

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	クレブソルミディウムおよびゼニゴケにおけるオリゴガラクト脂質合成に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	清水信介
Author(English)	Shinsuke Shimizu
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12834号, 授与年月日:2024年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:下嶋 美恵,本郷 裕一,増田 真二,加藤 明,吉田 啓亮,太田 啓之
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12834号, Conferred date:2024/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

クレブソルミディウムおよびゼニゴケにおける オリゴガラクト脂質合成に関する研究

清水 信介

令和6年度 博士論文

東京工業大学

生命理工学院 生命理工学系 生命理工学コース

指導教員 下嶋 美恵 准教授

目次

1. 序論	
1.1 序	4
1.2 表および図	12
2. 車軸藻植物門クレブソルミディウムにおけるオリゴガラクト脂質合成に関する研究	
2.1 序	13
2.2 実験材料と方法	15
2.3 結果	20
2.4 考察	24
2.5 表および図	27
3. ゼニゴケにおけるオリゴガラクト脂質合成に関する研究	
3.1 序	48
3.2 実験材料と方法	50
3.3 結果	57
3.4 考察	63
3.5 表および図	67
4. 総合考察	99
参考文献	102
謝辞	111

略語一覽

35S Pro : Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter

ABA : abscisic acid

AOX1a : alternative oxidase 1 a

ami RNA : artificial microRNA

AP2/ERF : APETALA2 (AP2)/Ethylene Responsive Element Binding Factor (EREB) domain

CBB : Coomassie Brilliant Blue

CBL : Calcineurin B-like

CIPK : Calcineurin B-like (CBL)-interacting protein kinase

DAG : diacylglycerol

DGD : DGDG synthase

DGDG : digalactosyldiacylglycerol

GFP : green fluorescent protein

GGGT : galactolipid:galactolipid galactosyltransferase

HRP : Horseradish peroxidase

Kn : *Klebsormidium nitens*

MGD : MGDG synthase

MGDG : monogalactosyldiacylglycerol

Mp : *Marchantia polymorpha*

NCED3 : Nine- Cis-Epoxy-carotenoid Dioxygenase 3

PSI (II) : photosystem I (II)

PVDF : polyvinylidene fluoride

Pi : inorganic phosphate

RAV : RAV transcription factor family

RFP : red fluorescent protein

Rbcs : ribulose 1,5-bisphosphatecarboxylase/oxygenase small subunit

SFR2 : Sensitive to Freezing2

SlSFR2 RNAi : *Solanum lycopersicum* [M82 cv] SFR2 RNAi knockdown mutant

TAG : triacylglycerol

TGDG : trigalactosyldiacylglycerol

TLC : thin-layer chromatography

TeGDG : tetragalactosyldiacylglycerol

UDP-Gal : uridine diphosphate-galactose

1. 序論

1.1 序

1.1.1 陸上植物におけるガラクト脂質の機能

酸素発生型光合成生物の生体膜は極性頭部に糖を含む糖脂質が多くを占めており、植物の葉緑体において、光合成反応を行う場として重要な構造であるチラコイド膜の脂質組成は、MGDGやDGDGの2つのガラクト脂質が約80%を占めている(Block *et al.*, 1983).

また、ガラクト脂質はチラコイド膜を構成する脂質として重要なだけでなく、光合成に必要な光化学系タンパク質 (PSI, PSII) にも糖脂質が含まれていることが近年報告されている(Makshakova *et al.*, 2020 ; Graça *et al.*, 2021). MGDG によって構成されるヘキサゴナル構造(HII)は、キサントフィルサイクルの活性に必要不可欠である。また、DGDGのような二重膜を作る脂質と MGDG のような単独では二重膜を作らない脂質の割合は、葉緑体の形態を決定づける (Hieber *et al.*, 2004; Jahns *et al.*, 2009) .

ガラクト脂質は小麦の花からベンゼンで抽出できた脂質として初めて同定された (Carter *et al.*, 1956). ガラクト脂質の生合成は 1950 年の後期に放射性同位体の実験によって決定づけられた (Carter *et al.*, 1956). Carter らは、緑藻 *Chlorella* を $^{14}\text{CO}_2$ でインキュベートし、ラベルが迅速に糖脂質に取り込まれること、またこれは UDP-ガラクトースを用いたただ 1 つの経路であることを示唆した。この経路は後に *in vitro* の系で単離したホウレンソウの葉緑体における UDP-Gal ^{14}C の取り込み実験により検証された (Neufeld and Hall, 1964). その後、糖脂質生合成に関わる 2 つの異なる酵素、MGDG synthase (MGD) と、DGDG synthase (DGD) が提示された (Ongun and Mudd 1968) . また別の研究では、MGDG の 17%のガラクトースは α -ガラクトシダーゼで加水分解されて、残りのフラクションは β 結合であることが明らかになった (Neufeld and Hall, 1964).

MGDG および DGDG はグリセロール骨格の sn-3 位に 1 つまたは 2 つのガラクトース基を含んでおり、これらガラクト脂質は葉緑体包膜において合成されている (Douce, 1974; Benning and Ohta, 2005). 今から 30 年ほど前, MGDG 合成酵素活性は, ホウレンソウ葉緑体分画物の活性測定により, 葉緑体包膜に局在する膜タンパク質であることがわかった (Maréchal *et al.*, 1994). その後, キュウリから MGDG 合成酵素遺伝子の同定後 (Shimajima *et al.*, 1997), シロイヌナズナゲノム中に, Type A MGDG 合成酵素 (シロイヌナズナでは MGD1) と Type B MGDG 合成酵素 (同じく MGD2, MGD3) が同定された (Awai *et al.*, 2001). MGD1 は, N 末端に約 100 アミノ酸の切断可能な葉緑体トランジットペプチドが存在するのが特徴的である. MGD1 は膜貫通領域を持たない膜局在型タンパク質であり, 内包膜(IEM)の外側に局在することが示された (Miège *et al.*, 1999). MGD1 は, チラコイド膜の大規模な発達に必要な大量の MGDG の合成を担う, 最も活性の高いアイソフォームであることが示された.

他のシロイヌナズナの MGD アイソフォーム (MGD2, MGD3) は, そのほとんどが光合成を行わない組織で産生され, 特にリン酸欠乏に応答して誘導される (Awai *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2009). MGD1 とは対照的に, MGD2 と MGD3 は外包膜 (OEM) の外葉に局在するが (Awai *et al.*, 2001), MGD2, MGD3 のノックアウト変異体は通常条件下での顕著な表現型を示さない (Kobayashi *et al.*, 2009).

また, シロイヌナズナでは, DGD をコードする 2 つの遺伝子が同定され, その性質が明らかにされている (Dörmann, *et al.*, 1999; Kelly and Dörmann, 2002). DGD1 は DGDG の大部分 (90% 以上) の合成に関与しているが, DGD2 はわずかな量の DGDG を生産するのみである (Kelly *et al.*, 2003). *dgd1* 変異体は重度の矮小化と光合成効率の低下を示すが (Dörmann *et al.*, 1995), *dgd2* 変異体はその影響がかなり少ない (Kelly *et al.*, 2003). リン酸欠乏時には DGD1 と DGD2 の両方の発現が誘導されるが, DGD2 は DGDG をプラスチド外に供給する主要な酵素であるようである (Härtel *et al.*, 2000; Kelly and Dörmann, 2002).

両酵素とも葉緑体外包膜に局在し (Froehlich *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2003), DGD1 は葉緑体内包膜で MGD1 によって形成された MGDG を使い, DGD2 は Pi 欠乏下では, 葉緑体外包膜で MGD2/MGD3 によって生成された MGDG を使う (Benning, 2009).

陸上植物のガラクト脂質合成酵素遺伝子の機能についてはモデル植物であるシロイヌナズナを用いて主に研究が進められてきた (Dörmann and Benning, 2002).

近年では, ストレスのかかっていない条件で, MGDG と DGDG が MGDG 合成酵素 (MGD) や DGDG 合成酵素 (DGD) によって連続的なガラクトース残基の付加により合成されることがわかっている. 1 つ目のガラクトースは DAG に β グリコシドな結合をし, β -MGDG ができる. そして連続的なガラクトシル化によって $\alpha\beta$ -DGDG を合成する.

植物から糖脂質が失われてしまうとうなるかという知見もシロイヌナズナで得られている. 例えば, MGDG 合成酵素である MGD1 のノックアウト変異体では, 光合成活性が完全に消失し, 葉緑体チラコイド膜の形成ができなくなり, 胚発生にも異常をきたす (Kobayashi *et al.*, 2007). また MGD1 を ami-RNA でノックダウンした植物体はアルビノ表現型を示す (Fujii *et al.*, 2014) . ほかにも, MGDG と DGDG のバランスが崩れた植物体では葉緑体の形がおかしくなり, 明らかに生育が遅れるという報告もなされている (Yu *et al.*, 2020) .

このように, 植物にとって糖脂質とは必要不可欠な脂質である.

1.1.2 陸上植物とゼニゴケの脱水ストレス応答

植物の脱水ストレス応答は, いくつかの因子やホルモンシグナル伝達経路が関与する複雑なメカニズムである. RAV1 は AP2/ERF ファミリーに属する転写因子で, 様々な発生経路で働くことが知られており, RAV1 遺伝子発現のダウンレギュレーションが, 効率的な脱

水ストレス応答に重要であることを示されている (Sengupta *et al.* , 2020).

また、植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)は、乾燥ストレス後に蓄積され、植物の乾燥ストレス応答(遺伝子制御, 気孔閉鎖, 種子成熟, 休眠など)に重要な役割を果たしている。脱水ストレス応答, 特に ABA の蓄積調節に寄与する因子は不明であったが, NCED3 という酵素が, 脱水ストレス時の ABA 生合成に必須であり, NCED3 遺伝子は干ばつストレスにより高度に誘導されることを明らかにしている (Sato *et al.*, 2018).

ストレプト藻類においても乾燥ストレスが, 初期分枝性連鎖藻類 *K. crenulatum* において, 3 つの植物ホルモン経路(サイトカイニン, ABA, エチレンシグナル)の発現を制御することが示された (Holzinger and Becker 2015).

蘚苔類 *Marchantia polymorpha* においても ABA の研究がなされている。 *Marchantia polymorpha* 葉状体の凍結・乾燥後の生存率が, 濃度の高いスクロース存在下で ABA で前処理することにより増加することが示されている。ABA 処理により, 葉状体中の可溶性糖の蓄積が増加するが, 糖の蓄積は培地にスクロースを添加することによりさらに増加したと報告されている (Akter *et al.*, 2014)。また, 塩ストレスについての報告もされている。 *M. polymorpha* では 2 つの CIPK と 1 つの CBL は顕著な塩応答性の転写変化を示し, すべての *M. polymorpha* の CBL-CIPK は, 植物体内で互いに相互作用している。CIPK-B をノックアウトすると塩に対する感受性が上昇することから, この CIPK が塩シグナル伝達に関与していることが示唆されている (Tansley *et al.*, 2022)。

これは転写因子とは関わりはないが, *M. polymorpha* の無性生殖単位である無性芽を, スクロース(0.2 M), マンニトール(0.5 M), ポリエチレングリコール(PEG 10%)に暴露して生理的干ばつを誘発し, 形態学的, 生理学的, 生化学的レベルでの影響を調べた論文がある。 *M. polymorpha* は脱水ストレスに曝されると, 極端な生長阻害, 膜安定性の破壊, 光合成色素含量の減少を引き起こした。 *M. polymorpha* において, 適合溶質であるプロリンと ABA が支配する生理的な干ばつ耐性メカニズムが採用されていることが示唆された (Ghosh *et al.*,

2021).

このように、陸上植物や蘚苔類において脱水ストレスに着目して数々の研究が行われてきているが、脱水ストレス時に糖脂質に何が起きているかについて着目した知見はほとんどない。

1.1.3 オリゴガラクト脂質に関する知見

オリゴガラクト脂質に関する初めての発見はハウレンソウから単離してきた葉緑体により得られた(Neufeld and Hall, 1964). また、異なるアプローチ (免疫抗体, アイソトープなど) によってハウレンソウにオリゴガラクト脂質が存在することが確証付けられた(Ongun and Mudd, 1968). さらに研究により、いくつかの単子葉類や双子葉類から単離した葉緑体は、*in vitro* で TGDG や TeGDG を合成できることを実証し、全ての被子植物はオリゴガラクト脂質を産出する能力があることが示唆された。オリゴガラクト脂質は通常条件下の種子植物の葉では蓄積されておらず、TGDG と TeGDG が極性脂質に占める割合は 0.2%程度である。しかしながら、オリゴガラクト脂質は様々な種類のストレスに応答して葉緑体に蓄積する。

この葉緑体で見出された新たな糖脂質合成酵素では 2 つの放射性同位体を使い、UDP-Gal が無くても DGDG を合成できることが単離葉緑体で明らかにされた (Van Besouw and Wintermans, 1978). この酵素は、galactolipid:galactolipid galactosyltransferase(GGGT)活性があり、MGDG から糖を他の MGDG や DGDG に転移する (図 1.1). しかしながら、これまでに糖の結合様式についての報告はない。

1.1.4 シロイヌナズナ凍結感受性株 *sfr2*

シロイヌナズナの凍結感受性を引き起こす *sfr2* 変異については、2004 年から調べられてきた(Throlby *et al.*, 2004). マッピング、トランスジェニック相補性により、*sfr2* は *At3g06510* 遺伝子の変異であることが明らかになった。*SFR2* の発現は、ストレス誘導性ではないこと

が観察され、ほとんどの地上部組織に分布していた。SFR2 は family 1 の glycosylhydrolase (β -glycosidase) に相同なタンパク質をコードしていることがわかった。

また、2008 年にも、シロイヌナズナの *sfr2* 変異体の凍結感受性を、野生型由来の SFR2 遺伝子で相補することができたという報告があった(Fourrier *et al.*, 2008)。シロイヌナズナでは、SFR2 タンパク質は葉緑体の外包膜に局在していることが、SFR2 と GFP の融合タンパク質を発現させた植物の解析、共焦点顕微鏡による解析、およびサーモリシンプロテアーゼで処理した単離葉緑体の免疫学的解析によって明らかになった。さらに、*sfr2* 変異体の葉緑体は、凍結の後急速な損傷を受けることが明らかになり、葉緑体の保護における SFR2 の役割が示唆された。

一方で、凍結時に植物は TGDG(trigalactosyldiacylglycerol)を蓄積することが明らかになっていたが、なぜ TGDG を蓄積するのか、そして原因遺伝子についての知見は得られていなかった。

シロイヌナズナ野生株において、凍結させてから通常生育条件に戻した植物体は生育するのに対して、*sfr2* 欠損変異体では凍結させてから通常生育条件に戻した際に枯死してしまう。さらに膜脂質を見ると、凍結処理後(FT ; freezing treatment)に野生株で TGDG が蓄積するが *sfr2* 欠損変異体では蓄積が見られないことが明らかになった (Moellering *et al.*, 2010)。

また、*in vitro* の結果から SFR2 は MGDG を基質として連続的に DGDG, TGDG を合成する GGGT であることが明らかになった。

SFR2 が葉緑体膜の脂質リモデリングに関与していることが示唆された。二重層形成脂質と非二重層形成脂質の比率を変化させ、ラメラ二重層の形成を促進することは、凍結ストレス時に膜を安定化させるメカニズムである。SFR2 は、膜の生物物理学的および組成的变化のセンサーとして、生物ストレスに応答して脂質のリモデリングを引き起こす役割を担っていると推測できる。

1.1.5 トマト *SFR2* 類似遺伝子ノックダウン体と脱水ストレス以外のオリゴガラクト脂質蓄積条件

野生型トマトの耐塩性の高さは、*SFR2* 活性の産物である TGDG の産生と相関していた。*SlSFR2* RNAi 系統をトマト (*Solanum lycopersicum* [M82 cv]) で作製し、塩・乾燥ストレスを施した。野生株では蓄積する TGDG が *SlSFR2* RNAi 系統では蓄積しなかった (Wang *et al.*, 2016)。しかしながら、シロイヌナズナに塩ストレスや乾燥ストレスを与えたところ、植物の生育に不可逆的な影響を与える前に *SFR2* が誘導される条件は特定できなかった。このことから、シロイヌナズナ *SFR2* は凍結耐性にトマト *SFR2* 類似遺伝子は主に塩・乾燥ストレス耐性に寄与していることが示唆された。つまり、陸上環境に幅広く存在する脱水ストレス耐性に *SFR2* 類似遺伝子が寄与していることが示唆された。

さらに脱水ストレス以外にも、オリゴガラクト脂質の蓄積条件があることが報告されている。2016 年に有機酸溶液にシロイヌナズナロゼット葉を浮かべると、TGDG が合成されるという報告があった (Barnes *et al.*, 2016)。GGGT 活性は同じ酸でも無機酸を使用した場合には生じず、有機酸を使用した場合にのみ生じた。これはおそらく有機酸がプロトン化された形で膜を通過しプロトンを運び、細胞質 pH に影響を与えることができるためだと考察されている。

SFR2 の活性化は他のタンパク質との相互作用で引き起こされるのではなく、植物の葉や根でサイトゾルの pH や Mg^{2+} の濃度変化で起こる。これらの知見は様々な種類の浸透圧ストレスに対する *SFR2* の共通の制御経路の存在を明らかにした。凍結・乾燥・塩ストレスは、利用可能な水の減少という点で共通している (Andrews, 1996; Verslues *et al.*, 2006)。液胞は植物細胞において、 Mg^{2+} のメインの保管場であり、細胞質と葉緑体のイオンのホメオスタシスを制御する (Marschner, 1995)。細胞質と葉緑体の Mg^{2+} の濃度は、2~10 mM であり (Leigh and Wyn Jones, 1986)、液胞内の Mg^{2+} のレベルは 3~120 mM と異なる (Shaul, 2002)。対照的に、細胞外空間 (pH 5.5)・液胞 (pH 4.5-5.9) に比べて細胞質は酸性度が低い (pH 7.3-

7.6)(Kurdjian and Guern, 1989). Wang *et al.*, 2016 で述べているように、独立的な浸透圧ストレスの起源-細胞の脱水による膜の破壊-は、小さいイオン (Mg^{2+} や H^{+}) の漏出を引き起こし、葉緑体外包膜に存在する SFR2 の活性化を引き起こすと考えられる..

1.7 オリゴガラクト脂質を蓄積する他の生物

TGDG はいくつかの種類のシアノバクテリアで確認されている。 *Tolypothrix tenuis* と *Oscillatoria chalybea* で、生育中に TGDG が蓄積するのを確認している (Zepke *et al.*, 1978). オリゴガラクト脂質の存在は頻繁に渦鞭毛藻類のスーパークラスで見られ (Gray *et al.*, 2009) , 低温に適応する 4 つの渦鞭毛藻類で膜脂質組成を解析し、TGDG を発見した。他の種、門、例えば褐藻や紅藻に関するオリゴガラクト脂質の存在については更なる研究が必要である。

そこで、本研究ではクレブソルミディウムおよびゼニゴケのオリゴガラクト脂質合成能を確かめ、その生理的な意義について研究を行うことを目的とした。

1.2 図

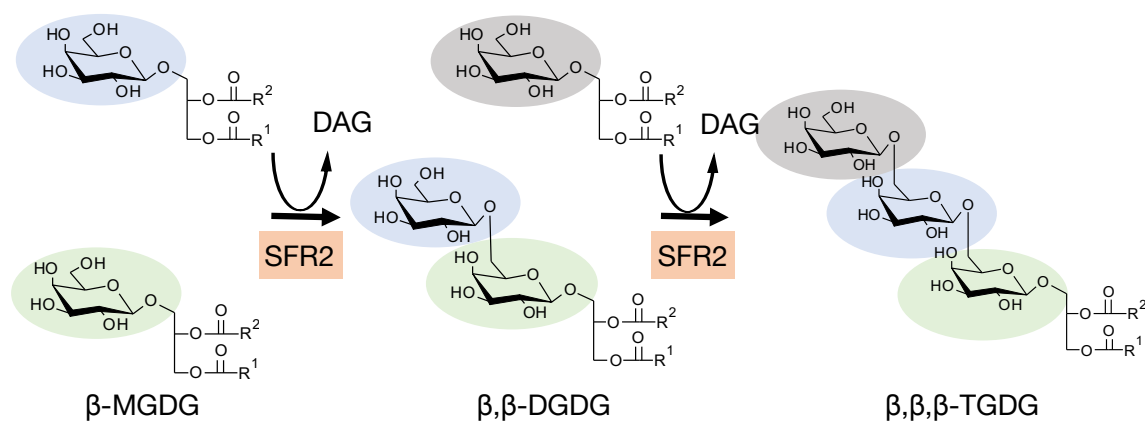


図 1.1 GGGT(galactolipid: galactolipid galactosyl transferase)反応

SFR2 は MGDG から別の MGDG へ、MGDG から別の DGDG へと糖を転移することによって TGDG を合成する。

第2章 車軸藻植物門クレブソルミディウムにおけるオリゴガラクト脂質合成に関する研究

2.1 序

植物の陸上進出は痕跡化石等から少なくとも4億7千年より前に起きたと考えられており、現在の地球環境の形成に大きな影響をもたらしたと考えられている (Rubinstein *et al.*, 2010) . 植物が陸上に進出し繁栄したことは、大気中の酸素分圧の増大 (Scott and Glasspool, 2006) や物質循環 (Parnell and Foster, 2012) をもたらし、引き続く動物の陸上進出と合わせて現在の陸上生態系の要となったと考えられる。しかしながら、陸上には乾燥・凍結・高温など様々な環境ストレスがあり、植物が陸上化する際にはこれらに適応していく必要があったと考えられる。最初にどのような植物が陸上に進出したかは明らかではないが、細胞分裂の様式や生化学的解析から陸上植物の祖先は車軸藻植物門の中から生まれたと考えられており、また近年の系統解析の結果もこのことを支持している (Lewis and McCourt, 2004) .

車軸藻植物門は緑藻植物門から分岐したと考えられている藻類であり、様々な形態の藻類を含む多系統群である。主に淡水に生息する藻類であるが、土壌や樹木などに生育する陸生藻類を含む。車軸藻植物門はクロロキブス藻綱、クレブソルミディウム藻綱、コレオケーテ藻綱、接合藻綱、車軸藻綱からなる。もっとも陸上植物に近い系統群についてはまだ諸説あるが、近年の転写産物の分子系統解析により接合藻綱が陸上植物に最も近い系統群であるとの報告が有力である (Timme *et al.*, 2012) . また、それぞれの系統群が分岐していく過程で段階的に多細胞化や有性生殖などを獲得している (Leliaert. *et al.*, 2012) . したがって、その特徴を明らかにし比較していくことで、陸上植物への進化過程を追うことができると期待されている。

車軸藻植物門クレブソルミディウム綱に属する *Klebsormidium nitens* NIES-2285 (以下、クレブソルミディウムと呼ぶ) は単純な体制をもつ糸状性の藻類である (図 2.1) . 水中・陸

上どちらの環境でも生育でき、身近な環境においては、擁壁の排水管のそばなど湿潤なコンクリート壁などに生育していることが多い。無分岐の多細胞藻類であるが、細胞分化や有性生殖は報告されていない。車軸藻植物門の中でクロロキブス藻綱の次に分岐した藻類であり、陸上植物が出現する過程のごく初期に、どのような特性や遺伝子が植物の陸上進出に影響を与えたのかを解明する糸口として期待されている。そこで私が所属する研究室では、これまでにクレブソルミディウムのドラフトゲノム解析が行われ、他の藻類や陸上植物との間でゲノム DNA にコードされた遺伝子群の比較解析が行われた (Hori *et al.*, 2014) 。その結果、クレブソルミディウムはこれまでに報告された他の藻類とは異なり、藻類特有の遺伝子に加えて、陸上植物特有の遺伝子の多くを保有する藻類であることが明らかになった (Hori *et al.*, 2014) 。このことから、クレブソルミディウムを用いたさらなる解析が植物の陸上進出を解明するために重要であることが示唆された。

クレブソルミディウムは高い凍結耐性があること、低温馴化により糖・アミノ酸の蓄積が起こり、凍結耐性が向上することが先行研究で明らかになっている (Nagao *et al.*, 2008)。またクレブソルミディウムは、凍結時にしか TGDG を蓄積しないシロイヌナズナと異なり、通常生育時でも TGDG を蓄積する (図 2.2, 渡邊 修論 2016)。さらに、クレブソルミディウムは、シロイヌナズナの *SFR2* 類似遺伝子を 3 コピー (GGGT1, 2, 3) 持つことが明らかになっている (図 2.3, Hori *et al.*, 2016)。

以上を踏まえて、本研究ではクレブソルミディウムにおけるオリゴガラクト脂質合成がクレブソルミディウムの耐凍性に寄与しているのかどうかを明らかにすることを目的として、クレブソルミディウム *SFR2* 類似遺伝子 (KnGGGT1, 2, 3) の解析を行った。

2.2 実験材料と方法

材料

2.2.1 *Klebsormidium nitens* (NIES-2285)

国立研究開発法人国立環境研究所 微生物系統保存施設から分譲された個体を用いた。試験管にて 50 ml の BCDATG 培地 (表 2.1, Nishiyama *et al.*, 2000) , 23°C, 光強度 10 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件で通気培養を行った (Hori. *et al.*, 2014) .

2-2-2. *Arabidopsis thaliana*

野生株 (Col-0) を 23°C, 連続光 ($40 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で 1/2MS 培地において 10 日前後育成したのち, 土壌に移植し生育した (表 2.2).

2-2-3. *Nicotiana benthamiana*

野生株を 23°C, 連続光 ($40 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で土壌において 1~2 か月程度育成した。

方法

2.2.4 Rbcs-RFP, AOX1a-RFP および KnMGD-RFP 発現用コンストラクトの作製とアグロバクテリウムへの形質転換

各配列を PrimeSTAR HS DNA Polymerase を用いた PCR により増幅した (使用したプライマーは表 2.3 に示した). PCR 産物は BP クロナーゼ II (Invitrogen) を用いて, pDONR/Zeo にサブクローニングし, シークエンス解析により配列を確認した後, LR クロナーゼII (Invitrogen) によりアグロバクテリウムのバイナリーベクター pGWB460 に導入し, 35S Pro : 各配列 : RFP の配列を持つプラスミドを作製した。

アグロバクテリウム GV3101::pMP90 への形質転換は freezing 法を用いた。アグロバクテリウムコンピテントセルを氷上で溶かし、プラスミドを $1\text{ }\mu\text{g}$ 程度加え液体窒素に 5 分間浸した。37°C 水槽に 25 分間浸し、YEP 培地 (表 2.4) を 1 mL 加え 30°C で 1 時間培養した。1,000 g で 5 分間遠心分離し、上清を少量残して菌体を回収し、YEP 固体培地 (終濃度 $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ スペクチノマイシン) にストリークし、2 日間培養した。コロニーを 3 mL の YEP 液体培地 (終濃度 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ゲンタマイシン, 終濃度 $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ スペクチノマイシン) に植え、30°C で 1 日培養した。培養液 500 μL に等量の 50% グリセロールを加え、-80°C で保存した (25% グリセロールストック)。

2.2.5 *Nicotiana benthamiana* (ベンサミアナタバコ) を用いた遺伝子の一過的発現

2.2.4 で作成したアグロバクテリウムのグリセロールストックを少量かきとり、YEP 固体培地 (終濃度 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ カナマイシン, 終濃度 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ハイグロマイシン, 終濃度 $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ スペクチノマイシン; 表 2.4) にストリークし、30°C で 2 日間培養した。コロニーを 2 mL の YEP 液体培地 (終濃度 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ カナマイシン・終濃度 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ハイグロマイシン・終濃度 $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ スペクチノマイシン) に植え、30°C で 20~22 時間振盪培養した。培養液を 1,000 g で 10 分間遠心分離し、菌体を回収した。Infiltration Buffer (表 2.5) を 1 mL で再懸濁し、1,000 g で 10 分間遠心分離し、菌体を回収した。Infiltration Buffer での洗浄は 3 回行った。菌体は Infiltration Buffer (終濃度 150 μM アセトシリンゴン含有) で再懸濁し、 $\text{OD}_{600} = 0.6$ 程度になるように調整した。

KnGGGT-GFP 導入株, SFR2-GFP 導入株, RbcS-RFP 導入株, AOX1a-RFP 導入株, KnMGD-RFP 導入株とサイレンスサプレッサーを発現する pBINp19 導入株を等量ずつ混合し、シリンジを用いてベンサミアナタバコ葉の細胞間隙に注入した。2~4 日後に採取し各種解析を行った。

なお, KnGGGT1, 2 および 3-GFP, SFR2-GFP 各導入株は, 当研究室の先行研究者から引き継いだものである (渡邊修論 2016).

2.2.6 シロイヌナズナ SFR2 欠損変異体 (*sfr2*) バックグラウンド KnGGGT1 および 2-GFP, SFR2-GFP の発現株の作出

シロイヌナズナ形質転換は flower-dipping 法を用いた. 坂口フラスコに 200 mL LB 培地 (表 2.6) を作製し, LB 培地に前培養したアグロバクテリウムを入れ, 30°C で一晩振盪した. OD₆₀₀ が 1.2-1.5 になるまで培養し, 2,510 g, 15 分, 室温で遠心して回収した. 沈殿物に対して, 懸濁液 (表 2.7) 500 mL でサスペンドし, 500 mL ポリビーカーに入れた. 既についていた鞘を取り除いた植物の鉢を逆さにして入れ, 3 分間放置した. この時ロゼット葉につけないように注意した. 終わったら軽く揺すり, アグロバクテリウム菌液を軽く落とした後, 横に寝かせ, パンケースにラップをして弱光下で 1 日間静置した. 次の日にラップを外して通常生育に戻した.

変異体のスクリーニングは薬剤選抜で行った. MS 培地に 50 µg/mL カナマイシンと 50 µg/mL ハイグロマイシンを加え, 種子を撒き, 薬剤耐性株を変異体候補とした.

2.2.7 タンパク質解析

サンプルを液体窒素下で乳鉢により破碎した. サンプル重量の半量程度の破碎 buffer を加えて懸濁し, 4°C, 17,700 g で 5 分間遠心分離した. 上清を可溶性画分とし, 沈殿は 2% SDS 破碎 buffer を加えて再懸濁し, 不溶性画分とした. 各画分から適量分注し, DC™ プロテインアッセイキット (Bio-Rad) を用いてタンパク質定量をおこなった. その後, 各画分に等量の sample buffer を加え, 3 分間ボイルした. 抽出したサンプル適量 (CBB 染色用: 10 µg, western blot 用: 2 µg) をポリアクリルアミドゲル (表 2.8) で泳動し, タンパク質を分離した. 分離後, CBB 染色により総タンパク質を染色, またはウェスタンブロット

解析を行った。ウェスタンブロット解析はセミドライ法で行い、PVDF メンブレン (GE Healthcare) を用いた。メタノールに浸し親水処理をしたメンブレンを Western 用泳動バッファ (表 2.8) に浸して置換した。タンパク質を分離したアクリルアミドゲルを Western 用泳動バッファ 20 分間に浸して置換した後、blotting 装置にバッファを浸したろ紙でメンブレンとゲルをはさんでセットし、1.5 A/cm² で 30 分程度 blotting した。メンブレンを blocking バッファで 1 時間振盪し、次に一次抗体として抗 GFP-mouse 抗体溶液で 3 時間振盪した。TTBS (表 2.8) で置換し、二次抗体として HRP 標識抗 mouse 抗体溶液で 1 時間振盪した。TTBS で置換し、AmershamTM ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) で検出し ImageQuant LAS 500 で撮影した。

2.2.7 植物体の脂質抽出

脂質はサンプルを液体窒素で凍結させながら乳鉢で破碎し、以下の通りに Bligh and Dyer's method (1959) に基づいて抽出した。破碎したサンプル 300 mg 程度に 3 mL のクロロホルム/メタノール混合溶液 (1:2, v/v) を加え混和させた。共栓付き試験管に移し 1,750 g で 5 分間遠心分離した。上清を別の共栓付き試験管に移し、沈殿に 3 mL のクロロホルム/メタノール混合溶液 (1:2=v/v) と 0.8 mL の 1% KCl を加えて混和させた。1,750 g で 5 分間遠心分離し上清を先の上清に加えた。2 mL のクロロホルムと 1.2 mL の 1% KCl を加え混和し、1,750 g で 5 分間遠心分離した。下層を別の試験管に移し、窒素ガスにより乾固後、適量のクロロホルム/メタノール混合溶液 (2:1, v/v) に溶解させ、20 mg/mL になるように調整し、-25°C で保存した。

脂質の分離は薄層クロマトグラフィー (TLC) で行い、一回の解析で総脂質 800 μ g を展開した。TLC プレートは、TLC Slica gel 60 25 Glass plates 20 $\times$ 20 cm (Merck) を用いた。糖脂質を分離した一次元 TLC の展開溶媒は、クロロホルム/メタノール/酢酸/水

(85:20:10:4, by vol.) を用いた。また、糖脂質の呈色はアンスロン硫酸法 (表 2.9) を用いた。

2.3 結果

2.3.1 ベンサミアナタバコ葉を用いた KnGGGT1-3 の一過的発現と共焦点顕微鏡を用いた局在解析

クレブソルミディウムの KnGGGT1,2 および 3 が GGGT 活性を有するのかどうかを明らかにするために、各 KnGGGT の C 末端側に GFP を付加した融合タンパク質 (以下, KnGGGT1-GFP, KnGGGT2-GFP, KnGGGT3-GFP と表記) とコントロールとして SFR2 の C 末端側に GFP を付加した融合タンパク質 (以下, SFR2-GFP と表記) をアグロバクテリウム感染によりベンサミアナタバコ葉で一過的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡によって各タンパク質の細胞内局在解析を行った (図 2.4). なお、コントロールとして Rbcs (Rubisco small subunit)-RFP (葉緑体ストロマ局在), AOX1a-RFP (ミトコンドリア局在) を共発現させた. SFR2:GFP は先行研究(Fourrier N. *et al.*, 2008)と同様に葉緑体包膜への局在が観察された(図 2.4A). KnGGGT1 および 2-GFP 融合タンパク質については、部分的に強い蛍光を発する箇所があったものの (図 2.4B, C), SFR2-GFP (図 2.4A)と同様に葉緑体包膜に局在する様子が観察された. この強い蛍光は多々見られたが、これは藻類遺伝子の一過的な発現系でよく見られるものである. また、KnGGGT3-GFP は先行研究の結果 (渡邊修論 2016) から、ミトコンドリアに局在するのではないかと示唆されていた. しかし、KnGGGT3-GFP については、弱い GFP 蛍光は検出されたが細胞内の局在は不明瞭で、KnGGGT1-GFP および KnGGGT2-GFP とは異なり、葉緑体包膜局在は見られなかった(図 2.4D).

2.3.2 KnGGGT1-GFP および KnGGGT2-GFP を一過的に発現させたベンサミアナタバコ葉の脂質解析

クレブソルミディウムの KnGGGT1 および 2 が GGGT 活性を有するのかどうかを明らかにするために、KnGGGT1 および KnGGGT2-GFP と、コントロールとして SFR2-GFP を一過的に発現させたベンサミアナタバコ葉を用いて脂質解析を行った. その結果、SFR2-GFP

発現葉では TGDG の蓄積が見られたが, KnGGGT1 および KnGGGT2-GFP 発現葉ではいずれも TGDG の蓄積が見られなかった (図 2.5).

これまでに, シロイヌナズナを用いた実験により, マグネシウム含有酢酸溶液 (20 mM acetic acid/ 10 mM MgCl₂ pH 4.0) に浸した葉では GGGT の活性化が起こり, TGDG が蓄積することが知られている (Barnes *et al.*, 2016). そこで, 同様の処理条件 (以下, GGGT 活性化処理条件と表記) を用いて, ベンサミアナタバコにおいても KnGGGT の活性化と TGDG の蓄積が起こるかどうかを調べた.

KnGGGT1 および 2-GFP と SFR2-GFP を発現させた葉に GGGT 活性化処理を 1, 6, 24 時間施し, 脂質解析を行った (図 2.6). その結果, 1 時間処理では SFR2-GFP 発現葉でのみ TGDG が検出されたが, 6 時間と 24 時間処理では SFR2-GFP 発現葉に加えて KnGGGT1 および 2-GFP 発現葉でも TGDG 合成が確認された. しかし, 6 時間と 24 時間処理 GFP のみを発現した葉 (ネガティブコントロール) においても TGDG 合成が観察され, その際の TGDG 蓄積量は KnGGGT1 および 2-GFP 発現葉における TGDG 蓄積量と大きく変わらなかった. すなわち, 通常生育条件下のベンサミアナタバコの葉ではほとんど TGDG は検出されないが, 葉に GGGT 活性化処理を施すとベンサミアナタバコ自身の GGGT が活性化され, TGDG が蓄積することがわかった. またこのことから, 本実験により発現誘導した融合タンパク質由来の TGDG 合成を内在性 GGGT が合成する TGDG と分けて解析することは困難であることがわかった.

2.3.3 KnMGD および KnGGGT を一過的に共発現させたベンサミアナタバコ葉の脂質解析

クレブソルミディウムの TGDG では, 構成する総脂肪酸の約 35%程度を 16:0 が占めており, また C18:3 よりも C18:2 の占める割合が高い. しかし, TGDG 生合成の基質である MGDG では, C16:0 は構成する総脂肪酸の 5%程度で, より不飽和度の高い C16:2, C16:3 の割合が合わせて 30%程度と非常に高い. また, MGDG 中の C18:2 と C18:3 の割合はいずれ

れも 30%程度と非常に高いことがわかっている。これらのことと、MGDG に含まれる脂肪酸の不飽和化は MGDG が生成された後に順次起こることを考慮すると、TGDG の生合成の基質となる MGDG は、生成されてまだ不飽和化が十分に進行していない新規に合成された MGDG である可能性が示唆された (渡邊修論 2016, 図 2.7)。そこで、MGDG の新規合成の促進が TGDG 合成に与える影響を明らかにするために、クレブソルミディウムの MGDG 合成酵素の C 末端に RFP を付加した融合タンパク質 (KnMGD-RFP) を SFR2-GFP, KnGGGT1-GFP, KnGGGT2-GFP および KnGGGT3-GFP のそれぞれとベンサミアナタバコにおいて一過的に共発現させ、発現葉を用いて脂質解析を行った (図 2.8)。その結果、SFR2-GFP と KnMGD-RFP を共発現させた葉では TGDG 合成が確認できたが、KnGGGT1, 2, および 3-GFP と KnMGD-RFP を共発現させた葉では TGDG 合成が確認できなかった (図 2.8)。

このことから、少なくともベンサミアナタバコ葉の一過的発現系では、KnMGD-RFP と共発現させても KnGGGT による TGDG 合成は検出できないことがわかった。

2.3.4 シロイヌナズナ SFR2 欠損変異体 (*sfr2*) バックグラウンド KnGGGT1 および 2-GFP, SFR2-GFP の発現株の作出と解析

KnGGGT がシロイヌナズナにおいて SFR2 の機能を相補できるかどうかを調べるために、KnGGGT1 および KnGGGT2-GFP, SFR2-GFP をそれぞれ *sfr2* 欠損変異体において過剰発現させた形質転換体を作成した (以下、相補株と表記)。ウェスタンブロット解析の結果、導入した各タンパク質の分子量と同じ位置にバンドが検出され、各タンパク質が発現していることがわかった (図 2.9)。

次に、各シロイヌナズナ相補株の葉において、GGGT 活性化処理 (2.3.2 と同様の処理) を行なった後、脂質解析を行った。その結果、SFR2-GFP 相補株では TGDG 合成が検出できたのに対し、KnGGGT1 および 2 相補株では TGDG 合成が検出できなかった (図 2.10)。

このことから、KnGGGT1 および 2-GFP は、シロイヌナズナにおいてタンパク質として発現はするが、TGDG 合成活性は示さないことが示唆された。

以上の結果から、シロイヌナズナ SFR2 のクレブソルミディウムホモログとして単離した KnGGGT1 および KnGGGT2 は、GFP との融合タンパク質を用いた細胞内局在解析により SFR2 と同様、葉緑体包膜に局在する様子は観察されたが、ベンサミアナタバコ葉における一過的発現、シロイヌナズナにおける *sfr2* バックグラウンドでの過剰発現のいずれにおいても、TGDG 合成能を検出することはできなかった。

2.4 考察

2.4.1 ベンサミアナタバコ葉での一過的発現系でTGDGが合成されなかった原因について

ベンサミアナタバコ葉において、KnMGD と KnGGGT を共発現させた場合でも TGDG が合成されなかったことから、TGDG の基質が新規に合成された MGDG ではない可能性が考えられる。過去の知見にもあるように (Kojima *et al.*, 1990 ; Gasulla *et al.*, 2013), TGDG は DGDG を基質にしても合成される。クレブソルミディウムにおける TGDG を構成する脂肪酸種は、C16:0 が 35%, C18:2 が 35%程度で C18:3 が 15%程度を占めている (図 2.7)。これに対して DGDG の脂肪酸種は、C16:0 が 10%程度で C18:2, C18:3 が 40%程度と、特に不飽和度の高い C18 脂肪酸の含有量について TGDG と DGDG は非常に似ている (図 2.11)。このことから、クレブソルミディウムの TGDG は、新規に合成された MGDG に対する 2 度のガラクトース転移により生成されているのではなく、DGDG に対する 1 度のガラクトース転移により生成している可能性が示唆された。また、シロイヌナズナやベンサミアナタバコ葉でも DGDG は多量に含まれており、上記後者の反応であっても基質量としては十分と思われる。それに関わらず、TGDG 合成がみられなかったことを鑑みると、クレブソルミディウムの GGGT はクレブソルミディウム由来の DGDG が基質として必要だということが考えられる。

MGDG や DGDG などのグリセロガラクト脂質の場合、含まれる脂肪酸種に加えてグリセロール骨格に対するガラクトースの配位 (α または β) の違いも、それらを基質とする酵素の基質特異性により活性に影響を与える。SFR2 (GGGT) の酵素反応においては、 β -MGDG から β -MGDG へと糖が転移され β,β -DGDG が、さらに β -MGDG から β,β -DGDG へと糖が転移されて β,β,β -TGDG が生成されるという、連続的な糖転移反応が起こる。したがって、種子植物において、通常葉緑体に豊富に存在する α,β -DGDG は SFR2 (GGGT) の基質とはならない。もしこの α,β -DGDG から SFR2 (GGGT) による糖転移反応が起きると、生成されるのは β,α,β -TGDG となる。本研究でおこなった TLC を用いたクレブソルミディ

ウムの TGDG の解析から、クレブソルミディウムの TGDG はシロイヌナズナで蓄積する TGDG, すなわち β,β,β -TGDG とは、若干移動度が異なる様子が観察された。このことから、クレブソルミディウムで合成されている TGDG は、シロイヌナズナやベンサミアナタバコなどの種子植物とは異なり、 β,α,β -TGDG または、 α,α,β -TGDG である可能性も考えられる (Gasulla *et al.*, 2013). 従って今後は、まずクレブソルミディウムが生成している MGDG, DGDG, TGDG の NMR 解析を行い、糖の結合様式を確認する必要がある。また、ベンサミアナタバコにおいて、KnDGD と KnGGGT を共発現した場合に TGDG 合成が検出されるかどうか解析することで、KnGGGT についての新たな知見が得られるのではないかと考えている。

2.4.2 シロイヌナズナ SFR2 が KnGGGT により機能相補されなかった理由について

2.4.1 に述べた基質特性の違いである可能性に加えて、KnGGGT1 および 2 は GGGT 活性化条件がシロイヌナズナなどの種子植物とは異なる可能性も考えられる。クレブソルミディウムは生育環境の温度変化によらず、常に TGDG を蓄積していることから、GGGT が常に活性化している可能性が高い。ベンサミアナタバコを用いた一過的発現系は、酵素活性を調べる上では簡便であるが、ホスト植物側の生育コンディションを考慮した実験には不向きである。そのため考えられる手法としては、本研究で作出したシロイヌナズナ *sfr2:KnGGGT* 相補体に凍結ストレスなど脱水ストレスを与え、TGDG が蓄積するかどうか確かめることが重要であると考えている。また、これまでに試みた生育条件において、クレブソルミディウムは常に TGDG を蓄積しているが、TGDG が蓄積しない条件はいまだにわかっていない。このことから、TGDG が蓄積しない、あるいは減少する因子 (生育条件、培地組成) を同定することで、クレブソルミディウムの GGGT 活性化因子を見つけることができるのではないかと考えている。なお、シロイヌナズナとベンサミアナタバコでは、GGGT の活性化処理 (条件) でのみ TGDG 蓄積が見られることから、クレブソルミディ

ウムでは、種子植物とは異なる活性化因子によって GGGT 活性化が起こっていることが示唆される。今後は、クレブソルミディウムの形質転換法が確立され、形質転換体を用いた解析を通して新しい知見が得られることを期待したい。

2.5 表および図

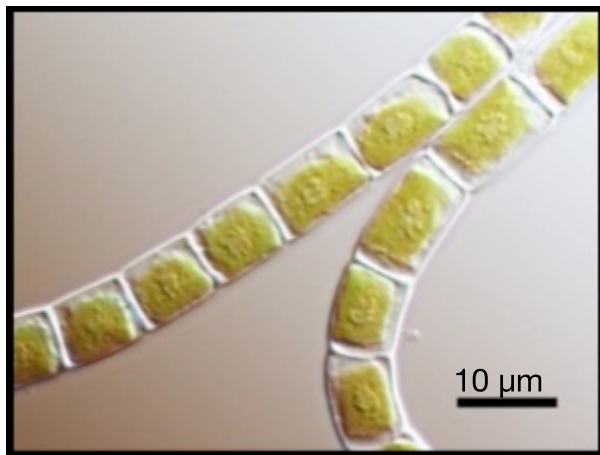


図 2.1 ストレプト藻類 *Klebsormidium nitens*

Klebsormidium nitens は糸状性の藻類である。

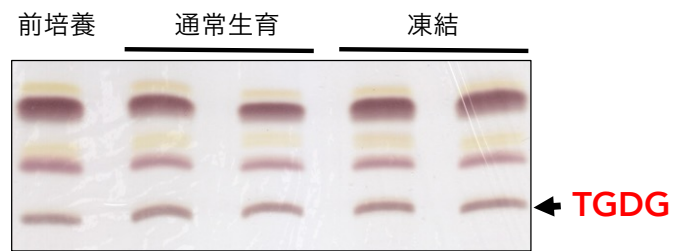


図 2.2 クレブソルミディウムの通常生育条件時と凍結条件時の糖脂質

クレブソルミディウムにおいて、前培養・通常生育条件・凍結処理を施した藻体から脂質を抽出して TLC で分画した(渡邊修論 2016).

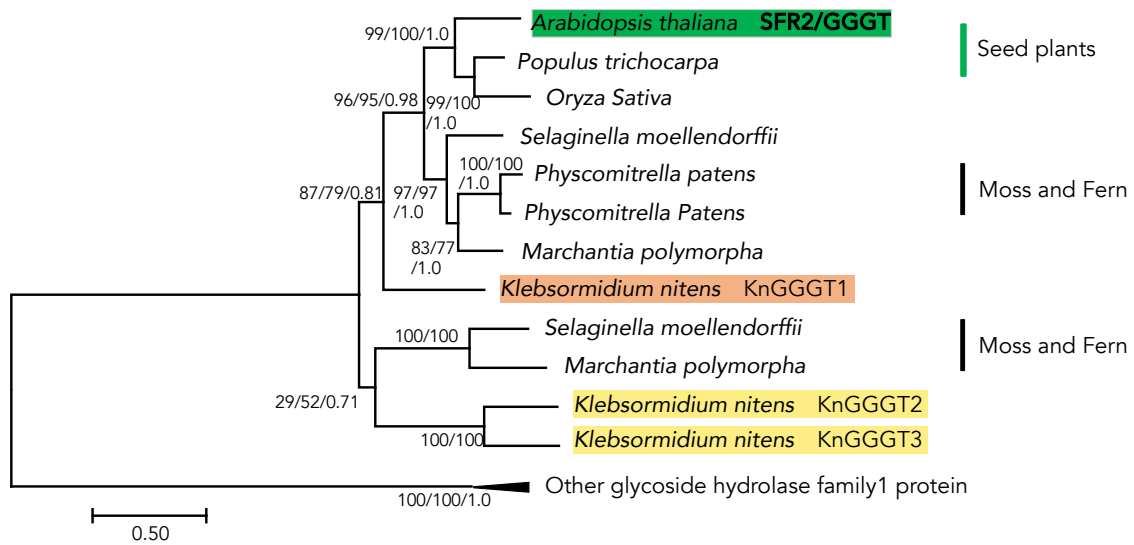


図 2.3 SFR2 とその類似タンパク質の系統樹

当研究室の堀孝一助教が作成した系統樹.

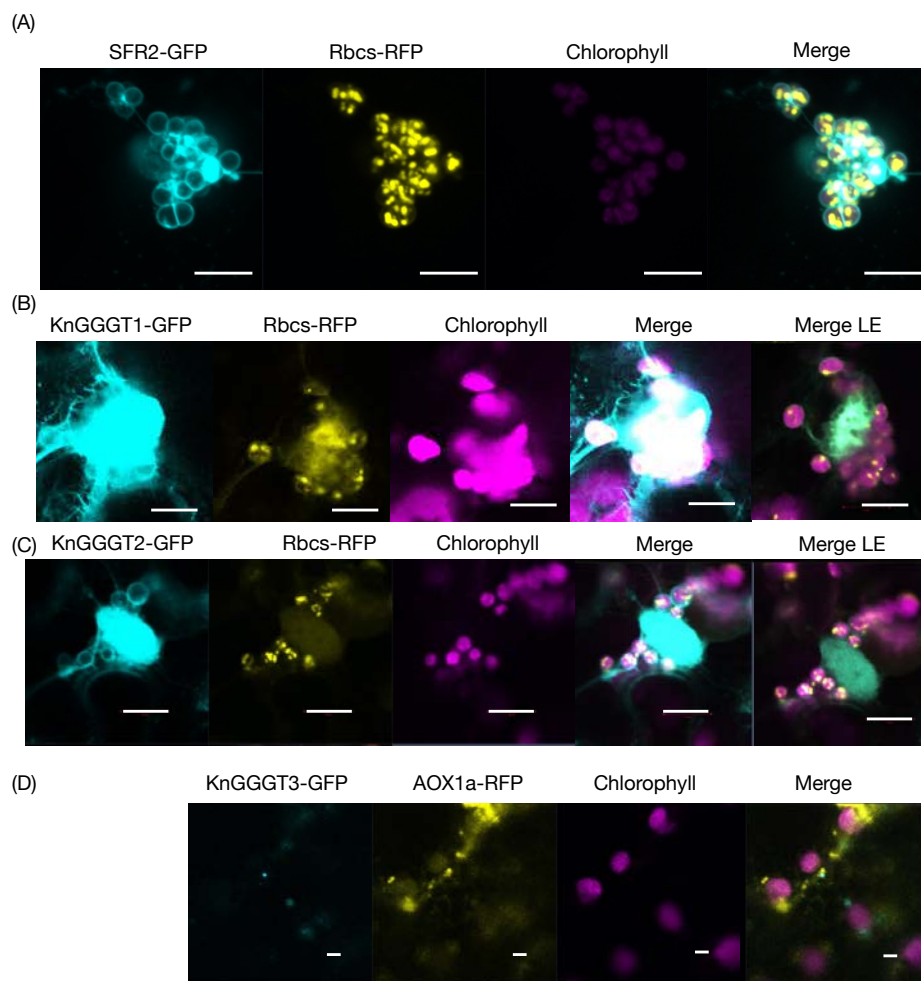


図 2.4 ベンサミアナタバコ葉を用いた KnGGGT-GFP の一過的発現と細胞内局在解析

GFP を融合させた (A) SFR2 (SFR2-GFP), (B) KnGGGT1 (KnGGGT1-GFP), (C) KnGGGT2 (KnGGGT2-GFP), (D) KnGGGT3 (KnGGGT3-GFP) の細胞内局在を共焦点レーザー蛍光顕微鏡によって解析した.

(A-C) Rbcs-RFP (葉緑体ストロマ局在) との共発現 (Scale bars = 10 μ m)

(D) AOX1a-RFP (ミトコンドリア局在) との共発現 (Scale bars = 10 μ m)

クロロフィルは葉緑体の自家蛍光. Merge, GFP, RFP, クロロフィル蛍光写真の重ね合わせ;

Merge LE, 重ね合わせて低露光させて得た写真.

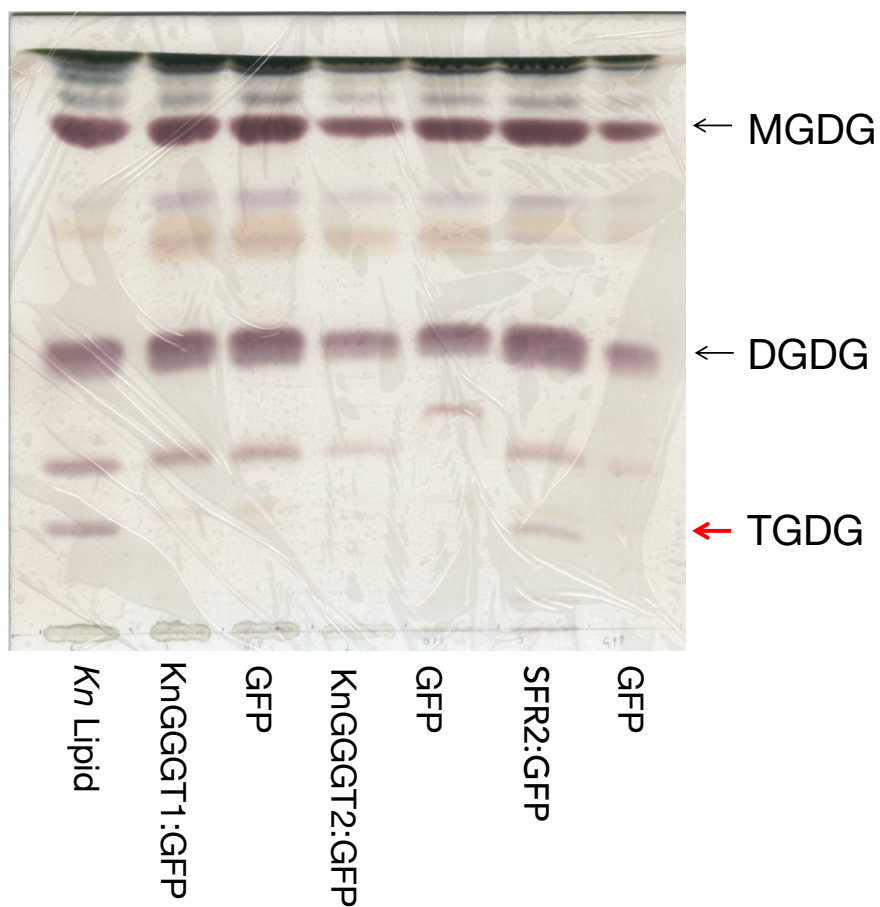


図 2.5 KnGGGT1-GFP および KnGGGT2-GFP を一過的に発現させたベンサミアナタバコ葉の脂質解析

KnGGGT1-GFP, KnGGGT2-GFP, SFR2-GFP および GFP を一過的に発現させたベンサミアナタバコ葉から抽出した総脂質それぞれ 600 μ g を一次元 TLC 展開し、脂質種を分画した。赤矢印は Trigalactosyldiacylglycerol (TGDG)を示す。Kn Lipid, クレブソルミディウム藻体の総脂質; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol.

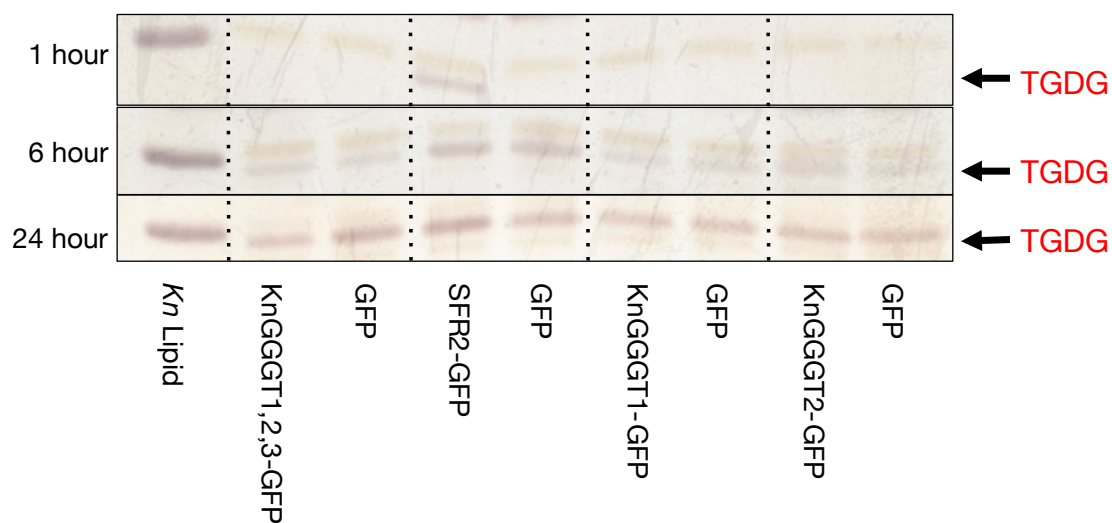


図 2.6 GGGT 活性化処理を行った KnGGGT-GFP 発現葉の脂質解析

各タンパク質を一過的に発現させたベンサミアナタバコ葉にそれぞれ GGGT 活性化処理を 1, 6, 24 時間行った後、総脂質 600 μ g を一次元 TLC で分画、TG DG を発色させた。KnGGGT1, 2, 3-GFP は、KnGGGT1, 2, 3-GFP の 3 種を共発現した。

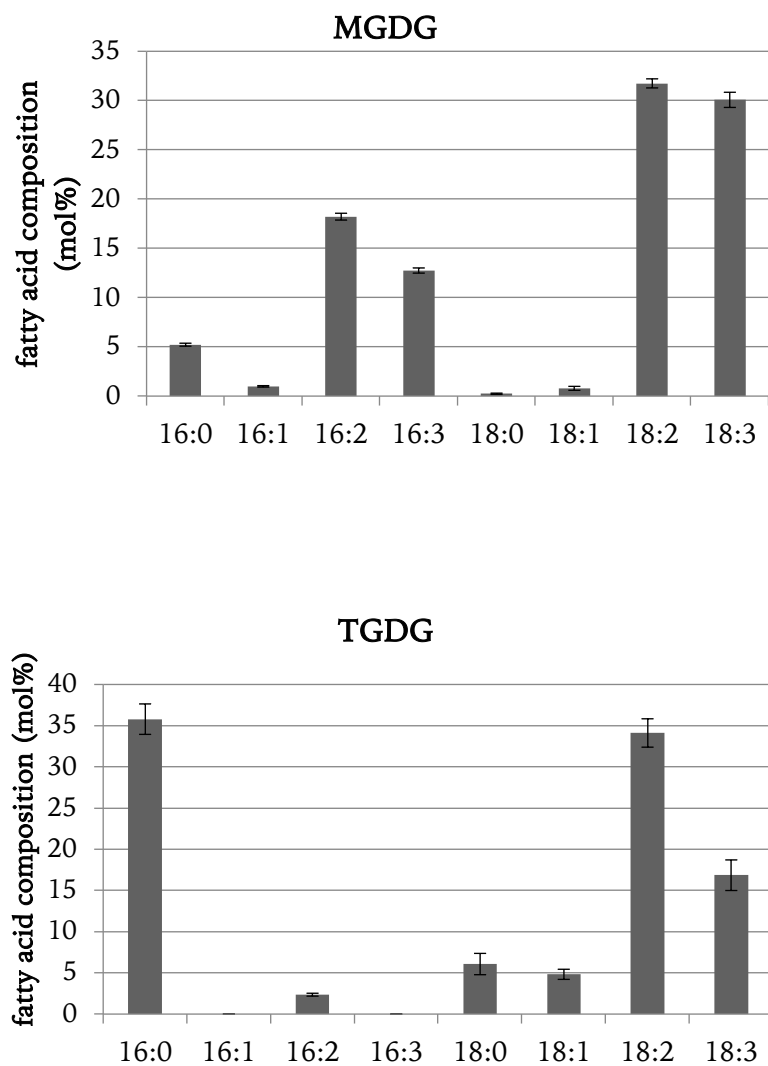


図 2.7 クレブソルミディウムの MGDG と TGDG の脂肪酸組成 (渡邊汀・修士論文 2016 年度)

クレブソルミディウムの MGDG および TGDG を構成する脂肪酸をメチルエステル化し，ガスクロマトグラフィーによって定量したもの．グラフ中の全ての脂肪酸のモル数の和を 100%とし，各脂肪酸のモル数を mol%として示した．(n = 3).

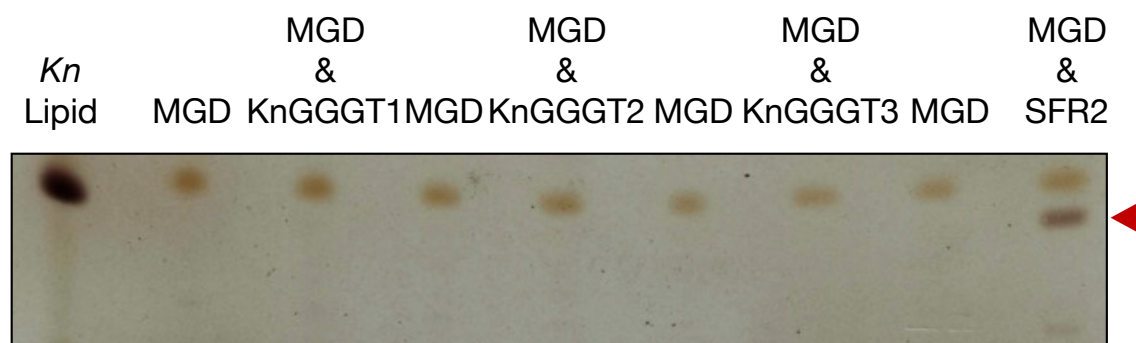


図 2.8 KnMGD, KnGGGT を一過的に共発現したベンサミアナタバコ葉の脂質解析

KnGGGT1-GFP, KnGGGT2-GFP, KnGGGT3-GFP, SFR2-GFP と KnMGD 共発現葉の総脂質 600 μ g を一次元 TLC 展開し, TGDG を呈色させた. 赤矢印は TGDG を示す. Kn, クレブソルミディウム藻体由来の TGDG; MGD, KnMGD のみ発現; MGD&KnGGGT1, 2, 3, SFR2; KnMGD と各タンパク質を共発現



図 2.9 シロイヌナズナ SFR2 欠損変異体 (*sfr2*) バックグラウンド KnGGGT1 および 2-GFP, SFR2-GFP 過剰発現株におけるウェスタンブロット解析

シロイヌナズナ *sfr2* 欠損変異体に KnGGGT1 及び 2-GFP と SFR2-GFP を発現させた形質転換体の葉における各タンパク質の発現量を GFP 抗体を用いたウェスタンブロット解析により調べた。推定分子量は、KnGGGT1-GFP=～102 kDa, KnGGGT2-GFP=～96 kDa, SFR2-GFP=～98 kDa. *GGGT1 Ox*, KnGGGT1-GFP 発現株；*GGGT2 Ox*, KnGGGT2-GFP 発現株；*SFR2 Ox*, SFR2-GFP 発現株。

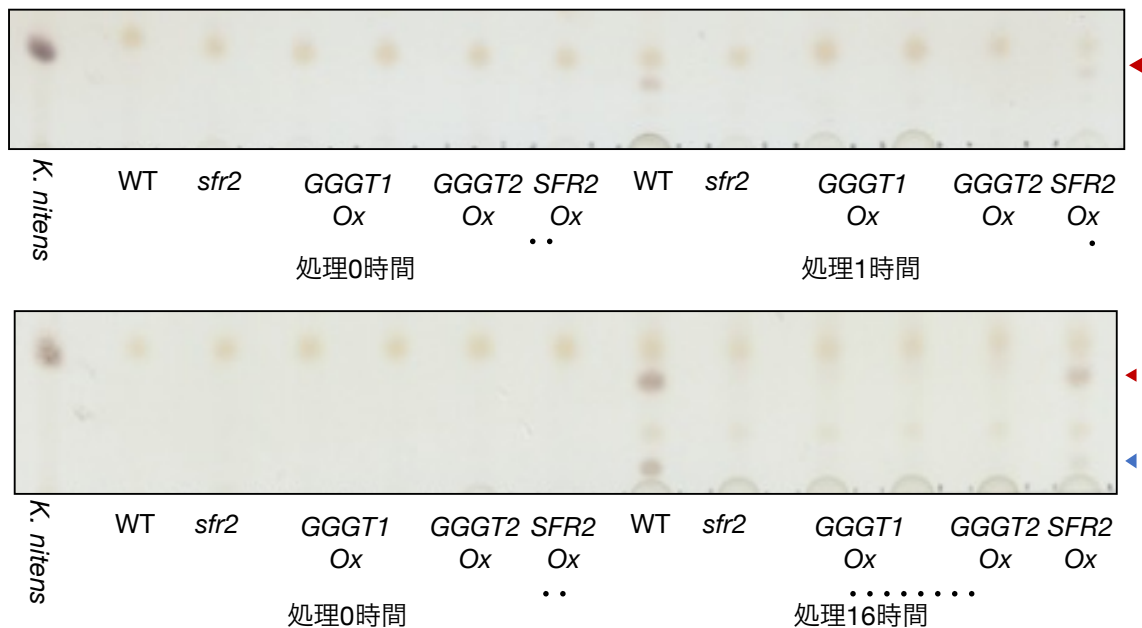


図 2.10 シロイヌナズナ SFR2 欠損変異体 (*sfr2*) バックグラウンド KnGGGT1 および 2-GFP, SFR2-GFP 過剰発現株の脂質解析

各形質転換体の総脂質 600 μ g を一次元 TLC 展開し, TGDG の呈色を行った. 処理時間は GGGT 活性化処理を施した時間を示している. 赤矢印は TGDG を, 青矢印は Tetragalactosyldiacylglycerol (TeGDG) を示す. *K. nitens*, クレブソルミディウム藻体由来の TGDG; WT, シロイヌナズナ野生株の TGDG; GGGT1 Ox, シロイヌナズナ *sfr2* 欠損変異体に KnGGGT1-GFP を過剰発現した株; GGGT2 Ox, シロイヌナズナ *sfr2* 欠損変異体に KnGGGT2-GFP を過剰発現した株; SFR2 Ox, シロイヌナズナ *sfr2* 欠損変異体に SFR2-GFP を過剰発現した株; *sfr2*, シロイヌナズナ *sfr2* 欠損変異体

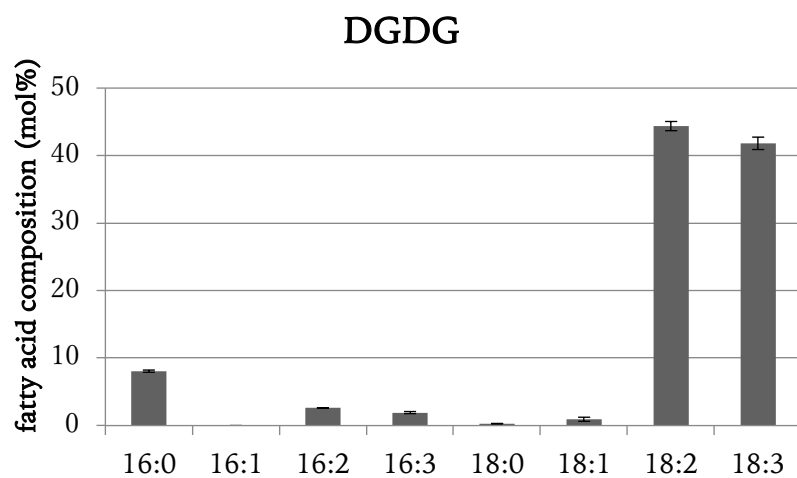


図 2.11 クレブソルミディウムの DGDG の脂肪酸組成 (渡邊汀・修士論文 2016 年度)

クレブソルミディウムの DGDG を構成する脂肪酸をメチルエステル化し，ガスクロマトグラフィーによって定量したもの，グラフ中の全ての脂肪酸のモル数の和を 100%とし，各脂肪酸のモル数を mol% として示した．(n = 3)．

表 2.1 BCTATG 培地の組成

化合物	終濃度(mg/ 100 mL)
Vitamin B ₁₂	10 µg
Biotin	15 µg
Thiamine-HCl	50 µg
MgSO ₄ •7H ₂ O	250 mg
KH ₂ PO ₄	250 mg
KNO ₃	1.01 g
FeSO ₄ •7H ₂ O	125 mg
CuSO ₄ •5H ₂ O	5.5 µg
H ₃ BO ₃	61.4 µg
CoCl ₂ •6H ₂ O	5.5 µg
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	2.5 µg
ZnSO ₄ •7H ₂ O	5.5 µg
MnCl ₂ •4H ₂ O	38.9 µg
KI	2.8 µg
Ammonium Tartrate	9.205 g
CaCl ₂ •2H ₂ O	15 mg
Glucose	100 mg

表 2.2 MS 培地の組成

化合物	終濃度 (mg/ L)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ ·5H ₂ O	0.25
KI	0.83
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
EDTA Na Fe H ₂ O	38.5
ミオイノシトール	100
チアミン塩酸	0.1
ピリドキシン塩酸	0.5
ニコチン酸	0.5
グリシン	2

表 2.3 使用したプライマー配列

名称	配列 5'→3'
KnMGD1 Fwd	AAAAAGCAGGCTCAAAAATGGCGTCTCTCTCTCTCGC
KnMGD1 Rev	AGAAAGCTGGGTTATCTACATAAACACGCCCTTGCTACC
Rbcs Fwd	AAAAAGCAGGCTCAAAAATGATGATAACTCGCGGTGG
Rbcs Rev	AGAAAGCTGGGTTATCATGATACCCAATTGGAGCTG
AOX1a Fwd	AAAAAGCAGGCTCAAAAATGATGATAACTCGCGGTGG
AOX1a Rev	AGAAAGCTGGGTTATCATGATACCCAATTGGAGCTG

表 2.4 YEP 培地(固体培地のみ Bacto Agar を加えた)

試薬名	終濃度 (g/ 100 mL)
Bacto Tryptone	1 g
NaCl	1 g
Yeast extract	1 g
Bacto Agar	1.5 g

表 2.5 Infiltration Buffer

試薬名	終濃度
MES, pH 5.6	10 mM
MgSO ₄	10 mM
アセトシリンゴン	150 μ M

表 2.6 LB 培地(固体培地のみ Bacto Agar を加えた)

試薬名	終濃度 (g/ 100 mL)
Bacto Tryptone	1 g
NaCl	1 g
Yeast extract	0.5 g
Bacto Agar	1.5 g

表 2.7 懸濁液 fill up to 1 L with D.W.

試薬名	
Silwet L-77	0.5 mL
スクロース	50 g

表 2.8 タンパク質の発現解析に使用した溶液作成方法

1) 破碎 buffer(fill up to 1 mL with D.W.)

試薬名	終濃度
Tris-HCl, pH 6.8	50 mM
EDTA	1 mM

2) Sample buffer (fill up to 1 mL with D.W.)

試薬名	終濃度
Tris-HCl, pH 6.8	500 mM
SDS	1% (w/ v)
グリセロール	20% (w/ v)
2-メルカプトエタノール	10% (w/ v)
BPB 飽和溶液	5%(w/ v)

3) SDS-PAGE 濃縮ゲル

試薬名	容量
30% アクリルアミド	1.4 mL
10% SDS	0.1 mL
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 mL
D.W.	6 mL
10% APS	60 μ L
TEMED	7 μ L

4) SDS-PAGE 分離ゲル

試薬名	容量
30% アクリルアミド	3.3 mL
10% SDS	0.1 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 mL
D.W.	4 mL
10% APS	60 μ L
TEMED	7 μ L

(表 2.8 続き)

5) SDS-PAGE 泳動用 10xbuffer (fill up to 1 L with D.W.)

試薬名	容量
Tris	30.3 g
グリシン	144 g
SDS	10 g

6) Western 用泳動バッファー (fill up to 1 L with D.W.)

試薬名	容量
Tris	3 g
グリシン	14.4 g
メタノール	200 mL

7) TTBS (fill up to 1 L with D.W.)

試薬名	容量
KH_2PO_4	0.2 g
KCl	0.2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 g
NaCl	8 g
Tween20	1 mL

表 2.9 アンスロン硫酸

試薬名	容量
アンスロン	0.05 g
チオ尿素	1 g
66% (v/ v)硫酸	100 mL

第3章 ゼニゴケにおけるオリゴガラクト脂質合成に関する研究

3.1 序

地球史における重大なイベントのひとつとして、およそ4億8千万年前に起こったとされる植物の陸上化があげられる (Kenrick and Crane 1997) . 陸上植物の進化は、それまでの荒廃した大地を緑色にしていたという点で、陸上環境を一変させた。陸上植物は基本的に単系統で、単細胞緑藻から水中で多細胞化して誕生した車軸藻植物門を祖先とし、その後、表皮細胞のクチクラなどを身につけてコケ植物が陸上進出を果たしたとされている。分類学状のコケ植物は、苔類、蘚類、ツノゴケ類であり、この3群は古くから分岐したと考えられている。その後、ヒカゲノズラ類、シダ類、裸子植物の順で側方系統が分岐して被子植物に至った。

苔類ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* は世界中に広く分布する。葉状体として成長し、背側には気室を発達させる複雑葉状性のコケである。陸上植物の特徴は、配偶体世代と孢子体世代が交互に現れる世代交代を行うことであるが、ゼニゴケを含むコケ植物は配偶体世代が優占的である。配偶体世代の核相は単相であり、遺伝学的解析に適している。一方で核相が複相の孢子体世代も存在する。ゼニゴケは世界中に広く分布し、形態学を中心として植物学の材料として利用されてきた。

M. polymorpha の全ゲノムは2017年に解読された (Bowman *et al.*, 2017) . その結果、*M. polymorpha* は他の陸上植物と比較すると、ほとんどの代謝経路において遺伝的重複が少ないことが明らかになった。また、ゼニゴケではすでに形質転換手法が確立されており、アグロバクテリウムを用いた孢子体の形質転換 (Ishizaki *et al.*, 2008) や葉状体を用いた形質転換 (Kubota *et al.*, 2013) , 1枚の寒天プレートで行う Agar-Trap 法が確立されている (Tsuboyama and Kodama, 2014). このように *M. polymorpha* は全ゲノムが解読されている点や形質転換手法や遺伝子組み換え系が確立されていることから、シロイヌナズナと同様

に新たなモデル陸上植物として研究が進んでいる。

ゼニゴケにおける脱水ストレス応答に関する知見は、主に転写因子の解析から蓄積されているが、オリゴガラクト脂質に関する知見は未だ無い。脱水ストレス耐性におけるオリゴガラクト脂質の重要性については 1 章にも述べたように、シロイヌナズナやトマトにおいてはオリゴガラクト脂質合成酵素 SFR2 の解析を通して明らかになっているが、オリゴガラクト脂質がどのようなメカニズムで植物体に脱水ストレス耐性を与えるのかについてはまだ明らかになっていない。

そこで、本研究では、オリゴガラクト脂質を介した脱水ストレス、特に酸ストレスに対する耐性付与が陸上植物の基部で進化したゼニゴケにおいても保存されているのかどうかを明らかにするために、ゼニゴケの SFR2 類似タンパク質の機能解析および生理的役割について解析を行った。

3.2 実験材料と方法

材料

3.2.1 *Marchantia polymorpha*

野生株を 23°C 連続光で 1/2 Gamborg's B5 寒天培地(表 3.1)上において生育した植物体を用いた。継代は 1 ヶ月～1 ヶ月半おきに一回、酸培地におくサンプルは 1% (w/v) スクロース含有 1/2 Gamborg's B5 寒天培地 (以下 Suc 培地と記載する) で 2 週間培養した。

3.2.2 *Nicotiana benthamiana*

2.2.3 と同様の手法で生育させた。

手法

3.2.3 ゼニゴケ葉状体の RNA 抽出と逆転写反応

凍結したサンプルを乳鉢と乳房で粉末状にした後に、サンプル新鮮重量の 3 倍量の SDS-EB バッファー(表 3.2)および酸性フェノールを加えてサンプルが溶解する前に完全に溶かした。全量を 1.5 mL チューブに移して 12,000 g, 5 分, 4°C で遠心した。上清を別のエッペンチューブに移してから 0.5 倍量の酸性フェノールおよびクロロホルムを加えてよく混和し、12,000 g, 5 分, 4°C で遠心した。上層を分取し、再度上記のフェノクロ抽出を行った。この操作は 3 回行った。上層に等量のイソプロパノールを加えてよく混和し、12,000 g, 15 分, 4°C で遠心した。上清を廃棄した後、沈殿を 70% エタノールでリンスした (12,000 g, 15 分, 4°C)。その後沈殿を風乾し、90 μ L の MilliQ 水と 10 μ L の DNase I Buffer を加え、さらに 1 μ L の DNase I (5 U/ μ L) を加えて 37°C, 30 分間インキュベートした。50 μ L の酸性フェノールと 50 μ L のクロロホルムを加え、10 μ L の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を入れてよく混和した後、12,000 g, 15 分, 4°C で遠心し、水層を分取した。水層に対して 2.5 倍量のエタノールを加え、ボルテックス後に 12,000 g, 5 分, 4°C で遠心した。得られた沈殿は風乾し、

適当量の MilliQ 水で沈澱を溶かした。吸光度測定と 0.8%アガロースゲル電気泳動で得られた RNA の精製度を確認した後に、逆転写反応を行った。

逆転写反応を行う前に、RNA 溶液は逆転写反応組成液（表 3.3-1）で 65°C, 5 分間処理を行い、その後氷上で 1 分間インキュベートした。反応終了後、表 3.3-2 の Super Script II 反応液（Super Script II (Invitrogen)）で逆転写反応（42°C, 50 分）を行い、その後、70°C 15 分処理し、MilliQ 水を 10 μ L 加えて cDNA 溶液とした。

3.2.4 MpGGGT-GFP 発現ベクターの作製

GATEWAY システムを利用して植物におけるタンパク質発現ベクター作製を行った。

3.2.3 で調製したゼニゴケの cDNA 標品を鋳型として attB 配列を付加した *MpGGGT1*, *MpGGGT2* のタンパク質の coding sequence 断片を PCR によって増幅した。断片の増幅には Prime STAR GXL (TaKaRa) を用いた。PCR によって得られた断片は精製後、pDONR/Zeo (Invitrogen) に対して BP 反応によりサブクローニングした。サブクローニングした配列は、シーケンス解析によって配列に誤りがないことを確認し、LR 反応によって pGWB5 に組換ええた。上記で使用したプライマーについては表 3.4 にまとめた。

3.2.5 *Nicotiana benthamiana* (ベンサミアナタバコ) を用いた遺伝子の一過的発現

3.2.4 で作成した各形質転換用プラスミドを含むアグロバクテリウムを用いて、2.2.5 と同様に実験を行った。

3.2.6 ウェスタンブロット解析

2.2.7 と同様に実験を行った。

3.2.7 ゼニゴケにおけるゲノム編集用ベクターの作製

MpGGGT1, 2 のゲノム編集用ベクターを作製した。ゼニゴケのゲノムデータベース (Marpolbase) から MpGGGT1, 2 の配列を入手し、研究室内サーバーに実装されている CasFinder および CasOT を用いてゲノム編集のための guide RNA 配列を選定した。CasFinder を用いてそれぞれの遺伝子における PAM 配列を選定し、CasOT を用いてオフターゲット効果が起こる可能性の低い配列を選定した。

DNA 合成によって得られた guide RNA 配列を含むプライマーをアニールさせ、*Bsa* I 配列を介したライゲーションにより pMpGE_En03 にサブクローニングした。シーケンス解析により配列に誤りがないことを確認した後に、LR 反応によってゲノム編集用ベクターである pMpGE010 に組み換えた (図 3.1)。なお、pMpGE010 には *ccdB* 配列が組み込まれているため、プラスミドを増殖させる際の大腸菌は BL21 株を用いた。また、使用したプライマーは表 3.5 に示した。

3.2.8 アグロバクテリウムへの形質転換

アグロバクテリウム (GV3101(pMp90)株) を YEP 寒天培地 (表 3.6) にストリークし、30°C で培養した。寒天培地上のシングルコロニーを YEP 液体培地 5 mL に植菌し、30°C で 16 時間程度培養した。培養したアグロバクテリウム菌液を 100 mL の YEP 液体培地に継代し、30°C で OD₆₀₀ の値が 0.3 程度になるまで培養した。培養したアグロバクテリウム菌液は 1,000 g, 10 分で遠心し、沈殿を 10 mM Tris-HCl (8.0) で 2 回洗浄した後に 1 mL の YEP 培地に懸濁した。この懸濁液をアグロバクテリウムコンピテントセルとし、以降の実験に用いた。

アグロバクテリウムの形質転換手法は freezing 法を採用した。アグロバクテリウムコンピテントセルを氷上で溶かし、形質転換するプラスミドを 1 µg 程度加え液体窒素に 5 分間浸した。その後、37°C の恒温槽に 25 分間浸してインキュベートし、YEP 液体培地を 1 mL 加えて 30°C で 2 時間回復培養した。その後、1,000 g, 5 分遠心して菌体を回収し、YEP 寒

天培地に全量撒いて 30°C で 2 日間培養した。

3.2.9 ゼニゴケの葉状体を用いた形質転換

ゼニゴケの葉状体を用いた形質転換方法は Kubota らの論文に拠った (Kubota *et al.*, 2013)。寒天培地上で無性芽から 2 週間程度生育させたゼニゴケの葉状体を、医療用メスを用いて 8 等分に切断した。葉状体の切片は 3 日間寒天培地上で生育させた。

抗生物質を含む YEP 寒天培地にアグロバクテリウムのグリセロールストックの一部をストリークし、30°C で培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを、スペクチノマイシンを含む YEP 液体培地に植菌して 30°C で 24 時間振盪培養した。培養したアグロバクテリウム菌液 1 mL を 100 μ M のアセトシリンゴンを含む 0M51C 液体培地 (表 3.7) 4 mL に継代し、30°C で 6 時間程度振盪培養した。

3 日間培養したゼニゴケ葉状体の切片を 100 μ M のアセトシリンゴンを含む 0M51C 液体培地 50 mL に入れ、培養していたアグロバクテリウム菌液 1 mL と共存培養させた。共存培養は 25°C、連続光 (60 μ E) の条件下で 3 日間振盪培養した。

共存培養したゼニゴケの葉状体を 50 mL チューブに移し、25 mL 程度の滅菌水で 5 回洗浄後、終濃度 1 mg/ mL のクラフォランを含む滅菌水に浸し、15 分間静置した。その後滅菌水を廃棄し、葉状体をクラフォラン (100 μ g/ mL) と抗生物質 (ハイグロマイシン 10 μ g/ mL) を含んだ寒天培地に移した。その後、3, 4 週間後に得られた薬剤耐性株を形質転換体候補とした。

3.2.10 ゼニゴケ葉状体からのゲノム抽出

ゼニゴケサンプルに抽出バッファー 100 μ L (表 3.8) を加え、ペッスルで破碎した後に、95 °C、10 分間加熱した。D.W. 400 μ l を加え、ボルテックスの後、17700 g、5 分間遠心した。この後、DNA をエタノール沈殿させ、100 μ L の D.W. に溶かした。溶かした DNA 1 μ L

を PCR テンプレートとして PCR を行った。使用したプライマーは表 3.9 に示した。なお、MpGGGT1 は Fwd プライマーで、MpGGGT2 は Rev プライマーでシーケンス解析を行った。

3.2.11 脂質抽出

2.2.7 と同様に実験を行った。

3.2.12 植物体の酸処理

植物体および葉状体のオリゴガラクト脂質合成活性化条件は、Barnes らの手法に拠った (Barnes *et al.*, 2016)。植物体を酢酸溶液(表 3.10)に浮かべ、23°C、連続光照射下 (60 μ E) で一定時間放置した(図 3.2)。一定時間後、植物体の表面をペーパータオルで拭き取り、液体窒素で凍結後、-80°Cで保存した。

3.2.13 ゼニゴケ葉状体の有機酸・無機酸培地での生育

植物体は 2 週間スクロース含有 1/2 Gamborg's 培地で生育させた後に、酢酸、ホルムアルデヒドまたは塩酸培地(表 3.11)に植え替えた (図 3.3) 。 6 時間静置した後、1/2 Gamborg's B5 培地に植え替え、生育の様子を経時的に観察した。なお、酸培地作成の際は D.W.(寒天)と、酸培地を等量混ぜることで作成した。

3.2.14 薄層クロマトグラフィーによる脂質の分画

3.2.11 の手法で抽出した総脂質は、薄層クロマトグラフィーによって分離し、以降の解析に用いた。TLC プレート (TLC Silica gel 60 (Merck Millipore)) に 1 次元 TLC の場合は 600 μ g, 2 次元 TLC の場合は 800 μ g の総脂質をスポットし、展開を行った。2 次元 TLC の展開では、1 次元目にクロロホルム/メタノール/7 N アンモニア水混合溶媒 (60/40/8, v/v/v

by vol.) を、2 次元目にクロロホルム/メタノール/酢酸/水混合溶媒 (85/20/10/4, v/v/v/v by vol.) を用いた。1 次元展開を行う際には、2 次元展開を行う溶媒のうち 2 次元目の展開に用いる混合溶媒を用いた。また、トリアシルグリセロール (TAG) の分画には、ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸 (80/20/2, v/v/v by vol.) を展開溶媒に用いた。糖脂質の呈色は、2.2.7 と同様に行った。貯蔵脂質(TAG)および総膜脂質の発色にはプリムリン溶液 (0.01% (w/v) プリムリン/80% (v/v) アセトン) を TLC に噴霧し、UV 照射によって可視化した。

3.2.15 脂質の定量分析

展開した脂質をブラックライト照射下でプリムリン発色を基に各脂質のスポットを確認し、各スポットを削り取り、内部標準としてヘンエイコ酸(C21:0 Sigma-Aldrich)を 0.1 μmol ずつを加え、塩酸メタノール(Sigma-Aldrich)で 85°C1 時間メタノリシスを行い、各脂質に含まれる脂肪酸をメチルエステル化した。各スポットに相当するシリカに対してヘキサン 500 μL で 3 回脂肪酸メチルエステルを抽出した。

各脂質から調製した脂肪酸メチルエステルの分析は島津製作所の Nexis GC-2030 で行った。

カラムは信和化工の ULBON HR-SS-10(0.25 mm $\times$ 25 m)、キャリアガスは太陽日酸の純窒素ガスを線速度 13.0 cm/ 秒に設定して流した。スプリット比はサンプル注入量 1 μL に対して 1:50 に設定した。気化室の温度は 250°Cに設定し、検出は FID(flame ionization detector)で行った。温度は 250°Cに、窒素ガス、水素、空気の流量はそれぞれ 24 mL/ min, 32 mL/ min, 200 mL/ min に設定した。各脂肪酸メチルエステル分子種の保持時間の指標として、毎回 Supelco 37 Component FAME Mix(Sigma-Aldrich)をサンプルの前に分析し、その結果を基に各サンプルの脂肪酸に該当するピークを同定した。

得られたクロマトグラムは Lab Solution で再解析し、各ピークの面積値を取得した。

3.2.16 ゼニゴケ葉状体の透過型電子顕微鏡観察

ゼニゴケ WT, *gggt1* 変異体を Suc 培地から通常培地に置いて 1 日の葉状体をコントロールとして(Normal), また酢酸培地に 6 時間置き, 通常培地に戻してから 1 日目の葉状体をサンプルとした(Acetate). なお, 葉状体の周辺部分は *gggt1* 変異体において 1 日目でも変化が見られるため, 電顕観察を行った際は葉状体の中央部分を用いた. サンプルは OFC (オープンファシリティセンター) 池田桂子氏に解析を依頼した.

3.3 結果

3.3.1 ゼニゴケのシロイヌナズナ SFR2 類似タンパク質

当研究室の堀孝一助教が作成した系統樹(図 3.4)により、ゼニゴケにはシロイヌナズナ SFR2 類似タンパク質が2つ存在することが分かった。そこで、シロイヌナズナ SFR2 と近いグループの方を MpGGGT1, 遠いグループの方を MpGGGT2 として解析を進めることにした。

3.3.2 ゼニゴケ MpGGGT1 および MpGGGT2 のベンサミアナタバコ葉での一過的発現とタンパク質発現解析

ゼニゴケ MpGGGT1, MpGGGT2 と GFP の融合タンパク質 (それぞれ, MpGGGT1-GFP, MpGGGT2-GFP と表記)を, ベンサミアナタバコ葉で一過的に発現させた。

感染葉で各導入タンパク質の発現を確認するため, GFP 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行ったところ, MpGGGT1-GFP については推定分子量サイズの位置にバンドが確認されたが (図 3.5) , MpGGGT2-GFP は推定分子量サイズの位置の他に, GFP 断片も確認されたことから, 発現させたタンパク質の一部が分解している可能性が示唆された。SFR2-GFP についても, SFR2-GFP の他に GFP のバンドが検出されたことから, MpGGGT2-GFP と同様, 一部は分解されていることが示唆された (図 3.5) 。

3.3.3 ベンサミアナタバコ葉において一過的に発現させた MpGGGT1-GFP, MpGGGT2-GFP の細胞内局在解析

MpGGGT1-GFP と MpGGGT2-GFP 発現葉を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。その際, 細胞内局在を比較するために, AtRbcs-RFP (シロイヌナズナ *rubisco* small subunit ; ストロマ局在) をそれぞれのタンパク質と共発現させた。また, コントロールとして既に葉緑体包膜局在であることが報告されている SFR2-GFP の発現葉も, 顕微鏡観察した。その結果,

MpGGGT1-GFP は SFR2-GFP と同様に、葉緑体包膜に局在していることが確認された(図 3.6)。しかしながら、MpGGGT2-GFP の蛍光は弱く、また細胞質に局在している傾向は若干観察されたが、これは GFP の蛍光である可能性が示唆された (図 3.6)。

3.3.4 MpGGGT1-GFP, MpGGGT2-GFP の脂質解析

酢酸処理を 1 時間行ったものと、何も行っていないものの、感染葉の脂質抽出を行った。各脂質は TLC で分画し、アンスロン硫酸法によって糖脂質を呈色した。すると SFR2-GFP 発現葉と同様、MpGGGT1-GFP 発現葉でも TGDG の合成が確認された (図 3.7)。しかし、酢酸処理を 1 時間行っても MpGGGT2-GFP 発現葉では TGDG の合成が確認されなかった (図 3.7)。

3.3.5 Mpggt1, Mpggt2 欠損変異体の作出と生育比較

MpGGGT1 については第 3 エキソンを標的に、MpGGGT2 については第 1 エキシオンを標的にゲノム編集を行い、それぞれの変異の入り方が異なる変異体を 3 ラインずつ作出した。MpGGGT1 変異は第 3 エキソン周辺に見られ (図 3.8 a)、また MpGGGT2 変異も第 1 エキシオン周辺に見られた (図 3.9)。翻訳産物としては *gggt2* 変異体に関しては SFR2 で予測されている活性ドメイン (Roston *et al.*, 2014) よりも N 末端側の塩基配列部分に終始コドンが入っており、*gggt1* 変異体に関しては、SFR2 活性ドメインで保存されているアミノ酸とは異なるアミノ酸に置換されていることを確認した (図 3.8 b)。

なお、WT, *gggt1* 変異体 (*gggt1-3, 1-7, 1-17*), *gggt2* 変異体 (*gggt2-17, 2-20, 2-21*) を通常生育条件下で 14 日間生育しても大きな生育の差は見られなかった (図 3.10)。

3.3.6 ゼニゴケ葉状体の酢酸処理と脂質解析

ゼニゴケ WT, *gggt1* 変異体, *gggt2* 変異体を酢酸処理後、脂質抽出を行い、TLC によって

脂質を分画した。分画した脂質はアンスロン硫酸法によって糖脂質を呈色させた (図 3.11, 12)。

未処理の場合では、ゼニゴケ WT, *gggt1* 変異体のいずれも TGDG は合成されなかった (図 3.11)。しかし、酢酸処理後、ゼニゴケ WT では TGDG の蓄積が処理時間 1 時間でも見られたが、*gggt1* 変異体では処理時間 6 時間でも検出されなかった (図 3.11)。一方で、*gggt2* 変異体では酢酸処理 3 時間、6 時間のいずれにおいても WT と同様に TGDG の蓄積が見られた (図 3.12)。これらの結果から、ゼニゴケで TGDG を合成するのは MpGGGT1 であることが明らかになった。

3.3.7 ゼニゴケ葉状体の酢酸培地への植え替えと通常培地へ戻した際の生育比較

ゼニゴケ WT, *gggt1* 変異体を Suc 培地で 2 週間生育させた後、酢酸培地へと移し、6 時間処理後に通常培地へと戻した際の生育比較を行った (図 3.13)。酢酸培地から通常培地へと戻した初日 (0 日目, Day 0) では WT と *gggt1* 変異体との間で大きな差は見られなかったが、3 日目 (Day 3) になると *gggt1* 変異体では葉状体の周辺が枯死し始めた (図 3.13)。さらに 5 日目 (Day 5) になると、野生型は枯死することなく生育している様子が見られたが、*gggt1* 変異体は葉状体の大部分が枯死した (図 3.13)。この結果から、酢酸ストレスを与えた際のゼニゴケの生育には MpGGGT1 活性、すなわち TGDG 合成が必須だということがわかった。

3.3.8 ゼニゴケ WT と *gggt1* 変異体の酢酸処理後の TAG 定量

これまでに、シロイヌナズナ *sfr2* 欠損変異体では野生型と比較して凍結後の TAG 含量が減少するという報告がある (Moellering *et al.*, 2010)。そこで、ゼニゴケでも同じことが起きているのかどうかを調べた。ゼニゴケ WT, *gggt1* 変異体を Suc 培地で 2 週間生育後、酢酸培地に 6 時間移し、サンプリングを行った。得られた葉状体から脂質を抽出し、TLC で

展開してトリアシルグリセロール (TAG) の蓄積について調べた。その結果、TLC 後のプリムリン染色したプレート上では、通常生育条件で酢酸無処理における、WT と *gggt1* 変異体の間で TAG 含量および TAG のスポットの様子に大きな差はみられなかった (図 3.14)。しかし、酢酸処理した場合は WT よりも *gggt1* 変異体の TAG 量は少ない傾向がみられた (図 3.14)。また、本実験条件においては、TAG の分子種 (含まれる脂肪酸の違い) によって、移動度に差が生じる。不飽和度の高い脂肪酸を多く含有する TAG は、展開溶媒中での移動度が低くなる。酢酸処理した場合は、特に不飽和度の高い脂肪酸を多く含む TAG が *gggt1* 変異体では WT よりも少ない傾向が見られた (図 3.14)。そこで、WT と *gggt1* の間で TAG の量や脂肪酸組成に違いがあるのかどうかを明らかにするために、ガスクロマトグラフィーによる解析を行った。その結果、WT と *gggt1* 変異体との間で Normal (Suc 培地から通常培地へ 6 時間移した) 条件下では、TAG 量に有意差は見られないが、Acetate (Suc 培地から酢酸培地に 6 時間移した) 条件下では WT の TAG 量は *gggt1* 変異体に比べて有意に高いことがわかった (図 3.15)。また、WT の TAG 量は酢酸処理により有意に増加したが、*gggt1* 変異体では、増加傾向ではあるが有意差は見られなかった。

さらに TAG の脂肪酸組成について詳細に解析を行ったところ、Normal 条件下では、WT、*gggt1* 共に 16:0 脂肪酸が TAG の主要構成脂肪酸であるが、Acetate 条件下では、WT、*gggt1* 共に 16:0 脂肪酸の割合が減少し、16:3, 18:2, 18:3 脂肪酸の割合の増加がみられた (図 3.16)。特に、Acetate 条件での 18:3 脂肪酸の割合は、*gggt1* と比べて WT で有意に高いことがわかった (図 3.16)。これまでに、シロイヌナズナ SFR2 は葉緑体包膜に局在する TGDG 合成酵素であるが、その糖転移反応の過程で生じる副産物として生じるジアシルグリセロール (DAG) は TAG に変換されるというモデルが提唱されている (Moellering and Benning, 2011)。今回、ゼニゴケ *gggt1* では酢酸処理、無処理に関わらず TGDG が合成されず、さらに酢酸処理時の TAG 蓄積も起こらないことがわかった。この結果は、シロイヌナズナで凍結ストレス時に起こる事象と一致しており、酢酸処理は凍結ストレスと同様なストレスで

あり、そのストレス耐性には葉緑体包膜における GGGT 活性化による MGDG の減少、TGDG および TAG の蓄積が寄与していることが示唆された。

3.3.9 ゼニゴケ WT と *gggt1* 変異体の塩酸またはホルムアルデヒド処理の影響

これまでに、酢酸処理したシロイヌナズナでは乾燥耐性が上昇するという報告があり、その要因の1つはGGGTの活性化によるものなのではないかと着想した (Kim *et al.*, 2017) . この耐性付与効果は、塩酸処理やホルムアルデヒド処理したシロイヌナズナでは見られなかった (Kim *et al.*, 2017). そこで、塩酸やホルムアルデヒド処理がゼニゴケの生育や TGDG 合成に影響を及ぼすかどうかを調べるため、酢酸処理と同様の実験を行った。ゼニゴケ WT, *gggt1* 変異体を Suc 培地で 2 週間育て、塩酸またはホルムアルデヒド培地へと移し、6 時間処理した後に通常培地へと戻し、経時的に生育を比較した(図 3.17, 18). 塩酸含有培地で処理した場合は、WT, *gggt1* 変異体のいずれについても処理後 0 日目 (Day 0) では表現型の変化はみられなかった。また、1 日目 (Day 1) 以降は枯死することなく生育している様子が見られ、それは 5 日 (Day 5) 後も同様だった (図 3.17). ホルムアミド含有培地で処理した場合も、塩酸の場合と同様に視覚的には大きな差が認められなかった (図 3.18). そこで、それぞれの条件下で処理した WT, *gggt1* 変異体の葉状体の脂質解析を行った。その結果、塩酸処理では WT も *gggt1* 変異体も TGDG の蓄積が見られないが、ホルムアルデヒド処理では WT のみ TGDG の蓄積が見られた (図 3.19). シロイヌナズナの乾燥ストレス耐性は酢酸処理では向上するが、塩酸、ホルムアルデヒド処理ではいずれも効果がないことから (Kim *et al.*, 2017), TGDG 合成の活性化と乾燥ストレス耐性には相関性がないか、またはシロイヌナズナとゼニゴケでは TGDG 合成活性化のメカニズムに違いがある可能性が示唆された。

3.3.10 酢酸処理後に通常培地で生育したゼニゴケ WT と *gggt1* 変異体の透過型電子顕微鏡

解析

シロイヌナズナでは、大きな極性頭部を持った TGDG が膜と膜の融合を忌避するために合成されるという仮説が提唱された (Moellering and Benning, 2011) . しかし、シロイヌナズナでは *sfr2* 変異体は凍結後枯死してしまうため、凍結ストレス時の細胞内膜構造の変化、特に葉緑体膜の構造変化を観察するのは難しい。一方、ゼニゴケでは *gggt1* 変異体を酢酸培地上で生育させ、通常培地に戻した際に枯死始めるのは 3 日後である。つまり、酢酸処理後に通常培地に移してから 1 日目か 2 日目の葉状体の細胞内の葉緑体の膜構造を透過型電子顕微鏡で観察すれば、酸性処理が葉緑体に与える影響が WT と *gggt1* 変異体で異なるのかどうか明らかにすることができると考えた。そこで、ゼニゴケ WT, *gggt1* 変異体を Suc 培地から通常培地に移して 1 日目 (Normal) の葉状体をコントロールとして観察し (N, 図 3.20), 酢酸培地に 6 時間置き、通常培地に戻してから 1 日目 (Acetate) の葉状体と比較した (A, 図 3.21)。その結果、特に *gggt1* 変異体に酢酸培地処理を 6 時間行くと、液胞の破壊、葉緑体の肥大、チラコイド膜のゆるみや分解などが多くみられた (図 3.21)。Acetate 条件下で WT においてもチラコイド膜が崩壊している様子が散見されたが (図 3.22), *gggt1* 変異体ではほとんどの葉緑体でダメージを受けている様子が観察された。この結果から、酢酸処理時の GGGT 活性化は、酢酸処理時に起こる葉緑体の破壊を抑制する働きがあることが示唆された。

3.4 考察

3.4.1 酢酸と塩酸が TGDG 合成に与える影響

これまでに、シロイヌナズナに酢酸を処理すると乾燥耐性が付与されるという結果が報告されている (Kim *et al.*, 2017). この効果は、塩酸やホルムアルデヒド処理では得られず、酢酸処理により JA (ジャスモン酸) を介したシグナル伝達が活性化された結果であることが示唆されている。しかし、シロイヌナズナ葉に酢酸処理した際には TGDG が蓄積すること、また、酢酸処理したゼニゴケでは TGDG 合成が活性化し、それが酢酸処理後の生育を可能にすることを考え合わせると、GGGT を介した葉緑体膜の脂質組成変化も乾燥ストレス耐性に寄与している可能性が高いと考えられる。シロイヌナズナの酢酸処理時の乾燥ストレス耐性に TGDG 合成が寄与しているかどうか、またその寄与の程度については、今後、シロイヌナズナの *sfr2* 変異体に酢酸処理した場合の乾燥ストレス耐性を野生株と比較することで明らかにできると考えている。またこれまでに、シロイヌナズナを用いた実験で、塩酸処理やホルムアルデヒド処理では TGDG が合成されないことが示されている (Barnes *et al.*, 2016). このことは、シロイヌナズナにおいて、塩酸処理では乾燥耐性が付与されないことから、TGDG 合成と乾燥ストレス耐性との相関性がある可能性を支持していると考えられる。

一方、本研究において、ゼニゴケ野生株を用いて同様の実験を行ったところ、塩酸培地上では TGDG を合成しないが、ホルムアルデヒド処理では TGDG の蓄積がみられた。これらの結果は、TGDG 合成の活性化メカニズムは同じ陸上植物であってもシロイヌナズナとゼニゴケで異なる可能性を示唆している。また、同じ酸であるにもかかわらず、酢酸と塩酸では TGDG 合成活性化に対する影響が異なる、また、塩酸処理は酢酸処理と異なり通常生育培地に移した後のゼニゴケ生育には影響を与えなかったことから、この結果が酸の種類に寄るものなのか、または有効な処理濃度が異なる (本実験では濃度を揃えている) ためなのかなどについては、今後明らかにしていく必要があると考えている。

3.4.2 ゼニゴケにおけるホルムアルデヒド処理後の TGDG 蓄積が生育に与える影響

ゼニゴケ WT では、ホルムアルデヒド処理後に TGDG の蓄積がみられたが、*gggt1* 変異体ではそれがみられなかった。TGDG 合成は葉緑体膜中の MGDG や DGDG を基質として消費し、その反応の際に中性脂質である TAG を蓄積するため、葉緑体を中心とした細胞内の膜構造に大きな影響を与える事象である。しかし、ホルムアルデヒド処理後に通常生育させたゼニゴケ WT、*gggt1* 変異体のいずれにおいても、その後の生育に大きな影響はみられなかった。本研究で行った透過型電子顕微鏡観察の結果から、酢酸培地に 6 時間置いてから通常培地に 1 日置いた WT の葉状体の細胞では、葉緑体にはダメージが少ない細胞も多々みられたが、一様に液胞膜が破れている様子がみられた。本研究では、ホルムアルデヒド処理した葉状体の電子顕微鏡観察は行っていないが、ホルムアルデヒド培地に 6 時間置いた WT では酢酸溶液に 1 時間浸した程度の TGDG しか合成されていなかったことから考えると、処理濃度や時間を検討することで、ホルムアルデヒド処理後の生育における TGDG 合成の影響も観察できた可能性がある。これまでに、シロイヌナズナにおいて GGGT は Mg^{2+} イオンにより活性化されることが知られている (Roston *et al.*, 2014)。液胞には H^{+} や Mg^{2+} などが多量に含まれており、液胞膜が破れ、内容物が漏出したことも GGGT 活性化に繋がったと考えられる。ホルムアルデヒド培地に 6 時間置いても液胞膜の損傷がそれほど大きくなかったため、このことが野生型と *gggt1* 変異体で処理後の生育に影響がなく、また、2 者の生育に差がなかったことを説明できるのではないかと考えている。

3.4.3 酢酸処理が葉緑体包膜に与える影響と TGDG 蓄積の生理的意義

酢酸処理 6 時間後の液胞の損傷は、WT と *gggt1* 変異体で同様にほぼすべての細胞で観察された。その一方、WT では葉緑体のチラコイド膜が崩壊しているものとグラナ構造を維持しているものが混在して観察されたにも関わらず、*gggt1* 変異体ではほとんどの細胞においてチラコイド膜が崩壊している様子が見られた。シロイヌナズナにおいて、TGDG 合成は葉

緑体包膜と他の生体膜間の接触を忌避しているというモデルが提唱されているが、WT と *gggt1* 変異体間で包膜の構造の違いまでは観察することはできなかった。

SFR2 は恒常的に発現しており、 Mg^{2+} などで活性化される翻訳後修飾されるタンパク質であり (Roston *et al.*, 2014)、本研究での顕微鏡観察により、酢酸処理により細胞内に流入してきた酢酸は液胞へと運ばれるが、酢酸を溜め込みすぎた液胞膜は損傷し、内在していた Mg^{2+} や H^{+} が大量に細胞質に流出している可能性が示唆された。また、葉緑体も崩壊している様子が見られたため、葉緑体の崩壊によって内在していた Mg^{2+} が細胞質へ流出していると示唆される。

また、急激な温度変化が液胞を崩壊させるという報告もあるため (Ohnishi *et al.*, 2015, Kadohama *et al.*, 2013)、酢酸ストレス条件下での液胞の崩壊は凍結を模しており、本研究で行った顕微鏡観察は凍結させたゼニゴケ葉状体を観察していることと同等であることが示唆された。

細胞質での Mg^{2+} イオン濃度の上昇に伴い、葉緑体外包膜に局在する GGGT1 がセンサーとして活性化され (Rocha *et al.*, 2018)、葉緑体包膜を安定化させている可能性が考えられる (Boudière *et al.*, 2014)。

光合成をする植物が繁栄するためには、光合成の場である葉緑体チラコイド膜が必要である。このようなストレス条件下で生き延びるためには、葉緑体包膜を安定化させてチラコイド膜を守る必要があったのかもしれない。ただ、TGDG 合成の基質は MGDG や DGDG であるため、MGDG や DGDG の含量にも影響が出ていて、そちらの方が重要な役割を担っている可能性もある。そのためには、酢酸処理後の MGDG や DGDG の含量を注意深く定量する必要があると考えている。

3.4.4 TGDG 合成にともなう TAG の蓄積について

GGGT 反応により、MGDG から他の MGDG へと糖が転移し、DGDG が合成される。さ

らに MGDG から他の DGDG へと糖を転移することによって TGDG が合成される。つまり、TGDG 1 分子を生成する際に、2 分子のジアシルグリセロール (DAG) が生じることになる。DAG や遊離脂肪酸の蓄積は、膜の破壊、酸化ストレス、さらには細胞死を引き起こす可能性があり、これらは総称して脂質毒性 (lipotoxicity) として知られている (Fan *et al.*, 2013, 2017; Garbarino *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2020; Petschnigg *et al.*, 2009 Yu *et al.*, 2022)。そのため、細胞内では生成した DAG を TAG へと即座に変換することで、脂質毒性を防いでいると考えられる。また、TAG は高エネルギー蓄積体であり、 β 酸化により必要な時にエネルギーを得ること、また部分分解することで得られる DAG から新たに膜脂質を生成できる。そのため、ストレス後の生育促進のための準備をしているとも考えられるが、本研究において酢酸処理後に蓄積した TAG については、その生成に寄与する酵素や細胞内での生成箇所についてはまだ明らかになっておらず、まず既知の TAG 合成酵素がこの反応ステップに寄与しているのかどうか、変異体を用いた解析を進める必要があると考えている。

3.4.5 陸上環境における酸性土壌の存在について

本研究では、植物の陸上化に際して起こる脱水ストレスの 1 つとして酸性ストレスに着目し、酸性生育環境がゼニゴケ生育に与える影響について解析をおこなった。陸上環境における酸性土壌は植物種によってはその生育に重要であり、例えばブルーベリーは酸性土壌を好んで生育する農作物としてよく知られている。また、園芸肥料としてよく利用される腐葉土は、落ち葉や枝などを発酵させたもので、pH6~7 の中性の資材であるが、ピートモス (peat moss) は、苔などの植物が腐植物質となって蓄積した泥炭 (でいたん) を乾燥させたもので、強い酸性を示すフミン酸 (腐植酸) を含有し、pH3~4 である。このことから考えると、植物の祖先が陸上に進出した頃にも枯死した植物によって形成された酸性土壌があつて、酸性土壌環境下でより生育範囲を広げて繁栄するためには GGGT を介した TGDG 合成が必須だったのではないかと、そのため、GGGT は種子植物からコケ植物まで広く

保存されているのではないかと考えている.

3.5 表および図

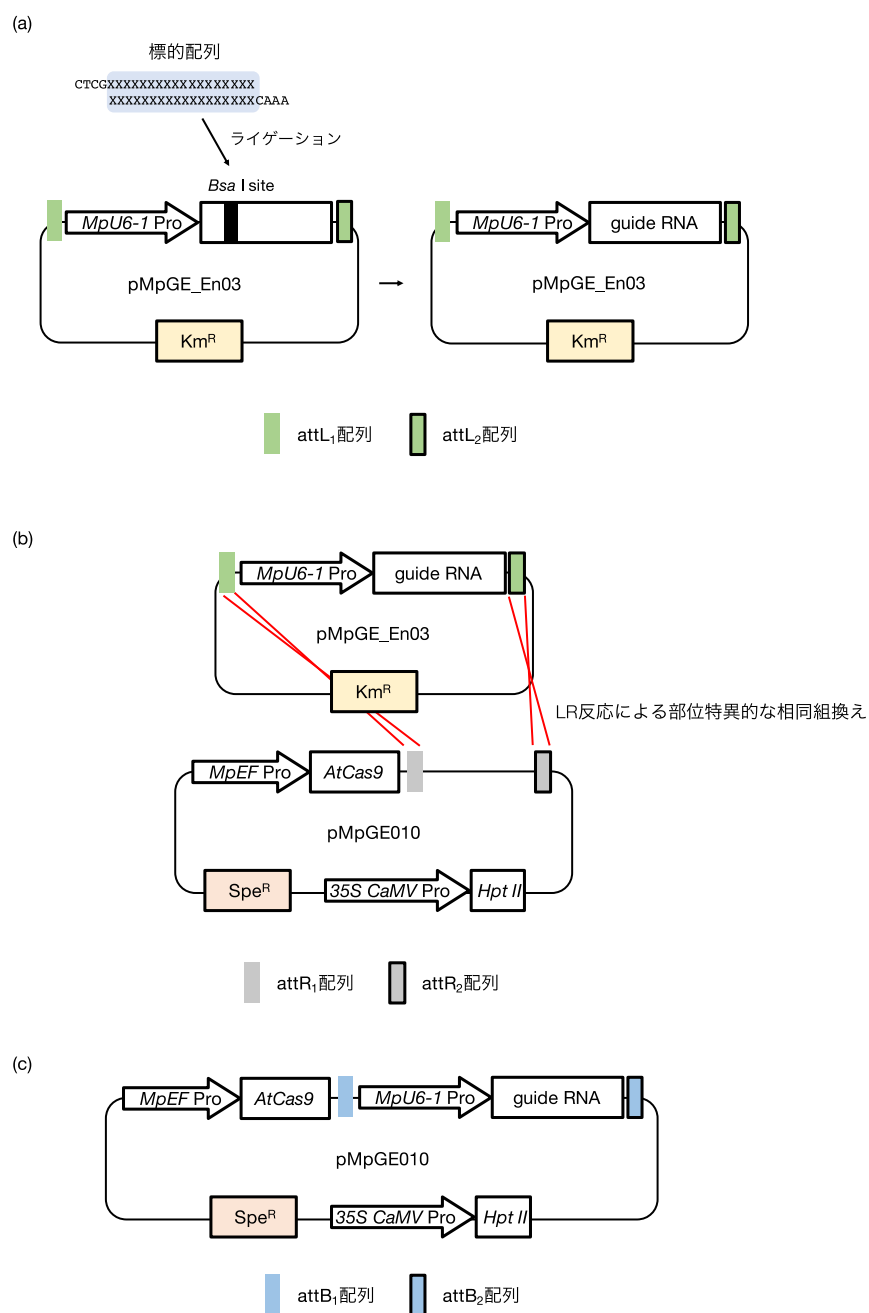


図 3.1 ゼニゴゲノム編集用バクターの作製

標的配列をライゲーションで pMpGE_En03 に挿入した。その後、LR 反応により pMpGE010 へと特異的に相同組み換えし、バクターを作製した。

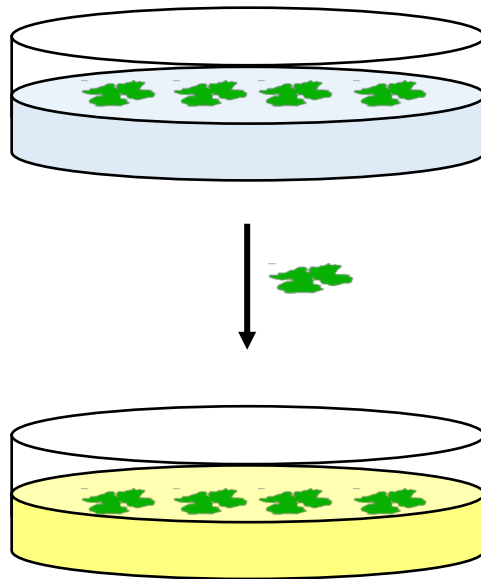


図 3.2 ゼニゴケの酢酸処理方法

2 週間培養したゼニゴケ WT, *gggt1* 変異体, *gggt2* 変異体を酢酸溶液に浸漬した.

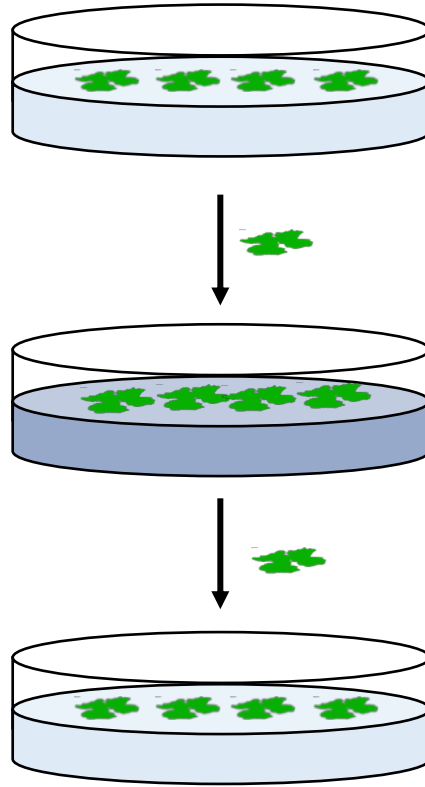


図 3.3 ゼニゴケの酸処理後の生育方法

Suc 培地で 2 週間生育したゼニゴケを酸培地へ 6 時間置き，通常培地へと戻した，戻した後で，表現型を観察した．

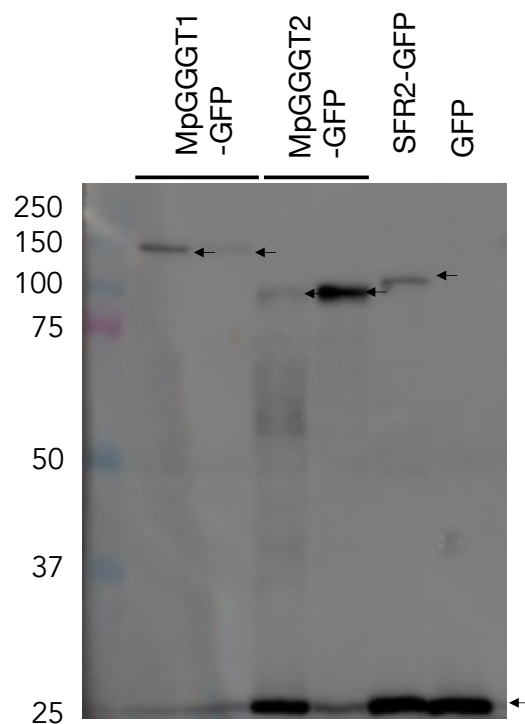


図 3.5 MpGGGT1-GFP, MpGGGT2-GFP, SFR2-GFP, GFP をそれぞれ一過的に発現させたベ
ンサミアナタバコ葉のウェスタンブロット解析

Anti-GFP 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。左側の数字はタンパク質の分子量を示す(kDa)。また、打ち込んだ葉は複数枚あり、各発現葉から抽出したタンパク質をレーン毎に流した。それぞれのタンパク質の推定分子量は, MpGGGT1-GFP = ~118 kDa, MpGGGT2-GFP = ~96 kDa, SFR2-GFP = ~98 kDa, GFP = ~27 kDa。上方の矢印は各推定分子量と合致するタンパク質バンドを, 下方の矢印は GFP に相当するバンドを示す。

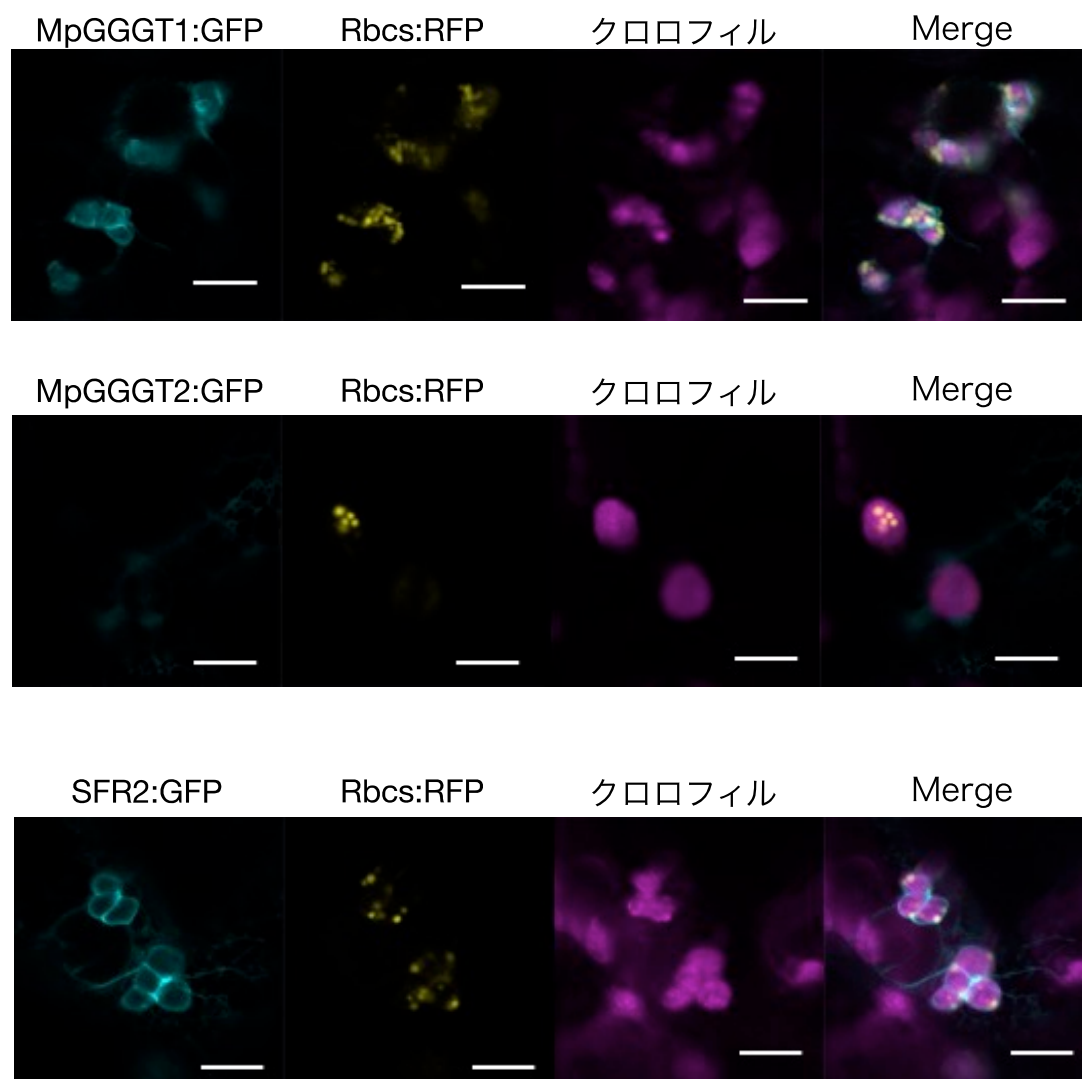


図 3.6 ベンサミアナタバコ葉を用いた MpGGGT の一過的発現と細胞内局在解析

GFP を融合させた MpGGGT1-GFP, MpGGGT2-GFP, SFR2-GFP の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡によって解析した。全て Rbcs-RFP (葉緑体ストロマ局在) と共発現させた。クロロフィル, クロロフィルの自家蛍光; Merge, GFP, RFP およびクロロフィル蛍光の重ね合わせ。 (Scale bars = 10 μ m).

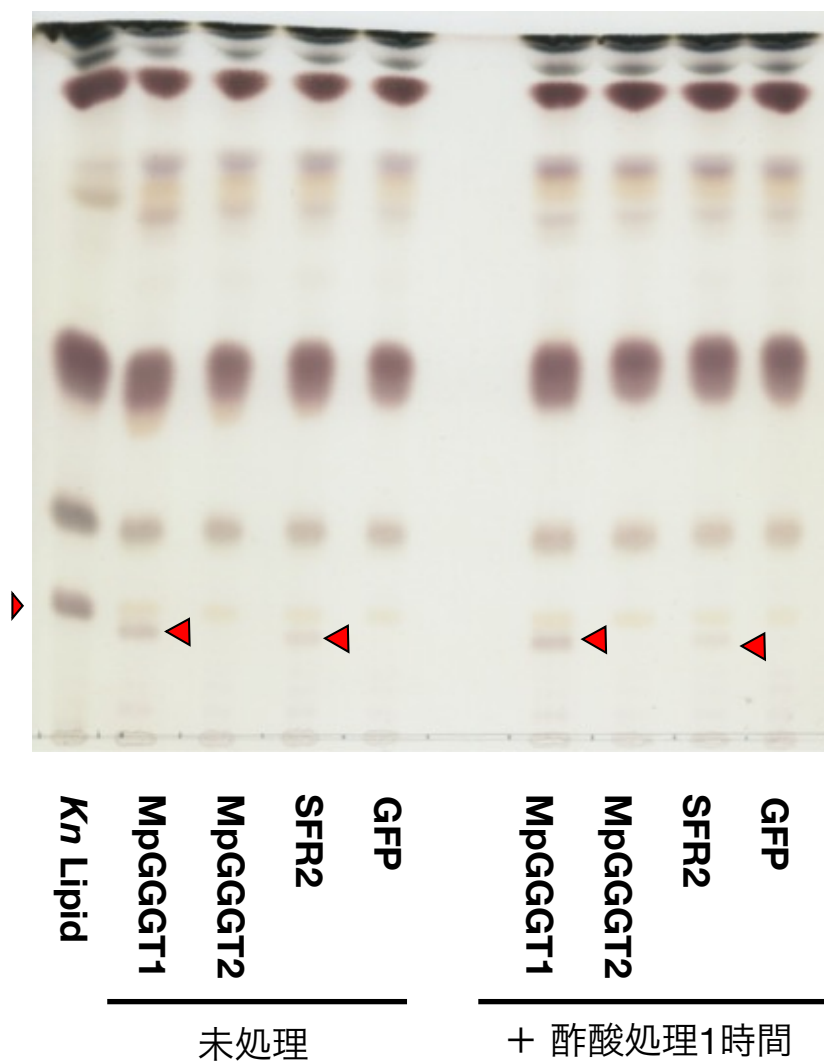


図 3.7 MpGGGT1-GFP および MpGGGT2-GFP を一過的に発現させたベンサミアナタバコ葉の脂質解析

酢酸処理を施した MpGGGT1-GFP, MpGGGT2-GFP, SFR2-GFP, GFP 発現葉の総脂質 600 μ g を一次元 TLC 展開した. Kn Lipid, クレブソルミディウム藻体の総脂質; MpGGGT1, MpGGGT1-GFP; MpGGGT2, MpGGGT2-GFP; SFR2, SFR2-GFP. 赤矢印は TGDG を示す.

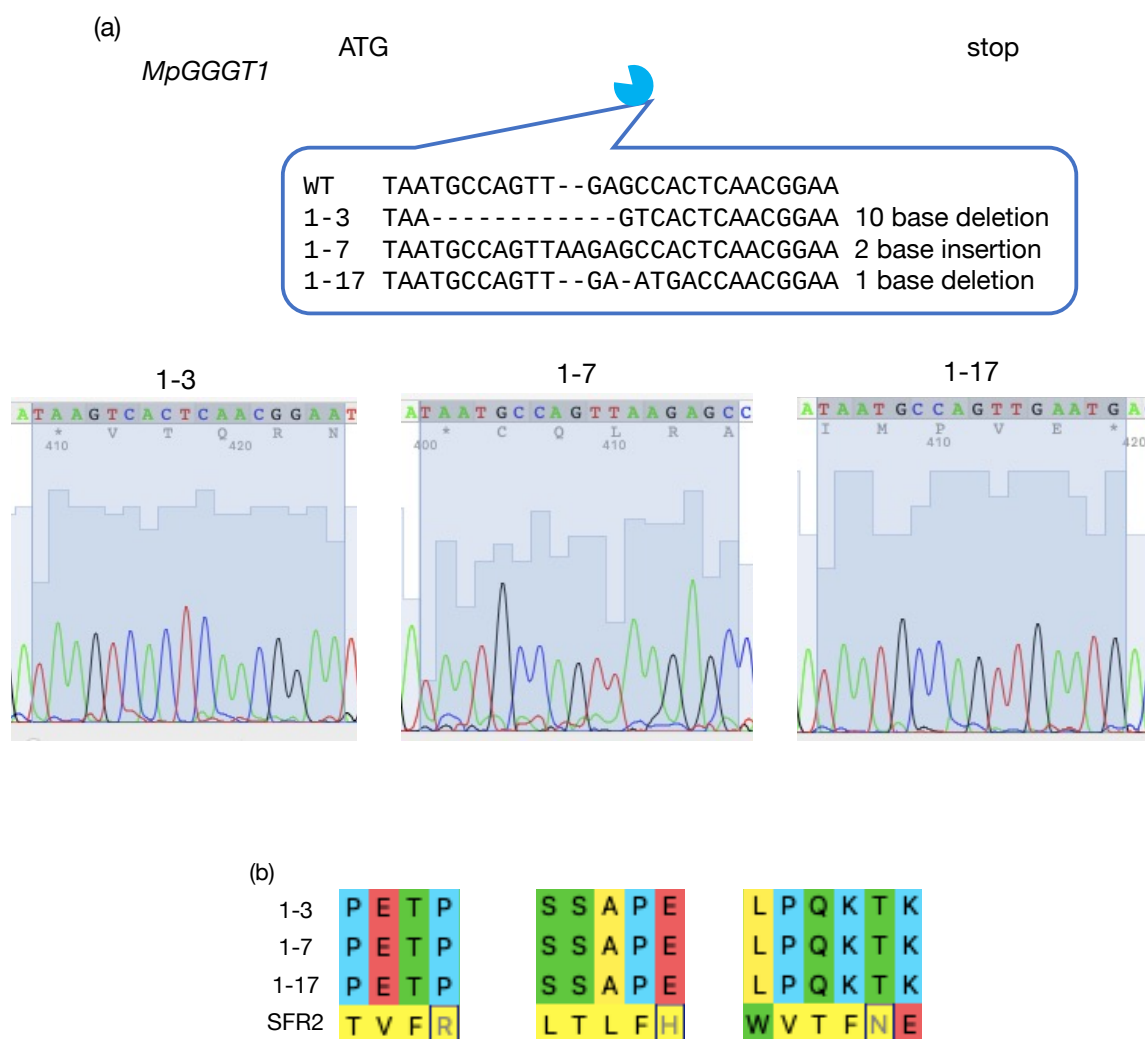


図 3.8 CRISPR-Cas9 による *MpGGGT1* のゲノム編集

(a) *MpGGGT1* は第 3 エキソンを標的に CRISPR-Cas9 系を介したゲノム編集を行った。塩基配列は野生株 (WT) と比較して変異が導入された箇所を表記。1-3, 1-7, 1-17, *MpGGGT1* 変異体 (*gggt1*)。シーケンス解析結果を下に示した。Fwd プライマーでシーケンス解析を行った。

(b) SFR2 で予測されている活性ドメインとは異なるアミノ酸になっていることを確認した。

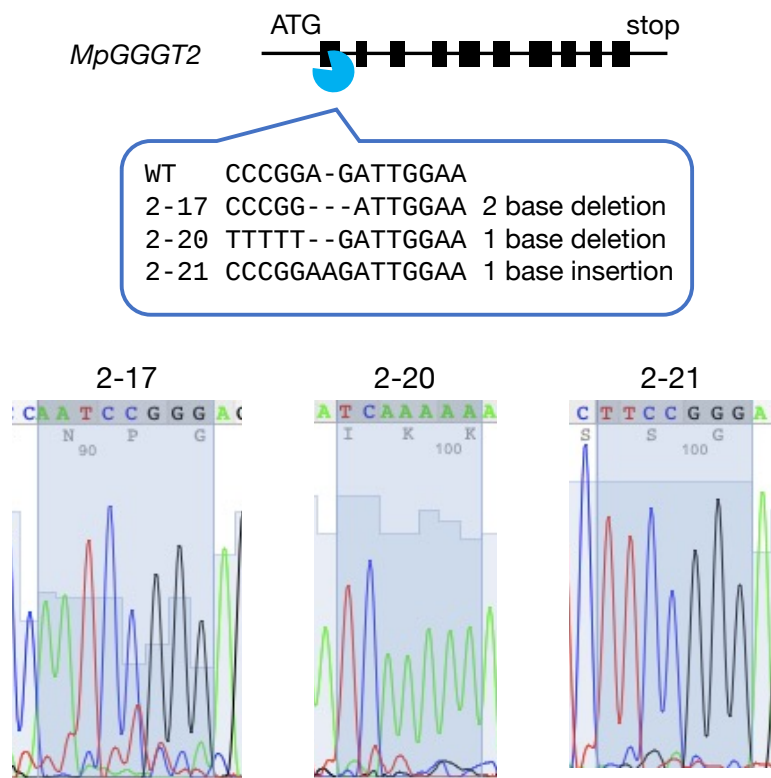


図 3.9 CRISPR-Cas9 による *MpGGGT2* のゲノム編集

MpGGGT2 は第 1 エキソンを標的にして CRISPR-Cas9 系を介したゲノム編集を行った。塩基配列は野生株 (WT) と比較して変異が導入された箇所を表記。2-17, 2-20, 2-21, *MpGGGT2* 変異体 (*gggt2*)。

シーケンス解析結果を下に示した。Rev プライマーでシーケンス解析を行った。

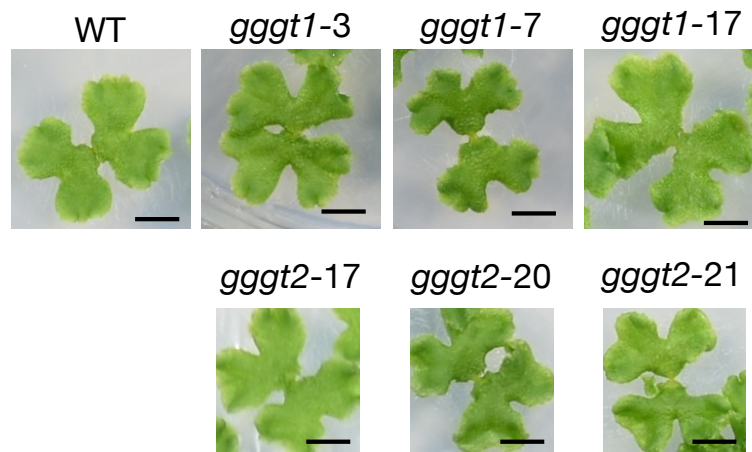


図 3.10 ゼニゴケ野生株 (WT) と *gggt1* 変異体および *gggt2* 変異体の表現型比較

WT と *gggt* 変異体は生育 14 日目で大きな変化は無かった (Scale bars = 1 cm).

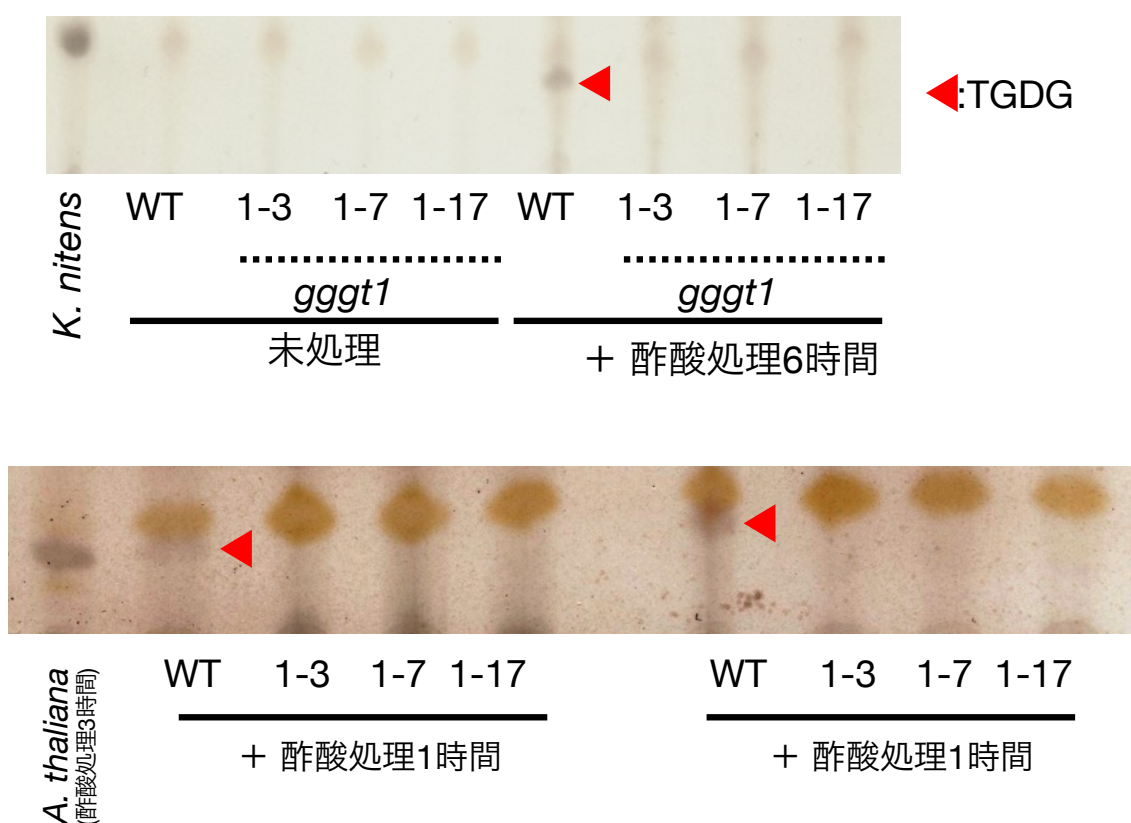


図 3.11 酢酸処理または未処理のゼニゴケ野生株 (WT) と *gggt1* 変異体の脂質解析

ゼニゴケ WT と *gggt1* 変異体において、酢酸処理または未処理 (処理時間 1, 6 時間) の葉状体総脂質 600 μg を一次元 TLC 展開した。赤矢印は TGDG を示す。

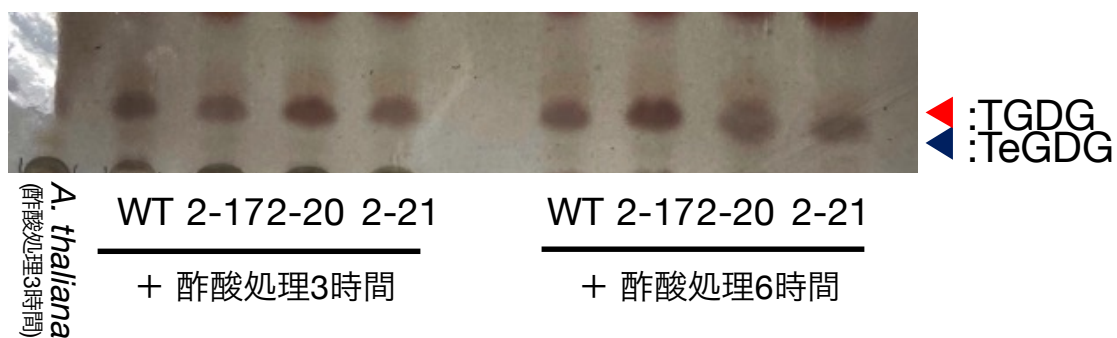


図 3.12 ゼニゴケ野生型と *gggt2* 変異体の脂質解析

ゼニゴケ WT と *gggt2* 変異体において酢酸処理 (処理時間 3, 6 時間) の葉状体総脂質 600 μ g を一次元 TLC 展開した。赤矢印は TGDG を示し、青矢印は TeGDG を示す。

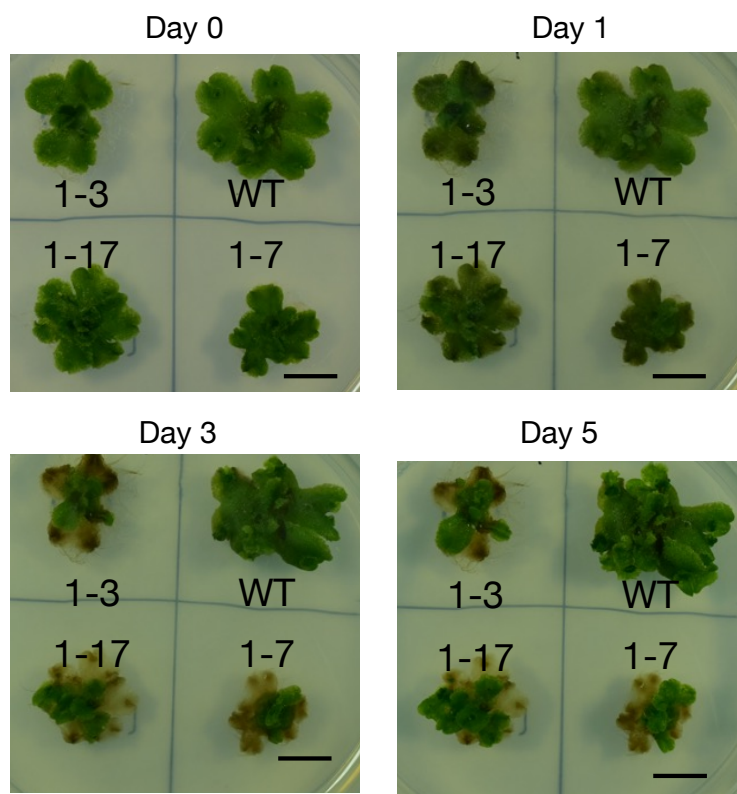


図 3.13 酢酸培地から通常培地に移した後のゼニゴケ WT および *gggt1* 変異体の表現型解析

酢酸培地から通常培地に移した直後 (Day 0), 移した後 1 日 (Day 1), 3 日 (Day 3), 5 日 (Day 5) 経過したゼニゴケの生育を観察した様子. 酢酸培地から戻した後のゼニゴケの生育を観察した様子 (Scale bars = 1 cm).

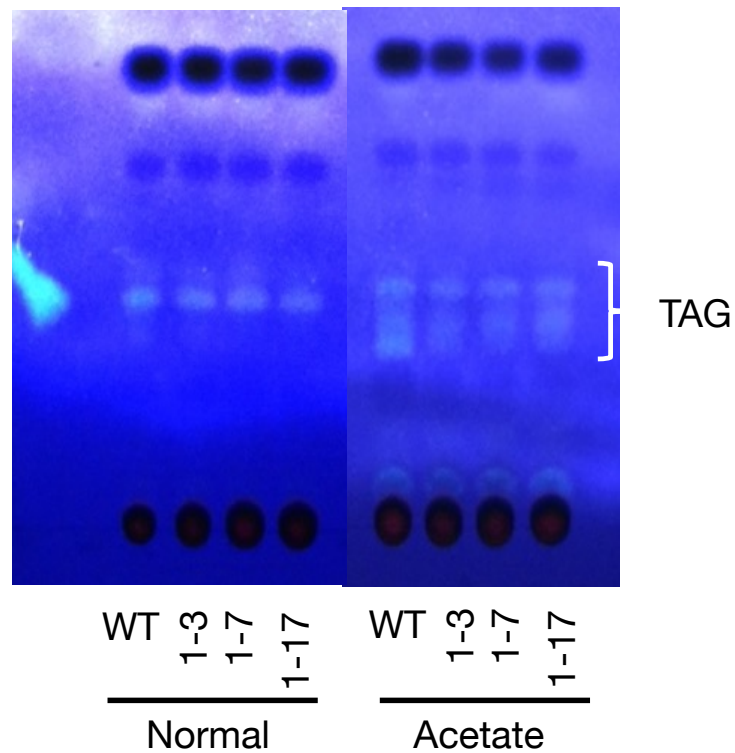


図 3.14 ゼニゴケ WT と *ggt1* 変異体の TAG 蓄積の様子 (TLC プレート)

各処理条件下のゼニゴケ野生型と *ggt1* 変異体の葉状体から抽出した総脂質 600 μ g を一次元 TLC 展開し、プリムリン染色後に UV 照射下で TLC プレートを撮影した。白い枠で示した部分が TAG。 Normal, 通常培地で 6 時間処理； Acetate, 酢酸培地で 6 時間処理。

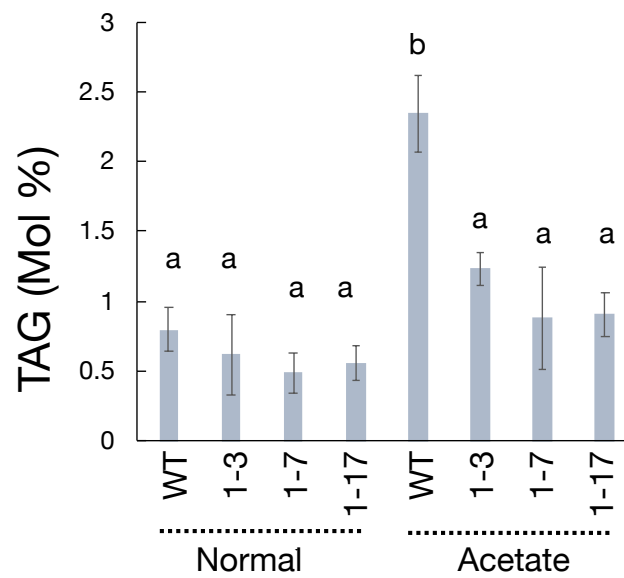


図 3.15 各処理条件下におけるゼニゴケ WT と *gggt1* 変異体の TAG 量

総脂肪酸中の TAG 由来脂肪酸の割合をモル%で示した。 N, 通常培地で 6 時間処理 ;
 A, 酢酸培地で 6 時間処理。 a, b 間で有意差が見られた ($P < 0.05$) (Tukey's test. $n = 3$).

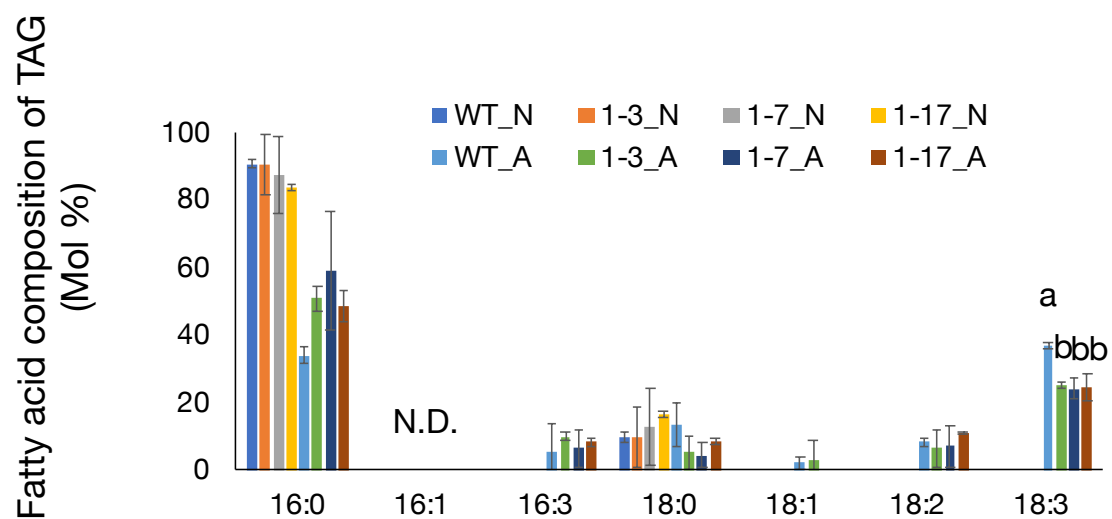


図 3.16 各処理条件下におけるゼニゴケ WT と *gggt1* 変異体の TAG の脂肪酸組成

TAG に含まれる総脂肪酸を 100%とした際の各脂肪酸種の割合をモル%で示した。N, 通常培地で 6 時間処理；A, 酢酸培地で 6 時間処理。a, b 間で有意差が見られた ($P < 0.05$) (Tukey's test. $n = 3$).

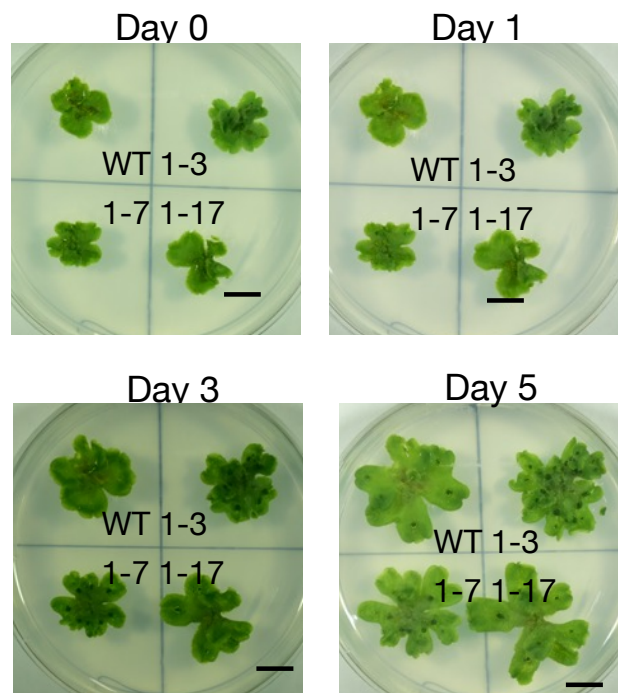


図 3.17 塩酸培地から通常培地に移した後のゼニゴケ WT および *ggt1* 変異体の表現型解析

塩酸培地から通常培地に移した直後 (Day 0), 移した後 1 日 (Day 1), 3 日 (Day 3), 5 日 (Day 5) 経過したゼニゴケの生育を観察した様子 (Scale bars = 1 cm).

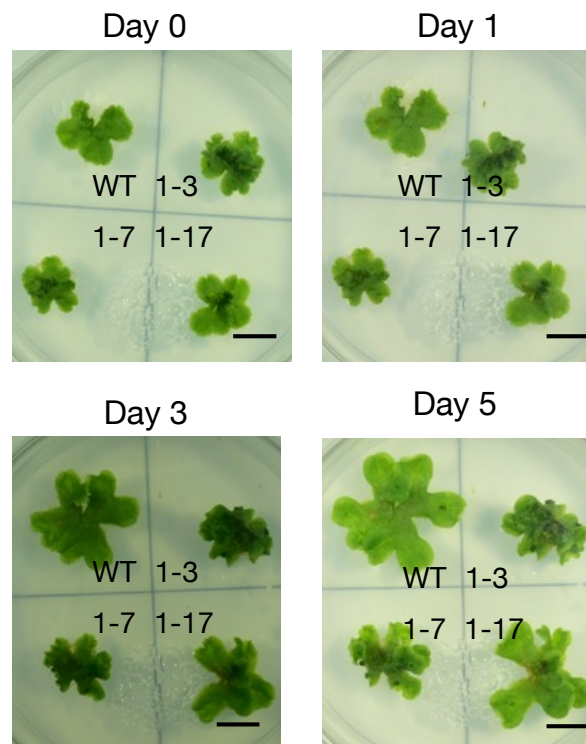


図 3.18 ホルムアルデヒド培地から通常培地に移した後のゼニゴケ WT および *gggt1* 変異体の表現型解析

ホルムアルデヒド培地から通常培地に移した直後 (Day 0), 移した後 1 日 (Day 1), 3 日 (Day 3), 5 日 (Day 5) 経過したゼニゴケの生育を観察した様子 (Scale bars = 1 cm).

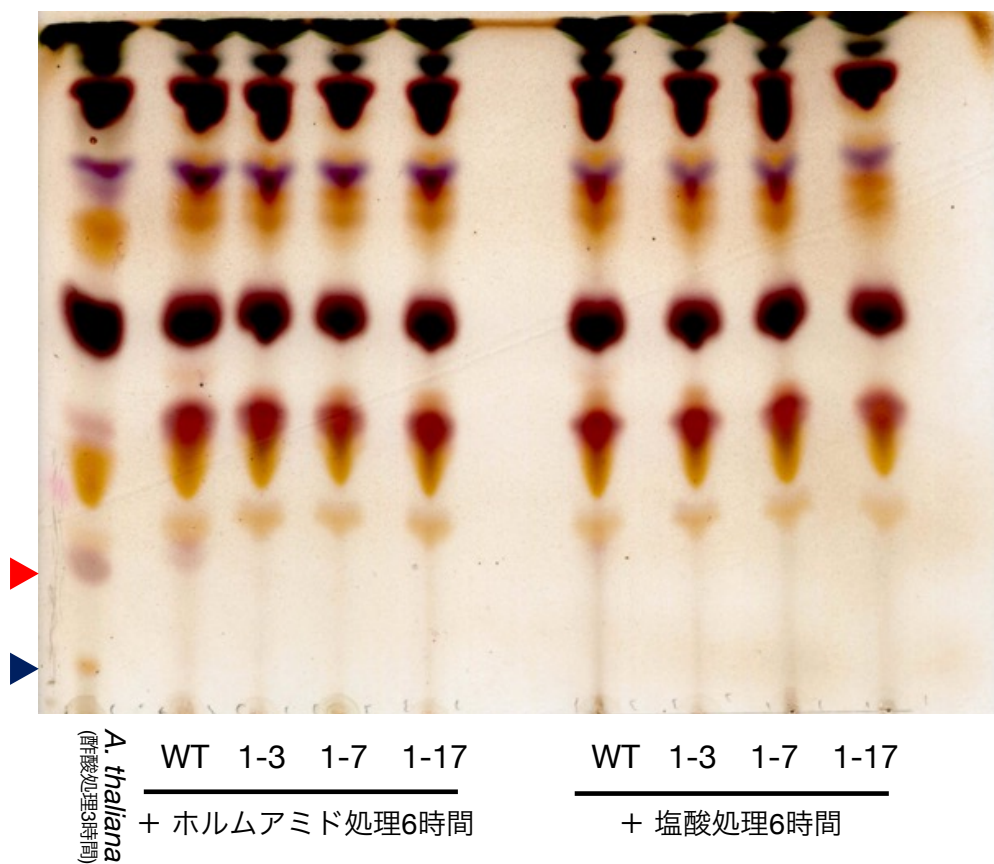
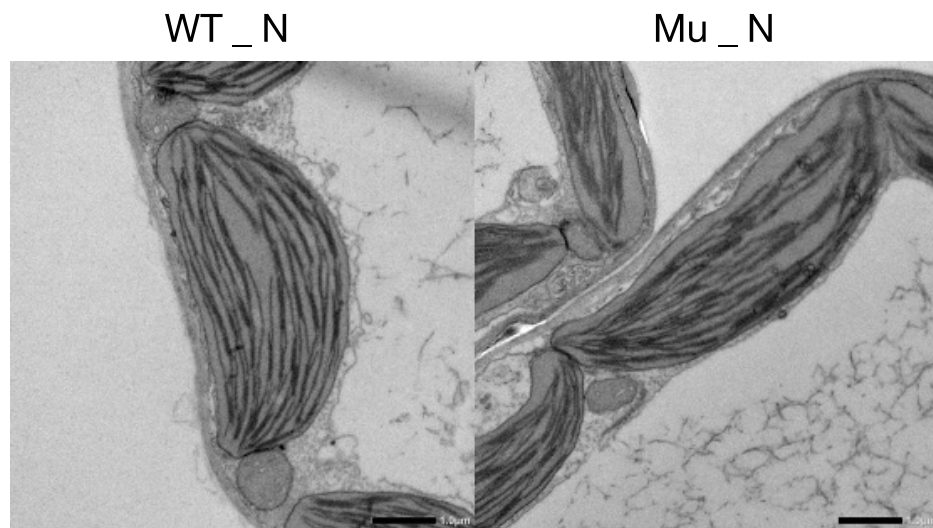


図 3.19 ホルムアルデヒド培地と塩酸培地での 6 時間処理後のゼニゴケ WT と *gggt1* 変異体の脂質解析

ホルムアルデヒドまたは塩酸処理を施したゼニゴケ WT と *gggt1* 変異体の葉状体から抽出した総脂質 600 μ g を一次元 TLC 展開，糖脂質を呈色させた。 *A. thaliana* 酢酸処理 3 時間後のシロイヌナズナ葉の脂質。赤矢印は TGDG を，青矢印は TeGDG を示す。



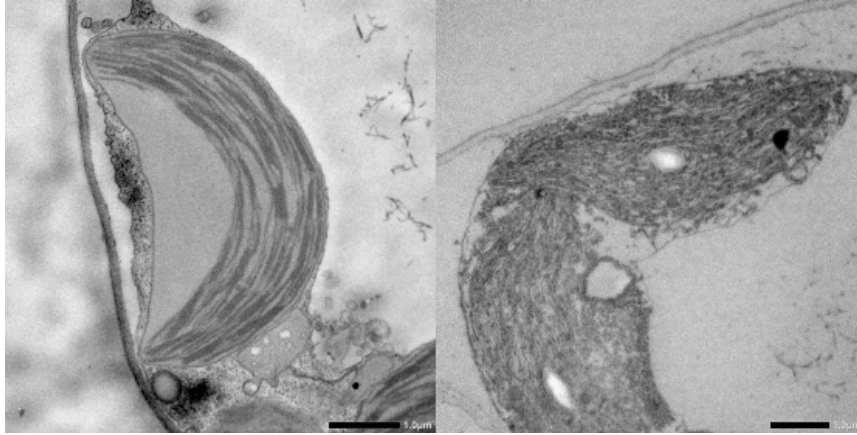
Scale Bar = 1 μ m

図 3.20 透過型電子顕微鏡によるゼニゴケ観察

Normal 条件での透過型電子顕微鏡観察.

WT_A

Mu_A



Scale Bar = 1 μ m

図 3.21 透過型電子顕微鏡によるゼニゴケ観察

Acetate 条件での透過型電子顕微鏡観察.

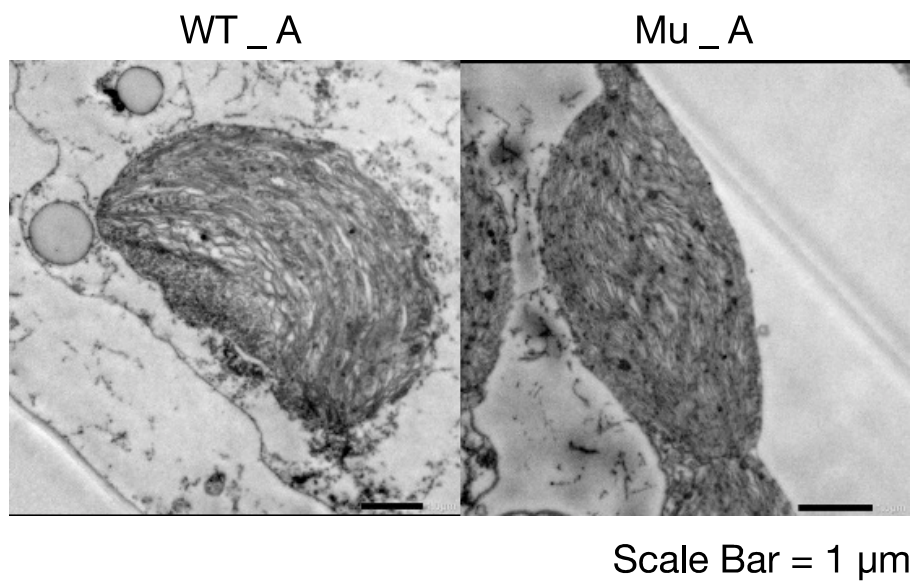


図 3.22 透過型電子顕微鏡によるゼニゴケ観察

Acetate 条件での透過型電子顕微鏡観察.

表 3.1

Gamborg's B5 寒天培地 fill up to 1 L with D.W. KOH で pH 5.5 に調整

試薬	容量
Gamborg's 粉末	1.65 g
MES	0.5 g
(スクロース)	10 g

Gamborg's 粉末 1.65 g

試薬名	容量
KNO_3	1250 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	125 mg
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	75 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	75 mg
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	67 mg
$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$	18.65 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	13.9 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5 mg
H_3BO_3	1.5 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg
KI	0.375 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.125 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0125 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0125 mg

表 3.2 SDS-EB バッファー

試薬	終濃度
SDS	0.8% (w/ v)
Tris-HCl, pH 7.5	25 mM
KCl	25 mM
MgCl ₂	25 mM

表 3.3 逆転写反応組成液

表 3.3-1 fill up to 6 μL with MilliQ 水

試薬	容量
Oligo dT ₁₆ (50 pmol/ μL)	0.5 μL
2.5 mM dNTP Mix	2 μL
総 RNA	≤ 1 μg

表 3.3-2

試薬	容量
0.1 M DTT	1 μL
RNase Inhibitor (RNase OUT)	0.5 μL
Super Script II	0.5 μL
5 $\times$ First Strand Buffer	2 μL

表 3.4 MpGGGT-GFP 作成に使用したプライマー

プライマー名	配列
MpGGGT1 Fwd	AAAAAGCAGGCTCAAAAATGGCGCCGTTTTTGTGCTG
MpGGGT1 Rev	AGAAAGCTGGGTTATCGGCTGCTGCTGTAGCTCTCT
MpGGGT2 Fwd	AAAAAGCAGGCTCAAAAATGGCGATTTCCCTTGAGGAAG
MpGGGT2 Rev	AGAAAGCTGGGTTATCAACTCCCCGGTCCTAAGTTC

表 3.5 ゼニゴケ *Mpggt1* および *Mpggt2* 変異体作成プライマー

プライマー名	配列
MpGGGT1 sgRNA Fwd 3rd exon 8	CTCGATTCCGTTGAGTGGCTCAAC
MpGGGT1 sgRNA Rev 3rd exon 8	AAACGTTGAGCCACTCAACGGAAT
MpGGGT2 sgRNA Fwd 1st exon	CTCGTGGAGACGGCTCCCGGAGAT
MpGGGT2 sgRNA Rev 1st exon	AAACATCTCCGGGAGCCGTCTCCA

表 3.6 YEP 培地 fill up to 200 mL with D.W.

試薬	容量
Yeast Extract	2 g
Bacto tryptone	2 g
NaCl	1 g
Bacto Agar (固体培地のみ)	3 g

表 3.7

0M51C 液体培地 fill up to 1 L with D.W.

試薬	容量
10×M51C ストック	100 mL
スクロース	20 g
Casamino Acids	1 g
L-glutamine	0.3 g

10×M51C ストック fill up to 1 L with D.W.

試薬	容量
KH_2PO_4	2.75 g
KNO_3	20 g
NH_4NO_3	4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3 g
EDTA•NaFe(III)	400 mg
Gamborg's B5 微量成分溶液	10 mL
Gamborg's B5 ビタミン混合溶液	10 mL
0.075% KI 溶液	10 mL

Gamborg's B5 微量成分溶液 fill up to 100 mL with D.W.

試薬	容量
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 g
H_3BO_3	300 mg

Gamborg's B5 ビタミン混合溶液 fill up to 100 mL with D.W.

試薬	容量
Myo-inositol	10 g
Nicotinic acid	100 mg
Pyridoxine-HCl	100 mg
Thiamine-HCl	1 g

表 3.8 ゲノム抽出バッファー fill up to 40 mL with D.W.

試薬	終濃度
Tris-HCl, pH 7.5	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0.5%

表 3.9 ゼニゴケ *Mpgggt1* および *Mpgggt2* 変異体ダイレクトシーケンス用プライマー

dir seq MpGGGT1 Fwd for 2nd 2	ATGGCTAGAGTTCGCTGAGC
Mpgggt1 dir seq rev 3rd exon	TTGTGATCTCGCGTTGTTCG
dir seq MpGGGT2 Fwd	GGCGATCTGTAAGGGTTTAG
dir seq MpGGGT2 Rev	ATGCAACGAACCTGATTTTG

表 3.10 酢酸溶液 1 M K_2HPO_4 で pH 4.0 に調整

試薬	終濃度
CH_3COOH	20 mM
MgCl_2	10 mM

表 3.11 無機酸・有機酸培地 fill up to 200 mL with D.W. 5N KOH で pH 5.5 に調整

試薬	容量/ 終濃度
Gamborg's B5 粉末	0.66 g
MES	0.2 g
HCl, HCHO, CH ₃ COOH	20 mM
MgCl ₂	10 mM

4. 総合考察

本研究では、世界中の高地や砂漠、都市部などあらゆる環境ストレス下で生育し、ゲノム解読が終了した車軸藻植物門 *Klebsormidium nitens* と陸上植物進化の基部で分岐し、こちらもゲノム解読が終了したゼニゴケ *Marchantia polymorpha* に着目し、その高度な環境適応能の高さの要因の一つがオリゴガラクト脂質にあるのではないかと推定した。

そこで、第2章では *K. nitens* のオリゴガラクト脂質合成能の機能解析を行った。 *K. nitens* は常に TGDG (オリゴガラクト脂質) を蓄積しており、これだけで脱水ストレス条件に適応できうる。実際に、クレブソルミディウムは実験室環境下だけではなく、野外のコンクリート壁にも存在している。クレブソルミディウムは細胞表面にワックスを含有しており、これが野外でも生育できる理由とされていたが (Kondo *et al.*, 2016) , もう1つ理由があるのかもしれない。つまり、TGDG を常時蓄積することで、あらゆる環境ストレスに対応できるのではないだろうか。

残念ながら、クレブソルミディウムでは形質転換法が確立されていないため、予測されている TGDG 合成酵素類似遺伝子を改変することはできなかった。そのため、ベンサミアナタバコを用いた一過的発現系やシロイヌナズナ *sfr2* 欠損変異体の相補実験を行ったが、ここでも期待される結果は得られなかった。

第2章でも述べたが、TGDG が蓄積しない、あるいは減少する因子 (生育条件、培地組成) を同定することで、クレブソルミディウムの GGGT 活性化因子を見つけることができるのではないかと考えている。なお、シロイヌナズナとベンサミアナタバコでは、GGGT の活性化処理 (条件) でのみ TGDG 蓄積が見られることから、クレブソルミディウムでは、種子植物とは異なる活性化因子によって GGGT 活性化が起こっていることが示唆された。今後は、クレブソルミディウムの形質転換系が確立され、形質転換体を用いた解析を通して新たな知見が得られることに期待したい。

第 3 章では陸上植物進化の基部で分岐したゼニゴケに焦点を当てて研究を行った。ゼニゴケも野外で生育し、よく見られるコケ植物の 1 種である。

ゼニゴケには CRISPR-Cas9 によるゲノム編集系が確立されているため、Mpgggt1 変異体と Mpgggt2 変異体を作成した。酸処理を施した結果、MpGGGT1 がゼニゴケにおいて主要な TGDG 合成酵素遺伝子であることがわかった。酸処理を施し、生育を経時的に観察したところ、TGDG を合成できない ggg1 変異体は枯死してしまうということがわかったが、塩酸やホルムアミドでも処理をしたが、生育には影響が出ないことがわかった。

第 3 章でも述べたが、陸上環境における酸性土壌は植物種によってはその生育に重要であり、例えばブルーベリーは酸性土壌を好んで生育する農作物としてよく知られている。また、園芸肥料としてよく利用される腐葉土は、落ち葉や枝などを発酵させたもので、pH 6～7 の中性の資材であるが、ピートモス (peat moss) は、苔などの植物が腐植物質となって蓄積した泥炭 (でいたん) を乾燥させたもので、強い酸性を示すフミン酸 (腐植酸) を含有し、pH 3～4 である。この結果から考えられることは、炭素が 2 つ以上ついたカルボン酸に対して植物はオリゴガラクト脂質を蓄積することによって耐性を示しているのではないかということである。

また、オリゴガラクト脂質を合成できたとしても、植物は陸上環境に多面的に存在するストレスに適応できなかったと考えられる。例えば、陸上環境に酸性土壌が広がっていたとすると、オリゴガラクト脂質を合成できない植物は枯死し、合成できる植物は生育できる。しかしながら、陸上環境には酸性ストレスだけではない、栄養欠乏ストレス、強光ストレスなど幅広いストレスが存在する。そのような環境下に置かれた植物はどのようにして生きていけばいいのか、と考えると膜脂質組成を柔軟に環境ストレスに応じた状態にすることが重要であると考えられる。植物が陸上に進出した際に、まず考えられる大きな環境ストレスの一つとして酸性ストレスがある。そこから繁栄していくためにはまずはオリゴガラクト脂質が合成できること、そして考えられるもう 1 つの方策はオリゴガラクト脂質を迅速に

分解し、MGDG や DGDG へと戻す-つまりオリゴガラクト脂質の分解反応-が必要だったのではないか。

SFR2 は β -グルコシルヒドロラーゼファミリーに属し、加水分解酵素ファミリーのタンパク質である。なぜ糖転移反応を示すのかはわからなかったが、近年報告された論文では、他のバクテリアなどの β -グルコシルヒドロラーゼと比較すると、loop A というループを SFR2 タンパク質は保持しており、このループの存在により、糖転移活性を持つことが明らかになっている (Roston *et al.*, 2014) 。系統樹の結果からも、MpGGGT1, MpGGGT2 は β -グルコシルヒドロラーゼファミリーに属するため、加水分解活性を持っていたもおかしくはない。本研究では調べられなかったが、MpGGGT2 がオリゴガラクト脂質の加水分解反応を担っている可能性があり、今後の解析が必要だと考えている。

参考文献

- Akter, K. Kato, M. Sato, Y. Kaneko, Y. Takezawa, D. Absciscic acid-induced rearrangement of intracellular structures associated with freezing and desiccation stress tolerance in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Journal of Plant Physiology*. **171**, 1334–1343 (2014).
- Andrews, C.J. How do plants survive ice? *Annals of Botany*. **78**, 529 – 536 (1996).
- Awai, K. Maréchal, E. Block, M.A. Brun, D. Masuda, T. Shimada, H. Takamiya, K. Ohta, H. Joyard, J. Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98**(19), 10960 – 10965 (2001).
- Awai, K. Thylakoid development and galactolipid synthesis in cyanobacteria. *Lipids in Plant and Algae Development*. **86** 85 – 101 (2016).
- Barnes, A. C. Benning, C. Roston, R. L. Chloroplast Membrane Remodeling during Freezing Stress Is Accompanied by Cytoplasmic Acidification Activating SENSITIVE TO FREEZING2. *Plant Physiology*. **171**, 2140–2149 (2016).
- Benning, C. Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **25**, 71 – 91 (2009).
- Benning, C. Ohta, H. Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. *Journal of Biological Chemistry*. **280**, 2397 – 2400 (2005).
- Besouw, V. A. Wintermans, J. F. G. M. Galactolipid formation in chloroplast envelopes I. evidence for two mechanisms in galactosylation. *Biochimica et Biophysica Acta*. **529**, 44 – 53 (1978).
- Bligh, E. Dyer, W. A. rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. **37**(8), 911 – 917 (1959).
- Block, M. A. Dorne, A. J. Joyard, J. Douce, R. Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *Journal of Biological Chemistry*. **258**, 13281 – 13286 (1983).

Boudière, L. Michaud, M. Petroutsos, D. Rébeillé, F. Falconet, D. Bastien, O. Roy, S. Finazzi, G. Rolland, N. Jouhet, J. Block, M. A. Maréchal, E. Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis, and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1837**, 470–480 (2014).

Bowman, J. L. Kohchi, T. Yamato, K.T. Jenkins, J. Shu, S. Ishizaki, K. Yamaoka, S. Nishihama, R. Nakamura, Y. Berger, F. Adam, C. Aki, S. S. Althoff, F. Araki, T. Arteaga-Vazquez, M. A. Balasubramanian, S. Barry, K. Bauer, D. Boehm, C. R. Briginshaw, L. Caballero-Perez, J. Catarino, B. Chen, F. Chiyoda, S. Chovatia, M. Davies, K.M. Delmans, M. Demura, T. Dierschke, T. Dolan, L. Dorantes-Acosta, A.E. Eklund, D.M. Florent, S.N. Flores-Sandoval, E. Fujiyama, A. Fukuzawa, H. Galik, B. Grimanelli, D. Grimwood, J. Grossniklaus, U. Hamada, T. Haseloff, J. Hetherington, A.J. Higo, A. Hirakawa, Y. Hundley, H. N. Ikeda, Y. Inoue, K. Inoue, S. Ishida, S. Jia, Q. Kakita, M. Kanazawa, T. Kawai, Y. Kawashima, T. Kennedy, M. Kinose, K. Kinoshita, T. Kohara, Y. Koide, E. Komatsu, K. Kopischke, S. Kubo, M. Kyozuka, J. Lagercrantz, U. Lin, Shuh-Shun. Lindquist, E. Lipzen, A.M. Lu, Chia-Wei, De Luna, E. Martienssen, R. A. Minamino, N. Mizutani, M. Mizutani, M. Mochizuki, N. Monte, I. Mosher, R. Nagasaki, H. Nakagami, H. Naramoto, S. Nishitani, K. Ohtani, M. Okamoto, T. Okumura, M. Phillips, J. Pollak, B. Reinders, A. Rövekamp, M. Sano, R. Sawa, S. Schmid, M. W. Shirakawa, M. Solano, R. Spunde, A. Suetsugu, N. Sugano, S. Sugiyama, A. Sun, R. Suzuki, Y. Takenaka, M. Takezawa, D. Tomogane, H. Tsuzuki, M. Ueda, T. Umeda, M. Ward, J. M. Watanabe, Y. Yazaki, K. Yokoyama, R. Yoshitake, Y. Yotsui, I. Zachgo, S. Schmutz, J. Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell*. **171**, 287–304 (2017).

Carter, H. E. McCluer, R. H, Slifer, E. D. Lipids of wheat flour. I. Characterization of galactosylglycerol components. *Journal of the American Chemical Society*. **78**, 3735–3738 (1956).

Douce, R. Site of biosynthesis of galactolipids in spinach chloroplasts. *Science*. **183**, 852–853 (1974).

Dörmann, P. Balbo, I. Benning, C. Arabidopsis Galactolipid Biosynthesis and Lipid Trafficking Mediated by DGD1. *Science*. **284**, 2181–2184 (1999).

Dörmann, P. Benning, C. Galactolipids rule in seed plants. *Trends in Plant Science*. **3**, 112–118 (2002).

Dörmann, P. Hoffmann-Benning, S. Balbo, I. Benning, C. Isolation and characterization of an Arabidopsis mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell*. **11**, 1801 – 1810 (1995).

Fan, J. Yan, C. Xu, C. Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase-mediated triacylglycerol biosynthesis is crucial for protection against fatty acid-induced cell death in growing tissues of Arabidopsis. *Plant Journal*. **76**, 930 – 942 (2013).

Fan, J. Yu, L. Xu, C. A central role for triacylglycerol in membrane lipid breakdown, fatty acid beta-oxidation, and plant survival under extended darkness. *Plant Physiology*. **174**, 1517 – 1530 (2017).

Fourrier, N. Bédard, J. Lopez-Juez, E. Barbrook, A. Bowyer, J. Jarvis, P. Warren, G. Thorlby, G. A role for *SENSITIVE TO FREEZING2* in protecting chloroplasts against freeze-induced damage in Arabidopsis. *Plant Journal*. **55**(5), 734 – 745 (2008).

Froehlich, J. E, Benning, C, Dörmann, P. The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. **276**, 31806 – 31812 (2001).

Fujii, S. Kobayashi, K. Nakamura, Y. Wada, H. Inducible knockdown of *MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE1* reveals roles of galactolipids in organelle differentiation in Arabidopsis cotyledons. *Plant Physiology*. **166**(3), 1436 – 1449 (2014).

Garbarino, J. Padamsee, M. Wilcox, L. Oelkers, P. M. D'Ambrosio, D. Ruggles, K. V. Sterol and diacylglycerol acyltransferase deficiency triggers fatty acid-mediated cell death. *Journal of Biological Chemistry*. **284**, 30994 – 31005 (2009).

Gasulla, F. Vom Dorp, K. Dombrink, I. Zähringer, U. Gisch, N. Dörmann, P. Bartels, D. The role of lipid metabolism in the acquisition of desiccation tolerance in *Craterostigma plantagineum*: a comparative approach. *Plant Journal*. **75**, 726 – 741 (2013).

Ghosh, T. K. Tompa, N. H. Rahman, Md. M. Mohi-Ud-Din, M. Al-Meraj, S. M. Z. Biswas, M. Mostofa, M. G. Acclimation of liverwort *Marchantia polymorpha* to physiological drought reveals important roles of antioxidant enzymes, proline and abscisic acid in land plant adaptation to osmotic stress. *PeerJ*. **9**, e12419 (2021).

Gray, C. G. Lasiter, A. D. Leblond, J. D. Mono- and digalactosyldiacylglycerol composition of dinoflagellates. I. Peridinin-containing taxa. *European Journal Phycology*. **44**, 191 – 197 (2009).

Gray, C. G. Lasiter, A. D. Leblond, J. D. Mono- and digalactosyldiacylglycerol composition of dinoflagellates. III. Four cold-adapted, peridinin-containing taxa and the presence of trigalactosyldiacylglycerol as an additional glycolipid. *European Journal Phycology* **44**, 439 – 445 (2009).

Graça, A. T. Hall, M. Persson, K. Schröder, W. P. High-resolution model of Arabidopsis Photosystem II reveals the structural consequences of digitonin-extraction. *Scientific Reports*. **11**, 15534 (2021).

Hieber, A. D. Kawabata, O. Yamamoto, H. Y. Significance of the lipid phase in the dynamics and functions of the xanthophyll cycle as revealed by PsbS overexpression in tobacco and in vitro de epoxidation in monogalactosyldiacylglycerol micelles. *Plant and Cell Physiology*. **45** , 92 – 102 (2004).

Holzinger, A. Becker, B. Desiccation tolerance in the streptophyte green alga *Klebsormidium*: The role of phytohormones. *Communicative and Integrative Biology*. **8**:4 (2015).

Hori, K. Maruyama, F. Fujisawa, T. Togashi, T. Yamamoto, N. Seo, M. Sato, S. Yamada, T. Mori, H. Tajima, N. Moriyama, T. Ikeuchi, M. Watanabe, M. Wada, H. Kobayashi, K. Saito, M. Masuda, T. Sasaki-Sekimoto, Y. Mashiguchi, K. Awai, K. Shimojima, M. Masuda, S. Iwai, M. Nobusawa, T. Narise, T. Kondo, S. Saito, H. Sato, R. Murakawa, M. Ihara, Y. Oshima-Yamada, Y. Ohtaka, K. Satoh, M. Sonobe, K. Ishii, M. Ohtani, R. Kanamori-Sato, M. Honoki, R. Miyazaki, D. Mochizuki, H. Umetsu, J. Higashi, K. Shibata, D. Kamiya, Y. Sato, N. Nakamura, Y. Tabata, S. Ida, S. Kurokawa, K. Ohta, H. *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature Communications*. **5**, 3978 (2014).

Hori, K. Nobusawa, T. Watanabe, T. Madoka, Y. Suzuki, H. Shibata, D. Shimojima, M. Ohta,

H. Tangled evolutionary processes with commonality and diversity in plastidial glycolipid synthesis in photosynthetic organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. **9**, 1294–1308 (2016).

Härtel, H. Dörmann, P. Benning, C. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**, 10649–10654 (2000).

Ishizaki, K. Chiyoda, S. Yamato, K. T. Kohchi, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. *Plant and Cell Physiology*. **49**, 1084–1091 (2008).

Jahns, P. Latowski, D. Strzalka, K. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica et biophysica acta*. **1787**, 3–14 (2009).

Kadohama, N. Goh, T. Ohnishi, M. Fukaki, H. Mimura, T. Suzuki, Y. Sudden Collapse of Vacuoles in *Saintpaulia* sp. Palisade Cells Induced by a Rapid Temperature Decrease. *Plos One*. **8**(2), e57259

Kelly, A. A. Dörmann, P. DGD2, an arabidopsis gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. *Journal of Biological Chemistry*. **277**(2), 1166–1173 (2002).

Kelly, A. A. Froehlich, J. E. Dörmann, P. Disruption of the Two Digalactosyldiacylglycerol Synthase Genes *DGD1* and *DGD2* in *Arabidopsis* Reveals the Existence of an Additional Enzyme of Galactolipid Synthesis. *Plant Cell*. **15**, 2694–2706 (2003).

Kenrick, P. Crane, P. R. The origin and early evolution of plants on land. *Nature*. **389**, 33–39 (1997).

Kim, Jong-Myong. To, T. K. Matsui, A. Tanoi, K. Kobayashi, N. I. Matsuda, F. Habu, Y. Ogawa, D. Sakamoto, T. Matsunaga, S. Bashir, K. Rasheed, S. Ando, M. Takeda, H. Kawaura, K. Kusano, M. Fukushima, A. Endo, T. A. Kuromori, T. Ishida, J. Morosawa, T. Tanaka, M. Torii, C. Takebayashi, Y. Sakakibara, H. Ogihara, Y. Saito, K. Shinozaki, K. Devoto, A. Seki, M. Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. *Nature Plants*. **3**, 17097 (2017).

Kobayashi, K. Kondo, M. Fukuda, H. Nishimura, M. Ohta, H. Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**(43), 17216 – 17221 (2007).

Kobayashi, K. Awai, K. Nakamura, M. Nagatani, A. Masuda, T. Ohta, H. Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation. *Plant Journal*. **57**, 322 – 331 (2009).

Kojima, M. Seki, K. Ohnishi, M. Ito, S. Fujino, Y. Structure of novel glyceroglycolipids in adzuki bean (*Vigna angularis*) seeds. *Biochemistry and cell biology*. **68**, 59 – 64 (1990).

Kondo, S. Hori, K. Sasaki-Sekimoto, Y. Kobayashi, A. Kato, T. Yuno-Ohta, N. Nobusawa, T. Ohtaka, K. Shimojima, M. Ohta, H. Primitive Extracellular Lipid Components on the Surface of the Charophytic Alga *Klebsormidium flaccidum* and Their Possible Biosynthetic Pathways as Deduced from the Genome Sequence. *Front Plant Sci*. **7**, 952 (2016).

Kubota, A. Ishizaki, K. Hosaka, M. Kohchi, T. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **77**, 167 – 172 (2013).

Kurdjian, A. Guern, J. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. **40**, 271 – 303 (1989).

Leliaert, F. Smith, D. R. Moreau, H. Herron, M. D. Verbruggen, H. Delwiche, C. F. Oliver. De Clerck. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **31**(1), 1 – 46 (2012).

Lewis, L. A. and McCourt, R. M. Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany*. **91**(10), 1535 – 1556 (2004).

Lu, J. Xu, Y. Wang, J. Singer, S. D. Chen, G. The role of triacyl- glycerol in plant stress response. *Plants*. **9**, 472 (2020).

Makshakova, O. Breton, C. Perez, S. Unraveling the complex enzymatic machinery making a key galactolipid in chloroplast membrane: a multiscale computer simulation. *Scientific Reports*. **10**, 13514 (2020).

Marschner, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. *Academic Press*, London, San Diego (1995).

Maréchal, E. Block, M. A. Joyard, J. Douce, R. Kinetic properties of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. *Journal of Biological Chemistry*. **269**, 5788 – 5798 (1994).

Miège, C. Maréchal, E. Shimojima, M. Awai, K. Block, M. A. Ohta, H. Takamiya, K. Douce, R. Joyard, J. Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *European journal of molecular biology and biochemistry*. **265**, 990 – 1001 (1999).

Moellering, E. R. Benning, C. Galactoglycerolipid metabolism under stress: a time for remodeling. *Trends in Plant Science*. **16**(2), 98 – 107 (2011).

Moellering, E. R. Muthan, B. Benning, C. Freezing tolerance in plants requires lipid remodelling at the outer chloroplast membrane. *Science*. **330**, 226 – 228 (2010).

Nagao, M. Matsui, K. Uemura, M. *Klebsormidium flaccidum*, a charophycean green alga, exhibits cold acclimation that is closely associated with compatible solute accumulation and ultrastructural changes. *Plant Cell and Environment*. **31**(6), 872 – 885 (2008).

Neufeld, E. F. Hall, C. W. Formation of galactolipids by chloroplasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **14**, 503 – 508 (1964).

Nishiyama, T. Hiwatashi, Y. Sakakibara, I. Kato, M. Hasebe, M. Tagged mutagenesis and gene-trap in the moss, *Physcomitrella patens* by shuttle mutagenesis. *DNA Research*. **7**(1), 9 – 17 (2000).

Ohnishi, M. Kadohama, N. Suzuki, Y. Kajiyama, T. Shichijo, C. Ishizaki, K. Fukaki, H. Iida, H. Kambara, H. Mimura, T. Involvement of Ca²⁺ in Vacuole Degradation Caused by a Rapid Temperature Decrease in *Saintpaulia Palisade* Cells: A Case of Gene Expression Analysis in a Specialized Small Tissue. *Plant and Cell Physiology*. **56**(7), 1297–1305 (2015).

Ongun, A. Mudd, J. B. Biosynthesis of galactolipids in plants. *Journal of Biological Chemistry*. **243**, 1558–1566 (1968).

Parnell, J. Foster, S. Ordovician ash geochemistry and the establishment of land plants. *Geochemical Transactions*. **13**(1), 7 (2012).

Petschnigg, J. Wolinski, H. Kolb, D. Zellnig, G. Kurat, C. F. Natter, K. Good fat, essential cellular requirements for triacylglycerol synthesis to maintain membrane homeostasis in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. **284**, 30981–30993 (2009).

Rocha, J. Nitenberg, M. Girard-Egrot, A. Jouhet, J. Maréchal, E. Block, M. A. Breton, C. Do Galactolipid Synthases Play a Key Role in the Biogenesis of Chloroplast Membranes of Higher Plants? *Frontiers in Plant Science*. **126**, (2018).

Roston, R. L. Wang, K. Kuhn, L. A. Benning, C. Structural determinants allowing transferase activity in SENSITIVE TO FREEZING 2, classified as a family I glycosyl hydrolase. *Journal of Biological Chemistry*. **289**(38), 26089–26106 (2014).

Rubinstein, C. V. Gerrienne, P. de la Puente, G. S. Astini, R. A. Steemans, P. Early Middle Ordovician evidence for land plants in Argentina (eastern Gondwana). *New Phytologist*. **188**(2), 365–369 (2010).

Sato, H. Takasakia, H. Takahashia, F. Suzuki, T. Iuchic, S. Mitsudad, N. Ohme-Takagid, M. Ikeda, M. Seo, M. Yamaguchi-Shinozakig, K. Shinozaki, K. *Arabidopsis thaliana* NGATHA1 transcription factor induces ABA biosynthesis by activating NCED3 gene during dehydration stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **115**(47), 11178–11187 (2018).

Scott, A. Glasspool, I. The diversification of Paleozoic fire systems and fluctuations in atmospheric oxygen concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**(29), 10861–10865 (2006).

Sengupta, S. Ray, A. Mandal, D. Chaudhuri, R. N. ABI3 mediated repression of RAV1 gene expression promotes efficient T dehydration stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta*. **194582** (2020).

Shaul, O. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *Biometals* **15** (3), 309–323 (2002).

Shimajima, M. Ohta, H. Iwamatsu, A. Masuda, T. Shioi, Y. Takamiya, K. Cloning of the gene for monogalactosyldiacylglycerol synthase and its evolutionary origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**(1), 333–337 (1997).

Tansley, C. Houghton, J. Rose, A. M. E. Witek, B. Payet, R. D. Wu, T. Miller, J. B. CIPK-B is essential for salt stress signalling in *Marchantia polymorpha*. *New Phytologist* **237**, 2210–2223 (2022).

Thorlby, G. Fourrier, N. Warren, G. The *SENSITIVE TO FREEZING2* gene, required for freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*, encodes a β -glucosidase. *Plant Cell*. **16**(8), 2192–2203 (2004).

Timme, R. E. Bachvaroff, T. R. Delwiche, C. F. Broad Phylogenomic Sampling and the Sister Lineage of Land Plants *PLoS One*. **7**(1), e29696 (2012).

Tsuboyama, S. Kodama, Y. AgarTrap: a simplified Agrobacterium-mediated transformation method for sporelings of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant and Cell Physiology*. **55**, 229–236 (2014).

Uemura, M. Joseph, R. A. Steponkus, P. L. Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions). *Plant Physiology*. **109**(1), 15–30 (1995).

Van Besouw, A. Wintermans, J. F. G. M. Galactolipid formation in chloroplast envelopes : I. Evidence for two mechanisms in galactosylation. *Biochimica et Biophysica Acta*. **529**, 44–53 (1978).

Verslues, P. E. Agarwal, M. Katiyar-Agarwal, S. Zhu, J. Zhu, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*. **45**, 523–539 (2006).

Wang, K. Hersh, H. L. Benning, C. SENSITIVE TO FREEZING2 aids in resilience to salt and

drought in freezing-sensitive tomato. *Plant Physiology*. **172**, 1432–1442 (2016).

Yu, C. W. Lin, Y. T. Li, H. Increased ratio of galactolipid MGDG : DGDG induces jasmonic acid overproduction and changes chloroplast shape. *New Phytologist*. **228**(4), 1327–1335 (2020).

Yu, L. Zhou, C. Fan, J. Shanklin, J. Xu, C. Mechanisms and functions of membrane lipid remodeling in plants. *Plant Journal*. **107**(1), 37-53 (2021).

Zepke, H. D. Heinz, E. Radunz, A. Linscheid, M. Pesch, R. Combination and positional distribution of fatty acids in lipids from blue-green algae. *Archives of Microbiology*. **119**, 157–162 (1978).

謝辞

私は 2019.10.21 に東京都新宿区の階段 10 段ほどの高さから頭部から転落し、急性硬膜下血腫(右急性硬膜下血腫と左急性硬膜外血腫)になりました。脳という人間で一番大事な場所を大きく損傷した影響で、僕は障害者です。

急性硬膜下血腫は、数々の著名人が亡くなっている病気(頭部外傷)です。僕も死にかけていました(両目共に瞳孔が開いていました)。

そこから急性期病院(国立国際医療研究センター病院)に運ばれ、無事一命を取り留め、初台リハビリテーション病院でリハビリをする事となりました。

初台リハビリテーション病院にお見舞いに来て下さった皆様(堀孝一氏(いつも僕が悩んでいる時、苦しんでいる時に優しい言葉をかけてくださいました)、村川雅人氏(退院後も大変お世話になりました。こんな僕のためにありがとうございました)、佐藤諒一氏、金森(佐藤)美有氏(ティッシュありがとうございました。金森さんの優しさ、一生忘れません)、唐司典明氏、伊藤道俊氏、角谷夏恵氏、清水隆之氏、井原雄太氏、高橋佑弥氏、牧村草汰氏、関根伸輔氏、三浦希氏、佐々木(関本)結子氏、岩井雅子氏、山川薫氏(写真ありがとうございました。とても効きました))、お見舞い品を送ってくださった皆様(大島(山田)由衣氏、下城彩氏)、本当にとっても、とても感謝しています。ありがとうございました。皆さんが僕のために来てくださって、刺激を受けたおかげで今の僕があると思います。

初台リハビリテーション病院-現在は退職されて、Su-Clu-Lab Terrace(サクラボテラス)の代表理事-の積田綾子氏に感謝を申し上げたいと思います。高次脳機能障害がひどく、何もわからなかった僕に適切なリハビリを考えてくださってありがとうございました。また、退院時までに歩けるようになったにもかかわらず、外来リハでも足のリハを続けた方がいいと言ってくれたこと、訪問リハもやった方がいいと言ってくれたこと、右手でピペットマンが使えるようになりたいですね、と言ったら慶應病院を紹介してくれたこと、もう数え切れないほどの感謝があります。

そして初台リハビリテーション病院のスタッフの皆様、特に古田沙織氏(早く卒業したいとうるさく言ってすみませんでした)、榎本映子氏、渡邊光紀氏、工藤有希子氏、作業療法士の狩俣祐二氏、奈良加奈子氏、理学療法士の富樫千夏氏(僕が再び二足歩行できるようになったのは富樫さんのおかげです)、上野公裕氏、柳瀬海大氏には感謝を申し上げたいと思います。

退院後、お世話になった方々にも感謝の意を表したいと思います。

ヘルパーステーションあんさんぶる稲城の皆様—代表的なメンバーしか挙げませんが—榎本退助代表(稲城駅までの歩行訓練、忘れません)、榎本由美氏(ほとんど全ての面でお世話になりました)、上田亜理沙氏、小山芳生氏、齋藤大輔氏、請盛用太氏、寺本能成氏、池田智氏、安達隆行氏(あんさんぶる稲城まで連れて行ってくれて、ありがとうございました。あれから通学訓練が始まって、通学訓練にも付き合ってくれました。本当にありがとうございました)、高次脳機能障害が酷く、一つ所に居られなかった僕を歩かせてくれて、そして生きる意味を教えてくれてありがとうございました。

また、訪問リハのアットリハ新百合ヶ丘のメンバーにも感謝を述べたいと思います。作業療法士の笹川拓海氏、理学療法士の森康裕氏、度重なる時間変更、大変申し訳ありませんでした。でも、すぐに対応して頂き、本当にありがとうございました。身体機能の向上は、アットリハさんのおかげだと思っています。

指導教員である下嶋美恵准教授にも感謝を述べたいと思います。どうしても博士が取りたいと言った私に適切なアドバイスを下さったこと、そしてそれを優しく見守ってくれたこと。また、博士論文は自分で書かないとダメだと言いつつも、博士論文を見てくれたこと、清水くんを卒業させたいと言ってくれたこと。清水くんが世界で初めてゼニゴケで TGDG が合成されると突き止めたし、*gggt1* でそれが合成されないとわかったのも清水くんが世界で初めて見つけた、といった言葉は非常に力強く感じました。

旧指導教員である太田啓之名誉教授にも感謝を述べたいと思います。事故に遭ってまず初めに来て下さったのが太田先生だったみたいですね。藻類がやりたいです、修士の時に言って、適切なテーマを与えてくれたこと、修士の時に公務員試験を受けたのに、博士に進みたいです、と言ったらここでもまた適切なテーマを与えてくれたこと、ゼニゴケをやろうと言ってくれたこと、ASPLに行きたくないですと言って参加辞退希望までしたのに、僕と一緒にしようと言ってくれたこと、こんなにも重い障害を負った僕に対して、他の学生と分け隔てなく接してくれたこと、復学したいと言ったら、良いよと言ってくれたこと、一緒に卒業しようと言ってくれた事、本当に感謝しています。

周真昕氏には特に感謝を述べたいと思います。事故に遭った時から(国立国際医療研究センター病院入院時から)ずっとお見舞いに来てくれたこと、退院してからずっと寄り添ってくれたこと、通学訓練を手伝ってくれたこと、記憶を取り戻すきっかけをくれたこと、本当に、本当に、感謝しています。

そして事故に遭ったときの4人には特別の感謝を申し上げたいと思います。事故に遭った時に適切な処置をしてくれた医師2人、遠藤剛氏(国立国際医療研究センター病院に連れて行ってくれて本当にありがとう)、竹内智紀氏(優しく、そして力強くなれたのは竹内くんのおかげです)、そして尾台俊亮氏(研究報告、予備審査スライドを見てくれてありがとう。そして本審査にまで来てくれて本当にありがとう)、大脇顕氏(事故に遭った時は快気祝いだったのにごめんね、本当にごめんね、でも僕は、君が下に居なくて本当によかったと思っているよ)に感謝を述べます。

最後に親に感謝を述べたいと思います。

こんな姿になっても、頭がおかしくなっても、変わらず僕に接してくれたこと、愛を捧げてくれたこと。高次脳機能障害が酷く、歩きたいと言ったら歩かせてくれたこと、通学訓練を手伝ってくれたこと、雨が強い日や台風の日には車で送り迎えをしてくれたこと、誰かと一緒にいる時間が楽しいと思わせてくれたこと、生きていてよかったのだと思わせてくれたこと。本当に、本当に、本当に感謝しています。ありがとう。