

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05826

研究課題名（和文）ピロリン酸による植物の代謝制御とそれを応用した植物機能改変

研究課題名（英文）Pyrophosphate-Mediated Regulation of Plant Metabolism and Its Application in Modifying Plant Functions

研究代表者

瀬上 紹嗣（Segami, Shoji）

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・助教

研究者番号：00765935

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：植物はV-PPaseとsPPaseという2種類の分解酵素を併用しており、その使い分けにより組織ごとに最適なピロリン酸濃度を保っていることを検証した。根端コルメラ細胞では、V-PPaseの異所発現によりデンプンの減少と液胞の肥大がみられ、変異によりH⁺輸送活性を欠損しても同様であり、機能維持のために発現を低く保つ生理的意義を見出した。NH₄⁺を窒素源として用いない場合に地上部でのV-PPase欠損表現型が強化される現象について、V-PPaseとsPPase以外の分解酵素は関与せず、これらの発現変動もないことまで判明したが、地上部でPPiを生産する経路の同定までには至らず、今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

V-PPaseは液胞膜においてH⁺を輸送するポンプであり、その過剰発現により植物に有益な形質を付与することが多数報告されている。しかし、ピロリン酸の濃度を決定する因子であることも近年判明しており、その機能の本質的な理解はまだ十分ではない。本研究ではV-PPaseが例外的に少ない根端コルメラに注目し、V-PPase高発現がH⁺輸送活性の有無に依らず悪影響を及ぼす例を示した。当初の仮説を否定する結果も得られておりピロリン酸蓄積との関係を議論するにはさらなる解析が必要だが、コルメラの機能維持のための液胞膜タンパク質発現制御という側面を見出した。

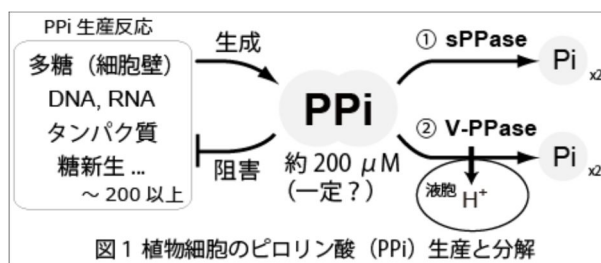
研究成果の概要（英文）：We verified that plants maintain optimal pyrophosphate concentrations in different tissues by utilizing two types of hydrolytic enzymes, V-PPase and sPPase, selectively. In columella cells at the root apex, ectopic expression of V-PPase led to a reduction in starch and enlargement of vacuoles, a phenomenon also observed in mutants lacking H⁺ transport activity. This suggests a physiological significance in maintaining low V-PPase expression for functional integrity. Regarding the enhanced V-PPase deficiency phenotype in aerial parts when NH₄⁺ was not used as a nitrogen source, it was determined that no other hydrolytic enzymes besides V-PPase and sPPase were involved, and there were no changes in their expression levels. However, identifying the pathway of PPI production in the aerial parts remains unresolved and is a subject for future research.

研究分野：植物生理学

キーワード：ピロリン酸 液胞 プロトンポンプ ピロホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

ピロリン酸(PPi)は核酸やタンパク質、セルロース、ショ糖など 200 を超える代謝反応において生産される低分子化合物である。PPi から 2 分子のリン酸(Pi)への不可逆的な加水分解が代謝反応の推進力となっており、soluble PPase (sPPase)で PPi の分解が行われる大腸菌では、その欠損により DNA の合成が阻害され致死となることが知られる。動物を含む多くの生物



種は sPPase しか持たないが、植物では UGPase, PFP, PPK など PPi を利用する酵素が存在し、エネルギー源や代謝調節物質としての役割を持つと考えられる。特に、PPi を基質として液胞への H⁺輸送を行う V-PPase は細胞質 PPi の分解除去に最も重要であり、sPPase が補助的であることを代表者たちは分子遺伝学的手法を用いて明らかにしてきた(Segami 2018, *Plant Cell*)。PPi 分解を担う V-PPase と sPPase の時空間的な発現は組織ごとに差異が見られ(Segami, 2018, *Plant Cell*)、また PPi の生産量も各種代謝反応の活性に依存するため、PPi 濃度は組織に固有の生産と分解のバランスにより決定されることを想定した。実際に植物への大腸菌 sPPase 異種発現により代謝が変動することが報告されている(Osorio, 2013, *Front. Plant Sci.*)そこで、植物が生体内で積極的に PPi 濃度差を作り、代謝調節に利用している可能性を検証する。また、植物は巨大な液胞の酸性維持に多量のエネルギーを必要とするため、V-ATPase と V-PPase を併用していると考えられているが、V-PPase の過剰発現は V-ATPase の欠損を相補できないことから、H⁺ポンプとしての役割は限定的であるとされている(Kriegel, 2015, *Plant Cell*)。しかし、V-PPase が利用可能な PPi レベルは PPi 生産量及び sPPase 活性とのバランスによって決定するため、この点を考慮して再評価する必要があると考え、本研究課題に着手した。

2. 研究の目的

本研究ではこれまで H⁺ポンプとしてのみとらえられてきた V-PPase の生理的機能を見直し、基質である PPi の利用可能余地により規定されるという視点から再評価する。V-PPase 過剰発現植物体はバイオマスの増大や塩、乾燥、低温耐性に寄与するなど応用上でも重要な形質を与えることが数多く報告されている。本研究では PPi の単純分解を行う sPPase の変異と組み合わせることで、代謝・膜輸送の両面からさらなる植物の改変の可能性も模索し、独創的成果に結びつけることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナにおいて PPi を超蓄積する V-PPase (AtVHP1/AVP1/FUGU5) sPPase (AtPPa1) の二重破壊株 *fugu5 ppa1* ではデンプンの蓄積がみられ、大腸菌 sPPase 異種発現株では可溶性糖が増加する。一方、VHP1 は、ほぼすべての組織で発現しているが、例外的に根端コルメラの重力感知を行う層においてほとんど発現が見られないという特徴を有している。この細胞では重力感知のための平衡石としてアミロプラストを発達させているが、この生理機能の維持のために VHP1 の発現を抑えていることを想定した。コルメラ特異的な発現を示す ADF9 プロモーター下で各種遺伝子を発現させることで、PPi の積極的な濃度調節が行われているかを検証する。

(2) 培地に NH₄⁺が含まれない場合、V-PPase 欠損株は葉の辺縁が壊死するなどより顕著な表現型を示す。シロイヌナズナでは NH₄⁺は根で同化されるのに対し、NO₃⁻は地上部に輸送された後、光合成の還元力を用いて NH₄⁺に還元される。このことから、窒素源が NO₃⁻のみの場合、地上部・明期に PPi 生産が集中して、地上部の sPPase のみでは支えきれなくなると想定した。ただし、NO₃⁻還元経路には PPi を直接生産する反応が含まれないため、代謝経路の同定のため、野生型と *fugu5-1* を NH₄⁺含有また

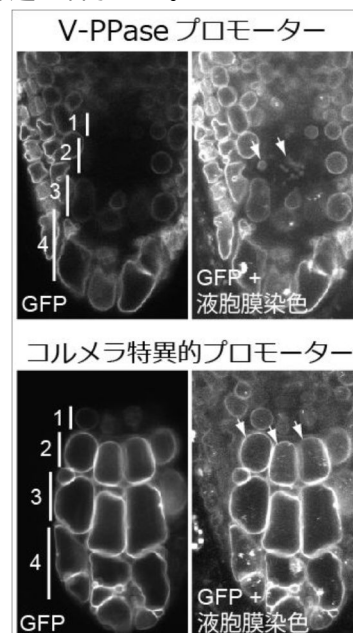


図2 根端の液胞形状と V-PPase-GFP の発現
数字：コルメラの細胞層
矢印：第2層の液胞

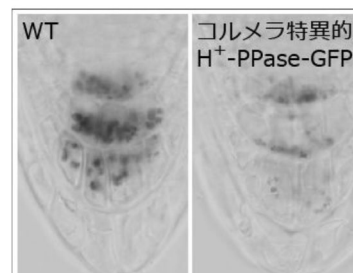


図3 根端のデンプン染色

は非含有培地で生育させたのちに、RNA-seq による比較を行った。

(3) 液胞膜の主要 H⁺ポンプである V-ATPase を欠損した *vha-a2, a3* 二重破壊株は VHP1 の過剰発現により相補できない。VHP1 の基質である PPi を単純分解する Ppa1 を破壊し、基質となる PPi を増加させることで VHP1 の機能強化が可能かを評価する。

4. 研究成果

(1) 根端コルメラ細胞に VHP1-GFP を特異的に発現させたラインでは、特に暗条件かつ糖を外から与えない環境下において、アミロプラストでのデンプンの減少の他、液胞の肥大が起きていた。この表現型は GFP タグ無しのラインでも確認された。また、VHP1 の欠損株である *fugu5* では、逆にデンプン量の増加を確認した。これらの表現型における H⁺ポンプと PPi 分解の寄与を明らかにするため、H⁺輸送活性を欠損し PPi 分解のみを行う脱共役型 VHP1-GFP をコルメラ特異的に発現させたところ、このラインでもデンプン減少と液胞肥大の表現型が見られた。このことから、H⁺ポンプ機能の亢進が液胞肥大の原因とは言えないことが示唆された。大腸菌 sPPase である *ppa*、酵母 sPPase である IPP1 や植物 sPPase である Ppa1 の発現ラインも構築したが、*ppa*-GFP においてデンプン量が低下する傾向がみられたものの IPP1 と Ppa1 は明確な表現型が得られておらず、高発現株の確保やデンプン定量法の改良などを進めている。H⁺ポンプ活性のみを向上させる目的で液胞膜局在型の P-type H⁺-ATPase である AHA10-GFP をコルメラ特異的に発現させたところ、このラインでもデンプン減少と液胞肥大の表現型が見られた。以上の結果から、H⁺ポンプと PPi 分解だけではこの表現型を単純に説明できないことが判明した。

デンプンの減少については、ATP の消費も一因となっている可能性が考えられたが、ATP センサー ATeam による解析はライン構築までに留まっており、解析は今後の課題である。液胞の肥大については、液胞膜タンパク質の過剰発現が足場となる膜の過剰供給を引き起こしていることを想定した。液胞膜マーカーとして知られる TIP1;1 と Vam3 の GFP 融合タンパク質を ADF9 プロモーター下で発現させた系を構築、観察した。TIP1;1-GFP では予想外に液胞膜局在性が弱く、高発現ラインでは凝集体を形成したために評価ができなかった。GFP-Vam3 は液胞膜局在を示し、発現量の高いラインにおいて液胞が肥大する傾向が見られた。コルメラ細胞におけるアミロプラストの沈降と重力屈性の関係を考えると、液胞の過剰な肥大も重力感知に負の影響を与える可能性が考えられる。VHP1-GFP の特に発現量の高いラインにおいては、糖制限条件において重力屈性の低下を示した。本研究により、液胞膜タンパク質の 10%程を占める V-PPase がコルメラ細胞においては低く保たれていることには、その機能維持のための生理的な意義があることを示したが、これは当初の予想と異なり液胞膜タンパク質の種類に限らない一般的な制御である可能性も見えてきた。PPi 量による調節が存在するかどうかについての最終的な結論は sPPase の異所発現系の再解析が必要であり、今後も解析を続けて成果に結び付けていきたい。

(2) RNA-seq の結果、*fugu5* において NH₄⁺が含まれない条件では病害応答、接触刺激に関わる遺伝子群の上昇が目立っていた。この条件では、PPi 蓄積を介して *fugu5* の細胞壁とクチクラ層が弱体化するが、それがこれらの遺伝子群を誘導することが考えられた。sPPase である Ppa1-5 は NH₄⁺や V-PPase の有無で変動しておらず、これらの sPPase の誘導が NH₄⁺により起きることは否定された。*fugu5 ppa1 ppa2*, *fugu5 ppa1 ppa4* 三重破壊株では NH₄⁺の有無にかかわらず致死に近い表現型が見られたことから (Fukuda 2020 *Front. Plant Sci.*)、想定外の PPase が関与していることも考えにくい。一方、細胞質で PPi を直接生産する酵素の遺伝子では Proline t-RNA ligase しか増加しておらず、経路の同定につながるような結果は得られなかった。今後は *fugu5* または *fugu5 ppa1* における明暗の PPi 経時的変化の定量やメタボローム解析を進めることで、窒素代謝と PPi 生産の関係を明らかにしていきたい。

(3) 液胞膜 V-ATPase の破壊株 *vha-a2, a3* と、最も発現量の高い sPPase である Ppa1 の 3 重破壊株を作製し、その表現型を解析することで PPi 生産量と V-PPase 活性の機能亢進の可能性を検討することとした。3 重破壊株の手前 *ppa1^{-/-} vha-a2^{+/-} a3^{-/-}* および *ppa1^{-/-} vha-a2^{-/-} a3^{+/-}* まで完了し、現在も解析を進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Sakamoto Yuki, Kawamura Ayako, Suzuki Takamasa, Segami Shoji, Maeshima Masayoshi, Polyn Stefanie, De Veylder Lieven, Sugimoto Keiko | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 Transcriptional activation of auxin biosynthesis drives developmental reprogramming of differentiated cells | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 The Plant Cell | 6. 最初と最後の頁 4348 ~ 4365 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koac218 | 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 Fukuda Mayu, Mieda Marika, Sato Ryosuke, Kinoshita Satoru, Tomoyama Takaaki, Ferjani Ali, Maeshima Masayoshi, Segami Shoji | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Lack of Vacuolar H ⁺ -Pyrophosphatase and Cytosolic Pyrophosphatases Causes Fatal Developmental Defects in Arabidopsis thaliana | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science | 6. 最初と最後の頁 655 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.00655 | 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 Hosokawa Chika, Yagi Hiroki, Segami Shoji, Nagano Atsushi J, Koumoto Yasuko, Tamura Kentaro, Oka Yoshito, Matsushita Tomonao, Shimada Tomoo | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 The Arabidopsis katamari2 Mutant Exhibits a Hypersensitive Seedling Arrest Response at the Phase Transition from Heterotrophic to Autotrophic Growth | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology | 6. 最初と最後の頁 350 ~ 361 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcad156 | 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 - |

〔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 瀬上 紹嗣、Palfalvi Gergo、棚瀬 邦明、下村 拓史、陳 鵬、松田 陸玖、須田 啓、張 列弛、大井 祥子、真野 弘明、重信 秀次、豊田 正嗣、長谷部 光泰 |
| 2. 発表標題 食虫植物モウセンゴケにおける高速カルシウムシグナル伝達 |
| 3. 学会等名 日本植物学会 第86回大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 瀬上 紹嗣、Gergo Palfalvi、陳 鵬、棚瀬 邦明、下村 拓史、松田 陸玖、須田 啓、張 列弛、大井 祥子、真野 弘明、山口 勝司、重信 秀次、豊田 正嗣、長谷部 光泰 |
| 2. 発表標題 食虫植物の活動電位を介した長距離情報伝達 |
| 3. 学会等名 第 95 回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 瀬上 紹嗣、Gergo Palfalvi、棚瀬 邦明、松田 陸玖、Peng Chen、須田 啓、下村 拓史、大井 祥子、豊田 正嗣、長谷部 光泰 |
| 2. 発表標題 食虫植物モウセンゴケの運動を制御する高速電気シグナルの解析 |
| 3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shoji Segami |
| 2. 発表標題 Electrical and Ca ²⁺ Signal Transductions Controlling the Tentacle Movement of the Carnivorous Plant <i>Drosera rotundifolia</i> |
| 3. 学会等名 19th International Workshop on Plant Membrane Biology 2023 (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 福田 菜由、三枝 穂花、佐藤 良介、木下 悟、巴山 貴晶、Fanny Bellegarde、Ali Ferjani、前島 正義、瀬上 紹嗣 |
| 2. 発表標題 植物におけるピロリン酸と窒素代謝の関係を探る |
| 3. 学会等名 日本植物学会第84回大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 瀬上 紹嗣, Peng Chen, 近藤 真紀, 大井 祥子, 須田 啓, 豊田 正嗣, 長谷部 光泰. |
| 2. 発表標題 食虫植物モウセンゴケ触毛におけるカルシウム波動態の解析 |
| 3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 瀬上 紹嗣, 近藤 真紀, 松田 陸玖, Zhang Liechi, 落合 由裕, Chen Peng, 大井 祥子, 須田 啓, 豊田 正嗣, 長谷部 光泰 |
| 2. 発表標題 食虫植物モウセンゴケの触毛における高速カルシウム波の伝播経路 |
| 3. 学会等名 日本植物学会第87回大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shoji Segami, Maki Kondo, Riku Matsuda, Liechi Zhang, Tadahiro Ochiai, Peng Chen, Shoko Ohi, Hiraku Suda, Masatsugu Toyota, Mitsuyasu Hasebe |
| 2. 発表標題 Multiple cytosolic calcium waves with different dynamics used in trapping hairs of carnivorous sundew <i>Drosera rotundifolia</i> |
| 3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2023 (国際学会) |
| 4. 発表年 2023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 | 木下 悟 (Kinoshita Satoru) | | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 前島 正義 (Maeshima Masayoshi) | | |

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 | | | |
|---------|-----------|--|--|--|
| ドイツ | ハイデルベルグ大学 | | | |