

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：1 4 4 0 1

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：2 3 6 5 7 0 3 5

研究課題名（和文） 葉緑体は二酸化炭素定位を示すか

研究課題名（英文） Does CO<sub>2</sub> regulate the intracellular chloroplast positioning?

研究代表者

高木 慎吾 (TAKAGI SHINGO)

大阪大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：1 0 1 9 2 6 2 6

研究成果の概要（和文）：葉緑体は光合成の基質である CO<sub>2</sub> を葉内の細胞間隙から吸収する。葉肉細胞中の葉緑体が、細胞同士が隣り合う部分ではなく、細胞間隙に接する部分に分布することから、CO<sub>2</sub> 濃度の高い場所に葉緑体を分布させる仕組みがあると予想されている。細胞壁を除いた葉肉細胞プロトプラストをゲルに埋める実験系により、この予想が正しいことを強く支持する結果を得た。また、ガス交換システムを用いて個葉の細胞間隙 CO<sub>2</sub> 濃度を調節することにより、葉緑体の細胞内分布が光強度と CO<sub>2</sub> 濃度とのクロストークを介して決まることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：Chloroplasts absorb the photosynthetic substrate CO<sub>2</sub> from the intercellular air spaces. Since chloroplasts in mesophyll cells are adjacent to the cell wall along the intercellular air spaces but not the neighboring cells, it has been hypothesized that chloroplasts are located at the cell wall containing higher CO<sub>2</sub>, although without any experimental verification. By embedding mesophyll protoplasts in a gel, we obtained the results strongly supporting the hypothesis. Further, by regulating the CO<sub>2</sub> concentration in the intercellular air spaces of each leaf, we proposed that the final destination of chloroplasts is determined through cross talk between the light intensity and the local CO<sub>2</sub> concentration in the cell wall.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：細胞間隙二酸化炭素濃度、シロイヌナズナ、二酸化炭素、背腹性、葉肉細胞、葉緑体

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体の細胞内分布はさまざまな環境要因によって制御されている。最もよく知られているのは光による制御で、葉緑体は、弱光下では受光面積が最大に、強光下では最小になるように分布する。これらの反応は、弱光下で光合成速度を上げ、強光下で光傷害を避けることに寄与すると考えられている (Wada et al. 2003)。特に強光の作用については、葉緑体の分布変化が起こらないシロイヌナズ

ナ突然変異株において、野生株よりも早く光合成装置が壊れ、葉が白化、枯死することが報告されている (Kasahara et al. 2002)。

一方、光合成に適した条件下では、葉緑体は細胞間隙に接する部分に分布し、細胞同士が隣り合う部分には分布しない (Evans and von Caemmerer 1996)。光合成の基質である CO<sub>2</sub> は、大気 気孔 細胞間隙 葉肉細胞の細胞壁 細胞膜 細胞質 葉緑体包膜という経路を経てストロマに達す

る。細胞壁は液相であり、CO<sub>2</sub>は非常に拡散しにくくなることから、葉緑体が細胞間隙に沿って分布するのは、細胞間隙から効率よくCO<sub>2</sub>を吸収するためと考えられている (Terashima et al. 2006)。葉緑体が細胞間隙に沿って分布する傾向が強いほど、CO<sub>2</sub>の通りやすさの指標である葉肉コンダクタンスや光合成速度が高くなることが報告されている (Tholen et al. 2008)。

葉緑体が細胞間隙に沿って分布することから、CO<sub>2</sub>濃度の高い場所に葉緑体を分布させる仕組みがあると予想されているが、適切な実験系が開発されておらず、明確な検証例は無い。その原因として、葉緑体の細胞内分布が光を含む複数の要因の影響を受けること、刺激として光を用いる場合と比べて、葉肉細胞周辺のCO<sub>2</sub>濃度の調節や、各細胞に対して局所的な刺激を与えることが難しいことをあげることができる。

## 2. 研究の目的

本研究では、葉肉細胞をプロトプラスト化してゲルに埋め込むことにより、発生学的要因(葉の背腹性)や解剖学的要因(細胞と隣り合うか細胞間隙と隣り合うか)を除外した実験系を構築する。ゲルのCO<sub>2</sub>濃度を調節することにより、葉緑体分布のCO<sub>2</sub>応答性を定量的に解析する。

また、同化箱(密閉できる小型チェンバー)とガス交換システムを用いて個葉の細胞間隙CO<sub>2</sub>濃度を調節し、葉緑体分布決定に対する寄与を確定する。

## 3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナのロゼット葉から、葉緑体運動についてのインタクトネスをできるだけ損わないように、細胞壁分解酵素の副作用を最小限に抑えた方法で葉肉細胞プロトプラストを調製し、低温固化アガロースゲルに埋める。ゲルの片側に炭酸水素カリウム溶液(KHCO<sub>3</sub>)を置き、反対側にホスホエノールピルビン酸(PEP)およびPEPカルボキシラーゼを含む溶液を置くことによって重炭酸イオンを積極的に除き、ゲル中のCO<sub>2</sub>成分の濃度勾配を維持する。一定時間ごとに緑色光によって蛍光画像を撮影し、各プロトプラストにおける葉緑体全体の中心位置を算出することにより、分布変化を解析する。

(2) 孔辺細胞外への陰イオンの流出に必須で、気孔閉鎖に機能するシロイヌナズナSLAC1 (Negi et al. 2008, Vahisalu et al. 2008) の遺伝子破壊株、および野生株のロゼット葉を、温度を調節することのできる同化箱内に置く。ガス交換システムを用いて、組成を調節したガスを同化箱に注入し、排出されるガスのCO<sub>2</sub>濃度および水蒸気濃度から、光合成速度

および細胞間隙CO<sub>2</sub>濃度を見積もる。

異なる処理を施した後、葉を固定、包埋し、横断切片を作成する。細胞の横断面を撮影し、細胞壁を、細胞の向軸側と背軸側(発生学的パラメータ)、上下面と側面(受光量のパラメータ)、細胞間隙に接する部分と細胞に接する部分(細胞間隙CO<sub>2</sub>濃度のパラメータ)に分割する。各細胞内で葉緑体がそれぞれの部分を占める割合を求め、葉緑体の細胞内分布の傾向を定量的に解析する。

## 4. 研究成果

(1) ゲルに埋めた葉肉細胞プロトプラスト中の葉緑体分布はKHCO<sub>3</sub>溶液を置いた側へ偏り、反応は2-3時間で飽和する傾向を示した。葉緑体がCO<sub>2</sub>濃度の高い場所に定位することを強く示唆する結果が得られた。

現在、ゲルに含まれるCO<sub>2</sub>の定量を進めており、葉緑体がCO<sub>2</sub>濃度の絶対値に应答するのかCO<sub>2</sub>の濃度勾配に应答するのか、反応に光依存性があるか、柵状組織葉肉細胞と海綿状組織葉肉細胞とでCO<sub>2</sub>応答性に違いがあるかなどの問題を解決する。

(2)- 外気CO<sub>2</sub>濃度を45 ppmもしくは1000 ppmに設定して植物体を暗処理し、個葉における葉緑体分布を解析した。野生株では、上記3つのパラメータについて異なるCO<sub>2</sub>濃度での違いは無く、背軸側に分布する傾向は向軸側に対して3倍高く(=葉緑体の暗黒位)、上下面と側面には均等に分布し、細胞間隙に沿う傾向は細胞に対して2倍高かった。これに対して1000 ppm CO<sub>2</sub>で暗処理した*slac1*では、背軸側に分布する傾向が有意に低くなり、細胞間隙に沿う傾向が有意に高くなった。主に発生学的要因(葉の背腹性)に依存する暗黒位の決定にCO<sub>2</sub>濃度が干渉する可能性が示された。

(2)- 外気CO<sub>2</sub>濃度を400 ppmもしくは1000 ppmに設定して青色光を照射した。野生株では1000 ppm CO<sub>2</sub>で背軸側に分布する傾向がより高くなり、*slac1*では1000 ppm CO<sub>2</sub>で細胞間隙に沿う傾向がより低く、上下面に分布する傾向がより高くなった。光照射下でも発生学的要因とCO<sub>2</sub>濃度とが干渉すること、葉緑体の受光量の調節がCO<sub>2</sub>濃度の影響を受けることなどが示唆された。

(2)- 野生株の細胞間隙CO<sub>2</sub>濃度を調節しながら異なる強さの青色光を照射したところ、同一の強さの青色光下でも、CO<sub>2</sub>濃度が高いと受光量を大きくする分布をとる傾向が認められた。葉緑体の分布決定において、光強度と細胞間隙CO<sub>2</sub>濃度とがクロストークする可能性が示唆された。今後、これを定量的に解析し、クロストークが葉緑体のレドックス状態を介するかを検証する。

## 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 7 件)

(1) Y. Sakamoto, S. Takagi (2013) LITTLE NUCLEI 1 and 4 regulate nuclear morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 54: 622-633. 査読有 DOI: 10.1093/pcp/pct031

(2) 高木慎吾 (2012) ストロコスコープ型遠心顕微鏡による運動現象の解析. *Plant Morphology* 24: 5-11. 査読無 <http://square.umin.ac.jp/pl-morph/>

(3) H. Takamatsu, S. Takagi (2011) Actin-dependent chloroplast anchoring is regulated by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin in spinach mesophyll cells. *Plant and Cell Physiology* 52: 1973-1982. 査読有 DOI: 10.1093/pcp/pcr130

(4) S. Takagi, M.S. Islam, K. Iwabuchi (2011) Dynamic behavior of double-membrane-bound organelles in plant cells. *International Review of Cell and Molecular Biology* 286: 181-222. 査読無 DOI: 10.1016/B978-0-12-385859-7.00004-5

(5) N. Sakurai-Ozato, S. Takagi (2011) Possible involvement of phytochromes in regulation of cytoplasmic motility in *Arabidopsis thaliana* leaf epidermal cells. *In Treatise on Photophysiology* (eds. C. Haldar and P. Basu), pp.55-65. 査読無 ISBN: 978-81-921414-1-1

(6) M.S. Islam, Y. Niwa, S. Takagi (2011) Light-induced mitochondrial redistribution in *Arabidopsis thaliana* palisade cells. *In Treatise on Photophysiology* (eds. C. Haldar and P. Basu), pp.167-171. 査読無 ISBN: 978-81-921414-1-1

(7) 高木慎吾 (2011) 植物オルガネラは忙しい. *生産と技術* 63: 74-76. 査読無 <http://www6.ocn.ne.jp/~seisan/>

〔学会発表〕(計 19 件)

(1) 田中怜、岩淵功誠、西村いくこ、高木慎吾 シロイヌナズナ葉肉細胞における核光定位運動への葉緑体の関与 第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山、2013 年 3 月 21-23 日)

(2) 高木慎吾 植物ピリンは葉緑体アンカーに關与するか 第 15 回植物オルガネラワークショップ (岡山、2013 年 3 月 20 日)

(3) Y. Sakamoto, S. Takagi Analysis of LINC involved in the maintenance of nuclear morphology in *Arabidopsis thaliana*. 第 35 回日

本分子生物学会年会 (福岡、2012 年 12 月 11-14 日)

(4) M.S. Islam, S. Takagi Phototropin2-dependent co-localization of mitochondria with chloroplasts in *Arabidopsis thaliana* mesophyll cells. 平成 24 年度近畿植物学会 (奈良、2012 年 11 月 10 日)

(5) 坂本勇貴、高木慎吾 シロイヌナズナにおける細胞核形態を維持する LINC の解析 日本植物学会第 76 回大会 (姫路、2012 年 9 月 15-17 日)

(6) Iwabuchi K., Hidema J., Tamura K., Takagi S., Hara-Nishimura I. Light-dependent nuclear positioning serves as a UV-protection system in plants. The 1st international symposium on plant environmental sensing (2012 March 19-21, Nara, Japan)

(7) Iwabuchi K., Hidema J., Tamura K., Takagi S., Hara-Nishimura I. Light-dependent nuclear positioning reduces UV-induced DNA damage in plants. 第 53 回日本植物生理学会年会 (2012 年 3 月 16-18 日、京都産業大学)

(8) 坂本勇貴、高木慎吾 シロイヌナズナにおける細胞核形態を維持する因子の解析 第 53 回日本植物生理学会年会 (2012 年 3 月 16-18 日、京都産業大学)

(9) Nguyen V.T., Islam M.S., Takagi S. Roles of phototropins and myosins in the light-induced redistribution of mitochondria and chloroplasts in leaf palisade cells of *Arabidopsis thaliana*. International Symposium 'Strategies of Plants against Global Environmental Change' (2011 December 8-10, Kurashiki, Japan)

(10) 高木慎吾 イメージングによる細胞内運動の解析 日本植物学会第 75 回大会 (2011 年 9 月 17-19 日、東京大学)

(11) Islam M.S., Takagi S. Photoregulation of mitochondria/chloroplasts co-localization in *Arabidopsis thaliana* mesophyll cells. The 5th Asia Oceania Conference on Photobiology (2011 July 30-Aug 1, Nara, Japan)

(12) Ishida Y., Takagi S. Regulation of chloroplast positioning by light and CO<sub>2</sub>. The 5th Asia Oceania Conference on Photobiology (2011 July 30-Aug 1, Nara, Japan)

〔その他〕  
ホームページ等

[http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio\\_web/  
lab\\_page/takagi/index.html](http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/takagi/index.html)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

高木 慎吾 (TAKAGI SHINGO)  
大阪大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：10192626

### (2)研究協力者

石田 泰浩 (ISHIDA YASUHIRO)  
大阪大学・大学院理学研究科・大学院生