は植物の成長や繁殖、生産性に深く関わる。チラコイド膜は、脂質二重層を基本とし、そこを足場に光合成タンパク質と色素の複合体が適切に組み立てられることで、正常な光合成膜として機能する。葉緑体のチラコイド膜では、ガラクト脂質である MGDG と DGDG がその約 8 割を占め、残りの 2 割を、酸性含硫黄糖脂質である SQDG と酸性リン脂質である PG が同じくらいの割合で占める。これらの脂質は、チラコイド膜の形成や機能においてそれぞれ独自の役割を持つが、我々は、葉緑体の前駆体においても、脂質が非常に重要な役割を果たすことを報告した。暗所で発芽した黄化芽生えの子葉では、葉緑体の前駆体としてエチオプラストが発達するが、その内膜系(プロラメラボディ)の発達や光合成色素の合成、色素-タンパク質複合体の形成に、MGDG と DGDG がそれぞれ別の役割を担うことを見出した^{1,2}。また、黄化芽生えが光を受けると、プロラメラボディはチラコイド膜へと速やかに変換され、それに伴いエチオプラストは葉緑体へと分化するが、その際にも MGDG と DGDG が別々の機能を果たすことも突き止めた³。MGDG と DGDG の極性頭部はガラクトース 1 個分の違いしかないが、エチオプラスト内でのプロラメラボディの発達と、そこからのチラコイド膜の形成に、その違いが決定的に重要であることを示唆している。一方で、上記の研究は変異や遺伝子操作で MGDG 合成や DGDG 合成を減少させたシロイヌナズナにおいて行われており、観察された異常が、実際に個々のガラクト脂質含量の低下によるのか、または、総脂質量の低下や、残った酸性脂質 (SQDG や PG) の割合の増加、脂肪酸組成の変化などの影響を強く受けているのか、定かではなかった。さらに、ガラクト脂質とは異なる性質を持つ SQDG や PG が、エチオプラストでのプロラメラボディの形成や色素代謝、照射後の葉緑体分化過程にどのように関わるのかも不明であった。

2. 研究の目的

これまでの光合成研究では、光合成反応に関わるタンパク質や色素の研究に重点が置かれていたが、近年、脂質分子の重要性も注目されてきており、足場として脂質二重層を形成するだけでなく、光化学系の構成分子として電子伝達反応に直接的な影響を与えるなど、多様な役割を担うことを見出されていた。そのような中、我々は独自の研究から、脂質が葉緑体の発達開始に決定的な役割を果たすと考え、葉緑体分化の脂質駆動モデルを提唱した。しかし、一口に膜脂質と言っても、極性頭部と疎水性尾部の組み合わせによりその構造は非常に多様であり、またそれらの分子が複雑に混ざり合っていることから、チラコイド膜形成のどのようなプロセスに、どのような脂質分子が、どのようなかたちで関わっているのかに関しては、ほとんど分かっていなかった。本研究では、葉緑体の酸性脂質が減少したシロイヌナズナ変異体において、葉緑体形成や植物体の成長の様子を調べることで、葉緑体分化の脂質駆動モデルにおいて酸性脂質が果たす役割を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

SQDG 合成に関わる遺伝子に欠失変異が入った *sqd1* 変異体と *sqd2* 変異体を SQDG 欠損変異体として用いた。また、葉緑体での PG 合成が 70%低下した *pgp1-1* 変異体と完全に失われた *pgp1-2* 変異体を、PG 欠損変異体として用いた。さらに、SQDG 欠損変異体と PG 欠損変異体を掛け合わせて作出した、*sqd1 pgp1-1* 変異体、*sqd2 pgp1-1* 変異体、*sqd2 pgp1-2* 変異体、および *sqd2 pgp1-2* 変異体を解析に用いた。これらの変異体において、個体の発達過程や、チラコイド膜やその前駆体膜の形成、クロロフィルや中間体の合成、光合成活性への影響などを調べた。

4. 研究成果

まず初めに、酸性脂質の欠損が個体の成長にどのような影響を与えるのかを、葉緑体における SQDG 合成と PG 合成を共に完全に欠損した *sqd1 pgp1-2* 変異体と *sqd2 pgp1-2* 変異体を用いて調べた⁴。1%ショ糖を含む寒天培地で生育したところ、クロロフィルの蓄積や光合成活性はほぼ見られず、チラコイド膜の発達も非常に強く阻害されていた。これらの変異体では、胚発達の段階から成長に阻害が見られ、発芽しても葉がわずかにしか成長しなかった (図 1)。さらに、根端の細胞が乱れ、根の成長も阻害された。このことから、これらの酸性脂質は、光合成組織だけでなく、非光合成組織である根でも重要な役割を持つことが明らかとなった。おそらく、根の色素体における酸性脂質の減少が、根の細胞の発達や成長に影響を与えたと考えられる。

sqd1 pgp1-2 や *sqd2 pgp1-2* 変異体は植物の発達に非常に強い影響を与え、芽生えのうちに致死となるため、それ以上の詳細な解析は不可能であった。そこで、SQDG 合成の単独欠損変異体 (*sqd1* と *sqd2*) に加え、葉緑体で PG を合成できるが、その活性が野生株の 30%ほどに低下した *pgp1-1* を用いて解析を行った。その結果、*sqd1* と *sqd2* は野生株と比べ、根の伸長や地上部の成長にほとんど違いを示さなかった。葉に蓄積したクロロフィル量も、これらの変異体と野生株では違いが見られなかった。一方、*pgp1-1* の地上部の成長は野生株とほぼ同等であったが、クロロフィル含量は野生株よりも低くなっていた。また、*pgp1-1* では野生株に比べて若干、根の伸

長が減少した(図1)。*sqd1 pgp1-1*や*sqd2 pgp1-1*二重変異体では、地上部の成長やクロロフィルの蓄積が顕著に低下しており、根の成長にもある程度の減少が見られた。ただし、*pgp1-1*や二重変異体を暗所で発芽させたところ、根の伸長に野生株との差が見られなかったことから、これらの変異体における根の成長量の低下には、光合成量の低下が関係していると考えられた。

PGがその構造中にリン酸をもつリン脂質であるのに対し、SQDGはリンを持たない糖脂質である。植物がリン欠乏になると、細胞内のPGの含量が減り、その代わりにSQDGの含量が増えることが知られており、SQDGがPGの減少を補っていると考えられて

いた。そこで、このSQDGによるPGの相補の役割を明らかにするために、上記の変異体をリン欠乏条件下で育て、その際の光合成活性の変化をパルス変調クロロフィル蛍光(PAM)解析法により調べた。その結果、*sqd1*や*sqd2*変異体は、通常栄養条件下では野生株と光合成活性に差を示さなかったのに対し、リン欠乏条件下では野生株よりも低い光合成活性を示した。また、二重変異体は、リン欠乏の有無にかかわらず、常に野生株よりも低い光合成活性を示した。このことから、リン欠乏時にはSQDGが光合成におけるPGの機能の一部を相補するが、SQDG合成の変異体ではそれができなくなって光合成活性が低下した一方、二重変異体では、常にPGとSQDGの量が低下しているためリン欠乏に関わらず光合成活性が低かったと考えられた。

次に、暗所で発芽した黄化芽生えにおいて、葉緑体の前駆体であるエチオプラストの発達にこれらの変異がどのような影響を与えるのかを調べた⁵。その結果、クロロフィル合成の中間体であるプロトクロロフィリドの蓄積が*pgp1-1*変異体では野生株の半分程度に減少し、*sqd1 pgp1-1*や*sqd2 pgp1-1*では野生株の1/4程度になることが明らかとなった。そこで、どの段階でプロトクロロフィリドの合成が阻害されるのかを調べるため、プロトクロロフィリド合成の律速中間体である5-アミノレブリン酸(ALA)を植物に過剰に与え、プロトクロロフィリド合成の中間体の蓄積を調べたところ、*pgp1-1*や二重変異体では、プロトポルフィリンIXが過剰に蓄積していることが分かった。一方で、プロトポルフィリンIXにMg²⁺が配位して作られるMg-プロトポルフィリンIXはほとんど蓄積していなかった。このことから、*pgp1-1*や二重変異体では、プロトポルフィリンIXにMg²⁺を入れる反応が特異的に阻害されていると考えられた。

*pgp1-1*や*sqd1 pgp1-1*、*sqd2 pgp1-1*で、黄化芽生えにおけるクロロフィル中間体の合成が強く阻害されていたことから、これらの変異体では、黄化芽生えに特徴的な色素体であるエチオプラストの発達が阻害されていることが考えられた。そこで、電子顕微鏡解析により、これらの変異体におけるエチオプラストの形態を野生株と比較したところ、*pgp1-1*では、プロラメラボディと呼ばれるエチオプラスト特有のハチの巣状の膜構造が緩んでいること、二重変異体ではそれがさらに顕著になり、ほとんどまともなプロラメラボディが見られないことが明らかとなった(図2)。そこで、これらの変異体において脂質組成を測定したところ、*pgp1-1*における全PG量の減少はわずかで、有意差がでないレベルであった。

以上の結果から、葉緑体内に存在するPG量の変化は解析できておらず分からないが、部分的なPG合成の減少が、プロトクロロフィリド合成経路やプロラメラボディの形成に非常に大きな影響を与えることが明らかとなった。今後は、黄化芽生えに光が当たって緑化が起こる際の、葉緑体発達の過程にこれらの酸性脂質がどのように関わるのかを明らかにする予定である。

<引用文献>

1. Fujii S. et al. *Plant Physiol* **177**, 1487–1497 (2018).
2. Fujii S. et al. *Plant Physiol* **174**, 2183–2198 (2017).
3. Fujii S. et al. *Plant Cell Physiol* **60**, 1224–1238 (2019).
4. Yoshihara A. et al. *Int J Mol Sci* **22**, 4860 (2021).
5. Yoshihara A. et al. *Biorxiv Preprint* at <https://doi.org/10.1101/2023.05.16.541020> (2023).

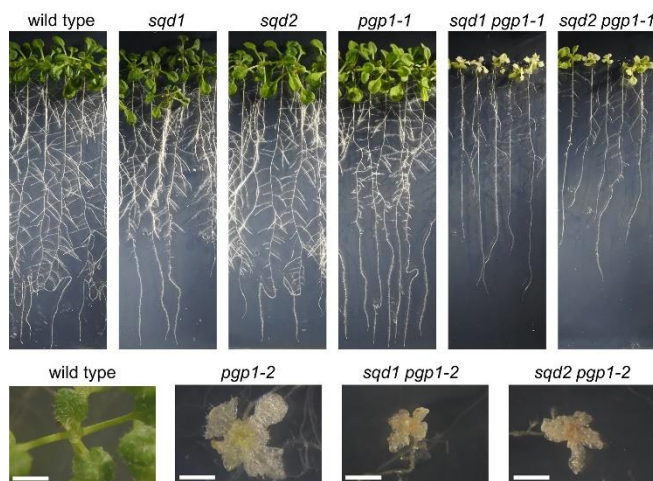


図1. 葉緑体酸性脂質変異体の表現型 スケールバーは2 mm。

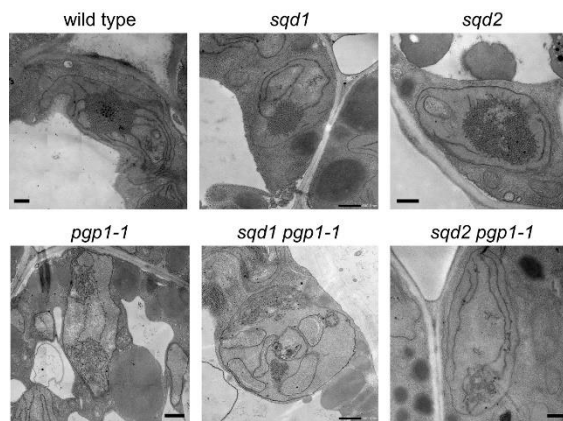


図2. 葉緑体酸性脂質変異体のエチオプラスト スケールバーは500 nm。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akiko Yoshihara, Noriko Nagata, Hajime Wada, Koichi Kobayashi	4. 巻 20
2. 論文標題 Plastid anionic lipids are essential for the development of both photosynthetic and non-photosynthetic organs in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22094860	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 Akiko Yoshihara, Koichi Kobayashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Lipids in photosynthetic protein complexes in the thylakoid membrane of plants, algae, and cyanobacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erac017	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 Sho Fujii, Koichi Kobayashi, Ying-Chen Lin, Yu-chi Liu, Yuki Nakamura, Hajime Wada	4. 巻 -
2. 論文標題 Impacts of phosphatidylglycerol on plastid gene expression and light induction of nuclear photosynthetic genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erac034	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 該当する
1. 著者名 Yu-chi Liu, Yue-Rong Tan, Chin-Wen Chang, Van C. Nguyen, Kazue Kanehara, Koichi Kobayashi, Yuki Nakamura	4. 巻 -
2. 論文標題 Functional divergence of a pair of <i>Arabidopsis</i> phospho-base methyltransferases, PMT1 and PMT3, conferred by distinct N-terminal sequences	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.15741	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 該当する

1. 著者名 Obata Tomoki, Kobayashi Koichi, Tadakuma Ryosuke, Akasaka Taiki, Iba Koh, Negi Juntaro	4. 巻 -
2. 論文標題 The Endoplasmic Reticulum Pathway for Membrane Lipid Synthesis Has a Significant Contribution toward Shoot Removal-Induced Root Chloroplast Development in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab009	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 Hirashima Takashi, Jimbo Haruhiko, Kobayashi Koichi, Wada Hajime	4. 巻 534
2. 論文標題 A START domain-containing protein is involved in the incorporation of ER-derived fatty acids into chloroplast glycolipids in Marchantia polymorpha	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 436 ~ 441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.063	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 小林康一、吉原晶子	4. 巻 12
2. 論文標題 脂質代謝が印す葉緑体の進化と多様性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植物科学の最前線	6. 最初と最後の頁 23-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24480/bsj-review.12a4.00197	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10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉原晶子、永田典子、和田元、小林康一
2. 発表標題 植物の発達における色素体酸性脂質の相補的關係
3. 学会等名 第33回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉原晶子, 小林康一
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803において窒素欠乏下の光合成と細胞増殖はフィコピリソーム分解に関与する
3. 学会等名 第11回日本光合成学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉原晶子、永田典子、和田元、小林康一
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるエチオプラスト発達時の色素体酸性脂質の役割
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 吉原晶子, 小林康一
2. 発表標題 光合成と細胞成長がシアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803の窒素欠乏時のフィコピリソーム分解に与える影響
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 小林康一
2. 発表標題 脂質代謝が印す葉緑体の進化と多様性
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉原晶子、和田元、小林康一
2. 発表標題 シロイヌナズナの芽生えの発達において色素体酸性脂質の果たす役割
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平嶋孝志、神保晴彦、小林康一、和田元
2. 発表標題 ゼニゴケの葉緑体膜脂質代謝に関するオルガネラ間脂質輸送タンパク質の解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小畑智暉、小林康一、多田隈遼亮、赤坂泰輝、射場厚、祢宜淳太郎
2. 発表標題 地上部切除により誘導される根細胞での葉緑体の発達には小胞体からの脂質供給が欠かせない
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平嶋孝志、神保晴彦、小林康一、和田元
2. 発表標題 STARTドメインをもつタンパク質がゼニゴケにおいて小胞体由来する脂肪酸の葉緑体糖脂質への取り込みに関与している
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉原晶子、和田元、小林康一
2. 発表標題 色素体特有の酸性脂質は植物の非光合成器官の成長にも必須である
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ウェブサイト https://sites.google.com/view/kobayashi-lab/ 大阪府立大学小林康一研究室ホームページ https://sites.google.com/view/kobayashi-lab/
--

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
---------	---------