

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292011

研究課題名(和文) C4植物に特異的なアブシジン酸応答性葉緑体凝集運動の生理的役割と分子機構の解明

研究課題名(英文) Physiological roles and molecular mechanisms of abscisic acid-responsive chloroplast aggregative movement specific to C4 plants

研究代表者

谷口 光隆 (TANIGUCHI, Mitsutaka)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：40231419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：重イオンビーム照射により突然変異を誘発させたC4植物エノコログサの後代種子を採取した。その変異体ライブラリーを対象として、アブシジン酸応答性の葉肉葉緑体凝集運動が起こらない変異体のスクリーニング法を確立した。また、葉肉細胞内での凝集配置は、暗条件あるいは発生初期の未熟な色素体でも起こる一方、非ストレス明所下ではむしろ葉緑体を分散させる機構が働いていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Progeny seeds of green foxtail mutagenized by heavy ion beam irradiation were collected. We have established a screening method for mutants that do not cause abscisic acid-responsive aggregative movement of mesophyll chloroplasts with the mutant library. We also revealed that the aggregative arrangement in mesophyll cells occurs even in plastids under the dark conditions or in the early stage of development, while a mechanism for dispersing the chloroplasts is working under the non-stressed light conditions.

研究分野：作物生理生化学

キーワード：C4植物 葉緑体 凝集運動 アブシジン酸 青色光 エノコログサ シコクビエ 環境ストレス

1. 研究開始当初の背景

C₄植物の葉組織では、維管束の周りを維管束鞘細胞が取り囲み、さらにその外側を1層の葉肉細胞が放射状に取り巻いている。その両光合成細胞を一巡するC₄回路がCO₂濃縮ポンプとして働き、維管束鞘葉緑体に局在するRubisco近傍のCO₂濃度を高めることで、C₄植物は高い光合成能と環境ストレス耐性能を獲得している。隣り合う葉肉細胞と維管束鞘細胞は構造および機能の面で様々に分化しており、環境ストレスに対する応答や耐性機構も両光合成細胞で違いが見られる。

両細胞内の葉緑体は異なる細胞内配置をとり、葉肉葉緑体が細胞周縁部に散在している一方、維管束鞘葉緑体は維管束側あるいは葉肉細胞側に局在している(図1A)。我々は、強光、乾燥、塩などの環境ストレスに応答して葉肉葉緑体が維管束鞘細胞側に凝集することを見出した(図1B)。この葉緑体凝集運動は真夏の炎天下で育つC₄植物でも観察されたことから、過酷かつ複合的な自然環境下で生育するC₄植物のストレス応答機構の一つだと考えられた。また、ストレスに伴い、葉の光合成速度、気孔コンダクタンスおよび蒸散速度が低下するが、その低下の程度と相関して、葉緑体凝集運動もより顕著に起こる。したがって、葉緑体凝集運動は光合成代謝と

連動した生理的役割を担うと考えられる。さらに、凝集運動はアブシジン酸(ABA)により誘発されることを見出し(図1D)、環境ストレスを感知すると葉細胞内のABA含量が増大して葉緑体凝集運動が誘発されると推察した。

様々な植物種を調査した結果、葉肉葉緑体の凝集運動はC₃植物では起こらず、C₃-C₄中間種で僅かに起こり、C₄植物で普遍的に見られたことから、この運動はC₃植物からC₄植物への進化過程で獲得された生理機構だと考えられる。また、維管束鞘葉緑体の細胞内局在はいかなる環境ストレスによっても乱れることはなく、葉肉細胞と維管束鞘細胞間で異なる葉緑体配置機構ならびにストレス耐性戦略が存在すると考えられる。C₃植物の葉肉葉緑体も強光照射により運動するが、①運動方向が異なる(光の入射方向と平行な細胞壁側へ移動する逃避運動が起こる)、②活性酸素により促進される、という点でC₄葉肉葉緑体の凝集運動とは異なる。他方、青色光とアクチンが両葉緑体運動に共通して関与していることが判明している。また、青色光照射によりC₄植物においても葉肉葉緑体の逃避運動が部分的に起こり(図1C)、さらにABAが共存すると凝集運動が顕著に誘導されることから(図1D)、C₄葉肉細胞にも葉緑体逃避運動機構が存在するが、ABAが葉緑体の運動様式を凝集運動へとシフトさせることが判明した。

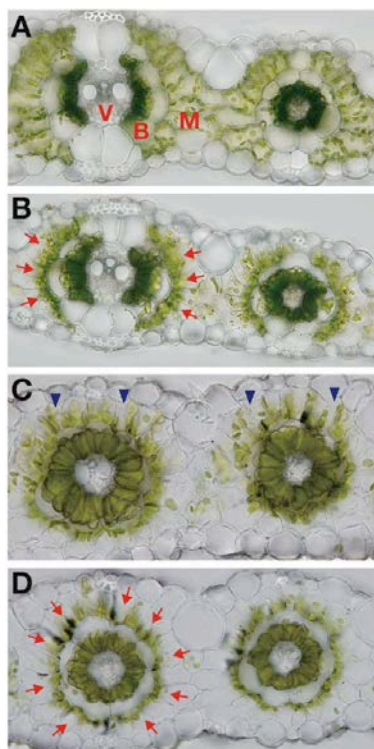


図1 C₄植物シコクビエの葉構造。(A)非ストレス時のシコクビエ葉身の横断面。B: 維管束鞘細胞, M: 葉肉細胞, V: 維管束 (B)乾燥ストレス時の葉身。葉肉葉緑体が維管束鞘細胞側に凝集している(矢印)。(C)非ストレス葉片を蒸留水に浮かべ、青色光を8時間照射した。光照射側(上側)の葉肉葉緑体が逃避運動を起こしている(矢尻)。(D)非ストレス葉片をABA溶液上に浮かべ、青色光を照射した。葉肉葉緑体の顕著な凝集運動が起こっている。

2. 研究の目的

以上のように、C₄葉肉細胞は、C₃植物で見られる葉緑体逃避運動に加えて、ストレスシグナルABAにより誘導される葉緑体凝集運動機構をもつことが明らかとなった。しかし、葉緑体凝集運動の生理的役割は解明できていない。また、ABAを葉肉細胞がどのように検知して葉緑体凝集運動を引き起こすのか、葉緑体をどのようにして維管束鞘細胞側へ移動させているのかといった情報伝達や運動制御の詳細も解明できていない。

これらの未解明点を明らかにするには凝集運動を起こさない変異体を用いた解析が有効であるが、そのような変異体は見出されていない。そこで、本研究では、凝集運動の変異体を単離し、凝集運動の生理的役割ならびに凝集運動に関わるタンパク質因子の同定を行うことを目的とした。研究材料は、今後のC₄モデル植物と目されるエノコログサ(*Setaria viridis*)を用いることとした。また、エノコログサ変異体の解析だけでなく、我々が今まで用いてきたC₄植物シコクビエ(*Eleusine coracana*)も研究対象として、凝集運動と逃避運動の関連性やABA情報伝達機構の解明も行う。

凝集運動の生理的役割と分子機構を明らかにすることで、C₄植物の更なる機能改良やC₃植物のC₄化を行うにあたっての新たな分

子基盤を提供できると考えた。

3. 研究の方法

(1) 重イオンビームを照射して突然変異を誘発させたエノコログサ (A10 株) の後代種子を採取した。得られた種子を培養土に播種し、人工気象室 (明期 14 時間, 28°C, 光強度 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ / 暗期 10 時間, 20°C, 湿度 60%) 内で約 3 週間生育させた後、各系統あたり 4 個体について、最上位完全展開葉の葉身中央部分を実験に用いた。改良法においては、グロースチャンバー (明期 14 時間, 28°C, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ / 暗期 10 時間, 20°C) 内で約 1 週間生育させた後、完全展開した第 1 葉の葉身中央部分を用いた。葉身から葉片 (5 mm 四方) を数枚切り出し、12 ウェルプラスチックマイクロプレートに分注した 100 μM ABA 溶液に浮かべ、プレートごと脱気して、葉組織内に溶液を浸透させた。次いで、青色 LED 光 (500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を 4 時間照射して凝集運動を誘導させた。プレート中の葉片を倒立型光学顕微鏡で観察し、取得したデジタル画像の 256 階調輝度分布から凝集運動の程度を定量化した (図 2)。

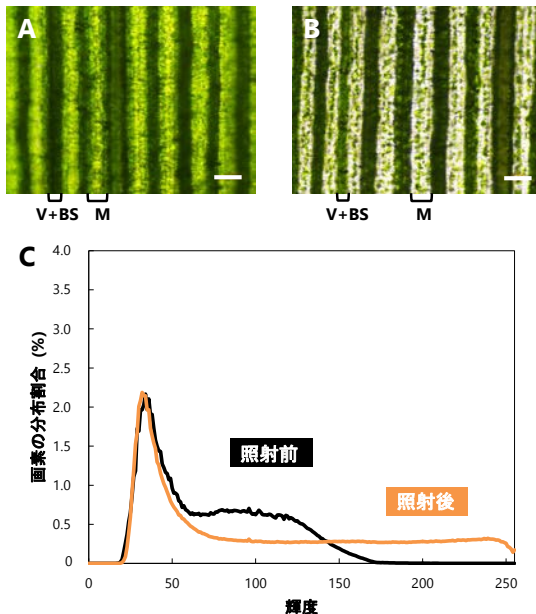


図2 エノコログサ葉片の光学顕微鏡像。(A) 青色光照射前。(B) 青色光照射後。照射後は葉肉細胞の列(M)が明るく見える。V+BS: 維管束系と維管束鞘細胞の列。(C) 光学顕微鏡観察画像の輝度分布。青色光照射後では、高輝度画素の分布割合が増えている。

(2) シコクビエ (雪印系) 種子を寒天培地に播種し、25°C の暗所下で 9 日間生育させた後、黄化実生の第 1 葉横断切片を顕微鏡観察した。また、人工気象室 (明期 14 時間, 28°C, 光強度 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ / 暗期 10 時間, 20°C, 湿度 60%) 内で約 3 週間生育したシコクビエを暗所に移し、8 日後まで第 6 葉の葉緑体配置を観察した。同様の条件で生育したシコクビエを 3 日間暗所に置いた後、明所 (培養棚 :

22°C, 湿度 90%, 光強度 50~60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) に移し、第 7 葉の葉緑体配置を観察した。

(3) 人工気象室にて約 3 週間生育させたシコクビエの展開伸長中の第 7 葉を、基部から 1 cm ごとに分け、横断切片を作製して、光学顕微鏡で観察した。さらに、撮影したデジタル画像上のピクセル座標に基づき、葉肉葉緑体が維管束鞘細胞側にどの程度局在しているかを示す“凝集配置指数”を算出した。凝集配置指数は、数値が高いほど強い凝集が起きていることを示し、細胞全体に葉緑体が均等に散在している場合は 50% になる。

(4) 葉緑体の細胞内配置を立体的に把握するため、エノコログサ葉身横断切片を共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス社 FV1000-D BX61) にて観察した。葉緑体をクロロフィルの自家蛍光により、細胞壁をリグニンやスベリンの自家蛍光により検出し、得られた連続画像を基に三次元像を再構築した。

4. 研究成果

(1) エノコログサの野生型種子に重イオンビームを照射して突然変異を誘発させ、圃場、温室および人工気象室で変異後代種子の多量増幅を行った。その結果、約 1,000 系統の変異後代種子を得ることができた。栽培条件によって得られる種子の数および品質が異なったため、さらなる種子増幅に向けて最適栽培条件を検討した。エノコログサの種子は休眠が深く、採種直後の種子はほぼ発芽しない。そこで、多系統の種子を取り扱う際の簡易休眠打破法を調査した。その結果、土中播種したまま 4°C で 2~3 週間保存後に生育環境に移す方法が最も簡便であることが判明した。

マイクロプレート内で葉片を青色光・ABA 処理し、光学顕微鏡により向軸側から葉緑体の配置を観察し、画像解析自動化マクロを用いて一度に多系統の植物を解析するスクリーニング系を確立した。当初は 3 週間ほど生育させたエノコログサを用いてスクリーニングを行ったが、栽培に長時間および広い場所を必要とするため、供試材料の見直しを行った。その結果、完全展開した第 1 葉においても、凝集運動の誘導が確認でき、運動の程度は約 3 週間生育した植物の最上位完全展開葉を用いた場合と差が見られなかった。したがって、第 1 葉をスクリーニング対象にすることが可能であり、より効率良くスクリーニングが行えるようになった。観察した変異系統の中で、緑化せず第 2 葉が完全展開する前に枯れてしまう個体や、凝集運動の程度が弱い個体が見出された。前者では、多くの葉肉細胞において色素体の凝集運動が観察されなかった。光合成能の低下が葉肉細胞内の色素体の運動能にも影響を及ぼしたと考えられる。後者では、光照射時間を 6 時間ま

で延長すると十分な凝集運動が観察できた。したがって、葉緑体運動の開始に関わるシグナル伝達や葉緑体運動系に何らかの障害が起きていると考えられた。以上のように、葉緑体の挙動が野生株と少し異なる植物も見られたが、葉緑体凝集運動が著しく低下した変異体を見出すことはできなかった。

(2) 黄化実生の葉組織はクランツ構造を有しており、葉肉黄色体は維管束鞘細胞側に寄る凝集配置がみられた。さらに、黄化実生に光を照射すると、その緑化過程で葉肉葉緑体が分散配置をとることが判明した。一方、成熟葉を2日以上暗所に放置すると、分散配置していた葉肉葉緑体が凝集配置をとるのが観察された。ただし、凝集の程度は、塩ストレスや乾燥ストレス時に見られた強いものではなく、暗処理をさらに続けても凝集程度に変化はみられなかった。暗処理後の植物をもう一度明所に戻すと、葉肉葉緑体の凝集配置が解除され、明所移動後8時間で通常の細胞周縁部に分散した葉緑体配置にほぼ戻った。以上の結果より、葉肉葉緑体の凝集配置は激しい環境ストレスでのみ誘導されるストレス応答機構という捉え方のみでなく、暗条件あるいは発生初期でも起こる現象であり、むしろ非ストレス明所下では葉肉葉緑体を分散させる機構が働いているという視点もつ必要があるといえる。

(3) 展開伸長途中のシコクビエの葉身を基部から先端部まで段階的に観察し、成熟過程で葉肉葉緑体の細胞内配置がどのように変化しているかを調べた。特に、葉身が下位葉から抽出して光に直接当たる境目前後での配置変化に着目した。下位葉に包まれ光に直接当たっていない部位(基部~抽出点[5.6 cm])は、葉肉細胞の成熟に伴い葉肉葉緑体の凝集配置が強まり、光が直接当たる抽出以後の部位では分散配置へと変化していくことが見出された(図3)。このことから、葉肉葉緑体は光に当たるまでは凝集配置になろうとするが、光合成細胞へと転換する際に光を効率的に受容できる分散配置へと変化している可能性が示唆された。

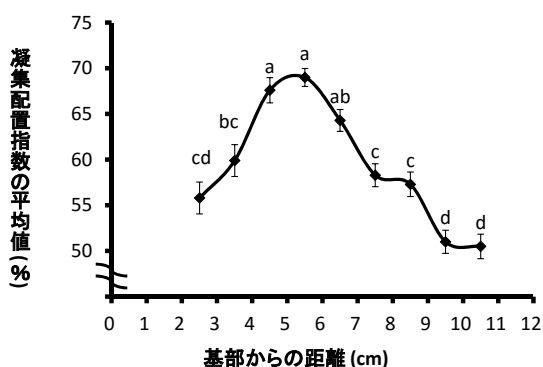


図3 シコクビエ展開伸長葉における成熟に伴う葉緑体凝集配置指数の変化。横軸は葉身基部からの距離であり、抽出点の平均距離は5.6cmであった。

(4) クロロフィルおよびリグニン・スベリンの自家蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、細胞内での葉緑体の三次元的配置を簡便に観察・解析できるようにした。葉肉葉緑体が分散配置から凝集配置へ変化する過程を三次元的に把握できるようになり、葉緑体の相互の重なり方や細胞膜との接触などがどのように変化するか、また、植物種によって異なるかどうかを明らかにしていく予定である。

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 Omoto, E., Iwasaki, Y., Miyake, H. and Taniguchi, M. (2016) Salinity induces membrane structure and lipid changes in maize mesophyll and bundle sheath chloroplasts. *Physiologia Plantarum* 157: 13-23 (査読有) DOI: 10.1111/ppl.12404
- ② Weissmann, S., Ma, F., Furuyama, K., Gierse, J., Berg, H., Shao, Y., Taniguchi, M., Allen, D. K. and Brutnell, T. P. (2016) Interactions of C₄ subtype metabolic activities and transport in maize are revealed through the characterization of DCT2 mutants. *Plant Cell* 28: 466-484 (査読有) DOI: 10.1105/tpc.15.00497
- ③ Taniguchi, M., Weber, A.P.M., von Caemmerer, S. (2016) Editorial: Future research into C₄ biology. *Plant & Cell Physiology* 57: 879-880 (査読無) DOI: 10.1093/pcp/pcw082
- ④ 谷口光隆, 三宅博 (2016) C₄植物におけるストレス応答の細胞特異性. *植物科学最前線 (BSJ-Review)* 7: 2 (査読無) http://bsj.or.jp/jpn/general/bsj-review/BSJ-Review7A_2-11.pdf

[学会発表] (計7件)

- ① 山川早紀, 大井崇生, 谷口光隆 C₄植物葉肉葉緑体の凝集運動に伴う配置変化の三次元観察の試み. 第8回日本光合成学会年会およびシンポジウム, 2017年5月27~28日(滋賀県・大津市)
- ② 塚口駿貴, 加藤優太, 大井崇生, 谷口光隆 長期暗条件により誘導されるC₄植物葉肉葉緑体の凝集配置. 日本作物学会第241回講演会, 2016年3月28~29日(茨城県・水戸市)
- ③ 加藤優太, 塚口駿貴, 大井崇生, 谷口光隆 C₄植物における葉肉葉緑体の細胞内

配置: 葉組織成長に伴う凝集配置から光受容に伴う分散配置への変化. 日本作物学会第 241 回講演会, 2016 年 3 月 28~29 日 (茨城県・水戸市)

- ④ 堤浩一, 宗像里美, 大井崇生, 木羽隆敏, 榑原均, 谷口光隆 C₄ 植物葉肉葉緑体凝集運動の効率的観察法, 日本作物学会第 239 回講演会, 2015 年 3 月 27~28 日 (神奈川県・藤沢市)
- ⑤ 大元英司, 岩崎雄吾, 三宅博, 谷口光隆 トウモロコシの葉肉葉緑体と維管束鞘葉緑体の塩ストレスに伴う脂質組成変化. 第 27 回植物脂質シンポジウム, 2014 年 11 月 28~29 日 (静岡県・静岡市)
- ⑥ Tsukaguchi T., Maai E., Miyake H. and Taniguchi M.: The aggregative movement of mesophyll chloroplasts is an environmental response common in C₄ plants. 8th Asian Crop Science Association Conference (ACSA8 - 2014), 2014. 9. 23 - 25. Hanoi (Vietnam)
- ⑦ 谷口光隆 C₄ 光合成研究の新たな課題: ストレス応答の細胞特異性. 日本植物学会第 78 回大会シンポジウム「C₄ 光合成研究の新展開」, 2014 年 9 月 12~14 日 (神奈川県・川崎市)

[図書] (計 1 件)

- ① 谷口光隆 (分担執筆) (2015) 「ライフサイエンスのための生物学」 pp.64-76 培風館 ISBN: 978-4-563-07815-7

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~shigen/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 光隆 (TANIGUCHI, Mitsutaka)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 40231419

(2) 連携研究者

榑原 均 (SAKAKIBARA, Hitoshi)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・グループディレクター
研究者番号: 20242852

(3) 研究協力者

大井 崇生 (OI, Takao)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号: 60752219