

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440123

研究課題名(和文) 高等植物の小胞体ストレス耐性に関わるGタンパク質及びPLCシグナル伝達系の解明

研究課題名(英文) Study on roles of G protein and PLC signalings in plant endoplasmic reticulum stress tolerance

研究代表者

金原 和江 (KANEHARA, Kazue)

室蘭工業大学・工学(系)研究科(研究院)・その他(客員准教授)

研究者番号：30587746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物は周囲の環境変化に適応して生命を維持するため、様々な戦略をたてながら進化を遂げてきた生き物である。近年の研究により、気温の上昇や塩濃度などの変化によってもたらされる環境ストレスが、植物の個々の細胞レベル特に細胞内小器官のひとつである小胞体レベルで明らかになりつつある。本研究では、高等植物の小胞体ストレス応答反応に、三量体Gタンパク質と脂質合成酵素のひとつが重要な働きをすることを明らかにし、その成果を3報の原著論文として英文の国際誌に報告した。

研究成果の概要(英文)：Plants have evolved molecular mechanisms to adapt themselves to environmental changes using various strategies. Recent investigations revealed cellular mechanisms, particularly at the endoplasmic reticulum, in response to environmental stresses including high temperature and high salinity. In our research project, we found that heterotrimeric G proteins and lipid synthesis enzyme played crucial roles for endoplasmic reticulum stress tolerance in a model higher plant *Arabidopsis thaliana*. These findings were published as three original research articles in international scientific journals.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ストレス応答 高等植物 小胞体 Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) 高等植物において、病原菌感染や高温、高塩などの各種ストレスが、小胞体ストレスを誘起することが報告されていたが、その分子機構に関する知見は限られていた。

(2) 動物細胞を用いた先行研究から、小胞体ストレス応答と脂質シグナルに重要な関連性があることが報告されていたが、その詳細な分子機構は不明であった。特に、植物においては、この点に関してほとんど報告がなかった。

(3) 高等植物のモデル生物であるシロイヌナズナの三量体 G タンパク質のベータサブユニットが小胞体ストレス応答に関与することが知られていたが、その詳細な機構については不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナの根をモデルとし、小胞体ストレス、PLC (Phospholipase C) 活性、G タンパク質シグナル伝達の関連性に注目し、環境ストレス耐性機構を小胞体の恒常性維持の観点から理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナのゲノムにコードされた9つのホスフォイノシタイド特異的なフォスホオリパーゼ C 遺伝子に注目し、まず始めにストックセンターで入手可能であった T-DNA 挿入形質転換植物を取得した。具体的には、AtPLC1, AtPLC2, AtPLC3, AtPLC4, AtPLC6 の5種類を取得した。取得した種子から、これら遺伝子のホモ接合体を単離した後、ゲノム上での T-DNA 挿入箇所とヌル変異体であることを PCR: Polymerase Chain Reaction 及び RT-PCR: Reverse transcription-PCR 方を用いて確認した。これらホモ接合体と野生型植物体を用いて、ホスフォイノシタイドのリピドミクス解析により、主要な酵素を同定した。

(2) 上述の解析により同定した遺伝子を単独で欠失する変異植物体, *plc2-1* を用いて、ホスフォイノシタイド特異的なフォスホオリパーゼ C 活性が、シロイヌナズナの根の成長に必要であることを、無菌条件下で生育した植物体の主根の長さを測定することで明らかにした。また、変異植物体で観察された根の生育欠損が、外部から AtPLC2 遺伝子を発現することにより回復することを機能的な相補実験により示した。

(3) AtPLC2 変異植物体の小胞体ストレス応答への関与を、下記の2つの方法により調べた。  
① ツニカマイシンは、タンパク質の糖鎖付加反応を阻害することで知られている薬品である。ツニカマイシンで細胞や植物体を処理

することにより、小胞体ストレス反応を誘起することが可能である。そこで植物体を、ツニカマイシンを含む培地と含まない培地で育て、その生育状況を観察した。

② 小胞体ストレス応答時に、発現が上昇する遺伝子が報告されている。特に、UPR (Unfolded Protein Response) 遺伝子と呼ばれる遺伝子群は、その制御転写因子の同定を含め、研究が進んでいる。これら UPR 遺伝子の発現レベルを指標にして qRT-PCR: quantitative RT-PCR 方により、AtPLC2 の小胞体ストレス応答への関与を調べた。

(4) シロイヌナズナ植物体内での AtPLC2 の組織及び細胞内局在を明らかにするため、まず始めに *ProPLC2::PLC2-GUS* 及び *ProPLC2::PLC2-Venus* 発現ベクターを作成した。これらを *plc2* 変異植物体に、アグロバクテリアを用いた植物形質転換方により導入した。構築した形質転換植物における AtPLC2 の組織特異性は、導入したレポーター遺伝子 GUS(beta-glucuronidase)の組織化学的染色により明らかにした。また、細胞内局在は、蛍光タンパク質である Venus のシグナルを共焦点レーザー顕微鏡により観察することで調べた。

(5) シロイヌナズナの三量体 G タンパク質のサブユニット( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )それぞれをコードする遺伝子の T-DNA 挿入形質転換植物を取得した。取得した種子から、これら遺伝子のホモ接合体を単離した後、各遺伝子の小胞体ストレス応答への関与について、上述の(2)-①と(2)-②と同様の方法を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) 9つの AtPLC 遺伝子のうち、入手可能であった5種類の T-DNA 挿入形質転換植物のホモ接合体 (*plc1-1*, *plc2-1*, *plc3-1*, *plc4-1*, *plc6-1*)の単離に成功した。これら植物体がヌル変異体であることを示した (図1)。

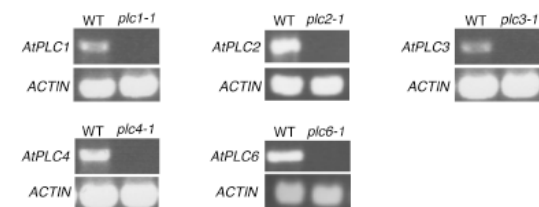


図1: RT-PCR 法による AtPLC 遺伝子転写産物の解析結果。ACTIN 遺伝子の転写産物をコントロールとして用いた。

これらヌル変異体を用いて、ホスフォイノシタイドのリピドミクス解析をおこなった。その結果、*plc2-1* 変異体でのみ野生型と比較して PLC の基質である PI(4,5)P<sub>2</sub> 及び PI4P の量が増加した (図2)。このことは、ホスフォイノシタイド代謝において、AtPLC2 が主要な酵素であることを示唆する。

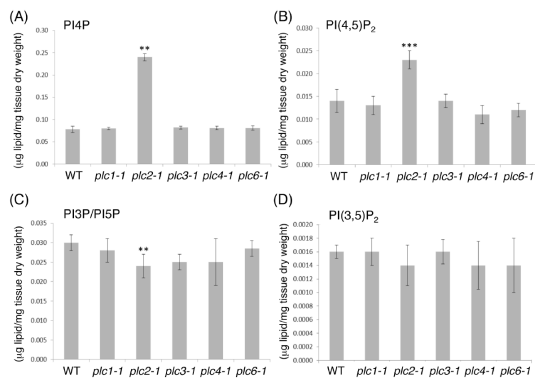
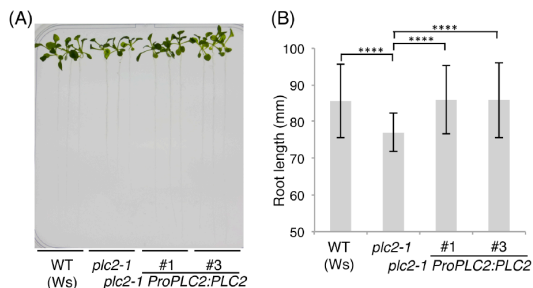


図 2 : 野生型及び AtPLC 変異植物体におけるフォスフォイノシタイドの脂質プロファイリング。

(A) Phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P), (B) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P<sub>2</sub>], (C) Sum of phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) and phosphatidylinositol 5-phosphate (PI5P), (D) Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate [PI(3,5)P<sub>2</sub>]. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (Student's t-test)

(2) AtPLC2 変異植物体では、野生型と比較して根の発育欠損を示すことを見出した。この発育欠損は、外部から AtPLC2 遺伝子を導入した形質転換植物体では回復することを示した (図 3)。

図 3 : *plc2-1* 変異植物体における根の生育欠



損。(A)野生型、*plc2-1*、2つの AtPLC2 相補形質転換植物体の出芽後 15 日目の写真。(B)(A)で示した植物体の主根の長さ。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (Student's t-test)

(3) AtPLC2 変異植物体が、ツニカマイシンが誘起する小胞体ストレスに対して脆弱であることを明らかにした (図 4)。

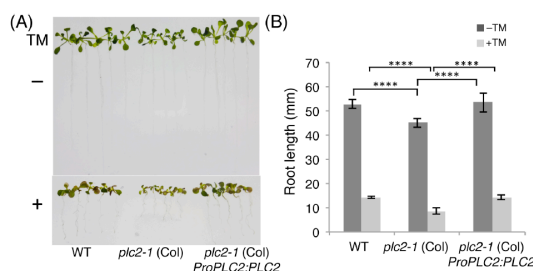


図 4 : *plc2-1* 変異植物体は小胞体ストレスに脆弱である。(A)野生型、*plc2-1* 変異植物体、AtPLC2 相補形質転換植物体を 7 日間通常培地で生育し、引き続きさらに 6 日間小胞体ストレス条件で培養した植物体の代表的な芽生えの写真。(B)植物体(A)の主根の長さを測定したもの。\*\*\*P<0.0001 (Student's t-test)

(4) シロイヌナズナ植物体内での AtPLC2 の組織特異性を *ProPLC2::PLC2-GUS* を導入した形質転換植物体の組織化学的染色により明らかにした。AtPLC2 は葉や花、根などの組織で発現し、特に維管束で強い発現が見られた。

さらに、AtPLC2 の細胞内局在を *ProPLC2::PLC2-Venus* を導入した形質転換植物体の Venus 蛍光タンパク質の観察により明らかにした。AtPLC2 は細胞内において、細胞膜局在マーカー FM4-64 と共局在した。このことから、AtPLC2 が主に細胞膜に存在する酵素であることを示した。

(5) シロイヌナズナの三量体 G タンパク質の各サブユニット(α, β, γ)それぞれをコードする遺伝子の T-DNA 挿入形質転換植物を取得し、ホモ接合体の単離に成功した。単離した植物体の小胞体ストレス耐性を調べたところ、ベータサブユニットをコードする AGB1 遺伝子を破壊した植物体でのみ、顕著な欠損が見られた。この欠損は、外部から AGB1 を導入した形質転換植物体においては観察されなかった。以上の結果から、シロイヌナズナ三量体 G タンパク質の中で、特に AGB1 が小胞体ストレス耐性に重要であることを示した。

(6)タンパク質の糖鎖付加反応において、ドリコールリン酸が重要な働きをすることが知られている。しかしながら、シロイヌナズナでは、ドリコールをリン酸化するリン酸化酵素が未同定であった。我々はゲノムの相同性解析から AtDOK1 遺伝子を見出し、AtDOK1 が植物の発生に重要であることを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① [Kazue Kanehara](#), Chao-Yuan Yu, Yueh Cho, Wei-Fun Cheong, Federico Torta, Guanghou Shui, Markus R Wenk, Yuki Nakamura. Arabidopsis AtPLC2 is a primary phosphoinositide-specific phospholipase C in phosphoinositide metabolism and the endoplasmic reticulum stress response. *PLoS Genetics*, 査読有、2015、pp. 1 - 19、DOI:10.1371/journal.pgen.1005511

② Yueh Cho, Chao-Yuan Yu, [Tatsuo Iwasa](#), [Kazue Kanehara](#). Heterotrimeric G

protein subunits differentially respond to endoplasmic reticulum stress in Arabidopsis. *Plant Signaling & behavior* 査読有、2015、pp. 1 - 5、DOI:10.1080/15592324.2015.1061162

③ Kazue Kanehara, Yueh Cho, Ying-Chen Lin, Chia-En Chen, Chao-Yuan Yu, Yuki Nakamura. Arabidopsis DOK1 encodes a functional dolichol kinase involved in reproduction. 査読有、Vol. 81、2015、pp. 292 - 303、DOI:10.1111/tbj.12727

[学会発表] (計5件)

① Kazue Kanehara, Chao-Yuan Yu, Yueh Cho, Wei-Fun Cheong, Federico Torta, Guanghou Shui, Markus Wenk, Yuki Nakamura. Arabidopsis AtPLC2 is a primary phosphoinositide-specific phospholipase C in phosphoinositide metabolism and endoplasmic reticulum stress response (2015) 6<sup>th</sup> International Singapore Lipid Symposium (ISLS) & Asian Symposium on Plant Lipids (ASPL), Singapore, Singapore

② Yueh Cho, Chao-Yuan Yu, Kazue Kanehara. Arabidopsis DOK1 encodes a functional dolichol kinase involved in reproductive processes (2015) 56<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologist, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

③ Kazue Kanehara, Chia-En Chen, Ying-Chen Lin, Tatsuo Iwasa. Arabidopsis DOK1 encodes a functional dolichol kinase in protein glycosylation. (2014) Annual scientific meeting of the American Society of Plant Biologists 2014, Oregon, USA

④ Yuki Nakamura, Chia-En Chen, Yu-Chi Liu, Wei-Fun Cheong, Guanghou Shui, Tatsuo Iwasa, Markus Wenk, Kazue Kanehara. Phosphoinositides metabolism is involved in endoplasmic reticulum homeostasis in Arabidopsis. (2013) 3<sup>rd</sup> International Conference on Plant Vascular Biology 2013, Helsinki, Finland

⑤ Kazue Kanehara, Chia-En Chen, Yu-Chi Liu, Wei-Fun Cheong, Guanghou Shui, Tatsuo Iwasa, Markus Wenk, Yuki Nakamura. A phospholipase C involved in phosphoinositides metabolism and endoplasmic reticulum homeostasis (2013) 6<sup>th</sup> European Symposium on Plant Lipids, Bordeaux, France

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

金原和江 (KANEHARA, Kazue)  
室蘭工業大学・工学研究科・客員准教授  
研究者番号：30587746

### (2)研究分担者

岩佐達郎 (IWASA, Tatsuo)  
室蘭工業大学・工学研究科・教授  
研究者番号：00133926