

2016 年度
博士論文

シロイヌナズナの LCB キナーゼ 1 (LCBK1) における
スフィンゴ脂質の代謝動態の解析

指導教員 今井博之

甲南大学大学院 自然科学研究科
生命・機能科学専攻
植物細胞工学研究室

柳川大樹

目次

略語	1~2
要旨	3
緒論	4~12

第一章 アセチル誘導体化したスフィンゴイド長鎖塩基 1-リン酸の LC-MS/MS 分析

序論	13~14
実験材料と方法	15~21
結果	22~26
考察	27~29

第二章 スフィンゴイド長鎖塩基 1-リン酸の代謝動態に及ぼすフモニシン B₁ の影響

序論	30
実験材料と方法	31~52
結果	53~75
考察	76~81

第三章 LCBK ファミリーにおけるアミノ酸配列の相同性比較と分子系統樹解 析

序論	82
実験方法	83
結果	84~87
考察	88~91

総合考察	92~96
謝辞	97
参考文献	98~119
公表論文リスト	120

<略語>

ABA	アブシシン酸
C-4OHase	LCB C-4 ヒドロキシラーゼ
CaMV35S	カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター
CER (Cer)	セラミド
CS I	CER シンターゼ I
CS II	CER シンターゼ II
$\Delta 4$ Des	LCB- $\Delta 4$ デサチュラーゼ
$\Delta 8$ Des	LCB- $\Delta 8$ デサチュラーゼ
DPL	LCBP リアーゼ
DRM	界面活性剤不溶性膜
d17:1 ^{4E}	C ₁₇ -スフィンゲニン
d17:1 ^{4E} -P	C ₁₇ -スフィンゲニン 1-リン酸
d18:0	ジヒドロスフィンゴシン
d18:0-P	ジヒドロスフィンゴシン 1-リン酸
d18:1 ^{4E}	スフィンゴシン
d18:1 ^{4E} -P	スフィンゴシン 1-リン酸
d18:1 ^{8Z}	8-シス-ジヒドロキシスフィンゲニン
d18:1-P	スフィンゲニン 1-リン酸
d18:1 ^{8E}	8-トランス-ジヒドロキシスフィンゲニン
ESI	エレクトロスプレーイオン化法
FA2H	脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼ
FB ₁	フモニシン B ₁
GCS	グルコシルセラミドシンターゼ
GlcCer	グルコシル CER
GIPC	グリコシルイノシトールホスホ CER
GIPC-PLD	GIPC 特異的ホスホリパーゼ D
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
hCER	ヒドロキシセラミド
HR	過敏感反応
IPC	イノシトールホスホセラミド

IPCS	イノシトールホスホセラミドシンターゼ
3-KSR	3-ケトジヒドロスフィンゴシンレダクターゼ
JA	ジャスモン酸
LCB	スフィンゴイド長鎖塩基
LCBP	LCB1ーリン酸
LCBK	LCB キナーゼ
LCFA	長鎖脂肪酸
LC-MS/MS	高速液体クロマトグラフィー質量分析装置
MPK	有糸分裂活性化タンパク質キナーゼ
MRM	多重反応モニタリング
NBD-F	4-フルオロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾキサジアゾール
ODS	オクタデシルシリル
ORM	オロソムコイド
PLD α 1	ホスホリパーゼ D α 1
PR	病原菌関連
ROS	活性酸素種
SA	サリチル酸
SM	スフィンゴミエリン
SPP	LCBP ホスファターゼ
SPT	セリンパルミトイルトランスフェラーゼ
ssSPT	小サブユニット SPT
t18:0	ファイトスフィンゴシン
t18:0-P	ファイトスフィンゴシン 1ーリン酸
t18:1 ^{8Z}	8-シス-トリヒドロキシスフィンゲニン
t18:1-P	トリヒドロキシスフィンゲニン 1ーリン酸
t18:1 ^{8E}	8-トランス-トリヒドロキシスフィンゲニン
VLCFA	超長鎖脂肪酸

<要旨>

スフィンゴ脂質は、スフィンゴイドと呼ばれる長鎖塩基 (long-chain base、以下 LCB と略す) を基本骨格にもつ一群の脂質である。スフィンゴ脂質代謝系の分解産物である LCB1-リン酸 (LCBP) は、LCB キナーゼ (LCBK) によって合成され、LCBP ホスファターゼ (SPP) により脱リン酸化されて LCB にリサイクルされるか、もしくは LCBP リアーゼ (DPL) により C₁₆ アルデヒドとホスホエタノールアミンに分解される。したがって、生体内における LCBP のレベルは、これら LCBP の合成系と分解系に働く酵素の相対活性によって制御されていると考えられる。

セラミドシンターゼ (LCB-N-アシルトランスフェラーゼ) の阻害剤であるフモニシン B₁ (FB₁) を植物組織に処理すると、LCB が蓄積されるとともに、細胞死が誘導されることが報告されている。一方、FB₁ 処理の際は、LCB の蓄積を回避するために、LCBK による LCBP の合成と、DPL による LCBP の分解という反応が強く働くと考えられるが、異化代謝経路と FB₁ 応答との関係については、不明な点が多い。そこで本研究では、シロイヌナズナの LCBK1 の過剰発現株 (LCBK1-OX1, LCBK1-OX2) と抑制株

(LCBK1-KD1, LCBK1-KD2) を用いて FB₁ に対する影響を調べた。FB₁ を含む MS 培地で植物体の表現型の観察を行ったところ、LCBK1-OX1 は野生型に比べて耐性を示し、LCBK1-KD1 では感受性を示した。次に、LCBP 代謝に関わる形質転換体を用いて、FB₁ 処理した際の細胞死の判定に基づく表現型解析と LC-MS/MS による LCB および LCBP の定量分析を行った。具体的には、シロイヌナズナの LCBP 代謝に関係する 3 つの遺伝子 (LCBK1、SPP1、DPL1) について LCBK1 を過剰発現、または抑制させた形質転換体 (LCBK1-OX1、LCBK1-KD1)、および、ノックアウトミュータントの *spp1*、*dpl1* を用いて解析した。FB₁ 処理したロゼット葉をトリパンブルー染色によって観察したところ、LCBK1-KD1 および *dpl1* では野生型に比べて死細胞が多く観察されたが、LCBK1-OX1 および *spp1* ではほとんど観察されなかった。LCB の解析において、LCBK1-KD1 および *dpl1* では野生型と比較して、主にジヒドロスフィンゴシン (d18:0) が蓄積したが、LCBK1-OX1 および *spp1* においては蓄積しなかった。一方、LCBP の解析では、*spp1* および *dpl1* において、野生型と比較して LCBP 量は増加したが、LCBK1-KD1 では減少した。これらの結果から、FB₁ によって誘導される細胞死は、d18:0 の蓄積が原因であること、LCBP は LCB の蓄積を回避するために変換されることがわかった。したがって、LCBK1 による LCB をリン酸化する経路は、FB₁ 処理における LCB の蓄積を調節し、細胞死を制御するのに不可欠であることが示唆された。

＜緒論＞

スフィンゴ脂質とは、スフィンゴイド（長鎖塩基 long-chain base, 以下 LCB と略す）を共通構成成分として含む複合脂質の総称であり、動物、植物、真核微生物と一部の原核生物（*Sphingomonas* や *Sphingobacterium*）に幅広く存在している[1-5]。スフィンゴ脂質は 1874 年に J.L.W. Thudichum らによって動物の神経組織から発見され、この脂質の特性が珍しいもので謎だったことから、Sphinx の謎を連想させて Sphingo と名づけられたといわれている[1]。植物では 1961 年に H. Carter らによって初めてスフィンゴ脂質の存在が報告された[6]。植物におけるスフィンゴ脂質は、細胞内に約 500 種類の分子種が存在すると言われており、モデル植物であるシロイヌナズナでは 200 種類以上の分子種が存在する[4]。植物における LCB は、メチル化、ヒドロキシル化、リン酸、脱リン酸化、二重結合の数と位置を組み合わせることによってそれぞれ固有の分子種を生み出しており、これらの分子種や代謝反応に関わる酵素遺伝子が、植物の形態発生、老化、生物、非生物的なストレス応答といった様々なことに関与する生理活性分子として重要であることが示唆されている。スフィンゴ脂質は、細胞膜の構築に不可欠な構成成分であり、植物細胞の細胞膜において 40%以上占めていると予想されている[7-8]。また、スフィンゴ脂質は、脂質ラフトと呼ばれるステロールとタンパク質を多く含んだマイクロドメインに多いことが界面活性剤不溶性膜（DRM）画分を用いた実験から報告されている[7-8]。なお、本論文では、LCB のアミノ基にアシル基（またはヒドロキシアシル基）がアミド結合したものを総称して「セラミド（CER）」と呼ぶ。

動物のスフィンゴ脂質は、ガングリオシドのような各種の糖類が結合したスフィンゴ糖脂質と、スフィンゴミエリン（SM）のような CER の C-1 位の水酸基にリン酸およびホスホン酸誘導体が結合したスフィンゴリン脂質の 2 つに大別される。一方、植物のスフィンゴ脂質は、グリコシルイノシトールホスホ CER（GIPC）、グルコシル CER（GlcCer）が主成分であり、その他に中間代謝産物と考えられる CER、遊離 LCB、LCB1-リン酸（LCBP）などが検出される。GlcCer と GIPC は、細胞膜の外膜と液胞膜内の主要な構成成分であり、マイクロドメインを構成する主要成分ではないかといわれている[9-10]。LCBP は、アブシシン酸（ABA）を介した気孔の開閉に関与するシグナル伝達物質として機能することが報告されている[11-12]。シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）において、GlcCer と GIPC の含量を合計すると、スフィンゴ脂質全体の 9 割以上を占めている。一方、遊離 LCB や LCBP は合計で 1%程度であり、微量でしか存在しない [3]。

シロイヌナズナの葉におけるスフィンゴ脂質代謝経路を Fig. 1 に示した。LCB の de

novo 代謝経路は、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) による L-セリンとパルミトイル CoA の脱炭酸縮合反応から始まり、3-ケトジヒドロスフィンゴシンが生成される[13-14]。3-ケトジヒドロスフィンゴシンは、3-ケトジヒドロスフィンゴシンレダクターゼ (3-KSR) の触媒により、ジヒドロスフィンゴシン (d18:0) に変換される[15]。d18:0 は、LCB-C4 ヒドロキシラーゼ (C-4OHase) によってファイトスフィンゴシン (t18:0) に変換される[16]。

d18:0 は CER シンターゼ I (CS I) によって炭素鎖 16 の長鎖脂肪酸 (LCFA) と結合した後、LCB- Δ 8 デサチュラーゼ (Δ 8Des) によって d18:1 を有する CER に変換される[17]。一方、t18:0 は CER シンターゼ II (CS II) によって、炭素鎖 18 から 26 の超長鎖脂肪酸 (VLCFA) と結合し[18-19]、その後、 Δ 8Des によって、t18:1 を有する CER になる。次に、このような CER 分子種は、脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼ (FA2H) によってアシル鎖部分の α 位が水酸化され、ヒドロキシセラミド (hCER) と呼ばれる CER 分子種になる[20-22]。この hCER 分子種は、さらに CER:UDP-グルコーストランスフェラーゼ (GlcCer シンターゼ、GCS) によって GlcCer になるか[23]、あるいは、イノシトールホスホセラミドシンターゼ (IPCS) によってイノシトールホスホセラミド (IPC) になる[24]。ここで生じた IPC は、その後いくつかの糖鎖修飾を経て[25-26]、GIPC になる。一方、スフィンゴ脂質の分解系に関して、植物や酵母には、GIPC や GlcCer を CER に分解し、最終的に LCB に分解する経路が存在するといわれている。植物において GIPC や GlcCer を分解する酵素は同定されていないが、CER を LCB に分解するセラミダーゼは、同定されている[27-29]。

スフィンゴ脂質の微量な中間代謝産物である遊離 LCB は、スフィンゴ脂質の生合成経路および分解経路のいずれにおいても生じると予想されるが、遊離 LCB の生体内レベルを低く保つ仕組みとして、上記で述べた遊離 LCB のアシル化の他に、スフィンゴ脂質の異化代謝経路と呼ばれる遊離 LCB のリン酸化経路も存在する。この異化代謝経路において、遊離 LCB は LCB キナーゼ (LCBK) によってリン酸化され、LCBP に変換される[30-31]。一方、LCBP は LCBP ホスファターゼ (SPP) により脱リン酸化され遊離 LCB に戻るか[32]、もしくは、LCBP は LCBP リアーゼ (DPL) によってホスホエタノールアミンと C₁₆ アルデヒドに分解される[33-34]。スフィンゴ脂質の代謝系から外れたこれらの分解産物の一部は、その後グリセロ脂質の合成系に利用されると考えられている[35-36]。LCBP の不飽和化は、*de novo* 合成から分解された不飽和化 LCB が LCBP に変換される、もしくは LCBP に変換されてから Δ 8Des によって不飽和化されることが

考えられるが、詳細はわかっていない。

LCBP 代謝系に関与する酵素遺伝子の研究は、主としてシロイヌナズナにおいて行われてきた。LCBP の脱リン酸化を触媒する SPP は、シロイヌナズナ EST と出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のゲノム配列との相同性により、*At3g58490* が見つかり、DPL を欠損した *S. cerevisiae* のミュータント ($\Delta dpl1$) を用いた相補性試験と *in vivo* の酵素アッセイによって、*At3g58490* が SPP をコードすることが報告された[32]。さらに、SPP1 のシロイヌナズナ T-DNA ノックアウトミュータント (*spp1-1*, *spp1-2*) を用いて d18:0-P の蓄積量を調べたところ、野生型と比べて増加したことから、SPP が LCBP レベルを調節することが示唆された[32]。シロイヌナズナ培養細胞のプロトプラストにおける sGFP-SPP1 の発現解析において、SPP1 は小胞体に局在することが示唆された[32]。また、シロイヌナズナ気孔孔辺細胞の閉鎖に及ぼす ABA の影響を調べる *in vitro* アッセイにおいて、ABA 処理によって *spp1* は野生型よりも気孔が閉鎖したことから、気孔閉鎖の ABA 情報伝達経路において、LCBP が脂質シグナルとしての役割を果たすことが示唆された[32]。

シロイヌナズナ DPL の研究において、西川らと Tsegaye らがそれぞれ別々に *S. cerevisiae* のアミノ酸配列との相同性検索によって *At1g27980* を見つけた。DPL を欠損した *S. cerevisiae* のミュータント ($\Delta dpl1$) との相補性試験と、発現タンパク質の *in vivo* アッセイによって、*At1g27980* の遺伝子産物が機能的に DPL であることが明らかになった[33-34]。また、シロイヌナズナ DPL に関する T-DNA ノックアウトミュータント (*dpl1-1*, *dpl1-2*) を用いた機能解析で、*dpl1-1* と *dpl1-2* の新鮮重量の減少の割合は、野生型と比べて少なかったことから、DPL1 は乾燥ストレス耐性に重要な役割を果たすことが示唆された[34]。さらに、シロイヌナズナの培養細胞のプロトプラストによる sGFP-DPL1 の発現解析において、DPL1 は小胞体に局在することが示唆された[34]。

植物の LCBK の研究において、Lynch らは、トウモロコシのシュートから調製したミクロソームを用いて、植物においてはじめて LCBK 活性を報告した[37]。LCBK は、シロイヌナズナにおいて、*LCBK1* (*At5g23450*)、*LCBK2* (*At2g46090*)、*SPHK1* (*At4g21540*)、*SPHK2* (*At4g21534*) の 4 つのホモログが存在する。*LCBK1* は西浦らによって同定され、大腸菌の発現タンパク質を用いた *in vitro* アッセイによって、シロイヌナズナ LCBK1 は、d18:0 に対し基質特異性が高く、スフィンゴシン(d18:1^{4E})や t18:0 も基質とすることが示された[31]。さらに、植物器官における遺伝子発現のレベルを RT-PCR 法を用いて解析したところ、花での高い発現が見られた[31]。しかし、生殖器官における LCBK1

の役割については未だにわかっていない。*SPHK1* は、Worrall らによって同定された[38]。また、*SPHK2* は Guo らによって同定された[39-40]。これらの LCB キナーゼは、シロイヌナズナの葉から抽出したライセートを用いた酵素活性の測定結果や、T-DNA ノックアウトミュータント、過剰発現体の解析により、ABA を介した気孔孔辺細胞の閉鎖の誘導と、気孔開口の阻害の両方に関わっていることが明らかにされている[40,41-42]。しかし、この ABA を介した気孔開閉の誘導や阻害に関わるシグナル伝達経路は不明な点が多いが、最近、ホスホリパーゼ $D\alpha 1$ ($PLD\alpha 1$) 反応によって生じるホスファチジン酸が *SPHK* を活性化し、*SPHK* によって生じる $t18:0\text{-P}$ が $PLD\alpha 1$ を活性化することで ABA に対する反応性が増幅され、気孔の閉鎖促進が起こることが示唆された[40]。さらに、*SPHK1* は細胞内のカルシウム流入を介した花粉管伸長の調節に重要な役割を果たしていることが報告されている[43]。また、最近 *LCBK2* が低温ストレス (22°C から 4°C) における $t18:0\text{-P}$ の一過的な蓄積に関わっており、有糸分裂活性化タンパク質キナーゼ (MPK) 遺伝子である *MPK6* を介してシグナル伝達され、植物の寒冷応答に関わっていることが報告された[44]。

植物におけるスフィンゴ脂質代謝に関わる酵素遺伝子の研究は、ここ 10 年間で急速に進み、葉の形態の異常だけでなく、雄性配偶体の発達や花粉管伸長のシグナリングの調節に関わることがわかってきた[14, 25,27,43,45-46]。その中で、病害抵抗性の細胞死とスフィンゴ脂質代謝との関連性に着目した研究が活発に行われている。細胞死は、植物の成長に不可欠な生理的プロセスであり、病原菌感染のような環境ストレスだけでなく、老化や器官の形成といったことにも貢献している[47-50]。特に、病害抵抗性の細胞死の研究が古くから進められていた[51-52]。バクテリア、ウイルスのような生体栄養性の病原菌が宿主に攻撃、あるいは侵入すると、感染した細胞が急速に細胞死を起こすことによって病徴の拡大を阻止し、個体全体を護るという機構がはたらく[53-56]。一方、カビのような屍体栄養性病原菌に対しては罹病性であり、毒物、すなわちマイコトキシンを分泌することで宿主細胞を殺し、死細胞から栄養源を接種して生育を増大させる[57-61]。このように、過敏感反応 (HR) のような植物の抵抗力と病原菌の感染戦略との関連性が調べられているが、詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。

最近、スフィンゴ脂質代謝物の個々の分子種を高速液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いた網羅的分析手法が開発された[62-66]。これにより、LCB や CER といったスフィンゴ脂質の特定の分子種が、植物病原菌の感染によって誘導される過敏感反応 (HR) や、病原菌防御関連の遺伝子発現によって調節される細胞死の分

子メカニズムに重要な役割を担っていることが報告されている[67-83]。その中で、屍体栄養性の病原真菌から分泌されるマイコトキシンが、スフィンゴ脂質代謝を攪乱させて、細胞死を引き起こすことが知られていた[84-85]。それは、LCB の構造類似体のマイコトキシンの 1 つであり、CER シンターゼ阻害剤のフモニシン B₁ (FB₁) である。FB₁ は、*Fusarium verticillioides* や *Fusarium moniliforme* のようなフザリウム属によって生産され、トウモロコシや小麦などといった穀類に重大な病変症状をもたらす[86-87]。FB₁ が蓄積した穀物は、家畜に甚大な影響を与え、ウマでは白質脳症、ブタでは肺水腫を引き起こすことがわかっている[87]。また、ヒトにおいても食道がん、肝臓がん、心血管障害など健康被害をもたらすことが懸念されている[87]。

これまでに、スフィンゴ脂質代謝経路に関わる酵素遺伝子を欠損させたミュータントを用いて FB₁ の感受性について研究が行われている。FB₁ を植物組織に処理すると、LCB が蓄積されるとともに、細胞死が誘導される[85, 88-91]。一方、スフィンゴ脂質生合成の初発酵素である SPT を欠損したシロイヌナズナのノックアウトミュータント (*lcb2a-1*) は、FB₁ に対して野生型に比べて耐性を示し、LCB を蓄積しないことが報告されている[91]。さらに、小サブユニット SPT (ssSPT) の RNAi ノックダウン株も FB₁ に対して耐性を示すことがわかっている[90]。また、CER シンターゼに関するノックアウトミュータント (*loh1-1 loh3-1*) と過剰発現株 (LOH1-OX) は、FB₁ に対して野生型よりも感受性を示す[18,92]。これらの結果から、LCB レベルの調節に関与するスフィンゴ脂質の *de novo* 合成反応が、植物の FB₁ に対する感受性を決めることが明らかになっている。また、MPK6 が d18:0 の蓄積によって誘導される細胞死の下流シグナリングを調節することがわかっている[73]。一方、FB₁ 処理の際は、LCB の蓄積を回避するために、LCBK による LCBP の合成と、DPL による LCBP の分解というスフィンゴ脂質の異化代謝経路の反応が強く働くと考えられている。最近、LCBP が細胞死を制御するのに重要な代謝物であることが報告されている[93]。*dpl1* は FB₁ に高い感受性を示すとともに、LCB や LCBP が野生型に比べて過度に蓄積することから、*DPL1* は増大した LCB や LCBP のレベルの維持に重要な役割を果たすことが示唆された[32-33] (Fig. 2)。一方、FB₁ 処理した *spp1* の実生は、葉の白色化があまり見られないことから、おそらく野生型と比べて LCB が減少し、LCBP が増加したことで細胞死が抑制されると予想される[32] (Fig. 2)。しかし、LCBP のどのような分子種が FB₁ 誘導細胞死に関与するかは解析されておらず、スフィンゴ脂質の分解に関する代謝経路と、植物の FB₁ 応答との関係については、まだ不明な点が多い。

近年、LC-MS/MS が植物のスフィンゴ脂質代謝物の解析の強力なツールとして用いられており、GIPC、GlcCer、CER、遊離 LCB、LCBP のそれぞれの分子種を定量的かつ網羅的な分析を行うスフィンゴリピドミクスが可能となった[94-96]。植物における総スフィンゴ脂質の抽出方法は、Markham らによるイソプロパノール/ヘキサン/水の混合溶媒系が主流である[62,65-66]。この混合溶媒は、元々、高度病原性真菌であるパラコキシジオイデス (*Paracoccidioides brasiliensis*) の糖脂質の抽出に使用するものであり、試料中のリパーゼ活性を低減することから、多くの研究者がこの抽出システムを利用している。しかしながら、LCB や LCBP は複合スフィンゴ脂質と比べて、存在量が非常に少なく、誘導体化せずに定量することは困難である。特に、LCBP は両親媒性を有する構造で極性が高いことからイソプロパノール/ヘキサン/水の混合溶媒系ではほとんど溶出しにくい。最近、アミノ酸分析に使用される蛍光誘導体化試薬 4-フルオロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾキサジアゾール (NBD-F) を用いて、LCB を誘導体化する方法が石川らによって確立された[97-98]。この方法により、植物から抽出された 9 種類すべての LCB の分子種を正確に定量することができる。ところが、植物における LCBP に特化した抽出、定量分析法は確立されていないのが現状である。興味深いことに、ヒト肺動脈の血管内皮細胞から抽出した LCBP 画分をアセチル誘導体化して LC-MS/MS で定量分析できることが Berdyshev らによって報告されている[99]。しかしながら、アセチル化したトリヒドロキシ型の LCBP は分析されていない[99]。

本研究では、FB₁ 処理におけるスフィンゴ脂質代謝の変動に際し、LCBP の重要性を理解するために、シロイヌナズナ *LCBK1* に注目した。第一章では、トリヒドロキシ LCBP のスタンダードをアセチル誘導体化し、定量方法を LC-MS/MS を用いて確立させた。さらに、植物の内在性の LCBP を同定、定量する手法を確立するために、メタノール/水 (1:1, v/v, 0.1% ギ酸) で LCBP 抽出し、アセチル誘導体化して LC-MS/MS 分析した。第二章では、FB₁ を含む培地に生育させた *LCBK1* の過剰発現株 (*LCBK1-OX1*、*LCBK1-OX2*) および、*LCBK1* ノックダウン株 (*LCBK1-KD1*、*LCBK1-KD2*) の実生における葉と根の表現型の解析を行った。また、細胞死の表現型の解析をするために、細胞死を判定するための指標となる導電率測定とトリパンブルー染色したロゼット葉の観察をシロイヌナズナ *LCBK1* の過剰発現株および、*LCBK1* ノックダウン株を用いて行った。第 1 章で確立させた手法を用いて、*LCBK1* の過剰発現株および、*LCBK1* ノックダウン株の LCB および、LCBP の分子種組成を LC-MS/MS で定量分析した。また、スフィンゴ脂質の分解系に関わる代謝経路と FB₁ 応答の関係をさらに詳しく調べるために、

SPP1 および *DPL1* に関するシロイヌナズナのノックアウトミュータント (*spp1*、*dpl1*) を用いて LCB、LCBP の分子種組成と細胞死の表現型の比較を行った。第三章では、シロイヌナズナの LCBK1 が様々な生物の LCBK ファミリーとどの程度保存されて、どのように進化してきたかを調べるために、アミノ酸配列を用いた相同性解析と分子系統樹解析を行った。

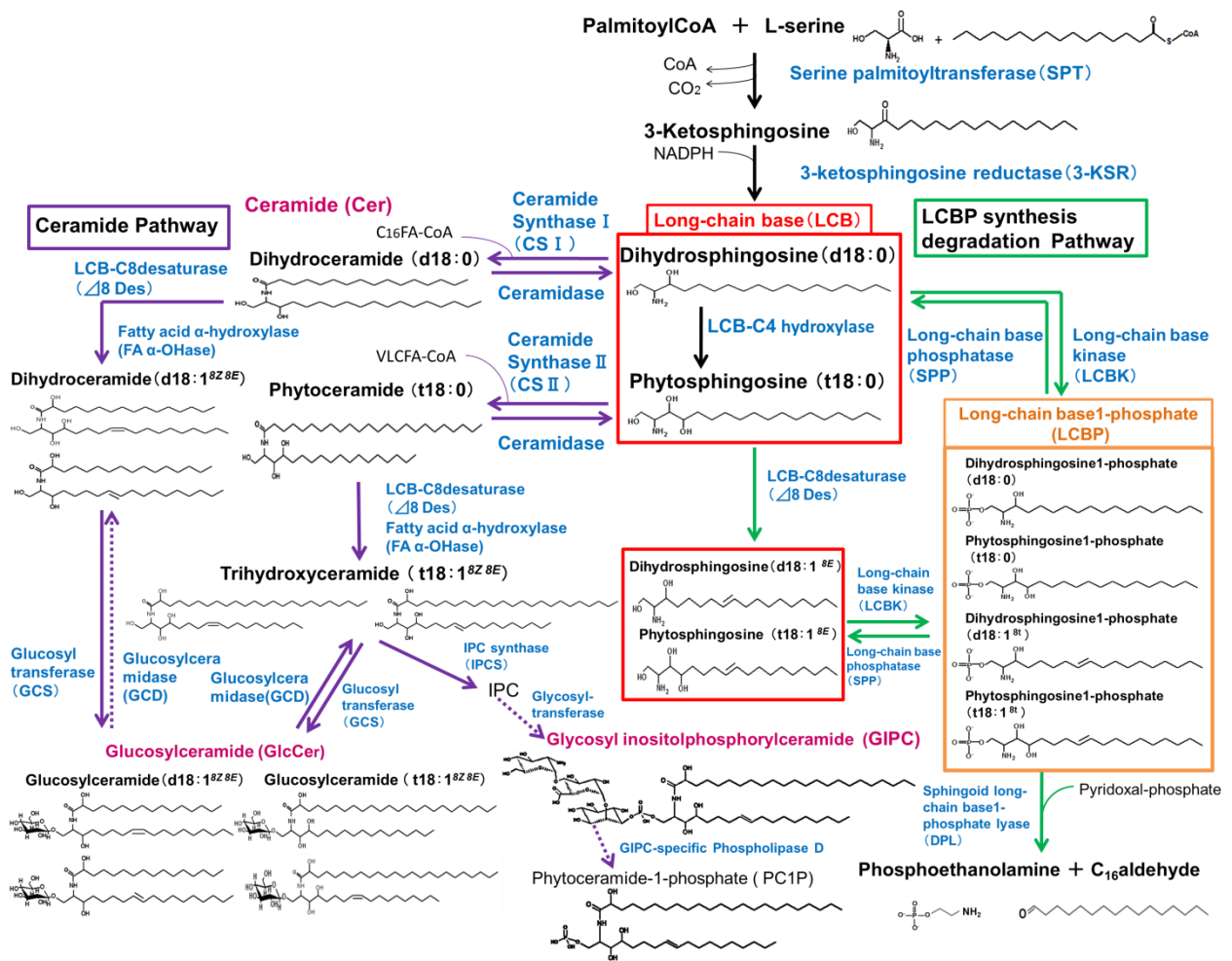


Fig. 1 シロイヌナズナにおけるスフィンゴ脂質代謝経路

黒色の矢印は LCB の *de novo* 合成経路、紫色の矢印はセラミド系経路、緑色の矢印は LCBP の合成・分解経路を示している。

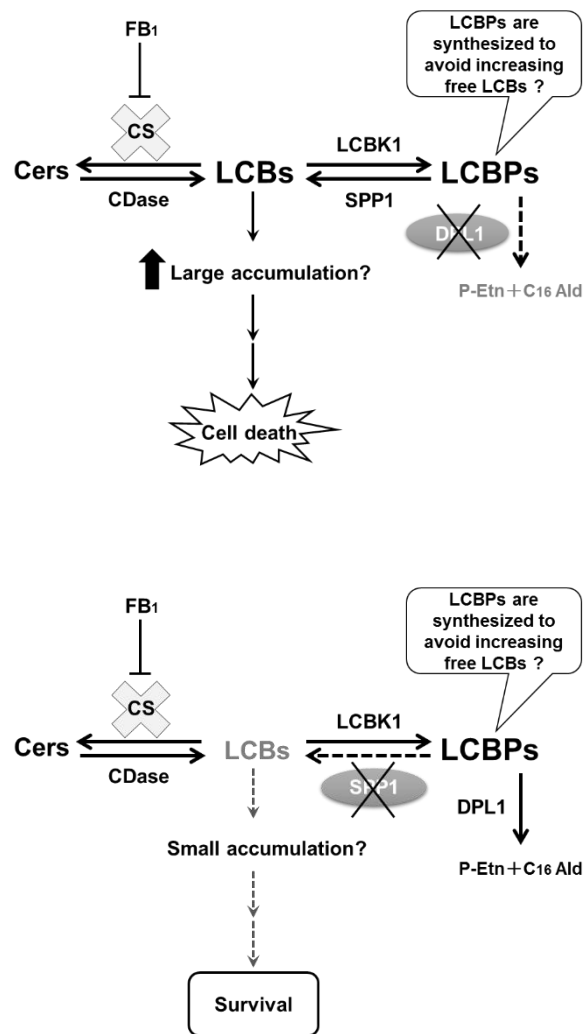


Fig. 2 シロイヌナズナにおける LCBP 代謝と FB₁ の関係

(A) *dpl1* における FB₁ 応答

(B) *spp1* における FB₁ 応答

第一章 アセチル誘導体化したスフィンゴイド長鎖塩基 1

ーリン酸の LC-MS/MS 分析

序論

植物におけるスフィンゴ脂質の研究は、スフィンゴ脂質生合成経路に関わる遺伝子のミュータントや形質転換体を用いた逆遺伝学的な手法で進められている。その中で、LC-MS/MS を基盤としたスフィンゴ脂質代謝物を網羅的に分析するスフィンゴリピドミクスが、植物の生理学的な現象を解明するのに不可欠なツールとなっている[62,66]。このような研究で対象となるスフィンゴ脂質代謝物は、GlcCer、GIPC、Cer、遊離 LCB、LCBP の 5 つがあげられる。シロイヌナズナの緑葉において、複合スフィンゴ脂質である GlcCer と GIPC は全体の約 95% を占めているが、遊離 LCB や LCBP は極めて微量である (Fig. 3)。最近、植物サンプルからこれらすべての代謝物を抽出できる方法として、イソプロパノール／ヘキサン／水の混合溶媒が基本的によく使用されている[65]。しかしながら、この混合溶媒は Bligh & Dyer [100] によって確立されたクロロホルム／メタノール／水の混合溶媒に比べて複合スフィンゴ脂質は可溶化できる。しかしながら、生体内で微量であり、両親媒性を有する構造をもつ LCBP は、この混合溶媒では効率よく抽出することができないことが予想される。さらに、誘導体化せずに各々の LCBP の分子種を同定および定量することは非常に困難である。遊離 LCB の分析において、アミノ基蛍光ラベル化剤である NBD-F を用いて誘導体化し、植物から抽出されたすべての LCB の分子種を正確に定量できる方法が石川らによって確立された[97-98]。ところが、植物における LCBP に特化した抽出、定量分析法は未だに確立されていない。したがって、植物の内在性の LCBP を同定、定量する手法を確立するために、メタノール/水 (1:1, v/v, 0.1% ギ酸) の混合溶媒を用いて LCBP 画分を抽出する方法を開発した。さらに、抽出した LCBP をアセチル誘導体化し、LC-MS/MS 分析した。

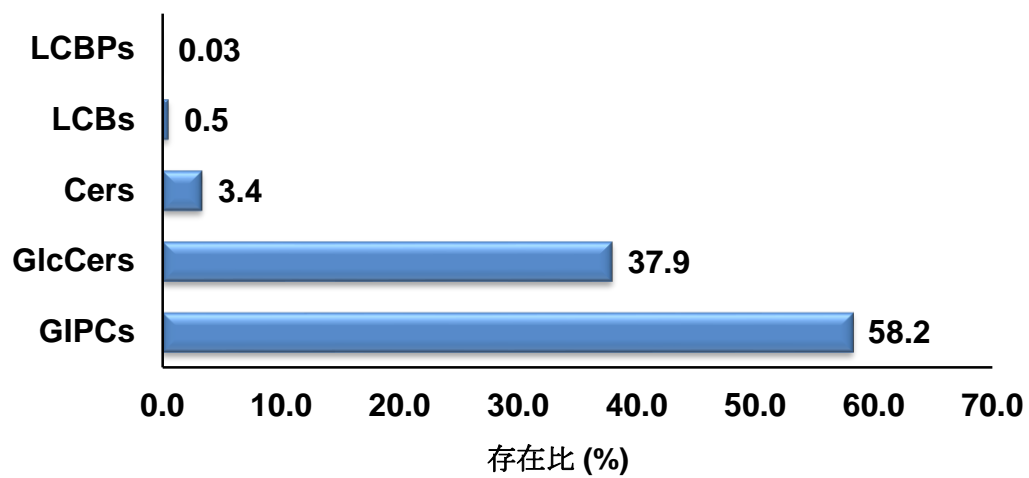


Fig. 3 シロイヌナズナの緑葉におけるスフィンゴ脂質の存在比

＜実験材料と方法＞

1. 使用した試薬

有機溶媒および試薬は、和光純薬工業の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用、もしくは特級グレードのものを使用した。C₁₇ スフィンゲニン 1-リン酸（d17:1^{4E}-P）、ファイトスフィンゴシン 1-リン酸（t18:0-P）は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) から購入した。

2. スタンダードサンプルのアセチル化

2.5 mM に調製した d17:1^{4E}-P と t18:0-P のスタンダードサンプルをそれぞれ 1.5 ml マイクロチューブに移し、50℃のヒートブロック（Type 17600, Thermolyne）で温めながら窒素ガスで乾固した。ピリジン 50 μ l、無水酢酸 25 μ l 加え、40℃のウォーターバス（SB-1000, EYELA）で 20 分インキュベートした。遠心エバポレーター（CVE-100D, EYELA）で遠心濃縮した後、メタノール/水=1:1 を 50 μ l 加え、ボルテックス（TM-250, IWAKI）、ソニケーションした後、15000 rpm、1 分、室温で遠心した。上清をガラスバイアル（GLCTV-801, 島津ジーエルシー）に移し、LC-MS/MS で分析した。

3. LCBP スタンダードサンプルの測定と検量線の作成

LCBP の異なる分子種におけるマススペクトルの感度を検証するために、アセチル化した d17:1^{4E}-P と t18:0-P を用いて多重反応モニタリング（MRM）のネガティブイオンモード[M-H]⁻で LC-MS/MS 分析した。

LC-MS/MS を用いた LCBP の検出条件

高速液体クロマトグラフ質量分析装置は以下の機器を用いた。

DEGASSER (PGU-20A₅, 島津)

LIQUID CHROMATOGRAPH (LC-20ADXR, LC-10AT, 島津)

AUTO SAMPLER (SIL-20A CXR, 島津)

COLUMN OVEN (CTO-10A, 島津)

Tandem quadrupole mass spectrometer (ACQUITY[®]TQD, waters)

(高速液体クロマトグラフィー)

使用したカラム 150 mm×2.0 mm id, 3 μm TSKgel ODS-100Z column (TOSOH)

カラムの温度 40°C

溶媒 A メタノール/アセトニトリル (3:2 v/v)、0.1%ギ酸、5 mM ギ酸アンモニウム

溶媒 B 水/ギ酸 (1000:1 v/v)

流速 0.2 ml/min

LCBP を分離するためのグラジエント条件のパラメーターは、Table 1 に示した。

(タンデム四重極型質量分析条件)

Experiment file LCBP-Ac8.exp

イオンモード MRM [M-H]⁻ 5 チャンネル ES⁻
Span 0.6

ES⁻ Source

Voltages Capillary(kV) 3.00

Cone(V) 40

Extractor(V) 2

Temperatures Source Temp(°C) 120

Desolvation Temp(°C) 350

分析時間 1~20 分

Table 1 LCBP 分子種を分離するための HPLC のグラジエント条件

Solvent A (%)	Solvent B (%)	Gradient time (min)
70	30	0
70	30	2
100	0	10
100	0	16
70	30	17

LCBP 溶出後、次のサンプルを分析する前に、溶媒 A 70%、溶媒 B 30%のグラジエント条件で 3 分間カラムを平衡化した（トータル 20 分）

4. アセチル化方法を用いた t18:0-P の同定

アセチル化した t18:0-P のプレカーサーイオンとプロダクトイオンを同定するために、プレカーサーイオンはネガティブフルスキャンモード、プロダクトイオンはプロダクトイオンスキャンモードで測定した。同定したプレカーサーイオンとプロダクトイオンのマススペクトルのパラメーターを Table 2 に示した。

Table 2 アセチル化した LCBP 分子種を MRM で検出するためのマスペクトルパラメーター

LCBP molecular species	Precursor ion [M-H] ⁻ (m/z)	Product ion (m/z)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (V)	Note
d17:1-P	448.4	388.4	50	26	Berdyshev et al., 2005
d18:1-P	462.4	402.4	50	28	Berdyshev et al., 2005
d18:0-P	464.4	404.4	50	28	Berdyshev et al., 2005
t18:1-P	520.4	418.4	60	32	The present study
t18:0-P	522.4	420.4	60	32	The present study

5. FB₁ 未処理の植物体からの LCBP 画分の抽出方法

LCBP の抽出は、Merrill らの方法を参考にして行った[101]。50 ml の遠心沈殿管 (8422CTF50, IWAKI) に 2-プロパノールを 20 ml 加え、80℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で予熱した後、電子天秤で新鮮重量 5 g のシロイヌナズナロゼット葉あるいは新鮮重量 10 g のカイワレダイコンのスプラウトを測定し、2-プロパノールが入った 50 ml の遠心沈殿管 (8422CTF50, IWAKI) に入れ、80℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 10 分間インキュベートした。直ちに氷冷した後、メタノール/水=1 : 1 (0.1%ギ酸) を 25 ml、2.5 μ M d17:1^{4E}-P (内部標準) を 50 μ l 加えてヒスコトロン (日音医理科器械製作所、ジェネレータシャフトは NS-10 を使用した) で破碎した後、60℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 10 分インキュベートし、冷却遠心機 (KUBOTA 2700) で 1500 \times g、10 分、室温で遠心した。上清をパスツールピペット (IK-PAS-5P, IWAKI) で新しい 50 ml の遠心沈殿管 (8422CTF50, IWAKI) に回収し、残りのペレットにメタノール/水=1 : 1 (0.1%ギ酸) を 45 ml 加えてボルテックス (TM-250, IWAKI) した後、60℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 10 分インキュベートし、冷却遠心機 (KUBOTA 2700) で 1500 \times g、10 分、室温で遠心した。上清を再び 50 ml の遠心沈殿管 (8422CTF50, IWAKI) に回収した後、ペレットにメタノール/水=1 : 1 (0.1%ギ酸) を 45 ml 加えてボルテックス (TM-250, IWAKI) した後、60℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 10 分インキュベートし、冷却遠心機 (KUBOTA 2700) で 1500 \times g、10 分、室温で遠心した。上清を 50 ml の遠心沈殿管 (8422CTF50, IWAKI) に回収した後、200 ml のナス型フラスコ (82-0730, IWAKI) に移し、ロータリーエバポレーター (N-1, EYELA) で濃縮乾固した。ナス型フラスコ (82-0730, IWAKI) にクロロホルム/メタノール/濃塩酸=100 : 200 : 1 を 10 ml 加え、ソニケーションして溶解させた後、15 ml のネジ付き試験管 (TST SCR 16-100, IWAKI) に回収した。50℃のヒートブロック (Type, 17600, Thermolyne) で温めながら窒素ガスで乾固させた後、-20℃で保存した。

6. FB₁ 未処理の植物体から抽出した LCBP のアセチル化

5. の方法により抽出して得られたサンプルにメタノール/水=1 : 1 (0.1%ギ酸) を 5 ml 加え、60℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 3 分インキュベートした後、冷却遠心機 (KUBOTA 2700) で 1500 \times g、10 分、室温で遠心し、上清を新しい 15 ml のネ

ジ付き試験管 (TST SCR 16-100, IWAKI) に回収した。上清 1 ml を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移し、50°C のヒートブロック (Type 17600, Thermolyne) で温めながら窒素ガスで乾固した (この操作を 4 回繰り返した)。乾固したサンプルにピリジン 50 μ l、無水酢酸 25 μ l 加え、40°C のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 20 分インキュベートした。遠心エバポレーター (CVE-100D, EYELA) で遠心濃縮した後、メタノール/水=1 : 1 を 50 μ l 加え、ボルテックス (TM-250, IWAKI)、ソニケーションした後、マイクロ遠心機 (KUBOTA 3400) で 20000 \times g、1 分、室温で遠心した。上清をガラスバイアル (GLCTV-801, 島津ジーエルシー) に移し、LC-MS/MS で分析した。

7. LC-MS/MS を用いた LCBP の定量解析

分析後、検出されたピーク面積を MSLinux ver. 4.1 (waters) のソフトウェアで算出して、内部標準法 (d17:1^{4E}-P を使用した) により LCBP の分子種組成の定量を行った。

<結果>

「LCBP 分析における LC-MS/MS 分析条件の最適化」

最近の研究で、植物における LCBP の定量分析は MRM モードのポジティブイオンモードで行われているが、生体内の LCBP 量は非常に少なく、誘導体化せずに植物の抽出サンプルから LCBP を正確に定量することは難しい[62,66]。そこで我々は、LCBP をアセチル化して定量するという分析方法を確立することを試みた。シロイヌナズナにおいて、LCBP は主に、スフィンゲニン 1-リン酸 (d18:1-P)、スフィンゴシン 1-リン酸 (d18:0-P)、トリヒドロキシスフィンゲニン 1-リン酸 (t18:1-P)、ファイトスフィンゴシン 1-リン酸 (t18:0-P) の 4 つの分子種が存在し、t18:1-P、t18:0-P が主要構成成分である。Berdyshev らのアセチル化分析方法によると、スフィンゴシン 1-リン酸 (d18:1^{4E}-P) と d18:0-P のみ分析が行われており、トリヒドロキシ型の LCBP は分析されていない[99]。したがって、我々は、トリヒドロキシ型の LCBP の測定に焦点をあてた。標品の t18:0-P を用いてネガティブフルスキャンモードで分析したところ、[M-H]⁻が主なマシグナルであり、質量電荷比 (m/z) 522.4 が検出された (Fig. 4A)。このマシスペクトルは、第一アミン、第二アルコール 2 個にアセチル基が結合した t18:0-P のアセチル誘導体を表している。このマシスペクトルに従って、我々はマシフラグメンテーションを同定するために、プロダクトイオンスキャンモードで測定した。プレカーサーイオンから断片化されたプロダクトイオンは、m/z 402.4、420.4、480.4 が検出された (Fig. 4B)。これらのプロダクトイオンは、t18:0-P のアセチル誘導体を表しており、m/z 420.4 が主なピークであることを表している (Fig. 4B)。m/z 420.4 は、[M-H-102]⁻の損失した構造であり、アセチル化したアミドとアルコール経由の[O-C-CH₂]と H₂O から脱離されたものであると説明できる (Fig. 4B)。したがって、ネガティブイオン化 MRM モードにおけるアセチル化した t18:0-P のプレカーサーイオン/プロダクトイオンの組み合わせは m/z 522.4 > 420.4 であることを特定した。LCB や GlcCer の定量分析において、トリヒドロキシ型の分子種はエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) でのイオン化効率が悪く、ジヒドロキシ型より低感度であることが報告されている[66,97,102]。アセチル誘導体化した LCBP におけるマシスペクトルレスポンスを算出するために、d17:1^{4E}-P、t18:0-P を用いて解析した。それぞれ異なるモル量 (5、25、50、100、250 pmol) で定量し、検量線を作成したところ、d17:1^{4E}-P、t18:0-P 間で感度の違いはなかった (Fig. 4C)。これらの結果から、アセチル化 LCBP の同定と定量化は、マシレスポンスファクターな

しで LCBP の相対量の算出に利用することができることが明らかになった。

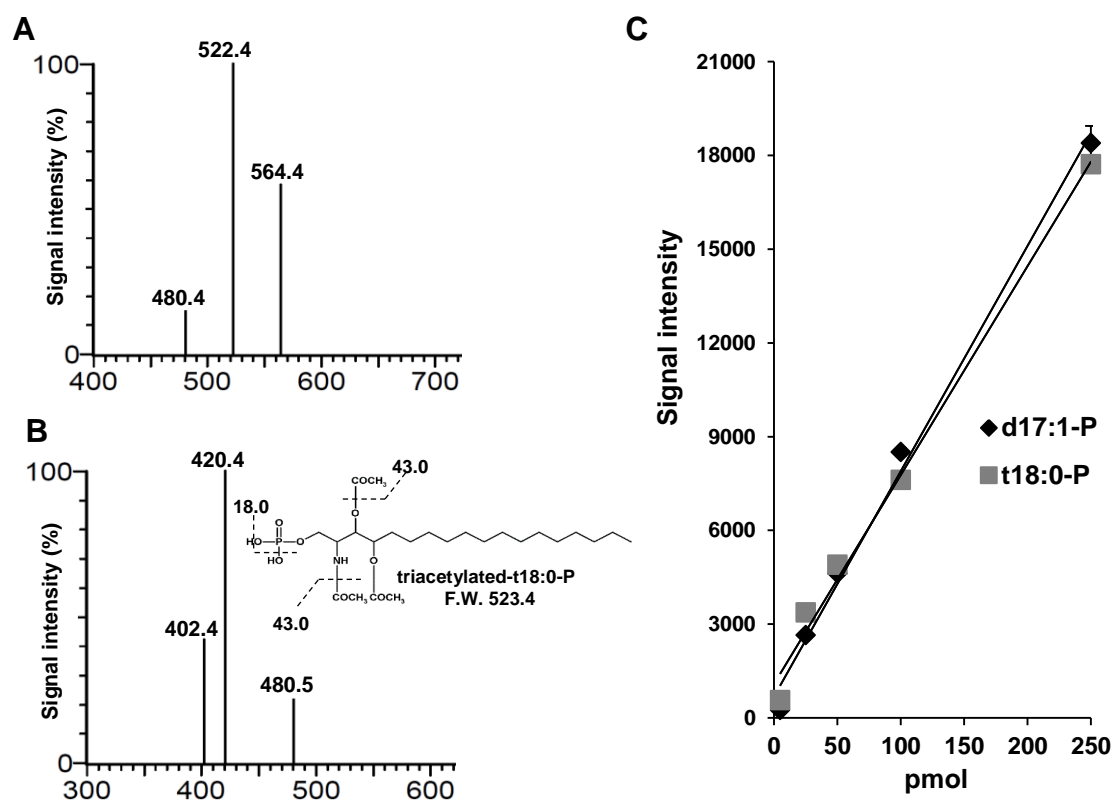


Fig. 4 LCBP の LC-MS/MS 分析

t18:0-P はピリジンと無水酢酸を用いて誘導体化した。アセチル誘導体化した LCBP は LC-MS/MS を用いて分析した。LC によるサンプルの分離は、Prominence UFLCXR system (島津製作所)、分離試料は、ACQUITY TQD mass spectrometer (Waters)によって解析した。

- (A) アセチル誘導体化した t18:0-P のプレカーサーイオン
- (B) アセチル誘導体化した t18:0-P の $m/z = 522.4$ のプロダクトイオン
- (C) アセチル誘導体化した t18:0-P の定量分析 ($n = 3$)

「植物サンプルを用いた LCBP の抽出方法の確立と分子種分析」

植物の内在性の LCBP を分析するために、シロイヌナズナの野生型のロゼット葉（新鮮重量 300 mg）を一般的に総スフィンゴ脂質の抽出方法に使われているイソプロパノール/ヘキサン/水（55:5:16, v/v/v）の混合溶媒で抽出し、アセチル誘導体化したものを LC-MS/MS で分析した。しかしながら、すべての LCBP を検出することができなかった。この原因は、LCBP は両親媒性の構造を有するために、イソプロパノール/ヘキサン/水（55:5:16, v/v/v）の混合溶媒に溶解しにくいことが考えられる。また、LCBP は他のスフィンゴ脂質代謝物に比べてごく微量でしか存在しないことから、大量の植物サンプルを用いて抽出する必要がある。したがって、我々は Merrill らの LCBP の抽出方法を参考にして[101]、メタノール/水（1:1, 0.1% ギ酸）の混合溶媒を用いて新鮮重量 5 g の野生型（WT）のロゼット葉から LCBP を抽出し、アセチル誘導体化したものを LC-MS/MS で分析した。LC-MS/MS 分析したところ、シロイヌナズナの葉において主要な分子種である d18:1-P、d18:0-P、t18:1-P、t18:0-P が同定され、新鮮重量 1 g あたり 0.52~5.12 pmol の範囲で検出された（Fig. 5A）。この抽出方法が他の植物でも適用できるかどうか確認するために、同じアブラナ科植物であるカイワレダイコンのスプラウト（新鮮重量 10 g）を用いて行った。LC-MS/MS で分析すると、シロイヌナズナと同様に d18:1-P、d18:0-P、t18:1-P、t18:0-P の分子種が検出された。新鮮重量 1 g あたりに換算すると、1.36~5.34 pmol の範囲であった（Fig. 5B）。トータル LCBP 量を比較すると、シロイヌナズナの野生型では新鮮重量 1 g あたり、約 8 pmol なのに対し、カイワレダイコンのスプラウトでは新鮮重量 1 g あたり、約 12 pmol であった。これらの結果から、メタノール/水（1:1, 0.1% ギ酸）の混合溶媒により、植物の内在性の LCBP が効率よく抽出されることがわかった。

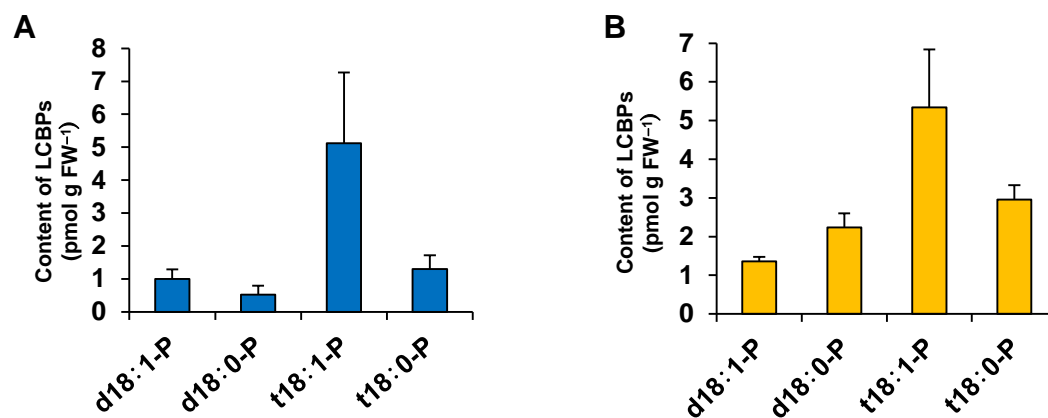


Fig. 5 フモニシン B₁未処理の LCBP 分子種分析

LCBP はピリジンと無水酢酸を用いて誘導体化し、LC-MS/MS を用いて分析した。LC によるサンプルの分離は、Prominence UFLCXR system (島津製作所)、分離試料は、ACQUITY TQD mass spectrometer (Waters)によって解析した。

(A) シロイヌナズナ野生型における LCBP の分子種組成

(B) カイワレダイコンにおける LCBP の分子種組成

<考察>

基本的に、哺乳類における主要な LCB の構造は、 $\Delta 4$ の位置に二重結合をもつスフィンゴシン ($d18:1^{4E}$) というタイプであるが、C-4 の位置にヒドロキシル化された LCB、いわゆるトリヒドロキシ LCB は、表皮、小腸、腎臓のような組織特異的に存在することが知られている[103-105]。植物における主要な LCB の構造はトリヒドロキシ LCB であり、このタイプは GlcCer、GIPC のような複合スフィンゴ脂質に多く存在しており、LCBP でも主要な構成要素である[62]。したがって、LC-MS/MS を用いてトリヒドロキシ LCB を有するスフィンゴ脂質代謝物を分析することは重要である。我々は、本研究で $t18:0-P$ の標品を用いてアセチル誘導体化し、定量する分析手法を確立させた (Fig. 4)。この方法で、植物の内在性の主要な LCBP を同定し、定量することができた (Fig. 5)。ところが、この分析方法ではいくつかの問題がある。 $t18:0-P$ をネガティブフルスキャンモードで分析した結果によると、質量電荷比 522.4 だけでなく、480.4 も検出された (Fig. 4A)。このマスペクトルは、おそらく、LCBP の 2 つ目の水酸基の水素原子がアセチル基に置換されずに生じたものであると考えられる。また、質量電荷比 564.4 も検出されたが、このマスペクトルは同定できていないが、アセチル化するインキュベート時間と温度の条件によってリン酸の水酸基にアセチル化が起こった (オーバーアセチレーション) と予想される。プロダクトスキャンにおいて、プレカーサーイオン $[M-H]^-$ に対するプロダクトイオンの移行は、質量電荷比 422.4 以外にと 402.4 と 480.4 が検出された (Fig. 4B)。402.4 は、 $[M-H-120]^-$ の損失した構造であり、アセチル化したアミドとアルコール経由の $[O-C-CH_2]$ と 2 分子の H_2O から脱離されたものであると予想される。480.4 は $[M-H-42]^-$ であり、アセチル化したアミド経由の $[O-C-CH_2]$ から脱離されたものであると説明できる。このマスペクトルは、アセチル化の条件下で、完全に反応していないために検出されたかもしれない。

植物における LC-MS/MS を用いたスフィンゴ脂質分析において、トリヒドロキシ型の分子種は ESI でのイオン化効率が悪く、ジヒドロキシ型より低感度であることが報告されているが、 $d17:1^{4E}-P$ 、 $t18:0-P$ のスタンダードを用いた分析では、ジヒドロキシ型とトリヒドロキシ型間で特に違いは見られなかった (Fig. 4C)。一方、 FB_1 未処理のロゼット葉 300 mg で LCBP を分析すると、どの分子種においても検出されなかった。LCBP の標品である $d17:1^{4E}-P$ を用いて LC-MS/MS 分析したところ、100 fmol が検出限界であった。要するに、LCBP は生体内で微量でしか存在せず、新鮮重量 300 mg での LCBP 量は、検出限界以下である。しかしながら、 FB_1 未処理の野生型のロゼット葉 5 g では、

夾雑物が多く、アセチル化の効率も低い可能性がある。

一般的に、アセチル化というのは、アルコールとアミンの水素原子をアセチル基に置換する反応であるが、この反応はトリエチルアミン、ピリジンのような塩基性触媒のもとで塩化アセチル、もしくは無水酢酸を用いて行われる。我々は、Berdyshev らと同様にアセチル化試薬として無水酢酸とピリジンを選択した[99]。もし、大量の植物試料から LCBP を抽出してアセチル化する場合、今後 *N,N*-ジメチル-4-アミノピリジン(DMAP)のような求核試薬を用いて誘導体化の効率を向上させる必要があるかもしれない。

LCBP は、様々な細胞内シグナリングに関わるシグナル分子として作用することがわかっている[11,12,106]。しかしながら、LCBP は生体内で微量にしか存在せず、総スフィンゴ脂質のうち約 1000 分の 1 しか存在しないことが予想されている[4]。実際に、植物組織から LCBP を抽出することは非常に難しく、LC-MS/MS で定量するのも難しい。また、LCBP の抽出に特化したアプローチが確立していない。これまでの研究で、ほとんどの植物スフィンゴ脂質の研究者は、植物から総スフィンゴ脂質画分を抽出するために、イソプロパノール/ヘキサン/水の混合溶媒系を利用し、そこからダイレクトに LCBP を MRM のポジティブイオンモードで測定している[15,19,40,94,95]。ところが、この混合溶媒系では、全種類のスフィンゴ脂質を網羅的に抽出することができない。実際に、この溶媒システムで LCBP 抽出して分析したが、検出されなかった。これは、LCBP は両親媒性を有する構造であり、LCB の C_1 部分の水酸基に結合しているリン酸があるために極性が高く、酸性条件下以外のシステムでは溶出しにくいためであると考えられる。

以前の研究で、LCBP の抽出にクロロホルム/メタノール/濃塩酸 (100:200:1, v/v/v) の溶媒を用いて内在性 LCBP の同定と定量が行われたが、結局のところ、クロロホルム/メタノール溶媒系では、抽出効率が悪いことから、スフィンゴ脂質の抽出に適さない[32]。動物における LCBP の研究で、Merrill らによってメタノール/水 (1:1, v/v) の溶媒系を用いた抽出方法が確立されている[101]。LCBP が酸性条件かつ高極性の溶媒で適用できるか確認するために、我々はメタノール/水 (1:1, v/v) で 0.1%ギ酸を含む溶媒系を適用した。この新たな溶媒系を用いて抽出したサンプルを LC-MS/MS で分析したところ、内在性の LCBP を検出することに成功した。また、本研究で開発した LCBP の抽出解析方法を用いて、シロイヌナズナのサンプルだけでなく、カイワレダイコンのサンプルからでもすべての LCBP を検出できたことから、植物体からの LCBP 抽出解析に適した方法の開発も成功した。しかしながら、溶媒の極性が比較的に高いため、水溶性の物質も同時に抽出される。今後、より高純度の LCBP を抽出するためには、オクタデシル

シリル (ODS) 基カラムやイオン交換カラムなどを用いて、LCBP 画分を精製する必要がある。また、今回の分析システムでは、ODS カラム (150×2.0 mm i.d.) を用いて LCBP の分子種を分離して質量分析した。しかしながら、不飽和 LCBP のシス/トランス異性体を分離できなかった。これは、ODS カラム (250×2.0 mm i.d.) を 1 つもしくはタンデムに 2 本つなげたシステムで分析すると分離できる可能性がある[98,102]。今後、モールスケールで分析するために高感度で最適化された分析方法や抽出方法をさらに改良させることがスフィンゴ脂質代謝における LCBP の重要性を理解するための鍵となると予想される。

第二章 スフィンゴイド長鎖塩基 1-リン酸の代謝動態に 及ぼすフモニシン B₁ の影響

序論

スフィンゴ脂質の中間代謝物である LCB、LCBP は、生体内で微量ではあるが、細胞内シグナリングに重要な役割を担う生理活性分子である[11,12,79]。CER シンターゼ阻害剤である FB₁ は、スフィンゴ脂質代謝を抑制することが動物や、植物の研究で知られている[79,107-109]。FB₁ を植物組織に処理すると、LCB が蓄積されるとともに、細胞死が誘導されることがスフィンゴ脂質代謝経路に関わる酵素遺伝子のノックアウトミュータントや形質転換体を用いて明らかになっている[89-92]。しかしながら、この植物の生体内の現象は、LCB が合成される前の段階であり、スフィンゴ脂質代謝のファーストステップである SPT や SPT のネガティブレギュレーターであるオロソムコイド (ORM) 遺伝子に焦点を当てた研究がほとんどである[110]。一方、FB₁ 処理の際は、LCB の蓄積を回避するために、LCBK による LCBP の合成と、DPL、SPP による LCBP の分解というスフィンゴ脂質の異化作用がはたらくと考えられる。最近、*dpl1* のロゼット葉や実生を FB₁ 処理すると、野生型と比較して白色化し、過感受性を示すことがわかっている[32-33]。さらに、*dpl1* は LCB と同時に LCBP も過剰に蓄積することから、LCBP は LCB の蓄積を回避するために合成されたと考えられている[32-33]。したがって、細胞内の LCBP/LCB のバランスが細胞死の運命を司るのではないかと予想されるが、FB₁ 誘導細胞死と LCBP 代謝との関係性については、まだ不明な点が多い。我々は、LCBK1 が FB₁ の感受性と LCBP レベルとの関係を理解するためのカギとなると予想した。そこで本研究では、LCBP 代謝に関わるシロイヌナズナの形質転換体を用いて、FB₁ によって引き起こされる細胞死と、LCB および LCBP の分子種レベルとの関係性を調べた。

＜実験材料と方法＞

1. 使用した植物と生育条件

実験で用いたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型はコロンビア株を用いた。

LCBK1 過剰発現株は、以下のように作製した。まず、野生型のロゼット葉から抽出したゲノム DNA を用いて PCR により *LCBK1* を増幅させた。この PCR 断片を Gateway cloning technology (Thermo Fisher Scientific) を用いて pDONR221 に導入し、エントリークローンを作製した。続いて 35S プロモーター制御下の発現クローンを作製するために、デスティネーションベクターである pFASTG-02 に導入し[111]、コンストラクトを作製した (Fig. 6)。この発現クローンをエレクトロポレーションによってアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*, GV3101 株) に形質転換させ、花序浸し法を用いて野生型に感染させた[112]。感染させた植物によって得られた形質転換種子 (T1) は、蛍光実体顕微鏡 (M165FC, LEICA) を用いて選別し、最終的に T3 種子 (ホモザイガス系統) を得た (Fig. 7)。 *LCBK1* ノックダウン変異株は、人工的な miRNA を用いた遺伝子サイレンシング法 (WMD3-Web MicroRNA Designer) を用いて *LCBK1* 特異的な microRNA をデザインした[113-114]。 *LCBK1* 特異的な人工 miRNA 前駆体を pRS300 を用いて作製し、この PCR 断片を過剰発現株と同様に pDONR221 を用いてエントリークローンに導入した (Fig. 6)。 pFAST-G02 に導入して発現クローンを作製した後、アグロバクテリウムに形質転換させ、花序浸し法により、野生型に感染させて最終的に T3 種子 (ホモザイガス系統) を得た (Fig. 7)。

実験で用いたシロイヌナズナ野生型、過剰発現株、抑制株は、土壌もしくはムラシゲススクグ (MS) 寒天培地で生育させ、22°C、長日条件 (16 時間明期 (4000~5000 ルックス) / 8 時間暗期) に設定したインキュベーター (MIR-553, SANYO)、もしくは恒温室で生育させた。

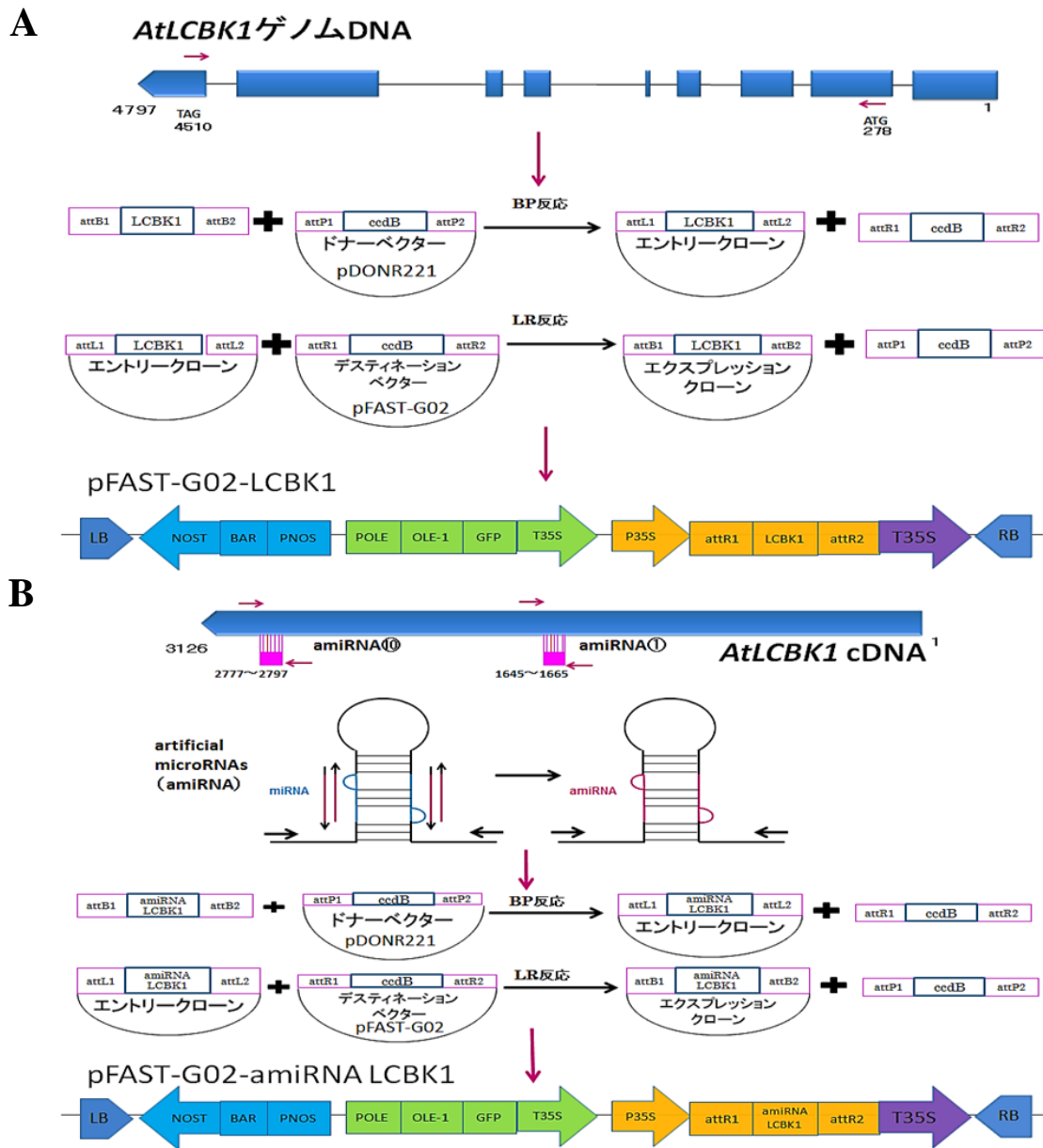


Fig. 6 *AtLCBK1* 形質転換体の作製

LCBK1 の形質転換体を作製するために、Gateway 法を用いてクローニングした。

(A) *AtLCBK1* 過剰発現株用コンストラクトの作製

過剰発現用コンストラクトはゲノム DNA をテンプレートにして *LCBK1* の ORF を増幅し、デスティネーションベクター (pFAST-G02) を用いてコンストラクトを作製した。

(B) *AtLCBK1* 抑制株用コンストラクトの作製

抑制用コンストラクトは WMD3 による amiRNA 法を用いて *LCBK1* 特異的な 20 塩基の配列を増幅し、最終的にデスティネーションベクター (pFAST-G02) を用いてコンストラクトを作製した。

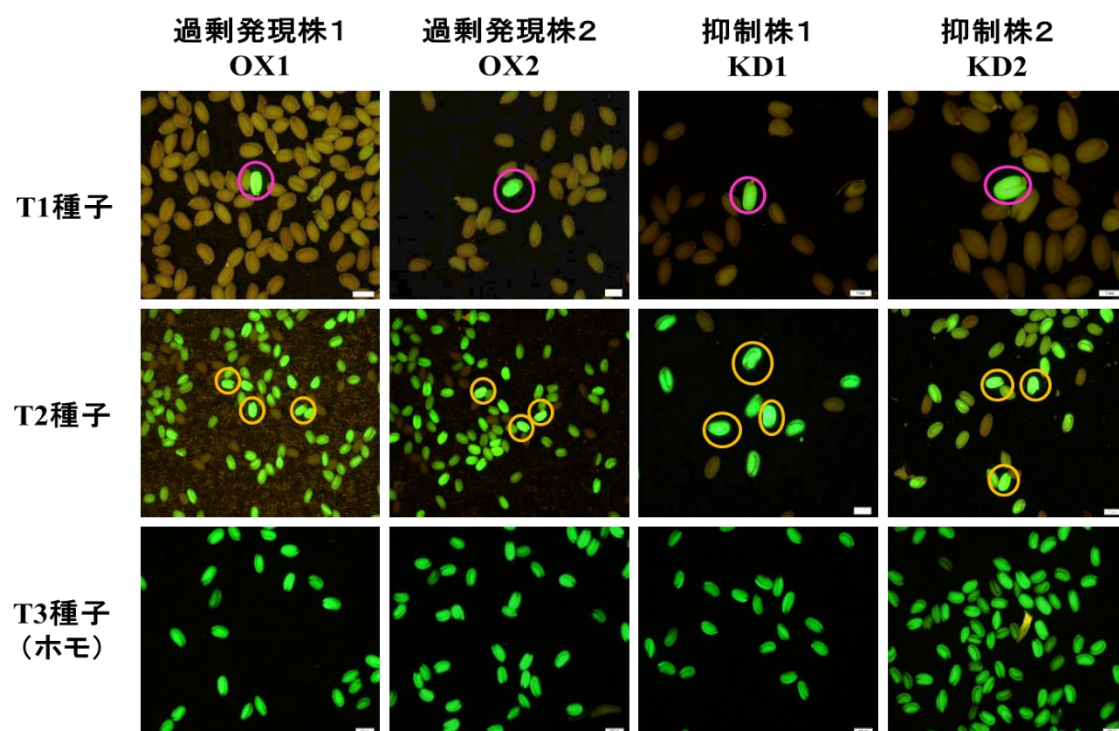


Fig. 7 AtLCBK1 形質転換種子の選別

形質転換種子を蛍光実体顕微鏡（GFP 観察用蛍光フィルターを使用）で観察した。紫色で囲んだ種子は形質転換した T1 種子、橙色で囲んだ種子はホモと考えられる種子を示している。

2. 使用した試薬

有機溶媒および試薬は、和光純薬工業の HPLC、もしくは特級グレードのものを使用した。

33% メチルアミン溶液はシグマアルドリッチから購入した。FB₁ は和光純薬工業から購入した。NBD-F、トリパンプルーは同仁化学から購入した。C₁₇-スフィンゲニン (d17:1^{4E}) は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) から購入した。

3. 実験で用いたプライマー

LCBK1 を含んだコンストラクトを作製するのに用いたプライマーと *LCBK1* の発現量を確認するために用いたプライマーを下記の Table 3 にリストアップした。

Table 3 LCBK1 の mRNA 量を解析するために使用したプライマー

Primer name	sequence
attB1-AtLCBK1-F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGCAGAAGAGTGGTGTAA-3'
attB2-AtLCBK1-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTATGAATGTCGTCCAGGAG-3'
attB1-amiRNA-A	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC-3'
attB2-amiRNA-B	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAG-3'
amiRNA forward1-1-AtLCBK1	5'-GATTAACATATGAATGTCGTCCATTCTCTCTTTTGTATTCC-3'
amiRNA forward2-1-AtLCBK1	5'-GAATGGACGACATTCATAGTTAATCAAAGAGAATCAATGA-3'
amiRNA forward3-1-AtLCBK1	5'-GAATAGACGACATTCTTAGTTATTACAGGTCGTGATATG-3'
amiRNA forward4-1-AtLCBK1	5'-GAATAACTAAGAATGTCGTCTATTCTACATATATATTCCT-3'
amiRNA forward1-10-AtLCBK1	5'-GATATAATACCGGTATGACTCCATCTCTCTTTTGTATTCC-3'
amiRNA forward2-10-AtLCBK1	5'-GATGGAGTCATACCGGTATTATATCAAAGAGAATCAATGA-3'
amiRNA forward3-10-AtLCBK1	5'-GATGAAGTCATACCGCTATTATTTCACAGGTCGTGATATG-3'
amiRNA forward4-10-AtLCBK1	5'-GAAATAATAGCGGTATGACTTCATCTACATATATATTCCT-3'
AtLCBK1-525-U	5'-TGTATCTGATCCAGGTCCAA-3'
AtLCBK1-ORF-L	5'-CTATGAATGTCGTCCAGGAG-3'
At-Act2-F	5'-AGAGATTCAGATGCCAGAAGTCTT-3'
At-Act2-R	5'-AACGATTCCTGGACCTGCCTC-3'
Real-Time EF-1-alfa-F	5'-TCGCGTGTTATAGCTTCGTTTC-3'
Real-Time EF-1-alfa -R	5'-CGCCACCTCCGATCAAGA-3'
Real-Time AtLCBK1-F	5'-TGCATTGCATGGAGAAGTGATAT-3'
Real-Time AtLCBK1-R	5'-ATGTCGTCCAGGAGCGTTACC-3'
Real-Time AtSPP-F	5'-CGGAGTGCAGCAAACGTACA-3'
Real-Time AtSPP-R	5'-AGGGAGCTCTGGTGAGAAGATTTC-3'
Real-Time AtDPL-F	5'-TTACTCTTCAACACGTCCCTGTA-3'
Real-Time AtDPL-R	5'-GTGATCGGTCCTGGGTTTGC-3'

4. *AtLCBK1* 形質転換体における遺伝子発現量の解析

4-1. トータル RNA 抽出

LCBK1 形質転換体の LCBP 関連遺伝子の発現量を確認するために、RNA Spin Mini RNA isolation Kit (GE healthcare) を用いてロゼット葉からトータル RNA を抽出した。

ロゼット葉 1 枚を 2 ml のマイクロチューブに移し、ジルコニアビーズを 2 個入れてふたを閉めた後、液体窒素で凍らせた。ボルテックス (TM-250, IWAKI) で破碎し、液体窒素で再び凍らせ、細くなるまで繰り返した (計 5 回)。RA1 溶液 (メルカプトエタノール添加済み) を 353.5 μ l 加え、ボルテックス (TM-250, IWAKI) した後、マイクロ遠心機 (KUBOTA 3400) で 20000 \times g、5 分、室温で遠心した。新しい 1.5 ml マイクロチューブに上清を移し、70%エタノールを 350 μ l 加え、10 秒 \times 2 回ボルテックス (TM-250, IWAKI) してスピンドウンした。コレクションチューブと SV ミニカラム (promega) を組み立てた後、ライセートをカラムに入れてマイクロ遠心機 (KUBOTA 3400) で 14000 \times g、30 秒、室温で遠心した。カラムを新しいコレクションチューブに移した後、350 μ l の MDB 溶液を加え、マイクロ遠心機 (KUBOTA 3400) で 14000 \times g、1 分、室温で遠心した。フロースルーを捨て、再びカラムとコレクションチューブをセットした後、95 μ l の DNase 溶液 (DNase I 9.5 μ l、DNase 反応バッファー 85.5 μ l) を加え、室温で 30 分インキュベートした。RA2 溶液を 200 μ l 加え、マイクロ遠心機 (KUBOTA 3400) で 14000 \times g、1 分、室温で遠心し、フロースルーを廃棄した。カラムに新しいコレクションチューブをセットした後、RA3 溶液を 600 μ l 加え、マイクロ遠心機 (KUBOTA 3400) で 14000 \times g、1 分、室温で遠心した。フロースルーを捨て再びカラムとコレクションチューブをセットした後、250 μ l の RA3 溶液を加え、マイクロ遠心機 (KUBOTA 3400) で 14000 \times g、2 分、室温で遠心した。カラムを 1.5 ml マイクロチューブにセットし、滅菌水を 50 μ l 加え、マイクロ遠心機 (KUBOTA 3400) で 14000 \times g、1 分、室温で遠心した。カラムを捨て、抽出したトータル RNA をナノドロップ 2000 (Thermo Scientific) で定量した後、N₂ ガスで溶液を還元し、-80°C で保存した。

4-2. RT-PCR 法による cDNA 合成

抽出したトータル RNA を逆転写酵素を用いて cDNA 合成した。

RNA Spin Mini RNA 単離キット (GE healthcare) で抽出したトータル RNA を 1 μg になるように調製し、8 μl を PCR チューブに加えた。PCR チューブに Oligo (dT)₁₂₋₁₈ プライマー (Invitrogen) を 1 μl 、dNTP Mix (TaKaRa) を 4 μl 加え、65°C で 5 分インキュベートし、氷上で 1 分間インキュベートした。5×First strand バッファー (Invitrogen) を 4 μl 、0.1 M DTT (Invitrogen) を 2 μl 加えてスピンドウンした後、M-MLV 逆転写酵素 (Invitrogen) を 1 μl 加え、サンプルを PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を用いて 37°C で 50 分、70°C で 15 分間処理した。サンプルを室温でインキュベートした後、RNaseH 溶液を 1 μl 加え、スピンドウンし、サンプルを PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を用いて 37°C で 30 分処理した後、ナノドロップ 2000 (Thermo Scientific) で定量し、-20°C で保存した。

RT-PCR 反応液組成 (1 本分)

Total RNA	8 μl
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primer	1 μl
dNTP Mix	4 μl
5×First strand buffer	4 μl
0.1 M DTT	2 μl
M-MLV RT (200V/ μl)	2 μl
<hr/>	
Total	20 μl

RNaseH 溶液 (1 本分)

RNaseH	0.2 μl
D.W.	0.8 μl
<hr/>	
Total	1 μl

4－3．電気泳動法による mRNA 量の発現解析

調製した cDNA をテンプレートとして PCR し、*Act2* 発現量を確認した。

PCR 反応液組成 (5 本)		PCR 反応条件	
10×Ex Taq buffer	10 µl	94℃	3 分
dNTP	8 µl	94℃	30 秒
AtACT2-F	2 µl	55℃	30 秒
AtACT2-R	2 µl	72℃	1 分
Ex Taq	0.5 µl	72℃	3 分
滅菌水	72.5 µl	4℃	∞
Total		95 µl	
↓ 19 µl ずつ分注		<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">}</div> <div>25cycles</div> </div>	

cDNA 1 µl×5 本 total 20 µl

※10×Ex taq buffer 、2.5 mM dNTP Mix、Ex taq はタカラバイオ社の製品、プライマーは invitrogen で受託合成したものを用いた

サンプル 2 µl、滅菌水 8 µl、10×Dye1 µl を混ぜて、1%アガロースゲル溶液で電気泳動した

1%アガロースゲル溶液 16 ml 組成

Agarose L03 (TaKaRa)	0.16 g
0.5×TBE	16 ml
Gel Red Nucleic Acid Gel Stain 10000×in H ₂ O (Biotium)	1.6 µl

5×TBE 組成 (500 ml)

Tris	27 g
ホウ酸	13.75 g
0.5 M EDTA	10 ml
Up to MilliQ	500 ml

Act2 のバンド確認後、cDNA をテンプレートとして *LCBK1* の発現量を確認した

PCR 反応液組成 (5 本)

PCR 反応条件

10×Ex Taq buffer	10 μl	94℃	3 分	} 25cycles
dNTP	8 μl	94℃	30 秒	
AtLCBK1-525-U	2 μl	55℃	30 秒	
AtLCBK1-ORF-L	2 μl	72℃	1 分	
Ex Taq	0.5 μl	72℃	3 分	
滅菌水	72.5 μl	4℃	∞	
Total 95 μl				
↓				
19 μl ずつ分注				
cDNA	1 μl×5 本	total 20 μl		

※10×Ex taq buffer 、2.5 mM dNTP Mix、Ex taq はタカラバイオ社の製品、プライマーは invitrogen で受託合成したものを用いた

サンプル 3 µl、滅菌水 7 µl、10×Dye1 µl を混ぜて、1%アガロースゲル溶液で電気泳動した

1%アガロースゲル溶液 16 ml 組成

Agarose L03 (TaKaRa)	0.16 g
0.5×TBE	16 ml
Gel Red Nucleic Acid Gel Stain 10000×in H ₂ O (Biotium)	1.6 µl

4-4. RT-qPCR 法による LCBP 関連遺伝子の発現解析

LCBK1 の mRNA 発現量を数値化するために、Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (TaKaRa) を用いて *LCBK1* の過剰発現株、抑制株を野生型と比較して定量を行った。qPCR の試薬は、SYBR Premix Ex taq II (TaKaRa) を用いた。

mRNA 発現量を異なるサンプル間で比較するために、ハウスキーピング遺伝子として *EF-1 α* 遺伝子を用いて相対定量を行った。相対定量を行うために、目的遺伝子とハウスキーピング遺伝子のそれぞれについて 5 段階濃度のスタンダード (野生型) を用いて検量線を作成した。具体的に、合成した cDNA の原液を 1 として、0.5、0.2、0.1、0.05 と段階希釈した。

検量線サンプル (5 本)

	1 段階上からとったサンプル量	滅菌水	トータル
1 (原液)			
0.5	2.5 μ l	2.5 μ l	5 μ l
0.2	2.0 μ l	3.0 μ l	5 μ l
0.1	2.5 μ l	2.5 μ l	5 μ l
0.05	2.5 μ l	2.5 μ l	5 μ l

野生型、過剰発現株、抑制株の RNA サンプルは合成した cDNA (原液) から 2 倍希釈したものをテンプレートとして用いた。

<EF1 α >

qPCR 反応液組成 (15 本)

SYBR Premix Ex taq II	150 μ l
Real-Time EF-1-Alfa-F	15 μ l
Real-Time EF-1-Alfa-R	15 μ l
滅菌水	105 μ l
<hr/>	
Total	285 μ l

↓

19 μ l ずつ分注

↓

各 cDNA サンプルを 1 μ l ずつ加えた total 20 μ l

qPCR 反応条件

95°C	30 秒	} 40 cycles
95°C	5 秒	
60°C	30 秒	
95°C	15 秒	} Dissociation
60°C	30 秒	
95°C	15 秒	

<LCBK1>

qPCR 反応液組成 (15 本)

SYBR Premix Ex taq II	150 μ l
Real-Time EF-1-Alfa-F	15 μ l
Real-Time EF-1-Alfa-R	15 μ l
滅菌水	105 μ l
<hr/>	
Total	285 μ l

↓

19 μ l ずつ分注

↓

各 cDNA サンプルを 1 μ l ずつ加えた total 20 μ l

qPCR 反応条件

95°C	30 秒	} 40 cycles
95°C	5 秒	
60°C	30 秒	
95°C	15 秒	} Dissociation
60°C	30 秒	
95°C	15 秒	

<SPPI>

qPCR 反応液組成 (15 本)

SYBR Premix Ex taq II	150 μ l
Real-Time EF-1-Alfa-F	15 μ l
Real-Time EF-1-Alfa-R	15 μ l
滅菌水	105 μ l
<hr/>	
Total	285 μ l

↓

19 μ l ずつ分注

↓

各 cDNA サンプルを 1 μ l ずつ加えた total 20 μ l

qPCR 反応条件

95°C	30 秒	} 40 cycles
95°C	5 秒	
60°C	30 秒	
95°C	15 秒	} Dissociation
60°C	30 秒	
95°C	15 秒	

<DPL1>

qPCR 反応液組成 (15 本)

SYBR Premix Ex taq II	150 µl
Real-Time EF-1-Alfa-F	15 µl
Real-Time EF-1-Alfa-R	15 µl
滅菌水	105 µl
<hr/>	
Total	285 µl

↓

19 µl ずつ分注

↓

各 cDNA サンプルを 1 µl ずつ加えた total 20 µl

qPCR 反応条件

95°C	30 秒	} 40 cycles
95°C	5 秒	
60°C	30 秒	
95°C	15 秒	} Dissociation
60°C	30 秒	
95°C	15 秒	

<SPHK1>

qPCR 反応液組成 (15 本)

SYBR Premix Ex taq II	150 µl
Real-Time EF-1-Alfa-F	15 µl
Real-Time EF-1-Alfa-R	15 µl
滅菌水	105 µl
<hr/>	
Total	285 µl

↓

19 µl ずつ分注

↓

各 cDNA サンプルを 1 µl ずつ加えた total 20 µl

qPCR 反応条件

95°C	30 秒	} 40 cycles
95°C	5 秒	
60°C	30 秒	
95°C	15 秒	} Dissociation
60°C	30 秒	
95°C	15 秒	

5. 表現型の解析

5-1. FB₁ 処理と導電率の測定

FB₁ 処理した時の LCBK1 形質転換植物のロゼット葉におけるイオン漏出量を調べるために、ロゼット葉 2 枚を FB₁ 溶液 (10 μ M) 10 ml を試験管に入れ、24、48、72 時間後のイオン漏出量を、導電率メーター (ES-14, HORIBA) を用いて測定した。

FB₁ 溶液 50 ml の場合

MilliQ	50 ml
10 mM FB ₁ ストック溶液 (10 μ M)	50 μ l

5-2. トリパンブルー染色

トリパンブルー染色方法は、Rate、Koch らのグループの手順に従って行った[115-116]。FB₁ 処理した葉において細胞死の判定をするために、FB₁ 処理 48、72 時間の LCBK1 形質転換植物のロゼット葉を用いてトリパンブルー染色した。FB₁ 溶液で処理したロゼット葉を MilliQ で洗浄した後、1.5 ml マイクロチューブに移し、トリパンブルー溶液を 1 ml 加え、100°C で 5 分間ボイルした。室温で一晩おいた後、トリパンブルー溶液を捨て、抱水クロラール溶液 (100 ml の MilliQ に対して 250 g の抱水クロラール) を 1 ml 加えて、振とう台 (SHM-100, IWAKI) を用いて脱色した。青色が薄くなるまで、この操作を繰り返した。脱色後、ロゼット葉をガラスシャーレに移し、実体顕微鏡 (SZX16-3131, OLYMPUS) で観察した。

トリパンブルー溶液 (ロゼット葉 4 枚あたり)

フェノール	1 g
グリセロール	1 ml
乳酸	1 ml
トリパンブルー	1 ml
MilliQ	1 mg

5-3. FB₁ を添加した MS 培地を用いた植物体と根の解析

FB₁ を含む MS 培地に野生型、LCBK1 形質転換株の種子を播種するために、種子の滅菌を行った。種子を 1.5 ml マイクロチューブに入れた後、70%エタノールを 1 ml 加え、1 分間チューブを上下撹拌して洗浄した。マイクロ遠心機で 5 秒遠心した後、上清を取り除き、5%滅菌液（キッチンブリーチを薄めたもの）を 1 ml 加えて 15 分間チューブを上下撹拌して洗浄した。マイクロ遠心機で 5 秒遠心した後、上清を取り除き、1 ml の MilliQ を加えて 1 分間チューブを上下撹拌して洗浄した。マイクロ遠心機で 5 秒遠心した後、上清を取り除いた。1 ml の MilliQ で洗浄して上清を取り除く操作を 4 回繰り返した。種子を MS 培地（2.3 mg ml⁻¹ MS 塩、1% (w/v) スクロース、3 µg ml⁻¹ チアミン塩酸塩、5 µg ml⁻¹ ニコチン酸、0.5 µg ml⁻¹ ピリドキシン塩酸塩、0.2% (w/v) ゲランガム）に 0.3 µM、0.5 µM の FB₁ を含むプレートに播種し、4°C で 2 日間インキュベートした。4°C で処理した後、22°C、長日条件（16 時間明期（4000~5000 ルックス）／8 時間暗期）に設定した恒温室で生育させた。植物体の観察は、22°C の長日条件で生育してから 18 日経過した植物体を実体顕微鏡（SZX16-3131, OLYMPUS）またはデジタルカメラ（CASIO）で観察した。根の観察は、22°C の長日条件で生育してから 7、14 日目の根を実体顕微鏡（SZX16-3131, OLYMPUS）またはデジタルカメラ（CASIO）で観察し、根の伸長を測定した。

MS 培地 組成 250 ml 角 2 号シャーレ 5 枚分

2×MS ストック溶液	(0.5×)	62.5 ml
1000×ビタミンストック溶液	(1×)	250 µl
スクロース	(1%)	2.5 g
1N KOH で pH 5.8 に調製		
Up to MilliQ		250 ml
ゲランガム	(0.2%)	0.5 g

1000×ビタミンストック溶液 100 ml

チアミン塩酸塩	300 mg
ニコチン酸	500 mg
ピリドキシン塩酸塩	50 mg
Up to MilliQ	100 ml

5-4. FB₁ 処理サンプルの調整

FB₁ 処理した時の LCBK1 形質転換植物における LCB、LCBP の含有量を調べるために、FB₁ 溶液 (10 μ M) 10 ml にロゼット葉 300 mg を浸し、22°C、長日条件 (16 時間明期 (4000~5000 ルックス) / 8 時間暗期) でインキュベートした。インキュベート後、48 時間経ったロゼット葉を MilliQ で洗浄し、3 ml のイソプロパノールが入った 15 ml ネジ付き試験管に移し、80°C のウォーターバスで 10 分間インキュベートした。インキュベート後、直ちに氷冷し、-20°C で保存した。このサンプルを用いて LCB あるいは LCBP の抽出を行った。

10 μ M FB₁ 溶液 10 ml

10 mM FB₁ ストック溶液 10 μ l

MilliQ 10 ml

6. スフィンゴ脂質分析

スフィンゴ脂質の分析を行うために、野生型、過剰発現株、抑制株の FB₁ 処理、もしくは未処理のロゼット葉 300 mg を用いて実験を行った。

6-1. 総スフィンゴ脂質の抽出

総スフィンゴ脂質の抽出は、Markham らの方法を改変して行った[66]。15 ml のネジ付き試験管 (TST SCR 16-100, IWAKI) に 2-プロパノールを 3 ml 加え、80°C のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で予熱した後、電子天秤で新鮮重量 300 mg のロゼット葉を測定し、2-プロパノールが入った 15 ml のネジ付き試験管 (TST SCR 16-100, IWAKI) に入れ、80°C のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 10 分間インキュベートした。直ちに氷冷した後、ヘキサン 250 μ l、MilliQ 600 μ l、10 μ M d17:1^{4E} 溶液 (内部標準) を 10 μ l を加えてヒスコトロン (日音医理科器械製作所、ジェネレータシャフトは NS-10 を使用した) で破碎した後、60°C のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 10 分インキュベートし、冷却遠心機 (KUBOTA 2700) で 1500 \times g、10 分、室温で遠心した。上清をパスツールピペット (IK-PAS-5P, IWAKI) で新しい 15 ml のネジ付き試験管 (TST SCR 16-100, IWAKI) に回収し、残りのペレットに 2-プロパノール/ヘキサン/水 (55 : 5 : 16) を 3 ml 加えてボルテックス (TM-250, IWAKI) した後、60°C のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 10 分インキュベートし、冷却遠心機 (KUBOTA 2700) で 1500 \times g、10 分、室温で遠心した。上清を再び 15 ml のネジ付き試験管 (TST SCR 16-100, IWAKI) に回収した後、ペレットに 2-プロパノール/ヘキサン/水=55:5:16 を 3 ml 加えてボルテックス (TM-250, IWAKI) した後、60°C のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 10 分インキュベートし、冷却遠心機 (KUBOTA 2700) で 1500 \times g、10 分、室温で遠心した。上清を 15 ml のネジ付き試験管 (TST SCR 16-100, IWAKI) に回収した後、50 ml のナス型フラスコ (82-0723, IWAKI) に移し、ロータリーエバポレーター (N-1, EYELA,) で濃縮乾固した。ナス型フラスコ (82-0723, IWAKI) に 2-プロパノール/ヘキサン/水=55 : 5 : 16 を 1 ml 加え、ソニケーションして溶解させた後、15 ml のネジ付き試験管 (TST SCR 16-100, IWAKI) に回収し、50°C のヒートブロック (Type 17600, Thermolyne) で温めながら窒素ガスで乾固させた。33% メチルアミンを 1 ml 加え、ボルテックス (TM-250, IWAKI)、ソニケーションし、50°C のヒートブロック (Type 17600, Thermolyne) で 1 時間弱アルカリ処理し

た。窒素ガスで乾固した後、テトラヒドロフラン/メタノール/水=2 : 1 : 2 (0.1% ギ酸) を 1 ml 加え、-20℃で保存した。

6-2. LCB 画分の抽出

6-1の方法で抽出したサンプルを 60℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 3 分間インキュベートし、ボルテックス (TM-250, IWAKI)、ソニケーションした後、再び 60℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 3 分間インキュベートし、直ちに 1.5 ml マイクロチューブに移した。50℃のヒートブロック (Type17600, Thermolyne) で温めながら窒素ガスで乾固した後、ヘキサンを 200 μ l、メタノール/水=1 : 1 を 300 μ l 加え、ボルテックス (TM-250, IWAKI) し、マイクロ遠心機 (KUBOTA3400) で 20000 \times g、2 分、室温で遠心した。上層を取り除いた後、ヘキサンを 200 μ l 加えてボルテックス (TM-250, IWAKI) し、マイクロ遠心機 (KUBOTA3400) で 20000 \times g、2 分、室温で遠心し、上層を取り除いた。残りの下層にクロロホルム 300 μ l、25%アンモニア水 22.5 μ l 加えてボルテックス (TM-250, IWAKI) し、マイクロ遠心機 (KUBOTA3400) で 20000 \times g、3 分、室温で遠心した。下層を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移し、-20℃で保存した。

6-3. LCB の誘導体化

6-2の方法で抽出した LCB 画分のサンプルを 50℃のヒートブロック (Type 17600, Thermolyne) で温めながら窒素ガスで乾固させ、100%メタノールを 50 μ l 加えて、ボルテックス (TM-250, IWAKI)、ソニケーションした。0.1 M ホウ酸バッファーを 10 μ l、NBD-F (1 mg/ml) を 40 μ l を加えてボルテックス (TM-250, IWAKI) し、60℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 20 分インキュベートした。直ちに 10%ギ酸を 10 μ l 加えて 5 分間氷冷し、マイクロ遠心機 (KUBOTA3400) で 20000 \times g、1 分、室温で遠心した。上清をガラスバイアル (GLCTV-801, 島津ジーエルシー) に移し、LC-MS/MS で分析した。

6-4. LC-MS/MS の条件

LC-MS/MS の条件 LCB の場合

高速液体クロマトグラフ質量分析装置

DEGASSER (PGU-20A₅, 島津)

LIQUID CHROMATOGRAPH (LC-20ADXR, LC-20AT, 島津)

AUTO SAMPLER (SIL-20A CXR, 島津)

COLUMN OVEN (CTO-10A, 島津)

Tandem quadrupole mass spectrometer (ACQUITY[®]TQD, waters)

(高速液体クロマトグラフィー)

使用したカラム 150 mm×2.0 mm id, 3 μm TSKgel ODS-100Z column (TOSOH)

カラムの温度 40°C

溶媒 A 水/ギ酸 (1000:1 v/v)

溶媒 B メタノール/アセトニトリル (3:2 v/v)

流速 0.2 ml/min

LCBP を分離するためのグラジエント条件のパラメーターは、Table 4 に示した。

(タンデム四重極型質量分析条件)

Experiment file LCB-NBD-F-7.exp

イオンモード MRM [M-H]⁻ 5 チャンネル ES⁻
Span 0.6

ES⁻Source

Voltages Capillary (kV) 3.00

Cone (V) 40

Extractor (V) 2

Temperatures Source Temp (°C) 120

Desolvation Temp (°C) 350

分析時間 1~20 分

LCB のプレカーサーイオンとプロダクトイオンの MS スペクトルのパラメーター (Table 5) と溶媒のグラジエント条件は、石川らの方法に従って行った[97]。

Table 4 LCB 分子種を分離するための HPLC のグラジエント条件

Solvent A (%)	Solvent B (%)	Gradient time (min)
30	70	0
15	85	2
10	90	10
0	100	16
70	30	17

LCB 溶出後、次のサンプルを分析する前に、溶媒 A 30%、溶媒 B 70%のグラジエント条件で 3 分間カラムを平衡化した（トータル 20 分）

Table 5 NBD-LCB 分子種を MRM で検出するためのマススペクトルパラメーター

LCB molecular species	Precursor ion [M-H] ⁻ (m/z)	Product ion (m/z)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (V)	Note
d17:1	447.3	193	25	20	Ishikawa et al., 2014
d18:1	461.3	193	25	20	Ishikawa et al., 2014
d18:0	463.3	193	25	20	Ishikawa et al., 2014
t18:1	477.3	193	25	22	Ishikawa et al., 2014
t18:0	479.3	193	25	22	Ishikawa et al., 2014

6-5. LC-MS/MS を用いた LCB の定量解析

分析後、検出されたピーク面積を MSLine ver. 4.1 (waters) のソフトウェアで算出して、内部標準法 (d17:1^{4E} を使用した) により LCB の分子種組成の定量を行った。

6-6. FB₁ 処理サンプルからの LCBP 画分の抽出

LCBP の抽出は、Merrill らの方法を参考にして行った[101]。15 ml のネジ付き試験管 (TST SCR 16-100, IWAKI) に 2-プロパノールを 3 ml 加え、80℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で予熱した後、電子天秤で新鮮重量 300 mg のロゼット葉を測定し、2-プロパノールが入った 15 ml のネジ付き試験管 (TST SCR 16-100, IWAKI) に入れ、80℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 10 分間インキュベートした。直ちに氷冷した後、メタノール/水=1:1 を 1 ml、2.5 μM d17:1^{4E}-P (内部標準) を 50 μl 加え、ヒスコトロン (日音医理科器械製作所、ジェネレータシャフトは NS-10 を使用した) で破碎した後、60℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 10 分インキュベートし、冷却遠心機 (KUBOTA 2700) で 1500 × g、10 分、室温で遠心した。上清をパスツールピペット (IK-PAS-5P, IWAKI) で新しい 15 ml のネジ付き試験管 (TST SCR 16-100, IWAKI) に回収し、残りのペレットにメタノール/水=1:1 を 3 ml 加えてボルテックス (TM-250, IWAKI) した後、60℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 10 分インキュベートし、冷却遠心機 (KUBOTA 2700) で 1500 × g、10 分、室温で遠心した。上清を再び 15 ml のネジ付き試験管 (TST SCR 16-100, IWAKI) に回収した後、ペレットにメタノール/水=1:1 を 3 ml 加えてボルテックス (TM-250, IWAKI) した後、60℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 10 分インキュベートし、冷却遠心機 (KUBOTA 2700) で 1500 × g、10 分、室温で遠心した。上清を 15 ml のネジ付き試験管 (TST SCR 16-100, IWAKI) に回収した後、50 ml のナス型フラスコ (82-0723, IWAKI) に移し、ロータリーエバポレーター (N-1, EYELA) で濃縮乾固した。ナス型フラスコ (82-0723, IWAKI) にクロロホルム/メタノール/塩酸=100:200:1 を 2 ml 加え、ソニケーションして溶解させた後、15 ml のネジ付き試験管 (TST SCR 16-100, IWAKI) に回収し、50℃のヒートブロック (Type 17600, Thermolyne) で温めながら窒素ガスで乾固させた。メタノール/水=1:1 を 1 ml 加え、ボルテックス (TM-250, IWAKI)、ソニケーションし、-20℃で保存した。

6-7. FB₁ 処理サンプルから抽出した LCBP のアセチル化

6-6の方法で抽出したサンプルを、60℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で3分インキュベートし、1.5 ml マイクロチューブに移し、マイクロ遠心機 (KUBOTA 3400) で 20000 × g、3 分、室温で遠心した。上清を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移し、50℃のヒートブロック (Type 17600, Thermolyne) で温めながら窒素ガスで乾固した。ピリジン 50 μl、無水酢酸 25 μl 加え、40℃のウォーターバス (SB-1000, EYELA) で 20 分インキュベートした。遠心エバポレーター (CVE-1001, EYELA) で遠心濃縮した後、メタノール/水=1:1 を 50 μl 加え、ボルテックス (TM-250, IWAKI)、ソニケーションした後、マイクロ遠心機 (KUBOTA 3400) で 20000 × g、1 分、室温で遠心した。上清をガラスバイアル (GLCTV-801, 島津ジーエルシー) に移し、LC-MS/MS で分析した。LC-MS/MS の分析条件と定量方法は、第一章で示した通りである。

<結果>

「AtLCBK1 形質転換植物を用いた LCBP 代謝関連酵素遺伝子の発現とフモニシン B₁ によって引き起こされる細胞死の表現型との相関性」

植物における LCB キナーゼの機能を調べるために、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (CaMV35S) 制御下で作製した過剰発現株 (LCBK1-OX1, LCBK1-OX2) と抑制株 (LCBK1-KD1, LCBK1-KD2) を用いた。抑制株の作製は、人工的な miRNA を用いた遺伝子サイレンシング法で作製した (Fig. 6)。まず、LCBK1 の mRNA の発現量を確認するために、リアルタイム PCR を行った。その結果、LCBK1-OX1 では野生型と比較して LCBK1 の mRNA の発現量が 3 倍増加し、LCBK1-OX2 は 8 倍増加した (Fig. 8)。一方、LCBK1 の mRNA の発現量は、LCBK1-KD1 では 75%減少し、LCBK1-KD2 では 90%減少した (Fig. 8)。これらの結果から、*LCBK1* を過剰発現、抑制された形質転換植物であることを確認した。これらの形質転換植物を用いて、長日条件 (16 時間明期 ($100 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) / 8 時間暗期) で約 3 週間経った植物体の表現型を観察したところ、野生型と比較して特に明白な違いは見られなかった (Fig. 9)。次に、LCBP の分解に関わる酵素遺伝子の mRNA の発現量を調べた。*SPP1* の発現量にはあまり変化が見られなかったが、*DPL1* の発現量は、過剰発現株では増加し、抑制株では減少していた (Fig. 8)。これらの結果から、LCBK1 の発現量に伴い、LCBP の蓄積を回避するために、LCBP の分解系の酵素遺伝子の発現量を調節されていることが示唆された。このことから、LCBP の蓄積が回避されていることが予想される。

LCBP 代謝における FB₁ の影響を解明するために、シロイヌナズナの LCBK1 形質転換植物における FB₁ の感受性を調べた。まず、我々は LCBK1 形質転換体を 0.3 μM 、0.5 μM の FB₁ を含む MS プレート上で生育させた実生の表現型の解析を行った。MS プレート (コントロール) に生育させて 18 日間経った実生は、すべての系統において明白な違いはみられなかった (Fig. 10)。注目すべきことに、FB₁ 条件下で 18 日間経った LCBK1-OX1 の実生を観察したところ、少し個体は小さいが、野生型に比べてあまり白色化していない個体が見られた (Fig. 10)。さらに、0.5 μM 条件下で 18 日間経った LCBK1-OX1 の実生の一部の個体は、耐性を示した (Fig. 11)。LCBK1-KD1、LCBK1-KD2 の実生は、0.3 μM を含む MS プレートでは野生型と比べて特に違いは見られなかったが、0.5 μM 条件下で大いに白色化し、生育が阻害された個体が見られた (Fig. 11)。0.3

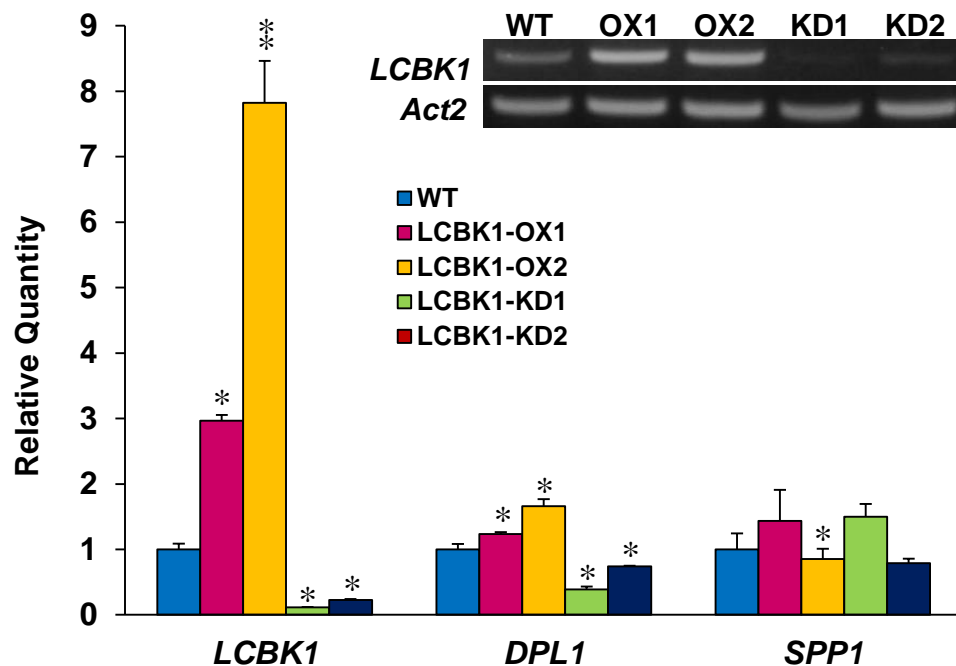


Fig. 8 *AtLCBK1* 形質転換体における LCBP 代謝関連酵素の qPCR 分析

LCBP 代謝関連酵素に関わる遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法を用いて分析した。

EF1-α 遺伝子の発現量を内部標準として用いた。データは、野生型の値を 1 としたときの相対値を、平均値±標準偏差（野生型と *LCBK1* 形質転換体のそれぞれについて $n = 4$ ）で示した。アスタリスクは有意差を示す（*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ Student's *t*-test）。右上のパネルは、RT-PCR 法によって *LCBK1* の発現量を解析したデータである。播種後、5 週間経った植物のロゼット葉からトータル RNA を抽出し、RT-PCR 法によって *LCBK1* の発現量を調べた。野生型と *LCBK1* 形質転換体は *LCBK1* 特異的プライマーを用いて分析した。 *Actin2* は内部標準として用いた。

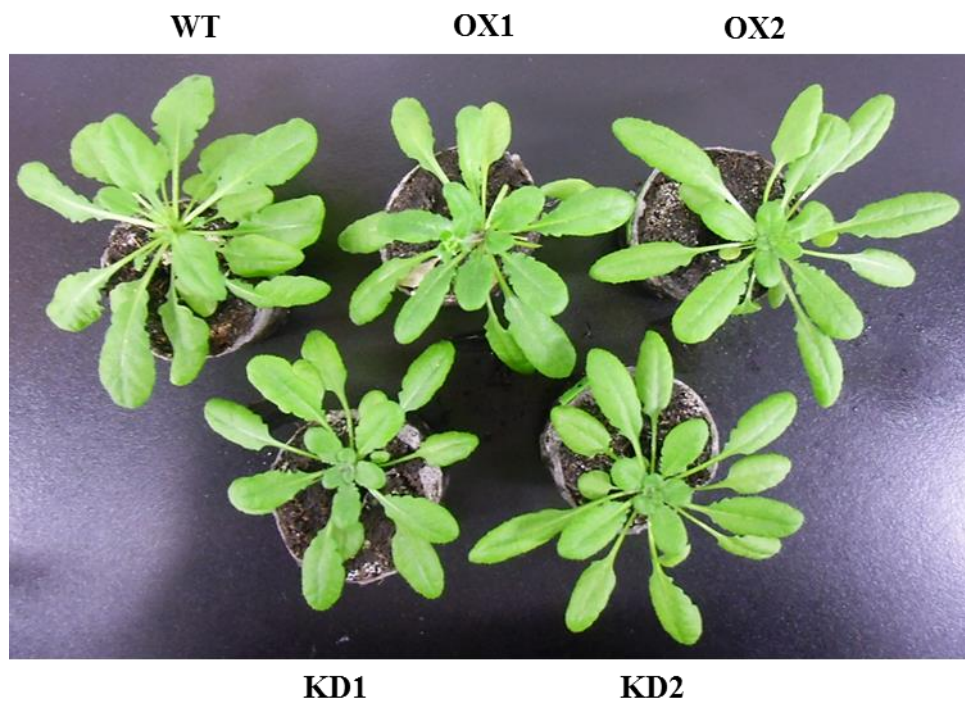


Fig. 9 *AtLCBK1* 形質転換体の植物体における植物体の表現型解析
22℃、長日条件で約3週間経った植物体をデジタルカメラで撮影した。

μM を含む MS プレートで 18 日間生育させた植物体を観察したところ、LCBK1-KD1、LCBK1-KD2 両方とも野生型に比べて白色化し、生育が阻害されていた (Fig. 11)。LCBK1 形質転換体が示したこれらの実生の表現型の特徴を、標準 (緑色で個体が大きい)、中間 (標準より小さく、一部の葉が白色化している)、重度 (双葉で生育が停止し、白色化している) の 3 つのタイプに分けて統計解析を行った (Fig. 12A)。0.3 μM FB₁ 条件下の LCBK1-OX1 において、約 20% が標準の表現型であることを示した (Fig. 12B)。さらに、0.5 μM FB₁ 条件下では、約 14% が標準の表現型であった (Fig. 12B)。興味深いことに、0.3 μM FB₁ 条件下の重度の表現型の割合を比較したところ、野生型と LCBK1-KD 系統では 55~65% であるのに対し、LCBK1-OX1、LCBK1-OX2 とともに約 45% であった (Fig. 12B)。また、0.5 μM FB₁ 条件下における LCBK1-KD1、LCBK1-KD2 の重度の表現型の割合は、野生型より多く、80% 以上が重度の表現型であることが統計解析の結果から明らかにされた (Fig. 12B)。これらの結果から、LCBK1-OX1 は FB₁ に対して耐性、LCBK1-KD1 は感受性を示すことがわかった。次に、FB₁ がもたらす根の表現型の影響を明らかにするために、LCBK1 形質転換体の主根の長さを調べた。MS プレート (コントロール) に生育させて 7 日間経った実生における根の伸長をテストしたところ、LCBK1-KD1 における主根の長さは、野生型に比べて著しく短かった (Figs. 13、14)。しかしながら、MS プレートに生育させて 14 日間経った実生における主根の長さは、LCBK1 すべての系統において、明白な違いはなかった (Figs. 13、14)。対照的に、LCBK1-OX1 における 14 日目の根の長さは、0.3 μM 、0.5 μM FB₁ 条件下において野生型より大いに長かった (Figs. 13、14)。一方、LCBK1-KD1 における主根の長さは、0.3 μM 、0.5 μM FB₁ 条件下において野生型と変わらなかった (Figs. 13、14)。これらの結果から、FB₁ 条件下による根の生育は、実生の生育よりも影響を受けないことがわかり、以前報告された Markham、Stone らの観察結果と一致している [18,117]。したがって、LCBK1 は FB₁ 処理によって誘導された葉の病変症状の程度の制御に役割を果たしていることが示唆された。

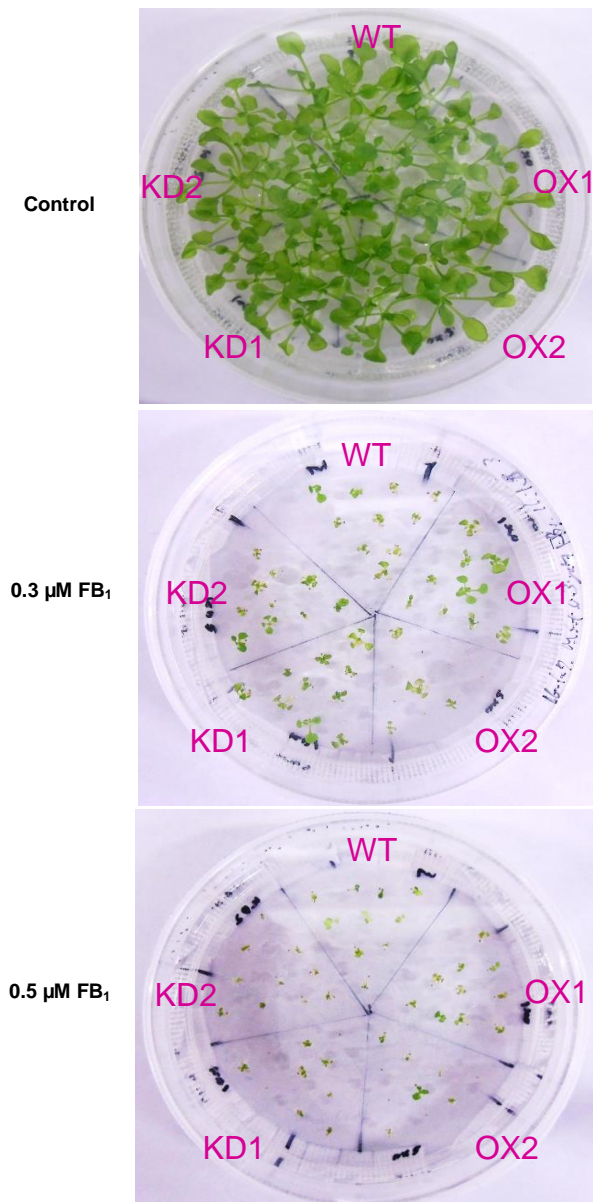


Fig. 10 フモニシン B_1 にさらした時の *AtLCBK1* 形質転換体の影響

FB_1 条件下で生育させた *AtLCBK1* 形質転換体の実生の表現型。22°Cで生育後、18日経った実生をデジタルカメラで撮影した。

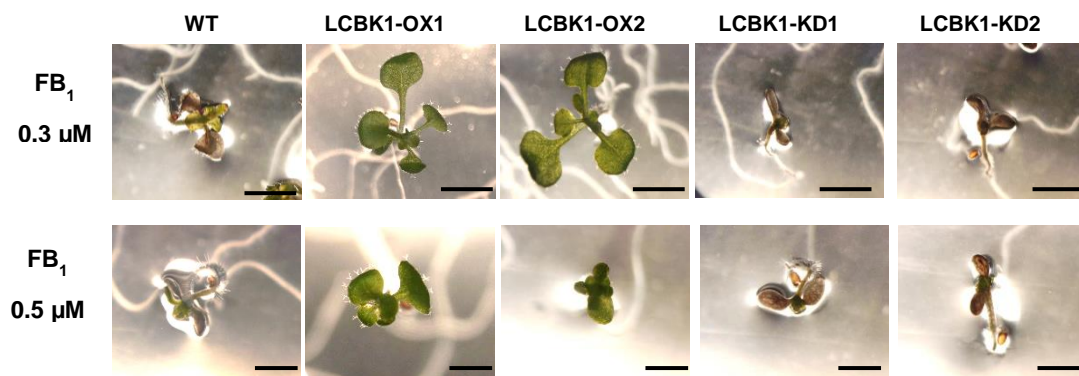
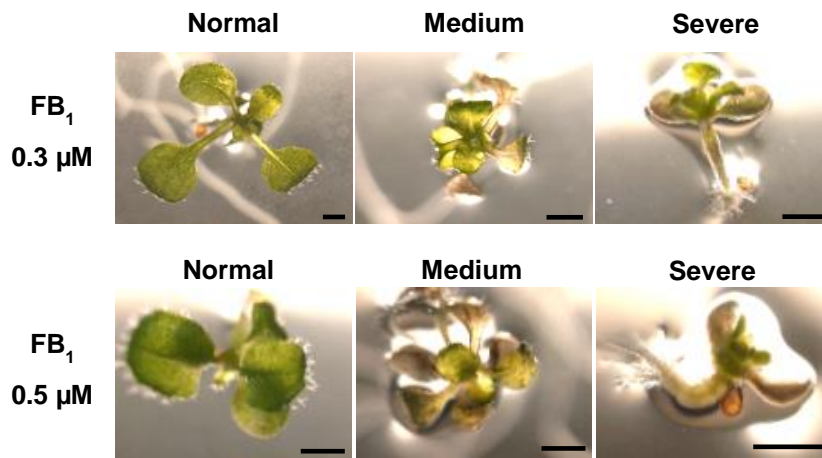


Fig. 11 フモニシン B₁ にさらした時の *AtLCBK1* 形質転換体の影響

FB₁ 条件下で生育させた *AtLCBK1* 過剰発現株、抑制株の実生の表現型。22°C で生育後、18 日経った実生を実体顕微鏡で撮影した。Scale bars: (0.3 μM) 3 mm, (0.5 μM) 2 mm

A



B

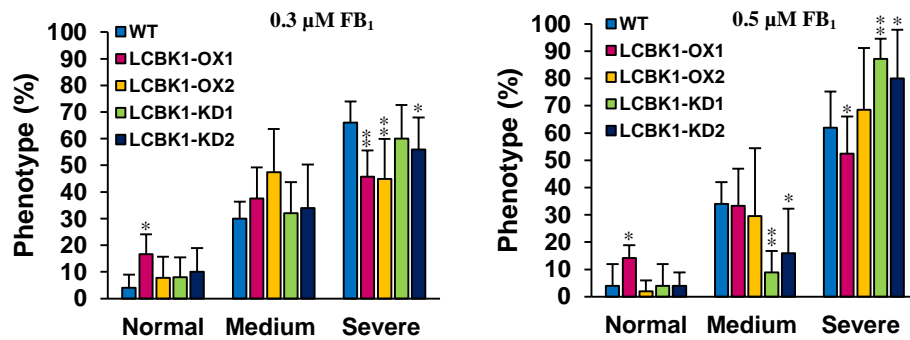


Fig. 12 *AtLCBK1* 形質転換体の植物体における実生の表現型解析

(A) FB₁ 存在下における実生の表現型。22℃で生育後、18 日目の植物体を実体顕微鏡で観察した。実生の表現型は、標準、中間、重度の 3 つのタイプに分けた。Scale bars: 1 mm

(B) *AtLCBK1* 形質転換体における FB₁ 感受性応答の統計解析。実生の表現型は、標準、中間、重度の 3 つのタイプに分けて集計した。データは平均値±標準偏差 ($n = 50$) で示した。アスタリスクは有意差を示す (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ Student's t -test)。

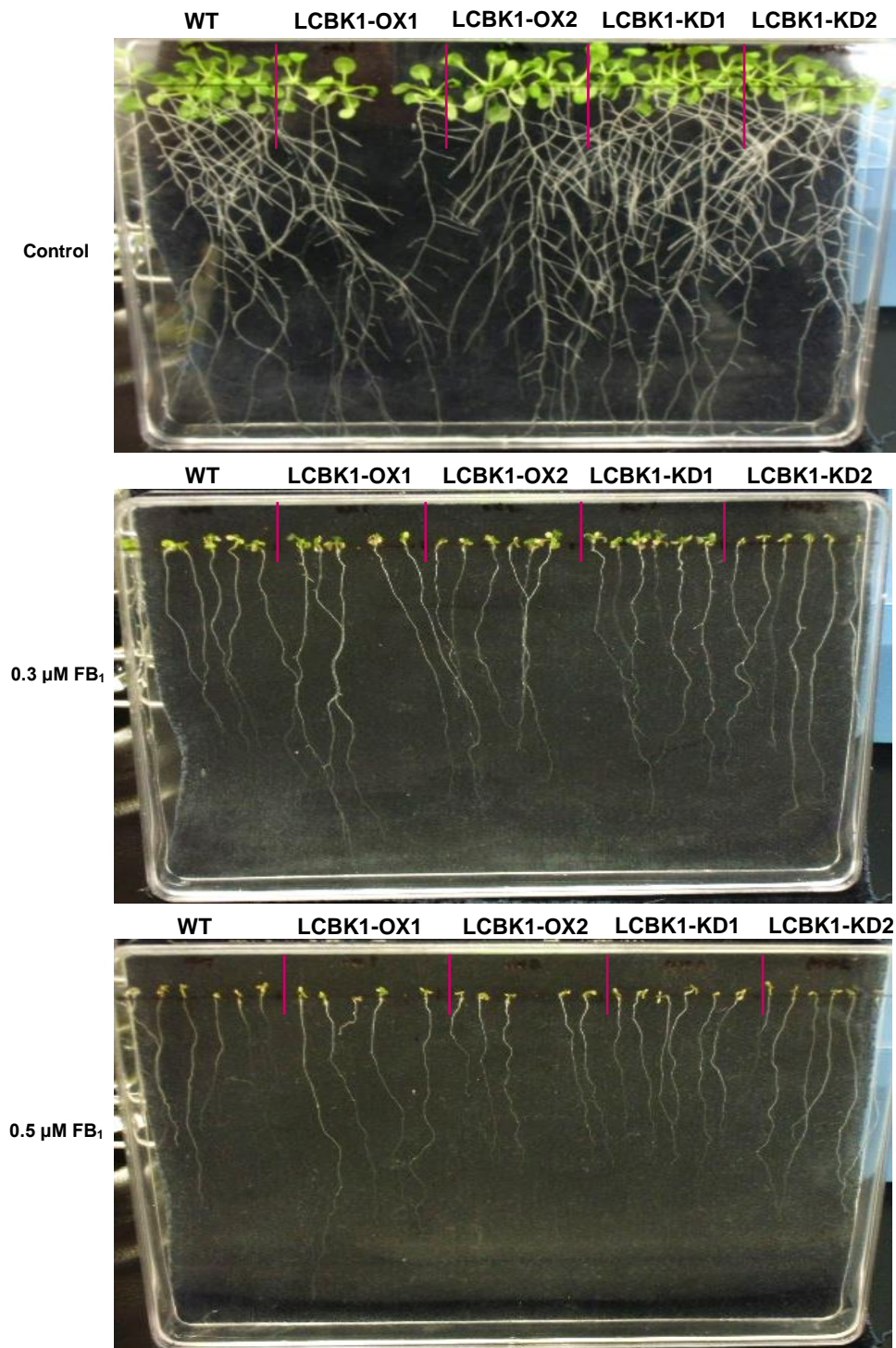


Fig. 13 フモニシン B₁ にさらした時の *AtLCBK1* 形質転換体の根の影響

FB₁ 非存在下もしくは 0.3 μM 、0.5 μM FB₁ 存在下における *AtLCBK1* 過剰発現株、抑制株の根の表現型。22°Cで生育後、14 日経った根をデジタルカメラで撮影した。

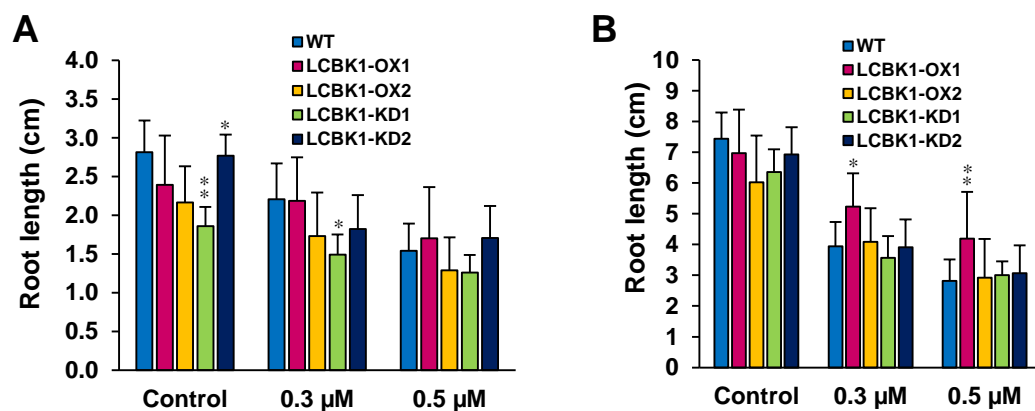


Fig. 14 *AtLCBK1* 形質転換体の植物体における根の表現型解析

AtLCBK1 形質転換体における主根の長さの統計解析。主根の長さは、22℃で生育後 7 日、14 日経った実生を用いて測定した。(A) 生育後 7 日目の主根の長さ。(B) 生育後 14 日目の主根の長さ。データは平均値±標準偏差 ($n = 20$) で示した。アスタリスクは有意差を示す (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ Student's t -test)。

「FB₁ 誘導細胞死に対する LCBP 代謝関連植物の影響」

FB₁ に対する LCBK1 形質転換体の根と実生における表現型の解析の結果から、特に実生の葉において、LCBK1-OX1 が最も耐性を示し、LCBK1-KD1 が最も感受性を示した。そこで、FB₁ 誘導細胞死における LCBK1 の役割を調べるために、我々は LCBK1-OX1 と LCBK1-KD1 それぞれ 1 系統ずつ用いた。さらに、LCBP 代謝における FB₁ の影響を詳しく解明するために、LCBK1 形質転換植物だけでなく、SPP1 の T-DNA ノックアウトミュータント (*spp1*) と DPL1 の T-DNA ノックアウトミュータント (*dpl1*) を用いた。シロイヌナズナのロゼット葉を FB₁ 処理し、電気導電率測定とトリパンブルー染色法を用いて細胞死アッセイを行った。最初に、ロゼット葉を 0.1% メタノール溶液 (コントロール)、もしくは 10 μ M の FB₁ 溶液に 24、48、72 時間処理した時の葉の形態観察を行った。FB₁ 未処理のロゼット葉では、48 時間、72 時間処理したそれぞれの系統間で葉の表面に退色した形跡はみられず、変化は見られなかった (Fig. 15A)。対照的に、LCBK1-KD1 と *dpl1* において、FB₁ 処理 48 時間で葉の表面の退色が観察され、72 時間処理した葉の表面では全体的に退色していることがわかる (Fig. 15A)。一方、LCBK1-OX1 と *spp1* における葉の形態変化は、FB₁ 処理 48、72 時間で葉の色に変化はなかった (Fig. 15A)。次に、FB₁ によって誘導される死細胞を検出するために、10 μ M の FB₁ 溶液に 48、72 時間処理したロゼット葉をトリパンブルー染色して観察した。FB₁ 未処理のロゼット葉では、48 時間、72 時間処理したそれぞれの系統間で変化は見られず、青色に染まった細胞は出現していない (Fig. 15A)。一方、48 時間 FB₁ 処理した *dpl1* では、青色に染色された単一の死細胞が出現し、FB₁ 処理 72 時間で野生型、LCBK1-KD1、*dpl1* の葉で、青色のクラスター状の死細胞が観察された (Fig. 15A)。次に、ロゼット葉を 0.1% メタノール溶液 (コントロール)、もしくは 10 μ M の FB₁ 溶液に 72 時間処理した時のイオンの漏出量を測定した。もし、細胞死が起こっている場合、細胞が壊れてイオンが漏出してくるはずである。FB₁ 未処理のイオン漏出量は、野生型、LCBK1-OX1、LCBK1-KD1、*spp1*、*dpl1* 間で変化は見られなかった (Fig. 16)。一方、FB₁ 処理した時のイオン漏出量は、特に 72 時間 FB₁ 処理した LCBK1-KD と *dpl1* では、野生型と比較してそれぞれ約 1.7、3.2 倍増加した (Fig. 16)。しかし、72 時間処理した LCBK1-OX1 と *spp1* では、野生型に比べてイオン漏出量が増加せず、未処理と比較しても著しい増加は見られなかった (Fig. 16)。特に、*dpl1* において、葉が全体的に死細胞で覆われていることから、この結果は、イオン漏出量の結果と相関していることがわかる。対照的に、LCBK1-OX1 と *spp1* では、48 時間、72 時間ともにほとんど

死細胞は観察されなかった (Fig. 15A)。実際に、トリパンプルー染色によって明らかにされた死細胞の数を調べたところ、野生型が 1 mm² あたり 30 個であるのに対し、LCBK1-KD1 は約 2 倍多い (Fig. 15B)。一方、LCBK1-KD1 と *spp1* の死細胞の数は、極めて少ない (Fig. 15B)。これらの結果から、FB₁ 誘導細胞死は、LCB と LCBP の含有量が変動することで引き起されることが予想された。

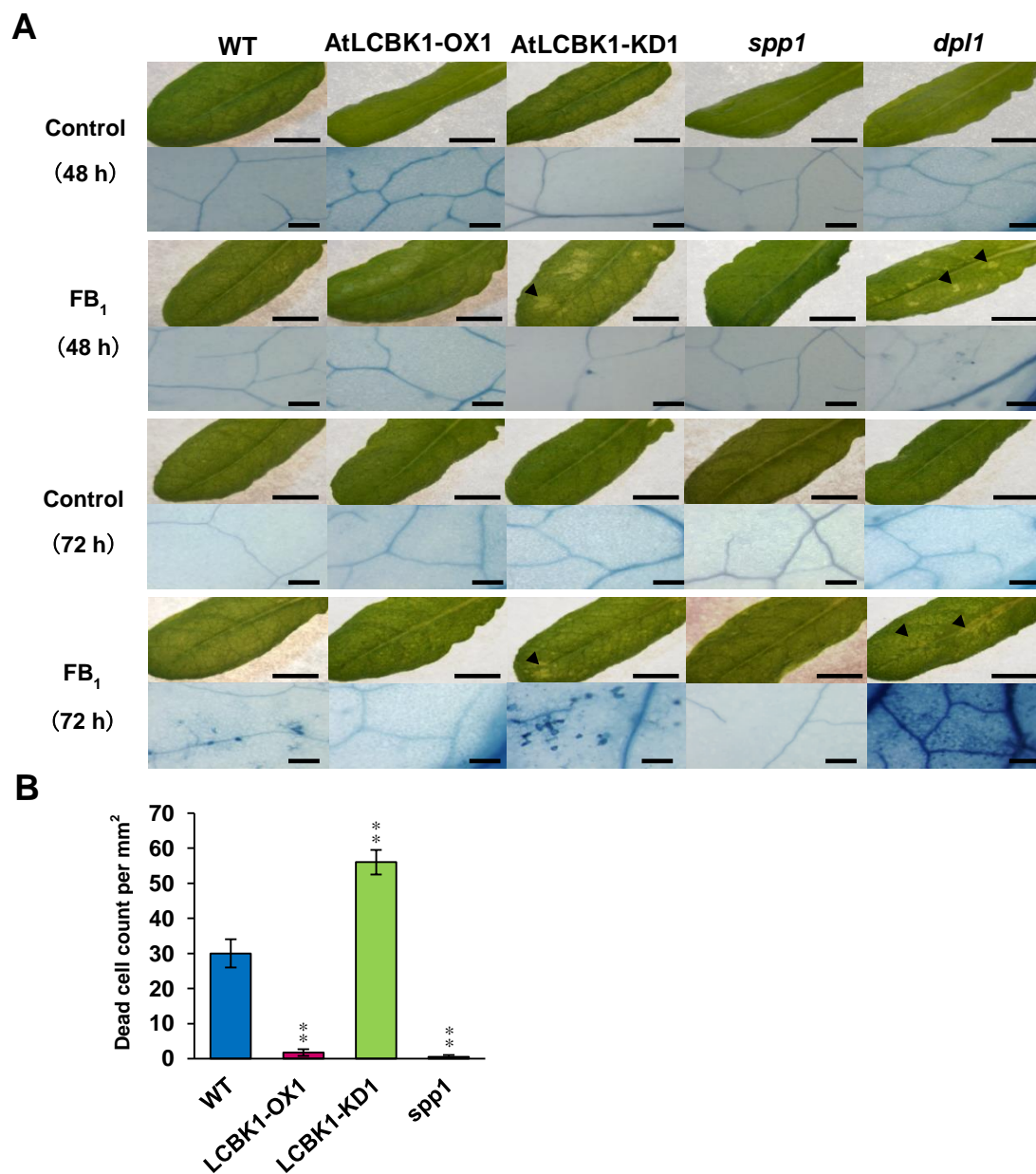


Fig. 15 フモニシン B₁ にさらした時の LCBP 代謝に関わる形質転換体の細胞死アッセイ
 (A) 10 μ M の FB₁ 存在下あるいは非存在下(コントロール)で処理した細胞死の表現型解析
 細胞死アッセイはトリパンプルー染色を用いて行った。約 6 週間経ったロゼット葉を 10 μ M のフモニシン B₁ 溶液に浸し、48 時間および 72 時間経ったサンプルを実体顕微鏡で観察した。写真は、10 μ M の FB₁ 存在下あるいは非存在下(コントロール)で処理した細胞死の表現型を示している。Scale bars: 緑葉 5 mm、トリパンプルー染色像 250 μ m。 (B) 10 μ M の FB₁ 存在下で 72 時間処理した時の死細胞の数。データは平均値 \pm 標準偏差 ($n = 4$) で示した。アスタリスクは有意差を示す (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ Student's t -test)

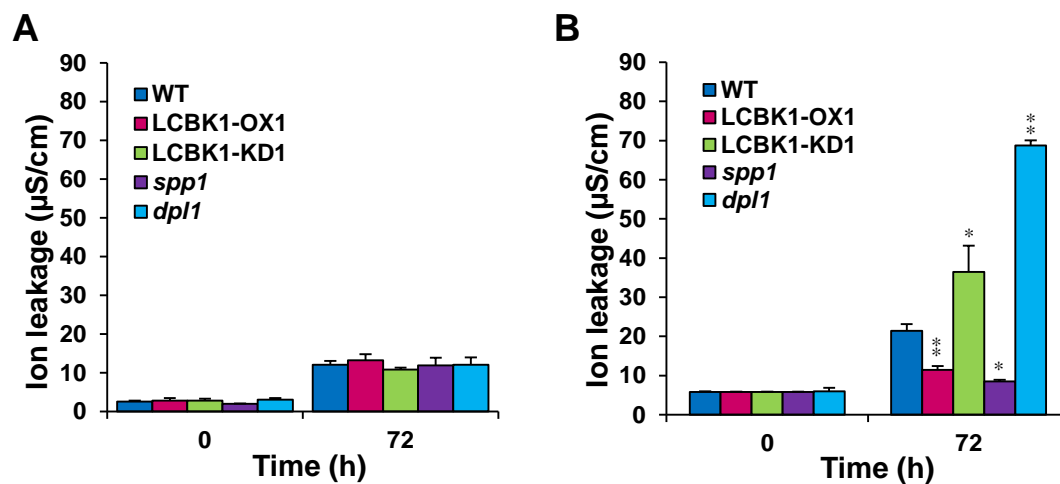


Fig. 16 フモニシン B₁に晒した時のイオン漏出量

イオン漏出量の測定は、約6週間経ったロゼット葉を10 μMのフモニシン B₁溶液に浸し、0時間から72時間経ったサンプルを用いて行った。(A) FB₁非存在下(コントロール)で処理した時のイオン漏出量の測定値。(B) 10 μMのFB₁存在下で処理した時のイオン漏出量の測定値。データは平均値±標準偏差 ($n=3$) で示した。アスタリスクは有意差を示す (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ Student's *t*-test)。

「LCBP 代謝関連植物における遊離 LCB、LCBP 含有量のプロファイル」

FB₁ 処理 72 時間の野生型、LCBK1-KD1、*dpl1* のロゼット葉において、クラスター状の死細胞が観察されたことが、細胞死アッセイによって明らかとなった (Fig. 15A)。さらに最近、10 μ M の FB₁ 溶液に 72 時間処理した野生型の葉をサンプルにして LCB、LCBP 量を LC-MS/MS で測定したところ、12 時間処理した時の LCB、LCBP 量に比べて増加することが Saucedo-García らによって報告されている[91]。また、LCB の分子種組成において、d18:0 が蓄積することで下流にある MPK6 を介したシグナリングを活性化し、細胞死が誘発されることが示唆されている[91]。そこで我々は、72 時間より前に LCB、LCBP 量が増加することによって細胞死を引き起こされているのではないかと考えた。FB₁ に晒した時の LCB と LCBP の分子種組成を調べるために、LCBP 代謝関連に関わる植物系統を、FB₁ を含む MS プレートで生育させたものを用いることを試みた。しかしながら、植物体になるには多大な時間がかかり、小さい個体を大量に集めないといけないため、この実験系は適していない。そこで、細胞死アッセイの方法と同様に、ロゼット葉を用いることにした。具体的に、野生型、LCBK1-OX1、LCBK1-KD1、*spp1*、*dpl1* のロゼット葉を 0.1% メタノール溶液 (コントロール)、あるいは 10 μ M の FB₁ 溶液に 48 時間浸し、これらのサンプルを LCB 抽出し、NBD-F を用いて誘導体化したものを LC-MS/MS で分析した。

シロイヌナズナにおいて、LCB は、ジヒドロスフィンゴシン (d18:0)、8-シス-ジヒドロキシスフィンゲニン (d18:1^{8Z})、8-トランス-ジヒドロキシスフィンゲニン (d18:1^{8E})、ファイトスフィンゴシン (t18:0)、8-シス-トリヒドロキシスフィンゲニン (t18:1^{8Z})、8-トランス-トリヒドロキシスフィンゲニン (t18:1^{8E}) の 6 つの分子種が存在する。FB₁ 未処理のサンプルでは、飽和 LCB だけでなく、不飽和ジヒドロキシ LCB (d18:1^{8Z}, d18:1^{8E})、不飽和トリヒドロキシ LCB (t18:1^{8Z}, t18:1^{8E}) をシス・トランスに分離して定量することができた (Fig. 17A、Table 6)。各 LCB の分子種は新鮮重量 1 g あたり数十～数百 pmol の範囲で検出された (Fig. 17A、Table 4)。トータル LCB 量を野生型と比較すると、LCBK1-KD1 と *dpl1* では有意な差は見られなかった。一方、LCBK1-OX1 と *spp1* は野生型に比べて少なく、それぞれ 66%、54% 減少していた (Fig. 17B)。次に、FB₁ 処理した各系統それぞれのサンプルでは、FB₁ 未処理と比べてトータル LCB 量が 10～70 倍増加した (Figs. 17B、18D)。FB₁ 条件下でのトータル LCB 量を野生型と比較すると、LCBK1-KD1 は 1.3 倍蓄積し、*dpl1* は 2.6 倍蓄積していた (Figs. 17B、18D)。一方、LCBK1-OX1 は 10% 減少し、*spp1* は 76% 減少した (Figs. 17B、18D)。LCB 分子種組成

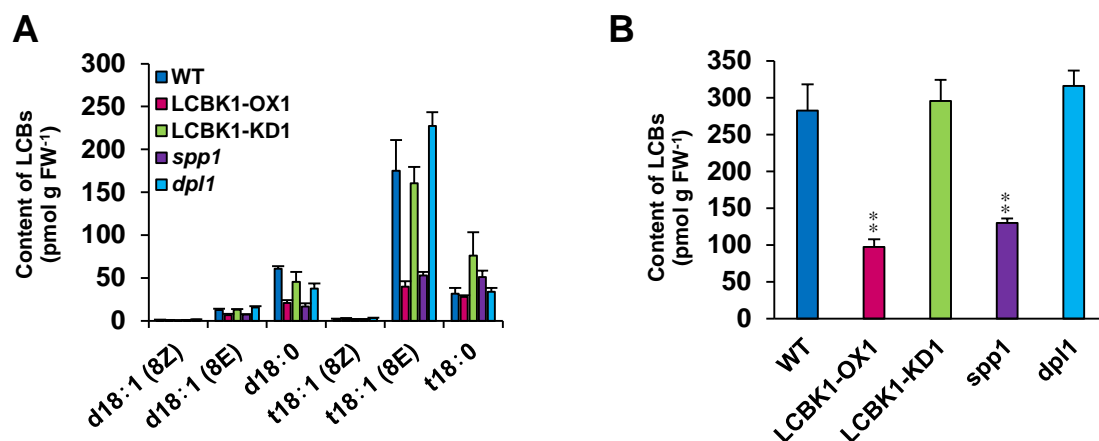


Fig. 17 フモニシン B₁ 未処理の LCB 分子種の変動

LCB は 4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラザン(NBD-F)を用いて誘導体化した。NBD 誘導体化した LCB は LC-MS/MS によって分析した。LC によるサンプルの分離は、Prominence UFLCXR system (島津製作所)、分離試料は、ACQUITY TQD mass spectrometer (Waters)によって解析した。(A) FB₁ 未処理(コントロール)の LCB 分子種組成 (B) FB₁ 未処理(コントロール)のトータル LCB 量。データは平均値±標準偏差 ($n=3$) で示した。アスタリスクは有意差を示す (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ Student's t -test)。

Table 6 フモニシン B₁ 未処理の LCB 分子種の定量分析

LCB molecular species	WT	LCBK1-OX1	<i>P</i> value	LCBK1-KD1	<i>P</i> value	<i>spp1</i>	<i>P</i> value	<i>dpl1</i>	<i>P</i> value
d18:1 (8Z)	0.68±0.64	0.51±0.28	0.343	0.56±0.18	0.383	0.64±0.16	0.442	1.16±0.65	0.001
d18:1 (8E)	12.64±1.22	6.55±1.38	0.000	13.09±0.64	0.216	7.20±0.50	0.010	15.54±1.66	0.029
d18:0	60.61±2.96	20.60±3.47	0.000	45.50±11.56	0.101	16.80±3.44	0.000	37.44±6.23	0.024
t18:1 (8Z)	1.40±0.92	2.01±1.39	0.302	1.53±0.38	0.407	1.18±0.86	0.423	3.11±0.51	0.051
t18:1 (8E)	175.23±35.69	39.70±6.30	0.013	160.50±19.17	0.172	52.81±4.17	0.012	227.56±15.93	0.108
t18:0	31.68±6.48	27.74±2.14	0.214	76.02±27.44	0.037	51.12±7.49	0.069	34.03±4.13	0.118

データは Fig.17A に相当し、平均値 (pmol per g fresh weight) ±標準偏差 ($n = 3$) で示した。P 値は student's *t*-test から算出した。

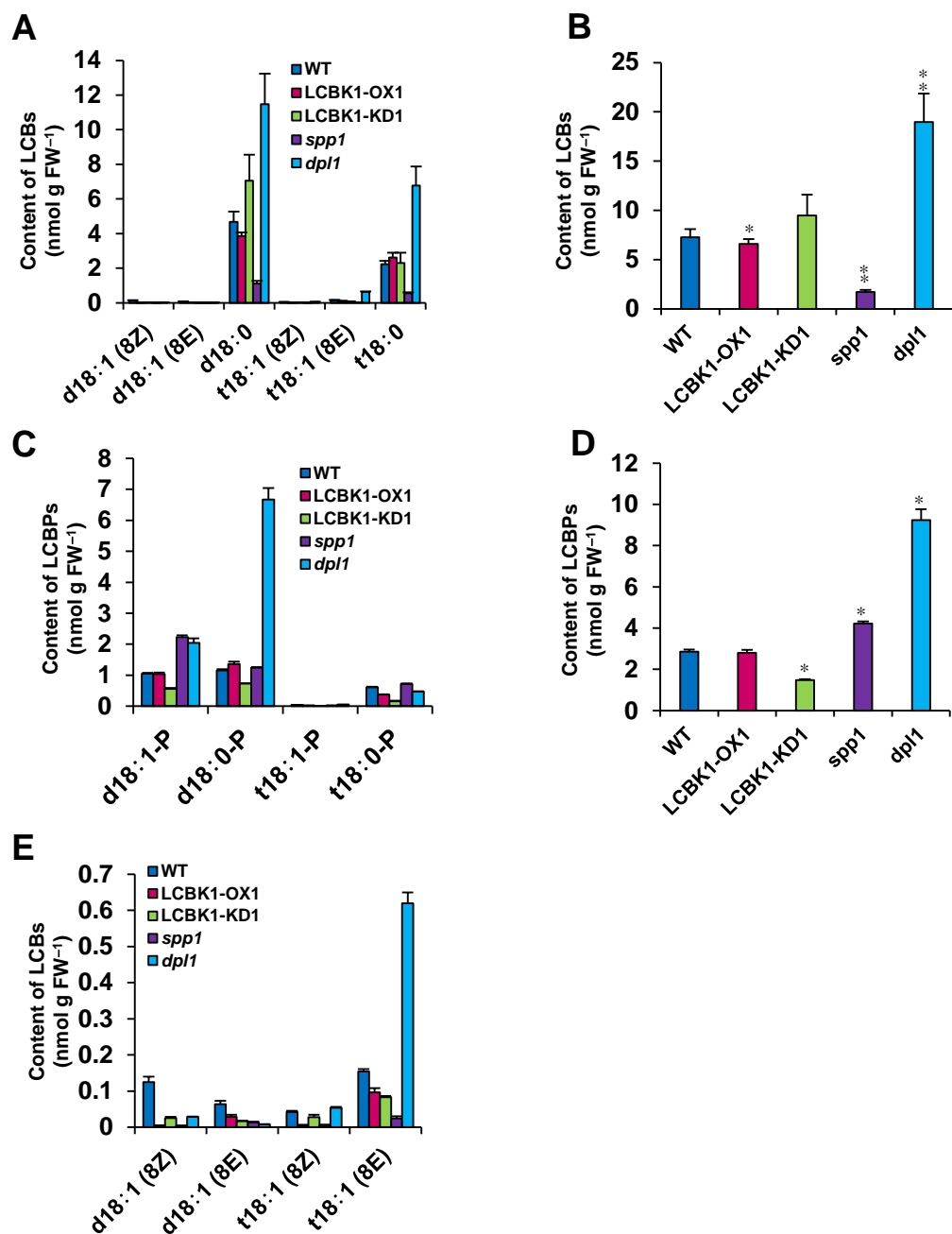


Fig. 18 フモニシン B₁ で処理した時の LCB・LCBP 分子種の変動

(A) 10 μ M の FB₁ で 48 時間処理した時の LCB の分子種組成 (B) 10 μ M の FB₁ で 48 時間処理した時のトータル LCB 量 (C) 10 μ M の FB₁ で 48 時間処理した時の LCBP の分子種組成 (D) 10 μ M の FB₁ で 48 時間処理した時のトータル LCBP 量 (E) A の拡大図 (8-不飽和化 LCB の分子種) データは平均値±標準偏差 ($n = 3$) で示した。アスタリスクは有意差を示す (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ Student's t -test)。

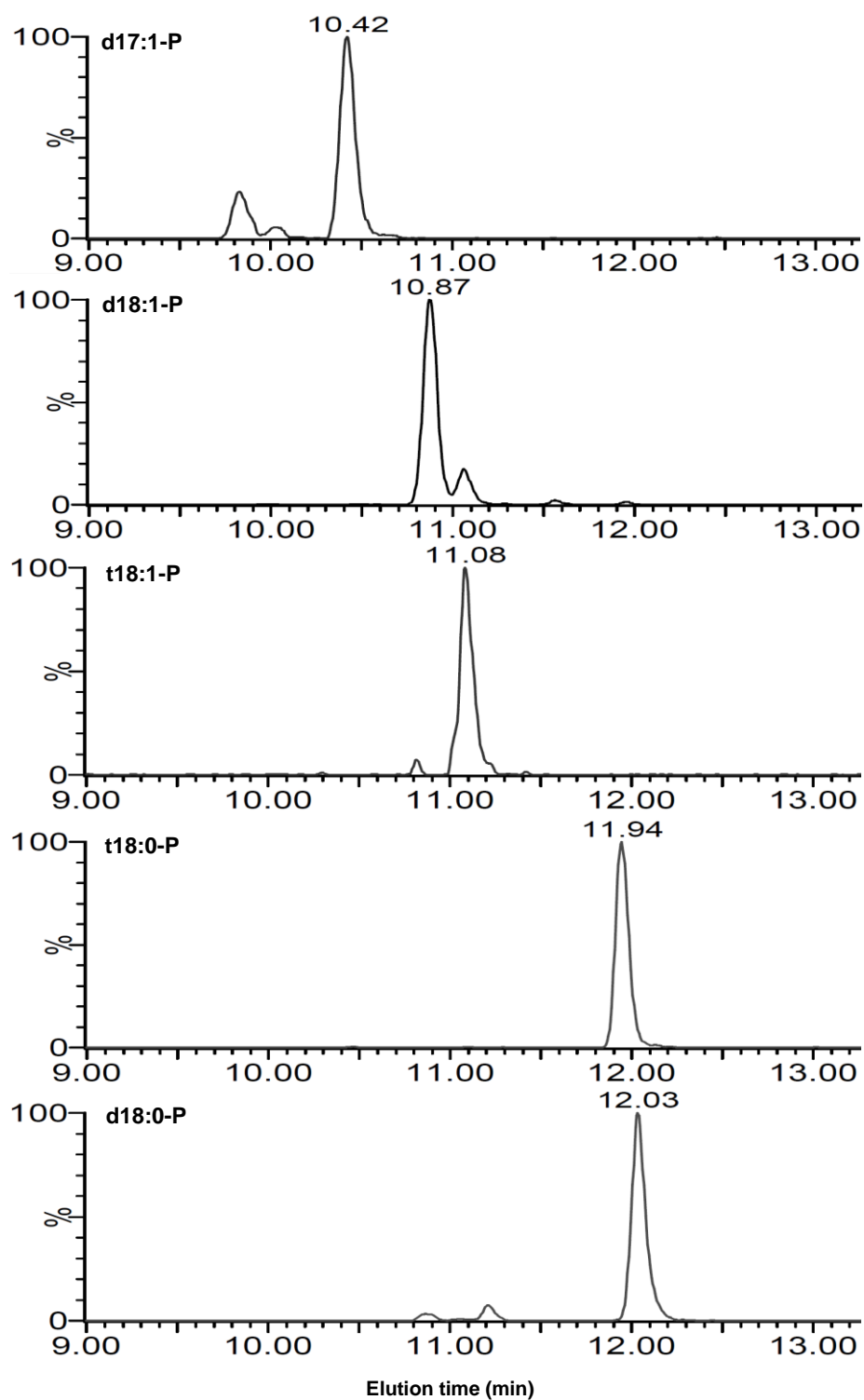


Fig. 19 野生型における LCBP のイオンクロマトグラム

野生型から抽出した LCBP 画分をアセチル誘導体化し、MRM のネガティブイオンモード[M-H]⁻で LC-MS/MS 分析した。

を詳細に解析したところ、主に飽和型 LCB である d18:0、t18:0 が蓄積しており (Fig. 18A)、不飽和 LCB の d18:1^{8Z}、d18:1^{8E}、t18:1^{8Z}、t18:1^{8E} はすべての系統において蓄積されず、FB₁ 未処理の含有量とほとんど変わらなかった (Fig. 18E)。以前の研究で、LCB の不飽和化は CER が合成された後に行われることが示唆されている[118]。この結果から、LCB の 8-不飽和化は CER に変換された後の段階で行われ、複合スフィンゴ脂質である GlcCer、GIPC からの分解産物由来であることが示唆された。

d18:0 の蓄積レベルを野生型と比較すると、LCBK1-KD1、*dpl1* それぞれ 1.5 倍、2.5 倍増加した (Fig. 18A、Table 7)。逆に、LCBK1-OX1 と *spp1* はそれぞれ 18%、76% 少なかった (Fig. 18A)。t18:0 の蓄積レベルを野生型と比較したところ、LCBK1 形質転換植物間で有意差は見られず、一方で *spp1* は 75% 少なく、*dpl1* は 3 倍蓄積していた (Fig. 18A)。*dpl1* における t18:0 の増加は、d18:0 の蓄積を回避するために、C-4 水酸化酵素によって変換されたためであると予想される。これらの結果から、生体内における d18:0 の蓄積量によって、FB₁ 誘導細胞死が引き起こされることが示唆された。

LCB の蓄積を回避するために、LCB のヒドロキシ化以外に LCBP の合成反応が強くはたらくと考えられる。LCBP 分析するために、野生型、LCBK1-OX1、LCBK1-KD1、*spp1*、*dpl1* のロゼット葉を 10 μM の FB₁ 溶液に 48 時間浸し、これらのサンプルを第一章に既述したように、メタノール/水 (1:1, 0.1% 酢酸) の混合溶媒で LCBP 抽出し、アセチル誘導体化したものを LC-MS/MS で分析した。FB₁ 処理したサンプルでは、LCBP 分子種を検出することができ、野生型における検出された LCBP のイオンクロマトグラフを Fig. 19 に示した。第一章で既述したように、FB₁ 未処理の LCBP の分子種を解析すると、トリヒドロキシ LCB が主要である (Fig. 5A,B)。野生型におけるトータル LCBP 量は 7.95 pmol であるが、FB₁ 未処理のトータル LCB 量と比較したところ、LCB は LCBP の約 35 倍多いことがわかった (Fig. 5A,17B)。FB₁ 処理したトータル LCBP 量を野生型と比較すると、LCBK1-OX1 はほとんど同じ蓄積量だが、LCBK1-KD1 は 49% 少なかった (Fig. 18D、Table 8)。一方、*spp1* と *dpl1* はそれぞれ 1.5 倍、3.2 倍蓄積した (Fig. 18D、Table 6)。FB₁ 処理した LCBP の分子種組成を解析したところ、主にジヒドロキシ LCBP (d18:1-P、d18:0-P) が蓄積しており、トリヒドロキシ型 LCBP は特徴的な増加はみられず、系統間で差はなかった (Fig. 18C)。FB₁ 処理した野生型の LCBP 量は、FB₁ 未処理と比べて約 360 倍増加した (Fig. 5A、18D)。興味深いことに、*dpl1* における d18:0-P レベルは、野生型と比較して 5.7 倍増加していた (Fig. 18C)。これは、d18:0 が過剰に増加したために、LCB をリン酸化することで d18:0 の蓄積を回避したと考えられる。ま

た、LCB は主に飽和型のジヒドロキシ LCB が蓄積するが、LCBP では飽和、不飽和のジヒドロキシ LCB 両方とも蓄積することから、LCBP における 8-不飽和化は LCBP に変換されてから行われる可能性がある。

フモニシン B₁ 誘導細胞死は、LCBP/LCB のバランスの維持が重要であることが予想されている。これらを確認するために、FB₁ 処理した LCBP/LCB 比を比較したところ、野生型が 0.39 なのに対し、細胞死が起きていない LCBK1-OX1 と *spp1* は、それぞれ 0.42、2.5 であった (Table 9)。一方、細胞死を引き起こした LCBK1-KD1 と *dpl1* は、それぞれ 0.15、0.49 であった (Table 7)。注目すべきことに、LCBK1-KD1 は、細胞死アッセイの実験データから、死細胞が出現しているが、LCB の含有量は野生型に比べて増加し、LCBP は減少している (Figs. 15A、18A、18C)。*spp1* では、細胞死は起こっていないが、LCB は減少し、LCBP は増加している (Figs. 15A、18A、18C)。分子種ごとに比較すると、*dpl1* を除いて d18:0 と d18:0-P の増減が FB₁ 誘導細胞死と相関していることがわかった (Figs. 18A、18C、Table 7、8)。これらの結果から、LCBP は、LCB の蓄積を回避するために蓄積したと考えられる。しかしながら、*dpl1* では、トータル LCB、LCBP 両方とも野生型と比べて増加しているにも関わらず、細胞死を引き起こしている (Table 7)。したがって、FB₁ 誘導細胞死は、LCB (d18:0) が引き金となって引き起こされることが示唆された。

Table 7 フモニシン B₁ で処理時の LCB 分子種の定量分析

LCB molecular species	WT	LCBK1-OX1	<i>P</i> value	LCBK1-KD1	<i>P</i> value	<i>spp1</i>	<i>P</i> value	<i>dpl1</i>	<i>P</i> value
d18:1 (8Z)	0.12±0.02	0.005±0.00	0.004	0.03±0.00	0.006	0.004±0.00	0.004	0.03±0.00	0.006
d18:1 (8E)	0.06±0.01	0.03±0.01	0.009	0.02±0.00	0.009	0.01±0.00	0.010	0.01±0.00	0.006
d18:0	4.68±0.48	3.85±0.17	0.043	7.05±1.24	0.050	1.12±0.14	0.003	11.48±1.43	0.005
t18:1 (8Z)	0.04±0.00	0.01±0.00	0.004	0.03±0.01	0.052	0.01±0.00	0.003	0.05±0.00	0.036
t18:1 (8E)	0.15±0.01	0.10±0.01	0.004	0.08±0.00	0.001	0.02±0.01	0.001	0.62±0.03	0.001
t18:0	2.22±0.16	2.62±0.22	0.137	2.29±0.49	0.437	0.55±0.06	0.001	6.78±0.89	0.007

データは Fig.18A に相当し、平均値 (pmol per g fresh weight) ±標準偏差 ($n = 3$) で示した。P 値は student's *t*-test から算出した。

Table 8 フモニシン B₁ で処理時の LCBP 分子種の定量分析

LCBP molecular species	WT	LCBK1-OX1	<i>P</i> value	LCBK1-KD1	<i>P</i> value	<i>spp1</i>	<i>P</i> value	<i>dpl1</i>	<i>P</i> value
d18:1-P	1.05±0.03	1.04±0.05	0.439	0.56±0.03	0.037	2.23±0.05	0.021	2.04±0.15	0.031
d18:0-P	1.16±0.04	1.36±0.08	0.226	0.73±0.00	0.024	1.24±0.02	0.058	6.67±0.36	0.015
t18:1-P	0.04±0.00	0.02±0.00	0.171	0.01±0.00	0.030	0.03±0.00	0.044	0.05±0.00	0.099
t18:0-P	0.61±0.03	0.37±0.01	0.058	0.16±0.01	0.030	0.72±0.02	0.025	0.47±0.02	0.015

データは Fig.18C に相当し、平均値 (pmol per g fresh weight) ±標準偏差 ($n = 3$) で示した。P 値は student's *t*-test から算出した。

Table 9 フモニシン B₁ 処理時の LCB・LCBP の増減パターン

WT と比較	LCB (d18:0)	LCB (t18:0)	LCBP (d18:1-P)	LCBP (d18:0-P)	LCBP/LCB 比 WT 0.39	細胞死
LCBK1-OX1	0.8 ↓	—	—	1.2 ↑	0.42	起こらない
LCBK1-KD1	1.5 ↑	—	0.5 ↓	0.6 ↓	0.15	起こる
<i>spp1</i>	0.2 ↓	0.2 ↓	2.1 ↑	1.1 ↑	2.5	起こらない
<i>dpl1</i>	2.5 ↑	3.0 ↑	2.0 ↑	5.8 ↑	0.49	起こる

↑:多い ↓:少ない —:変化なし

＜考察＞

本研究では、植物の生体内で *LCBK1* がどのように調節され、機能しているのかを明らかにするために *LCBK1* を過剰発現、抑制した形質転換体を用いて FB_1 に対する表現型の解析、脂質分析を行い、スフィンゴ脂質代謝経路におけるリン酸化の重要性について調べた。

シロイヌナズナにおいて、スフィンゴ脂質の中間代謝物である LCB は、 FB_1 誘導細胞死のセカンドメッセンジャーとして作用することが分かっている[79-81,119]。LCB アナログマイコトキシンである FB_1 は、CER シンターゼの阻害剤であり、d18:0 と t18:0 の蓄積を導く。シロイヌナズナにおいて、CER シンターゼは LOH1、LOH2、LOH3 の 3 つのホモログが存在し、CS I と CS II の 2 つのグループに大別される。CS I は、d18:0 と LCFA の組み合わせを選択し、CS II は t18:0 と VLCFA の組み合わせを選択する。最近の研究で、LOH1 と LOH3 は CS II のタイプであり、LOH2 は CS I のタイプであることがシロイヌナズナと酵母を用いた実験で報告されている[18-19]。そして、興味深いことに、 FB_1 条件下での CS 活性測定の結果から、LOH1 が最も感受性が高いことから、 FB_1 は LOH1 を阻害することが示唆された[118]。また、CS それぞれの基質特異性を調べたところ、LOH1 と LOH3 は t18:0 を効率的に使用するが、LOH1 が優勢な CS であることが示唆されている[118]。一方、LOH2 は d18:0 を使用することから、LOH1 が FB_1 によって阻害されることでトリヒドロキシ LCB の供給を必要とせず、LOH2 が d18:0 を必要とするために、LCB プールで d18:0 が蓄積すると考えられる。

FB_1 誘導細胞死は、LCBP/LCB ホメオスタシスの維持が重要であることが示唆されている。 FB_1 処理したサンプルを用いた LCB 分析で、我々は t18:0 の増減が影響するというより、d18:0 の蓄積が FB_1 誘導細胞死の引き金になることを明らかにした (Fig. 18A)。実際に、*LCBK1-KD1* と *dpl1* では、 FB_1 処理 48 時間で d18:0 が比較的蓄積しており、多数の死細胞が FB_1 処理 72 時間の葉で観察された (Fig. 15、18A)。この現象は、d18:0 が許容範囲を超えたとき、48 から 72 時間の間で細胞死が引き起こされると推測できる。また、*LCBK1-OX1* において、t18:0 の含有量は野生型、*LCBK1-KD1* と比べて少し多いに関わらず、細胞死は起きていない (Fig. 15、18A)。よって、t18:0 の蓄積は LCB プールにおける d18:0 許容量を超えたために、C-4OHase によって置換されたものであると考えられる。最近、C-4OHase の T-DNA ノックアウトミュータントである *sbh1-1* は、著しくトリヒドロキシ LCB 量が減少しているが、 FB_1 に対して感受性であり、細胞死を

引き起こすことが報告されている[91]。また、*sbh1 sbh2* ダブルミュータントはトリヒドロキシ LCB を欠いているが、プログラム細胞死のような病変を引き起こすことがわかっている[16]。これは、トリヒドロキシ LCB レベルの減少が細胞死を誘発するのではなく、d18:0 の蓄積が原因であることが考えられる[16]。しかしながら、t18:0 が必ずしも FB₁ 誘導細胞死に関与しないとは限らない。直接的ではないが、カルシウム依存セリン/トレオニンタンパクキナーゼファミリーである CPK3 は、Ca²⁺濃度に依存して FB₁ 存在下で t18:0 を仲介したプログラム細胞死のポジティブレギュレーターとして作用することが *cpk3* ミュータントの解析から明らかにされた[120]。このことから、d18:0 と t18:0 は、それぞれ独立の異なる非依存的な経路に貢献しているかもしれない。

興味深いことに、FB₁ 処理した LCB の分子種組成を比較すると、飽和型の LCB は増加するが、不飽和型の LCB はほとんど蓄積しない (Fig. 18A、E)。一方、LCBP ではジヒドロキシ型において飽和型、不飽和型両方とも蓄積することが今回の実験データは示した (Fig. 18C)。最近の Markham らの研究で、LOH1、LOH2、LOH3 の基質特異性を調べたところ、不飽和ジヒドロキシ LCB (d18:1^{8Z}、d18:1^{8E}) に対する活性はなかったことから、これらの基質は CER 合成にリサイクルされないことが示唆された[118]。したがって、d18:1^{8Z}、d18:1^{8E} は、CER から分解されたものが LCB プールに供給されるはずだが、FB₁ 処理した d18:1^{8Z}、d18:1^{8E} の含有量は、FB₁ 未処理と比べて少し多くなっている (Fig. 17A、18A)。植物において、*de novo* 合成最終産物である GlcCer は、d18:1^{8Z}、d18:1^{8E} タイプの LCB を多く含むことがわかっている[121-124]。一方、GIPC は d18:1^{8Z}、d18:1^{8E} タイプの LCB はほとんど存在しない[62,96]。このことから、LCB プールに蓄積した d18:1^{8Z}、d18:1^{8E} は、GlcCer の分解産物由来であることが示唆された。一方、FB₁ 未処理の野生型における LCBP の分子種組成はトリヒドロキシ LCBP が主に占めているが、FB₁ 処理した時の野生型における LCBP の分子種組成は、ジヒドロキシ LCBP の方が増加しており、d18:0-P の増加だけでなく、d18:1-P の増加がみられた (Fig. 18C)。不飽和 LCB 量は変化していないことから、LCBP の 8-不飽和化は LCBP に変換された後に行われることが示唆された。

気孔は、植物独自の構造であり、空気と水蒸気の交換、光合成、病原菌侵入の抑制などのような多面的な応答シグナリングに貢献している[125-127]。最近、ABA を介した気孔閉鎖の促進には、LCBP がセカンドメッセンジャーとして作用することがわかっている[38-42]。この機構に関わる LCBP の分子種は、ジヒドロキシ LCBP 型ではなく、トリヒドロキシ LCBP 型が重要な役割を果たしていることが報告されている[40]。今回の

実験で、FB₁ 処理した時の LCBP の分子種組成はジヒドロキシ型がほとんど占めていることがわかった。特に、*dpl1* において、過剰な d18:0-P の蓄積が確認できたが、この現象もおそらく d18:0 の蓄積を回避するために、*LCBK* によって LCBP に変換されたと考えられる (Fig. 18A、18C)。したがって、ジヒドロキシ LCBP は細胞死の制御に重要な代謝物であることが示唆された。また、*LCBK1* 形質転換植物における LCB・LCBP の増減と細胞死アッセイの結果は、FB₁ 誘導細胞死の原因を理解するのに重要であることがわかった。特に、d18:0 と d18:0-P が細胞死応答に重要な代謝物であることが予想される (Fig. 20)。しかしながら、*LCBK1-OX1* における d18:0-P の蓄積は、*dpl1* と比べて少ない (Fig. 18C)。これは、*DPL1* の mRNA 量が増加しているために、d18:0-P があまり蓄積しないと考えられる (Fig. 8)。しかしながら、mRNA 量が増加してもタンパク質が増加しているとは限らない。今後、タンパク質の発現量も調べる必要がある。また、*spp1* ではトータル LCBP が蓄積し、細胞死を引き起こさないが、*dpl1* においてトータル LCBP の蓄積が顕著であるにも関わらず、細胞死を引き起こしている (Fig. 15、18C)。さらに、LCBP/LCB 比においても、*dpl1* は細胞死と関連性がない (Table 9)。おそらく、LCB 量が LCBP 量より大量に蓄積したために、細胞死が引き起こされたと予想されるが、詳細はわからない。今後、*LCBK1* 形質転換体と LCBP 代謝関連酵素遺伝子の形質転換体もしくはノックアウトミュータントをかけあわせたダブルミュータント (e.g. *LCBK1-OX/spp1*, *LCBK1-OX/dpl1*) を用いて解析する必要がある。

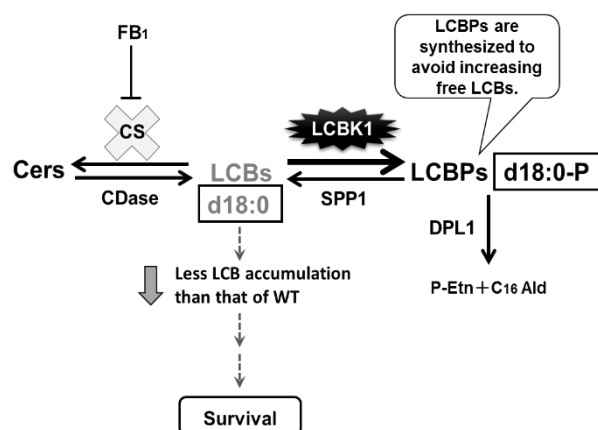
FB₁ に関する研究は、主に葉を用いて行われている。スフィンゴ脂質代謝に関わる酵素遺伝子の多くは、生殖器官、特に花粉で発現が高いことが知られている。シロイヌナズナ eFP Browser の DNA マイクロアレイデータによる遺伝子発現プロファイルによると [128]、*LCBK1* は成熟した花粉に発現が高いことが示されている。しかし、FB₁ 処理した花を用いた研究は行われていない。したがって、生殖器官を構成するおしべ、めしべなど、パーツごとに分けて大量に集めたサンプルを FB₁ 処理し、LCB・LCBP 分析する必要がある。しかしながら、今回の研究で作製した *LCBK1-OX* は *CaMV35S* プロモーターの制御下である。このプロモーターは、花粉ではほとんど発現しないことがわかっている [129]。生殖器官で *LCBK1* がどのような役割を担っているか調べるために、花粉に発現させることが可能であるユビキチンプロモーター (*UBQ10*) 制御下で形質転換体を作製することができる手法を利用することが必須となる [130]。今後、*LCBK1* の発現を調節する形質転換体を用いて、生殖器官を FB₁ 処理した試料中の LCB・LCBP の分子種組成を葉と比較し、それぞれの器官での *LCBK1* の役割を明らかにしたい。

シロイヌナズナにおいて、LCB の C-4 部分を不飽和化する酵素である $\Delta 4$ デサチュラーゼ ($\Delta 4$ Des) は、葉では発現せず、花において特異的に発現が高いことが知られている。このため、葉の $d18:1^{4E}$ はほとんど存在しない[95,131]。一方、動物の $\Delta 4$ Des は、CER 合成後に行われることがわかっている[132]。興味深いことに、シロイヌナズナの CER シンターゼのホモログである LOH2 は、主として $d18:1^{4E}$ を取り込むことから、LCB の 4-不飽和化は CER 合成の前の段階で行われることが予想されている。もし、この仮説が正しいとすれば、花を FB_1 処理すると $d18:1^{4E}$ もしくはスフィンガジエニン ($d18:2^{4E,8E}$ 、 $d18:2^{4E,8Z}$) が主な分子種になる可能性がある。この問題は LCBK1 と $\Delta 4$ Des の形質転換体を用いることで解決できるかもしれない。

スフィンゴ脂質と FB_1 に関する研究と同時に、生体栄養性病原菌や屍体栄養性病原菌を用いた細胞死の研究も大きく進んでいる。病原菌感染させると、スフィンゴ脂質の中間代謝物である CER や LCB が引き金となって活性酸素種 (ROS) の生産、植物防御応答に関わるシグナリングなどのような免疫応答がはたらくことがわかってきている[79-81]。セラミドキナーゼをコードする *acd5* ミュータントやイノシトールホスホセラミドシンターゼをコードする *RPW8* ミュータントは、Cer、防御応答に関わるサリチル酸 (SA)、病原菌関連 (PR) タンパク質を蓄積するために、自発的な細胞死を引き起こし、生体栄養性病原菌に対して耐性をもつことがわかっている[24,78]。このようにスフィンゴ脂質は、SA を介した全身獲得抵抗性シグナル伝達経路に重要な役割を果たしているが、最近、灰色カビ病菌である *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) とトマト斑葉細菌病菌である *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*) を *dpl1* ミュータントに感染したところ、SA と SA 関連遺伝子に顕著な違いは見られないが、特に *B. cinerea* 接種後の応答で、ジャスモン酸 (JA) の蓄積と JA 関連遺伝子の発現が増加し、耐性を持つことが確認された[133]。このことから、DPL1 は SA と JA の抵抗性誘導シグナル伝達経路の選択に関わる制御因子であり、スフィンゴ脂質代謝物の修飾が屍体栄養性病原菌に対する防御応答にも重要であることが示唆された。また、病原菌接種によって LCB、LCBP 量は増加するが、特に $d18:0$ と $t18:0-P$ が病原菌の種類によって細胞死と ROS の蓄積を左右するキープレイヤーであることが報告されている[133]。興味深いことに、我々の FB_1 処理した時の LCBP のデータでは、 $t18:1-P$ よりも $t18:0-P$ の方が多い (Fig. 10C)。しかしながら、植物に悪影響をもたらす病原菌は多数存在し、宿主に感染するための戦略パターンも様々である。今後、LCBK1 によってもたらされる LCB、LCBP 含有量の調節と、その下流で作用する SA、JA のような植物ホルモンを介したシグナル伝達経路に関わる防

御応答関連遺伝子の発現量、病原菌応答における ROS の発生機構との関連性を調べることで、植物免疫応答におけるスフィンゴ脂質の役割の解明につながるかもしれない。

A



B

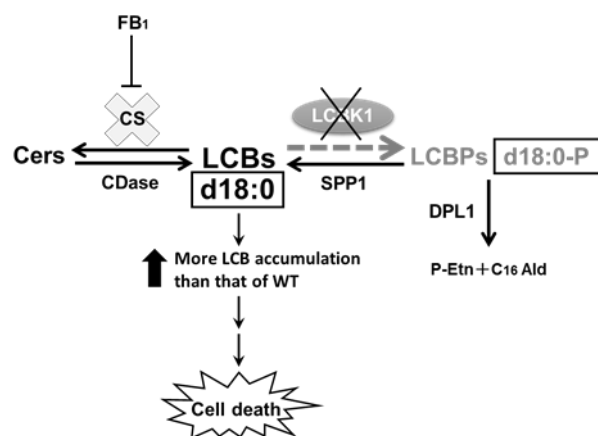


Fig. 20 シロイヌナズナにおける LCBK1 と FB₁ の関係

(A) LCBK1-OX における FB₁ 応答

(B) LCBK1-KD における FB₁ 応答

第三章 LCBK ファミリーにおけるアミノ酸配列の相同性比較と分子系統樹解析

序論

スフィンゴ脂質の中間代謝物の1つである LCBP は、様々な細胞内反応、及び生理機能に関わるシグナル分子として作用する生理活性脂質である[11-12]。LCBP は、長鎖塩基キナーゼによって合成され、この酵素は動物、微生物、植物に至るまで幅広く保存されていることがわかっている[30-31,134-136]。長鎖塩基キナーゼは、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼやジアシルグリセロールキナーゼのような脂質キナーゼファミリーに分類されている[137]。これまでに、長鎖塩基キナーゼファミリーには、C1、C2、C3、C4、C5 の5つの保存された機能ドメインを有していることが、アミノ酸の一次配列を用いた構造解析から明らかにされている[138-139]。C2 ドメインは、ATP 結合領域、C4 ドメインは基質認識に重要な領域である[138-139]。C1-C3、C5 ドメインはジアシルグリセロールキナーゼや CER にリン酸を付加させる酵素であるセラミドキナーゼにも高度に保存されているが、C4 ドメインは長鎖塩基キナーゼファミリー独自の保存された機能ドメインであることがわかっている[138-139]。

シロイヌナズナの LCBK には LCBK1 (At5g23450)、LCBK2 (At2g46090)、SPHK1 (At4g21450)、SPHK2 (At4g21534) の4つのホモログが存在する。これら4つの遺伝子は、ヒトやマウスのスフィンゴシンキナーゼ遺伝子を用いたホモロジー検索により、候補遺伝子として明らかにされ、発現タンパク質を用いた *in vivo* アッセイによって同定された[30-31, 38-39]。しかしながら、これらのシロイヌナズナ LCBK が他の植物だけでなく、動物、微生物の LCBK 遺伝子と比較してどのように進化してきたのかはまだ不明な点が多い。そこで本研究では、シロイヌナズナの LCBK1 が様々な生物の LCBK 遺伝子とどの程度保存されて、どのように進化してきたかを調べるために、アミノ酸配列を用いた相同性解析と分子系統樹解析を行った。

＜実験方法＞

1. LCBK のアミノ酸配列解析

LCBK ホモログのアミノ酸配列はNCBI、GenBank、JGIのデータベースから抽出した。アミノ酸配列は多重アラインメントプログラム（CLUSTAL W）を用いてアラインメントした[140]。アラインメントした LCBK ホモログのアミノ酸配列の類似性は、EsPript 3.0 プログラムを用いて確認した[141]。NCBI、GenBank、JGI のアミノ酸配列データの登録番号は以下の通りである: *Mus musculus* SPHK1, NP_001165944.1; *Mus musculus* SPHK2, NP_001166032.1; *Homo sapiens* SPHK1, AAF73423.1; *Homo sapiens* SPHK2, AAQ02408.1; *Oryzias latipes* SPHK, XP_011476505.1; *Oryzias latipes* SPHK, XP_011483655.1; *Danio rerio* SPHK1, XP_002667585.2; *Danio rerio* SPHK2, XP_009290770.1; *Ciona intestinalis* SPHK, XP_009858111.1; *Apis mellifera* SPHK, XP_394823.3; *Linepithema humile* SPHK, XP_012228731.1; *Drosophila melanogaster* SPHK1, AAF48045.1; *Drosophila melanogaster* SPHK2, AAF47706.3; *Caenorhabditis elegans* SPHK1, NP_001022017.1; *Aurantiochytrium limacinum* SPHK, gm1.4070_g; *Aplanochytrium kerguelense* SPHK, estExt_Genewise1.C_40029; *Saccharomyces cerevisiae* LCB4, NP_014814.1; *Saccharomyces cerevisiae* LCB5, NP_013361.1; *Oryza sativa* LCBK1, AAP54628.1; *Oryza sativa* SPHK1, BAD30563.1; *Oryza sativa* LCBK, NP_001048817.1; *Arabidopsis thaliana* LCBK1, BAB07787.1; *Arabidopsis thaliana* SPHK1, NP_193885.6; *Arabidopsis thaliana* SPHK2, NP_001190787.1; *Arabidopsis thaliana* LCBK2, NP_566064.1; *Arabidopsis lyrata* LCBK1, XP_002874132.1; *Lotus japonicas* LCBK1, BAD86587.1; *Glycine max* LCBK, XP_003524575.1; *Glycine max* SPHK, XP_003545841.1; *Solanum lycopersicum* LCBK, XP_004230034.1; *Solanum lycopersicum* SPHK, XP_004232808.1; *Cucumis sativus* LCBK, XP_004147089.1; *Cucumis sativus* SPHK, XP_004155653.1.

2. LCBK の分子系統解析

1. で用いたアミノ酸配列をもとに、MEGA6.0 を使用し、近隣結合法による分子系統樹を作成した[142-144]。

<結果>

LCBK ファミリーに属するタンパク質をコードする遺伝子配列は、植物以外でも動物、菌類、ラビリンチュラ類などの幅広い分類群でデータベース上に登録されており、ヒト、マウス、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエでは、シロイヌナズナと同様に *SPHK1* と *SPHK2* の 2 つのパラログが報告されている[134-135,145-147]。これまでに、LCBK ファミリーには 5 つの保存された機能ドメインがあることが報告されている[31,148]。今回、植物、動物、菌類、ラビリンチュラ類を含む 19 種の生物から 33 個の LCBK ファミリーのアミノ酸配列を取得し、配列を比較した。その結果、これらの機能ドメインの配列は、先行研究で報告されているように、よく保存されていることが示された (Fig. 21)。特に、C2 ドメインの ATP 結合部位と予想されている S/G-GDG モチーフは、33 タンパク質のすべてにおいて高度に保存されていることがわかった (Fig. 21)。C4 ドメインで基質の結合に重要とされているアミノ酸残基 (★印) は、動物、菌類、ラビリンチュラ類、陸上植物の SPHK ではアスパラギン酸であるのに対し、陸上植物の LCBK1 ではロイシンであった (Fig. 21)。これらの配列情報をもとに分子系統樹を作成した結果、LCBK ファミリーは、陸上植物 LCBK2、菌類 LCB、陸上植物 LCBK1、陸上植物 SPHK サブファミリー、ラビリンチュラ+動物 SPHK サブファミリーの 5 つに大きく分けられた (Fig. 22)。また、この系統樹からは、脊椎動物、ショウジョウバエ、シロイヌナズナで知られている SPHK1、SPHK2 と名付けられたパラログは、それぞれの系統で独立に生じたものであることが示唆された。さらに、陸上植物 LCBK1 は、陸上植物 LCBK2、陸上植物 SPHK サブファミリーと異なり、独立して生じていることも明らかとなった。

C1

ScLCB4	TLVILNP	HG	KK	GTAKN	LF	LT
ScLCB5	IFVILNP	FG	KK	GKAKK	LF	MT
MmSPHK1	VLVLNP	QG	KK	GKALQ	LF	QS
HsSPHK1	VLVLNP	RG	KK	GKALQ	LF	RS
MmSPHK2	LLILNP	FG	GR	GLAWQ	RC	MD
HsSPHK2	LLLLNP	FG	GR	GLAWQ	WC	KN
SPHK2_Oryzias_latipes	LLLLNP	FS	GR	QAMQW	QC	QT
DrSPHK2	LLLLNP	FS	GR	QAMQW	QC	QT
SPHK1_Oryzias_latipes	MLLLNP	QS	GR	QALAL	FN	NS
DrSPHK1	MLVLP	QS	GR	QAMAQ	YN	NG
SPHK_Ciona_intestinalis	YIVVNP	FS	QG	GKAVEM	YN	NG
SPHK_Apis_mellifera	LLVLLNP	KK	SG	GRSRE	TF	QK
SPHK_Linepithema_humile	LLVLLNP	KK	SG	AGRGRE	VF	QK
DmSPHK2	VLVLNP	KK	SG	GDARE	VN	FM
DmSPHK1	LLILNP	KK	SG	GKGRE	LF	QK
CeSPHK1	LLVFN	NP	SG	TKSLE	TF	AN
SPHK_Aurantiochytrium	LLVFN	NP	SG	GLGRSK	IK	WG
SPHK_Aplanochytrium	LLIFLNP	KK	SG	TQALP	IK	WK
AtSPHK1	LLVFN	NP	FG	KKTKARK	IF	QE
AtSPHK2	LLVFN	NP	FG	KKTKARK	IF	VE
SPHK1_Glycine_max	LLVFN	NP	FG	KKTKARK	IF	AE
SPHK1_Cucumis_sativus	LFVLNP	FG	KK	TGSK	IK	RD
SPHK1_Solanum_lycopersicum	LLVLLNP	YGG	SR	SAPK	VE	SD
OsSPHK1	LFII	NP	YGG	KRGGR	IK	QT
AtLCBK1	MLVILNP	RS	GH	GRS	IK	VE
AllCBK1	MLVILNP	RS	GH	GRS	IK	VE
LjLCBK1	MLVILNP	RS	GH	GRS	IK	VE
LCBK1_Glycine_max	MLVILNP	RS	GH	GRS	IK	VE
LCBK1_Cucumis_sativus	MLVILNP	RS	GH	GRS	IK	VE
LCBK1_Solanum_lycopersicum	MLVILNP	RS	GH	GRS	IK	VE
OsLCBK1	TLVILNP	RS	GH	GRS	IK	VE
OsLCBK2	FVFN	NP	SG	ANGRT	GN	QW
AtLCBK2	LVFN	NP	SG	ANGRT	AK	EW

C2

ScLCB4	YDTIACAS	GDG	TP	YEVING	GLY	RR	DR
ScLCB5	YDTIACAS	GDG	TP	YEVING	GLY	RR	DR
MmSPHK1	WDALAVMS	GDG	LM	HEVING	GLMER	PD	W
HsSPHK1	WDALVMS	GDG	LM	HEVING	GLMER	PD	W
MmSPHK2	WEGIVTVS	GDG	LL	YEVING	GLLDR	PD	W
HsSPHK2	WDGIVTVS	GDG	LL	HEVING	GLLDR	PD	W
SPHK2_Oryzias_latipes	WDGIVTVS	GDG	LL	HEVING	GLMER	PD	W
DrSPHK2	WDGIVTVS	GDG	LL	HEVING	GLMER	PD	W
SPHK1_Oryzias_latipes	WDALVIMS	GDG	LL	YEVING	GLLER	SD	W
DrSPHK1	WDALVIMS	GDG	LL	YEVING	GLMER	PD	W
SPHK_Ciona_intestinalis	CDGIIIVS	GDG	LL	HEVING	GLMER	KD	W
SPHK_Apis_mellifera	WSGLVMVG	GDG	IV	FEVING	GLFQR	PD	W
SPHK_Linepithema_humile	WSGLVMVG	GDG	IV	FEVING	GLFQR	PD	W
DmSPHK2	WCCVAVAG	GDG	LF	HEIVN	GLLQR	QD	W
DmSPHK1	YSGIVVAS	GDG	LF	YEVING	GLMER	MD	W
CeSPHK1	FNGVLIIS	GDG	LV	FEALN	GLCQR	EDA	W
SPHK_Aurantiochytrium	YKGIIVIS	GDG	LV	FEVING	GLMER	PD	W
SPHK_Aplanochytrium	FDGIIIVS	GDG	LL	HEVING	GLMER	PD	W
AtSPHK1	YDGIVCVS	GDG	LV	FEVING	GLLER	SD	W
AtSPHK2	YDGIVCVS	GDG	LV	FEVING	GLLER	SD	W
SPHK1_Glycine_max	YDGIVCVS	GDG	LV	FEVING	GLLER	SD	W
SPHK1_Cucumis_sativus	YDGIVCVS	GDG	LV	FEVING	GLLER	SD	W
SPHK1_Solanum_lycopersicum	YDGIVCVS	GDG	LV	FEVING	GLLER	SD	W
OsSPHK1	YDGIVCVS	GDG	LV	FEVING	GLLER	SD	W
AtLCBK1	SDGIIICVG	GDG	IV	NEVING	GLLTR	SN	P
AllCBK1	SDGIIICVG	GDG	IV	NEVING	GLLTR	SN	P
LjLCBK1	PDGIIICVG	GDG	IV	NEVING	GLLTR	SN	P
LCBK1_Glycine_max	PDGIIICVG	GDG	IV	NEVING	GLLTR	SN	P
LCBK1_Cucumis_sativus	PDGIIICVG	GDG	IV	NEVING	GLLTR	SN	P
LCBK1_Solanum_lycopersicum	PDGIIICVG	GDG	IV	NEVING	GLLTR	SN	P
OsLCBK1	PDGIIICVG	GDG	IV	NEVING	GLLTR	SN	P
OsLCBK2	ADAVI	AVG	GDG	TL	HEVING	GLLER	SD
AtLCBK2	ADAVI	AVG	GDG	TL	HEVING	GLLER	SD

C3

ScLCB4	VTQLP	CG	SG	NA	MS	IS	CS
ScLCB5	ITEIP	CG	SG	NA	MS	IS	CS
MmSPHK1	LCSLP	CG	SG	NA	LA	AS	VS
HsSPHK1	LCSLP	CG	SG	NA	LA	AS	VS
MmSPHK2	IGVLP	CG	SG	NA	LA	AG	AV
HsSPHK2	VGILP	CG	SG	NA	LA	AG	AV
SPHK2_Oryzias_latipes	VGILP	CG	SG	NA	LA	AG	AV
DrSPHK2	VGILP	CG	SG	NA	LA	AG	AV
SPHK1_Oryzias_latipes	LGILP	CG	SG	NA	LA	AS	VS
DrSPHK1	LGILP	CG	SG	NA	LA	AS	VS
SPHK_Ciona_intestinalis	IGIVP	CG	SG	NA	LA	AS	VS
SPHK_Apis_mellifera	LGIVP	CG	SG	NA	LA	AS	VS
SPHK_Linepithema_humile	LGIIIP	CG	SG	NA	LA	AS	VS
DmSPHK2	LGIIIP	CG	SG	NA	LA	AS	VS
DmSPHK1	LGIIIP	CG	SG	NA	LA	AS	VS
CeSPHK1	IGIVP	CG	SG	NA	LA	AS	VS
SPHK_Aurantiochytrium	IGVLP	CG	SG	NA	LA	AS	VS
SPHK_Aplanochytrium	FGIVP	AG	TG	NG	LA	TV	VL
AtSPHK1	IGMVP	AG	SG	NG	MI	KS	SL
AtSPHK2	IGMVP	AG	SG	NG	MI	KS	SL
SPHK1_Glycine_max	LGIVP	AG	TG	NG	MA	KS	SL
SPHK1_Cucumis_sativus	LGIVP	AG	TG	NG	MA	KS	SL
SPHK1_Solanum_lycopersicum	LGIVP	AG	TG	NG	MA	KS	SL
OsSPHK1	LGIIIP	AG	SG	NA	LA	AS	VS
AtLCBK1	IGIVP	AG	SD	NS	LV	WT	TV
AllCBK1	IGIVP	AG	SD	NS	LV	WT	TV
LjLCBK1	IGIIIP	AG	SD	NS	LV	WT	TV
LCBK1_Glycine_max	IGIIIP	AG	SD	NS	LV	WT	TV
LCBK1_Cucumis_sativus	IGIIIP	AG	SD	NS	LV	WT	TV
LCBK1_Solanum_lycopersicum	IGIIIP	AG	SD	NS	LV	WT	TV
OsLCBK1	IGIIIP	AG	SD	NS	LV	WT	TV
OsLCBK2	LGLIPL	LG	TG	SD	DE	AR	TE
AtLCBK2	LGLIPL	LG	TG	SD	DE	AR	TE

C4

ScLCB4	LSFL	LS	QTY	GV	IAES	DI	IN	TE	FI	WM	GP	VR	FN
ScLCB5	LSFL	LS	QTY	GV	IAES	DI	IN	TE	FI	WM	GP	VR	FN
MmSPHK1	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
HsSPHK1	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
MmSPHK2	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
HsSPHK2	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
SPHK2_Oryzias_latipes	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
DrSPHK2	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
SPHK1_Oryzias_latipes	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
DrSPHK1	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
SPHK_Ciona_intestinalis	YGVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
SPHK_Apis_mellifera	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
SPHK_Linepithema_humile	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
DmSPHK2	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
DmSPHK1	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
CeSPHK1	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
SPHK_Aurantiochytrium	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
SPHK_Aplanochytrium	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
AtSPHK1	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
AtSPHK2	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
SPHK1_Glycine_max	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
SPHK1_Cucumis_sativus	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
SPHK1_Solanum_lycopersicum	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
OsSPHK1	YSVLS	LS	WGF	VAD	VD	IE	SE	KY	RL	GE	AR	FT	VL
AtLCBK1	YGMT	VS	YGF	VS	DL	EL	SE	KY	KRF	GP	LR	YF	VL
AllCBK1	YGMT	VS	YGF	VS	DL	EL	SE	KY	KRF	GP	LR	YF	VL
LjLCBK1	YGLT	VS	YGF	VS	DL	EL	SE	KY	KRF	GP	LR	YF	VL
LCBK1_Glycine_max	YGLT	VS	YGF	VS	DL	EL	SE	KY	KRF	GP	LR	YF	VL
LCBK1_Cucumis_sativus	YGLT	VS	YGF	VS	DL	EL	SE	KY	KRF	GP	LR	YF	VL
LCBK1_Solanum_lycopersicum	YGLT	VS	YGF	VS	DL	EL	SE	KY	KRF	GP	LR	YF	VL
OsLCBK1	YGLT	VS	YGF	VS	DL	EL	SE	KY	KRF	GP	LR	YF	VL
OsLCBK2	YFVN	VAD	I	HL	SA	KAG	YF	SS	MY	KRF	GN	LC	YF
AtLCBK2	YFVN	VAD	I	HL	SA	KAG	YF	SS	MY	KRF	GN	LC	YF

C5

ScLCB4	F S V D G E K E
ScLCB5	F S V D G E K E
MmSPHK1	F S V D G E L M
HsSPHK1	F A V D G E L M
MmSPHK2	L T V D G E L V
HsSPHK2	L T V D G E Q V
SPHK2_Oryzias_latipes	L T V D G E L V
DrSPHK2	L T V D G E L V
SPHK1_Oryzias_latipes	I T V D G E V V
DrSPHK1	L T V D G E R V
SPHK_Ciona_intestinalis	M T V D G E L I
SPHK_Apis_mellifera	I T V D G E R V
SPHK_Linepithema_humile	I T V D G E E V
DmSPHK2	I T V D G E R V
DmSPHK1	L V V D G E R V
CeSPHK1	V V L D G E V V
SPHK_Aurantiochytrium	I A I D G E D V
SPHK_Aplanochytrium	I C I D G E A V
AtSPHK1	I D S D G E V I
AtSPHK2	I D S D G E V I
SPHK1_Glycine_max	I D S D G E V I
SPHK1_Cucumis_sativus	I D A D G E I L
SPHK1_Solanum_lycopersicum	I D V D G E V I
OsSPHK1	I D S D G E V I
AtLCBK1	C G I D G E L E
AlLCBK1	C G I D G E L E
LjLCBK1	C G I D G E L E
LCBK1_Glycine_max	C G I D G E L E
LCBK1_Cucumis_sativus	C G I D G E L E
LCBK1_Solanum_lycopersicum	C G I D G E L E
OsLCBK1	C G I D G E L E
OsLCBK2	V Q S D G E H E
AtLCBK2	V Q S D G E H E

Fig. 21 LCBK ファミリーにおける保存されたドメイン構造のアミノ酸一次配列

アミノ酸配列は多重アラインメントプログラム (CLUSTAL W) を用いて整列し、EsPript 3.0 を用いて解析した。同一のアミノ酸はマゼンタ、類似のアミノ酸はオレンジで示している。C2 ドメインの実線は ATP と基質の結合部位を示しており、▼印は ATP 結合に重要な残基を示している。C4 ドメインの★印は基質の結合に重要な残基を示している。略名は以下の通りである：

Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Mm, *Mus musculus*; Hs, *Homo sapiens*; Dr, *Danio rerio*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; At, *Arabidopsis thaliana* Os, *Oryza sativa*; Al, *Arabidopsis lyrata*; Lj, *Lotus japonicus*.

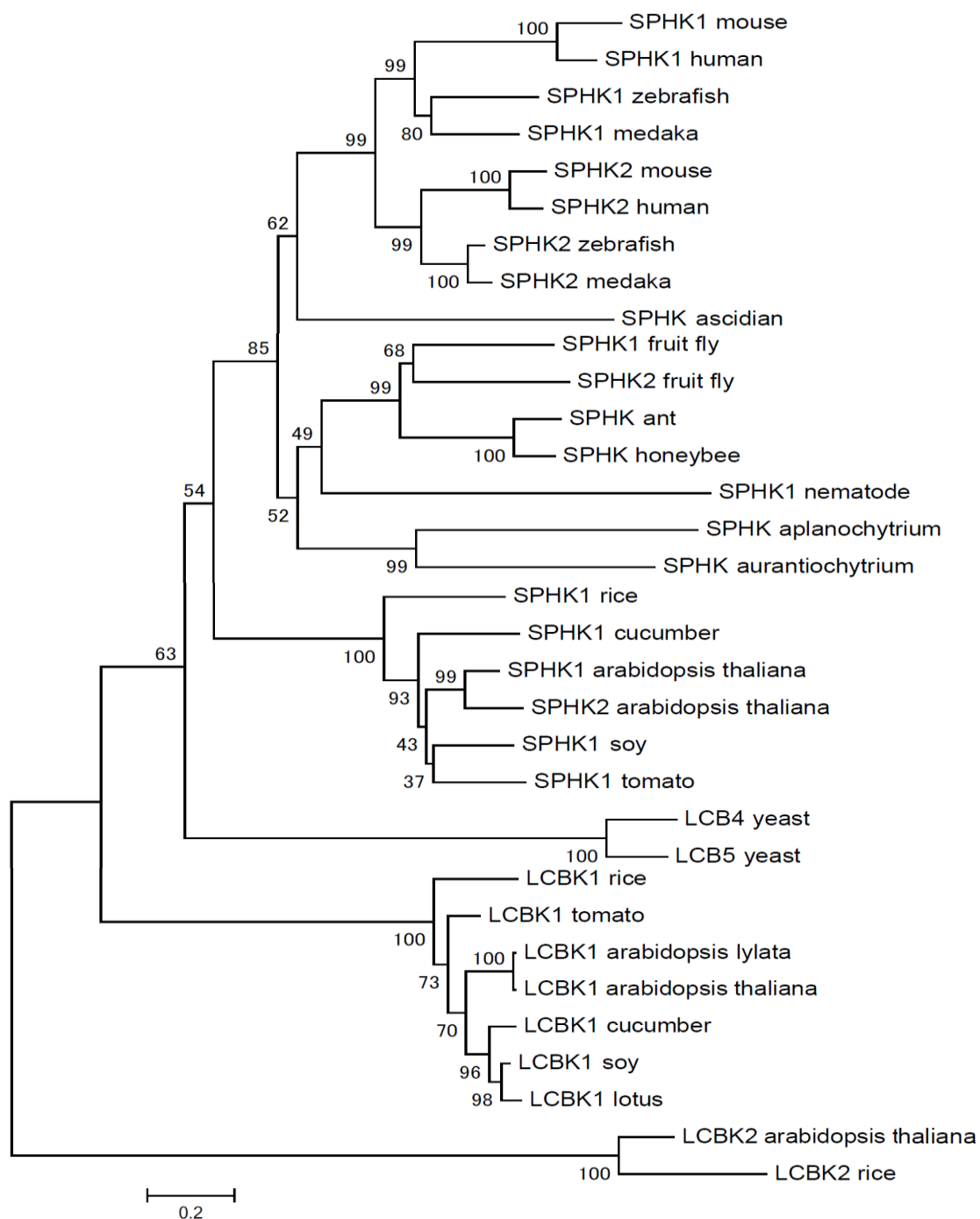


Fig. 22 LCBK ファミリーの分子系統樹

分子系統樹は MEGA6.0 を使用し、CLUSTAL W で整列させたアミノ酸配列のデータを用いて近隣結合法で作成した。分岐の信頼度はブートストラップ法を用いて検定した。節の上の数字は 1000 回の反復で得られたブートストラップ値を示す。部位あたり 0.2 回のアミノ酸置換に相当する枝の長さをスケールバーで示した。

<考察>

これまでに、LCBK ファミリーが幅広い分類群で見つかっており、今回の研究でそのアミノ酸配列が高度に保存されていることから、LCBK ファミリーの機能の重要性が示唆された。陸上植物+ラビリンチュラ+動物 SPHK サブファミリーでは、これらの分岐は生物の系統関係を反映していた。そのため、SPHK サブファミリーが幅広い分類群で共通した機能をもつことが考えられる。また、脊椎動物とショウジョウバエ、シロイヌナズナの SPHK1 と SPHK2 はオーソログではなく、それぞれの分類群で遺伝子重複により独立に生じたことが示された。これらのうち、ショウジョウバエとシロイヌナズナの SPHK1 と SPHK2 は、それぞれ昆虫、陸上植物の他種の SPHK に対するよりも、同種のパラログ間で最も近縁であることが示されており、比較的最近の遺伝子重複により生じたものであることが推測される (Fig. 22)。一方、脊椎動物の SPHK1 と SPHK2 は、ホヤと脊椎動物の分岐後に脊椎動物の初期進化の過程で生じたものであると考えられる (Fig. 22)。脊椎動物の進化の過程で SPHK1 と SPHK2 がよく保存されていることは、各パラログに特有の機能の重要性を示唆している。

これまでに、マウスの *SPHK1* と *SPHK2* のダブルノックアウトミュータントは血管と神経の発生異常のために胚性致死になることがわかっている[149]。また、キイロショウジョウバエの *SPHK1* と *SPHK2* のダブルノックアウト個体は致死になることがわかっており、*SPHK2* のシングルミュータントでは飛行能力の低下と排卵の異常をもたらす[150]。一方、マウス、ショウジョウバエにおける *SPHK1* あるいは *SPHK2* のシングルミュータントは生存できることから、この2つの遺伝子はいくつかの機能的な重複性をもっていることが示唆されている[149-150]。ゼブラフィッシュにおいて、母系性と接合子性の両方の *SPHK2* 遺伝子産物が供給されない *SPHK2* ノックアウトミュータント胚では、二又心臓になることから、*SPHK2* は心臓の発生に不可欠であることが示唆された[151]。このように、*SPHK1* と *SPHK2* が多様な分類群や組織で、発生過程や生殖など様々な機能に関与していることから、SPHK サブファミリーがそれぞれの分類群で機能分化していることがわかる。

LCBK1 と LCBK2 の2つのサブファミリーは、陸上植物+ラビリンチュラ+動物 SPHK サブファミリーよりも系統樹上で離れており、これまでに陸上植物以外で見つからないことから、これらは陸上植物の系統で独立に進化したといえる。分子系統樹上で他のサブファミリーから最も遠く離れている LCBK2 は、ほかの LCBK のホモログと比べてあまり研究が進んでいなかった。最近、シロイヌナズナにおいて、低温ストレス (22°C

から 4℃) にさらすと t18:0-P が合成され、一過的に蓄積することがわかっている[44]。この現象に関わる遺伝子は、*SPHK1* ではなく、*LCBK2* が低温応答における t18:0-P の生産に必要であることが示唆された[44]。したがって、*LCBK2* は低温にさらしたときのみ発現する遺伝子であり、その機能がシロイヌナズナで知られている他のホモログには見られないことから、陸上植物が低温環境に適応する過程で独自に獲得された遺伝子の 1 つであると考えられる。したがって、*LCBK* は陸上植物における脂質代謝調節の機能、および多様性を考える上で重要な遺伝子といえる。*LCBK2* と同様に、*LCBK1* の進化も大変興味深い、その機能は本研究で用いられたシロイヌナズナ以外での植物ではあまり知られていない。今後、様々な植物種で *LCBK1* の機能解析が進むことで、その重要性和進化的な背景が理解できるだろう。

マウス *SPHK1* 遺伝子を用いた *in vitro* 実験で、基質認識の場所として予想されている C4 ドメインの 177 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換すると、*SPHK1* 活性が減少したことから、177 番目のアスパラギン酸が基質認識に関与することが報告されている[138]。しかし、177 番目を置換しただけでは *SPHK* 活性は完全に消失しないことから、C4 ドメイン内の違うアミノ酸残基、あるいはそれ以外のドメインに基質認識に重要な部位が存在することが示唆された[138]。さらに、ヒト *SPHK1* 遺伝子においても 178 番目のアスパラギン酸がスフィンゴシンの基質認識に重要であることが示唆されている。また、178 番目のアスパラギン酸とともに、81 番目のアスパラギン酸と 168 番目のセリンがそれぞれスフィンゴシンの水酸基とアミノ基の部分と水素結合して相互作用を形成することが、基質結合を安定化させるのに重要であることがわかっている[139] (Fig. 23)。

以前の研究で、このモチーフの 82 番目のグリシンは ATP の結合に関わることが報告されているが、81 番目のアスパラギン酸の触媒作用がわかっていない[152]。最近、ヒト *SPHK1* における結晶構造解析の研究で、アスパラギン酸をアラニンに置換すると、ATP の加水分解とリン酸基の転移に対する活性が著しく減少することから、81 番目のアスパラギン酸は基質へのリン酸基の転移反応に重要であることが示され、*SPHK1* の触媒作用に決定的な残基であることが明らかになった[139]。したがって、C2 ドメインの S⁷⁹GDG⁸²モチーフが ATP と基質の両者との結合に重要な役割を有することが示唆された[139]。実際に、33 種の *LCBK* ファミリーのアミノ酸配列を比較したところ、C2 ドメインの S/G-GDG モチーフは、これらすべての *LCBK* ファミリータンパク質において保存されていることがわかった (Fig. 21)。一方、C4 ドメインで基質の結合に重要とさ

れている部位が、動物、菌類、ラビリンチュラ類、陸上植物 SPHK ではアスパラギン酸であるのに対し、陸上植物 LCBK1 ではロイシンである (Fig. 21)。植物における LCBK1 の基質カイネティクスについてはほとんど解析が進んでおらず、アミノ酸残基の違いが基質認識にどのように影響をもたらすかは不明である。興味深いことに、大腸菌の組換えタンパク質を用いた LCBK1 の基質特異性を調べたところ、d18:0 を基質として好むことがわかっている[31]。一方、LCBK のホモログである LCBK2、SPHK1、SPHK2 は t18:0 を好む[40]。第二章で、FB₁ 処理したサンプルを LC-MS/MS 分析すると、ジヒドロキシ LCB・LCBP が蓄積することが明らかになり、これらの代謝物の増減が細胞死の程度と相関している。したがって、LCBK1 が FB₁ 条件下における LCB から LCBP への変換を担っており、ジヒドロキシ LCBP が植物免疫応答におけるシグナリングに重要な生理活性分子かもしれない。今後、LCBK1 の結晶構造解析と保存されたモチーフに存在するアミノ酸置換による動態解析を組み合わせることで、LCBK1 の機能解明につながるだろう。

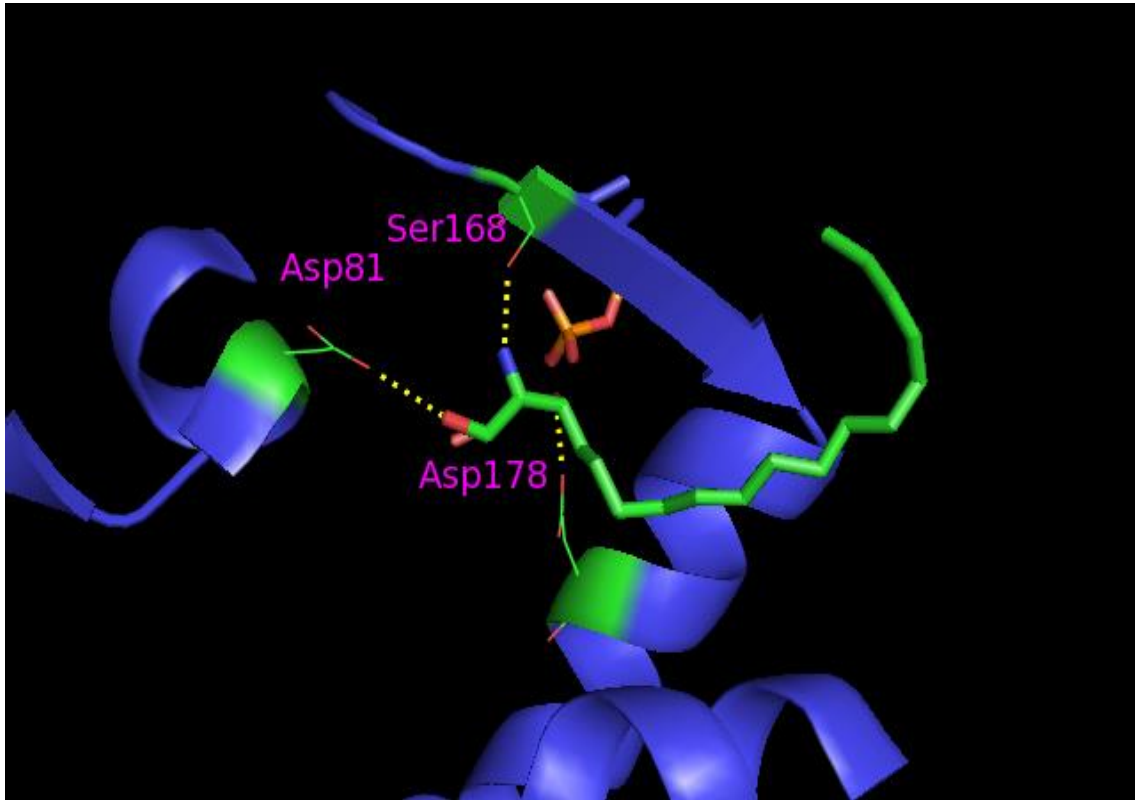


Fig. 23 ヒト SPHK1 における LCB 結合モデル

LCB-HsSPHK1 複合体 3D モデルの作製は、PyMol を用いて行った。SPHK1 の側鎖は、細い棒状で示した (Asp81, Ser168 and Asp178)。水素結合は、黄色の破線で示した。

＜総合考察＞

本研究では、シロイヌナズナのスフィンゴ脂質代謝における LCB キナーゼ 1 (LCBK1) の生理的役割を明らかにすることを目的とした。第一章では、生体内で極微量成分である LCBP を、LC-MS/MS を用いて定量する方法を確立した。第二章では、LCBK1 の過剰発現株とノックダウン株を用いて FB₁ 処理によってもたらされる表現型と LC-MS/MS を用いた LCB および LCBP の分子種組成の関連性を調べた。その結果、LCBP 代謝が FB₁ 誘導細胞死の制御に重要であることが明らかになった。第三章では、LCBK1 がどのように進化してきたかをアミノ酸の一次配列を用いた相同性解析と分子系統樹解析を行った。その結果、*LCBK1* は同じシロイヌナズナ LCBK ファミリーに属する *SPHK1*、*SPHK2* 遺伝子とは独立して生じたことが明らかとなった。

細胞膜には、スフィンゴ脂質やステロール脂質を主成分とする膜脂質の不均一分布（特定の区画）が存在し、これはマイクロドメイン（脂質ラフト）と呼ばれている。マイクロドメインは、膜タンパク質との相互作用に重要な足場となり、細胞の情報伝達、膜輸送、病原菌の侵入など、様々な細胞機能に関与していることが示唆されている[9-10]。最近、CER 骨格のアシル鎖部分における α 水酸化を触媒する酵素 FA2H は、シロイヌナズナやイネの耐病性と関係することが報告されている[153-154]。スフィンゴ脂質の大半を占める GlcCer や GIPC は、マイクロドメインの主要な構成成分と考えられているが、マイクロドメインはダイナミックに膜中で配置を変えており、さらに大きな極性基を持たない CER 分子は、膜の裏側から表側へとフリップフロップすることも可能である。このダイナミクスの一端は、スフィンゴ脂質代謝における GlcCer や GIPC 合成と分解の過程で生じると考えられるが、いまだに分からないことが多い。興味深いことに、FB₁ 処理した植物サンプルを LC-MS/MS で分析したところ、8-不飽和の LCB が検出されることが本研究で明らかとなった。したがって、スフィンゴ脂質の分解系で生じた遊離 LCB や LCBP が病原菌に対する植物免疫反応の細胞情報、あるいは ABA を介した気孔開閉の細胞情報に貢献するのではないかと考えられる。しかし、LCB から複合スフィンゴ脂質の合成に関わる酵素遺伝子は同定されているが、複合スフィンゴ脂質の分解に関わる酵素遺伝子は、ほとんど同定されていない。最近、GIPC を CER1-リン酸に加水分解する GIPC 特異的ホスホリパーゼ D (GIPC-PLD) 活性が、アブラナ科の根、緑化していない葉や茎にあることがわかっている[155]。モヤシや長ネギの白い葉の部分でも GIPC-PLD 活性が検出されているが、この GIPC-PLD をコードする遺伝子は、まだ

見つかっていない[156]。興味深いことに、動物において、SM や GlcCer のアシル基を加水分解してサイコシン（ガラクトシルセラミド分解由来のリゾ型スフィンゴ脂質）のような代謝物を生じさせるデアシラーゼ遺伝子が同定されている[157-158]。最近、GlcCer を合成できないミュータント (*gcs-1*) にグルコサイコシン (d18:1 タイプの LCB にグルコースが結合したもの) を添加することによって、合成機能が相補されるという報告がある[23]。つまり、GlcCer から CER、最終的に LCB へと分解する経路のほかに、GlcCer からグルコサイコシンに分解するという別の経路が、植物にも存在することが予想される。しかしながら、複合スフィンゴ脂質の分解系がどのように *de novo* 合成経路、および異化代謝経路で生じる代謝物のバランスを維持しているかは不明である。将来的に、複合スフィンゴ脂質の分解経路と LCBP 代謝との関係性を調べることで、植物の生命活動におけるスフィンゴ脂質の意義がわかるかもしれない。今後、植物で GlcCer と GIPC 経由の分解経路に関わる酵素遺伝子が同定されることを期待したい。

本研究では、FB₁ 誘導細胞死は LCBP 代謝に依存し、LCBK1 は LCBP 代謝に重要な役割があることがわかった。したがって、LCBK1 はこれらの分子メカニズムを解明するためのキープレイヤーになると考えられる。しかし、病原菌とスフィンゴ脂質の関係性を調べた研究は、主に双子葉植物で行われており、単子葉植物ではほとんどされておらず、スフィンゴ脂質と免疫応答を解明するための架け橋となる知見が少ない。今後、双子葉植物だけでなく、植物と微生物の研究でよく用いられており、単子葉植物であるイネを用いてスフィンゴリピドミックスの観点から解析したいと考えている[159]。

シロイヌナズナにおけるスフィンゴ脂質代謝に関わる酵素の多くは、小胞体、ゴルジ装置に局在していることがわかっている[160]。ところが、LCBK のホモログである SPHK1 と SPHK2 は液胞膜に局在することが、*Nicotiana benthamiana*、あるいはシロイヌナズナを用いた細胞内局在解析から明らかとなった[39]。一方、LCBK1 の細胞内局在は明らかになっていないが、最近、植物に対して強力な先天性免疫応答を誘導するエリシター（植物誘引物質）として作用するフラジェリンペプチド (flg22) を処理したシロイヌナズナ培養細胞から細胞膜を単離して、LC-MS/MS で定量的プロテオーム解析すると、LCBK1 の活性が上昇することがわかっている[161]。興味深いことに、動物の SPHK1 は、細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK1/2) によって 225 番目のセリンがリン酸化されると、局在場所が細胞質から細胞膜へ移行することがわかっている[162-163]。さらに、細胞内のサイトカインを産生させることができるホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート (PMA) をヒト胎児腎細胞 (HEK293) に処理すると、SPHK1 はマイクロドメイ

ンに再局在化することが DRM 画分を用いた研究からわかっている[164-165]。これらのタンパク質解析の知見から、LCBK1 も細胞膜に局在すると考えられるが、まだ明らかにされていない。したがって、LCBK1 のオープンリーディングフレームの上流または下流に GFP を連結させたコンストラクトをアグロバクテリウムに形質転換し、タバコの表皮細胞を用いた一過性発現法により、細胞内局在を特定することが必要である。また、シロイヌナズナの葉から抽出した細胞成分画分をイムノブロットし、一過性発現法の結果と比較することで、LCBK1 の細胞内局在を明らかにしたい。これらを踏まえて、LCBK1 が様々な細胞機能を制御するマイクロドメインにどのように関与するかを調べるための指標となり、大変興味深い。もし、LCBK1 が細胞膜中のマイクロドメインに局在するならば、小胞体での *de novo* 合成によって生じた遊離 LCB をリン酸化するのではなく、GlcCer、GIPC の分解から生じた遊離 LCB を基質として使われることが予想される。しかしながら、第二章で示したように、FB₁ 処理によって蓄積された LCB と LCBP は細胞膜ではなく、主に小胞体で合成されたものであると考えられる。さらに、SPP1 と DPL1 は小胞体に局在することから、LCBK1 の局在場所に矛盾が生じる。興味深いことに、シロイヌナズナの細胞内プロテオミクスデータベース (SUBA3) 上では[166]、シグナルペプチドや膜貫通領域がないことが示されている。また、LCBP は細胞内シグナリングに関わる生理活性脂質である。このことから、LCBK1 は FB₁ にさらされると、細胞質に移行するのではないかと考えられる。今後、FB₁ 処理した時の LCBK1 の細胞内局在性を明らかにしたい。FB₁ を分泌するフザリウム属のような死体栄養性の病原菌は、宿主に細胞死を起こさせ、死んだ細胞から栄養を吸収することで生存をはかっている。植物の病気の原因の大半はカビであるが、植物のカビに対する植物の免疫機構は細菌やウイルスに比べて進んでおらず、いまだ不明な点が多い。将来的に、植物免疫の分子メカニズムをスフィンゴ脂質代謝の観点から解明し、実用植物を病害から護ることができる技術を開発したい。

第三章で前述したように、C4 ドメインの基質認識に重要な 178 番目のアミノ酸残基が、SPHK ではアスパラギン酸であるのに対し、LCBK1 ではロイシンである。SPHK1 は主としてトリヒドロキシ型の LCB を基質とするが、LCBK1 はジヒドロキシ型の LCB に対して基質特異性が高いことが示唆されている[31,39]。最近、ヒト SPHK1 の結晶構造解析で、SPHK1 はスフィンゴ脂質の構造の特徴である水酸基およびアミノ基を有する頭部と、炭化水素鎖を有する尾部を認識し、スフィンゴシンと結合するメカニズムが提唱された[139]。しかし、ヒト SPHK1 がどのように頭部を認識しているのかの詳細は

いまだ不明である[167]。動物の LCB は主にスフィンゴシンであるが、植物はスフィンゴシンの他に、8-不飽和ジヒドロキシ、およびトリヒドロキシ LCB、4,8-不飽和ジヒドロキシ LCB が存在し、LCB 構造の多様性が見られる。植物におけるこのような LCB の構造多様性を LCBK1 がどのように認識しているのかは大変興味深い。今後、基質認識に重要なアミノ酸残基を違うアミノ酸残基に置換した時、発現タンパク質の活性、基質選択性にどのような影響を及ぼすかを解析していきたい。

植物細胞内における LCBK1 の役割を図に示した (Fig. 24)。植物が生物あるいは非生物的なストレスにさらされたとき、細胞膜上のスフィンゴ脂質代謝が活性化され、細胞膜近辺あるいは細胞質に局在する LCBK1 がスフィンゴ脂質代謝における異化経路を制御することで、様々な病原菌に対する植物防御応答のシグナリングや、気孔開閉応答などといった分子機構に貢献するのではないかと予想される。今後、ゲノム編集技術で作製したスフィンゴ脂質代謝を改変した植物を用いて、質量分析を基盤としたスフィンゴリピドミクス、プロテオミクス、細胞内局在、結晶構造解析など生理・生化学的な機能解析を行うことで、スフィンゴ脂質代謝の LCBK1 の重要性が明らかになり、植物のスフィンゴ脂質研究の進展につながるだろう。

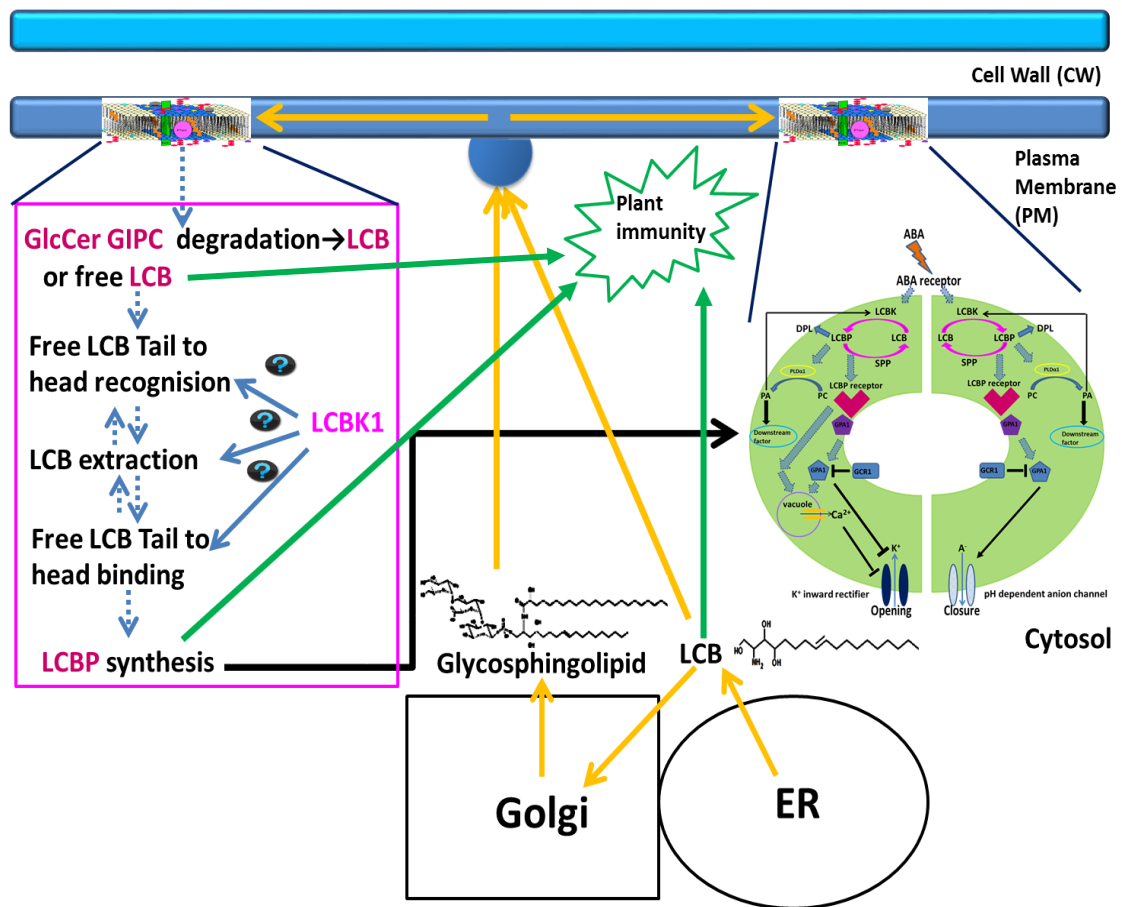


Fig. 24 植物細胞における LCBK1 の役割を示した模式的なモデル

<謝辞>

本研究をするにあたり、終始懇切なご指導、助言をしてくださいました今井博之先生に深謝申し上げます。また、研究に協力してもらい、たくさんの助言をしていただきました甲南大学植物細胞生物学区研究室の西村いくこ教授、京都大学理学部植物分子細胞生物学区研究室の田村謙太郎助教、埼玉大学大学院理工学研究科環境科学・社会基盤部門の川合真紀教授、石川寿樹助教、甲南大学植物細胞工学区研究室の学生の方々に厚くお礼を申し上げます。

< 参考文献 >

1. Dunn, T. M., Lynch, D. V., Michaelson, L. V., and Napier, J. A. (2004) A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot.* **93**, 483–497
2. Lynch, D. V., Chen, M., and Cahoon, E. B. (2009) Lipid signaling in *Arabidopsis*: no sphingosine? No problem! *Trends Plant Sci.* **14**, 463–466
3. Zäuner, S., Ternes, P., and Warnecke, D. (2010) Biosynthesis of sphingolipids in plants (and some of their functions). *Adv Exp Med Biol.* **688**, 249–263
4. Pata, M. O., Hannun, Y. A., and Ng, C. K. (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol.* **185**, 611–630
5. Markham, J. E., Lynch, D. V., Napier, J. A., Dunn, T. M., and Cahoon, E. B. (2013) Plant sphingolipids: function follows form. *Curr Opin Plant Biol.* **16**, 350–357
6. Carter, H. E., Hendry, R. A., Nojima, S., Stanacev, N. Z., and Ohno, K. (1961) Biochemistry of the sphingolipids. XIII. Determination of the structure of cerebrosides from wheat flour. *J Biol Chem.* **236**, 1912–916
7. Borner, G. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N. D., Macaskill, A., Napier, J. A., Beale, M. H., Lilley, K. S., and Dupree, P. (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.* **137**, 104–116
8. Cacas, J. L., Buré, C., Grosjean, K., Gerbeau-Pissot, P., Lherminier, J., Rombouts, Y., Maes, E., Bossard, C., Gronnier, J., Furt, F., Fouillen, L., Germain, V., Bayer, E., Cluzet, S., Robert, F., Schmitter, J. M., Deleu, M., Lins, L., Simon-Plas, F., and Mongrand, S. (2016) Revisiting Plant Plasma Membrane Lipids in Tobacco: A Focus on Sphingolipids. *Plant*

9. Simon-Plas, F., Perraki, A., Bayer, E., Gerbeau-Pissot, P., and Mongrand, S. (2011) An update on plant membrane rafts. *Curr Opin Plant Biol.* **14**, 642–649
10. 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
11. Chalfant, C. E., and Spiegel, S. (2005) Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J Cell Sci.* **118**, 4605–4612
12. Strub, G. M., Maceyka, M., Hait, N. C., Milstien, S., and Spiegel, S. (2010) Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv Exp Med Biol.* **688**, 141–155
13. Tamura, K., Mitsuhashi, N., Hara-Nishimura, I., and Imai, H. (2001) Characterization of an Arabidopsis cDNA encoding a subunit of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1274–1281
14. Chen, M., Han, G., Dietrich, C. R., Dunn, T. M., and Cahoon, E. B. (2006) The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the Arabidopsis LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell* **18**, 3576–3593
15. Chao, D. Y., Gable, K., Chen, M., Baxter, I., Dietrich, C. R., Cahoon, E. B., Guerinot, M. L., Lahner, B., Lü, S., Markham, J. E., Morrissey, J., Han, G., Gupta, S. D., Harmon, J. M., Jaworski, J. G., Dunn, T. M., and Salt, D. E. (2011) Sphingolipids in the root play an important role in regulating the leaf ionome in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell.* **23**, 1061–1081
16. Chen, M., Markham, J. E., Dietrich, C. R., Jaworski, J. G., and Cahoon, E. B. (2008)

Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 1862–1878

17. Chen, M., Markham, J. E., and Cahoon, E. B. (2012) Sphingolipid $\Delta 8$ unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in Arabidopsis. *Plant J.* **69**, 769–781
18. Markham, J. E., Molino, D., Gissot, L., Bellec, Y., Hématy, K., Marion, J., Belcram, K., Palauqui, J. C., Satiat-Jeunemaître, B., and Faure, J. D. (2011) Sphingolipids containing very-long-chain fatty acids define a secretory pathway for specific polar plasma membrane protein targeting in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**, 2362–2378
19. Ternes, P., Feussner, K., Werner, S., Lerche, J., Iven, T., Heilmann, I., Riezman, H., and Feussner, I. (2011) Disruption of the ceramide synthase LOH1 causes spontaneous cell death in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.* **192**, 841–854
20. Nagano, M., Ihara-Ohori, Y., Imai, H., Inada, N., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., and Kawai-Yamada, M. (2009) Functional association of cell death suppressor, Arabidopsis Bax inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome b₅. *Plant J.* **58**, 122–134
21. Nagano, M., Takahara, K., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., and Kawai-Yamada, M. (2012) Arabidopsis sphingolipid fatty acid 2-hydroxylases (AtFAH1 and AtFAH2) are functionally differentiated in fatty acid 2-hydroxylation and stress responses. *Plant Physiol.* **159**, 1138–1148
22. Nagano, M., Uchimiya, H., and Kawai-Yamada, M. (2012) Plant sphingolipid fatty acid 2-hydroxylases have unique characters unlike their animal and fungus counterparts. *Plant Signal Behav.* **7**, 1388–1392
23. Msanne, J., Chen, M., Luttgeharm, K. D., Bradley, A. M., Mays, E. S., Paper, J. M., Boyle,

- D. L., Cahoon, R. E., Schrick, K., and Cahoon, E. B. (2015) Glucosylceramides are critical for cell-type differentiation and organogenesis, but not for cell viability in Arabidopsis. *Plant J.* **84**, 188–201
24. Wang, W., Yang, X., Tangchaiburana, S., Ndeh, R., Markham, J. E., Tsegaye, Y., Dunn, T. M., Wang, G. L., Bellizzi, M., Parsons, J. F., Morrissey, D., Bravo, J. E., Lynch, D. V., and Xiao, S. (2008) An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 3163–3179
 25. Rennie, E. A., Ebert, B., Miles, G. P., Cahoon, R. E., Christiansen, K. M., Stonebloom, S., Khatab, H., Twell, D., Petzold, C. J., Adams, P. D., Dupree, P., Heazlewood, J. L., Cahoon, E. B., and Scheller, H. V. (2013) Identification of a sphingolipid α -glucuronosyltransferase that is essential for pollen function in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**, 3314–3325
 26. Mortimer, J. C., Yu, X., Albrecht, S., Sicilia, F., Huichalaf, M., Ampuero, D., Michaelson, L. V., Murphy, A. M., Matsunaga, T., Kurz, S., Stephens, E., Baldwin, T. C., Ishii, T., Napier, J. A., Weber, A. P., Handford, M. G., and Dupree, P. (2013) Abnormal glycosphingolipid mannosylation triggers salicylic acid-mediated responses in Arabidopsis. *Plant Cell.* **25**, 1881–1894
 27. Chen, L. Y., Shi, D. Q., Zhang, W. J., Tang, Z. S., Liu, J., and Yang, W. C. (2014) The Arabidopsis alkaline ceramidase TOD1 is a key turgor pressure regulator in plant cells. *Nat Commun.* **6**, 6030
 28. Wu, J. X., Li, J., Liu, Z., Yin, J., Chang, Z. Y., Rong, C., Wu, J. L., Bi, F. C., and Yao, N. (2015) The Arabidopsis ceramidase AtACER functions in disease resistance and salt tolerance. *Plant J.* **81**, 767–780
 29. Li, J., Bi, F. C., Yin, J., Wu, J. X., Rong, C., Wu, J. L., and Yao, N. (2015) An Arabidopsis neutral ceramidase mutant *ncer1* accumulates hydroxyceramides and is sensitive to oxidative stress. *Front Plant Sci.* **6**, 460

30. Nishiura, H., Tamura, K., Morimoto, Y., and Imai, H. (2000). Characterization of sphingolipid long-chain base kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Soc Trans.* **28**, 747–748
31. Nishiura, H., and Imai, H. (2005) Phosphorylation of sphingoid long-chain bases in *Arabidopsis*: functional characterization and expression of the first sphingoid long-chain base Kinase gene in plants. *Plant Cell Physiol.* **46**, 375–80
32. Nakagawa, N., Kato, M., Takahashi, Y., Shimazaki, K., Tamura, K., Tokuji, Y., Kihara, A., and Imai, H. (2012) Degradation of long-chain base 1-phosphate (LCBP) in *Arabidopsis*: functional characterization of LCBP phosphatase involved in the dehydration stress response. *J Plant Res.* **125**, 439–449
33. Tsegaye, Y., Richardson, C. G., Bravo, J. E., Mulcahy, B. J., Lynch, D. V., Markha, J. E., Jaworski, J. G., Chen, M., Cahoon, E. B., and Dunn, T. M. (2007) *Arabidopsis* mutants lacking long chain base phosphate lyase are fumonisin-sensitive and accumulate trihydroxy-18:1 long chain base phosphate. *J Biol Chem.* **282**, 28195–28206
34. Nishikawa, M., Hosokawa, K., Ishiguro, M., Minamioka, H., Tamura, K., Hara-Nishimura, I., Takahashi, Y., Shimazaki, K., and Imai, H. (2008) Degradation of sphingoid long-chain base 1-phosphates (LCB-1Ps): functional characterization and expression of AtDPL1 encoding LCB-1P lyase involved in the dehydration stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1758–1763
35. Kihara, A. (2013) Sphingosine 1-phosphate is a key metabolite linking sphingolipids to glycerophospholipids. *Biochim Biophys Acta.* **1841**, 766–772
36. Kondo, N., Ohno, Y., Yamagata, M., Obara, T., Seki, N., Kitamura, T., Naganuma, T., and Kihara, A. (2014) Identification of the phytosphingosine metabolic pathway leading to odd-numbered fatty acids. *Nat Commun.* **5**, 5338

37. Crowther, G. J., and Lynch, D. V. (1997) Characterization of sphinganine kinase activity in corn shoot microsomes. *Arch Biochem Biophys.* **337**, 284–290
38. Worrall, D., Liang, Y. K., Alvarez, S., Holroyd, G. H., Spiegel, S., Panagopulos, M., Gray, J. E., and Hetherington, A. M. (2008) Involvement of sphingosine kinase in plant cell signalling. *Plant J.* **56**, 64–72
39. Guo, L., Mishra, G., Taylor, K., and Wang, X. (2011) Phosphatidic acid binds and stimulates Arabidopsis sphingosine kinases. *J Biol Chem.* **286**, 13336–13345
40. Guo, L., Mishra, G., Markham, J. E., Li, M., Tawfall, A., Welti, R., and Wang, X. (2012) Connections between sphingosine kinase and phospholipase D in the abscisic acid signaling pathway in Arabidopsis. *J Biol Chem.* **287**, 8286–8296
41. Ng, C. K., Carr, K., McAinsh, M. R., Powell, B., and Hetherington, A. M. (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature.* **410**, 596–599
42. Coursol, S., Le Stunff, H., Lynch, D. V., Gilroy, S., Assmann, S. M., and Spiegel, S. (2005) Arabidopsis sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture. *Plant Physiol.* **137**, 724–737
43. Wu, J., Qin, X., Tao, S., Jiang, X., Liang, Y. K., and Zhang, S. (2014) Long-chain base phosphates modulate pollen tube growth via channel-mediated influx of calcium. *Plant J.* **79**, 507–516
44. Dutilleul, C., Benhassaine-Kesri, G., Demandre, C., Rézé, N., Launay, A., Pelletier, S., Renou, J. P., Zachowski, A., Baudouin, E., and Guillas, I. (2012) Phytosphingosine-phosphate is a signal for AtMPK6 activation and Arabidopsis response to chilling. *New Phytol.* **194**, 181–191

45. Teng, C., Dong, H., Shi, L., Deng, Y., Mu, J., Zhang, J., Yang, X., and Zuo, J. (2008) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme for de novo synthesis of sphingolipids, is essential for male gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **146**, 1322–1332
46. Dietrich, C. R., Han, G., Chen, M., Berg, R. H., Dunn, T. M., and Cahoon, E. B. (2008) Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J.* **54**, 284–298
47. Greenberg J. T. (1996) Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 12094–12097
48. Pennell, R. I., and Lamb, C. (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell.* **9**, 1157–1168
49. Morel, J. B., and Dangl, J. L. (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ.* **4**, 671–683
50. Beers, E. P., McDowell, J. M. (2001) Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr Opin Plant Biol.* **4**, 561–567
51. Greenberg, J. T., and Ausubel, F. M. (1993) Arabidopsis mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. *Plant J.* **4**, 327–341
52. He, S. Y., Huang, H. C., and Collmer, A. (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell.* **73**, 1255–1266
53. Gilchrist, D. G. (1998) Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annu Rev Phytopathol.* **36**, 393–414

54. Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*. **305**, 855–858
55. Coll, N. S., Epple, P., and Dangl, J. L. (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ*. **18**, 1247–1256
56. Igarashi, D., Bethke, G., Xu, Y., Tsuda, K., Glazebrook, J., and Katagiri, F. (2013) Pattern-triggered immunity suppresses programmed cell death triggered by fumonisin B1. *PLoS One*. **8**, e60769
57. Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*. **43**, 205–227
58. Friesen, T. L., Faris, J. D., Solomon, P. S., and Oliver, R. P. (2008) Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cell Microbiol*. **10**, 1421–1428
59. Oliver, R.P., Solomon, P. S. (2010) New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. *Curr Opin Plant Biol*. **13**, 415–419
60. Vleeshouwers, V. G., and Oliver, R. P. (2014) Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact*. **27**, 196–206
61. El Oirdi, M., El Rahman, T. A., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M. C., Daayf, F., Vojnov, A., and Bouarab, K. (2011) Botrytis cinerea manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell*. **23**, 2405–2421
62. Markham, J. E., and Jaworski, J. G. (2007) Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled

- to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **21**, 1304–1314
63. Salas, J. J., Markham, J. E., Martínez-Force, E., and Garcés, R. (2011) Characterization of sphingolipids from sunflower seeds with altered fatty acid composition. *J Agric Food Chem.* **59**, 12486–12492
 64. Tellier, F., Maia-Grondard, A., Schmitz-Afonso, I., and Faure, J. D. (2014) Comparative plant sphingolipidomic reveals specific lipids in seeds and oil. *Phytochemistry* **103**, 50–58
 65. 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
 66. Markham, J. E. (2013) Detection and quantification of plant sphingolipids by LC-MS. *Methods Mol Biol.* **1009**, 93–101
 67. Lachaud, C., Da Silva, D., Cotellet, V., Thuleau, P., Xiong, T. C., Jauneau, A., Brière, C., Graziana, A., Bellec, Y., Faure, J. D., Ranjeva, R., and Mazars, C. (2010) Nuclear calcium controls the apoptotic-like cell death induced by d-erythro-sphinganine in tobacco cells. *Cell Calcium.* **47**, 92–100
 68. Lachaud, C., Da Silva, D., Amelot, N., Béziat, C., Brière, C., Cotellet, V., Graziana, A., Grat, S., Mazars, C., and Thuleau, P. (2011) Dihydrosphingosine-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells is independent of H₂O₂ production. *Mol Plant.* **4**, 310–318
 69. Michaelson, L. V. (2011) New insights into cell death induced by long chain bases in Arabidopsis. *New Phytol.* **191**, 909–911
 70. Da Silva, D., Lachaud, C., Cotellet, V., Brière, C., Grat, S., Mazars, C., and Thuleau, P. (2011) Nitric oxide production is not required for dihydrosphingosine-induced cell death in

tobacco BY-2 cells. *Plant Signal Behav.* **6**, 736–739

71. Thuleau, P., Aldon, D., Cotellet, V., Brière, C., Ranty, B., Galaud, J. P., and Mazars, C. (2013) Relationships between calcium and sphingolipid-dependent signalling pathways during the early steps of plant-pathogen interactions. *Biochim Biophys Acta.* **1833**, 1590–1594
72. Rivas-San Vicente, M., Larios-Zarate, G., and Plasencia, J. (2013) Disruption of sphingolipid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* activates salicylic acid-dependent responses and compromises resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Planta.* **237**, 121–136
73. Coursol, S., Fromentin, J., Noirot, E., Brière, C., Robert, F., Morel, J., Liang, Y. K., Lherminier, J., and Simon-Plas, F. (2015) Long-chain bases and their phosphorylated derivatives differentially regulate cryptogeiin-induced production of reactive oxygen species in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells. *New Phytol.* **205**, 1239–1249
74. Brodersen, P., Petersen, M., Pike, H. M., Olszak, B., Skov, S., Odum, N., Jørgensen, L. B., Brown, R. E., and Mundy, J. (2002) Knockout of *Arabidopsis* accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev.* **16**, 490–502
75. Liang, H., Yao, N., Song, J. T., Luo, S., Lu, H., and Greenberg, J. T. (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev.* **17**, 2636–2641
76. König, S., Feussner, K., Schwarz, M., Kaeffer, A., Iven, T., Landesfeind, M., Ternes, P., Karlovsky, P., Lipka, V., and Feussner, I. (2012) *Arabidopsis* mutants of sphingolipid fatty acid α -hydroxylases accumulate ceramides and salicylates. *New Phytol.* **196**, 1086–1097
77. Simanshu, D. K., Zhai, X., Munch, D., Hofius, D., Markham, J. E., Bielawski, J., Bielawska, A., Malinina, L., Molotkovsky, J. G., Mundy, J. W., Patel, D. J., and Brown, R.

- E. (2014) Arabidopsis accelerated cell death 11, ACD11, is a ceramide-1-phosphate transfer protein and intermediary regulator of phytoceramide levels. *Cell Rep.* **6**, 388–399
78. Bi, F. C., Liu, Z., Wu, J. X., Liang, H., Xi, X. L., Fang, C., Sun, T. J., Yin, J., Dai, G. Y., Rong, C., Greenberg, J. T., Su, W. W., and Yao, N. (2014) Loss of ceramide kinase in Arabidopsis impairs defenses and promotes ceramide accumulation and mitochondrial H₂O₂ bursts. *Plant Cell* **26**, 3449–3467
 79. Berkey, R., Bendigeri, D., and Xiao, S. (2012) Sphingolipids and plant defense/disease: the "death" connection and beyond. *Front Plant Sci.* **3**, 68
 80. Sánchez-Rangel, D., Rivas-San, V., Torre-Hernández, M. E., Nájera-Martinez, M., and Plasencia, J. (2015) Deciphering the link between salicylic acid signaling and sphingolipid metabolism. *Front Plant Sci.* **6**, 125
 81. Bruggeman, Q., Raynaud, C., Benhamed, M., and Delarue, M. (2015) To die or not to die? Lessons from lesion mimic mutants. *Front Plant Sci.* **6**, 24
 82. Asai, T., Stone, J. M., Heard, J. E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J., and Ausubel, F. M. (2000) Fumonisin B1-induced cell death in arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* **12**, 1823–1836
 83. Takahashi, Y., Berberich, T., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Kusano, T., and Terauchi, R. (2009) Unraveling the roles of sphingolipids in plant innate immunity. *Plant Signal Behav* **4**, 536–538
 84. Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T., and Merrill, A. H. Jr. (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem.* **266**, 14486–14490
 85. Abbas, H. K., Tanaka, T., Duke, S. O., Porter, J. K., Wray, E. M., Hodges, L., Sessions, A.

- E., Wang, E., Merrill, A. H Jr., and Riley, R. T. (1994) Fumonisin- and AAL-Toxin-Induced Disruption of Sphingolipid Metabolism with Accumulation of Free Sphingoid Bases. *Plant Physiol.* **106**, 1085–1093
86. Sydenham, E.W., Gelderblom, W. C. A., Thiel, P. G., and Marasas, W. (1990) Evidence for the natural occurrence of fumonisin B1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 285–290
 87. Vossa, K. A., Smith, G. W., and Haschek, W. M. (2007) Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology.* **137**, 299–325
 88. Spassieva, S. D., Markham, J. E., and Hille, J. (2002) The plant disease resistance gene *Asc-1* prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *Plant J.* **32**, 561–572
 89. Shi, L., Bielawski, J., Mu, J., Dong, H., Teng, C., Zhang, J., Yang, X., Tomishige, N., Hanada, K., Hannun, Y. A., and Zuo, J. (2007) Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res.* **17**, 1030–1040
 90. Kimberlin, A. N., Majumder, S., Han, G., Chen, M., Cahoon, R. E., Stone, J. M., Dunn, T. M., and Cahoon, E. B. (2013) *Arabidopsis* 56-amino acid serine palmitoyltransferase-interacting proteins stimulate sphingolipid synthesis, are essential, and affect mycotoxin sensitivity. *Plant Cell* **25**, 4627–4639
 91. Saucedo-García, M., Guevara-García, A., González-Solís, A., Cruz-García, F., Vázquez-Santana, S., Markham, J. E., Lozano-Rosas, M. G., Dietrich, C. R., Ramos-Vega, M., Cahoon, E. B., and Gavilanes-Ruíz, M. (2011) MPK6, sphinganine and the LCB2a gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **191**, 943–957

92. Luttgeharm, K. D., Chen, M., Mehra, A., Cahoon, R. E., Markham, J. E., and Cahoon, E. B. (2015) Overexpression of Arabidopsis Ceramide Synthases Differentially Affects Growth, Sphingolipid Metabolism, Programmed Cell Death, and Mycotoxin Resistance. *Plant Physiol.* **169**, 1108–1117
93. Alden, K. P., Dhondt-Cordelier, S., McDonald, K. L., Reape, T. J., Ng, C. K., McCabe, P. F., and Leaver, C. J. (2011) Sphingolipid long chain base phosphates can regulate apoptotic-like programmed cell death in plants. *Biochem Biophys Res Commun.* **410**, 574–580
94. Li, M., Markham, J. E., and Wang, X. (2014) Overexpression of patatin-related phospholipase AIII β altered the content and composition of sphingolipids in Arabidopsis. *Front Plant Sci.* **5**, 553
95. Michaelson, L. V., Zäuner, S., Markham, J. E., Haslam, R. P., Desikan, R., Mugford, S., Albrecht, S., Warnecke, D., Sperling, P., Heinz, E., and Napier, J. A. (2009) Functional characterization of a higher plant sphingolipid Delta4-desaturase: defining the role of sphingosine and sphingosine-1-phosphate in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **149**, 487–498
96. Nagano, M., Ishikawa, T., Ogawa, Y., Iwabuchi, M., Nakasone, A., Shimamoto, K., Uchimiya, H., and Kawai-Yamada, M. (2014) Arabidopsis Bax inhibitor-1 promotes sphingolipid synthesis during cold stress by interacting with ceramide-modifying enzymes. *Planta.* **240**, 77–89
97. Ishikawa, T., Imai, H., and Maki, K. Y. (2014) Development of an LC-MS/MS method for the analysis of free sphingoid bases using 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F). *Lipids.* **49**, 295–304
98. Ishikawa, T., Yanagawa, D., Kawai-Yamada, M., and Imai, H. (2014) Advanced LC-MS/MS techniques dissecting diverse isomers of plant sphingolipid species. *J Anal Bioanal Tech* **S5**, 007

99. Berdyshev, E. V., Gorshkova, I. A., Garcia, J. G., Natarajan, V., and Hubbard, W. C. (2005) Quantitative analysis of sphingoid base-1-phosphates as bisacetylated derivatives by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* **339**, 129–136
100. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* **37**, 911–917
101. Merrill, A. H. Jr., Caligan, T. B., Wang, E., Peters, K., and Ou, J. (2000) Analysis of sphingoid bases and sphingoid base 1-phosphates by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* **312**, 3–9
102. Imai, H., Hattori, H., and Watanabe, M. (2012) An improved method for analysis of glucosylceramide species having cis-8 and trans-8 isomers of sphingoid bases by LC-MS/MS. *Lipids.* **47**, 1221–1229
103. Smith, E. L., McKibbin, J. M., Karlsson, K. A., Pascher, I., and Samuelsson, B. E. (1975) Characterization by mass spectrometry of blood group A active glycolipids from human and dog small intestines. *Biochemistry.* **14**, 2120–2124
104. Murakami, I., Mitsutake, S., Kobayashi, N., Matsuda, J., Suzuki, A., Shigyo, T., and Igarashi, Y. (2013) Improved high-fat diet-induced glucose intolerance by an oral administration of phytosphingosine. *Biosci Biotechnol Biochem.* **77**, 194–197
105. Shirakura, Y., Kikuchi, K., Matsumura, K., Mukai, K., Mitsutake, S., and Igarashi, Y. (2012) 4,8-Sphingadienine and 4-hydroxy-8-sphingenine activate ceramide production in the skin. *Lipids Health Dis.* **11**, 108
106. Guo, L., and Wang, X. (2012) Crosstalk between Phospholipase D and Sphingosine Kinase in Plant Stress Signaling. *Front Plant Sci.* **3**, 51
107. Abnet, C. C., Borkowf, C. B., Qiao, Y. L., Albert, P. S., Wang, E., Merrill Jr, A. H., Mark, S.

- D., Dong, Z. W., Taylor, P. R., and Dawsey, S.M. (2001) Sphingolipids as biomarkers of fumonisin exposure and risk of esophageal squamous cell carcinoma in china. *Cancer Causes Control*. **12**, 821–828
108. Brandwagt, B. F., Kneppers, T. J., Nijkamp, H. J., and Hille, J (2002) Overexpression of the tomato Asc-1 gene mediates high insensitivity to AAL toxins and fumonisin B1 in tomato hairy roots and confers resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* in *Nicotiana umbratica* plants. *Mol Plant Microbe Interact*. **15**, 35–42
 109. Venkataraman, K., Riebeling, C., Bodennec, J., Riezman, H., Allegood, J. C., Sullards, M. C., Merrill Jr, A. H., and Futerman, A. H. (2002) Upstream of growth and differentiation factor 1 (uog1), a mammalian homolog of the yeast longevity assurance gene 1 (LAG1), regulates N-stearoyl-sphinganine (C18-(dihydro)ceramide) synthesis in a fumonisin B1-independent manner in mammalian cells. *J Biol Chem*. **277**, 35642–35649
 110. Kimberlin, A. N., Han, G., Luttgeharm, K. D., Chen, M., Cahoon, R. E., Stone, J. M., Markham, J. E., Dunn, T. M., and Cahoon, E. B. (2016) ORM Expression Alters Sphingolipid Homeostasis and Differentially Affects Ceramide Synthase Activity. *Plant Physiol*. **172**, 889–900
 111. Shimada, T. L., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I. (2010) A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. **61**, 519–528
 112. 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
 113. Ossowski, S., Schwab, R., and Weigel, D. (2008) Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J*. **53**, 674–690
 114. Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D. (2006) Highly

- specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 1121–1133
115. Rate, D. N., Cuenca, J. V., Bowman, G. R., Guttman, D. S., and Greenberg, J. T. (1999) The gain-of-function Arabidopsis *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell* **11**, 1695–1708
 116. Koch, E., and Slusarenko, A. (1990) Arabidopsis is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell* **2**, 437–445
 117. Stone, J. M., Heard, J. E., Asai, T., and Ausubel, F. M. (2000) Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (*fbr*) Arabidopsis mutants. *Plant Cell*. **12**, 1811–1822
 118. Lutgeharm, K. D., Cahoon, E. B., and Markham, J. E. (2015) Substrate Specificity, Kinetic Properties and Inhibition by Fumonisin B1 of Ceramide Synthase Isoforms from Arabidopsis. *Biochem J.* **473**, 593–603
 119. Saucedo-García, M., Gavilanes-Ruíz, M., and Arce-Cervantes, O. (2015) Long-chain bases, phosphatidic acid, MAPKs, and reactive oxygen species as nodal signal transducers in stress responses in Arabidopsis. *Front Plant Sci.* **6**, 55
 120. Lachaud, C., Prigent, E., Thuleau, P., Grat, S., Da Silva, D., Brière, C., Mazars, C., and Cotellet, V. (2013) 14-3-3-regulated Ca(2+)-dependent protein kinase CPK3 is required for sphingolipid-induced cell death in Arabidopsis. *Cell Death Differ.* **20**, 209–217
 121. Minamioka, H., and Imai, H. (2009) Sphingoid long-chain base composition of glucosylceramides in Fabaceae: a phylogenetic interpretation of Fabaceae. *J Plant Res.* **122**, 415–419
 122. Watanabe, M., Miyagi, A., Nagano, M., Kawai-Yamada, M., and Imai, H. (2011)

- Characterization of glucosylceramides in the Polygonaceae, *Rumex obtusifolius* L. injurious weed. *Biosci Biotechnol Biochem.* **75**, 877–881
123. Watanabe, M., and Imai, H. (2011) Characterization of glucosylceramides in leaves of the grass family (Poaceae): Pooideae has unsaturated hydroxy fatty acids. *Biosci Biotechnol Biochem.* **75**, 1838–1841
 124. Yanagawa, D., Tamura, K. and Imai, H. (2011) Characterization of glucosylceramides from leaves and roots of Brassicaceae plants: monoenoic 2-hydroxy fatty acids are major components. 甲南大学紀要 理工学編 **58**, 1–9
 125. Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S. M., and Kinoshita, T (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annu Rev Plant Biol.* **58**, 219–247
 126. McAdam, S. A., and Brodribb, T. J. (2013) Ancestral stomatal control results in a canalization of fern and lycophyte adaptation to drought. *New Phytol.* **198**, 429–441
 127. Ye, W., Muroyama, D., Munemasa, S., Nakamura, Y., Mori, I. C., and Murata, Y. (2013) Calcium-dependent protein kinase CPK6 positively functions in induction by yeast elicitor of stomatal closure and inhibition by yeast elicitor of light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **163**, 591–599
 128. Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., and Provart, N. J. (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* **2**, e718
 129. Wilkinson, J. E., Twell, D., and Lindsey, K. (1997) Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: Implications for field release of transgenic plants. *J Exp Bot.* **48**, 265–275
 130. Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., and Blatt, M. R. (2010)

- A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J.* **64**, 355–365
131. Luttgeharm, K. D., Kimberlin, A. N., Cahoon, R. E., Cerny, R. L., Napier, J. A., Markham, J. E., and Cahoon, E. B. (2015) Sphingolipid metabolism is strikingly different between pollen and leaf in Arabidopsis as revealed by compositional and gene expression profiling. *Phytochemistry*. **115**, 121–129
 132. Michel, C., vanEchtenDeckert, G., Rother, J., Sandhoff, K., Wang, E. and Merrill, A. H. (1997) Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J. Biol. Chem.* **272**, 22432–22437
 133. Magnin-Robert, M., Le Bourse, D., Markham, J., Dorey, S., Clément, C., Baillieul, F., and Dhondt-Cordelier, S. (2015) Modifications of Sphingolipid Content Affect Tolerance to Hemibiotrophic and Necrotrophic Pathogens by Modulating Plant Defense Responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **169**, 2255–2274
 134. Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S. (1998) Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem.* **273**, 23722–23728
 135. Liu, H., Sugiura, M., Nava, V. E., Edsall, L. C., Kono, K., Poulton, S., Milstien, S., Kohama, T., and Spiegel, S. (2000) Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem.* **275**, 19513–19520
 136. Nagiec, M. M., Skrzypek, M., Nagiec, E. E., Lester, R. L., and Dickson, R. C. (1998) The LCB4 (YOR171c) and LCB5 (YLR260w) genes of *Saccharomyces* encode sphingoid long chain base kinases. *J Biol Chem.* **273**, 19437–19442

137. Taha, T. A., Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2006). Sphingosine kinase: biochemical and cellular regulation and role in disease. *J. Biochem. Mol. Biol.* **39**, 113–131
138. Yokota, S., Taniguchi, Y., Kihara, A., Mitsutake, S., and Igarashi, Y. (2004) Asp177 in C4 domain of mouse sphingosine kinase 1 is important for the sphingosine recognition. *FEBS Lett.* **578**, 106–110
139. Wang, Z., Min, X., Xiao, S. H., Johnstone, S., Romanow, W., Meininger, D., Xu, H., Liu, J., Dai, J., An, S., Thibault, S., and Walker, N. (2013) Molecular basis of sphingosine kinase 1 substrate recognition and catalysis. *Structure.* **21**, 798–809
140. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680
141. Robert, X., and Gouet, P. (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* **42**, (Web Server issue):W320–324
142. Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406–425
143. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791
144. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725–2729
145. Nava, V. E., Lacana, E., Poulton, S., Liu, H., Sugiura, M., Kono, K., Milstien, S., Kohama, T., and Spiegel, S. (2000) Functional characterization of human sphingosine kinase-1.

146. Herr, D. R., Fyrst, H., Creason, M. B., Phan, V. H., Saba, J. D., and Harris, G. L. (2004) Characterization of the *Drosophila* sphingosine kinases and requirement for Sk2 in normal reproductive function. *J Biol Chem.* **279**, 12685–12694
147. Kihara, A., Anada, Y., and Igarashi, Y. (2006) Mouse sphingosine kinase isoforms SPHK1a and SPHK1b differ in enzymatic traits including stability, localization, modification, and oligomerization. *J Biol Chem.* **281**, 4532–4539
148. Liu, H., Chakravarty, D., Maceyka, M., Milstien, S., and Spiegel, S. (2002) Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **71**, 493–511
149. Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, G. F., Spiegel, S., and Proia, R. L. (2005) Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol.* **25**, 11113–11121
150. Yonamine, I., Bamba, T., Nirala, N. K., Jesmin, N., Kosakowska-Cholody, T., Nagashima, K., Fukusaki, E., Acharya, J. K., and Acharya, U. (2011) Sphingosine kinases and their metabolites modulate endolysosomal trafficking in photoreceptors. *J Cell Biol.* **192**, 557–567
151. Hisano, Y., Inoue, A., Okudaira, M., Taimatsu, K., Matsumoto, H., Kotani, H., Ohga, R., Aoki, J., and Kawahara, A. (2015) Maternal and Zygotic Sphingosine Kinase 2 Are Indispensable for Cardiac Development in Zebrafish. *J Biol Chem.* **290**, 14841–14851
152. Pitson, S. M., D'andrea, R. J., Vandeleur, L., Moretti, P. A., Xia, P., Gamble, J. R., Vadas, M. A., and Wattenberg, B. W. (2002) Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes. *Biochem J.* **350**, 429–441
153. Ishikawa, T., Aki, T., Yanagisawa, S., Uchimiya, H., and Kawai-Yamada, M. (2015)

- Overexpression of BAX INHIBITOR-1 Links Plasma Membrane Microdomain Proteins to Stress. *Plant Physiol.* **169**, 1333–1343
154. Nagano, M., Ishikawa, T., Fujiwara, M., Fukao, Y., Kawano, Y., Kawai-Yamada, M., and Shimamoto, K. (2016) Plasma Membrane Microdomains Are Essential for Rac1-RbohB/H-Mediated Immunity in Rice. *Plant Cell.* **28**, 1966–1983
 155. 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
 156. Kida, T., Itoh, A., Kimura, A., Matsuoka, H., Imai, H., Kogure, K., Tokumura, A., and Tanaka, T. (2016) Distribution of glycosylinositol phosphoceramide-specific phospholipase D activity in plants. *J Biochem.* n/a-n/a
 157. Higuchi, K., Hara, J., Okamoto, R., Kawashima, M., and Imokawa, G. (2000) The skin of atopic dermatitis patients contains a novel enzyme, glucosylceramide sphingomyelin deacylase, which cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. *Biochem J.* **350**, 747–756
 158. Imokawa, G. (2009) A possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. *J Dermatol Sci.* **55**, 1–9
 159. Ishikawa, T., Ito, Y., and Kawai-Yamada, M. (2016) Molecular characterization and targeted quantitative profiling of the sphingolipidome in rice. *Plant J.* **88**, 681–693
 160. Marion, J., Bach, L., Bellec, Y., Meyer, C., Gissot, L., and Faure, J. D. (2008) Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of Arabidopsis seedlings. *Plant J.* **56**, 169–179

161. Benschop, J. J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A. J., Slijper, M., and Menke, F. L. (2007) Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis. *Mol Cell Proteomics*. **6**, 1198–1214
162. Pitson, S. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Lynn, H. E., Xia, P., Vadas, M. A., and Wattenberg, B. W. (2003) Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *EMBO J*. **22**, 5491–5500
163. Pitson, S. M., Xia, P., Leclercq, T. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Lynn, H. E., Wattenberg, B. W., and Vadas, M. A. (2005) Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J Exp Med*. **201**, 49–54
164. Hengst, J. A., Guilford, J. M., Fox, T. E., Wang, X., Conroy, E. J., and Yun, J. K. (2009) Sphingosine kinase 1 localized to the plasma membrane lipid raft microdomain overcomes serum deprivation induced growth inhibition. *Arch Biochem Biophys*. **492**, 62–73
165. Hengst, J. A., Guilford, J. M., Conroy, E. J., Wang, X., and Yun, J. K. (2010) Enhancement of sphingosine kinase 1 catalytic activity by deletion of 21 amino acids from the COOH-terminus. *Arch Biochem Biophys*. **494**, 23–31
166. Tanz, S. K., Castleden, I., Hooper, C. M., Vacher, M., Small, I., Millar, H. A. (2013) SUBA3: a database for integrating experimentation and prediction to define the SUBcellular location of proteins in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res*. **41**(Database issue), D1185–1191
167. Lima, S., and Spiegel, S. (2013) Sphingosine kinase: a closer look at last. *Structure*. **21**, 690–692

公表論文リスト

副論文

Yanagawa, D., Ishikawa, T., and Imai, H. (2016) Synthesis and degradation of long-chain base phosphates affect fumonisin B₁-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res.* n/a-n/a

参考論文

Ishikawa, T., Yanagawa, D., Kawai-Yamada, M., and Imai, H. (2014) Advanced LC-MS/MS techniques dissecting diverse isomers of plant sphingolipid species. *J Anal Bioanal Tech* **S5**, 007.

植物スフィンゴ脂質の構造多様性と代謝経路の解析 (2016)

今井博之、柳川大樹 生化学 88 (1), 94-104.

紀要

シロイヌナズナにおけるスフィンゴイドキナーゼ(LCBK1)の形質転換体の作製 (2015)

柳川大樹、田中 修、日下部岳広、本多大輔、後藤彩子、今井博之

甲南大学紀要 理工学編 62 (1), 1-18.