

脂質が旗振る植物の生命現象

永田 賢司¹, 神保 晴彦^{1,2}

¹ 東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系
〒153-8902 東京都目黒区駒場 3 丁目 8-1

² 埼玉大学 大学院理工学研究科 生命科学部門 分子生物学領域
〒338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保 255

Lipid as a key player in governing various plant processes

Kenji Nagata¹, Haruhiko Jimbo²

¹ Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences,
The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo, 153-8902, Japan

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Saitama university, 255 Shimo-okubo,
Sakura-ku, Saitama, 338-8570, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.15c1.00266

脂質を扱う研究は一見して非常に難しく、参入するハードルが高いと考えられがちである。その理由として、DNA やタンパク質のような馴染み深い生体分子とは異なり、脂質は高い疎水性を持つため、一般的な分子生物学的実験とは全く異なる技術が必要となることが挙げられる。また、生体内には膨大な数の脂質分子種が存在するにも関わらず、脂質がタンパク質のように直接ゲノムにコードされた生体分子ではないため、ポストゲノム時代にあっても脂質分子に関する情報を簡単には得ることができないことも一因であろう。脂質は、研究対象として何かと敬遠されがちであるが、生物を理解する上で、その普遍性や多様性を看過することはできない。我々は、幅広い層が植物脂質の魅力とポテンシャルに気づくとともに植物脂質研究に親しみを持てる場を提供しようと、日本植物学会第 87 回大会 (札幌) において「脂質が旗振る植物の生命現象」と題したシンポジウムを企画した。本総説集は、脂質と植物の生命現象の関わりについて、事例を交えながら最新の研究知見が共有された本シンポジウムの内容を基に執筆されたものである。

本総説集の特徴として、執筆者の多くがもともと脂質研究にバックグラウンドを持たない研究者であることが挙げられる。また、各総説において取り上げる題材も、分子・生体膜・細胞小器官・細胞・組織・個体など広範な生命現象の階層をまたぐものである。そのため本総説集は、普段脂質研究に馴染みがない方にも親しみやすく、かつ幅広い生命現象の階層において脂質が重要な働きを持つことを実感してもらうことができる構成になっている。本総説集を通じて、さまざまな層の読者と研究対象としての脂質の魅力とポテンシャルを共有できれば幸いである。特に、脂質が実に多様な方法を通して多彩な生命現象を制御していることを認識するとともに、脂質との関わりという新たな視点から個々の研究を見直す機会を提供できれば幸いである。

脂質による光合成機能の制御

神保 晴彦

埼玉大学 大学院理工学研究科 生命科学部門 分子生物学領域
〒330-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保 255

Regulation of photosynthesis by lipids

Haruhiko Jimbo

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Saitama university, 255
Shimo-okubo, Sakura-ku, Saitama, 338-8570, Japan

Keywords: Lipase, Lipids, Photoinhibition, Photosystem II

DOI: 10.24480/bsj-review.15c2.00267

1. はじめに

膜脂質は、細胞の境界を定義する重要な生体物質である。こうした観点から、膜脂質分子の機能は、膜の構造形成に注目して研究が進んできた。特に低温障害における膜脂質分子の機能については、脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子欠損株を用いて研究されてきた。その結果、低温ストレス下において多価不飽和脂肪酸が合成されることで、膜の相転移温度を低下させ、低温下で起こる膜構造の崩壊を防ぐ役割があることが明らかとなった。脂質は、生体物質の中でも、特に多く細胞内に存在し、脂質の機能の普遍性・重要性は広く受け入れられている一方で、各脂質分子の生体内での機能の特異性は不明な点が多く存在する。

筆者らは、主に光合成微生物であるシアノバクテリアを用いて、光や CO₂ などの環境変化に応答した膜脂質の代謝回転について研究を行っている。最近、膜脂質の代謝回転が、特に光合成活性の維持に重要な働きをすることが明らかとなってきた。

本稿では、シアノバクテリアの脂質代謝から明らかになってきた、光合成の環境ストレス応答における膜脂質分子の役割について最近の進展を紹介するとともに、今後の研究展開についても解説する。

2. 光合成の機能における膜脂質の役割

光合成の電子伝達反応は、チラコイド膜で行われる。したがって、チラコイド膜を構成する膜脂質には、光合成電子伝達反応に必要な土台としての役割がある。チラコイド膜は、3種類の糖脂質であるモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) , ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG) , スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) と主要なリン脂質であるホスファチジルグリセロール (PG) から主に構成されている (図1)。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*S. 6803*) において、チラコイド膜の 80%以上を占めるガラクト糖脂質 MGDG と DGDG を合成できない *mgdE* 変異株では、前駆体であるグルコ糖脂質 (モノグルコシルジアシルグリセロール: GlcDG) が蓄積しているが、チラコイド膜の構

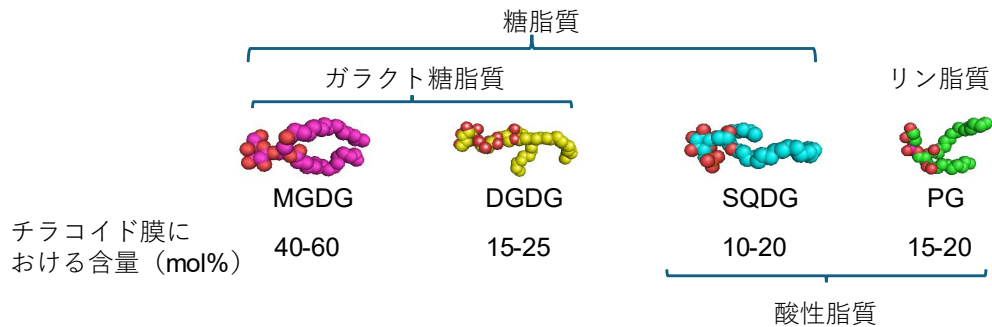


図 1. チラコイド膜を構成する主要な膜脂質

チラコイド膜は、全ての光合成生物において 4 種類のグリセロ脂質から構成される。その組成は、生物種によって異なるが、ほとんどのシアノバクテリア・植物では、ガラクトースを極性基にもつガラクト糖脂質である、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG) が、合計 55-85% を占める。スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) とホスファチジルグリセロール (PG) は酸性脂質であり、それぞれチラコイド膜の 10-20、15-20 % を占める。

造には大きな影響は見られなかった。したがって、チラコイド膜の構造には、ガラクト糖脂質は必須ではなく、グルコ糖脂質で代替できることがわかった (Awai *et al.*, 2014)。一方で、光化学系 II (PSII) の電子伝達速度は低下しており、光合成の機能において MGDG や DGDG に特異的な機能があることが示唆された (Awai *et al.*, 2014)。これまでに、結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析から、多くの膜脂質分子が光合成電子伝達に関わる光化学系 I (PSI) や光化学系 II、シトクロム b_6f 複合体 (Cyt b_6f 複合体) に内包されていることが明らかとなっている (Yoshihara and Kobayashi, 2022)。したがって、それぞれの膜脂質分子は、チラコイド膜の構造維持だけではなく、膜タンパク質複合体の機能においても重要な役割を持つと考えられる。ここでは、光合成における膜脂質の役割について解説し、それぞれの膜脂質合成酵素遺伝子の欠損株における光合成の表現型について表 1 にまとめた。

MGDG は、多くの光合成生物のチラコイド膜において、最も含量が高い膜脂質であり、およそ 40-60 % を占める。MGDG 合成を完全に欠損したシロイヌナズナは、チラコイド膜構造が維持できず、発達初期段階で枯死してしまうため、その後の解析が困難となる (Kobayashi *et al.*, 2007)。また、MGDG 合成を完全に欠損してしまうと、MGDG を前駆体とする DGDG も同時に欠損してしまうため、MGDG と DGDG 両方が欠損した影響を複合的に解析することになる。シロイヌナズナ MGDG 合成酵素の 5'-UTR 領域に変異を持つ *mgdl-1* は、MGDG 含量が野生株の 42% まで低下しているが、DGDG は野生株と同程度以上、蓄積している (Jarvis *et al.*, 2000)。この *mgdl-1* 変異株では、PSII 電子伝達活性やプロトン駆動力 (Proton motive force: PMF)、非光化学的消光 (non-photochemical quenching: NPQ) が低下しており (Aronsson *et al.*, 2008)、MGDG が PSII の機能に関わることが示唆された。タバコの *Mgd1* 遺伝子を RNA-i でノックダウンした株においては、MGDG 量が 53% まで低下しており、*mgdl-1* と同様に NPQ の低下が観察されている (Wu *et al.*, 2013)。この変異株では、Cyt b_6f 複合体の蓄積量も減少しており、MGDG が、プロトン濃度勾配形成に関わる Cyt b_6f 複合体を介して NPQ や PSII 電子伝達活性に影響していることが示唆された (Wu *et al.*, 2013)。

表1. 異なる生物種の光合成活性におけるチラコイド膜脂質の影響

生物種	変異株	脂質	光合成における表現型	引用文献
S. 6803	<i>mgdE</i>	MGDGの欠失 DGDGの欠失 GlcDGの蓄積	PSII活性が低下	Awai et al. 2014
	<i>dgdA</i>	DGDGの欠失	PsbO, PsbU, PsbVの欠落 PSII活性が低下	Sakurai et al. 2007
	<i>sqdB</i>	SQDGの欠失	PSII活性が低下	Gluer et al. 1996 Aoki et al. 2012
	<i>pgsA</i>	PGの欠失	PSII活性が欠失 PSI及びPSIIが単体化 表在性タンパク質の欠落	Laczko-Dobos et al.2008 Sakurai et al. 2007 Gombos et al. 2002
S. 7942	<i>mgdE</i>	——	——	——
	<i>dgdA</i>	——	——	——
	<i>sqdB</i>	SQDGの欠失	通常条件で影響なし	Aoki et al. 2004
	<i>pgsA</i>	PGの欠失	PSII活性が欠失	Bogos et al. 2002
<i>A. thaliana</i>	<i>mgd1-1</i>	MGDGが野生株 の30%に減少	PMFの低下 PSII活性が低下	Aronsson et al. 2008
	<i>dgd1</i>	DGDGの欠失	PSI活性が低下	Hartel et al. 1997
	<i>sqd1</i>	SQDGの欠失	通常条件で影響なし	Yu et al. 2002
	<i>pgp1-2</i>	PGが野生株の 12%に減少	PSII活性が低下	Hagio et al. 2002

S. 6803 において, *dgdA* 変異株は DGDG 合成能を欠損している (Sakurai *et al.*, 2007)。*dgdA* 変異株では, PSII の酸素発生複合体 (Oxygen-evolving Complex: OEC) に含まれる膜表在性タンパク質 PsbU が解離していることから, DGDG は PSII 活性に重要な働きを持つと考えられている (Sakurai *et al.*, 2007b)。また, *dgdA* 変異体から His タグを用いて PS を精製した研究から, DGDG が PSI 三量体の安定化に寄与していることも示唆されている (Kubota *et al.*, 2010)。シロイヌナズナにおいても, DGDG が PSI 複合体のルーメン側に結合する PsaD や PsaE の安定化に寄与するという知見とあわせると (Hartel *et al.*, 1997, Guo *et al.*, 2005), シアノバクテリアから被子植物に至るまで, DGDG が PSI の機能に広く関わるのが伺える。しかし, *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (S. 7942) など一部のシアノバクテリアにおいては, DGDG が生育自体に必須であることから, シアノバクテリアの種によっては, DGDG が, 光合成以外の別のエネルギー代謝に関わっている可能性がある (Maida and Awai, 2016)。多くの真核光合成生物において, SQDG は葉緑体にのみ存在する脂質であるため, 光合成に特別な機能があるのではないかと推測されてきた (Shimojima, 2011)。しかし, シロイヌナズナ、さらに

はシアノバクテリア *S. 7942* 株においても、SQDG を完全に欠損した変異株が、通常条件では光合成活性に異常を示さないことから、これらの種では SQDG は光合成には重要ではないと示唆されている (Guler *et al.*, 1996, Yu *et al.*, 2002, Aoki *et al.*, 2004)。一方、SQDG を欠損した *S. 6803* 株や緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) の *hf-2* 変異株では、SQDG の欠損により光合成活性が野生株の約 40%にまで低下することがわかっている (Aoki *et al.*, 2012, Sato *et al.*, 1995, Minoda *et al.*, 2002)。したがって、緑藻や一部のシアノバクテリアでは、SQDG が PSII 活性に重要な役割を持つ可能性があり、光合成における SQDG の役割には種間で差がある。

光合成における PG の役割については、これまでにかなり詳細に解析されている。PG は、チラコイド膜における唯一のリン脂質であるため、抽出したチラコイド膜に、リン脂質分解酵素であるホスホリパーゼ A を作用させることで、PG のみを分解することができる。この手法によって、PG が PSII 二量体の形成に必要であることが示唆された (Kruse *et al.*, 2000)。しかし、結晶解析から PG が PSII 二量体界面には存在しないこと (Umena *et al.*, 2011) や、PG がチラコイド膜の表在性タンパク質を安定化し、PSII の二量体化を促進すること (Sakurai *et al.*, 2007a) が明らかとなり、PSII 二量体形成への PG の寄与は間接的であった。また、*S. 6803* 株は、細胞外の PG 分子を取り込んで生育に利用することができる (Hagio *et al.*, 2000, Sato *et al.*, 2000)。したがって、PG 合成を欠損した *pgsA* 株を、PG 存在下で培養したのち、PG 非存在下に移すことで、細胞内の PG 含量を検出限界以下にすることができる。このような状態の *pgsA* 株を用いて光合成活性や PSII の電子伝達速度などを解析した結果、PG は、PSII における Q_A から Q_B への電子伝達 (Gombos *et al.*, 2002) や表在性タンパク質の結合 (Sakurai *et al.*, 2007a)、PSII の二量体化や CP43 タンパク質の結合 (Sakurai *et al.*, 2003, Laczko-Dobos *et al.*, 2008) に必要であることが明らかとなった。*S. 7942* やシロイヌナズナでも同様の結果が得られていることから (Bogos *et al.*, 2010, Kobayashi *et al.*, 2016)、PSII における PG の機能は種を超えて保存されているようである。

異なる生物種における脂質の機能については、脂質に結合した脂肪酸の機能も合わせて考える必要がある。例えば、*S. 7942* は、18:2 などの多価不飽和脂肪酸を持たないが、*S. 6803* は、18:2, 18:3, 18:4 などの複雑な脂肪酸分子種を持つ。脂質クラスに加えて、それぞれの脂質に結合した脂肪酸分子種の機能について考慮することで、生物種に特異的な脂質の機能について明らかになる可能性がある。

3. 光合成の環境ストレス応答における膜脂質の機能

光・CO₂・温度は、光合成を駆動する上で欠かせない要素であり、そのどれもが過剰であると光合成反応は破綻してしまう。特に光強度は常に一定ではなく、ダイナミックに変化している。したがって、光合成生物は、常に最適な光合成活性を維持するために、これらの環境ストレスに応答している。これまで、環境ストレス応答に関しては、転写・翻訳など、主にセントラルドグマの枠組の中で議論されており、その枠組みを外れた脂質分子に関しては、やや見過ごされてきたように感じる。ここでは、転写・翻訳ではなく、膜脂質の動態による光合成の環境ストレス応答について解説する。

光は、最もダイナミックに変動する環境要因であり、光合成生物は必ず光を感知する術を持っている。特に強光下では、過剰な光エネルギーが PSII を損傷させ、光合成活性の低下を引き起こす（光阻害）ため、光合成生物は損傷した PSII を迅速に修復することで、光合成活性を維持している。PSII 修復の過程は、損傷した PSII 複合体の解体、反応中心タンパク質である D1 の分解と新規合成、PSII 複合体の再構築に分けることができ、すべてチラコイド膜で行われる（図 2）。D1 タンパク質の分解と新規合成については、これまでに詳細な解析が

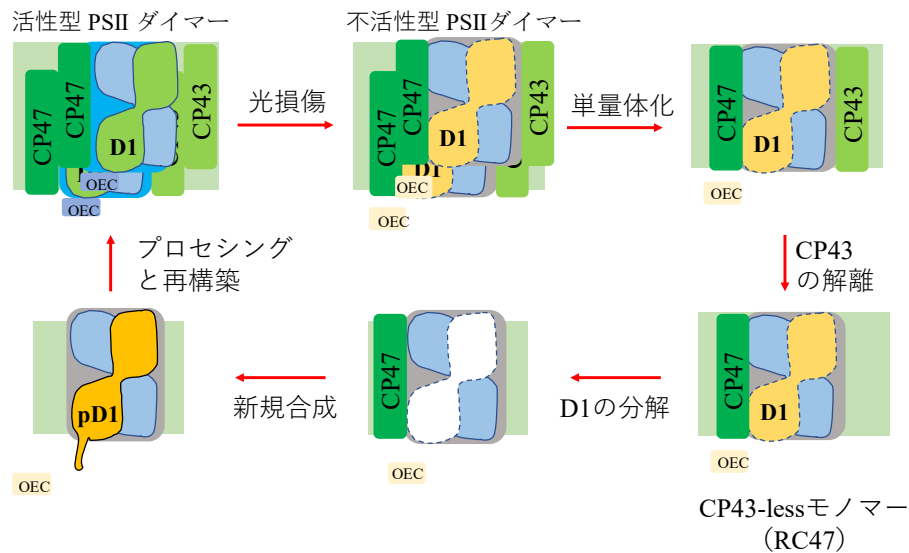


図 2. 光化学系 II (PSII) の修復サイクル

損傷した PSII 二量体は、単量体化および CP43 の解離を経て、CP43-less モノマー (RC47) となる。RC47 は、損傷した D1 を露出しており、チラコイド膜上のプロテアーゼ FtsH によって迅速に分解される。分解とほぼ同時に D1 タンパク質の新規合成・PSII 複合体への挿入が起こり、プレ D1 (pD1) となる。pD1 がプロセッシングされることで、表在性タンパク質・OEC の再構築が行われ、活性型の PSII へと修復が完了する。

行われているが、チラコイド膜脂質との関わりについては、未だに不明な点も多い。DGDG や PG に関しては、それぞれの合成酵素を欠損した変異株を用いた解析から、強光ストレスや高温ストレス下において損傷した PSII の修復に関わることがわかっている (Sakurai *et al.*, 2003, Mizusawa *et al.*, 2009a, Mizusawa *et al.*, 2009b)。筆者らは、膜脂質分子は PSII 複合体の中に内包されていることに着目し、膜脂質分子の分解が PSII 修復においてどのような役割があるのかについて研究を行なった。膜脂質は脂質分解酵素であるリパーゼによって分解される。筆者らは、脂肪酸分子をグリセロ脂質のグリセロール骨格から切り離すリパーゼ A に着目して *S. 6803* ゲノムからリパーゼ遺伝子の探索を行った。そのうち、*lipA* にコードされるリパーゼの基質特異性を生化学的に測定し、LipA が MGDG や DGDG, トリアシルグリセロール (TAG) などの脂質を分解することを明らかにした (Jimbo and Wada, 2023)。さらに、*lipA* 遺伝子を欠損した変異株を作製し、光合成の強光応答について解析したところ、LipA は、PSII を単量体することで、D1 タンパク質の分解及び PSII 修復を促進することを明らかにした (Jimbo and Wada, 2023)。PSII 二量体の結晶解析から、PSII の二量体界面には MGDG が 1 分子、SQDG が 2 分子、存在することがわかっている (Umena *et al.*, 2011, Yoshihara and Kobayashi, 2022)。Thermosynechococcus elongatus BP-1 において、SQDG を欠損した *sqdB* 株では、PSII が単量体化することから、SQDG は PSII 二量体の安定化に関わることが示唆されている (Endo *et al.*,

2016)。 *In vitro* の結果から、LipA は SQDG を基質としないため、PSII 二量体界面に存在する MGDG の分解が鍵となって、SQDG 分子の乖離と PSII の単量体化を引き起こすことや、SQDG を基質とする他のリパーゼの存在が考えられる。また、非常に興味深いことに、シアノバクテリアと植物のどちらにおいても、PSII 複合体に含まれる MGDG 分子の極性基（ガラクトシル基）のほとんどは、ルーメン側を向いている（Yoshihara and Kobayashi, 2022）。LipA の基質特異性は、膜脂質の極性基に依存するため、LipA はルーメン側から作用する可能性がある。PSII 二量体のルーメン側には、PsbO などの表在性タンパク質が存在し、PsbO を欠損すると、PSII 二量体が不安定化することが明らかとなっている（Choo *et al.*, 2022）。したがって、PSII の損傷に伴って、表在性タンパク質の乖離することによって、LipA が MGDG にアクセスしやすくなり、PSII の単量体化を促進している可能性がある。これらの仮説を検証することで、OEC の崩壊による PSII の損傷過程と PSII 単量体化による修復過程をシームレスに繋げる機構を解明できると期待される。

4. 脂質を介した光合成活性の機能改変

膜脂質には、脂肪酸が結合しており、チラコイド膜脂質の主要な 4 つの脂質クラスの物性は結合する脂肪酸分子種によっても変化する。脂肪酸分子は、鎖長・二重結合の数・位置・シス/トランスなどの膨大な数の組み合わせが生じるため多様性に富んでいる。筆者らは、この脂肪酸分子の多様性に着目し、現在商業的に入手可能な 50 種類の脂肪酸分子を収集し脂肪酸分子ライブラリーを作成した。この脂肪酸分子ライブラリーを用いて、それぞれの脂肪酸分子種を *S. 6803* 細胞懸濁液に添加した際の PSII 光阻害への影響について網羅的に解析を行った。その結果、炭素数 16-18 の長鎖飽和脂肪酸は、PSII 光阻害を緩和したのに対し、炭素数 12-14 の中鎖脂肪酸は、PSII 光阻害を促進した。これらの飽和脂肪酸は、PSII 修復を促進あるいは阻害することで、PSII 光阻害の程度を変化させていた（Jimbo *et al.*, 2020）。さらに、不飽和脂肪酸についても同様の解析を行ったところ、18:1 などのモノ不飽和脂肪酸は、光阻害に影響がなかったのに対し、二重結合を 2 つ以上持つ多価不飽和脂肪酸は、PSII の損傷過程を促進することで、PSII 光阻害を促進した。これらの不飽和脂肪酸は、PG におけるグリセロール骨格の 2 番目の炭素（*sn*-2 位）に特異的にエステル結合し、Mn クラスターの崩壊を促進することで、PSII 光損傷を促進していた（Jimbo *et al.*, 2021）。これらの解析結果をまとめ、脂肪酸分子種と PSII 光阻害の構造相関解析を行うと、脂肪酸分子種の二重結合が 2 つ以上存在する場合、その位置に関わらず光合成活性を顕著に阻害することがわかった。また、鎖長についても C14 より短くなるほど阻害効果が高いことがわかった。これらの研究成果は、光合成生物の大量発生である、赤潮やアオコなどを防除するための薬剤などの開発につながる可能性がある。

脂肪酸の組成は、生物種に特有であり、その生育環境によって大きく異なる。シアノバクテリアの中でも特に海洋性シアノバクテリアは、淡水性のシアノバクテリアよりも鎖長が短い 14:0 脂肪酸を多く持っている（Kenyon *et al.*, 1972, Pittera *et al.*, 2018）。海洋は、日差しを遮るものがなく、常に照度が高いため、海洋性シアノバクテリアである *Cyanothece* や *Synechocystis* sp. PCC 7002 は、PSII 光阻害に対する耐性が高い。そこで筆者らは、14:0 と PSII

光阻害との関係を明らかにするため、14:0 を多く持つ窒素固定性シアノバクテリアである *Cyanothece sp.* 8801 のリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAAT) を、*S.* 6803 の LPAAT と置換し、脂肪酸の鎖長を改変した T-1274 Δ 1848 株を作製した (Saito *et al.*, 2018)。T-1274 Δ 1848 株では、アンテナタンパク質による光化学系へのエネルギーの分配が変化し、強光下における一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の発生速度が低下した。その結果、 $^1\text{O}_2$ のターゲットとなる D1 の翻訳が促進し、PSII 修復が亢進した (Kurima *et al.*, 2024)。これまでに、*S.* 7942 に *S.* 6803 の不飽和化酵素の遺伝子 *desA* を導入し、脂肪酸の不飽和度を高めると、強光下における PSII 修復が促進することが明らかとなっている (Gombos *et al.*, 1997)。14:0 も、不飽和脂肪酸と同様に膜の流動性を向上させることから、14:0 の導入によってチラコイド膜の流動性が向上し、PSII 修復を促進している可能性がある。遺伝子改変による脂質分子の改変は、特異的な影響だけでなく、チラコイド膜の物性を変化させるほどの大きな変化を引き起こす。したがって、脂質に着目して環境ストレス耐性を向上させることで、光合成機能の飛躍的な向上が期待される。

5. 今後の展望

植物脂質の研究は、非常に歴史が長く、これまでに幅広い知識の蓄積がある。しかし、脂質の物性から、生物学で用いられる手法よりもどちらかといえば化学的な解析手法が多く、生物学者から扱うのを避けられているように思う。しかし、全ての生物にとって脂質は生存に必須な物質であり、また、その分子の多様性からも多くの機能があるに違いない。これまでの研究では、他の生体物質 (タンパク質や DNA, RNA) と同様に、その合成関連遺伝子の欠損変異株を用いた遺伝学で研究が進められ、脂質代謝経路については多くのことが明らかとなってきた。しかしながら、脂質合成遺伝子の欠損変異株の取得や解析は、シビアな表現型となり、その後の生理学的な解析がままならない場合が多い。近年、網羅的な脂質解析をゲノム解析と組み合わせたリポドーム-ゲノムワイド相関解析 (Lipidome-GWAS) によって、特定の脂質分子の機能を解明する試みがされている (Gazave *et al.*, 2020, Luzarowska *et al.*, 2023)。本稿で解説した光合成における脂質の機能についても、光合成機能を指標とした Lipidome-GWAS 解析を行うことで、光合成における脂質の機能について、新たな関係性が見えてくる可能性がある。また、光合成の機能は常に一定ではなく、生育環境に応じて、NPQ の発達や PSII 修復の促進などを通じてダイナミックに変化している。したがって、こうした光合成活性のフィットネスにおける脂質の関わりについても、解明していくことが必要である。

引用文献

Aoki, M., Sato, N., Meguro, A., Tsuzuki, M. (2004) Differing involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in photosystem II in two species of unicellular cyanobacteria. *Eur J Biochem*, 271, 685-693. doi: 10.1111/j.1432-1033.2003.03970.x

- Aoki, M., Tsuzuki, M., Sato, N. (2012) Involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in DNA synthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BMC research notes*, 5, 98. doi: 10.1186/1756-0500-5-98
- Aronsson, H., Schottler, M.A., Kelly, A.A., Sundqvist, C., Dormann, P., Karim, S., Jarvis, P. (2008) Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in *Arabidopsis* affects pigment composition in the prolamellar body and impairs thylakoid membrane energization and photoprotection in leaves. *Plant Physiol*, 148, 580–592. doi: 10.1104/pp.108.123372
- Awai, K., Ohta, H., Sato, N. (2014) Oxygenic photosynthesis without galactolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 13571–13575. doi: 10.1073/pnas.1403708111
- Bogos, B., Ughy, B., Domonkos, I., Laczko-Dobos, H., Komenda, J., Abasova, L., Cser, K., Vass, I., Sallai, A., Wada, H., et al. (2010) Phosphatidylglycerol depletion affects photosystem II activity in *Synechococcus* sp. PCC 7942 cells. *Photosynth Res*, 103, 19–30. doi: 10.1007/s11120-009-9497-0
- Choo, P., Forsman, J.A., Hui, L., Khaing, E.P., Summerfield, T.C., Eaton-Rye, J.J. (2022) The PsbJ protein is required for photosystem II activity in centers lacking the PsbO and PsbV luminal subunits. *Photosynth Res*, 151, 103–111. doi: 10.1007/s11120-021-00862-y
- Endo, K., Kobayashi, K., Wada, H. (2016) Sulfoquinovosyldiacylglycerol has an Essential Role in *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 Under Phosphate-Deficient Conditions. *Plant Cell Physiol*, 57, 2461–2471. doi: 10.1093/pcp/pcw159
- Gazave, E., Tassone, E.E., Baseggio, M., Cryder, M., Byriell, K., Oblath, E., Lueschow, S., Poss, D., Hardy, C., Wingerson, M., et al. (2020) Genome-wide association study identifies acyl-lipid metabolism candidate genes involved in the genetic control of natural variation for seed fatty acid traits in *Brassica napus* L. *Industrial Crops and Products*, 145, 112080. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.112080
- Gombos, Z., Kanervo, E., Tsvetkova, N., Sakamoto, T., Aro, E.M., Murata, N. (1997) Genetic enhancement of the ability to tolerate photoinhibition by introduction of unsaturated bonds into membrane glycerolipids. *Plant Physiol*, 115, 551–559. doi: 10.1104/pp.115.2.551
- Gombos, Z., Varkonyi, Z., Hagio, M., Iwaki, M., Kovacs, L., Masamoto, K., Itoh, S., Wada, H. (2002) Phosphatidylglycerol requirement for the function of electron acceptor plastoquinone Q(B) in the photosystem II reaction center. *Biochemistry*, 41, 3796–3802. doi: 10.1021/bi011884h
- Guler, S., Seeliger, A., Hartel, H., Renger, G., Benning, C. (1996) A null mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 deficient in the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. *J Biol Chem*, 271, 7501–7507. doi: 10.1074/jbc.271.13.7501

- Guo, J., Zhang, Z., Bi, Y., Yang, W., Xu, Y. and Zhang, L. (2005) Decreased stability of photosystem I in *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 579, 3619–3624. doi: 10.1016/j.febslet.2005.05.049
- Hagio, M., Gombos, Z., Varkonyi, Z., Masamoto, K., Sato, N., Tsuzuki, M., Wada, H. (2000) Direct evidence for requirement of phosphatidylglycerol in photosystem II of photosynthesis. *Plant Physiol*, 124, 795–804. doi: 10.1104/pp.124.2.795
- Hartel, H., Lokstein, H., Dormann, P., Grimm, B., Benning, C. (1997) Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 115, 1175–1184. doi: 10.1104/pp.115.3.1175
- Jarvis, P., Dormann, P., Peto, C.A., Lutes, J., Benning, C., Chory, J. (2000) Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8175–8179. doi: 10.1073/pnas.100132197
- Jimbo, H., Takagi, K., Hirashima, T., Nishiyama, Y., Wada, H. (2020) Long-chain saturated fatty acids, palmitic and stearic acids, enhance the repair of photosystem II. *Int J Mol Sci*, 21. doi: 10.3390/ijms21207509
- Jimbo, H., Wada, H. (2023) Deacylation of galactolipids decomposes photosystem II dimers to enhance degradation of damaged D1 protein. *Plant Physiol*, 191, 87–95. doi: 10.1093/plphys/kiac460
- Jimbo, H., Yuasa, K., Takagi, K., Hirashima, T., Keta, S., Aichi, M., Wada, H. (2021) Specific incorporation of polyunsaturated fatty acids into the *sn*-2 position of phosphatidylglycerol accelerates photodamage to photosystem II under strong light. *Int J Mol Sci*, 22. doi: 10.3390/ijms221910432.
- Kenyon, C.N., Rippka, R., Stanier, R.Y. (1972) Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. *Arch Mikrobiol*, 83, 216–236. doi: 10.1007/BF00645123
- Kobayashi, K., Endo, K., Wada, H. (2016) Multiple impacts of loss of plastidic phosphatidylglycerol biosynthesis on photosynthesis during seedling growth of *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, 7, 336–348. doi: 10.3389/fpls.2016.00336
- Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M., Ohta, H. (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 17216–17221. doi: 10.1073/pnas.0704680104
- Kruse, O., Hankamer, B., Konczak, C., Gerle, C., Morris, E., Radunz, A., Schmid, G.H., Barber, J. (2000) Phosphatidylglycerol is involved in the dimerization of photosystem II. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 6509–6514. doi: 10.1074/jbc.275.9.6509

- Kubota, H., Sakurai, I., Katayama, K., Mizusawa, N., Ohashi, S., Kobayashi, M., Zhang, P., Aro, E.M., Wada, H. (2010) Purification and characterization of photosystem I complex from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by expressing histidine-tagged subunits. *Biochim Biophys Acta*, 1797, 98–105. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.09.001
- Kurima, K., Jimbo, H., Fujihara, T., Saito, M., Ishikawa, T., Wada, H. (2024) High myristic acid in glycerolipids enhances the repair of photodamaged photosystem II under strong light. *Plant Cell Physiol.* 65, 790-797. doi: 10.1093/pcp/pcae021
- Laczko-Dobos, H., Ughy, B., Toth, S.Z., Komenda, J., Zsiros, O., Domonkos, I., Parducz, A., Bogos, B., Komura, M., Itoh, S., et al. (2008) Role of phosphatidylglycerol in the function and assembly of Photosystem II reaction center, studied in a *cdsA*-inactivated PAL mutant strain of *Synechocystis* sp. PCC6803 that lacks phycobilisomes. *Biochim Biophys Acta*, 1777, 1184–1194. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.06.003
- Luzarowska, U., Russ, A.K., Joubes, J., Batsale, M., Szymanski, J., V, P.T., Luzarowski, M., Wu, S., Zhu, F., Endres, N., Khedhayir, S., et al. (2023) Hello darkness, my old friend: 3-KETOACYL-COENZYME A SYNTHASE4 is a branch point in the regulation of triacylglycerol synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 35, 1984–2005. doi: 10.1093/plcell/koad059
- Maida, E., Awai, K. (2016) Digalactosyldiacylglycerol is essential in *Synechococcus elongatus* PCC 7942, but its function does not depend on its biosynthetic pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1861, 1309–1314. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.03.011
- Minoda, A., Sato, N., Nozaki, H., Okada, K., Takahashi, H., Sonoike, K., Tsuzuki, M. (2002) Role of sulfoquinovosyl diacylglycerol for the maintenance of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem*, 269, 2353–2358. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02896.x
- Mizusawa, N., Sakata, S., Sakurai, I., Sato, N., Wada, H. (2009a) Involvement of digalactosyldiacylglycerol in cellular thermotolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch Microbiol*, 191, 595–601. doi: 10.1007/s00203-009-0486-7
- Mizusawa, N., Sakurai, I., Sato, N., Wada, H. (2009b) Lack of digalactosyldiacylglycerol increases the sensitivity of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high light stress. *FEBS Lett*, 583, 718–722. doi: 10.1016/j.febslet.2009.01.021
- Pittera, J., Jouhet, J., Breton, S., Garczarek, L., Partensky, F., Marechal, E., Nguyen, N.A., Dore, H., Ratin, M., Pitt, F.D., et al. (2018) Thermoacclimation and genome adaptation of the membrane lipidome in marine *Synechococcus*. *Environ Microbiol*, 20, 612–631. doi: 10.1111/1462-2920.13985

- Saito, M., Endo, K., Kobayashi, K., Watanabe, M., Ikeuchi, M., Murakami, A., Murata, N., Wada, H. (2018) High myristic acid content in the cyanobacterium *Cyanothece* sp. PCC 8801 results from substrate specificity of lysophosphatidic acid acyltransferase. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1863, 939–947. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.05.011
- Sakurai, I., Hagio, M., Gombos, Z., Tyystjarvi, T., Paakkarinen, V., Aro, E.M., Wada, H. (2003) Requirement of phosphatidylglycerol for maintenance of photosynthetic machinery. *Plant Physiol*, 133, 1376–1384. doi: 10.1104/pp.103.026955
- Sakurai, I., Mizusawa, N., Ohashi, S., Kobayashi, M., Wada, H. (2007a) Effects of the lack of phosphatidylglycerol on the donor side of photosystem II. *Plant Physiol*, 144, 1336–1346. doi: 10.1104/pp.107.098731
- Sakurai, I., Mizusawa, N., Wada, H., Sato, N. (2007b) Digalactosyldiacylglycerol is required for stabilization of the oxygen-evolving complex in photosystem II. *Plant Physiol*, 145, 1361–1370. doi: 10.1104/pp.107.106781
- Sato, N., Hagio, M., Wada, H., Tsuzuki, M. (2000) Requirement of phosphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10655–10660. doi: 10.1073/pnas.97.19.10655
- Sato, N., Sonoike, K., Tsuzuki, M., Kawaguchi, A. (1995) Impaired photosystem II in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* defective in sulfoquinovosyl diacylglycerol. *Eur J Biochem*, 234, 16–23. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.016_c.x.
- Shimajima, M. (2011) Biosynthesis and functions of the plant sulfolipid. *Prog Lipid Res*, 50, 234–239. doi: 10.1016/j.plipres.2011.02.003.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.R., Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 473, 55–60. doi: 10.1038/nature09913.
- Wu, W., Ping, W., Wu, H., Li, M., Gu, D., Xu, Y. (2013) Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in tobacco inhibits the cytochrome b6f-mediated intersystem electron transport process and affects the photostability of the photosystem II apparatus. *Biochim Biophys Acta*, 1827, 709–722. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.02.013.
- Yoshihara, A., Kobayashi, K. (2022) Lipids in photosynthetic protein complexes in the thylakoid membrane of plants, algae, and cyanobacteria. *J Exp Bot*, 73, 2735–2750. doi: 10.1093/jxb/erac017.

Yu, B., Xu, C., Benning, C. (2002) *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 5732–5737. doi: 10.1073/pnas.082696499

膜交通のハブ TGN でのソーティングを支える膜脂質

伊藤 容子

お茶の水女子大学 ヒューマンライフサイエンス研究所
〒112-8610 東京都文京区大塚 2-1-1

Membrane lipids in the cargo sorting at the TGN, the intracellular trafficking hub

Yoko Ito

Institute for Human Life Science, Ochanomizu University
2-1-1, Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-8610, Japan

Keywords: lipid, membrane traffic, *trans*-Golgi network

DOI: 10.24480/bsj-review.15c3.00268

1. はじめに

真核生物の細胞内では、膜で区切られたオルガネラ同士が、小胞やチューブを介して盛んに物質のやりとりを行っている。小胞体 (ER) で合成されたタンパク質を機能すべきオルガネラへ届けたり、細胞外から取り込んだタンパク質を分解のために液胞へ送ったりと、正しいタンパク質を正しい目的地へ運ぶために、多くの輸送ルートが厳密に制御されている。この仕組みは、人間社会の交通網になぞらえて『膜交通 (メンブレントラフィック)』と呼ばれている。

膜交通を制御する分子機構にせよ、運ばれる“積荷”にせよ、タンパク質が注目されがちであるが、“膜”交通の名の通り、そこには脂質でできた生体膜が常に存在している。オルガネラや小胞の単なるビルディングブロックとしてだけでなく、特定の脂質はこの交通網における積荷の仕分けと配送に欠かせない機能分子でもある。本稿では、多くの輸送ルートが交錯するオルガネラであるトランスゴルジ網 (*trans*-Golgi Network; TGN) で膜脂質が積荷のソーティングに果たす役割について、植物以外の知見も交えつつ紹介するとともに、植物の膜交通研究と脂質研究の融合についても展望を述べたい。

2. TGNでの積荷ソーティングと膜脂質

2-1. TGNからの極性輸送

ER で新規に合成されたタンパク質は、ゴルジ体を通った後、ゴルジ体の出口側に存在するオルガネラである TGN に運ばれる。TGN はたくさんの小胞がブドウの房のように繋がりあった構造で、かつてはゴルジ体の一部として扱われていたものの、ゴルジ体本体とは異なりクラスリン被覆小胞を形成すること (Robinson and Pimpl 2014)、そして何より、植物細胞で TGN がゴルジ体から離れたり再会合したりと独自の挙動を見せることが明らかになり (Viotti et al. 2010; Uemura et al. 2014)、ゴルジ体とは別のオルガネラとしての認識が広がりつ

つある。さらに TGN がゴルジ体本体と異なる点として、TGN は細胞膜・細胞外からエンドサイトーシスによって取り込まれた積荷も受け取っており、動物細胞の初期エンドソームに相当する役割も担っていることが挙げられる (Dettmer et al. 2006; Viotti et al. 2010)。このようにして ER・ゴルジ体から、あるいはエンドサイトーシス経路から TGN へと運ばれてきた積荷は、次の目的地に応じて仕分けされ、膜でできた輸送小胞に詰め込まれて様々なルートへと送り出される。複数の輸送経路が交わり出入りすることから、TGN は膜交通の『ハブ』と表現されることもある。

TGN からの輸送の目的地のひとつである細胞膜は、一細胞につきひとつつながりの膜である。しかし、細胞膜に局在するタンパク質の中には、その一部にだけ偏在するものが存在している。例えば根の細胞では、地上部側 (apical 面) か根端側 (basal 面) か、表層側か中心柱側かといった極性に従って、細胞のどこかの面にのみ偏って局在することで機能するタンパク質がある。そういったものの中でも、オーキシン輸送体である PIN-FORMED (PIN) ファミリータンパク質は、植物の形態形成や環境応答において占めている役割の重要さもあって、常に注目を集めてきた。PIN ファミリーのメンバーは、根においては PIN1 は中心柱の細胞の basal 面に、PIN2 は表皮細胞の apical 面にといったように、それぞれ異なる組織で異なる極性を持って細胞膜に局在することが知られており、この偏りが根全体を巡るオーキシンの流れを作り出すことにつながっている (Tanaka et al. 2006; 松浦, 田中 2020)。動物細胞のタイトジャンクションのような境界のないひと続きの植物細胞膜において、PIN の偏在がどのようにして達成されているのかについては、細胞内から細胞膜への輸送、細胞膜上での拡散と細胞壁との相互作用、さらに細胞膜から細胞内への取り込みと再度細胞膜へ向かうリサイクリングという多くの要素が絡み合っているため、長い間様々な議論が重ねられてきた (Geldner et al. 2001; Boutté et al. 2006; Tanaka et al. 2013; 松浦, 田中 2020)。こうした中、新規に合成された PIN タンパク質は、細胞膜への輸送の段階で、既に極性を持って運ばれていることが示された (Kleine-Vehn et al. 2011; Łangowski et al. 2016)。さらに、一度細胞膜からエンドサイトーシスによって取り込まれた PIN タンパク質の細胞膜へのリサイクリングについても、やはり極性があることが明らかになった (Drdová et al. 2013; Łangowski et al. 2016; Tan et al. 2016)。ER で合成され、細胞膜で機能しつつ細胞質との間でリサイクリングされる PIN タンパク質も、積荷として TGN を介して運ばれている。前述のように、新規合成からの輸送にせよリサイクリングにせよ、PIN が細胞膜へ運ばれる時点で極性があるということは、TGN から運び出される際に、単に「細胞膜行き」ではなく、少なくとも「細胞膜の apical 面行き」あるいは「細胞膜の basal 面行き」として、特定の輸送小胞へと細かく仕分けされていることを示唆している。しかし、TGN というひとつのオルガネラの中で、このような細かい仕分けをどのようにして実現しているのかについてはほとんどわかっていない。

2-2. TGN のスフィンゴ脂質と PI4P

TGN での積荷の仕分けにおいて、特に重要であると考えられている膜脂質が、スフィンゴ脂質とホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) である。スフィンゴ脂質は、長鎖塩基に脂肪酸が結合したセラミドを基本構造とする脂質であり、さらにリン酸や糖といった親水

性の頭部が付加されることでグルコシルセラミド (GlcCer) や様々な種類のグリコシルイノシトールホスホセラミド (GIPC) となる (Cassim et al. 2020; 石川 2020)。植物の脂質に占めるスフィンゴ脂質の割合は 10%程度であり、生体膜の大部分を占めるグリセロ脂質と比較するとかなり少ない (Lynch and Dunn 2004)。また、グリセロ脂質と比較して、スフィンゴ脂質の脂肪酸には炭素分子の数が 21 個以上である超長鎖脂肪酸 (Very-Long-Chain Fatty Acid; VLCFA) が特に多く含まれており、二重結合の数も少ない (Sperling and Heinz 2003; Pata et al. 2010; Cassim et al. 2020)。このような長く直線状に近い分子構造上の特徴が強い分子間疎水性相互作用を生むため、脂質膜上のスフィンゴ脂質はステロールと共に密に集まり、分子の流動性が低い『脂質ラフト』あるいは『脂質ナノドメイン』と呼ばれる小さな領域を形成する (Lingwood and Simons 2010; Cacas et al. 2012; Ott 2017)。さらに植物のスフィンゴ脂質は、長鎖塩基と脂肪酸鎖の両方ともにヒドロキシ化を受ける場合が多い。脂肪酸鎖の 2 つ目の炭素へのヒドロキシ基の付加は、シロイヌナズナではセラミドの頭部に多様な親水基が結合した複合スフィンゴ脂質の 90%に及ぶ割合で見られ、これが脂質分子同士の水素結合によりナノドメイン形成を促進することが、シロイヌナズナとイネで報告されている (Markham and Jaworski 2007; Nagano et al. 2016; Ukawa et al. 2022)。植物細胞におけるこのような脂質のナノドメインは、膜の相状態を可視化できる蛍光プローブの利用によって (プローブが脂質二重膜の中に入り込むこと自体によって膜の状態が変わってしまうという懸念は残るものの)、細胞膜での観察例が蓄積されつつある (Nagano et al. 2016; Jaillais and Ott 2019; Ukawa et al. 2022)。細胞膜のナノドメインには、その物理的性質により特定のタンパク質が濃縮し、病原菌といった細胞外からの刺激に対する効率的なシグナル伝達のためのプラットフォームになっていると考えられている (Cacas et al. 2012; Jaillais and Ott 2019)。

積荷の仕分けの場としての脂質ラフトのコンセプトは、動物の上皮細胞において細胞膜の頂端側へのみ向かう輸送ルートがあることを説明するために、実際に細胞膜でナノドメインの存在が観察されるより前に考え出されたものであった。Simons らは、ゴルジ体で新規に合成された GlcCer や、オルガネラ膜の内腔側のリーフレットに局在し、サイトゾル側でクラスリン等のコートタンパク質と相互作用できないグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカータンパク質が、タイトジャンクションによって区切られた細胞膜の頂端側に多く輸送されていることを発見した (Simons and Meer 1988)。このことから、TGN の膜においてスフィンゴ脂質のクラスターが形成され、脂質やタンパク質のソーティングセンターとなることで、特定の積荷が TGN から頂端側へ運ばれている可能性を提唱した (Simons and Meer 1988; Simons and Ikonen 1997; Lingwood and Simons 2010)。TGN に脂質のドメインが存在するかは顕微鏡観察によって直接的に確かめられてはいないが、哺乳類細胞で最も多いスフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリンの代謝が TGN からの輸送に関与しているという報告があるほか、TGN から作られた小胞にスフィンゴ脂質とステロールが多く含まれていることが、植物と酵母で明らかになっている (Klemm et al. 2009; Surma et al. 2011; Wattlelet-Boyer et al. 2016; Ramazanov et al. 2021)。

もう一つの重要な膜脂質である PI4P は、スフィンゴ脂質とは異なりグリセロール骨格を持ち、ホスホイノシタイドと総称される脂質群のひとつである。ホスホイノシタイドには親水

基のイノシトール環に受けるリン酸化の位置や数によっていくつもの種類があり、かつそれらは特異的なリン酸化酵素と脱リン酸化酵素の働きによって互いに迅速に転換される (Noack and Jaillais 2017)。それぞれのホスホイノシタイドは細胞内で異なる局在を示すことが知られており、オルガネラ膜のアイデンティティに大きく関わっていると言える。この細胞内分布は生物種によって多少異なっており、PI4P に結合するバイオセンサー (後述) を用いた研究では、動物では PI4P は主にゴルジ体/TGN に局在して、少量が細胞膜やエンドソームにも見られるが、植物では大半が細胞膜に蓄積し、少量が TGN にも観察されることが報告されている (Balla et al. 2005; Hammond et al. 2014; Simon et al. 2016)。

PI4P は、頭部が大きくマイナスチャージを持っているという物理化学的な性質によって直接生体膜の形やタンパク質のリクルートに関与するだけでなく、特異的な結合ドメインを介していくつもの膜交通関連タンパク質と相互作用し、TGN からの様々な輸送キャリアの形成に不可欠な役割を果たしている。PI4P を産生する PI4 キナーゼ (PI4K) の働きがゴルジ体・TGN からの積荷の運び出しに深く関わっていることは、酵母や動物細胞で 20 世紀の終わりがごろから明らかになり始めた (Godi et al. 1999; Hama et al. 1999; Walch-Solimena and Novick 1999; Wang et al. 2003)。また逆に、動物細胞で PI4P の脱リン酸化酵素である Sac1 を人為的に TGN に局在させることで局所的に PI4P のレベルを下げると、細胞膜へ運ばれるはずの積荷タンパク質の輸送が阻害されることも、TGN における PI4P の重要性を示している (Szentpetery et al. 2010)。PI4P がタンパク質との特異的な結合によって積荷の選別に関与する詳細な分子機構はここでは網羅しきれないが、例えば TGN から形成されるクラスリン小胞に積荷を積み込むアダプタータンパク質である AP-1 や GGA は、小胞形成を制御する低分子量 GTPase である Arf1 の活性化型と PI4P の両方に相互作用する。Arf1 は PI4K の膜への局在を促進することでさらなる PI4P を産生し、より多くのアダプターを形成中の小胞にリクルートする (Wang et al. 2003, 2007)。また、動物細胞では、PI4P に結合する GOLPH3 が、特定の積荷の小胞への積み込みのアダプターとなるだけでなく、ミオシンとも結合することで TGN からの膜キャリア形成のための物理的な力を発生させていると考えられている (Dippold et al. 2009; Rizzo et al. 2021)。クラスリンのような被覆を持たない輸送キャリアについても、動物細胞で TGN から細胞膜への特定の積荷の輸送を担う CARTS (carriers of the TGN to cell surface) の形成に、TGN 膜の PI4P が必要であることが近年明らかになった (Wakana et al. 2015)。植物 TGN において PI4P が膜交通に関わる例としては、膜交通の制御因子である Rab GTPase のひとつである RabA4b が PI4K を TGN 膜にリクルートし、PI4P を産生する例が挙げられる。FLS2 の輸送レギュレーターである PUB13 が、RabA4b と産生された PI4P を認識することで、免疫反応に関わる FLS2 の TGN から液胞分解経路への輸送を行うというモデルが提唱されている (Antignani et al. 2015; Noack and Jaillais 2017)。

2-3. PI4P, スフィンゴ脂質と ER-TGN コンタクトサイト

動物細胞では、TGN における PI4P の恒常性が、他の膜脂質と深く関わっていることが知られている。カギとなるのは、TGN と ER のコンタクトサイトである。ER と TGN の間に、互いの膜が 10-20 nm と近接していながら融合はしていないコンタクトサイトが存在している

ことは、哺乳類細胞での電子顕微鏡観察によって 1960 年代から指摘されていたが、その重要な役割が小胞輸送に依らない膜脂質の輸送であることが明らかになってきたのは近年のことである。TGN 膜上の PI4P は、このオルガネラをまたいだ脂質の輸送を担うタンパク質群の ER-TGN コンタクトサイトへの局在に必要であることがわかっている。ステロールの輸送を行う OSBP (oxysterol-binding protein) やセラミドの輸送を行う CERT (ceramide transport protein) は、PI4P に結合する PH (pleckstrin homology) ドメインを持っている。PI4K のノックダウンや阻害剤処理により TGN での PI4P レベルを低下させると、これらのタンパク質の TGN への局在が減少し、コンタクトサイトを介した ER-TGN 間の膜脂質の輸送も低下する (Levine and Munro 2002; Tóth et al. 2006; Antonny et al. 2016; Kumagai and Hanada 2019)。さらに、PI4P はそれ自体が他の膜脂質と引き換えに対向輸送される場合もある。OSBP の場合は、ER から TGN へ 1 分子のコレステロールを運ぶと同時に、逆に TGN から ER へ PI4P を運ぶ。ER と TGN の間の PI4P 濃度の勾配が、ステロールを輸送する“燃料”となるのである (Antonny et al. 2016)。最近の研究では、ER-TGN コンタクトサイトにおいて、同様の対向輸送が PI4P とホスファチジルセリンの組み合わせでも起きることが提唱されている (Venditti et al. 2019)。

ER から TGN へスフィンゴ脂質であるセラミドを輸送する CERT は、OSBP のように PI4P との対向輸送を行うわけではないが、前述のように局在が PI4P に依存している以上、ER と TGN の間の PI4P のバランスは TGN でのスフィンゴ脂質の恒常性に影響する。さらに、スフィンゴ脂質の側から PI4P へのフィードバック機構が存在することも報告されている (Capasso et al. 2017)。CERT によって TGN に運ばれたセラミドは、ホスホコリンの付加によってスフィンゴミエリンになるが、この際副産物としてジアシルグリセロール (DAG) が産生される。この DAG によって TGN で PKD (protein kinase D) が活性化され、PI4K がそのリン酸化を受けて活性化し、PI4P を増産する。PKD は OSBP も同時にリン酸化して活性化するため、OSBP はより多くの PI4P を ER へと運び、結果として TGN の PI4P レベルが下がるというモデルである。こうして TGN の PI4P レベルが減少すると CERT の TGN へのリクルートも減り、結果として TGN へのセラミドの供給も減るというネガティブループになっていると考えられる (Capasso et al. 2017)。このように、ER-TGN コンタクトサイトを介して、PI4P とスフィンゴ脂質という 2 種類の全く異なる膜脂質の相互調節機構が存在しているのである (図 2 左側)。

このモデルを植物に当てはめてみたとき問題となるのは、ER-TGN コンタクトサイトが植物にも存在するか否かである。ゴルジ体の動きが微小管に依存している動物細胞とは対照的に、植物のゴルジ体は他の多くのオルガネラと同じようにアクチン-ミオシン系に依存し、原形質流動に乗って毎秒数 μm の速度で移動する (Ito et al. 2014)。TGN は、移動するゴルジ体本体の *trans* 側に会合しているものもあれば、ゴルジ体から離れて全く異なる動きをするポピュレーションもある (Viotti et al. 2010; Uemura et al. 2014)。このような激しいダイナミクスの中で、ER とコンタクトサイトを形成して脂質のやりとりをすることが可能であるか、現在のところ全く不明である。シロイヌナズナの根のメリステム領域における電子線トモグラフィ解析では、ゴルジ体は必ず *cis* 側を ER に向けており、ER からゴルジ体へ向かう COPII 小胞の出芽部位 (ER exit site; ERES) のほとんどがゴルジ体から 300 nm の範囲にあると報告さ

れている (Kang and Staehelin 2008)。これは ER とゴルジ体 *cis* 槽との密接な関係を示すものではあるが、一般に「オルガネラコンタクトサイト」と呼ばれるような膜同士の近接とは異なっており、ER と TGN の関係も定かではない。光ピンセットを用いてゴルジ体を引っ張るというアプローチにより、ER 膜とゴルジ体膜とが物理的に繋留されていることを明らかにし、ゴルジ体に局在するコイルドコイルタンパク質がそれに寄与しているという報告もなされているが、これが TGN に関係するかどうかはわかっていない (Sparkes et al. 2009; Osterrieder et al. 2017)。哺乳類の ER-TGN コンタクトサイトで機能する OSBP と共通したステロール結合ドメインを持つ ORP (OSBP-related proteins) は植物にも存在し、シロイヌナズナのゲノムには 12 個の ORP 候補遺伝子がコードされている (Skirpan et al. 2006)。そのうちのひとつである ORP3a は、動物の OSBP と結合する ER 局在膜タンパク質 VAP のホモログ PVA12 (VAP27-3 とも呼ばれる) と相互作用し、タンパク質全長では ER に、PVA12 結合部位に変異を導入するとサイトゾルとゴルジ体に局在する。このことから、OSBP と同じように ER とゴルジ体/TGN の間にまたがってステロールの輸送を行っているのではないかと推測されているが (Saravanan et al. 2009)、決定的な証拠はまだ欠けていると言わざるを得ないのが現状である。

2-3. 植物細胞の TGN でのスフィンゴ脂質による PI 4 P 調節機構

筆者が所属していたフランスのボルドー大学・CNRS の研究グループでは、TGN に局在する SANRE 分子である SYP61 をマーカーとして、シロイヌナズナ個体から TGN の膜小胞を免疫沈降し、そこに含まれる脂質を解析することで、VLCFA を持つスフィンゴ脂質が特に多く濃縮していることを見出していた。さらに、VLCFA の炭素鎖の伸長を阻害する薬剤である Metazachlor (Mz, 図 1 上) を用いて、このスフィンゴ脂質の脂肪酸鎖の長さを短い状態にすると、根において細胞膜の apical 面へ本来輸送されるべき PIN2 の TGN からの輸送が異常になり、その結果、巨視的な表現型として根の重力屈性異常が引き起こされることも発見していた (Wattelet-Boyer et al. 2016)。驚くべきことに、細胞膜の basal 側に局在する PIN1 の輸送や極性は Mz 処理によって全く影響されず、Mz が引き起こすスフィンゴ脂質の脂肪酸鎖長の変化は、TGN からの全ての輸送に一律に関わるのではなく、少なくとも PIN2 を含む特異的な輸送ルートにのみ関与していることが示唆された。

TGN は本来小胞がブドウの房のようにチューブで繋がった形態をしているが、Mz 処理によって小胞の肥大やチューブ状構造の減少という異常を示す (Wattelet-Boyer et al. 2016)。このような TGN の膜構造の形態異常は、TGN で PI4P を産生する PI4K β をコードする遺伝子欠損変異体で見られるものと共通しており、さらにその変異体は Mz 処理への感受性が低いことがわかった (Kang et al. 2011; Ito et al. 2021b)。これらの結果は、植物でもスフィンゴ脂質と PI4P の間になんらかのつながりがあることを示していた。そこで、PI4P に特異的なバイオセンサーを用いて PI4P の細胞内局在を観察したところ、Mz 処理を行うと TGN に PI4P が蓄積することが明らかになった (図 1 下)。これは単離 TGN 小胞のリピドミクス解析によっても確認することができた。同様の TGN への PI4P の蓄積は、セラミドから GIPC を合成する経路で働く酵素 IPCS のノックダウンによっても観察されたことから、やはりスフィンゴ脂質により TGN の PI4P レベルが影響されることが確認された。この PI4P がどこからやってくるの

かを明らかにするため、動物で PI4P と対向輸送されるステロールやホスファチジルセリンについても単離小胞膜の解析やバイオセンサーを用いた観察を行ったが、Mz 処理による変化はなく、これらの脂質の対向輸送システムが関わっている可能性は低いと考えられた (Ito et al. 2021b)。PI4K と PI3K の阻害剤である Wortmannin を使った解析により、PI4K による PI4P の生成は直接的には関わっていないことを示唆する結果も得られた (Ito et al. 2021a)。

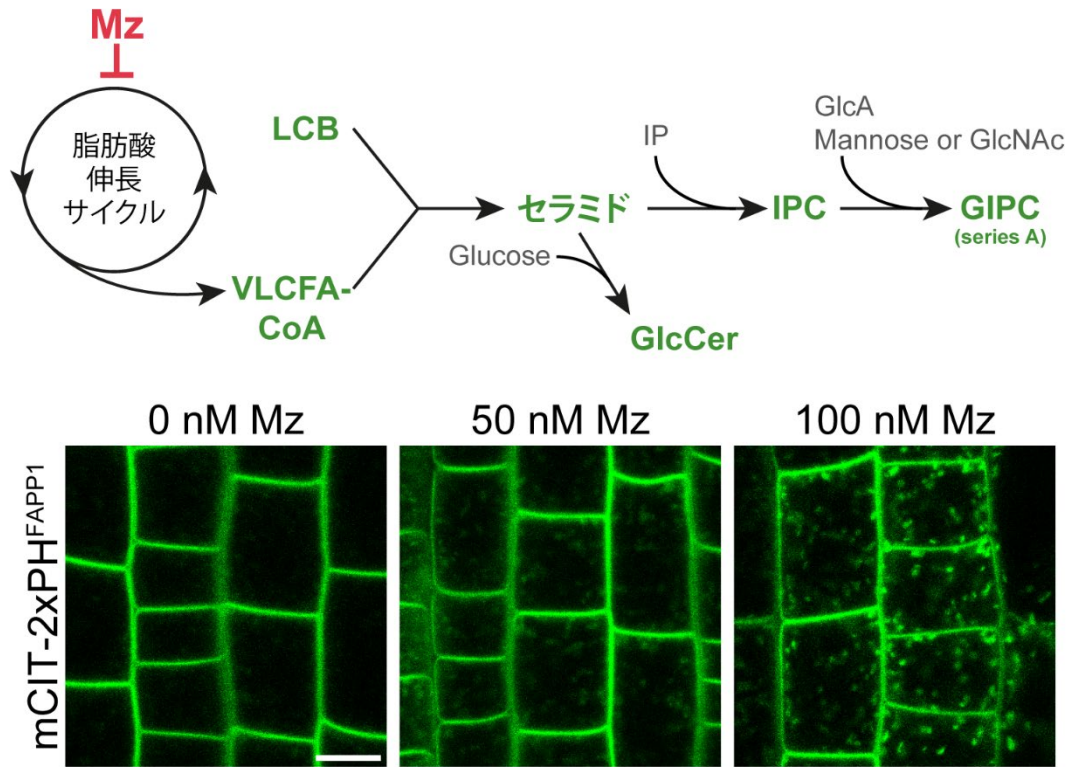


図 1. Mz 処理による PI4P 局在の変化

(上) 植物のスフィンゴ脂質合成経路の模式図。Mz は最初の脂肪酸伸長サイクルを阻害する。Ito et al. 2021b より改変。

(下) PI4P バイオセンサーである mCitrine-2xPH^{FAPP1} を発現させたシロイヌナズナに Mz 処理を行った際の、根の表皮細胞の共焦点蛍光像。Mz の濃度を上げると、細胞内のドット (TGN) への PI4P の蓄積が起こる。スケールバー=10 μm。

他のオルガネラからの供給でも、PI4K による産生でもない、新たな PI4P レベル調整メカニズムで機能する分子として明らかになったのはホスホイノシタイドの加水分解酵素 PI-PLC (phosphoinositide-specific phospholipase C) であった。単離 TGN 小胞のプロテオミクス解析を行ったところ、多くの TGN マーカーやホスホイノシタイド関連タンパク質が Mz 処理で変化しなかった一方、PI-PLC2/7 が Mz 処理下で大幅に減少していたのである。PI-PLC は PI4,5P₂ や PI4P の親水頭部を切断する酵素であるため、TGN において PI-PLC が減少すれば、PI4P の分解が減少し、結果として PI4P 量の増加につながる。これを裏付けるように、PI-PLC の阻害剤 U73122 の処理は、TGN への PI4P の蓄積、PIN2 の輸送阻害と極性の喪失という、Mz 処理と同様の現象を引き起こした。これらの結果を総合して、スフィンゴ脂質が TGN に局在する PI-PLC の量を介して PI4P レベルをローカルに調節し、それが PIN2 を含む特定の積荷の TGN

におけるソーティングに寄与するという、スフィンゴ脂質-PI4P 間の新たな関係を提唱するに至った (図 2 右側, Ito et al. 2021b)。

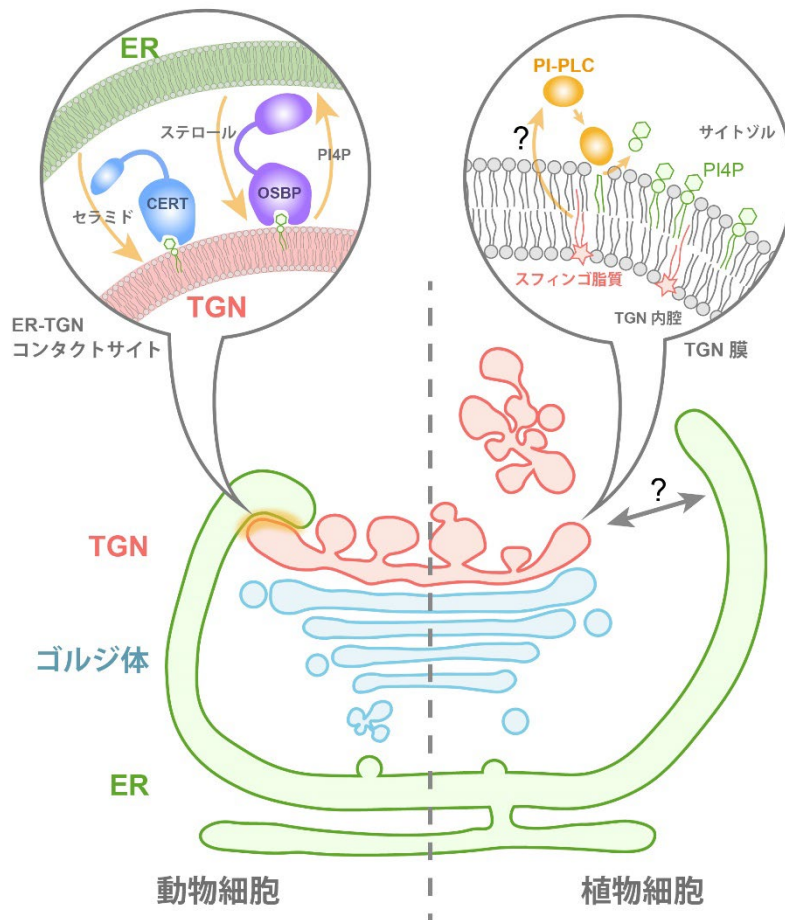


図 2. 動物と植物の TGN における脂質動態

(左側) 動物細胞の ER-TGN コンタクトサイトにおける膜脂質のやりとり。例として CERT と OSBP のみを示しているが、このほかにも多数のタンパク質が機能している。(右側) 植物細胞の TGN 膜におけるスフィンゴ脂質と PI4P の関係。TGN 内腔側リーフレットのスフィンゴ脂質が、サイトゾル側での PI-PLC のリクルートを介して PI4P の恒常性に関与する。ER-TGN コンタクトサイトの存在は確認されていない。

興味深いのは、スフィンゴ脂質の種類によって、TGN での積荷ソーティングにおける役割に違いがあることが示唆されたことである。Markham らの報告によると、VLCFA をセラミド分子に取り込むセラミド合成酵素を特異的に阻害する Fumonisin B1 処理を行うと、Mz とは逆に PIN1 の輸送・局在が阻害される一方で、PIN2 は影響を受けない (Markham et al. 2011)。Mz と Fumonisin B1 の効果を比較すると、両者とも脂質の量には影響しないが、Mz は糖付加を受けたスフィンゴ脂質 (GlcCer や GIPC) の脂肪酸鎖の長さ、Fumonisin B1 はセラミドの脂肪酸鎖の長さに関与する傾向がある (Markham et al. 2011; Ito et al. 2021b)。すなわち、TGN から apical 面と basal 面への異なる輸送小胞を形成するにあたって、スフィンゴ脂質を使い分けた別々のメカニズムが働いているのではないかと考えられる。

スフィンゴ脂質がどのようにして PI-PLC の局在を変化させるのかは、現在のところ全く不明である。特に、ノックダウンによって Mz と同様の表現型が得られた IPCS が生合成に関わ

る GIPC は、TGN の内腔側のリーフレットに局在していると考えられているのに対し、PLC はサイトゾル側に存在するタンパク質であり、両者が直接的に相互作用することは考えにくい。この現象にスフィンゴ脂質の脂肪酸鎖の長さが重要であることを鑑みると、VLCFA が脂質二重膜の中で反対側のリーフレットにまで侵入することでサイトゾル側の膜表面を変化させ、タンパク質のリクルートにも影響するのかもしれない。あるいは、膜貫通型の未知のタンパク質が介在している可能性も考えられる。また最近、通常塩ストレス下で観察されるサイトゾルへの Ca^{2+} の蓄積が、IPCS の下流ではたらく酵素 IPUT1 (IPC glucuronosyltransferase 1) の変異体では起こらないということが報告された。この結果を足掛かりとした解析により、細胞膜の GIPC の頭部への Na^+ イオンの結合が、カルシウムチャネルによるサイトゾルへの Ca^{2+} の流入を促進することが明らかになった (Jiang et al. 2019)。植物の PI-PLC は C 末に Ca^{2+} に結合する C2 ドメインを有しており、このドメインのホスホイノシタイドへの結合が Ca^{2+} によって正に制御されていると考えられている (Pokotylo et al. 2014)。TGN においても、積荷の増加といったなんらかのトリガーによって、内腔側へ流入した Na^+ が GIPC と結合することでサイトゾルへの Ca^{2+} 放出が起こり、局所的に PI-PLC の膜へのリクルートが促進されるのではといったことも考えられるが、未だ仮説段階である。さらに、このスフィンゴ脂質による PI4P の制御が、植物のみが獲得したメカニズムであるのか、または他の真核生物にも保存されているのかについても、今後の研究が待たれる。

3. 細胞生物学的手法と脂質解析の融合

脂質研究の分野と細胞生物学的研究分野では、よく使われる手法に多少の違いがある。ここでは、両分野の融合にあたって特に強力と思われるツールを細胞生物学側の立場から紹介し、将来の展望を述べたい。

3-1. 薬剤処理の活用

細胞生物学や膜交通の分野では、様々な薬剤を用いて特定の生化学反応を阻害し、その反応を観察するのは定石のひとつである。前章で紹介した植物のスフィンゴ脂質-PI4P の関わりと膜交通への影響を調べる過程でも、解析のカギとなった Mz に加え、Brefeldin A, Wortmannin, Fumonisin B1, U73122 と、いくつもの阻害剤を駆使することとなった。TGN からの輸送をブロックするために Brefeldin A を用いるように、阻害剤処理が引き起こす結果そのものをツールとして利用する場合はさておき、特定のタンパク質を阻害する目的で用いる場合には特異性の問題が常につきまとうため、同じタンパク質に作用する全く別の阻害剤との比較や変異体を用いた遺伝学的な解析など、他の手段による補強がほぼ不可欠になる。とはいえ、遺伝子重複が多く、多重変異体の作出に多大な時間と労力を要する植物の場合、薬剤処理は類似の分子の機能を一気に阻害できる魅力的な手段であると言える。例えば Mz は除草剤として用いられるクロロアセトアミドのひとつであり、分子的なターゲットは 3-ケトアシル CoA 合成酵素 (KCS) である (Böger 2003)。シロイヌナズナの KCS ファミリータンパク質は 21 個に及び、そのうち調べられている 7 個の KCS すべてが Mz によって強く阻害される (Joubès et al. 2008; Tresch et al. 2012)。これらすべての多重変異体を作成するのは至難の業であり、数

十分～数日の処理で効果が観測できる薬剤処理の利便性は言うまでもない。近年は、膨大な化合物ライブラリーの中から特定の効果を持つものをスクリーニングし、そのターゲットを特定することで分子機構の解明につなげたり、薬剤処理への感受性によって変異体のスクリーニングを行ったりと、ケミカルバイオロジー、ケミカルジェネティクスと呼ばれる手法が発達しつつあり、植物研究への応用も進んできている（能年 2016）。薬剤の活用は、今後ますます広がっていくと期待される。

3-2. 膜脂質の可視化

顕微鏡の発明が「細胞」の発見をもたらしたことに始まり、細胞生物学は常に顕微鏡や可視化技術の進歩と共に発展してきた。GFP を代表とする蛍光タンパク質による生きた細胞でのタンパク質の可視化が爆発的な成果を生み続けている現在、膜交通やオルガネラ研究の分野において、脂質、特に細胞内膜系の膜脂質の可視化が待ち望まれている。特定の脂質については、親水基に特異的に結合するタンパク質の脂質結合ドメインに蛍光タンパク質を融合させたものを発現させることで、間接的に局在を観察できる（Colin et al. 2021）。ホスホイノシタイドはその最たる例であり、前述の PI4P の細胞内分布の可視化は、様々な PI4P 結合タンパク質の PH ドメインに蛍光タンパク質をつなげた「バイオセンサー」を利用して行われた（Simon et al. 2014, 2016; Ito et al. 2021b）。PI4P だけでなく、同様にして他のホスホイノシタイド分子種も可視化したシロイヌナズナ株のシリーズは、Jaillais らのグループによって“PIP line”として配布されている（Simon et al. 2014）。こういったバイオセンサーの活用は、ダイナミックに変化する細胞内の脂質の挙動を知るのに非常に有用であると言える一方、脂質認識ドメインが脂質に結合してマスクしてしまうことで、膜脂質の本来の機能を損ない、結果的に生理学的に意味のある観察が行えない危険も織り込んでおく必要がある。また、植物のスフィンゴ脂質のように頭部に多様な修飾が付加される場合、その頭部を認識するバイオセンサーの開発は困難であり、動物で利用されているヒトのスフィンゴ脂質結合ドメインを用いたバイオセンサーを植物に応用する試みも、現在のところ成功には至っていない（Fougère et al. 2024）。

このような状況を打破する福音となりうるのが、2022 年のノーベル化学賞となったクリックケミストリーの利用である。クリックケミストリーとは、特定の組み合わせの官能基（代表的なのはアジドとアルキン）を持った分子が、特異的かつ効率よく共有結合を形成する反応であり、官能基が付加された 2 種類の分子を生体内で繋ぐことができる。ホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンといったコリンを含むリン脂質については、クリック反応のためのアジドを付加したコリンと、オルガネラ特異的に局在する蛍光物質にアルキンを付加したものを組み合わせて、オルガネラ特異的に脂質をラベルする方法が開発され、生きた動物細胞での観察例が報告されている（Tamura et al. 2020）。また、異なるオルガネラ局在傾向を持つアジドコリンアナログを用いることで、オルガネラ特異的にホスファチジルコリンをラベルする手法も提案されている（Chiu and Baskin 2022）。植物細胞での観察例はまだ報告されていないものの、今後の展開が期待される。

3-3. 脂質がもたらす植物膜交通研究の展望

クリックケミストリーのような技術的な進展は確実にあるものの、細胞内での膜脂質の可視化、それもサブオルガネラレベルの観察は現在のところは困難であり、細胞内膜系において脂質のナノドメインの存在はまだ確かめられていない。しかしタンパク質サイドからは、植物の TGN の中に複数の異なるサブドメイン、あるいは『ゾーン』が存在するという認識が、複数の TGN 局在タンパク質の可視化と、光学顕微鏡の分解能の向上によって広まりつつある。TGN 局在のタンパク質同士でも共局在しない例があることは 2000 年代の初めから報告されていたが、近年超解像顕微鏡での 3 色同時観察によって、実際にひとつの TGN 上で、細胞膜・細胞外へ向かう膜交通経路で機能するタンパク質と、液胞へ向かう膜交通経路で機能するタンパク質が別々に局在していることが確かめられた (Shimizu et al. 2021)。こういったゾーンがどのように形成されるのかは明らかではないが、膜脂質が関与していることは大いに考えられ、超解像レベルでのタンパク質と膜脂質の同時可視化の実現は、この謎の解明のための重要な鍵となるだろう。また、TGN 以外でも、酵母の ER では積荷の種類によってゴルジ体への輸送小胞が出芽する ERES が使い分けられ、そのソーティングにセラミドの脂肪酸鎖の長さに関わっていることがわかっている (Muñiz et al. 2001; Rodriguez-Gallardo et al. 2020)。植物でも、タバコ BY-2 細胞で Fumonisin B1 処理によって ER からゴルジ体へのタンパク質輸送が阻害されることが報告されており、分泌経路の中で TGN より早い段階においても、膜脂質が積荷のソーティングや輸送になんらかの役割を果たしていることが推測される (Aubert et al. 2011)。今後も、様々なオルガネラ間に張り巡らされた複雑な交通網のあらゆるステップで、膜脂質の役割に光が当たっていくかもしれない。

4. おわりに

本稿は、日本植物学会第 87 回大会において開催されたシンポジウム『脂質が旗振る植物の生命現象』がきっかけとなって執筆された。筆者の専門である膜交通やオルガネラ研究の分野においては、オルガネラも輸送小胞も膜脂質なしには成り立たないにもかかわらず、タンパク質に着目した解析の比重が非常に大きい。筆者もたまたま脂質の世界に足を踏み入れることになったが、苦手意識を持っていたことは否定できない。そんな中、このシンポジウムで話をしないかとお声掛けいただき、また脂質研究の垣根を低くしたいというオーガナイザーの先生方のお話を伺って、脂質についてはほとんど素人であることを言い訳しつつ、本稿で紹介した植物 TGN のスフィンゴ脂質と PI4P について発表をさせていただいた。膜交通研究の側と脂質研究の側の双方に、新しい発見や視点を提供できていれば幸甚である。

細胞生物学では顕微鏡で“観る”ことが重視されているが、脂質は分子特異的な可視化ツールに乏しかったことが、脂質研究との間に溝があった理由のひとつなのではないかと思われる。近年、新しい可視化手段の発展に伴って、植物だけでなくオルガネラ研究の分野全体で膜脂質の注目度が高まっているのを感じている。これから先、両分野のさらなる融合によって新たな扉が開かれていくことを願ってやまない。

謝辞

最後に、シンポジウムのオーガナイザーである永田賢司先生（東京大学）と神保晴彦先生（埼玉大学）に、また本稿で紹介した TGN の脂質の研究において筆者の postdoc supervisor であった Yann Boutté 先生と、ボルドー大学・CNRS の Membrane Biogenesis Laboratory の関係者の皆様、そして本稿の執筆にあたりアドバイスをいただいた現所属先の植村知博先生（お茶の水女子大学）に、厚くお礼申し上げます。

引用文献

- Antignani V, Klocko AL, Bak G, Chandrasekaran SD, Dunivin T, Nielsen E (2015) Recruitment of PLANT U-BOX13 and the PI4K β 1/ β 2 Phosphatidylinositol-4 Kinases by the Small GTPase RabA4B Plays Important Roles during Salicylic Acid-Mediated Plant Defense Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27: 243–261. doi: 10.1105/tpc.114.134262
- Antony B, Bigay J, Mesmin B (2016) The Oxysterol-Binding Protein Cycle: Burning Off PI(4)P to Transport Cholesterol. *Annu Rev Biochem* 87: 1–29. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044924
- Aubert A, Marion J, Boulogne C, Bourge M, Abreu S, Bellec Y, Faure J, Satiat-Jeunemaitre B (2011) Sphingolipids involvement in plant endomembrane differentiation: the BY2 case. *Plant J* 65: 958–971. doi: 10.1111/j.1365-313x.2011.04481.x
- Balla A, Tuymetova G, Tsiomenko A, Várnai P, Balla T (2005) A Plasma Membrane Pool of Phosphatidylinositol 4-Phosphate Is Generated by Phosphatidylinositol 4-Kinase Type-III Alpha: Studies with the PH Domains of the Oxysterol Binding Protein and FAPP1. *Mol Biol Cell* 16: 1282–1295. doi: 10.1091/mbc.e04-07-0578
- Böger P (2003) Mode of Action for Chloroacetamides and Functionally Related Compounds. *J Pestic Sci* 28: 324–329. doi: 10.1584/jpestics.28.324
- Boutté Y, Crosnier MT, Carraro N, Traas J, Satiat-Jeunemaitre B (2006) The plasma membrane recycling pathway and cell polarity in plants: studies on PIN proteins. *J Cell Sci* 119: 1255–1265. doi: 10.1242/jcs.02847
- Cacas JL, Furt F, Guédard ML, Schmitter JM, Buré C, Gerbeau-Pissot P, Moreau P, Bessoule JJ, Simon-Plas F, Mongrand S (2012) Lipids of plant membrane rafts. *Prog Lipid Res* 51: 272–299. doi: 10.1016/j.plipres.2012.04.001
- Capasso S, Sticco L, Rizzo R, Pirozzi M, Russo D, Dathan NA, Campelo F, Galen J, Hölltä-Vuori M, Turacchio G, et al (2017) Sphingolipid metabolic flow controls phosphoinositide turnover at the *trans*-Golgi network. *EMBO J* 36: 1736–1754. doi: 10.15252/embj.201696048
- Cassim AM, Grison M, Ito Y, Simon-Plas F, Mongrand S, Boutté Y (2020) Sphingolipids in plants: a guidebook on their function in membrane architecture, cellular processes, and environmental or developmental responses. *Febs Lett* 594: 3719–3738. doi: 10.1002/1873-3468.13987
- Chiu DC, Baskin JM (2022) Organelle-Selective Membrane Labeling through Phospholipase D-Mediated Transphosphatidylation. *JACS Au* 2: 2703–2713. doi: 10.1021/jacsau.2c00419

- Colin L, Martin-Arevalillo R, Bovio S, Bauer A, Vernoux T, Caillaud MC, Landrein B, Jaillais Y (2021) Imaging the living plant cell: from probes to quantification. *Plant Cell* 34: 247–272. doi: 10.1093/plcell/koab237
- Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K (2006) Vacuolar H⁺-ATPase Activity Is Required for Endocytic and Secretory Trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 715–730. doi: 10.1105/tpc.105.037978
- Dippold HC, Ng MM, Farber-Katz SE, Lee SK, Kerr ML, Peterman MC, Sim R, Wiharto PA, Galbraith KA, Madhavarapu S, et al (2009) GOLPH3 Bridges Phosphatidylinositol-4- Phosphate and Actomyosin to Stretch and Shape the Golgi to Promote Budding. *Cell* 139: 337–351. doi: 10.1016/j.cell.2009.07.052
- Drdová EJ, Synek L, Pečenková T, Hála M, Kulich I, Fowler JE, Murphy AS, Žárský V (2013) The exocyst complex contributes to PIN auxin efflux carrier recycling and polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant J* 73: 709–719. doi: 10.1111/tpj.12074
- Fougère L, Mongrand S, Boutté Y (2024) The function of sphingolipids in membrane trafficking and cell signaling in plants, in comparison with yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Biol Lipids* 1869: 159463. doi: 10.1016/j.bbalip.2024.159463
- Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jürgens G, Palme K (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425–428. doi: 10.1038/35096571
- Godi A, Pertile P, Meyers R, Marra P, Tullio GD, Iurisci C, Luini A, Corda D, Matteis MAD (1999) ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase- β and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P₂ on the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 1: 280–287. doi: 10.1038/12993
- Hama H, Schnieders EA, Thorner J, Takemoto JY, DeWald DB (1999) Direct Involvement of Phosphatidylinositol 4-Phosphate in Secretion in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274: 34294–34300. doi: 10.1074/jbc.274.48.34294
- Hammond GRV, Machner MP, Balla T (2014) A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi. *J Cell Biol* 205: 113–126. doi: 10.1083/jcb.201312072
- 石川寿樹 (2020) 植物固有なスフィンゴ脂質糖鎖の多様な構造と機能 植物で独自に進化したスフィンクスのナゾ. *化学と生物* 58: 659–666. doi: 10.1271/kagakutoseibutsu.58.659
- Ito Y, Esnay N, Fougère L, Platre MP, Cordelières F, Jaillais Y, Boutté Y (2021a) Inhibition of Very Long Chain Fatty Acids Synthesis Mediates PI3P Homeostasis at Endosomal Compartments. *Int J Mol Sci* 22: 8450. doi: 10.3390/ijms22168450
- Ito Y, Esnay N, Platre MP, Wattelet-Boyer V, Noack LC, Fougère L, Menzel W, Claverol S, Fouillen L, Moreau P, et al (2021b) Sphingolipids mediate polar sorting of PIN2 through phosphoinositide consumption at the *trans*-Golgi network. *Nat Commun* 12: 4267. doi: 10.1038/s41467-021-24548-0
- Ito Y, Uemura T, Nakano A (2014) Formation and maintenance of the Golgi apparatus in plant cells. In: Kwang JW (ed) *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, pp 221–87
- Jaillais Y, Ott T (2019) The Nanoscale Organization of the Plasma Membrane and Its Importance in Signaling: A Proteolipid Perspective. *Plant Physiol* 182: 1682–1696. doi: 10.1104/pp.19.01349

- Jiang Z, Zhou 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 Ca²⁺ influx. *Nature* 572: 341–346. doi: 10.1038/s41586-019-1449-z
- Joubès J, Raffaele S, Bourdenx B, Garcia C, Laroche-Traineau J, Moreau P, Domergue F, Lessire R (2008) The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. *Plant Mol Biol* 67: 547–566. doi: 10.1007/s11103-008-9339-z
- Kang BH, Nielsen E, Preuss ML, Mastronarde D, Staehelin LA (2011) Electron Tomography of RabA4b- and PI-4K β 1-Labeled *Trans* Golgi Network Compartments in *Arabidopsis*. *Traffic* 12: 313–329. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01146.x
- Kang BH, Staehelin LA (2008) ER-to-Golgi transport by COPII vesicles in *Arabidopsis* involves a ribosome-excluding scaffold that is transferred with the vesicles to the Golgi matrix. *Protoplasma* 234: 51–64. doi: 10.1007/s00709-008-0015-6
- Kleine-Vehn J, Wabnik K, Martinière A, Łangowski Ł, Willig K, Naramoto S, Leitner J, Tanaka H, Jakobs S, Robert S, et al (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol Syst Biol* 7: 540–540. doi: 10.1038/msb.2011.72
- Klemm RW, Ejsing CS, Surma MA, Kaiser HJ, Gerl MJ, Sampaio JL, Robillard Q de, Ferguson C, Proszynski TJ, Shevchenko A, et al (2009) Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the *trans*-Golgi network. *J Cell Biology* 185: 601–612. doi: 10.1083/jcb.200901145
- Kumagai K, Hanada K (2019) Structure, functions and regulation of CERT, a lipid-transfer protein for the delivery of ceramide at the ER–Golgi membrane contact sites. *FEBS Lett* 593: 2366–2377. doi: 10.1002/1873-3468.13511
- Łangowski Ł, Wabnik K, Li H, Vanneste S, Naramoto S, Tanaka H, Friml J (2016) Cellular mechanisms for cargo delivery and polarity maintenance at different polar domains in plant cells. *Cell discovery* 2: 16018. doi: 10.1038/celldisc.2016.18
- Levine TP, Munro S (2002) Targeting of Golgi-Specific Pleckstrin Homology Domains Involves Both PtdIns 4-Kinase-Dependent and -Independent Components. *Curr Biol* 12: 695–704. doi: 10.1016/s0960-9822(02)00779-0
- Lingwood D, Simons K (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Sci New York N Y* 327: 46–50. doi: 10.1126/science.1174621
- Lynch DV, Dunn TM (2004) An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *N Phytol* 161: 677–702. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.00992.x
- 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, Molino D, Gissot L, Bellec Y, Hématy K, Marion J, Belcram K, Palauqui JC, Satiat-JeuneMaître B, Faure JD (2011) Sphingolipids Containing Very-Long-Chain Fatty Acids Define a

- Secretory Pathway for Specific Polar Plasma Membrane Protein Targeting in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 2362–2378. doi: 10.1105/tpc.110.080473
- 松浦友紀, 田中博和 (2020) オーキシン輸送体の局在制御因子が関わる発生制御. *BSJ-Rev* 11: 172–182. doi: 10.24480/bsj-review.11b7.00189
- Muñiz M, Morsomme P, Riezman H (2001) Protein Sorting upon Exit from the Endoplasmic Reticulum. *Cell* 104: 313–320. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00215-x
- 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
- Noack LC, Jaillais Y (2017) Precision targeting by phosphoinositides: how PIs direct endomembrane trafficking in plants. *Curr Opin Plant Biol* 40: 22–33. doi: 10.1016/j.pbi.2017.06.017
- 能年義輝 (2016) 植物科学におけるハイスループットケミカルスクリーニングとその利用. *植物の生長調節* 51: 138–143. doi: 10.18978/jsrsc.51.2_138
- Osterrieder A, Sparkes IA, Botchway SW, Ward A, Ketelaar T, Ruijter N de, Hawes C (2017) Stacks off tracks: a role for the golgin AtCASP in plant endoplasmic reticulum-Golgi apparatus tethering. *J Exp Bot* 68: 3339–3350. doi: 10.1093/jxb/erx167
- Ott T (2017) Membrane nanodomains and microdomains in plant–microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol* 40: 82–88. doi: 10.1016/j.pbi.2017.08.008
- Pata MO, Hannun YA, Ng CK (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *N Phytol* 185: 611–630. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03123.x
- Pokotylo I, Kolesnikov Y, Kravets V, Zachowski A, Ruelland E (2014) Plant phosphoinositide-dependent phospholipases C: Variations around a canonical theme. *Biochimie* 96: 144–157. doi: 10.1016/j.biochi.2013.07.004
- Ramazanov BR, Tran ML, Blume J von (2021) Sending out molecules from the TGN. *Curr Opin Cell Biol* 71: 55–62. doi: 10.1016/j.ceb.2021.02.005
- Rizzo R, Russo D, Kurokawa K, Sahu P, Lombardi B, Supino D, Zhukovsky MA, Vocat A, Pothukuchi P, Kunnathully V, et al (2021) Golgi maturation-dependent glycoenzyme recycling controls glycosphingolipid biosynthesis and cell growth via GOLPH3. *EMBO J* 40: e107238. doi: 10.15252/embj.2020107238
- Robinson DG, Pimpl P (2014) Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends Plant Sci* 19: 134–139. doi: 10.1016/j.tplants.2013.10.008
- Rodriguez-Gallardo S, Kurokawa K, Sabido-Bozo S, Cortes-Gomez A, Ikeda A, Zoni V, Aguilera-Romero A, Perez-Linero AM, Lopez S, Waga M, et al (2020) Ceramide chain length-dependent protein sorting into selective endoplasmic reticulum exit sites. *Sci Adv* 6: eaba8237. doi: 10.1126/sciadv.aba8237
- Saravanan RS, Slabaugh E, Singh VR, Lapidus LJ, Haas T, Brandizzi F (2009) The targeting of the oxysterol-binding protein ORP3a to the endoplasmic reticulum relies on the plant VAP33 homolog PVA12. *Plant J* 58: 817–830. doi: 10.1111/j.1365-313x.2009.03815.x

- Shimizu Y, Takagi J, Ito E, Ito Y, Ebine K, Komatsu Y, Goto Y, Sato M, Toyooka K, Ueda T, et al (2021) Cargo sorting zones in the *trans*-Golgi network visualized by super-resolution confocal live imaging microscopy in plants. *Nat Commun* 12: 1901. doi: 10.1038/s41467-021-22267-0
- Simon MLA, Platre MP, Assil S, Wijk R van, Chen WY, Chory J, Dreux M, Munnik T, Jaillais Y (2014) A multi-colour/multi-affinity marker set to visualize phosphoinositide dynamics in *Arabidopsis*. *Plant J* 77: 322–337. doi: 10.1111/tpj.12358
- Simon MLA, Platre MP, Marquès-Bueno MM, Armengot L, Stanislas T, Bayle V, Caillaud MC, Jaillais Y (2016) A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants. *Nat Plants* 2: 16089. doi: 10.1038/nplants.2016.89
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569–572. doi: 10.1038/42408
- Simons K, Meer GV (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27: 6197–6202. doi: 10.1021/bi00417a001
- Skirpan AL, Dowd PE, Sijacic P, Jaworski CJ, Gilroy S, Kao T (2006) Identification and characterization of PiORP1, a *Petunia oxysterol-binding-protein* related protein involved in receptor-kinase mediated signaling in pollen, and analysis of the ORP gene family in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 61: 553–565. doi: 10.1007/s11103-006-0030-y
- Sparkes IA, Ketelaar T, Ruijter NCA de, Hawes C (2009) Grab a Golgi: laser trapping of Golgi bodies reveals in vivo interactions with the endoplasmic reticulum. *Traffic* 10: 567–71. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00891.x
- Sperling P, Heinz E (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Biol Lipids* 1632: 1–15. doi: 10.1016/s1388-1981(03)00033-7
- Surma MA, Klose C, Klemm RW, Ejsing CS, Simons K (2011) Generic Sorting of Raft Lipids into Secretory Vesicles in Yeast. *Traffic* 12: 1139–1147. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01221.x
- Szentpetery Z, Várnai P, Balla T (2010) Acute manipulation of Golgi phosphoinositides to assess their importance in cellular trafficking and signaling. *Proc Natl Acad Sci* 107: 8225–8230. doi: 10.1073/pnas.1000157107
- Tamura T, Fujisawa A, Tsuchiya M, Shen Y, Nagao K, Kawano S, Tamura Y, Endo T, Umeda M, Hamachi I (2020) Organelle membrane-specific chemical labeling and dynamic imaging in living cells. *Nat Chem Biol* 16: 1361–1367. doi: 10.1038/s41589-020-00651-z
- Tan X, Feng Y, Liu Y, Bao Y (2016) Mutations in exocyst complex subunit SEC6 gene impaired polar auxin transport and PIN protein recycling in *Arabidopsis* primary root. *Plant Sci* 250: 97–104. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.06.001
- Tanaka H, Dhonukshe P, Brewer PB, Friml J (2006) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol Life Sci CMLS* 63: 2738–2754. doi: 10.1007/s00018-006-6116-5

- Tanaka H, Kitakura S, Rakusová H, Uemura T, Feraru MI, Rycke RD, Robert S, Kakimoto T, Friml J (2013) Cell Polarity and Patterning by PIN Trafficking through Early Endosomal Compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 9: e1003540. doi: 10.1371/journal.pgen.1003540
- Tóth B, Balla A, Ma H, Knight ZA, Shokat KM, Balla T (2006) Phosphatidylinositol 4-Kinase III β Regulates the Transport of Ceramide between the Endoplasmic Reticulum and Golgi. *J Biol Chem* 281: 36369–36377. doi: 10.1074/jbc.m604935200
- Tresch S, Heilmann M, Christiansen N, Looser R, Grossmann K (2012) Inhibition of saturated very-long-chain fatty acid biosynthesis by mefluidide and perfluidone, selective inhibitors of 3-ketoacyl-CoA synthases. *Phytochemistry* 76: 162–171. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.12.023
- Uemura T, Suda Y, Ueda T, Nakano A (2014) Dynamic Behavior of the *trans*-Golgi Network in Root Tissues of *Arabidopsis* Revealed by Super-Resolution Live Imaging. *Plant Cell Physiol* 55: 694–703. doi: 10.1093/pcp/pcu010
- 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
- Venditti R, Rega LR, Masone MC, Santoro M, Polishchuk E, Sarnataro D, Paladino S, D’Auria S, Varriale A, Olkkonen VM, et al (2019) Molecular determinants of ER–Golgi contacts identified through a new FRET–FLIM system. *J Cell Biol* 218: jcb.201812020. doi: 10.1083/jcb.201812020
- Viotti C, Bubeck J, Stierhof YD, Krebs M, Langhans M, Berg W van den, Dongen W van, Richter S, Geldner N, Takano J, et al (2010) Endocytic and Secretory Traffic in *Arabidopsis* Merge in the *Trans*-Golgi Network/Early Endosome, an Independent and Highly Dynamic Organelle. *Plant Cell* 22: 1344–1357. doi: 10.1105/tpc.109.072637
- Wakana Y, Kotake R, Oyama N, Murate M, Kobayashi T, Arasaki K, Inoue H, Tagaya M (2015) CARTS biogenesis requires VAP–lipid transfer protein complexes functioning at the endoplasmic reticulum–Golgi interface. *Mol Biol Cell* 26: 4686–4699. doi: 10.1091/mbc.e15-08-0599
- Walch-Solimena C, Novick P (1999) The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase Pik1 regulates secretion at the Golgi. *Nat Cell Biol* 1: 523–525. doi: 10.1038/70319
- Wang J, Sun HQ, Macia E, Kirchhausen T, Watson H, Bonifacino JS, Yin HL (2007) PI4P Promotes the Recruitment of the GGA Adaptor Proteins to the *Trans*-Golgi Network and Regulates Their Recognition of the Ubiquitin Sorting Signal. *Mol Biol Cell* 18: 2646–2655. doi: 10.1091/mbc.e06-10-0897
- Wang YJ, Wang J, Sun HQ, Martinez M, Sun YX, Macia E, Kirchhausen T, Albanesi JP, Roth MG, Yin HL (2003) Phosphatidylinositol 4 Phosphate Regulates Targeting of Clathrin Adaptor AP-1 Complexes to the Golgi. *Cell* 114: 299–310. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00603-2
- Wattelet-Boyer V, Brocard L, Jonsson K, Esnay N, Joubès J, Domergue F, Mongrand S, Raikhel N, Bhalerao RP, Moreau P, et al (2016) Enrichment of hydroxylated C24- and C26-acyl-chain sphingolipids mediates PIN2 apical sorting at *trans*-Golgi network subdomains. *Nat Commun* 7: 12788. doi: 10.1038/ncomms12788

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。

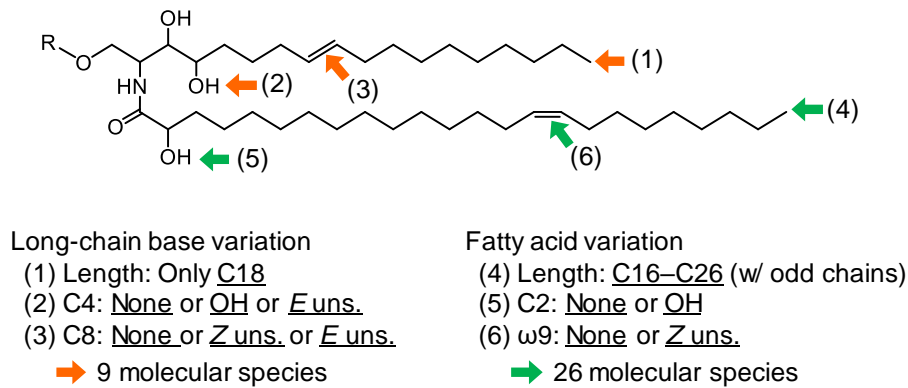


図1. 植物にみられるセラミドの化学構造

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)。

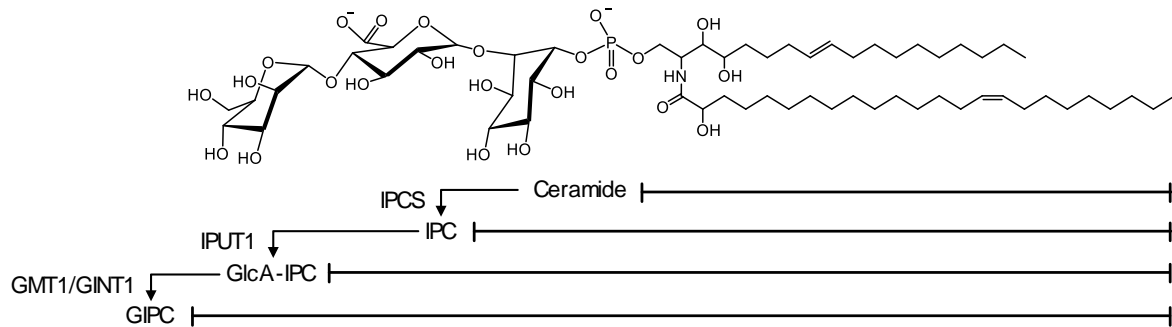


図 2. 植物 GIPC の構造と合成経路

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ドミクス

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 (リポドミクス) 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ド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)。

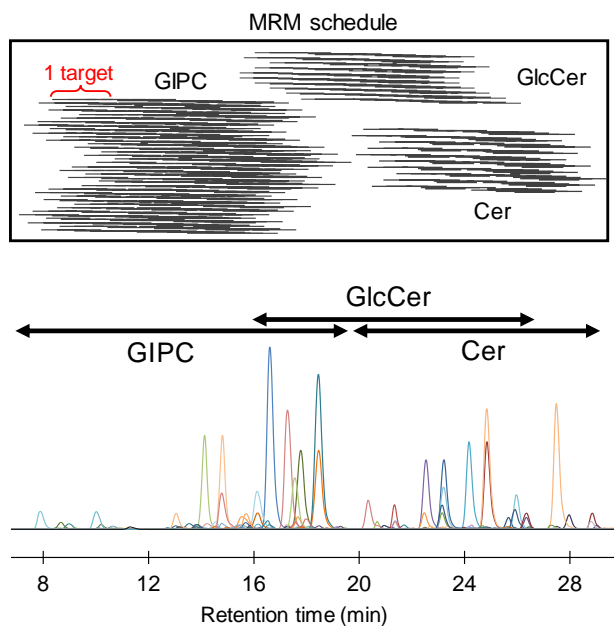


図 3. 植物スフィンゴ脂質の一斉分析手法
 (上) 個々の分子種の検出を HPLC の溶出時間の前後にスケジュール化することで同時測定対象分子数を 100 前後に抑え、総計千種以上の分子種を一度の分析で定量する。
 (下) 植物脂質粗抽出物を分析した例。異なる色は、それぞれ異なる分子種 (MRM) のクロマトグラムを示す。

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。

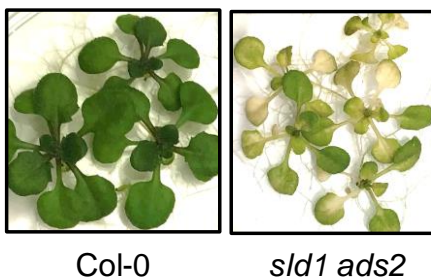


図 4. セラミド不飽和結合欠損植物の低温感受性
22°C で 2 週間生育させた植物体を 4°C で 1 週間処理し、再び 22°C に戻して 1 週間後の写真。野生型は特に障害を示さないが、セラミド不飽和結合欠損変異体 (*sld1 ads2*) は成長が停止し葉が白化する。

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

植物における発生と脂質の相互制御

永田 賢司, 阿部 光知

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系
〒153-8902 東京都目黒区駒場 3 丁目 8-1

Mutual regulation between development and lipid environment in plants

Kenji Nagata, Mitsutomo Abe

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences,
The University of Tokyo
3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo, 153-8902, Japan

Keywords: ATML1, Ceramide, Epidermis, PDF2, VLCFA

DOI: 10.24480/bsj-review.15c5.00270

1. はじめに

タンパク質・核酸・糖と並び、脂質は細胞の主要な構成成分の一つに位置づけられる。細胞において脂質の大部分は、細胞やオルガネラの周囲を覆う生体膜中に存在する。1972年に Singer と Nicolson が提唱した流動モザイクモデルでは、種々の脂質は生体膜中に均一に分布し、多様な生体膜機能を担うタンパク質群の足場としてはたらくと考えられた (Singer and Nicolson 1972)。しかし、生体膜における脂質の動態や機能の理解は、脂質組成の脂質二重層間非対称性の発見 (Verkleij et al. 1973) や脂質ラフトモデルの提唱 (Simons and Ikonen 1997) などを通じて、徐々に変容を遂げてきた。現在では、種々の脂質は生体膜中に不均一に分布し、同一の生体膜内でも脂質組成の局所的な違いがあることが広く受け入れられている。こうした脂質組成の違いは、パッキング密度・表面電荷・疎水性度・弾性・厚み・湾曲率などの生体膜の物理化学的性質の違いを生み出し、シグナル伝達やエネルギー生産、物質輸送など生体膜が示すユニークな生命機能の基盤となる (Bigay and Antonny 2012; Boutte and Moreau 2014; Holthuis and Menon 2014; Prasad et al. 2020)。これは、脂質が単なる生体膜の構成成分でなく、その機能を制御するためのキープレイヤーであることを意味している。

脂質組成の違いは同一の生体膜内にとどまらず、様々な発生スケール (オルガネラ, 細胞, 組織, 器官, 個体, etc.) で見られる。例えば、小胞体膜は不飽和度が高く脂肪酸鎖長の短い円錐型構造の脂質を多く含む。そのため、小胞体膜を構成する脂質のパッキング密度は疎で、膜の厚みは比較的薄くなる。こうした小胞体膜の物理化学的性質は、脂質や膜タンパク質の産生や輸送を流動的に行う場として小胞体膜が効率的に機能するために重要である。一方、細胞膜には不飽和度が低く脂肪酸鎖長の長い円筒型構造の脂質が多く含まれる。そのため、細胞膜を構成する脂質のパッキング密度は密になり、膜の厚みは比較的厚くなる。その結果、細胞膜は細胞内外の環境を隔てる堅牢な物理的障壁としての機能側面を強く発揮する (Holthuis and Menon 2014; Boutte and Jaillais 2020)。また、葉緑体を構成する膜は、主にリ

ン脂質から構成される他の生体膜と異なり、糖脂質を主成分とする。糖脂質の生合成に異常のあるシロイヌナズナの変異体が葉緑体の光合成機能や形態形成に強い異常を示すことは、糖脂質が正常な葉緑体機能に不可欠であることを示している (Kobayashi 2016; 小林・吉原 2021)。

さらに、発生段階や環境条件によっても脂質組成のダイナミックな変化が生じる。例えば、根の表皮細胞では分化に伴ってホスファチジルセリンの細胞内分布が変化する (Platre et al. 2019)。また、植物体内の脂質組成は日周に伴ってダイナミックに変化する (Nakamura et al. 2014; Maatta et al. 2012)。これらの例は、植物では脂質の分布や組成といった脂質に関わる生体内環境 (脂質環境) が、発生・環境応答プログラムの一部として巧妙に制御されていることを示している。一方、脂質環境それ自体が植物の発生・環境応答を主導的に制御する例も数多く報告されている。根の表皮細胞においてホスファチジルセリンは、オーキシニンシグナル経路で働く Rho of Plants 6 (ROP6) タンパク質の局在を制御し、根の重力応答を制御する (Platre et al. 2019)。また、日周に伴った脂質組成の変化は、フロリゲンの分子実体である FLOWERING LOCUS T と脂質の相互作用動態の変化を引き起こし、花成のタイミングを厳密に制御する (Nakamura et al. 2014)。このように植物においては、発生・環境応答プログラムによって脂質環境が制御されるのに加えて、脂質環境が植物の発生・環境応答を制御する、発生・環境応答-脂質環境間の相互制御が存在すると考えられている (Boutte and Jaillais 2020)。本稿では植物における発生・環境応答-脂質環境間の相互制御について、表皮細胞の分化を例に概観する。特に、「表皮細胞にユニークな脂質環境の形成はどのように制御されるのか?」「表皮細胞の脂質環境はどのように表皮細胞の発生を制御するのか?」という問いについて、我々の最近の研究成果を基に議論したい。

2. 表皮細胞にユニークな脂質環境の形成機構

植物体の最外層に位置する表皮細胞群の脂質環境は、高度に分化している (※植物体の地下部、すなわち根の最外層を占めるのは表皮、側部根冠、コルメラを構成する細胞群のうち、根の表層に露出した一部の細胞群である。しかし、本稿では分かりやすさのため、地上部と地下部で植物体の最外層を占める細胞群をまとめて表皮細胞と呼称する。)。表皮細胞は植物体内部と外部環境を隔てる位置に分化する。固着生活を送る植物は外部環境で生じる多様なストレスに常に晒されるため、表皮細胞は多様な防御形質を発現し植物体内部を保護している。その一つの象徴が、表皮細胞の細胞表層に形成されるクチクラ層である (図 1)。クチクラ層は主に、不飽和脂肪酸が重合 (ポリエステル化) したクチンと炭素鎖数が 20 以上と極めて長い極長鎖脂肪酸 (Very-long-chain fatty acid; VLCFA) の派生物質であるワックスからなる脂溶性構造体である (Yeats and Rose 2013)。そのため、表皮細胞にはクチクラ層形成に必要なユニークな脂質環境が発達している (図 1)。

それでは植物の発生の過程において、表皮細胞が持つユニークな脂質環境はどのように確立されるのだろうか?クチクラ層の形成は、色素体で生合成された炭素鎖数 16 または 18 の脂肪酸 (C16/18 long-chain-fatty acid; C16/18 LCFA) が小胞体へ輸送されることから始まる (Yeats and Rose 2013)。その後、一部の C16/18 LCFA は小胞体において種々の修飾を受けた

のち、グリセロ骨格に組み込まれてモノアシルグリセロールとなる。モノアシルグリセロールは細胞外に輸送された後、重合されてクチンとなる (Yeats and Rose 2013)。また、一部の C16/18 LCFA は小胞体において炭素鎖数 20 以上の VLCFA に延長され、その後アルコールやエステル、アルデヒド、アルカン、ケトンに変換されることで、ワックスとなる。合成されたワックスは細胞外に輸送された後、クチンと共にクチクラ層を形成する (Yeats and Rose 2013)。このように、表皮細胞にはクチクラ層の形成に必要な脂質代謝系が発達する (図 1)。

表皮細胞がクチクラ層を形成するために必要な脂質環境は、クチクラ層の直接の材料であるクチン・ワックス生合成のための脂質代謝系だけではない。クチクラ層は表皮細胞と外部環境の境界面に形成されることではじめて、個体の内外を隔てる防御障壁として機能する。そのため、クチクラ層の構成成分は表皮細胞内で合成された後、外部環境の方向へ極性を持って輸送・分泌される必要がある。こうしたクチクラ層構成成分の極性を持った輸送には、表皮細胞が持つ高度に極性化した膜区画が必要である。表皮細胞膜は、外部環境に面する細胞膜区画 (Outer Lateral Membrane; OL 膜) と植物体内部に面する膜区画 (Inner Lateral Membrane; IL 膜) に区画化されている (Luo et al. 2007; Nakamura and Grebe 2008; Nagata et al. 2021)。細胞外へのクチクラ層構成成分の輸送を担う ABC トランスポーター群などは表皮細胞膜の中でも OL 膜に特異的に集積し、クチクラ層の構成成分の極性を持った輸送を担う (図 1) (Luo et al. 2007; Nagata et al. 2021)。こうした表皮細胞膜に形成される特徴的な細胞膜区画の形成もまた、表皮細胞がクチクラ層を形成するために必要なユニークな脂質環境の一つである (図 1)。本節では、ワックスの生合成に必須の過程である VLCFA の生合成に着眼点を置き、上述した表皮細胞の持つユニークな脂質環境の確立機構について議論したい。

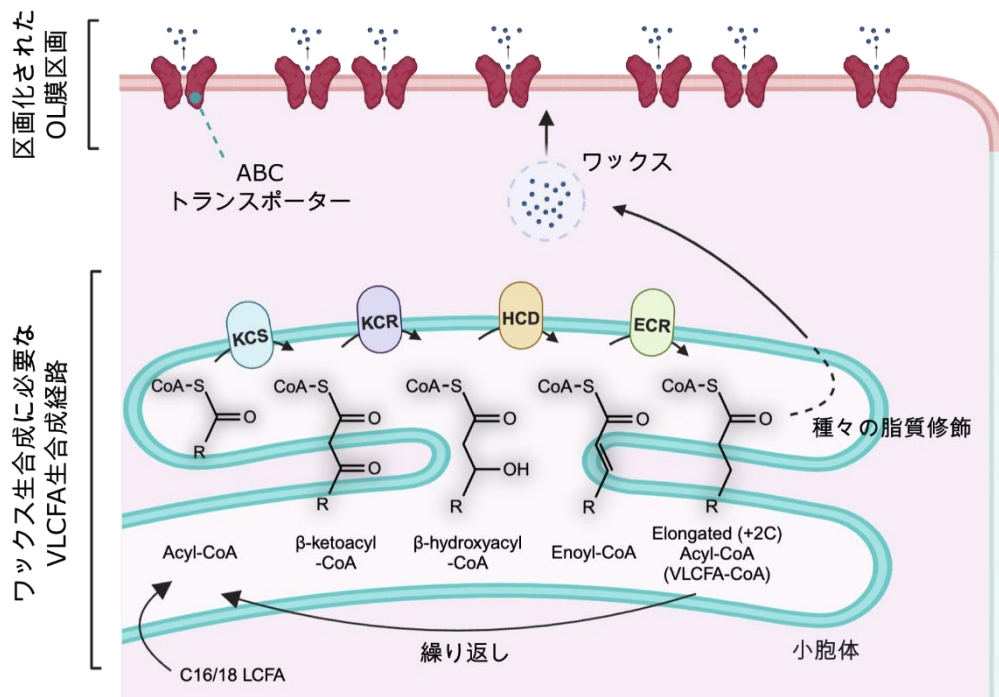


図 1. 表皮細胞が発達させるユニークな脂質環境

色素体で合成された C16/18 LCFA は Coenzyme A (CoA) と結合した後、小胞体に局在する 4 つの酵素 (KCS, KCR, HCD, ECR) の連続的な働きによって VLCFA に変換される。合成された VLCFA は種々の脂質修飾を受けたのちにワックスとなり、OL 膜に局在する ABC トランスポーター群などの働きによって細胞外に輸送・分泌される。

2-1. 表皮細胞における VLCFA 生合成経路の形成機構

VLCFA の生合成は Fatty Acid Elongase と呼ばれる酵素複合体による 4 段階の連続的な酵素反応（縮合→還元→脱水→還元）によって脂肪酸鎖に炭素を 2 個ずつ付加する過程を繰り返すことで起こる（図 1）（Bach and Faure 2010）。各段階の酵素反応はそれぞれ、 β -ketoacyl-CoA synthase (KCS), β -ketoacyl-CoA reductase(KCR), β -hydroxacyl-CoA dehydratase (HCD) , enoyl-CoA reductase (ECR)により触媒される。発芽後の植物体において、これら酵素をコードする遺伝子群（VLCFA 生合成遺伝子群）は、表皮細胞のほか VLCFA を用いたスベリン合成が起こる根の内皮細胞で発現することが知られる。我々は表皮細胞における VLCFA 生合成経路の確立過程を詳細に理解するため、シロイヌナズナにおいて機能的な HCD をコードする唯一の遺伝子である *PASTICCINO2* (*PAS2*) 遺伝子（Bach et al. 2008）の発現パターンを詳細に解析した。その結果、胚発生過程において *PAS2* 遺伝子は未熟な表皮細胞（原表皮細胞）から構成される層構造（原表皮）が初めて形成される 16 細胞期に先んじて発現していた（図 2）（Nagata et al. 2021）。原表皮の形成後、*PAS2* 遺伝子の発現は原表皮細胞のみに限定され（図 2）、発芽後も表皮細胞における *PAS2* 遺伝子の発現は維持されていた（Nagata et al. 2021）。また、根に後生的に形成される側生器官である側根でも、*PAS2* 遺伝子の発現はごく初期の発生段階から一貫して表皮細胞で観察された（図 2）（Nagata et al. 2021）。これらの観察から、VLCFA の生合成に必要な代謝系は植物の発生の極めて初期の段階に確立された後、原表皮/表皮細胞のみに継承されると考えられた。

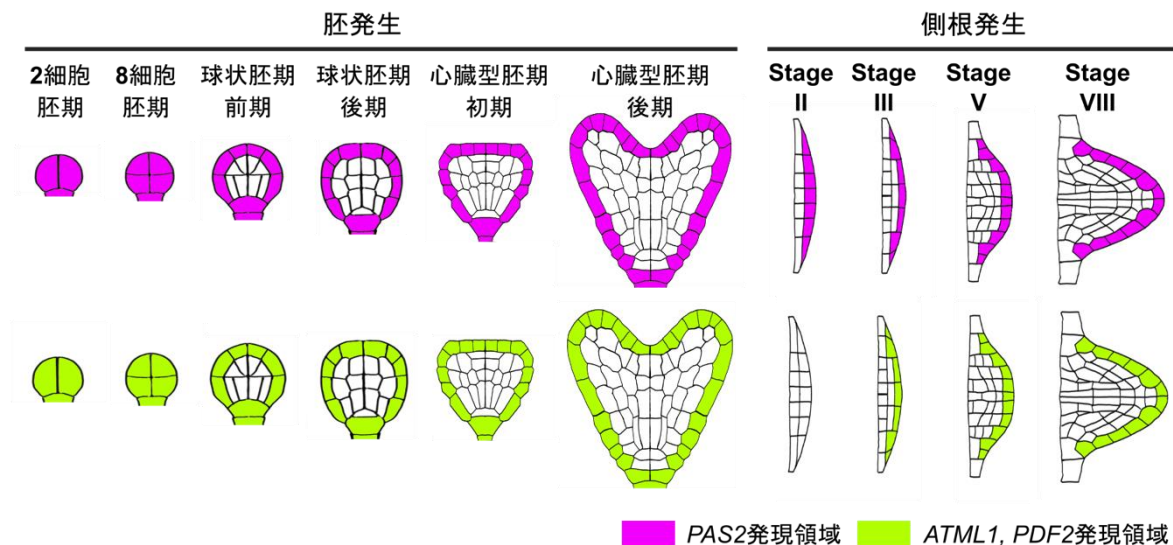


図 2. 表皮細胞の発生過程における VLCFA 生合成遺伝子 (*PAS2* 遺伝子) と表皮細胞分化制御の鍵遺伝子 (*ATML1*, *PDF2* 遺伝子) の発現動態

シロイヌナズナにおいて表皮細胞の分化は、クラス IV ホメオボックス-ロイシンジッパー (HD-ZIP IV) 転写因子の *ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM LAYER1* (*ATML1*) および *PROTODERMAL FACTOR2* (*PDF2*) によって制御される (Abe et al. 2001, 2003)。*PAS2* 遺伝子と同様、*ATML1* をコードする *ATML1* 遺伝子および *PDF2* をコードする *PDF2* 遺伝子の発現は胚発生や側根発生の極めて初期段階に開始し、発生過程を通じて原表皮/表皮細胞で特異

的に維持される (図 2) (Lu et al. 1996; Sessions et al. 1999; Abe et al. 2001, 2003; Takada et al. 2007; Nagata et al. 2021)。ATML1 および PDF2 は表皮細胞特異的遺伝子群のプロモーターに共通して存在するシス配列 (L1 box) に結合し、下流の遺伝子発現を促進する (Abe et al. 2001, 2003)。興味深いことに、*PAS2* 遺伝子を含む VLCFA 生合成遺伝子群の多くは、そのプロモーター領域に L1 box を持つ。また、人工マイクロ RNA によって *ATML1*, *PDF2* 遺伝子の特異的にノックダウンした植物体では、*PAS2* 遺伝子を含む VLCFA 生合成遺伝子群の発現が低下する (Rombolá-Caldentey et al. 2014)。すなわち、原表皮/表皮細胞における VLCFA やその派生脂質の生合成は、原表皮/表皮細胞特異的に発現する転写因子 *ATML1* および *PDF2* によって制御されると考えられる。植物では、VLCFA はワックスの生合成に用いられる他、特にスフィンゴ脂質の生合成に用いられる (Bach and Faure 2010)。そこで我々は、*ATML1* 遺伝子と *PDF2* 遺伝子のはたらきを同時に欠損した *atml1; pdf2* 二重変異体において VLCFA を含むスフィンゴ脂質を定量し、野生型植物と比較した。その結果、VLCFA を含むスフィンゴ脂質量は、野生型植物と比較して *atml1; pdf2* 二重変異体で顕著に減少していた (Nagata et al. 2021)。以上の結果から、*ATML1*, *PDF2* 遺伝子は表皮細胞分化プログラムの一部として、VLCFA の生合成、とりわけ VLCFA を含むスフィンゴ脂質の生合成という表皮細胞特異的な脂質の代謝を制御していると考えられる。

2-2. 植物の表皮細胞が持つ特徴的な細胞膜区画の形成機構

生体膜の区画化には、スフィンゴ脂質とステロールに富む細胞膜構造である脂質ラフト (マイクロドメイン) が関与することが知られる (Simons and Ikonen 1997; Simons and Toomre 2000)。そこで我々は、表皮細胞膜に形成される細胞膜区画の形成に VLCFA, 特に脂質ラフトの形成に重要なはたらきを果たす VLCFA を含むスフィンゴ脂質が関わるか検討した。VLCFA を含むスフィンゴ脂質の生合成を特異的に阻害する薬剤の存在下で、OL 膜と IL 膜のそれぞれに局在する膜タンパク質の挙動を検討したところ、OL 膜に局在する膜タンパク質の局在のみが感受性を示し、細胞内の顆粒状構造へ移行した (Nagata et al. 2021)。これらの結果から、表皮細胞膜に形成される細胞膜区画のうち、クチクラ層の構成成分の極性を持った輸送に重要な OL 膜の形成には、VLCFA を含むスフィンゴ脂質が関与することが示唆された。すなわち表皮細胞では、*ATML1*, *PDF2* 遺伝子のはたらきで形成される表皮細胞特異的な脂質代謝経路の産物である VLCFA は、ワックスの生合成に利用されるだけでなく、スフィンゴ脂質に組み込まれた後、OL 膜区画の形成においても活用されると考えられる。

3. 表皮細胞が持つユニークな脂質環境による表皮細胞分化の制御機構

本節では、*ATML1*, *PDF2* 遺伝子のはたらきにより形成される表皮細胞にユニークな脂質環境が、いかに表皮細胞の分化を制御するのかについて議論する。クチクラ層に象徴される多様な防御形質を発現する表皮細胞は、植物体内部と外部環境を隔てる植物体の最外層に正確に分化することで、植物体内部を様々なストレスから保護する。では、どのような分子機構が正確な位置での表皮細胞分化を実現するのだろうか？

この疑問に答えることは、表皮細胞分化を司る *ATML1*, *PDF2* 遺伝子の発現が植物体の最外層でのみ正確に維持される分子機構を解き明かすことに他ならない。前節で述べたように、*ATML1*, *PDF2* は表皮細胞特異的遺伝子群のプロモーターに共通して存在するシス配列 L1 box に結合し、下流の遺伝子発現を促進する (Abe et al. 2001, 2003)。L1 box は *ATML1*, *PDF2* 遺伝子プロモーター領域にも存在し、*ATML1*, *PDF2* 遺伝子の転写は自らの翻訳産物 (*ATML1* および *PDF2*) を介したフォワードフィードバック機構 (オートレギュレーション) により制御されると考えられた (Abe et al. 2001, 2003)。オートレギュレーションはシンプルな遺伝子発現制御機構であり、一見して表皮細胞特異的な遺伝子発現という複雑な発現様式を制御することは考えづらい。しかし我々は、*ATML1*, *PDF2* が位置依存的な翻訳後安定性制御を受け、表皮細胞群のみで安定的に存在できることを明らかにした (Nagata et al. 2021; Nagata and Abe 2023)。すなわち、オートレギュレーションによる *ATML1*, *PDF2* 遺伝子の転写制御機構は、*ATML1*, *PDF2* 遺伝子プロモーター内の L1 box に結合する転写制御因子である *ATML1*, *PDF2* が安定的に存在できる表皮細胞群のみで維持されると考えられた。

次に我々は、*ATML1*, *PDF2* の位置依存的な翻訳後安定性制御機構の理解を試みた。*ATML1*, *PDF2* は植物に固有の HD-ZIP IV 型転写因子ファミリーに属する。HD-ZIP IV 型転写因子の特徴の一つに、steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer (START) ドメインを有することが挙げられる。START ドメインは動物・植物を含む真核生物に広く保存された脂質結合ドメインであり、植物では START ドメインはリガンド脂質との結合を介して転写因子活性の制御に関わることが示唆されていた (Schrick et al. 2014)。そこで脂質-タンパク質間相互作用を検出する *in vitro* の解析手法である Protein-lipid overlay 法によって *ATML1* の START ドメインのリガンド脂質を探索したところ、スフィンゴ脂質の一種であるセラミドが同定された。興味深いことに、*ATML1* の START ドメインによるセラミドとの相互作用にはセラミドが含む脂肪酸鎖長に対する選択性があり、VLCFA を含むセラミドのみが *ATML1* の START ドメインと相互作用することが明らかになった (Nagata et al. 2021)。また我々の報告の後、*in vivo* 手法を用いた *PDF2* のリガンド脂質の網羅的探索によって、VLCFA を含むセラミドが *PDF2* のリガンド脂質の一つであることが報告された (Wojciechowska et al. 2021)。そこで、*ATML1*, *PDF2* と VLCFA を含むセラミドとの相互作用が *ATML1*, *PDF2* の位置依存的な翻訳後安定性制御に必要なか検討した。VLCFA を含むセラミドとの相互作用が特異的に阻害される 1 アミノ酸置換を含む変異型 *ATML1* は、表皮細胞群における安定性を喪失していた (Nagata et al. 2021)。また、同様の位置に一アミノ酸置換が導入された変異型 *PDF2* も同様に表皮細胞群における安定性を喪失していた (Nagata and Abe 2023)。さらに、VLCFA の生合成を阻害した条件下においては野生型の *ATML1*, *PDF2* であっても表皮細胞群における安定性を喪失していた (Nagata et al. 2021)。以上の結果は、*ATML1*, *PDF2* と VLCFA を含むセラミドとの相互作用が *ATML1*, *PDF2* の位置依存的な翻訳後安定性制御に必要なことを示している (図 3A)。最後に、*ATML1*, *PDF2* 遺伝子の転写制御における、*ATML1*, *PDF2* の位置依存的な翻訳後安定性制御の役割を検討した。VLCFA の生合成を阻害した条件下においては、*ATML1*, *PDF2* 遺伝子の転写量は顕著に低下していた (Nagata et al. 2021)。すなわち、*ATML1*, *PDF2* 遺伝子プロモーター内の L1 box に結合する転写制御因子である *ATML1*, *PDF2* が

VLCFA を含むセラミドとの相互作用を通じて安定性を維持することは、オートレギュレーションによる *ATML1*, *PDF2* 遺伝子の表皮細胞特異的な転写制御に必要であると考えられた(図3B)。

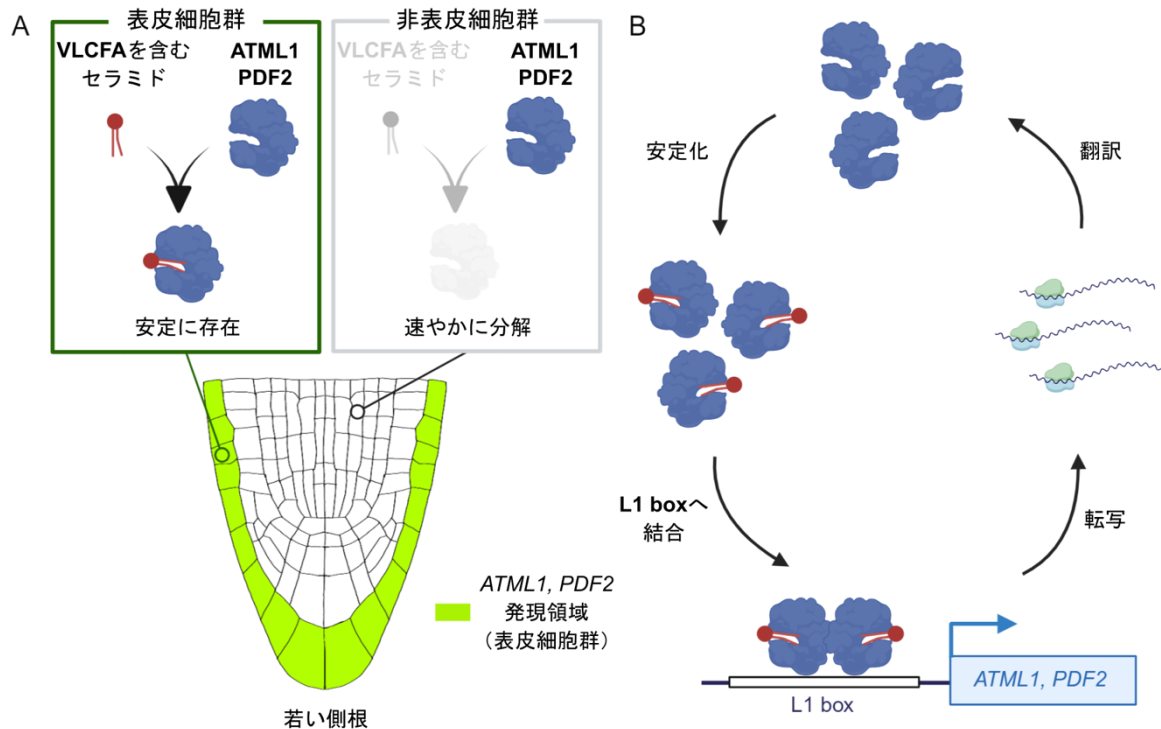


図3. *ATML1*, *PDF2* 遺伝子の発現制御メカニズム

(A) *ATML1*, *PDF2* タンパク質は表皮細胞群に存在する VLCFA を含むセラミドと複合体を形成したときのみ、安定に存在できる。(B) *ATML1*, *PDF2* 遺伝子の発現を制御するオートレギュレーションは、VLCFA を含むセラミドと *ATML1*, *PDF2* タンパク質の相互作用を通じて安定に維持される。

4. 鶏が先か卵が先か

表皮細胞のユニークな脂質環境は、*ATML1*, *PDF2* による転写制御により形成されることが考えられる。一方、*ATML1*, *PDF2* の表皮細胞特異的な活性や発現パターンは表皮細胞の脂質環境によって制御されることが考えられる。すなわち、表皮細胞の分化は表皮細胞分化を制御する転写因子である *ATML1*, *PDF2* と表皮細胞の脂質環境の相互制御を通じて進行するといえる。それでは、*ATML1*, *PDF2* の発現と表皮細胞の脂質環境の形成のどちらが表皮細胞の分化の起点となるのだろうか？この問いに答えることは今後の大きな課題の一つである。本節では、我々の解析結果やいくつかの重要な先行研究を基に現時点での理解や今後の展望を議論したい。

4-1. 側根発生及び胚発生の初期過程における観察

シロイヌナズナでは、維管束の原生木部に接する内鞘細胞が分裂することで、側根形成が開始される。側根の初期形成過程では規則正しい細胞分裂が繰り返され、秩序だった層構造をもつ側根原基が形成される。我々は、側根の初期発生過程での *ATML1*, *PDF2* 遺伝子と *PAS2* 遺伝子の発現動態を時系列にそってそれぞれ観察した。その結果、*ATML1*, *PDF2*, *PAS2* 遺伝

子は全て、側根原基の最外層を構成する細胞群のみで特異的に観察された。興味深いことに、*PAS2* 遺伝子の発現は、*ATML1*, *PDF2* 遺伝子が発現を開始するタイミングよりわずかに早い時期にも観察された (図 2) (Nagata et al. 2021)。側根発生初期における VLCFA 生合成遺伝子群の発現は、AP2/ERF 型転写因子の *PUCHI* によって制御されることが報告されている (Trinh et al. 2019)。また、*puchi* 変異体では、側根における *ATML1*, *PDF2* 遺伝子の発現が抑制される (Bellande et al. 2022)。すなわち、側根の初期発生過程においては *ATML1*, *PDF2* 遺伝子と VLCFA 生合成遺伝子群の発現は独立に制御され、*ATML1*, *PDF2* 遺伝子の発現には VLCFA 生合成遺伝子群の先行した発現が必要であることが示唆される。

シロイヌナズナの胚発生では、8 細胞期から 16 細胞期にかけての細胞分裂によって胚を構成する細胞群の間に初めて内外方向の位置の違いが生じる。我々は、8 細胞期胚および 16 細胞期胚における *ATML1* の発現動態を詳細に解析した。その結果、*ATML1* の発現は 8 細胞期胚では常に全ての細胞の核で確認されたが、16 細胞期胚では全ての細胞の核で確認される場合と外側に位置する原表皮細胞群の核のみで観察される場合があった (Nagata et al. 2021)。一方、*ATML1* 遺伝子の転写活性を詳細に解析した先行研究 (Takada et al. 2007) では、*ATML1* 遺伝子の転写活性は 8 細胞期では胚の全ての細胞に見られるにも関わらず、16 細胞期に移行した後は外側に位置する原表皮細胞のみで維持され、内側に位置する細胞群では厳密に抑制されることが報告されている。このことは、16 細胞期胚で内側に位置する細胞の核に存在する *ATML1* は、細胞分裂後に新たに転写・翻訳されたのではなく、8 細胞期胚 (以前) に転写・翻訳された *ATML1* が細胞分裂を介して分配されたものであることを示唆している。一方、高度に極性化した膜区画は 8 細胞期胚を構成する細胞群や 16 細胞期胚の原表皮細胞群でも観察される (Liao and Weijers 2018)。すなわち、*ATML1* は細胞分裂を介して (一過的には) 非表皮細胞群にも分配されうるものの、表皮細胞に特徴的な細胞膜区画を持たない非表皮細胞群では即座に転写因子活性を失い、その後分解されることが示唆される。我々はこうした転写因子活性の迅速な制御メカニズムの候補として、*ATML1* の転写因子活性に必要な *ATML1* ホモダイマーや *ATML1*-*PDF2* ヘテロダイマーの形成が、*ATML1* と VLCFA を含むセラミドの相互作用に依存することを明らかにしている (Nagata and Abe 2021, 2023)。

4-2. 今後の展望

現在のところ我々は、表皮細胞分化において *ATML1*, *PDF2* の発現と表皮細胞の脂質環境の形成は、原表皮細胞分化の確立段階においては独立に制御されると考えている。しかし、表皮細胞群の分化が転写因子-脂質環境間相互制御を通じて維持され続けるためには、脂質環境が先行して形成されていることが必要であると考えている。表皮細胞に形成された脂質環境は細胞の位置情報を含むとともに、*ATML1*, *PDF2* の発現を主導的に制御していく役割を持つと推測している。こうしたアイデアを今後実証していくためには、植物の発生プロセスの最初期 (配偶子や受精卵, 側根原基の創始細胞) を解析の出発点として、*ATML1*, *PDF2* の発現と表皮細胞が持つユニークな脂質環境の形成の関係を丁寧に検証していく必要がある。特に、*ATML1*, *PDF2* と VLCFA を含むセラミドとの相互作用に関して、その生体内動態を高い時空間解像度で明らかにしていくことは今後の最も重要な課題であると考えている。さら

に、胚発生や器官形成の極めて初期段階で未分化な表皮細胞における *ATML1*, *PDF2* 遺伝子の発現を誘導する具体的な分子メカニズムも併せて解明することが出来れば、植物の表皮細胞分化制御機構に関して包括的理解が得られると期待している。

5. おわりに

本稿では、植物における発生・環境応答-脂質環境間の相互制御を、表皮細胞における例を基に概観してきた。植物の発生や環境応答が脂質環境とのクロストークを通じて制御されていく事例は、これからも数多く明らかになっていくだろう。特に、*ATML1*, *PDF2* と同様に *START* ドメインを持つ *HD-ZIP III*, *IV* 型転写因子群は非常に魅力的な研究対象である。シロイヌナズナのゲノム上には 21 個の *HD-ZIP III*, *IV* 型転写因子群がコードされており、植物の発生の様々な局面に関与する (Ariel et al. 2007)。最近、*ATML1*, *PDF2* 以外の *HD-ZIP III*, *IV* 型転写因子に関しても、リガンド脂質との相互作用を通じた機能制御 (安定性制御, ダイマー化制御) をうけることが報告された (Mukherjee et al. 2022; Husbands et al. 2023)。また、プレプリントの段階ではあるものの、*in vivo* 手法による *HD-ZIP IV* 型転写因子のリガンド脂質の単離・同定も報告されている (Wojciechowska et al. 2021)。近年急速に進歩しつつある様々な脂質解析技術を用いて、近い将来ユニークな脂質環境とのクロストークを通じた *HD-ZIP III*, *IV* 型転写因子群による植物の発生や環境応答の制御メカニズムが数多く解き明かされることを期待したい。

謝辞

本稿で紹介した研究は、共同研究者である岡山大学の高橋卓教授、埼玉大学の川合真紀教授、石川寿樹准教授のご協力のもと行われました。この場を借りて心から感謝申し上げます。本稿の図表は Biorender.com を使用して作成されました。

引用文献

- Abe M, Katsumata H, Komeda Y, Takahashi T (2003) Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in *Arabidopsis*. *Development* 130: 635–643. doi:10.1242/dev.00292
- Abe M, Takahashi T, Komeda Y (2001) Identification of a *cis*-regulatory element for L1 layer-specific gene expression, which is targeted by an L1-specific homeodomain protein. *Plant J* 26: 487–494. doi:10.1046/j.1365-313x.2001.01047.x
- Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL (2007) The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci* 12:419–426. doi:10.1016/j.tplants.2007.08.003
- Bach L, Faure JD (2010) Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter. *C R Biol* 333:361–370. doi:10.1016/j.crv.2010.01.014
- Bach L, Michaelson LV, Haslam R, Bellec Y, Gissot L, Marion J, Da Costa M, Boutin JP, Miquel M, Tellier F, et al (2008) The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14727–14731. doi:10.1073/pnas.0805089105

- Bellande K, Trinh DC, Gonzalez AA, Dubois E, Petitot AS, Lucas M, Champion A, Gantet P, Laplaze L, Guyomarc'h S (2022) PUCHI represses early meristem formation in developing lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 73:3496–3510. doi:10.1093/jxb/erac079
- Bigay J, Antony B (2012) Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity. *Dev Cell* 23:886–895. doi:10.1016/j.devcel.2012.10.009
- Boutté Y, Jaillais Y (2020) Metabolic Cellular Communications: Feedback Mechanisms between Membrane Lipid Homeostasis and Plant Development. *Dev Cell* 54:171–182. doi:10.1016/j.devcel.2020.05.005
- Boutté Y, Moreau P (2014) Modulation of endomembranes morphodynamics in the secretory/retrograde pathways depends on lipid diversity. *Curr Opin Plant Biol* 22:22–29. doi:10.1016/j.pbi.2014.08.004
- Helms JB, Zurzolo C (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* 5:247–254. doi:10.1111/j.1600-0854.2004.0181.x
- Holthuis JCM, Menon AK (2014) Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* 510:48–57. doi:10.1038/nature13474
- Husbands AY, Feller A, Aggarwal V, Dresden CE, Holub AS, Ha T, Timmermans MCP (2022) The START domain potentiates HD-ZIPIII transcriptional activity. *Plant Cell* 35: 2332–2348. doi:10.1093/plcell/koad058
- Kobayashi K (2016) Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J Plant Res* 129:565–580. doi:10.1007/s10265-016-0827-y
- 小林康一, 吉原晶子 (2021) 脂質代謝が印す葉緑体の進化と多様性. *BSJ Review* 12A:23–37 doi:10.24480/bsj-review.12a4.00197
- Liao CY, Weijers D (2018) A toolkit for studying cellular reorganization during early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 93:963–976. doi:10.1111/tpj.13841
- Lu P, Porat R, Nadeau JA, O'Neill SD (1996) Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell* 8:2155–2168. doi:10.1105/tpc.8.12.2155
- Luo B, Xue XY, Hu WL, Wang LJ, Chen XY (2007) An ABC transporter gene of *Arabidopsis thaliana*, *AtWBC11*, is involved in cuticle development and prevention of organ fusion. *Plant Cell Physiol* 48:1790–1802. doi:10.1093/pcp/pcm152
- Maatta S, Scheu B, Roth MR, Tamura P, Li M, Williams TD, Wang X, Welti R (2012) Levels of *Arabidopsis thaliana* Leaf Phosphatidic Acids, Phosphatidylserines, and Most Trienoate-Containing Polar Lipid Molecular Species Increase during the Dark Period of the Diurnal Cycle. *Front Plant Sci* 3:49. doi:10.3389/fpls.2012.00049
- Mukherjee T, Subedi B, Khosla A, Begler EM, Stephens PM, Warner AL, Lerma-Reyes R, Thompson KA, Gunewardena S, Schrick K (2022) The START domain mediates *Arabidopsis* GLABRA2 dimerization and turnover independently of homeodomain DNA binding. *Plant Physiol* 190:2315–2334. doi:10.1093/plphys/kiac383

- Nagata K, Abe M (2023) A conserved mechanism determines the activity of two pivotal transcription factors that control epidermal cell differentiation in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* 136:49–358. doi:10.1007/s10265-023-01439-7
- Nagata K, Abe M (2021) The lipid-binding START domain regulates the dimerization of ATML1 via modulating the ZIP motif activity in *Arabidopsis thaliana*. *Dev Growth Differ* 63:448–454. doi:10.1111/dgd.12753
- 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
- Nakamura M, Grebe M (2018) Outer, inner and planar polarity in the Arabidopsis root. *Curr Opin Plant Biol* 41:46–53 doi:10.1016/j.pbi.2017.08.002
- Nakamura Y, Andrés F, Kanehara K, Liu YC, Dörmann P, Coupland G (2014) *Arabidopsis* florigen FT binds to diurnally oscillating phospholipids that accelerate flowering. *Nat Commun* 5:3553. doi:10.1038/ncomms4553
- Platre MP, Bayle V, Armengot L, Bareille J, Marquès-Bueno MDM, Creff A, Maneta-Peyret L, Fiche J-B, Nollmann M, Miège C, et al (2019) Developmental control of plant Rho GTPase nano-organization by the lipid phosphatidylserine. *Science* 364:57–62. doi:10.1126/science.aav9959
- Prasad R, Sliwa-Gonzalez A, Barral Y (2020) Mapping bilayer thickness in the ER membrane. *Sci Adv* 6:eaba5130. doi:10.1126/sciadv.aba5130
- Rombolá-Caldentey B, Rueda-Romero P, Iglesias-Fernández R, Carbonero P, Oñate-Sánchez L (2014) Arabidopsis DELLA and two HD-ZIP transcription factors regulate GA signaling in the epidermis through the L1 box cis-element. *Plant Cell* 26:2905–2919. doi:10.1105/tpc.114.127647
- Schrick K, Bruno M, Khosla A, Cox PN, Marlatt SA, Roque RA, Nguyen HC, He C, Snyder MP, Singh D, et al (2014) Shared functions of plant and mammalian StAR-related lipid transfer (START) domains in modulating transcription factor activity. *BMC Biol* 12:70. doi:10.1186/s12915-014-0070-8
- Sessions A, Weigel D, Yanofsky MF (1999) The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant J* 20:259–263. doi:10.1046/j.1365-313x.1999.00594.x
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569–572. doi:10.1038/42408
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720–731. doi:10.1126/science.175.4023.720
- Takada S, Jürgens G (2007) Transcriptional regulation of epidermal cell fate in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 134:1141–1150. doi:10.1242/dev.02803
- Trinh D-C, Lavenus J, Goh T, Boutté Y, Drogue Q, Vaissayre V, Tellier F, Lucas M, Voß U, Gantet P, et al (2019) PUCHI regulates very long chain fatty acid biosynthesis during lateral root and callus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:14325–14330. doi:10.1073/pnas.1906300116

- Verkleij AJ, Zwaal RF, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, van Deenen LL (1973) The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 323:178–193. doi:10.1016/0005-2736(73)90143-0
- Yeats TH, Rose JKC (2013) The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol* 163:5–20. doi:10.1104/pp.113.222737
- Wojciechowska I, Mukherjee T, Knox-Brown P, Hu X, Khosla A, Mathews GL, Thompson KA, Peery ST, Szlachetko J, Thalhammer A, et al (2021) *Arabidopsis* PROTODERMAL FACTOR2 binds lysophosphatidylcholines and transcriptionally regulates phospholipid metabolism. *bioRxiv* doi:10.1101/2021.10.20.465175

気孔(孔辺)細胞が特殊な脂質代謝を発達させている意義

柘 亘 淳太郎, 小畑 智暉, 宋 普錫

九州大学 大学院 理学研究院
〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

The stomatal guard cells developing specialized lipid metabolism

Juntaro Negi, Tomoki Obata, Boseok Song

Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University,
744 Motooka, Nishi-Ku, Fukuoka, 819-0395, Japan

Keywords: Arabidopsis, Guard cells, Lipid metabolism, Stomatal movement

DOI: 10.24480/bsj-review.15c6.00271

1. はじめに

植物の脂質合成経路には色素体経路と小胞体経路の2つがあり, この2つの経路の代謝フラックスの比率は植物種や組織ごとに異なることが知られている (Somerville and Browse 1996)。これまで我々は, 気孔(孔辺)細胞が葉肉細胞と比較して小胞体経路を発達させたユニークな脂質特性を有していることを発見した (Negi et al. 2018)。一方, なぜ孔辺細胞で小胞体経路が発達しているのか, その生理学的意義は不明である。最近我々は, 気孔のCO₂応答に異常を持つシロイヌナズナ変異体 *cdi4* の原因遺伝子の解析から, 小胞体経路から合成されるリン脂質の1つであるホスファチジルエタノールアミン (PE) が, 葉肉細胞と比較して孔辺細胞において豊富に存在し, 気孔開口に欠かせない脂質であることを明らかにした (Negi et al. 2023)。本稿では, これらの解析から見えてきた孔辺細胞で特殊な脂質代謝バランスを発達させている意義や, オルガネラ間でおこなわれる脂質配分の重要性について議論する。

2. 孔辺細胞はユニークな脂質代謝バランスを保持している

植物の生体膜を構成するグリセロ脂質はグリセロ糖脂質とグリセロリン脂質に分類される。糖脂質にはモノガラクトシルジアシルグリセロール (MDGD), ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG), スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) があり, リン脂質にはホスファチジルグリセロール (PG), ホスファチジルコリン (PC), PE, ホスファチジン酸 (PA), ホスファチジルイノシトール (PI) などがある。これらの植物脂質は色素体経路と小胞体経路の2種類の経路を介して合成される (図1)。色素体経路は色素体内で脂質が合成される経路であるのに対し, 小胞体経路は, 色素体で作られた脂肪酸が小胞体に運ばれ脂質が合成される経路である (Somerville and Browse 1996)。葉緑体膜の大部分を占める

糖脂質 (MGDG, DGDG, SQDG) は色素体経路と小胞体経路の両方で合成される。また葉緑体膜に含まれるリン脂質である PG は主に色素体経路から合成される。一方、葉緑体以外の生体膜に多く含まれる PC, PE, PI などのリン脂質は主に小胞体経路から合成される。色素体経路と小胞体経路の両方の経路から合成される糖脂質は、グリセロールに結合している脂肪酸の炭素数の違いから、どちらの経路から合成されたかを識別することができ、色素体経路由来は炭素数 16 と炭素数 18 の脂肪酸を 1 つずつ保有するのに対し、小胞体経路由来は炭素数 18 の脂肪酸を 2 つ保有する。この 2 つの経路の比重は、植物種ごとに異なることが知られており、進化的に藻類は色素体経路が発達しているのに対して、陸上植物では色素体経路が退化し、小胞体経路が発達する傾向がある (Mongrand et al. 1998)。また同一種でも組織ごとに、2 つの経路に対する比重に偏りがあり、種子及び花組織では小胞体経路が発達していることが分かっている (Xue et al. 2005; Nakamura et al. 2014)。しかし、なぜ植物が 2 つの脂質代謝経路を保持しているのか、その生理学的な意義は明らかになっていない。

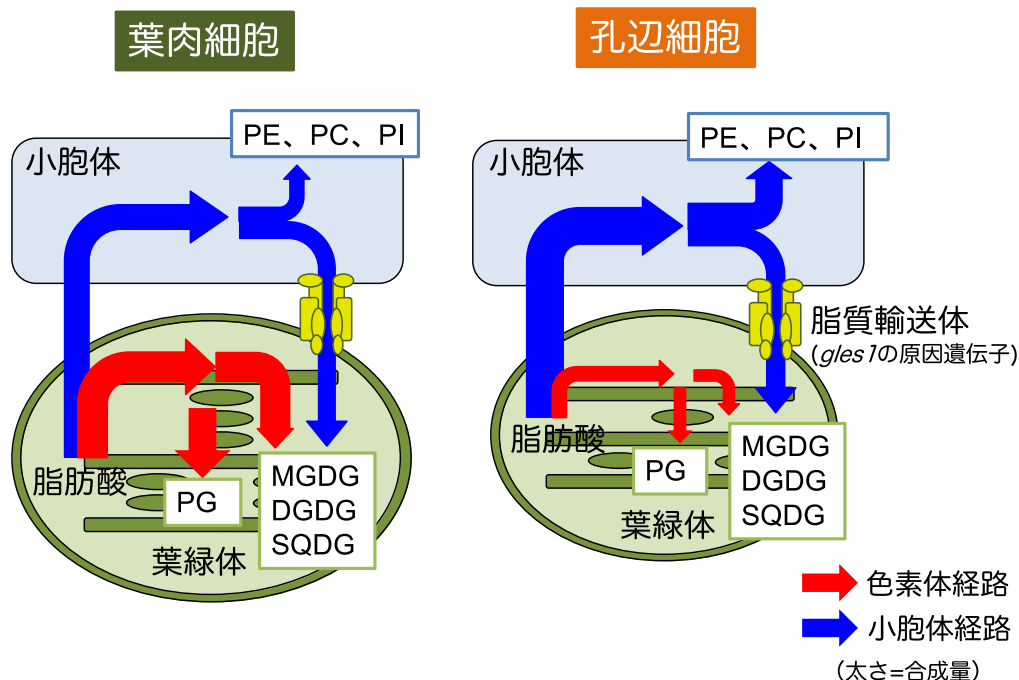


図 1 孔辺細胞が持つ特徴的な脂質代謝バランス

陸上植物の葉緑体膜脂質は、色素体経路 (赤矢印) と小胞体経路 (青矢印) の 2 つの経路から合成される。孔辺細胞では葉肉細胞と比較して色素体経路が退化しており、小胞体経路が孔辺細胞の葉緑体形成に中心的な役割を果たしている。

これまで我々は、葉肉細胞における葉緑体形成は正常であるが、孔辺細胞での葉緑体形成が阻害されたシロイヌナズナの変異体 *gles1* (*green less stomata 1*) を単離した。*gles1* は葉緑体包膜に局在する脂質輸送体 TGD (トリガラクトシルジアシルグリセロール) 複合体のサブユニットの 1 つ TGD5 の変異体であった (Negi et al. 2018)。この TGD 複合体は小胞体経路上の小胞体から色素体への脂質輸送を担うと考えられている (図 1; Fan et al. 2016)。TGD5 は孔辺細胞だけでなく、葉肉細胞でも発現していた (Negi et al. 2018)。小胞体経路が阻害さ

れたことによる葉緑体形成への影響がなぜ孔辺細胞と葉肉細胞で異なるのか、その原因を明らかにするため孔辺細胞と葉肉細胞の LC-MS/MS システムによる脂質組成解析を行った。その結果、孔辺細胞では葉肉細胞と比較して色素体経路が退化しており、葉緑体脂質の多くが小胞体経路を経て合成されていることが分かった (Negi et al. 2018)。この孔辺細胞における小胞体経路優位な脂質代謝バランスが、*gles1* で孔辺細胞特異的に葉緑体形成が阻害される原因であると考えられる。また、我々は地上部切除によって発達が促進される根細胞葉緑体が、孔辺細胞と同じく小胞体経路由来の脂質供給に依存していることを根の脂質組成解析から明らかにした (Obata et al. 2021)。実際に、野生型や色素体経路が阻害された変異体では地上部切除により根が緑化するのに対して、小胞体経路が阻害された *gles1* では、根の緑化が強く阻害されていた。根細胞葉緑体は、デンプンが蓄積し、グラナが未発達であり、孔辺細胞葉緑体と構造的に類似しているが、加えて、脂質代謝において小胞体経路が発達している共通点があることが分かった。これらの知見は、葉緑体脂質合成に対する 2 つの脂質合成経路の寄与度すなわち、葉緑体の脂質代謝バランスが植物組織間で異なることを示しており、この違いにより、葉緑体の膜構造を特徴づけていると示唆された。

3. 小胞体経路から合成される PE の気孔における役割

これまでの研究から、脂質代謝における色素体経路と小胞体経路のバランスは組織ごとに大きく異なり、気孔の葉緑体形成には小胞体経路が重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Negi et al. 2018)。しかしながら、なぜ孔辺細胞は小胞体経路を発達させているのか、その生理学的意義は不明であった。最近、我々は小胞体経路から合成されるリン脂質の 1 つである PE が気孔開口制御に必須であることを明らかにしたので、本稿で詳しく紹介したい。気孔は様々な環境刺激に応じて開度を調節しており、例えば光や低 CO₂ 条件では気孔は開き、乾燥や高 CO₂ 条件では気孔は閉じる。これまで我々は、CO₂ による気孔開閉の分子メカニズムを明らかにするため、サーモグラフィーを用いたスクリーニングにより CO₂ に対して

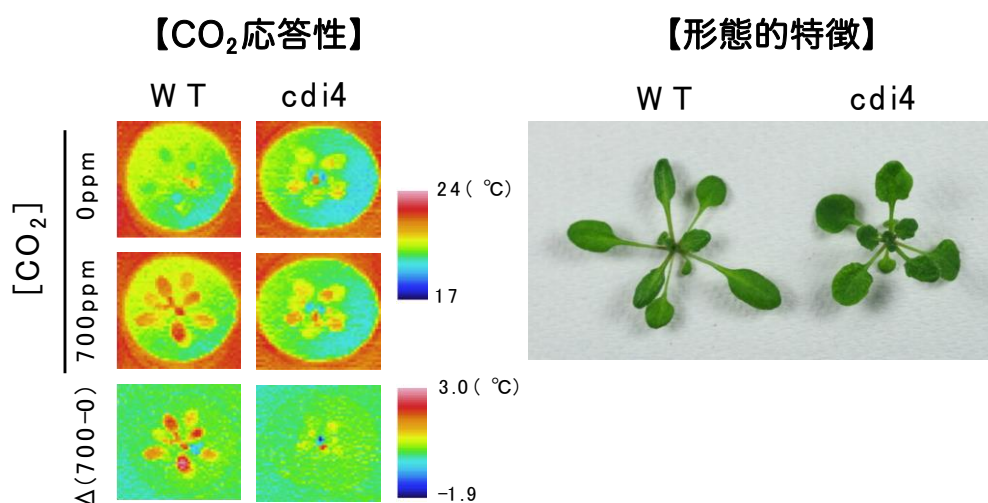


図2 *cdi4* 変異体の葉面温度画像と形態的特徴

WT では CO₂ 濃度依存的に葉面温度が上昇するが、*cdi4* 変異体は応答しない。また *cdi4* は葉の形が丸くなる特徴を持つ。

非感受性を示す変異体を数多く単離した (Negi et al. 2014)。その中の 1 つである *cdi4* (*carbon dioxide insensitive 4*) 変異体は、CO₂ 濃度を変化させても葉面温度が変化しない変異体の 1 つとして単離された (図 2)。この変異体の原因遺伝子は、PE 合成の律速酵素である CTP ホスホリルエタノールアミンシチジリルトランスフェラーゼ (PECT1) をコードしていた (Negi et al. 2023)。PE は主要なリン脂質の 1 つで、PECT1 は胚発生に必須であると報告されているが (Mizoi et al. 2006)、気孔における PECT1 の役割は不明であった。そこで、我々は気孔開閉における PECT1 の機能を明らかにすることにした。まず、PECT1 は孔辺細胞を含む全ての組織で発現していたため、気孔以外組織における *cdi4* 変異の影響を排除するため、孔辺細胞特異的に PECT1 の発現を抑制した系統を作成した。この系統を用いて気孔における CO₂ や光応答性を調べたところ、*cdi4* と同様に、低 CO₂ や光処理をしても気孔が開かず、応答性が低下していた。この結果より、孔辺細胞で発現する PECT1 が気孔の CO₂ 及び光応答を制御することが示された。続いて、どのような仕組みで PECT1 が気孔開口を制御しているのか明らかにするために、気孔開口を駆動する細胞膜 H⁺-ATPase に着目して解析を進めた。具体的には *cdi4* 変異が細胞膜 H⁺-ATPase の発現、局在、リン酸化、活性に与える影響を調べた。まず細胞膜 H⁺-ATPase をコードする主要な遺伝子である AHA1 の発現や局在を調べた結果、*cdi4* と野生型の間には顕著な違いは見られなかった。次に H⁺-ATPase を常に活性化させ気孔を開かせるカビ毒フシコクシンに対する気孔開口応答を調べた。その結果、*cdi4* および PECT1 発現抑制株において、フシコクシンによる気孔開口応答が抑制された。また、H⁺-ATPase は C 末端がリン酸化されることで活性化するが (Kinoshita and Shimazaki 1999)、そのリン酸化レベルの変化を免疫化学染色法により測定した。その結果、フシコクシンによる H⁺-ATPase のリン酸化は *cdi4* 変異体でも野生株と同程度起こることが分かった。最後に、H⁺-ATPase 活性を直接測るため、孔辺細胞を用いたプロトンポンピングアッセイをおこなった。フシコクシンによるプロトン輸送活性は WT と *cdi4* の間でほとんど差がなかった。

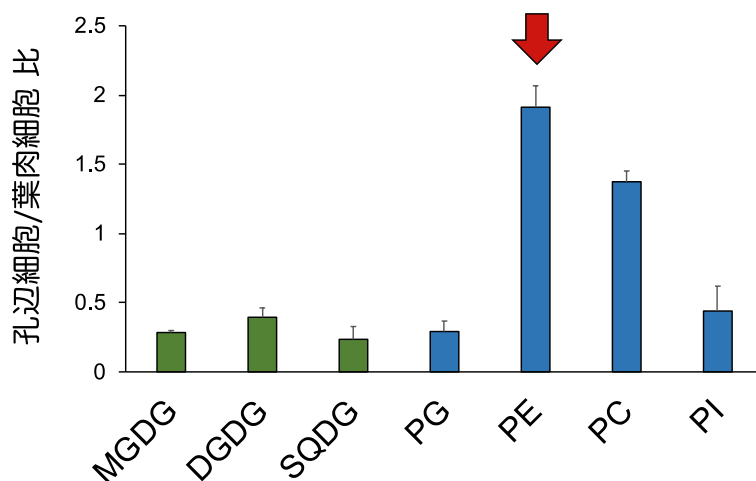


図 3 孔辺細胞は葉肉細胞と比較して大量の PE を保持する。

孔辺細胞と葉肉細胞における各脂質分子種の含量を比較したところ、孔辺細胞は小胞体経路から合成される PE を多く保持していた。図の一部は Negi et al. 2023 から転載。

これらの解析から、PECT1 は H⁺-ATPase の下流もしくは独立した経路で気孔開口応答を制御することが示された。孔辺細胞における PE の重要性を調べるため、孔辺細胞と葉肉細胞のリピドミクス比較解析をおこなったところ、葉肉細胞に対する孔辺細胞における PE 量の比が、

他のグリセロ脂質と比較して高く、孔辺細胞は小胞体経路から合成される PE を多く保持していることが明らかとなった (図 3)。以上の解析から、PE は気孔の開口機能に欠かせない脂質であることが示された。PE がどのように気孔開口制御に関与するのか、その分子メカニズムは現在のところ不明であるが、我々は以下の 3 つの仮説を立てている。

(1) 輸送体/チャネルの立体構造仮説： H^+ -ATPase の活性は、膜のリン脂質組成によって変化することが報告されている (Kasamo and Yamanishi 1991)。PE は円錐形の構造を持つ非膜形成脂質であるため、膜タンパク質を脂質二重膜に適切に固定または接着する機能を持つ可能性がある (van den Brink-van der Laan et al. 2004)。PE は、 H^+ -ATPase の下流で働く内向きカリウムイオンチャネルの安定化に寄与している可能性が考えられる。この仮説を検証するためには、*cdi4* 変異体におけるカリウムイオンチャネル活性の測定を含むさらなる研究が必要である。

(2) シグナル仮説：青色光による H^+ -ATPase のリン酸化は *cdi4* 変異体において抑制されていた (Negi et al. 2023)。PE のようなリン脂質は、ホスホリパーゼによって加水分解され、リゾリン脂質と遊離脂肪酸になる。光誘導性気孔開口反応では、ホスホリパーゼ A2 β (PLA2 β) がリゾリン脂質を生成することが示唆されており (Seo et al. 2008)、このリゾリン脂質は、細胞膜 H^+ -ATPase を活性化するシグナル分子であると考えられている (Wielandt et al. 2015)。従って、孔辺細胞の PECT1 によって合成された PE は、ホスホリパーゼによって加水分解され、 H^+ -ATPase を活性化するための lyso-PE を生成する可能性も考えられる。

(3) ミトコンドリア仮説：PECT1 はミトコンドリアに局在し (Mizoi et al. 2006; Negi et al. 2023)、PE はミトコンドリア膜の主要なグリセロ脂質である (Michaud et al. 2017)。PECT1 はミトコンドリアの PE レベルを制御し、呼吸能力を維持するためにシトクロム c オキシダーゼ (COX) 活性を調節する (Otsuru et al. 2013)。*cdi4* における気孔開口反応の低下は、呼吸活性の低下、あるいはミトコンドリア膜脂質組成の変化によるエネルギー供給の低下によって説明できるかもしれない。

4. PE 以外のリン脂質が気孔開閉に及ぼす影響について

リン脂質と気孔開閉制御との関わりについては、PE 以外にも、ホスファチジン酸 (PA) やホスファチジルイノシトール (PI) は、脂質性シグナル伝達物質として、いくつかの研究事例があるので、紹介したい。まず PA は、乾燥などの環境刺激により合成されるアブシジン酸 (ABA) シグナル伝達に関与する脂質であることが知られている。ABA 処理により PLD (ホスホリパーゼ D) の酵素活性が上昇し、PLD の生成物である PA が孔辺細胞内で 2 倍近く増加する (Jacob et al. 1999; Uraji et al. 2012)。PLD によって合成された PA は、内向きのカリウムイオンチャネルの活性を抑制する (Jacob et al. 1999)。加えて PA は、ABA シグナル伝達を負に制御するタイプ 2C プロテインホスファターゼである ABI1 と結合し、細胞膜にトラップすることで、ABI1 の機能を阻害し、ABA による気孔閉鎖を促進する (Zhang et al. 2004)。さらに PA は単量体型 G タンパク質 α サブユニット (GPA) やタイプ 1 プロテインホスファターゼ (PP1) と結合することで、ABA による気孔開口阻害作用にも寄与すると考えられている (Mishra et al. 2006; Takemiya and Shimazaki 2010)。一方、PI は分子種ごとに気

孔開閉機能に及ぼす影響が異なり、ホスファチジルイノシトール 4,5 ビスリン酸 (PI4,5P₂) は気孔開口を促す脂質として、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3P) やホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) は気孔閉鎖を促す脂質としての機能が報告されている。例えば、PI4,5P₂は光処理により、孔辺細胞において細胞質から細胞膜へ局在が変化し、細胞膜に存在するアニオンチャネルの機能の阻害することで気孔開口を促す機能があると考えられている (Lee et al. 2007)。また PI3P や PI4P は阻害剤による実験などから、ABA による気孔閉鎖 (Jung et al. 2002; Choi et al. 2008) や、CO₂による気孔閉鎖 (Takahashi et al. 2017) に関与していることが示されており、これらの脂質は気孔閉鎖時のアクチン繊維のリモデリングに欠かせないことが報告されている (Choi et al. 2008)。

5. 今後の展望

PE や PE 以外のリン脂質も気孔開閉において重要な機能を持ち、リン脂質の主要な合成経路である小胞体経路は、孔辺細胞にとって欠かせない大事な経路であることが分かってきた。また、我々は最近、小胞体経路から主に合成される葉緑体脂質の 1 つである DGDG が気孔葉緑体形成や気孔開閉機能に必須であることを見出している (Song et al. 投稿準備中)。これらの知見を統合すると、孔辺細胞が小胞体経路を発達させている意義の 1 つとして、孔辺細胞は小胞体経路優位な脂質分配をすることで、気孔に特徴的な葉緑体を形成し、気孔開閉機能に適した脂質組成にカスタマイズしているのかもしれない。今後は、個々の脂質分子種が気孔葉緑体形成や気孔開閉機能に及ぼす影響を精査するとともに、その背後にある分子メカニズムの理解が必要だと考えられる。さらに、脂質イメージングによる各脂質分子種の分布の偏りを、オルガネラもしくは 1 分子レベルで検出できるようになれば、脂質の新たな機能や脂質同士の相互作用による協調的な働きなど分子レベルの理解が進み、脂質研究のイノベーションが生まれるのではないかと期待される。

謝辞

九州大学理学研究院の射場厚 名誉教授をはじめ、埼玉大学理工学研究科の西田生郎 名誉教授、名古屋大学理学研究科の木下俊則 教授、熊本大学先端科学研究部の澤進一郎 教授に感謝申し上げます。本研究は、内藤記念科学奨励金、住友財団基礎科学研究助成、日本学術振興会・科学研究費補助金 基盤研究 B (21H02512; 24K02046)、学術変革領域研究 A (21H05667; 23H04204)、特別研究員奨励費 (20J13660; 22KJ2467) の支援を受けた。

引用文献

- Choi Y, Lee Y, Jeon BW, Staiger CJ, Lee Y (2008) Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate modulate actin filament reorganization in guard cells of day flower. *Plant Cell Environ.* 31: 366–377. doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01769.x
- Fan J, Zhai Z, Yan C, Xu C (2015) *Arabidopsis* TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL5 interacts with TGD1, TGD2, and TGD4 to facilitate lipid transfer from the endoplasmic reticulum to plastids. *Plant Cell* 27: 2941–2955. doi: 10.1105/tpc.15.00394

- Jacob T, Ritchie S, Assmann SM, Gilroy S (1999). Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 12192–12197. doi: 10.1073/pnas.96.21.12192
- Jung JY, Kim YW, Kwak JM, Hwang JU, Young J, Schroeder JI, Hwang I, Lee Y (2002) Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate are required for normal stomatal movements. *Plant Cell* 14: 2399–412. doi: 10.1105/tpc.004143
- Kasamo K, Yamanishi H (1991) Functional reconstitution of plasma membrane H⁺-ATPase from Mung Bean (*Vigna radiata* L.) hypocotyls in liposomes prepared with various molecular species of phospholipids. *Plant Cell Physiol.* 32: 1219–1225. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078200
- Kinoshita T, Shimazaki K (1999) Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *The EMBO Journal* 18: 5548–5558. doi: 10.1093/emboj/18.20.5548
- Lee Y, Kim YW, Jeon BW, Park KY, Suh SJ, Seo J, Kwak JM, Martinoia E, Hwang I, Lee Y (2007) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is important for stomatal opening. *Plant J* 52: 803–16. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03277.x
- Michaud M, Prinz WA, Jouhet J (2017) Glycerolipid synthesis and lipid trafficking in plant mitochondria. *The FEBS Journal* 284: 376–390. doi: 10.1111/febs.13812
- Mishra G, Zhang W, Deng F, Zhao J, Wang X (2006). A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science* 312: 264–266. doi: 10.1126/science.1123769
- Mizoi J, Nakamura M, Nishida I (2006) Defects in CTP:PHOSPHORYLETHANOLAMINE CYTIDYLYLTRANSFERASE affect embryonic and postembryonic development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 3370–3385. doi: 10.1105/tpc.106.040840
- Mongrand S, Bessoule J, Cabantous F, Cassagne, C (1998) The C16:3/C18:3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry* 49: 1049–1064. doi:10.1016/S0031-9422(98)00243-X
- Nakamura Y, Teo NZ., Shui G, Chua CH, Cheong WF, Parameswaran S, Koizumi R, Ohta H, Wenk MR, Ito T (2014). Transcriptomic and lipidomic profiles of glycerolipids during *Arabidopsis* flower development. *New Phytologist* 203: 310–322. doi: 10.1111/nph.12774
- Negi J, Hashimoto-Sugimoto M, Kusumi K, Iba K (2014) New approaches to the biology of stomatal guard cells. *Plant Cell Physiol.* 55: 241–250. doi: 10.1093/pcp/pct145
- Negi J, Munemasa S, Song B, Tadakuma R, Fujita M, Azoulay-Shemer T, Engineer CB, Kusumi K, Nishida I, Schroeder JI, Iba K (2018) Eukaryotic lipid metabolic pathway is essential for functional chloroplasts and CO₂ and light responses in *Arabidopsis* guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 115: 9038–9043. doi: 10.1073/pnas.1810458115
- Negi J, Obata T, Nishimura S, Song B, Yamagaki S, Ono Y, Okabe M, Hoshino N, Fukatsu K, Tabata R et al. (2023) PECT1, a rate-limiting enzyme in phosphatidylethanolamine biosynthesis, is involved in the regulation of stomatal movement in *Arabidopsis*. *Plant J.* 115: 563–576. doi: 10.1111/tpj.16245

- Obata T, Kobayashi K, Tadakuma R, Akasaka T, Iba K, Negi J (2021) The endoplasmic reticulum pathway for membrane lipid synthesis has a significant contribution toward shoot removal-induced root chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 62: 494–501. doi: 10.1093/pcp/pcab009
- Otsuru M, Yu Y, Mizoi J, Kawamoto-Fujioka M, Wang J, Fujiki Y, Nishida I (2013) Mitochondrial phosphatidylethanolamine level modulates Cyt c oxidase activity to maintain respiration capacity in *Arabidopsis thaliana* rosette leaves. *Plant Cell Physiol.* 54: 1612–1619. doi: 10.1093/pcp/pct104
- Seo J, Lee HY, Choi H, Choi Y, Lee Y, Kim YW, Ryu SB, Lee Y (2008) Phospholipase A₂β mediates light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 59: 3587–3594. doi: 10.1093/jxb/ern208
- Somerville C, Browse J (1996) Dissecting desaturation: plants prove advantageous. *Trends Cell Biol.* 6: 148–153. doi: 10.1016/0962-8924(96)10002-7
- Takahashi S, Monda K, Higaki T, Negi J, Hashimoto-Sugimoto M, Hasezawa S, Iba K (2017) Differential effects of phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) and 3-kinase (PI3K) inhibitors on stomatal responses to environmental signals. *Front. Plant Sci.* 8: 677. doi: 10.3389/fpls.2017.00677
- Takemiya A, Shimazaki K (2010) Phosphatidic acid inhibits blue light-induced stomatal opening via inhibition of protein phosphatase 1. *Plant Physiology* 153: 1555–1562. doi: 10.1104/pp.110.155689
- Uraji M, Katagiri T, Okuma E, Ye W, Hossain MA, Masuda C, Miura A, Nakamura Y, Mori IC, Shinozaki K et al. (2012) Cooperative function of PLDδ and PLDα1 in abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 159: 450–460. doi: 10.1104/pp.112.195578
- van den Brink-van der Laan E, Killian JA, de Kruijff B (2004) Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666: 275–288. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.06.010
- Wielandt AG, Pedersen JT, Falhof J, Kemmer GC, Lund A, Ekberg K, Fuglsang AT, Pomorski TG, Buch-Pedersen MJ, Palmgren M (2015) Specific activation of the plant P-type plasma membrane H⁺-ATPase by lysophospholipids depends on the autoinhibitory N- and C-terminal domains. *J. Biol. Chem.* 290: 16281–16291. doi: 10.1074/jbc.M114.617746
- Xu C, Fan J, Froehlich JE, Awai K, Benning C (2005) Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 3094–3110. doi: 10.1105/tpc.105.035592
- Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X (2004) Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 9508–9513. doi: 10.1073/pnas.0402112101