

論文内容の要旨

論文題目: Molecular genetic studies of CTP:phosphorylethanolamine cytidyltransferase in *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナの CDP-エタノールアミン合成酵素に関する分子遺伝学的研究)

氏 名 溝 井 順 哉

序論

細胞は内と外を細胞膜で区切られ、またその内部も複雑にオルガネラ膜で区画化されている。これらの生体膜は、細胞の様々な生命活動の場を提供するほか、小胞輸送などの膜のダイナミズムや膜脂質由来のシグナル分子のソースとして重要である。

生体膜はリン脂質などの両親媒性の脂質分子(極性脂質)によって作られる脂質二重膜を基本構造としている。極性脂質は主なリン脂質に限っても5種類以上存在し、結合する脂肪酸の多様性とあわせると実に多様な分子種を含んでいる。生体膜には、なぜこのように多様な分子種が含まれるのかは、古くからの疑問であるが、その生理学的意義を明らかにした研究は少ない。

ホスファチジルエタノールアミン(PE)は、生理的条件下で脂質二重膜構造をとりにくい性質を持つことから、非二重膜脂質と呼ばれる。その含量は、生体膜の機能を左右する要因の一つであることが酵母や動物細胞の系で明らかにされている。一方、植物は多細胞体ながら可塑性を持ち、必須成分の欠乏に対して対処できるので、PE 合成の欠損が多細胞体の生育に与える影響を調べる系として適当であると考えられる。植物では、PE は色素体以外の生体膜に含まれ、その合成には3つの経路が知られている(図1)。このうち、CDP-エタノールアミン経路は主要合成経路であり、CTP:ホスホリルエタノールアミンシチジルトランスフェラーゼ(PECT)が鍵酵素であると考えられている(図1)。そこで植物細胞における PE とその合成系の生理的な役割の解明を目指し、シロイヌナズナの PECT をコードする唯一の遺伝子である *PECT1* に注目して分子遺伝学的解析を行った。

結果

<*pect1* 変異対立遺伝子(アリル)の単離>

TILLING 法により *PECT1* 遺伝子座の複数の点突然変異アリルを取得した。得られたアリルのうち、*pect1-4* はホモ接合体のロゼット葉で PECT 活性が野生型の 26%に低下した(図2)。また、*pect1-6* は、異常なスプライシングを起こすアリルで、ホモ接合体は単離できなかった。ヘテロ接合体のロゼット葉では PECT1 タンパク質の蓄積量が野生型の約半分に減少し、PECT 活性は野生型の 53%であった(図2)。異常なスプライシング産物によってコードされるポリペ

プチドは活性部位の一部を持たないため、*pect1-6* はヌルアリルであることが示唆された。

<PECT1 は初期の胚発生に必須である>

pect1-6 アリルはヘテロ接合体の果実中に 25%の割合で死亡種子を生ずることから、胚発生における劣性致死変異遺伝子であることがわかった。種子の致死性はトランス遺伝子として導入した野生型 *PECT1* 遺伝子(*transPECT1*)により相補されたので *pect1-6* は死亡種子の原因遺伝子である。登熟中の種子を透明化し、*pect1-6* ホモ接合体の胚発生を微分干渉顕微鏡により観察したところ、典型的な *pect1-6* 胚は、野生型の胚に比べて生育が遅く、8細胞期を越えた胚は見つからなかった(図3)。また、*pect1-6* 胚を取り巻く胚乳では核の数が少なく巨大化していた。さらに時間が経過すると異常胚は細胞質を失い、崩壊していた。以上の結果から、CDP-エタノールアミン経路がシロイヌナズナの初期の胚発生に必須であることを明らかにした。

<PECT 活性の大幅な低下は植物を矮性化させる>

pect1-6 ホモ接合体は PECT 活性を完全に欠損しているため生育ができないのに対し、*pect1-4* ホモ接合体(PECT 活性 = 26%)は、野生型に比べてやや小さめだが、多くは正常に生育した。PECT 活性は *PECT1* 遺伝子座の遺伝子量に比例するので(図2)、交配によりロゼット葉の PECT 活性が 19%まで低下した *pect1-4/pect1-6* 植物を作出した。この植物は、ロゼット葉が小さく、花茎伸長が抑制されるなど、顕著な矮性を示した(図4A)。組織切片の観察により、ロゼット葉では、細胞数の減少、細胞サイズの縮小、細胞間隙の減少が、花茎では、主に細胞数の減少が矮性化の原因であることが分かった。また、ロゼット葉や花茎で維管束の発達が不十分であることも観察された。根の先端では、分裂組織のサイズが野生型と比べて縮小していたことから、*pect1-4/pect1-6* 植物では細胞分裂の速度が遅くなっている可能性が考えられた。

<PECT 活性の低下は植物の稔性に影響する>

pect1-4/pect1-6 植物は、自家受粉による種子数が野生型の果実あたり 49 個に対して 2 個まで低下した。果実内を観察した結果、胎座の数が野生型の約半分に減少していた上、未受精の胚珠が多く見られた。未受精の胚珠ができる原因は、雄蕊の発達不良による花粉量の減少や花糸の短さ(図4C)に加え、受粉能力のない胚珠(図4E)が出現することであることを明らかにした。さらに正常に受精した胚珠でも、そのうち約半分は致死性を示したが、これは遺伝子型解析の結果、*pect1-6* ホモ接合体の胚に加えて *pect1-4/pect1-6* 胚の一部が致死であるためと分かった。以上の結果から、*pect1-4/pect1-6* の稔性が低下する原因は、雌雄の生殖器官形成の異常と、変異の浸透性の不完全さから一部の *pect1-4/pect1-6* 胚が致死となることによる複合的な効果によることが分かった。

<PECT 活性の低下は脂質の代謝に影響を与える>

pect1-4 ホモ接合体、*pect1-4/pect1-6* 植物のロゼット葉における脂質組成を調べた結果、PECT 活性の低下に伴って PE の割合が野生型と比べてそれぞれ 92%、65%まで低下し、逆にホスファチジルコリン(PC)の割合が増加した(図5)。またチラコイド脂質が少ない黄化芽生えの場合、*pect1-4* ホモ接合体で PE の割合が野生型と比べて 77%まで低下していた。*pect1-4/pect1-6* 植物の黄化試料は著しい矮性のため分析に供する量が確保できなかったが、*pect1-4* ホモ接合体から得られた結果を外挿することによって、黄化した *pect1-4/pect1-6* 植物ではロゼット葉より大きな PE 量の低下が期待される。脂質に結合している脂肪酸の組成に注目すると、PE では野生型と変異体の間に顕著な違いは見られなかったが、PC では炭素数 16 の脂肪酸の割合が増加していた。これらの結果から、ロゼット葉および黄化芽生えの脂質合成において CDP-エタノールアミン経路が PE 合成の主要経路の一つであることが示唆された。またこの経路の抑制が PE 以外のリン脂質の代謝を変化させることがわかった。

<表現型の回復について>

上記の表現型は *transPECT1* の導入によって完全に回復した。このことから、シロイヌナズナの正常な生育とリン脂質合成には十分な PECT 活性が必要であることがわかった。一方、*transPECT1* を局所的に発現させた場合は、表現型の回復が不完全であったことから、*pect1-4/pect1-6* の表現型は、異なる組織の異常に影響されたものと結論できる。

<PECT1 は細胞分裂や細胞伸長の盛んな組織で高発現する>

生組織における PECT1 タンパク質の発現を調べるため、野生型シロイヌナズナに PECT1-EYFP 融合タンパク質を *PECT1* 全長プロモーターの支配下で発現させた形質転換植物を作出し、落射蛍光顕微鏡下で観察した。この植物では、すべての組織で蛍光が認められたが、茎頂と根端の分裂組織付近、側根の形成部位、花茎とロゼット葉の維管束、花粉の中央などで、特に強い蛍光が認められた(図6A-6E)。また、共焦点レーザー走査顕微鏡下での観察により、胚での発現も認められた(図6F)。以上の結果は細胞の分裂や伸長が盛んな組織で CDP-エタノールアミン経路の働きが強化されている可能性を示唆している。

<PECT1-EYFP 融合タンパク質はミトコンドリア表面に局在する>

根の表皮細胞における PECT1-EYFP 融合タンパク質の局在を共焦点レーザー走査顕微鏡により観察したところ、リング状の蛍光像が観察された(図6G)。この蛍光像はミトコンドリアを染色する MitoTracker 色素による染色蛍光像(図6H)と重なり、EYFP の蛍光はミトコンドリアを取り巻くように観察されることがわかった(図6I)。過去の植物 PECT の研究から得られた知見も考慮し、PECT1 はミトコンドリア外膜の細胞質側に存在する膜タンパク質であると結論した。植物の CDP-エタノールアミン経路による PE 合成にミトコンドリアが関与している可能性が考えられた。

まとめ

私は、本研究で *PECT1* 遺伝子座の複数の変異アリルを単離し、その解析を行った。ヌルアリル *pect1-6* のホモ接合体が胚性致死であることを見出し、PECT 活性がシロイヌナズナの初期の胚発生に必須であることを示した。また、PECT 活性が大幅に低下した *pect1-4/pect1-6* 植物の表現型解析および、PECT1 の発現解析から、PECT が植物細胞の分裂や伸長にとって重要な役割を担っていることを示唆した。さらに、*pect1-4/pect1-6* 植物では PE 量が低下していることを示し、CDP-エタノールアミン経路が発芽後の生育においても PE 合成の主要な経路として機能していることを示唆した。

今後、*pect1* 変異と他の変異との遺伝学的相互作用を調べることで、表現型と PE 量との関係を深く理解することが可能になると期待される。また、本研究において得られた PE 量が減少した植物は膜脂質の性質が変化していることが予測され、植物の脂質代謝、膜タンパク質の活性、小胞輸送などの制御に関する研究に寄与する材料となると期待される。

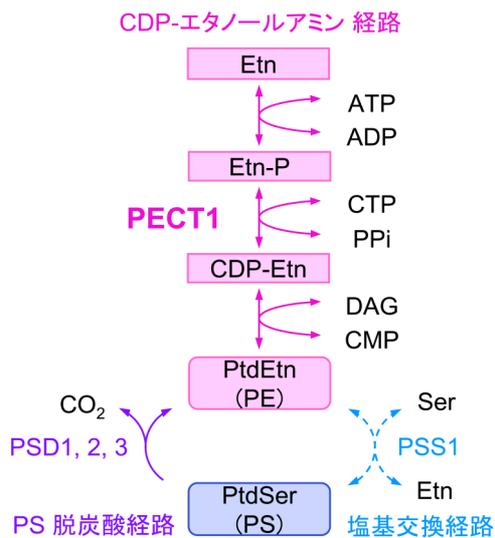


図1 ホスファチジルエタノールアミン(PE)の合成経路
シロイヌナズナでは、ホスファチジルエタノールアミンを合成する経路は3つあることがゲノム情報から予想される。

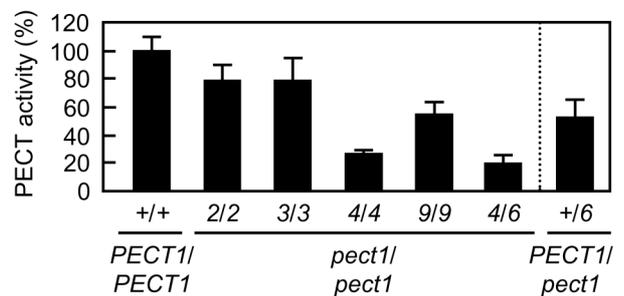


図2 *pect1* 変異体のロゼット葉における PECT 活性
pect1-4 ホモ接合体は野生型の 26%、*pect1-6* ヘテロ接合体は野生型の 53% の PECT 活性を示した。
pect1-4/pect1-6 植物の PECT 活性は野生型の 19%まで低下した。

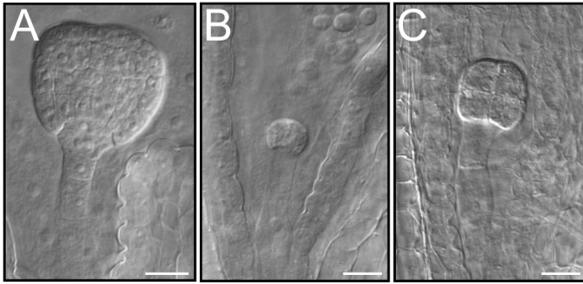


図3 *pect1-6* ホモ接合体の表現型

pect1-6 ヘテロ接合体の自家受粉による開花後4日目の胚の形態を示す。75%の胚は(A)のように正常な発生を示したが、25%の胚は致死であり、最も発生の進んだ胚でも8細胞期を越えなかった(B, C)。Bar = 10 μ m。

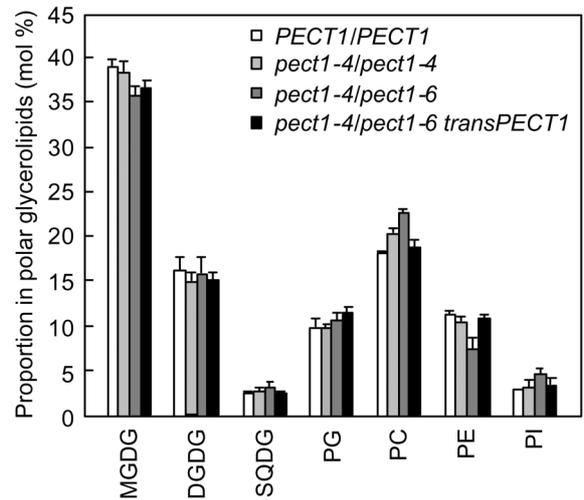


図5 *pect1* 変異体のロゼット葉における脂質組成
PECT 活性の低い植物では、PE の割合が減少した。減少分は主に PC によって補われていた。

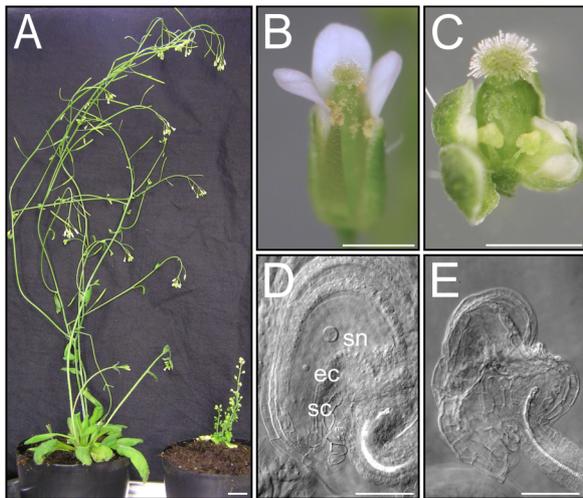


図4 *pect1-4/pect1-6* 植物の表現型

(A) *pect1-4/pect1-6* 植物(右)は野生型植物(左)と比較して顕著な矮性を示した。Bar = 1 cm。
(B-E) *pect1-4/pect1-6* 植物の花(C)は、野生型の花(B)と比較して、雄蕊が未発達であった。また雌蕊の中には、野生型の胚珠(D)のような構造が見られない異常な胚珠(E)が多くみられた。Bar = 1 mm (B, C), 50 μ m (D, E)。

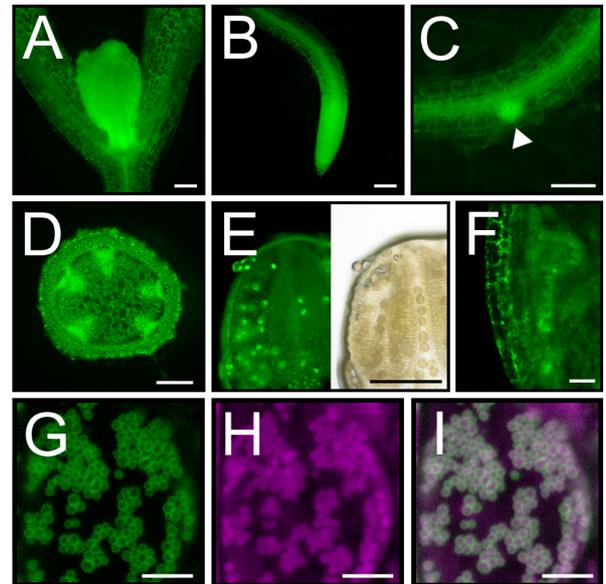


図6 Pro_{PECT1}::PECT1-EYFP の発現

PECT1-EYFP の蛍光は全ての組織で認められたが、分裂組織の周辺(A, 茎頂; B, 根端; C, 側根), 維管束(D), 花粉(E), 胚(F)で特に強かった。
根の表皮細胞においては、PECT1-EYFP の蛍光(G)が、ミトコンドリアを染色する MitoTracker 色素の蛍光(H)を取り巻いている様子が観察された(I, 両者を重ねた像)。Bar = 100 μ m (A-E), 50 μ m (F), 10 μ m (G-I)。