

PRESS RELEASE

令和4年7月4日
愛媛大学
ブエノスアイレス大学

塩ストレスに対する植物のエネルギー代謝の順化機構

1 細胞スケールで見えてきた膨圧刺激によるカルジオリピン合成に同期したクリステの形態変化

概要

愛媛大学大学院農学研究科 和田博史教授、野並浩名誉教授、畠山友翔助教、愛媛大学大学院連合農学研究科博士課程 中田佳佑、ブエノスアイレス大学有機化学科・国家科学技術研究会議（CONICET）のロザ エラ・バルセルス教授の国際共同研究チームは、塩ストレス処理後の生きた状態のトマト植物中の1細胞を対象に行った原形質流動速度・水分状態・代謝産物の連続計測・透過型電子顕微鏡解析から、膨圧変化を介する一時的なカルジオリピン合成の増大と、これに同期したミトコンドリアのクリステの構造変化による細胞内のエネルギー代謝維持の仕組みを世界で初めて実験的に明らかにしました。本研究成果は、2022年7月1日（金）にイギリス・ドイツに本拠を置く Springer Nature が刊行する国際学術誌、「*Scientific Reports*」の電子版で公表されました。なお、本研究は、JSPS 科研費（24228004、19J13330、20J01211、22H00369）、住友財団 2021 年度基礎科学研究助成、愛媛大学研究業績数改善促進費の支援を受けて行われました。

発表雑誌

掲載誌：*Scientific Reports*

DOI 番号：10.1038/s41598-022-14164-3

題名：Dynamics and stabilization mechanism of mitochondrial cristae morphofunction associated with turgor-driven cardiolipin biosynthesis under salt stress conditions

著者：中田佳佑¹、畠山友翔²、ロザ エラ・バルセルス³、野並浩²、和田博史^{1,2,*}¹ 愛媛大学大学院連合農学研究科² 愛媛大学大学院農学研究科³ ブエノスアイレス大学有機化学科・国家科学技術研究会議（CONICET）

*責任著者

論文 URL：<https://doi.org/10.1038/s41598-022-14164-3>

問い合わせ先

国立大学法人 愛媛大学 大学院農学研究科 食料生産学科 植物工場システム学コース
植物細胞システム計測学 教授 和田 博史（わだ ひろし）

Tel: 089-946-9824

Fax: 089-946-9867

Email: hwada@agr.ehime-u.ac.jp

ポイント

- ・トマトのミトコンドリア内膜のクリステ^{注1)}の構造は、一般に知られている「バッフルモデル」ではなく、最近提唱されている「クリステジャンクションモデル」の形態をとる。
- ・トマト植物体に軽微な塩ストレスを処理した後、葉の毛状突起（トライコーム）の1柄細胞を対象に原形質流動速度と細胞体積とともに、同じ細胞の水分状態・代謝産物を連続的に計測した。その結果、塩ストレス処理期間を通して原形質流動速度は一定に保たれたものの、膨圧低下を初期シグナルとして、一時的な細胞体積の減少・ミトコンドリアの体積拡大が起こり、解糖系からクエン酸回路に至る一次代謝が活性化することで、クリステの屈曲性を司るリン脂質、カルジオリピン^{注2)}の合成が促進され、一時的にクリステの形態が変化し、呼吸・エネルギー代謝が維持される。
- ・1細胞スケールで検出されたカルジオリピン含量とクリステの屈曲度の間に見出された正の相関関係から、クリステの屈曲率の変化は可逆的に起こるミトコンドリア内膜へのカルジオリピンの挿入に起因する。
- ・本成果は、植物の細胞小器官のスケールでの環境変化に対するエネルギー代謝の順化機構を理解するための基礎知見である。

研究の背景と経緯

動物とは異なり、一般に自由に動くことのできない植物は絶えず環境の変化に晒され続けています。そのため、植物が生きていく上で、生体内のエネルギー生産効率をいかに維持するかは生存戦略上、重要な命題です。細胞内を原形質流動により巡回するエネルギープラントであるミトコンドリアの内膜では、リン脂質、カルジオリピンの取り込みによるクリステの屈曲度が増すことで、呼吸・エネルギー代謝が維持されると考えられてきましたが、実際の植物の1細胞スケールでその直接的な証拠は得られていませんでした。特に、環境変化に対する順化の過程では、どのようなメカニズムでカルジオリピン合成が誘導され、クリステの形態変化とエネルギー代謝維持が働くのか、水分状態・代謝変化と関連付けて実際の1細胞で連続的に計測された事例はなく、その全容は不明のままでした。

研究の内容

今回の研究では、モデル植物としてトマト植物体の根圏に軽微な塩ストレスを処理後、葉に局在するタイプII毛状突起(図1A)の1柄細胞(図1B)の細胞内応答に注目しました。塩ストレス処理後の柄細胞の体積と原形質流動の速度計測、1細胞生体計測法として知られるピコリットル・プレッシャープロブ・エレクトロスプレーイオン化質量分析法(picoPPESI-MS)^{注3)}を用いて、細胞の水分状態(細胞膨圧^{注4)}、浸透ポテンシャル^{注5)}、水ポテンシャル^{注6)}の計測直後に、同じ細胞から約200 pLになるように体積を揃えて細胞液を採取し、その内容物について、リアルタイムに代謝物計測(図1B、C)を行いました。並行して、透過型電子顕微鏡により、経時的に細胞内のミトコンドリアの体積とその内部形態について観察を行いました。

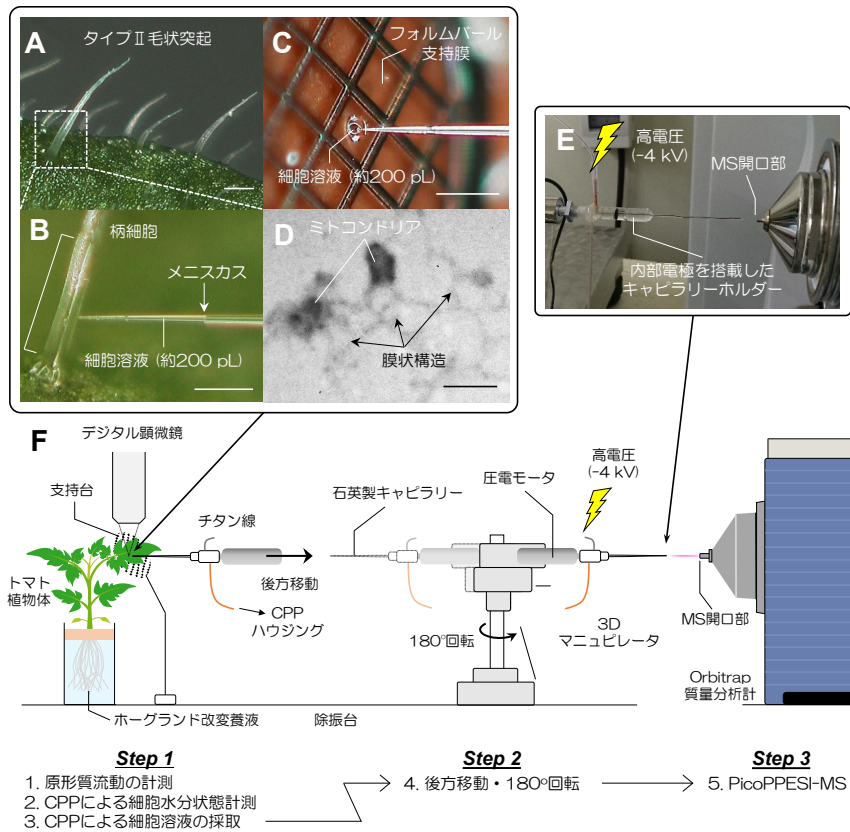


図1. セル・プレッシャープロブ (CPP) 機能を備えたピコリットル・プレッシャープロブ・エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (picoPPESI-MS) による1細胞生体計測の流れ. トマト葉に局在するタイプII毛状突起の1柄細胞(A)を対象にした原形質流動速度計測、CPPによる1細胞水分状態計測(B). 同じ1柄細胞からCPPで直接採取した細胞液の内容物を透過型電子顕微鏡用グリッド上にロード(C参照)した後、細胞液中に観察されたミトコンドリアと膜構造の透過型電子顕微鏡画像(D). 細胞水分状態計測後、細胞液の採取体積を約200 pLに調整後、石英キャピラリーを細胞から瞬時に抜き出し、3Dマニピレータを後方に移動、180°回転させ、キャピラリーチップ先端部に印加電圧をかけ、Orbitrap質量分析計のMS開口部に向かってイオン化することで、1細胞代謝産物計測を行った(F). スケールバーは250 μm(A-C), 500 nm(D)を示す.

また、トマト葉の毛状突起の1柄細胞(図1A)から直接採取した約200 pLの細胞液の内容物を透過型電子顕微鏡用グリッド上にロードし(図1C)、透過型電子顕微鏡により観察したところ、ミトコンドリアと膜構造が数多く観察されました(図1D)。

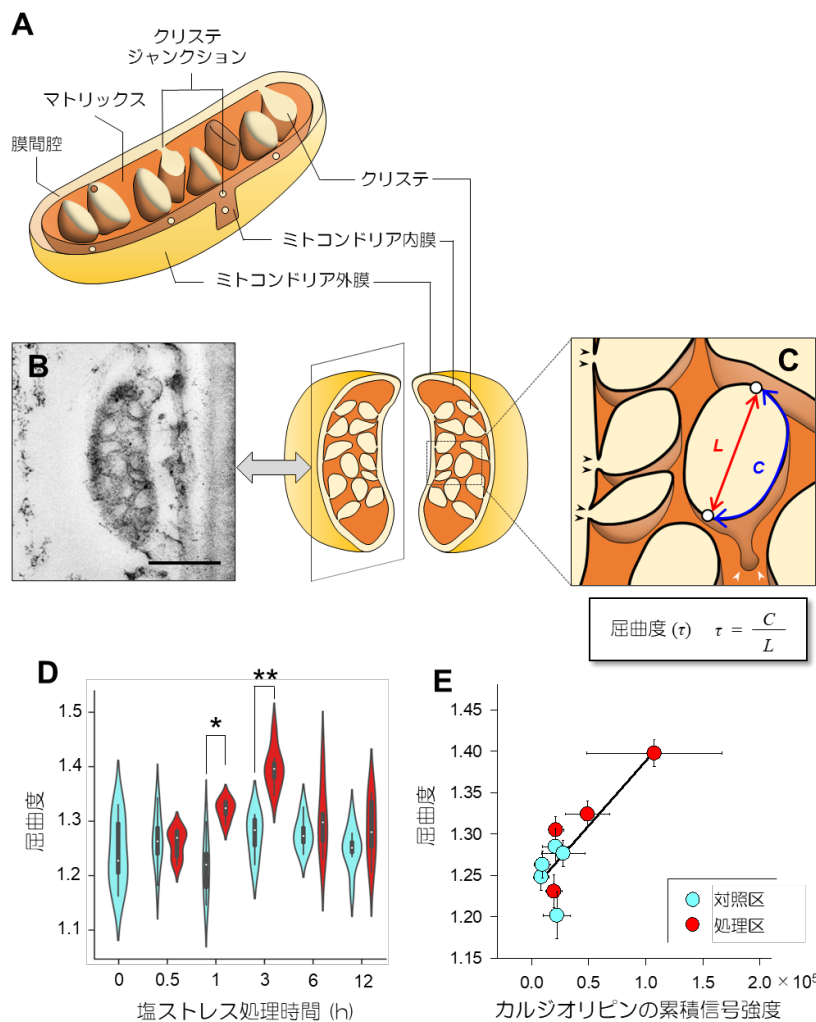


図2. ミトコンドリアの膜構造モデルと塩ストレス処理後のトマト毛状突起柄細胞のミトコンドリアの内部構造変化。 最近提唱されているもう一つのクリステ構造「クリステジャンクションモデル」(A)。Logan (2006) *J. Exp. Bot.*を基に作図 (A)。トマト葉の柄細胞において観察されたミトコンドリア縦断片の透過型電子顕微鏡写真 (B) と推定上のクリステ構造の拡大図と計測したクリステの屈曲度の定義 (C)。塩ストレス処理後のクリステの屈曲度の経時的変化 (D)。picoPPESI-MS (図1)により取得したカルジオリピンの累積信号強度と屈曲度の相関関係 (E)。図C中の矢じりはクリステジャンクションの位置を示す(図A参照)。図Bのスケールバーは500 nmを、図D中のアスタリスクは処理区間で統計的な有意差があることを示す。

まず、透過型電子顕微鏡解析から、トマトのミトコンドリアのクリステの折り畳み構造は、「クリステジャンクションモデル」の形態をとることが示唆されました(図2A)。ミトコンドリアの電子顕微鏡画像(図2B)から塩ストレス処理後のクリステの屈曲度を経時的に測定したところ、塩ストレス処理後1時間~3時間目にかけて一時的に屈曲度の高いクリ

ステ数が増加し、6時間目には対照区と同程度まで低下しました（図2D）。さらに、クリステの屈曲度と1細胞スケールで検出したカルジオリピンの累積信号強度との間には正の相関関係が認められました（図2E）。

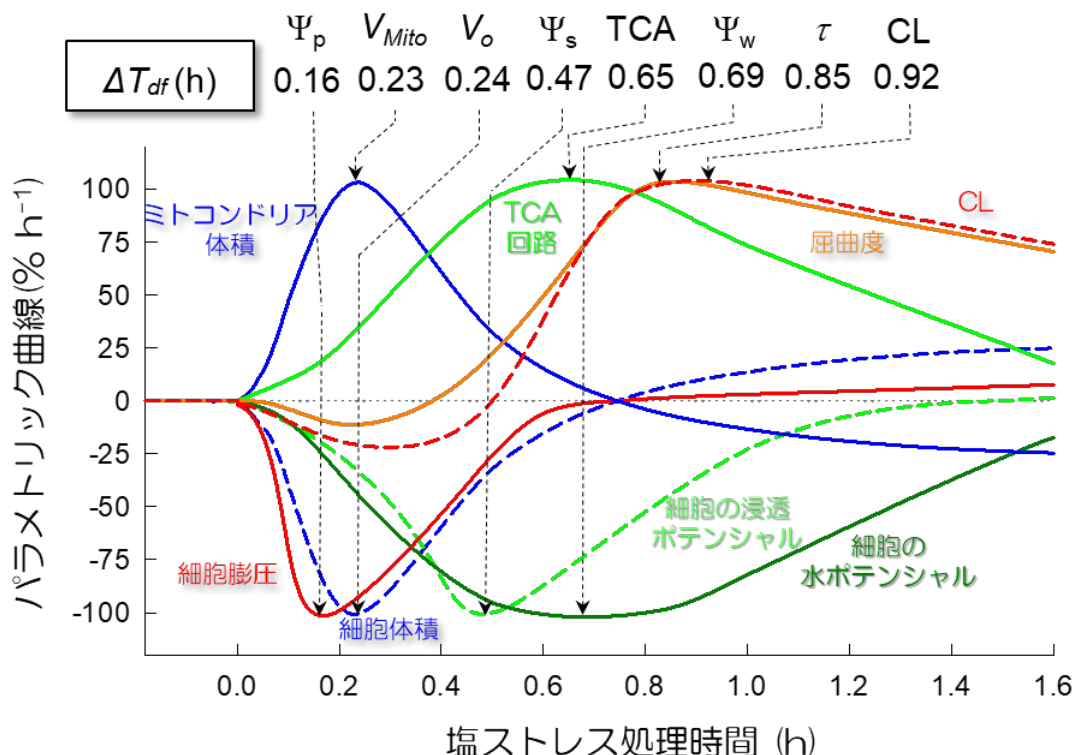


図3. 細胞膨圧 (Ψ_p) 変化に伴うカルジオリピン (CL) 集積に同期したクリステの構造変化. V_{Mito} はミトコンドリア体積, V_o は柄細胞体積, Ψ_s は細胞の浸透ポテンシャル, Ψ_w は細胞の水ポテンシャル, τ は屈曲度を示す. 図中の全てのパラメーターは変化量の最大/最小の絶対値を $\pm 100\%$ にしたパラメトリック曲線で示す. ΔT_{df} は各パラメーターにおける処理後の最大/最小値に達するまでに要した時間を示す.

図3は、1細胞スケールで計測した全細胞パラメーターについて、ストレス処理後の経時的な相対変化を示しています。塩ストレス処理後の各パラメーターの曲線から、処理後の最大値もしくは最小値に達するまでに要した時間 (ΔT_{df}) を求めました。 ΔT_{df} の算出により、何が初期シグナルとして（カルジオリピン合成酵素の遺伝子発現増大を通して）カルジオリピン合成促進の引き金となったか特定を試みました。その結果、塩ストレス処理後、まず、細胞膨圧の低下が起こり、続いて細胞体積が低下すると同時にミトコンドリアの体積上昇が観測されました。その後、細胞の浸透ポテンシャルが低下し（浸透圧調節の発現の開始）、クエン酸回路の活性化、細胞の水ポテンシャル低下、クリステの屈曲度の上昇・CL含量の上昇の順で各イベントが起こっていることが分かりました（図3）。一方、両処理区とも処理期間中の葉の組織水分状態・蒸散速度は一定に推移し、処理間差が

認められなかったことから、本実験で処理した塩ストレスに対する応答は柄細胞を含む一部の細胞に限定した部位特異的な応答であったことが示唆されました。

以上の結果から、トマト植物を軽微な塩ストレス条件に晒すことで、1) 膨圧変化が初期シグナルとなり、クエン酸回路の活性化を介して、カルジオリピンの生合成が増大すること、2) 膨圧変化に続いて、可逆的な細胞体積・ミトコンドリアの体積変化が起こった後、クリステにおける一時的な屈曲度の上昇を観測することができました。さらに、3) 今回の picoPPESI-MS 解析では、1 細胞内の ATP・ADP 含量を捉えることにも成功しており、塩ストレス処理直後には膨圧低下とともに、過渡的な ATP 含量の増大も検出されました。4) 塩ストレス処理の間、柄細胞においては原形質流動速度が一定に保たれていたことから、上の応答がミトコンドリア内膜における電子伝達系と ATP 生成の持続に寄与し、細胞内のエネルギー代謝が維持されることで塩ストレスに順化していたことが、連続的な 1 細胞生体計測から明らかになりました (図 4)。

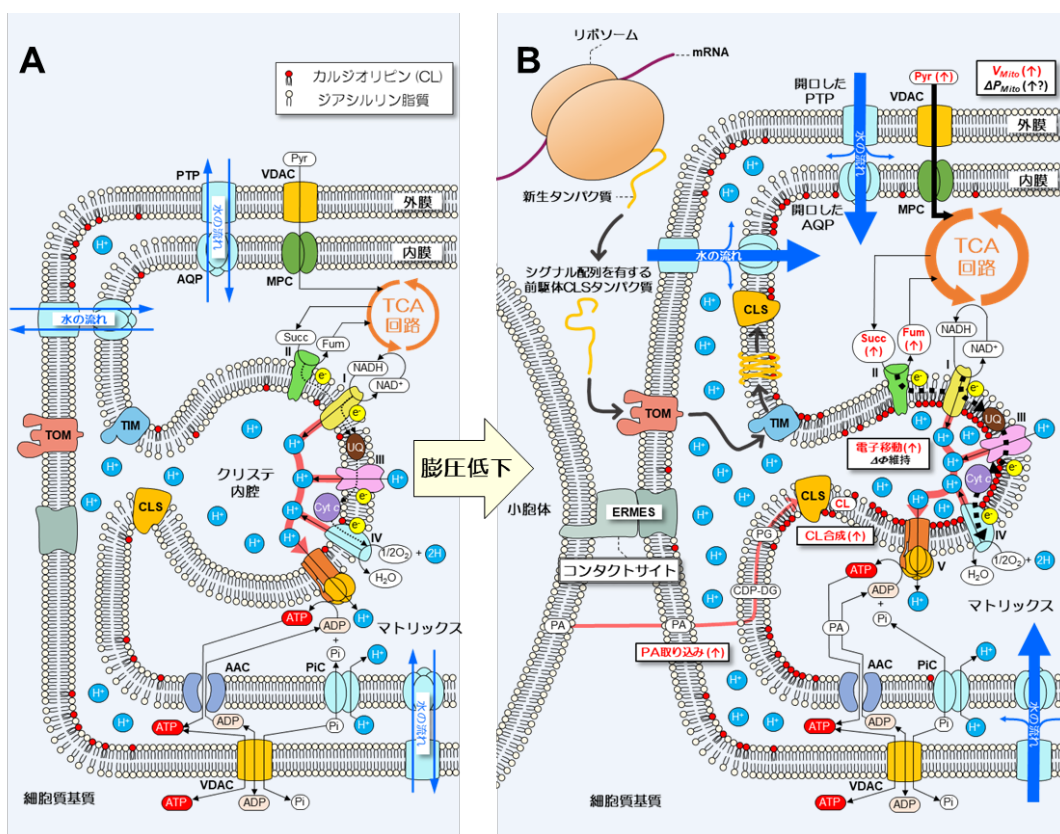


図 4. 推定上の膨圧誘導性カルジオリピン (CL) 生合成モデル、及びミトコンドリアの体積制御を介したミトコンドリア内膜の電子伝達系と ATP 生成。本研究により提案された通常条件下 (A) と塩ストレス条件下 (B) でのミトコンドリアのエネルギー代謝のモデル図。細胞膨圧の低下が圧カシグナルとして核膜に伝達され、核内のカルジオリピン合成酵素 (CLS) の遺伝子発現が誘導されることが強く示唆された。塩ストレス処理後、膨圧低下に続いて細胞体積がわずかに減少するが、このとき、ミトコンドリア外膜・内膜に局在するミトコンドリア膜透過性遷移孔 (PTP) およびアク

アポリン (AQP) の開口により、ミトコンドリア体積 (V_{Mito}) の一時的な増大が起きた後、内膜に CL が集積する。細胞質基質では、新たに翻訳された前駆体 CLS タンパク質が内外膜のトランスポーター (TOM および TIM) を介して内膜に取り込まれ、CLS の立体構造が形成。原形質流動過程で、ERMES (endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure) を介した小胞体-ミトコンドリア間のコンタクトサイトからホスファチジン酸 (PA) が小胞体から内膜に取り込まれた後、合成が進み、CL となり、内膜の曲率の一時的な上昇に寄与する。これにより、ミトコンドリア膜の電位差 ($\Delta\psi$) が維持され、電子伝達系における電子の伝達の効率化と H^+ 勾配の維持が ATP 合成に寄与することで、原形質流動速度が維持されたと考えられた。図中の VDAC は電位依存性陰イオンチャネル、MPC: ミトコンドリアピルビン酸キャリア、Pyr はピルビン酸、Succ はコハク酸、Fum はフマル酸、UQ はユビキノン、Cyt-c はシトクロム c、PiC はリン酸キャリア、AAC はミトコンドリア ADP/ATP キャリアを示す。

今後の展開

細胞を個体から切り離すことなく、生きている植物の 1 細胞を対象にした連続的な細胞水分状態・代謝変化の計測と、オルガネラスケールの形態解析から、環境変化に対してダイナミックに起こる細胞のストレス順化機構を明らかにすることができました。また、本研究から、一般に生体内の 9 割以上が水で満たされている植物において、膨圧変化という細胞内の圧力伝播が遺伝子の発現に影響するという根拠が示されました。本知見は環境ストレス下のエネルギー代謝制御に関する基礎的な知見です。今後、生きている細胞中のオルガネラスケールでの直接計測への展開が期待されます。

用語解説

注 1 クリステ

ミトコンドリアの内膜の折り畳み構造。

注 2 カルジオリピン

ミトコンドリアの主に内膜に局在する酸性リン脂質。ホスファチジルグリセロールが重合した 2 量体で、2 つのリン酸基と 4 本の脂肪酸鎖をもつ。ミトコンドリアの電子伝達系の複合体・輸送タンパク質等種々の機能タンパク質の活性発現に必須なリン脂質であり、**クリステの屈曲度の調節**などクリステの形態変化にも重要な役割を担う。

注 3 ピコリットル・プレッシャープローブ・エレクトロスプレーイオン化質量分析法

1 植物細胞における非破壊水分状態(膨圧)計測器として知られるプレッシャープローブと高感度かつ高精度な代謝プロファイリングが可能なエレクトロスプレーイオン化質量分析計とを組み合わせた **1 細胞生体計測法**である。プレッシャープローブを用いることで、生きている状態のまま**植物細胞の水分状態を計測した後、同じ細胞から代謝産物を含んだピコリットルレベルの超微量細胞液の体積を揃え**たうえで、分析試料として採取できる。この

採取した細胞液に高電圧を直接印加することにより、前処理の必要なく**リアルタイムに直接代謝産物分析**できる（図1）。本手法は愛媛大学の当グループを中心に開発され（下記参考文献参照）ており、本供試材料であるトマトの他、蜜入りリンゴ果実（https://www.ehime-u.ac.jp/data_release/data_release-169084/）、イネ胚乳細胞・1花粉粒、オウシュウトウヒ木部細胞などで実績がある。

注4 細胞膨圧

植物の細胞において細胞壁に対して働く力（圧力）である。細胞膨圧は細胞拡大、気孔制御、果実軟化、代謝活性の維持等に密接に関わる生理学的に重要なパラメーターである。プレッシャープローブ計測では、シリコンオイルが充填された**キャピラリーの先端を1植物細胞に突き刺す**ことで、**細胞膨圧を計測**することができる。

注5 浸透ポテンシャル

浸透圧にマイナスの符号をつけて示されるパラメーター。凝固点降下法（試料溶液の凝固点降下度は重量モル濃度の総和に比例）に基づき、プレッシャープローブで採取した植物細胞溶液をナノリッター浸透圧計に導入し、凍結・解凍し、溶液中に含まれる全溶質を対象にその凝固点を求めることで浸透ポテンシャルを計測できる。

注6 水ポテンシャル

水ポテンシャルは植物の水分状態を示す指標として植物生理学分野で計測されるパラメーターである。水の化学ポテンシャルを水の部分モル体積で割った、水が持つエネルギー量を示し、純水を基準として、どれだけエネルギー的な化学ポテンシャル差があるか量的に示すことができる。**植物細胞の水ポテンシャルは細胞膨圧と浸透ポテンシャルの和として求まり、値はマイナスの符号のついた負の圧力値として示される。**

参考文献

Nakashima, T. *et al.* Single-cell metabolite profiling of stalk and glandular cells of intact trichomes with internal electrode capillary pressure probe electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **88**, 3049-3057, doi:10.1021/acs.analchem.5b03366 (2016).