

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20570031

研究課題名 (和文) 高等植物におけるカルジオリピンの機能に関する分子生物学的解析

研究課題名 (英文) Molecular-biological studies on the function of cardiolipin in higher plants

研究代表者

和田 元 (WADA HAJIME)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：60167202

研究成果の概要 (和文)：シロイヌナズナのカルジオリピン合成酵素遺伝子 (*CLS*) が破壊されたタグラインを用いて、カルジオリピン (CL) の機能について解析した。その結果、(1) *CLS* が植物体における CL 量を制御していること、(2) *CLS* は胚や維管束、気孔孔辺細胞、主根のコルメラ細胞など、特殊な形態をしたミトコンドリアが高密度で存在する組織で発現していること、(3) 変異株において CL 量が一定量以下となると、根の伸長阻害やミトコンドリアの形態異常が生じることを見出し、CL がミトコンドリアの形態維持に必要であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : We studied physiological roles of CL with *cls* mutants of *Arabidopsis thaliana*, in which the *CLS* gene for CL synthase is disrupted by T-DNA insertion. The findings obtained in this study are as follows: (1) *CLS* expression can control the level of CL and CL plays important roles in growth of plants. (2) *CLS* gene is highly expressed in cells of tissues, such as the columella and guard cells, where the number of mitochondria is higher than that in cells of other tissues, suggesting importance of *CLS* in mitochondria-rich cells. (3) The shape of mitochondria in *cls* mutants is abnormal, namely, mitochondria in mutant cells are extremely larger than those in wild-type cells. These findings demonstrate that CL plays critical roles in maintenance of mitochondrial structure and plant development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子機能・生理学

キーワード：カルジオリピン、高等植物、脂質、シロイヌナズナ、生体膜、ミトコンドリア

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

CLの機能は、真正細菌、酵母、動物細胞などを用いて解析され、CLが呼吸の電子伝達を担っている複合体に結合しており、それらの複合体の安定化やアセンブリーに必要であることが示唆されていた。また、CLのアポトシスへの関与や、CLに結合した脂肪酸の再構成に関わる遺伝子がヒトのBarth症候群の原因遺伝子であることなどが明らかにされていた。しかし、高等生物のCL合成欠損株を用いてCLの機能を*in vivo*で解析した例は報告されていなかった。

そこで、本研究ではCL合成酵素遺伝子が破壊されたシロイヌナズナのタグラインを用いて、CLの機能解析を進めることを計画した。シロイヌナズナのCLS遺伝子にT-DNAが挿入されたヘテロの植物体を自家受粉させて種子を回収すると、そのうちの約25%は黒く縮んだ異常な種子で、それらは培地に蒔いても発芽せず、また、残りの種子を発芽させたものの中にはホモの植物体を見出すことはできなかった。このことから、CLS遺伝子が破壊された植物体は、胚性致死になり異常な種子を形成するものと考えられた。しかし、胚発生の初期の段階で胚を取り出し、寒天培地上で培養すると、ホモの植物体でも生育することが見出された。得られたホモの植物体は、CLS遺伝子が完全に破壊されているが、野生株に比べ矮性にはなるものの、生育することができ、生活環を全うすることができた。非常に興味深いことに、この変異株は野生株に比べて以下のような表現型を示した。(1)変異株の細胞では、通常のみトコンドリアに比べて数十倍の体積をもつ巨大なミトコンドリアが観察された。(2)変異株では子葉の維管束の形成パターンに異常が見られた。(3)変異株では根の伸長阻害が見られた。このように、変異株が様々な異常を示すことから、CLが植物体において極めて重要な機能を担っていることが示唆された。変異株で見られる異常の中で、ミトコンドリアの形態異常は発生初期の胚でも観察された。そこで、本研究では変異株においてミトコンドリアの形態に異常が生じる原因を詳細に解析することで、CLの*in vivo*での機能を直接的に明らかにすることができると考えて本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

CLは、4分子の脂肪酸を結合した二量体構造をもつユニークなリン脂質であり、真核生物ではミトコンドリア膜にのみ局在してい

る。分子内のリン酸基が中性付近のpHでは解離するので、この脂質は生体内ではマイナスの電荷をもった分子として存在する。そのため、CLは酸性リン脂質と呼ばれ、その電荷によってタンパク質などの分子と相互作用し、他の脂質にはない特別な機能をもつと考えられている。これまで、CLの機能は、おもに生化学的、細胞生物学的な手法によって解析され、多くの知見が蓄積されているが、CLの機能についての分子生物学的な解析は、一部のバクテリアや酵母に限られており、動物での研究例は殆どない。そこで、本研究ではCL合成酵素遺伝子(CLS)が破壊されたタグラインを用いて、CLの機能について解析した。この変異株では、ミトコンドリアの巨大化や植物のもつ高次機能に様々な異常が見られることから、CLが極めて重要な機能分子であることが示唆されており、本研究では、変異株において異常が生じる原因を解析することによって、CLのもつ未知の機能を解析した。特に、以下の3点に注目して解析を進めた。

(1)変異株において、ミトコンドリアが巨大化する原因を解明する。植物ミトコンドリアの分裂には、DRP3AやELM1などが関わっていることが知られている。しかし、これらのタンパク質はミトコンドリアへの移行シグナルをもたず、どのようにミトコンドリアへ輸送されるのか、まだわかっていない。もし、この輸送にCLが関わっているとすると、変異株ではDRP3やELM1の輸送が影響を受けることによって分裂が異常となり、ミトコンドリアの巨大化が起こるものと考えられる。また、ミトコンドリアの融合についても解析する。これらの解析結果をもとに、CLとミトコンドリアの分裂および融合との関係を明らかにする。

(2)変異株におけるCLの合成について解析し、CLの合成が部分的に欠損しているのか、完全に欠損しているのかを明らかにする。

(3)変異株の呼吸活性を調べ、CLがミトコンドリアでの呼吸に必要な不可欠であるかどうかを明らかにする。もし、変異株において呼吸活性が検出されれば、CLがなくても呼吸ができることを示したことになる、従来の常識を覆すことになる。

3. 研究の方法

1. ミトコンドリアの分裂に関わっているDRP3AとGFPとの融合タンパク質を発現している株とミトコンドリアをYFPで可視化した

cIs 変異株とを掛け合わせ、DRP3A とミトコンドリアを可視化した *cIs* 変異株を作製した。また、ミトコンドリアの融合を調べるために、Kaede にミトコンドリアへの移行シグナルを付加したものを発現する野生株と *cIs* 変異株の形質転換体も作製した。作製した DRP3A とミトコンドリアの両方を可視化した *cIs* 変異株の細胞内のミトコンドリアの様子や DRP3A の細胞内局在について蛍光顕微鏡を使って観察した。この観察によって、DRP3A がミトコンドリアへ正常にターゲットされているかどうかを明らかにする。また、Kaede タンパク質にミトコンドリアへの移行シグナルを付加して発現させた株については、野生株と *cIs* 変異株の細胞におけるミトコンドリアの融合の程度や頻度を測定し、ミトコンドリアの融合に CL が関与しているかどうかを明らかにする。

2. *CLS* 遺伝子のプロモーターに GUS の翻訳領域をつないだ遺伝子 (*CLS*-GUS) を野生株に導入した株を作製し、GUS の発現がどこで見られるかを調べることで、*CLS* の発現部位を解析した。

3. 外来エストロゲンの投与により *CLS* の発現を誘導できる pER8:*CLS* を導入した *CLS* 変異株を作製した。

4. *cIs* 変異株 (*cIs-1* 変異株, *cIs-2* 変異株)、pER8:*CLS* を導入した *cIs-2* 変異株について、*CLS* の活性および CL の合成量を測定した。pER8:*CLS* を導入した *cIs-2* については、外来エストロゲンを投与して *CLS* の発現を誘導する前と後で *CLS* の活性および CL の合成量を測定した。

5. *cIs-1* 変異株、*cIs-2* 変異株、pER8:*CLS* を導入した *cIs-2* 変異株について、各株の植物体の成長およびミトコンドリアの呼吸活性について調べた。

6. 以上の解析結果を総合的に検討し、CL のもつ *in vivo* での機能を総括した。

4. 研究成果

CLS は胚や維管束、気孔孔辺細胞、主根のコルメラ細胞などの組織で高発現しているが、それらの組織では特殊な形態したミトコンドリアが高密度で観察された。野生株と変異株のそれらの組織において YFP によりミトコンドリアを可視化して観察したところ、変異株では巨大化したミトコンドリアやくびれを

持って長くなったミトコンドリアが多く観察された。電子顕微鏡でも、発達したクリステ様構造をもった巨大なミトコンドリアが確認された。蛍光タンパク質 Mit-Kaede を用いてミトコンドリアの融合頻度を測定したところ、変異株のミトコンドリアはほとんど融合を行っていないことがわかった。このことから、CL はミトコンドリアの融合を制御することでミトコンドリアの形態に重要な役割を果たすものと推測された。また、植物ミトコンドリアの分裂には、DRP3A や ELM1 などが関わっていることが知られている。これらのタンパク質のミトコンドリアへ輸送を調べたところ、変異株ではミトコンドリアへの輸送がおこらないことが明らかとなった。このことは、ミトコンドリアの分裂に関わる因子の輸送も異常となっており、それもミトコンドリアの巨大化がおこる原因の 1 つであることを示している。融合と分裂のバランスによって維持されているミトコンドリアの形態が、CL が欠損することにより、融合と分裂のアンバランスを引き起こし形態に異常が生じるものと考えられる。

次に、*CLS* 遺伝子が破壊された *cIs-1* と *cIs-2* について、芽生えを [³³P] Pi を用いて長時間ラベルすることで、CL 量を測定した。その結果、全リン脂質中に占める CL の割合は、WT, *CLS-2/cIs-2*, *cIs-1/cIs-1*, *cIs-2/cIs-2* の順に低下していた。これは観察された表現型の異常の程度と対応していた。また、外来エストロゲンの投与により *CLS* の発現を誘導できる pER8:*CLS* を *cIs-2/cIs-2* に導入した変異体では、根の伸長やミトコンドリアの形態異常が外来エストロゲン濃度依存的に回復したが、この変異株のカルスでは、エストロゲンの投与により CL 量のみが上昇した。さらに、非誘導条件では *CLS* 活性が検出できなかったのに対し、誘導に伴い発現時間に対応して *CLS* 活性が上昇することを確認した。以上の結果は、*CLS* が植物体における CL 量を制御可能であり、CL 量が一定量以下となるのが様々な異常の原因であることを示唆している。

CL が欠損した変異株は、野生株に比べて生育が悪いものの、生活環を全うすることができ、呼吸活性も検出された。このことから、CL がミトコンドリアでの呼吸に必須ではないことが明らかとなった。この知見は、生化学的な解析によって得られた「CL が呼吸に必須である」という、従来の常識を覆す画期的な成果である。

このように、本研究において、CL がミトコンドリアの分裂と融合に関与していること、呼吸に必須でないことが明らかとなり、CL の

新規機能の発見であるばかりでなく、ミトコンドリアの形態制御機能の研究にも大きな影響を与える重大な知見をもたらした。また、これらの研究成果は植物の研究分野だけではなく、他の多くの研究分野にも波及効果をもたらすものと考えられる。

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4件)

1. Katayama, K and Wada, H. T-DNA insertion in the *CLS* gene for cardiolipin synthase affects development of *Arabidopsis thaliana*. *Cytologia* 査読有, vol. 76 (2011), in press.

2. Mizusawa, N. and Wada, H. (2011) The role of lipids in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 査読有, vol. 1807 (2011), in press.

3. Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., Baud, S., Bird, D., DeBono, A., Durrett, T. P., Franke, R. B., Graham, I. A., Katayama, K., Kelly, A. A., Larson, T., Markham, J. E., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., Rowland, O., Samuels, L., Schmid, K. M., Wada, H., Welti, R., Xu, C., Zallot, R. and Ohlrogge, J. (2010) Acyl lipid metabolism. The *Arabidopsis* book. 査読有, vol. 8 (2010), e0133.

4. Katayama, K. and Wada, H. Cellular function of the phospholipid cardiolipin. *Plant Morphol.* 査読有, vol. 21 (2009), 17-28.

[学会発表] (計10件)

1. 和田 元、ホスファチジルグリセロールはシロイヌナズナの胚発生に必要である、日本植物生理学会、2011年3月20日、仙台(東北大学)

2. 和田 元、植物におけるカルジオリピンの機能解析、日本植物生理学会、2011年3月20日、仙台(東北大学)

3. Hajime Wada, Roles of anionic phospholipids,

phosphatidylglycerol and cardiolipin, in photosynthetic organisms, Japanese-Finnish binational seminar, March 3, 2011, Okayama (Okayama Royal Hotel)

4. 和田 元、ホスファチジルグリセロールはシロイヌナズナの胚発生に必要である、日本植物脂質シンポジウム、2010年11月27日、京都(京都大学)

5. 和田 元、カルジオリピン合成酵素はカルジオリピン量を制御できる、日本植物生理学会、2010年3月21日、熊本(熊本大学)

6. 和田 元、シロイヌナズナにおけるPG合成に関わるPGP合成酵素遺伝子の機能解析、日本植物生理学会、2010年3月21日、熊本(熊本大学)

7. Hajime Wada, Roles of lipids in photosynthesis, The third Asian symposium on plant lipids, November 27, 2009, Yokohama (Yokohama Media and Communication Center)

8. Hajime Wada, Roles of lipids in photosynthesis under stressed conditions, Japanese-Finnish binational seminar, October 31, 2008, Helsinki (Finland)

9. 和田 元、膜脂質研究に多細胞性をどう生かすか オルガネラ機能および発生におけるカルジオリピンの役割、日本植物学会、2008年9月25日、高知(高知大学)

10. Hajime Wada, Cardiolipin synthase plays important roles in plant morphology, The 18th International Symposium on Plant Lipids, July 20, 2008, Bordeaux (France)

[図書] (計3件)

1. Wada, H. and Murata, N., Springer, Lipids in photosynthesis: Essential and regulatory functions. (2009), pp. 1-9

2. Wada, H. and Mizusawa, N., Springer, Lipids in photosynthesis: Essential and regulatory functions. (2009), pp. 243-263.

3. Sato, N. and Wada, H., Springer, Lipids in Photosynthesis: Essential and regulatory functions. (2009), pp. 157-177.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]
ホームページ等
<http://hajimewada.c.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 元 (WADA HAJIME)
東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号：60167202

(2) 研究分担者

水澤 直樹 (MIZUSAWA NAOKI)
東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号：80342856

(3) 連携研究者

()

研究者番号：