

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15411

研究課題名（和文）植物固有なスフィンゴ脂質糖鎖の形成機構と生物学的機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the biosynthesis and functions of plant glycosphingolipids

研究代表者

石川 寿樹 (Ishikawa, Toshiki)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：20598247

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、植物に固有なスフィンゴ糖脂質の機能解明を目的として研究を行った。初めに、研究代表者が確立した分析手法によって植物種や組織ごとに多様な糖鎖型の分布を明らかにし、さらにそれらを決定する糖転移酵素遺伝子GMT1とGINT1を同定した。これらの酵素を欠損する変異体の解析から、糖鎖型に特異的な機能の存在が示され、gint1欠損変異体では種子が肥大し貯蔵油脂およびタンパク質の増大が認められた。また、糖脂質クラスに特異的なセラミド疎水骨格の改変により、スフィンゴ糖脂質が植物のアルミニウム耐性に寄与することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スフィンゴ脂質は真核生物に普遍的な存在であるが、その構造は生物ごとに多彩な進化を遂げており、それぞれに特有の機能をもつと考えられる。本研究は植物に固有なスフィンゴ糖脂質の機能の一端を解明し、さらにその構造を遺伝子レベルで人為改変することに世界で初めて成功した。これは、本研究で明らかにした種子生産性や酸性土壌のアルミニウム耐性など、植物の有用機能を向上させる新たな分子育種技術として期待される。

研究成果の概要（英文）：This study addressed the functions of plant-unique glycosphingolipids. Sphingolipidomic and genetic approaches determined plant species- and tissue-dependent variation of oligosaccharide types and the responsible enzymes GMT1 and GINT1. Analyses of the mutants revealed sugar type-specific functions, such as enlarged seed size and accumulated seed lipid and protein contents in gint1 mutant. Genetic modification of the hydrophobic ceramide moieties, showing lipid class-dependent diversity, demonstrated that glycosphingolipids contribute to tolerance to aluminum toxicity in plants.

研究分野：植物脂質生化学

キーワード：スフィンゴ脂質 糖鎖 糖転移酵素 種子栄養 種子サイズ制御 アルミニウム耐性

が HexN 型に特異的な糖転移酵素であることを示した (図 1)。

(3) *gint1* 変異体の種子表現型解析

HexN 型酵素を欠損する *gint1* 変異体を確立し、表現型を解析した。種子特異的な発現パターンと一致し、栄養組織の成長には全く影響が認められなかった。種子の表現型を解析したところ、種子外皮の構造および生理機能には影響がなかったが、種子全体が大きく肥大していることが認められた (図 2)。一粒当たりの重量は野生型より 20-30% 増大しており、内部の貯蔵油脂およびタンパク質含量もそれに比例して増加していた (図 2)。さらに種子発芽性を解析したところ、通常の発芽および幼苗の生育にはまったく変化がなかったものの、アブシシン酸および NaCl 存在下による発芽抑制に対して、顕著な感受性の低下が認められた (図 3)。以上のことから、*gint1* 変異体では種子のアブシシン酸応答に何らかの障害が発生している可能性が考えられた。

図 2

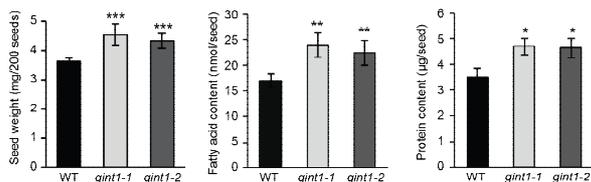
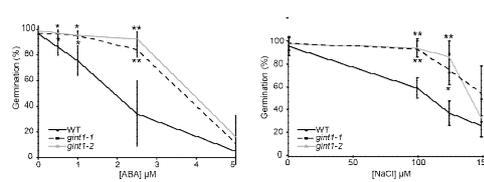


図 3



(4) 異種相補系統を用いた GIPC 糖鎖型の互換性解析

主要な Hex 型糖鎖を欠損する *gmt1* 変異体は、重度の矮性と実生致死の表現型を示す。この変異をヘテロにもつ個体に GINT1 を恒常的に発現させるコンストラクトを導入し、後代において組換え個体の中から *gmt1* ホモ接合体を単離した。その結果、GINT1 の導入により、*gmt1* で蓄積していた GlcA-IPC が減少し、HexN 型 GIPC が産生された個体を複数得た。これらは、*gmt1* 変異体でみられた実生致死の表現型が消失し、また依然として矮性を示すものの、*gmt1* に比べると生育は著しく改善し、わずかながら正常種子を得ることができた。一方、*gint1* 変異体における種子表現型は、GMT1 を種子特異的なプロモーター下に発現させてもまったく回復しなかった。以上の結果から、Hex 型糖鎖と HexN 型糖鎖は完全に相補的ではなく、糖鎖型に特異的な分子機能を有することが示された。

(5) セラミド骨格の改変による植物スフィンゴ糖脂質クラスの機能解析

植物スフィンゴ脂質はアルミニウム耐性と関連が示唆されているが、その決定的証拠は未だない。特に GIPC はアルミニウムイオンが強固に結合するリン酸基をもっており、アルミニウム毒性の分子標的である可能性が考えられる。そこで GlcCer と GIPC ではセラミド骨格の構造が大きく異なることに着目し、それらを特異的に改変することでアルミニウム耐性への寄与度を検証した。イネにシロイヌナズナ由来スフィンゴ脂質 8 不飽和化酵素を (SLD) を導入したところ、GlcCer の 8 シス不飽和結合と、GIPC の 8 飽和構造の両方が、トランス不飽和結合に変化した系統が得られた。また、4 不飽和化酵素遺伝子を CRISPR/Cas9 法により機能破壊し、GlcCer の含量が 40% 程度に減少した系統を得た。これらのイネ系統のアルミニウム耐性を解析したところ、どちらも野生型に比べ有意に耐性が低下していた (図 4)。さらにアルミニウム耐性に重要な細胞膜流動性を計測したところ、SLD 系統では流動性が増加し、CRISPR/Cas9 系統では逆に流動性が低下していた (図 5)。以上の結果から、GIPC の構造改変はアルミニウム耐性を変化させず、その親水部はアルミニウム毒性の分子標的ではないことが考えられた。一方、親水部にアルミニウム結合性を持たない GlcCer がアルミニウム耐性と密接に関係していることが明らかとなり、植物スフィンゴ脂質はアルミニウムイオンとの直接的結合ではなく、細胞膜流動性の維持を介してその耐性に寄与していることが明らかとなった。

図 4

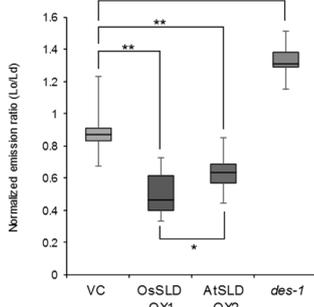
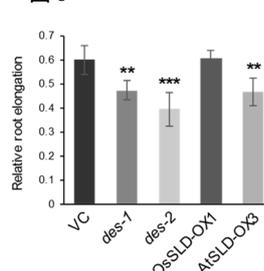


図 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sato M, Nagano M, Jin S, Miyagi A, Yamaguchi M, Kawai-Yamada M, Ishikawa T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Plant-unique cis/trans isomerism of long-chain base unsaturation is selectively required for aluminum tolerance resulting from glucosylceramide-dependent plasma membrane fluidity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants9010019	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 Hasi RM, Miyagi M, Morito K, Ishikawa T, Kawai-Yamada M, Imai H, Fukuta T, Kogure K, Kanemaru K, Hayashi J, Kawakami R, Tanaka T.	4. 巻 166
2. 論文標題 Glycosylinositol phosphoceramide-specific phospholipase D activity catalyzes transphosphatidylation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biolchem.	6. 最初と最後の頁 441-448
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1093/jb/mvz056	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 -
1. 著者名 Ishikawa T, Fang L, Rennie EA, Sechet J, Yan J, Jing B, Moore W, Cahoon EB, Scheller HV, Kawai-Yamada M, Mortimer JC.	4. 巻 177
2. 論文標題 GLUCOSAMINE INOSITOLPHOSPHORYLCERAMIDE TRANSFERASE1 (GINT1) is a GlcNAc-containing glycosylinositol phosphorylceramide glycosyltransferase.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiol.	6. 最初と最後の頁 938-952
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1104/pp.18.00396	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 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 JC.	4. 巻 96
2. 論文標題 Suppressing Arabidopsis GGLT1 affects growth by reducing the L-galactose content and borate cross-linking of rhamnogalacturonan II.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant J.	6. 最初と最後の頁 1036-1050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.14088	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 Imamura T, Obata C, Yoneyama K, Ichikawa M, Ikura A, Mutsuro-Aoki H, Ishikawa T, Kawai-Yamada M, Sasaki T, Kusano H, Shimada H.	4. 巻 93
2. 論文標題 DSH5, a dihydrosphingosine C4 hydroxylase gene family member, shows spatially restricted expression in rice and is lethal when expressed ectopically.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Genet. Syst.	6. 最初と最後の頁 135-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1266/ggs.17-00054	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 Ishikawa T*, Fang L*, Rennie EA, Sechet J, Yan J, Jing B, Moore W, Cahoon EB, Scheller HV, Kawai-Yamada M, Mortimer JC	4. 巻 in press
2. 論文標題 GINT1 is a GIPC GlcNAc glycosyltransferase.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 -
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29件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Toshiki Ishikawa, Maki Kawai-Yamada
2. 発表標題 A seed-specific glycosyl head of sphingolipid is associated with regulation of seed size in Arabidopsis.
3. 学会等名 8th Asian-Oceanian Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaya Sato, Toshiki Ishikawa, Minoru Nagano, Maki Kawai-Yamada
2. 発表標題 8 cis-unsaturated glucosylceramides contribute to aluminum tolerance in rice
3. 学会等名 8th Asian-Oceanian Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川寿樹、川合真紀
2. 発表標題 植物セラミドの固有構造：分子進化からみた生物学的意義と産業利用への展望
3. 学会等名 第12回セラミド研究会学術集
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川寿樹、川合真紀
2. 発表標題 植物の環境適応においてスフィンゴ脂質の分子進化が果たした意義
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤大和、宮城敦子、山口雅利、川合真紀、石川寿樹
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるスフィンゴ脂質糖鎖異常変異体の表現型解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川寿樹、小野田瑞希、川合真紀
2. 発表標題 シロイヌナズナの種子特異的なスフィンゴ糖脂質は種子サイズの制御に關与する
3. 学会等名 日本植物細胞分子生物学会第37回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川洋佑、石川寿樹、宮城敦子、山口雅利、川合真紀
2. 発表標題 コケ植物独自のスフィンゴ脂質構造を形成する長鎖塩基 8不飽和化酵素の機能解析
3. 学会等名 日本植物細胞分子生物学会第37回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤正弥、石川寿樹、長野稔、山口雅利、川合真紀
2. 発表標題 イネのアルミニウム耐性におけるスフィンゴ脂質cis/trans異性体の機能差異
3. 学会等名 日本植物細胞分子生物学会第37回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田祐樹、石川寿樹、宮城敦子、山口雅利、川合真紀
2. 発表標題 植物に特徴的な2つのセラミド不飽和結合の機能解析
3. 学会等名 第32回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川洋佑、石川寿樹、宮城敦子、山口雅利、川合真紀
2. 発表標題 コケ植物に特有なスフィンゴ脂質構造を形成する長鎖塩基 8不飽和化酵素の機能解析
3. 学会等名 第32回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤大和、宮城敦子、山口雅利、川合真紀、石川寿樹
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるスフィンゴ脂質糖鎖異常変異体の機能解析
3. 学会等名 第32回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤正弥、石川寿樹、長野稔、宮城敦子、山口雅利、川合真紀
2. 発表標題 グルコシルセラミドの長鎖塩基 8 cis型不飽和結合はイネのアルミニウム耐性に寄与する
3. 学会等名 第32回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川寿樹、川合真紀
2. 発表標題 スフィンゴ脂質ヘキソサミン型糖鎖はシロイヌナズナの種子サイズ制御に関与する
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshiki Ishikawa, Maki Kawai-Yamada
2. 発表標題 Molecular evolution of unique structures of plant sphingolipids.
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Plant Lipids 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiki Ishikawa, Maki Kawai-Yamada
2. 発表標題 The evolutionary journey of plant-unique long-chain base unsaturation.
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 Hiroyuki Imai, Toshiki Ishikawa, Maki Kawai-Yamada, Makoto Miyagi, Tamotsu Tanaka
2. 発表標題 Identification of phytoceramide 1-phosphate and its producing enzyme in plants.
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 Masaya Sato, Toshiki Ishikawa, Maki Kawai-Yamada
2. 発表標題 Sphingolipid 8 cis/trans unsaturation increases aluminum tolerance in rice.
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 石川寿樹、川合真紀
2. 発表標題 植物におけるスフィンゴ脂質糖鎖構造の多様性形成機構と生物学的意義
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田祐樹、石川寿樹、山口雅利、川合真紀
2. 発表標題 植物に特徴的な2つのセラミド不飽和結合の機能比較
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川洋佑、石川寿樹、山口雅利、川合真紀
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤正弥、石川寿樹、山口雅利、川合真紀
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川寿樹、川合真紀
2. 発表標題 植物固有なスフィンゴ脂質糖鎖構造を形成する糖転移酵素の同定と機能解析
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 石川寿樹、川合真紀
2. 発表標題 植物型スフィンゴ脂質糖鎖の構造多様性と機能
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 石川寿樹、川合真紀
2. 発表標題 植物のスフィンゴ脂質糖鎖型を決定する新奇糖転移酵素
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川寿樹、葛葉修平、小川洋佑、川合真紀
2. 発表標題 植物特有なスフィンゴ脂質不飽和構造の分子進化
3. 学会等名 第35回日本植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石川寿樹、葛葉修平、小川洋佑、川合真紀
2. 発表標題 植物スフィンゴ脂質の分子進化
3. 学会等名 第81回日本植物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石川寿樹、葛葉修平、小川洋輔、川合真紀
2. 発表標題 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選択性逆転とデュアルハイブリッド化
3. 学会等名 第30回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshiki Ishikawa, Maki Kawai-Yamada
2. 発表標題 New insights into molecular evolution of sphingolipid unsaturation in plants
3. 学会等名 The 7th Asian Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石川 寿樹、川合 真紀
2. 発表標題 植物特異的なセラミド不飽和化の分子進化
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 セラミド研究会編	4. 発行年 2019年
2. 出版社 食品化学新聞社	5. 総ページ数 337
3. 書名 セラミド研究の新展開～基礎から応用へ～	

〔産業財産権〕

〔その他〕

埼玉大学理工学研究科 遺伝子環境工学研究室HP
<http://park.saitama-u.ac.jp/~geneenvtech/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----