

植物組織のホモジナイズに伴う
グリコシルイノシトールホスホセラミド分解の生理的意義

令和6年3月

徳島大学大学院
先端技術科学教育部
物質生命システム工学専攻

高井 誠道

目次

要約	3
序論	4
実験方法	6
実験結果	8
考察	18
参考文献	20
謝辞	23

本論文では、以下の略語を用いた。

Abbreviations

DAG, diacylglycerol; (ジアシルグリセロール)
DGDG, digalactosyldiglyceride; (ジガラクトシルジアシルグリセロール)
FFA, free fatty acid; (遊離脂肪酸)
GIPC, glycosylinositol phosphoceramide (グリコシルイノシトールホスホセラミド)
GluCer, glucosylceramide (グルコシルセラミド)
InoGly, inositol glycan; (イノシトールグリカン)
MGDG, monogalactosyldiglyceride; (モノガラクトシルジアシルグリセロール)
NPC, nonspecific phospholipase C; (非特異的ホスホリパーゼ C)
PA, phosphatidic acid; (ホスファチジン酸)
PC1P, phytoceramide 1-phosphate (フィトセラミド 1-リン酸)
PCer, phytoceramide; (フィトセラミド)
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)
PI, phosphatidylinositol; (ホスファチジルイノシトール)
PS, phosphatidylserine; (ホスファチジルセリン)
PSH, phytoshingosine; (フィトスフィンゴシン)
PLC, phospholipase C; (ホスホリパーゼ C)
PLD, phospholipase D; (ホスホリパーゼ D)
SphM, sphingomyelin; (スフィンゴミエリン)
SQDG, sulfoquinovosyldiglyceride; (スルホキノボシルジアシルグリセロール)
THAP, 2,4,6-trihydroxy-acetophenone; (2,4,6-トリヒドロキシアセトフェノン)
VLCFA, very long-chain fatty acid. (極長鎖脂肪酸)

要約

植物スフィンゴ脂質（グリコシルイノシトールホスホセラミド、GIPC；グルコシルセラミド、GluCer；フィトセラミド 1-リン酸、PC1P およびフィトセラミド、PCer）の簡便な定量法を開発した。この方法は、1) 1-ブタノールを用いた脂質の抽出、2) メチルアミンによるアルカリ加水分解、3) TLC による分離、4) プリムリン/UV で可視化した TLC 上のスポットの発色強度に基づく定量から成る。この方法を用いて、植物組織のホモジナイズに伴うスフィンゴ脂質の組成変化を調べた結果、アブラナ科植物（キャベツ、ブロッコリー、シロイヌナズナ）の組織をホモジナイズすると、ほとんどの GIPC が分解されることが明らかになった。GIPC の減少に伴って、PC1P と PCer が増加することから、GIPC はそれぞれ GIPC の D 位と C 位で加水分解されていることが示唆された。ニンジンの根と葉では、GIPC 分解の大部分は PCer の増加によって補われた。イネの根では、GIPC の減少は PC1P と PCer の増加では十分に説明できず、ホスホリパーゼ C と D 活性以外の酵素が働いていることが示唆された。脂質の分離に汎用される TLC は誰でも手軽に行えるだけでなく、画像解析による定量も可能であり、新たな脂質の出現や既存脂質の増減を検出できる。今回開発した方法は植物におけるスフィンゴ脂質の代謝様式の解析に有用と考えられる。

序論

スフィンゴ脂質は真核細胞の細胞膜の主要な構成成分である。動物における主なスフィンゴ脂質はスフィンゴミエリンとスフィンゴリン脂質であり、植物における主なスフィンゴ脂質はグリコシルイノシトールホスホセラミド (GIPC) とグルコシルセラミド (GluCer) である[1]。セラミド (Cer) は、これらのスフィンゴ脂質の疎水性骨格を形成している。動物のスフィンゴ脂質は、スフィンゴシン (d18:1) と極長鎖脂肪酸 (VLCFA) -または長鎖脂肪酸(LCFA)からなる Cer がその骨格である。一方、植物のスフィンゴ脂質の骨格であるフィトセラミド (PCer) は、フィトスフィンゴシンまたはフィトスフィンガニン (t18:1 または t18:0) と長鎖または極長鎖の α -ヒドロキシ脂肪酸 (hVLCFA) から構成される[1-4]。動物および植物において、Cer または PCer はスフィンゴ脂質生合成の中間体となっている [5]。また、動物において、細胞内で生じる Cer は動物細胞の分化とアポトーシスに関与するシグナル伝達物質の役割も担っている [6]。植物においても、細胞内で生成する PCer は、同様のシグナル伝達の役割を担っているようである[5]。

以前、筆者所属する研究室ではキャベツ葉をホモジネートすることによって生じる、未同定のスフィンゴ脂質を見出し、これをフィトセラミド 1-リン酸 (PC1P) と同定した[7]。また、この PC1P が GIPC の D 位の加水分解によって生じることも見出した[7]。筆者の所属するグループはこの酵素活性を GIPC-ホスホリパーゼ D (GIPC-PLD) 活性と命名し、いくつかの植物でその特性を明らかにした[8, 9]。最近、筆者の所属するグループは大根の GIPC-PLD タンパク質が非特異的ホスホリパーゼ C3 (NPC3) として知られる遺伝子にコードされるタンパク質であることを同定した[10]。この遺伝子はそのアミノ酸配列の類似性からホスホリパーゼ C と想定され、Nonspecific phospholipase C (NPC) として命名されていたが、その酵素活性について詳しい解析はされていなかった。筆者の所属するグループは、大腸菌で発現させた NPC3 タンパク質は、アブラナ科植物から精製された GIPC-PLD 活性と本質的に同じホスホリパーゼ D としての特性を持つこと、ホスホリパーゼ C 活性はもたないことを明らかにしている[10]。

一方、GIPC加水分解酵素として、報告されている酵素の一つに NPC4 がある。Yang らは、NPC4 を GIPC-PLC と同定し、NPC4 の役割は植物におけるリン酸飢餓時のリン供給であると提唱している[11-13]。

このようにホモジナイズやリン酸飢餓に伴って GIPC 分解酵素が活性化されることから、GIPC の加水分解は、植物の創傷や栄養不足などのストレスや環境変化に対する細胞応答の引き金になっている可能性が考えられる。また、その酵素の実態は NPC 酵素となっているのかもしれない。しかしながら、現段階では、そのような仮説は完全に

証明されておらず、GIPC 分解の正確なメカニズム、PC1P、グリコシルイノシトール、PCer、グリコシルイノシトールリン酸などの GIPC 由来の加水分解産物の役割についてはほとんど分かっていない。このような研究課題を行うには、植物におけるスフィンゴ脂質の簡便な定量法が有用である。そこで、筆者は GIPC を含むスフィンゴ脂質の抽出法、簡便な分離定量法を開発しようと考えた。

脂質の分離に汎用される TLC は、脂質分離だけでなく、個々の脂質の相対量を推し量るのに便利な方法である。また、試料中の新しい脂質の出現や消失も容易である。本研究では、植物スフィンゴ脂質である GIPC、PC1P、GluCer、PCer を TLC イメージング法を用いて簡便に測定する方法を開発した (図 1)。この方法を用いた解析により、いくつかの植物において、組織をホモジナイズすることで GIPC が消失し、PC1P と PCer に分解されることを明らかにした。

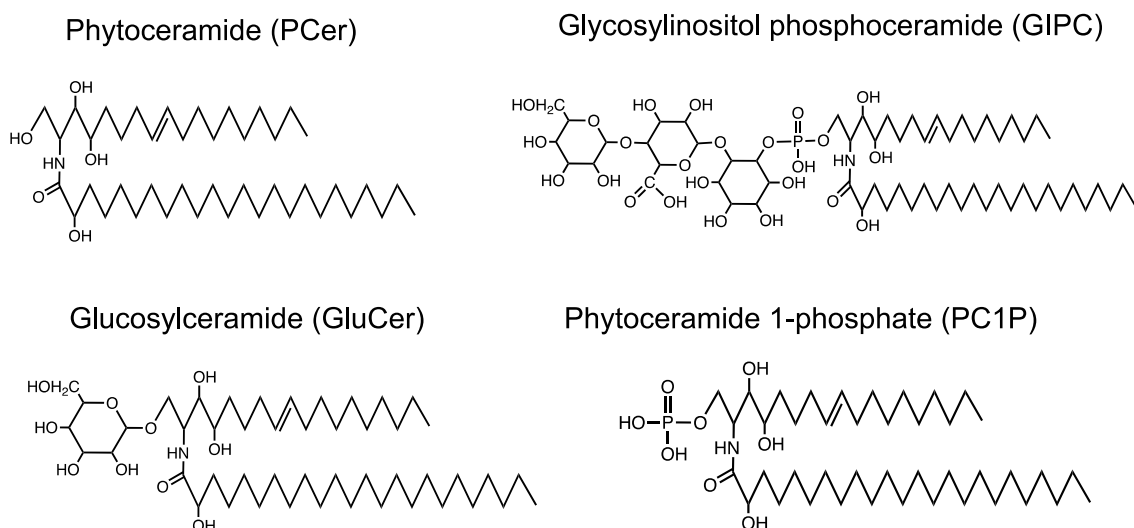


Fig. 1 Typical structure of PCer, GluCer, GIPC and PC1P in cruciferous plants.

Phytoceramide composed of phytosphingenine (*t*18:1) and α -hydroxy nervonic acid (24:0h) is the typical backbone of GluCer, GIPC and PC1P in cabbage. GIPC having two sugars (mannose-glucuronic acid) is the predominant type in cruciferous plants.

実験方法

1-1 試薬

イネ由来の GluCer と *Saccharomyces cerevisiae* 由来の N-(2'-(R)-hydroxylignoceroyl)-phytosphingosine (PCer)は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)から購入し用いた。GIPC は、キャベツの脂質から以前示した方法で単離した[14]。キャベツ (*Brassica oleracea* L. var. capitata)、ブロッコリー (*Brassica oleracea* L. var. italica) は地元の市場から購入した。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は土壌で栽培し、成熟した株を実験に用いた。ニンジン (*Daucus carota* L.) は地元の農家から入手した物を用いた。イネ (*Oryza sativa*) は JA とくしま市 (徳島県) から提供された。2,4,6-Trihydroxyacetophenone (THAP)は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)から購入し用いた。Zn 含有 Phos-tag [⁶⁸Zn]は和光純薬工業 (大阪、日本)から購入し用いた。本研究で使用した有機溶媒はすべて特級品の試薬を用い、ナカライテスク株式会社 (東京、日本)から購入した。

1-2 植物組織のホモジナイズ

新鮮な根、葉、茎などの植物組織 (湿重量 0.3~3 g) を単離し、細かく切断した。同量の冷水を加えた後、ウルトラディスペーサー (LK-21; ヤマト科学、東京、日本) を用いて、組織を室温で 3 分間ホモジナイズした。スフィンゴ脂質の分解は急速に進行するため、ホモジナイズの前に熱処理を行い、植物酵素の不活性化を行なった。植物酵素の不活性化は新鮮な植物組織 (湿重量 0.3-3g) を蒸し器に入れ、100°C で 10 分間加熱した。冷却して水分を拭き取った後、上記の方法でホモジナイズした。熱処理を行なった植物試料のスフィンゴ脂質組成は、ホモジナイズを行なう前のものとみなした。

1-3 脂質抽出および TLC

ブタノールと水 (1:1, v/v) の二層系溶媒を用いて植物ホモジネートから脂質を抽出した[15]。1100×g で 5 分間遠心分離して得られるブタノール層をエバポレーターを用いて 50°C で減圧し、溶媒を留去した。抽出脂質を 40%メチルアミン/エタノール (5:7, v/v) で 50°C、2 時間処理し、グリセリン脂質を加水分解した。溶媒を留去した後、得られた抽出物をイソプロパノール/ヘキサン/水 (55:20:25, v/v/v) の下層 (Solvent A) に少量ずつ溶解し、TLC で展開した。GIPCとPC1Pの分離に用いた展開系は、クロロホルム/メタノール/7%アンモニア水 (45:35:10, v/v/v) であった。GluCer の分離にはクロロホルム/メタノール/酢酸 (85:15:1, v/v/v) を用いた。PCer の分離には、クロロホルム/メタノール/酢酸 (90:6:1, v/v/v) を用いた。TLC プレートを送風乾燥し、プリムリン (80%アセトン中 0.01%) をスプレーし、プレート上の脂質を紫外線で可視化した。検出感度を高めるため、LED-UV ライトを使用した。

1-4 TLC イメージングによるスフィンゴ脂質の定量

スフィンゴ脂質の定量は、TLC プレート上の GIPC、PC1P、GluCer、PCer スポットのデジタル画像のピクセル強度値(PIV)に基づいて行った。スポットの PIV は ImageJ ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD, USA)を用いて決定した。これらの脂質の量は、標準脂質バンドの PIV 値との相対値に基づいて定量した[16]。

1-5 TOF-MAS

キャベツ由来 GIPC の構造は、MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)を用い、陰イオン検出モードで分析し[14]、GluCer と PCer は陽イオン検出モードで測定した。THAP 溶液(0.1%トリフルオロ酢酸を含む 75%アセトニトリル中 10 mg/mL)をマトリックスとして用いた。窒素発光レーザーの波長は 337nm、イオンチャンバー内の圧力は 3.7×10^{-7} Torr、加速電圧は 20kV であった。PC1P の分子種は、以前示した論文[7]のように、Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS によって決定した。PC1P のアリコート、0.3%アンモニアを含む 100 μ L のメタノールに溶解した。得られた溶液(10 μ L)を 0.1 mM の⁶⁸Zn Phos-tag 溶液 5 μ L と混合し、この混合物の一部(0.5 μ L)を MALDI サンプルプレート上にスポットした。すぐに、0.5 μ L の 2,4,6-トリヒドロキシアセトフェノン (THAP) 溶液(アセトニトリル中 10 mg/mL)をマトリックス溶液として混合物に重ねた。サンプルプレートを数分間乾燥させた後、マトリックス/分析物を陽イオン検出モードで MALDI-TOF MS にて測定した。

1-6 Statistical analysis

すべての結果は平均値 \pm SD で表した。2 つの平均値間の有意差は Student's t-test を用いて決定した。P < 0.05、***P < 0.01、***P < 0.001 を統計的に有意と定義した。

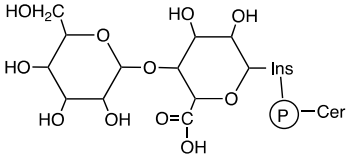
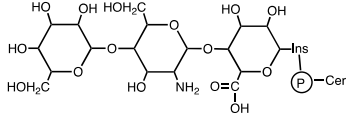
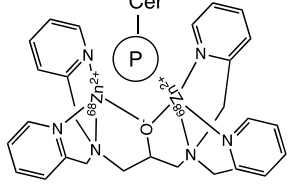
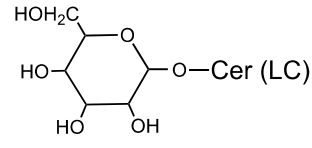
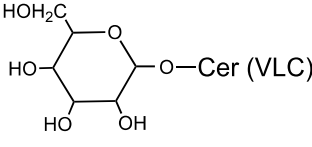
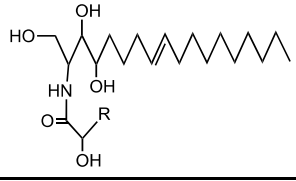
実験結果

2-1 植物脂質の TLC

Bligh&Dyer法[17]は、生体物質からのスフィンゴ脂質の抽出に一般的に用いられている手法である。しかし、GIPCはクロロホルム層への溶解度が低いため、GIPCの抽出には適用できない[14]。本研究では、Buréらの報告[15]に従い、ブタノールを用いて植物脂質を抽出した。熱処理したキャベツの葉から抽出した脂質をTLCで分離したところ、図2のようになった。GIPCとPC1Pは、溶媒クロロホルム/メタノール/7%アンモニア水(45:35:10, v/v/v)を用いたTLCで他の脂質と分離した。GluCerはクロロホルム/メタノール/酢酸(85:15:1, v/v/v)を用いて分離した。PCerの分離にはクロロホルム/メタノール/酢酸(90:6:1, v/v/v)を用いた。抽出した脂質をメチルアミンでアルカリ加水分解し、共存するグリセロ脂質を分解した。この手順は、図2に示すように、スフィンゴ脂質のバンドへのグリセロ脂質の混入を避けるために行った。

単離したGIPC、PC1P、GluCerおよびPCerをMALDI-TOF/MSに供し、構造を確認した。図2Aに示すように、キャベツの葉には2つの糖鎖を含むGIPC(GIPC Series AまたはS2 GIPC)と3つの糖鎖を含むGIPC(GIPC Series BまたはS3 GIPC)が存在した。これらは、フィトスフィンゴシン(t18:1)およびN-アシル残基として鎖長C16~C24の α -ヒドロキシ脂肪酸を有するGIPCであると推定された(図3A, B, 表1)。PC1Pはホモジナイズに反応して形成されるスフィンゴ脂質である。キャベツのPC1Pの分子種組成は、S2のGIPCと類似していた(図3C, 表1)。これらの結果は、我々の以前の研究[14]と一致していた。TLC(図2B)で観察されたGluCerとLCFAおよびGluCerとVLCFAの帰属は、質量分析に基づくものであった。前者はフィトスフィンゴシン(t18:1)とC16:1hの鎖長を有する α -ヒドロキシ脂肪酸を持つGluCerであり、後者はC24:1hを含むGluCerであった(図3D, E, 表1)。これらの帰属は、[2]によって報告された結果に基づいている。PCerは2種しか検出されなかった。これらは、C22:0hとC24:1hの鎖長である α -ヒドロキシ脂肪酸を持つフィトスフィンゴシン(t18:1)に割り当てられた(図3F, 表1)。

Table 1. Ions detected in MALDI-TOF mass spectra and their possible assignments.

Sphingolipids	Structure of sphingolipids	Exact mas	Observed mas (m/z)	Possible assignments of ceramide moieties
GIPC S2 (Series A)		1148.6	1148.7	$t18:1/h16:0$
		1232.7	1232.9	$t18:1/h22:0$
		1246.7	1246.9	$t18:1/h23:0$
		1258.7	1258.9	$t18:1/h24:1$
		1260.7	1260.9	$t18:1/h24:0$
GIPC S3 (Series B)		1421.8	1421.1	$t18:1/h24:1$
		1422.8	1423.1	$t18:1/h24:0$
		1445.8	1445.1	$t18:1/h24:0 + Na^+$
PCIP with phos-tag		1236.6	1236.7	$t18:1/h16:0$
		1320.6	1320.7	$t18:1/h22:0$
		1334.6	1334.7	$t18:1/h23:0$
		1346.6	1346.7	$t18:1/h24:1$
		1348.7	1348.7	$t18:1/h24:0$
		1362.7	1362.7	$t18:1/h25:0$
GluCer LC		754.5	754.5	$t18:1/h16:1 + Na^+$
		770.5	770.5	$t18:1/h16:1 + K^+$
		864.7	864.6	$t18:1/h24:1 + Na^+$
GluCer VLC		864.7	864.6	$t18:1/h24:1 + Na^+$
		880.7	880.6	$t18:1/h24:1 + K^+$
PCer		676.6	676.6	$t18:1/h22:0 + Na^+$
		702.6	702.6	$t18:1/h24:1 + Na^+$

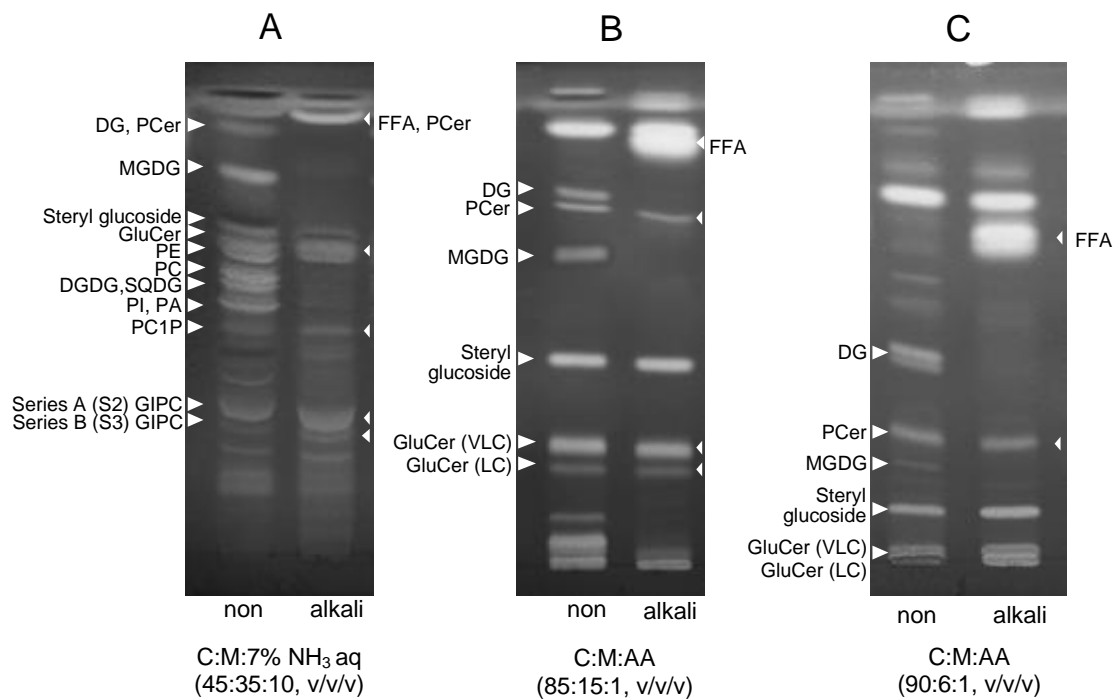


Fig. 2. TLC of plant sphingolipids

The frozen cabbage leaves were homogenized. Lipids were extracted and treated with (alkali) or without (non) methylamine. The resulting lipids were separated by TLC by indicated solvent systems. Assignments of respective bands were performed co-migration on TLC with standard lipids, or MALDI TOF-MS.

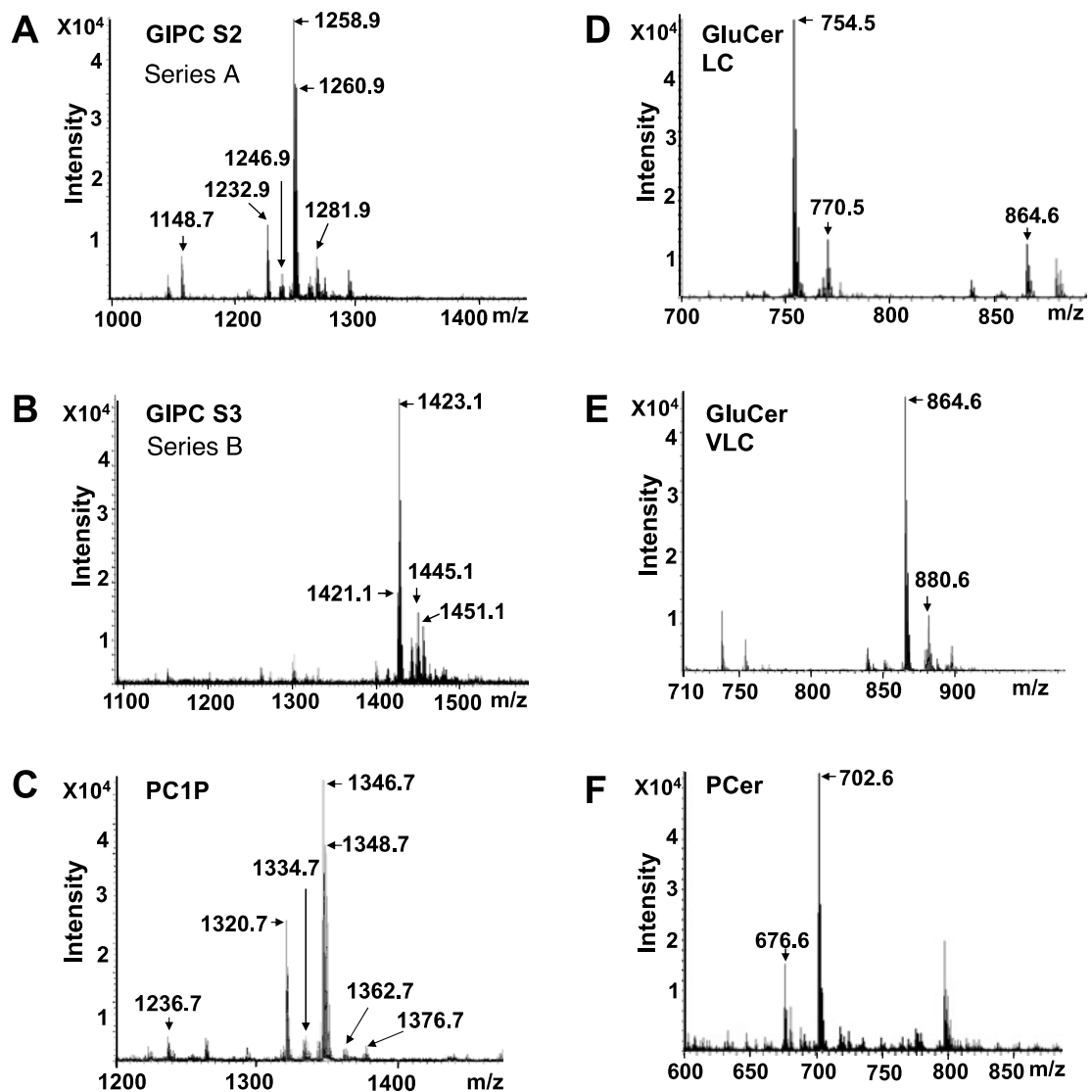


Fig. 3. MALDI TOF-MS of sphingolipids in cabbage lipids.

S2 (upper band) and S3 (lower band), GIPC, PC1P, GluCer (lower band), GluCer (upper band) and PCer were isolated from the cabbage lipid by TLC as shown in Fig. 2. The isolated lipids were subjected to MALDI-TOF MS as described in the Materials and Methods. The possible assignments of the major ions detected in the mass spectrum are shown in Table 1.

2-2 TLC イメージングによるスフィンゴ脂質の定量

以前、申請者のグループは TLC イメージング技術を用いて、ホスファチジン酸やホスファチジルコリンなどの植物リン脂質を定量する方法を開発した[16]。これは、プリムリン/紫外線誘導蛍光の強度が、TLC 上のバンドに存在する脂質の量に比例するという特徴が存在する。この方法を GIPC、PC1P、GluCer、PCer の定量に応用するため、プリムリン/紫外線誘導蛍光の強度と各スフィンゴ脂質の量の関係を調べた。幅約 1cm の TLC プレートに 20nmol までの異なる量の標準スフィンゴ脂質を塗布した。TLC プレートを展開した後、脂質バンドをプリムリン/UV で可視化し、ImageJ ソフトウェアを用いてデジタル化した。その結果、試験したすべてのスフィンゴ脂質について、脂質の量とプリムリン/UV で検出された蛍光強度との間に比例関係が認められた(図 4)。これらの結果をもとに、同じ TLC プレートで展開した既知量の標準バンドの強度の相対値を用いて、サンプル中のスフィンゴ脂質の量を決定した。この TLC-イメージング法で定量した GIPC と PC1P の量は、従来のホスホリブデン-マラカイトグリーン形成に基づく比色法[18]で得られた量と同様であることを確認した。

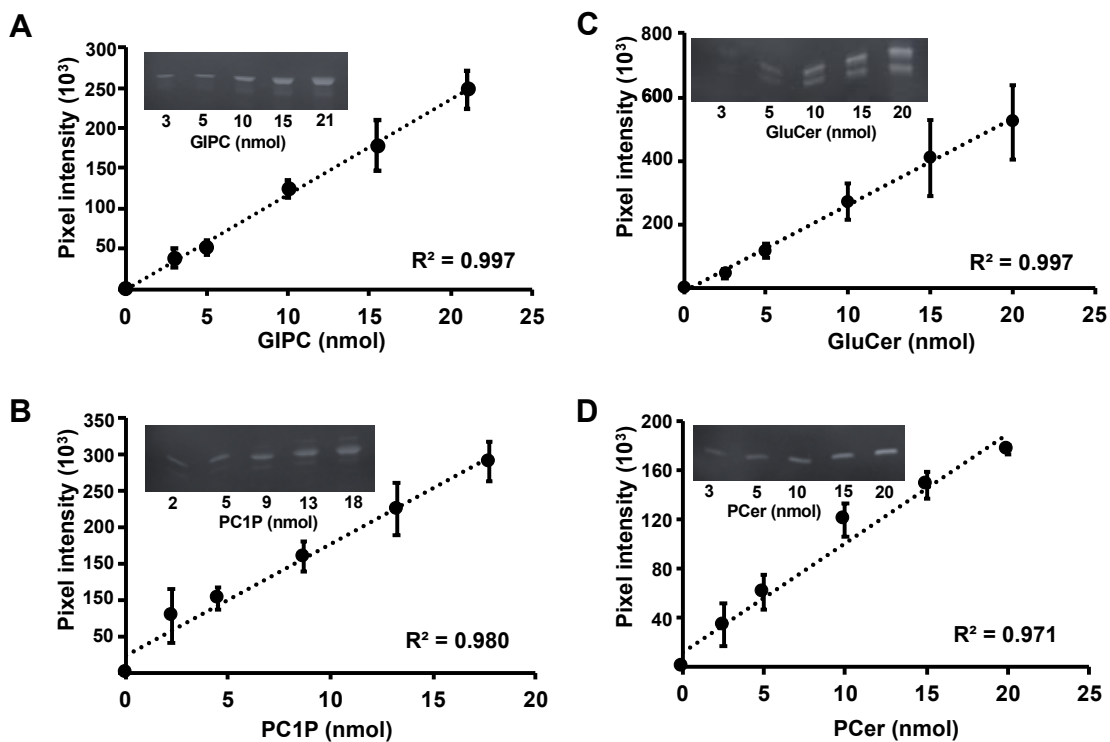


Fig. 4. Relationship between the amount of sphingolipid and pixel intensity of the lipid band visualized on TLC.

Different amounts of standard sphingolipids (GIPC, PC1P, GluCer, and PCer) were applied to a TLC plate and developed as described in the Materials and Methods. The TLC image was captured by digital camera after visualizing the lipid bands using primulin/UV. The intensity of the band was quantified using ImageJ software and is shown as pixel intensity.

2-3 植物組織ホモジナイズにおけるスフィンゴ脂質の組成変化

ホモジナイズ前(熱処理サンプル)とホモジナイズ後(生サンプル)の植物組織中のスフィンゴ脂質の組成変化を、TLC-イメージングを用いて調べた(図 5)。キャベツの葉と茎をホモジナイズすると、PC1P と PCer の増加が観察され、GIPC はほぼ完全に消失した(図 5A, C)。PC1P と PCer の増加量の合計は GIPC の減少量とほぼ等しかったことから(図 5D)、ホモジナイズに反応して生成した PC1P と PCer は GIPC に由来すると考えられた。図 5A に示すように、A 系列(S2)の GIPC は優先的に分解されたが、B 系列(S3)の GIPC は分解されなかった。このことは、キャベツ GIPC-PLD が A 系列(S2)の GIPC に対しては活性を示すが、シリーズ B(S3) GIPC に対しては活性を示さないという我々の以前の観察と一致している[14]。GluCer の量は、どのキャベツ組織でもホモジナイズによって有意な変化は見られなかった(図 5B, D)。

GIPC の分解と PC1P および PCer の形成は、ブロッコリー(根と茎)やシロイヌナズナ(根と葉)といった他のアブラナ科植物でも観察された(図 6A, B, 補図 1, 2)。GIPC 分解の程度はアブラナ科植物よりも低かったが、ニンジン(根と葉)では PC1P と PCer の生成が観察された。ニンジンでは、GIPC から PCer への変換は、GIPC から PC1P への変換よりも優先的に進行するようであった(図 6C, 補図 3)。イネの根では、GIPC の減少が PC1P と PCer の増加の合計を上回った。このことは、PC1P と PCer が組織内でさらに分解を受けることを示唆している(図 6D, 補図 4)。

また、キャベツの葉をホモジナイズする際のスフィンゴ脂質の時間依存的変化も調べた(図 7)。この実験では、GIPC の分解は室温では制御が難しい急速なプロセスであるため、冷凍キャベツの葉を使用した。その結果、GIPC の減少に伴って PC1P と PCer の量が増加したのに対し、GluCer は各反応時間で変化はなかった。興味深いことに、PCer の形成は PC1P の形成よりも遅かった(図 7C, G)。

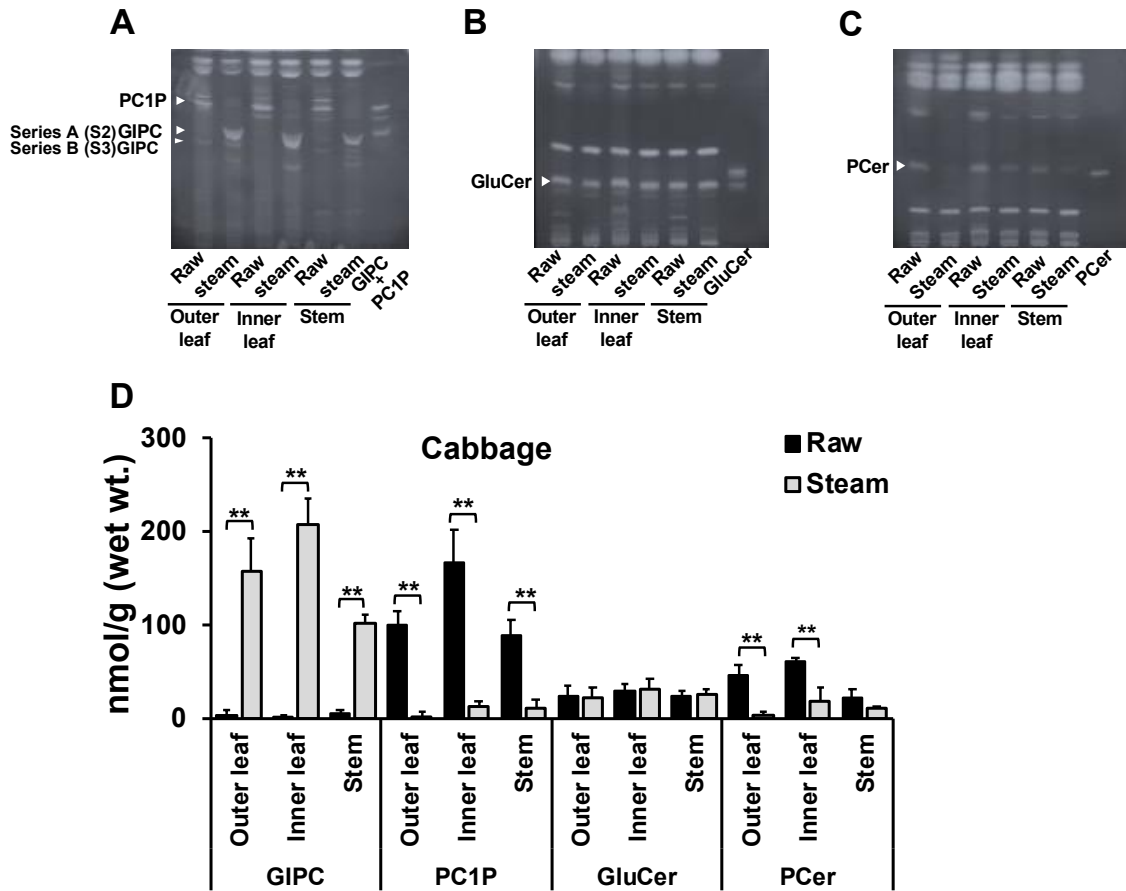


Fig. 5. Change in the sphingolipid contents of cabbage tissues during homogenization. Homogenates of the cabbage tissues were prepared after treatment with (steam) or without (raw) steam. Lipids were extracted, treated with methylamine, and separated by TLC (A-C). Sphingolipids were quantified by TLC imaging and are expressed as nmol/g (wet weight) in D.

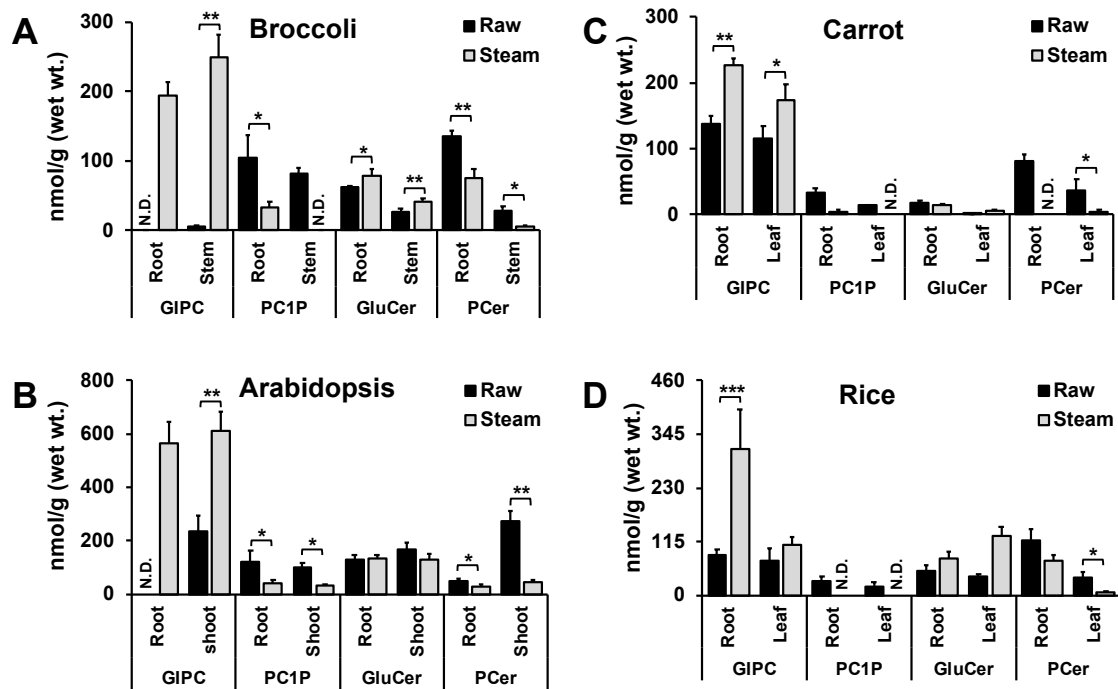


Fig. 6. Change in the sphingolipid contents of tissues of broccoli (A), Arabidopsis (B), carrot (C) and rice (D) during homogenization.

Homogenates of tissues of the plants were prepared after treatment with (steam) or without (raw) steam. Lipids were extracted, treated with methylamine, and separated by TLC. Sphingolipids were quantified by TLC imaging and are shown as nmol/g (wet weight).

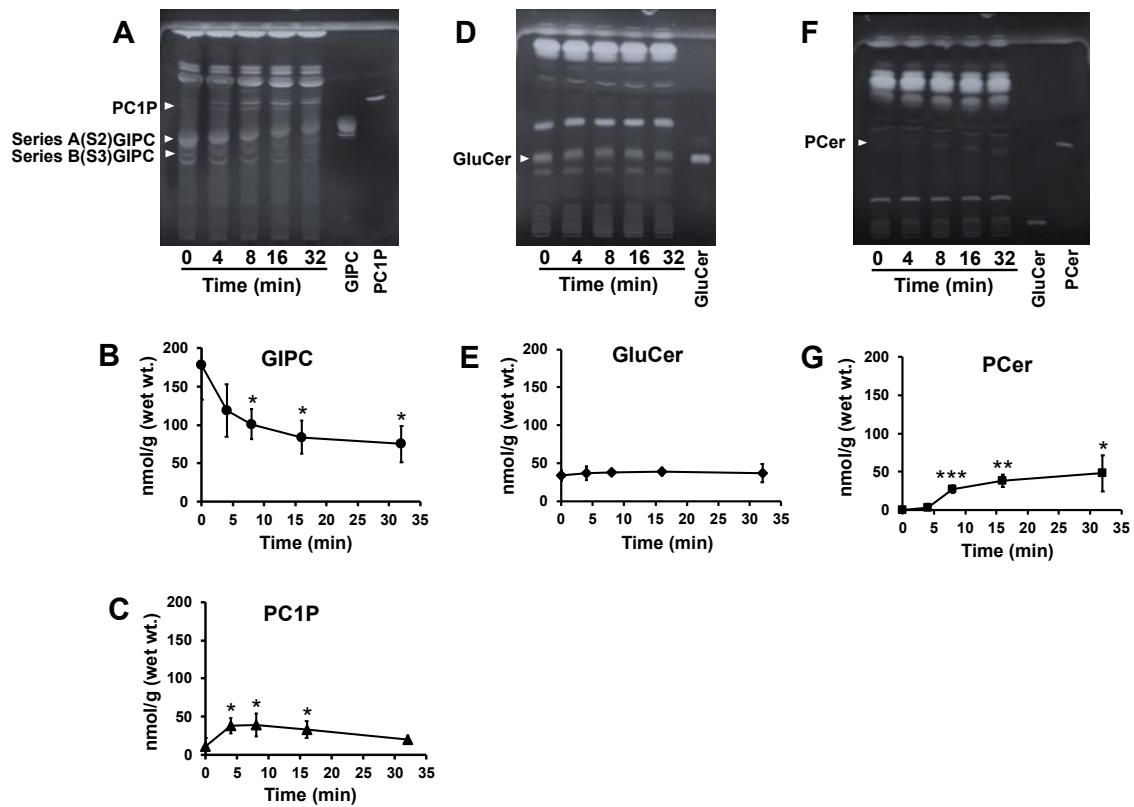


Fig. 7. Time-dependent change in the sphingolipids during homogenization of cabbage leaves.

The young leaves of cabbage were frozen at -80°C for overnight. After quick clashing and homogenization, the homogenates were incubated at 30°C for indicated times. The lipids were extracted from the homogenates after steam treatment. The sphingolipids were separated by TLC (A, D, F), quantified by TLC imaging and are shown as nmol/g (wet weight) (B, C, E, G).

考察

以前、我々はキャベツの葉をホモジネートした際に含まれる未同定のスフィンゴ脂質を PC1P と同定した[7]。この観察から、GIPC を加水分解する PLD(GIPC-PLD)がキャベツ組織に存在し[7-9]、NPC3 がこの GIPC-PLD 活性を担う酵素のひとつであることがわかった[10]。これは、植物組織をホモジナイズする事によるスフィンゴ脂質の組成変化を調べることで、GIPC 分解経路に関する知見が得られることを示す良い例である。本研究では、TLC-イメージングを用いたスフィンゴ脂質の定量分析法を開発し、ホモジナイズ中の植物組織中のスフィンゴ脂質の組成変化を調べた。

本研究において、GIPCの分解とPC1Pの形成は、アブラナ科植物だけでなく、イネ(*Oriza sativa*)の根やニンジン(*Daucus carota*)の葉や根など、他の植物でも起こることが示された。このことは、これらの植物に GIPC 分解酵素が存在することを示している(図 8)。実際、NPC 遺伝子ファミリーはイネのゲノム中に存在する[19]。PC1Pの形成が NPC3の活性だけで説明できるかどうかはわからないが、NPC3 はシロイヌナズナの根で高レベルに発現しており[20]、根の発達に関与していることが示されている[21]。これらの事実は、我々の以前の研究[8]や、試験したすべての植物で PC1P 形成が他の組織よりも根で高かったという今回の観察結果と一致している。

本研究では、アブラナ科植物だけでなくすべての植物で GIPC の分解が PCer の生成に関与していることが観察された。アブラナ科植物では、GIPC の減少は PC1P と PCer の増加の合計と同程度であり、生じた PCer と PC1P は GIPC から生成されることが示された(図 8)。この点に関して、シロイヌナズナでは NPC4 が GIPC 加水分解 PLC として特徴づけられている[11-13]。NPC4 遺伝子は、ダイコンやイネを含むいくつかの植物で見つかっている[10, 22]。したがって、NPC4 は GIPC からの PCer 形成を説明する酵素である可能性がある。NPC3 と同様に、NPC4 の mRNA は根に多く存在し[20, 21]、根の成長に関与していることが示されており[11]、これはアブラナ科植物の PCer 形成が葉よりも根で高いという観察と一致する。イネとニンジンでも PCer の形成を観察した。NPC4 の発現はイネの根でのみ観察されている[22]。

PCer 形成を説明するもう一つのメカニズムは、ホスファターゼによる PC1P の脱リン酸化である(図 8)。植物を含む多くの生物は、非特異的ホスファターゼを持っている事が知られている[23]。PC1P は、ホモジナイズ中にホスファターゼ活性によって PCer に変換される可能性がある。この点に関して、図 7 に示すように、PCer の形成は PC1P の形成よりも遅かったことから推測できる。

植物のグリセリン脂質に作用する PLD 活性は、1948 年に発見された[24]。それ以来、多くの種類の PLD が同定され、その構造、制御機構、生理学的役割が明らかにされてきた[25]。

現在では、グリセリン脂質に作用する植物 PLD が、細胞内シグナル分子としてホスファチジン酸(PA)を産生することにより、ストレスやホルモン応答において重要な役割を果たすことが確立されている[26]。本研究では、植物において最も豊富なスフィンゴ脂質である GIPC のかなりの部分がホモジナイズに反応して分解され、PC1P と PCer に変換されることを示した。GIPC 分解産物のイノシトールグリカンがバラの細胞増殖に伴って増加することから、GIPC 分解産物が増殖の関わる何らかのシグナル機能を担う可能性[4]や、植物ホルモンの一種、ブラシノライドの刺激により、NPC3 (GIPC-PLD)あるいは NPC4(GIPC-PLC)が活性化されることが報告されている[21]。今回、見出された現象と、これらの報告を考え合わせると GIPC は細胞内外で機能するシグナル因子前駆体で、その加水分解は細胞応答を誘導するシグナル因子の産生の役割を担っているのかもしれない。今回開発した TLC イメージングによる簡便な植物スフィンゴ脂質の定量法が、植物におけるスフィンゴ脂質代謝の生理的意義の解明に向けた研究に貢献することを期待する。

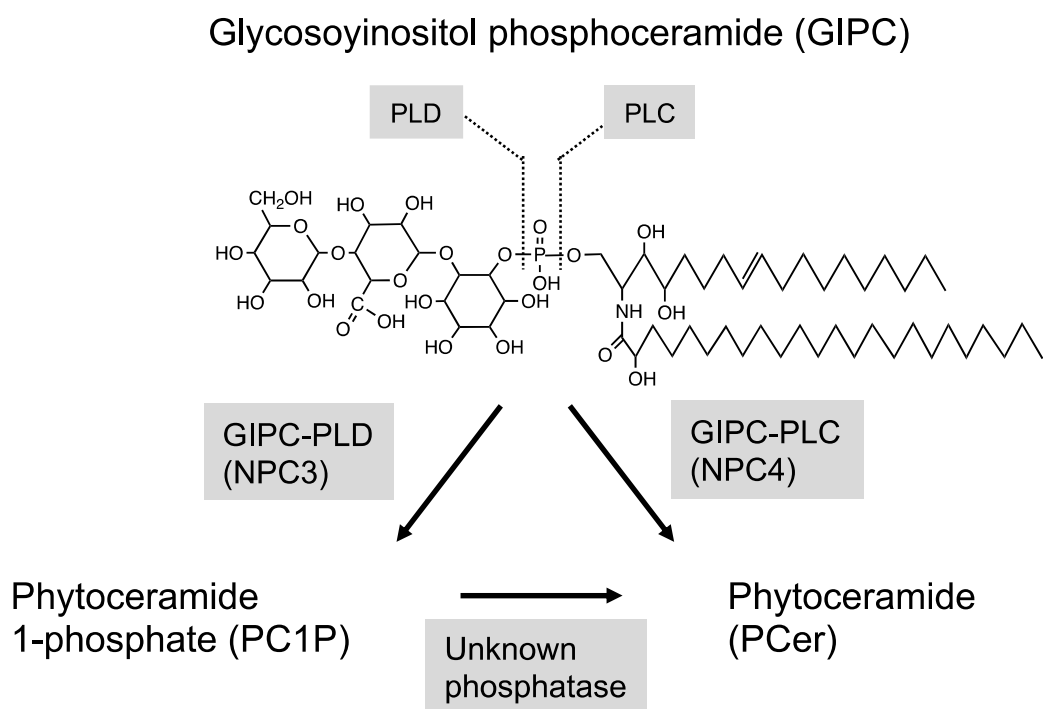


Fig. 8. Possible degradation pathway of GIPC in response to homogenization in plants.

参考文献

- [1] Markham, J.E., Li, J., Cahoon, E.B., and Jaworski, J.G. (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J. Biol. Chem.* **281**, 22684–22694
- [2] Cacas, J.L., Furt, F., Le Guédard, M., Schmitter, J.M., Buré, C., Gerbeau-Pissot, P., Moreau, P., Bessoule, J.J., Simon-Plas, F., and Mongrand, S. (2012) Lipids of plant membrane rafts. *Prog. Lipid Res.* **51**, 272-299
- [3] Sperling, P., and Heinz, E. (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1632**, 1-15.
- [4] Gronnier, J., Germain, V., Gouguet, P., Cacas J.L., and Mongrand S. (2016) GIPC: Glycosyl Inositol Phospho Ceramides, the major sphingolipids on earth. *Plant Signal Behav.* **11**, e1152438
- [5] Liu, N.J., Hou, L.P., Bao, J.J., Wang, L.J., Chen, X.Y. (2021) Sphingolipid metabolism, transport, and functions in plants: Recent progress and future perspectives. *Plant Commun.* **2**, 100214.
- [6] Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2018) Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 175-191
- [7] Tanaka, T., Kida, T., Imai, H., Morishige, J., Yamashita, R., Matsuoka, H., Uozumi, S., Satouchi, K., Nagano, M., and Tokumura, A. (2013) Identification of a sphingolipid-specific phospholipase D activity associated with the generation of phytoceramide-1-phosphate in cabbage leaves. *FEBS J.* **280**, 3797-3809
- [8] Kida, T., Itoh, A., Kimura, A., Matsuoka, H., Imai, H., Kogure, K., Tokumura, A., and Tanaka, T. (2017) Distribution of glycosylinositol phosphoceramide-specific phospholipase D activity in plants. *J. Biochem.* **162**, 449-458
- [9] Hasi, R.Y., Miyagi, M., Morito, K., Ishikawa, T., Kawai-Yamada, M., Imai, H.,

- Fukuta, T., Kogure, K., Kanemaru, K., Hayashi, J., Kawakami, R., and Tanaka, T. (2019) Glycosylinositol phosphoceramide-specific phospholipase D activity catalyzes transphosphatidylation. *J. Biochem.* **166**, 441–448
- [10] Hasi, R.Y., Ishikawa, T., Sunagawa, K., Takai, Y., Ali, H., Hayashi, J., Kawakami, R., Yuasa, K., Aihara, M., and Tanaka, T. (2022) Nonspecific phospholipase C3 of radish has phospholipase D activity towards glycosylinositol phosphoceramide. *FEBS Lett.* **596**, 3024–3036
- [11] Yang, B., Li, M., Phillips, A., Li, L., Ali, U., Li, Q., Lu, S., Hong, Y., Wang, X., and Guo, L. (2021) Non-specific phospholipase C4 hydrolyzes phosphosphingolipids and sustains plant root growth during phosphate deficiency. *Plant Cell.* **33**, 766–780
- [12] Yang, B., Zhang, K., Jin, X., Yan, J., Lu, S., Shen, Q., Guo, L., Hong, Y., Wang, X., and Guo, L. (2021) Acylation of nonspecific phospholipase C4 determines its function in plant response to phosphate deficiency. *Plant J.* **106**, 1647–1659
- [13] Fan, R., Zhao, F., Gong, Z., Chen, Y., Yang, B., Zhou, C., Zhang, J., Du, Z., Wang, X., Yin, P., Guo, L., and Liu, Z. (2023) Insights into the mechanism of phospholipid hydrolysis by plant nonspecific phospholipase C. *Nat. Commun.* **14**, 194
- [14] Hasi, R.Y., Majima, D., Morito, K., Ali, H., Kogure, K., Nanjundan, M., Hayashi, J., Kawakami, R., Kanemaru, K., and Tanaka, T. (2020) Isolation of glycosylinositol phosphoceramide and phytoceramide 1'-phosphate in plants and their chemical stabilities. *J. Chromatogr. B.* **1152**, 122213
- [15] Buré, C., Cacas J-L, Mongrand, S. and Schmitter, J-M. (2014) Characterization of glycosyl inositol phosphoryl ceramides from plants and fungi by mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 995–1010
- [16] Tanaka, T., Kassai, A., Ohmoto, M., Morito, K., Kashiwada, Y., Takaishi, Y., Urikura, M., Morishige, J., Satouchi, K., and Tokumura, A. (2012) Quantification of Phosphatidic Acid in Foodstuffs Using a Thin-Layer-Chromatography-Imaging Technique. *Agric. Food Chem. J.* **16**, 4156–4161
- [17] Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and

purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917

[18] Chalvardjian, A., and Rudnicki, E. (1970) Determination of lipid phosphorus in the nanomolar range. *Anal. Biochem.* **36**, 225-230

[19] Nakamura, Y., and Ngo, A.H. (2020) Non-specific phospholipase C (NPC): an emerging class of phospholipase C in plant growth and development. *J. Plant Res.* **133**, 489-497

[20] Peters, C., Li, M., Narasimhan, R., Roth, M., Welti, R., and Wang, X. (2010) Nonspecific phospholipase C NPC4 promotes responses to abscisic acid and tolerance to hyperosmotic stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 2642-2659

[21] Wimalasekeraa, R., Pejcharb, P., Holka, A., Martinecb, J., and Scherer, G.F.E. (2010) Plant phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipases C NPC3 and NPC4 with roles in root development and brassinolide signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **3**, 610-625

[22] Cao, H., Zhuo, L., Su, Y., Sun, L., and Wang, X. (2016) Non-specific phospholipase C1 affects silicon distribution and mechanical strength in stem nodes of rice. *Plant J.* **86**, 308-321

[23] Moorhead, G.B., De Wever, V., Templeton, G., and Kerk, D. (2009) Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem. J.* **417**, 401-409.

[24] Hanahan, D.J., and Chaikoff, I.L. (1984) On the nature of the phosphorus-containing lipides of cabbage leaves and their relation to a phospholipide-splitting enzyme contained in these leaves. *J. Biol. Chem.* **172**,191-8.

[25] Selvy, P.E., Lavieri, R.R., Lindsley, C.W., and Brown, H.A. (2011) Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem. Rev.* **111**, 6064-6119

[26] Li, M., Hong, Y., and Wang, X. (2009) Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochim Biophys Acta.* **1791**, 927-

謝辞

本研究の遂行並びに論文作成に際し、終始適切な御指導御鞭撻を賜りました徳島大学大学院社会産業理工学研究部生物資源産業学域食料科学分野の田中保教授に心より感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、御協力を賜りました徳島大学大学院社会産業理工学研究部の Rumana Yesmin Hasi 博士、MD Hanif Ali 博士、栗飯原睦美先生、林順司先生、川上竜巳先生をはじめ田中研究室の卒業生、在学生の皆様に厚く御礼申し上げます。