

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20909

研究課題名(和文)植物スフィンゴ脂質の分子機能解明と代謝改変技術の確立

研究課題名(英文)Molecular functions of sphingolipids in plants for technological development of metabolic engineering

研究代表者

石川 寿樹 (ISHIKAWA, Toshiki)

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：20598247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物は動物や菌類とは異なる独自のスフィンゴ脂質構造を有しており、それらは植物固有の機能を担っていることが推測される。本研究では、多様な植物スフィンゴ脂質分子種を網羅する理論ライブラリーを構築し、その全分子種を標的とした一斉定量分析システムを開発した。本技術を用いることで、植物細胞膜上のマイクロドメインの形成と特定のタンパク質の局在化において、植物特有のスフィンゴ脂質分子構造が重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに分析技術のハイスループット性と網羅性を生かし、機能未知糖転移酵素変異体の中から、植物型スフィンゴ脂質糖鎖の多様性の根幹を形成する新規糖転移酵素を同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Plants have typical sphingolipid structures distinct from other eukaryotes. To dissect plant-specific structures of sphingolipids, we established a comprehensively targeted sphingolipidomics technology based on theoretical library covering whole molecular species present in plants. The technical development provided new insights into molecular functions of plant-specific sphingolipid structures in the formation of functional lipid-protein clusters as plasma membrane microdomains. Moreover, we succeeded to identify a novel glycosyl transferase gene family responsible for biosynthesis of the diverse sugar chains of plant sphingolipids. These results will further accelerate understanding of molecular functions of plant sphingolipids as well as applied biotechnological development through metabolic engineering of sphingolipids.

研究分野：植物生理生化学

キーワード：スフィンゴ脂質 スフィンゴリピドミクス 細胞膜マイクロドメイン ストレス耐性 代謝改変

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らの先行研究により、ストレス誘導性細胞死抑制因子 **Bax inhibitor-1 (BI-1)** の作用機構において、スフィンゴ脂質代謝酵素が重要な役割を担っていることが示唆された。スフィンゴ脂質は真核生物に普遍的な生体膜脂質であり、細胞膜上にマイクロドメインと呼ばれる特異分子集合領域を形成することにより、生体膜を介した様々な情報伝達のプラットフォームとして機能すると考えられている。その構造の形成と維持にはスフィンゴ脂質特有の分子構造が重要な役割を果たすと推測されるが、動物や菌類とは異なる植物に特有なスフィンゴ脂質分子構造の代謝機構や分子機能はほとんどわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

植物のスフィンゴ脂質は、動物や菌類とは大きく異なる特徴を有する。特にセラミド不飽和化と多様な糖鎖構造は植物に特有であり、これらの合成酵素の同定およびその機能解明は、植物におけるスフィンゴ脂質と細胞膜ドメイン機能の解明に不可欠である。本研究では、植物固有の多彩な構造をもつスフィンゴ脂質を定性的・定量的に解析する手法として、全スフィンゴ脂質分子を網羅するスフィンゴリポドミクスの手法を確立することを目指した。さらにその技術を活用し、細胞膜マイクロドメイン構造の形成におけるスフィンゴ脂質の重要性を検証し、その生理学的意義の解明を目指した。また、新規分析手法を活用することにより、未知であったスフィンゴ脂質糖鎖合成酵素の探索を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) スフィンゴ脂質分析手法の確立

植物組織に含まれる多彩な化学的性質をもつスフィンゴ脂質クラス群の全てを高収率かつ迅速に抽出、精製する操作スキームを開発し、最適化した。さらに多様な分子種を選択的かつ正確に定性・定量する手法として、液体クロマトグラフトンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた網羅的スフィンゴ脂質分析法 (スフィンゴリポドミクス) の手法を構築した。

### (2) スフィンゴ脂質と細胞膜マイクロドメイン機能の関係

新規スフィンゴ脂質分析手法を用い、細胞死抑制因子 **BI-1** がスフィンゴ脂質代謝酵素との相互作用を介して細胞膜マイクロドメインに及ぼす影響を脂質分子レベルで解析し、さらにプロテオミクス解析により **BI-1** のストレス耐性機構に関与する膜機能について調査した。

### (3) **BI-1** と相互作用するスフィンゴ脂質不飽和化酵素の機能解析

**BI-1** と相互作用する因子として単離した

セラミド長鎖塩基  $\Delta 4$  不飽和化酵素 **DES** について、**BI-1** との相互作用試験および酵母発現系を用いた酵素活性試験を行った。

### (4) 新規スフィンゴ脂質代謝酵素の探索

未だ全容が明らかとなっていない植物固有のスフィンゴ脂質糖鎖合成に関わる酵素の同定を目的として、機能未知糖転移酵素変異体のスフィンゴリポドミクス解析により糖鎖異常変異体の探索を行った。

## 4. 研究成果

### (1) スフィンゴリポドミクス技術の確立

本研究において、数百 mg 程度の微量植物組織から全スフィンゴ脂質を高収率かつ迅速に抽出する手法を確立することができた。さらに総脂質画分から、スフィンゴ脂質の親水部クラスの化学的性質に基づき、市販の固相抽出カラムを用いた簡便かつ再現性の高い精製スキームを確立した。これにより、これまで数日を要した植物スフィンゴ脂質の抽出および精製操作が、わずか数時間内に完了するに至った。また植物スフィンゴ脂質の **MS/MS** 挙動を明らかにし、フルスキャン、プリカーサーイオンスキャン、ニュートラルロススキャン等の **MS/MS** 解析手法を併用することで、脂質構造を迅速に決定する手法を確立した。さらにシロイヌナズナ、タバコ、イネ等の様々な植物においてスフィンゴ脂質構造を解析し、全脂質構造を網羅する理論ライブラリーを構築、総脂質画分を用いた網羅的なスフィンゴリポドミクス解析系を確立した。本成果は *Plant J* 誌の **Technical Advance Article** として報告した (Ishikawa et al., 2016)。

### (2) **BI-1** がイネのスフィンゴ脂質代謝と細胞膜マイクロドメイン機能に及ぼす影響

上述のスフィンゴ脂質分析技術を用い、イネ **Bax inhibitor-1** 過剰発現系統において 2-ヒドロキシ脂肪酸を含むスフィンゴ脂質が増加し、それが細胞膜マイクロドメインに濃縮されていることを明らかにした。さらに生化学的に調製したマイクロドメイン画分の定量的プロテオミクス解析により、**BI-1** 過剰発現により量的に変動する複数のタンパク質を同定した。そのうち **Flotillin (FLOT)** および **Hypersensitive-induced response 3 (HIR3)** が **BI-1** 過剰発現イネの細胞膜マイクロドメインで顕著に減少していることを免疫学的に立証し、さらにこれらの遺伝子破壊および発現抑制系統において酸化ストレス誘導性細胞死が大きく抑制されることを見出した。以上のことから、植物の酸化ストレス誘導性細胞死において、細胞膜マイクロドメインが動的な細胞死を誘導するうえで重要な役割を担っていること、**BI-1** はスフィンゴ脂質代謝系との相互作用を介してマイクロドメイン上の細胞死誘導系を抑制的に制御していることが明らかとなった。本成果は

植物の細胞膜マイクロドメインが担う具体的な細胞機能の実体をはじめ明らかにするものであり、Plant Physiol.誌に報告した(Ishikawa et al., 2015)。さらに BI-1 と直接相互作用する FAH (スフィンゴ脂質脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼ) が、イネの細胞膜マイクロドメイン形成と病原応答に重要な役割を担うことを見出し、植物の環境応答において細胞膜マイクロドメインが動的に寄与することを明らかにした (Nagano et al., 2016)。

### (3) BI-1 と相互作用する新規因子 DES の機能解析

BI-1 過剰発現イネのスフィンゴリピドミクス解析により、シロイヌナズナではみられないイネ特有の脂質構造である長鎖塩基  $\Delta 4$  不飽和化が BI-1 により亢進されることを見出し、その責任酵素として DES を単離した。酵母 two-hybrid 解析および BiFC 解析により、DES が電子伝達因子シトクロム b5 (Cb5) を仲介として BI-1 とタンパク質間相互作用することを示した。さらにピキア酵母発現系を用いた酵素活性試験により、DES の活性発現には Cb5 が必要であることが明らかとなった。以上のことから、DES は Cb5 を介して BI-1 による酵素活性調節を受けているものと推測された。現在ゲノム編集技術によりイネ DES 変異系統の作出を進めており、その生理学的機能をさらに解析する予定である。

### (4) 新規スフィンゴ脂質糖鎖合成酵素の同定

スフィンゴリピドミクス技術の確立により、様々な植物種および組織におけるスフィンゴ脂質糖鎖構造の分析が可能となり、糖鎖の基部から 2 残基がリン酸イノシトールとグルクロン酸であることが植物に共通であり、3 番目の糖残基においてヘキソースやヘキソサミン、N-アセチルヘキソサミンといった多様性をもつことが明らかとなった。すなわち第 3 糖残基は植物におけるスフィンゴ脂質糖鎖多様性の根幹であるといえるが、この糖残基の転移を触媒する酵素は不明であった。そこで機能未知糖転移酵素の中で、シロイヌナズナの遺伝子欠損変異体がスフィンゴ脂質合成異常変異体と類似の生育異常表現型を示すものを選抜し、スフィンゴリピドミクス解析により糖鎖構造異常を示す系統を探索した。その結果、シロイヌナズナで主要なヘキソースを転移する酵素遺伝子を同定することに成功し、さらに相同性を有する糖転移酵素ファミリーの中からヘキソサミンおよび N-アセチルヘキソサミンの転移を触媒する酵素遺伝子も相次いで同定した (Fang et al., 2016; Ishikawa et al., in preparation)。この発見により、セラミド構造に続いて植物特有の糖鎖構造の機能解明が今後加速すると共に、その遺伝的改変による分子育種的应用に向けた研究が進展することが期待される。

## 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 8 件)

① Yanagawa D, Ishikawa T, Imai H. (2017) Synthesis and degradation of long-chain base phosphates affect fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. J. Plant Res., 査読有, vol. 130, pp. 571-585.

DOI:10.1007/s10265-017-0923-7

② Ishikawa T, Ito Y, Kawai-Yamada M. (2016). Molecular characterization and targeted quantitative profiling of the sphingolipidome in rice. Plant J., 査読有, vol. 88, pp. 681-693.

DOI: 10.1111/tjp.13281

③ Fang L, Ishikawa T, Rennie EA, Murawska GM, Lao J, Yan J, Tsai ALY, Baidoo EEK, Xu J, Keasling JD, Demura T, Kawai-Yamada M, Scheller HV, Mortimer JC. (2016) Loss of inositol phosphorylceramide sphingolipid mannosylation induces plant immune responses and reduces cellulose content in *Arabidopsis*. Plant Cell, 査読有, vol. 28, pp. 2991-3004.

DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00186>

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, 査読有, vol. 28, pp. 1966-1983.

DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00201>

⑤ Ishikawa Y, Miyagi A, Haishima Y, Ishikawa T, Nagano M, Yamaguchi M, Hihara Y, Kawai-Yamada M. (2016) Metabolomic analysis of NAD kinase-deficient mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. J. Plant Physiol., 査読有, vol. 205, pp. 105-112.

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2016.09.002>

⑥ 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 Physiol., 査読有, vol. 169, pp. 1333-1343.

DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.15.00445>

⑦Sawake S, Tajima N, Mortimer JC, Lao J, 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 GDP-mannose generation and affect l-ascorbic acid and glucomannan biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 査読有, vol. 27, pp. 3397-3409.  
DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00379>

⑧Yamaguchi M, Nagahage ISP, Ohtani M, Ishikawa T, Uchimiya H, Kawai-Yamada M, Demura T. (2015). Arabidopsis NAC domain proteins VND-INTERACTING1 and ANAC103 interact with multiple NAC domain proteins. *Plant Biotech.*, 査読有, vol. 32, pp. 119-123.  
DOI:  
<http://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.15.0208a>

〔学会発表〕(計 7件)

①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年11月25日-26日(大阪府豊中市)

② Ishikawa T, Kawai-Yamada M. Comprehensively targeted sphingolipidomics reveals plant species- and lipid class-specific metabolism of sphingolipids in monocots. The 22nd International Symposium on Plant Lipids, 2016年7月3日-8日(Göttingen, Germany)

③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年3月18日-20日(岩手県盛岡市)

④Ishikawa T, Kawai-Yamada M. Plasma membrane microdomains participate in Bax inhibitor-1-mediated stress tolerance in rice. The 6th Asian Symposium on Plant Lipids, 2015年12月2日-4日(Singapore)

⑤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年9月30日-10月2日(静岡県三島市)

⑥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年9月9日-10日(東京都千代田区)

⑦石川寿樹、金松、中曽根光、長野稔、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33回日本植物分子細胞生物学会、2015年8月10日-12日(東京都文京区)

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.saitama-u.ac.jp/~geneenvtech/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 寿樹 (ISHIKAWA, Toshiki)

埼玉大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：20598247