

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 3 月 31 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21580418

研究課題名（和文）ステロール側鎖構造が担う新規生理機能の解明を基盤とした植物機能開発

研究課題名（英文）Development of stress tolerance trait through phytosterol structure modifications.

研究代表者太田 大策（DAISAKU OHTA）

大阪府立大学生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10305659

研究成果の概要（和文）：ステロールは生体膜の主要脂質の一つである。動物細胞膜にはコレステロールが唯一の成分として蓄積する。一方、植物細胞では多様な側鎖構造を持つステロールが合成される。本研究では、植物特異的に進化したステロール側鎖構造の修飾反応が担う生理機能の解明を目的とした。ステロール側鎖構造の修飾にかかわる遺伝子発現改変系統を供試し、植物特異的に蓄積する C24 エチルステロールが、植物細胞分裂に特徴的にみられる細胞板形成に必須の役割を担うことを初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Sterols are primarily found as membrane lipid components. In mammals, cholesterol is the primary membrane sterol, while plant cells accumulate a variety of sterol molecular species; particularly, diverse side-chain structures are prominent, and most of these sterols are found only in plants. Involvement of such plant sterols in unidentified essential cellular events, besides the brassinosteroid biosynthesis, has been repeatedly reported. However, their actual roles remain to be clarified. Here, we studied the sterol side-chain structure modifications in plant specific cellular functions and demonstrated that the loss of C24 ethylsterols resulted in the apparent arrest of cell cycle at the stage of cell plate formation. This is the first report of the involvement of C24 alkylgroup in plant specific cellular events.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2000000	600000	2600000
2010 年度	900000	270000	1170000
2011 年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
総計	3800000	1140000	4940000

研究分野：境界農学

科研費の分科・細目：応用分子細胞生物学

キーワード：メタボロミクス 植物脂質 ストレス耐性 生体膜 ステロール

1. 研究開始当初の背景

ステロールは生体膜の主要脂質の一つである。動物細胞膜にはコレステロールが唯一の成分として蓄積する。一方、植物細胞では多様な側鎖構造を持つステロールが生合成されるが、植物ステロールの側鎖構造が担う生理機能は明らかではない。

研究代表者は、すでに植物ステロール側鎖 C22 位の不飽和化を触媒するシトクロム P450 遺伝子の特定と酵素反応解析について、世界に先駆けて報告している。また同時に実施した先行研究の中で、ステロール側鎖 C24 位アルキル化反応の欠損は、著しい生育阻害と不稔を呈することを明らかにしていた。そこで、植物に特異的な側鎖 C24 位アルキル化反応が担う生理機能の解明が、植物の生育に関わる新規知見の提供に寄与すると考えられた。C24 位アルキル化反応と C22 位不飽和化反応は図 1 に示した。

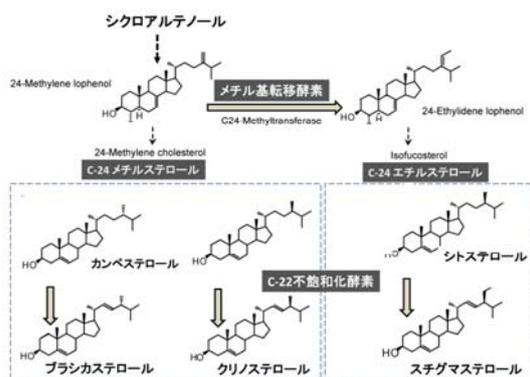


図 1. 植物ステロール生合成の最終段階において C24 位アルキル化反応と C22 位不飽和化反応によって側鎖構造が修飾される。植物ステロールは、C24 メチルステロールと C24 エチルステロールに大別される。C24 エチルステロールであるシトステロールとスチグマステロールは植物特異的に存在する。

2. 研究の目的

本研究では、植物に特異的に進化したステロール側鎖構造の修飾反応が担う生理機能の解明を目指す。その研究過程で得られる知見とステロール構造修飾に関わる遺伝子を利用することで、植物膜ステロール組成の改変を可能にする。得られた植物体のストレス応答と植物バイオマス生産力の増強の可能性を検討する。

3. 研究の方法

シロイヌナズナでは、ステロール側鎖 C24 位アルキル化は、*SMT1* による 1 段階目のメチル基転移反応と、*SMT2* と *SMT3* による 2 段階目のメチル基転移反応によって達成される (図 1)。C22 位不飽和化は *CYP710A1*, *CYP710A2*, *CYP710A3*, *CYP710A4* が担う (図 1)。これらの遺伝子に関する T-DNA 挿入によるノックアウト系統、RNA 干渉によるノックダウン系統、過剰発現系統を揃える。これらの表現型解析結果を統合し、膜ステロールが担う生理機能解明を目指す。

4. 研究成果

前項で準備した遺伝子組換え系統は、実験意図を正確に反映した側鎖構造 (C22 位の不飽和結合の有無と C24 位アルキル化レベル) を持つステロール分子種を蓄積していることがわかった。研究成果は、1) 22 位不飽和化反応と、2) 24 位アルキル化反応に分けて記載する。

1) C22 位不飽和化は *CYP710A1*, *CYP710A2*, *CYP710A3*, *CYP710A4* 遺伝子の過剰発現系統では、C22 位が不飽和化されたステロール (stigmasterol と brassicasterol) の蓄積量が顕著に上昇していた。現在、これらの系統のストレス応答反応を調査中である。

2) *SMT2* と *SMT3* による 2 段階目のメチル基転移反応を欠損した *smt2-smt3* 二重変異系統は C24 エチルステロール生合成能をほぼ喪失し、維管束の発達異常とともに著しい生育遅延と不稔性を示した (図 2)。 *DR5::GUS*

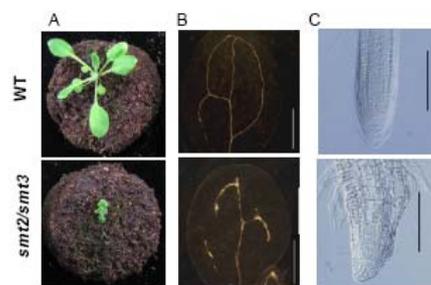


図 2. 野生型と *smt2-smt3* 二重変異体の表現型比較。

レポーター遺伝子発現コンストラクトおよびオーキシン排出輸送体 PIN2-GFP 融合タンパク質遺伝子を変異体に導入し、オーキシン輸送が正常に機能していないことを明ら

かにした (図 3, 4).

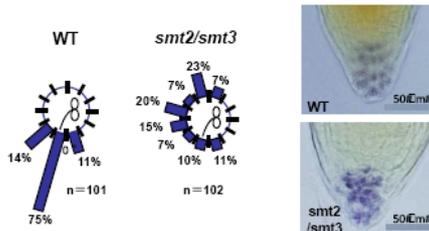


図 3. 野生型と *smt2-smt3* 二重変異体の根の重力屈性の比較. *smt2-smt3* 二重変異体では重力屈性が失われるとともに、根冠部分のデノンペン粒の正常な配列がみられ

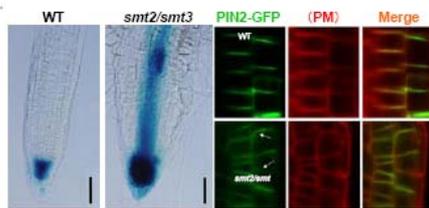


図 4. 野生型と *smt2-smt3* 二重変異体の根端部分での *DR5:GUS* 発現、および PIN2-GFP 融合タンパク質の細胞内局在性の比較. *smt2-smt3* 二重変異体では、*DR5:GUS* 発現の様子からオーキシン局在性の異常と PIN2-GFP タンパク質の局在性異常が観察され、オーキシン輸送の攪乱が示唆される. PIN2-GFP タンパク質の局在性異常は、細胞形態の異常が原因と推察される

一方、*smt2-smt3* 系統の根組織の抗チューブリン抗体による免疫染色では、細胞板形成段階で細胞分裂が停止した細胞が多数認められ、これらの細胞は分裂の極性を喪失していた (図 5).

そこでアクチン結合タンパク質-GFP、チューブリン-GFP 融合タンパク質を *smt2-smt3* 株に導入し細胞骨格系を観察したところ、C24 ステロール欠損が細胞骨格形成に重大な影響を与えることを明らかにした. チューブリン-GFP 融合タンパク質を発現する *smt2-smt3* 系統由来のプロトプラスト培養によって、小胞輸送の攪乱と細胞質分裂期での細胞分裂の停滞を明らかにした (図 6).

各種のレポーター発現系統解析から、C24 ステロール欠損は、植物の細胞分裂に特異的な

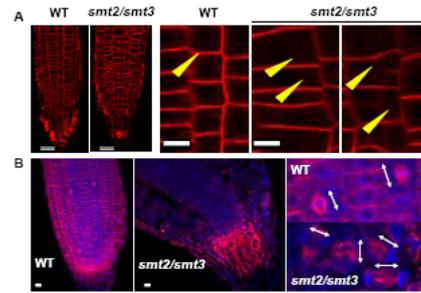


図 5. *smt2-smt3* 系統の根組織の抗チューブリン抗体による免疫染色と細胞膜の FM4-64 による染色. 細胞板形成 (黄色矢じり) の異常と細胞分裂極性の喪失が認められる. この観察結果は、*smt2-smt3* 変異体では細胞分裂が正常に進行しないことを示唆している.

段階である細胞板形成段階に停滞と細胞分裂の極性喪失を引き起こすと推察した. オーキシン輸送の攪乱は極性を喪失した細胞分裂の結果と考えられる.

以上の結果は、植物に特異的に進化した二段階のステロール側鎖 C24 位アルキル化反応によって生成する C24 エチルステロールが、植物の細胞分裂段階に特徴的にみられる細胞板形成に必須の役割を担うことを示している.

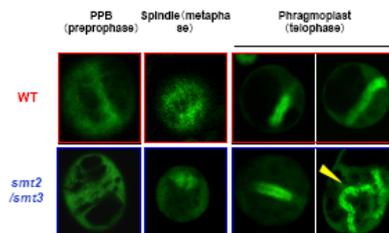


図 6. 野生型と *smt2-smt3* 系統の根プロトプラストにおけるチューブリン配向性の比較. チューブリン-GFP 融合タンパク質を発現す植物体の根からプロトプラストを単離し、それぞれの細胞分裂中のチューブリン配向を観察した. 変異体由来プロトプラストでは細胞板形成段階における細胞分裂の停滞が観察された (黄色矢じり).

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 3 件)

① Mizutani M, Ohta D (2010) Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annu Rev Plant Biol.* 61: 291-315

② Kai K, Takahashi H, Saga H, Ogawa T, Kanaya S, Ohta D (2011) Metabolomic characterization of the possible involvement of a Cytochrome P450, CYP81F4, in the biosynthesis of indolic glucosinolate in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology.* 28:379-385

③ Saga H, Ogawa T, Kai K, Suzuki H, Ogata Y, Sakurai N, Shibata D, Ohta D. (2012) Identification and Characterization of ANAC042, a Transcription Factor Family Gene Involved in the Regulation of Camalexin Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 25:684-696.

〔学会発表〕 (計 6 件)

① 中本雅俊, 嵯峨寛久, 太田大策 「植物ステロールの側鎖修飾機能が担う生理機能の解明」日本農芸化学会関西支部 第472回講演会 平成23年12月10日 神戸大学

② 中本雅俊, 嵯峨寛久, 太田大策 「Studies on essential roles of plant sterol side chain modification」 第53回日本植物生理学会 平成24年3月17日 京都産業大学

③ Ohta D 「Transcriptional cross-pathway regulation involved in balancing different secondary metabolisms in *Arabidopsis*」
10th International Symposium P450 Biodiversity and Biotechnology.
平成22年10月3日 アメリカ マサチューセッツ州, ウッズホール海洋生物学研究所

④ 嵯峨 寛久, 小川 拓水, 鈴木 秀幸, 柴田 大輔, 太田 大策 「植物の化学防御に関わる複数の二次代謝経路を制御する新規転写調節因子の同定と機能解析」
日本植物生理学会 平成23年3月20日 東北大学

⑤ 中本雅俊, 池添弘樹, 嵯峨寛久, 高部圭

司, 太田大策 「植物ステロールの側鎖修飾機能が担う生理機能の解明」
日本植物生理学会 平成23年3月20日 東北大学

⑥ 嵯峨 寛久, 中本 雅俊, 太田 大策 「植物ステロール組成改変による生育への影響評価」日本農芸化学会 平成23年3月29日 東北大学

〔図書〕 (計 1 件)

① Ohta D & Mizutani M (2012) “Sterol C22-desaturase and its Biological Roles” in *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms*, edited by Thomas Bach, Springer.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者 太田大策
(DAISAKU OHTA)

研究者番号 : 10305659

(2) 研究分担者 小川拓水
(TAKUMI OGAWA)

研究者番号 : 00580367