

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07467

研究課題名(和文)植物細胞内における余剰リピッドボディの消失調節機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of regulation of the disappearance of excess lipid body in plant cells.

研究代表者

林 八寿子 (HAYASHI, YASUKO)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：20228597

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)：植物の子葉細胞内では、ペルオキシソームがリピッドボディと接触し、発芽後に必要なエネルギーが産出される。しかし、培地にショ糖が存在するとこの接触は減少し、貯蔵脂肪は減少しない。また、この時、小胞体がりピッドボディを取り囲むことで、ペルオキシソームの代謝速度を調節している可能性が示された。また、子葉の緑化により不要となった余剰貯蔵脂肪は、ペルオキシソームの代謝だけでなく、それ以外の消失機構によっても減少することが示唆された。また、窒素飢餓で緑藻細胞内に蓄積したリピッドボディは、ペルオキシソームの代謝系ではなく、オートファジーなどが関与する機構によって分解されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発芽後生育場所を変更できない植物にとっては、発芽後、光合成能を獲得するまでの生き残り戦略を有することは重要である。発芽しても光が得られず緑化が進行しない場合は、エネルギー源の消費速度を抑え、生存期間をできるだけ引き伸ばすことが必要であり、順調に光合成能が獲得された場合は、貯蔵脂肪を不用物として速やかに分解する機構の存在が必要である。本研究は、子葉細胞内において、これまでに知られていないリピッドボディの消失調節機構が存在する可能性を示した。本研究の結果は、将来的に地球の環境が大きく変化しても生き残ることができる植物の作出などにヒントを提供する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the cotyledonary cells of Arabidopsis, peroxisomes come into contact with lipid bodies and produce the necessary energy after germination. However, the presence of sucrose in the medium reduces this contact and does not reduce storage lipids. At this time, it was suggested that the endoplasmic reticulum may regulate the metabolic rate of peroxisomes by surrounding the lipid body. It was also shown that the excess storage lipids that became unnecessary due to the greening of cotyledons is reduced not only by the metabolism of peroxisomes but also by other disappearance mechanisms. In addition, it was shown that the lipid bodies accumulated in unicellular green algae cells of Chlamydomonas due to nitrogen deficiency may be degraded by a mechanism such as autophagy rather than the peroxisome metabolism system.

研究分野：超微形態機能学・細胞生物学

キーワード：リピッドボディ シロイヌナズナ マイクロボディ ER 子葉 クラミドモナス オートファジー 貯蔵脂肪

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪性種子植物では種の登熟期に脂肪が蓄積し、発芽後、ペルオキシソームの関与する代謝系によって、貯蔵脂肪から初期成長に必要なエネルギーが生産されることがわかっている (Hayashi et al., 2000 など)。しかし、暗所生育でも培地にショ糖が存在するとペルオキシソームは LB (リピッドボディ) と接触しなくなることや、その接触のために必要なペルオキシソーム膜上の候補因子を我々は報告している (Cui et al., 2016)。

また、単細胞緑藻では、栄養素飢餓状態で細胞内に脂肪が蓄積し、飢餓を解除すると速やかに蓄積した脂質が消失することが明らかとなっている (Preininger et al., 2015 など)。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物細胞内での貯蔵脂肪の消失調節機構を明らかにすることを目的とする。シロイヌナズナを用いた研究では、発芽しても光が十分に得られない場合の貯蔵脂肪の代謝速度調節機構や、発芽後速やかに子葉の緑化が起こった場合に余剰となるとと思われる貯蔵脂肪の消失機構について解析する。また、単細胞緑藻を用いた研究では、ストレス下で蓄積した脂肪がストレス解除によってエネルギー源として利用されるのか、あるいは単に不用物として分解されるのかを調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) 子葉細胞内でのリピッドボディの消失調節機構の解析

*Arabidopsis thaliana* を材料として用いた。小胞体を可視化した野生株 (*GFP-h*)、ペルオキシソームを可視化した野生株 (*GFP-pts1*)、グリオキシル酸回路欠損株 (*icl*)、オートファジー変異株 (*atg2, atg5*) について、光照射後の LB とさまざまなオルガネラとの相互関係をレーザー顕微鏡で解析した。また、HPM-100 (Leica) を用いた高圧凍結及び凍結置換法で作成した試料を用いて、細胞内微細構造の電子顕微鏡解析や免疫電子顕微鏡解析も行った。それ以外にペルオキシソーム酵素 (THIO, ICL, HPR) の抗体を用いたウエスタンブロットングによるタンパク質発現解析や、ラボアッセイトリグリセライド (Wako) を用いたトリアシルグリセロール (TAG) 含量の測定も行った。

### (2) 緑藻細胞内におけるリピッドボディの消失機構

*Chlamydomonas reinhardtii* を材料として使用した。窒素飢餓培地で形成される貯蔵脂肪の形成過程や窒素飢餓解除後の細胞内オルガネラの挙動をレーザー顕微鏡 (TCS-SP8, Leica) や HPM-100 (Leica) を用いた高圧凍結及び凍結置換法で作成した試料を用いて、細胞内の微細構造の電子顕微鏡解析や免疫電子顕微鏡解析も行った。

## 4. 研究成果

### (1) 子葉細胞内での LB の消失調節機構の解析

#### ①野生株における子葉細胞内での LB を取り巻く膜構造の解析

発芽後暗所 3 日目の細胞内において、LB が 2 枚の膜構造に取り込まれているものが多数観察されることを報告した (Hayashi et al., 2018)。それらには、全周を取り囲むものや一部を取り囲んでいるものが混在していた。この膜構造は、小胞体の可能性、オートファジーの可能性及び、それ以外の新規構造体である可能性があった。そこで、抗原価の保存に適しているとされる高圧凍結及び凍結置換法を用いて小胞体に緑色蛍光タンパク質が蓄積している野生株 (*GFP-h*) の子葉細胞試料の細胞内構造を観察し、オートファジ関連因子 (*ATG2*) と緑色蛍光タンパク質 (*GFP*) の抗体を用いて免疫電子顕微鏡解析を行った。その結果、小胞体であることが示唆された。

#### ②野生株における子葉細胞内での LB の挙動とオルガネラとの相互関係

発芽後の暗所生育条件下では子葉細胞内のペルオキシソームは LB と接触し、貯蔵脂肪の代謝を行っていること、光照射によって光合成を始めた細胞内では、ペルオキシソームは LB とは接触しなくなり、光呼吸の役割をするために葉緑体と接触すること、この時に見られるオルガネラの接触には接触を保つための因子が膜上に存在していることなど、これまでの我々の研究結果とこれからの課題をまとめた総説を発表した (Oikawa et al., 2019)。その後、①の結果を受けて、*GFP-h* 株をナイルレッドで染色し、レーザー顕微鏡で観察した結果、LB を取り巻く膜構造が確かに小胞体であることが裏付けられた。そこで、ショ糖添加培地と非添加培地における LB の消失程度を比較した。その結果、暗所生育ではショ糖添加培地の方が LB の残存量が多いことが明瞭であり、残存量の少ないショ糖非添加培地の LB の方が小胞体に取り囲まれているもの

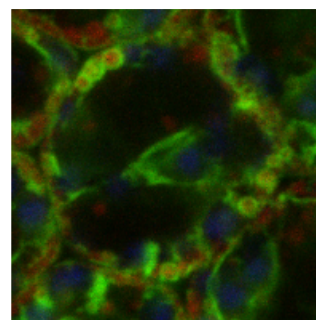


図1 暗所生育3日の子葉細胞  
赤: LB、緑: 小胞体

が多かった。また、光照射を開始すると 12 時間において LB は急激に減少し、小胞体に取り囲まれた LB はほとんど存在していないことがわかった。

### ③野生株における光照射後のペルオキシソーム酵素の発現解析

これまでも子葉の緑化におけるペルオキシソーム酵素の発現量の変化は報告されている (Hayashi et al., 2000)。しかし、光照射直後から葉緑体が光合成を始めるまでの期間についての詳細な解析はなされていなかったことから、暗所生育 3 日目の子葉に光を照射し、12 時間ごと脂肪酸  $\beta$ -酸化系酵素 (THIO) とグリオキシル酸回路酵素 (ICL)、緑葉ペルオキシソーム酵素 (HPR) の発現をウエスタンブロットィングで解析した。その結果、脂肪酸  $\beta$ -酸化系酵素と緑葉ペルオキシソーム酵素 (HPR) は光照射開始後迅速に発現量が増加するが、グリオキシル酸回路の酵素は、光照射開始後 12 時間では、発現量が低下しないことが示された。

### ④LB 代謝異常変異株の解析

LB 可視化野生株から EMS 処理によって、暗所生育 3 日目においても子葉細胞内の LB がほとんど減少しない株を選別した。連鎖マーカー解析の結果、原因遺伝子の候補が 2 か所に絞られた。そこで、それぞれの遺伝子のノックアウト株を取り寄せその表現型を調べたところ、原因遺伝子はグリオキシル酸回路中の酵素 ICL をコードする At3g21720 遺伝子であることが分かった (未発表データ)。そこで次に、グリオキシル酸回路が欠損した場合、培地へのショ糖添加の有無により LB の残存量に差が生じるかどうか、レーザー顕微鏡解析、及び電子顕微鏡解析により調べた。レーザー顕微鏡解析では、ショ糖添加培地では、野生株と変異株に有意な差は見られないが、ショ糖非添加培地の変異株では、減少量が極めて少なく、LB が多く残っていることを確認した。そこで、電子顕微鏡像について統計解析をおこなった。細胞の大きさは野生株と有意な差はなかった。LB の密度については、ショ糖添加培地では野生株と差はなかったが、非添加培地では野生株よりも多く有意な差があった。LB の大きさについては、ショ糖非添加培地について有意に大きいことがわかった。

### ⑤野生株及び変異株における貯蔵脂肪の消失速度解析

グリオキシル酸回路の欠損やオートファジー関連因子の欠損株において、LB の消失速度が野生株と異なるかどうか調べた。暗所生育 3 日目の野生株の子葉細胞では、ショ糖添加培地において非添加培地よりも TAG の残存量が多いことが数値的にも裏付けられた。また、グリオキシル酸回路欠損株 (*icl*) においては、野生株よりも 2 倍程度、TAG の残存量が多いことも数値的に裏付けられた。また、オートファジー関連因子欠損 (*atg2,atg5*) においては、予想していたよりももともと種に含まれる TAG 量が少なく、野生株の半分程度しか含まれていないことが明らかになった。光照射開始後 12 時間における TAG の減少量を比較したところ、ショ糖非添加培地では、野生株と欠損株においてほとんど差は見られなかったが、ショ糖添加培地では野生株において、急激な TAG 量の減少が見られた。

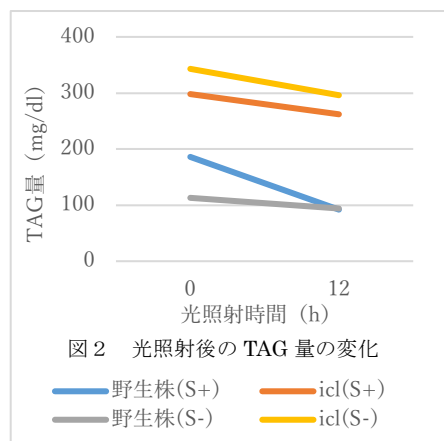


図2 光照射後の TAG 量の変化

— 野生株(S+)      — *icl*(S+)  
— 野生株(S-)      — *icl*(S-)

### ◎まとめ

本研究では、まず、野生株の子葉細胞内における LB の挙動を正確に把握することを目的とした。野生株の形態学的解析結果 (①、②) からは、暗所生育時の子葉細胞内において、培地にショ糖が存在すると LB の消失速度は減少すること、細胞内の LB は小胞体に囲まれており、光照射開始直後は小胞体に包まれた LB が存在するが、光照射によって小胞体に包まれた LB は見られなくなり、LB の大きさも数も減少することが明瞭に示された。これらの結果は、小胞体に取り囲まれることによって LB とペルオキシソームとの接着 (すなわち代謝) が調節されている可能性を示唆する。また、光照射直後のペルオキシソーム酵素の発現量解析 (③) からは、光照射が開始されると脂肪酸  $\beta$ -酸化系酵素 (THIO) と緑葉ペルオキシソーム酵素 (HPR) は迅速に発現量が低下するが、グリオキシル酸回路酵素 (ICL) の減少は 12 時間後でも見られなかったことが明らかとなった。このことは、ペルオキシソームへの脂肪の取り込みは速やかに停止するが、中間産物の代謝はしばらくの間行われている可能性を示唆する。

グリオキシル酸回路欠損株 (*icl*) の形態学的解析 (④) と子葉細胞内の TAG 量の解析 (⑤) からは、暗所生育ではショ糖添加培地においてグリオキシル酸回路欠損株 (*icl*) では LB がほとんど減少しないが、光を照射するとショ糖添加培地でも非添加培地でもほぼ同じような割合で TAG 量が減少したため、光照射した細胞内では、グリオキシソームの代謝によらない LB の消失機構が存在する可能性が示唆された。しかし、これらの考えを裏付けるためのデータはまだ出揃っていない。

## (2) 緑藻細胞内における LB の消失機構

### ①窒素飢餓培養下での LB 形成過程の解析

窒素源を取り除いた TAP 培地で培養するとクラミドモナス細胞内に 2 日目から脂質が蓄積することが確認できた。そこで、窒素飢餓 2~3 日目に形成される LB の膜に注目して電子顕微鏡解析をおこなった。その結果、LB の膜が単膜ではなく脂質 2 重層となっていることを示唆する

像がいくつか観察された。また、LB の膜に向かって、多数の小胞が供給されているように見える像も多く観察された。そこで、窒素飢餓3日目の細胞において、細胞内のリピッドを Lipi-Blue で、オートリソソームを DALGreen で二重染色し、レーザー顕微鏡で観察した結果、共染色されるリピッドボディがいくつか存在することが明らかとなった。しかし、オートファジ関連因子 ATG9 の抗体を用いて免疫電子顕微鏡解析を行った結果、LB の膜にポジティブな反応は得られなかった。

#### ②窒素飢餓解除後のリピッドボディ消失過程の解析

窒素飢餓3日目の細胞を窒素源を含む TAP 培地に移し替えると24時間後にはLBが消失することが確認された。そこで、6時間から12時間までの細胞内微細構造を電子顕微鏡解析した。その結果、ペルオキシソームとLBの間には相互関係は見られず、LBだと考えられる電子密度の高い領域にリソソームと思われる小胞が多数融合していると考えられる像や、電子密度の低い大きな液胞領域内に電子密度の高いLBの残骸だと思われる領域が取り込まれたと考えられる像が多く観察された。

#### ◎まとめ

窒素飢餓により2日目には細胞内に大きなLBが形成されること、窒素飢餓を解除すると24時間で形成されたリピッドボディは消失することが確認できた。このLB消失過程では、ペルオキシソームとLBの間には相互関係は見られず、LBをエネルギー源として代謝していないこと、LBの消失は、オートリソソームあるいは液胞による分解であると結論づけられる。LBがマイクロオートファジーではなく、マクロオートファジーを受けていることを示唆する像も得られたが、本研究期間中に結論を出すことはできなかった。今後、免疫電子顕微鏡解析に有効な抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析など、更なる詳細な解析が必要である。

#### <引用文献>

- ① Hayashi et al., Functional transformation of plant peroxisomes. *Cell Biochem. Biophys.* 32: 295-304, 2000
- ② Cui, et al., Sucrose production mediated by lipid metabolism suppresses physical interaction of peroxisomes and oil bodies during germination of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, Doi: 10.1074/jbc.M116.748814, 2016
- ③ Preininger et al., Structural and functional changes in the photosynthetic apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii* during nitrogen deprivation and replenishment. *PHOTOSYNTHETICA* DOI: 10.1007/s11099-015-0129-y, 53 (3): 369-377, 2015

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Oikawa Kazusato, Hayashi Makoto, Hayashi Yasuko, Nishimura Mikio	4. 巻 61
2. 論文標題 Re evaluation of physical interaction between plant peroxisomes and other organelles using live cell imaging techniques	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Integrative Plant Biology	6. 最初と最後の頁 836-852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jipb.12805	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Widyaningrum Dwiyantari, Iida Daisuke, Tanabe Yuma, Hayashi Yasuko, Kurniasih Sari Dewi, Ohama Takeshi	4. 巻 55
2. 論文標題 Acutely induced cell mortality in the unicellular green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Chlorophyceae) following exposure to acrylic resin nanoparticles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Phycology	6. 最初と最後の頁 118 ~ 133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jpy.12798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yasuko Hayashi, Chinatsu Takagi and Mikio Nishimura	4. 巻 83
2. 論文標題 Existence of Lipid Bodies Surrounded by Membranes in Early Greening Cotyledonary Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cytologia	6. 最初と最後の頁 1-1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Al-Azab Ayat J.S., Widyaningrum Dwiyantari, Hirakawa Haruna, Hayashi Yashuko, Tanaka Satoshi, Ohama Takeshi	4. 巻 54
2. 論文標題 A resin cyanoacrylate nanoparticle as an acute cell death inducer to broad spectrum of microalgae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 102191 ~ 102191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.algal.2021.102191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Mano Shoji、Hayashi Yasuko、Hikino Kazumi、Otomo Masayoshi、Kanai Masatake、Nishimura Mikio	4. 巻 298
2. 論文標題 Ubiquitin-conjugating activity by PEX4 is required for efficient protein transport to peroxisomes in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102038 ~ 102038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 プラスチック樹脂製ナノ粒子が広範囲の藻に誘導する細胞死メカニズムの解析
2. 発表標題 Dwiyantari Widyaningrum, Ayat Alazab, Yasuko Hayashi, Akito Yamazaki and Takeshi Ohama
3. 学会等名 第13回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayat Alazab, Dwiyantari Widyaningrum, Yasuko Hayashi and Takeshi Ohama
2. 発表標題 Acutely induced burst ROS generation and cell death on board algal species by resin nanoparticle exposure
3. 学会等名 5th International volvox conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋慶介, 中野智美, 田辺友真, Dwiyantari Widyaningrum, 大濱 武, 林八寿子
2. 発表標題 アクリル微粒子の緑藻に及ぼす影響
3. 学会等名 日本植物形態学会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 霜田圭祐, 早乙女真穂, 及川和聡, 真野昌二, 西村幹夫, 林八寿子
2. 発表標題 シロイヌナズナATG2変異体におけるPI3PとATG18aの局在解析
3. 学会等名 日本植物形態学会第29回大会
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
研究分担者	及川 和聡  (Oikawa Kazusato)  (70508457)	京都大学・工学研究科・特定講師    (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------