

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380014

研究課題名（和文）C<sub>4</sub>植物の葉肉葉緑体が環境ストレスに応答して集合運動する分子機構とその生理的意義研究課題名（英文）Mechanism and physiological significance of aggregative movement of mesophyll chloroplasts in C<sub>4</sub> plants in response to environmental stresses

研究代表者

谷口 光隆 (TANIGUCHI MITSUTAKA)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：40231419

研究成果の概要（和文）：環境ストレスに応答して C<sub>4</sub>植物の葉肉葉緑体が維管束鞘細胞側に凝集する葉緑体運動の分子機構と生理的意義の解明を目指した。この凝集運動は、植物ストレスホルモンであるアブシジン酸と青色光により誘導されることを見出した。様々な植物種を調査した結果、葉肉葉緑体の凝集運動は C<sub>3</sub>植物では起こらず、C<sub>4</sub>植物で普遍的に見られる生理応答であり、C<sub>3</sub>植物から C<sub>4</sub>植物への進化過程で獲得された環境ストレス耐性機構だと考えられた。

研究成果の概要（英文）：This research aimed to elucidate the molecular mechanism and physiological significance of the intracellular movement of mesophyll chloroplasts redistributing aggregatively toward the bundle sheath cells of C<sub>4</sub> plants in response to environmental stresses. We found that the aggregative movement of mesophyll chloroplasts is induced by abscisic acid, a plant stress hormone, and blue light. A survey of the chloroplast movement in many plant species revealed that the aggregative movement of mesophyll chloroplasts is a universal physiological response of C<sub>4</sub> plants, but not C<sub>3</sub> plant. It is thought that the response is one of the environmental stress-resistant mechanisms acquired during the evolution from C<sub>3</sub> to C<sub>4</sub> plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学，作物学・雑草学

キーワード：C<sub>4</sub>植物，環境ストレス，葉肉細胞，維管束鞘細胞，葉緑体，葉緑体運動，アブシジン酸，青色光

## 1. 研究開始当初の背景

C<sub>4</sub>植物の葉組織では、維管束の周りを維管束鞘細胞が取り囲み、さらにその外側を葉肉細胞が取り巻いており、CO<sub>2</sub>濃縮回路であるC<sub>4</sub>回路はその両細胞にまたがって駆動している。C<sub>4</sub>植物は優れた光合成能と環境耐性能

を発揮することから、その回路を C<sub>3</sub>植物に導入して生産性の向上した植物を開発しようとする研究が行われている。しかし、単にC<sub>4</sub>回路を構成する酵素遺伝子を導入するだけでなく、回路の活性調節機構や代謝産物輸送機構、さらには葉肉、維管束鞘細胞の分化

を理解することが重要である。

我々は環境ストレスに対する葉肉、維管束鞘細胞の応答性を細胞内構造の面から比較し、環境ストレスに対する応答性や耐性が両細胞間で分化していることを明らかにしてきた。両細胞は構造・機能の面で様々に分化しており、葉緑体の細胞内配向性にも違いが見られる。すなわち、葉肉葉緑体は細胞膜に沿ってバラバラに分布しているが、維管束鞘葉緑体は維管束側または葉肉細胞側に局在している。我々は、 $C_4$ 植物シコクビエの葉に極強光 ( $3,000\sim 4,000\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) を照射すると、細胞膜に沿って偏在していた葉肉葉緑体が維管束鞘細胞側に凝集的に集合する運動が起こることを発見した (図1)。一方、維管束側に片寄った求心的配列をとる維管束鞘葉緑体は、長時間の強光照射によってもその位置を変化させなかった。阻害剤実験により、この葉肉葉緑体の凝集運動には細胞骨格のアクチンフィラメントが関与していることも明らかとなった。また、乾燥、塩、あるいは浸透圧ストレスを植物体が受けると、通常光 ( $500\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) 下でも葉肉葉緑体の凝集運動が起こったが、維管束鞘葉緑体の求心的配列に変化はなかった。葉肉葉緑体の凝集運動は真夏の直射日光に曝されている圃場生育のシコクビエでも観察されたことから、過酷な気象条件の野外で通常起きている現象であると考えられた。

興味深いことに、葉肉葉緑体の凝集運動は葉片にアブシジン酸 (ABA) を浸透させ光照射することによっても引き起こされる。また、植物体全体を暗所下に置きストレス処理を行うと葉肉葉緑体の凝集運動は起こらないが、葉の一部を遮光した植物を明所下でストレス処理すると、遮光した部分の葉肉葉緑体でも凝集運動が見られた。したがって、葉肉葉緑体の運動には光によって誘導される細胞間伝達シグナルが関与していると考えられた。

## 2. 研究の目的

これらの知見は、機能や構造が様々な面で分化している  $C_4$  植物の葉肉、維管束鞘細胞は、環境の変動に応じた葉緑体の配向性制御においても異なる分子機構をもつことを示している。しかしながら、配向性を引き起こす情報伝達や運動制御系の実体、その生理的意義については不明であり、本研究ではそれらの詳細を明らかにすることを目的とした。

このような  $C_4$  植物の細胞特異的な葉緑体運動系を解析することは、葉肉、維管束鞘細胞の耐性機構の分化ならびに  $C_3$  植物から  $C_4$  植物への進化を研究する上での新しい知見を提供できると考えられる。また、一般に  $C_4$  植物が  $C_3$  植物に比べて環境ストレス耐性

能が高いと言われる要因を、葉緑体の細胞内配向性から検討しようとする点にも特色がある。環境ストレス下で葉緑体が凝集することのメリットと分子機構を解明できれば、その機構を増強させたり、他の作物に付与することによって環境耐性能が向上した作物の開発へと展開するための研究基盤を提供できると考えた。

## 3. 研究の方法

実験材料としては、NAD-マリックエンザイム型  $C_4$  植物シコクビエを主に用い、他の様々な  $C_4$  植物および  $C_3$  植物の最上位完全展開葉を用いた。

葉身中央部から葉片を切り出し、ABA、過酸化水素、あるいは各種阻害剤を含む溶液中で脱気して溶液を葉内に浸透させた後、葉片を同溶液上に浮かべて、白色蛍光灯あるいはLED光を向軸側から照射した。各処理後、葉片をグルタルアルデヒド固定し、振動刃マイクロトームを用いて横断切片を作製し、光学顕微鏡観察を行った。

葉肉葉緑体の凝集運動の程度を定量化するために、葉横断切片の顕微鏡デジタル画像上で、各葉緑体のピクセル座標を抽出し、葉肉細胞に接する維管束鞘細胞壁から各葉肉葉緑体までの相対距離を求めた。この数値を元に、葉肉細胞内の葉緑体が維管束鞘細胞側にどの程度局在しているかを示す“凝集配置指数”を算出した。葉肉葉緑体が細胞内にバラバラに存在している場合指数は約50%であり、葉肉葉緑体が維管束鞘細胞側に凝集するほど、この指数は100%に近づくことになる。

植物体のストレス処理は、灌水を5日間停止することによる乾燥ストレス処理、3% NaCl 溶液を5~7日間灌水することによる塩ストレス処理を行った。

## 4. 研究成果

環境ストレスに応答して  $C_4$  植物の葉肉葉緑体が維管束鞘細胞側に移動する凝集運動 (図1) について、以下の点を明らかにした。

(1) シコクビエ葉片におけるABAと光に応答した葉肉葉緑体の凝集運動の経時変化を調べた結果、凝集運動は白色光 ( $100\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) 照射6~8時間後に確認され、 $C_3$  植物葉緑体の逃避運動に比べて誘導には時間がかかることが明らかとなった (図2)。

(2) 葉肉葉緑体凝集運動は光依存的に誘導されることから、光依存性の誘導シグナルが活性酸素である可能性を検討した。シコクビエ葉片を暗所下でABAと過酸化水素を共存させた溶液上でインキュベートしても、葉肉葉

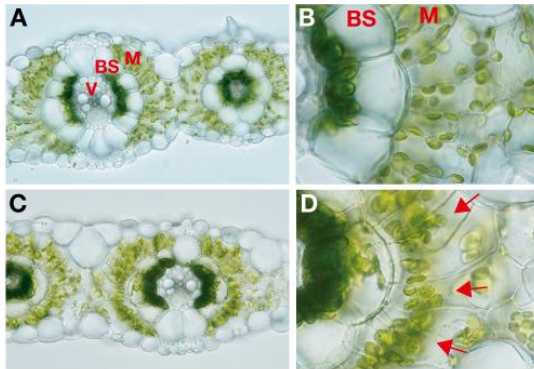


図1 光強度に依存した葉肉葉緑体の凝集運動. シコクビエ葉身に250 (A, B) または4,000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (C, D) の光を向軸側(図の上側)から2時間照射した. 強光照射により葉肉葉緑体の凝集運動が見られた(図中の矢印)が, 維管束鞘葉緑体の求心的配列に変化は見られなかった. BS: 維管束鞘細胞, M: 葉肉細胞, V: 維管束

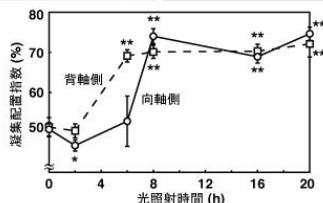
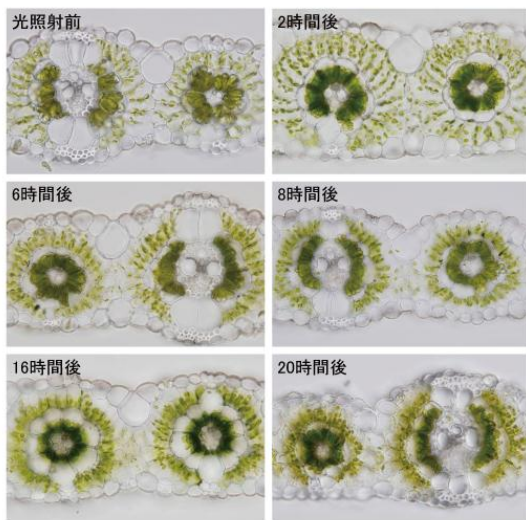


図2 ABAに应答した葉緑体配置の経時変化. シコクビエ葉片をABA溶液上に浮かべて白色光( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )を向軸側(各写真の上側)から照射し, 葉緑体配置の変化を経時的に観察した. さらに, 各時間における葉肉葉緑体の凝集運動の程度を定量化した. \*\*, \*は照射前の指数と比較して, それぞれ1%水準, 5%水準で有意差があることを示す.

緑体の凝集運動は誘導されなかった. また, 明所下でのABAに应答した凝集運動は, 活性酸素スカベンジャーを共存させても阻害されなかった. したがって, 活性酸素は葉肉葉緑体の凝集運動を誘導する因子ではないと考えられた.

(3) ABAに应答した葉肉葉緑体凝集運動に関わる光質を調べた. その結果, 凝集運動は赤色光では誘導されず, 青色光で誘導され, フォトリポピンの関与が示唆された.

(4) シコクビエ葉片にABA非存在下で青色光( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )を照射すると, 葉肉葉緑体が光の入射方向と平行な細胞壁側に移動する逃避運動が見られた(図3). 一方, ABA存在下では凝集運動が引き起こされた. したがって, ABAは葉肉葉緑体を逃避運動から凝集運動へとシフトさせると考えられた. 強青色光( $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )照射を行うと, ABA非存在下では, 照射側で逃避運動が, 反対側で凝集運動が見られた. また, ABA存在下ではすべての葉肉葉緑体が凝集運動を示した. したがって, シコクビエ葉肉細胞には, 葉緑体の逃避運動と凝集運動の両機構が存在するが, 青色光強度とABAのバランスにより, それらの運動の優位性が異なることが示唆された. つまり, ある程度の青色光照射により逃避運動が誘起されるが, ABAが共存すると凝集運動の反応性が高くなると考えられる.

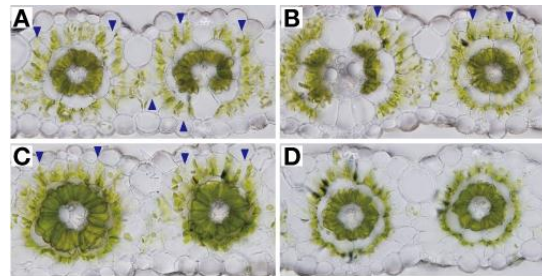


図3 青色光およびABAに应答したシコクビエ葉肉葉緑体の配置変化. シコクビエ葉身に100 (A, B) または500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (C, D) の青色光を向軸側(図の上側)から8時間照射した. A, C: ABA非存在下, B, D: ABA存在下. 矢尻は逃避運動が起こっている典型的な葉肉細胞を示す.

(5) 葉肉葉緑体の凝集運動は, 植物体を明所下で乾燥や塩ストレスに曝すことによって引き起こされる. そこで, 脱ストレス過程での葉緑体配置の変化を調べた. 乾燥ストレスにより葉肉葉緑体の凝集運動が見られたシコクビエに再び水を与えたところ, 約18時間かけて徐々に元の配置に戻っていく様子が観察された. したがって, 葉肉葉緑体の凝集運動は, 環境ストレスに应答した可逆的な生理応答であると考えられた. 根から吸収した水が各々の葉細胞に行きわたり, 凝集運動を誘起していたストレスから回復することで, 元の葉緑体配置へと戻ったと考えられる.

(6) 植物体を塩ストレスに曝すと,  $C_4$  光合成のサブタイプに関わらず, 調べたすべての単子葉  $C_4$  植物において葉肉葉緑体の凝集運動が観察された. しかし, その凝集運動の程度には種間差が見られた. NADP-マリックエンザイム型  $C_4$  植物(トウモロコシ, ソルガム)では, 凝集運動よりも逃避運動が顕著に起こった. 一方, NAD-マリックエンザイム型  $C_4$  植物(シコクビエ, キビ)では維管束間の葉肉葉緑体が一部逃避運動しているものの, 凝



集運動が強く現れた。ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ型  $C_4$  植物のギニアグラスでは弱い凝集運動しか起こらないが、ローズグラスでは強い凝集運動が見られた。

また、環境ストレスにともなう葉緑体凝集運動の応答性を単子葉  $C_4$  植物と双子葉  $C_4$  植物間で比較したところ、単子葉  $C_4$  植物の方が顕著な応答性が見られた。

したがって、ストレスに応答した葉肉葉緑体の凝集運動は  $C_4$  光合成のサブタイプに関わらず多くの  $C_4$  植物で誘導されるが、その程度は植物種によって異なることが明らかとなった。 $C_4$  植物種によってストレス対応戦略が異なり、環境ストレスに応答した凝集運動の発現にも影響が及ぼされていると考えられた。凝集運動の程度を葉構造、供試植物が属する系統グループ、維管束鞘葉緑体のグラナの発達度、維管束鞘細胞からの  $CO_2$  の漏出率などと比較したが、明白な関連性は見いだせず、凝集運動の程度差を導く要因の解明は今後の課題である。

(7) 葉片に ABA 溶液を浸透後、青色光を照射すると葉肉葉緑体の凝集運動が引き起こされる応答反応について、様々な植物について比較した。その結果、単子葉  $C_4$  植物（シコクビエ、トウモロコシ、キビ）および双子葉  $C_4$  植物（ハゲイトウ、*Flaveria bidentis*）において凝集運動が観察された。一方、 $C_3$  植物（オオムギ、イネ、シロイヌナズナ）の葉肉葉緑体では凝集運動は観察されず、強光に応答した逃避運動のみが見られた。

パニカム属植物には、 $C_3$  型、 $C_4$  型、および  $C_3$  型から  $C_4$  型への進化途上と考えられる  $C_3$ - $C_4$  中間型の植物種が存在するので、ABA と青色光に応答した葉肉葉緑体凝集運動を様々なパニカム属植物で比較した。その結果、 $C_3$  型種（*Panicum bisulcatum*, *P. laxum*, *P. trichanthum*）では逃避運動のみが見られた。一方、 $C_4$  型種（*P. amarum*, *P. bergii*, *P. dichotomiflorum*, *P. hallii*, *P. hirticaule*, *P. miliaceum*, *P. virgatum*）では凝集運動が見られた。また、 $C_3$ - $C_4$  中間型種の *P. decipiens* では凝集運動が見られなかったが、*P. milioides* においては逃避運動に加えて弱い凝集運動が観察された（図 4）。

以上の結果より、 $C_4$  植物は ABA と青色光に応答した凝集運動機構を普遍的に有しており、逃避運動機構をもつ  $C_3$  植物から  $C_4$  植物が分岐進化する過程で、 $C_4$  植物特有の細胞内構造や代謝様式の獲得とともに葉緑体凝集運動機構も獲得してきたと推察された。 $C_3$ - $C_4$  中間型種において、凝集運動機構をもつ種と持たない種が確認されたことから、両植物種の差異を詳しく比較することで、凝集運動を誘起する分子機構の解明を目指したい。

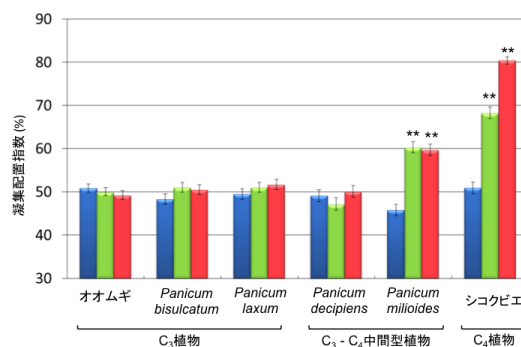


図4 ABA および青色光に対する葉肉葉緑体配向性応答の比較。葉片を ABA あり、または、なしの溶液に浮かべ、青色光を照射した。横断葉切片の顕微鏡像より、葉肉葉緑体凝集運動の程度を示す凝集配置指数を算出した。各植物種において、右端(青)が処理前、真ん中(緑)が ABA を含まない溶液での処理、左端(赤)が ABA 溶液での処理を示す。\*\*は、各植物種における処理前の指数と比較して、1%水準で有意差があることを示す。

(8)  $C_4$  植物に特異的な葉肉葉緑体凝集運動の推定される生理的意義として、①葉緑体の相互被陰による強光ストレス障害からの防御、②ストレス下で維管束鞘細胞から漏出する  $CO_2$  の再固定促進、③ストレス下での光呼吸代謝機能の維持、④  $C_4$  光合成中間代謝産物の細胞間輸送の促進、などが考えられた。本研究期間内ではこれらの仮説を証明することができなかったが、ストレス下での  $C_4$  光合成機能と葉緑体凝集運動の関連性を詳しく解析することで、凝集運動の生理的意義や分子機構が明らかになると考えている。

## 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 16 件)

- ① Taniguchi, M. and Miyake, H. (2012) Redox-shuttling between chloroplast and cytosol: integration of intra- and extra-chloroplast metabolism. Current Opinion in Plant Biology (印刷中) (査読有) DOI:10.1016/j.pbi.2012.01.014
- ② 谷口光隆 (2012) 植物の  $CO_2$  固定機能を高める  $C_4$  光合成の最近の話題. 日本の科学者, 47: 307-311 (査読有) <http://www.jsa.gr.jp/04pub/index.html#nihonnokagakusya>
- ③ Maai, E., Shimada, S., Yamada, M., Sugiyama, T., Miyake, H. and Taniguchi, M. (2011) The avoidance and aggregative movements of mesophyll chloroplasts in  $C_4$  monocots in response to blue light

and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* 62: 3213-3221 (査読有) DOI:10.1093/jxb/err008

- ④ Maai, E., Miyake, H. and Taniguchi, M. (2011) Differential positioning of chloroplasts in  $C_4$  mesophyll and bundle sheath cells. *Plant Signaling & Behavior* 6: 1111-1113 (査読無) DOI:10.4161/psb.6.8.15809
- ⑤ 間合絵里, 三宅博, 谷口光隆 (2011) 青色光と ABA に応答した  $C_4$  植物の葉肉細胞における葉緑体の運動. *光合成研究*, 21: 16-19 (査読有) <http://photosyn.c.u-tokyo.ac.jp/>
- ⑥ Kinoshita, H., Nagasaki, J., Yoshikawa, N., Yamamoto, A., Takito, S., Kawasaki, M., Sugiyama, T., Miyake, H., Weber, A.P.M. and Taniguchi, M. (2011) The chloroplastic 2-oxoglutarate/malate transporter has dual function as the malate valve and in carbon/nitrogen metabolism. *Plant Journal* 65: 15-26 (査読有) DOI:10.1111/j.1365-313X.2010.04397.x
- ⑦ Yamada, M., Kawasaki, M., Sugiyama, T., Miyake, H. and Taniguchi, M. (2009) Differential positioning of  $C_4$  mesophyll and bundle sheath chloroplasts: Aggregative movement of  $C_4$  mesophyll chloroplasts in response to environmental stresses. *Plant & Cell Physiology* 50: 1736-1749 (査読有) DOI:10.1093/pcp/pcp116

[学会発表] (計 13 件)

- ① 谷口光隆, 塚口駿貴, 間合絵里, 島田祥宇, 三宅博 葉肉葉緑体の凝集運動は  $C_4$  植物に共通した生理応答である. 第 3 回日本光合成学会, 2012 年 6 月 1~2 日 (横浜)
- ② Maai, E., Miyake, H. and Taniguchi, M. Movement of chloroplasts in  $C_4$  mesophyll cells in response to blue light and abscisic acid. The 7th Asian Crop Science Association Conference, 2011 年 9 月 27~30 日 (Bogor, Indonesia)
- ③ 間合絵里, 三宅博, 谷口光隆  $C_4$  植物葉肉葉緑体の青色光と ABA に応答した運動. 日本作物学会第 230 回講演会, 2010 年 9 月 4~5 日 (札幌)

④ 島田祥宇, 三宅博, 谷口光隆 環境ストレスに可逆的に応答する  $C_4$  植物葉肉葉緑体の細胞内配置. 日本作物学会第 230 回講演会, 2010 年 9 月 4~5 日 (札幌)

⑤ Maai, E., Shimada, S., Yamada, M., Miyake, H., and Taniguchi, M. Aggregative movement of  $C_4$  mesophyll chloroplasts in response to environmental stresses. 2010 Symposium on  $C_4$  Plant Biology, 2010 年 8 月 18~20 日 (上海, 中国)

⑥ 間合絵里, 谷口光隆, 三宅博 青色光および ABA に応答した  $C_4$  植物葉肉葉緑体の運動. 第 1 回日本光合成学会, 2010 年 6 月 4~5 日 (東京)

[その他]

ホームページ

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~shigen/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷口 光隆 (TANIGUCHI MITSUTAKA)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・  
准教授  
研究者番号: 40231419

### (2) 研究協力者

三宅 博 (MIYAKE HIROSHI)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号: 60134798