

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：34506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15145

研究課題名(和文)葉緑体の新奇光応答反応-葉緑体DNAの光に依存した動き-

研究課題名(英文)A novel light-dependent behavior of nucleoids in chloroplasts

研究代表者

岩淵 功誠 (Iwabuchi, Kosei)

甲南大学・理工学部・研究員

研究者番号：30583471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：私達は植物の葉緑体の核様体が明暗条件にしたがって分布様式を変えることを発見した。これは未だ報告のない現象である。核様体は明所で小さなスペckルを形成して葉緑体全体に分散し(光分散反応)、暗所で葉緑体中央に集合する(暗集合反応)。本研究において、光分散反応は青色から遠赤色までの広い波長域の光によって強度依存的に誘導されることや光合成に依存することが明らかになった。さらに、核様体構成タンパク質MpSiR-YFP発現ゼニゴケを作製することで核様体のライブイメージングが可能となった。本研究により核様体の空間的配置という独自の視点から葉緑体機能を紐解く基礎を築くことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では葉緑体内部で起こる光応答反応に着目し、核様体の空間的配置という独自の視点で葉緑体機能を理解する。本研究が達成されれば植物の新たな光応答反応が明らかになる。これは基礎生物学や光生物学分野において極めて重要な発見であると考えている。また、本研究において核様体の分布と光合成との関連が見えてきた。光合成の調節機構を完全に解き明かすことは、人工光合成研究への応用だけでなく、植物の光合成能力の向上や今後変動しうる自然環境の中で植物が生き残るための機能を知る上でも重要である。本研究はこうした応用研究を支える重要な基礎研究と考え、更なる研究を展開していく。

研究成果の概要(英文)：We recently found that the chloroplast nucleoids of the liverwort *Marchantia polymorpha* gather at the center of chloroplasts in the dark and disperse evenly forming small speckles and throughout the chloroplasts under white-light condition. In this study, we investigated the basic features of the nucleoid responses in more detail. We revealed that the nucleoid dispersal depended on light intensities but not on light wavelengths, and on photosynthesis. We further generated transgenic *Marchantia* plants expressing MpSiR-YFP, a fluorescent marker of nucleoids, thereby allowing the live imaging of nucleoids. This study provides an opportunity to understand the chloroplast functions under fluctuating light conditions from the viewpoint of nucleoid dynamics.

研究分野：植物光生理学

キーワード：葉緑体 核様体 光応答反応 光分散 暗集合 光合成 ゼニゴケ

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光は植物が光合成を行うエネルギー源や外環境シグナルとしても働くが、過剰な光は細胞に損傷を与える。特に太陽光に含まれる紫外線は細胞核の DNA に直接傷を作り、最終的に細胞を死に至らしめる。では太陽光の下で植物が生きていられるのはどうしてだろうか。その問いに答えるべく申請者は細胞核の空間的配置に着目した研究を行ってきた。シロイヌナズナのロゼット葉の葉肉細胞では、核は暗所で細胞底面中央に位置し、強光下で細胞側壁に移動する (Iwabuchi et al. 2007)。側壁への核の移動は青色光や紫外線といった比較的短波長の光かつ強光によって誘導され、フォトトロピン 2 青色光受容体やアクチン細胞骨格により制御される (Iwabuchi et al. 2007, 2010)。また近年、葉緑体の存在も核の移動に必須であることが報告された (Higa et al. 2014)。すなわち、核と葉緑体は互いに物理的に接しており、この葉緑体が光に依存して動く (葉緑体光定位運動) ことで核も一緒に動くというものである (お神輿仮説)。

このような特徴をもつ核の光定位運動について、紫外線により生じる DNA 損傷および細胞死との関係を調べたところ、核が細胞側壁に移動すると DNA 損傷や細胞死が劇的に抑制されることが分かった (Iwabuchi et al. 2016)。核の移動は強光下で 1-3 時間以内に誘導されるのに対し、紫外線防御に寄与すると考えられているアントシアニン蓄積や葉の肥厚は強光下でそれぞれ 24 時間以上かかるかまったく起こらない。このことから核光定位運動は紫外線防御機構として迅速かつ強力に機能することが明らかになった。動けない植物は代わりに核を動かすことで紫外線から逃れる術を発達させてきたのではないかと考えている。光に依存した核定位運動は植物特有の現象であり、これまで種子植物 (シロイヌナズナ) とシダ植物 (ホウライシダ) で確認されている。植物はこの光応答反応を進化の過程でいつ獲得したのだろうか。その答えを得るべく、陸上植物進化の基部に位置する苔類ゼニゴケを用いて実験を行った。無性芽が成長してできた葉状体の表皮細胞では、核は暗所で細胞上面に位置し、明所で細胞側壁に位置することがわかった (未発表)。このことから植物は少なくとも海から陸上に進出した時点で核光定位運動を有していたと考えられる。

以上のように、申請者は核定位運動の研究をメインで行なってきた。一連の実験では、透明な核を可視化するために蛍光試薬で DNA を染色するが、この操作により葉緑体の核様体も同時に染まる。そこで核様体を注意深く観察したところ、驚くことに葉緑体の核様体が光に依存して位置を変えることをゼニゴケで見いだした。核様体は暗所では葉緑体中央に集合するのに対し、明所ではいくつかの小さなスペckルを形成して葉緑体内に分散した。この発見が本研究の端緒である。核様体の配置は葉緑体の発生と密接な関係にあることが知られているが、光など外環境との関係についてはまったく分かっていない。

2. 研究の目的

光に依存した核様体の動きの基本的な特徴を把握し、その制御に関わる光受容体を明らかにすることを目的とし、さらにライブイメージングならびに突然変異体の単離・解析を行い、制御機構の解明を目指した。本研究は DNA の空間的配置という独自の視点から葉緑体機能を解明しようとするものであり、植物の頑強な外環境応答能力を理解する上で重要な意味を持つと考える。

3. 研究の方法

光に依存した核様体の動きについて 1) 生理学的な特徴付け, 2) 光受容体の特定, 3) ライブイメージング, 4) 突然変異体スクリーニングを実施した。具体的な研究内容を以下に記す。

1) 核様体の集合と分散の経時変化, 光強度依存性, 光波長依存性を解析した。

- 2) フォトトロピン, フィトロム変異体および光合成阻害剤を用いて光受容体を特定した.
- 3) 核様体構成タンパク質 MppSiR-GFP を発現する形質転換ゼニゴケを作製し, 生細胞で核様体の集合・分散の様子を観察した.
- 4) ゼニゴケ胞子を重イオンビームで変異原処理し, 核様体の配置に異常を示す個体の選抜を試みた.

4. 研究成果

1) 光に依存した核様体の動きの生理学的特徴

白色光下で3日間培養した幼葉状体を2日間暗所に置いたときの核様体の経時変化を調べた. その結果, 暗処理前(白色光)ではほとんどの核様体が分散していたのに対し, 暗処理後1日目では約50%の核様体が葉緑体中央に集合していた. また, 暗処理後2日目では約80%の核様体が集合していた.

暗処理後, 再び光処理を行ったときの核様体の経時的な変化を調べた. 光処理をしてから30分, 1時間, 2時間, 3時間, 4時間, 5時間, 6時間後のゼニゴケを蛍光顕微鏡で観察した. 光処理後30分の時点で核様体の分散が起こり, 光処理後約3時間でほぼ全ての葉緑体の核様体が分散していた. この結果より, 核様体の分散は光に依存して繰り返し誘導されることが明らかになった.

2日間暗処理した幼葉状体に対して単色光(青色光, 緑色光, 赤色光, 遠赤色光)を3時間連続照射した. その結果, 全ての波長において, $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度, すなわち暗所では, 核様体は葉緑体の中央に集まっていた. 一方, 1, 10, 50, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度では, 全ての波長において, 核様体は小さなスペckルを複数形成して葉緑体全体に分散していた. 核様体の分散を定量化した結果, いずれの単色光においても光強度に依存して核様体の分散率は上がり, 特に青色光と赤色光では緑色光や遠赤色光に比べ $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度でもほとんどの核様体が分散することがわかった.

2) 光受容体

光受容体フィトクロム及びフォトトロピンが核様体の分散・集合に関与するのかどうか調べた. 2日間暗処理した恒常活性型フィトクロム発現体 *proEF:MpPHY^{241H} #8* およびフォトトロピン欠損変異体 *Mpphot^{KO} 21-5-2* を1日光処理した. その結果, 野生型の核様体の分散率は, 光処理前が約30%, 光処理後1日目が約100%であった. これに対し *proEF:MpPHY^{241H} #8* の分散率は, 光処理前が約15%, 光処理後1日目が約100%であった. また *Mpphot^{KO} 21-5-2* の分散率は, 光処理前が約20%, 光処理後1日目が約100%であった. これらのことから, 光受容体フィトクロム, フォトトロピンは核様体の集合・分散に関与しない, あるいは集合・分散において重要性は低いことがわかった. 次に光合成阻害剤(DCMU, DBMIB)が核様体の分散に与える影響を調べた. 暗処理した幼葉状体をDCMUあるいはDBMIBで処理し, 続いて光処理を3時間行った. コントロールでは約94%の核様体が分散した. これに対しDCMUの濃度が $10 \mu\text{M}$ の場合では86%, $100 \mu\text{M}$ では62%, $1000 \mu\text{M}$ では11%の核様体が分散し, DCMUの濃度に依存して核様体の分散率の低下がみられた. 一方, DBMIBの濃度が $10 \mu\text{M}$ の場合では52%の核様体が分散した. $100 \mu\text{M}$ および $1000 \mu\text{M}$ のDBMIB存在下では, 細胞が死んでしまい, 分散率の定量化ができなかった. これはDBMIBの副作用によるものと考えられる. 以上の結果より, 核様体の分散は光合成に依存することが示唆された.

3) ライブイメージング

アガートラップ法を用いて核様体マーカーMpSiR-YFPを発現するゼニゴケ Tak-1 を作製した。この植物体において、MpSiR-YFP 明所では分散し、暗所では葉緑体中央に集合する様子が確認できた。これにより核様体の動態を生細胞で解析できる基盤が確立された。

4) 突然変異体スクリーニング

重イオンビームで変異原処理したゼニゴケ胞子を、共同研究者の石崎公庸博士（神戸大学）より得た。胞子を寒天培地に播種し、葉状体になるまで培養した。今後は、葉状体上にできた無性芽を新たな寒天培地に播種し、3日間白色光下で幼葉状体になるまで培養する。この幼葉状体をグルタルアルデヒドで固定後、DAPI で核様体を染色し、光分散が見られない系統を選抜する。また幼葉状体を2日間暗所に静置した後、固定染色を行い、暗集合が見られない系統を選抜する。得られた突然変異体は戻し交配を行った後に次世代シーケンサーで全塩基配列を読み、重イオンビーム照射により塩基欠損が生じた部位を特定することで原因遺伝子を同定する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kondou Youichi, Miyagi Yuta, Morito Takeshi, Fujihira Kenta, Miyauchi Wataru, Moriyama Asami, Terasawa Takuya, Ishida Sakiko, Iwabuchi Kosei, Kubo Hiroyoshi, Nishihama Ryuichi, Ishizaki Kimitsune, Kohchi Takayuki	4. 巻 249
2. 論文標題 Physiological function of photoreceptor UVR8 in UV-B tolerance in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 <i>Planta</i>	6. 最初と最後の頁 1349 ~ 1364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00425-019-03090-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwabuchi Kosei, Ohnishi Haruna, Tamura Kentaro, Fukao Yoichiro, Furuya Tomoyuki, Hattori Koro, Tsukaya Hirokazu, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 179
2. 論文標題 ANGUSTIFOLIA Regulates Actin Filament Alignment for Nuclear Positioning in Leaves	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 <i>Plant Physiology</i>	6. 最初と最後の頁 233 ~ 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.18.01150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 石原静圭, 坂下幸汰, 石田悠介, 木森義隆, 岩淵功誠, 西村いくこ
2. 発表標題 葉緑体核様体に見られる新奇光応答反応
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iwabuchi K, Ohnishi H, Tamura K, Tsukaya H, Hara-Nishimura I
2. 発表標題 ANGUSTIFOLIA mediates the dark-induced nuclear positioning in leaf cells of <i>Arabidopsis thaliana</i>
3. 学会等名 TAIWAN-Japan 2017 Plant Biology Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石原静圭, 坂下幸汰, 石田悠介, 木森義隆, 西村芳樹, 小林優介, 西村いくこ, 岩淵功誠
2. 発表標題 葉緑体核様体に見られる新奇光応答反応ー光分散・暗集合反応ー
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原静圭, 坂下幸汰, 石田悠介, 木森義隆, 岩淵功誠, 西村いくこ,
2. 発表標題 葉緑体核様体に見られる新奇光応答反応
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原静圭, 坂下幸汰, 石田悠介, 木森義隆, 西村芳樹, 小林優介, 西村いくこ, 岩淵功誠
2. 発表標題 葉緑体核様体の新奇光応答反応ー光分散・暗集合反応ー
3. 学会等名 近畿植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩淵功誠
2. 発表標題 葉緑体核様体の光分散・暗凝集反応
3. 学会等名 エンドメンブレンミーティング
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩淵功誠、大西春菜、田村謙太郎、深尾陽一朗、古谷朋之、服部考郎、塚谷裕一、西村いくこ
2. 発表標題 ANGUSTIFOLIAはアクチン繊維の配向調節を介してシロイヌナズナの葉の求心性核定位を制御する
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩淵功誠
2. 発表標題 葉緑体核様体の新奇光応答反応 核様体の分散と凝集
3. 学会等名 エンドメンブレンミーティング
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩淵功誠、大西春菜、田村謙太郎、深尾陽一朗、塚谷裕一、西村いくこ
2. 発表標題 ANGUSTIFOLIAはアクチン繊維の配向を制御することでシロイヌナズナ葉細胞のホメオスタティックな核定位に関わる
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩淵功誠
2. 発表標題 ANGUSTIFOLIAはアクチン繊維の配向を介して細胞核の暗定位運動に関わる
3. 学会等名 エンドメンブレンミーティング
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩淵功誠、大西春菜、田村謙太郎、深尾陽一朗、塚谷裕一、西村いくこ
2. 発表標題 ANGUSTIFOLIAおよびACTIN7はシロイヌナズナ葉肉細胞の核の暗定位運動を制御する
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----