T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	シロイヌナズナの多面的な環境応答における糖脂質合成の意義に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	村川雅人
Author(English)	Masato Murakawa
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10585号, 授与年月日:2017年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:太田 啓之,久堀 徹,田中 寛,駒田 雅之,増田 真二,下嶋 美恵
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10585号, Conferred date:2017/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

平成 28 年度　博士論文

シロイヌナズナの多面的な環境応答における糖脂質合成の意義に関する研究

村川　雅人

東京工業大学
大学院生命理工学研究科　生体システム専攻

指導教員　　太田　啓之　教授

目次

第1章　序論

1.1　序　4

1.2　表および図　16

1.3　文献　18

第2章　スクロース添加生育時におけるシロイヌナズナの糖脂質代謝の機能解析

2.1　序　28

2.2　実験材料と方法　30

2.3　結果　36

2.4　考察　45

2.5　表および図　49

2.6　文献　64

第3章　酸性ストレス条件下におけるシロイヌナズナの糖脂質代謝の解析

3.1　序　70

3.2　実験材料と方法　74

3.3　結果　81

3.4　考察　93

3.5　表および図　100

3.6　文献　119

第4章　総括

4.1　総合討論と今後の展望　125

4.2　表および図　128

4.3　文献　130

報文目録　132

謝辞　133

略語表記一覧

DAG：diacylglycerol、ジアシルグリセロール

DGD：DGDG synthase、DGDG 合成酵素

DGDG：digalactosyldiacylglycerol、ジガラクトシルジアシルグリセロール

FA：fatty acid、脂肪酸

MGD：MGDG synthase、MGDG 合成酵素

MGDG：monogalactosyldiacylglycerol、モノガラクトシルジアシルグリセロール

NPC：non-specific PLC

OE：overexpresser、過剰発現株

PA：phosphatidic acid、ホスファチジン酸

PAH：phosphatidate phosphohydrolase、ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ

PC：phosphatidylcholine、ホスファチジルコリン

PE：phosphatidylethanolamine、ホスファチジルエタノールアミン

PG：phosphatidylglycerol、ホスファチジルグリセロール

PI：phosphatidylinositol、ホスファチジルイノシトール

Pi：inorganic phosphate、無機リン酸

PLC：phospholipase C、ホスホリパーゼ C

PLD：phospholipase D、ホスホリパーゼ D

PS：phosphatidylserine、ホスファチジルセリン

SQDG：sulfoquinovosyldiacylglycerol、スルホキノボシルジアシルグリセロール

Suc：sucrose、スクロース

T6P：trehalose-6-phosphate、トレハロース-6-リン酸

TeGDG：tetragalactosyldiacylglycerol、テトラガラクトシルジアシルグリセロール

TGDG：trigalactosyldiacylglycerol、トリガラクトシルジアシルグリセロール

第 1 章　序論

1.1　序

1.1.1　シロイヌナズナにおけるガラクト脂質生合成とその機能

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の割合を占めており、動物を含むその他多くの生物の細胞膜が極性頭部にリンを持つリン脂質から主に構成されていることとは大きく異なっている（Block et al., 1983）。植物の葉緑体はシアノバクテリアの細胞内共生が起源であると考えられている。この根拠の一つとして葉緑体膜の脂質組成とシアノバクテリアの膜脂質組成との著しい類似性があげられる（Poincelot, 1973; Joyard et al., 1998）。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、モノガラクトシルジアシルグリセロール（MGDG）およびジガラクトシルジアシルグリセロール（DGDG）という 2 つのガラクト脂質が約 80 %を占めている（表 1-1; Block et al., 1983）。これらのガラクト脂質の蓄積は葉緑体ゲノムにコードされた遺伝子の発現、および光合成活性に不可欠である（Kobayashi et al., 2013）。また、植物の非緑色組織中においてもプラスチドを構成する膜脂質の約 60 %がガラクト脂質によって占められている（Alban et al., 1988）。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、これらの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）。高等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）。

シロイヌナズナにおいては 3 つの MGDG 合成酵素遺伝子 *MGD1*、*MGD2*、*MGD3* が存在している（Awai et al., 2001; Kobayashi et al., 2004; Jarvis et al., 2000; Kobayashi et al., 2007）。これらはいずれも、ジアシルグリセロール（DAG）と UDP-ガラクトースを基質として、UDP-ガラクトースのガラクトース基を DAG に転移する反応を担う糖転移酵素をコードしている。MGD1、MGD2、MGD3 は、アミノ酸配列の相同性によって A-type（MGD1）と B-type（MGD2、MGD3）に分類されている。A-type MGDG 合成酵素である MGD1

はN末端に葉緑体移行シグナルが書き込まれたトランジットペプチドを持ち、葉緑体内包膜に局在している（Miège et al., 1999）。*MGD1* を欠損したシロイヌナズナは通常生育時のMGDG含量が野生株と比べて90 %程度減少しており、胚発生に異常が見られ、致死の表現型を示す（Kobayashi et al., 2007）。*MGD1* は、光照射と、植物ホルモンの一種であるサイトカイニンによって協調的に活性化されることが、キュウリ子葉を用いた実験から明らかにされている（Yamaryo et al., 2003）。一方、B-type MGDG 合成酵素であるMGD2、MGD3は葉緑体へ移行するためのトランジットペプチド配列を持たず、葉緑体の外包膜上で機能していると考えられている（Awai et al., 2001）。また、*MGD2*、*MGD3* のそれぞれの欠損株および、両遺伝子の二重欠損株は、通常生育条件では野生株と比較して明確な表現型の違いを示さない（Kobayashi et al., 2009a）。*MGD1* の欠損株が致死の表現型を示すことと併せて考えると、MGD2 および MGD3 は通常生育条件において MGD1 の機能を代替することはできず、通常条件での葉緑体の形成に必要なガラクト脂質の合成にはほとんど寄与していないと考えられている（Shimojima and Ohta, 2011）。ところが、*MGD2* と *MGD3* の二重欠損変異株はリン欠乏時に DGDG 含量が減少する表現型を示すことから、葉においてはリン欠乏時特異的に機能すると考えられている（Kobayashi et al., 2009a）。また、根や花といった非光合成器官における機能も示唆されている（Nakamura et al., 2009a）。リン欠乏時のMGD2およびMGD3の機能に関しては後述する。

DGDG合成酵素に関しては、シロイヌナズナにはDGD1とDGD2の2つのアイソフォームが存在している（Dörmann et al, 1995; Kelly and Dörmann, 2002）。DGD1とDGD2はいずれも、MGDGとUDP-ガラクトースを基質として、UDP-ガラクトースのガラクトース基をMGDGに転移する反応を担う、糖転移酵素である。DGD2はDGD1のC末端配列と高い相同性を示すが、DGD1のN末端配列を欠失している。*DGD1* を欠損した植物体はDGDG含量が90 %程度減少し、葉緑体の形成に異常が見られ、個体も矮小化するが致死にはならない（Dörmann et al, 1995）。DGD1は葉緑体外包膜への局在が確かめられており（Froehlich et al., 2001）、また、葉緑体内包膜で多量に合成されるMGDGを基質としたDGDG合成を担っているため、葉緑体内包膜と外包膜にまたがるように局在し、機能していると考えられている（Kelly et al., 2016）。一方、*DGD2* を欠損したシロイヌナズナは

通常生育条件において野生株と比較して明確な表現型の違いを示さず、DGDG 含量も野生株と同程度である（Kelly et al., 2003）。*DGD2* は主にリン欠乏時にその発現が上昇し、B-type MGDG 合成酵素と同様に葉緑体外包膜上で機能すると考えられている（Kelly et al., 2003）。DGD2 のリン欠乏時の機能については後述する。

以上の知見から、MGDG 合成酵素と DGDG 合成酵素を介したガラクト脂質合成経路は、シロイヌナズナにおいて二つの経路に分かれていると考えられている（Benning and Ohta, 2005）。一つは、MGD1-DGD1 を介した経路で、通常生育時の緑色組織において主に機能しており、葉緑体へのガラクト脂質供給を担っている。もう一つは MGD2/3-DGD2 を介した経路で、こちらはリン欠乏時や非緑色組織において活性化され、プラスチド外へのガラクト脂質供給に寄与している（図 1-1; Kobayashi et al., 2009b）。これらのガラクト脂質合成経路の活性化にはそれぞれ異なる植物ホルモンが関与しており、MGD1-DGD1 経路はサイトカイニンによって、MGD2/3-DGD2 経路はオーキシンによって活性が制御されていることが知られている。オーキシンとサイトカイニンは互いに拮抗的に作用する植物ホルモンであるため、A-type MGDG 合成酵素を介した MGD1-DGD1 経路と、B-type MGDG 合成酵素を介した MGD2/3-DGD2 経路の使い分けは、植物の環境適応や形態形成において重要な役割を果たしていることが示唆されている。

DGD1 と *DGD2* の両遺伝子を欠損したシロイヌナズナにおいても DGDG 合成活性がわずかながら残っていた（Kelly et al., 2003）。また、*DGD1* の欠損株および *DGD1* と *DGD2* の二重欠損株においては、ガラクトース基を 3 つまたは 4 つもつトリガラクトシルジアシルグリセロール（TGDG）、テトラガラクトシルジアシルグリセロール（TeGDG）が検出されており（Kelly et al., 2003）、DGDG 以外にオリゴガラクト脂質を合成する活性を有する galactolipid:galactolipid galactosyltransferase（GGGT）の存在が示唆されていた。この酵素遺伝子はシロイヌナズナにおいて *SENSITIVE TO FREEZING2*（*SFR2*）であることがわかった（Moellering et al., 2010）。*SFR2* の欠損株は通常条件では野生株と変わらずに生育するが、凍結ストレスに対しては高感受性を示す（Fourrier et al., 2008）。SFR2 は MGDG ともう 1 分子のガラクト脂質を基質として、MGDG のガラクトース基をもう一方のガラクト脂質に受け渡し、DGDG（TGDG、TeGDG）と DAG を生成する活性を有しており、

連続的にオリゴガラクト脂質を合成する（Moellering et al., 2010; Roston et al. 2014）。こうして蓄積したオリゴガラクト脂質は、凍結時に膜の癒着を防ぐことで葉緑体の安定化に寄与していると考えられている（Moellering et al., 2010）。

ガラクト脂質は単なるチラコイド膜の主要構成脂質としての役割にとどまらず、様々な生理機能を担っていると考えられている。例えば、光合成タンパク質複合体の X 線結晶構造解析の結果、*Themosynechococcus vulcanus* の光化学系 II 複合体中には 6 分子の MGDG と 5 分子の DGDG が含まれることが明らかにされている（Umena et al., 2011）。また、*Thermosynechococcus elongatus* の光化学系 I も、1 分子の MGDG を含むと報告されている（Jordan et al., 2001）。加えて、*DGD1* を欠損したシロイヌナズナの解析により、DGDG が光化学系 I や II の安定化においても重要であることが示されている（Guo et al., 2005）。また、以上のような葉緑体内での機能に限らず、ガラクト脂質は葉緑体外においても重要な機能を担っている。その一つとしてよく知られているのが、リン欠乏時の膜脂質転換機構と呼ばれる現象である。次項ではこのリン欠乏時の膜脂質転換機構についての現在までの知見を紹介する。

1.1.2　リン欠乏時の膜脂質転換機構

リンは生物の生育に必須な元素である。植物の生体膜のうち、葉緑体膜はガラクト脂質が主要構成成分であるが、それ以外の生体膜ではリン脂質が主要構成成分となっている。リン脂質は生体中のリンの約 1/3 から 1/2 を含んでいるとも言われており、リンの貯蔵形態としても重要な意味があると考えられている。それが顕著に現れる現象が、リン欠乏時の膜脂質転換である。

リン欠乏は植物の生育における全世界的な問題の一つである(Kochian, 2012)。リン欠乏に適応するために植物は様々な応答機構を有することが知られている。なかでもリン欠乏時の膜脂質転換機構は、リン欠乏時の植物体の生育に大きな影響を与えることが知られている。この機構は、核酸の合成やタンパク質のリン酸化といった重要な生体反応におけるリンの不足を補うため、リン脂質の極性頭部を構成しているリンを各種リパーゼによって切り出し、減少したリン脂質を非リン脂質によって代替するという一連の代謝反応から成り

立っており、数多くの遺伝子が関与することが知られている（Nakamura, 2013）。

シロイヌナズナでは、B-type MGDG 合成酵素である MGD2 および MGD3 がリン欠乏時の膜脂質転換におけるガラクト脂質合成に主に寄与している。*MGD2* および *MGD3* は植物種をまたいでオルソログが保存されており（Awai et al., 2001; Yuzawa et al., 2012; Hori et al., 2016）、リン欠乏によって強く発現が誘導される。シロイヌナズナの *MGD3* 欠損株および *MGD2* と *MGD3* の二重欠損株はリン欠乏時の DGDG 含量が顕著に減少するのに対し、*MGD2* の欠損株はリン欠乏時の DGDG 含量に変化が見られないことから、シロイヌナズナにおいては *MGD3* がリン欠乏時のガラクト脂質の合成を担っている主要な酵素遺伝子であることが明らかにされている（Kobayashi et al., 2009a）。MGDG は単独で二分子膜構造を形成できない、非ラメラ脂質である。B-type MGDG 合成酵素によって合成された MGDG はそのままの形で膜には蓄積せず、DGDG 合成酵素の反応基質として使われ、生成されたラメラ脂質である DGDG が膜脂質として蓄積する。*MGD2* と *MGD3* の二重欠損株は野生株と比べて、リン欠乏条件での根の長さや新鮮重量が減少するため、B-type MGDG 合成酵素の機能はリン欠乏時の生育にも重要であることが示されている（Kobayashi et al., 2009a）。一方、*MGD2* と *MGD3* 二重欠損株のリン欠乏時の植物体地上部における DGDG 含量は、通常生育時と比較すると増加していることから、リン欠乏時の植物体地上部におけるガラクト脂質合成には MGD1 も少なからず寄与していることが示されている。しかし、非緑色組織である根においては MGD1 の寄与は小さく、リン欠乏時の根での膜脂質転換には B-type MGDG 合成酵素の機能が必須である（Kobayashi et al., 2009a）。

リン欠乏時における B-type MGDG 合成酵素遺伝子の発現誘導には、植物ホルモンの一種であるオーキシンが関わっている。リン欠乏に加えて、地上部から切り離した根にオーキシンを処理すると B-type MGDG 合成酵素遺伝子の発現誘導が増強される（Kobayashi et al., 2006）。また、オーキシンシグナル伝達の変異株では、リン欠乏時の B-type MGDG 合成酵素の遺伝子発現量や膜脂質組成における DGDG 含量が減少する（Narise et al., 2010）。さらに、オーキシンとは拮抗的に作用する植物ホルモンであるサイトカイニンを植物体に処理した場合、根においてオーキシンとは逆に、リン欠乏時の B-type MGDG 合成酵素遺

伝子の発現誘導が抑制され、DGDG の蓄積も阻害される（Kobayashi et al., 2006）。このことから、リン欠乏時の B-type MGDG 合成酵素の活性はオーキシンとサイトカイニンのクロストークによって制御されていると考えられている。

リン欠乏時の膜脂質転換機構に関わる、B-type MGDG 合成酵素以外の酵素遺伝子に関しても、多くの機能解析がなされてきた。シロイヌナズナに存在する 2 つの DGDG 合成酵素遺伝子はどちらもリン欠乏に応答して遺伝子発現量が増加し、リン欠乏時の DGDG 合成に寄与している（Kelly et al., 2003）。また、リン欠乏時に DGD1 および DGD2 によって合成された DGDG は、細胞膜やミトコンドリア膜、液胞膜といった葉緑体外の生体膜に蓄積することが知られている（Andersson et al., 2003, 2005; Russo et al., 2007; Jouhet et al., 2004）。しかし、DGDG が葉緑体から他の生体膜へ輸送される分子機構については未だ明らかにされてはいない。

リン脂質の分解によるガラクト脂質合成経路への基質供給も、リン欠乏時の膜脂質転換における重要な過程である。リン欠乏時、この反応は主にホスホリパーゼ C（PLC）および D（PLD）の 2 種の酵素活性によって担われていると考えられている。ホスホリパーゼ C 活性は反応基質によって 2 種に分けられる。一つはホスファチジルイノシトール（PI）に対して作用する PI-PLC 活性であり、もう一つはホスファチジルコリン（PC）やホスファチジルエタノールアミン（PE）を反応基質とする NPC（Non-specific PLC）活性である（Nakamura, 2013）。シロイヌナズナに 6 つ存在する *NPC* のうち、*NPC4* と *NPC5* がリン欠乏に応答して発現量が増大することが知られている。NPC4 および NPC5 はそれぞれ細胞膜および葉緑体外可溶性画分に局在する酵素で、どちらも PC および PE の極性頭部を切断し、DAG を生成する反応を担っている（Nakamura et al., 2005; Gaude et al., 2008）。*NPC4* の欠損株はリン欠乏時の NPC 活性の大部分を欠失するが、DGDG 蓄積に大きな変化は見られていない（Nakamura et al., 2005）。一方で *NPC5* の欠損株はリン欠乏時の NPC 活性に変化は見られないが、DGDG 含量は顕著に減少する（Gaude et al., 2008）。これらの事実から、NPC 活性と膜脂質転換の関係性の全貌については未だ不明な点も多い。

PLD 活性は NPC 活性と同じく PC や PE を主な反応基質として極性頭部の切断を行うが、NPC 活性とは作用部位が異なり、反応の結果ホスファチジン酸（PA）を生成する。シ

ロイヌナズナには 12 の *PLD* が存在しており種々の環境応答において機能していると考えられているが（Hong et al., 2016）、そのうちの *PLDζ1* および *PLDζ2* がリン欠乏に応答して発現量が増加する（Qin and Wang, 2002; Cruz-Ramírez et al., 2006）。PLDζ2 は液胞膜に局在し（Yamaryo et al., 2008）、リン欠乏時の根において膜脂質転換に寄与することが知られている（Cruz-Ramírez et al., 2006）。また、*PLDζ2* は様々な器官においてオーキシンによって発現が誘導され、根においてはオーキシン輸送や重力屈性に寄与している（Li and Xue, 2007）。

PA は、NPC によって生成された DAG のリン酸化や、PLD 活性、および Kennedy pathway を介した新規合成によってつくられる。これらの PA を基質として DAG を生成する PA ホスファターゼ (PAP) 活性を持つ可溶性画分タンパク質として、シロイヌナズナでは 2 つのアイソフォーム PAH1 と PAH2 が知られており、リン欠乏時の膜脂質転換への寄与が明らかにされている（Nakamura et al., 2009b）。*PAH1* と *PAH2* の二重欠損株は通常生育時から PC と PA が高蓄積しており、MGDG と DGDG の含量が少ないという表現型を示すことから、これらの酵素は PC の分解を介して葉緑体内包膜における MGDG 合成に基質を供給していると考えられている（Nakamura et al., 2009b）。さらにこの二重欠損株は、リン欠乏時の生育が野生株に比べて著しく抑制される。また、二重欠損株のリン欠乏時の膜脂質組成においては野生株と比較して DGDG 含量の顕著な減少がみられ、PC 含量も多いままであることから、リン欠乏時のリン脂質の分解における PAH1 と PAH2 の寄与が明らかにされている（Nakamura et al., 2009b）。

リン欠乏時に種々のリン欠乏応答性遺伝子の発現を活性化させるグローバル制御因子として、PHR1 が知られている（Rubio et al., 2001; Nilsson et al., 2007）。PHR1 は MYB 転写因子であり、転写調節領域に存在する P1BS モチーフとして知られるコンセンサス配列に結合することで遺伝子発現を誘導する。リン欠乏時の膜脂質転換に関与する遺伝子の多くは転写開始点上流に 1 つまたは複数の P1BS モチーフを持っている。また、*PHR1* を欠損した植物体を用いた解析により、リン欠乏時の膜脂質転換も部分的に PHR1 の制御下にあることが明らかにされている（Pant et al., 2015）。

上述したように、リン欠乏時の膜脂質転換機構は様々な植物種においてその存在が確認

されている環境適応機構であるが、もともとこの現象は非光合成細菌である *Pseudomonas diminuta* において発見された（Minnikin et al., 1974）。その後現在まで多くの知見が蓄積され、リン欠乏時の膜脂質転換機構は様々な生物種に広く保存されているリン欠乏適応の仕組みであることが明らかになってきている。光合成生物においても、*Rhodobacter sphaeroides* における、スルホキノボシルジアシルグリセロール（SQDG）の蓄積を介したリン欠乏適応機構が報告されて以来（Benning et al., 1993）、シアノバクテリアや藻類もリン欠乏時にリン脂質を非リン脂質で代替する適応機構を有することが明らかにされてきた（Van Mooy et al., 2009; Shemi et al., 2016）。また、種々の従属栄養生物においても、リン欠乏時の膜脂質転換の存在が確認されてきた。例えば、アルファルファ根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* は、リン欠乏時に膜脂質中の PC や PE を SQDG やオルニチン脂質、ジアシルグリセリルトリメチルホモセリン（DGTS）に置き換える膜脂質転換機構を持つことが報告されている（Geiger et al., 1999）。その後、*S. meliloti* のリン欠乏時の膜脂質転換機構において主要な役割を果たす遺伝子として、リン脂質分解酵素ホスホリパーゼ C（PlcP）が同定された（Zavaleta-Pastor et al., 2010）。この PlcP は陸上植物のホスホリパーゼ C とは相同性を示さないが、海洋性プランクトン由来の環境サンプルを用いた解析においても幅広い生物種に保存されていることが明らかにされており、リン欠乏に応答した発現誘導を示すこと、また、様々なリン欠乏応答性遺伝子や膜脂質代謝酵素遺伝子と遺伝子クラスターを形成していることが知られている（Carini et al., 2015; Sebastián et al., 2016）。リン脂質を代替する非リン脂質は生物種によって様々であるが（Van Mooy et al., 2009; Popendorf et al., 2011）、リン脂質を非リン脂質によって代替する膜脂質転換機構は、土壌から海洋までみられる、広く普遍的なリン欠乏環境への適応戦略であると考えられる。

1.1.3　リン欠乏以外の環境ストレスに対する膜脂質代謝制御機構

リン欠乏時の膜脂質転換機構については、その生理的な意義も明確であり、様々な研究成果によって多くの知見が積み重ねられてきた。他方、植物はリン欠乏以外の様々な環境ストレスに対しても膜脂質組成を変動させることが報告されている。

窒素欠乏に陥ったシロイヌナズナは *DGD1* の遺伝子発現を上昇させ、結果として

MGDG の減少と、DGDG、PC、PE の増加を引き起こすことが知られている（Gaude et al., 2007）。また、この際に MGDG の分解産物として生じる脂肪酸と、クロロフィル分解の結果生じるフィトールから、脂肪酸フィチルエステルが合成される（Gaude et al., 2007）。また、マグネシウム欠乏時にも窒素欠乏と同様に、MGDG／DGDG 比の減少が見られることが報告されている（Gaude et al., 2007）。

乾燥ストレス時のシロイヌナズナにおいても *DGD1* の遺伝子発現上昇が誘導されることが知られており、この際にも、MGDG の減少に伴う DGDG の増加が見られる（Gigon et al., 2004; Torres-Franklin et al., 2007）。また、高温ストレス時のシロイヌナズナにおいても DGDG の蓄積が見られ、DGD1 の機能を部分的に欠損した変異株では高温ストレスに高感受性を示すことが知られている（Chen et al., 2006）。さらに、シロイヌナズナの近縁種であり、乾燥や塩ストレスを含む各種環境ストレスに高い耐性を示す *Thellungiella salsuginea* の乾燥ストレス生育時の膜脂質組成をシロイヌナズナと比較した結果、シロイヌナズナにおいて減少していた DGDG の絶対量（総膜脂質中の割合は増加する）が、*Thellungiella* においては増加しており、ストレス耐性との関連性が示唆されている（Yu and Li, 2014）。また、ガラクト脂質合成は塩ストレス条件への適応にも影響を及ぼすことが知られている。イネの沈水ストレスに関連する因子として単離され、シロイヌナズナの B-type MGDG 合成酵素遺伝子と高い相同性を示した *OsMGD* は、塩ストレスと乾燥ストレスによって発現が誘導される（Qi et al., 2004）。この *OsMGD* をタバコにおいて過剰発現させた植物体は野生株と比較して塩ストレスに耐性を獲得しており、この際 MGDG／DGDG 比が減少することが確認されている（Wang et al., 2014）。通常生育時の葉緑体チラコイド膜を構成する MGDG と DGDG の存在比は概ね 2:1 に保たれており（Block et al., 1983）、この存在比のバランスがチラコイド膜の形態や光合成活性の維持に寄与していると考えられている。一方で、上記のように多くのストレス条件下で見られる MGDG／DGDG 比の変動もまた、ストレス環境下での葉緑体の機能維持において重要であると考えられているが、その生理的意義については、未だ統一的な解釈はなされていない。

アルミニウムは土壌中に存在し、アルミニウムイオンの形で溶出すると植物の根に傷害を与える。アルミニウムストレスは膜脂質中の PA の減少を引き起こすことが報告されて

おり（Pejchar et al., 2008）、この過程には PLC の阻害が関わっていると考えられている（Ramos-Díaz et al., 2007; Pejchar et al., 2015）。また、シロイヌナズナに 12 ある *PLD* 遺伝子の中で、*PLDγ* はアルミニウムストレスによって転写レベルで発現誘導される。しかし、*PLDγ* の欠損株およびノックダウン株は野生株に比べて高いアルミニウム耐性を示す（Zhao et la., 2011）。アルミニウムストレス時には、細胞膜のリン脂質がもつ負電荷にアルミニウムイオンの正電荷が引きつけられ、根圏のアルミニウムイオン濃度の上昇を招くと考えられている。実際に、PA の蓄積が見られる *PAH1* と *PAH2* の二重欠損株はアルミニウムストレスに対して高感受性を示す（Kobayashi et al., 2013）。このため、リン脂質の減少はアルミニウム耐性の獲得に繋がると考えられている（Khan et al., 2009; Maejima and Watanabe, 2014）。これを支持する知見として、前もってリン欠乏処理を行うことでガラクト脂質を蓄積したイネの根はアルミニウム耐性を示したほか（Maejima et al., 2014）、高いアルミニウム耐性をもつ *Melastoma melabathricum* や *Melaleuca cajuputi* の根においては、リン脂質に対するガラクト脂質の構成比が高いことが知られている（Maejima and Watanabe, 2014）。また、アルミニウムストレスにさらされたタバコの根の膜脂質組成においては MGDG が減少するのに対し、*OsMGD* を過剰発現させたタバコはアルミニウムストレス時の根における MGDG の減少が抑制された結果、アルミニウムストレスからの復帰実験において野生株よりも新鮮重量が増加した（Zhang et al., 2016）。しかし、アルミニウムストレスに応答して積極的にリン脂質の分解と糖脂質の合成を促進するような膜脂質代謝調節機構の存在は今のところ報告されてはいない。

植物細胞において脂質分子の担う多面的な生理的機能の一つとして、シグナル分子としての機能についても研究が進められてきた。リン脂質から生産されるリゾリン脂質や PA、ホスファチジルイノシトール（PI）から生産されるイノシトール-1,4,5-3 リン酸、糖脂質から合成されるジャスモン酸や、各種スフィンゴ脂質は、低濃度の存在量でも植物細胞の生理機能や植物体の生育に大きな影響を及ぼす（Okazaki and Saito, 2014）。

以上の知見から、脂質代謝調節は植物の発達や生育環境への適応に際して、多面的な機能を担っていることが知られている。

1.1.4　植物は複合的かつ多面的な生育環境ストレスに直面する

植物の根からのリンの吸収を妨げる原因の一つとして、リンがもつ、土壌に強く吸着しやすいという性質があげられる。そこで、リン欠乏に陥った植物は、リンの吸収効率を高めるために根から様々な有機物を分泌している。高等植物は、同化した全炭素量の 2 割から 3 割を根から土壌中へ分泌しているとも言われており、中でも有機酸の分泌能は植物のリン欠乏耐性と深い関わりがある（Hinsinger et al., 2003）。

有機酸の分泌による土壌中難溶性リンの獲得戦略については、多くの先行研究が存在する。たとえば、マメ科植物のルーピンは根からクエン酸を放出し、難溶性のリンをリン酸-鉄-クエン酸複合体として溶解させることで吸収効率を高めている。また、キマメはピシジン酸やシュウ酸、マロン酸を分泌することで鉄と結合したリンを離脱させている他、イネはムギネ酸を放出することでリン酸を溶解させていると言われており、分泌される有機酸の種類や量は植物種によって異なっている（平舘、1999）。

このような栄養欠乏に対する植物の適応機構は、一方で、土壌の酸性化という、植物自身にとっての新たな環境ストレスを引き起こす原因ともなっている。酸性土壌とは、一般に表層 pH が 5.5 から 5.0 を下回った土壌を指し、多くの植物の生育に対して抑制的な影響を及ぼすことが知られている（Shavrukov and Hirai, 2016）。カルシウムやカリウムといった塩基性物質が豊富に存在する土地においては土壌の酸性化が進む速度は遅くなるが、降水量が多くカルシウムやカリウムが土壌から流出しやすい地域では、特に土壌の酸性化が深刻な問題となりやすい。世界の表土の約 3 割が酸性土壌によって占められていると考えられており、酸性土壌のうちで耕作地として利用されている面積は 5.4％しかないとする試算もある（von Uexküll and Mutert, 1995）。

酸性土壌が植物に及ぼす影響は、アルミニウムイオンによる毒性との関連について長年研究が進められてきた。アルミニウムは土壌に最も多く存在する金属元素であり、土壌質量の約 7％を占めると言われている。また、アルミニウムは土壌 pH が酸性に寄ることで土壌溶液にイオンとして溶け出てくることが知られており、アルミニウムの活性化と呼ばれている。アルミニウムは pH の変化により様々なイオン形態をとり、塩基性ではアルミネートアニオン $Al(OH)_4^-$、中性付近では不溶性の $Al(OH)_3$、さらに酸性に寄るにつれて $Al(OH)_2^+$、

$Al(OH)^{2+}$と変化し、pH4.5 以下では大部分がアルミニウムイオン Al^{3+}として存在する。このうち、$Al(OH)_4^-$と Al^{3+}が植物にとって毒性を示すとされており、とく Al^{3+}は低濃度かつ短時間で、植物の根に不可逆的かつ深刻なダメージを与えると言われている（松本英明、2003; Samac and Tesfaye, 2003）。これに加えて、活性化したアルミニウムは土壌中のリン酸イオンと結合し、難溶性のリン酸アルミニウム塩を形成することで、さらなるリン欠乏を引き起こす要因となる。このように、土壌の酸性化によるストレスはリン欠乏ストレスとも密接に関わっている。

また、植物の側においても、環境ストレスに応答する各種植物ホルモンを介したシグナル伝達経路はお互いにクロストークしており、複雑に絡み合っている。例えば、リン欠乏と酸性ストレスのどちらの生育環境においても、植物ホルモンの一つであるオーキシンを介したシグナル伝達が、環境適応において重要な役割を担っていることが明らかにされている。オーキシンは、先に述べたようにリン欠乏時の膜脂質転換に B-type MGDG 合成酵素遺伝子の発現誘導を介して寄与しているほか、側根形成の促進といった形態変化にも関わっている（López-Bucio et al., 2002）。また、酸性ストレス時にもオーキシン合成とオーキシンシグナルの活性化が起こり、根における H^+-ATPase の活性化を介して植物の酸性耐性に寄与していることが知られている（Hachiya et al., 2014; Inoue et al., 2016）。さらに、オーキシンの合成やシグナル伝達機構は、植物体内の糖と炭素代謝のセンシングによって制御されていることが知られており（Sairanen et al., 2012; Lilley et al., 2012）、さらにオーキシンシグナルを介した糖とリン欠乏応答の関連性についても明らかになりつつある（Hammond and White, 2008; Franco-Zorrilla et al., 2005）。

以上のように、単一の環境ストレスが膜脂質組成に及ぼす影響については多くの知見が積み上げられてきた。しかし一方で、多面的な環境ストレスに対して膜脂質代謝が示す応答機構については、ほとんど判っていない。本研究では、これまで詳細な解析がなされていなかった、植物内部の生理条件である糖過剰と、外部の環境条件である酸性ストレスに焦点を当て、これらの要因がガラクト脂質代謝に与える影響を明らかにするとともに、多面的なストレス応答におけるガラクト脂質代謝が担う生理的役割について考察を行った。

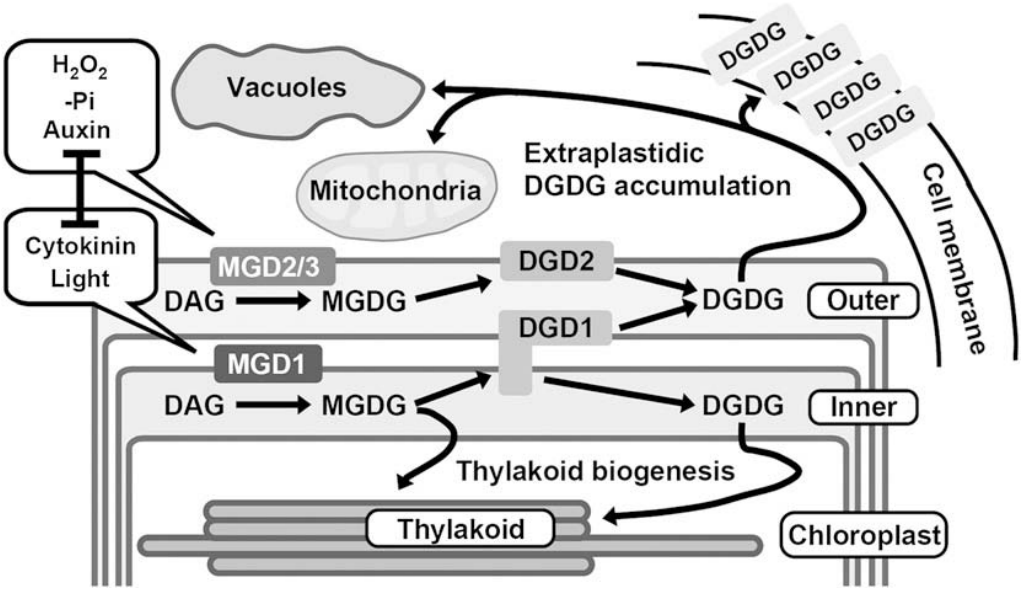
1.2　表および図

表1-1.　ホウレンソウ葉緑体の膜脂質組成（mol %）

Chloroplast		MGDG	DGDG	SQDG	PG	PC	PI
Envelope membrane	Outer	17	29	6	10	32	5
	Inner	49	30	5	8	6	1
Thylakoid membrane		52	26	6.5	9.5	4.5	1.5

（Block et al., 1983）

MGDG、モノガラクトシルジアシルグリセロール；DGDG、ジガラクトシルジアシルグリセロール； SQDG、スルホキノボシルジアシルグリセロール；PG、ホスファチジルグリセロール；PC、ホスファチジルコリン；PI、ホスファチジルイノシトール



（Kobayashi et al., 2009b）

図 1-1.　シロイヌナズナにおけるガラクト脂質合成経路とその調節機構

1.3 文献

Alban, C., Joyard, J. and Douce, R. (1988) Preparation and Characterization of Envelope Membranes from Nongreen Plastids. *Plant Physiol.* **88**, 709–717.

Andersson, M.X., Stridh, M.H., Larsson, K.E., Liljenberg, C. and Sandelius, A.S. (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett.* **537**, 128–132.

Andersson, M.X., Larsson, K.E., Tjellström, H., Liljenberg, C. and Sandelius, A.S. (2005) Phosphate-limited Oat: The Plasma Membrane and the Tonoplast as Major Targets for Phospholipid-To-Glycolipid Replacement and Stimulation of Phospholipases in the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* **280**, 27578–27586.

Awai, K., Maréchal, E., Block, M.A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H. and Joyard, J. (2001) 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10960–10965.

Benning, C., Beatty, J.T., Prince, R.C. and Somerville, C.R. (1993) The sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodobacter sphaeroides* but enhances growth under phosphate limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 1561–1565.

Benning, C. and Ohta, H. (2005) Three Enzyme Systems for Galactoglycerolipid Biosynthesis Are Coordinately Regulated in Plants. *J. Biol. Chem.* **280**, 2397–2400.

Block, M.A., Dorne, A., Joyard, J. and Douce, R. (1983) Preparation and Characterization of Membrane Fractions of Outer and Inner Envelope Membranes from Spinach C. *J. Biol. Chem.* **258**, 13281–13286.

Carini, P., Van Mooy, B.A.S., Thrash, J.C., White, A., Zhao, Y., Campbell, E.O., Fredricks, H.F. and Giovannoni, S.J. (2015) SAR11 lipid renovation in response to phosphate starvation. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. **112**, 7767–7772.

Chen, J., Burke, J.J., Xin, Z., Xu, C. and Velten, J. (2006) Characterization of the *Arabidopsis* thermosensitive mutant *atts02* reveals an important role for galactolipids in thermotolerance. *Plant, Cell Environ.* **29**, 1437–1448.

Cruz-Ramírez, A., Oropeza-Aburto, A., Razo-Hernández, F., Ramírez-Chávez, E. and Herrera-Estrella, L. (2006) Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 6765–6770.

Dörmann, P., Hoffmann-Benning, S., Balbo, I. and Benning, C. (1995) Isolation and Characterization of an Arabidopsis Mutant Deficient in the Thylakoid Lipid Digalactosyl Diacylglycerol. *Plant Cell* **7**, 1801–10.

Dörmann, P. and Benning, C. (2002) Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci.* **7**, 112–118.

Douce R. (1974) Site of Biosynthesis of Galactolipids in Spinach Chloroplasts. *Science* **183**, 852–853.

Franco-Zorrilla, J.M., Martín, A.C., Leyva, A. and Paz-Ares, J. (2005) Interaction between Phosphate-starvation, Sugar, and Cytokinin Signaling in Arabidopsis and the Roles of Cytokinin Receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiol.* **138**, 847–857.

Froehlich, J.E., Benning, C. and Dörmann, P. (2001) 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. *J. Biol. Chem.* **276**, 31806–31812.

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

Gaude, N., Bréhélin, C., Tischendorf, G., Kessler, F. and Dörmann, P. (2007) Nitrogen deficiency in Arabidopsis affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytyl esters. *Plant J.* **49**, 729–739.

Gaude, N., Nakamura, Y., Scheible, W.-R., Ohta, H. and Dörmann, P. (2008) Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of Arabidopsis. *Plant J.* **56**, 28–39.

Geiger, O., Röhrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T.M. and Thomas-Oates, J.E. (1999) The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti*. *Mol. Microbiol.* **32**, 63–73.

Gigon, A., Matos, A.-R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y. and Pham-Thi, A.-T. (2004) Effect of Drought Stress on Lipid Metabolism in the Leaves of *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Columbia). *Ann. Bot.* **94**, 345–351.

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.

Hachiya, T., Sugiura, D., Kojima, M., Sato, S., Yanagisawa, S., Sakakibara, H., Terashima, I. and Noguchi, K. (2014) High CO_2 Triggers Preferential Root Growth of *Arabidopsis thaliana* Via Two Distinct Systems Under Low pH and Low N Stresses. *Plant Cell Physiol.* **55**, 269–280.

Hammond, J.P. and White, P.J. (2008) Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *J. Exp. Bot.* **59**, 93–109.

Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C. and Jaillard, B. (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant Soil* **248**, 43–59.

Hong, Y., Zhao, J., Guo, L., Kim, S.-C., Deng, X., Wang, G., Zhang, G., Li, M. and Wang, X. (2016) Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses. *Prog. Lipid Res.* **62**, 55–74.

Hori, K., Nobusawa, T., Watanabe, T., Madoka, Y., Suzuki, H., Shibata, D., Shimojima, M. and Ohta, H. (2016) Tangled evolutionary processes with commonality and diversity in plastidial glycolipid synthesis in photosynthetic organisms. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1861**, 1294–1308.

Inoue, S., Takahashi, K., Okumura-Noda, H. and Kinoshita, T. (2016) Auxin Influx Carrier AUX1 Confers Acid Resistance for Arabidopsis Root Elongation Through the Regulation of Plasma Membrane H^+-ATPase. *Plant Cell Physiol.* **57**, 2194–2201.

Jarvis, P., Dörmann, P., Peto, C.A., Lutes, J., Benning, C. and 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.

Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W. and Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**, 909–917.

Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J. and Block, M.A. (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J. Cell Biol.* **167**, 863–874.

Joyard, J., Maréchal, E., Miège, C., Block, M.A., Dorne, A. J. and Douce, R. (1998) Structure, distribution and biosynthesis of glycerolipids from higher plant chloroplasts, in Lipid in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics (Siegenthaler P. A.and Murata N. Eds.) pp 21-52

Kelly, A.A. and Dörmann, P. (2002) DGD2, an *Arabidopsis* Gene Encoding a UDP-Galactose-dependent Digalactosyldiacylglycerol Synthase Is Expressed during Growth under Phosphate-limiting Conditions. *J. Biol. Chem.* **277**, 1166–1173.

Kelly, A.A., Froehlich, J.E. and Dörmann, P. (2003) 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.

Kelly, A.A., Kalisch, B., Hölzl, G., Schulze, S., Thiele, J., Melzer, M., Roston, R.L., Benning, C. and Dörmann, P. (2016) Synthesis and transfer of galactolipids in the chloroplast envelope membranes of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 10714–10719

Khan, M.S.H., Tawaraya, K., Sekimoto, H., Koyama, H., Kobayashi, Y., Murayama, T., Chuba, M., Kambayashi, M., Shiono, Y., Uemura, M., Ishikawa, S. and Wagatsuma, T. (2009) Relative abundance of Δ^5-sterols in plasma membrane lipids of root-tip cells correlates with

aluminum tolerance of rice. *Physiol. Plant.* **135**, 73–83.

Kobayashi, K., Awai, K., Takamiya, K. and Ohta, H. (2004) Arabidopsis Type B Monogalactosyldiacylglycerol Synthase Genes Are Expressed during Pollen Tube Growth and Induced by Phosphate Starvation. *Plant Physiol.* **134**, 1–9.

Kobayashi, K., Masuda, T., Takamiya, K. and Ohta, H. (2006) Membrane lipid alteration during phosphate starvation is regulated by phosphate signaling and auxin/cytokinin cross-talk. *Plant J.* **47**, 238–248.

Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M. and 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.

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

Kobayashi, K., Nakamura, Y. and Ohta, H. (2009b) Type A and type B monogalactosyldiacylglycerol synthases are spatially and functionally separated in the plastids of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **47**, 518–525.

Kobayashi, K., Narise, T., Sonoike, K., Hashimoto, H., Sato, N., Kondo, M., Nishimura, M., Sato, M., Toyooka, K., Sugimoto, K., Wada, H., Masuda, T. and Ohta, H. (2013) Role of galactolipid biosynthesis in coordinated development of photosynthetic complexes and thylakoid membranes during chloroplast biogenesis in Arabidopsis. *Plant J.* **73**, 250–261.

Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Watanabe, T., Shaff, J.E., Ohta, H., Kochian, L.V, Wagatsuma, T., Kinraide, T.B. and Koyama, H. (2013) Molecular and Physiological Analysis of Al^{3+} and H^{+} Rhizotoxicities at Moderately Acidic Conditions. *Plant Physiol.* **163**, 180–92.

Kochian, L. V. (2012) Plant nutrition: Rooting for more phosphorus. *Nature* **488**, 466–467.

Li, G. and Xue, H.-W. (2007) *Arabidopsis PLDζ2* Regulates Vesicle Trafficking and Is Required for Auxin Response. *Plant Cell* **19**, 281–295.

Lilley, J.L.S., Gee, C.W., Sairanen, I., Ljung, K. and Nemhauser, J.L. (2012) An Endogenous

Carbon-Sensing Pathway Triggers Increased Auxin Flux and Hypocotyl Elongation. *Plant Physiol.* **160**, 2261–2270.

López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Nieto-Jacobo, M.F., Simpson, J. and Herrera-Estrella, L. (2002) Phosphate Availability Alters Architecture and Causes Changes in Hormone Sensitivity in the Arabidopsis Root System. *Plant Physiol.* **129**, 244–256.

Maejima, E., Watanabe, T., Osaki, M. and Wagatsuma, T. (2014) Phosphorus deficiency enhances aluminum tolerance of rice (*Oryza sativa*) by changing the physicochemical characteristics of root plasma membranes and cell walls. *J. Plant Physiol.* **171**, 9–15.

Maejima, E. and Watanabe, T. (2014) Proportion of phospholipids in the plasma membrane is an important factor in Al tolerance. *Plant Signal Behav* **9**, e29277.

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

Minnikin, D.E., Abdolrahimzadeh, H. and Baddiley, J. (1974) Replacement of acidic phosphates by acidic glycolipids in *Pseudomonas diminuta*. *Nature* **249**, 268–269.

Moellering, E.R., Muthan, B. and Benning, C. (2010) Freezing Tolerance in Plants Requires Lipid Remodeling at the Outer Chloroplast Membrane. *Science* **330**, 226–228.

Nakamura, Y., Awai, K., Masuda, T., Yoshioka, Y., Takamiya, K. and Ohta, H. (2005) A Novel Phosphatidylcholine-hydrolyzing Phospholipase C Induced by Phosphate Starvation in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **280**, 7469–7476.

Nakamura, Y., Kobayashi, K. and Ohta, H. (2009a) Activation of galactolipid biosynthesis in development of pistils and pollen tubes. *Plant Physiol. Biochem.* **47**, 535–539.

Nakamura, Y., Koizumi, R., Shui, G., Shimojima, M., Wenk, M.R., Ito, T. and Ohta, H. (2009b) *Arabidopsis* lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20978–83.

Nakamura, Y. (2013) Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Prog. Lipid*

Res. **52**, 43–50.

Narise, T., Kobayashi, K., Baba, S., Shimojima, M., Masuda, S., Fukaki, H. and Ohta, H. (2010) Involvement of auxin signaling mediated by IAA14 and ARF7/19 in membrane lipid remodeling during phosphate starvation. *Plant Mol. Biol.* **72**, 533–544.

Nilsson, L., Muller, R. and Nielsen, T.H. (2007) Increased expression of the MYB-related transcription factor, *PHR1*, leads to enhanced phosphate uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell Environ.* **30**, 1499–1512.

Okazaki, Y. and Saito, K. (2014) Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. *Plant J.* **79**, 584–596.

Pant, B.D., Burgos, A., Pant, P., Cuadros-Inostroza, A., Willmitzer, L. and Scheible, W.-R. (2015) The transcription factor PHR1 regulates lipid remodeling and triacylglycerol accumulation in *Arabidopsis thaliana* during phosphorus starvation. *J. Exp. Bot.* **66**, 1907–1918.

Pejchar, P., Pleskot, R., Schwarzerová, K., Martinec, J., Valentová, O. and Novotná, Z. (2008) Aluminum ions inhibit phospholipase D in a microtubule-dependent manner. *Cell Biol. Int.* **32**, 2007–2009.

Pejchar, P., Potocký, M., Krčková, Z., Brouzdová¡, J., Daněk, M. and Martinec, J. (2015) Non-specific phospholipase C4 mediates response to aluminum toxicity in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* **6**, 4–11.

Poincelot, R.P. (1973) Differences in Lipid Composition between Undifferentiated and Mature Maize Chloroplasts. *Plant Physiol.* **51**, 802–4.

Popendorf, K.J., Lomas, M.W. and Van Mooy, B.A.S. (2011) Microbial sources of intact polar diacylglycerolipids in the Western North Atlantic Ocean. *Org. Geochem.* **42**, 803–811.

Qi, Y., Yamauchi, Y., Ling, J., Kawano, N., Li, D. and Tanaka, K. (2004) Cloning of a putative monogalactosyldiacylglycerol synthase gene from rice *(Oryza sativa* L.) plants and its expression in response to submergence and other stresses. *Planta* **219**, 450–8.

Qin, C. and Wang, X. (2002) The Arabidopsis Phospholipase D Family. Characterization of a Calcium-Independent and Phosphatidylcholine-Selective PLDζ1 with Distinct Regulatory

Domains. *Plant Physiol.* **128**, 1057–1068.

Ramos-Díaz, A., Brito-Argáez, L., Munnik, T. and Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2007) Aluminum inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway. *Planta* 393–401.

Roston, R.L., Wang, K., Kuhn, L.A. and Benning, C. (2014) Structural Determinants Allowing Transferase Activity in SENSITIVE TO FREEZING 2, Classified as a Family I Glycosyl Hydrolase. *J. Biol. Chem.* **289**, 26089–26106.

Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martin, A.C., Iglesias, J., Leyva, A. and Paz-Ares, J. (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* **15**, 2122–2133.

Russo, M.A., Quartacci, M.F., Izzo, R., Belligno, A. and Navari-Izzo, F. (2007) Long- and short-term phosphate deprivation in bean roots: Plasma membrane lipid alterations and transient stimulation of phospholipases. *Phytochemistry* **68**, 1564–1571.

Sairanen, I., Novák, O., Pěnčík, A., Ikeda, Y., Jones, B., Sandberg, G. and Ljung, K. (2012) Soluble Carbohydrates Regulate Auxin Biosynthesis via PIF Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 4907–4916.

Samac, D.A. and Tesfaye, M. (2003) Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils - a review. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **75**, 189–207.

Sebastián, M., Smith, A.F., González, J.M., Fredricks, H.F., Van Mooy, B., Koblížek, M., Brandsma, J., Koster, G., Mestre, M., Mostajir, B., Pitta, P., Postle, A.D., Sánchez, P., Gasol, J.M., Scanlan, D.J. and Chen, Y. (2016) Lipid remodelling is a widespread strategy in marine heterotrophic bacteria upon phosphorus deficiency. *ISME J.* **10**, 968–978.

Shavrukov, Y. and Hirai, Y. (2016) Good and bad protons: genetic aspects of acidity stress responses in plants. *J. Exp. Bot.* **67**, 15–30.

Shemi, A., Schatz, D., Fredricks, H.F., Van Mooy, B.A.S., Porat, Z. and Vardi, A. (2016) Phosphorus starvation induces membrane remodeling and recycling in *Emiliania huxleyi*. *New Phytol.* **211**, 886-898

Shimojima, M. and Ohta, H. (2011) Critical regulation of galactolipid synthesis controls membrane differentiation and remodeling in distinct plant organs and following environmental changes. *Prog. Lipid Res.* **50**, 258–266.

Torres-Franklin, M.-L., Gigon, A., Melo, D.F. De, Zuily-Fodil, Y. and Pham-Thi, A.-T. (2007) Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. *Physiol. Plant.* **131**, 201–210.

Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. and Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* **473**, 55–60.

Van Mooy, B.A.S., Fredricks, H.F., Pedler, B.E., Dyhrman, S.T., Karl, D.M., Koblížek, M., Lomas, M.W., Mincer, T.J., Moore, L.R., Moutin, T., Rappé, M.S. and Webb, E.A. (2009) Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* **458**, 69–72.

von Uexküll, H.R. and Mutert, E. (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil* **171**, 1–15.

Wang, S., Uddin, M.I., Tanaka, K., Yin, L., Shi, Z., Qi, Y., Mano, J., Matsui, K., Shimomura, N., Sakaki, T., Deng, X. and Zhang, S. (2014) Maintenance of Chloroplast Structure and Function by Overexpression of the Rice *MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE* Gene Leads to Enhanced Salt Tolerance in Tobacco. *Plant Physiol.* **165**, 1144–1155.

Yamaryo, Y., Kanai, D., Awai, K., Shimojima, M., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K. and Ohta, H. (2003) Light and Cytokinin Play a Co-operative Role in MGDG Synthesis in Greening Cucumber Cotyledons. *Plant Cell Physiol.* **44**, 844–855.

Yamaryo, Y., Dubots, E., Albrieux, C., Baldan, B. and Block, M.A. (2008) Phosphate availability affects the tonoplast localization of PLDζ2, an *Arabidopsis thaliana* phospholipase D. *FEBS Lett.* **582**, 685–690.

Yu, B. and Li, W. (2014) Comparative profiling of membrane lipids during water stress in *Thellungiella salsuginea* and its relative *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **108**, 77–86.

Yuzawa, Y., Nishihara, H., Haraguchi, T., Masuda, S., Shimojima, M., Shimoyama, A., Yuasa, H.,

Okada, N. and Ohta, H. (2012) Phylogeny of Galactolipid Synthase Homologs Together with their Enzymatic Analyses Revealed a Possible Origin and Divergence Time for Photosynthetic Membrane Biogenesis. *DNA Res.* **19**, 91–102.

Zavaleta-Pastor, M., Sohlenkamp, C., Gao, J.-L., Guan, Z., Zaheer, R., Finan, T.M., Raetz, C.R.H., López-Lara, I.M. and Geiger, O. (2010) *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 302–307.

Zhang, M., Deng, X., Yin, L., Qi, L., Wang, X., Wang, S. and Li, H. (2016) Regulation of Galactolipid Biosynthesis by Overexpression of the Rice *MGD* Gene Contributes to Enhanced Aluminum Tolerance in Tobacco. *Front. Plant Sci.* **7:337**

Zhao, J., Wang, C., Bedair, M., Welti, R., Sumner, L.W., Baxter, I. and Wang, X. (2011) Suppression of Phospholipase Dγs Confers Increased Aluminum Resistance in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **6**, e28086

平舘俊太郎 (1999) 根から分泌される有機酸と土壌の相互作用. *化学と生物* **37**, 454-459

松本英明 (2003) 酸性土壌とアルミニウムストレス. *根の研究* **12**, 149-162

第2章　スクロース添加生育時におけるシロイヌナズナの糖脂質代謝の機能解析

2.1　序

糖過剰な生理条件に対して植物が示す応答機構と、リン欠乏な環境条件に対する応答機構との間には、類似性が指摘されている。たとえば、スクロース添加培地で生育した植物はリン酸トランスポーターの遺伝子発現が上昇する（Lejay, 2003）ほか、炭素代謝に関わる酵素をコードした遺伝子の幾つかについて、植物のリン酸含有量に応じた転写レベルでの制御機構の存在が知られている（Nielsen et al., 1998; Ciereszko et al., 2001a,b）。また、リン欠乏時のトランスクリプトーム解析や個々の遺伝子発現解析から、スクロース代謝に関わる酵素遺伝子の多くがリン欠乏によって発現制御を受けることも明らかにされている（Hammond et al., 2003; Vance et al., 2003; Wu et al., 2003; Misson et al., 2005; Müller et al., 2005, 2007; Hammond and White, 2008）。リン欠乏に高感受性を示すシロイヌナズナの *hypersensitive to phosphate starvation1*（*hps1*）は、スクローストランスポーターをコードした *SUC2* 遺伝子の機能が亢進した変異体であり、培地中のスクロースを根から過剰に吸収する（Lei et al., 2011）。*hps1* 変異体は、リン十分な生育条件においてもリン欠乏時と類似した表現型を示し、また、リン欠乏応答性遺伝子の発現が上昇していることが知られている。B-type MGDG 合成酵素遺伝子である *MGD3* についても、リン十分条件で生育した *hps1* において遺伝子発現量の増加が確認されている。これら一連の知見から、植物組織内におけるリンと糖の含量のバランスは植物の生育に大きな影響を与えていることが推測されるが、その詳細な分子機構については不明であった。また、リン欠乏時の膜脂質転換に寄与する遺伝子群のスクロース応答性や、糖過剰な生理条件におけるガラクト脂質代謝の制御機構およびその生理的意義については、詳細な議論がなされていなかった。

本研究では、培地に糖（スクロース）を添加して生育させたシロイヌナズナ野生株と *MGD3* の欠損株、および *MGD3* を恒常的に過剰発現させた形質転換体を用いて様々な解析を行った。その結果、リン十分かつ糖過剰な生育条件下で見られる植物体の生育促進にお

いて、葉緑体外包膜上におけるガラクト脂質合成が担う役割を明らかにした。

2.2　実験材料と方法

2.2.1　植物試料とその生育条件

シロイヌナズナ野生株(WT)はColumbia-0を用いた。*MGD3*欠損株(*mgd3*)はKobayashi et al.（2009）と同じ系統を用いた。植物体は0.8％（w/v）INAアガー、20 mM MES-KOH（pH 6.0）を含んだMS培地（Murashige and Skoog, 1962）上にて、23 ℃、連続光条件で生育させた。スクロース添加培地の作成にあたっては、上記のMS培地に1％（w/v）スクロースを、対照培地の作成にあたっては浸透圧を揃えるために0.53％（w/v）のマンニトールを加えた。

MGD3過剰発現株の作出においては、プラスミドベクターpBI121の35S-CaMVプロモーター下にシロイヌナズナ*MGD3*（At2g11810）cDNAの終始コドンを除く全長配列およびGFPタグを挿入したコンストラクトを作成し、アグロバクテリウムを用いたフローラル・ディップ法（Clough and Bent, 1998）を改変した方法によりWTへの形質転換を行った。形質転換体は50 μg/mLのカナマイシンを含む培地で選抜を行った。

2.2.2　定量的RT-PCR

植物試料からの全RNAの抽出にはSV Total RNA Isolation System（Promega）を用いた。逆転写反応にはPrimeScript RT reagent kit（Takara）を用いてcDNA合成を行った。PCR反応はSYBR Premix Ex Taq II（Takara）を用い、Thermal Cycler Dice Real Time System（Takara）によってシグナル検出を行った。定量RT-PCRは以下の手順で行った。各反応系は最終液量が25 μLとなるように、6 ngのRNA由来の逆転写産物であるcDNA、10 μLのSYBR Premix Ex Taq IIおよび0.4 μMのプライマーを含むよう調製を行った。PCRのプログラムは、95 ℃ 30秒に続き、95 ℃ 5秒、60 ℃ 30秒の増幅を40サイクル行った後、95 ℃ 15 秒、60 ℃ 30 秒の処理を行った。リファレンス遺伝子としては *UBQ10*（At4g05320）を用いた。プライマー配列は表 2-1に示した。*TPS5*、*TPS1*、*TPPB*、*AKIN11*のプライマーセットの配列はNunes et al.（2013）を、*MGD2*、*IPS1*、*At4*のプライマーセットは Narise et al.（2010）を、*CYCD2;1*、*CDKA1*のプライマーセットはSanz et al.（2011）をそれぞれ参照した。

2.2.3　植物体の新鮮重量の測定

植物の地上部および根の新鮮重量は、3〜5 個体をまとめて試料重量を測定し、その平均値を個体あたりの新鮮重量とした。こうして 12 回測定を行った結果を用いて、平均値±SE を算出した。

2.2.4　ウェスタンブロット解析

WT および MGD3 過剰発現株を 50 mM Tris-HCl（pH 7.5）で破砕し、3,000 × *g* で 10 分間の遠心分離により組織残渣を取り除いた上澄を全抽出画分タンパク質とした。20 μg の地上部由来の全抽出画分タンパク質および、10 μg の根由来の全抽出画分タンパク質を、12.5％ ポリアクリルアミドの SDS-PAGE によって分画し、ニトロセルロース膜（Whatman）に転写を行った。1 次抗体として、5,000 倍に希釈した抗 GFP モノクローナル抗体（Clontech）を用いて 23 ℃、3 時間インキュベートの後、2 次抗体として 100 倍に希釈した horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG（Thermo Scientific）で 23 ℃、1 時間インキュベートを行った。バンドの検出には化学発光基質として SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate（Thermo Scientific）を、感光材として Hyperfilm ECL（GE Healthcare）を、それぞれ用いた。

細胞内局在解析に際しては、全抽出画分タンパク質を 125,000 × *g*、1 時間の超遠心分離によって可溶性画分（上澄）とミクロソーム膜画分（沈殿）とに分画を行った。それぞれの画分について、上述の SDS-PAGE およびブロッティング、抗体処理を行った後、抗 GFP 抗体由来のバンドを Image Quant LAS 500（GE Healthcare）によって検出した。

葉緑体への局在解析に際しては、Protease Inhibitor Cocktail（Roche; complete Mini）を含む 50 mM HEPES-KOH、330 mM ソルビトール、2.0 mM EDTA、1.0 mM $MgCl_2$、1.0 mM $MnCl_2$、pH 7.8 の破砕バッファーを用いて植物をブレンダーで破砕し、2,000 × *g* で 5 分間遠心分離した沈殿を無傷葉緑体の濃縮画分とした。上澄（非無傷葉緑体画分）と無傷葉緑体画分について上述の SDS-PAGE およびブロッティング、抗体処理を行った。LHCB6 の検出においては、1 次抗体として 5,000 倍に希釈した抗 LHCB6 モノクローナル抗体

（Agrisera）を、2 次抗体として 10,000 倍に希釈した anti-rabbit IgG secondary antibody（Vector Laboratories）をそれぞれ用い、検出には Image Quant LAS 500（GE Healthcare）を用いた。

2.2.5　ガラクト脂質合成活性の測定

WT および MGD3 過剰発現株の地上部を破砕した後、3,000 × *g* で 5 分間遠心分離した上澄を 125,000 × *g* での 1 時間の超遠心分離にかけて得られた沈殿（ミクロソーム膜画分）を活性測定に用いた。ガラクト脂質合成活性は ^{14}C でラベルされた UDP-ガラクトースを基質として用い、Yamaryo らの方法に従って測定を行った（Yamaryo et al., 2003; Shimojima et al., 2013）。アッセイ用プレミクスとして、ミクロソーム膜画分タンパク質 40 μg または 200 μg、6.4 mM dioleoylglycerol、0.01 %（w/v）Tween 20, 10 mM dithiothreitol、10 mM sodium acetate、18 mM MOPS-KOH（pH 7.8）を調製し、これを 30 ℃で 5 分間インキュベートした後 10 μL の ^{14}C-labeled UDP-galactose（8.08 mM、91.6 Bq/nmol）を加えて反応を開始した。反応の停止、および反応産物であるガラクト脂質の抽出には酢酸エチルを用いた。抽出した脂質はシリカゲルプレート上での薄層クロマトグラフィー（アセトン／トルエン／水＝136：45：13、v/v/v）で分画した後、フルオロイメージアナライザー（FLA-7000、Fujifilm）によって検出した。

2.2.6　脂質解析

Bligh-Dyer 法によって総脂質の抽出を行った（Bligh and Dyer, 1959）。具体的な手順は以下の通りである。0.5 ～1 g の植物試料を 3 mL のクロロホルム／メタノール（1 : 2, v/v）を用いて破砕し、1,600 × *g* で 5 分間遠心分離した上澄を取得した。残渣に 3 mL のクロロホルム／メタノール（1 : 2, v/v）と 0.8 mL の 1 % KCl（w/v）を加えてよく撹拌し、再度 1,600 × *g* で 5 分間遠心分離して得られた上澄を先ほどの上澄と併せて分取した。ここに 2 mL のクロロホルムと 1.2 mL の 1 % KCl（w/v）を加えてよく撹拌した後、1,600 × *g* での 5 分間の遠心分離によって得られた二層分離したうちの下層を極性脂質画分として取得した。極性脂質種の分画は、シリカゲルプレート（TLC Silica gel 60, Glass plates 20×20 cm,

Merck）を用いた2次元薄層クロマトグラフィーによって行った（Kobayashi et al., 2007）。1次元目の展開溶媒組成は、クロロホルム／メタノール／7 Nアンモニア水（115 : 80 : 8、v/v/v）とし、2次元目の展開溶媒組成はクロロホルム／メタノール／酢酸／水（170 : 25 : 15 : 3、v/v/v/v）とした。こうして分画された各脂質のシリカゲルスポットをかき取り、塩酸メタノール（Methanolic HCl, 3N、Supelco）中で85 ℃、1時間の反応により脂肪酸メチルエステルへと変換した後、ヘキサンを用いて抽出し、ガスクロマトグラフィーによって定量を行った。ガスクロマトグラフィーによる定量の内部標準には既知の濃度のペンタデカン酸を用いた。

脂質および脂肪酸の定量分析には、水素炎イオン化検出器（FID）を接続したガスクロマトグラフィー（GC-2014、Shimadzu）を用いた。カラムはULBON HR-SS-10（長さ：25 m、内径：0.25 mm、Shinwa）を用い、カラムオーブン温度180 ℃、検出器温度250 ℃とした。キャリアガスにはヘリウムを用い、カラム流量0.53 mL/min、1サンプルあたりの保持時間は20分間とした。

ミクロソーム膜画分の脂質解析においては、2.2.4項に記載した方法で分画したミクロソーム膜画分に10倍量のクロロホルム／メタノール（2 : 1、v/v）を加えてよく撹拌し、1,600 × *g* で5分間遠心分離した後の上澄を捨て、下層に等量の0.45 % NaCl（w/v）を加えて再度撹拌、遠心分離を行って得られた下層をミクロソーム膜画分の総脂質として取得した。以降の薄層クロマトグラフィーによる分離からガスクロマトグラフィーを用いた定量の方法は上記と同様の方法で行った。

2.2.7　無機リン酸含量の定量

植物体地上部および根から遊離の無機リン酸を抽出し、リンモリブデン酸アッセイによる比色定量を行った（Chiou et al., 2006）。植物試料は10 mM Tris、1.0 mM EDTA、100 mM NaCl、1.0 mM β-メルカプトエタノール、pH 8.0の抽出バッファー中で破砕し、12,000 × *g* での10分間の遠心分離により残渣を取り除いた。つぎに、この上澄100 μL に900 μL の1 % 氷酢酸を加え、42 ℃で30分間インキュベートを行った。12,000 × *g* で5分間遠心分離した上澄300 μL を分取し、700 μL の0.35 %（w/v）NH_4MoO_4、0.43 M H_2SO_4、

1.4 %（w/v）アスコルビン酸を含むアッセイバッファーと混和し、42 ℃で 30 分間インキュベートを行った後、820 nm における吸光度を測定した。遊離の無機リン酸の含量は既知濃度のリン酸を用いて作成した標準曲線に従って算出した。

2.2.8　光合成活性の測定

PAM クロロフィル蛍光測定法には Dual-PAM（Walz）を用いた。まず、暗順応させた植物に 655 nm の測定パルス光を 0.05 – 0.15 μmol photons/m^2/s^1 強度で照射することで、クロロフィル蛍光強度の最小値（Fo）を測定した。ここに 800 nm の飽和パルス光を照射することでクロロフィル蛍光強度の最大値（Fm）を測定し、続いて 80 μmol photons/m^2/s^1 の励起光を照射しながら同様に飽和パスル光を照射した際の蛍光強度（Fm’）を測定した。また励起光のもとで定常状態となった蛍光強度、および励起光停止後の蛍光強度をそれぞれ、Fs、Fo’とした。以上の測定値を用いて、各種蛍光パラメーターの算出を以下の方法で行った。

最大量子収率　Fv/Fm = （Fm – Fo） / Fm

光化学消光　qP = （Fm' – Fs） / （Fm' – Fo'）

非光化学消光　NPQ = （Fm – Fm'） / Fm'

実効量子収率　ΦII = （Fm' – Fs） / Fm'

2.2.9　クロロフィル含量の定量

植物試料を 80 %アセトン（v/v）で破砕することでクロロフィルの抽出を行い、12,000 × *g*、4 ℃で 5 分間遠心分離した上澄を、分光光度計（U-0080D、HITACHI）を用いて吸光度を測定した。全クロロフィル量の算出は以下の式に従った（Porra, 2002）。

全クロロフィル （nmol/mL） = 19.54 * （$A_{646.8}$ − A_{720}） + 8.29 * （$A_{663.2}$ − A_{720}）

2.2.10　スクロース含量の定量

可溶性の糖の抽出は、植物試料を 80 %エタノール（v/v）で破砕した後、80 ℃、10 分間のインキュベートにより行った。2,500 × *g*、10 分間の遠心分離処理後の上澄を窒素ガス留

去下で溶媒を揮発させ、新たに 50％（v/v）クロロホルムを加えボルテックスして得られた上層（水層）を定量に用いた。グルコースの定量には、Glucose Colorimetric/Fluorometric Assay Kit（Bio Vision）を用いた。スクロース定量には、Invertase Solution from Yeast（Wako）を 50％（v/v）の終濃度になるように加え 25 ℃で 1 時間反応させた試料を用いて、上記の方法に従ってグルコース定量を行った。Invertase 処理を行った際のグルコース含量から Invertase 未処理のグルコース含量を引くことで、スクロース含量を算出した。

2.2.11　スクロースの根からの吸収および脂質代謝への取込活性の測定

スクロースの根からの吸収にあたっては、Lei et al.（2011）を参照した。スクロースを添加していない MS 培地で 2 週間生育させた植物体を MS 液体培地（pH 5.7）に根が浸かるよう 30 分インキュベートした後、0.1％（w/v）スクロース中に ^{14}C でラベルされたスクロース（0.5 mCi/mL）を含む MS 液体培地に移しさらに 2 時間インキュベートを行った。試料を 1％（w/v）スクロースで 2 回洗浄し、根を切除して、地上部に取り込まれた ^{14}C をシンチレーションカウンター（LS6500, Beckman）を用いて測定した。また、試料から抽出した脂質はシリカゲルプレートを用いた薄層クロマトグラフィー（アセトン／トルエン／水＝136：45：13、v/v/v）によって分画し、各脂質種のスポットにおける放射活性をフルオロイメージアナライザー（FLA-7000, Fujifilm）で測定した。

2.3　結果

2.3.1　スクロース添加培地におけるシロイヌナズナ野生株の遺伝子発現応答

はじめに、シロイヌナズナにおいてリン欠乏時の膜脂質転換に寄与する遺伝子群の、培地へのスクロース添加に対する応答機構を調べるため、1％（w/v）スクロースを添加したMS培地（以後、スクロース添加培地または+sucと記載する）、またはスクロース添加時と同じ浸透圧となるように0.53％（w/v）マンニトールを添加したMS培地（以後、対照培地または-sucと記載する）においてシロイヌナズナ野生株（WT）を生育させ、定量的RT-PCR法を用いて植物体地上部および根における遺伝子発現量を解析した（図2-1）。対象とした遺伝子は、*MGD1*、*MGD2*、*MGD3*、*DGD1*、*DGD2*、*NPC5*、*SUC2*、*IPS1*、*At4*の9つである。

対照培地生育時に対する、スクロース添加時の植物体地上部における遺伝子発現解析の結果（図2-1（A））、スクロートランスポーターをコードする*SUC2*の発現量が2倍程度に上昇していた。*SUC2*は通常、ソース器官（主に光合成器官）からシンク器官（主に根など）への炭素同化産物の輸送において、スクロースを師管へと積み込む機能を担っている（Sauer et al., 1994; Truernit and Sauer, 1995）。一方、SUC2の機能が亢進した植物体である*hps1*は培地からのスクロースの取り込み活性が増加することから、培地中のスクロースの根からの吸収および輸送にも寄与していると考えられている（Lei et al., 2011）。A-type MGDG合成酵素をコードする*MGD1*はスクロース添加による発現変動が見られなかったのに対し、B-type MGDG合成酵素をコードする*MGD2*および*MGD3*は2倍程度の発現上昇を示した。DGDG合成酵素をコードする*DGD1*と*DGD2*、PCの極性頭部を加水分解する*NPC5*（Gaude et al., 2008）はいずれもリン欠乏に発現応答を示し、リン欠乏時の膜脂質転換に寄与することが知られている脂質代謝酵素遺伝子であるが（Härtel et al., 2000; Kelly and Dörmann, 2002; Kelly et al., 2003; Gaude et al., 2008）、これら3遺伝子はいずれもスクロース添加による植物体地上部での発現変動が見られなかった。一方、リン欠乏に応答するノンコーディング遺伝子である*IPS1*および*At4*（Martín et al., 2000; Rubio et al., 2001; Bari et al., 2006; Narise et al., 2010）の植物体地上部における発現量は、スクロース添加による増加が見られた（図2-1（A））。

また、根におけるスクロース添加時の遺伝子発現解析の結果（図 2-1（B））、*MGD2* および *MGD3* の発現上昇に加えて、*DGD2* と *NPC5* に関しても発現量の増加がみられた。また、地上部においてスクロース添加時に発現上昇がみられた *SUC2*、*IPS1*、*At4* の遺伝子については、根における発現変動を示さなかった。

以上の結果から、リン欠乏時の膜脂質転換に寄与する遺伝子の一部がスクロース添加に応答した発現上昇を示すことがわかった。また、スクロース添加の遺伝子発現への影響は植物体地上部と根で異なっており、器官特異的な制御機構が働いていることが示唆された。

2.3.2　スクロース添加培地における *MGD3* 欠損株の生育

生育培地へのスクロース添加は、植物の生育を促進させることが知られている（Karthikeyan et al., 2007）。そこで次に、スクロース添加によって地上部および根の両方で遺伝子発現量が増大していた *MGD3* に着目し、スクロース添加時にみられる植物の生育促進における、B-type MGDG 合成酵素の寄与を検証するための実験を行った。スクロース添加培地または対照培地において WT およびシロイヌナズナ *MGD3* 欠損株（*mgd3*）を生育させ、新鮮重量を地上部と根に分けて測定した（図 2-2）。

対照培地において生育を行った場合には、植物体地上部および根における WT と *mgd3* の新鮮重量にいずれも差異は認められなかったのに対し、スクロース添加培地において生育を行った場合の *mgd3* の新鮮重量は、地上部が WT の 90％ 程度、根が WT の 86％ 程度にそれぞれ減少していた。

この結果から、スクロース添加生育時の植物の生育促進に MGD3 が寄与していることが示唆された。

2.3.3　シロイヌナズナ MGD3 過剰発現株の作出

スクロース添加培地での生育時における MGD3 の機能をさらに解析するために、シロイヌナズナ MGD3 過剰発現株の作出を行った。WT を遺伝的バックグラウンドとして、植物細胞において恒常的に発現する 35S-CaMV プロモーター下流に、終始コドンを除く *MGD3* の全長塩基配列と、その C 末端に GFP 配列を付与したコンストラクト（以後、*MGD3-GFP*

と記載）を作成し、アグロバクテリウムを用いて形質転換を行った（以後、MGD3 過剰発現株または OE と記載する）。この中から *MGD3-GFP* の発現量がとくに高かった 2 つのライン、OE3 と OE7 を選抜した。定量的 RT-PCR 法を用いた遺伝子発現解析の結果、スクロース添加培地で生育した OE3 および OE7 においては、WT に対する *MGD3* の相対発現量が、それぞれ約 100 倍と約 500 倍に増加していた（図 2-3）。また、いずれのラインも地上部と根における過剰発現の程度に差は見られなかった。

次に、過剰発現させた MGD3-GFP のタンパク質レベルでの蓄積および細胞内局在を確認するため、抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロット法によって MGD3-GFP タンパク質の発現解析を行った（図 2-4（A）（B））。植物体から抽出した全抽出画分タンパク質を用いたウェスタンブロット解析の結果、OE3 と OE7 は、植物体地上部と根の双方において MGD3-GFP タンパク質を高蓄積していることが示された（図 2-4（A））。また、このウェスタンブロット解析に用いた全抽出画分タンパク質の CBB 染色結果を図 2-4（B）に示した。OE7 は OE3 と比較して、mRNA と同様にタンパク質も高蓄積していることが示されたので、以降の解析には OE7 を主に用いた。図 2-4（A）において 75 kDa 付近に 2 本のバンドが見られた理由としては、MGD3 の CDS 配列において翻訳開始点から 183bp 下流に存在する ATG から翻訳が始まった場合に想定されるタンパク質の分子量が下方のバンドサイズとほぼ等しいことから、一部、MGD3-GFP の全長配列を有していないタンパク質が翻訳されている可能性が考えられた。しかしながら、下流の開始コドンから翻訳が始まった場合にもフレームシフトのない、活性部位を有する MGD3-GFP がつくられると予想されたこと、また、上方の目的バンドが十分に検出されていたことから、これらの植物体において MGD3-GFP の過剰発現は達成されているものと考えた。

次に、遠心分離による可溶性画分と膜画分の分画によって、OE7 における MGD3-GFP の細胞内局在を調べた（図 2-4（C）（D））。OE7 全抽出画分を 3,000 × *g* での遠心分離によって沈殿（チラコイド膜濃縮画分、レーン 1）と上澄（レーン 2）に分画し、さらにレーン 2 の画分を 125,000 × *g* での超遠心分離によって、沈殿（ミクロソーム膜画分、レーン 3）および上澄（可溶性画分、レーン 4）とに分画した。これらのタンパク質画分を用いてウェスタンブロット解析を行った結果、MGD3-GFP は可溶性画分には少なく、主にミクロ

ソーム膜画分（レーン 3）に蓄積していることが示された（図 2-4（C））。また、図 2-4（D）には、同サンプルに対する対照実験として行った CBB 染色結果を示した。

ミクロソーム膜画分は葉緑体包膜や細胞膜、小胞体膜などの、チラコイド膜以外の生体膜から主に構成されている。そこでさらに、MGD3-GFP の葉緑体包膜上における局在を確認するため、OE7 から無傷葉緑体の単離を行った。OE7 植物体をブレンダーで破砕した抽出液（総タンパク質、レーン 1）を 2,000 × *g* での低速遠心にかけることによって得られた上澄（非無傷葉緑体画分、レーン 2）と沈殿（無傷葉緑体画分、レーン 3）に分画し、抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロットによって MGD3-GFP の検出を行った（図 2-5（A））。その結果、過剰発現させた MGD3-GFP の大部分は破砕された葉緑体包膜断片などを含む画分（レーン 2）に検出されたが、無傷葉緑体画分（レーン 3）にも検出された。また、レーン 3 が無傷葉緑体画分であることを、チラコイド膜に局在する LHCB6（Light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein）に結合する抗体を用いたウェスタンブロットによって確認した（図 2-5（B））。

続いて、過剰発現させた MGD3-GFP が MGDG 合成活性を有していることを確認するために、WT と OE7 のミクロソーム膜画分タンパク質を用いたガラクト脂質合成活性の測定を行った（図 2-6）。ガラクト脂質合成活性の測定には、MGDG 合成の基質として、ジアシルグリセロールと共に ^{14}C でラベルした UDP-ガラクトースを用いた。OE7 由来のミクロソーム膜画分の MGDG 合成活性は、WT 由来のミクロソーム膜画分と同程度であったが、これは通常生育時の主要な MGDG 合成酵素である MGD1 の活性によるものであると考えられた。一方、OE7 の DGDG 合成活性は WT に対して有意に増加していた。リン欠乏時に MGD3 によって葉緑体外包膜上で合成される MGDG は速やかに DGDG 合成の基質として使われることを考慮すると、一連の結果より、過剰発現させた MGD3-GFP は葉緑体包膜に局在し、MGDG 合成活性を有する形で機能していると考えられたため、この MGD3-GFP 過剰発現株を用いてさらなる解析を行うことにした。

2.3.4　スクロース添加培地における MGD3 過剰発現株の生育

MGD3 過剰発現株として得られた OE3 および OE7 を、スクロース添加培地（+suc）ま

たは対照培地（-suc）において生育させ、WT との新鮮重量比較を行った（図 2-7）。

地上部の新鮮重量比較の結果、スクロース添加培地で生育した OE3 および OE7 の新鮮重量は、WT に対してそれぞれ約 13 % および約 14 % 程度増加していた。対照培地での生育時は、OE7 が WT と同程度の新鮮重量を示したのに対し、OE3 は 26 % 程度の増加を示した（図 2-7（A）（B））。

根の新鮮重量比較の結果、OE7 はスクロース添加の有無にかかわらず WT と同程度の新鮮重量を示したのに対し、OE3 では対照培地での生育時にのみ WT に対して新鮮重量の増加が見られた（図 2-7（C）（D））。

以上の結果から、OE3 と OE7 の間で根の表現型の違いは見られたものの、いずれの MGD3 過剰発現株もスクロース添加培地で生育した際の地上部新鮮重量が増加していたことから、スクロース添加時における植物体地上部生育促進への MGD3 の寄与が示唆された。このことは、スクロース添加培地で生育させた *mgd3* が、WT に対して地上部新鮮重量の減少を示した結果を支持した（図 2-2）。

2.3.5　スクロース添加培地におけるシロイヌナズナの膜脂質組成

リン欠乏が膜脂質組成に与える影響については既に多くの先行研究が存在するが、生育培地へのスクロース添加の有無が植物の膜脂質組成に与える影響についての詳細な解析はなされていなかった。そこで次に、スクロース添加培地（+suc）および対照培地（-suc）において生育させた WT および OE7 の膜脂質組成解析を行った（図 2-8）。

まず、スクロース添加培地と対照培地で生育させた WT 地上部の膜脂質組成を比較すると（図 2-8（A））、スクロース添加時に DGDG が有意に増加（約 2.0 %）したのに対し、DGDG 合成の前駆体である MGDG は減少（約 3.4 %）していた。また、OE7 の地上部膜脂質組成をスクロース添加の有無で比較した場合にも、WT と同様にスクロース添加時の DGDG の増加（約 4.4 %）と、MGDG の減少（約 2.6 %）が示された。スクロース添加培地で生育させた OE7 における *MGD3* の発現量は、リン欠乏時の WT でみられる発現応答と同程度かそれ以上であった（図 2-3；Narise et al., 2010）。しかし、リン欠乏時の WT においては通常生育時と比較して DGDG が 15 % 近く増加するのに対し（Kobayashi et al.,

2009)、スクロース添加培地で生育したWTとOE7それぞれの地上部の総膜脂質組成を比較するとDGDGの増加量は僅かであり（3 %以下)、統計的有意差はみられなかった（図2-8（A))。

リン欠乏時に増加するDGDGは葉緑体外の生体膜に蓄積することが知られている（Andersson et al., 2003, 2005; Jouhet et al., 2004)。そこで次に、スクロース添加時のOE7地上部の膜脂質組成において僅かに増加していたDGDGが葉緑体外の生体膜に蓄積しているかを検証するために、葉緑体チラコイド膜以外の生体膜を濃縮したミクロソーム膜画分の脂質組成を解析した（図2-8（B))。通常生育時、チラコイド膜におけるMGDGとDGDGの構成比は2:1である（Poincelot, 1973)。このため、WTのミクロソーム膜画分においてそれぞれ約16 %と約8 %を占めていたMGDGとDGDGは、チラコイド膜の混入を示していると考えられた。一方、OE7のミクロソーム膜画分においてもWTと同程度（約16 %）のMGDGの混入がみられたのに対し、DGDGは13 %程度を占めていた。このことからOE7のミクロソーム膜画分において有意に増加していたDGDGは、葉緑体チラコイド膜以外の生体膜に蓄積していることが示唆された。

次に、根の膜脂質組成解析の結果をみると、対照培地で生育したWTとOE7の比較、またはスクロース添加培地で生育したWTとOE7の比較において、いずれの生育条件においてもOE7の根はWTに比べてDGDGを多く蓄積していることがわかった。一方、WTとOE7いずれの植物体においても、対照培地生育時に対する、スクロース添加時のDGDG増加は認められなかった（図2-8（C))。

また、全脂肪酸量についてはスクロース添加の有無、および地上部・根という器官の違いにかかわらず、WTとOE7の間に差異は認められなかった（図2-9)。

2.3.6 MGD3 過剰発現株における無機リン酸およびクロロフィル含量と光合成活性

リンを含まない培地で生育させた植物体の無機リン酸含量は著しく減少する（Narise et al., 2010)。リン欠乏条件下で生育した植物は生体膜中のリン脂質を分解することで、他の生体反応に必要なリンを供給し、リンの利用効率を高めていると考えられている。そこで次

に、スクロース添加時にみられた DGDG の増加がリンの利用効率に及ぼしている影響を調べる解析を行った。スクロース添加培地（+suc）と対照培地（-suc）で生育させた WT と OE7 における細胞中の遊離の無機リン酸含量を測定した結果、WT と OE7 は、地上部と根のいずれの部位においても、同程度の無機リン酸を含有していることが示された（図 2-10（A））。このことから、DGDG の増加は、細胞内のリンの利用効率には影響を与えていないことが示唆された。

次に、スクロース添加培地（+suc）と対照培地（-suc）において生育させた WT および OE7 のクロロフィル含量を測定した（図 2-10（B））。クロロフィル含量に関しても、WT と OE7 の間に差は見られなかった。また、スクロース添加培地において生育させた WT および OE7 を用いて、PAM クロロフィル蛍光測定法による光合成活性測定を行った（表 2-2）。クロロフィル蛍光強度から算出した、最大量子収率（Fv/Fm）、光化学消光（qP）、非光化学消光（NPQ）、実効量子収率（ϕII）、いずれの光合成活性パラメーターについても WT と OE7 の間に違いは見られなかった。

以上の結果より、スクロース添加条件下における OE7 の生育促進の直接の原因は、リンの利用効率や光合成活性の上昇によるものではないことが示唆された。

2.3.7　MGD3 過剰発現株におけるスクロース代謝の解析

スクロースは植物体内で同化された炭素の主要な輸送形態である（Lemoine, 2000）。OE7 はスクロース添加条件下において生育が促進されるが、クロロフィル含量および光合成活性には WT と比較して差が見られなかった（図 2-10、表 2-2）。そこで次に、細胞分裂周期とトレハロース-6-リン酸の代謝に関わる幾つかの遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法を用いて解析した（図 2-11）。トレハロース-6-リン酸の含量および代謝の活性化は、スクロース添加時の植物体生育促進に関連することが知られている（Zhang et al., 2009; Debast et al., 2011; Delatte et al., 2011; Martínez-Barajas et al., 2011）。しかし、いずれの遺伝子発現量に関しても WT と OE7 の間に差異は認められなかった。

これまでの解析結果から、OE7 のスクロース添加培地における生育促進は、根からのスクロースの吸収量の増大や、吸収したスクロースの代謝効率の上昇に起因しているのでは

ないかと考え、これを検証する実験を行った。まず、WT と OE7 の植物体地上部および根におけるスクロース含量を定量した（図 2-12）。対照培地（-suc）で生育させた OE7 のスクロース含量は、地上部または根のいずれの部位においても WT と同程度であったのに対し、スクロース添加培地（+suc）で生育させた際には、OE7 の地上部におけるスクロース含量は、WT の 75％ 程度に低下していた（図 2-12（A））。スクロース添加培地で生育した植物体は対照培地生育時と比較して、特に地上部におけるスクロース含量の増加が顕著であり、WT は対照培地の約 2.2 倍にまでスクロース含量が増加していた。これに対してスクロース添加培地で生育した OE7 の地上部スクロース含量は対照培地生育時の約 1.7 倍であり、このことが WT と OE7 のスクロース添加培地生育時の植物体地上部スクロース含量の差となって現れたと考えられた。一方、スクロース添加培地および対照培地それぞれの生育条件における、WT と OE7 の根が含有するスクロースの量には差が見られなかった（図 2-12（B））。

この結果を受け、OE7 において観察された地上部でのスクロース含量減少の原因を解明するため、^{14}C で放射性標識したスクロースを根から吸収させる実験を行った（図 2-13）。放射活性を有するスクロースを含む液体培地上で植物体を 2 時間静置した後に地上部と根を切り離し、地上部に輸送されたスクロースの放射活性を測定したところ、根から吸収されたスクロースの量には WT と OE7 の間に有意差はみられなかった（図 2-13（A））。次に、根から吸収されたスクロースの脂質代謝への取り込み活性を比較した（図 2-13（B））。スクロース処理後に植物体地上部から抽出した各脂質種の放射活性をみると、ガラクト脂質だけでなく各種リン脂質にも、スクロース由来の ^{14}C が多量に含まれていた。このことから、根から吸収されたスクロースは速やかに単糖に分解され、脂肪酸部位またはグリセロール骨格を構成する炭素源として脂質代謝に広く利用されていることが示唆された。根から吸収したスクロースに由来する各脂質種の ^{14}C の放射活性を比較したところ、OE7 においては DGDG に取り込まれた ^{14}C の割合が WT と比較して有意に増大していた（図 2-13（B））。この結果から、OE7 は WT と同程度のスクロースを根から吸収しながら、活性化された葉緑体外包膜上でのガラクト脂質代謝経路へスクロース由来の炭素源をより優先的に供給していることが示唆された。

スクロース由来の炭素は細胞内の様々な代謝に利用される。本実験では代謝産物の網羅的な解析は行っていないため、OE7 において観察された地上部でのスクロース含量減少の原因が DGDG 合成の活性化によるものであると断定することはできない。しかしながら、スクロース添加条件で生育した OE7 が DGDG を多く蓄積していたことと併せて考えると（図 2-8)、根から吸収したスクロースをガラクト脂質合成の基質として優先的に用いたことが、OE7 の地上部におけるスクロース含量減少の原因の一つであると考えられた。

2.4　考察

スクロース添加に応答したシロイヌナズナ野生株（WT）の植物体地上部における遺伝子発現解析の結果、スクローストランスポーターである *SUC2* に加えて、B-type MGDG 合成酵素遺伝子をコードする *MGD2* および *MGD3*、リン欠乏に応答する *IPS1* と *At4* の発現量が上昇していた。このことから、スクロース添加時における、リン欠乏に類似した遺伝子発現誘導機構の存在が示唆された。生育培地へのスクロースの添加がリン欠乏と類似した遺伝子発現応答を引き起こす例は過去にも報告があり（Hammond et al., 2003; Vance et al., 2003; Wu et al., 2003; Misson et al., 2005; Müller et al., 2005, 2007; Hammond and White, 2008）、今回の結果はこれらの既報を支持した。しかし、リン欠乏に応答し膜脂質転換に寄与する *DGD1*、*DGD2*、*NPC5* は、スクロース添加に応答した地上部での発現上昇を示さなかった（図 2-1）。このことから、スクロース添加は WT において、リン欠乏時の膜脂質転換に寄与する脂質代謝酵素遺伝子の全てに対して発現誘導を引き起こすわけではないことが明らかとなった。

シロイヌナズナの *hps1* 変異体は、SUC2 の機能が亢進した点変異導入植物体であり、スクロース添加培地で生育させた際の植物体地上部および根におけるスクロース含量が増加することが知られている（Lei et al., 2011）。*hps1* 変異体はリン欠乏に高感受性を示し、またリン十分条件においてもリン欠乏と同様の表現型を示すことから（Lei et al., 2011）、スクロースはリン欠乏応答を誘導するグローバル制御因子であると考えられている。*hps1* 変異体のマイクロアレイ解析の結果では、リン欠乏応答性遺伝子として知られているうち、約 70％ の遺伝子が通常時から発現誘導されていた。中でも *MGD3* は、*hps1* 変異体において高発現しているリン欠乏応答性遺伝子の上位 20 遺伝子に入っていた。一方で *DGD1* および *DGD2* の遺伝子発現量は *hps1* 変異体において WT と同程度、*NPC5* は WT の 5 分の 1 に発現が低下していた（Lei et al., 2011）。リン欠乏時にはこれらの遺伝子が協調的に発現誘導されることで、膜脂質転換が促進されている（Benning and Ohta, 2005; Nakamura, 2013）。今後はスクロース添加条件下での遺伝子発現の時間的変動など、より詳細な解析が必要であるが、スクロース添加に対する応答とリン欠乏に対する応答においては、類似しながらもそれぞれに異なる調節機構が働いていると考えられる。

スクロース添加生育時における MGD3 の機能を調べるため解析に用いた、MGD3-GFP を恒常的に過剰発現させた形質転換シロイヌナズナ（OE3 および OE7）について、当研究室の下村によって、リン欠乏条件下での生育および膜脂質組成が解析されている（下村, 修士論文, 2011）。その際の生育条件にはいずれも、本研究におけるスクロース添加条件と同様の 1 %スクロースを含む培地を用いていた。下村は、リン十分およびリン欠乏条件において OE3 および OE7 の地上部新鮮重量が WT と比較して増加していること、またリン十分時の DGDG 含量が WT（約 15 %）に対して、OE3（約 18 %）および OE7（約 20 %）では増加傾向にあることを示している。また、新鮮重量および DGDG 含量においては、OE3 は WT と OE7 の中間的値を示していた。一方、下村はスクロースを培地に加えない生育条件での解析は行っていなかった。本研究においても OE3 および OE7 は、スクロース添加培地において生育させた際の植物体地上部の新鮮重量が WT よりも増大していた（図 2-7）。また、本研究によって、WT と比較した OE7 の新鮮重量および DGDG 含量の増加は、スクロース添加時特異的な現象であることが明らかとなった（図 2-7; 図 2-8）。加えて、*MGD3* を欠損したシロイヌナズナ（*mgd3*）は、スクロース添加培地における生育時に、WT と比較して地上部の新鮮重量が減少していた（図 2-2）。スクロース添加に応答して *MGD3* の発現量が増大することと併せて考えると（図 2-1）、スクロース添加時の生育促進への MGD3 の寄与が強く示唆された。

OE7 における *MGD3* の発現量は、リン欠乏時にみられる誘導と比較すると、同程度かそれ以上であった（図 2-3；Narise et al., 2010）。しかし、リン欠乏時には、膜脂質組成に占める DGDG がリン十分時と比べて 15 % 程度増加するのに対し、OE7 の膜脂質組成に占める DGDG の増加量は、WT と比較して 3 %以下であった（図 2-8（A）；Kobayashi et al., 2009）。OE7 の膜脂質組成において、遺伝子発現量から期待されたほどには DGDG が増加していなかった理由として、二つの原因が考えられた。一つは、ガラクト脂質合成経路における MGD3 の下流、すなわち DGDG 合成の活性化が伴っていなかった点である。DGDG 合成酵素遺伝子をコードした *DGD1* および *DGD2* の地上部における発現量は、スクロース添加に応答を示さなかった（図 2-1（A））。MGDG 合成に対して DGDG 合成が追いつかない場合、膜脂質中への MGDG の蓄積が起こると考えられる。しかしながら、MGDG

は極性頭部が小さく、二分子膜構造を形成することができない非ラメラ脂質であるため、MGDG の細胞膜への高蓄積は細胞毒性を示すと考えられている（Murphy, 1986）。実際に、形質転換により MGDG を高蓄積した大腸菌は細胞膜表面が荒くなる表現型を示し、細胞分裂に異常をきたすことが報告されている（Gad et al., 2001）。DGDG がそれほど増加しなかった OE7 においては、前駆体となる MGDG にも増加が認められなかったことから、植物細胞内において葉緑体外の生体膜への MGDG の高蓄積を妨げるような何らかのフィードバック制御が存在する可能性がある。

OE7 において DGDG の大幅な増加が見られなかった原因の二つ目として考えられたことは、ガラクト脂質合成経路における MGD3 の上流部分、すなわちリン脂質の分解によるガラクト脂質合成への基質供給が活性化されていなかった点である。リン欠乏時の膜脂質転換では、ガラクト脂質合成の活性化に伴ってリン脂質の分解も促進される。その結果として DGDG が増加する反面、PC や PE が大幅に減少する（Essigmann et al., 1998; Härtel and Benning, 2000; Tjellström et al., 2008）。植物体地上部において、スクロース添加に応答した *NPC5* の発現上昇は見られなかった（図 2-1（A））。また、スクロース添加時の膜脂質組成においては、WT と OE7 の双方がスクロース添加に応答して DGDG を増加させたのに対し、PC および PE の減少は見られなかった（図 2-8（A））。これらの結果から、スクロース添加時の OE7 においては、MGDG 合成以外の脂質代謝全体のフローが協調的に活性化されていなかったために、リン欠乏時の膜脂質転換のような DGDG の大幅な増加が起こらなかったと考えられる。

WT と OE7 の遊離無機リン酸含量（図 2-10（A））、クロロフィル含量（図 2-10（B））、および光合成活性（表 2-2）には差が見られなかった。ところが、WT と OE7 の植物体スクロース含量を定量したところ、OE7 の地上部のスクロース含量が WT と比較して有意に減少していた（図 2-12）。また、WT と OE7 の根からのスクロース吸収量には差が見られず（図 2-13（A））、OE7 はスクロース由来の炭素をより優先的に DGDG 合成に利用していたことから（図 2-13（B））、B-type MGDG 合成酵素を介した葉緑体外包膜におけるガラクト脂質合成は、炭素源としての糖を優先的に膜脂質合成に利用することで、スクロース添加培地における植物体地上部の生育促進に寄与していたと考えられる。

培地へのスクロース添加によって植物体内に利用可能な糖が増加すると、細胞内のトレハロース-6-リン酸（T6P）の含量が増加することが知られている（Schluepmann et al., 2004; Lunn et al., 2006）。T6P は成長組織において SnRK1（SNF1-related protein kinase）の触媒活性を阻害することで、1000 を超える数の遺伝子発現に影響を及ぼす（Zhang et al., 2009; Debast et al., 2011; Delatte et al., 2011; Martínez-Barajas et al., 2011; Baena-González et al., 2007; Nunes et al., 2013）。しかし、*MGD3* が SnRK1 によって制御されるという知見は報告されておらず、また OE7 において T6P 代謝や SnRK1 を介したシグナル伝達に関わる遺伝子の発現量に変動が見られなかったことから（図 2-11）、本研究でみられたスクロース添加時における MGD3 過剰発現株の地上部生育促進は、SnRK1 を介した経路とは異なる制御機構によって誘導されていたと考えられる。

リン欠乏時の細胞内リンの減少に加えて、糖が増加すると植物はより強いリン欠乏応答を誘導するようになることから、植物細胞内におけるリンと糖の含有量比がリン欠乏の検知や発現制御において重要な役割を果たしていると考えられている（Lei and Liu, 2011）。また、本研究で得られた結果から、スクロース添加生育時には B-type MGDG 合成酵素が、過剰な糖の分解によって供給された炭素源を基質としてガラクト脂質合成を活性化していることが示唆されたことで、B-type MGDG 合成酵素を介したガラクト脂質合成が、リン欠乏適応時において担う生理的役割が新たに推察された。一つは、過剰な糖をガラクト脂質合成の炭素源として消費することで植物組織内における利用可能なリンと糖のバランスを適切な範囲内に保つ働きであり、もう一つは、植物の生育に伴って需要が増大する膜の構成要素として DGDG を供給することで、糖過剰な条件での生育促進に寄与するという働きである。これらの検証にはさらなる実験と議論を重ねる必要があるが、リン欠乏からリンを再供給した際のシロイヌナズナの脂質組成解析結果もこの仮説を支持している。リン再供給後には DGDG の速やかな分解が起こり、その分解量はリン脂質の合成量をはるかに上回ることから、リン欠乏時に蓄積する DGDG にはリン脂質を代替する役割の他に、炭素の貯蔵源としての機能を有することが示唆されている（藤原ら、投稿準備中）。本研究は MGD3 の生理機能に関する新たな知見を報告するとともに、リンと糖のバランス、およびガラクト脂質代謝と植物体生育の関係性を解き明かす糸口を示すことができたと考えている。

2.5　表および図

表 2-1.　定量的RT-PCRに用いたプライマー

Gene		Primer Sequences
MGD3	Fw	5' TCGTGGCGGATTGGTTTAG 3'
	Rv	5' CGTTGTTGTTGTTGGGATAGATG 3'
MGD2	Fw	5' GATTCGATCACTTCCTATCATCCTC 3'
	Rv	5' TGTGCTAAACCATTCCCCAAC 3'
DGD1	Fw	5' CTGAAGAGAGATCCCGTGGTG 3'
	Rv	5' TCCCAAGTTCGCTTTTGTGTT 3'
DGD2	Fw	5' TGCAGAACCTATGACGATGGA 3'
	Rv	5' GCTCTGTAAGTTGCGATGGTTG 3'
NPC5	Fw	5' TTCTTCATCTCCCCTTGGATTG 3'
	Rv	5' GTGACATTAGGTACGGCCCATT 3'
SUC2	Fw	5' TCCCTTTCCTTCTCTTCGACAC 3'
	Rv	5' CATAAGCCCCAAAGCACCA 3'
IPS1	Fw	5' AGACTGCAGAAGGCTGATTCAGA 3'
	Rv	5' TTGCCCAATTTCTAGAGGGAGA 3'
At4	Fw	5' CTGAAGCTCAAGAACCCTCTGAA 3'
	Rv	5' CCTCTCAAAACCCTTTATTGGTGA 3'
MGD1	Fw	5' AGGTTTCACTGCGATAAAGTGGTT 3'
	Rv	5' AACGGCAATCCCTCCTCAC 3'
CYCD2;1	Fw	5' GCTGCTGCAGTGTCTGTTTC 3'
	Rv	5' ACAGCTCTTACCGCAACTCG 3'
CYCD3	Fw	5' CAACTACCAGTGGACCGCATC 3'
	Rv	5' AATCACGCAGCTTGGACTGTT 3'
CDKB2	Fw	5' CCAATGAAGAAGTATACCCATGAGA 3'
	Rv	5' AATGGGTGGCACCAAGAAG 3'
CDKA1	Fw	5' CCGAGCACCAGAGATACTCC 3'
	Rv	5' GTTACCCCACGCCATGTATC 3'
TPS5	Fw	5' TCTCGGTTTGGGTGCAGAGCA 3'
	Rv	5' ACCAAACTCGACGTTTCCCAGTCT 3'
TPS1	Fw	5' ACCATAGTTGTTCTGAGCGGAAGCA 3'
	Rv	5' TCATCCACTCTCCATTCGTAAGCCT 3'
TPPB	Fw	5' GGGACAAGGGCCAGGCACTC 3'
	Rv	5' ACACCGGCACAACATCATCCGA 3'
AKIN11	Fw	5' CACCATTCCTGAGATCCGTCA 3'
	Rv	5' GAGACAGCAAGATAACGAGGGAG 3'
UBQ10	Fw	5' CCCTAACGGGAAAGACGATTAC 3'
	Rv	5' AAGAGTTCTGCCATCCTCCAAC 3'

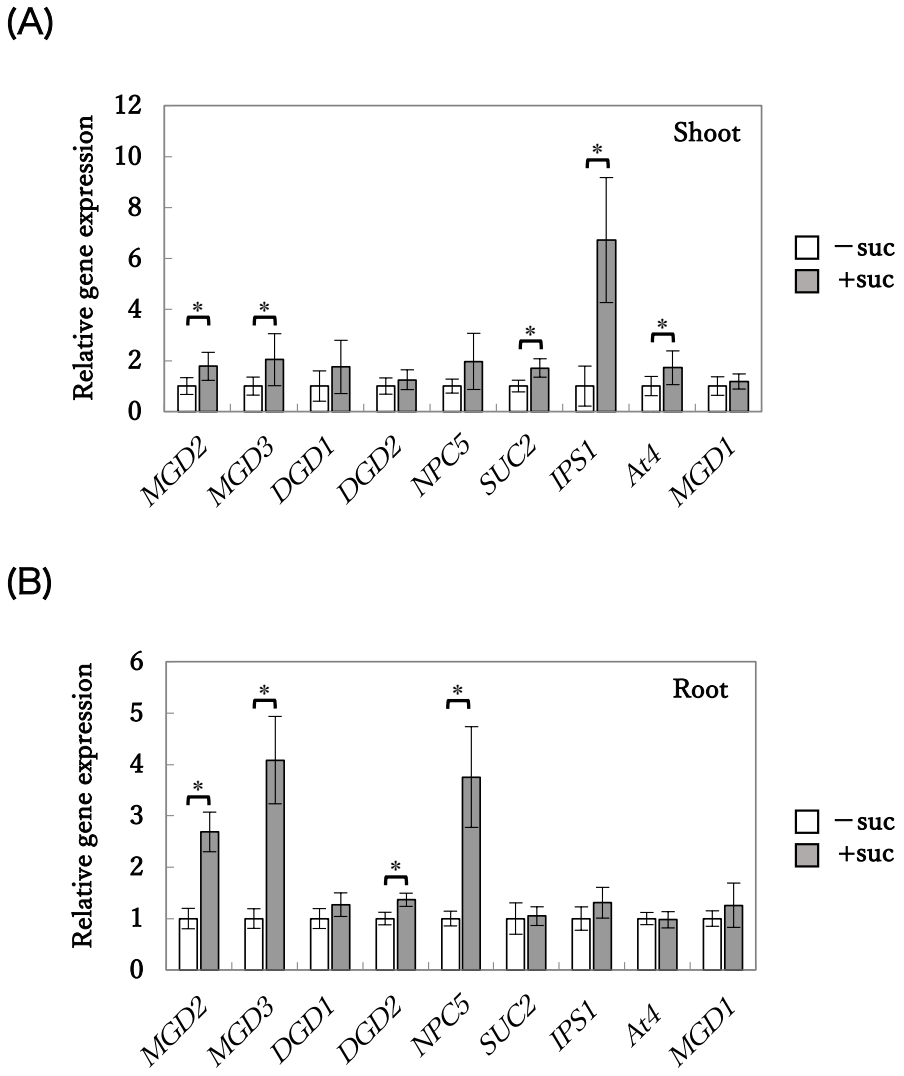


図 2-1.　スクロース添加時のWTにおける遺伝子発現量
WTは、1 %スクロースを添加した（+suc）MS培地、または0.53 %マンニトールを添加した（-suc）対照MS培地で7日間生育させた後、+sucまたは-sucの1/2 MS培地に植え替え、さらに7日間生育させた。植物体地上部（A）および根（B）における各遺伝子の発現量を、定量的RT-PCR法により解析した。-sucにおける各遺伝子の発現量に対する相対発現量を平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。リファレンス遺伝子には*UBQ10*を用いた。 * $P < 0.05$

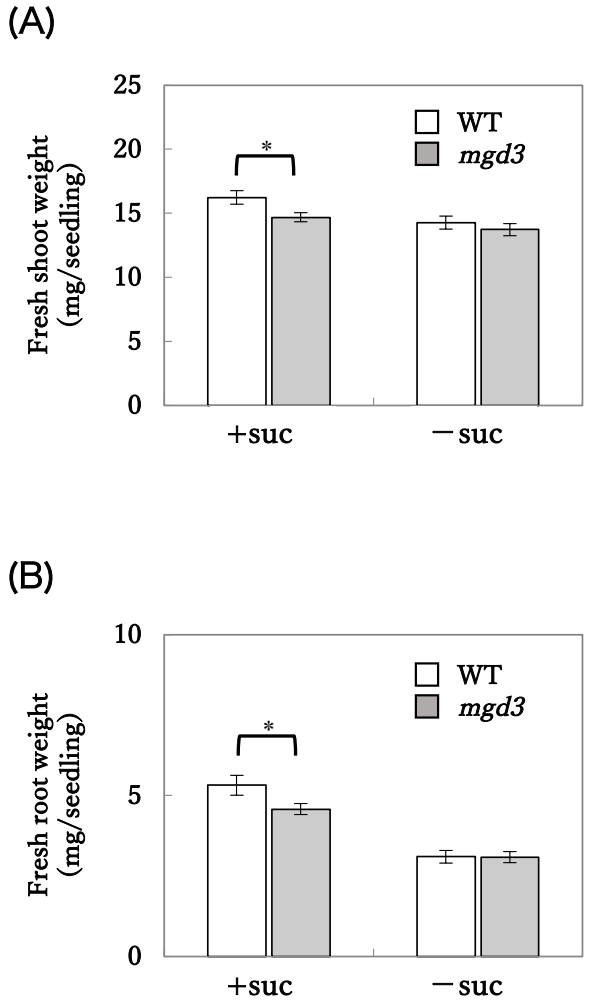


図 2-2.　スクロース添加時のWTおよび*mgd3*の新鮮重量
植物体は、1 %スクロースを添加した（+suc）MS培地、または0.53 %マンニトールを添加した（-suc）対照MS培地で7日間生育させた後、+sucまたは-sucの1/2 MS培地に植え替え、さらに7日間生育させた。WTおよび*mgd3*の地上部の新鮮重量（A）および根の新鮮重量（B）を、平均値 ± SE（$n = 12$）をそれぞれ示した。 * $P < 0.05$

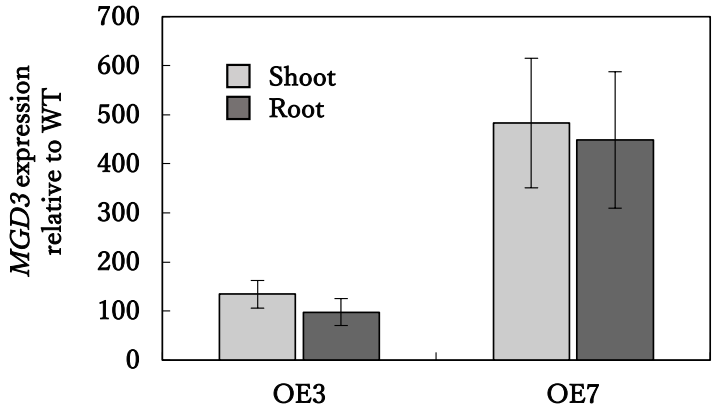


図 2-3.　OE3およびOE7における*MGD3*遺伝子発現量
植物体は、1 %スクロースを含む1/2 MS培地において14日間生育させた。形質転換によって作出したOE3およびOE7の、地上部および根における*MGD3*の発現量を定量的RT-PCR法により解析した。同条件で生育させたWTにおける*MGD3*の発現量に対する相対発現量を、平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。リファレンス遺伝子には*UBQ10*を用いた。

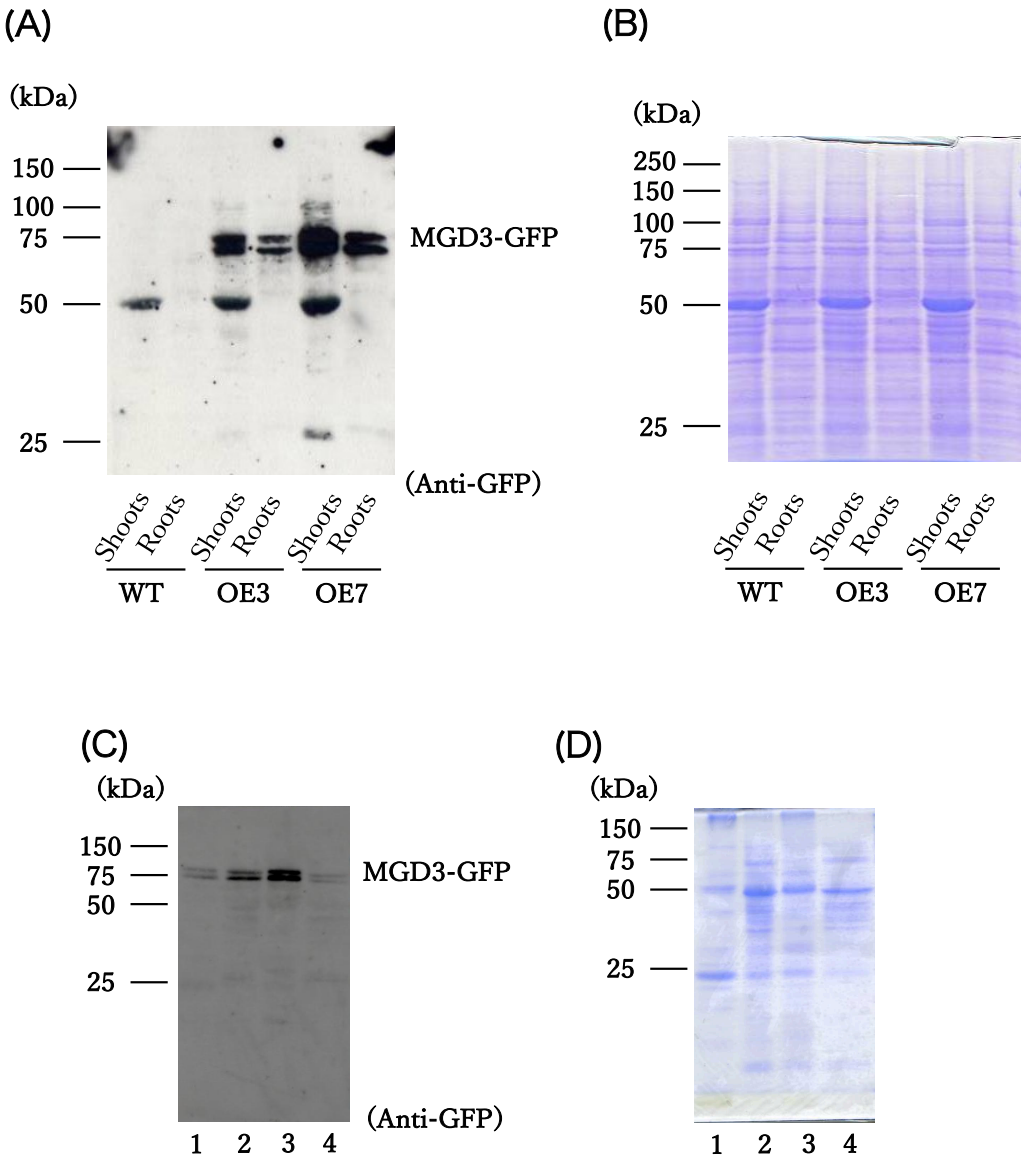


図 2-4.　OE3およびOE7におけるタンパク質発現解析
植物体は、1 %スクロースを含む1/2 MS培地において14日間生育させた。**(A)** WT、OE3およびOE7由来の全抽出画分タンパク質20μg（地上部）または10μg（根）に対する、抗GFP抗体を用いたMGD3-GFPの検出結果。**(B)** (A) と同一サンプルを用いて対照実験として行った、CBB染色の結果。**(C)** OE7由来のミクロソーム膜画分タンパク質に対する、抗GFP抗体を用いたMGD3-GFPの検出結果。レーンの説明は以下の通り。レーン1、チラコイド膜画分（3,000 × *g*、沈殿）；レーン2、非チラコイド膜画分（3,000 × *g*、上澄）；レーン3、ミクロソーム膜画分（125,000 × *g*、沈殿）；レーン4、可溶性画分（125,000 × *g*、上澄）。いずれのレーンも 10 μgのタンパク質を用いた。**(D)** (C) と同一サンプルを用いて対照実験として行った、CBB染色の結果。

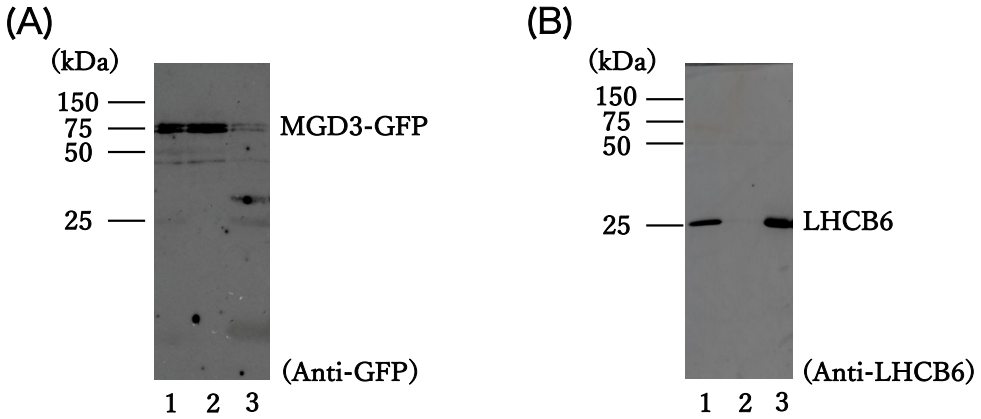


図 2-5.　OE7における葉緑体タンパク質の解析
植物体は、1％スクロースを含む1/2 MS培地において14日間生育させた。OE7由来の無傷葉緑体画分タンパク質に対する、抗GFP抗体を用いたMGD3-GFPの検出結果（A）および抗LHCB6抗体を用いたLHCB6の検出結果（B）。レーンの説明は以下の通り。レーン1、総タンパク質；レーン2、非無傷葉緑体画分（2,000 × *g*、上澄）；レーン3、無傷葉緑体画分（2,000 × *g*、沈殿）。いずれのレーンも10 μgのタンパク質を用いた。

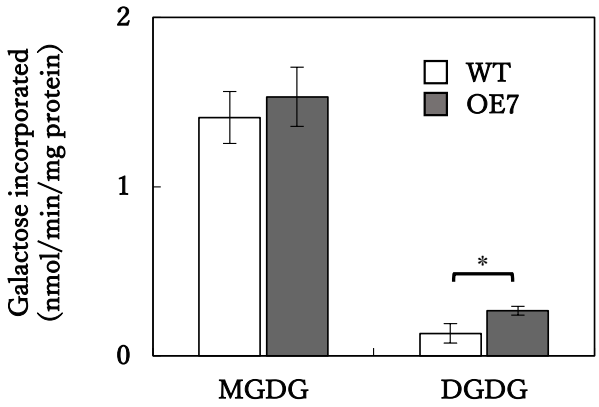


図 2-6.　WTおよびOE7のガラクト脂質合成活性
植物体は、1 %スクロースを含む1/2 MS培地において14日間生育させた。WTおよびOE7由来のミクロソーム膜画分におけるガラクト脂質合成活性を、平均値±SD（$n = 3$）で示した。* $P < 0.05$

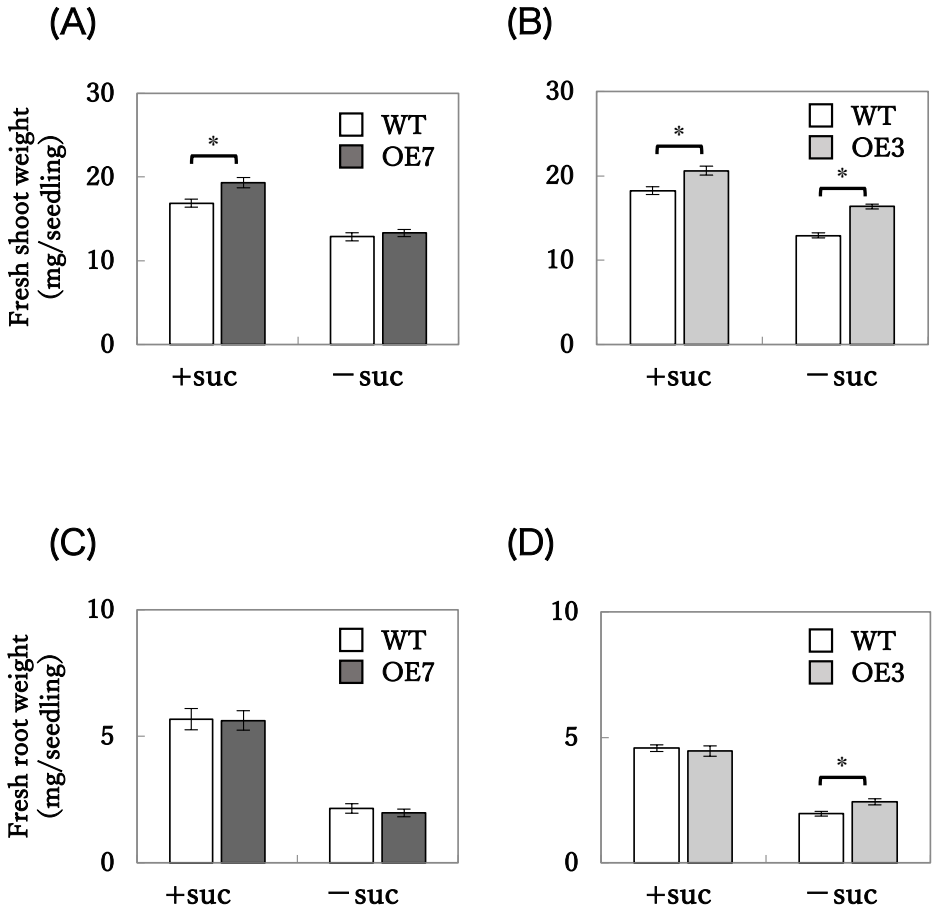


図 2-7.　スクロース添加時のOE3およびOE7の新鮮重量
植物体は、1 %スクロースを添加した（+suc）MS培地、または0.53 %マンニトールを添加した（-suc）対照MS培地で7日間生育させた後、+sucまたは-sucの1/2 MS培地に植え替え、さらに7日間生育させた。植物体の新鮮重量を、平均値 ± SEでそれぞれ示した。WTとOE7の地上部（A）および根（B）の新鮮重量。WTとOE3の地上部（C）および根（D）の新鮮重量。サンプル数は以下の通り。（A）、$n = 12$；（B）、$n = 20$；（C）、$n = 6$；（D）、$n = 20$。* $P < 0.05$

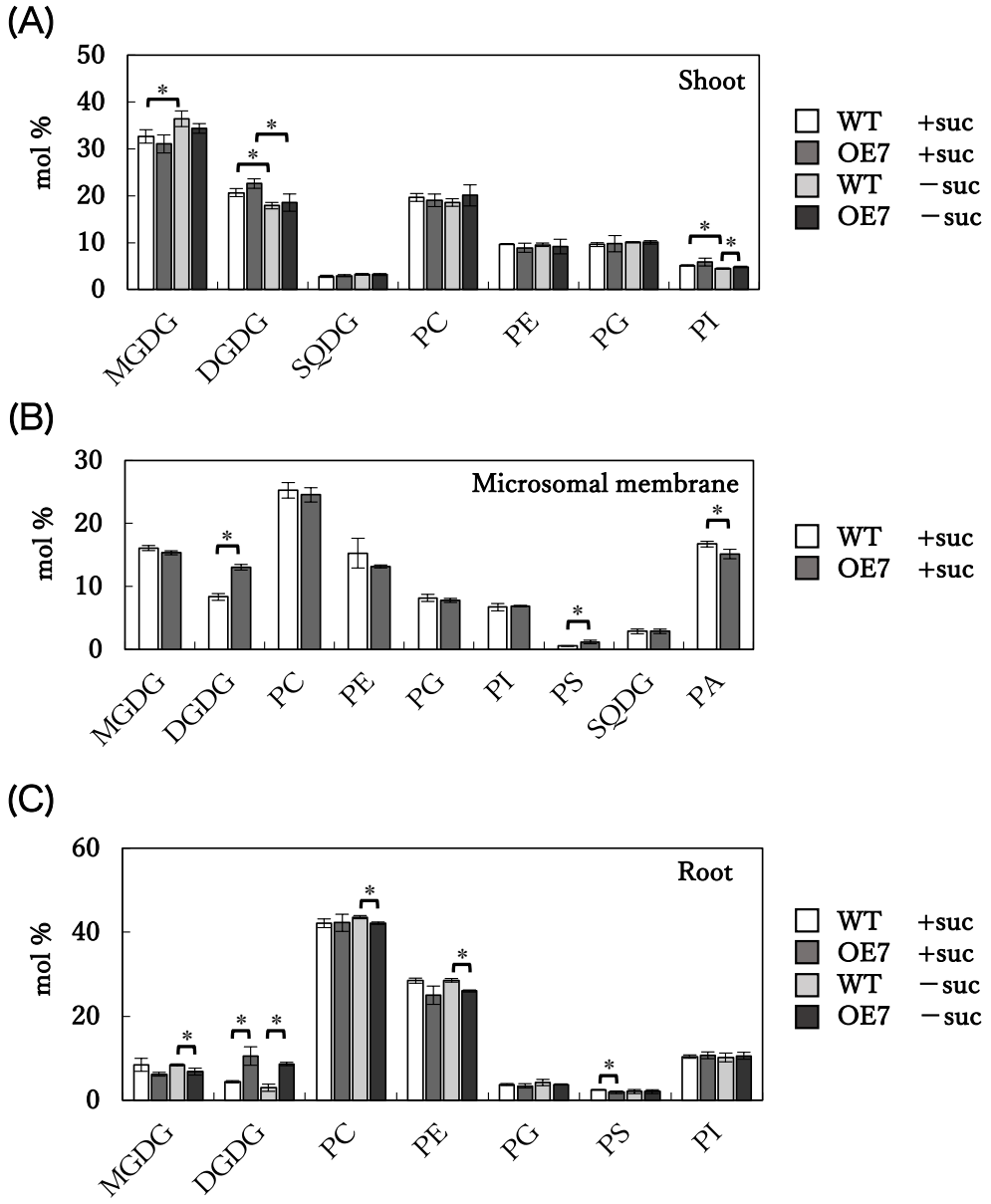


図 2-8.　スクロース添加時のWTおよびOE7の膜脂質組成
植物体は、1 %スクロースを添加した（+suc）MS培地、または0.53 %マンニトールを添加した（-suc）対照MS培地で10日間（A）（C）または7日間（B）生育させた後、+sucまたは-sucの1/2 MS培地に植え替え、さらに10日間（A）（C）または7日間（B）生育させた。WTおよびOE7における、植物体地上部の膜脂質組成（A）、ミクロソーム膜画分の膜脂質組成（B）、根の膜脂質組成（C）を、それぞれ平均値±SD（$n = 3$）で示した。* $P < 0.05$
MGDG、モノガラクトシルジアシルグリセロール；DGDG、ジガラクトシルジアシルグリセロール；PC、ホスファチジルコリン；PE、ホスファチジルエタノールアミン；PG、ホスファチジルグリセロール；PI、ホスファチジルイノシトール；PS、ホスファチジルセリン；SQDG、スルホキノボシルジアシルグリセロール；PA、ホスファチジン酸

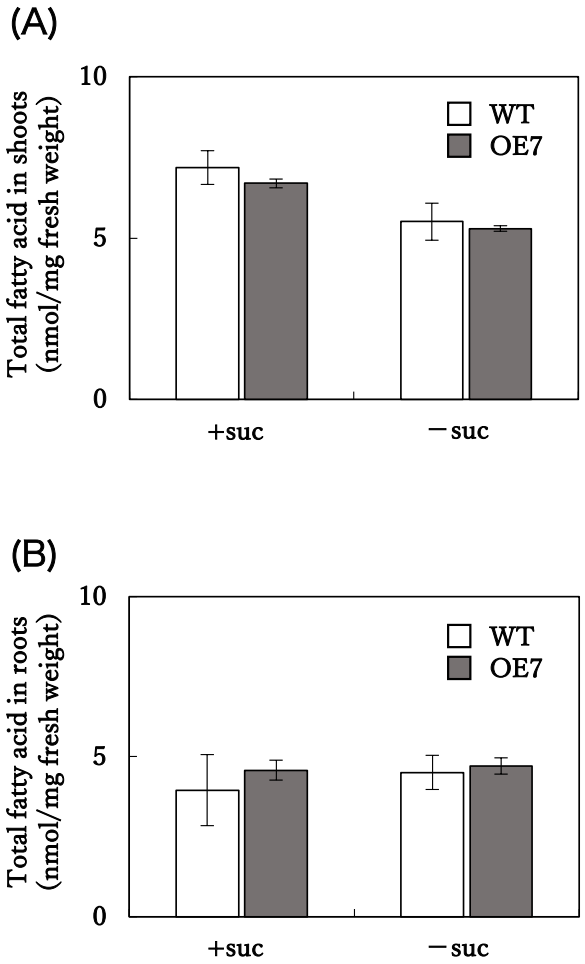


図 2-9.　スクロース添加時のWTおよび OE7の総脂肪酸量
植物体は、1 %スクロースを添加した（+suc）MS培地、または0.53 %マンニトールを添加した（-suc）対照MS培地で7日間生育させた後、+sucまたは-sucの1/2 MS培地に植え替え、さらに7日間生育させた。WTおよびOE7における、植物体地上部（A）および根（B）の総脂肪酸量を、それぞれ平均値±SD（$n = 3$）で示した。

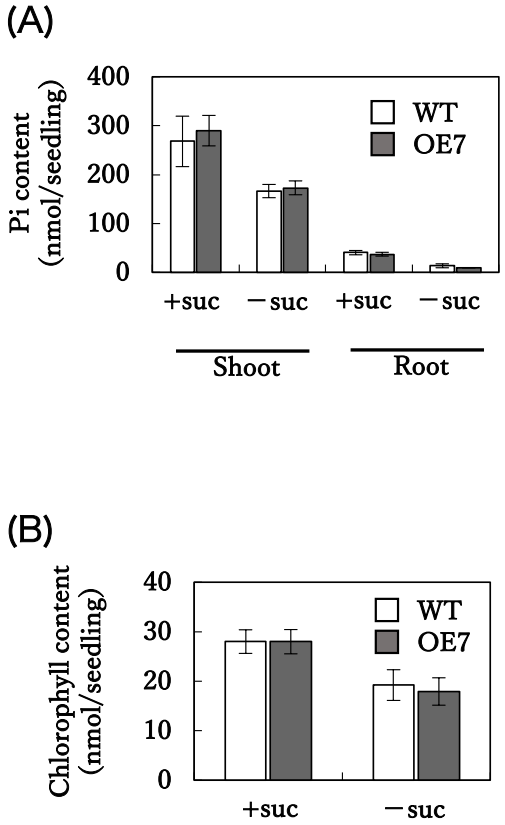


図 2-10.　WTおよびOE7の無機リン酸およびクロロフィル含量
植物体は、1 %スクロースを添加した（+suc）MS培地、または0.53 %マンニトールを添加した（-suc）対照MS培地で7日間生育させた後、+sucまたは-sucの1/2 MS培地に植え替え、さらに7日間生育させた。WTおよびOE7における、無機リン酸含量（A）およびクロロフィル含量（B）を、平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。

表 2-2.　WTおよびOE7の光合成活性
1 %スクロースを含む1/2 MS培地において14日間生育させたWTおよびOE7について、PAMクロロフィル蛍光測定法を用いて算出した光合成活性パラメーターの値を、平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。
Fv/Fm、最大量子収率；　qP、光化学消光；　NPQ、非光化学消光；ϕ II、実効量子収率

	WT	OE7
Fv/Fm	0.83 ± 0.00	0.82 ± 0.04
qP	0.83 ± 0.01	0.88 ± 0.04
NPQ	0.23 ± 0.06	0.32 ± 0.02
ϕ II	0.55 ± 0.02	0.60 ± 0.08

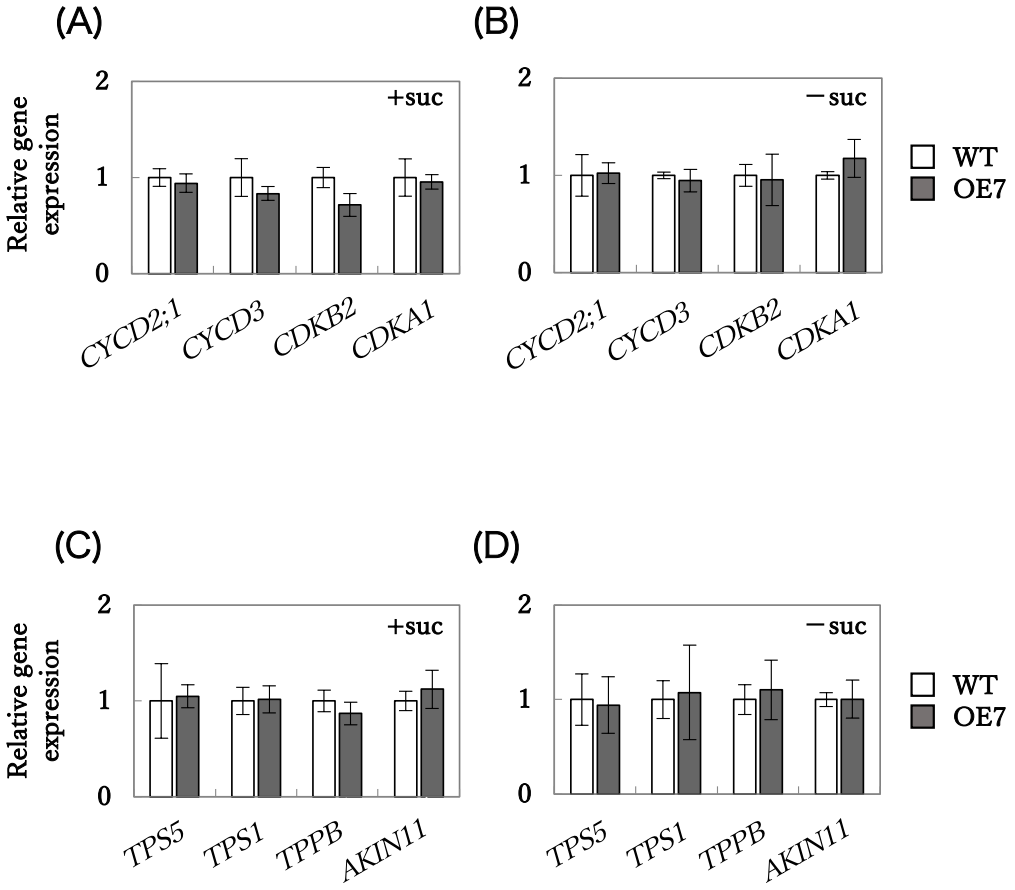


図 2- 11.　WTおよびOE7における細胞周期関連遺伝子およびトレハロース-6-リン酸代謝関連遺伝子の発現量

植物体は、1 %スクロースを添加した（+suc）MS培地、または0.53 %マンニトールを添加した（-suc）対照MS培地で7日間生育させた後、+sucまたは-sucの1/2 MS培地に植え替え、さらに7日間生育させた。WTおよびOE7の植物体地上部における、細胞周期関連遺伝子（A）（B）およびトレハロース-6-リン酸代謝関連遺伝子（C）（D）の発現量を定量的RT-PCR法により解析した。WTにおける各遺伝子の発現量に対する相対発現量を、平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。リファレンス遺伝子には*UBQ10*を用いた。

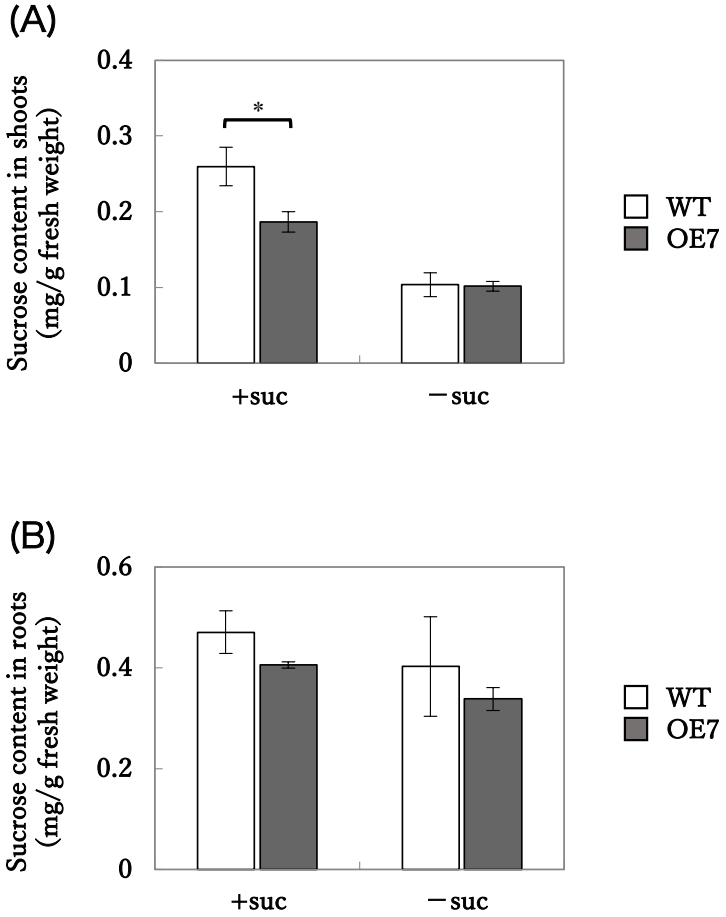


図 2-12.　WTおよびOE7のスクロース含量
植物体は、1 %スクロースを添加した（+suc）MS培地、または0.53 %マンニトールを添加した（-suc）対照MS培地で7日間生育させた後、+sucまたは-sucの1/2 MS培地に植え替え、さらに7日間生育させた。WTおよびOE7の植物体地上部（A）および根（B）におけるスクロース含量を、平均値 ± SDで示した。サンプル数は以下の通り。+suc 地上部、$n = 6$；-suc 地上部、$n = 5$；±suc 根、$n = 3$。 * $P < 0.05$

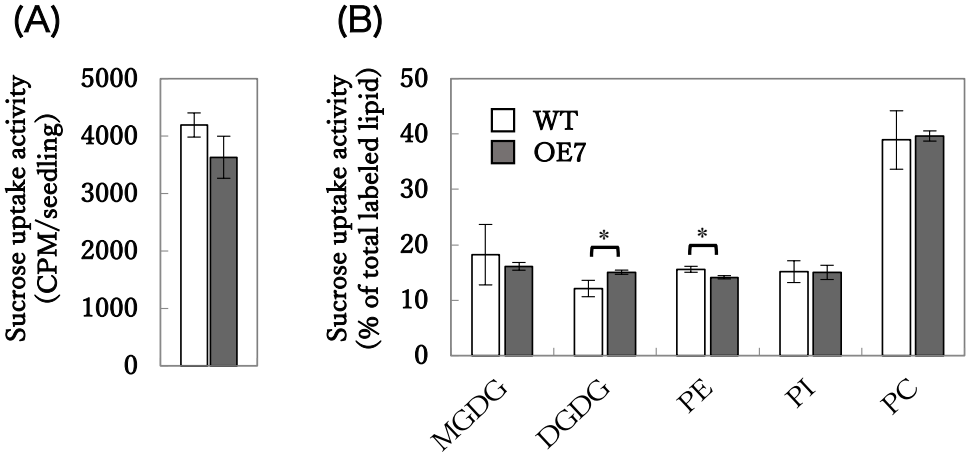


図 2-13.　WTおよびOE7のスクロース吸収量と脂質代謝への取り込み
スクロースを含まない1/2 MS培地で14日間生育させたWTおよびOE7について、^{14}Cで放射性標識したスクロースを用いて測定した、根からのスクロース吸収量（**A**）および根から吸収したスクロースの脂質代謝への取り込み量（**B**）を、平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。
＊ $P < 0.05$

2.6 文献

Andersson, M.X., Stridh, M.H., Larsson, K.E., Liljenberg, C. and Sandelius, A.S. (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett.* **537**, 128–132.

Andersson, M.X., Larsson, K.E., Tjellström, H., Liljenberg, C. and Sandelius, A.S. (2005) Phosphate-limited Oat: The Plasma Membrane and the Tonoplast as Major Targets for Phospholipid-To-Glycolipid Replacement and Stimulation of Phospholipases in the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* **280**, 27578–27586.

Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J.M. and Sheen, J. (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**, 938–942.

Bari, R., Datt Pant, B., Stitt, M. and Scheible, W.R. (2006) PHO2, MicroRNA399, and PHR1 Define a Phosphate-Signaling Pathway in plants. *Plant Physiol.* **141**, 988–999.

Benning, C. and Ohta, H. (2005) Three Enzyme Systems for Galactoglycerolipid Biosynthesis Are Coordinately Regulated in Plants. *J. Biol. Chem.* **280**, 2397–2400.

Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37,** 911–917.

Chiou, T.J., Aung, K., Lin, S.I., Wu, C.C., Chiang, S.F. and Su, C.L. (2006) Regulation of Phosphate Homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 412–421.

Ciereszko, I., Johansson, H., Hurry, V. and Kleczkowski, L.A. (2001a) Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and *pho* mutants of *Arabidopsis*. *Planta* **212**, 598–605.

Ciereszko, I., Johansson, H. and Kleczkowski, L.A. (2001b) Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. *Biochem. J.* **354**, 67–72.

Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743.

Debast, S., Nunes-Nesi, A., Hajirezaei, M.R., Hofmann, J., Sonnewald, U., Fernie, A.R. and Börnke, F. (2011) Altering Trehalose-6-Phosphate Content in Transgenic Potato Tubers Affects Tuber Growth and Alters Responsiveness to Hormones during Sprouting. *Plant Physiol.* **156**, 1754–1771.

Delatte, T.L., Sedijani, P., Kondou, Y., Matsui, M., De Jong, G.J., Somsen, G.W., Wiese-Klinkenberg, A., Primavesi, L.F., Paul, M.J. and Schluepmann, H. (2011) Growth Arrest by Trehalose-6-Phosphate: An Astonishing Case of Primary Metabolite Control over Growth by Way of the SnRK1 Signaling Pathway. *Plant Physiol.* **157**, 160–174.

Essigmann, B., Güler, S., Narang, R.A., Linke, D. and Benning, C. (1998) Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of *SQD1*, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1950–1955.

Gad, M., Awai, K., Shimojima, M., Yamaryo, Y., Shimada, H., Masuda, T., Takamiya, K., Ikai, A. and Ohta, H. (2001) Accumulation of Plant Galactolipid Affects Cell Morphology of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 114–118.

Gaude, N., Nakamura, Y., Scheible, W.R., Ohta, H. and Dörmann, P. (2008) Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of Arabidopsis. *Plant J.* **56**, 28–39.

Härtel, H. and Benning, C. (2000) Can digalactosyldiacylglycerol substitute for phosphatidylcholine upon phosphate deprivation in leaves and roots of *Arabidopsis*? *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 729–732.

Härtel, H., Dörmann, P. and Benning, C. (2000) DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 10649–10654.

Hammond, J.P., Bennett, M.J., Bowen, H.C., Broadley, M.R., Eastwood, D.C., May, S.T., Rahn, C., Swarup, R., Woolaway, K.E. and White, P.J. (2003) Changes in Gene Expression in Arabidopsis Shoots during Phosphate Starvation and the Potential for Developing Smart Plants. *Plant Physiol.* **132**, 578–596.

Hammond, J.P., and White, P.J. (2008) Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *J. Exp. Bot.* **59**, 93–109.

Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J. and Block, M.A. (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J. Cell Biol.* **167**, 863–874.

Karthikeyan, A.S., Varadarajan, D.K., Jain, A., Held, M.A., Carpita, N.C. and Raghothama, K.G. (2007) Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in *Arabidopsis*. *Planta* **225**, 907–918.

Kelly, A.A. and Dörmann, P. (2002) *DGD2*, an *Arabidopsis* Gene Encoding a UDP-Galactose-dependent Digalactosyldiacylglycerol Synthase Is Expressed during Growth under Phosphate-limiting Conditions. *J. Biol. Chem.* **277**, 1166–1173.

Kelly, A.A., Froehlich, J.E. and Dörmann, P. (2003) 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.

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

Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M. and 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.

Lei, M. and Liu, D. (2011) Sucrose regulates plant responses to deficiencies in multiple nutrients. *Plant Signal. Behav.* **6**, 1247–1249.

Lei, M., Liu, Y., Zhang, B., Zhao, Y., Wang, X., Zhou, Y., Raghothama, K.G. and Liu, D. (2011) Genetic and Genomic Evidence That Sucrose Is a Global Regulator of Plant Responses to Phosphate Starvation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **156**, 1116–1130.

Lejay, L., Gansel, X., Cerezo, M., Tillard, P., Muller, C., Krapp, A., Von Wiren, N., Daniel-Vedele, F. and Gojon, A. (2003) Regulation of Root Ion Transporters by Photosynthesis: Functional

Importance and Relation with Hexokinase. *Plant Cell* **15**, 2218–2232.

Lemoine, R. (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 246–262.

Lunn, J.E., Feil, R., Hendriks, J.H., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., Scheible, W.R., Carillo, P., Hajirezaei, M.R. and Stitt, M. (2006) Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J* **397**, 139–148.

Müller, R., Morant, M., Jarmer, H., Nilsson, L. and Nielsen, T.H. (2007) Genome-Wide Analysis of the Arabidopsis Leaf Transcriptome Reveals Interaction of Phosphate and Sugar Metabolism. *Plant Physiol.* **143**, 156–171.

Müller, R., Nilsson, L., Nielsen, L.K. and Nielsen, T.H. (2005) Interaction between phosphate starvation signalling and hexokinase-independent sugar sensing in *Arabidopsis* leaves. *Physiol. Plant.* **124**, 81–90.

Martín, A.C., Del Pozo, J.C., Iglesias, J., Rubio, V., Solano, R., De La Peña, A., Leyva, A. and Paz-Ares, J. (2000) Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* **24**, 559–567.

Martínez-Barajas, E., Delatte, T., Schluepmann, H., De Jong, G.J., Somsen, G.W., Nunes, C., Primavesi, L.F., Coello, P., Mitchell, R.A. and Paul, M.J. (2011) Wheat Grain Development Is Characterized by Remarkable Trehalose 6-Phosphate Accumulation Pregrain Filling: Tissue Distribution and Relationship to SNF1-Related Protein Kinase1 Activity. *Plant Physiol.* **156**, 373–381.

Misson, J., Raghothama, K.G., Jain, A., Jouhet, J., Block, M.A., Bligny, R., Ortet, P., Creff, A., Somerville, S., Rolland, N., Doumas, P., Nacry, P., Herrerra-Estrella, L., Nussaume, L. and Thibaud, M.C. (2005) A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11934–11939.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with

Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473–497.

Murphy, D.J. (1986) The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* **864**, 33–94.

Nakamura, Y. (2013) Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Prog. Lipid Res.* **52**, 43–50.

Narise, T., Kobayashi, K., Baba, S., Shimojima, M., Masuda, S., Fukaki, H. and Ohta, H. (2010) Involvement of auxin signaling mediated by IAA14 and ARF7/19 in membrane lipid remodeling during phosphate starvation. *Plant Mol. Biol.* **72**, 533–544.

Nielsen, T.H., Krapp, A., Röper-Schwarz, U. and Stitt, M. (1998) The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen. *Plant Cell Environ.* **21**, 443–454.

Nunes, C., Primavesi, L.F., Patel, M.K., Martinez-Barajas, E., Powers, S.J., Sagar, R., Fevereiro, P.S., Davis, B.G. and Paul, M.J. (2013) Inhibition of SnRK1 by metabolites: Tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol. Biochem.* **63**, 89–98.

Poincelot, R.P. (1973) Differences in Lipid Composition between Undifferentiated and Mature Maize Chloroplasts. *Plant Physiol*. **51**, 802–4.

Porra, R.J. (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynth. Res.* **73**, 149–156.

Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martín, A.C., Iglesias, J., Leyva, A. and Paz-Ares, J. (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* **15**, 2122–2133.

Sanz, L., Dewitte, W., Forzani, C., Patell, F., Nieuwland, J., Wen, B., Pedro Quelhas, P., Jager, S., Titmus, C., Campilho, A., Ren, H., Estelle, M., Wang, H. and Murray, J.A.H. (2011) The *Arabidopsis* D-Type Cyclin CYCD2;1 and the Inhibitor ICK2/KRP2 Modulate Auxin-Induced Lateral Root Formation. *Plant Cell* **23**, 641–660.

Sauer, N. and Stolz, J. (1994) SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*;

expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J.* **6**, 67–77.

Schluepmann, H., Van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M. and Smeekens, S. (2004) Trehalose Mediated Growth Inhibition of Arabidopsis Seedlings Is Due to Trehalose-6-Phosphate Accumulation. *Plant Physiol* **135**, 879–890.

Shimojiima, M., Watanabe, T., Madoka, Y., Koizumi, R., Yamamoto, M. P., Masuda, K., Yamada, K., Masuda, S. and Ohta, H. (2013) Differential regulation of two types of monogalactosyldiacylglycerol synthase in membrane lipid remodeling under phosphate-limited conditions in sesame plants. *Front. Plant Sci.* **4**, 469.

Tjellström, H., Andersson, M.X., Larsson, K.E. and Sandelius, A.S. (2008) Membrane phospholipids as a phosphate reserve: the dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant Cell Environ.* **31**, 1388–1398.

Truernit, E. and Sauer, N. (1995) The promoter of the *Arabidopsis thaliana SUC2* sucrose-H^+ symporter gene directs expression of β-glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* **196**, 564–570.

Vance, C.P., Uhde-Stone, C. and Allan, D.L. (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptation by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* **157**, 423–447.

Wu, P., Ma, L., Hou, X., Wang, M., Wu, Y., Liu, F. and Deng, X.W. (2003) Phosphate Starvation Triggers Distinct Alterations of Genome Expression in Arabidopsis Roots and Leaves. *Plant Physiol.* **132**, 1260–1271.

Yamaryo, Y., Kanai, D., Awai, K., Shimojima, M., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K. and Ohta, H. (2003) Light and Cytokinin Play a Co-operative Role in MGDG Synthesis in Greening Cucumber Cotyledons. *Plant Cell Physiol.* **44**, 844–855.

Zhang, Y., Primavesi, L.F., Jhurreea, D., Andralojc, P.J., Mitchell, R.A., Powers, S.J., Schluepmann, H., Delatte, T., Wingler, A. and Paul, M.J. (2009) Inhibition of SNF1-Related Protein Kinase1 Activity and Regulation of Metabolic Pathways by Trehalose-6-Phosphate. *Plant Physiol.* **149**, 1860–1871.

第3章　酸性ストレス条件下におけるシロイヌナズナの糖脂質代謝の解析

3.1　序

土壌の酸性化は植物の生育に大きな影響を及ぼす。その一つが序論において紹介した通り、アルミニウムの活性化によるアルミニウムストレスの誘発であり、その耐性獲得に関わる分子機構を含め、現在までに多くの知見が蓄積されてきた。その一方で、土壌の質やアルミニウムの含有量によっては、アルミニウムイオンが植物に対して毒性を示さないと考えられる酸性土壌も存在する（Shavrukov and Hirai, 2016）。酸性ストレス単体でも植物の根の生育を著しく阻害することが知られており（Koyama et al., 2001）、また、アルミニウム耐性を示す植物体が、必ずしも酸性ストレスへの耐性を示さないことから（Ikka et al., 2007）、酸性ストレスはアルミニウムストレスとは独立した環境ストレスとして植物に感知されていることが示唆されている。

酸性ストレスよって過剰なプロトン（ヒドロニウムイオン；H_3O^+）にさらされた植物の根では、まずプロトンポンプの活性化が起こるとされている。細胞質の pH を中性付近に保つため、過剰なプロトンが細胞外または液胞へと輸送される（Yan et al., 1998）。それでも細胞質にプロトンの蓄積が起こると、つづく酸性ストレス応答性のシグナル伝達が活性化される。シロイヌナズナを pH 4.5 の酸性条件に 1～8 時間さらした際のトランスクリプトーム解析の結果、酸性に対する遺伝子発現応答のプロファイルは、オーキシンやサリチル酸、ジャスモン酸を介したシグナル伝達経路と類似していることが明らかにされている（Lager et al., 2010）。また実際に、酸性条件で生育した植物はオーキシンを蓄積することが知られており（Hachiya et al., 2014）、根におけるオーキシンの蓄積がプロトンポンプの活性化を介して酸性ストレスへの耐性付与に貢献していることも示されている（Inoue et al., 2016）。また、酸性ストレスで生育した植物体はスクロースやグルコースといった糖を蓄積することも知られており、糖含量の上昇が酸性生育条件におけるオーキシン合成を誘導していると考えられている（Hachiya et al., 2014）。

酸性ストレスが植物の膜に与える影響としては、膜脂質の過酸化によるマロンジアルデヒドの蓄積がよく知られている（Zhang et al., 2015）。これは酸性ストレス時に蓄積する過酸化水素（H_2O_2）などの活性酸素種（ROS）による作用であると考えられている。しかし、酸性ストレス時の植物の膜脂質組成は未だ調べられた例がなかった。

生物の酸性ストレス適応に関する研究は、植物以外にも、酸性環境を好んで生育する微生物や、極限環境微生物などを用いても行われてきた。好酸性細菌 *Acidiphilium* 属の細菌の多くは、脂肪酸組成においてオレイン酸（18:1）を多量に含むことが知られているが（Okumura et al., 2015）、これは大腸菌やシアノバクテリアとは異なる特徴である（Marr and Ingraham, 1962; Murata et al., 1992）。一方で、高熱好酸性古細菌の脂質が示す特徴としては、環境ストレスに応答したテトラエーテル脂質の蓄積が知られている。テトラエーテル脂質は膜の流動性や、プロトンを含む各種イオンの膜透過性を大幅に低下させる（Mathai et al., 2001）。加えて、高熱好酸性古細菌 *Thermoplasma acidophilum* は、pH 2 以下の強酸性環境や 50 ℃を超える高温環境での生育時に、極性頭部に複数の糖を付加した特殊なテトラエーテル脂質を増加させることが報告されている（Shimada et al., 2008）。この複数の糖を持つテトラエーテル脂質を用いてつくられたリポソーム膜は、他のテトラエーテル脂質と比べても低いプロトン透過性を示したことから、極性頭部に糖を持つ脂質は、強酸性条件において、膜を隔てたプロトン濃度勾配の維持に寄与する物理化学的な性質を有すると考えられている。この結果に着目した Wang らは、糖脂質膜においてみられたプロトン透過性低下の原因は、糖のヒドロキシル基（-OH）によって膜表面に形成される水素結合ネットワークによるものであると考え、ヒドロキシル基を多数結合した人工ポリマーを作成し、これが低 pH 条件においてプロトンのバリアとして機能することを示している（Wang et al., 2012）。

植物の葉緑体膜は、ガラクト脂質が構成比の約 8 割を占めており、非常に糖脂質に富んだ構成になっている。また、葉緑体チラコイド膜を隔ててルーメン側とストロマ側の間には大きなプロトン濃度勾配が形成されており（ΔpH 2～4 程度）、これによって生育に必要なエネルギーを生産している（Kramer et al., 1999）。これは、ミトコンドリアにおけるΔpH が約 1.0 であることとは大きく異なる（Hoek et al., 1980）。葉緑体におけるガラクト脂質の

生理的な役割に関しては、ヒドロキシル基がタンパク質の安定化に寄与するとする説や（Williams and Gounaris, 1992）、膜近傍におけるプロトン濃度を高めて H^+-ATPase に効率的にプロトンを受け渡しているという Hyducton 仮説など（Yoshinaga et al., 2016）、様々な仮説が提唱されている。また、植物由来の DGDG および PC を用いて再構成したリポソームのイオン透過性を測定した結果では、DGDG は PC と比較して、Cl^-の透過性が減少する一方で、Rb^+の透過性が増加することが示されている（Webb and Green, 1989）。このことから、脂質組成の変化は膜のイオン透過性にも影響を及ぼすことが示唆されている。しかしながら、光合成生物の膜が糖脂質から構成されていることの生理的な意義については未知のままである。

各種脂質を用いた膜のイオンおよびプロトン透過性を測定した報告は多く存在するが、個々の報告において実験条件や測定値は様々であり、これらを横並びに比較することは難しい。たとえば、DGDG 膜は Egg yolk 由来の PC と同等のプロトン透過性を示すとする報告（Foley et al., 1988）がある一方で、DGDG と SQDG を混合したリポソーム膜は、Egg yolk 由来の PC と SQDG を混合したリポソーム膜に比べて高いプロトン透過性を示すとする報告もある（Baba et al., 2001）。一方で、理由は定かではないが、Egg yolk 由来の PC はその他方法で精製された PC やリン脂質に対して低いプロトン透過性を示すことが知られており（Elamrani and Blume, 1983）、DGDG もその他のリン脂質に対して低いプロトン透過性を示す可能性があった。加えて、コンピュータシミュレーションによる分子動力学計算の結果からも、糖脂質（MGDG およびモノグルコシルジアシルグリセロール）はリン脂質（PC および PE）よりも膜の静電ポテンシャルに対して高い安定性を有することが予測されている（Róg et al., 2007）。このことは、糖脂質膜がプロトンやイオンを透過させにくい性質を持つことを示唆しており、葉緑体チラコイド膜において糖脂質の存在がプロトン濃度勾配の維持に貢献している可能性を示唆していた。しかしながら、同一植物試料由来の糖脂質とリン脂質のプロトン透過性を一つの論文中で比較した報告は見受けられなかった。

細胞内 pH とガラクト脂質合成系の関係性を示唆する報告として、pH の低下と Mg^{2+}による SENSITIVE TO FREEZING2（SFR2）の活性化機構に関する知見がある（Barnes et al., 2016）。SFR2 は二つのガラクト脂質を基質として一方から他方へと糖残基を転移する反

応（GGGT 活性、galactolipid : galactolipid galactosyltransferase）を触媒しており、オリゴガラクト脂質の合成を担っている酵素である。*SFR2* を欠損したシロイヌナズナは凍結ストレスに対して高感受性を示すことから（Fourrier et al., 2008）、凍結時の葉緑体損傷が引き起こす細胞質の pH 低下や Mg^{2+}濃度上昇が引き金となり、GGGT 活性の上昇が起こると考えられている（Barnes et al., 2016）。

酸性ストレスについてはリン欠乏とも関連が深く、また農学的にも耐性獲得の分子メカニズムの解明が望まれるが、酸性環境が植物の膜脂質代謝に与える影響については未だ十分な議論がなされていない。そこで本研究では、酸性生育条件下における植物の膜脂質組成に関する詳細な解析を行い、酸性環境に応答した植物の膜脂質代謝制御機構の存在を明らかにした。

3.2　実験材料と方法

3.2.1　レシチンの調整

レシチンは、Asolectin from soybean（Sigma）を用いた。中性脂質（トリアシルグリセロール；TAG）やタンパク質などを除くため、10 g のレシチンを秤量し、30 mL のクロロホルムと氷冷した 180 mL のアセトンを加えて、2 時間撹拌した。その後 4 ℃で一晩静置し、上澄を捨て、窒素ガスで溶媒を留去し乾燥させた。リポソームの作成にはこれをクロロホルムに溶かしたものを使用した。

3.2.2　植物試料由来の DGDG 画分および PC 画分の取得

植物試料には、青果店で購入したホウレンソウ葉を用いた。DGDG 画分および PC 画分の抽出は以下の手順で行った。まず、ホウレンソウの総膜脂質を Bligh-Dyer 法（Bligh and Dyer, 1959）に一部改変を加えた方法で行った。具体的な手順は以下の通りである。5 g の植物試料を 15 mL のクロロホルム／メタノール（1 : 2, v/v）によって破砕し、1,600 × *g* で 5 分間遠心分離した上澄を取得した。残渣に 15 mL のクロロホルム／メタノール（1 : 2, v/v）と 4 mL の 1 % KCl（w/v）を加えてよく撹拌し、再度 1,600 × *g* で 5 分間遠心分離して得られた上澄を先の上澄と併せて分取した。ここに 8 mL のクロロホルムと 6 mL の 1 % KCl（w/v）を加えてよく撹拌した後、1,600 × *g* での 5 分間の遠心分離によって得られた下層を総脂質画分として取得した。つづいて、シリカゲルプレート（TLC Silica gel 60, Glass plates 20×20 cm, Merck）を用いた薄層クロマトグラフィーによって DGDG および PC の分画を行った。展開溶媒は、アセトン／トルエン／水（136 : 45 : 12、v/v/v）を用いた。展開の終わったシリカゲルプレートに 80 % アセトン（v/v）溶媒中で 0.01 %（w/v）に調整したプリムリンを吹き付け、UV 照射によって各脂質スポットを検出したのち、DGDG および PC のスポットをそれぞれ掻き取り、DGDG はクロロホルム／メタノール（1 : 1、v/v）を、PC はメタノールをそれぞれ抽出溶媒として用いて、シリカゲルからの再抽出を以下の手順で行った。試験管に分取したシリカゲルに抽出溶媒を 2 mL 加えてボルテックスし 10 分間静置したのち、卓上遠心機（TOMY、LC-100）を用いて 1,600 × *g* で 10 分間の遠心分離によってシリカゲルを沈殿させた。この上澄を分取し、沈殿に再度 2 mL の抽出溶媒を加えて

ボルテックスし3分間静置したのち、1,600 × g で10分間の遠心処理によってシリカゲルを沈殿させた。この手順をもう一度繰り返して、3回分の上澄を再度1,600 × g で10分間の遠心分離にかけることで、わずかに混入していたシリカゲルを沈殿させた。この上澄に窒素ガスを吹きつけて溶媒を留去し、重量を測定したのち20 mg/mLとなるよう、クロロホルム／メタノール（2 : 1、v/v）に溶かした。

上記の方法によって再抽出したDGDG画分およびPC画分のガスクロマトグラフィーによる定量と脂肪酸組成解析は以下の手順で行った。再抽出したDGDG画分およびPC画分は、85 ℃に熱した塩酸メタノール（Methanolic HCl, 3N、Supelco）中での1時間の反応により脂肪酸メチルエステルへと変換した後、ヘキサンを用いて抽出し、ガスクロマトグラフィーによって定量を行った。ガスクロマトグラフィーによる定量の内部標準には既知の濃度のペンタデカン酸を用いた。また、対照サンプルとして用いた未再抽出のDGDGおよびPCは、シリカゲルプレートを用いた2次元薄層クロマトグラフィーによってホウレンソウの総膜脂質を分画することで得た。1次元目の展開溶媒組成は、クロロホルム／メタノール／7Nアンモニア水（115 : 80 : 8、v/v/v）とし、2次元目の展開溶媒組成はクロロホルム／メタノール／酢酸／水（170 : 25 : 15 : 3、v/v/v/v）とした。こうして分画されたDGDGおよびPCのシリカゲルスポットをかき取った後、脂肪酸メチルエステルへの変換以降の操作は上記の方法に従った。

脂質および脂肪酸の定量分析には、水素炎イオン化検出器（FID）を接続したガスクロマトグラフィー（GC-2014、Shimadzu）を用いた。カラムはULBON HR-SS-10（長さ：25 m、内径：0.25 mm、Shinwa）を用い、カラムオーブン温度は180 ℃、検出器温度は250 ℃とした。キャリアガスにはヘリウムを用い、カラム流量を0.53 mL/minに設定し、1サンプルあたりの保持時間は20分間とした。

3.2.3　プロトン透過性測定に用いたリポソームの作製

リポソームの作製には、3.2.1項に記述した方法により調製したレシチン、および3.2.2項に記述した方法により調製した植物由来のDGDG画分とPC画分を用いた。リポソームの作製は、以下の手順で行った。まず、試験管に500 μLのクロロホルムを分取し、脂質重量

が 4 mg となるようにレシチン、DGDG 画分、PC 画分を所定の含量ずつ混合し、ここに窒素ガスを吹きつけて溶媒を留去することで、試験管底にフィルム状になった脂質を得た。ここに pH 感受性の蛍光物質であるピラニン（Tokyo Chemical Industry）を含む、300 μL の膨潤バッファー（2 mM ピラニン、5 mM リン酸二水素カリウム、100 mM 塩化カリウム、1 nmol/mg・lipid バリノマイシン、水酸化カリウムによって pH を 7.0 に調整）を加え、10 分間 37 ℃でのインキュベートにより膨潤させたのち、卓上超音波洗浄器（Branson 3210、yamato）で 20 分間、続けて超音波発生機（UD-201, TOMY：output; 1、duty; 30）で 60 秒間の超音波照射を行い、大きさの均一な small uni-lamellar vesicle（SUV）を得た。これを 3,000 × *g* で 5 分間の遠心分離にかけ、不均一なリポソームを沈殿として除去した。上澄はその後、透析バッファー（5 mM リン酸二水素カリウム、100 mM 塩化カリウム、水酸化カリウムによって pH を 7.0 に調整）で 2 晩の透析処理（バッファー交換の目安は、500 mL で 2 時間、1 L で 1 晩、500 mL で 8 時間の後、1 L で 1 晩）することにより、リポソーム外のバッファーからピラニンを取り除いた。これを再度 3,000 × *g* で 5 分間の遠心分離にかけた上澄をリポソームのプロトン透過性測定実験に用いた。

3.2.4 リポソーム膜のプロトン透過性測定

リポソーム膜のプロトン透過性の測定にあたっては、リポソームに内包したピラニンの蛍光励起スペクトルを、分光蛍光光度計（F-2700, HITACHI）を用いて測定した。100 μL のリポソーム懸濁液を 1.9 mL の酸性外部バッファー（5 mM リン酸二水素カリウム、100 mM 塩化カリウム、塩酸によって pH を 4.5 に調整した）と混合した瞬間を 0 分とし、以降 1、2、3、5、7、10、15、20、25、30 分後の蛍光励起スペクトル（蛍光波長 510 nm）を測定した。また、0 分時のリポソームの pH は、中性外部バッファー（5 mM リン酸二水素カリウム、100 mM 塩化カリウム、水酸化カリウムによって pH を 7.0 に調整した）によって 10 倍に希釈した際の蛍光励起スペクトルの値を用いた。各時点での蛍光励起スペクトルの測定結果から、励起波長 460 nm と 400 nm における蛍光強度の比に対して自然対数をとり、あらかじめ既知の pH に調整したピラニンの蛍光励起スペクトル測定結果から得られた標準曲線に基づいて、各時点でのリポソーム内部の pH を算出した。標準曲線の算出

方法は以下の通りである。33 μM ピラニン、5 mM リン酸二水素カリウム、100 mM 塩化カリウムを含み、pH をそれぞれ、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 となるように調整したバッファーを用いて、蛍光波長 510 nm におけるピラニンの蛍光励起スペクトルを測定し、460 nm と 400 nm における蛍光強度の比に対して自然対数をとり、pH との比例関係から標準曲線を導出した。

3.2.5　酸性条件下における植物水耕栽培用培地のイオン組成の計算

通常条件下（pH 6.0）および酸性条件下（pH 3.5）における、1/3 MGRL 培地のイオン組成は、Geochem-EZ（Shaff et al., 2010）を用いて計算した。Geochem-EZ は以下のホームページからダウンロードした（http://www.plantmineralnutrition.net/geochem.php）。シミュレーションのパラメーターの設定についてはマニュアルを参照し、「Convergence criterion」は 1e-4 に、「Number of Interactions」は 50 に、「Solids」は「none allowed」に、そして「Fixed Ionic Strength」は 0.10 にそれぞれ設定した。

3.2.6　植物試料とその生育条件

シロイヌナズナ野生株として Columbia-0 を使用した。*MGD2* と *MGD3* の欠損株（*mgd2mgd3*）は Kobayashi et al.（2009）と同一の系統を用いた。

植物体は、20 %（v/v）次亜塩素酸、0.1 %（v/v）Tween 20 で種子を滅菌後、0.8 %（w/v）INA アガー、1 %（w/v）スクロースおよび 20 mM MES-KOH（pH 6.0）を含む 1/2 MS 培地（Murashige and Skoog, 1962）上で、23 ℃、連続光条件で 10 日間生育させた後、1/3 MGRL 培地（Fujiwara et al., 1992）を用いた水耕栽培に植え替えを行った。

リン十分条件の水耕栽培においては、水耕栽培開始から 5 日間は 1/3 MGRL 培地（pH 未調整、約 pH 6.0）にて生育を行った。その後、培地を交換し、以降 7 日間、酸性条件での水耕栽培を行った。酸性条件での水耕栽培には、硫酸または塩酸を用いて pH を 3.7 に調整した 1/3MGRL 培地（以降では、硫酸酸性および塩酸酸性と記載）、および対照培地として pH 未調整の 1/3 MGRL 培地（以降では pH 6.0 と記載）を用いた。硫酸酸性および塩酸酸性用の培地は 1 日に一度、pH・水質分析計 LAQUA F-72（HORIBA）を用いて培地 pH

を測定し、硫酸または塩酸を用いて pH を 3.7 に調整した。対照培地は 7 日間 pH 調整を行わずに生育させた。

リン欠乏条件の水耕栽培においては、水耕栽培開始から 5 日間は、リン酸塩を除き、10 mM MES-KOH（pH 6.0）によって pH を 6.0 に調整した 1/3 MGRL 培地（以降、1/3 MGRL-Pi と記載する）を用いて生育を行った後、培地を交換し、以降 7 日間、酸性リン欠乏条件での水耕栽培を行った。酸性リン欠乏条件での水耕栽培には、リン酸塩を除き、硫酸を用いて pH を 4.5 または 3.7 に調整した 1/3 MGRL 培地（以降では、-Pi：pH 4.5 および -Pi：pH 3.7 と記載）、および対照培地として 1/3 MGRL-Pi 培地（以降では、-Pi：pH 6.0 と記載）を用いた。酸性リン欠乏培地は 1 日に一度、pH・水質分析計 LAQUA F-72（HORIBA）を用いて培地 pH を測定し、硫酸を用いて pH の調整を行った。対照培地は 7 日間、pH の調整を行わずに生育させた。

3.2.7　シロイヌナズナの脂質解析

シロイヌナズナの総脂質の抽出、シリカゲルプレートを用いた 2 次元薄層クロマトグラフィーによる脂質種の分離、およびガスクロマトグラフィーによる定量は、3.2.2 項に記載した方法に従った。

ミクロソーム膜画分の脂質解析は以下の手順で行った。約 3 g の植物試料を 10 mL の破砕バッファー（50 mM HEPES-KOH（pH 7.8）、2 mM EDTA、1 mM $MgCl_2$、1 mM $MnCl_2$）で破砕し、300 × *g* で 5 分間の遠心分離により組織残渣を取り除いた。続いて 3,000 × *g* で 10 分間の遠心分離によりチラコイド膜を沈殿させ、上澄を分取する操作を 2 回繰り返した。こうして得られた上澄に対して 125,000 × *g* で 1 時間の超遠心分離操作を行い、得られた沈殿をミクロソーム膜画分として 500 μL の 50 mM HEPES-KOH（pH 7.8）に絵筆で懸濁した。ここに 10 倍量のクロロホルム／メタノール（2：1、v/v）を加えてよく攪拌し、1,600 × *g* で 5 分間遠心分離した後、上澄を捨て、下層に等量の 0.45 % NaCl（w/v）を加えて再度攪拌、1,600 × *g* で 5 分間の遠心分離を行って得られた下層をミクロソーム膜画分の脂質として取得した。以降の薄層クロマトグラフィーによる分離からガスクロマトグラフィーを用いた定量の方法は上記と同様の方法で行った。

オリゴガラクト脂質の検出は、Barnes et al. (2016)を参照し、以下の手順で行った。各生育条件で生育させたシロイヌナズナから抽出した総膜脂質を、シリカゲル TLC プレート上に 800 μg スポットし、1 次元 TLC 展開により脂質種の分離を行った。展開溶媒組成は、クロロホルム／メタノール／酢酸／水（85 : 20 : 10 : 4、v/v/v/v）を用いた。展開の終わったシリカゲルプレートにアンスロン硫酸（アンスロン 0.05 g とチオ尿素 1 g を 66 %硫酸（v/v) 100 mL に溶解したもの）を吹き付け、110 ℃で 10 分間処理し、糖脂質を検出した。また、オリゴガラクト脂質検出の陽性対照用に行った TGDG 合成アッセイは、Barnes et al.（2016）を参照し、以下の手順で行った。0.8 %（w/v）INA アガー、1 %（w/v）スクロースおよび 20 mM MES-KOH（pH 6.0）を含む 1/2 MS 培地上で 2 週間生育させたシロイヌナズナ野生株を、KH_2PO_4 によって pH 4.0 に調整した 20 mM 酢酸、10 mM $MgCl_2$ に浸し、光照射下、23 ℃で一晩インキュベートした。翌日、液体窒素でサンプルを凍結させ、上記の方法に従って総脂質の抽出を行った。

3.2.8　定量的 RT-PCR

植物試料からの全 RNA の抽出には SV Total RNA Isolation System（Promega）を用いた。逆転写反応には PrimeScript RT reagent kit（Takara）を用いて cDNA 合成を行った。PCR 反応は SYBR Premix Ex Taq II (Takara) を用い、Thermal Cycler Dice Real Time System（Takara）によってシグナル検出を行った。定量 RT-PCR は以下の手順で行った。各反応系は最終液量が 25 μL となるように、7 ng の RNA 由来の逆転写産物である cDNA、12.5 μL の SYBR Premix Ex Taq II および 0.4 μM のプライマーを含むよう調製を行った。PCR のプログラムは、95 ℃ 30 秒に続き、95 ℃ 5 秒、60 ℃ 30 秒の増幅を 40 サイクル行った後、95 ℃ 15 秒、60 ℃ 30 秒の処理を行った。リファレンス遺伝子としては *UBQ10*（At4g05320）を用いた。プライマー配列は表 3-1 に示した。*MGD2*、*NPC4*、*At4* のプライマーセットの配列は Narise et al. (2010)を参照した。*IAA1* のプライマーセットの配列は Inoue et al. (2016)を参照した。

3.2.9　無機リン酸含量の定量

植物体地上部および根から遊離の無機リン酸を抽出し、リンモリブデン酸アッセイによる比色定量を行った（Chiou et al., 2006）。植物試料は 10 mM Tris、1.0 mM EDTA、100 mM NaCl、1.0 mM β-メルカプトエタノール、pH 8.0 の抽出バッファー中で破砕し、12,000 × g での 10 分間の遠心分離により残渣を取り除いた。つぎに、この上澄 100 μL に 900 μL の 1 % 氷酢酸を加え、42 ℃で 30 分間インキュベートを行った。12,000 × g で 5 分間遠心分離した上澄 300 μL を分取し、700 μL の 0.35 %(w/v) NH_4MoO_4、0.43 M H_2SO_4、1.4 %（w/v）アスコルビン酸を含むアッセイバッファーと混和し、42 ℃で 30 分間インキュベートを行った後、820 nm における吸光度を測定した。遊離の無機リン酸の含量は既知濃度のリン酸を用いて作成した標準曲線に従って算出した。

3.3　結果

3.3.1　植物由来の DGDG を含む膜のプロトン透過性の測定

古細菌由来の糖脂質が膜のプロトン透過性を減少させることから、植物由来のガラクト脂質も膜のプロトン透過性を減少させる性質を有しているかを検証するため、ホウレンソウ葉からガラクト脂質として DGDG を、リン脂質として PC をそれぞれ抽出し、これらを任意の割合で混合し作成したリポソームについて膜のプロトン透過性の測定を行った。

植物から脂質を抽出する際、TLC-再抽出のステップを何回か繰り返すと、脂肪酸の酸化や脂質分子の分解の原因となる可能性が考えられた。そこで、再抽出した DGDG 画分および PC 画分の脂肪酸組成の解析を行った（図 3-1（A）（B））。対照サンプルとしては、ホウレンソウの総脂質を 2 次元 TLC によって分離し、その後再抽出操作を行わなかった DGDG と PC の脂肪酸組成を解析した。1 次元 TLC のスポットから再抽出した脂質は 1～4 回目いずれの試行においても、対照サンプルと比較して脂肪酸組成に違いは見られなかった。また、この脂肪酸定量結果から、4 回独立に再抽出した DGDG 画分 の平均脂質含有量は 0.94 nmol/μg lipid、PC 画分 4 回分の平均脂質含有量は 0.88 nmol / μg lipid と算出され（図 3-1（C）（D））、両者の間に大きな差はないことがわかった。

リポソームの作製にあたっては、レシチン 2 mg に加えて、(i) DGDG 画分 2 mg、(ii) DGDG 画分 1 mg および PC 画分 1 mg、(iii) PC 画分 2 mg、という 3 種類の異なる割合で混合した脂質を用いた。これらのリポソームの脂質構成比を図 3-2（A）に示した。(i)（ii）(iii) いずれのリポソームにおいてもレシチンがモル分率の約 4 割を占めており、(i) では残りの 6 割を DGDG が、(ii) では DGDG と PC が 3 割ずつを、(iii) では PC が 6 割を占めていると見積もられた。

リポソーム内部の pH を算出するにあたっては、pH 感受性の蛍光物質であるピラニンの蛍光励起スペクトルの測定値を用いた。pH 4.5 から 7.5 の間において、既知 pH の溶液中において測定したピラニンの蛍光励起スペクトル（蛍光波長 510 nm）に基づき、励起波長 400 nm と 460 nm における蛍光強度の比と溶液 pH の関係から、標準曲線を導出した（図 3-2（B））。

つぎに、植物由来の DGDG と PC を用いたリポソームの作製を行った。ソニケーション

処理によって大きさの揃ったリポソーム（small uni-lamellar vesicle；SUV）を作製する際、ピラニンをリポソーム内部に含有させた。こうして作製したピラニン含有リポソームを酸性の外部バッファーで10倍に希釈し、ピラニンの蛍光励起スペクトルを継時的に測定した。この値を用いて、標準曲線からリポソーム内部の pH を算出した（図 3-2（C））。その結果、2 mg の PC 画分を含む（iii）のリポソームが最も高いプロトンの膜透過性を示し、ついで高いプロトン透過性を示したのは DGDG 画分と PC 画分を 1 mg ずつ含む（ii）のリポソームであった。最もプロトンの透過性が低かったのは 2 mg の DGDG 画分を含む（i）のリポソームであった。この結果は、古細菌由来の糖脂質と同様に植物由来のガラクト脂質も膜のプロトン透過性を低下させる性質を有することを示唆していた。

ホウレンソウ由来の DGDG が膜のプロトン透過性を減少させたことから、酸性生育条件において、植物はリン欠乏応答と同様に DGDG の含量を増加させる耐性機構を有しているのではないかと考え、以降でこれを検証することにした。

3.3.2　酸性生育培地の条件検討

植物を酸性条件で生育させるにあたり、まずは生育培地の検討を行った。膜脂質の変化を観察するには一週間以上安定した生育環境を保つ必要があるが、MS アガー培地は低 pH においてアガーの架橋が阻害され培地が固まりにくくなる性質を持つため、酸性条件での生育培地としては適切ではないと考えられた。そこで、水耕栽培用の培地である MGRL 培地（Fujiwara et al., 1992）を 3 倍に希釈して用いることにした。

生育培地中の各種イオンの濃度の組み合わせによっては、酸性条件においてリン酸が他の陽イオンと不溶塩を形成してしまい、植物が栄養欠乏に陥ってしまう可能性が考えられた。そこで、1/3 MGRL 培地の pH 6.0 および 3.5 における培地中のイオン組成をシミュレーションによって検討した。結果を表 3-2 に示す。シミュレーションには、複雑なイオン組成の溶液であっても任意の pH におけるイオン形態を計算することのできるソフトウェア GEOCHEM-EZ（Shaff et al., 2010）を用いた。この結果、pH を 3.5 まで低下させた 1/3 MGRL 培地においても、大半の陽イオンおよび陰イオンの存在形態は pH 6.0 における場合と比較して大きな変化はみられないと予測された（表 3-2）。変化がみられた陽イオンと

しては鉄とマンガンが、pH 6.0 においては EDTA にキレートされた状態で大半が存在しているのに対し、pH 3.5 では約半分量がフリーメタルとして存在すると予測された。また陰イオンとしては、モリブデン酸塩と EDTA が pH 3.5 では 8 割近くがプロトンと結びついて存在すると予測された。一方で、リン酸、硝酸、カリウムを含むその他のイオンについては、pH 6.0 と 3.5 の間で存在形態に目立った変化が認められなかったことから、pH を 3.5 まで低下させた 1/3 MGRL 培地であっても植物に深刻な栄養欠乏のストレスを与えることはないと考え、本研究での酸性生育培地として用いることとした。

さらに、生育培地の pH 調整にあたって硫酸および塩酸の二種類の酸を用いることとした。pH 調整を行わない場合の 1/3 MGRL 培地の pH は約 6.0 であり、この pH を 3.5 まで低下させるには、終濃度 0.2 mM 程度の硫酸または、終濃度 0.4 mM 程度の塩酸を加える必要があったため、プロトンに加えて、これらの酸から生じる陰イオンの影響についても評価しなければならないと考えたためである。

以上の条件検討の結果を踏まえ、事前にシロイヌナズナ野生株を酸性条件で生育させたところ、pH 3.5 では生育へ阻害効果が大きく、個体によって生育に大きなばらつきがみられた。一方、pH 3.7 においては比較的安定した生育が観察されたため、以降の解析にあたっては pH 3.7 を植物の酸性生育条件として用いることにした。

3.3.3　酸性条件下での植物の生育

図 3-3（A）（B）（C）にそれぞれ、pH6.0、硫酸酸性および塩酸酸性条件におけるシロイヌナズナ野生株の地上部の生育の様子を示した。硫酸酸性および塩酸酸性で生育させた植物体は pH 6.0 と比較して個体のサイズが小さく、また一部には黄緑や茶色がかった退色が見られる葉も存在しており、酸性生育条件は植物体地上部の生育に悪影響を及ぼすことがわかった。一方で、硫酸酸性と塩酸酸性の植物体地上部に目立った違いは認められず、硫酸イオンと塩酸イオンが生育に及ぼす影響については差が見られなかった。

また、硫酸酸性および塩酸酸性で生育させた植物全体の様子を見ると、酸性生育条件では根の伸長が著しく阻害されている様子が見られた（図 3-3（D））。そこで、pH6.0、硫酸酸性および塩酸酸性で生育させた野生株の主根長を測定した（図 3-4）。5d は水耕栽培 5 日目

を意味し、硫酸酸性および塩酸酸性に移し替える直前の主根長を示している。また 12d は水耕栽培 12 日目を意味し、pH 6.0、硫酸酸性および塩酸酸性に植え替えて 7 日後の主根長を示している。水耕栽培 5 日目、酸性処理以前の状態では主根長はいずれも約 70 mm の値を示していた。pH 6.0 においては水耕栽培 5 日目から 12 日目の 7 日間の間に主根長が約 60 mm 伸長し、130 mm 程度になったのに対し、硫酸酸性および塩酸酸性ではいずれも 5 日目の状態からの伸長が見られなかった。このことから、pH 3.7 の酸性条件は主根の伸長を強く抑制することがわかった。

3.3.4　酸性生育条件下での植物の膜脂質組成

培地の pH を 3.7 まで低下させることは植物にとって深刻なストレスとなることがわかったので、このストレスに応答した膜脂質代謝制御機構の有無を調べるため、pH 6.0、硫酸酸性および塩酸酸性で生育させたシロイヌナズナの膜脂質組成の解析を行った（図 3-5）。解析に際しては、野生株と共に、2 つの B-type MGDG 合成酵素、*MGD2* と *MGD3* 両遺伝子を欠損した *mgd2mgd3*（Kobayashi et al., 2009）を用いた。B-type MGDG 合成酵素はリン欠乏に応答したガラクト脂質合成に寄与しており、B-type MGDG 合成酵素を介して合成された DGDG は、リン欠乏時に葉緑体外の膜に蓄積することが知られている（Andersson et al., 2003, 2005; Russo et al., 2007; Jouhet et al., 2004）。*mgd2mgd3* は、リン欠乏時の植物体地上部および根において DGDG 増加が顕著に抑制される表現型を示すことから（Kobayashi et al., 2009）、酸性生育時にも野生株と脂質組成の比較を行うことで、ガラクト脂質の合成経路や蓄積場所に関する推定が可能になると考え、解析に用いた。

まず、植物体地上部の膜脂質組成を見ると（図 3-5（A））、pH 6.0 での生育時、野生株と *mgd2mgd3* においていずれも 15～16 %程度であった DGDG の含量が、硫酸酸性および塩酸酸性では 19～20 %程度を占めており、モル分率にして約 4 %増加していることが示された。他の脂質種については、MGDG が 2～3 %程度の減少、PE と PG が 1 %程度の減少を示したほかは、目立った違いは見受けられなかった。このことから、硫酸酸性および塩酸酸性条件で生育した植物は、植物体地上部の膜脂質組成において MGDG を減少させ、DGDG を増加させるという応答を示すことが明らかになった。また、野生株の硫酸酸性および塩酸

酸性生育時の地上部において見られたDGDGの増加と同じ現象が*mgd2mgd3*においても観察されたことから、*MGD2*および*MGD3*は、酸性時のDGDG蓄積には寄与してはいないと考えられた。このことから、硫酸酸性および塩酸酸性生育時に増加したDGDGはMGD1-DGD1経路を介して合成されていることが示唆された。

次に、根の膜脂質組成をpH 6.0と硫酸酸性および塩酸酸性で比較すると、地上部においてみられたようなDGDGの蓄積はみられず、ガラクト脂質の変動はごく僅かであった（図3-5（B））。一方、酸性生育時の根においては、PEが5％程度減少し、PAが3％程度増加していた。この結果は、酸性生育時の地上部と根において異なる脂質代謝調節機構が働いていることを示唆するものであった。非緑色組織である根においては、プラスチドは葉緑体としては存在していない。酸性生育時の地上部で増加したDGDG合成を担っていると考えられたMGD1-DGD1経路を介したガラクト脂質合成は、緑色組織において発達した葉緑体包膜で機能している。これらのことから、酸性生育時の根においては、プラスチドが葉緑体に分化していないために、ガラクト脂質合成の活性化が起こらなかったものと考えられた。

リン欠乏時の膜脂質転換機構によって合成されたDGDGは葉緑体外の膜――ミトコンドリア膜、液胞膜、細胞膜――などに蓄積することが知られている（Andersson et al., 2003, 2005; Russo et al., 2007; Jouhet et al., 2004）。そこで次に、酸性条件下の植物体地上部におけるDGDGの増加部位を調べるため、遠心分離によりチラコイド膜の含量を大幅に低下させたミクロソーム膜画分を、pH 6.0または硫酸酸性条件において生育させた野生株および*mgd2mgd3*から抽出し、その脂質組成を解析した（図3-6（A））。pH 6.0および硫酸酸性生育時の野生株と*mgd2mgd3*のミクロソーム膜画分脂質組成を比較すると、いずれの植物体においても硫酸酸性生育時にDGDGが増加していた。この結果は、硫酸酸性生育時の総膜脂質において増加が見られたDGDGが、チラコイド膜以外の膜に蓄積していることを示唆していた。さらに、MGD1-DGD1経路を介して合成されたガラクト脂質は葉緑体膜の構成要素として使われていることを併せて考えると、酸性生育時に増加したDGDGは、葉緑体膜のうちのチラコイド膜以外の生体膜、すなわち葉緑体包膜に蓄積していると考えられた。

酸性環境で生育可能な古細菌は、低 pH 条件で三つ以上の糖が付加された極性頭部を持つオリゴガラクト脂質を蓄積することが知られている（Shimada et al., 2008）。シロイヌナズナにおいても、凍結ストレス時などにトリガラクトシルジアシルグリセロール（TGDG）やテトラガラクトシルジアシルグリセロール（TeGDG）といった、三つ以上の糖を極性頭部にもつオリゴガラクト脂質が蓄積することが知られている（Moellering et al., 2010）。そこで、DGDG の増加が見られた酸性条件で生育させた植物体地上部におけるオリゴガラクト脂質の蓄積を検証するため、2 次元 TLC 後の定量操作よりも検出感度のよい、アンスロン硫酸による糖残基の呈色反応を用いたオリゴガラクト脂質の検出を行った（図 3-6(B)）。陽性対照サンプルとしては、Barnes らによって報告された *in vivo* での TGDG 合成アッセイ処理（Barnes et al., 2016）を行った植物体から抽出した脂質を用いた。陽性対照サンプルにおいては TGDG および TeGDG といったオリゴガラクト脂質の蓄積が確認されたが、硫酸酸性および塩酸酸性条件で生育させた野生株または *mgd2mgd3* のいずれの植物脂質試料においてもオリゴガラクト脂質の蓄積は見られなかった。

3.3.5　酸性生育条件下での植物膜脂質の脂肪酸組成

続いて、3.2.4 で示した膜脂質組成解析の過程で得られた植物体地上部または根における各脂質種の脂肪酸組成を図 3-7 および図 3-8 にそれぞれ示した。

まず、植物体地上部における各脂質種の脂肪酸組成（図 3-7）をみると、モル分率に変動が見られた MGDG および DGDG の脂肪酸組成に変化は見られなかった。この結果は、酸性時に増加した DGDG は通常生育時と同じ合成経路、すなわち主に MGD1-DGD1 によって合成されていることを示唆していた。また、これらガラクト脂質合成酵素の基質として使われる DAG の供給経路に関しても、酸性生育時特異的な変化は起こっていないと考えられた。一方、PC、PE、PG、PI のリン脂質の脂肪酸組成においては、酸性生育時に 18:1 の含量が顕著に減少していた。これらのリン脂質種の中で、特に細胞膜の脂質組成において占める割合の大きい PC と PE では、18:1 の減少に伴って 16:0 が増加していた。小胞体において合成されるリン脂質は、*sn*-2 位に炭素数 18 の脂肪酸を持ち、*sn*-1 位に炭素数 16 または 18 の脂肪酸を持つことが知られている（Li-Beisson et al., 2013）。このことから、酸性

生育時の PC や PE において見られた、18:1 の減少に伴う 16:0 の増加は、*sn*-1 位への脂肪酸の結合反応における基質選択性の変化を示唆していた。

つぎに、根における各脂質種の脂肪酸組成（図 3-8）をみると、地上部とは逆に PC と PE の脂肪酸組成において 18:1 が増加し、16:0 が減少していた。これに加えて 18:0、18:2 の増加と 18:3 の減少がみられた。また、酸性生育時の膜脂質組成において、PE の減少に伴って増加していた PA の脂肪酸組成は PE や PC の脂肪酸組成と類似していた。PA は脂質の Kennedy pathway を介した新規合成によっても生成されるが、脂肪酸組成の解析結果から、酸性生育時に増加した PA は PE や PC の分解によって生じた可能性が強く示唆された。

3.3.6　酸性生育条件下での植物展開葉における遺伝子発現解析

酸性生育時の植物体地上部においてみられた DGDG 蓄積の機構を推定するため、pH 6.0、硫酸酸性および塩酸酸性条件において生育させたシロイヌナズナ野生株の展開葉から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法によって遺伝子発現量を解析した（図 3-9）。対象とした遺伝子はそれぞれ、ガラクト脂質合成酵素をコードする *MGD1*、*MGD2*、*MGD3*、*DGD1*、*DGD2*、リン欠乏時に機能するリン脂質の分解酵素をコードする *NPC4*、*NPC5*、*PAH1*、*PAH2*、リン欠乏応答性のノンコーディング RNA である *At4*、およびオーキシン応答性を示す *IAA1* の、計 11 遺伝子である。

通常生育時の MGDG 合成の 9 割以上を担う *MGD1* は、硫酸酸性および塩酸酸性生育時の発現量が pH 6.0 に比べてそれぞれ約 44 %、約 33 %にまで低下していた。一方で、リン欠乏に応答する MGDG 合成酵素 *MGD2* および *MGD3* の発現量を見ると、*MGD2* に関しては硫酸および塩酸酸性条件でいずれも 2.5 倍程度、*MGD3* に関しては硫酸および塩酸酸性条件でいずれも 14 倍程度に発現量が増大していた。しかし、*MGD2* と *MGD3* を欠損した *mgd2mgd3* においても野生株と同様の DGDG 蓄積が見られたことから、*MGD2* と *MGD3* は酸性時の DGDG 蓄積の主たる原因遺伝子ではないと考えられた。

通常生育時の DGDG 合成の 9 割を担う *DGD1* に関しては、硫酸酸性および塩酸酸性時の発現量が pH 6.0 に比べていずれも約 2 倍に増加していた。一方で、リン欠乏応答性の DGDG 合成酵素である *DGD2* の硫酸酸性および塩酸酸性における発現応答は、pH 6.0 に

比べて約 1.3 倍程度にしか増加していなかった。以上の結果から、通常生育時の主たるMGDG 合成酵素遺伝子（*MGD1*）と DGDG 合成酵素遺伝子（*DGD1*）は、酸性ストレスに対して相反する応答を示すことわかった。また、これらの発現解析の結果は、酸性生育時の植物体地上部膜脂質組成において見られた MGDG の減少に伴う DGDG の増加（図 3-5（A））を支持した。また、酸性生育時の DGDG 増加は *DGD1* の発現上昇に起因している可能性が強く示唆された。

リン脂質の分解酵素である *NPC4*、*NPC5*、*PAH1*、*PAH2* の発現量に関しては、*PAH1* にのみ硫酸および塩酸に応答した 1.5 倍程度の発現上昇が見られたほかは、顕著な発現変動は見られなかった。*PAH1* はリン欠乏に応答して発現量が上昇することが知られており、今回の酸性生育条件では発現上昇がみられなかった *NPC4* および *NPC5* もリン欠乏時に発現が上昇する遺伝子である。この結果は、酸性生育時にはリン脂質分解の活性化が起こっていないことを示唆するものであり、膜脂質組成解析の結果を支持した（図 3-5（A））。

酸性生育時の植物展開葉において幾つかのリン欠乏応答性膜脂質代謝関連遺伝子の発現応答が見られたことを受け、リン欠乏応答の指標としても用いられる *At4* の発現量を解析した。*At4* は硫酸酸性および塩酸酸性に応答して 15 倍程度の発現上昇を示すことがわかった。一方、この際の植物展開葉における遊離の無機リン酸含量を測定した結果、酸性時の展開葉においてリンの欠乏は起こっていないことが示された（図 3-10）。

リン欠乏時の膜脂質転換に対しては、オーキシンによる活性化も重要な調節機構であることが知られている。また、酸性条件で生育させたシロイヌナズナの植物体地上部および根においてオーキシンの蓄積が起こることも報告されているため、硫酸酸性および塩酸酸性生育時の植物展開葉における、オーキシン応答性遺伝子 *IAA1* の発現解析を行った結果、*IAA1* も酸性ストレスに応答して発現量が上昇していた。

以上、一連の遺伝子発現解析の結果、酸性条件で生育したシロイヌナズナの展開葉においては、リン欠乏と一部類似しながらも、それとは異なる遺伝子の発現プロファイルが示された。そこで次に、酸性条件において見られた DGDG の増加が、リン欠乏時の膜脂質転換とは独立な機構によるのかを検証するため、酸性とリン欠乏を併せた条件でシロイヌナズナを生育させ、さらなる解析を行うことにした。

3.3.7　酸性リン欠乏条件下での植物の生育

図 3-11（A）（B）（C）にはそれぞれ、pH を 6.0、4.5、3.7 に調整したリン欠乏水耕培地（-Pi：pH 6.0、-Pi：pH 4.5、-Pi：pH 3.7）において生育させたシロイヌナズナ野生株の地上部の様子を示した。

-Pi : pH 6.0 で生育させた野生株は、リン十分時と比べて、地上部の矮小化や展開葉におけるアントシアニンの蓄積が見られ、リン欠乏へのストレス応答が誘導されていた（図 3-3（A)、図 3-11（A))。リン欠乏に加えて pH を低下させた、-Pi : pH 4.5 または-Pi : pH 3.7 で生育させた植物体は、-Pi : pH 6.0 と比較して植物体地上部の大きさに目立った変化は見られなかった。リン十分時の酸性ストレスは植物体地上部の生育を阻害したことから（図 3-3)、リン欠乏ストレスは酸性ストレスに対する植物体地上部の感受性を低下させることが示唆された。一方で-Pi : pH 3.7 では植物体地上部が黒ずんで見え、-Pi：pH 6.0 と比較してアントシアニンがさらに蓄積していたことから、植物は酸性リン欠乏をリン欠乏とは異なるストレスとして認識していると考えられた（図 3-11（B）(C))。

また、-Pi : pH 6.0、-Pi : pH 4.5 および-Pi : pH 3.7 で生育させた植物全体を見ると、pH の低下に伴って根の伸長に著しい阻害が起こることがわかった（図 3-11（D))。そこで、-Pi : pH 6.0、-Pi : pH 4.5 および-Pi : pH 3.7 で生育させた植物の主根長を測定した（図 3-12)。この結果、pH を 6.0 から 4.5、3.7 と下げていくに従って、主根の伸長も段階的に抑制されることが示された。

-Pi : pH 6.0 における主根長は、リン十分時の主根長を大きく上回っていた（図 3-4、図 3-12)。リン欠乏に陥った植物は地上部の生育を抑制し、代わりに根の生育を促進することが知られている。リン十分時の酸性ストレスは根の伸長を抑制したことから、リン欠乏と酸性ストレスは根の伸長に対して相反する影響を及ぼしていたが、結果としてリン欠乏時においても、pH を 3.7 まで低下させると主根の伸長は強く抑制された。

3.3.8　酸性リン欠乏条件下での植物の膜脂質組成

-Pi : pH 6.0、-Pi : pH 4.5 および-Pi : pH 3.7 で生育させたシロイヌナズナ野生株の地上

部、および根における膜脂質組成を解析した（図 3-13（A）（B））。また、これら三つの生育条件に加えて、酸性処理用培地に植え替える直前（以降は-Pi（5d）と記載）の植物体の膜脂質組成も併せて解析した。

植物体地上部の膜脂質組成（図 3-13（A））をみると、-Pi（5d）において、DGDG、PC、PE のモル分率はそれぞれ約 16.8％ 、17.3％ 、9.0％ であった。これは通常生育時とほぼ同じ水準であったことから、酸性処理開始時点においてはリン欠乏時の膜脂質転換は未だ起こっていないことがわかった。この後 7 日間、-Pi : pH 6.0 で生育させた植物体は DGDG が 31.4 ％ まで増加したのに対し、PC および PE はそれぞれ 7.4 ％ と 5.2 ％ まで減少しており、リン欠乏時の膜脂質転換が誘導されていることが示された。これに対し、-Pi : pH 3.7 で生育させた植物体地上部の膜脂質組成においては DGDG が 33.4 ％ まで増加しており、-Pi : pH 6.0 と比較して約 2 ％ 増加していた。一方で-Pi : pH 6.0 と-Pi : pH 3.7 における MGDG のモル分率はそれぞれ 38.3 ％ と 35.7 ％ であり、-Pi : pH 3.7 では Pi : pH 6.0 と比較して約 2.6 ％ の減少が見られた。また、-Pi : pH 4.5 におけるモル分率は pH 6.0 と pH 3.7 の中間的な値を示していた。酸性リン欠乏時に見られた MGDG の減少と DGDG の増加は、リン十分時の酸性生育条件下において見られた脂質組成の変動と同様の傾向を示していた（図 3-5（A））。リン欠乏に応答した DGDG の増加に加えて、pH 依存的な DGDG の増加が相加的に誘導されていたことから、酸性生育時に見られた地上部での DGDG 合成の活性化は、リン欠乏時の膜脂質転換とは独立な機構によって誘導されていることが示唆された。

次に、酸性リン欠乏時の根における膜脂質組成の解析結果をみると（図 3-13（B））、-Pi（5d）の膜脂質組成における DGDG、PC、PE のモル分率はそれぞれ約 4.2％ 、38.4％ 、26.7％ であり、地上部と同じくこの時点ではリン欠乏時の膜脂質転換は誘導されていないことがわかった。その後 7 日間、-Pi : pH 6.0 で生育した植物の根における DGDG、PC、PE のモル分率はそれぞれ、37.1％、29.0％、15.8％へと変化しており、主要リン脂質の分解に伴う DGDG 合成の活性化が示された。これに対し、-Pi : pH 3.7 で生育した植物の根においては、DGDG が 20.2％ 、PC が 36.9％ 、PE が 20.4％ の割合を占めており、-Pi：pH 6.0 と比較すると、リン欠乏時の膜脂質転換が抑制されていることが示唆された。

また、-Pi : pH 4.5 における膜脂質組成は pH 6.0 と pH 3.7 の中間的な値を示していたことから、これは pH 依存的な現象であると考えられた。一方、-Pi：pH3.7 の DGDG モル分率を-Pi と比較すると、依然として 16%程度の大幅な増加が見られたことから、酸性リン欠乏条件下でもリン欠乏時の膜脂質転換は部分的に誘導されていることが示唆された。

また、-Pi : pH 3.7 の PC および PE のモル分率を-Pi（5d）の値と比較すると、PC は酸性処理前とほぼ同等であったのに対し、PE は酸性処理前よりも大きく減少していた。すなわち、酸性リン欠乏時のリン脂質分解抑制は、PC においてより顕著であり、PE の分解抑制の効果は弱いことが示された。リン十分時にも酸性生育条件で根の膜脂質組成における PE の分解が促進されていた（図 3-5（B））ことを併せて考えると、酸性ストレスは根の膜脂質における PE の割合を減少させる効果があることが示唆された。

以上より、酸性リン欠乏条件で生育させたシロイヌナズナ野生株の地上部と根においては、それぞれに異なる脂質組成の変化がみられ、膜脂質代謝の器官特異的な調節を介した、酸性ストレスへの適応機構の存在が示された。また、この脂質代謝の応答機構はリン欠乏時の膜脂質転換とは独立した制御を受けていることも示唆された。

3.3.9　酸性リン欠乏条件下での植物膜脂質の脂肪酸組成

次に、3.3.8 項で示した膜脂質組成解析の過程で得られた、酸性リン欠乏時の植物体地上部および根における各脂質種の脂肪酸組成を図 3-14、図 3-15 にそれぞれ示した。

-Pi : pH 3.7 での植物体地上部においては、-Pi：pH 6.0 と比較して、いずれの脂質種においても目立った変化は見られなかった（図 3-14）。一方、酸性リン欠乏の根においては（図 3-15）、PC、PE、PI の脂肪酸組成において、培地 pH の低下に伴う 18:0、18:1、18:2 の増加と、18:3 の減少が共通の傾向として見られた。また DGDG に関しても、酸性リン欠乏時に-Pi：pH 6.0 と比較して 18:2 が増加し、18:3 が減少していた。これらの結果から、酸性リン欠乏時の根の膜は不飽和度が減少していることがわかった。また、PA の脂肪酸組成は PE や PC のものと類似しており、かつ酸性リン欠乏に対する構成比の変化も PE や PC と同様であったことから、PA は PE や PC の分解によって生成されていると考えられた。

3.3.10　酸性リン欠乏条件下での植物の遺伝子発現解析

3.3.6 項において発現解析を行った遺伝子について、酸性リン欠乏条件下の展開葉および根での遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法によって解析した（図 3-16、図 3-17）。

酸性リン欠乏時の展開葉においては、三つの MGDG 合成酵素遺伝子（図 3-16（A）（B）（C））のうち *MGD3* のみが酸性に応答を示し、その相対発現量は-Pi：pH 6.0 に対して-Pi：pH 3.7 で約 1.4 倍に増加していた。*MGD3* は、-Pi : pH 6.0 の条件において既にリン十分時よりも大幅に発現量が増加しているが、それに加えて酸性リン欠乏ではさらに発現量が増加することがわかった。また、二つの DGDG 合成酵素遺伝子（図 3-16（D）、（E））のうちでは、*DGD1* の発現量が-Pi : pH 6.0 と比較して-Pi : pH 3.7 において約 1.2 倍に増加していた。*NPC4*、*NPC5*、*PAH1*、*PAH2* はいずれの遺伝子も、-Pi : pH 6.0 に対する-Pi : pH 4.5 および 3.7 での発現変動はみられなかった。*At4* は-Pi : pH 6.0 に対して-Pi : pH 3.7 で約 1.5 倍に、*IAA1* は-Pi : pH 6.0 に対して-Pi : pH 3.7 で約 1.8 倍に発現量が増加していた。酸性リン欠乏に応答して発現が上昇していた遺伝子は、いずれもリン十分条件においても酸性に応答した発現上昇を示していたことから（図 3-9）、酸性生育条件に対する展開葉における遺伝子発現応答は、リン欠乏応答とは独立な機構によって制御されていると考えられた。

一方、リン欠乏と比較した酸性リン欠乏時の根での相対発現量においては、リン欠乏時の膜脂質転換に寄与している *MGD2*、*MGD3*、*DGD1*、*DGD2*、*NPC4*、*NPC5*、*PAH1* の遺伝子発現量が軒並み減少していた（図 3-17）。この結果は、酸性リン欠乏時の根における膜脂質転換の抑制を示唆した膜脂質組成解析結果と合致した（図 3-13（B））。しかし酸性リン欠乏生育時の *At4* の発現量は減少してはおらず（図 3-17（J））、*IAA1* に関しては酸性リン欠乏で発現量が上昇していたことから（図 3-17（K））、酸性リン欠乏は根におけるリン欠乏応答を包括的に抑制しているわけではないことが示唆された。また、リン欠乏条件においてもリン十分時と同様に、酸性に応答したオーキシンシグナルの活性化が起こっていることが示唆された。

3.4　考察

本研究においては、まず、同一のホウレンソウ試料から抽出したDGDGおよびPCを用いてリポソームを再構成し、そのプロトン透過性を測定した(図3-2(C))。その結果、DGDGのリポソーム中のモル分率が増加するにつれて、リポソームのプロトン透過性は減少することがわかった。

DGDG と PC はどちらも通常生育時のシロイヌナズナ地上部膜脂質組成において 15～20 % 程度を占めており（図 3-5（A))、MGDG についで多量に存在している脂質種である。また、どちらも二分子膜構造を形成できるラメラ脂質であることから、これら二つを植物由来の糖脂質とリン脂質の代表としてプロトン透過性の比較に用いることは適当であると判断した。しかし一方でDGDGとPCにそれぞれの疎水性尾部として結合している脂肪酸の構成比には違いが見られることから（図3-1（A）（B))、DGDG と PC において見られたプロトン透過性に関する差が、両者の脂肪酸組成の違いによって生じた可能性も残されている。この検証のためには同一の脂肪酸組成をもつDGDGとPCを用いて同様の実験を行う必要があるが、現状、そのような脂質を必要量用意することは不可能である。

古細菌がもつエーテル脂質は真正細菌や真核生物の膜を形成するエステル脂質に比べて、一般に膜のプロトン透過性が低い。これはイソプレノイドからなる疎水性尾部の分子運動性や、親水性頭部と疎水性尾部をつなぐエーテル結合の化学的安定性に起因すると考えられている。高熱好酸性古細菌である *Sulfolobus acidocaldarius* 由来の膜脂質を用いて再構成されたリポソームは大腸菌や好熱性細菌由来の膜に比べて高温におけるプロトンの膜透過性が低いという性質を示す（Elferink et al., 1994)。このことから、極性頭部と疎水性尾部の結合様式および疎水性尾部の構造は、膜のプロトン透過性に大きな影響を及ぼすことがわかる。高熱好酸性古細菌である *Thermoplasma acidophilum* は、酸性生育時にオリゴ糖脂質の割合を増加させるという環境適応機構を有しており、より低い pH で生育させた *T. acidophilum* が蓄積するオリゴ糖脂質から再構成したリポソームは、より高pH側で生育した *T. acidophilum* 由来の膜脂質に比べて、プロトン透過性が顕著に減少する（Shimada et al., 2008)。このことから、極性頭部の構造も膜のプロトン透過性に影響を与えることが示唆されている。

植物由来のDGDGがPCと比較して低いプロトン透過性を示したこと、高熱好酸性古細菌が酸性生育時にオリゴ糖脂質を蓄積すること、および、植物の生育環境において酸性ストレスとリン欠乏は深い関わりがあることから、植物においても酸性ストレスに応答したガラクト脂質の蓄積がみられるのではないかと考え、シロイヌナズナ野生株および*mgd2mgd3*二重欠損株を酸性条件と通常条件において生育させ、膜脂質組成を解析した。アンスロン硫酸による糖脂質の定性的解析の結果、酸性条件下で生育させた植物体において、TGDGやTeGDGといったオリゴガラクト脂質は蓄積しないことがわかった（図3-6（B））。しかし、膜脂質組成を詳細に解析した結果、酸性ストレスはシロイヌナズナの脂質代謝に影響を及ぼすことが明らかとなった。

酸性条件下で生育させた野生株および*mgd2mgd3*はいずれも、植物体地上部の膜脂質組成においてDGDGの占める割合が、通常生育時よりも約4％ 増加していた（図3-5（A））。この増加量は通常生育時のDGDG含量（モル分率で15.6％）の約26％にあたる。乾燥ストレスや高温ストレス時のシロイヌナズナにおいては、DGDGが、対照生育条件下での含量に対してそれぞれ 28 ％と 23 ％程度増加することが知られている（Gigon et al., 2004; Chen et al., 2006）。また、塩ストレスに耐性を示す、イネのMGDG合成酵素遺伝子を過剰発現させたタバコは、塩ストレス条件下で野生株に対して10～24％程度DGDG含量が増加していた（Wang et al., 2014）。植物種による違いや、細胞内でのDGDGの増加部位などをさらに詳細に検討する必要はあるが、本研究において酸性条件下でみられた DGDG の増加は、シロイヌナズナの酸性ストレス適応において重要な生理的役割を担っている可能性がある。

一方で、酸性生育時のDGDG増加量は、リン欠乏時の膜脂質転換が引き起こすDGDG増加と比較すると僅かであった（図3-5（A）、図3-13（A））。リン欠乏時には、リン脂質の分解によりガラクト脂質合成経路に多量の基質が供給されているが、酸性生育時の植物体地上部においてリン脂質の減少は観察されなかった（図3-5（A））。このため、酸性生育時にはリン脂質の分解によるガラクト脂質合成への基質供給は起こっていないことがわかった。酸性生育時の植物展開葉における遺伝子発現解析の結果もこれを支持しており、*MGD2*、*MGD3*、*DGD1* といったガラクト脂質合成酵素の遺伝子発現量が増加していたのに対し、

リン欠乏時のリン脂質分解に寄与する *NPC4*、*NPC5*、*PAH1*、*PAH2* はいずれも酸性ストレスに対して発現上昇を示さなかった（図 3-9）。また、野生株展開葉において *MGD2* と *MGD3* は酸性に応答して発現量が上昇したが、酸性生育時の *mgd2mgd3* においても野生株と同程度の DGDG 蓄積が見られたことから、DGDG 合成の基質となる MGDG は主に MGD1 によって供給されていたと考えられる。しかしながら、酸性生育時に *MGD1* の発現量は通常生育時の半分程度に低下しており（図 3-9（A））、膜脂質組成における MGDG 含量の減少も観察された（図 3-5（A））。通常生育時の DGDG 合成の 9 割を担う *DGD1* の発現量が酸性時に 2 倍程度に増加していたことから（図 3-9（D））、酸性生育時に増加した DGDG は DGD1 によって合成されていると考えられる。

また、酸性時の植物体地上部における各脂質種の脂肪酸組成の解析結果（図 3-7）も、上記の考察と合致した。すなわち、MGDG と DGDG、いずれの脂肪酸組成においても通常生育時と酸性生育時の間に差は見られなかったことから、酸性生育時の植物体地上部において増加した DGDG は通常生育時と同様の基質供給および合成経路を介して生成されていることが示唆された。*MGD1* および *DGD1* の遺伝子欠損株は著しい矮化や光合成活性の消失が起こることから、これらの欠損株を用いて解析を行うことは難しい。今後は、シロイヌナズナにおいて既に技術が確立されている、一過的な遺伝子発現の抑制系などを用いることで、酸性生育時の糖脂質代謝制御機構の詳細やその生理的意義について、さらなる知見が得られると考えている。

次に、野生株および *mgd2mgd3* の根における膜脂質組成を通常生育時と酸性生育時で比較したところ、いずれの植物体においても MGDG や DGDG といったガラクト脂質の顕著な増加はみられず、かわりに PE の減少に伴う PA の増加が観察された（図 3-5（B））。酸性生育時の根における PA と PE は類似した脂肪酸組成を示していたことから（図 3-8）、この PA はリパーゼ活性によって PE から生成されたと考えられた。pH 3.7～6.0 においては、PE は電荷を示さず、PA は 1 価の負電荷を示す。このため根の膜脂質において PE が PA に置き換わると、膜は全体として負に帯電する。プロトン濃度勾配を維持している葉緑体の膜脂質が、SQDG や PG といった、負電荷をもつ脂質を含むことから、負に帯電した生体膜はプロトン透過性の低下に寄与している可能性がある。また、プロトンの膜透過機構

について、膜内の水分子の運動性に基づいたモデルが提唱されている（Paula et al., 1996）。DGDG は膜表面近傍の含水量が少ない dry lipid であると言われているが（McDaniel, 1988）、PA も pH 3.0 以下においてはそのほとんどがプロトン化された状態で存在するため、PA の蓄積は低 pH において疎水的な膜環境をつくる役割もあるのかもしれない。

PE から PA を生成する反応は PLD 活性が担っているが、今までのところ、PE 特異的に作用する PLD は発見されていない。酸性ストレス時のトランスクリプトーム解析の結果、酸性ストレスに発現応答を示す幾つかの phospholipase-like あるいは lipase-like な遺伝子が報告されており、これらの中に未知の PE 特異的な PLD が含まれている可能性がある（Lager et al., 2010）。また、オーキシンに応答する PLDζ2 の基質特異性は明らかにされておらず、酸性生育時にはオーキシンの蓄積が見られることから、PLDζ2 が機能している可能性もある。PE から生産された PA は、シグナル伝達物質としてさまざまな生理機能を果たす脂質種である（Wang et al., 2006）。酸性ストレス時には、H_2O_2 含量が増加するほか（Zhang et al., 2015）、サリチル酸シグナル伝達を介した病傷害応答に類似した遺伝子発現応答が誘導される（Lager et al., 2010）。また、PE に対して基質親和性を持つ PLDδ による PA の生産は、気孔孔辺細胞における H_2O_2 およびサリチル酸によって制御されるシグナル伝達下流に位置し、乾燥に応答した気孔の開閉に寄与していることが知られている（Guo et al., 2012; Kalachova et al., 2013）。加えて、PLDδ による PA 生成機構は病害耐性の獲得にも寄与している（Pinosa et al., 2013）ことから、酸性生育時の根において蓄積が見られた PA も、これらのシグナル伝達系を介して酸性環境への適応に寄与している可能性がある。

酸性条件で生育した植物展開葉の遊離のリン酸含量は通常時よりも高い水準を示した（図 3-10）。それにもかかわらず、*MGD2*、*MGD3* や *PAH1* といったリン欠乏に応答して発現量が上昇する膜脂質代謝酵素の一部の発現量が酸性条件で上昇していた（図 3-9）。また、リン欠乏応答の指標として使われる遺伝子の一つである *At4* についても酸性ストレスに応答した発現上昇が見られたことから、酸性生育条件はリン欠乏に類似したストレス応答を植物体に誘導することがわかった。酸性ストレス条件下で生育した植物の地上部および根では、植物ホルモンの一種であるオーキシンの含量が増加し、オーキシン応答が活性化されることが知られている（Hachiya et al., 2014; Inoue et al., 2016）。本研究においても、

酸性条件の植物展開葉においてオーキシン応答性遺伝子 *IAA1* の発現上昇が見られたことは、既報と合致する（図 3-9（K））。オーキシン応答はリン欠乏時の膜脂質転換にも部分的に寄与している（Kobayashi et al., 2006; Narise et al., 2010）。そこで酸性生育時の植物体地上部および根においてみられた脂質代謝変動がリン欠乏時の膜脂質転換とは独立な機構であるかを検証するため、リン欠乏条件において培地 pH を 6.0、4.5、3.7 と、段階的に低下させた際の（-Pi : pH 6.0、-Pi : pH 4.5、-Pi : pH 3.7）の膜脂質組成の変化を解析した。

-Pi : pH6.0 で生育させた植物体地上部の膜脂質組成は、リン十分時と比較して DGDG の含量が大幅に増加しており、リン欠乏水耕栽培において膜脂質転換が誘導されていることが確認できた。これに加えて、pH が 4.5、3.7 と低下するに従って、わずかながら DGDG がさらに増加する一方で、MGDG の含量は減少した（図 3-13（A））。これらの脂質組成の変化は、リン十分時の酸性生育時に、植物体地上部において観察された現象と同様のものであった。このことから、植物体地上部における酸性ストレスに応答したガラクト脂質代謝の調節は、リン欠乏時の膜脂質転換とは独立な機構であることが示唆された。

酸性リン欠乏時にはリン欠乏ストレスによる MGD2/MGD3-DGD2 経路を介した DGDG 合成に加えて、酸性ストレスによる MGD1-DGD1 経路を介した DGDG 合成が活性化されていたことから、酸性ストレスによって植物体地上部で増加した DGDG は、リン欠乏によって増加した DGDG とは異なる生体膜において増加していることが示唆された。リン欠乏時に MGD2/MGD3-DGD2 経路によって合成された DGDG は葉緑体外の生体膜に蓄積することから（Andersson et al., 2003, 2005; Russo et al., 2007; Jouhet et al., 2004）、酸性ストレス時には葉緑体膜において DGDG が増加していると考えられた。さらに、リン十分時の酸性条件におけるミクロソーム膜画分の脂質解析の結果、DGDG はチラコイド膜以外の生体膜においても増加していることが示されたことから、増加場所は葉緑体内かつチラコイド膜以外の膜、すなわち、葉緑体包膜であると考えられた。これは、葉緑体が発達していない根において DGDG の増加が見られなかったこととも合致した。葉緑体外包膜の膜脂質組成においては、DGDG と PC がそれぞれ 30 %程度を占めている（Block et al., 1983）。DGDG は PC に対して低いプロトン透過性を示したことから（図 3-2（C））、酸性ストレス条件下において葉緑体包膜で増加した DGDG は、葉緑体ストロマへのプロトン

の流入を防ぐバリアとして機能し、葉緑体や光合成活性の機能維持に寄与しているのかもしれない。

酸性リン欠乏時の根における膜脂質組成は、地上部とは異なる変化を示した（図3-13（B））。-Pi : pH6.0 では、リン十分時と比較して DGDG が大幅に増加し、代わりに PC、PE、PI といったリン脂質が減少していた。一方、リン欠乏に加えて pH を低下させていくと、pH 依存的に DGDG の増加が抑制されることがわかった。また、遺伝子発現解析の結果から、酸性リン欠乏時の根においては、リン欠乏時の膜脂質転換に寄与する *MGD2*、*MGD3*、*DGD1*、*DGD2*、*NPC4*、*NPC5*、*PAH1* の発現量が軒並み低下しており、酸性リン欠乏における根での膜脂質転換の抑制が示唆された。一方で、*At4* の発現量に変化は見られず、総てのリン欠乏応答が抑制されているわけではないことも示された。また、地上部と同様に *IAA1* の発現量は上昇しており、オーキシン応答は活性化していた。オーキシン応答はリン欠乏時の根における膜脂質転換に寄与するが（Kobayashi et al., 2006; Narise et al., 2010）、以上の結果から、酸性ストレスは根においてリン欠乏とオーキシンの作用を打ち消し、DGDG 合成の活性化を抑制することがわかった。

酸性リン欠乏時の根において、PC と PE の変動パターンには違いが見られた。PC 含量は pH の低下に伴って段階的に増加し、pH 3.7 では酸性処理前と同程度に達していた。PE 含量も pH の低下に伴って段階的に増加したが、pH 3.7 においても酸性処理前と比較すると顕著な減少がみられた。リン十分条件で生育させた植物の根においても酸性ストレス時には PE の減少がみられたことから（図 3-5（B））、酸性ストレスはリン欠乏時の膜脂質転換とは独立な機構で、根において PE の分解を促進していることが示唆された。

また、酸性リン欠乏時の根における各脂質種の脂肪酸組成からも、酸性ストレス特有の変化が示唆された（図 3-15）。リン十分時の根における各脂質種の脂肪酸組成（pH 6.0）と、リン欠乏時（pH 6.0）の結果を比較すると、PC、PE、PI における 18:2 脂肪酸の減少と 18:3 脂肪酸の増加が顕著であった（図 3-8、3-15）。この理由は、リン欠乏時にはリン脂質の合成活性が低下し、分解活性が上昇することで、残ったリン脂質の脂肪酸に対して不飽和化が進行し、脂肪酸の不飽和度が上昇したためであると考えられる。一方、酸性リン欠乏時の PC、PE、PI においては、リン欠乏時と比較していずれも 18:2 が増加し、18:3 が減少して

いた（図 3-15）。また、リン十分時の PC、PE、PI の脂肪酸組成を見ても、pH 6.0 と酸性条件の比較においては同様の傾向が示された（図 3-8）。加えて、リン欠乏時、-Pi：pH 3.7 においても根の膜脂質の 20％ 程度を占める DGDG の脂肪酸組成においても、-Pi：pH6.0 と比較して 18:2 の増加と 18:3 の減少が見られたことから、酸性ストレスは、根の細胞膜を構成する主要な脂質に対して、不飽和度の低下を引き起こすと考えられた。膜脂質の不飽和度が下がると膜の流動性が低下するが、このような膜の物理化学的性質は特に低温ストレスに対する適応機構と関連していることが知られている（Wada and Murata, 1990）。プロトン過多な状態においても膜の流動性の低下は、プロトンの膜透過性を減少させることで細胞機能の維持に寄与している可能性がある。

本研究では、今まで調べられていなかった、酸性生育時および酸性リン欠乏生育時のシロイヌナズナの膜脂質組成を詳細に解析し、酸性ストレスに特異的な膜脂質代謝制御機構の存在を示した。

3.5　表および図

表 3-1.　定量的RT-PCRに用いたプライマー

Gene		Primer Sequences
MGD1	Fw	5' AGGTTTCACTGCGATAAAGTGGTT 3'
	Rv	5' AACGGCAATCCCTCCTCAC 3'
MGD2	Fw	5' GATTCGATCACTTCCTATCATCCTC 3'
	Rv	5' TGTGCTAAACCATTCCCCAAC 3'
MGD3	Fw	5' TCGTGGCGGATTGGTTTAG 3'
	Rv	5' CGTTGTTGTTGTTGGGATAGATG 3'
DGD1	Fw	5' CTGAAGAGAGATCCCGTGGTG 3'
	Rv	5' TCCCAAGTTCGCTTTTGTGTT 3'
DGD2	Fw	5' TGCAGAACCTATGACGATGGA 3'
	Rv	5' GCTCTGTAAGTTGCGATGGTTG 3'
NPC4	Fw	5' AGCATCAAATGCTGCTGCTCAACC 3'
	Rv	5' TCCACCCACACACAAGAGAAGTGA 3'
NPC5	Fw	5' CTGCGGTTATGAACGGATTT 3'
	Rv	5' TCGTTGTTCCGTGTGATGTT 3'
PAH1	Fw	5' GGATAACGAGGACAGGAAGACTG 3'
	Rv	5' AGCAGCTGCGCTAAGTCCCATAC 3'
PAH2	Fw	5' CTCAAGCCTCAGTCACAAGACAA 3'
	Rv	5' AAGGAAAGAGACCATCAGGAGAGA 3'
At4	Fw	5' CTGAAGCTCAAGAACCCTCTGAA 3'
	Rv	5' CCTCTCAAAACCCTTTATTGGTGA 3'
IAA1	Fw	5' TGAAAGGATCCGAAGCTCCTACT 3'
	Rv	5' TGCCTCGACCAAAAGGTGTT 3'
UBQ10	Fw	5' CCCTAACGGGAAAGACGATTAC 3'
	Rv	5' AAGAGTTCTGCCATCCTCCAAC 3'

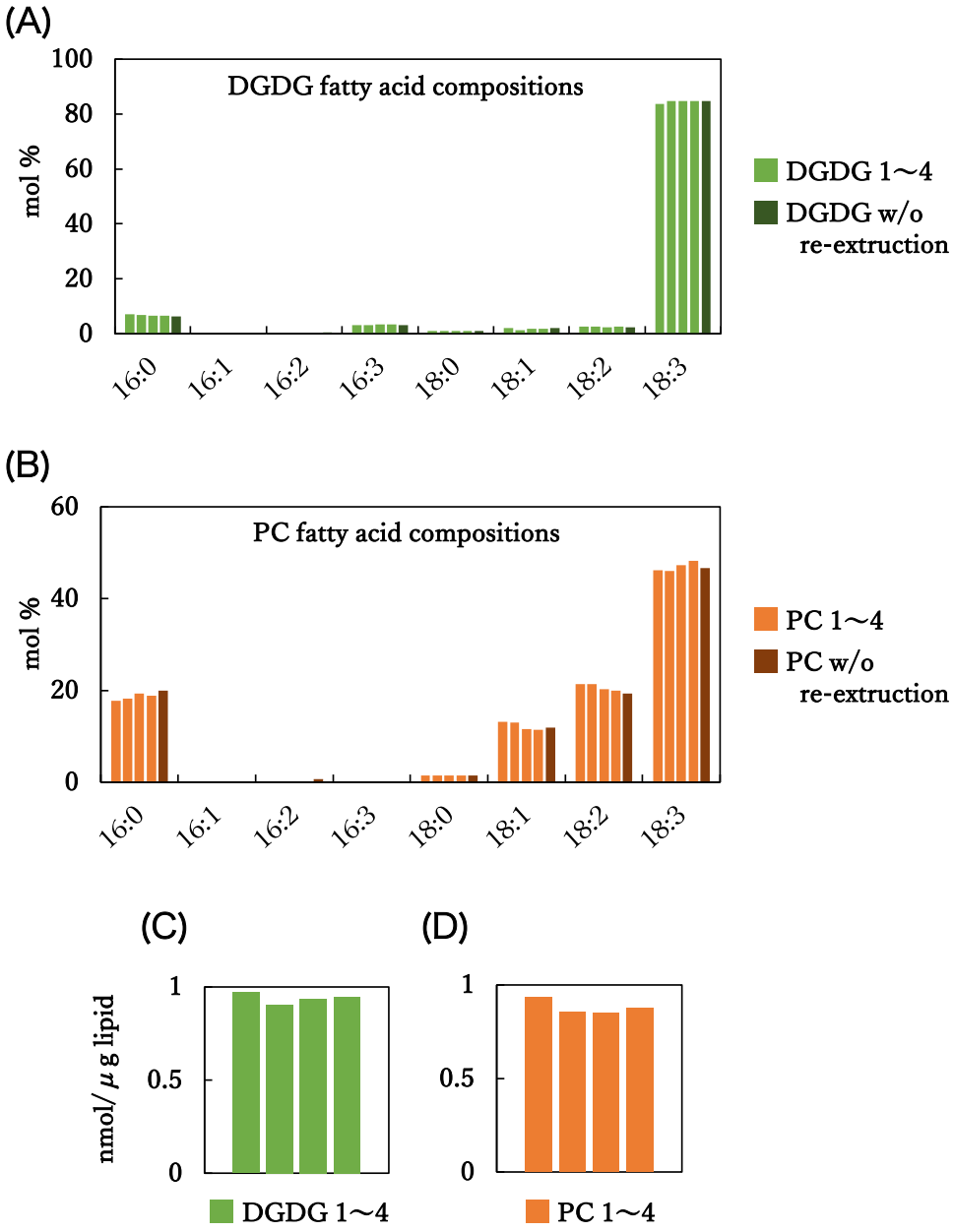


図 3-1.　ホウレンソウ葉由来のDGDG画分およびPC画分の脂肪酸組成と脂質含量
ホウレンソウ葉から取得したDGDG画分（A）およびPC画分（B）の脂肪酸組成を、再抽出操作を行わなかった際のDGDGおよびPCの分析結果と比較した。また、これらのDGDG画分およびPC画分の脂質含量を、(C)および(D)にそれぞれ示した。
DGDG（PC）1～4：独立に4回（1～4）再抽出を行い、取得したDGDG（PC）

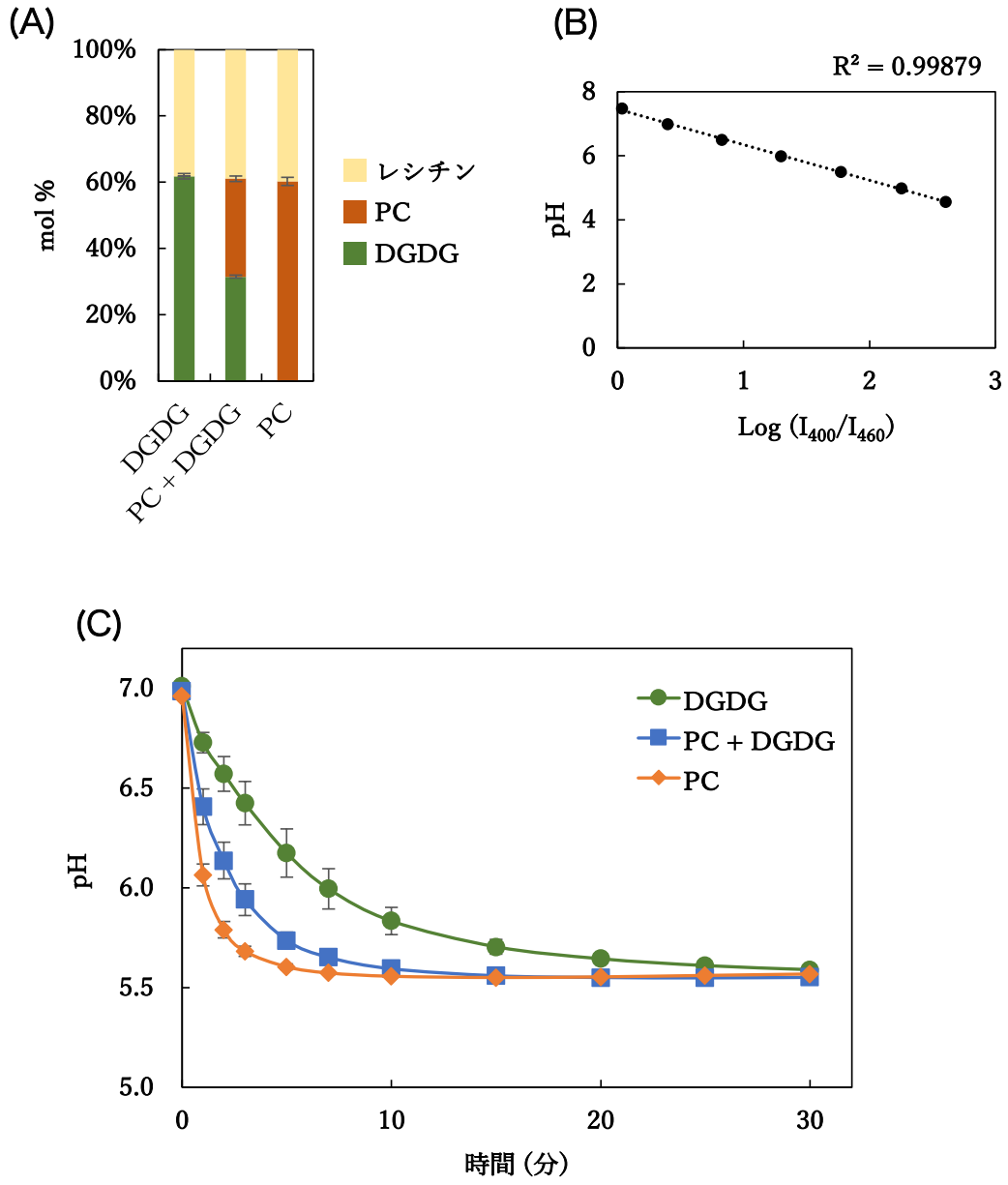


図 3-2.　ホウレンソウ葉脂質由来のリポソームのプロトン透過性
（A）作製したリポソームの脂質構成比。（B）リポソーム内部のpH測定に用いたピラニンについて導出した標準曲線。励起波長400 nmと460 nmにおける蛍光強度（蛍光波長510 nm）の比に対して自然対数を取り、溶液pHとの直線関係から標準曲線を導出した。（C）ホウレンソウ葉由来のDGDGおよびPCを用いて作成したリポソームの内部pHの変化。100 μLのリポソーム懸濁液（pH 7.0）を、1.9 mLの酸性バッファー（pH 4.5）と混合し、継時的に取得した蛍光励起スペクトルの値から、（B）において導出した標準曲線に基づいてリポソーム内部のpHを算出した。

表 3-2.　pH 6.0および3.5における1/3 MGRL培地のイオン濃度組成
GEOCHEM-EZ（Shaff et al., 2010）を用いて算出した、1/3 MGRL培地のpH6.0または3.5におけるイオンの存在割合の推定値を示した。

Metal	pH 6.0	pH 3.5	
Na	99.91%	99.91%	as a free metal
K	99.86%	99.86%	as a free metal
Ca	95.50%	98.11%	as a free metal
	1.00%	0.58%	complexed with PO_4
	1.26%	1.28%	complexed with SO_4
	2.24%	0.03%	complexed with EDTA
Mg	98.13%	98.97%	as a free metal
	1.03%	1.02%	complexed with SO_4
Fe^{2+}	1.06%	43.97%	as a free metal
	0.16%	5.21%	complexed with PO_4
	0.01%	0.45%	complexed with SO_4
	98.77%	50.31%	complexed with EDTA
Co^{2+}	99.99%	99.48%	complexed with EDTA
Cu^{2+}	100.00%	99.99%	complexed with EDTA
Zn	99.99%	99.51%	complexed with EDTA
Mn^{2+}	2.62%	63.35%	as a free metal
	97.34%	33.80%	complexed with EDTA

Ligand	pH 6.0	pH 3.5	
Cl	99.92%	99.92%	as a free ligand
NO_3	100.00%	100.00%	as a free ligand
PO_4	1.14%	0.66%	complexed with Ca
	98.19%	99.31%	complexed with H^+
SO_4	96.89%	95.45%	as a free ligand
	1.66%	1.68%	complexed with Ca
	1.02%	1.01%	complexed with Mg
	--	1.44%	complexed with H^+
$B(OH)_4$	99.92%	100.00%	complexed with H^+
MoO_4	99.06%	24.98%	as a free ligand
	0.94%	75.02%	complexed with H^+
EDTA	67.79%	0.97%	complexed with Ca
	12.89%	6.56%	complexed with Fe^{2+}
	1.50%	1.50%	complexed with Cu^{2+}
	1.50%	1.49%	complexed with Zn
	15.18%	5.27%	complexed with Mn^{2+}
	0.12%	83.97%	complexed with H^+

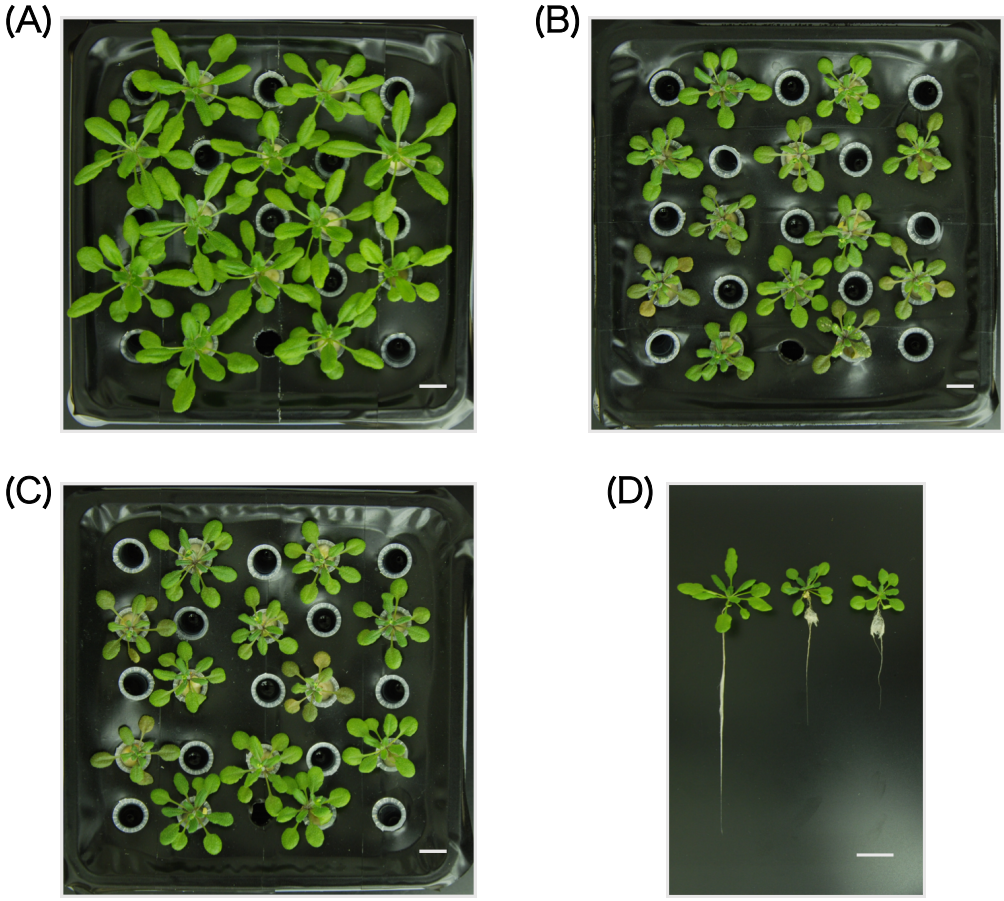


図 3-3.　酸性条件下でのシロイヌナズナ野生株の生育
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株を、1/3 MGRL培地に植え替えて5日間生育させた後、7日間の酸性処理を行った。（A）pH 6.0、（B）硫酸酸性（pH 3.7）、（C）塩酸酸性（pH 3.7）において7日間生育させた野生株の地上部の様子、および植物全体の様子（D）。左、pH6.0；中央、硫酸酸性；右、塩酸酸性。　bar = 1 cm

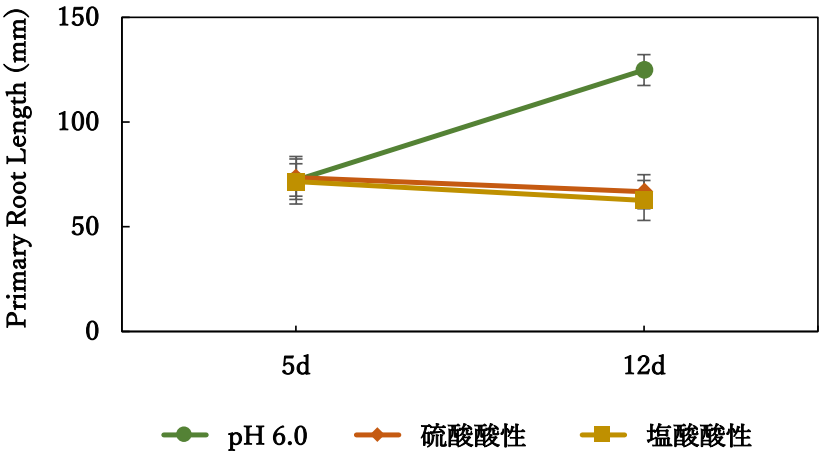


図 3-4.　酸性生育時のシロイヌナズナ野生株の主根長
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株を、1/3 MGRL培地に植え替えて5日間生育させた後、7日間の酸性処理を行った。pH 6.0、硫酸酸性（pH 3.7）、塩酸酸性（pH 3.7）における、水耕栽培5日目（5d）と12日目（12d）の主根長を平均値 ± SD（$n = 20$）で示した。

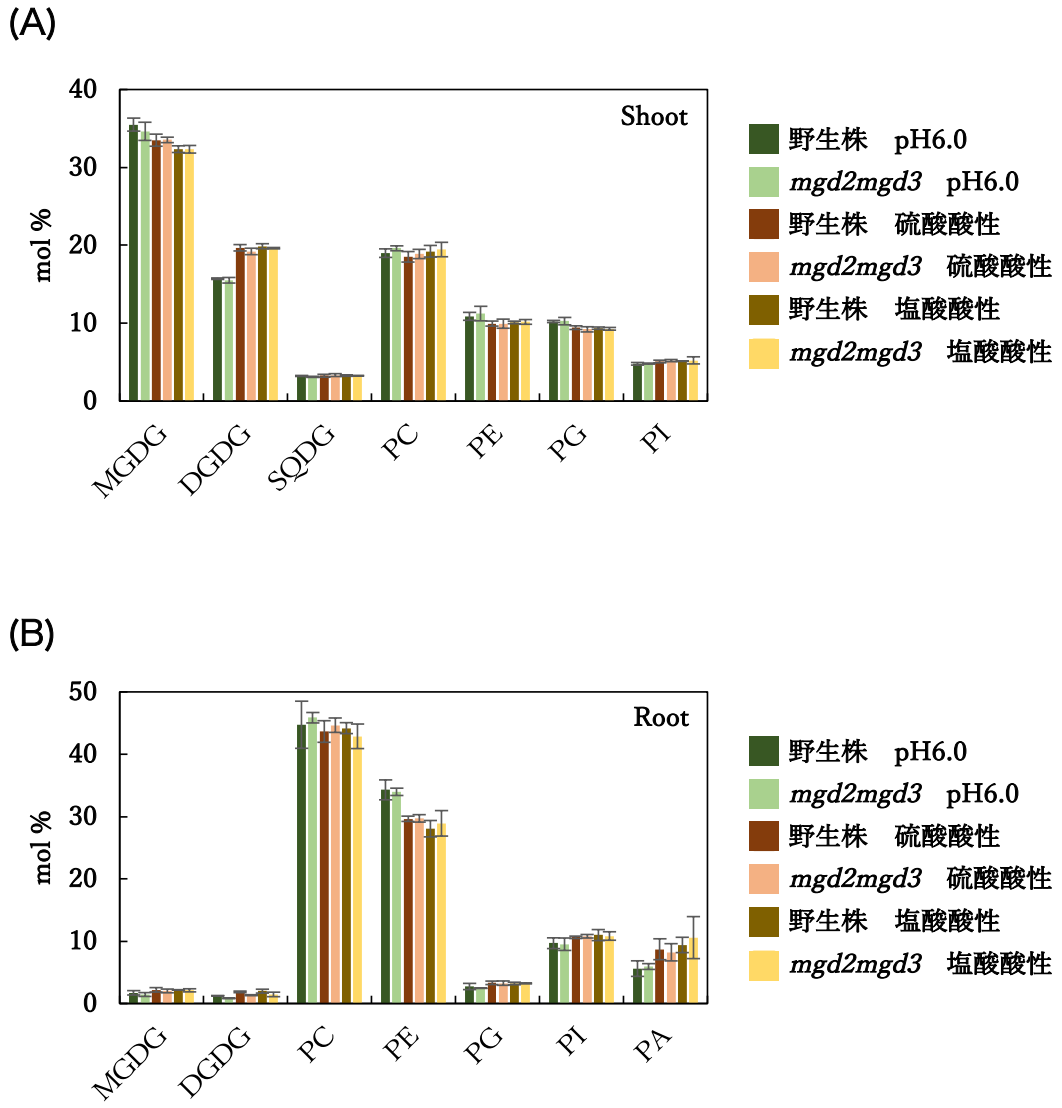


図 3-5.　酸性生育時のシロイヌナズナ野生株および*mgd2mgd3*の膜脂質組成
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株および*mgd2mgd3*を、1/3 MGRL培地に植え替えて5日間生育させた後、7日間の酸性処理を行った。pH 6.0、硫酸酸性（pH 3.7）、塩酸酸性（pH 3.7）において7日間生育させた植物の、地上部（A）および根（B）の膜脂質組成を、平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。
MGDG、モノガラクトシルジアシルグリセロール；DGDG、ジガラクトシルジアシルグリセロール； SQDG、スルホキノボシルジアシルグリセロール； PC、ホスファチジルコリン；PE、ホスファチジルエタノールアミン；PG、ホスファチジルグリセロール；PI、ホスファチジルイノシトール；PA、ホスファチジン酸

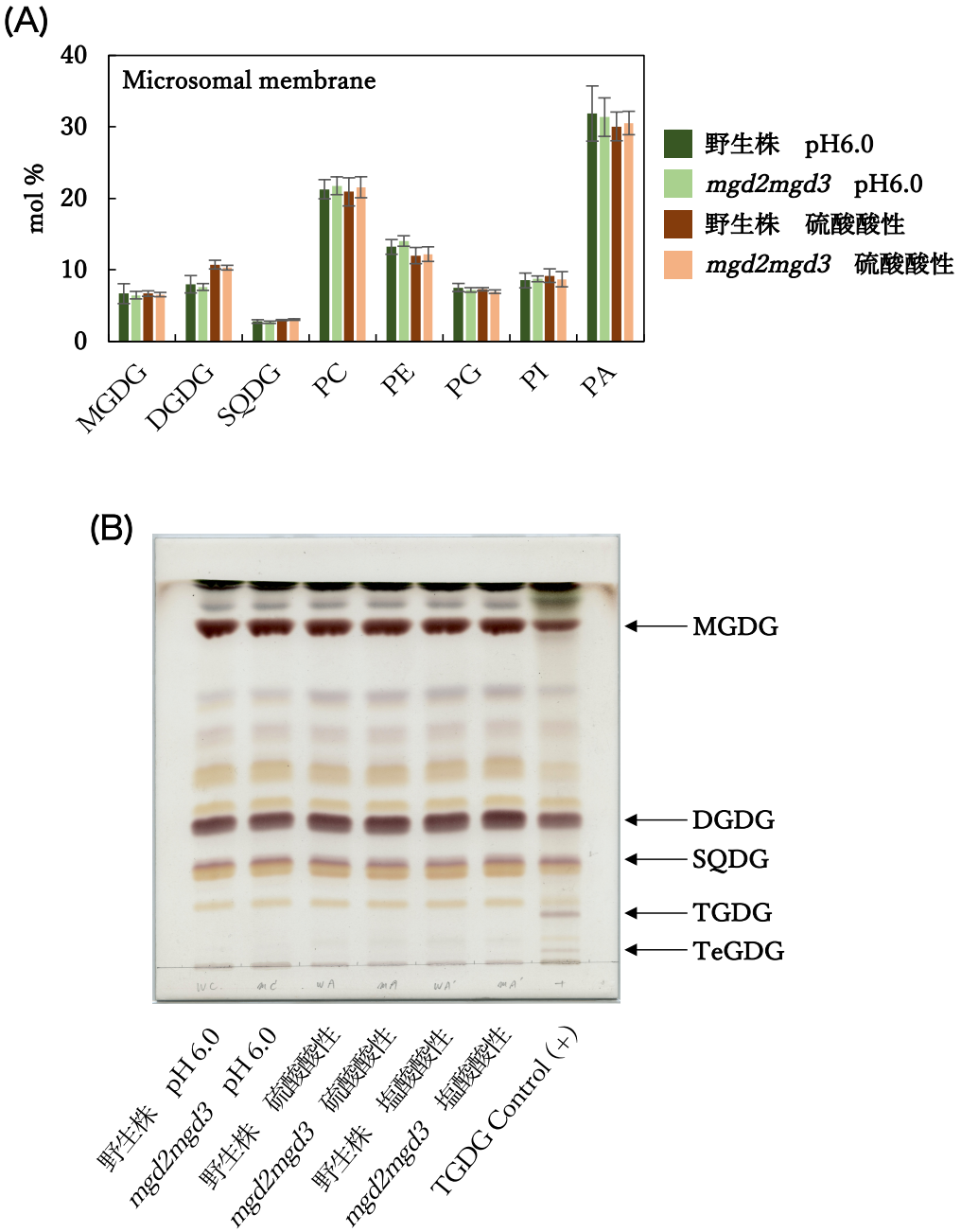


図 3-6.　酸性生育時のシロイヌナズナ野生株および*mgd2mgd3*の脂質解析
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株および*mgd2mgd3*を、1/3 MGRL培地に植え替えて5日間生育させた後、7日間の酸性処理を行った。pH 6.0、硫酸酸性（pH 3.7）、塩酸酸性（pH 3.7）において7日間生育させた植物の、地上部ミクロソーム膜画分の脂質組成（**A**）およびアンスロン硫酸を用いた糖脂質の検出（**B**）。膜脂質組成は平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。

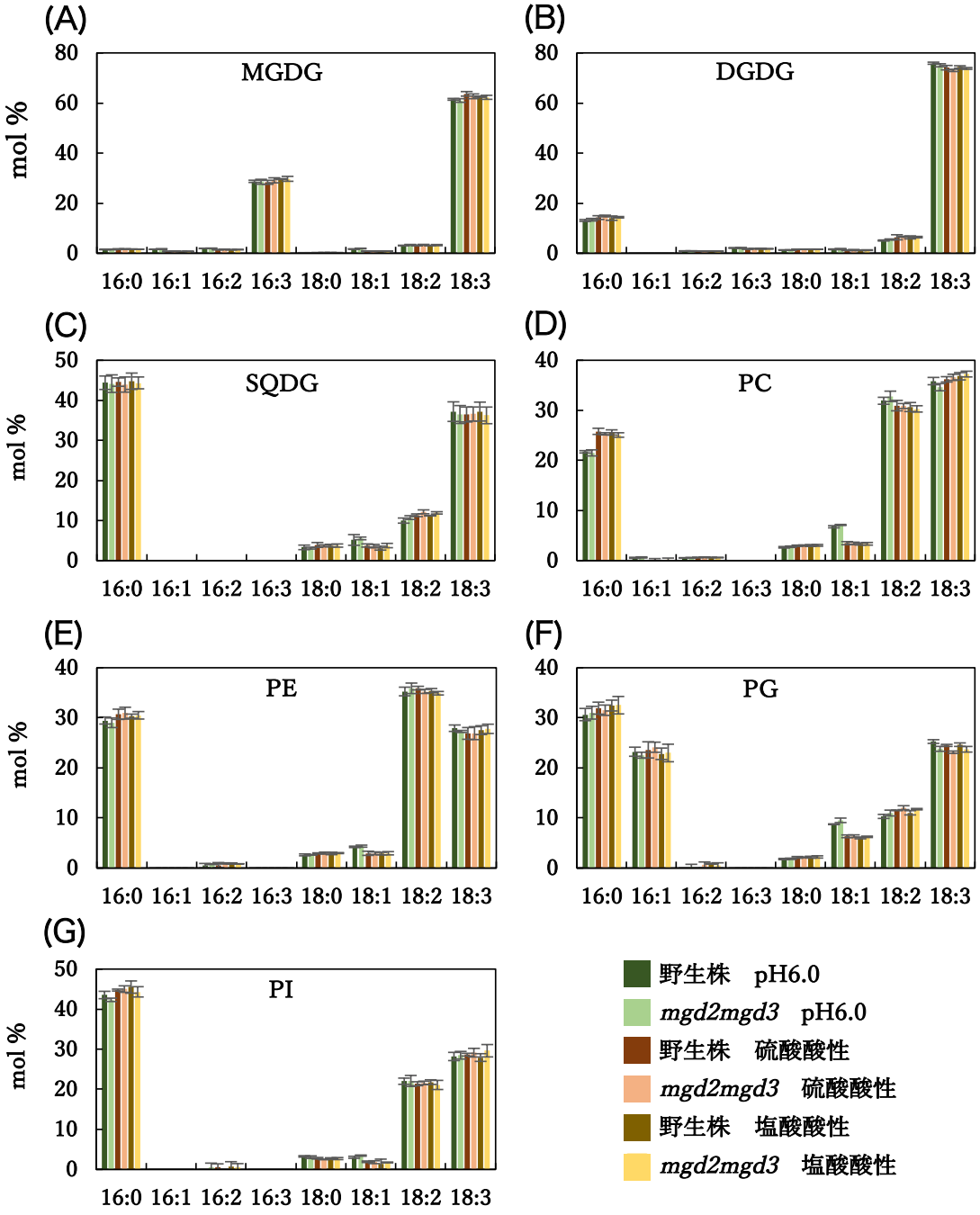


図 3-7.　酸性生育時のシロイヌナズナ野生株および*mgd2mgd3*の地上部における脂肪酸組成
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株および*mgd2mgd3*を、1/3 MGRL培地に植え替えて5日間生育させた後、7日間の酸性処理を行った。pH 6.0、硫酸酸性（pH 3.7）、塩酸酸性（pH 3.7）において7日間生育させた植物の、地上部におけるMGDG（A）、DGDG（B）、SQDG（C）、PC（D）、PE（E）、PG（F）、PI（G）それぞれの脂肪酸組成を、平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。

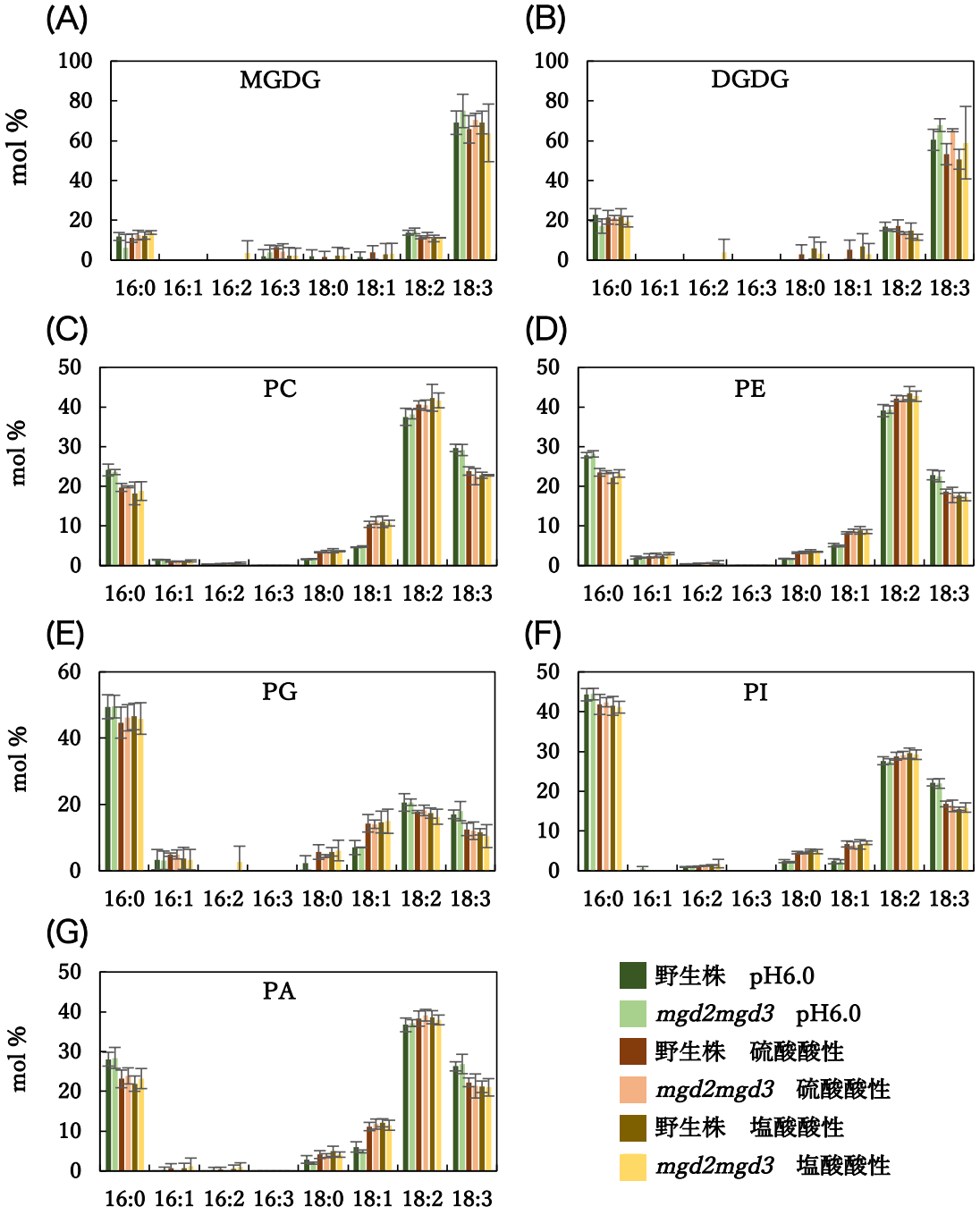


図 3-8.　酸性生育時のシロイヌナズナ野生株および*mgd2mgd3*の根における脂肪酸組成
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株および*mgd2mgd3*を、1/3 MGRL培地に植え替えて5日間生育させた後、7日間の酸性処理を行った。pH 6.0、硫酸酸性（pH 3.7）、塩酸酸性（pH 3.7）において7日間生育させた植物の、根におけるMGDG（A）、DGDG（B）、PC（C）、PE（D）、PG（E）、PI（F）、PA（G）それぞれの脂肪酸組成を、平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。

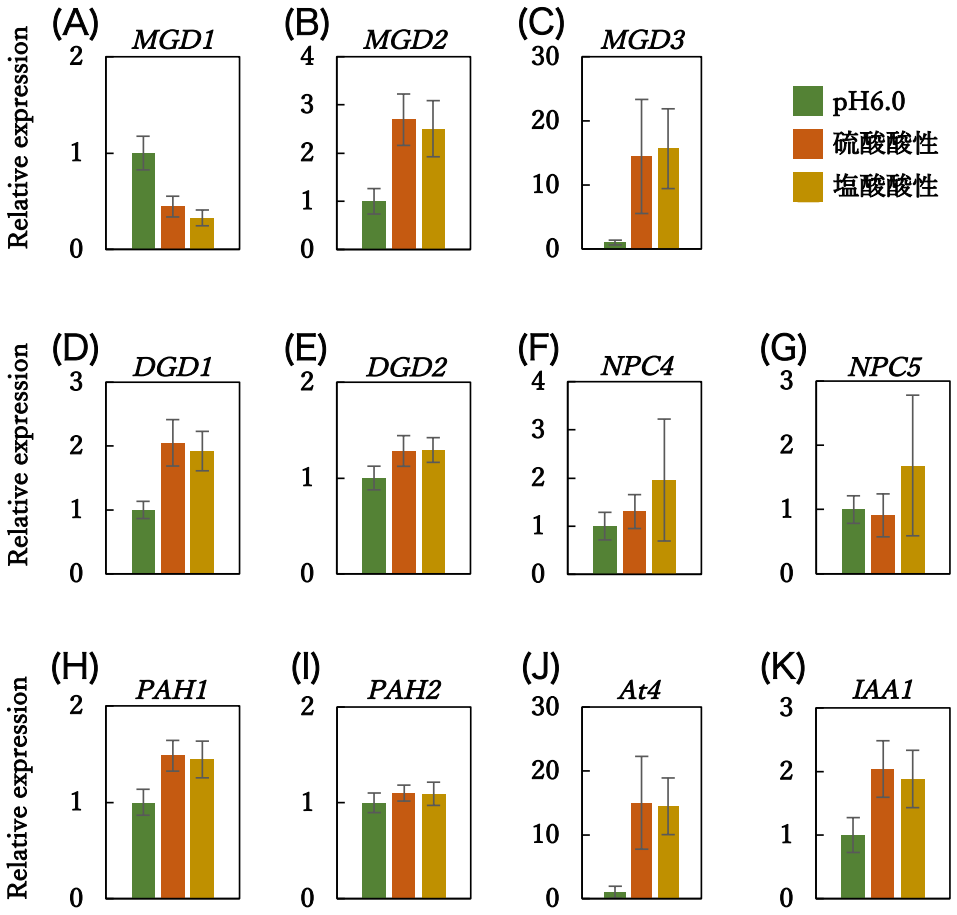


図 3-9.　酸性生育時のシロイヌナズナ野生株展開葉における遺伝子発現量
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株を、1/3 MGRL培地に植え替えて5日間生育させた後、7日間の酸性処理を行った。pH 6.0、硫酸酸性（pH 3.7）、塩酸酸性（pH 3.7）において7日間生育させた野生株の展開葉における、*MGD1*（A）、*MGD2*（B）、*MGD3*（C）、*DGD1*（D）、*DGD2*（E）、*NPC4*（F）、*NPC5*（G）、*PAH1*（H）、*PAH2*（I）、*At4*（J）、*IAA1*（K）各遺伝子の発現量を定量的RT-PCR法により解析した。pH 6.0における各遺伝子の発現量に対する相対発現量を、平均値 ± SD（$n = 8$）で示した。リファレンス遺伝子には*UBQ10*を用いた。

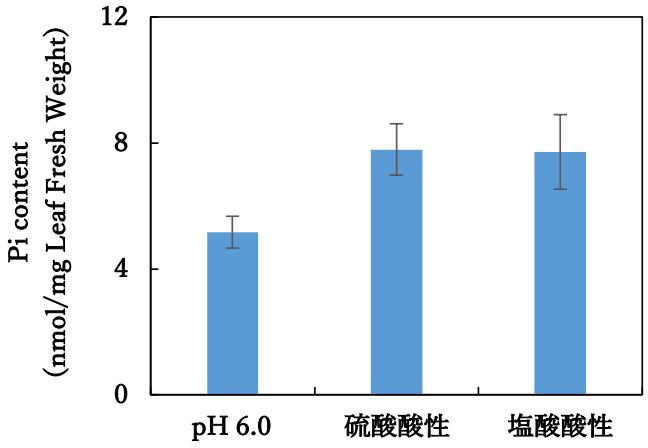


図 3-10.　酸性生育時のシロイヌナズナ野生株展開葉における無機リン酸含量
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株を、1/3 MGRL培地に植え替えて5日間生育させた後、7日間の酸性処理を行った。pH 6.0、硫酸酸性（pH 3.7）、塩酸酸性（pH 3.7）において7日間生育させた野生株の展開葉における、遊離の無機リン酸含量を、平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。

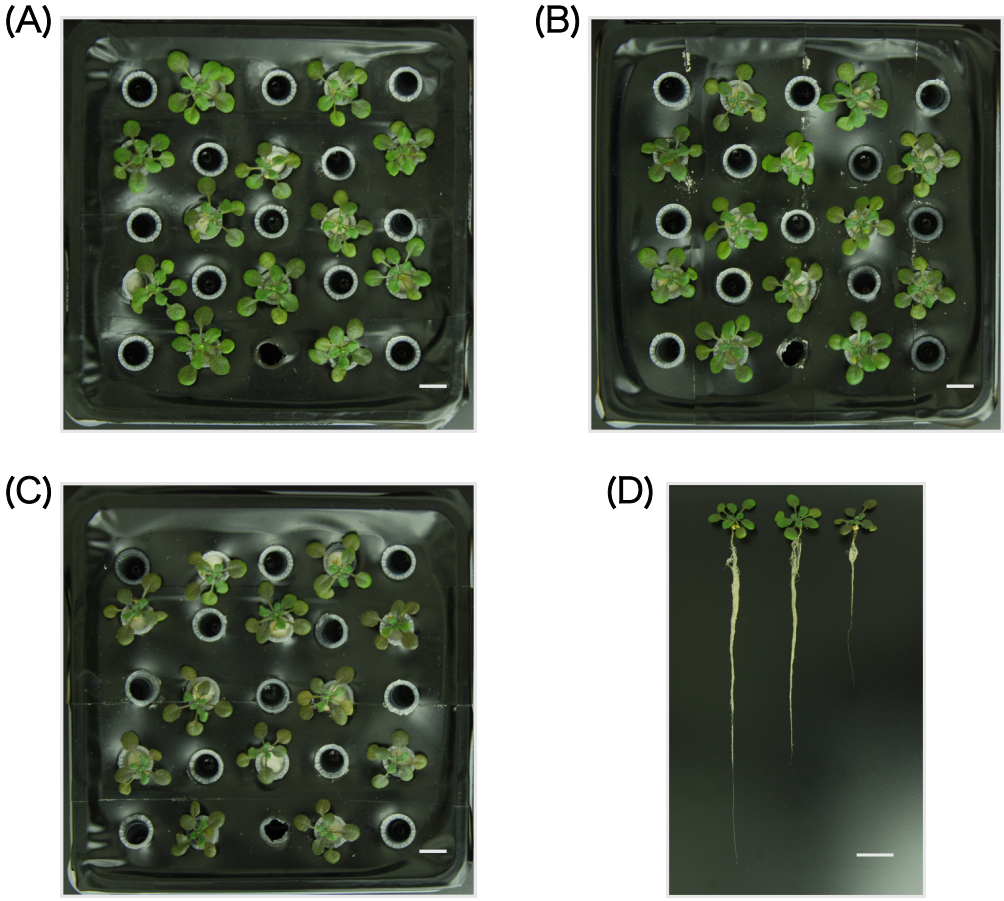


図 3-11.　酸性リン欠乏条件下でのシロイヌナズナ野生株の生育
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株を、1/3 MGRL-Pi培地に植え替えて5日間生育させた後、7日間の酸性リン欠乏処理を行った。（A）pH 6.0、（B）pH 4.5、（C）pH 3.7において7日間生育させた野生株の地上部の様子および植物全体の様子（D）。左、pH 6.0；中央、pH 4.5；右、pH 3.7。　bar = 1 cm

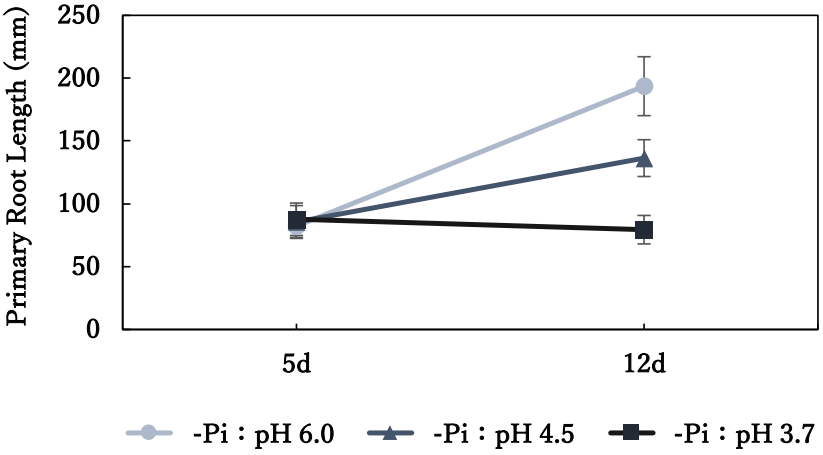


図 3-12.　酸性リン欠乏生育時のシロイヌナズナ野生株の主根長
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株を、1/3 MGRL-Pi培地に植え替えて5日間生育させた後、7日間の酸性リン欠乏処理を行った。pH 6.0、4.5、3.7における、水耕栽培5日目（5d）と12日目（12d）の主根長を平均値 ± SD（$n = 20$）で示した。

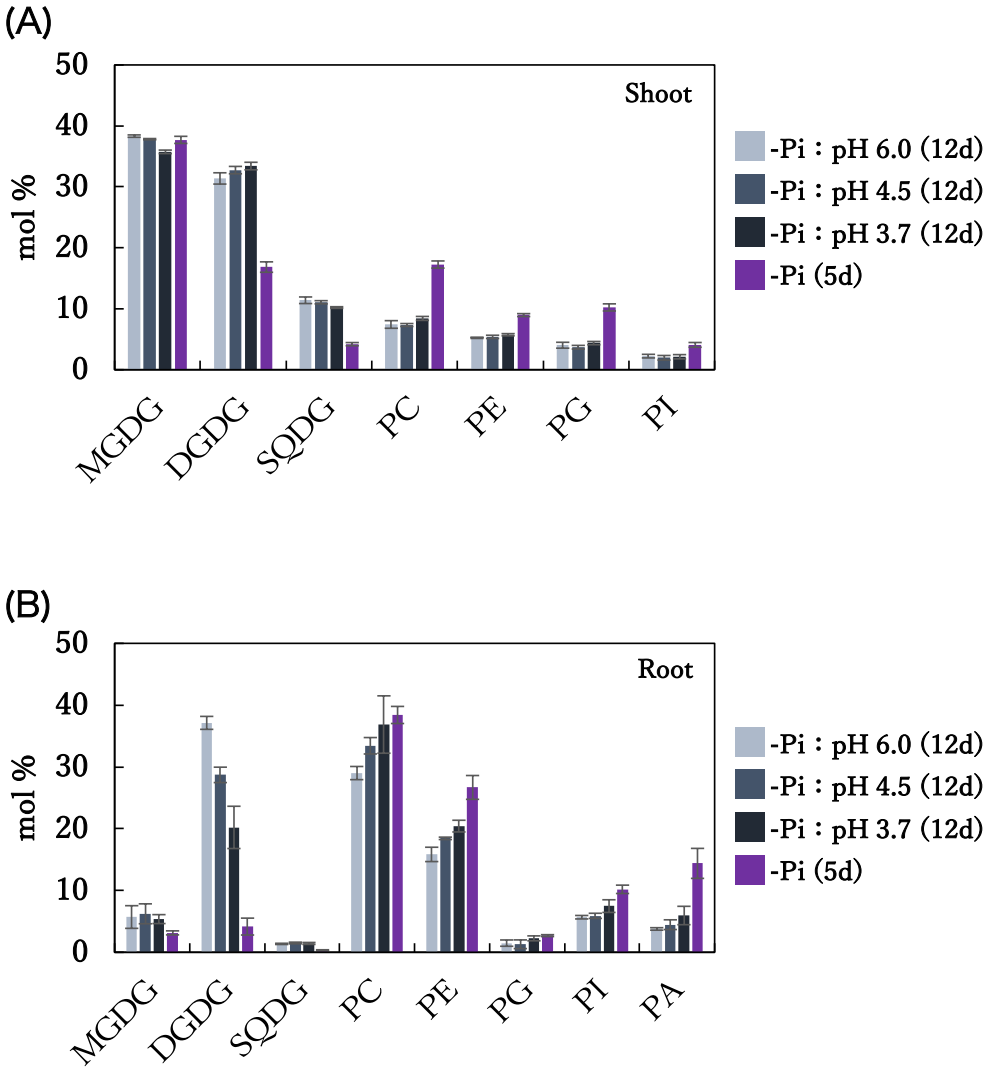


図 3-13.　酸性リン欠乏生育時のシロイヌナズナ野生株の膜脂質組成
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株を、1/3 MGRL-Pi培地に植え替えて5日間生育させた（-Pi（5d））後、7日間の酸性リン欠乏処理を行った。pH 6.0、4.5、3.7において7日間生育させた植物（-Pi：pH 6.0（12d）、4.5（12d）、3.7（12d））、および酸性リン欠乏処理前の植物（-Pi（5d））の地上部（A）および根（B）の膜脂質組成を、平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。
MGDG、モノガラクトシルジアシルグリセロール；DGDG、ジガラクトシルジアシルグリセロール； SQDG、スルホキノボシルジアシルグリセロール； PC、ホスファチジルコリン；PE、ホスファチジルエタノールアミン；PG、ホスファチジルグリセロール；PI、ホスファチジルイノシトール；PA、ホスファチジン酸

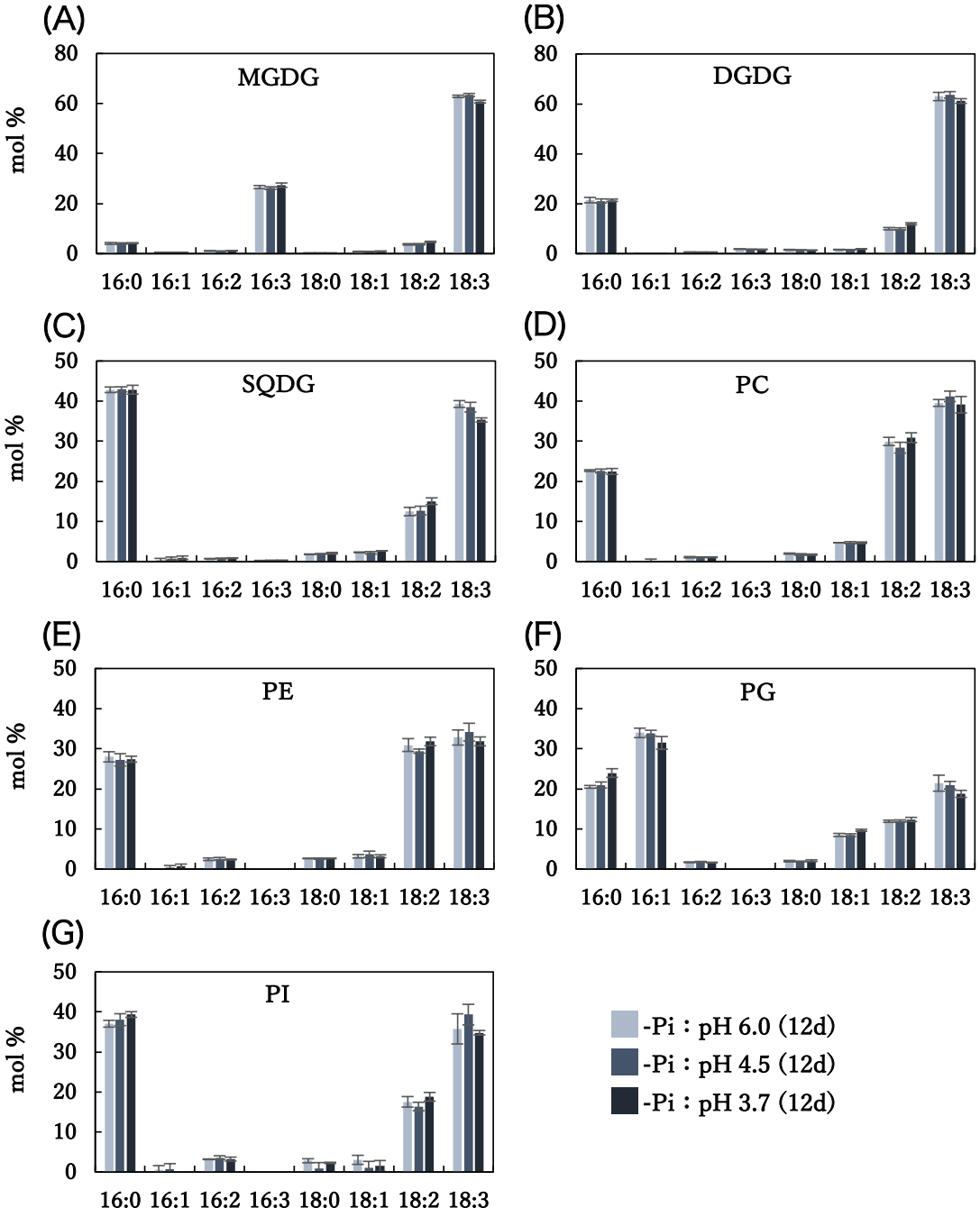


図 3-14.　酸性リン欠乏生育時のシロイヌナズナ野生株の地上部における脂肪酸組成
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株を、1/3 MGRL-Pi培地に植え替えて5日間生育させた後、7日間の酸性リン欠乏処理を行った。pH 6.0、4.5、3.7の酸性リン欠乏条件で生育させた植物の地上部におけるMGDG（A）、DGDG（B）、SQDG（C）、PC（D）、PE（E）、PG（F）、PI（G）それぞれの脂肪酸組成を、平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。

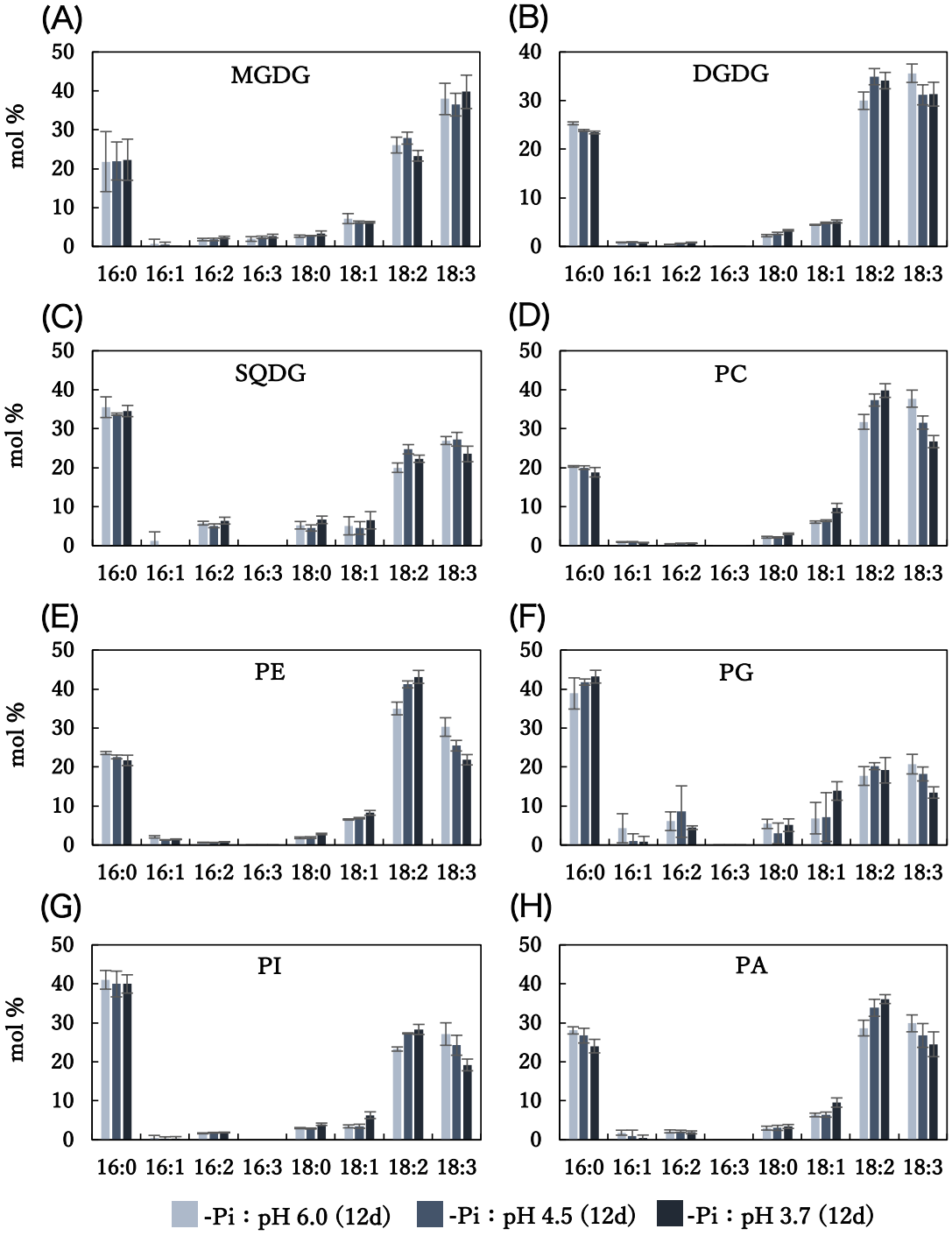


図 3-15.　酸性リン欠乏生育時のシロイヌナズナ野生株の根における脂肪酸組成
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株を、1/3 MGRL-Pi培地に植え替えて5日間生育させた後、7日間の酸性リン欠乏処理を行った。pH 6.0、4.5、3.7の酸性リン欠乏条件で生育させた植物の根におけるMGDG（A）、DGDG（B）、SQDG（C）、PC（D）、PE（E）、PG（F）、PI（G）、PA（H）それぞれの脂肪酸組成を、平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。

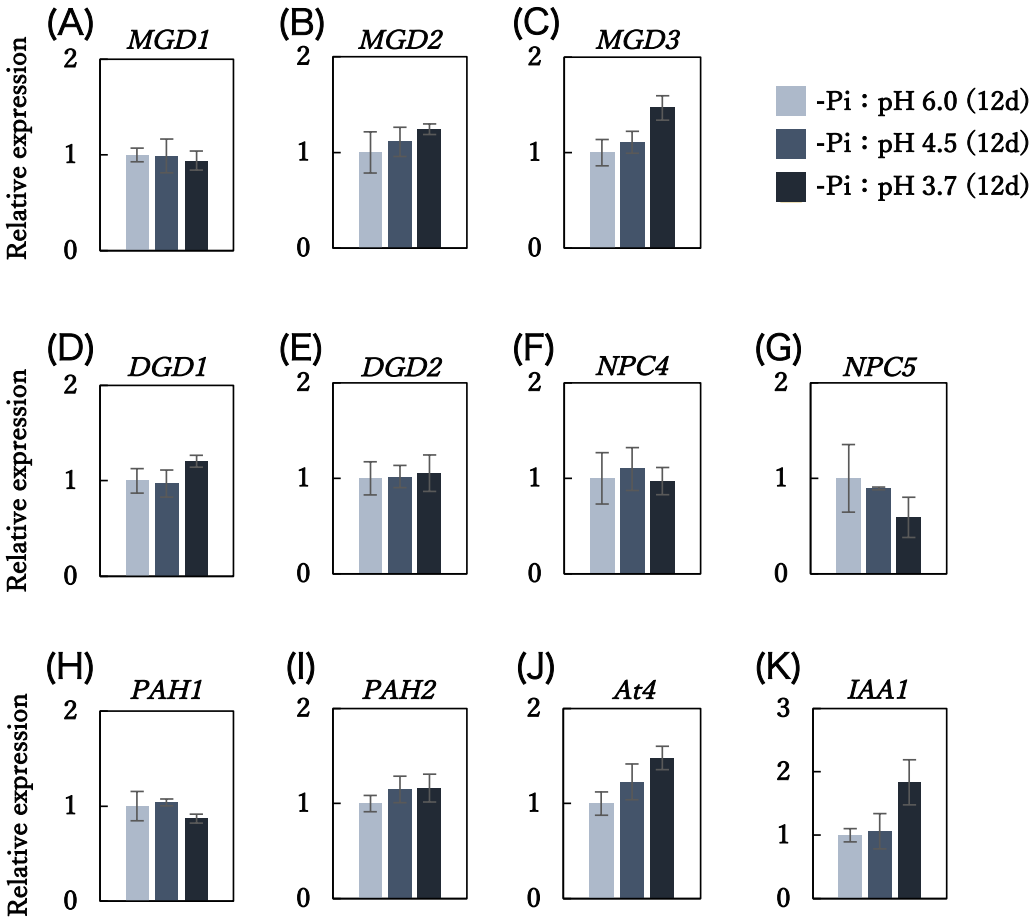


図 3-16.　酸性リン欠乏生育時のシロイヌナズナ野生株展開葉における遺伝子発現量
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株を、1/3 MGRL-Pi培地に植え替えて5日間生育させた後、7日間の酸性リン欠乏処理を行った。pH 6.0、4.5、3.7の酸性リン欠乏条件で生育させた野生株の展開葉における、*MGD1*（A）、*MGD2*（B）、*MGD3*（C）、*DGD1*（D）、*DGD2*（E）、*NPC4*（F）、*NPC5*（G）、*PAH1*（H）、*PAH2*（I）、*At4*（J）、*IAA1*（K）各遺伝子の発現量を定量的RT-PCR法により解析した。pH 6.0における各遺伝子の発現量に対する相対発現量を、平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。リファレンス遺伝子には*UBQ10*を用いた。

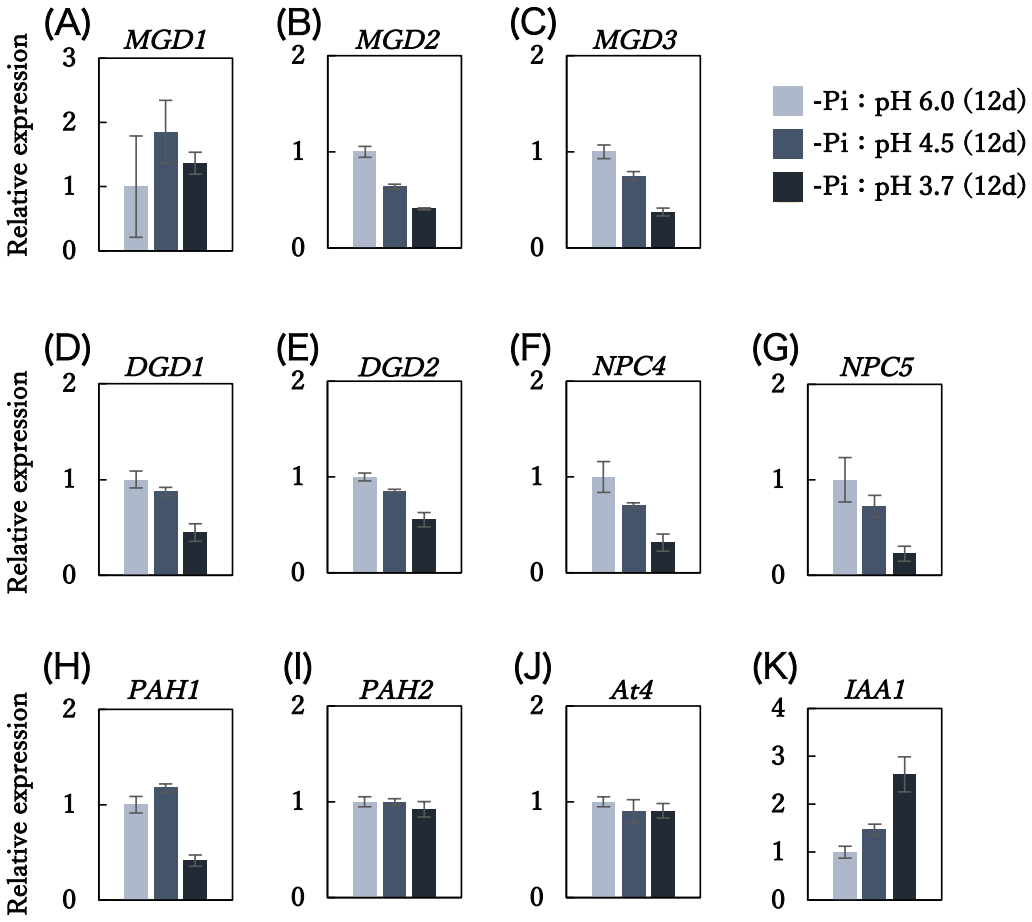


図 3-17.　酸性リン欠乏生育時のシロイヌナズナ野生株の根における遺伝子発現量
1/2 MS培地で10日間生育させたシロイヌナズナ野生株を、1/3 MGRL-Pi培地に植え替えて5日間生育させた後、7日間の酸性リン欠乏処理を行った。pH 6.0、4.5、3.7の酸性リン欠乏条件で生育させた野生株の根における、*MGD1*（A）、*MGD2*（B）、*MGD3*（C）、*DGD1*（D）、*DGD2*（E）、*NPC4*（F）、*NPC5*（G）、*PAH1*（H）、*PAH2*（I）、*At4*（J）、*IAA1*（K）各遺伝子の発現量を定量的RT-PCR法により解析した。pH 6.0における各遺伝子の発現量に対する相対発現量を、平均値 ± SD（$n = 3$）で示した。リファレンス遺伝子には*UBQ10*を用いた。

3.6 文献

Andersson, M.X., Stridh, M.H., Larsson, K.E., Liljenberg, C. and Sandelius, A.S. (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett.* **537**, 128–132.

Andersson, M.X., Larsson, K.E., Tjellström, H., Liljenberg, C. and Sandelius, A.S. (2005) Phosphate-limited Oat: The Plasma Membrane and the Tonoplast as Major Targets for Phospholipid-To-Glycolipid Replacement and Stimulation of Phospholipases in the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* **280**, 27578–27586.

Baba, T., Minamikawa, H., Hato, M. and Handa, T. (2001) Hydration and Molecular Motions in Synthetic Phytanyl-Chained Glycolipid Vesicle Membranes. *Biophys. J.* **81**, 3377–3386.

Barnes, A.C., Benning, C. and Roston, R. (2016) Chloroplast Membrane Remodeling during Freezing Stress Is Accompanied by Cytoplasmic Acidification Activating *SENSITIVE TO FREEZING 2*. *Plant Physiol.* **171**, 2140–2149.

Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37,** 911–917.

Block, M.A., Dorne, A., Joyard, J. and Douce, R. (1983) Preparation and Characterization of Membrane Fractions of Outer and Inner Envelope Membranes from Spinach C. *J. Biol. Chem.* **258**, 13281–13286.

Chen, J., Burke, J.J., Xin, Z., Xu, C. and Velten, J. (2006) Characterization of the *Arabidopsis* thermosensitive mutant *atts02* reveals an important role for galactolipids in thermotolerance. *Plant, Cell Environ.* **29**, 1437–1448.

Chiou, T.J., Aung, K., Lin, S.I., Wu, C.C., Chiang, S.F. and Su, C.L. (2006) Regulation of Phosphate Homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 412–421.

Elamrani, K. and Blume, A. (1983) Effect of the lipid phase transition on the kinetics of H^+/OH^- diffusion across phosphatidic acid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **727**, 22–30.

Elferink, M.G.L., Wit, J.G. de, Driessen, A.J.M. and Konings, W.N. (1994) Stability and proton-

permeability of liposomes composed of archaeal tetraether lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1193**, 247–254.

Foley, A.A., Brain, A.P.R., Quinn, P.J. and Harwood, J.L. (1988) Permeability of liposomes composed of binary mixtures of monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta* **939**, 430–440.

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

Fujiwara, T., Hirai, M.Y., Chino, M., Komeda, Y. and Naito, S. (1992) Effects of Sulfur Nutrition on Expression of the Soybean Seed Storage Protein Genes in Transgenic Petunia. *Plant Physiol.* **99**, 263–268.

Gigon, A., Matos, A.-R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y. and Pham-Thi, A.-T. (2004) Effect of Drought Stress on Lipid Metabolism in the Leaves of *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Columbia). *Ann. Bot.* **94**, 345–351.

Guo, L., Devaiah, S.P., Narasimhan, R., Pan, X., Zhang, Y., Zhang, W. and Wang, X. (2012) Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases Interact with Phospholipase Dδ to Transduce Hydrogen Peroxide Signals in the *Arabidopsis* Response to Stress. *Plant Cell* **24**, 2200–2212.

Hachiya, T., Sugiura, D., Kojima, M., Sato, S., Yanagisawa, S., Sakakibara, H., Terashima, I. and Noguchi, K. (2014) High CO_2 Triggers Preferential Root Growth of *Arabidopsis thaliana* Via Two Distinct Systems Under Low pH and Low N Stresses. *Plant Cell Physiol.* **55**, 269–280.

Hoek, J.B., Nicholls, D.G. and Williamson, J.R. (1980) Determination of the Mitochondrial Protonmotive Force in Isolated Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **255**, 1458–1464.

Ikka, T., Kobayashi, Y., Iuchi, S., Sakurai, N., Shibata, D., Kobayashi, M. and Koyama, H. (2007) Natural variation of *Arabidopsis thaliana* reveals that aluminum resistance and proton resistance are controlled by different genetic factors. *Theor. Appl. Genet.* **115**, 709–719.

Inoue, S., Takahashi, K., Okumura-Noda, H. and Kinoshita, T. (2016) Auxin Influx Carrier AUX1

Confers Acid Resistance for Arabidopsis Root Elongation Through the Regulation of Plasma Membrane H^+-ATPase. *Plant Cell Physiol.* **57**, 2194–2201.

Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J. and Block, M.A. (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J. Cell Biol.* **167**, 863–874.

Kalachova, T., Iakovenko, O., Kretinin, S. and Kravets, V. (2013) Involvement of phospholipase D and NADPH-oxidase in salicylic acid signaling cascade. *Plant Physiol. Biochem.* **66**, 127–33.

Kobayashi, K., Masuda, T., Takamiya, K. and Ohta, H. (2006) Membrane lipid alteration during phosphate starvation is regulated by phosphate signaling and auxin/cytokinin cross-talk. *Plant J.* **47**, 238–248.

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

Koyama, H., Toda, T. and Hara, T. (2001) Brief exposure to low-pH stress causes irreversible damage to the growing root in *Arabidopsis thaliana*: pectin-Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity. *J. Exp. Bot.* **52**, 361–368.

Kramer, D.M., Sacksteder, C.A. and Cruz, J.A. (1999) How acidic is the lumen? *Photosynth. Res.* **60**, 151–163.

Lager, I., Andréasson, O., Dunbar, T.L., Andreasson, E., Escobar, M.A. and Rasmusson, A.G. (2010) Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses. *Plant Cell Environ.* **33**, 1513–1528.

Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., et al. (2013) Acyl-Lipid Metabolism. *Arab. B.* **11**, e0161.

Marr, A.G. and Ingraham, J.L. (1962) Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **84**, 1260–1267.

Mathai, J.C., Sprott, G.D. and Zeidel, M.L. (2001) Molecular Mechanisms of Water and Solute Transport across Archaebacterial Lipid Membranes. *J. Biol. Chem.* **276**, 27266–27271.

McDaniel, R. V. (1988) Neutron diffraction studies of digalactosyldiacylglycerol. *Biochim. Biophys.*

Acta **940**, 158–164.

Moellering, E.R., Muthan, B. and Benning, C. (2010) Freezing Tolerance in Plants Requires Lipid Remodeling at the Outer Chloroplast Membrane. *Science* **330**, 226–228.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiol.* **15**, 473–497.

Murata, N., Wada, H. and Gombos, Z. (1992) Modes of Fatty-Acid Desaturation in Cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* **33**, 933–941.

Narise, T., Kobayashi, K., Baba, S., Shimojima, M., Masuda, S., Fukaki, H. and Ohta, H. (2010) Involvement of auxin signaling mediated by IAA14 and ARF7/19 in membrane lipid remodeling during phosphate starvation. *Plant Mol. Biol.* **72**, 533–544.

Okamura, K., Kawai, A., Wakao, N., Yamada, T. and Hiraishi, A. (2015) *Acidiphilium iwatense* sp. nov., isolated from an acid mine drainage treatment plant, and emendation of the genus *Acidiphilium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 42–48.

Paula, S., Volkov, A.G., Hoek, A.N. Van, Haines, T.H. and Deamer, D.W. (1996) Permeation of Protons, Potassium Ions, and Small Polar Molecules Through Phospholipid Bilayers as a Function of Membrane Thickness. *Biophys. J.* **70**, 339–48.

Pinosa, F., Buhot, N., Kwaaitaal, M., Fahlberg, P., Thordal-Christensen, H., Ellerström, M. and Andersson, M.X. (2013) Arabidopsis Phospholipase Dδ Is Involved in Basal Defense and Nonhost Resistance to Powdery Mildew Fungi. *Plant Physiol.* **163**, 896–906.

Róg, T., Vattulainen, I., Bunker, A. and Karttunen, M. (2007) Glycolipid Membranes through Atomistic Simulations: Effect of Glucose and Galactose Head Groups on Lipid Bilayer Properties. *J. Phys. Chem. B* **111**, 10146–10154.

Russo, M.A., Quartacci, M.F., Izzo, R., Belligno, A. and Navari-Izzo, F. (2007) Long- and short-term phosphate deprivation in bean roots: Plasma membrane lipid alterations and transient stimulation of phospholipases. *Phytochemistry* **68**, 1564–1571.

Shaff, J.E., Schultz, B.A., Craft, E.J., Clark, R.T. and Kochian, L. V. (2010) GEOCHEM-EZ: a chemical speciation program with greater power and flexibility. *Plant Soil* **330**, 207–214.

Shavrukov, Y. and Hirai, Y. (2016) Good and bad protons: genetic aspects of acidity stress responses in plants. *J. Exp. Bot.* **67**, 15–30.

Shimada, H., Nemoto, N., Shida, Y., Oshima, T. and Yamagishi, A. (2008) Effects of pH and Temperature on the Composition of Polar Lipids in *Thermoplasma acidophilum* HO-62. *J. Bacteriol.* **190**, 5404–5411.

Wada, H. and Murata, N. (1990) Temperature-Induced Changes in the Fatty Acid Composition of the Cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Plant Physiol.* **92**, 1062–1069.

Wang, S., Uddin, M.I., Tanaka, K., Yin, L., Shi, Z., Qi, Y., Mano, J., Matsui, K., Shimomura, N., Sakaki, T., Deng, X. and Zhang, S. (2014) Maintenance of Chloroplast Structure and Function by Overexpression of the Rice *MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE* Gene Leads to Enhanced Salt Tolerance in Tobacco. *Plant Physiol.* **165**, 1144–1155.

Wang, X., Devaiah, S.P., Zhang, W. and Welti, R. (2006) Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog. Lipid Res.* **45**, 250–278.

Wang, X., Lv, B., Cai, G., Fu, L., Wu, Y., Wang, X., Ren, B. and Ma, H. (2012) A proton shelter inspired by the sugar coating of acidophilic archaea. *Sci. Rep.* **2**, 892.

Webb, M.S. and Green, B.R. (1989) Permeability properties of large unilamellar vesicles of thylakoid lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **984**, 41–49.

Williams, W.P. and Gounaris, K. (1992) Stabilisation of PS-II-Mediated electron transport in oxygen-evolving PS-II core preparations by the addition of compatible co-solutes. *Biochim. Biophys. Acta* **1100**, 92–97.

Yan, F., Feuerle, R., Schäffer, S., Fortmeier, H. and Schubert, S. (1998) Adaptation of Active Proton Pumping and Plasmalemma ATPase Activity of Corn Roots to Low Root Medium pH. *Plant Physiol.* **117**, 311–319.

Yoshinaga, M.Y., Kellermann, M.Y., Valentine, D.L. and Valentine, R.C. (2016) Phospholipids and glycolipids mediate proton containment and circulation along surface of energy-transducing membranes. *Prog. Lipid Res* **64**, 1–55.

Zhang, Y.-K., Zhu, D.-F., Zhang, Y.-P., Chen, H.-Z., Xiang, J. and Lin, X.-Q. (2015) Low pH-

Induced Changes of Antioxidant Enzyme and ATPase Activities in the Roots of Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings. *PLoS One* **10**, e0116971.

第 4 章　総括

4.1　総合討論と今後の展望

本研究で得られたデータと既知の知見を踏まえ、各ストレス条件が植物の脂質組成と生育に与える影響を表 4-1 および表 4-2 にまとめた。これを基に、多面的な環境応答における糖脂質合成の意義について考察を行う。

リン欠乏時およびスクロース添加時には、B-type MGDG 合成酵素の活性化により合成された DGDG が葉緑体（プラスチド）外へと供給される。また、この際に特に根の生育が促進される。一方で、酸性ストレス時には A-type MGDG 合成酵素を介した DGDG 合成が活性化され、合成された DGDG が葉緑体包膜に蓄積することが示唆された。また、酸性生育時の地上部および根の生育は抑制された。環境ストレスへの適応は様々な代謝変動を伴うため、一般に多くのエネルギーを必要とする。そのため植物は、周囲の生育環境の特徴を捉えながら、限られたエネルギーのリソースを適切に配分して生育していく必要がある。リン欠乏に陥った植物は、リンの吸収効率を高めるために、根の生育を促進しなければならない。一方で、酸性環境において根の生育が促進されると、プロトン過多な環境と接する表面積が増えることで植物体の被る傷害がより深刻になると考えられる。このように特徴の異なる環境ストレスに対して、植物は A-type と B-type のガラクト脂質合成経路を巧みに使い分け、適応を行っていることが本研究により明らかになった。

第 2 章に示した結果より、B-type MGDG 合成酵素を介した DGDG 合成について、今まで考えられていたリンの節約の他に、過剰な糖を消費しながら生体膜の構成要素を供給するという生理的役割を担っていることが示唆された。糖含量は、植物にとって重要なエネルギーの指標であり、生育の促進と抑制を司る要因である。糖の中でもスクロースは植物体内において、光合成によって固定された炭素源の主要な輸送形態である。スクロース含量の上昇と生育促進の関連性については、スクロースの分解産物であるグルコースを介して生成されるトレハロース-6-リン酸が、生育促進を負に制御している SnRK1 を抑制することで、生育を促進する機構が明らかになっている（Lastdrager et al., 2014）。このことから、生

育促進にはスクロースそのものの増加が重要なのではなく、スクロースが滞りなく代謝されていることが重要であると考えられる。また、培地からの糖の吸収がない場合、スクロースはソース器官（おもに光合成器官）において多量に合成されているため濃度が高く、シンク器官（おもに根など）においては濃度が低い。この濃度勾配が生み出す浸透圧の差が師管液を介したスクロース輸送の駆動力になっていると考えられている。このことから、根の生育の促進には、スクロースを地上部から根に輸送すると同時に、根においてスクロースの過剰な蓄積が起こらないよう、スクロースの代謝・分解を促進することが必要となる。

糖過剰な条件はリン十分およびリン欠乏条件において、植物のリン欠乏応答を増強する（Müller, et al., 2007）。また、*Lupinus albus* においてリン欠乏に応答したリン酸トランスポーターや酸性ホスファターゼの発現に、光合成の活性化または培地への糖の添加が必要であることが知られており（Liu et al., 2005）、生体内における利用可能なリンと糖のバランスが植物のリン欠乏応答において重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、このバランスが大幅に崩れると、植物の生育は阻害される（Karthikeyan et al., 2007）。リン欠乏に陥った植物は、一方でリンの獲得のために根の生育を促進しなければならず、他方ではリンの使用量を最小限に抑えなければならない。加えて、生育促進のために必要な糖に関しても、常に代謝を回すことで過剰な蓄積を防ぐ必要がある。そのような状況において、B-type MGDG 合成酵素を介したプラスチド外への DGDG 供給は有利に働くと考えられる。

A-type MGDG 合成酵素を介した DGDG 合成が活性化されていた酸性ストレスへの適応にも糖が関わっている。酸性ストレス時の植物体の地上部および根においてスクロースの含量が増加し、さらに、酸性条件に重ねて CO_2 分圧を上昇させると酸性応答が強化されることが知られている（Hachiya et al., 2014）。一方で、リン欠乏時には葉緑体内にデンプンの蓄積が起こるが（Nielsen et al., 1998）、根や葉におけるスクロース含量の増加は見られず、茎のスクロース含量が増加する（Ciereszko et al., 2001）。このことは、リン欠乏時には葉から根へのスクロース輸送が活性化されると共に、根におけるスクロースの代謝・分解が促進されていることを示唆している。これに対して、地上部と根でスクロースの蓄積が起こる酸性ストレス条件では、根におけるスクロースの代謝・分解が抑制されていると考えられる。リン欠乏とは異なり、生育を促進することがデメリットとなるストレス条件においては、植

物は積極的に生育を抑制することで、ストレスへの適応を優先する戦略をとると考えられている（Kim et al., 2012; Breuer et al., 2012）。酸性ストレスと同じく、*DGD1* の寄与によって DGDG が増加することが知られている乾燥や高温ストレス時にも、植物の生育は抑制される（Gigon et al., 2004; Chen et al., 2006）。このことから、厳しい環境を耐え忍んで生育する際に、MGD1-DGD1 経路を介した DGDG 合成の活性化と、葉緑体膜への DGDG の蓄積が光合成機能の維持に寄与していると考えられる。

また、序論に示したように、自然界においてリン欠乏と酸性条件は複合的に起こりうる生育環境ストレスの例の 1 つである。第 3 章の後半に示した酸性リン欠乏ストレスの解析から、酸性ストレスとリン欠乏ストレスの影響が、地上部では相加的に、根では拮抗的に作用することが明らかになった。すなわち、地上部においてはリン欠乏によって誘導された DGDG の増加に加えて、酸性ストレスの影響による DGDG のさらなる増加が見られたのに対し、根ではリン欠乏時の膜脂質転換が抑制されていた。また、酸性リン欠乏時にはリン欠乏の影響が打ち消され、根の伸長が阻害された。この結果は、根での B-type MGDG 合成酵素を介したガラクト脂質合成の活性化と、植物体の生育促進との関連性を支持した。酸性リン欠乏環境では、酸性ストレスと同じく、根の生育を促進させることはデメリットが大きいと推測される。酸性リン欠乏時の根においては、リンの不足に加えて、B-type MGDG 合成酵素を介したガラクト脂質合成を抑制することで、リンと糖のバランスを崩し、根の伸長を積極的に阻害している可能性が考えられる。

酸性リン欠乏時の根においては、リン欠乏時の膜脂質転換が遺伝子の転写レベルから抑制されていた。一方で総てのリン欠乏応答が抑制されているわけではなかったことから、植物の生育や代謝と連動した何らかの機構によって B-type MGDG 合成酵素の活性が制御されていることが示唆された。オーキシンと拮抗的に作用するサイトカイニンはリン欠乏時の膜脂質転換を抑制することが知られているが（Kobayashi et al., 2006）、サイトカイニンは *At4* の遺伝子発現応答を含むリン欠乏応答を広く抑制することから（Franco-Zorrilla et al., 2005）、酸性リン欠乏条件時の根においてはサイトカイニンとも異なる制御機構が機能していると考えられる。今後、これらの制御機構の解明を含む、植物の膜脂質代謝を介した環境適応戦略の包括的理解に向けて、研究が進んでいくことを期待する。

4.2　表および図

表4-1.　リン欠乏・スクロース添加・酸性ストレスが植物に及ぼす影響の比較

生育条件	リン欠乏	スクロース添加	酸性ストレス
糖の含量	＋	＋	＋
遊離リン酸含量	－－	＋	＋
リン脂質含量	－－	変化なし	変化なし
糖脂質含量	＋＋	＋	＋
糖脂質合成経路	B-type	B-type	A-type
糖脂質の増加部位	葉緑体外	葉緑体外	葉緑体包膜
地上部の生育	抑制	促進	抑制
根の生育	促進	促進	抑制

表4-2.　リン欠乏・酸性ストレス・酸性リン欠乏ストレスが植物に及ぼす影響の比較

生育条件	リン欠乏	酸性リン欠乏		酸性ストレス
器官		地上部	根	
各ストレスの影響		相加的	拮抗的	
リン脂質含量	−−	−−	−	変化なし
糖脂質含量	++	+++	+	+
糖脂質合成経路	B-type	A/B-type	B-type	A-type
糖脂質の増加部位	葉緑体外	葉緑体内外	プラスチド外	葉緑体包膜
地上部の生育	抑制	抑制		抑制
根の生育	促進		抑制	抑制

4.3 文献

Breuer, C., Morohashi, K., Kawamura, A., Takahashi, N., Ishida, T., Umeda, M., Grotewold, E. and Sugimoto, K. (2012) Transcriptional repression of the APC/C activator CCS52A1 promotes active termination of cell growth. *EMBO J.* **31**, 4488–4501.

Ciereszko, I., Johansson, H., Hurry, V. and Kleczkowski, L.A. (2001) Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and *pho* mutants of *Arabidopsis*. *Planta* **212**, 598–605.

Chen, J., Burke, J.J., Xin, Z., Xu, C. and Velten, J. (2006) Characterization of the *Arabidopsis* thermosensitive mutant *atts02* reveals an important role for galactolipids in thermotolerance. *Plant, Cell Environ.* **29**, 1437–1448.

Franco-Zorrilla, J.M., Martín, A.C., Leyva, A. and Paz-Ares, J. (2005) Interaction between Phosphate-Starvation, Sugar, and Cytokinin Signaling in Arabidopsis and the Roles of Cytokinin Receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiol.* **138**, 847–857.

Gigon, A., Matos, A.-R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y. and Pham-Thi, A.-T. (2004) Effect of Drought Stress on Lipid Metabolism in the Leaves of *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Columbia). *Ann. Bot.* **94**, 345–351.

Hachiya, T., Sugiura, D., Kojima, M., Sato, S., Yanagisawa, S., Sakakibara, H., Terashima, I. and Noguchi, K. (2014) High CO_2 Triggers Preferential Root Growth of *Arabidopsis thaliana* Via Two Distinct Systems Under Low pH and Low N Stresses. *Plant Cell Physiol.* **55**, 269–280.

Karthikeyan, A.S., Varadarajan, D.K., Jain, A., Held, M.A., Carpita, N.C. and Raghothama, K.G. (2007) Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in *Arabidopsis*. *Planta* **225**, 907–918.

Kim, J.-S., Mizoi, J., Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakajima, J., Nakashima, K., Mitsuda, N., Takiguchi, Y., Ohme-Takagi, M., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Matsui, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) *Arabidopsis* GROWTH-REGULATING FACTOR7 Functions as a Transcriptional Repressor of Abscisic Acid– and Osmotic Stress–Responsive

Genes, Including *DREB2A*. *Plant Cell* **24**, 3393–3405.

Kobayashi, K., Masuda, T., Takamiya, K. and Ohta, H. (2006) Membrane lipid alteration during phosphate starvation is regulated by phosphate signaling and auxin/cytokinin cross-talk. *Plant J.* **47**, 238–248.

Lastdrager, J., Hanson, J. and Smeekens, S. (2014) Sugar signals and the control of plant growth and development. *J. Exp. Bot.* **65**, 799–807.

Liu, J., Samac, D.A., Bucciarelli, B., Allan, D.L. and Vance, C.P. (2005) Signaling of phosphorus deficiency-induced gene expression in white lupin requires sugar and phloem transport. *Plant J.* **41**, 257–268.

Müller, R., Morant, M., Jarmer, H., Nilsson, L. and Nielsen, T.H. (2007) Genome-Wide Analysis of the Arabidopsis Leaf Transcriptome Reveals Interaction of Phosphate and Sugar Metabolism. *Plant Physiol.* **143**, 156–171.

Nielsen, T.H., Krapp, A., Röper-Schwarz, U. and Stitt, M. (1998) The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen. *Plant, Cell Environ.* **21**, 443–454.

報文目録

Murakawa, M., Shimojima, M., Shimomura, Y., Kobayashi, K., Awai, K. and Ohta, H. (2014) Monogalactosyldiacylglycerol synthesis in the outer envelope membrane of chloroplasts is required for enhanced growth under sucrose supplementation. *Front. Plant Sci.* **5**, 280.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援とご指導をいただきました、指導教員である東京工業大学生命理工学院教授 太田啓之先生に心より感謝申し上げます。また、日頃より実験の指導やデータ解釈の議論を通じて、研究者としてのあり方をご教授いただきました、東京工業大学生命理工学院准教授 下嶋美恵先生には深く感謝致します。

研究室配属以来、実験指導や多くのご助言をいただきました、東京工業大学生命理工学院准教授 増田真二先生に深謝いたします。また、日頃より研究にまつわる様々な相談事に真摯に対応していただいた、東京工業大学生命理工学院助教 堀孝一先生に御礼申し上げます。

リポソームを用いた膜のプロトン透過性測定実験に際してご指導を賜り、試料もご提供いただきました、愛媛大学プロテオサイエンスセンター 野澤彰先生に感謝致します。また、タンパク質の局在および相互作用解析に関してご協力いただきました、島根大学生物資源科学研究科 西村浩二先生に感謝致します。

博士前期課程のフランス留学中に、研究の指導はもちろん、生活面でも多大なるご支援をいただきました Université Grenoble の Dr. Cyrille Botté および Dr. Yoshiki Botté Yamaryo、CNRS, CEA の Dr. Éric Maréchal に御礼申し上げます。

最後に、長い大学院生活において共に研究室の運営を現場で支えてくれた太田・下嶋研究室の皆様、並びに太田・増田研究室当時からの先輩、同期、後輩の皆様に感謝申し上げます。