

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：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770055

研究課題名(和文) シンク/ソース転換における可塑的葉緑体分化

研究課題名(英文) Regulation of chloroplast differentiation during sink/source conversion

研究代表者

小林 康一 (Kobayashi, Koichi)

東京大学・総合文化研究科・助教

研究者番号：40587945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：植物の器官分化と協調した葉緑体分化の制御機構の解明を目的とし、地上部を切除したシロイヌナズナの根の緑化機構を調べた。その結果、切除された根における光合成関連遺伝子の発現上昇と光合成効率の向上にサイトカイニンシグナルが必須なことが分かった。このシグナル経路の上流と下流では傷害応答性因子と葉緑体発達因子がそれぞれ関与していた。さらに、切除根の緑化は他の植物でも見られ、タンポポでは地上部の再生に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate coordination mechanisms of chloroplast differentiation with organ development in plants, greening mechanisms of Arabidopsis roots after shoot removal were examined. The results revealed that cytokinin signaling upregulates photosynthesis-associated genes and improves photosynthetic electron transport efficiency in roots after shoot removal. The cytokinin signaling involves a wounding-responsive factor in upstream and chloroplast-related transcription factors in downstream. Not only Arabidopsis thaliana, other angiosperms such as Dandelion (*Traxacum officinale*) also improved photosynthetic efficiency in the root after shoot removal. Further analyses showed that photosynthesis in the root is crucial for regeneration of the shoot in Dandelion.

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：葉緑体 光合成 サイトカイニン 色素体 シロイヌナズナ 緑化

1. 研究開始当初の背景

一般に植物の根は炭素源をソースである地上部に依存しており、葉緑体分化は抑制されている。しかし、シロイヌナズナを用いた解析から、地上部から切り離された根では緑化が誘導され、新たな光合成組織の構築が促されることを報告者は明らかにしている。これは一種の生存戦略であると捉えることができ、実際、タンポポの切除根などでは、緑化に引き続き地上部の再生が観察される。さらに報告者は、この緑化機構には植物ホルモンであるオーキシシンとサイトカイニンが深く関与することを突き止めた(図1)。通常、根では地上部から輸送されるオーキシシンにより葉緑体分化が強く抑制されている。しかしこのオーキシシンによる抑制は地上部を喪失した根では減少し、それと同時に傷害部におけるサイトカイニンシグナルが強くなり、緑化が誘導されることが分かってきた。実際、サイトカイニン処理やオーキシシンシグナルの変異により、根での葉緑体分化が誘導(脱抑制)され、クロロフィルの蓄積や葉緑体チラコイド膜の発達と共に、光合成電子伝達反応が増大することを明らかにした。この葉緑体分化は光合成関連遺伝子群の協調的な転写活性化を伴っており、光シグナルの転写因子 HY5 と植物ホルモン応答性の転写因子 GLK (GLK1 及び GLK2) が、転写活性化に関与していることが分かった。さらに報告者は、GLK の過剰発現が根の細胞において顕著な葉緑体分化を誘導し、光合成による光独立栄養生長を可能にするを見出した(図2)。以上の結果から、根では葉緑体の分化がホルモンシグナリングにより抑制されているが、条件が整った時にはそこから脱抑制し、光合成を行う能力を潜在的に備えていることを明らかにしている。

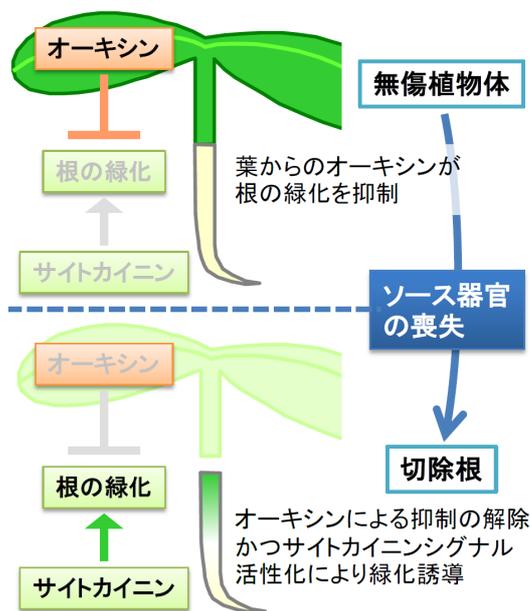


図1 ソース器官喪失による根の緑化機構

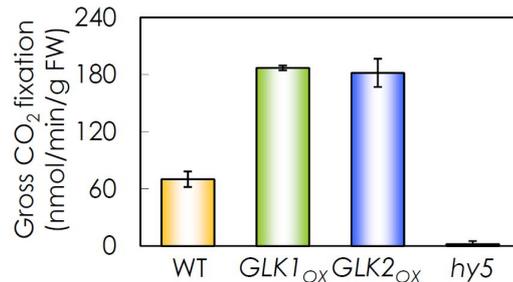
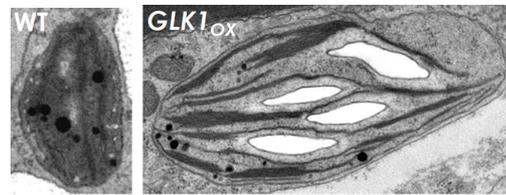


図2 GLK の過剰発現による根での葉緑体発達(上図)と根における二酸化炭素固定能(下図) WT;野生株、GLKox;GLK の過剰発現株

2. 研究の目的

申請者が明らかにした根の緑化機構は、ソース器官が強い損傷を受けた時にシンク器官で活性化する、植物の生存戦略機構の一つであると考えている。しかしこれまでこのような視点から行われた研究は無く、高等植物におけるその生理的な重要性や普遍性は明らかでない。また、申請者によりオーキシシン/サイトカイニンシグナルの関与がシロイヌナズナにおいて明らかとなっているが、その詳細なシグナル制御機構は不明である。そこで本研究では、このシンク器官における「ソース器官喪失応答」がどのような条件で、どのようなシグナル経路を介して起こるのかを詳細に明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 根のクロロフィル定量

根を液体窒素中で破碎し、80%アセトンでクロロフィルを抽出した。抽出したクロロフィル a およびクロロフィル b の吸光度を分光光度計 (ULT Rospec 2000, Amersham) で測定し、クロロフィル濃度を算出した。

(2) 遺伝子発現解析

根を液体窒素中で破碎し、RNA 抽出キット (RNeasy, Qiagen) によって組織に含まれる全 RNA を精製した。逆転写キット (PrimeScript RT Reagent kit with gDNA Eraser, TaKaRa Bio) により RNA から cDNA を合成し、リアルタイム PCR によって目的遺伝子の相対含量を測定した。PCR 反応には Thunderbird PreMix kit (Toyobo) を使い、(MiniOpticon, Bio-Rad) によって PCR 産物の増幅を計測した。

(3) 光合成活性測定

光合成クロロフィル蛍光誘導の測定は

JTS-10 (Bio-Logic) を用いて行った。

光化学系 II と光化学系 I 由来の蛍光の測定は、液体窒素中 (77K) で行った。サンプルを破碎し、チラコイドを含む膜画分を調整し、蛍光光度計 (RF-5300PC, Shimadzu) によって液体窒素中の蛍光スペクトルを取得した。

光化学系 II の実行量子収率の測定は、パルス変調クロロフィル蛍光測定装置 (Junior-PAM, Walz) を用いて行った。

(4) 光合成タンパク質のウェスタンブロット解析

根を液体窒素中で破碎し、トリスバッファに懸濁し、膜画分を粗精製した。SDS サンプルバッファによりタンパク質を可溶化し、SDS-PAGE により分離した。電気泳動後、タンパク質をニトロセルロース膜に転写し、光合成タンパク質に特異的な一次抗体と反応させた。アルカリフォスファターゼを結合した二次抗体と一次抗体を反応させ、アルカリフォスファターゼ検出キットによってタンパク質の検出を行った。

4. 研究成果

(1) 根の緑化における傷害応答シグナル経路の関与

最近の研究により、傷害ストレスが転写因子である WIND1 を介しサイトカイニンシグナルを活性化し、植物の器官分化を制御することが明らかとなっている (Iwase *et al.*, 2011)。そこで、WIND1 が切除根の緑化に関与するかどうかを調べるため、WIND1 の機能を人為的に抑制したシロイヌナズナの WIND1-SRDX 形質転換体において根の緑化能を調べた。その結果、WIND1 の機能を抑制したシロイヌナズナでは、切除後の根のクロロフィル蓄積が抑制されることが分かった。このことから、地上部を切除した根の緑化には、WIND1 を介した傷害応答シグナルが重要であることが明らかとなった。

(2) 根の緑化におけるサイトカイニンシグナル経路の解析

WIND1 は傷害によりその遺伝子発現が上昇し、サイトカイニンシグナルの下流因子である type-B ARR を活性化することが示されている (Iwase *et al.*, 2011)。そこで、地上部を切除した根で type-B ARR が活性化しているかどうかを、type-B ARR 依存的に発現する TCS::*GFP* レポーター遺伝子を用いて調べた。その結果、TCS::*GFP* 遺伝子を持つシロイヌナズナの根では切除処理により GFP 蛍光の大幅な増大が見られた。この結果から、地上部の切除処理によって type-B ARR の活性化が根の切除部位で起こることが明らかとなった。

そこで次に、type-B ARR が地上部を切除した根の緑化に関与するかどうかを、type-B ARR の変異体を調べることで解析した。その

結果、*arr1 arr12* 二重変異体では、地上部切除後の根の緑化がまったく見られないことが分かった。このことから、切除による根の緑化は type-B ARR である ARR1 と ARR12 を介して行われることが明らかとなった。

(3) 地上部切除後の根の緑化時における遺伝子発現変化

シロイヌナズナの根では葉緑体発達に関わるほとんどの遺伝子の発現が強く抑制されている。そこで、地上部切除後の根の緑化過程で葉緑体関連遺伝子の発現がどのように変化するのかを解析した。その結果、地上部を切除したシロイヌナズナ野生株の根では、核および葉緑体にコードされる光合成関連遺伝子の発現が大幅に上昇することが分かった。さらに、切除した根では、葉緑体の転写に関わる因子の発現も上昇した。次に、葉緑体の発達制御に関わる核の転写因子の発現を調べたところ、*CGA1* という遺伝子の発現が切除根では非常に高くなっていることが明らかとなった。また、クロロフィル合成に深く関わる転写因子である *GLK2* の発現も切除根で若干上昇していた。葉緑体の発達に関わる遺伝子と共に、通常葉で発現する緑葉ペルオキシソームや緑葉ミトコンドリアに関わる遺伝子の発現も切除根で上昇した。これらは光呼吸に関わる遺伝子であることから、切除根では葉緑体の発達と共に、他のオルガネラの分化も引き起こされていると考えられる。

次に、上記の遺伝子発現変化が、クロロフィルの蓄積と同様 ARR1 と ARR12 を介して行われているかどうかを *arr1 arr12* 二重変異体において調べた。地上部を切除した *arr1 arr12* 変異体の根では、核だけでなく葉緑体にコードされた光合成関連遺伝子の発現も強く抑制されていた。さらに、葉緑体発達に関わる転写因子 *CGA1* および *GLK2* や光呼吸に関わる遺伝子の発現も *arr1 arr12* 変異体の切除根では抑えられていた。これらの結果から、地上部を切除した根では、ARR1 と ARR12 を介したサイトカイニンシグナルによって光合成や光呼吸に関わる遺伝子の発現が誘導され、根の緑化が引き起こされることが明らかとなった。

(4) サイトカイニンシグナルの下流で働く根の緑化に関わる転写因子の解析

遺伝子発現解析により、葉緑体の発達に関わる転写因子の *CGA1* や *GLK2* といった遺伝子が、ARR1 や ARR12 の下流で地上部の切除にตอบสนองして発現上昇することが明らかとなった。そこで、これらの因子の発現誘導が地上部切除による根の緑化に関与するのかどうかを明らかにするため、*glk1 glk2* 二重変異体と *gnc cga1* 二重変異体の根の緑化応答を調べた。GLK1 と GNC はそれぞれ GLK2 と CGA1 のホモログである。根に含まれるクロロフィルの定量実験により、*glk1 glk2* では地上部の切除前

も切除後も共に根のクロロフィル含量が低下していたのに対し、*gnc cga1*では切除後のみ根のクロロフィル量が減少することが分かった。この結果から、GLK1とGLK2が恒常的に根のクロロフィル蓄積に必要なのに対し、GNCやCGA1は地上部切除時の根の緑化に特異的に関わっていることが明らかとなった。

(5) 地上部を切除した根における光合成効率の上昇とサイトカイニンの役割

遺伝子発現解析により、地上部切除後の根では核にコードされた光合成関連遺伝子だけでなく、葉緑体にコードされた遺伝子の発現も大幅に上昇することが明らかとなった。そこで、これらの光合成関連遺伝子の発現上昇が光合成に与える影響を調べた。まず、シロイヌナズナの根と葉の光化学系の実効量子収率を比較したところ、根では収率が葉に比べて大幅に低くなっていた。また、実行量子収率の低下は、光化学系 II の量子収率の低下と共に、光化学系 II 以降の電子伝達効率の低下が原因であることが分かった。さらに、光化学系 II と光化学系 I のクロロフィルから生じる蛍光を解析したところ、根では光化学系 I からのクロロフィル蛍光が大幅に低下していた。このことから、葉に比べ根では光化学系 II と光化学系 I の光エネルギーの分配がアンバランスになっており、不完全な光合成電子伝達系が形成されていると考えられる。実際、光合成タンパク質のウェスタンブロット解析によって、根では光化学系 I 複合体のコアタンパク質が大幅に欠失していることが明らかになった。しかし興味深いことに、地上部を切除した根ではこれらの効率の改善が見られ、光化学系 II/光化学系 I の蛍光比率や実行量子収率も葉に近い値を示すことが分かった。この結果から、根では地上部の切除により光合成系の再構成が行われていると考えられる。

さらに報告者は、この切除根における光合成効率の良化にサイトカイニンシグナルが関係するのかどうかを調べた。地上部未切除の根に合成サイトカイニンである 6-ベンジルアデニンを与えたところ、切除根と同様に光合成効率の良化が見られた。一方、*arr1 arr12* 変異体の根では、地上部の切除による光合成効率の良化が起らず、また、6-ベンジルアデニンによる効果も見られなかった。このことから、地上部を切除した根における光合成効率の良化は ARR1 と ARR12 を介したサイトカイニンシグナルによって誘導されていることが明らかとなった。

(6) 被子植物における根の緑化の普遍性の解析

これまでの解析により、シロイヌナズナでは地上部の切除により根での光合成効率の良化が引き起こされることが明らかとなった。そこで、この現象が他の被子植物でも見

られるかどうかを明らかにするため、セイヨウタンポポ (*Taraxacum officinale*)、アサガオ (*Ipomoea nil*)、カスミソウ (*Gypsophila paniculata*)、キュウリ (*Cucumis sativus*)、およびバジル (*Ocimum basilicum*) において根の光化学系量子収率の解析を行った。その結果、セイヨウタンポポ、アサガオ、カスミソウでは、シロイヌナズナと同様に地上部切除によって根の光合成効率の上昇が見られたが、キュウリやバジルではそのような効果は見られなかった。このことから、根の緑化応答は植物種によって異なることが示唆された。

次に、根の光合成が植物の生育にとって重要かどうかを明らかにするために、根から地上部の再形成が容易に起こるセイヨウタンポポを材料に地上部再分化実験を行った。地上部を切除したセイヨウタンポポの根を糖などのエネルギー源をまったく含まない培地で培養したところ、根から地上部が高い割合で再分化した。このことから、根からの地上部の再分化に外からのエネルギー添加が必要でないことが分かった。一方、根の光合成を阻害したところ、切除根からの地上部の再分化が強く阻害された。これらの結果から、セイヨウタンポポでは根の光合成が地上部の再分化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(7) 考察と結論

地上部を切除した根では、WIND1 を介した傷害応答シグナルが働き、根の緑化を誘導すると考えられる。WIND1 はサイトカイニンの正の情報伝達因子である type-B ARR を活性化することが報告されており (Iwase et al., 2011)、実際、切除根でも type-B ARR の活性化が観察された。type-B ARR の ARR1 と ARR12 の二重変異体では切除根の緑化が起らなかったことから、WIND1 の下流で ARR1 と ARR12 が根の緑化にメインに働いていると考えられる。さらに ARR1 と ARR12 の活性化により CGA1 の発現が上昇し、切除根で葉緑体の発達を促すと考えられる。この考えは、CGA1 の発現が ARR1 ARR12 依存的に上昇し、葉緑体の発達を促すという報告 (Chiang et al., 2012) とよく一致する。しかし、*gnc cga1* 二重変異体でもある程度の緑化が依然として見られることから、GLK などの他の転写因子も同時に根の緑化に寄与していることが推測される。

報告者の解析から、地上部を切除した根では、クロロフィルの蓄積と共に光合成効率が良化することが明らかとなった。切除根では核にコードされる光合成関連遺伝子だけでなく、葉緑体コードの光合成遺伝子の発現も大幅に上昇することから、このような全体的な光合成関連遺伝子の転写活性化が葉緑体の量的・質的な転換に寄与すると考えられる。実際、切除により根で光合成遺伝子の活性化が起らない *arr1 arr12* 変異体では、光合

成の良化も見られなかった。興味深いことに、サイトカイニンの添加によって切除なしでも根の光合成効率の良化が見られたことから、根の葉緑体の量的変化だけでなく、質的变化にもサイトカイニンシグナルが重要な役割を担っていることが分かった。

地上部切除による根の光合成の良化はシロイヌナズナだけでなく他の植物でも見られたが、それは種によってさまざまであることが分かった。セイヨウタンポポによる解析により、根の光合成が切除根からの地上部の再分化に重要であることが示された。報告者が明らかにした根の緑化機構が植物の生存戦略に一役買っている可能性が考えられる。根の緑化の仕組みが自然界でどのような役割を担っているのかを明らかにするには、今後のさらなる研究の伸展が必要である。

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 4 件)

1. Kobayashi K, Sasaki D, Noguchi K, Fujinuma D, Komatsu H, Kobayashi M, Sato M, Toyooka K, Sugimoto K, Niyogi KK, Wada H, Masuda T (2013) Photosynthesis of root chloroplasts developed in Arabidopsis lines overexpressing GOLDEN2-LIKE transcription factors. *Plant Cell Physiol.* 54: 1365-1377. Doi: 10.1093/pcp/pct086. 査読有
2. Kobayashi K, Narise T, Sonoike K, Hashimoto H, Sato N, Kondo M, Nishimura M, Toyooka K, Sato M, Sugimoto K, Wada H, Masuda T, Ohta H (2013) Role of galactolipid biosynthesis in coordinated development of photosynthetic complexes and thylakoid membranes during chloroplast biogenesis in Arabidopsis. *Plant J.* 73:250-261. Doi: 10.1111/tpj.12028. 査読有
3. Kobayashi K, Obayashi T, Masuda T (2012) Role of the G-box element in regulation of chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Signal. Behav.* 7:922-926. Doi: 10.4161/psb.20760. 査読有
4. 小林康一 (2012) 「高等植物のクロロフィル合成系の制御」, 光合成研究 22: 125-138. <http://photosyn.jp/journal/sections/kaiho64-9.pdf>. 査読有

[学会発表](計 6 件)

1. 藤井祥、小林康一、Krishna K. Niyogi、中村友輝、和田元 「シロイヌナズナにおける誘導的人工マイクロRNAを用いた主

要葉緑体膜脂質 MGDG の機能解析」第 55 回植物生理学会年会、2014 年 3 月 18-20 日、富山大学

2. Kobayashi K, Endo K, Hori H, Fujii S, Niyogi KK, Wada H "Photosynthetic characteristics of phosphatidylglycerol-deficient Arabidopsis mutant" 第 55 回植物生理学会年会、2014 年 3 月 18-20 日、富山大学
3. Fujii S, Kobayashi K, Niyogi KK, Nakamura Y, Wada H "Inducible knockdown of MGD1 in Arabidopsis" 5th Asian Symposium on Plant Lipids, 2013 年 11 月 29 日-12 月 1 日, Gwangju, Korea.
4. Kobayashi K, Endo K, Hori H, Fujii S, Niyogi KK, Wada H "Role of phosphatidylglycerol in Arabidopsis chloroplasts" 5th Asian Symposium on Plant Lipids, 2013 年 11 月 29 日-12 月 1 日, Gwangju, Korea.
5. 佐々木大地, 岩瀬哲, 杉本慶子, 増田建, 和田元, 小林康一 「傷害に応答した根の緑化に関わるサイトカイニンシグナル経路」第54回植物生理学会年会、2013年03月21日-23日、岡山大学
6. Kobayashi K, Sasaki D, Noguchi K, Fujinuma D, Kobayashi M, Sato M, Toyooka K, Sugimoto K, Wada H, Masuda T. "Photosynthesis in roots of Arabidopsis overexpressing GLK" 第54回植物生理学会年会、2013年03月21日-23日、岡山大学

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://hajimewada.c.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 康一 (KOBAYASHI KOICHI)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号：40587945

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし