

植物におけるスフィンゴ脂質の特異構造と機能

石川 寿樹

埼玉大学 大学院理工学研究科
〒338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保 255

Unique structures and functions of sphingolipids in plants

Toshiki Ishikawa

Graduate School of Science and Engineering, Saitama University
255 Shimo-Okubo, Sakura-ku, Saitama, Japan

Keywords: ceramide, lipidomics, membrane nanodomains, sphingolipid

DOI: 10.24480/bsj-review.15c4.00269

1. はじめに

スフィンゴ脂質は、長鎖塩基と脂肪酸からなるセラミド疎水骨格と、糖やリン酸を含む多彩な親水性頭部で構成される複合脂質であり、生体膜の構成要素として真核生物に普遍的に存在する。そのユニークな化学構造に起因する特性により、膜ナノドメインを介した情報伝達や、細胞表面の分子情報提示といった特異機能を果たしている。このような分子特性は本質的には真核生物に共通であるものの、スフィンゴ脂質の化学構造は生物ごとに実に多彩であり、それぞれに特有の分子機能が進化してきたことがうかがえる。本稿では、植物固有なスフィンゴ脂質の化学構造を形成する代謝機構とその生物学的意義について、最近の研究を紹介する。

2. スフィンゴ脂質の基本構造

植物に見出されるスフィンゴ脂質の大部分は、疎水骨格であるセラミドと多彩な親水部からなる複合脂質である。セラミドは、長鎖塩基 (long-chain base: LCB) の脂肪酸アシル誘導体であり、骨格構造がアミド結合で構成される点で極めてユニークな脂質分子である (図 1)。

セラミドに取り込まれる脂肪酸の鎖長は C16 から C26 で、極長鎖脂肪酸を主成分とし、また奇数鎖脂肪酸を比較的多く含む点でグリセロ脂質と異なっている。また、セラミドの長鎖塩基と脂肪酸は、いずれもグリセロ脂質のアシル鎖に比べて不飽和結合の折れ曲がりがない直線的な構造をとる。このため、生体膜中のセラミド分子間には強い疎水性相互作用が生じる。さらに植物には、動物で主要な LCB であるスフィンゴシンよりもヒドロキシ基が 1 つ多いファイトスフィンゴシンと 2-ヒドロキシ脂肪酸からなるセラミドが主成分として含まれる。これらのヒドロキシ基およびセラミド骨格のアミド基は、水素結合の供与基としてはたらくため、骨格にエステル基などの受容基しかもたないグリセロ脂質と異なり、セラミド分子同士は互いに強く引き寄せあう。このようなセラミド構造に基づく自己集合性により、

スフィンゴ脂質は脂質ラフトやナノドメインと呼ばれる高密度な生体膜領域を形成する。この膜領域は、特定のタンパク質が乗り合わせる“いかだ (ラフト)”となり、生体膜を介したシグナル伝達や物質輸送、膜交通などのプラットフォームとして機能している。

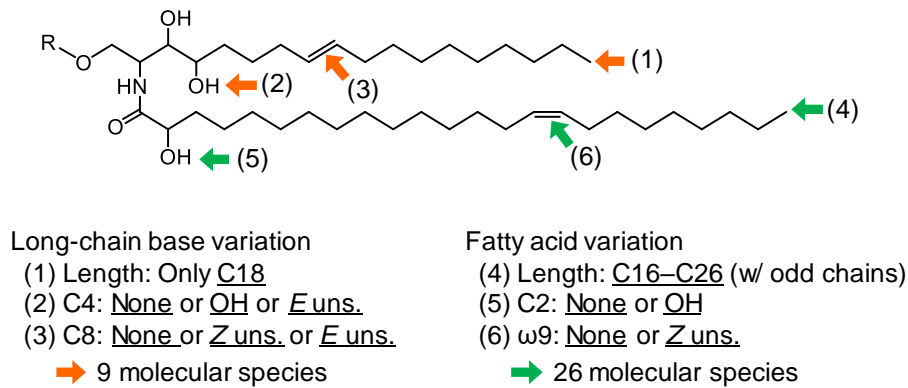


図1. 植物にみられるセラミドの化学構造

植物のセラミドを構成する長鎖塩基と脂肪酸の化学修飾部位およびそのバリエーションを示す。Rは親水部。

こうしたセラミドの生体膜脂質としての機能性は、真核生物の間で概ね共通であると考えられている。しかしながら、その分子機能を規定するスフィンゴ脂質の化学構造には多様性がみられ、特に親水部の構造は生物種間で大きく異なっている。動物の複合スフィンゴ脂質は、セラミドにリン酸を含む極性基が結合したリン脂質クラスと、セラミドに糖鎖が付加された糖脂質クラスに分類される (Merrill Jr 2008)。前者は、ホスファチジルコリンの親水部が転移されたスフィンゴミエリンが代表的であり、後者はシアル酸を含む糖鎖構造を有するガングリオシド類や、ABO式血液型の抗原糖鎖が付加された糖脂質が良く知られている

(Kushi et al. 1995)。一方、植物では、セラミドにグルコース1分子のみが付加されたグルコシルセラミド (GlcCer) と、イノシトールリン酸およびオリゴ糖鎖が付加されたグリコシルイノシトールホスホセラミド (GIPC) が主要な複合スフィンゴ脂質である (Markham et al. 2006; Markham and Jaworski 2007; Cacas et al. 2013)。図2に植物 GIPC の基本構造を示す。GIPC の親水部のうち、基部側のイノシトールリン酸および第1糖残基のグルクロン酸は、陸上植物に共通に保存されたコア構造で、第2糖以降は植物種によって異なる可変構造である。第2糖にマンノースなどのヘキソースをもつ H 型と、グルコサミンまたは N-アセチルグルコサミンをもつ N 型に分類され、それぞれ GIPC mannosyl transferase 1 (GMT1) および glucosamine inositolphosphoceramide transferase 1 (GINT1) と呼ばれる糖転移酵素によって選択的に合成される (Fang et al. 2016; Ishikawa et al. 2018; 図2)。栄養組織における GIPC の糖鎖型組成を比較すると、アブラナ科やキク科では H 型のみを含むのに対し、ナス科やイネ科は逆に N 型のみを有しており、マメ科のように H 型と N 型の両方をもつケースもある (Cacas et al. 2013; Ishikawa et al. 2016; Moore et al. 2021)。さらにヘキソース (分子種未同定) が付加された3糖タイプも自然界に広く見出される。これは双子葉植物では微量かほとんど検出されないことが多いが、イネ科植物やコケ植物では主成分として豊富に含まれる (Cacas et al. 2013; Ishikawa et al. 2016; Steinberger et al. 2021)。さらに複数のペントースが付

加されたより大きな GIPC も報告されているが、含量が少なく、詳細な構造や合成系は未同定である (Buré et al. 2011)。

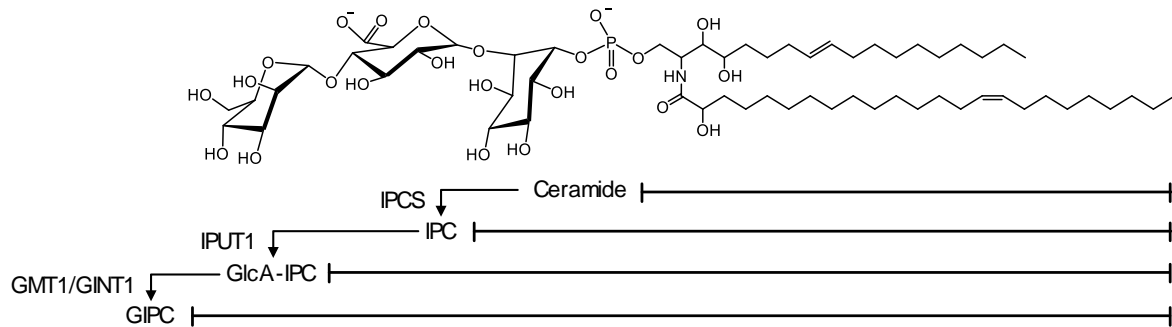


図 2. 植物 GIPC の構造と合成経路

シロイヌナズナで主要な H 型/2 糖タイプの GIPC の構造および合成酵素を示す。IPC; イノシトールホスホセラミド。GlcA-IPC; グルクロノシルイノシトールホスホセラミド。

3. 植物スフィンゴ脂質を対象とするリポミクス

植物 GIPC の発見は 20 世紀中頃まで遡るが (Carter et al. 1958), その後研究は進まず、長い間謎に包まれた存在であった。その理由の 1 つは、GIPC の難溶性にある。生体脂質の抽出溶媒として汎用されるクロロホルムや、脂質メタボロミクス (リポミクス) で分析溶媒に用いられるアセトニトリルなどへの溶解性が極めて低く、一般的な脂質分析法が適用できないことが GIPC の研究を妨げる要因となってきた。GIPC に適した実験手法の確立は 2000 年代の中盤以降になってからで、はじめにイソプロパノール/ヘキサン/水混合系による抽出法と、液体クロマトグラフータンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いた分析手法が報告された (Markham and Jaworski 2007)。その後、複数の研究グループによって GIPC の調製法や分析手法が考案されており、著者らも 1-ブタノール/メタノール/水混合系を用いた高速な抽出単離法を独自に確立している。現在では、GIPC だけでなく、遊離型のセラミドや GlcCer, さらにこれらの代謝中間体や分解産物も含めた全スフィンゴ脂質を含む粗抽出物を、簡便な操作で短時間内に調製できるようになり、オミクス的な大規模解析が可能になっている (Ishikawa et al. 2016; Steshin and Ishikawa 2021; Ukawa et al. 2022)。

スフィンゴ脂質には物性が大きく異なる複数のクラスが存在し、また上述のように使用できる溶媒にも制限があるため、一般的に用いられる固相抽出などの前処理法や分画法を適用することが容易ではない。そこで HPLC による化学分離と質量分析による選択的検出を組み合わせることで、脂質粗抽出物をそのまま分析する手法が採用される。著者らは、植物に含まれる多彩なスフィンゴ脂質分子群を、一度の分析ランで網羅定量するスフィンゴリポミクスのシステムを構築している (Ishikawa et al. 2016; Ukawa et al. 2022)。分離には C18 逆相カラムおよびテトラヒドロフラン/メタノール/酸性ギ酸アンモニウム水溶液からなるグラジエント系を用い、大きな極性基をもつ GIPC から、疎水性の強い遊離セラミドまで順に分離する。検出にはトリプル四重極型 MS/MS を用い、個々の分子種に特徴的な MS フラグメントを標的とした multiple reaction monitoring (MRM) 法によって、主要成分から微量成分までダイナミックレンジの広い定量分析が可能である。スフィンゴ脂質は、セラミドのアミド結

合部にプロトンが付加しやすいため、一段目の MS では分子量+1 にあたる m/z ($[M+H]^+$) が高感度に検出される。さらに、ガス衝突部では LCB もしくはセラミドに相当するフラグメントが高効率に生じるので、二段目の MS でそれらを標的とすることで特定の構造をもつ分子種を選択的に検出できる。LCB と脂肪酸の組成は、脂質抽出画分の加水分解物の解析によって容易に決定することができるため、それらの全組み合わせに相当する MRM を指定することで、理論上存在しうる全分子種を標的とした選択的検出系を構築できる。しかしながら、植物組織には少なくとも数百種に及ぶスフィンゴ脂質分子種が存在しており、その全てを検出するための MRM を並列させようとする感度や定量性を維持できない。そこで MRM による検出を各分子種の溶出時間付近に限定する分析スケジュールを組むことにより、1,000 以上の分子種を一斉に定量プロファイリングすることができる (図 3)。

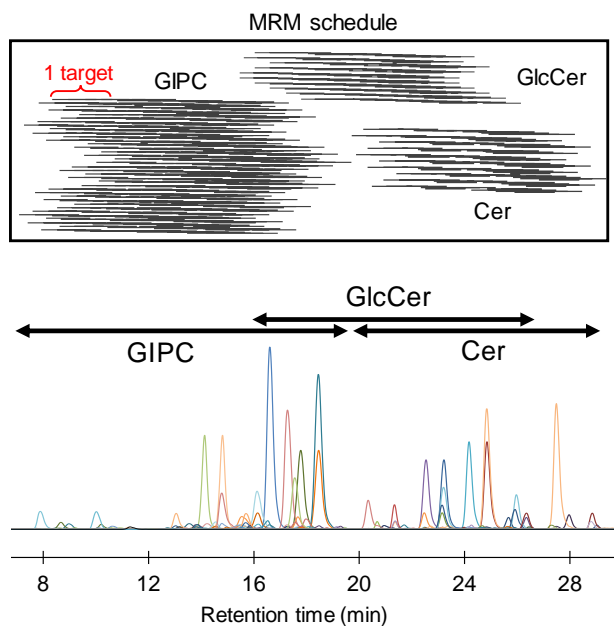


図 3. 植物スフィンゴ脂質の一斉分析手法
(上) 個々の分子種の検出を HPLC の溶出時間の前後にスケジュール化することで同時測定対象分子数を 100 前後に抑え、総計千種以上の分子種を一度の分析で定量する。
(下) 植物脂質粗抽出物を分析した例。異なる色は、それぞれ異なる分子種 (MRM) のクロマトグラムを示す。

4. 植物に特徴的なセラミド構造と生理機能

植物のセラミドの大部分は LCB C-4 位と脂肪酸 C-2 位にヒドロキシ基をもち (図 2), スフィンゴ脂質分子間に強固な水素結合が形成される。実際に、スフィンゴ脂質の 2-ヒドロキシ脂肪酸含量が低下したイネやシロイヌナズナでは、細胞膜上のナノドメイン構造が減少し、病原応答に関与する膜タンパク質の機能が低下することが報告されている (Nagano et al. 2016; Ukawa et al. 2022)。また、LCB C-4 ヒドロキシ化酵素を欠損したシロイヌナズナは致死的な表現型を示すことから、セラミドのヒドロキシ化は植物に必須な機能を果たしていると考えられる (Chen et al. 2008)。

一方、セラミド骨格に含まれる不飽和結合は、グリセロ脂質における脂肪酸の不飽和結合に比べると数は少ないものの、同様に脂質分子間の疎水性相互作用を抑制し、膜流動性を高める作用がある。植物のセラミドには、LCB Δ -8 位と脂肪酸 ω -9 位に不飽和結合が存在し、いずれも細胞膜の流動性低下を毒性要因とする低温や Al^{3+} への耐性に寄与していることが明らかになっている (Ryan et al. 2007; Chen et al. 2012; Chen and Thelen 2013; Nagano et al. 2014; Sato et al. 2020)。LCB Δ -8 不飽和結合を導入する sphingolipid LCB desaturase (SLD) が全て

の陸上植物に保存されているのに対し、脂肪酸 ω -9 不飽和化は種子植物の一部とコケ植物に特有であり、さらにそれらの遺伝的背景は異なることが示唆されている。たとえばシロイヌナズナでは、アシル CoA 不飽和化酵素ファミリーの 1 つである acyl-CoA desaturase 2

(ADS2) が、C24 および C26 の極長鎖脂肪酸に特異的な ω -9 不飽和化活性を有しており、これらの脂肪酸種を含むセラミドの合成に必須である (Smith et al. 2013)。しかしながら、ADS2 のオルソログは、シロイヌナズナに近縁なアブラナ科植物など限られた植物種にしか存在しない。最近、ヒメツリガネゴケにおいて、スフィンゴ脂質アシル鎖に不飽和結合を導入する sphingolipid fatty acid desaturase (SFD) が報告された (Resemann et al. 2021)。SFD はシロイヌナズナの ADS2 と相同性を示さないことから、これらの酵素遺伝子はそれぞれ独立に獲得されたと考えられる。単子葉植物のイチゴツナギ亜科 (ムギ類) など同様のセラミド脂肪酸の不飽和結合をもっているが、ADS2 と SFD のいずれの相同遺伝子もゲノム中に存在しないことから、シロイヌナズナやコケ植物と異なる独自の不飽和化機構を有していると推測される。このように、スフィンゴ脂質の脂肪酸不飽和化は収斂進化的に獲得されたと推定され、低温など特定の環境下における機能性に特化したものであることが示唆される。

最近、我々は LCB と脂肪酸の不飽和結合をいずれも欠損したシロイヌナズナ多重変異体において、低温耐性が著しく低下することを見出した。シロイヌナズナのような低温に強い植物では、4°C 前後の非凍結温度に短期間おかれた程度では大きな障害を受けることはなく、むしろさらなる温度低下による凍結障害に対する抵抗性を増大させる、いわゆる低温馴化と呼ばれる能動的な生理プロセスが誘導される。低温馴化過程では植物体の成長は抑制されるものの、通常の生育温度に戻すと速やかに馴化状態から脱し、植物体は正常な成長を再開する。これに対し、セラミド中の不飽和結合を完全に欠損したシロイヌナズナは、4°C の低温処理によって不可逆な損傷を受け、生育温度に戻すと地上部組織が枯死する表現型を示す (図 4)。このことは、細胞膜におけるスフィンゴ脂質の化学特性が、植物細胞の basal な低温耐性を規定する要因であることを示唆している。この変異体についてさらに詳細に解析を進めることで、植物の低温耐性の本質的な仕組みが今後明らかになることが期待される。

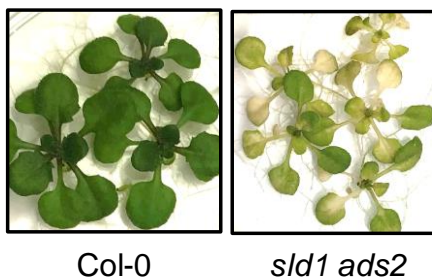


図 4. セラミド不飽和結合欠損植物の低温感受性
22°C で 2 週間生育させた植物体を 4°C で 1 週間処理し、再び 22°C に戻して 1 週間後の写真。野生型は特に障害を示さないが、セラミド不飽和結合欠損変異体 (*sld1 ads2*) は成長が停止し葉が白化する。

5. 植物固有なスフィンゴ脂質糖鎖の機能性

スフィンゴ脂質は細胞膜脂質二重層の外葉に偏局在していると考えられている (Tjellström et al. 2010; Cacas et al. 2016; Cassim et al. 2019)。従って、スフィンゴ脂質の親水部はアポプラストに露出しており、細胞膜表層の特異分子環境の形成や、膜タンパク質や細胞外因子との分子間相互作用に寄与していると推測されている (Mortimer and Sheller 2020)。Lenarčič

らは、植物病原菌に広く保存された Necrosis and ethylene-inducing peptide 1-like (NLP) と呼ばれる毒素タンパク質が、GIPC 糖鎖を分子標的とすることを見出した (Lenarčič et al. 2017)。病原菌から分泌された NLP が植物細胞表面の GIPC 糖鎖に結合すると、タンパク質の一部が細胞膜に陥入して小孔を形成する毒性機序が提唱されている (Pirc et al. 2023)。興味深いことに、2 糖型 GIPC に結合した NLP は細胞膜に陥入するが、3 糖型 GIPC に結合した場合は、糖 1 分子の大きさの分だけ細胞膜から遠ざかることになり、細胞膜を損傷できない。実際、植物体に含まれる 2 糖型と 3 糖型の GIPC 比率は NLP 感受性と相関することが示されており、GIPC 糖鎖の構造タイプが病原菌の宿主選択性を決定する要因となっている。もしかすると、3 糖型の GIPC は病原体毒素との共進化によって獲得されたデコイ分子としての側面をもつかもしれない。

また、GIPC は塩ストレスの受容に寄与することが示唆されている。植物を塩ストレスにさらすと、細胞内 Ca^{2+} が一過的に上昇し、下流のストレス応答を活性化するトリガーとなる (Knight et al. 1997)。この Na^+ 依存的な Ca^{2+} 変動が減衰し、塩ストレス耐性が低下した変異体として、*mocal* が単離された (Jiang et al. 2019)。*mocal* は、GIPC 第 1 糖のグルクロン酸転移酵素をコードする *IPUT1* (図 2) の C 末端付近に T-DNA が挿入されたノックダウン変異体であり、野生型植物に比べ GIPC 含量が著しく低下している。さらに、*mocal* 変異によってグルクロン酸残基を欠損したイノシトールホスホセラミドは、正常な糖鎖構造を有する GIPC に比べ、 Na^+ の結合容量が低下する。以上のことから、GIPC のグルクロン酸残基は細胞外の Na^+ と直接結合し、近傍の Ca^{2+} チャンネルを活性化することによって塩ストレス応答の誘導に寄与するモデルが提唱されている (Jiang et al. 2019)。

H 型と N 型の 2 種類の GIPC 糖鎖型に特異的な生理機能についても明らかになってきている。H 型糖鎖を合成できないシロイヌナズナ *gmt1* 変異体は、重篤な生育不全と恒常的に細胞死が誘導される表現型を示し、土壌栽培では発芽後ほとんど成長せずに枯死に至る (Fang et al. 2016)。この変異体に *GINT1* を異所的に発現させ、H 型の欠損を N 型糖鎖で置き換えた異種相補系統では、*gmt1* の細胞死はみられなくなるが、地上部や根の成長不全や稔性低下など、依然として重篤な表現型が残る。このことから、N 型では相補できない H 型糖鎖に特異的な機能が存在することが明らかである。一方、N 型糖鎖を欠損した *gint1* 変異体は、*gmt1* のような致死的な表現型は示さず、むしろ種子の肥大成長が顕著に促進される

(Ishikawa et al. 2018)。この表現型も、H 型糖鎖では相補できない N 型固有機能の欠損によるものである。

さらに、GIPC 糖鎖型に特異的な機能として、共生相互作用への関与が報告されている。マメ科植物では、H 型と N 型の合成を担う *GMT1* と *GINT1* が全身で発現し、両方の糖鎖が混在した状態にある。*Medicago truncatula* に根粒菌を接種すると、*GINT1* の発現上昇と *GMT1* の発現低下が誘導される。その結果、根粒組織では非感染部位と比べて N 型 GIPC の比率が大きく上昇する (Moore et al. 2021)。そこで RNAi 法により *GINT1* の発現を抑制したところ、根粒の総数には変化がなかったが、そのほとんどは根粒菌の増殖やレグヘモグロビンの蓄積が十分でなく、窒素固定能が著しく低下することが明らかになった。*GINT1* 抑制系統の根粒組織には、野生型組織にはみられない断片化した異常な膜構造が観察されること

から、N型 GIPC がシンビオソームの膜構造形成に重要な役割を担っていることが推測される。また、同様の共生不全の表現型は、同じ *GINT1* 抑制系統にアーバスキュラー菌根菌を接種した際にも観察されることから、GIPC は植物-微生物間の共生関係に広く寄与していることが考えられる (Moore et al. 2021)。これらの生物間相互作用の解析を通じて、植物細胞膜表面に存在するスフィンゴ脂質糖鎖の特異機能が解明されることが期待される。

6. おわりに

植物におけるスフィンゴ脂質研究は、リポドミクス技法の確立と、合成関連遺伝子の同定によって急速に進展してきた。これにより、植物における脂質組成のダイナミックな変動と、それに伴う膜機能についての理解が進んできた。しかしながら、スフィンゴ脂質の主要な機能場が細胞膜上の微小領域であることを考えると、今後は脂質分子や膜構造の局所的な動態を明らかにすることが必要であり、イメージング手法の発達が不可欠であると考えられる。植物型スフィンゴ脂質糖鎖を特異的に認識する抗体 (Cacas et al. 2016) や、病原体由来の GIPC 結合タンパク質 (Lenarčič et al. 2017) などを利用して、生体中のスフィンゴ脂質分子を可視化する分析ツールの開発が待たれる。また、植物のスフィンゴ脂質研究はこれまで主に合成系に焦点が当てられてきたが、分解代謝系についても遺伝子同定や機能研究が進みつつある (Nagata et al. 2021; Yang et al. 2021; Hasi et al. 2022)。合成と分解の両方の視点から膜脂質の代謝制御の理解が進むだけでなく、合成酵素と分解酵素を巧みに利用した新たな代謝工学的アプローチに繋がることを期待される。

謝辞

本執筆の機会をいただきましたシンポジウムオーガナイザーの永田賢司博士、神保晴彦博士に感謝申し上げます。本研究は、科研費 (19K05941, 22K05553) および国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 助成事業 (JPNP20004) の支援を受けて行われました。

引用文献

- Buré C, Cacas JL, Wang F, Gaudin K, Domergue F, Mongrand S, Schmitter JM (2011) Fast screening of highly glycosylated plant sphingolipids by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 25: 3131–3145. doi: 10.1002/rcm.5206
- Cacas JL, Buré C, Furt F, Maalouf JP, Badoc A, Cluzet S, Schmitter JM, Antajan E, Mongrand S (2013) Biochemical survey of the polar head of plant glycosylinositolphosphoceramides unravels broad diversity. *Phytochemistry* 96: 191–200. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.08.002
- Cacas JL, Buré C, Grosjean K, Gerbeau-Pissot P, Lherminier J, Rombouts Y, Maes E, Bossard C, Gronnier J, Furt F, et al. (2016) Revisiting plant plasma membrane lipids in tobacco: A focus on sphingolipids. *Plant Physiol* 170: 367–384. doi: 10.1104/pp.15.00564
- Carter HE, Celmer WD, Galanos DS, Gigg RH, Lands WEM, Law JH, Mueller KL, Nakayama T, Tomizawa HH, Weber E (1958) Biochemistry of the sphingolipides. X. Phytoglycolipide, a

- complex phytosphingosine-containing lipide from plant seeds. *J Am Oil Chem Soc* 35: 335–343. doi: 10.1007/BF02640547
- Cassim AM, Gouguet P, Gronnier J, Laurent N, Germain V, Grison M, Boutté Y, Gerbeau-Pissot P, Simon-Plas F, Mongrand S (2019) Plant lipids: Key players of plasma membrane organization and function. *Prog Lipid Res* 73: 1–27. doi: 10.1016/j.plipres.2018.11.002
- Chen M, Markham JE, Cahoon EB (2012) Sphingolipid $\Delta 8$ unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in *Arabidopsis*. *Plant J* 69: 769–781. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04829.x
- Chen M, Markham JE, Dietrich CR, Jaworski JG, Cahoon EB (2008) Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 1862–1878. doi: 10.1105/tpc.107.057851
- Chen M, Thelen JJ (2013) ACYL-LIPID DESATURASE2 is required for chilling and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 1430–1444. doi: 10.1105/tpc.113.111179
- Fang L, Ishikawa T, Rennie EA, Murawska GM, Lao J, Yan J, Tsai AY, Baidoo EEK, Xu J, Keasling JD, et al. (2016) Loss of inositol phosphorylceramide sphingolipid mannosylation induces plant immune responses and reduces cellulose content in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 28: 2991–3004. doi: 10.1105/tpc.16.00186
- Hasi RY, Ishikawa T, Sunagawa K, Takai Y, Ali H, Hayashi J, Kawakami R, Yuasa K, Aihara M, Kanemaru K, et al. (2022) Nonspecific phospholipase C3 of radish has phospholipase D activity towards glycosylinositol phosphoceramide. *FEBS Lett* 596: 3024–3036. doi: 10.1002/1873-3468.14520
- Ishikawa T, Fang L, Rennie EA, Sechet J, Yan J, Jing B, Moore W, Cahoon EB, Scheller HV, Kawai-Yamada, et al. (2018) GLUCOSAMINE INOSITOLPHOSPHORYLCERAMIDE TRANSFERASE1 (GINT1) is a GlcNAc-containing glycosylinositol phosphorylceramide glycosyltransferase. *Plant Physiol* 177: 938–952. doi: 10.1104/pp.18.00396
- Ishikawa T, Ito Y, Kawai-Yamada M (2016) Molecular characterization and targeted quantitative profiling of the sphingolipidome in rice. *Plant J* 88: 681–693. doi: 10.1111/tpj.13281
- Jiang Z, Zho X, Tao M, Yuan F, Liu L, Wu F, Wu X, Xiang Y, Niu Y, Liu F, et al. (2019) Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca^{2+} influx. *Nature* 572: 341–346. doi: 10.1038/s41586-019-1449-z
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1997) Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* 12: 1067–1078. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.12051067.x
- Kushi Y, Tsunoda A, Komatsuzaki A, Watanabe K, Kasama T, Handa S (1995) Characterization of Blood-group-ABO (H)-active glycosphingolipids in type-AB human erythrocytes. *Eur J Biochem* 231: 862–867. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.0862d.x
- Lenarčič T, Albert I, Böhm H, Hodnik V, Pirc K, Zavec AB, Podobnik M, Pahovnik P, Žagar E, Pruitt R, et al. (2017) Eudicot plant-specific sphingolipids determine host selectivity of microbial NLP cytolysins. *Science* 358: 1431–1434. doi: 10.1126/science.aan6874

- Markham JE, Jaworski JG (2007) Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21: 1304–1314. doi: 10.1002/rcm.2962
- Markham JE, Li J, Cahoon EB, Jaworski JG (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem* 281: 22684–22694. doi: 10.1074/jbc.M604050200
- Merrill Jr AH (2008) Sphingolipids. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 363–397, Elsevier, Amsterdam. doi: 10.1016/B978-044453219-0.50015-5
- Moore WM, Chan C, Ishikawa T, Rennie EA, Wipf HML, Benites V, Kawai-Yamada M, Mortimer JC, Scheller HV (2021) Reprogramming sphingolipid glycosylation is required for endosymbiont persistence in *Medicago truncatula*. *Curr Biol* 31: 2374–2385. doi: 10.1016/j.cub.2021.03.067
- Mortimer JC, Scheller HV (2020) Synthesis and function of complex sphingolipid glycosylation. *Trends Plant Sci* 25: 522–524. doi: 10.1016/j.tplants.2020.03.007
- Nagano M, Ishikawa T, Fujiwara M, Fukao Y, Kawano Y, Kawai-Yamada M, Shimamoto K (2016) Plasma membrane microdomains are essential for Rac1-RbohB/H-mediated immunity in rice. *Plant Cell* 28: 1966–1983. doi: 10.1105/tpc.16.00201
- Nagano M, Ishikawa T, Ogawa Y, Iwabuchi M, Nakasone A, Shimamoto K, Uchimiya H, Kawai-Yamada M (2014) Arabidopsis Bax inhibitor-1 promotes sphingolipid synthesis during cold stress by interacting with ceramide-modifying enzymes. *Planta* 240: 77–89. doi: 10.1007/s00425-014-2065-7
- Nagata K, Ishikawa T, Kawai-Yamada M, Takahashi T, Abe M (2021) Ceramides mediate positional signals in *Arabidopsis thaliana* protoderm differentiation. *Development* 148: dev194969. doi: 10.1242/dev.194969
- Pirc K, Albert I, Nürnberger T, Anderluh G (2023) Disruption of plant plasma membrane by Nep1-like proteins in pathogen–plant interactions. *New Phytol* 237: 746–750. doi.org/10.1111/nph.18524
- Resemann HC, Herrfurth C, Feussner K, Hornung E, Ostendorf AK, Gömann J, Mittag J, van Gessel N, de Vries K, Ludwig-Müller J, et al. (2021) Convergence of sphingolipid desaturation across over 500 million years of plant evolution. *Nat Plants* 7: 219–232. doi: 10.1038/s41477-020-00844-3
- Ryan PR, Liu Q, Sperling P, Dong B, Franke S, Delhaize E (2007) A higher plant $\Delta 8$ sphingolipid desaturase with a preference for (*Z*)-isomer formation confers aluminum tolerance to yeast and plants. *Plant Physiol* 144: 1968–1977. doi: 10.1104/pp.107.100446
- Sato M, Nagano M, Jin S, Miyagi A, Yamaguchi M, Kawai-Yamada M, Ishikawa T (2020) Plant-unique *cis/trans* isomerism of long-chain base unsaturation is selectively required for aluminum tolerance resulting from glucosylceramide-dependent plasma membrane fluidity. *Plants* 9: 19. doi: 10.3390/plants9010019
- Smith MA, Dauk M, Ramadan H, Yang H, Seamons LE, Haslam RP, Beaudoin F, Ramirez-Erosa I, Forseille L (2012) Involvement of Arabidopsis ACYL-COENZYME A DESATURASE-LIKE2

- (At2g31360) in the biosynthesis of the very-long-chain monounsaturated fatty acid components of membrane lipids. *Plant Physiol* 161: 81–96. doi: 10.1104/pp.112.202325
- Steinberger AR, Merino WO, Cahoon RE, Cahoon EB, Lynch DV (2021) Disruption of long-chain base hydroxylation alters growth and impacts sphingolipid synthesis in *Physcomitrella patens*. *Plant Direct* 5: e336. doi: 10.1002/pld3.336
- Steshin M, Ishikawa T (2021) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a new separation mode for rapid profiling of the *Z/E* isomers of plant glucosylceramides. *J Chromatogr B* 1178: 122807. doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122807
- Tjellström H, Hellgren LI, Wieslander Å, Sandelius AS (2010) Lipid asymmetry in plant plasma membranes: phosphate deficiency-induced phospholipid replacement is restricted to the cytosolic leaflet. *FASEB J* 24: 1128–1138. doi: 10.1096/fj.09-139410
- Ukawa T, Banno F, Ishikawa T, Kasahara K, Nishina Y, Inoue R, Tsujii K, Yamaguchi M, Takahashi T, Fukao Y, et al. (2022) Sphingolipids with 2-hydroxy fatty acids aid in plasma membrane nanodomain organization and oxidative burst. *Plant Physiol* 189: 839–857. doi: 10.1093/plphys/kiac134
- Yang B, Li M, Phillips A, Li L, Ali U, Li Q, Lu S, Hong Y, Wang X, Guo L (2021) Nonspecific phospholipase C4 hydrolyzes phosphosphingolipids and sustains plant root growth during phosphate deficiency. *Plant Cell* 33: 766–780. doi: 10.1093/plcell/koaa054