

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570059

研究課題名(和文) 定量的機能解析による葉緑体分裂制御システムの解明

研究課題名(英文) Study on the regulation of plastid division by a quantitative method

研究代表者

伊藤 竜一 (Itoh, Ryuichi)

琉球大学・理学部・准教授

研究者番号：50322681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：一般に葉緑体は均等二分裂によって増殖するため、一つの植物細胞内では葉緑体形態が均一となる。いっぽう、非緑色のプラスチドの形態は、葉緑体とは全く異なる複雑かつ不均一な形態をとるが、その分子制御は不明である。本研究では、非緑色プラスチドの形態変異体2種を新たに取得し、各原因遺伝子をほぼ特定した。一方の変異体の原因遺伝子は、葉緑体分裂に関わる既知遺伝子であった。もう一方の変異体の原因遺伝子は機能未知の新規遺伝子である可能性が高い。この結果から、非緑色プラスチドの形態は、葉緑体分裂関連遺伝子と非緑色プラスチドに対してのみ機能する遺伝子の双方で制御されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Generally, chloroplasts proliferate by binary fission so that morphology of chloroplasts is uniform within a single plant cell. To the contrary, morphology of non-green (non-photosynthetic) plastids is quite amorphous and heterogeneous, whose molecular basis is currently unknown. In this study, I obtained two Arabidopsis mutants which have aberrant morphology of non-green plastids and identified the candidates of the responsible genes for both mutants. A known gene for chloroplast division was found to be responsible for one mutant, whereas a function-unknown gene was likely to be responsible for another mutant. Taken together, these results suggest that morphology of non-green plastids is controlled both by chloroplast division genes and by non-green plastid-specific genes.

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：植物

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体は、進化的にシアノバクテリアの祖先が真核生物に細胞内共生することにより発生した植物特有の細胞小器官である。葉緑体には光合成 (CO<sub>2</sub> 固定) のほか、窒素代謝、硫黄代謝、アミノ酸合成、脂肪酸合成などの主要代謝経路が集中しており、植物の物質生産性と多様性を支えている。光合成組織の葉緑体は細胞当たり数十から数百個に達するが、それらはシュート頂分裂組織の少数の原色素体由来する。原色素体は植物の組織形成プログラムに従って細胞内で分化しつつ分裂増殖し、光合成機能を反映した形態を獲得しながら、細胞あたりの葉緑体個数を適切なレベルに調節する。1990年代末まで葉緑体分裂は主に細胞学的手法により研究が進められ、分子レベルでの知見は乏しかった。しかし2000年前後の植物ゲノム計画の成果により、バクテリアの細胞分裂リング因子 FtsZ および分裂位置制御因子 MinD, MinE の相同遺伝子が植物核ゲノムに保持されていること、更にそれらの産物が葉緑体ストロマに局在し分裂制御因子として機能することが証明された。その分子メカニズムの解明は当該分野の主要研究課題であった。また、非緑色 (非光合成) のプラスチドの増殖機構は、葉緑体分裂機構とは異なることが変異体解析などから明らかにされてきていたが、その具体的なメカニズムも未解明の重要課題であった。

これまでの葉緑体分裂研究の問題点として、研究の多くが定性的研究にとどまっており、定量的分析を欠いていたという点を挙げなければならない。すなわち、従来の研究では、遺伝子ノックアウト植物や過剰発現植物といった両極端なサンプルの表現型を観察することによって、個々の葉緑体分裂因子の機能を間接的かつ大雑把に推論していたに過ぎないと考えられる。生まれつきの遺伝子欠損や発現過剰に対して生物は様々な補完作用を示すため、最終表現型からの遺伝子機能の推定が正しい結論を導くとは限らない。そのため、遺伝子発現量の変化が葉緑体分裂に影響を及ぼす過程をリアルタイムでトレースでき、なおかつ遺伝子発現レベルと葉緑体分裂の異常度の相関を解析できるような、新たな実験系が必要となった。更に、従来の実験系と新規実験系とを非緑色プラスチドの研究にも適用することによって、非緑色プラスチドの増殖機構について研究を推し進める必要があった。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、上記の問題意識に基づき、

- (1) 葉緑体分裂制御システムの定量的解析法の開発
- (2) 非緑色プラスチドの増殖を制御する遺

伝子の同定  
を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 葉緑体分裂制御システムの定量的解析法の開発

葉緑体分裂因子の発現レベルの変化が葉緑体分裂に及ぼす影響を経時的に追跡するため、薬剤 (17 $\beta$ -estradiol) により発現誘導可能な転写制御系, XVE システム (Zuo *et al.* 2000) を基盤技術として利用した。XVE システムでは、外部からの 17 $\beta$ -estradiol の添加によって人工転写アクティベーター XVE の発現を誘導することにより、XVE 応答プロモーター ( $O_{LexA}$ ) 下に置いた目的遺伝子の発現をも誘導することができる。 $O_{LexA}$  下に *MinE1*, *MinD1*, *ARC3*, *MCD1*, *ARC6*, *PARC6*, *FtsZ1-1*, *ARC5* の各遺伝子 (cDNA またはゲノム DNA) をそれぞれ接続した発現コンストラクトを作製した。各遺伝子のコード領域末端には蛍光タンパク質 (GFP, CFP, YFP) のコード配列を接続した。

土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* の Ti プラスミドを介した floral dip 法 (Clough & Bent 1998) により、上記コンストラクトをシロイヌナズナへ導入した。形質転換第 1 世代を薬剤 (ハイグロマイシン) 耐性によりスクリーニングし、更に形質転換第 2 世代の中から導入遺伝子を homozygous にもつラインを選抜した (その子孫 [すなわち形質転換第 3 世代] が全て薬剤耐性をもてば、それが目的の homozygous ラインである)。これらのライン (以下、XVE ラインと呼ぶ) を以後の研究に用いた。

各 XVE ラインについて 様々な培養方法 (液体震盪培養、寒天培養、土壌栽培)、植物の日齢、17 $\beta$ -estradiol 濃度・処理時間・処理方法 (塗布、滴下、浸漬など) をテストし、発現誘導状態を蛍光タンパク質の蛍光強度によって確認した。発現誘導が確認された XVE ラインについて、葉緑体 (および非緑色プラスチド) の形態を蛍光顕微鏡下で観察した。

### (2) 非緑色プラスチドの増殖を制御する遺伝子の同定

葉 (本葉) の表皮において非緑色プラスチドの数・サイズ・形態が異常なシロイヌナズナ変異体を探索した。新規変異体取得の出発材料 (M<sub>0</sub> 植物) として、CaMV35S プロモーター制御下でプラスチド移行型 CFP (シロイヌナズナ FtsZ1 のプラスチド移行シグナル配列を強蛍光改変型 CFP の N 末端に接続した融合蛋白質。以下、ptCFP と呼ぶ) を構成的に強発現する系統 FL4-4 (Columbia [Col])

accession ; Itoh *et al.* 2010) を用いた。この系統の種子 ( $M_0$  種子) に対して, EMS による突然変異誘発処理を施した。変異誘発第 2 世代の種子 ( $M_2$  種子) を以下の実験に供した。

$M_2$  種子 7,000 粒を播き, 発芽後 10 日目の植物体から第一本葉基部 (葉柄を含む) を切り取り, 蛍光顕微鏡による ptCFP の観察を行った。表皮のプラスチド形態が, 同時期・同組織の親株 (変異誘発処理前の FL4-4) と明確に異なる  $M_2$  個体を選別した。本葉基部~葉柄については葉肉葉緑体の形態もあわせて観察し, 非緑色プラスチドに特異的な形態変異有無を確認した。

上で得られた変異体に関して, 親株 (FL4-4) と 3 回の戻し交雑を実施し, 目的外の余分な変異をできる限り除去すると同時に, 遺伝様式を確認した。これらの変異株を, accession の異なるシロイヌナズナ野生株 (Landsberg *erecta* [Ler] accession) と掛け合わせた (なお, ここでいう「Ler 野生株」は, CaMV35S pro. :: ptCFP 遺伝子を導入した ptCFP 強発現 Ler 株であり, スクリーニングと並行して予め作出した)。この交配で得られた  $F_1$  植物の自殖により,  $F_2$  種子を得る。 $F_2$  集団の中から, 元の変異体の表現型を示す個体を蛍光顕微鏡観察により選抜した。各個体 (変異体当たり約 500 個体) について, 多型マーカー (CAPS, SSLP, dCAPS) を用いて由来 accession (Col または Ler) を調べ, 原因遺伝子の存在領域を Ler 同型接合型または Col/Ler 異型接合型で挟み込むような多型マーカーによって絞り込んだ。その上で,  $F_2$  集団からバルク抽出したゲノム DNA を次世代シーケンシング技術 (NGS) により解読し, 親株ゲノムの NGS 解読結果と比較することにより, 当該領域に存在する変異 (read frequency が 100% のもの) を原因変異の候補とした。原因遺伝子の確定作業は, 既存変異体との交配によるアレリズムテスト, 原因遺伝子候補の野生型アレルの cDNA 発現コンストラクトを変異体に導入するレスキュー実験によって実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 葉緑体分裂制御システムの定量的解析法の開発

葉緑体分裂因子をコードする 8 種類の遺伝子に関して, 計 16 種類 (各遺伝子について複数種の蛍光タンパク質タグを付加した) の誘導発現型遺伝子組換えシロイヌナズナ (XVE ライン) を確立することができた。これらの XVE ラインについて, 発現誘導が葉緑体の形態, サイズ, 細胞あたりの数に及ぼす影響を調べた。その結果, 葉緑体分裂因子の発現レベルの上昇は, 必ずしも全ての組織・

細胞に一樣に影響を与えるものではなく, 細胞分裂や細胞の分化状態によって影響の有無が大きく異なることが明らかとなった。また, 蛍光タンパク質由来の蛍光強度から推定した導入遺伝子発現誘導のレベルは, 同一組織内であっても, 細胞間で非常に大きな heterogeneity が見られたため, 定量的分析に基づいた一般的結論を導き出すことは困難な結果となった。

XVE ラインのマクロな表現型, すなわち, 植物体の発生・成長・分化に関しても, 一過的な葉緑体分裂制御因子遺伝子の発現上昇が及ぼす影響を詳細に観察した。その結果, 葉緑体分裂因子 (8 遺伝子) の発現レベルの上昇は, どれも発芽を抑制することはなかった。しかしながら, 一つの遺伝子について, その一過的過剰発現が幼若個体の growth arrest, および, pale green 化を引き起こすことが明らかとなった。葉緑体分裂因子遺伝子の過剰発現, 発現抑制, 変異, 破壊などにより, 成長が顕著に阻害された例はこれまで報告されていなかった。多くの葉緑体分裂変異体では, 個体の成長そのものは (少なくとも実験室条件下では) ほとんど異常が見られない (Marrison *et al.* 1999, Schmitz *et al.* 2009)。それならば何故, 葉緑体は「わざわざ」整然と, 同じサイズ・同じ形・一定の個数となるように分裂しなければならないのか? この問題は「葉緑体分裂変異体のパラドックス」と呼ぶべきものである。上記の結果は, 葉緑体分裂と個体成長とをリンクさせる新現象である。今後, この現象について更なる研究を進めることによって, 「葉緑体分裂変異体のパラドックス」を解き, 葉緑体分裂の「真の意義」を知るための手がかりを得ることができるとも知れない。

##### (2) 非緑色プラスチドの増殖を制御する遺伝子の同定

プラスチドを CFP により蛍光ラベルしたシロイヌナズナ (FL4-4 ライン) に変異原 (EMS) 処理を施し, その  $M_2$  世代約 7,000 個体について, 蛍光顕微鏡を用いた直接観察スクリーニングをおこなった結果, 葉表皮の非緑色プラスチドの形態が異常な 2 ライン (no.3, no.6) を得ることができた。どちらのラインにも共通した表現型として, 表皮細胞当たりのプラスチド数の減少, プラスチド形態の異常と不均一化, サイズの増大, が観察された。形態異常として最も顕著な形質は, プラスチド本体から伸びる細管状構造「ストロミュール」の過剰形成・過剰伸長である。ストロミュールは, 一般に非緑色プラスチドにおいて高頻度で観察されるストロマ含有二重膜構造であるが, 両変異体においては, 形成頻度 (および絶対数)・ストロミュール長の両方が, 野生型 (変異原処理前の親株) の同組織と比較して有意に増大していた。また, 葉表皮以

外の他の非緑色細胞においても、概ね上記と同じようなプラスチド表現型が観察された。いっぽう、マクロな植物形態に関しては、親株と両変異体との間で明確な差異は見られなかった。

no.6 変異体では、葉肉葉緑体についても巨大化・形態不均一化が観察された。これは既知の葉緑体分裂変異体に見られる典型的な表現型である。これに対して no.3 変異体では、葉肉葉緑体のサイズ・形態・数は野生株と同等であった。つまり、no.6 変異体の原因遺伝子は、緑色・非緑色を問わず、プラスチド形態のユニバーサルな制御に関わる因子であるのに対して、no.3 変異体の原因遺伝子は、非緑色プラスチド特異的な形態制御因子をコードしている可能性がある。no.3 変異体のような表現型をもつ変異体はこれまで報告されていないことは、本研究で用いられたスクリーニング法が有効なものであったことを示している。また、no.3 原因遺伝子は、非緑色プラスチド特異的に形態制御に関与する、これまでに報告例のないタイプの遺伝子と考えられた。

両変異体について、多型マーカーを用いたマッピングと次世代シーケンシング法とを組み合わせた解析の結果、各原因遺伝子をほぼ特定することができた。no.6 変異体の原因遺伝子は、葉緑体分裂に関わる既知遺伝子であった。このことは、上記の表現型と合致する。また、この既知遺伝子が葉緑体分裂のみならず、プラスチド形態制御のユニバーサル因子であることも示している。この結果にヒントを得て、他の既存の葉緑体分裂変異体との比較解析をおこなった。その結果、葉緑体分裂に関わる遺伝子群の、非緑色プラスチドの形態制御への関与の程度はさまざまであり、非緑色プラスチドの形態制御には全く関与しないものから、弱く関与するもの、強く関与するもの、などのタイプに分けられることがわかった。no.6 は特に強く関与するタイプであり、特にストロミュール形成に大きな影響を及ぼしていた。いっぽう、no.3 変異体の原因遺伝子は、最終的な確定にはまだ至っていないものの、機能未知の新規遺伝子である可能性が高くなった。原因遺伝子の確定作業として、既存の T-DNA 挿入変異体およびトランスポゾン挿入変異体とのアレリズムテスト(no.3 変異体と既存の挿入変異体との人工交配、その F<sub>1</sub> 世代のプラスチド形態の観察)、および、レスキュー実験(no.3 変異体への候補遺伝子 cDNA 発現コンストラクトの導入と、そのプラスチド形態観察)を進行中である。

以上の結果から、非緑色プラスチドの形態は、葉緑体分裂関連遺伝子(の一部)と、非緑色プラスチドに対してのみ機能する遺伝子の双方で制御されていることが明らかと

なった。今後は、no.3 変異体原因遺伝子の解析を通して、

- ・ 非緑色プラスチド特異的な形態および増殖制御機構
  - ・ ストロミュール形成の制御機構
- についての理解を深めていきたい。また、no.6 変異体原因遺伝子の研究も並行して進めていくことにより
- ・ 葉緑体分裂とストロミュール形成との関係
  - ・ 葉緑体分裂機構と非緑色プラスチド増殖機構の共通性と相違点
- についても追究していきたい。

#### 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1件)

1. Makoto T. Fujiwara, Yasushi Yoshioka, Tomonari Hirano, Yusuke Kazama, Tomoko Abe, Kensuke Hayashi, Ryuichi D. Itoh (2012) Visualization of plastid movement in the pollen tube of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 7: 34-37. 査読有  
DOI: 10.4161/psb.7.1.18484

[学会発表](計0件)

[図書](計1件)

1. 伊藤竜一, 他 (2013) 知の源泉 やわらかい南の学と思想・5 (琉球大学 編). 沖縄タイムス社. 272-287.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 竜一 ( ITOH, Ryuichi )  
琉球大学・理学部・准教授  
研究者番号 : 50322681

(2) 研究分担者

該当なし (         ) )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

藤原 誠 ( FUJIWARA, Makoto )  
上智大学・理工学部・准教授  
研究者番号 : 90332345