

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570040

研究課題名(和文)ミトコンドリア膜リン脂質変異株が示す呼吸阻害と低温感受性に関する生理生化学的研究

研究課題名(英文) Effects of phospholipid biosynthesis mutation on the mitochondrial respiratory activity at ambient and low temperatures

研究代表者

西田 生郎 (NISHIDA, Ikuo)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：40189288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは植物の呼吸を担う大切な細胞小器官である。ミトコンドリアの呼吸機能は内膜に組み込まれた呼吸鎖膜タンパク質複合体によって支配されることが分かっている。一方、内膜はホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピンなどのリン脂質を含んでいるが、特に、ホスファチジルエタノールアミンは脂質二重膜構造を不安定化するにもかかわらず、内膜に大量に含まれている。本研究では、シロイヌナズナのホスファチジルエタノールアミン合成変異株*pect1-4*を用いて、ホスファチジルエタノールアミンが内膜のシトクロムオキシダーゼ活性維持に必要であることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are important organelles for respiratory activity in plants. In this study, the role of phosphatidylethanolamine, which is the major non-bilayer phospholipid of mitochondrial inner membrane, is investigated using *Arabidopsis pect1-4* mutants, which exhibit one fourth of the CTP:phosphorylethanolamine cytidylyltransferase activity. We found that the leaf respiratory activity increases with rosette leaf development in the wild type, but it did not increase in *pect1-4* mutants under prolonged short-day growth conditions. Cytochrome oxidase activity was selectively inhibited in *pect1-4* mutants, with no change in COXII protein levels. In *pect1-4* mutants, PE levels decreased in isolated mitochondria compared with that in wild-type mitochondrial. These results suggested that a shortage of phosphatidylethanolamine in the mitochondrial inner membrane causes a partial inhibition of COX activity.

研究分野：植物分子生理学

 キーワード：ホスファチジルエタノールアミン ミトコンドリア内膜 呼吸活性 シトクロムオキシダーゼ 葉の発達 葉の呼吸活性 リン脂質組成 *pect1-4*

1. 研究開始当初の背景

植物の呼吸はシアン感受性のチトクロムオキシダーゼ経路 (Cytochrome oxidase pathway; COP) とシアン耐性のオルタナティブオキシダーゼ経路 (Alternative oxidase pathway; AOP) が知られており、それぞれ異なる生理的役割を果たすと考えられている。これら呼吸経路はミトコンドリアの内膜に局在し、内膜のリン脂質組成の影響を受けると考えられるが、内膜リン脂質と呼吸活性の関係を分子生理学的に検証する実験系が確立していなかった。

ミトコンドリア内膜は4つのリン脂質クラスを含む。これらはホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルグリセロール (PG) およびカルジオリピン (CL) である。PC と PE は主要なリン脂質で、ミトコンドリア膜全体の~80%を占める。また、PE は、ミトコンドリア内膜では 50%にも達する (Douce, R. 1985, Mitochondria in Higher Plants, Academic Press)。非二重膜形成リン脂質である PE をこのように高い割合で含む生体膜はミトコンドリア内膜以外には知られていない。従って、PE はミトコンドリア内膜において何らかの重要な役割を果たすと考えられる。

西田研究室では、PE 生合成の律速酵素である CDP-エタノールアミン合成酵素 (PECT1) の活性が野生型の 1/4 となったシロイヌナズナ変異株 *pect1-4* 株を単離している。*pect1-4* 株は野生型に較べ常温での生育が若干悪く、その実生は 8 で著しい生育阻害を起こす。*pect1-4* 株の PE レベルは、野生型に較べ、ロゼット葉で 8%低下するのに対し、黄化実生、根および花では、それぞれ 20%、25.7%および 39%低下する。変異株の非緑色組織でミトコンドリア内膜の最も多いリン脂質である PE レベルが大きく低下することは、これらの組織で呼吸活性が大きく低下するかも知れないと考え、ロゼット葉の呼吸活性を調べた。その結果、*pect1-4* 株のロゼット葉では野生型に較べ、全呼吸活性および COP 活性がそれぞれ 25%および 38%低下することを見いだしていた。

2. 研究の目的

ホスファチジルエタノールアミン (PE) 生合成の律速酵素 CDP-エタノールアミン合成酵素 (PECT1) の活性が野生型の 1/4 となったシロイヌナズナ変異株 *pect1-4* 株は、ロゼット葉の呼吸低下と低温感受性を示す。この *pect1-4* 株について、

(1) 葉の呼吸低下の原因は、ミトコンドリア呼吸鎖のチトクロムオキシダーゼ経路 (COP) 活性低下によることを証明する。また、COP 活性低下は、シトクロムオキシダーゼ遺伝子 COXII の発現レベルの低下によるのではなく、ミトコンドリア内膜の PE レベル低下による COX 活性阻害に起因することを証明する。

(2) 低温感受性について、低温における COP 活性とオルタナティブオキシダーゼ経路 (AOP) 活性との関係を選択的呼吸阻害剤を用いて検証する。

(3) 野生株と *pect1-4* 株で、呼吸鎖タンパク質複合体の高次構造形成を比較し、PE の役割を検証する。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリアの呼吸活性比較: *pect1-4* 植物のロゼット葉は、野生型ロゼット葉よりも全呼吸活性および COP 活性ともに低かったため、ミトコンドリアを単離し、全呼吸活性、COP 活性および AOP 活性を比較する。COP 活性低下は、シトクロムオキシダーゼ遺伝子 COXII の発現レベルの低下によるのではなく、COX 活性低下に起因することを証明するため、抗 COXII および抗 AOX 抗体を用いたイムノブロット解析を行う。

(2) ミトコンドリア膜脂質組成の比較: COP 活性低下は、COXII 遺伝子の発現レベルの低下によるのではなく、ミトコンドリア内膜の PE レベル低下による COX 活性低下に起因することを検証するため、ガスクロマトグラフによる単離ミトコンドリアのリン脂質分析を行う。

(3) 呼吸鎖タンパク質複合体の高次構造解析: *pect1-4* 変異株における COX 活性阻害について、PE の役割を明らかにするために、単離ミトコンドリア膜のタンパク質複合体を BlueNative PAGE で解析し、COX タンパク質複合体の高次複合体形成について検討する。

(4) ロゼット葉および単離ミトコンドリアの呼吸活性に対する低温の影響: *pect1-4* 実生の低温感受性について、低温におけるミトコンドリア呼吸阻害によるものかどうかを検証するため、ロゼット葉および単離ミトコンドリアの呼吸活性を低温室に設置した酸素電極を循環冷却器で温度制御しながら経時的に測定し、*pect1-4* 特異的な活性阻害が起こる温度領域があるかどうかを検証する。また、COP と AOP のいずれの活性が影響を受けやすいか、選択的呼吸阻害剤 (KCN および SHAM) を用いて検証する。

(5) 蛍光染色法による植物組織の過酸化ストレスレベルの比較: *pect1-4* による呼吸阻害が、植物体内に過酸化ストレスを及ぼすかどうかを検証するために、過酸化脂質由来のマロンジアルデヒド (MDA) のレベルを、チオバルビツール酸 (TBA) を用いて蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡下で比較する。特に、低温処理前後についても染色の度合いを比較する。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリアの呼吸活性比較: *pect1-4* 植物のロゼット葉は、野生型ロゼット葉よりも全呼吸活性および COP 活性ともに低かったため、ミトコンドリアを単離し、全呼吸活性、COP 活性および AOP 活性を比較した。その結

果、COP 活性低下は、シトクロムオキシダーゼ遺伝子 COXII の発現レベルの低下によるのではなく、COX 活性低下に起因することを、抗 COXII および抗 AOX 抗体を用いたイムノブロット解析によりあきらかにした。

(2)ミトコンドリア膜脂質組成の比較:COP 活性低下は、COXII 遺伝子の発現レベルの低下によるのではなく、ミトコンドリア内膜の PE レベル低下によることをあきらかにした。すなわち、野生型および変異株ともに、3 週間から 5 週間にかけて、COX タンパク質レベルが増加するにも関わらず、野生型では PE レベルが増加し、変異株では PE レベルが低下した。

(3)蛍光染色法による植物組織の過酸化ストレスレベルの比較: *pect1-4* による呼吸障害が、植物体内に過酸化ストレスを及ぼすかどうかを検証するために、過酸化水素レベルを DBA 染色法で調べた。その結果、*pect1-4* 株は野生型に比べて DBA 染色の程度が高いことをあきらかにした。

(4)小胞体の油脂生合成を促進する因子 AtABCA9 について国際共同研究を実施し、小胞体への脂肪酸基質輸送をその機能として提唱した。

(5)種子貯蔵タンパク質の遺伝子破壊が種子中の油脂含量の増加をもたらすほかに、植物体あたりの種子数の増加をもたらすことをあきらかにした。

(6)野生型ロゼット葉の AOP 活性は、低温処理後一時的に低下するが、*pect1-4* ロゼット葉では、低温処理後の回復がおこらないことを見いだした。そこで、*aox1a* 変異株を入手し、*aox1a pect1-4* 二重変異株の作出を開始した。

(7)*pect1-4* 株は早期花成を示すが、野生型遺伝子導入復帰株ライン 2 および 6 (*pect1-4 transPECT1*) を作出したところ、ライン 6 は呼吸活性が回復するが、早期花成は回復しなかった。一方、ライン 2 は早期花成が回復した。以上の結果は、*pect1-4* 変異株の早期花成は、呼吸活性の低下とは無関係であることが明らかとなった。

(8)呼吸鎖高次タンパク質複合体に対する *pect1-4* 変異の影響は、野生型の電気泳動条件が整わず、今後の課題とした。

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 5 件)

Hayakawa, Y., Duan, Z., Yadake, M., Tsukano, J., Yamaoka, Y., Inatsugi, R., Fujiki, Y., Oikawa, A., Saito, K. and Nishida, I. (2015) Epigenetic floral homeotic mutation in pD991-AP3-derived T-DNA-tagged lines for CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase (CCT) genes: the

homeotic mutation of the *cct1-1* allele is enhanced by the *cct2* allele and alleviated by CCT1 overexpression. J Plant Biol. (査読有) 58: 183-192

DOI 10.1007/s12374-014-0587-y

Kim, S., Kim, H., Ko, D., Yamaoka, Y., Otsuru, M., Kawai-Yamada, M., Ishikawa, T., Oh, H.-M., Nishida, I., Li-Beisson, Y., and Lee, Y. (2013) Rapid induction of lipid droplets in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris* by brefeldin A. PLOS one (査読有) 8: e81978

DOI 10.1371/journal.pone.0081978

Otsuru, M., Yanbo, Y., Mizoi, J., Kawamoto-Fujioka, M., Wang, J., Fujiki, Y. and Nishida, I. (2013) Mitochondrial

phosphatidylethanolamine level modulates cytochrome c oxidase activity to maintain respiration capacity in *Arabidopsis thaliana* rosette leaves. Plant Cell Physiol. (査読有) 54: 1612-1619.

DOI: 10.1093/pcp/pct104

Fujiki, Y., Kudo, K., Ono, H., Otsuru, M., Yasuyo Yamaoka, Y., Akita, M. and Nishida, I. (2013) Genetic disruption of CRC 12S globulin increases seed oil content and seed yield in *Arabidopsis thaliana*. Plant Biotech. (査読有) 58: 183-192.

DOI: 10.1007/s12374-014-0587-y

Kim, S., Yamaoka, Y., Ono, H., Kim, H., Shim, D., Maeshima, M., Martinoia, E., Cahoon, E. B., Nishida, I. and Lee, Y. (2013) AtABCA9 transporter supplies fatty acids for lipid synthesis to the endoplasmic reticulum. Proc. Natl. Sci. Acad. USA (査読有) 110: 773-778

DOI: 10.1073/pnas.1214159110

〔学会発表〕(計 13 件)

Natsumi Hoshino, Saki Ikegai, Miki Yadake, Mayu Nakagawa, Yuki Fujiki, Ikuo Nishida (2015.3.16-18) A

mechanism of early flowering in *pect1-4* mutants of *Arabidopsis thaliana*. 第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学(東京都・世田谷区) 矢竹美樹、ユヤンボ、藤木友紀、野口航、西田生郎 (2015.3.16-18) シロイヌナズナの *pect1-4* 変異はシアン耐性呼吸変異 *aox1a-1* と合成致死性を示す. 第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学(東京都・世田谷区)

Ikuo Nishida, Saki Ikegai, Miki Yadake, Natsumi Hoshino, Mayu Nakagawa, Yuki Fujiki (2015.2.1-6) The mechanism of early flowering in *pect1-4* mutants-A

new hypothesis. Gordon Research Conference, Galvestone (USA)
Yuki Fujiki, Ai Inanobe, Kazumasa Kudo, Asuka Kato, Ikuo Nishida (2014.7.10-14) Combination of the genetic disruption of 12S globulins and the overexpression of BnDGAT1 improves seed oil productivity in *Arabidopsis thaliana*. ISPL 21th International Symposium on Plant Lipids, University of Guelph, Guelph (Canada)

矢竹美樹、生貝咲貴、大鶴真寿美、中川 繭、藤木友紀、西田生郎 (2014.3.18-20) シロイヌナズナ *pect1-4* 変異体が示す早期花成の誘導メカニズム. 第 55 回日本植物生理学会年会 富山大学(富山県・富山市)

Saki Ikegai, Miki Yadake, Masumi Otsuru, Mayu Nakagawa, Yuki Fujiki, Ikuo Nishida (2014.3.18-20) Characterization of axillary bud formation in *Arabidopsis pect1-4* mutants. 第 55 回日本植物生理学会年会 富山大学(富山県・富山市)

Fujiki, Y., Kudo, K., Kato, A., Nishida, I. (2013.11.29-12.1) Genetic disruption of 12S globulin genes increases seed oil content and seed yield in *Arabidopsis thaliana*. 2013 Annual Meeting of the Korean Society of Plant Biologists & the 5th Asian Symposium on Plant Lipids, Kimdaejung Convention Center, Gwangju (Korea)
Yamaoka, Y., Lee, Y., Nishida, I. (2013.11.29-12.1) Phosphatidylserine is involved in endocytic vesicles and important for phragmoplast formation in *Arabidopsis thaliana*. 2013 Annual Meeting of the Korean Society of Plant Biologists & the 5th Asian Symposium on Plant Lipids, Kimdaejung Convention Center, Gwangju (Korea)

矢竹美樹、相澤貴志、石川寿樹、藤木友紀、川合真紀、長谷川登志夫、西田生郎 (2013.9.16-17) シロイヌナズナにおける *cct* 変異はスフィンゴ脂質代謝を活性化し、稔性に影響を及ぼす. 第 26 回植物脂質シンポジウム 北海道大学(北海道・札幌市)

大鶴真寿美、Yu Yanbo, 溝井順哉、藤木友紀、西田生郎 (2013.9.16-17) シロイヌナズナにおける *pect1-4* 変異がもたらすミトコンドリアの脂質組成と呼吸活性への影響 第 26 回植物脂質シンポジウム 北海道大学(北海道・札幌市)

生貝咲貴、矢竹美樹、大鶴真寿美、中川 繭、藤木友紀、西田生郎 (2013.9.16-17) シロイヌナズナ *pect1-4* 変異は自律的経路を介して早期花成を誘導する. 第 26

回植物脂質シンポジウム 北海道大学(北海道・札幌市)

Nishida, I. (2013.3.26-31)

Physiological significance of the phosphatidylethanolamine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. 16th International Workshop on Plant Membrane Biology (IWPMB2013) (招待講演) 倉敷芸文館(岡山県・倉敷市)

Otsuru, M., Yu, Y., Fujiki, Y. and Nishida, I. (2012.7.8-13) *pect1-4* mutation affects the cytochrome oxidase pathway capacity of mitochondrial respiration in *Arabidopsis thaliana*. 20th International Symposium on Plant Lipids (ISPL2012) Seville (Spain)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

国際共同研究が拓く油脂増産技術 - 植物脂肪酸を油脂合成の場に運びしくみを解明 -

http://www.molbiol.saitama-u.ac.jp/~nishida/Nishida_Lab/Pub56.html

Nishida Lab Publication

http://www.molbiol.saitama-u.ac.jp/~nishida/Nishida_Lab/Publication.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田生郎 (NISHIDA, Ikuo)

埼玉大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：40189288

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：