

プロジェクト名：植物細胞膜の改変による環境ストレス耐性植物の分子育種

代表者：川合 真紀（理工学研究科・准教授）

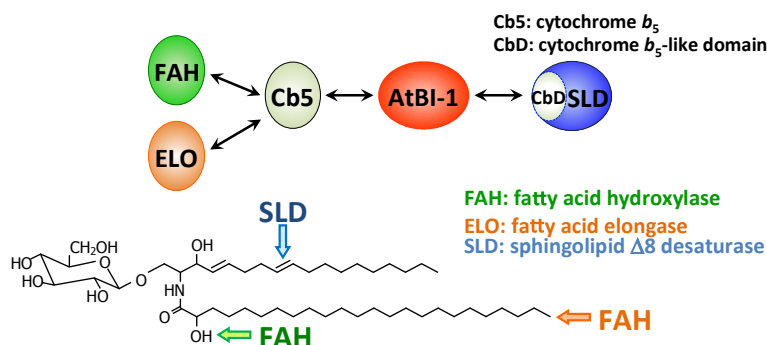
## 1 研究の目的

近年、人類の活動による環境破壊が深刻な問題になるとともに、人口増加による食料不足や、気候変動が食料生産にもたらす悪影響が強く懸念されている。本研究では、植物細胞膜の構造を改変することにより、環境ストレス耐性能力が向上した植物を分子育種することを最終的な目的とする。そのため、申請者がこれまで研究対象として取り組んできたシロイヌナズナの小胞体膜タンパク質（BI-1）の機能解析と、イネを用いた応用研究を目指す。BI-1 を高発現させたイネの培養細胞はメチルピオロゲンや過酸化水素などの活性酸素種に対して耐性を示す。その分子機構として、申請者らはBI-1 の相互作用因子の同定を進め、複数の脂質代謝関連酵素がBI-1 によって物理的に相互作用することを明らかにした。これらの成果を基に、本プロジェクトでは、スフィンゴ脂質の不飽和化酵素の発現量を変えた形質転換植物を用いて、本因子の植物環境応答における機能の解明を目指す。

## 2 研究背景

我々の研究グループでは、長年にわたり、生物界に広く保存された酸化ストレス誘導性細胞死の抑制因子であるBI-1 (Bax Inhibitor-1)の機能解明の研究をおこなってきた。植物は様々に変化する環境条件下で、それらに応答して細胞内の状況を変化させることで適応し、生育している。そのような、外的な環境ストレスに対する耐性能力を高めるための基盤研究として、BI-1 の機能が注目されている。これまでの研究から、BI-1 を高発現させた植物細胞は、サリチル酸や過酸化水素、メチルピオロゲンなどが引き起こす酸化ストレス誘導性細胞死に対して耐性を示す事が明らかとなっている。また、植物が様々なストレスに曝されたときに、その遺伝子発現量が上昇する事も知られている。近年、我々の研究室では本因子と相互作用する因子の単離を進めてきた。その結果、複数の脂質代謝酵素がBI-1 と電子伝達因子であるシトクロム b5（あるいはシトクロム b5 様ドメイン）を介して相互作用し、脂質組成に影響を与えていることを明らかにした。これまでにBI-1 との物理的、機能的相互作用が示唆された因子としては、スフィンゴ脂質ヒドロキシル化酵素（FAH）、脂肪酸伸長酵素（ELO）、スフィンゴ脂質 $\Delta 8$ 不飽和化酵素（SLD）があり、これら全てがスフィンゴ脂質に関する因子であったことから、酸化ストレス耐性の鍵となるのが脂質代謝の中でも特にスフィンゴ脂質代謝であると考えられた。スフィンゴ脂質は細胞膜上で、イオンチャネルや受容体などの環境ストレス応答に

関わるシグナル因子を局在化させるためのマイクロドメイン構造体として機能していることが知られている。昨年の研究では、BI-1 の高発現によって酸化ストレス耐性を獲得したイネの培養細胞を用い、そこから界面活性剤不溶性の画分としてマイクロドメインを精製し、含まれる脂質の組成分析と、マイクロドメインタンパク質のプロテオーム解析を行い、両者の比較を行った。そ



図：スフィンゴ脂質の構造とロイヌナズナBI-1 (AtBI-1) 相互作用因子。BI-1 と相互作用するとして酵母を用いたTwo Hybridスクリーニングによってシトクロム b5 (Cb5) が単離されたのを皮切りに、Cb5 (または Cb5 ドメイン) を介してBI-1 と相互作用する因子として、FAH、ELO、SLD 等も同定された。これらは全てスフィンゴ脂質の生合成に関与する因子であった。BI-1 はこれらの酵素複合体の制御因子として作用していると考えられる。

の結果、マイクロドメインを構成する脂質組成が両者の間で異なっており、BI-1 過剰発現によりスフィンゴ脂質の量が増加していることが確認された。また、LC-MS/MS システムを用いたタンパク質同定により、マイクロドメイン上に局在する複数のタンパク質の存在量が著しく変化していることが明らかとなっている。本年度は、BI-1 と相互作用する因子の一つであるスフィンゴ脂質  $\Delta 8$  不飽和化酵素 (SLD) 自体の環境ストレス応答における機能について解析をおこなうことにした。

### 3 研究成果と今後の展望

シロイヌナズナのゲノムには *AtSld1* と *AtSld2* という 2 つの *Sld* 遺伝子が存在する。スフィンゴ脂質は、植物の全脂質の約 10% を占めると考えられており、長鎖塩基 (LCB) と脂肪酸で構成されるセラミドを基本骨格としている。酵母では、シロイヌナズナの SLD を高発現させることによってスフィンゴ脂質組成を変化させるとアルミニウム耐性が付与されることが報告されるなど、環境ストレス応答に重要な役割を担っている可能性が考えられる。

そこでまず、*AtSld1* および *AtSld2* にそれぞれ T-DNA が挿入された変異体を入手し、また、カリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーターの下流にそれぞれの cDNA を連結して過剰発現させたシロイヌナズナ植物体の作出をおこなった。発現量を確認したのち、これらの植物系統の生育を調べたが、通常の生育条件下では、野生型との間に明確な違いは無かった。これらの形質転換体で実施にスフィンゴ脂質の LCB 組成が変化しているかどうかを調べた。22°C で育成した播種後 21 日目の植物体の地上部から全脂質を抽出し、ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて全脂質中の LCB 組成を解析した。その結果、*Atsld1* のノックアウト株では  $\Delta 8$  位不飽和型 LCB の割合が減少し、飽和型 LCB の割合が増加していた。さらに *Atsld1*、*Atsld2* 双方が欠失した系統では、不飽和型 LCB が検出されなかった。また、これらの遺伝子の過剰発現体では、飽和 LCB が減少し、不飽和 LCB が増加していた。これらの結果から、これらの遺伝子が実際に LCB の C8 位を不飽和化する機能を持っているが、それらの組成の変化は、通常の生育条件下では植物の形態や生育に大きな影響を与えない事が明らかとなった。

一方、マイクロアレイデータベースで *AtSld1*、*AtSld2* 遺伝子の発現を調べると、*AtSld1* のみ低温誘導性の発現をする可能性が示された。そこで、22°C で育成したシロイヌナズナ植物体を 4°C で 24 時間処理し、RNA を抽出して RT-PCR により発現量を調べた。その結果、実際に *AtSld1* のみが低温処理開始後 1-2 時間目に発現量が増加することがわかった。そこで、*AtSLD* 形質転換体の低温応答性を調べた結果、*AtSld1* の遺伝子機能が失われたノックアウト株では、低温ストレスに体する感受性が増加している事が明らかとなった。

これらの結果は、AtSLD1 が関与する LCB の  $\Delta 8$  位が不飽和化されたスフィンゴ脂質の低温条件下での合成が、植物の低温耐性に重要な役割をもち、その改変により植物の低温耐性能力を向上させられる可能性が新たに示された。今後、 $\Delta 8$  位の不飽和化度が低い植物種に、*AtSld1* を働かせて不飽和度を上昇させ、低温耐性能の変化を調べる等の研究が必要である。

### 4 発表論文

M. Nagano, K. Takahara, M. Fujimoto, N. Tsutsumi, H. Uchimiya, M. Kawai-Yamada (2012) Arabidopsis sphingolipid fatty acid 2-hydroxylases (*AtFAH1* and *AtFAH2*) are functionally differentiated in fatty acid 2-hydroxylation and stress responses. *Plant Physiology*, 159, 1138-1148.

M. Nagano, H. Uchimiya, M. Kawai-Yamada (2012) Plant sphingolipid fatty acid 2-hydroxylases have unique characters unlike their animal and fungus counterparts. *Plant Signaling and Behavior*, 7, 1388-1392.

A. Miyagi, M. Uchimiya, M. Kawai-Yamada, H. Uchimiya (2013) Impact of aluminium stress on oxalate and other metabolites in *Rumex obtusifolius*. *Weed Research*, 53, 30-41.