

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19256

研究課題名（和文）陸上植物におけるサイトプラスミックフリージング現象の機構解明

研究課題名（英文）Studies of cytoplasmic freezing in land plants

研究代表者

佐藤 良勝（Sato, Yoshikatsu）

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任准教授

研究者番号：30414014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：植物は個体としては動くことはできないが、その細胞内では原形質流動とよばれる細胞質内で原形質が流れるように動く現象が知られている。光合成器官である葉緑体は光刺激に応じて適切に再配置する葉緑体光定位運動と呼ばれる現象が知られている。また、糖の有無によってその光応答性が変化することも知られている。さらに、葉緑体の配置は、温度刺激や接触刺激によって誘導されることも報告されている。本研究では、私達はコケ植物蘚類のヒメツリガネゴケを用いて、環境シグナルに応じて葉緑体を含めた細胞内のオルガネラが停止する新たな現象を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、応募者自身による現象発見に端を発する芽生え期の研究であり完全にオリジナルな研究提案であり探索的性質が強く、導き出される学術的成果は独創的なものとなったと自負する。また、本研究は現象の解析基盤の創出から確立する必要があり、新たなライブセル解析システムを創出する価値があった。さらに本研究の成果は、新規現象の発見という学術的な意義をもたらすとともに、サイトプラスミックフリージング現象を指標とした植物ストレス応答機構の観点からバイオマス増産にも関与する可能性があり、農学分野の発展に寄与する社会的意義が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：Plants can not be capable of movement as individual organisms, but when observed under a microscope, a phenomenon known as cytoplasmic streaming can be observed, where protoplasm flows within the cytoplasm of their cells. Additionally, chloroplasts, the organelles responsible for photosynthesis, demonstrate a phenomenon called chloroplast photorelocation movement, where they appropriately redistribute in response to light stimulation. It has been known that the responsiveness of chloroplast photorelocation movement could vary depending upon the presence or absence of sugars. Furthermore, it has been also reported that chloroplast distribution could be induced by low-temperature and mechanical stimulation. In this study, using the moss species *Physcomitrium patens*, we discovered and analyzed a phenomenon wherein organelles within cells, including chloroplasts, halt in response to environmental signals.

研究分野：ライブセル生物学

キーワード：オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

植物は個体としては動くことはできないが、その細胞内では原形質流動とよばれる細胞質内で原形質が流れるように動く現象が知られている。光合成器官である葉緑体はさまざまな環境因子に応答してその細胞内配置を変化させる(図 1)。最も広く知られる現象は、光刺激に応じて適切に再配置する葉緑体光定位運動と呼ばれる現象である(1)。また、糖の有無によって葉緑体光定位運動の応答性が変化することも知られている(2, 3)。さらに、葉緑体の配置は、温度刺激や接触刺激によって誘導されることも報告されている(4, 5)。我々は、環境刺激により葉緑体を含む原形質の動きが停止すると思われるサイトプラスミックフリージング現象を発見した。

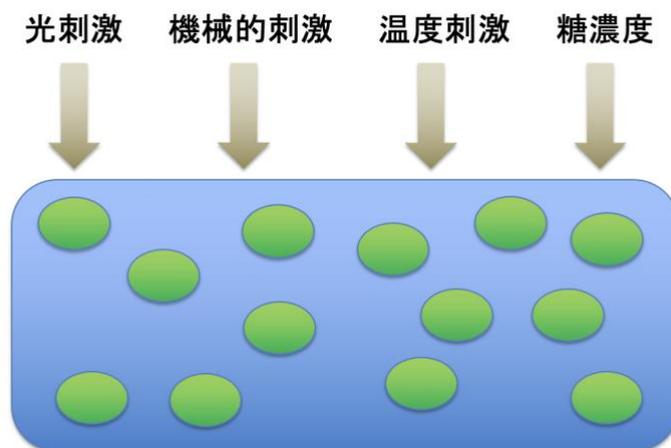


図 1. 環境因子による葉緑体運動

2. 研究の目的

これまでに報告例のないサイトプラスミックフリージング機構解析のイメージング解析基盤を創り、サイトプラスミックフリージング現象の植物細胞および植物の発生に対する重要性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 現象の基礎的解析

植物材料は、ヒメツリガネゴケの原系体を BCDAT 培地で約 3-5 週間培養して発生してきた茎葉体を用いた。茎葉体のサイトプラスミックフリージング現象の解析は、暗室下で赤外線イメージング顕微鏡 (AxioObserver; Zeiss) を用いて行った。観察光は、ハロゲンランプを光源に 850 nm 以上の赤外線のみを透過する IR85 (HOYA) フィルターを用いて赤外線を用いた。タイムラプス観察のインターバルは 20 分として、24 時間から 72 時間観察した。

3-2. 各種マーカー株の作出

赤外線イメージングによる観察結果から、サイトプラスミックフリージング現象においては葉緑体だけでなく核も運動を停止している様子が伺えた。そこで、葉緑体以外のオルガネラについてのサイトプラスミックフリージング現象を観察するため、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、ペルオキシソーム、液胞を蛍光タンパク質でラベルしたヒメツリガネゴケの形質転換体を作成

した。

3-3. ライブセルイメージング解析装置の開発

サイトプラスミックフリージング現象の植物における重要性を解析するため、ヒメツリガネゴケの先端成長を追尾する動体追尾イメージング装置の開発(Tholabs)および植物の育成環境の光条件に関係なく、明期も暗期もムラなく撮影可能な赤外線マクロイメージング装置の開発に取り組んだ。

4. 研究成果

4-1. 現象の基礎的解析

赤外線イメージングによるタイムラプス観察のデータから、N 枚目の画像(T_n)から N-1 枚目の画像(T_{n-1})の差分画像の動画ファイルを作成し、その明るさを指標とした Motility Index を算出した。その結果、サイトプラスミックフリージング現象は、刺激開始後 1 時間以内に誘導され、3-4 時間継続することがわかった(図2)。

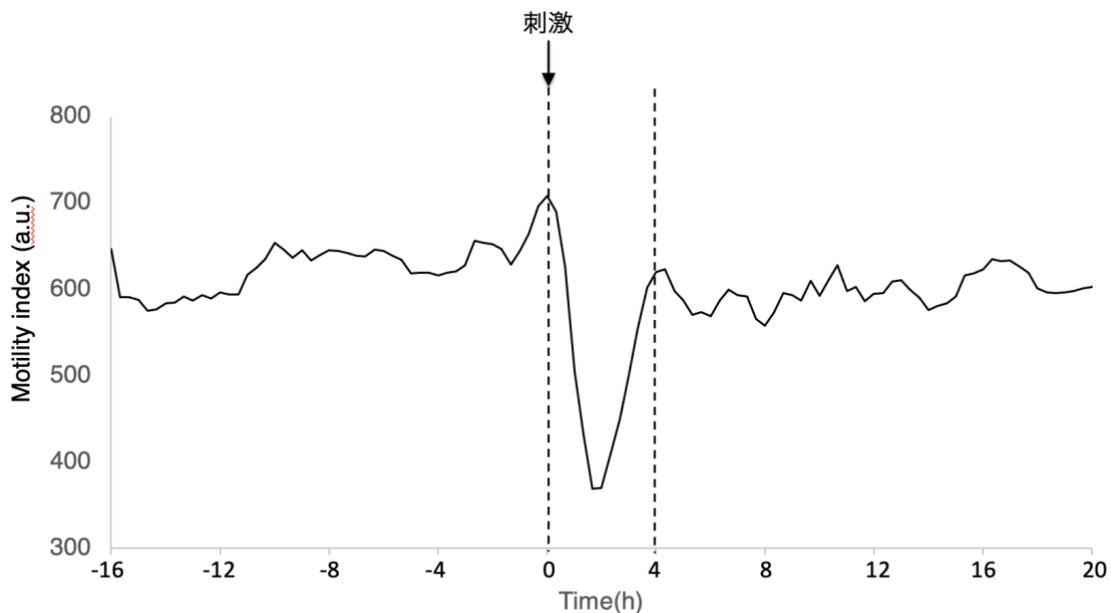


図2. ヒメツリガネゴケにおけるサイトプラスミックフリージング現象

4-2 各種マーカー株の作出とその解析

図2のモータリティインデックスは、赤外線イメージングにおいて十分なコントラストがえられる葉緑体を主とした運動変化を知ることができた。一方、その他のオルガネラが停止しているかどうかは赤外線イメージングだけで判断するのは困難である。そこで、ヒメツリガネゴケの各種オルガネラマーカーラインを作成した。各種マーカー株については、核は nls 配列、ミトコンドリア mito 配列、小胞体は HDEL 配列、ゴルジ体は Man 配列、ペルオキシソームは SKL 配列、葉緑体外包膜は OEP7 配列、液胞膜は VAM3 配列を用いて蛍光タンパク質 GFP 遺伝子の下流に融合して作成した(図2)。その結果、それぞれのオルガネラを特異的にラベルする株を得ることができた。

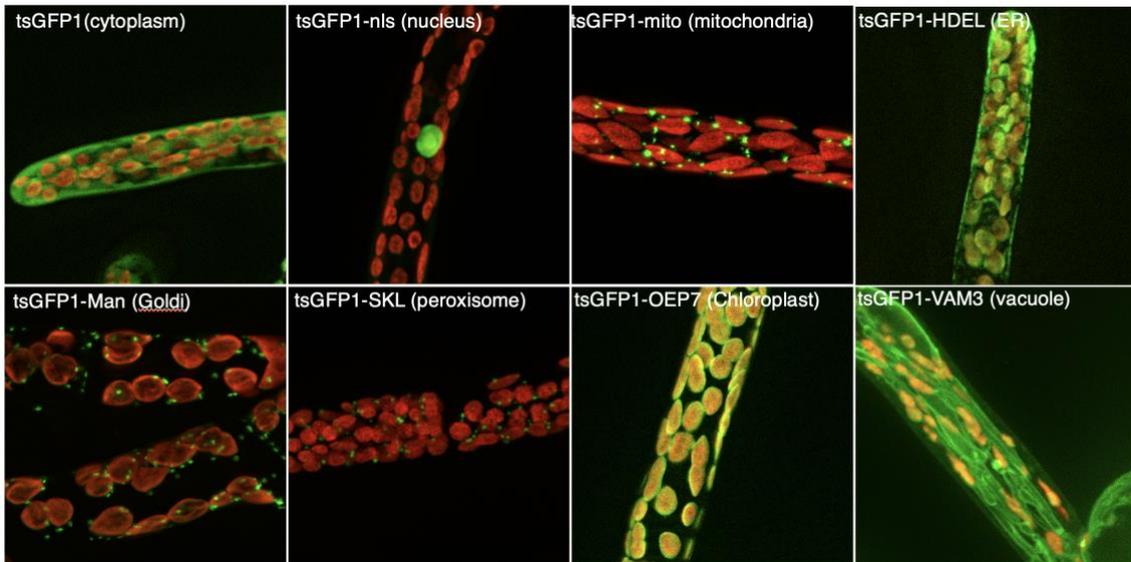


図3. ヒメツリガネゴケにおける各種オルガネラマーカー株の作出

次に、これらの株を用いて、申請者が考案した蛍光撮影時にのみ植物育成用の照明が消灯される明暗自動調節蛍光タイムラプスイメージングシステムで、様々なオルガネラにおけるサイトプラスミックフリージング現象の解析を開始した。しかし、本システムを用いて蛍光マーカー株を観察したところ、サイトプラスミックフリージング現象が見られなくなるという予期しない結果となった。おそらく蛍光観察における励起光の強度に起因するものと思われ、撮影条件の適正化を図ってる段階である。しかし、蛍光マーカー株の活用には励起光が必要であり、もし僅かな励起光でもサイトプラスミックフリージング現象に影響を与えるようであれば、さまざまなオルガネラの動態を解析するには、発光系のマーカー株に変更する必要があるが、本研究期間においては実現できなかった。

4-3 ライブセルイメージング解析装置の開発

プラスミックフリージング現象の植物細胞および植物の発生に対する重要性を明らかにするため、動体追尾イメージングや植物の育成環境の光条件に関係なく、明期も暗期もムラなく撮影可能な赤外線マクロイメージング装置の開発に取り組んだ。

動体追尾イメージングに関しては、ニコンの Keep object in view というマクロを動かすことにより可能となった。今後はサイトプラスミックフリージング誘導過程における細胞伸長や細胞分裂周期に与える影響を解析する予定である。

一方、植物個体を長期間観察する時、昼夜の明るさが異なるために撮影した画像についても、被写体を同じ明るさで輝度ムラなく撮影し続けることは困難である。そこで、赤外線マクロイメージング装置を作製した。赤外線マクロイメージング装置は、前述した赤外線イメージング顕微鏡に用いるカメラを顕微鏡から独立させた装置であり、別途光源として赤外線 LED を搭載させた。これにより植物個体全体の観察において、育成光の影響を完全に無視できるマクロイメージングシステムを確立した。図4は植物育成光消灯時と点灯時の撮影を並べて示しているが、輝度ムラなく撮影できていることがわかる(図4)。

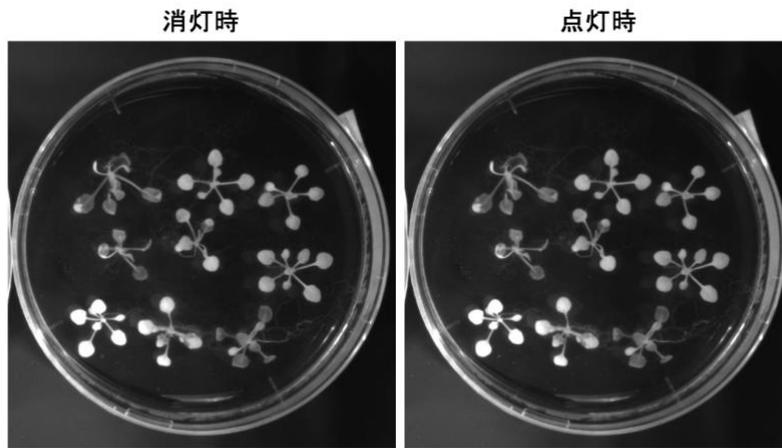


図4 植物への育成光条件に依存しない観察法
育成光消灯時に撮影した場合(左図)も点灯時に撮影した場合(右図)も輝度ムラなく撮影できる。

(参考文献)

1. Masamitsu Wada, Takatoshi Kagawa, Yoshikatsu Sato (2003) Chloroplast movement. *Annu Rev Plant Biol* 54 455-68
2. Yuka Sugiyama, Akeo Kadota (2011) Photosynthesis-Dependent But Neochrome1-Independent Light Positioning of Chloroplasts and Nuclei in the Fern *Adiantum capillus-veneris*. *Plant Physiol* 155 1205-1213
3. Agnieszka Katarzyna Banaś, Halina Gabryś (2007) Influence of Sugars on Blue Light-Induced Chloroplast Relocations *Plant Signal Behav* 2 221-230
4. Yutaka Kodama, Hidenori Tsuboi, Takatoshi Kagawa, Masamitsu Wada (2008) Low temperature-induced chloroplast relocation mediated by a blue light receptor, phototropin 2, in fern gametophytes
5. Yoshikatsu Sato, Akeo Kadota, Masamitsu Wada (1999) Mechanically induced avoidance response of chloroplasts in fern protonemal cells. *Plant Physiol* 121 37-44

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshikatsu Sato, Kakishi Uno, Nagisa Sugimoto	4. 巻 34
2. 論文標題 Plant DNA staining with new DNA staining dyes (Kakshine) based on period cyanine backbone	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Morphology	6. 最初と最後の頁 63-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5685/plmorphol.34.63	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Akira Yoshinari, Reika Isoda, Noriyoshi Yagi, Yoshikatsu Sato, Jelmer J. Lindeboom, David W. Ehrhardt, Wolf B. Frommer, Masayoshi Nakamura	4. 巻 -
2. 論文標題 Near-infrared imaging of phytochrome-derived autofluorescence in plant nuclei.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant J	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.16699	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 該当する

1. 著者名 Tsuayoshi Aoyama, Nagisa Sugimoto, Yoshikatsu Sato	4. 巻 -
2. 論文標題 Application of fluorescence lifetimes to multi-imaging analysis in plant cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.08.28.555227	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshikatsu Sato
2. 発表標題 Live cell imaging with different fluorescence lifetimes as well as fluorescence wavelength
3. 学会等名 New Frontiers in Developmental Biology: Celebrating the Diversity of Life, 3rd FRANCO-JAPANESE Developmental Biology meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究協力者	杉本 渚 (Sugimoto Nagisa)		
研究協力者	青山 剛士 (Aoyama Tsuyoshi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------