植物におけるホスホリパーゼDの生理機能

The Role of Phospholipase D in Plant

山口 武志

農業・食品産業技術総合研究機構 中央
農業総合研究センター作物開発研究領域
〒943-0193
新潟県上越市稲田 1-2-1

Takeshi YAMAGUCHI
National Agricultural Research
Center, National Agricultural and
Food Research Organization
Inada 1-2-1, Joetsu, Niigata 943-0193, Japan

山川 博幹

農業・食品産業技術総合研究機構 中央
農業総合研究センター作物開発研究領域
〒943-0193
新潟県上越市稲田 1-2-1

Hiromoto YAMAKAWA
National Agricultural Research
Center, National Agricultural and
Food Research Organization
Inada 1-2-1, Joetsu, Niigata 943-0193, Japan

黒田 昌治

農業・食品産業技術総合研究機構 中央
農業総合研究センター作物開発研究領域
〒943-0193
新潟県上越市稲田 1-2-1

Masaharu KURODA
National Agricultural Research
Center, National Agricultural and
Food Research Organization
Inada 1-2-1, Joetsu, Niigata 943-0193, Japan

羽方 誠

農業・食品産業技術総合研究機構 中央
農業総合研究センター作物開発研究領域
〒943-0193
新潟県上越市稲田 1-2-1

Makoto HAKATA
National Agricultural Research
Center, National Agricultural and
Food Research Organization
Inada 1-2-1, Joetsu, Niigata 943-0193, Japan

論文要旨：動植物の様々な生理機能にリン脂質代謝が重要な役割を果たしていることが知られている。植物では様々な環境ストレスやホルモンの情報伝達にホスホリパーゼD (PLD) が関与していることが報告されている。植物のPLDはシロイヌナズナで12個、イネで17個の遺伝子が存在し、その構造、生化学的特性からいくつかのタイプに分類されている。イネにおけるPLDの生理機能を解析するために、個々の遺伝子の発現をRNA干渉 (RNAi) で抑制したKnockdown (KD) 系統を形質転換で作出しその表現形質を解析した結果、イネのPLDの一つである*OsPLDβ1* が抑制された*OsPLDβ1*-KD系統が、病原菌感染が無い状態で防御応答を誘導し、病害抵抗性が大幅に強化されることが明らかになった。これまで植物のPLDは防御応答の誘導の正の制御に関与していることが示されていたが、*OsPLDβ1* が負の制御に関わっていることは、植物ではタイプの異なるPLDが環境応答で異なる機能を有することを示唆している。本稿では植物におけるPLDの生理機能について解説する。

Abstract: The phospholipids metabolism has been known to play an important role in both animals and plants. In plants, phospholipase D (PLD) has been suggested to be involved in many plant cellular processes, such as signaling for stress and hormone responses. Plant PLDs are a family of heterologous enzymes and 12 PLD genes in arabidopsis and 17 ones in rice were reported. They can be classified into several types based on their gene architectures, sequence similarities, domain structures, and biochemical properties. To examine the physiological function of PLD in rice, we made knockdown plants for each PLD isoform by introducing gene-specific RNAi constructs. One of them, *OsPLDβ1*-knockdown plants showed the accumulation of reactive oxygen species in the absence of pathogen infection. RT-PCR and DNA microarray analyses revealed that the knockdown of *OsPLDβ1* resulted in the up-/down-regulation of more than 1,400 genes, including the induction of defense-related genes such as PR protein genes and WRKY/ERF family transcription factor genes. HR-like cell death and phytoalexin production were also observed at a later phase of growth in the *OsPLDβ1*-knockdown plants. These results indicated that the *OsPLDβ1*-knockdown plants spontaneously activate the defense responses in the absence of pathogen infection.

Key words: phospholipase D, rice, RNAi, defense response, reactive oxygen species, phytoalexin

1 はじめに

動植物のホルモンや環境応答の生理機能にリン脂質代謝が重要であることが知られている。動物においてはホルモンの作用によりホスホリパーゼC (PLC) が活性化され、その結果としてイノシトールリン脂質の代謝により形成される Diacylglycerol (DAG) と Inositol triphosphate (IP₃) がそれぞれ Protein kinase C (PKC) の活性化と細胞内カルシウム濃度の上昇をトリガーし、特にカルシウムイオンに関わる細胞内のシグナル伝達を担っていることが明らかになっている^{1, 2)}。これらの研究以来、動物においては様々な生理機能にリン脂質代謝が重要な役割を果たしていることが確立されている。その後、植物においても病原菌の感染などの様々な環境変化に対する応答、植物ホルモンに対する応答にリン脂質代謝が活性化され、その結果形成される Phosphatidic acid (PA) が様々な生理機能を有していることが明らかになってきている (Fig. 1)³⁾。PA の生理機能としては、活性酸素の生成⁴⁻⁶⁾、Mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化⁷⁾ などが明らかにされ、さらに PA の幾つかのターゲット蛋白質としては、Protein kinase⁸⁻¹⁰⁾、Protein phosphatase¹¹⁾、Phosphoenolpyruvate carboxylase¹²⁾ などが生化学的に報告されている。植物の場合は生体膜リン脂質から PA を形成する二つのルートが知られていて、Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE) などの主要リン脂質からホスホリ

Fig. 1 植物のリン脂質の主要代謝モデル。PC: Phosphatidylcholine, PI: Phosphatidylinositol, PI4P: Phosphatidylinositol-4-phosphate, PI45P₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, IP₃: Inositol-tri-phosphate, DAG: Diacylglycerol, PA: Phosphatidic acid, PI4K: Phosphatidylinositol-4-kinase, PI5K: Phosphatidylinositol-5-kinase, PLC: Phospholipase C, DGK: Diacylglycerol kinase, PLD: Phospholipase D

パーゼD (PLD) の作用で直接 PA に変換する PLD 経路と、イノシトールリン脂質から PLC の活性化により形成された DAG が Diacylglycerol kinase (DGK) により PA に変換される PLC-DGK 経路が知られている (Fig. 1)。このうち本稿では植物の PLD の生理機能を中心に紹介する。

2 植物のホスホリパーゼD

PLD は植物で発見され植物の代表的なホスホリパーゼであり、生体膜リン脂質を PA と Choline などの塩基に分解する酵素である。PLD はその基質に低濃度の 1-Butanol 存在下で Phosphatidylbutanol を同時に生成することから、PLD の生理機能が特異的に阻害されるので¹³⁾、植物の生理機能への関わりが検出し易いため様々な生理機能との関与が報告されている (補足: PLD は 1-アルコール存在下では、PA などと加水分解反応と塩基交換反応の両方を触媒し、Phosphatidyl-アルコールを産生する。Ethanol 存在下では Phosphatidylethanol を、1-Butanol 存在下では Phosphatidylbutanol を産生するが、PLD の機能を阻害する研究では通常 1-Butanol が用いられている。)。その主なものとしては各種環境ストレスのシグナル伝達や植物ホルモンの応答^{3, 14)}、枯死過程における細胞膜の分解¹⁵⁾、生体膜の架橋^{16, 17)} などが報告されている。

植物の PLD 遺伝子が最初にクローニングされて以来¹⁸⁾、シロイヌナズナでは 12 個の、イネでは 17 個の PLD 遺伝子の存在が示唆されている (Fig. 2)¹⁹⁾。ちなみに動物は 2 個、酵母は 1 個の PLD 遺伝子を持っている²⁰⁾。PLD タンパク質はシロイヌナズナとイネで詳細に研究されていて、その構造上の特徴から PLD α , β , γ , δ , ϵ , ζ の 6 種類のクラスに分類されている。一方イネにおいては PLD α , β , δ , ϵ , η , θ , ζ , ι の 8 種類のクラスに分類されている。PLD はまたそのドメイン構造の相違から C2-PLD, PX/PH-PLD, その他に分類することもある。この分類では PLD ζ , PLD ι 以外のすべてのクラスの PLD が C2-PLD, PLD ζ が PX/PH-PLD に分類されている。イネに存在する PLD ι だけがどちらの PLD にも分類できない (Fig. 2)。ちなみに動物の 2 個の PLD はいずれも PX/PH-PLD である^{20, 21)}。PLD の酵素としての生化学的な特性はシロイヌナズナで詳細に検討され、クラスごとに PLD の活性化に対するカルシウム要求性、活性化に対する Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) の要求性、さらに基質特異性がそれぞれ異なることが報告されている。特に基質特異性の相違については PC と PE との比較において PLD α は PC > PE, PLD β は PC = PE, PLD γ と PLD δ は PE > PC,

Fig. 2 イネ (Os) とシロイヌナズナ (At) の PLD 遺伝子の系統樹 (A), ドメイン構成 (B), シロイヌナズナ PLD の基質特異性 (C)

PLD ζ はPCのみを基質とすることが、発現タンパク質を用いた実験系で認められている (Fig. 2)。

3 植物の PLD の生理機能

これまでシロイヌナズナとイネにおいて幾つかの PLD の生理機能が遺伝子発現を抑制した Knockdown (KD) 系統または遺伝子が欠損した Knockout (KO) 系統と、野生株 (Wild type) との表現形質を比較した様々な栽培生理試験において報告されている。PLD α についてはアブシジン酸 (ABA) やエチレンに対する応答²²⁾、活性酸素の生成⁴⁾、乾燥ストレス耐性²³⁾、凍結耐性²⁴⁾、種子の品質劣化^{25, 26)}、浸透圧ストレス耐性²⁷⁾、虫害抵抗性の誘導²⁸⁾に関与することがそれぞれ報告されている。PLD β については、防御応答の誘導に対する負の制御¹⁹⁾と種子の発芽時の ABA シグナル伝達²⁹⁾に関与することが報告されている。PLD δ については乾燥耐性の誘導³⁰⁾、微小管の再生^{16, 17)}、凍結、過酸化水素、UV 耐性の誘導^{31, 32)}に関与することがそれぞれ報告されている。PLD ζ については根毛の生育とパターン形成³³⁾と根のオーキシン誘導性反応³⁴⁾に関与することが報告されている。

このような PLD の生理機能が生体膜の機能を変化させるだけではなく、PLD の活性化で生じる PA がセカンドメッセンジャーとしてシグナル伝達に関与しているものと考えられている。PLD 経路で生成する PA のターゲットとしては Protein phosphatase である ABI1 (ABA Insensitive 1 蛋白質) が証明されている。シロイヌナズナの変異系統を用いた研究から、植物ホルモンである ABA の種子の発芽の抑制には Protein phosphatase で

ある ABI1 の抑制が必要不可欠であることが知られており³⁵⁾、ABA の作用により PLD が活性化されることもまた知られていた³⁶⁾。このシグナル伝達が AtPLD α 1 (At: *Arabidopsis thaliana*, シロイヌナズナ) の活性化により生成する PA が ABI1 に結合し、ABI1 の機能を抑制することにより ABA の機能を伝達していることが証明されている¹¹⁾。このように明瞭に解明された例はこれ以外にはないが、PLD の生理機能が PA かその代謝産物が主に Protein kinase または Protein phosphatase を介して伝達されているものと予想されている。

4 イネ PLD の生理機能

イネの PLD としては PLD α と PLD β の生理機能が幾つか明らかになっている。筆者らはイネにおける PLD の生理機能を解析する目的で、17 種類の PLD のうち PLD ι を除く 16 種類の PLD 遺伝子の発現を、イネの主な組織において解析した (Fig. 3)。その結果、OsPLD β 1, α 1, α 5 が解析したほとんどの組織で強く発現していた。特に OsPLD β 1 は解析したいずれの組織でも多量に発現していた。また組織ごとに発現する PLD の種類に違いが観られた。一方、OsPLD ϵ , δ 2, δ 3, η 1, θ の発現レベルは解析した組織では極めて低かった (Fig. 3)。これらの PLD のイネにおける生理機能を解析するために、それぞれの遺伝子の発現を抑制するための RNA 干渉用ベクターをアグロバクテリウムによる間接法でイネに導入し、それぞれの KD 系統を作出した。これらのイネを温室で栽培し、その表現形質を解析した結果、OsPLD β 1 を抑制した系統 (OsPLD β 1-KD 系統) だけが、温室における病原菌を接種しない通常の栽培条件下で、

Fig. 3 イネにおける各 PLD 遺伝子の発現解析。Roots, Leaf sheaths, Leaf blades は播種 30 日後, Immature seeds は出穂 10 日後

葉身にあたかも病原菌に感染したかのような疑似病斑を形成することが明らかになった (Fig. 4)。このような表現形質を示す植物体は疑似病斑変異体 (Disease lesion mimic mutant: DLMM) と呼ばれ, その多くは病原菌に対する抵抗性が高まることが知られている。またその原因遺伝子は Lesion mimic gene と呼ばれていて, イネを含む高等植物で多数報告されている³⁷⁾。たとえばイネの DLMM として知られている Spl7 と Spl11 の原因遺伝子はそれぞれ heat stress transcription factor と E3 ubiquitin ligase をコードしていることが報告されている^{38, 39)}。

5 *OsPLDβ1*-KD は防御応答が誘導されている

イネなどの高等植物には高等動物のような発達した免疫システムは備わっていないが, 病原菌やウイルスの感染に対して, 活性酸素や抗菌物質の産生, 細胞壁の強化,

Fig. 4 *OsPLDβ1*-KD (RNAi) 系統の葉身の疑似病斑

Fig. 5 *OsPLDβ1*-KD (RNAi) 系統の葉身の過酸化水素量 (A) と Momiclactone A 量 (B)。a: 疑似病斑以外部分, b: 疑似病斑部分

防御関連 (PR) タンパク質の誘導, 過敏感反応 (Hypersensitive reaction: HR) の誘導などの幾つかの生体防御反応を引き起こすことが知られている^{40, 41)}。植物に病原菌が感染した場合, それらに対して抵抗性を示す場合は HR を誘導し R 型と呼ばれる病斑が形成され, 病原菌感染の拡大を阻止することが知られている⁴²⁾。*OsPLDβ1*-KD 系統に現れる疑似病斑が R 型であるため (Fig. 4), *OsPLDβ1*-KD 系統が病原菌感染時に引き起こされる一連の防御応答が常に誘導されていることが予想された。それらの解析を行った結果, *OsPLDβ1*-KD 系統では, 葉身に高いレベルの活性酸素が検出され (Fig. 5A), また疑似病斑部分にはイネの代表的な抗菌物質である Momiclactone A が大量に検出されることが明らかになった (Fig. 5B)。さらに葉身に発現している遺伝子を解析した結果, 防御応答で発現する Probenazole-in-

Fig. 6 *OsPLDβ1*-KD (RNAi) 系統と Control の葉身における PR タンパク質遺伝子の発現解析。PBZ1: Probenazol-inducible protein 1, RCC: Rice chitinase, TLP: Thaumatin-like protein

ducible protein (PBZ1), Chitinase (RCC), Thaumatin-like protein (TLP) などの PR タンパク質遺伝子が極めて多く発現していることが明らかになった (Fig. 6)。さらに *OsPLDβ1*-KD 系統の葉身の発現遺伝子をイネ 44k-DNA- マイクロアレイで大量に解析した結果, *WRKY45* などの Pathogenesis-related transcription factor (防御関連転写因子) を多く発現していた¹⁹⁾。*WRKY45* はイネの病原菌感染に対して圧倒的な抵抗性を誘導できることが報告されている⁴³⁾。これらの遺伝子は、主に病原菌に感染した時に特異的に発現するものであるため、*OsPLDβ1*-KD 系統は常時防御応答が誘導されていることが明らかになった。イネに感染する代表的な病原菌としては糸状菌のいもち病菌 (*Piricularia grisea*) と細菌の白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*) が知られていて、*OsPLDβ1*-KD 系統のこれらの病原菌に対する抵抗性を検定した結果、いずれの感染に対しても抵抗性が大幅に増加することが明らかになった¹⁹⁾。従って、*OsPLDβ1* (*Os*: *Oryza sativa*, イネ) はイネの防御応答と病害抵抗性の誘導の Negative regulator として機能することが明らかになった¹⁹⁾。

6 PLDα と PLDβ の生理機能の相違

しかしながら *OsPLDβ1*-KD 系統はなぜ防御応答が常に誘導されるのか? そもそもなぜ活性酸素が蓄積されるのか? といった問題は依然不明である。これまでの研究では PLD の活性化で生じる PA はイネやシロイヌナズナなどの植物だけではなく、ヒトの好中球に対しても活性酸素生成の Positive regulator であることが報告されている^{4, 5, 44)}。また植物の場合この Positive regulator として作用するのがαタイプの PLD であることも示唆されている。イネの培養細胞を用いた研究ではキチンオ

Fig. 7 *OsPLDβ1*-KD (RNAi) 系統と Control (Cont) の葉身における PLD 活性。PC-PLD: Phosphatidylcholine-specific PLD 活性, PE-PLD: Phosphatidylethanolamine-specific PLD 活性

リゴ糖がイネの活性酸素生成を誘導することが知られているが、そのシグナル伝達が PLD の活性化を伴うこと、活性化される PLD がαタイプであることが報告されている⁶⁾。αタイプの PLD が活性酸素や防御応答の誘導の Positive regulator として機能していることが示唆されている一方、*OsPLDβ1* は明らかに Negative regulator として機能している。さらに *OsPLDβ1*-KD 系統と WT の葉身における PLD 活性の変化を定量した結果、*OsPLDβ1*-KD 系統では PC を分解する活性が大幅に低下していた (Fig. 7)。PLD 活性が低下しているにもかかわらず、活性酸素が増加するという事実はこれまでの報告とは全く逆の結果を示している。PLDα と PLDβ は同じ PLD であるにもかかわらず、全く逆の生理機能を有する理由は不明であるが、有力な可能性の一つとして PLD 分子の細胞内の局在性の相違が考えられる。イネの *OsPLDα1* は細胞壁、細胞膜、クロロプラストに存在し、α4 と α5 はクロロプラストに存在することが報告されている⁴⁵⁾。一方、トマトでクローニングされた *LePLDβ1* (*Le*: *Lycopersicon esculentum*, トマト) は蛍光蛋白質である GFP との融合タンパク質の細胞内の局在解析から、*LePLDβ1* が細胞質内の特に小胞の周辺に存在することが報告されている⁴⁶⁾。このような細胞内の局在性の相違が PLDα と PLDβ の生理機能の相違に反映しているものと思われる。

7 おわりに

本稿では植物の環境生理に関わる PLD の機能について紹介したが、植物の生育と環境応答におけるリン脂質

代謝を伴う生理機能に対しては、PLC や Phospholipase A (PLA) が同様に重要な役割を有していることが多数報告されており、リン脂質代謝が植物の様々な生理機能を制御していることが明らかになっている。

文 献

- 1) Nishizuka Y, *Nature*, **306**, 693-8 (1984).
- 2) Berridge MJ & Irvine RF, *Nature*, **312**, 315-21 (1984).
- 3) Testerink C & Munnik T, *Trends in Plant Sci.*, **10**, 368-75 (2005).
- 4) Sang Y *et al.*, *Plant Physiol.*, **126**, 1449-58 (2001).
- 5) Yamaguchi T *et al.*, *Physiol Plant.*, **118**, 361-70 (2003).
- 6) Yamaguchi T *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, **46**, 579-87 (2005).
- 7) Lee S *et al.*, *Plant J.*, **26**, 479-86 (2001).
- 8) Anthony RG *et al.*, *EMBO J.*, **23**, 572-81 (2004).
- 9) Deak M *et al.*, *FEBS Lett.*, **451**, 220-6 (1995).
- 10) Farmer PK & Choi JH, *Biochim Biophys Acta*, **1434**, 6-17 (1999).
- 11) Zhang W *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **101**, 9508-13 (2004).
- 12) Teasterink C *et al.*, *Plant J.*, **39**, 527-36 (2004).
- 13) Munnik T, *Trends in Plant Sci.*, **6**, 227-33 (2001).
- 14) Wang X, *Plant Physiol.*, **139**, 566-73 (2005).
- 15) Ryu SB & Wang X, *Plant Physiol.*, **108**, 713-19 (1995).
- 16) Dhonukshe *et al.*, *Plant Cell*, **15**, 2666-79 (2003).
- 17) Gardiner *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, **44**, 687-96 (2003).
- 18) Wang X *et al.*, *J Biol Chem.*, **269**, 20312-17 (1994).
- 19) Yamaguchi T *et al.*, *Plant Physiol.*, **150**, 308-19 (2009).
- 20) Elias M *et al.*, *BMG Genomics*, **3**, 1-15 (2002).
- 21) Qin C & Wang X, *Plant Physiol.*, **128**, 1057-68 (2002).
- 22) Fan L *et al.*, *Plant Cell*, **9**, 2183-96 (1997).
- 23) Song Y *et al.*, *Plant J.*, **28**, 135-44 (2001).
- 24) Welti R *et al.*, *J Biol Chem.*, **277**, 31944-2002 (2002).
- 25) Devaiah SP *et al.*, *Plant J.*, **50**, 950-57 (2007).
- 26) Suzuki Y, *Crop Science*, **51**, 567-73 (2011).
- 27) Hong Y *et al.*, *Plant Cell*, **20**, 803-86 (2008).
- 28) Qi J *et al.*, *Plant Physiol.*, **157**, 1987-99 (2011).
- 29) Li G *et al.*, *Cell Research*, **17**, 8881-94 (2007).
- 30) Katagiri T *et al.*, *Plant J.*, **26**, 595-605 (2001).
- 31) Zhang W *et al.*, *Plant Cell*, **15**, 2285-95 (2003).
- 32) Li W *et al.*, *Nature Biotech.*, **22**, 427-33 (2004).
- 33) Ohashi Y *et al.*, *Science*, **300**, 1427-30 (2003).
- 34) Li G & Xue HW, *Plant Cell*, **19**, 281-95 (2007).
- 35) Leung J *et al.*, *Science*, **264**, 1148-52 (1994).
- 36) Jacob T *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **96**, 12192-97 (2004).
- 37) Lorrain S *et al.*, *Trends in Plant Sci.*, **8**, 263-71 (2003).
- 38) Yamanouchi U *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **99**, 7530-35 (2002).
- 39) Zeng LR *et al.*, *Plant Cell*, **16**, 2795-808 (2004).
- 40) Boller T., *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, **46**, 189-214 (1995).
- 41) Dangl JL & Jones JDG., *Nature*, **441**, 826-33 (2001).
- 42) Takahashi A *et al.*, *Plant J.*, **17**, 535-45 (1999).
- 43) Shimono M *et al.*, *Plant Cell*, **19**, 2064-76 (2007).
- 44) Qualliotine-Mann D *et al.*, *J Biol Chem.*, **268**, 23843-49 (1993).
- 45) McGee JD *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, **44**, 1013-26 (2003).
- 46) Bargmann BOR *et al.*, *Plant J.*, **45**, 358-68 (2006).