

令和 2 年 4 月 1 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07392

研究課題名(和文) シロイヌナズナのリン脂質生合成変異株の低温生育阻害に関する生理生化学的研究

研究課題名(英文) pect1-4 shows growth retardation at low temperature due to downregulation of COP respiration

研究代表者

西田 生郎 (NISHIDA, IKUO)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：40189288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リン脂質ホスファチジルエタノールアミン(PE)は植物のミトコンドリアやペルオキシソームの膜を構成するリン脂質で、その生合成の低下は、ミトコンドリアやペルオキシソームのはたらきに大きく影響すると予想される。実際、PE生合成活性が野生型の1/4に低下したpect1-4変異株では、短日条件や低温での成長が著しく阻害される。また、花成時期が早まる。本研究では、pect1-4変異株の示す多面的変異表現型の発現が、呼吸活性低下によるストレス経路と、呼吸活性に依存しない非ストレス経路によって支配されることをあきらかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホスファチジルエタノールアミン(PE)はミトコンドリアなどの細胞内小器官の膜を構成するリン脂質であるが、その生合成を完全に阻害すると、細胞が生存できず、さらなる研究を阻んでいた。われわれは、PE生合成活性が野生型の1/4まで低下したpect1-4変異株を用いることにより、ミトコンドリアの機能低下によってもたらされる変異は、呼吸に依存したストレス経路と、呼吸に依存しない非ストレス経路によって引き起こされることをあきらかにした。

研究成果の概要(英文)：The pect1-4 mutant that exhibits a 26% residual activity of CDP-ethanolamine biosynthesis shows pleiotropic mutant phenotypes, such as growth retardation at low temperature or short-day conditions and early flowering. In this study, we demonstrated that pect1-4 mutation causes downregulation of COP respiratory capacity, which in turn causes the growth retardation at low temperature or short-day conditions. Overexpression of constitutively active AOX1a\* in pect1-4 mutants fully resumed the COP respiratory capacity and recovered from the growth retardation. On the other hand, pect1-4 AOX1a\* plants partially recovered from the early flowering phenotype. Taken together, our results suggested that the pect1-4 mutant exhibits the pleiotropic mutant phenotypes via a respiratory capacity-dependent stress pathway and a non-stress pathway.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：呼吸活性 低温成長 リン脂質生合成の意義

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 研究の学術的背景

リン脂質は生命の基本単位である生体膜を構成する構造分子であるが、膜タンパク質との相互作用を介して種々の生理活性に影響を与えると考えられる。しかし、このような脂質-タンパク質の相互作用を介する生理学的アウトプットを生化学的解析のみから探求するには限界がある。そこで、応募者の研究室では、種々のリン脂質生合成変異株を単離し、変異株のユニークな変異表現型の原因を探求するという独創的な研究手法で数々の成果を上げている。

CDP-エタノールアミン合成酵素(PECT)は、リン脂質ホスファチジルエタノールアミン(PE)生合成の律速酵素である。シロイヌナズナでは、*PECT1* 遺伝子が PECT をコードし、その完全破壊は致死的であるが、部分的(野生型の1/4)に活性を残存する *pect1-4* 株は、種々の生理的な異常を呈しながらも生殖可能なので、PEの生理的役割を解明する上でたいへん重要な変異株である(Mizoi et al. 2006, Plant Cell 18: 3370-3385)。*pect1-4* の特に重要な変異表現型は、8 での著しい生育阻害(実生のみ)、花粉成熟の部分的遅延(Mizoi et al. 2006, Plant Cell 18: 3370-3385)、早期老化、および早期花成である(Nishida et al. 2012, ISPL2012, Hoshino et al. 2017, JSPP2017)。

われわれは、すでに、*pect1-4* 株では、ミトコンドリア膜の PE が減少し、ホスファチジルコリン(PC)が増加すること、ロゼット葉のシトクロムオキシダーゼ経路(COP)の呼吸活性が低下し、シトクロムオキシダーゼ(COX)活性が部分的に阻害されることを見いだした(Otsuru et al. 2013, Plant Cell Physiol. 54: 1612-1619)。しかし、*pect1-4* の低温生育阻害の原因や、リン脂質組成変化に対する呼吸鎖タンパク質組成への影響は、十分に解明されていない。

植物のミトコンドリア呼吸では、シアン感受性の COP 活性が細胞のエネルギー(ATP)生産に直結して成長を調節するのに対し、シアン耐性(SHAM感受性)のオルタナティブオキシダーゼ経路(AOP)の呼吸活性は種々のストレス条件下で細胞内代謝の停滞によってもたらされる細胞および呼吸鎖の過還元状態を解消し、活性酸素種(ROS)の過剰発生による障害を回避すると考えられている。シロイヌナズナには、4つのオルタナティブオキシダーゼ(AOX)遺伝子が(AOX1a, AOX1b, AOX1c, AOX2)存在するが、このうち AOX1a が5日間の低温処理で発現上昇し、低温での呼吸鎖の過還元状態の回避に関与すると考えられている(Watanabe et al. 2008, Plant Cell Environ 31: 1190-1202)。そこで、COP活性の低下した *pect1-4* を低温(8 )で生育させると、ミトコンドリア呼吸鎖は野生型に比べて著しい過還元状態になると考えられるが、*pect1-4* では AOP 活性の調節が十分でないため生育阻害を示すのではないかと考えた。また、膜脂質組成の変化は葉緑体膜タンパク質複合体の高次複合体形成に影響することから、*pect1-4* においても、呼吸鎖タンパク質複合体の高次複合体形成に対する影響を評価する必要があった。

### 2. 研究の目的

リン脂質生合成変異株 *pect1-4* は、野生型よりミトコンドリアのシトクロムオキシダーゼ(COX)経路(COP)活性が低下し、低温(8 )で著しい生育阻害を示す。これら変異表現型とリン脂質との関係をあきらかにし、リン脂質の生理機能に関する理解を深めることを目的とする。COP活性低下は、低温での呼吸電子伝達鎖(以下、呼吸鎖)を過還元状態とし、活性酸素種(ROS)の過剰発生による障害を誘発する可能性がある。そこで、(1)オルタナティブオキシダーゼ(AOX)の変異株 *aox1a*、二重変異株 *pect1-4 aox1a*、および恒常的活性型 *AOX1a* 過剰発現 *pect1-4* 株(*pect1-4 AOX1a<sup>OX</sup>*)を作出し、*pect1-4* 株の低温生育における AOP 活性調節の役割を検証する。また、(2)リン脂質組成の変化は呼吸鎖タンパク質複合体の高次構造に影響する可能性があるため、野生型と *pect1-4* のミトコンドリア膜タンパク質を Blue-Native PAGE 法で比較解析し、この考えを検証する。

### 3. 研究の方法

COP活性の低下した *pect1-4* 株では、低温でその呼吸鎖が過還元状態となり、活性酸素種(ROS)の過剰発生による障害を誘発する可能性がある。そこで、(1) *aox1a*、*pect1-4 aox1a*、および *pect1-4 AOX1a<sup>OX</sup>* の低温生育阻害の程度を短日条件で比較した。また、切断ロゼット葉の呼吸活性を酸素電極で測定し、*pect1-4* 変異株の低温生育阻害における AOP 活性調節の役割を検証した。また、(2)リン脂質組成の変化はタンパク質複合体の高次構造に影響する可能性があるため、野生型と *pect1-4* ミトコンドリアの膜タンパク質を Blue-Native PAGE 法で比較解析し、*pect1-4* 変異の呼吸鎖タンパク質複合体の高次構造形成に対する影響を評価した。(3)ストレスおよび呼吸関連遺伝子の発現を RT-PCR 法で調べた。

### 4. 研究成果

- (1) 野生型、*aox1a*、*pect1-4*、および *pect1-4 aox1a* を 23 、短日条件で 2、3、4、5 週間生育させ、さらに、8 で 30 日間生育させ、成長を比較した。*pect1-4* 変異株は、3 週間目で葉が淡緑色化し、その徴候は 4 週間目で顕著となり、5 週間目ではが早期老化(黄化)の徴候が見られた。野生型、*aox1a*、および *pect1-4 aox1a* では、成長に顕著な違いがなかった。8 でさらに 30 日間生育させたところ、2 週間目で低温処理した

*pect1-4*では、約 25% (n=8)が枯死し、残りは早期老化の徴候を示した。一方、3週間以上生育させた *pect1-4* 個体では、枯死するものは無かったが、いずれも早期老化の徴候を示した。2週間目で低温処理した *pect1-4 aox1a* では、38% (n=8)の個体が生育不全を示し、3週間目で低温処理した個体では早期老化の徴候はあったが、*pect1-4* に比べて生育が改善しているように見えた。一連の実験で、*pect1-4* では、低温処理前の生育不全が低温後の生育不全を増幅している可能性が考えられた。低温処理した *pect1-4 aox1a* は、野生型や *aox1a* に比べて葉の黄緑色化が目立ち、ロゼットサイズがやや小さかった。

注) 常温の成長で *pect1-4* 変異株が緑黄化する表現型は、研究協力者がかわった H30 年以降、再現できなかった。また、*pect1-4* と *pect1-4 aox1a* の低温での生育表現型は、後者で低温によるアントシアンの蓄積がより顕著に見られた。*aox1a* 株は強光と低温ストレスが同時に加わるとアントシアンの蓄積が顕著になることが報告されている。*pect1-4 aox1a* の COP 活性は *pect1-4* に比べ回復していたが、低温と *pect1-4* ストレスの相乗効果が *pect1-4 aox1a* のアントシアン蓄積をより顕著にしたと考えられる。

- (2) 短日条件 (8L/16D)、湿度 40%の生育環境で、5週間培養した植物を低温 (8 )に移し、さらに 30日間培養を行うと、*pect1-4* では WT に比べて個体が矮小化するなどの表現型がみられたが、*pect1-4 aox1a-1* ではそのような表現型が大幅に改善していた。一方、5週目の *pect1-4* では WT に比べて COP 活性の有意な低下が確認できたが、*pect1-4 aox1a-1* 変異株では WT レベルに回復していた。*pect1-4 aox1a-1* 二重変異株では、野生型や *pect1-4* 株に比べて、ミトコンドリア内膜の外向き NAD(P)H デヒドロゲナーゼ NDB2 の転写産物レベルが有意に上昇していた。したがって、*pect1-4 aox1a-1* では NDB2 が発現上昇することにより、COP 経路の電子伝達を改善し、ATP 生産を確保することにより低温生育に改善をもたらしたと考えられる。
- (3) *pect1-4 aox1a* の低分離比の原因  
*pect1-4 aox1a/AOX1a* 植物の自家受粉種子から、*pect1-4 aox1a* を分離したが、その分離比が理論値 (1/4) よりも著しく低かった。しかし、*pect1-4 aox1a* 個体からは、より高い頻度で *pect1-4 aox1a* 種子が回収できた。*pect1-4* 変異は野生型に比べて COP 活性が 40%低下するが、*pect1-4 aox1a* 二重変異株では、その COP 活性は野生型レベルに回復していた。したがって、*pect1-4 aox1a/AOX1a* 植物からの *pect1-4 aox1a* 二重変異株の低分離比の原因は、親植物体 *pect1-4* の COP 活性低下による sporophytic な阻害効果かもしれない。今後、*pect1-4/PECT1 aox1a* 個体からの分離比の検討およびレシブローカルクロスによる *pect1-4 aox1a* 変異の伝搬状況について調べる必要がある。
- (4) 恒常的活性型 AOX1a<sup>+</sup>発現を過剰発現する *pect1-4 AOX1a<sup>+</sup>OX* 植物を作成した。短日条件における *pect1-4 AOX1a<sup>+</sup>OX* 植物の成長は野生型と遜色なく、その COP 活性も野生型と同程度まで回復した。一方、AOP 活性は大きく上昇しており、AOX1a<sup>+</sup>の過剰発現が植物体内で有効に機能していることを確認した。今のところ、AOX1a<sup>+</sup>の過剰発現により、なぜ *pect1-4* の COP 活性が回復したかは不明であるが、今後、NDB2 の発現レベルの上昇を検討する予定である。以上の結果は、*pect1-4* 株では、COP 活性の低下により生育阻害が引き起こされているが、COP 活性の回復および / あるいは AOX1a<sup>+</sup>の過剰発現によるストレス回避が、*pect1-4 AOX1a<sup>+</sup>OX* 植物の生育を回復させたと考えている。
- (5) *pect1-4* ミトコンドリアの BlueNative PAGE を行い、呼吸鎖複合体タンパク質の割合を調べたが、おおむね野生型の組成と変化はなかったが、複合体 III ダイマー (III<sub>2</sub>) に対する III<sub>2</sub>- 複合体の割合が *pect1-4* で若干低下している傾向が見られた。
- (6) *pect1-4* 変異株のロゼット全体の呼吸活性の低下は、成熟葉と若い葉で較べると、若い葉で大きく低下していることもあきらかにした。
- (7) *pect1-4* 植物におけるミトコンドリア活性の低下をさらに検証するために、光呼吸活性の低下を予想し、緑葉のメタボローム解析を実施したところ、光呼吸経路の代謝物の低下を確認

した。

- (8) *pect1-4 AOX1a<sup>OX</sup>* 植物では、呼吸活性が回復し成長が回復したが、*pect1-4* の早期花成表現型を部分的に解消した。したがって、*pect1-4* 変異株における多様な表現型の発現には、呼吸活性の低下によるストレス応答経路と、呼吸活性に依存しない非ストレス応答経路が関与することを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Negi, J., Munemasa, S., Song, B., Tadakuma, R., Fujita, M., Azoulay-Shemer, T., Engineer, C. B., Kusumi, K., Nishida, I., Schroeder, J. I. and Iba, K.	4. 巻 115
2. 論文標題 Eukaryotic lipid metabolic pathway is essential for functional chloroplasts and CO <sub>2</sub> and light responses in Arabidopsis guard cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 9038-9043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1073/pnas.1810458115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐藤有季、星野奈摘、生貝咲貴、藤木友紀、西田生郎
2. 発表標題 シロイヌナズナpect1-4変異株における早期花成とヒストン修飾に関する研究
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikuo Nishida, Kazuki Haneishi, Ai Inanobe, Aimi Sato, Asuka Kato, Youngsook Lee, Yuki Fujiki
2. 発表標題 シロイヌナズナ種子貯蔵タンパク質変異株における種子特異的BnDGAT1発現の影響
3. 学会等名 第31回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤木友紀、岡部茉莉子、Youngsook Lee、西田生郎
2. 発表標題 シロイヌナズナのPI3P結合タンパク質AtFYVE2のオートファジーと老化葉における役割
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiaki Kuga, Yuki Sato, Miki Yatake and Ikuo Nishida
2. 発表標題 The CDP-choline Pathway to Phosphatidylcholine Biosynthesis is Required for the Maintenance of Endoplasmic Reticulum at Low Temperature
3. 学会等名 The 23rd International Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Fujiki, Kazuki Haneishi, Aimi Sato, Asuka Kato, Youngsook Lee, Ikuo Nishida
2. 発表標題 Genetic Disruption of CRC 12S Globulin and Overexpression of BnDGAT1 Synergistically Improve the Seed Oil Content in Arabidopsis
3. 学会等名 The 23rd International Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水琢登 矢竹美樹 野口航 西田生郎
2. 発表標題 pect1-4のCOP活性低下はpect1-4 aox1a-1では解消する
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takuto Shimizu, Ko Noguchi, Ikuo Nishida
2. 発表標題 pect1-4 aox1a-1 Double Mutants Grow Better Than pect1-4 Single Mutants at Low Temperature
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Natsumi Hoshino, Saki Ikegai, Mayu Nakagawa, Yuki Fujiki, Ikuo Nishida
2. 発表標題 A mechanism of early flowering in Arabidopsis thaliana pect1-4 mutants
3. 学会等名 Japanese Society of Plant Physiologists Annual Meeting
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	清水 琢登  (Shimizu Takuto)		
研究協力者	佐藤 有季  (Sato Yuki)		
研究協力者	中沢 和音  (Nakazawa Kazuo)		
連携研究者	藤木 友紀  (Fujiki Yuki)  (00414011)	埼玉大学・大学院理工学研究科・助教   (12401)	H30年度まで