

## 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25年 5月31日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370016

研究課題名（和文） 葉と種子での脂質合成経路の振り分けに関わる分子機構

研究課題名（英文） Mechanism for the partitioning of glycerolipid biosynthetic pathways in leaves and seeds

研究代表者

太田 啓之（OHTA HIROYUKI）

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・教授

研究者番号：20233140

研究成果の概要（和文）：

チラコイド膜を構成するグリセロ糖脂質やグリセロリン脂質と、オイルボディに溜まる貯蔵脂質（トリアシルグリセロール）は、どちらもプラスチドで合成された脂肪酸がホスファチジン酸へと取り込まれた後、各経路に振り分けられて合成されるが、その経路転換の仕組みは明らかではない。本研究は、葉と貯蔵組織で全く異なる、脂質合成の振り分け制御機構を解明することにより、それぞれの器官の分化・発達機構を明らかにすることを大きな目的として研究を行った。その結果、phosphatidate phosphohydrolase (PAH) 1/2の葉でのTAG合成における役割を明らかにすると共に、根における葉緑体膜発達の抑制に異常をきたした変異体を取得した。

研究成果の概要（英文）：

Both membrane and storage lipids are mainly composed of glycerolipids in many living organisms, which commonly contain two or three fatty acid moieties attached to a glycerol backbone. In case of higher plants, all of the fatty acids are synthesized in plastids, whereas the major sites for the membrane and storage lipid biosyntheses are spatially separated in a cell. Since each plant organ contain different ratio of the two types of the glycerolipids and the ratio itself is one of a major feature of each organ identity, it is of interest how plants control the partitioning of the two different biosynthetic pathways for the membrane and storage glycerolipids. In this project, we studied on the strict control system for the partitioning of two different pathways of membrane and storage glycerolipid biosyntheses in each plant organ. In the course of this study, we found several nutrient deficient conditions strongly enhanced TAG synthesis even in leaves, and clarified the importance of phosphatidate phosphohydrolase (PAH1/2) in the leaf TAG synthesis. Moreover, we identified novel mutants which lack suppression of chloroplast membrane biogenesis in roots.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			0
年度			0
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

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：代謝生理 オルガネラ 脂質

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体チラコイド膜を構成する膜脂質は、モノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)やジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)と呼ばれる糖脂質により主に構成されている。特に MGDG はそのバイオマスとしての膨大さから地球上で最も多量に存在する膜脂質であるといわれており、その合成酵素(MGD1)の欠損はチラコイド膜の構築や光合成に決定的な損傷をもたらすことをすでに申請者らが明らかにしている(Kobayashi et al *PNAS* 2007)。実際葉の細胞を観察すると、チラコイド膜を発達させた葉緑体がびっしりと詰まっており、合成された脂肪酸の大部分が糖脂質に取り込まれる。一方、貯蔵器官である登熟種子では、合成された脂肪酸の大部分がトリアシルグリセロール (TAG) 合成に用いられ、糖脂質合成に用いられる割合はきわめて低い。植物細胞において脂肪酸合成はすべてプラスチドで行われ、合成された脂肪酸がグリセロール骨格に取り込まれてホスファチジン酸 (PA) が合成されるまでの経路は、貯蔵脂質合成と膜脂質合成共に ER の経路を主に用いている。しかし、ER で合成された PA が、どのような制御によって各脂質合成経路に振り分けられているかは全く分かっていない。

本研究の開始当初、申請者らは葉緑体の膜脂質合成経路が通常条件とリン欠乏条件で異なっており、その経路の転換に、脂質合成のカギとなるリン脂質 PA の代謝酵素、PA ホスファターゼ (PAH1, PAH2) が大きく寄与していることを明らかにしていた(Nakamura et al *PNAS* 2009)。この酵素 PAH1, PAH2 の両遺伝子を欠損した植物は、

通常条件では野生株と比べて大きな生育の違いを示さないが、リン欠乏条件で著しい生育阻害を示す。そこで、申請者らは、この PAH1, PAH2 の機能を以下のように考えた。

- (1) PAH1, PAH2 はサイトゾルに存在し、葉のリン欠乏条件で ER の主要リン脂質ホスファチジルコリン (PC) などから生じた PA を分解。そこで生成したリン酸 (Pi) を他の代謝経路にリサイクルすると同時に、もう一方の生成物であるジアシルグリセロール (DAG) を葉緑体での糖脂質合成に提供する。
- (2) 種子では、同じ PAH1, PAH2 が、脂質合成経路によって合成された PC から生じた PA を分解して DAG を生成する反応に関与し、TAG 合成に提供する。

同じ可溶性の PA ホスファターゼが、葉と種子でそれぞれ葉緑体の糖脂質合成、貯蔵脂質合成に関与することは、PAH1, PAH2 によって生成する DAG が、葉と種子で違う経路に振り分けられる機構が存在することを示している。このような同じ酵素による代謝経路の転換が起こる可能性として、器官によって PAH1, PAH2 の局在部位が変わる可能性、PAH1, PAH2 によって生成する DAG の輸送経路が異なる可能性などが考えられる。つまり、この制御機構を明らかにすることは、葉と種子という異なる器官で、何故それぞれ葉緑体の形成とオイルボディの形成という全く異なるオルガネラの発達が起こるかを明らかにする上で極めて重要な知見を与えることと期待される。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、油糧種子であり、脂質

合成経路に関する膨大な知見の蓄積しているシロイヌナズナを用いて、(1) 葉に貯蔵脂質 (TAG) を蓄積する変異体や、種子で糖脂質合成酵素遺伝子が高発現する変異体を単離し、葉と種子での脂質合成の振り分け機構に異常をもつ変異体を取得するとともに、その原因遺伝子を明らかにし、(2) PAH 自身の機能制御が、脂質合成経路の振り分けに関与している可能性を検証する。また PAH1, PAH2 の欠損によっても種子での TAG 合成が完全には消失しないことは、TAG 合成に関わる他の経路が存在することを示しているので、(3) PAH1, PAH2 以外の TAG 合成経路に関わる遺伝子の候補を見出し、その機能解明など種子の TAG 合成経路の全容を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) リン十分条件、リン欠乏条件で葉に貯蔵脂質 (TAG) を蓄積する変異体、一方、種子で糖脂質合成酵素遺伝子が高発現している変異体をそれぞれ単離し、葉と種子での脂質合成の振り分け機構に異常をもつ変異体を取得するとともに、その原因遺伝子を明らかにする。
- (2) PA ホスファターゼ (PAH) の機能制御が、脂質合成経路の振り分けに関与している可能性を検証する。PAH1, PAH2 の細胞内局在を、抗体、GFP などの蛍光タンパク質等を用いた手法で明らかにする。また、相互作用タンパク質の存在による局在変化の可能性を調べる。
- (3) PAH1, PAH2 以外に存在することが予想される TAG 合成に関わる未知の経路の候補を解析する。また、PA 供給に関わるホスホリパーゼ D の同定など、貯蔵脂質合成において未解明であった代謝経路の全容を解明する。

### 4. 研究成果

#### (1) 脂質合成経路の振り分けに関わる変異体の単離

上記のとおり、植物の緑色組織では糖脂質が合成され、葉緑体チラコイド膜が発達する。一方、非緑色組織では糖脂質の合成は抑制され、特に種子では貯蔵脂質が合成される。このことから、非緑色組織には糖脂質合成を抑制する仕組みが存在すると考えられた。緑色組織での糖脂質合成には、主要な MGDG 合成酵素である MGD1 が機能していることが我々の解析から明らかとなっている。そこで、MGD1 遺伝子のプロモーターにレポーター遺伝子を融合した配列を導入した株を作成し、その株を変異原処理したうえで、チラコイド膜の発達しない非緑色組織で発現が見られる変異体をスクリーニングした。研究の当初は、種子での発現を抑制する因子を探るため、MGD1 のプロモーターにレポーターとして赤色蛍光タンパク質 (RFP) を融合した遺伝子を導入した株を作成することを計画していた。RFP を種子で発現させると、緑色光をあてることで、比較的容易に遺伝子導入株を選別することができる。実際、RFP との融合遺伝子を導入した植物を単離したが、コントロールとなる緑色組織での発現が確認できず、変異原処理によって非緑色組織で発現する株の単離が難しいと考えられた。

そこで、種子と同様に非緑色組織である根に着目した。根では葉緑体は発達しておらず、色素体として白色体が存在する。つまり、MGD1 の発現は低く抑えられている。実際、RT-PCR による解析から、根での MGD1 の発現は低いことがわかっていた。このことから、根での MGD1 遺伝子の発現が強くなっている株を単離することで、非緑色組織での糖脂

質合成を抑制している因子を単離できると期待された。

変異株の単離には、レポーター遺伝子として $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を用いた。MGD1 の推定される転写開始点から上流 1,357 bp をプラスミドベクター (pCAMBIA0381) に挿入し、GUS 遺伝子と融合させた。このベクターを用いて、目的の融合遺伝子をシロイヌナズナに導入し、形質転換体を単離後、T2 世代の株を用いてスクリーニングを行った。なお、用いた T2 株は、相反交雑および分離比の解析から、導入遺伝子がホモ接合体となっていることを確認している。

エチルメタンスルホン酸によって変異原処理した株を播種し、得られた M2 種子を用いてスクリーニングを行った。スクリーニングには、非破壊の GUS 染色を行い、得られた変異株をそのままポットに植え替え、種子を取得することとした。解析の結果、8 ラインの変異株を単離することに成功した。得られた変異株は、コントロールと比べ、特に根端での GUS 染色がみられたものの、全体的に強い染色は見られなかった。興味深いことに、これらの株は共通して葯の開裂異常を示した。葯の開裂には植物ホルモン的一种、ジャスモン酸が関与していることが知られている。そこで、開裂しない葯を持つ花房をジャスモン酸溶液に浸したところ、葯の開裂が見られ、受粉することがわかった。受粉に成功した株は種子を結実し、その種子を用いた次世代株の解析でも同様の表現型が見られた。このことから、得られた変異株の表現型が変異原処理や GUS 染色による一時的な影響ではないことがわかった。これまで、糖脂質合成にジャスモン酸が関与している報告はなく、もしジャスモン酸が糖脂質合成の抑制に関与しているとすれば、未知の機構が働

いている可能性が高い。今後、得られた変異株の原因遺伝子を同定することで、緑色組織と非緑色組織での脂質合成スイッチング機構が解明できると期待される。

## (2) 栄養飢餓条件における葉でのTAG蓄積とPAHの機能解明

リン欠乏における膜脂質転換に関わる2つの新規ホスファターゼPAH1, PAH2の葉でのTAG蓄積における機能について本研究で詳しく調べ、これらがリン欠乏時に果たす役割を考察した。リン欠乏時における葉での脂質変化を詳しく調べたところ、葉で膜脂質の変化に加えて葉には通常見られないTAGが著しく蓄積していることを見出した。このことはリン欠乏条件が膜脂質と貯蔵脂質との2つの代謝経路のスイッチング機構を解明する上で優れた系であることを示している。リン濃度依存性を詳しく調べたところ、培地中のリン濃度が33 $\mu$ M以下の条件で顕著な蓄積が見られた。また、この脂質蓄積は光強度が高い条件でより顕著であった。栄養欠乏時においてはデンプンの蓄積が起こることが知られているため、デンプン合成が欠損した変異体*pgm1*においてリン欠乏時のTAG蓄積を調べたところ、通常条件でもTAGの蓄積が見られたが、リン欠乏時にその蓄積がさらに促進された。さらに、PAH1, PAH2 2重変異体において、栄養欠乏時におけるTAG蓄積を調べた。野生型に比べ、PAH1, PAH2 2重変異体でもリン欠乏時のTAG蓄積は認められたが、デンプン合成変異体*pgm1*との3重変異体を作成し、リン欠乏時におけるTAG蓄積を調べたところ、3重変異体ではリン欠乏時におけるTAG蓄積が著しく阻害された。またこの際リン脂質の異常な蓄積が認められた。このことはデンプン合成欠損時などによるリン脂質合成経路を介したTAG蓄積の促進にPAH1/2が寄与してい

ることを示している。現在PAH1, PAH2と相互作用する因子の単離をツーハイブリッド法、プルダウン法などによって進めている。幾つかの候補タンパク質を取得しており、本基盤研究終了後も引き続き解析を進める予定である。

### (3) PAH1, PAH2 以外の未知の TAG 合成経路

(2) の結果から特にデンプン欠損時などの TAG 合成の促進に PAH が寄与していることが明らかになったが、リン欠乏時における TAG 蓄積そのものには影響が見られなかった。このため、PAH1/2 以外に葉の TAG 蓄積に関わる未知のホスファチジン酸ホスファターゼが存在すると考えられるが、現在までのところその因子を見つけ出すことは出来ていない。今後のさらなる研究が必要である。

### 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 9 件)

1. Kobayashi K, Narise T, Sonoike K, Hashimoto H, Sato N, Kondo M, Nishimura M, Sato M, Toyooka K, Sugimoto K, Wada H, Masuda T, Ohta H. (2013) Role of galactolipid biosynthesis in coordinated development of photosynthetic complexes and thylakoid membranes during chloroplast biogenesis in Arabidopsis. *Plant J.* 73, 250-261. [査読有](#)
2. Iketani A, Nakamura M, Awai K and Shioi Y (2013) A novel serine protease with caspase- and legumain-like activities from edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Fungal Biology* 117, 173-181. [査読有](#)
3. Wakahama, T., Laza-Martinez, A., BinHaji Mohd Taha, A.I., Okuyama, H., Yoshida, K., Kogame, K., Awai K., Kawachi, M., Maoka, T. and Takaichi, S. (2012) Structural confirmation of a unique carotenoid lactoside, p457, in *Symbiodinium* sp. Strain NBRC 104787 isolated from a sea anemone and its distribution in dinoflagellates and various

marine organisms. *Journal of Phycology* 48, 1392-1402. [査読有](#)

4. Yuzawa Y, Nishihara H, Haraguchi T, Masuda S, Shimajima M, Shimoyama A, Yuasa H, Okada N, Ohta H. (2012) Phylogeny of galactolipid synthase homologs together with their enzymatic analyses revealed a possible origin and divergence time for photosynthetic Membrane biogenesis. *DNA Res.* 19, 91-102. [査読有](#)
5. Masuda S, Harada J, Yokono M, Yuzawa Y, Shimajima M, Murofushi K, Tanaka H, Masuda H, Murakawa M, Haraguchi T, Kondo M, Nishimura M, Yuasa H, Noguchi M, Oh-Oka H, Tanaka A, Tamiaki H, Ohta H. (2011) A monogalactosyldiacylglycerol synthase found in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum* reveals important roles for galactolipids in photosynthesis. *Plant Cell* 23, 2644-2658. [査読有](#)
6. Shimajima M, Ohta H (2011) Critical regulation of galactolipid synthesis controls membrane differentiation and remodeling in distinct plant organs and following environmental changes. *Prog Lipid Res.* 50, 258-266. [査読有](#)
7. Shimajima M (2011) Biosynthesis and functions of the plant sulfolipid *Prog Lipid Res* 50, 234-239. [査読有](#)
8. Narise T, Kobayashi K, Baba S, Shimajima M, Masuda S, Fukaki H, Ohta H (2010) Involvement of auxin signaling mediated by IAA14 and ARF7/19 in membrane lipid remodeling during phosphate starvation. *Plant Mol Biol* 72, 533-544. [査読有](#)
9. 中村友輝、太田啓之 (2010) 高等植物ホスファチジン酸ホスファターゼの膜脂質合成、シグナリングにおける機能 *生化学* 82, 1137-1141 [査読有](#).

[学会発表]

(以下の代表的なものを含め計 18 件)

1. Hiroyuki Ohta Metabolic remodeling of glycerolipid synthesis in response to developmental and environmental changes Gordon Research Conference, Plant lipid: Structure, Metabolism & Function 2011 (招待講演) Galveston TX, USA 2013年1月29日
2. Hiroyuki Ohta Galactolipid synthesis "Mechanism and Evolution" Gordon Research Conference "Plant

Lipids:Structure, Metabolism &  
Function" (招待講演) Galveston TX  
(USA) 2011年1月30日

〔図書〕(計2件)

1. Nakamura Y, Kobayashi K, Shimajima M and Ohta H, The Chloroplast Biochemistry, Molecular Biology and Bioengineering Springer-Verlag 2010, 185-202.
2. Nakamura Y, and Ohta H, Lipid Signaling in Plants Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010, 131-141.

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称：植物油脂の製造法  
発明者：下嶋美恵、円由香、太田啓之、遠藤圭二  
権利者：東京工業大学、花王株式会社  
種類：特願  
番号：2011-016848  
出願年月日：2011.1.28  
国内外の別：国内

名称：植物油脂の製造法  
発明者：太田啓之、下嶋美恵、小泉遼太、遠藤圭二  
権利者：東京工業大学、花王株式会社  
種類：特願  
番号：2010-123162  
出願年月日：2010.5.28  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 啓之 (OHTA HIROYUKI)  
東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・教授  
研究者番号：20233140

### (2) 研究分担者

栗井 光一郎 (Awai Koichiro)  
静岡大学・若手グローバル研究リーダー育成拠点・特任助教  
研究者番号：80431732

下嶋 美恵 (Shimajima Mie)  
東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・助教  
研究者番号：90401562