

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06231

研究課題名（和文）高湿度下での花器官形成と生殖成立における表層脂質微量成分の分子機能と進化

研究課題名（英文）Analysis of Surface Lipid Trace Components in Flower Organ Formation and Reproductive Success under High Humidity

研究代表者

信澤 岳（Nobusawa, Takashi）

広島大学・統合生命科学研究科（理）・助教

研究者番号：40814463

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：表層脂質は陸上植物にとって、外部環境に対する最初のバリアである。表層脂質はさまざまな分子より成るが、個々の成分が持つ役割に注目した知見は乏しい。本研究の中で、表層脂質中のマイナーな成分であるワックスエステル（WE）生合成能を欠損したシロイヌナズナ変異体が、高湿度環境下で形態異常を示す原因の一端を知ることができた。また、WE合成酵素WSDの進化的起源について探ったところ、車軸藻植物門クレブソルミディウムであることが実験的に証明できたことで、植物の環境応答と進化についての理解が深まった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の表層脂質の役割について、主に乾燥環境への耐性という視点での研究がこれまでに多数行われてきた一方で、その他の環境要因に着目した例は乏しかった。本研究により、表層脂質中のマイナーな成分が高湿度条件下での植物の生存において持つ意義や、その進化的な由来がわかってきた。今後も地球規模で気候が大きく変動することが予想されるが、高湿度条件下における植物の基本的な応答の一端の理解は、実用植物を安定的に活用していくための手がかりへと繋がる期待もある。

研究成果の概要（英文）：Surface lipids serve as the primary barrier to the external environment for terrestrial plants. Although surface lipids consist of various molecules, insights into the specific roles of individual components are limited. In this study, we were able to shed light on the role of wax esters (WE), a minor component in surface lipids, by studying a mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in WE biosynthesis, which exhibited morphological abnormalities under high humidity conditions. Furthermore, investigation into the evolutionary origin of the WE biosynthetic enzyme WSD revealed its presence in the charophyte alga *Klebsormidium*, thereby enhancing our understanding of plant environmental responses and evolution.

研究分野：植物生理学

キーワード：植物脂質

1. 研究開始当初の背景

表層脂質は植物と外部環境とを隔てる最初のバリアである。表層脂質については葉の乾燥耐性や耐病性、撥水性に注目した研究が進んできた一方で、他の器官や環境条件に着目した例や、表層脂質を構成する個々の脂質分子種が持つ特性および生理的意義にまで踏み込んだ知見は少ない。

とりわけ、本研究で注目する表層脂質成分「ワックスエステル(WE)」は陸上植物に広く保存されているものの、表層脂質総量の5%未満しか存在しない微量成分であり、欠損時の表現型が顕著である長鎖アルカンなどの主要成分と比べて研究例が乏しい。WE 合成経路は解明されているが、茎や葉で WE 生合成遺伝子を欠損しても形態変化は全く生じず、撥水性や乾燥耐性にも直接影響が生じないため [Plant Physiol. 148:97–107, 2008; Plant J. 98:727–744, 2019]、発生および環境適応における WE の役割は未解明であった。

申請者はシロイヌナズナの花において発現する5つ全ての WE 生合成遺伝子 *WSD* を破壊した植物を CRISPR/Cas9 系の活用により作出した。この *wsd* 五重変異体は通常栽培条件下では顕著な形態異常を示さないが、様々な環境条件を検証した結果、高湿度でのみ重篤な花弁の変形と融合ならびに不稔の表現型が表出することを発見した(未発表)。撥水性や乾燥耐性に異常はない。植物が高湿度を受容する仕組みには未解明な部分が多いが、湿度変動が概日時計の調節要素であることや [Nat Commun 9:4290, 2018]、湿度を含む外部環境要因により表層脂質成分やそれら生合成遺伝子の発現が敏感に変動することから [Annu. Rev. Plant Biol. 59:683–707, 2008]、高湿度条件の花では脂質代謝系を中心としたダイナミックな変化を介して、器官形成と生殖が維持されている可能性は高い。

植物進化の視点に立つてみると、WE 生合成酵素の獲得起源は植物が陸上進出し始めた段階、車軸藻植物門クレブソルミディウム(Kn)付近にあることが、本研究者が参加した研究から推定された(ただし Kn は、基質を欠くために WE を合成しない; Front Plant Sci. 7:952, 2016)。一方、高湿度の陸上に適応したセン類ヒメツリガネゴケでは、高等植物と大きく異なり WE とその基質である長鎖アルコールが表層脂質の主要成分である [Plant Cell 25:4000–4013, 2013]。やがて恒常的高湿度が必須ではない小葉類に至ると、WE は微量成分となる(イヌカタヒバ; 未発表)。WE はシロイヌナズナ以外の植物種でも微量成分として花に検出されることから、申請者は陸上進化の初期過程で獲得した WE が、種子植物への進化後も花器官の高湿度環境適応のために保存されているという仮説を考えついた。

2. 研究の目的

高湿度下での花器官形成と生殖維持における WE の役割を解明するために、*wsd* 五重変異体の花をモデルとした研究を行い、高湿度に対する植物の応答・適応機構の解明を目指す。また、陸上植物における WE 生合成酵素の獲得起源と特定と、高湿度環境適応における WE の役割の普遍性への理解を深めることを目的とする。

3. 研究の方法

wsd 五重変異体を用いて高湿度下における花の形態変化をもたらす要因を探るために、通常湿度と高湿度下における野生型ならびに *wsd* 変異体について RNA-seq を用いた発現変動遺伝子の網羅的な探索を試みた。これは、通常湿度では形態的な表現型が表出しないことから、2 次的なノイズを排除した有効な方法であると考えた。また花における *WSD* 遺伝子の機能を探るために、花で発現する5つの *WSD* 遺伝子に着目した組織レベルでの発現解析を試みた。さらに、*WSD* 遺伝子の進化的な獲得起源を探るために、クレブソルミディウム Kn*WSD* の *in vitro* ならびに *in vivo* での酵素機能の検証を行った。

4. 研究成果

通常湿度と高湿度下における野生型ならびに *wsd* 変異体について、まず花器官全体を用いた RNA-seq を用いた発現変動遺伝子の網羅的な探索を試みた。その結果、当初の想定以上に有意な変動遺伝子が少ないことがわかった。真に重要な遺伝子を絞り込みやすい条件であるとも考え

られたが、ノンコーディング RNA や機能未知遺伝子が主であったことから、高湿度条件下での花器官形成異常に直接的な影響をもたらす遺伝子の特定には現時点で至っていない。一方、高湿度条件下における花器官の形態異常を直接的にもたらす要因は、遺伝子発現レベルでの変化が先行するのではなく、WE 欠損もしくは *WSD* 遺伝子の機能欠損による細胞壁やクチクラの構造的な変化が鍵となっている可能性が示唆される。

花器官において mRNA が検出される *WSD* は *WSD1*, 2, 3, 6, 11 の 5 遺伝子である。そのうち、発現量の高い *WSD1* と *WSD11* が中心的な役割を担っていると考えられた。*WSD1* 遺伝子については、遺伝子上流 2 kb のプロモーター領域を GUS 発現に用いた場合には文献通り (*Plant Physiol.* 148:97-197, 2008) 花での発現が検出されなかった。その一方で、使用するプロモーター領域を上流 3 kb まで長く増やしたところ、花、特に花卉における強い発現が検出されるようになることが新たにわかった。つまり、上流 2-3 kb に花における発現誘導に必要な制御領域があると予想される。この組織レベルでのパターンは、もう 1 つの主要な *WSD* である *WSD11* と同様であり、花器官のうち特に花卉における WE 生合成が高湿度下での応答に重要な役割を持っていると考えられる。

また、*WSD* 遺伝子の獲得起源について、クレブソルミディウムの持つ *WSD* と配列類似性の高い遺伝子: *KnWSD1* に着目した。クレブソルミディウムは、生物が水中から陸上環境に適応進化する過程を探る上で重要な生物種である。進化的にみて車軸藻植物門クレブソルミディウム以前では *WSD* 遺伝子ホモログが見当たらないことから、*KnWSD1* は植物が陸上進出する過程において獲得した遺伝子であると考えられる。そこで、単離した *KnWSD1* の生化学的役割を探るため、出芽酵母内で発現させた組換えタンパク質を用いた *in vitro* での活性測定を行ったところ、WE 合成活性の取得に成功した。また、出芽酵母内 (H1246 系統) において *KnWSD1* を発現させた場合においても WE 生合成能が検出された。さらに、WE 生合成を欠損した *wsd* 五重変異体背景において *KnWSD1* を発現する形質転換植物体を作成したところ、シロイヌナズナにおいても WE 生合成能を回復させることがわかった。以上の結果から、*KnWSD1* は陸上植物の持つ *WSD* 遺伝子の直接の獲得起源であることが突き止められた。

興味深いことに、シロイヌナズナ以外の植物種キクタニギク (モデルキク) においても、筒状花特異的に発現する *WSD* ホモログ、*CsWSD1* を見出した。キク花序において筒状花同士は混み合っている上、内部は開花まで外界に触れない閉じた状態 (すなわち高湿度状態と推測される) にある。現在、*CsWSD1* について CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子破壊を試みており、植物種を超えて花器官における WE のもつ役割の普遍性が証明されれば、植物の発生と環境応答についてのさらに深い理解へと繋がると期待される。この研究項目に関する結果の目処が立ち次第、上記内容とともに論文として投稿する。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池松 朱夏, 辻野 建貴, 南井 啓太, 坂本 智昭, 信澤 岳, 木村 成介
2. 発表標題 水陸両生植物 <i>Rorippa aquatica</i> の水中でのガス交換を可能とするクチクラ層の機能的可塑
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 信澤 岳
2. 発表標題 環境適応における植物脂質の役割
3. 学会等名 植物科学フロンティア研究会2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1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
---------------------------	-----------------------	----

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