

令和元年6月17日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26292190

研究課題名(和文)細胞膜マイクロドメインを介した植物環境ストレス応答機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of plant environmental response through plasmamembrane microdomain

研究代表者

川合 真紀 (KAWAI-YAMADA, Maki)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：10332595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物は外的なストレスに対して、細胞膜上のマイクロドメインを介してシグナル伝達を行い、様々な応答反応を行なっていると考えられる。本研究では、高発現すると酸化ストレス耐性を植物細胞に付与するBI-1遺伝子の解析に端を発し、小胞体膜上のスフィンゴ脂質生合成関連酵素群を介した細胞応答機構の解明を行った。BI-1の相互作用因子として単離されたFAH、ELO、SLDに注目し、これらのBI-1との結合性の確認を行った。また、個々の遺伝子の発現量を変化させたイネおよびシロイヌナズナを作成し、それらの系統で、実際に細胞膜上のマイクロドメインを構成するスフィンゴ脂質の組成が変化する事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は様々な環境ストレス下で生育しており、時として、大きなダメージを受ける。本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナやイネを対象として、環境ストレスに対応するシグナル伝達因子が細胞膜上で局在して働くための足場を構成すると考えられているスフィンゴ脂質代謝系の因子に注目して研究を行った。その結果、それらの因子の機能を改変することにより、植物の環境ストレス感受性を変化させられる可能性を示した。本成果を作物に適用することにより、将来的に、食糧や生活に必要な植物資源の増産につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：Plants respond to various environmental stresses through plasmamembrane microdomains. In our previous studied, we demonstrated that the overexpression of Arabidopsis BI-1, which localized on ER membrane, appeared enhanced tolerance to oxidative stress. In this research project, we characterized FAH, ELO, and SLD proteins, which are isolated as interacting factors to BI-1, directly or indirectly. Interestingly, these factors are related to the sphingolipid metabolism. The sphingolipid is known to be involved in the plasmamembrane microdomain. In this study, we produced transgenic plants in which these genes were over-expressing or knock-down. These plants showed modified sphingolipid profiles and different responses to oxidative stresses, suggest that the involvement of sphingolipid metabolism to the plant environmental responses.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：酸化ストレス スフィンゴ脂質 脂質ラフト 細胞死

1. 研究開始当初の背景

様々な環境ストレスは植物において、光合成などの電子伝達系を攪乱し、余剰電子を生み出す。これにより活性酸素種が細胞内に発生し、酸化ストレスが細胞にもたらされる。植物細胞は、こうした細胞内変化に应答して酸化還元ホメオスタシス維持の機構を作用させるが、細胞が受けた障害が大きい時には、ストレスを受けた部位から細胞構成成分を回収するため、ストレス誘導性の細胞死を引き起こすと考えられている。

我々はこれまで、植物において過酸化水素やメナジオンなどの活性酸素薬剤によるストレス誘導性細胞死の制御機構の解明を目指して研究をおこない、Bax Inhibitor-1(BI-1)がこの機構に関与することを明らかにした。BI-1は、動植物に共通して存在する数少ない細胞死制御因子である。動物のBI-1は小胞体ストレスによって引き起こされる細胞死の抑制因子であるが、そのメカニズムは明らかになっていない。我々は、モデル植物であるシロイヌナズナのBI-1が酸化ストレス誘導性細胞死に対し抑制活性を有し、その発現を強めた形質転換植物は過酸化水素やメナジオン、サリチル酸などの酸化ストレス誘導性細胞死に対して耐性を示すことを見出した。また、小胞体タンパク質であるBI-1がカルシウムシグナル伝達因子であるカルモジュリンと相互作用し、電子伝達因子であるシトクロム b5 を介して脂肪酸ヒドロキシ化酵素であるFAHの制御に関与するなど、BI-1を介した細胞死制御の機構を動植物を通して初めて見出した。また、脂肪酸伸長酵素であるELOについても、Cb5との相互作用を介してBI-1による活性制御を受ける可能性が新たに示された。FAHやELOの産物である超長鎖ヒドロキシ脂肪酸はスフィンゴ脂質を構成する。このことは生物界に保存された因子であるBI-1が活性酸素によって誘導されるストレス誘導性細胞死制御において、スフィンゴ脂質代謝の制御を行う調節因子として機能することを示唆している。近年、シロイヌナズナの細胞死変異体の原因遺伝子がスフィンゴ脂質の代謝酵素であったという報告例も複数あることから、本機構の解明は、生物界に共通して存在すると考えられる活性酸素応答の基本分子メカニズムに迫ることにつながる。

2. 研究の目的

これまでの研究から、生物界に保存された細胞死関連因子であるBI-1によって制御される活性酸素誘導性細胞死の制御機構において、脂肪酸代謝が重要な役割を担っていることを初めて提唱した。本課題においては、活性酸素シグナルに対する植物の応答を、BI-1によるスフィンゴ脂質代謝酵素の活性調節の分子機構の観点から解明する。また、動物のBI-1も植物の分子種と類似の構造的特徴を兼ね備えていることから、そのC末端部位を介したカルモジュリンとの相互作用、およびシトクロム b5 との相互作用が可能であると考えられる。しかし、動物では、植物BI-1の間接的なターゲットと考えられるFAH自身がCb5ドメインを分子内に有している。さらに、BI-1の新規ターゲットとして見出されたELOは電子受容のドメインの有無に関して動植物の間で構造的な変異がかなり大きい。BI-1という共通の因子を介しながら、その下流の制御機構が生物種間で大きく異なっている可能性が高い。本研究ではBI-1を介した活性酸素誘導性細胞死の制御機構について、植物特異的な機構を抽出し、相互作用因子の構成と活性制御機構を解明する。さらに、BI-1によって制御されたスフィンゴ脂質代謝酵素の産物は細胞膜上で脂質ラフトの構成因子となる。酸化ストレス下の脂質ラフトの動態解析を行い、環境ストレスに対する植物の応答機構を、細胞膜を介したシグナル伝達の側面から解明する。

3. 研究の方法

過去の研究から、シロイヌナズナの BI-1 が小胞体膜タンパク質であるシトクロム b5(cb5)、および FAH と結合し、スフィンゴ脂質の構成/性質を制御する可能性が示唆された。これらの因子は皆、酸化ストレスにより発現量が上昇するストレス応答遺伝子である。動物では、ミトコンドリアと小胞体に各 1 種ずつの Cb5 アイソフォームが存在するが、シロイヌナズナの細胞内には 5 種類の Cb5 相同因子が存在する。このうち、小胞体膜タンパク質である BI-1 に結合する因子として単離されたのは、Cb5-3 と呼ばれる分子種であり、これまでに BiFC 法や FRET 法などのイメージングの手法を用いて BI-1/cb5-3 の 2 者間の植物細胞内における結合性を証明した。これらの成果を踏まえ、小胞体膜上の細胞死制御複合体の構成と動態の解明、細胞死制御複合体によって制御される脂質シグナルの解明、植物脂質ラフトの動態と環境応答への関与を解明した。具体的には、BI-1/cb5-3/FAH の 3 因子間の植物細胞内における物理的相互作用をバイオイメージングの手法を用いて検証した。さらに BI-1 の過剰発現植物およびノックアウト植物における FAH の発現および活性の変化を解析し、BI-1 がどの段階で FAH 活性に影響を与えるかを調べた。また、BI-1 による細胞死抑制活性に直接的な関与が示唆された FAH を欠失、または発現量を増加させたシロイヌナズナ系統の整備、作成を行い、これらにおけるスフィンゴ脂質類のプロファイリング、細胞死誘導処理に対する応答性を解析した。先行研究により、酵母の FAH や ELO 欠損株では BI-1 の細胞死抑制活性が低下することが示されている。植物の FAH1、ELO 欠損体においても同様に BI-1 の細胞死抑制機能が変化するか、また FAH、ELO 自身がストレス応答に直接関与するかを調べた。また、FAH 以外の BI-1 複合体のターゲット酵素の候補として、分子内にシトクロム b5 ドメインを有する他の因子についても複合体による制御を受ける可能性を精査した。

脂質ラフトはスフィンゴ脂質の生理機能を考える上で非常に重要なファクターとなる。脂質ラフトは細胞膜に存在しており、多数の情報伝達因子の集合体を形成していると考えられているマイクロドメインである。BI-1 の過剰発現により、ラフトを構成するスフィンゴ脂質の構成が変化すること、ラフトに含まれるタンパク質のプロファイルが変化することが示されている。FAH や ELO の産物は、超長鎖ヒドロキシ脂肪酸としてスフィンゴ脂質を構成する。すなわち、BI-1 は小胞体膜上においてスフィンゴ脂質の生合成系を統合的に制御し、細胞膜上の脂質ラフトのサイズ、構成を変動させることによって細胞の活性酸素シグナル応答を変化させるという仮説がたてられた。この仮説に沿って、植物脂質ラフトに含まれるタンパク質のプロテオーム解析と脂質分析、それらの系統の病原菌感染や過酸化水素処理に対する応答の変化を精査した。

4 . 研究成果

本研究は、酸化ストレス誘導性細胞死の抑制因子 BI-1 と相互作用する因子として、スフィンゴ脂質代謝関係の酵素タンパク質が単離されたことから、植物細胞の細胞膜上に存在する機能ドメインの構造とその生理機能に迫ることを目的としておこなわれた。まず、BI-1/cb5-3/FAH の 3 因子間の植物細胞内における物理的相互作用の検出に成功した。しかし、現時点では、定常状態での結合が検出された段階であり、この相互作用が、環境ストレス時にどのように変動するかについては今後解析を行う必要がある。また、BI-1 との物理的・機能的相互作用が推測されていた候補因子(FAH、SLD、ELO)の発現量を変化させた植物の作出とその表現型をマイクロドメインの構成変化と環境ストレスに対する応答性の変化を解析した。シロイヌナズナには FAH1 と FAH2 の 2 つのスフィンゴ脂質ヒドロキシル化酵素遺伝子が存在する。これまでに、FAH2 については T-DNA が挿入されたノックアウト株を入手し研究を行ってきたが、FAH1 については、T-DNA 挿入株が存在せず、RNAi 法によるノックダウン株を用いた研究のみが可能であった。し

たがって、両者を交配した二重変異株が研究に用いられてきたがこれは完全な FAH 欠損体とはいえなかった。本研究ではゲノム編集により FAH1 完全欠損体を作成し、これを FAH2 KO 株と交配することにより、FAH の完全欠損体を得ることができた。この個体は通常の生育環境下でも生育が若干悪くなることから、スフィンゴ脂質のヒドロキシル化が病原菌応答や酸化ストレス耐性に関するばかりでなく、正常な植物の生育のためにも必要な因子であることが明らかとなった。さらに、シロイヌナズナの FAH1、FAH2 の高発現体の脂質分析を LC-MSMS により行った結果、これらの系統では 2-ヒドロキシスフィンゴ脂質の割合が増加していることが分かった。また、シュドモナス菌(AvrRPT2)を感染させ、イオン漏出量を測定した結果、これらの系統ではより多くのイオンが漏出しており、抵抗性反応としての過敏細胞死がより強く誘発されている可能性が示された。また、BI-1 を高発現させたイネ培養細胞より単離した脂質ラフトタンパク質は、CBB 染色レベルで検出される大きなプロファイル変化を示しており、これらのタンパク質同定をおこなった。その結果、植物病原性応答に関わると考えられる因子や、他のタンパク質の膜局在として機能すると考えられるタンパク質の量が変動している可能性が示され、これらの因子の酸化ストレス誘導性細胞死への関与を今後検討する必要がある。

本研究により、小胞体膜上に存在する BI-1 が、スフィンゴ脂質代謝系の酵素群と相互作用し、細胞膜上の脂質ラフトを構成するスフィンゴ脂質の組成や量を変化させることが示唆された。脂質ラフトはステロールやスフィンゴ脂質が作る足場に受容体やチャネルなどの膜タンパク質が局在し、細胞のストレス応答に関わるシグナル伝達の間となっておりと考えられている。本研究により、BI-1 による植物細胞の環境応答性制御の分子メカニズムの一端を明らかにすることができたと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- (1) Sechet, J., Htwe, S., Urbanowicz, B., Agyeman, A., Feng, W., Ishikawa, T., Dinneny, J., Colomes, M., Satish Kumar, K., Kawai-Yamada, M., O'Neill, M., Mortimer, J. (2018) Suppressing Arabidopsis GGLT1 affects growth by reducing the L-galactose content and borate cross-linking of rhamnogalacturonan II. *Plant J.* 96, 1036-1050. Doi: 10.1104/pp.18.00396.
- (2) Ishikawa, T., Fang, L., Rennie, E.A., Sechet, J., Yan, J., Jing, B., Moore, W., Markham, J., Cahoon, E.B., Scheller, H.V., Kawai-Yamada, M., Mortimer, J.C. (2018) GLUCOSAMINE INOSITOLPHOSPHORYLCERAMIDE TRANSFERASE1 (GINT1) Is a GlcNAc-Containing Glycosylinositol Phosphorylceramide Glycosyltransferase. *Plant Physiology*, 177, 938-952. doi: 10.1104/pp.18.00396.
- (3) Imamura, T., Obata, C., Yoneyama, K., Ichikawa, M., Ikura, A., Mutsuro-Aoki, H., Ishikawa T., Kawai-Yamada, M., Sasaki, T., Kusano, H., Shimada, H. (2018) DSH5, a dihydrosphingosine C4 hydroxylase gene family member, shows spatially restricted expression in rice and is lethal when expressed ectopically. *Genes and Genetic Systems*, 93, 135-142. doi: 10.1266/ggs.17-00054.
- (4) Nagano, M., Ishikawa, T., Fujiwara, M., Fukao, Y., Kawano, Y., Kawai-Yamada, M., Shimamoto, K. (2016) Plasma membrane microdomains are essential for Rac1-RbohB/H-mediated immunity in rice. *Plant Cell*, 28, 1966-1983. Doi: 10.1105/tpc.16.00201.
- (5) Ishikawa, T., Ito, Y., Kawai-Yamada, M. (2016) Molecular characterization and targeted quantitative profiling of the sphingolipidome in rice. *Plant Journal*, 88, 681-693. Doi: 10.1111/tbj.13281.

- (6) Fang, L., Ishikawa, T., Rennie, E.A., Murawska, G.M., Lao, J., Yan, J., Tsai, A.Y., Baidoo, E.E., Xu, J., Keasling, J.D., Demura, T., Kawai-Yamada, M., Scheller, H.V., Mortimer, J.C. (2016) Loss of inositol phosphorylceramide sphingolipid mannosylation induces plant immune responses and reduces cellulose content in Arabidopsis. *Plant Cell*, 28, 2991-3004. doi: 10.1105/tpc.16.00186.
- (7) Ishikawa, T., Aki, T., Yanagisawa, S., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M. (2015) Overexpression of Bax inhibitor-1 links plasma membrane microdomain proteins to stress. *Plant Physiology*, 169, 1333-1343. doi: 10.1104/pp.15.00445.
- (8) Sawake, S., Tajima, N., Mortimer, J.C., Ishikawa, T., Yu, X., Yamanashi, Y., Yoshimi, Y., Kawai-Yamada, M., Dupree, P., Tsumuraya, Y., Kotake, T. (2015) KONJAC1 and 2 are key factors for generation of GDP-Mannose and affect L-ascorbic acid and glucomannan biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 27, 3397-3409. doi: 10.1105/tpc.15.0037.
- (9) Nagano, M*, Ishikawa, T*, Ogawa, Y., Iwabuchi, M., Nakasone, A., Shimamoto, K., Uchimiya, H. and Kawai-Yamada, M. (2014) Arabidopsis Bax inhibitor-1 promotes sphingolipid synthesis during cold stress by interacting with ceramide-modifying enzymes. *Planta*, 240, 77-89. (* equally contribution) doi: 10.1007/s00425-014-2065-7.
- (10) Kawai-Yamada, M., Nagano, M., Kakimoto, M., Uchimiya, H. (2014) Plastidic protein Cdf1 is essential in Arabidopsis embryogenesis. *Planta*, 239, 39-46.

〔学会発表〕(計 53 件)

- (1) 石川寿樹、川合真紀、植物型スフィンゴ脂質糖鎖の構造多様性と機能、第 31 回植物脂質シンポジウム、2018
- (2) 大島良美、鳴海貴子、金子康子、石川寿樹、川合真紀、高木優、光田展隆、転写因子 LATE MTERISTEM IDENTITY2 によるクチクラ形成と種子保存生の制御、第 31 回植物脂質シンポジウム、2018
- (3) 石川寿樹、川合真紀、植物固有なスフィンゴ脂質糖鎖を形成する糖転移酵素の同定と機能解析、日本植物学会第 82 回大会、2018
- (4) 小川洋佑、石川寿樹、山口雅利、川合真紀、コケ植物におけるスフィンゴ脂質 8 不飽和化酵素の同定と機能解析、第 36 回日本植物細胞分子生物学会、2018
- (5) 佐藤正弥、石川寿樹、山口雅利、川合真紀、スフィンゴ脂質長鎖塩基 8 不飽和化改変イネの作出と表現型解析、第 36 回日本植物細胞分子生物学会、2018
- (6) 長野稔、Yohann Boutté, Adilalah Mamode-Cassim, Laetitia Fouillen、川合真紀、Sébastien Mongrand、スフィンゴ脂質による植物細胞膜ダイナミクスの制御、第 36 回日本植物細胞分子生物学会、2018
- (7) Masaya Sato, Toshiki Ishikawa, Maki Kawai-Yamada, Sphingolipid $\Delta 8$ cis/trans unsaturation increases aluminum tolerance in rice, The 23ed International Symposium on Plant Lipids, 2018
- (8) Hiroyuki Imai, Toshiki Ishikawa, Maki Kawai-Yamada, Makoto Miyagi, Tamotsu Tanaka, Identification of phytoceramide 1-phosphate and its producing enzyme in plants, The 23ed International Symposium on Plant Lipids, 2018
- (9) Toshiki Ishikawa, Maki Kawai-Yamada, The evolutionary journey of plant-unique long-chain base unsaturation, The 23ed International Symposium on Plant Lipids, 2018
- (10) Minoru Nagano, Yohann Boutté, Adilalah Mamode-Cassim, Maki Kawai-Yamada and Sébastien Mongrand, The role of sphingolipids in the dynamics of plasma membrane in plants, The 23ed International Symposium on Plant Lipids, 2018
- (11) 石川寿樹、葛葉修平、川合真紀、植物特異的なセラミド不飽和化の分子進化、第 59 回植物生理学会、2018
- (12) Tomomi Ukawa, Minoru Nagano, Toshiki Ishikawa, Masatoshi Yamaguchi, Maki Kawai-Yamada, Analysis of the impact of 2-hydroxy sphingolipids on disease resistance in *Arabidopsis thaliana*, The 7th Asian Symposium on plant lipids, 2018

- (13) 石川寿樹、葛葉修平、小川洋輔、川合真紀、植物スフィンゴ脂質の分子進化に関する新展開：長鎖塩基不飽和化酵素の立体特異性逆転とデュアルハイブリッド化、第30回植物脂質シンポジウム、2017
- (14) 宇川智水、長野稔、石川寿樹、山口雅利、川合真紀、2-ヒドロキシルスフィンゴ脂質によるシロイヌナズナ耐病性の解析、日本植物学会第81回大会、2017
- (15) 石川寿樹、葛葉修平、小川洋祐、川合真紀、植物固有なスフィンゴ脂質構造多様性の分子進化、日本植物学会第81回大会、2017
- (16) 葛葉修平、石川寿樹、長野稔、山口雅利、川合真紀、植物スフィンゴ脂質不飽和化酵素の機能解析、第35回日本植物細胞分子生物学会（さいたま）大会、2017
- (17) Minoru Nagano, Chikako Kakuta, Masayuki Fujiwara, Yoichiro Fukao and Maki Kawai-Yamada, Arabidopsis Bax inhibitor-1 promote VLCFA synthesis through the interaction with VLCFA-related enzymes, Arabidopsis meeting, 2017
- (18) 長野稔、石川寿樹、島本功、川合真紀、細胞膜マイクロドメインはイネ免疫を制御する、第29回植物脂質シンポジウム、2016
- (19) 宇川智水、長野稔、石川寿樹、川合真紀、2-ヒドロキシルスフィンゴ脂質によるシロイヌナズナ免疫制御機構の解析、第29回植物脂質シンポジウム、2016
- (20) 石川寿樹、川合真紀、スフィンゴリピドミクスが解き明かす植物スフィンゴ脂質の独自性と多様性、第29回植物脂質シンポジウム、2016
- (21) Minoru Nagano, Tomomi Ukawa, Toshiki Ishikawa, Ko Shimamoto and Maki Kawai-Yamada, 2-hydroxy sphingolipids are essential for the formation of plasma membrane microdomains and innate immunity in plants, 22nd International Symposium on Plant Lipids, 2016
- (22) Toshiki Ishikawa and Maki Kawai-Yamada, Comprehensively targeted sphingolipidomics reveals plant species- and lipid class-specific metabolism of sphingolipids in monocots, 22nd International Symposium on Plant Lipids, 2016
- (23) 石川寿樹、川合真紀、植物のストレス誘導性細胞死における細胞膜マイクロドメインの機能、第57回日本植物生理学会年会、2016
- (24) Toshiki Ishikawa and Maki Kawai-Yamada, Plasma membrane microdomain participate in Bax inhibitor-1-mediated stress tolerance in rice. The 6th Asian Symposium on Plant Lipids, 2016
- (25) 石川寿樹、川合真紀、植物スフィンゴリピドミクスによるストレス耐性分子マーカーの探索、第9回メタボロームシンポジウム、2015
- (26) 石川寿樹、川合真紀、植物スフィンゴ脂質の代謝と機能における長鎖塩基不飽和化の役割、第28回植物脂質シンポジウム、2015
- (27) 石川寿樹、金松、中曽根光、長野稔、川合真紀、スフィンゴ脂質不飽和化酵素 SLD を過剰発現するイネの解析、第33回日本植物細胞分子生物学会（東京）大会・シンポジウム、2015
- (28) Maki Kawai-Yamada, Minoru Nagano, Toshiki Ishikawa, Function of plasmamembrane microdomain in plant oxidative stress, 第56回日本植物生理学会年会、2015
- (他25件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

6. 研究組織 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。