

機関番号：32672

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20570062

研究課題名（和文） 光合成タンパク質のゴルジ体から葉緑体への輸送と組込に関する分子細胞学的研究

研究課題名（英文） Immunocytochemical studies on the behavior of LHCP II in wax-rich cells of *Euglena*.

研究代表者

長船 哲齊 (OSAFUNE TETSUAKI)

日本体育大学・体育学部・教授

研究者番号：70074630

研究成果の概要（和文）：*Euglena gracilis* Z株を暗所で静置培養し無機培地に移して通気後に、0.1%ストレプトマイシンを添加し、正常な葉緑体形成を誘導する照度 150 ft-c の光を照射して、葉緑体が形成される過程を電顕で経時的に追跡した。その結果、LHCP II はピレノイド構造、プロラメラ体、高電子密度構造上に特異的に局在し、未発達のチラコイド膜には観察されなかった。すなわち、ゴルジ小胞体でプラスチドに運ばれた LHCP II タンパク質がチラコイド膜に配置されるためには、チラコイド膜の発達とプラスチドDNAにコードされ合成されるタンパク様の介在が必要と思われる。

研究成果の概要（英文）：Immunoelectron microscopy of wax-rich cells of *Euglena gracilis* Z using anti-LHCP II antibody and protein A-gold shows LHCP II first in the Cos, Golgi body and Golgi-derived vesicle by the thylakoids of the plastid. Golgi-derived vesicle fuses with the outermost membrane of the *Euglena* plastid. In the presence of 0.1% Streptomycin have plastids in which the disappearance of the prolamellar body (PLB) is inhibited; a paracrystalline body is formed in close proximity to the the PLB and pyrenoid which shows an immunoreaction with LHCP II antibody, but the immunoreaction is absent from the thylakoids. Thus conditions in the aerated wax-rich cells allow an unusual accumulation of LHCP II apoprotein at Streptomycin blocks the distribution of this apoprotein to the thylakoids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 形態・構造

キーワード：*Euglena*, immunoelectron microscopy, LHCP II, Golgi body, plastid, Golgi

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体の光化学系タンパク質に代表されるように光合成の機能単位の構造が明らかになるにつれて、それらの分子のダイナミッ

クな動態、輸送経路、複合体の形成機構に関心が集まっている。高等植物の細胞核支配による前駆体タンパク質は成熟型より大きいタンパク質として合成され、一定のプロセッ

シングを経て成熟型へと変化することが知られている。

長船哲齊らは免疫電顕法により、単細胞鞭毛藻ユーグレナの葉緑体形成過程で、分泌タンパク質以外の光化学系Ⅱ・集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体(LHCPⅡ)がERからゴルジ体を経由し、葉緑体へ輸送される現象を、最初に見いだした。すなわち、分泌タンパク質以外の光合成タンパク質分子が、ゴルジ体を通過し葉緑体に転送される現象は、単細胞藻類から高等植物に至るまで観察されており、一般の植物にみられる普遍的な現象であることが分かった。そこで、細胞質で合成されたゴルジ体を経由したタンパク質は、次にどのような経路でどのように葉緑体に運ばれ光合成装置に、どのように組み込まれ、どのようにして機能するようになるのかについて解析したい。

## 2. 研究の目的

長船哲齊らは免疫電顕法により、光化学系Ⅱ集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体分子が、ゴルジ体を経由し、葉緑体へ輸送される現象を最初に見いだした。すなわち、分泌タンパク質以外の光合成タンパク質分子が、ゴルジ体を経由し葉緑体へ輸送される、全く新しい現象である。今回、われわれが見いだした現象を踏まえ、ユーグレナの葉緑体、ミトコンドリア構築タンパク質分子の輸送経路、包膜透過、組込を細胞の基本的生命現象の一連の出来事としてとらえ、核支配タンパク質分子のダイナミズムを解明しようとする新しい研究の試みである。

## 3. 研究の方法

(1) ユーグレナの葉緑体包膜3層構造について、核支配光合成タンパク質分子が包膜をどのように通過するのか、免疫電子顕微鏡法を用いて、LHCPⅡ分子を経時的に追跡観察、撮影する。

(2) 細胞核にコードするユーグレナの多くの光合成タンパク質がゴルジ体を経由し、ゴルジ小胞体がどのように葉緑体に輸送され、次に3層の葉緑体包膜をどのように通過するのか、急速凍結置換固定法を応用し微細構造を追跡する。

(3) 小胞体と葉緑体構造との関連についてゴニオメーター装置による撮影や高圧電顕観察を行う。

(4) ストレプトマイシン処理細胞におけるLHCPⅡの動態を免疫電顕法で追跡する。

## 4. 研究成果

ユーグレナ(*Euglena gracilis* Z株)を暗所で静置培養し無機培地に移して通気後に、0.1%ストレプトマイシンを添加し、正常な葉緑体形成を誘導する照度 150 ft-c の光を照

射して、葉緑体が形成される過程を電顕で経時的に追跡した。その結果、暗所でもプラスチド内部の構造は、ある程度の発達がみられた。すなわち、プロラメラ体、プロピレノイドに隣接し高電子密度構造が形成され、照射するとピレノイド構造からは数枚のチラコイド膜が包膜に沿って形成された。プラスチド内部のプロラメラ体はストレプトマイシンが存在すると照射後も消失が起らなかった。このような葉緑体形成過程について、抗 LHCPⅡ抗体-免疫電顕法で経時的に観察すると、LHCPⅡはストレプトマイシン存在下では、高電子密度構造上に特異的に局在し、未発達のチラコイド膜には観察されなかった。さらに、通常、LHCPⅡタンパク質分子はゴルジ装置を経由して、プラスチドに輸送され、ストレプトマイシン存在下でも、LHCPⅡはゴルジ装置を通過することが判った。すなわち、LHCPⅡはストレプトマイシン存在下で、ゴルジからプラスチド内部に輸送され、LHCPⅡは高電子密度構造のプロラメラ体およびピレノイドに局在することが免疫電顕法により新しく判った。照射によりピレノイドからチラコイド膜構造が新しく形成されるが、チラコイド膜は未発達で、相互のスタッキングはみられなかった。さらにピレノイド局在の LHCPⅡは未発達のチラコイド膜へは転送はされないことが明らかになった。以上の結果から、LHCPⅡタンパク質分子はプラスチド内部で、チラコイド膜に適切に輸送され配置されるためには、チラコイド膜の発達とプラスチドDNAにコードされ合成されたタンパク質の介在が必要と思われる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Yamada H., Koike N., Ehara T. and Matsumoto T. Measurement of the antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by Poloxamer 407 gel. *Journal of Infection & Chemotherapy*, 査読有, Vol.17, 2011, 195-199.
2. Ehara, T., Nara, M., Schwartzbach, S. D. and Osafune, T. A scanning electron microscopic method for the study of bacterial growth inhibition by the paper disc method. *Cytologia*, 査読有, Vol. 76 No. 1, 2011, 49-54.
3. 奈良真孝, 長船哲齊, 柴田紘三郎. 柔道場畳から分離された真菌による殺菌効果の検討. 医学と生物学, 査読有, 154 卷 9 号, 2010, 430-433.
4. 加藤 希, 常見泰暢, 藤本英男, 長船哲

- 齊. スポーツ競技施設の細菌叢の基礎的研究: 紫外線によるレスリング場の細菌汚染の制御. 日本体育大学紀要, 査読有, 40 巻 1 号, 2010, 49-55.
5. 柴田紘三郎, 加藤 希, 長船哲齊, 江原友子. スポーツ競技施設の細菌の分離同定: II. 塩濃度と細菌叢に関する基礎的研究. 日本体育大学紀要, 査読有, 40 巻 1 号, 2010, 5-11.
  6. Osafune, T. and Schwartzbach, S.D. Immunoelectron microscopy of chemically fixed developing plant embryos. *Immunoelectron microscopy Methods in Mol. Biol.*, 査読有, 2010, 123-132.
  7. Osafune, T. and Schwartzbach, S.D. Serial section immunoelectron microscopy of algal cells. *Immunoelectron microscopy Methods in Mol. Biol.*, 査読有, 2010, 259-274.
  8. Osafune, T., Tanaka, K. and Ehara, T. Formation of "giant chloroplast" during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z in synchronized culture. *Cytologia*, 査読有, Vol. 75 No. 1, 2010, 1-2.
  9. 奈良真孝, 加藤 希, 久和彰江, 古市卓也, 江原友子. 柔道場分離細菌の走査型電子顕微鏡による阻止円の観察. 日本体育大学紀要, 査読有, 39 巻 2 号, 2010, 131-135.
  10. Osafune, T., Kiyohara, N. and Kiyota, M. Studies on the photosynthetic proteins in synchronized cells of *Euglena* by Immunoelectron microscopy. *Anadolu Univ J. Science and Technology*. 査読有, Vol. 10 No. 1, 2009, 109-120.
  11. Ito-kuwa, S., Nakamura, K., Valderrama, B., Aoki, S., Vidotto, V. and Osafune, T. Diversity of laccase among *Cryptococcus neoformans* serotypes. *Microbiol. immunol.*, 査読有, Vol. 50, 2008, 492-498.
  12. Kiyohara, N., Nara, M., Miwa, Y., Koizumi, K., Fujimoto, H., Shibata, K., Kibamoto, H., Ishii, T., Mizuno, M. and Osafune, T. Correlation between bacteria and fungi on wrestling mats. *Med. & Biol.*, 査読有, Vol. 152 No. 10, 2008, 422-426.
  13. Osafune, T., Kiyohara, N., Watanabe, I. and Ehara, T. Stage-dependent localization of mitochondria DNA during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z by immunogold electron microscopy. *Life Science*, (Edited by Anke Aretz, Benita Hermanns-Sachweh and Joachim Mayer) 査読有, vol. 3, 2008, 133-134.
- [学会発表] (計 25 件)
1. 長船哲齊, 他 2 名. 急速凍結置換免疫電顕法によるユーグレナ LHCP II のゴルジ小胞から葉緑体への輸送. ユーグレナ研究会第 26 回研究集会, 2010 年 11 月 13 日, 東京大学(東京).
  2. 神宮浩之, 他 2 名. Additional effect of lactoferrin on MIC of antibiotics for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. 第 4 回日本ラクトフェリン学会学術集会, 2010 年 11 月 13 日, 長浜バイオ大学(滋賀).
  3. 小林 了, 他 3 名. LCL を使った上皮細胞への EBV 感染モデル. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 7-9 日, 郷土文化会館(徳島)
  4. Osafune, T. Immunogold localization of RuBisCO and LHCP II in synchronized cells of *Euglena*. IMC17, Sep. 19-24, 2010, Rio de Janeiro, BRAZIL.
  5. 加藤 希, 他 3 名. 顕微鏡による柔道場畳の真菌と細菌の相関性に関する研究. 日本植物形態学会第 22 回大会, 2010 年 9 月 8 日, 中部大学(愛知).
  6. 長船哲齊, 他 2 名. 急速凍結置換法によるユーグレナ LHCP II のゴルジから葉緑体への輸送の追跡. 日本植物形態学会第 22 回大会, 2010 年 9 月 8 日, 中部大学(愛知).
  7. 田中和幸, 他 4 名. 剣道防具「面」の微生物叢: 真菌の分離同定. 日本体育学会第 61 回大会, 2010 年 9 月 8-10 日, 中京大学(愛知).
  8. 加藤 希, 他 5 名. レスリング場“マット細菌”の紫外線による殺菌効果. 日本体育学会第 61 回大会, 2010 年 9 月 8-10 日, 中京大学(愛知).
  9. 加藤 希, 他 5 名. 柔道場の畳の細菌と真菌との相関性に関する形態学的研究. 日本武道学会第 34 回大会, 2010 年 9 月 2-3 日, 明治大学(東京).
  10. 江原友子. 薄切・試料支持・電子染色の手法と工夫(電子顕微鏡試料作製技術). 日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会, 2010 年 5 月 23-26 日, 名古屋国際会議場(愛知).
  11. 加藤 希, 他 3 名. 顕微鏡による柔道場畳の真菌と細菌の相関性に関する研究. 日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会, 2010 年 5 月 23-26 日, 名古屋国際会議場(愛知).
  12. 長船哲齊, 他 1 名. 急速凍結置換固定・免疫電顕法によるユーグレナ LHCP II のゴルジ小胞体輸送の観察. 日本顕微鏡

学会第 66 回学術講演会, 2010 年 5 月 23-26 日, 名古屋国際会議場(愛知).

13. 加藤 希, 他 4 名. 顕微鏡による柔道場畳の真菌と細菌の相関性に関する研究. 東京体育学会第 1 回大会, 2010 年 3 月 6 日, 東京大学(東京).
14. 田中和幸, 他 4 名. 剣道防具から分離された *Paenibacillus* 属の抗真菌作用に関する研究. 東京体育学会第 1 回大会, 2010 年 3 月 6 日, 東京大学(東京).
15. 長船哲齊. 同調培養ユーグレナの cell cycle に於けるオルガネラの動態. ユーグレナ研究会 25 周年記念講演, 第 25 回 ユーグレナ研究会, 2009 年 11 月 14 日, 大阪府立大学学術交流会館(大阪).
16. Ehara, T. and Osafune, T. Immunogold localization of RuBisCO in synchronized cells of *Euglena*. 10th Inter-American Congress of Electron Microscopy, Oct. 25-28, 2009, Rosario, Argentina.
17. Kiyohara, N. 他 3 名, Correlation between bacteria and fungi on judo mats; Electron microscopic studies on bactericidal effects of fungal culture. 10th Inter-American Congress of Electron Microscopy, Oct. 25-28, 2009, Rosario, Argentina.
18. 田中和幸, 他 4 名. 剣道防具より発見された抗菌効果を示す細菌に関する研究. 日本体育学会第 60 回記念大会, 2009 年 8 月 26-28 日, 広島大学(広島).
19. 加藤 希, 他 5 名. 柔道場より分離された細菌と真菌の相関性; 真菌培養液による殺菌効果の検討(III). 日本体育学会第 60 回記念大会, 2009 年 8 月 26-28 日, 広島大学(広島).
20. 奈良真孝, 他 5 名. 柔道場より分離された細菌と真菌の相関性; 真菌の同定に関する研究(II). 日本体育学会第 60 回記念大会, 2009 年 8 月 26-28 日, 広島大学(広島).
21. 田中和幸, 他 2 名. 剣道具「面」由来細菌の抗真菌効果に関する研究. 日本武道学会第 42 回大会, 2009 年 8 月 24-25 日, 大阪大学(大阪).
22. 奈良真孝, 他 4 名. 柔道場の畳の細菌と真菌に関する研究. 日本武道学会第 42 回大会, 2009 年 8 月 24-25 日, 大阪大学(大阪).
23. 奈良真孝, 他 5 名. 柔道場・畳, レスリング・マットの細菌叢と真菌との相関; SEM による阻止円の観察. 日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会, 2009 年 5 月 26-29 日, 仙台国際センター(宮城).
24. 角田修次, 他 1 名. ユーグレナの従属栄

養から独立栄養への転換に関する研究. 日本顕微鏡学会関東支部第 33 回講演会, 2009 年 3 月 7 日, 工学院大学(東京).

25. 奈良真孝, 他 4 名. 柔道場、レスリング・マットの細菌叢と真菌との相関: SEM による阻止円の観察. 日本顕微鏡学会関東支部第 33 回講演会, 2009 年 3 月 7 日, 工学院大学(東京).

[図書] (計 1 件)

Schwartzbach, S.D. and Osafune, T. Springer, Humana Press, Immunoelectron Microscopy. 2010 年, 352 頁.

[その他]

ホームページ等

<http://www.osafunet.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長船 哲齊 (OSAUNE TETSUAKI)  
日本体育大学・体育学部・教授  
研究者番号: 70074630

### (2) 研究分担者

江原 友子 (EHARA TOMOKO)  
東京医科大学・医学部・助手  
研究者番号: 40468658