

令和元年9月2日現在

機関番号：12604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04803

研究課題名(和文)ピロリン酸の過剰蓄積が植物の発生に及ぼす影響の時空間的解析

研究課題名(英文) Spatio-temporal analysis of the effect of excess pyrophosphate on plant development

研究代表者

Ferjani Ali (FERJANI, Ali)

東京学芸大学・教育学部・准教授

研究者番号：20530380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリン酸(PPi)は生体反応で生成され、適切に除去することで正常な細胞機能が保たれる。植物では、H<sup>+</sup>-PPaseがPPiの除去を担い、その機能を喪失したfugu5ではPPiが蓄積し、生育に異常をきたす。本研究では、PPiの蓄積が引き起こす様々な発達異常のメカニズムを発生段階及び組織毎に解析し、植物の代謝と発生制御におけるH<sup>+</sup>-PPaseの役割の解明を目指した。その結果、PPiの蓄積がもたらす影響は組織毎に異なること、正常な気孔機能の発揮には孔辺細胞におけるPPi分解が必須であること、fugu5の初期成長における一時的なPPi除去能の付加が全発生異常を回復させるのに十分であることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PPi分解酵素は植物のみならず、大腸菌からヒトまでの生物が持つ重要な酵素であり、その活性が失われると生存できないとされてきたため、従来、解析のめどが立っていなかった。PPiの存在の発見以来70年余経つが、教科書では未だに生体内におけるPPi分解酵素の役割は謎とされている。そのなかで研究代表者は、独自に単離したPPi分解酵素の機能欠損型fugu5変異体を使うことで、上記の通り、PPiの阻害メカニズムの全貌を多元的に明らかにし、植物の代謝と発生制御におけるH<sup>+</sup>-PPaseの役割の解明に成功した。今回得られた成果は、基礎科学的貢献のみならず、近い将来、教科書を塗り替えることになると期待している。

研究成果の概要(英文)：Pyrophosphate (PPi) is generated by biological reactions, and its removal is essential for proper cell functions. In plants, H<sup>+</sup>-PPase is responsible for the removal of PPi, and the H<sup>+</sup>-PPase loss-of-function mutant fugu5 over-accumulates PPi, and displays postgerminative developmental and growth defects. In this study, the various developmental abnormalities caused by excess PPi have been analyzed in a developmental stage, tissue, and cell type specific manner, in order to elucidate the role of H<sup>+</sup>-PPase in plant metabolism and developmental regulation. As a result, we demonstrated that the effect of excess PPi differs among leaf tissues, that the degradation of PPi within guard cells is essential for exerting normal stomatal function, and that temporary removal of PPi during the initial phase following seed germination is proved to be necessary and sufficient to recover all developmental abnormalities in fugu5 background.

研究分野：植物生理学・分子発生遺伝学

キーワード：植物 葉器官 H<sup>+</sup>-PPase fugu5変異体 ピロリン酸 組織 補償作用 表皮細胞の単純化

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は当初、葉の細胞数とサイズの間関係について「補償作用」の概念を視座に解析を進めてきた(Ferjani et al., 2007)。補償作用とは、葉原基で細胞増殖活性の低下が起きた場合、それを引き金として起こる細胞の異常肥大現象のことで、その理解のために研究代表者は補償作用を示す突然変異体を多数単離し、その中から、液胞膜局在型  $H^+$ -PPase の欠損株である *fugu5* 変異体の示す特異な表現型に焦点をあてて研究してきた。その過程で、植物のみならず、生物全体におけるピロリン酸(PPi)の代謝の重要性が浮かび上がってきたので、近年はこれに注目してきた。その結果、種子発芽直後の段階では、液胞の酸性化よりも PPi の除去が重要であることを証明できた (Ferjani et al., 2011)。

## 2. 研究の目的

植物の初期生育に関して研究代表者は近年、種子発芽時に過剰蓄積する PPi の速やかな分解が、種子の貯蔵脂質をもとにした糖の新生、ひいてはそれを必要条件とした柵状組織の細胞増殖能保持に必須であることを証明した(Ferjani et al., 2011)。さらに、PPi 分解酵素活性を消失した *fugu5* について、糖の新生が特異的に阻害されるメカニズムをメタボローム解析により明らかにしてきた。また、PPi が植物体のどの細胞でも生産されることに注目して *fugu5* の子葉の表皮を観察したところ、表皮細胞の単純化や気孔数の増加が起きていることを見いだした。本研究では PPi の過剰蓄積で起こされる様々な発達異常の分子メカニズムを器官の発生段階、及び組織毎に解析し、植物の代謝と発生制御における  $H^+$ -PPase の役割を多角的に解明することが目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究の目的を達成するために、葉の表皮、柵状組織、孔辺細胞及び発生ステージ特異的に発現するプロモーター（以下、*pro*）を用いて PPi 分解能を導入することで、PPi 蓄積の影響を時空間的に検証した。また、細胞数・細胞サイズの定量化及び走査型電子顕微鏡 (SEM) による表皮細胞の観察及び解析（気孔の分布や数、表皮細胞の複雑さ等の定量化）を行った。

(2) *in vitro* の実験系を用いて、PPi の投与が直接的に微小管の重合・脱重合に与える影響を調べた。さらに、黄化芽生えを用いて CE-TOF MS によるメタボローム解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 表皮組織及び柵状組織における PPi 蓄積の影響の解析： $H^+$ -PPase の機能を喪失した *fugu5* では、細胞質内の PPi の過剰な蓄積によって糖新生が阻害され、子葉の柵状組織において補償作用が引き起こされる。一方で、*fugu5* の表皮細胞は、野生型と比較してジグソーパズル状の形態の単純化や気孔のパターニング異常が見られた。これらの発生異常は *fugu5* 背景で PPi の分解機能のみをもつ IPP1（出芽酵母の細胞質局在型 PPi 分解酵素）の導入株 (*AVP1<sub>pro</sub>::IPP1*) で完全に回復した。興味深いことに、ショ糖の添加は *fugu5* の子葉の形状

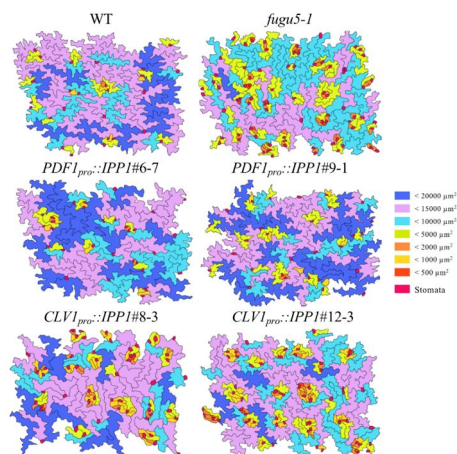


図1 表皮細胞の形状や気孔の分布がPPiの分解によって回復する。表皮細胞をサイズごとに色分けし、赤は気孔を示す。

異常や補償作用を回復させるが、表皮細胞の形状を回復させなかった。そこで、表皮 ( $PDF1_{pro}::IPP1$ ) 及び柵状組織 ( $CLV1_{pro}::IPP1$ ) それぞれに特異的な PPi 分解能を導入した系統を作製した。解析の結果、表皮組織において PPi 分解能を相補した場合にのみ表皮細胞の表現型が回復した (図 1)。また、柵状組織において PPi 分解能を相補した場合にのみ補償作用が誘導されなかった。以上から、葉の形態形成において PPi の過剰な蓄積が引き起こす全ての発生異常は細胞自律的な性質を持つことが強く示唆された。

(2) *fugu5* の初期成長における一時的な PPi 除去能付加がもたらす影響の検証: *fugu5* では、発芽時に種子の貯蔵脂質をスクロースに転換する一連の代謝反応において、副産物である PPi を除去できないことによる初期成長の障害が見られる (Ferjani et al., 2011)。*fugu5* では補償作用は特に子葉で顕著であり、第一葉では緩和されることから、PPi を速やかに除去することは成長初期に特に重要であると考えられる。そこで、初期発生時でのみ発現する  $ICL_{pro}::IPP1$  を *fugu5* に導入し、初期成長阻害及びその後の発生異常が、それによってどこまで緩和されるのかを検証することを計画した。その結果、*fugu5*  $ICL_{pro}::IPP1$  系統では、*fugu5* で見られる全ての発生異常 (子葉の形状、補償作用、生育遅延、黄化芽生胚軸身長など) が野生型並みに回復することが分かった。

(3) 孔辺細胞における PPi 分解の役割の解明: *fugu5* では気孔の閉口が遅れることが報告されているが、その原因は分かっていなかった。そこで、気孔の機能異常は PPi の蓄積に起因していると推測し、*fugu5* 背景において孔辺細胞で特異的に発現する  $GC1_{pro}::IPP1$  を導入した。その結果、 $GC1_{pro}::IPP1$  導入系統でも *fugu5* 同様に暗所における胚軸伸長の減少、気孔のパターニング異常が見られたが、気孔の閉口は正常であることを明らかにした (図 2、図 3)。この結果は、正常な気孔機能の発揮には孔辺細胞における PPi の分解が必須であることを示している (Asaoka et al., 2019)。

(4) 表皮細胞における PPi と細胞骨格の相互作用の解析: *fugu5* の表皮細胞の様々な形状やパターニング異常は、PPi の過剰蓄積によって細胞骨格の制御が異常となるためもたらされたのだろうか? この作業仮説を検証すべく、まず、*in vitro* の実験系を用いて、PPi

の投与が直接的に微小管の重合・脱重合に与える影響を調べた。その結果、5 mM 以上の PPi で微小管重合の阻害が見られた。以上のことから、高濃度の PPi は微小管の動態にダイレクトに影響する可能性があることを示唆している。また、 $UBQ_{pro}::EYFP-TUB6$  系統を *fugu5* 背景に導入し、微小管の可視化が可能な植物系統を作成した。ライブイメージングの解析結果から、*fugu5* の表皮細胞では微小管が不安定になっている可能性が示唆された。

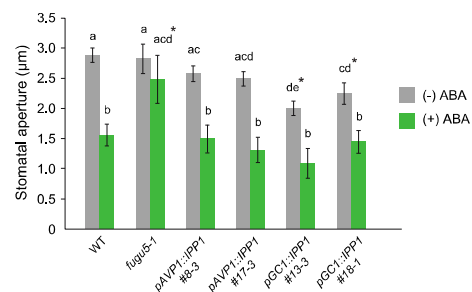


図2 気孔の閉口はPPiの分解によって回復する

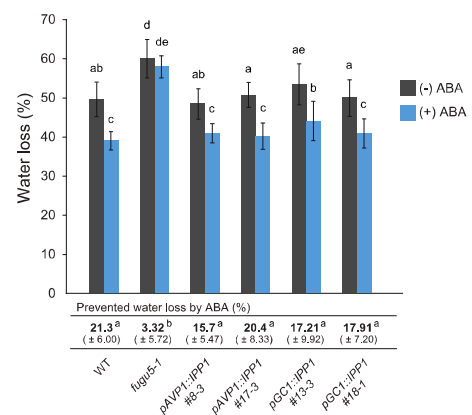


図3 *fugu5* の蒸散量はPPiの分解によって減少する

<引用文献>

Ferjani Ali, Segami Shoji, Horiguchi Gorou, Muto Yukari, Maeshima Masayoshi, Tsukaya Hirokazu, Keep an eye on PPI: the vacuolar-type H<sup>+</sup>-pyrophosphatase regulates postgerminative development in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 8 巻、2011、2895 - 2908

Ferjani Ali, Horiguchi Gorou, Yano Satoshi, Tsukaya Hirokazu, Analysis of leaf development in *fugu* mutants of *Arabidopsis* reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs, *Plant Physiology*, 2 巻、2007、988 - 999

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Asaoka Mariko, Inoue Shin-ichiro, Gunji Shizuka, Kinoshita Toshinori, Maeshima Masayoshi, Tsukaya Hirokazu, Ferjani Ali, Excess pyrophosphate within guard cells delays stomatal closure, *Plant Cell Physiology*, 査読有、60 巻、2019、pp.875 - 887

DOI:10.1093/pcp/pcz002

Yang Yang, Tang Ren-Jie, Mu Baicong, Ferjani Ali, Shi Jisen, Zhang Hongxia, Zhao Fugeng, Lan Wen-Zhi, Luan Sheng, Vacuolar proton pyrophosphatase is required for high magnesium tolerance in *Arabidopsis*, *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有、19 巻、2018、pii: E3617

DOI:10.3390/ijms19113617

Ferjani Ali, Kawade Kensuke, Asaoka Mariko, Oikawa Akira, Okada Takashi, Mochizuki Atsushi, Maeshima Masayoshi, Hirai Yokota Masami, Saito Kazuki, Tsukaya Hirokazu, Pyrophosphate inhibits gluconeogenesis by restricting UDP-glucose formation *in vivo*, *Scientific Reports*, 査読有、8 巻、2018、14696

DOI: 10.1038/s41598-018-32894-1

Graus Dorothea, Konrad Kai R., Bemm Felix, Patir Nebioglu Meliha Görkem, Lorey Christian, Duscha Kerstin, Güthoff Tilman, Herrmann Johannes, Ferjani Ali, Cuin Tracey Ann, Roelfsema M. Rob G., Schumacher Karin, Neuhaus H. Ekkehard, Marten Irene, Hedrich Rainer, V-PPase activity is beneficial under high salt loads, but detrimental without salinity, *New Phytologist*, 査読有、219 巻、2018、pp.1421 - 1432

DOI:10.1111/nph.15280

Segami Shoji, Tomoyama Takaaki, Sakamoto Shingo, Gunji Shizuka, Fukuda Mayu, Kinoshita Satoru, Mitsuda Nobutaka, Ferjani Ali, Maeshima Masayoshi, Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase and cytosolic soluble pyrophosphatases cooperatively regulate pyrophosphate levels in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell*, 査読有、30 巻、2018、pp.1040 - 1061

DOI:10.1105/tpc.17.00911

Hanchi Mohamed, Thibaud Marie-Christine, Légeret Bertrand, Kuwata Keiko, Pochon Nathalie, Beisson Fred, Cao Aiqin, Cuyas Laura, David Pascale, Doerner Peter, Ferjani Ali, Lai Fan, Li-Beisson Yonghua, Mutterer Jérôme, Philibert Michel, Raghothama Kashchandra G., Rivasseau Corinne, Secco David, Whelan James, Nussaume Laurent, Javot Helene, The

phosphate fast-responsive genes *PECP1* and *PPsPase1* affect phosphocholine and phosphoethanolamine content, *Plant Physiology*, 査読有、176 巻、2018、pp.2943 - 2962  
DOI:10.1104/pp.17.01246

Takahashi Kazuki, Morimoto Ryouzuke, Tabeta Hiromitsu, Asaoka Mariko, Ishida Masanori, Maeshima Masayoshi, Tsukaya Hirokazu, Ferjani Ali, Compensated cell enlargement in *fugu5* is specifically triggered by lowered sucrose production from seed-storage lipids, *Plant Cell Physiology*, 査読有、58 巻、2017、pp.668 - 678  
DOI:10.1093/pcp/pcx021

Tanaka Natsuki, Uno Hiroshi, Okuda Shohei, Gunji Shizuka, Ferjani Ali, Aoyama Takashi, Maeshima Masayoshi, SRPP, a cell wall protein is involved in development and protection of seeds and root hairs in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiology*, 査読有、58 巻、2017、pp.760 - 769  
DOI:10.1093/pcp/pcx008

Ferjani Ali, Maeshima Masayoshi, Editorial: Multiple facets of H<sup>+</sup>-pyrophosphatase and related enzymes, *Frontiers in Plant Science*, 査読有、7 巻、2016、1265  
DOI:10.3389/fpls.2016.01265

Wang Xianglan, Wang Hongwei, Liu Shengxue, Ferjani Ali, Li Jiansheng, Yan Jianbing, Yang Xiaohong, Qin Feng, Genetic variation in *ZmVPP1* contributes to drought tolerance in maize seedlings, *Nature Genetics*, 査読有、48 巻、2016、pp.1233 - 1241  
DOI:10.1038/ng.3636

Fukuda Mayu, Segami Shoji, Tomoyama Takaaki, Asaoka Mariko, Nakanishi Yoichi, Gunji Shizuka, Ferjani Ali, Maeshima Masayoshi, Lack of H<sup>+</sup>-pyrophosphatase prompts developmental damage in *Arabidopsis* leaves on ammonia-free culture medium. *Frontiers in Plant Science*, 査読有、7 巻、2016、819  
DOI:10.3389/fpls.2016.00819

Asaoka Mariko, Segami Shoji, Ferjani Ali, Maeshima Masayoshi, Contribution of PPI-hydrolyzing function of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase in vegetative growth of *Arabidopsis*: Evidenced by expression of uncoupling mutated enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 査読有、7 巻、2016、415  
DOI:10.3389/fpls.2016.00415

Katano Mana, Takahashi Kazuki, Hirano Tomonari, Kazama Yusuke, Abe Tomoko, Tsukaya Hirokazu, Ferjani Ali, Suppressor screen and phenotype analyses revealed an emerging role of the Monofunctional peroxisomal enoyl-CoA hydratase 2 in compensated cell enlargement, *Frontiers in Plant Science*, 査読有、7 巻、2016、132  
DOI:10.3389/fpls.2016.00132

[学会発表](計5件・他62件)

Mariko Asaoka, Stomatal closure is delayed by excess pyrophosphate, 60th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists, 2019

Shizuka Gunji, Tissue-targeted PPI hydrolysis in *fugu5* mutant background revealed

that excess PPI triggers developmental defects cell-autonomously, The 82nd Annual Meeting of the Botanical Society of Japan, 2018

多部田弘光、*fugu5*における補償作用の細胞肥大は IBA 由来の IAA によって引き起こされる、日本植物形態学会第 30 回総会・大会、2018

浅岡真理子、気孔の閉口は孔辺細胞におけるピロリン酸の蓄積により阻害される、日本植物形態学会第 30 回総会・大会、2018

郡司玄、ピロリン酸の過剰な蓄積が引き起こす全ての発生異常は細胞自律的な性質を持つ、日本植物形態学会第 30 回総会・大会、2018

〔その他〕

ホームページ等

東京学芸大学自然科学系教員紹介

<http://univinfo.u-gakugei.ac.jp/u-gakugei/hp/ferjani1.html>

研究室ホームページ (Ferjani Ali Lab.)

<http://ferjani-ali.jp>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

部局名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：郡司 玄

ローマ字氏名：(GUNJI, shizuka)

研究協力者氏名：浅岡 真理子

ローマ字氏名：(ASAOKA, mariko)