

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570034

研究課題名（和文）シロイヌナズナの根における低温応答性リン脂質合成機構の可視的解析

研究課題名（英文） Visualization of the site of phospholipid biosynthesis in Arabidopsis roots under low temperature conditions

研究代表者

西田 生郎 (NISHIDA IKUO)

埼玉大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：40189288

研究成果の概要（和文）：シロイヌナズナのリン脂質合成変異株 *cct1*、*cct2*、*cct1 cct2* を用いて、CCT 活性と低温における根の表皮細胞の内膜発達との相関関係を調べた。CCT 活性は、野生型 WS、*cct2*、*cct1*、*cct1 cct2* の順に低下したが、低温での内膜の発達は、同じ順番で低下した。*cct1 cct2* は低温で著しい伸長阻害を示した。sGFP-CCT1 および sGFP-CCT2 は ER 様の膜構造と共局在した。低温での内膜の発達には、CCT 活性が必要であることがわかった。

研究成果の概要（英文）： WS, *cct2*, *cct1-1* and *cct1-1 cct2* plants exhibited CCT activity in descending order. *cct1-1 cct2* seedlings were unable to elongate roots at 2°C. Root epidermal cells showed ER-Tracker fluorescence comparably in WS, *cct2* and *cct1-1* seedlings at ambient temperature and expandedly at 2°C or under salt stresses. In contrast, endomembrane structures developed less extensively in *cct1-1 cct2* seedlings at ambient temperature and disappeared in cold- or salt-stressed seedlings. sGFP-CCT1 and sGFP-CCT2 fluorescence was associated with ER-Tracker fluorescence in transgenic Arabidopsis roots. These results suggest that functional CCTs are required for stress-induced ER development and cell elongation in Arabidopsis roots.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：植物分子生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：ホスファチジルコリン・ホスファチジルエタノールアミン・低温応答・リン脂質合成・根の伸長・表皮細胞の内膜構造・CDP-コリン合成・ホスファチジルセリン

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物には、低温に弱い種と低温に強い種

が知られている。寒冷地に生育する植物は、一般に低温に耐性を示す。これらの植物は、

低温で生体膜の動きを活発化させ増殖させ、自らを生理的に低温環境により適したからだに作りかえることができる。低温におけるこのような植物の性質を理解することは、低温に弱い植物に対して低温に強い性質を付与するためには不可欠である。

(2) ホスファチジルコリン(PC)およびホスファチジルエタノールアミン(PE)は、植物の生体膜を構成する主要なリン脂質である。従って、低温における生体膜形成に必要なリン脂質の主成分である。低温におけるこれらリン脂質を合成するしくみ(生合成調節機構)や、低温で膜が発達してリン脂質が増える理由(膜発達の生理的意義)についてはよくわかっていない。

(3) 低温におけるリン脂質の役割を調べるためには、リン脂質を合成する酵素の遺伝子を破壊した変異株を単離し、その性質を調べる手法が考えられる(逆遺伝学的手法)。PCはCDP-コリン経路で合成され、その律速酵素はCDP-コリン合成酵素(CCT)である。シロイヌナズナには2つのイソ遺伝子 *CCT1* および *CCT2* が存在する。PEはCDP-エタノールアミン経路で合成され、その律速酵素はCDP-エタノールアミン合成酵素(PECT)である。シロイヌナズナには遺伝子 *PECT1* が存在する。PSは塩基置換経路とCDP-DG経路で合成されるが、シロイヌナズナには塩基置換経路を司ると推定されるPS合成酵素 *PSS1* が存在した。本研究では、これらの遺伝子の変異株を用いて研究を進めることとした。

(4) *pect1-4* 変異株はPECT活性が野生型の26%しか示さない変異株で、多様な変異表現型を示す。なかでも、低温特異的に生育の阻害を示すことは興味ある知見であった。

(5) 低温における植物リン脂質生合成のしくみは、これまで脂質合成酵素の遺伝子発現と活性変化を追跡することにより研究されてきたが、リン脂質合成関連酵素の細胞内局在変化や、低温で形成される膜構造の形態に関して、膜脂質生合成を細胞生物学的に可視化して研究した例はなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、シロイヌナズナの根を材料として、低温で形成される生体膜の形態を共焦点レーザー顕微鏡下で詳細に観察するとともに、脂質合成酵素の細胞内局在を明らかにする。

(2) 低温におけるリン脂質生合成のしくみと意義に関して新たな知見を得ることを目的とする。具体的には、PC合成の律速酵素である *CCT1* および *CCT2* について、低温における

活性化のしくみをあきらかにする。また、*CCT1* および *CCT2* の細胞内の局在性について明らかにする。

(3) 低温特異的な生育阻害を示すPE生合成変異株 *pect1-4* の低温感受性の原因を究明する。

(4) 研究の過程で、PC、PEの生合成変異株の他にも、PSの生合成変異株も根の伸長阻害をおこすことを見いだした。そこで、根の伸長阻害の原因を、細胞内膜系の構築と膜動態の視点から比較することとした。

3. 研究の方法

(1) 低温によるCCT活性変動の解析

cct1 および *cct2* 破壊株について、CCT活性測定し、CCT発現レベルをイムノブロット法で解析した(Inatsugi et al. 2009)。

(2) CCT細胞内局在の解析

sGFP-CCT および sGFP-CCT2 を発現したシロイヌナズナを作出し、共焦点レーザー顕微鏡下で局在を解析した。

(3) 細胞内膜系の観察

細胞内膜系であるER膜の染色は、ERトラッカー染色およびヘキシルローダミン染色で組織を染色し、共焦点レーザー顕微鏡下で構造を観察した。表皮細胞の細胞膜直下のER膜の観察は、高圧凍結SEMを用いて行った。

(4) 根の伸長解析

cct1、*cct2*、*cct1 cct2*、*pect1*、*pss1* 変異体の種子を無菌プレート培養し、根の伸長を観察した。また、(2)の染色試薬で組織を染色し、表皮細胞の内膜系形成を蛍光顕微鏡技法で観察した。

(5) 膜脂質分析

cct1、*cct2*、*cct1 cct2*、*pect1*、*pss1* 変異体の低温応答に伴う脂質変化を二次元薄層クロマトグラフィーとガスクロマトグラフィー(Inatsugi et al. 2009)で解析した。

4. 研究成果

(1) 低温におけるシロイヌナズナの根の表皮の内膜系の発達はCCT活性に依存する

シロイヌナズナの野生型WSおよび *cct1-1*、*cct2* および *cct1-1 cct2* 植物の実生を2°Cで3-7日処理したのち、根を切り取り、氷上で各種膜染色試薬(ER Tracker、MitoTracker Orange)に浸した。低温で洗浄後に共焦点レーザー顕微鏡下で観察したところ、*cct* 変異がひどくなるに従い表皮の内膜(エンドメンブレン)の形成が阻害された。また、埼玉大学・教育学部・金子康子教授と共同で、低温凍結SEMにより、野生株と変異株の根の表皮の内膜構造を直接観察し、二重変異株では細胞

胞膜直下の内膜構造形成が低下することを明らかにした。以上の結果は、低温でのCDP-コリン合成の活性低下が、内膜形成を阻害することを示している。以上の成果を、国際学会（第3回アジア植物脂質シンポジウム）で口頭発表した。

ER 構造をより鮮明に観察するために、ER 局在 Bip タンパク質に GFP を融合した Bip-GFP を発現するシロイヌナズナをバックに、*cct1 cct2* 変異株を作成することが望ましい。しかし、われわれの入手した T-DNA 挿入破壊株はホメオティックな変異を起こしやすく、また、他に適当な挿入変異株は得られなかった。結果的に、*cct1 cct2* 変異株は2代目以降不稔性を示した（早川ら 2010, 第51回植物生理学会年会; Nishida 2010, KSBMB Annual Meeting) が、*cct1/CCT1 Bip-GFP* 植物と *cct2 BipGFP* 植物を掛け合わせ、1代目の種子を回収することにより問題が解決されると予想した。現在、*cct1/CCT1 Bip-GFP* 植物と *cct2 BipGFP* 植物の作出を完了した段階であり、今後、研究を継続することにより CCT 活性の低下と低温における膜形成の相関関係について論文発表する予定である。

(2) CCT 1 と CCT2 の低温における活性化のしくみが異なる

cct 1 および *cct2* 破壊株について、CCT 活性測定したところ、予想に反して、CCT1 活性は低温においても主要な CCT としてはたらくことがわかった。さらに、*cct2* 破壊株では、低温処理により CCT 活性が増大することがわかった。一方、これまでの研究から CCT1 の mRNA レベルは低温処理で変わらないことがわかっていたので、*cct2* 破壊株における CCT 活性の低温応答は、CCT1 の翻訳後調節によることが明らかとなった。すなわち、CCT1 は低温で遺伝子発現上昇を伴わずに活性化するのに対し、CCT2 は低温で遺伝子発現量が増加することにより活性を増大することがわかった。この成果を Plant Cell Physiol 誌 (Inatsugi et al. 2009) に論文発表した。

(3) sGFP-CCT 1 と sGFP-CCT2 は核膜と ER 膜に局在するが、低温下では ER で異なる挙動を示す

sGFP-CCT1 および sGFP-CCT2 を発現する形質転換シロイヌナズナでは、いずれの蛍光も核膜と ER 膜に局在した。一方、低温にすると、表皮細胞の ER 膜発達にともない sGFP-CCT1 および sGFP-CCT2 の蛍光は強化されたが、両者は ER 膜に対して結合の強度が異なるように観察された。今後は、異なる蛍光タンパク質に結合させた CCT を発現させ、イソタンパク質の局在に違いについてさらに研究する必要がある。

(4) *cct1 cct2* 二重変異株は低温特異的にスフィンゴ脂質誘導体を蓄積し、根の伸長を停止する

cct1 cct2 二重変異株を低温処理すると、根の伸長が停止したが、このとき *cct1 cct2* 二重変異株の根の極性脂質画分に未同定の脂質が蓄積することを見いだした。この脂質の構造について、埼玉大学・理学部基礎化学科・長谷川登志夫准教授と共同で、各種 NMR 法により推定構造を決定し、スフィンゴ脂質関連脂質であることを見いだしている。MS スペクトル分析により、分子構造を確認した後、論文投稿予定である。この脂質類縁体は市販されているので、これをシロイヌナズナ実生の生育培地に添加することにより、脂質蓄積と根の伸長阻害との関係を検証する予定である。

(5) *pect1-4* 植物は呼吸活性に異常がある

多様な変異表現型を示す *pect1-4* 植物について、葉の呼吸活性の違いを検討した。23°C 短日条件で2週間生育させた *pect1-4* 植物の葉の呼吸は、野生型と比べ低いものの有意な差はなかった。しかし、5週間後の *pect1-4* 植物の葉では、野生型に比べ呼吸活性が有意に低下していた。今後は、ミトコンドリアを単離し、チトクロム経路と Alternative Oxidase 経路のいずれに原因があるのかを明らかにする。呼吸活性の低下とミトコンドリアの膜脂質組成との関係を第4回アジア植物脂質シンポジウムで口頭発表した。*pect1-4* は、野生型に比べ根の伸長が阻害された。今後は、*pect1-4* 変異体の根の成長阻害と表皮内膜系の構造との関係を、*cct* 変異株にならって観察する必要がある。

(6) *pss1* 変異株は部分的に花粉成熟に異常を示す

ホスファチジルセリン (PS) は比較的存在量の低い酸性リン脂質であるが、花や根にはその他の器官に比べて多い。PS 合成を司る PSS1 のヌル変異株 *pss1* を解析し、花粉成熟が部分的に阻害されることを明らかにし、Plant J 誌 (Yamaoka et al. 2011) に発表した。

(6) *pss1* 変異株は根の伸長阻害をおこすが、膜輸送系の異常と関連があるらしい

pss1 変異株は胚性致死となることが多いが、まれに *pss1* ヌル変異株が単離される。*pss1* 変異株の根の伸長が阻害されることを見いだした。根の伸長阻害は、細胞の伸長阻害が原因で、その結果、見かけ上根毛形成が促進した表現型を示した。PS を生体内で認識する sGFP-LactC2 を発現したシロイヌナズナを用いて、PS は小胞体膜、核膜に局在することを明らかにした。また、FM4-64 を用い

た細胞内膜系の染色は、膜輸送系の異常を示唆していた（投稿準備中）。

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2件）

- ① Yamaoka, Y., Yu, Y., Mizoi, J., Fujiki, Y., Saito, K., Nishijima, M., Lee, Y. and Nishida, I. (2011) *PHOSPHATIDYL SERINE SYNTHASE1* is required for microspore development in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 査読有、67: 648-661.
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04624.x
- ② Inatsugi, R., Kawai, H., Yamaoka, Y., Yu, Y., Sekiguchi, A., Nakamura, M. and Nishida, I. (2009) Isozyme-specific modes of activation of CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase in *Arabidopsis thaliana* at low temperature. Plant Cell Physiol 査読有、50: 1727-1735.
DOI:10.1093/pcp/pcp115

〔学会発表〕（計10件）

- ① Yu, Y., Otsuru, M., Duan, Z., Fujiki, Y., and Nishida, I. (2011) The effects of *pect1-4* mutation on mitochondrial lipid composition and respiration capacity in *Arabidopsis* at low temperature. The Fourth Asian Symposium on Plant Lipids (Hong Kong, 2011. 12.2)
- ② Otsuru, M., Yu, Y., Mizoi, J., Fujiki, Y., and Nishida, I. (2011) *pect1-4* mutation decreases leaf respiration by affecting the mitochondrial cytochrome pathway capacity. The Fourth Asian Symposium on Plant Lipids (Hong Kong, 2011. 12.2)
- ③ Yamaoka, Y., Duan, Z., Fujiki, Y., and Nishida, I. (2011) The importance of *PHOSPHATIDYL SERINE SYNTHASE1* in root development of *Arabidopsis thaliana*. The Fourth Asian Symposium on Plant Lipids (Hong Kong, 2011. 12.2)
- ④ 山岡靖代、溝井順哉、藤木友紀、西田生郎 (2011) シロイヌナズナの根におけるホスファチジルセリンの役割の解明 日本植物学会第75回大会（東京、2011.9.17-19）
- ⑤ 山岡靖代、溝井順哉、藤木友紀、西田生郎 (2011) シロイヌナズナにおけるホスファチジルセリン生合成の分子機構と花粉成熟における役割の解明 第52回日本

植物生理学会年会（仙台、2011.3.20-22；震災のため要旨集の発刊をもって発表となった）

- ⑥ Nishida, I., Mori, Y., Tsukano, Y., Yu, Y., Kawai, H., Yamaoka, Y., Lee, Y. and Fujiki, Y. (2010) Physiological Significance of CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase genes in *Arabidopsis* Roots under Stress Conditions. 19th International Symposium on Plant Lipids, (Cairns, 2010.7.10)
- ⑦ Nishida, I. (2010) Unusual phenotypes of *Arabidopsis* mutants defective in phospholipid biosynthesis. 2010 KSBMB Annual Meeting (Seoul, 2010.5.17-19) 招待講演
- ⑧ 早川慶紀、Jun-Young Jin、関口陽、溝井順哉藤木友紀、Youngsook Lee、西田生郎 (2010) シロイヌナズナのCDP-コリン合成酵素欠損株における花のホメオティック変異とBクラス陰電子のメチル化との関係 第51回日本植物生理学会年会（熊本、2010.3.18-21）
- ⑨ Yu, Y., Kawai, H., Kawamoto, M., Mizoi, J., Fujiki, Y. and Nishida, I. (2010) The effects of *pect1-4* mutation on the lipid composition and the respiration activity of isolated mitochondria. 第51回日本植物生理学会年会（熊本、2010.3.18-21）
- ⑩ Nishida, I., Tsukano, J., Mori, Y., Yamaoka, Y., Yu, Y., Kawai, H. and Fujiki, Y. (2009) CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase genes are important for endomembrane development in *Arabidopsis thaliana* root cells. The Third Asian Symposium on Plant Lipids (Yokohama, 2009. 11.28)

〔その他〕

ホームページ等

- ① 低温でリン脂質ホスファチジルコリンが生合成されるしくみ
http://www.molbiol.saitama-u.ac.jp/~nishida/Nishida_Lab/Pub53.html
- ② 花粉成熟におけるホスファチジルセリン生合成の意義に関する研究
http://www.molbiol.saitama-u.ac.jp/~nishida/Nishida_Lab/Pub54.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 生郎 (NISHIDA IKUO)
埼玉大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：40189288