

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 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22770046
研究課題名（和文）	カルシウム測定系を利用した葉緑体からの新規細胞内情報伝達経路の 解明
研究課題名（英文）	Elucidation of chloroplast-mediated calcium signaling pathway in Arabidopsis mesophyll cells
研究代表者	
	原田 明子 (Harada Akiko)
	大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：	80360626

研究成果の概要（和文）：

葉緑体は、自身の機能・分化の状態に応じて核や他のオルガネラへと情報を発信する。本研究では、葉緑体からの情報伝達因子としてサイトソルの Ca^{2+} シグナルに着目した。シロイヌナズナの葉において、赤色光により光合成に依存してサイトソル Ca^{2+} 濃度が上昇すること、 Ca^{2+} は細胞外から Ca^{2+} チャネルを介して流入している可能性を示した。また葉緑体関連突然変異体を用いて Ca^{2+} 濃度変化を測定する実験系を確立し、 Ca^{2+} 上昇が異常な突然変異体を見出した。

研究成果の概要（英文）：

We focused on a role of calcium signal in the chloroplast-mediated signaling pathway. We revealed that red light increased cytosolic Ca^{2+} through operation of photosynthesis in *Arabidopsis* leaves.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：シロイヌナズナ、光合成、葉緑体、カルシウムシグナル、赤色光

1. 研究開始当初の背景

植物特有のオルガネラである葉緑体は、自身の機能・分化の状態に応じて核や他のオルガネラへと情報を発信することが知られている。葉緑体からの情報伝達因子としては、活性酸素や Mg-プロトポルフィリン IX、プラストキノン等の酸化還元状態の関与などが報告されている。しかし、これらの上流や下流で働く因子は分かっておらず、葉緑体から

どのような因子を介して他のオルガネラへと情報が伝達されているか、その全容については未解明な部分が多い。また Mg-プロトポルフィリン IX については情報伝達因子として働き得ないことが示されるなど不明な点も多い。

我々は、シロイヌナズナ葉肉細胞において弱光の青色光により青色光受容体フォトトロピン依存的にサイトソル Ca^{2+} 濃度が上昇す

ること、強光下ではフォトトロピン依存的なものに加えて光合成依存的 Ca^{2+} 上昇が存在することを見出していた (図 1)。光合成依存的 Ca^{2+} 上昇は、細胞膜 Ca^{2+} チャンネルブロッカー処理により阻害された。これらの結果は、強光下では光合成に依存して葉緑体から細胞膜 Ca^{2+} チャンネルへと情報が伝達されていること

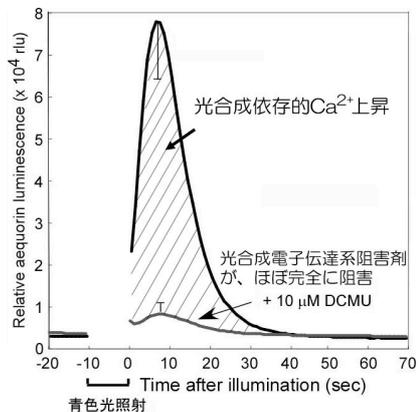


図 1 フォトトロピン二重変異体における青色光 ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) による Ca^{2+} 上昇と光合成電子伝達系阻害剤 DCMU の効果。縦軸はイコーリン発光でサイトソール Ca^{2+} 濃度を反映する。

を示している (図 2)。本研究では、光合成に依存してサイトソールで上昇する Ca^{2+} が葉緑体からの情報伝達を媒介する因子であると予想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 葉緑体からサイトソール Ca^{2+} 応答に至る情報伝達経路と、(2) 上昇した Ca^{2+} シグナルの役割を明らかにすることである (図 2)。

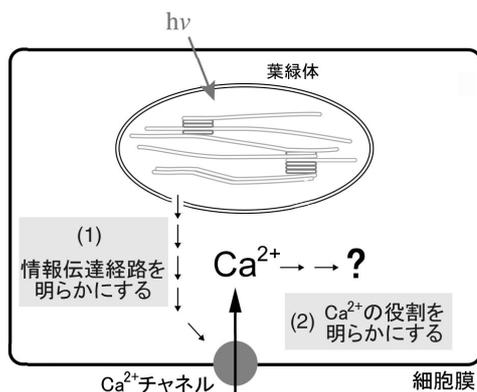


図 2 本研究の 2 つの目的

具体的には、

① 光合成に有効な赤色光による Ca^{2+} 応答を調べるために、 Ca^{2+} 結合性発光蛋白質イコーリンを導入したシロイヌナズナを用いたイコーリン発光測定実験系を確立する。また Ca^{2+} 上昇が細胞膜の Ca^{2+} チャンネル活性による

ものか調べるために、 Ca^{2+} 電流をパッチクランプ法により測定する。

② 赤色光による Ca^{2+} 応答が葉緑体に依存しているかを調べるため、斑入り突然変異体 *var2* の葉緑体の未発達な葉を用いて Ca^{2+} 濃度変化を測定する。

③ 葉緑体からの情報伝達因子として予想される因子 (活性酸素、Mg-プロトポルフィリン IX など) の代謝が異常な既存のシロイヌナズナ突然変異体や、プラストキノン酸化還元状態を変化させる阻害剤を用いて Ca^{2+} 応答を調べることにより、 Ca^{2+} チャンネル活性化にどのような因子が関与するかを明らかにする。

④ Ca^{2+} 応答が異常な突然変異体の形態や光応答反応を観察し、どのような現象に Ca^{2+} シグナルが関与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナ葉におけるサイトソール Ca^{2+} 濃度測定

Ca^{2+} 結合性発光タンパク質イコーリンを発現させたシロイヌナズナ (*Col-0*, *var2*, *flu* 突然変異体) を作出した。葉を切り取り、 $1 \mu\text{M}$ セレンテラジン溶液に浮かべ、暗黒下で 6 時間以上処理した。処理した葉を人工池水を満たしたチューブに入れ、イコーリン発光をルミカウンター 2500 (マイクロテックニチオン社) で測定した。この際、接触刺激による Ca^{2+} 応答の影響を排除するため、機器に内蔵されている攪拌装置を用いてチューブごと攪拌し、常に葉に接触刺激を与えた状態で赤色光を照射した。赤色光照射は赤色 LED (RoHS, $\lambda_{\text{max}} = 650 \text{ nm}$) により行い、照射時間は 10 秒間とした。以上の実験は安全光 (緑色光) 下で行った。測定後、それぞれの葉の重量測定及びクロロフィル定量 (Porra et al. (1989) *Biochimica et Biophysica Acta* 975: 384-394) を行い、クロロフィル量あたりのイコーリン発光変化を計算した。

(2) シロイヌナズナ葉肉細胞におけるホールセル電流測定 (岡山大学資源植物科学研究所・森泉博士との共同研究)

ホールセル電流測定のためのピペット溶液は 10 mM BaCl_2 , 4 mM EGTA , 10 mM HEPES / Tris (pH 7.1)、バス溶液は 100 mM BaCl_2 , 10 mM Mes / Tris (pH 5.6) とし、それぞれ浸透圧をソルビトールにより 500 mOsm および 485 mOsm とした。ホールセル電流測定、記録およびデータ処理には、植物科学最先端研究拠点ネットワークにより岡山大学資源植物科学研究所に設置された multiclamp700B アンプ (Molecular Devices)、Clampex 10.3

(Molecular Devices)、Clampfit10.3 ソフトウェア (Molecular Devices) を用いた。ガラス電極作製にはプラー (Model P1000, SUTTER INSTRUMENTS)、マイクロフォーシ (MF-900, ナリシゲ) を用いた。測定には、シロイヌナズナ (Col-0) の葉から調製した葉肉細胞プロトプラストを用いた。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの葉において、赤色光 (フォトトロピンには無効で光合成に有効) による Ca^{2+} 濃度変化を調べた。野生型 (Col-0) のシロイヌナズナ葉では、赤色光照射によりサイトソル Ca^{2+} 濃度上昇が観察された。赤色光 $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のときに反応がほぼプラトーに達したため、以後の実験にはこの光強度を用いた。次にこの反応に対する葉緑体の関与を調べるために、イコーリンを導入した斑入り突然変異体 *var2* の葉を用いて Ca^{2+} 濃度変化を調べた。*var2* 突然変異体の葉緑体が未発達でクロロフィル量の少ない葉においては、ほとんどの場合、赤色光による Ca^{2+} 上昇が抑えられた。以上から、赤色光による Ca^{2+} 上昇には葉緑体が関与すると考えられた。ただし、クロロフィル量の少ない葉でも Ca^{2+} 応答を示す場合があった。葉緑体以外の光受容体の関与も考えられた。

(2) 赤色光による Ca^{2+} 上昇にプラスチキノンの酸化還元状態が関与するかどうかを光合成電子伝達系阻害剤 DCMU および DBMIB 処理により調べた。DCMU は酸化型プラスチキンを蓄積させ、DBMIB は、還元型プラスチキンを蓄積させるが、いずれの阻害剤も Ca^{2+} 上昇を阻害した。以上から、この反応には、プラスチキンの酸化還元状態ではなく、光合成電子伝達そのものが関与することが分かった。

(3) 赤色光による Ca^{2+} 上昇が Ca^{2+} チャネルを介した細胞内への Ca^{2+} の流入によるものかどうかを、葉肉細胞プロトプラストを用いたホールセル電流測定により調べた。顕微鏡下でホールセルを作成し、45 分間の暗処理後、赤色光を連続照射下で 0 mV から -200 mV までのランプ電圧およびステップ電圧をかけた。その結果、照射開始約 30 秒後から Ca^{2+} 流入によると考えられる電流が観察された。赤色光による Ca^{2+} 濃度上昇は、 Ca^{2+} チャネルを介したものである可能性が示された。

以上のように、本研究では、葉緑体関連突然変異体を用いて Ca^{2+} 応答を調べる実験系を確立することができ、また *var2* 突然変異体で Ca^{2+} 応答が異常になっていることを見出すことができた。今後、様々な突然変異体を用いて Ca^{2+} 応答を調べることにより、どのよう

な因子が光合成に依存した Ca^{2+} チャネル活性化に関与するかを明らかにできる。また、 Ca^{2+} 応答が異常な突然変異体の形態や環境応答反応を調べることで、 Ca^{2+} シグナルの役割を明らかにできると考えられる。

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 5 件)

- ① Akiko Harada, Atsushi Takemiya, Shin-ichiro Inoue, Tatsuya Sakai, Ken-ichiro Shimazaki “Role of RPT2 in leaf positioning and flattening and a possible inhibition of phot2 signaling by phot1.” *Plant and Cell Physiology*, 査読有、Vol. 54、2013、pp. 36-47 DOI: 10.1093/pcp/pcs094
- ② Toshifumi Tsutsumi, Atsushi Takemiya, Akiko Harada, Ken-ichiro Shimazaki “Disruption of ROOT PHOTOTROPISM2 gene does not affect phototropin-mediated stomatal opening.” *Plant Science*, 査読有、Vol. 201-202、2013、pp. 93-97 DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.11.012
- ③ Yumi Nakai, Akiko Harada, Yasuyuki Hashiguchi, Masato Nakai, Hideyuki Hayashi “*Arabidopsis* molybdopterin biosynthesis protein Cnx5 collaborates with the ubiquitin-like protein Urm11 in the thio-modification of tRNA” *Journal of Biological Chemistry*, 査読有、Vol. 287、2012、pp. 30874-30884 DOI: 10.1074/jbc.M112.350090
- ④ Tatsuya Sakai, Susumu Mochizuki, Ken Haga, Yukiko Uehara, Akane Suzuki, Akiko Harada, Takuji Wada, Sumie Ishiguro and Kiyotaka Okada “The WAVY GROWTH 3 E3 ligase family controls the gravitropic response in *Arabidopsis* roots.” *The Plant Journal*, 査読有、Vol. 70、2012、pp. 303-314 DOI: 10.1111/j.1365-3113.2011.04870.x
- ⑤ Akiko Harada (2010) “Changes in Ca^{2+} metabolism in *Arabidopsis* guard cells in response to blue light.” *Plant Signaling and Behavior*, 査読無、Vol. 5、2010、pp. 397 - 400 <http://www.landesbioscience.com/journals/psb/article/10794/>

[学会発表] (計 8 件)

国内外の別：国内 7 件、海外 1 件

- ① 原田明子、武宮淳史、井上晋一郎、酒井達也、島崎研一郎「RPT2 は葉の定位と平滑化に関与している」第 54 回 日本植物生理学会年会・岡山・2013 年 3 月
- ② Yumi Nakai, Akiko Harada, Yasuyuki Hashiguchi, Masato Nakai “AtCnx5, Arabidopsis sulfurtransferase protein involved in molybdopterin biosynthesis, is also required to the thio-modification of tRNAs.” 第 54 回 日本植物生理学会年会・岡山・2013 年 3 月
- ③ 中井由実, 原田明子, 橋口康之, 中井正人, 林 秀行「Urm1 と Uba4 は細胞内含硫小分子への硫黄運搬と Urylation に関わる UBL-UBA システムである」第 85 回日本生化学会大会・福岡・2012 年 12 月
- ④ 原田明子「光応答とカルシウムシグナル」第 11 回 植物生体膜談シンポジウム「植物細胞におけるカルシウムシグナリング」・姫路・2012 年 9 月 15 日
- ⑤ 中井由実、原田明子、橋口康之、中井正人、林秀行「シロイヌナズナおよび酵母においてサイトゾルの tRNA 硫黄修飾に関与する、ユビキチン様 (UBI) タンパク質とユビキチン活性化酵素様 (UBA) タンパク質の比較解析」第 84 回生化学会大会・京都・2011 年 9 月
- ⑥ 堤俊文、武宮淳史、原田明子、島崎研一郎「シロイヌナズナ孔辺細胞青色光情報伝達における RPT2 の機能解析」第 52 回 日本植物生理学会年会・仙台・2011 年 3 月
- ⑦ 堤俊文、武宮淳史、原田明子、島崎研一郎「孔辺細胞青色光情報伝達における RPT2 の機能解析」第 55 回三学会合同大会 (植物学会 九州・沖縄支部会)・福岡 2010 年 5 月

[その他]

ホームページ等

大阪医科大学・生物学教室ウェブサイト

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/bio/biology006.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 明子 (Harada Akiko)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：80360626