

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440143

研究課題名(和文)植物ビリリンによる葉緑体アンカーの制御機構

研究課題名(英文)How plant villin regulates chloroplast anchoring

研究代表者

高木 慎吾 (Takagi, Shingo)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：10192626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、植物細胞の中で、葉緑体が、特定の環境条件の下で特定の分布パターンを保つことにより、受光量やCO<sub>2</sub>吸収量を調節し、光合成反応を最適な状態に維持する現象に注目している。葉緑体の分布パターンの維持に、アクチン細胞骨格が関与することを明らかにしており、アクチン細胞骨格の構築変化に働くCa<sup>2+</sup>感受性のアクチン結合蛋白質であるビリリン(VLN)について解析した。モデル植物シロイヌナズナが持つ5つのビリリンのうち、AtVLN2が、葉緑体上に局在し、Ca<sup>2+</sup>濃度の変化に応じてアクチン細胞骨格の構築を変化させ、柵状組織葉肉細胞の表層細胞質における葉緑体のアンカー状態を制御していることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：In photosynthesizing plant cells, chloroplasts maintain their specific intracellular distribution patterns under specific environmental conditions, which contributes to the operation of optimal photosynthesis under fluctuating environment. Since the actin cytoskeleton has been known to play some roles in the maintenance of chloroplast distribution patterns, we ascertained a possible involvement of a Ca<sup>2+</sup>-sensitive actin-binding protein villin (VLN). One of the five villin molecular species of the model plant *Arabidopsis thaliana*, AtVLN2 is localized on chloroplasts. AtVLN2 functions in the actin reorganization around the chloroplasts induced by a change in Ca<sup>2+</sup> concentration, so may be involved in the regulation of chloroplast anchoring in the cortical cytoplasm of leaf palisade cells.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：葉緑体アンカー

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体は環境の変化に応じて細胞内での存在場所を変え、細胞・個葉レベルでの光合成を最適化するような分布をとる (Kasahara et al. 2002, Tholen et al. 2008)。葉緑体が特定の場所に位置するとき、葉緑体はその場所で積極的にアンカーされていると考えられる。環境の変化に応じた分布パターンの変化は、葉緑体のアンカー解除 (= 脱アンカー) 移動、再アンカーを経てもたらされる。葉緑体の運動装置については九州大学・和田正三教授グループが先導的な研究を展開しているが (Kong and Wada 2011)、葉緑体アンカーを担う実体や脱アンカー・再アンカーの制御機構については未解明の問題が多く残っている (Takagi et al. 2009)。

葉緑体の運動や分布変化にアクチン細胞骨格が関与することを示唆する報告が多くある (Takagi 2003)。また、葉緑体の分布が異常になるシロイヌナズナ突然変異株から葉緑体外包膜に局在するアクチン結合蛋白質 CHUP1 が同定され (Oikawa et al. 2003, 2008)、外包膜からのアクチン重合を介して細胞膜との相互作用に機能する可能性が報告されている (Kadota et al. 2009, Kong et al. 2013)。一方、光によって  $Ca^{2+}$  動員が起こること (Harada and Shimazaki 2007)、光に依存した葉緑体の分布変化に  $Ca^{2+}$  が関与する可能性が示唆されているが (Banas et al. 2012)、 $Ca^{2+}$  動員からアクチン細胞骨格の制御に至る過程で働く因子については不明である。

我々は、プロトプラストや単離葉緑体の調製が容易なホウレンソウ緑葉を材料に、葉緑体のアンカー機構を解析してきた。弱光下の葉肉細胞では葉緑体を取り囲む細いアクチン繊維束が観察されるが、青色強光照射や 2 価カチオノフォア存在下での  $Ca^{2+}$  処理により、これらのアクチン繊維束は消失した。青色強光および  $Ca^{2+}$  処理の効果はカルモデュリン拮抗剤によって抑制された。

そこで、葉肉細胞プロトプラストから表層細胞質を露出させた細胞膜ゴーストを調製し、アクチン細胞骨格と葉緑体アンカーとの関連を解析した。弱光下で調製した細胞膜ゴーストには多数の葉緑体が付着しており、各葉緑体の近傍、特に細胞膜側にアクチンのシグナルが濃縮していた。アクチン脱重合剤や  $Ca^{2+}$  処理によってアクチンシグナルは大きく減少し、葉緑体が細胞膜ゴーストから脱落した。 $Ca^{2+}$  処理の効果はカルモデュリン拮抗剤や内在カルモデュリンの除去によって抑制された (Takamatsu and Takagi 2011)。以上の結果は、青色強光による  $Ca^{2+}$  動員の後、 $Ca^{2+}$ -カルモデュリンによる調節系を介してアクチン繊維の切断・脱重合が起こり、葉緑体の脱アンカーが誘導されることを強く示唆する。

光による  $Ca^{2+}$  動員の下流でアクチン細胞骨格制御に働く因子としてピリンに注目した。ピリンは小腸微絨毛のアクチン繊維束化蛋

白質として発見されたが (Bretscher et al. 1978)、束化だけでなく、アクチン繊維の切断・脱重合、プラス端キャッピング、重合核形成など多様な活性を持つことがわかってきた。それらの活性が  $Ca^{2+}$ 、リン脂質、リン酸化などの制御を受け、同時に蛋白質自身の局在も変化する多機能蛋白質である (Khurana and George 2008)。植物では、テッポウユリ花粉管から P-135-ABP (Vidali et al. 1999)、P-115-ABP (Yokota et al. 2003) の 2 種類のピリンが同定され、低  $Ca^{2+}$  条件下ではアクチン繊維を束化し、高  $Ca^{2+}$  とカルモデュリン存在下では切断することなどが明らかにされている (Yokota et al. 2003, 2005)。

G-アクチンと強固に結合する DNaseI をリガンドとするアフィニティカラム (Bretscher and Weber 1980) によりホウレンソウ葉から調製した  $Ca^{2+}$  感受性アクチン結合蛋白質の粗画分には、テッポウユリピリンである P-135-ABP に対する抗体により認識される 135-kDa 成分、同じく P-115-ABP 抗体により認識される 120-kDa 成分が含まれていた。質量分析により、135-kDa 成分はシロイヌナズナのピリン AtVNL2,3 と、120-kDa 成分は AtVNL4 と最も高いスコアを示し、これらはホウレンソウのピリンであると考えられた。葉肉細胞、細胞膜ゴースト、単離葉緑体の間接蛍光抗体法染色像から、135-kDa 成分が葉緑体外包膜に、120-kDa 成分が細胞膜近傍に局在する可能性が示唆された (Takamatsu Dr Thesis 2012)。

さらに、これらユリピリン抗体が細胞膜ゴーストからの葉緑体の脱落を誘導したことから、葉緑体におけるアクチン構築について調べた。単離葉緑体に骨格筋 G-アクチンを加えると、葉緑体上の蛍光ファロイジンによる染色シグナルが増加する。この効果は P-135-ABP 抗体もしくは  $Ca^{2+}$  処理によって抑制された。一方、G-アクチンの添加により蛍光ファロイジンシグナルが増加した単離葉緑体を各抗体もしくは  $Ca^{2+}$  で処理すると、いずれの処理もシグナルの減少を誘導した (森井 修士論文 2013)。

## 2. 研究の目的

以上の結果を総合して、「葉緑体外包膜および細胞膜近傍に異なるピリン分子種が局在し、低  $Ca^{2+}$  条件下では束化によってアクチン繊維を安定化して葉緑体アンカーに寄与し、高  $Ca^{2+}$  条件下ではアクチン繊維の切断・脱重合によって脱アンカーを誘導する」という仮説を導いた。しかし、ピリン分子種間の役割分担、それらの制御機構を追究するにはホウレンソウでは限界があると考え、シロイヌナズナを実験材料として導入した。

シロイヌナズナの持つ 5 つのピリン分子種のうち、AtVNL2,3,4 が葉に発現していることを DNaseI カラムクロマトグラフィと質量分析により確認した。各々の遺伝子破壊株を用いた細胞膜ゴーストアッセイの結果、

AtVNL2 欠損株では  $\text{Ca}^{2+}$  処理による葉緑体の脱落が起こりにくく、AtVNL4 欠損株では細胞膜ゴースト調製時に既に脱落が認められた(貴傳名 修士論文 2011)。本研究では、AtVNL2 が  $\text{Ca}^{2+}$  に依存した葉緑体脱アンカーに働く可能性について検証した。

### 3. 研究の方法

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia) の野生株、AtVNL2 欠損株 (SALK 114508) を材料とした。

野生株ロゼット葉のゲノム DNA から AtVNL2 のプロモータ領域を、cDNA から遺伝子領域をクローニングし、ゲートウェイベクターを用いて黄色蛍光蛋白質 (YFP) との融合遺伝子を構築した。これを AtVNL2 欠損株に導入し、AtVNL2 可視化株を作製した。

Takamatsu and Takagi (2011) に従って、葉肉細胞プロトプラストから、細胞膜直下の表層細胞質を露出させた細胞膜ゴーストを調製し、葉緑体のアンカー状態を見積もった。

無傷葉緑体は、ロゼット葉をミキサーで破碎後、パーコール遠心法により単離した。骨格筋 G-アクチン溶液を加え、一定時間後に遠心分離し、葉緑体を蛍光ファロイジンで染色することにより、アクチン繊維を可視化した。共焦点顕微鏡画像から、葉緑体外包膜におけるアクチン重合量を半定量化した。

### 4. 研究成果

(1) 細胞膜ゴーストアッセイにおいて、AtVNL2 欠損株では  $\text{Ca}^{2+}$  処理による葉緑体の脱落が起こりにくかったことから、青色強光によって誘導される葉緑体逃避運動について解析した。AtVNL2 欠損株では、葉緑体の移動開始時、葉緑体の運動が頻繁に停止し、スムーズに移動が始まらないことが分かった。また、クロロフィル蛍光測定により、AtVNL2 欠損株は、強光暴露下で光化学系 II の量子効率が野生株よりも減少しやすい傾向を示し(岡山大学、坂本巨博士・加藤裕介博士との共同研究)、葉緑体の運動やアンカー状態の異常が、高次の細胞機能に影響を与えることが示唆された。

(2) 本研究で作製した AtVNL2 可視化株の細胞膜ゴーストアッセイにおいて、AtVNL2 欠損株でみられた、 $\text{Ca}^{2+}$  処理による葉緑体の脱落が起こりにくい傾向が回復していることを確認した。

AtVNL2-YFP の蛍光シグナルは、細胞膜ゴーストの葉緑体上に検出された。塩、アルカリ、リン脂質などの処理によって葉緑体上の蛍光シグナルが減少したことから、AtVNL2 の葉緑体局在には、蛋白質や脂質との相互作用が関与している可能性が示唆された。

AtVNL2 可視化株の柵状組織葉肉細胞における蛍光シグナルを解析したところ、AtVNL2-YFP は、弱光下では葉緑体上に、強光下では細胞質中に繊維状に局在し、光条件の変化に従って AtVNL2 の細胞内局在が変化

する可能性が示唆された。

(3) ロゼット葉から単離した無傷葉緑体と骨格筋 G-アクチンとを用いて、葉緑体外包膜におけるアクチン構築を半定量化した。単離葉緑体に骨格筋 G-アクチンを加えると、葉緑体上の蛍光ファロイジンによる染色シグナルが増加した。この増加は、アクチン脱重合剤の存在下や、単離葉緑体をプロテアーゼで前処理した場合には、有意に抑制され、葉緑体外包膜におけるアクチン重合を検出していると判断した。

$\text{Ca}^{2+}$  非存在下での重合については、野生株と AtVNL2 欠損株との間に違いはなかったが、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下では、野生株において重合が抑制され、AtVNL2 欠損株においてその  $\text{Ca}^{2+}$  感受性が失われており、AtVNL2 可視化株において  $\text{Ca}^{2+}$  感受性が回復していた。いったん重合させたアクチン繊維の  $\text{Ca}^{2+}$  添加による脱重合については、野生株では起こるが、AtVNL2 欠損株では起こらなかった。

以上の結果より、AtVNL2 が葉緑体外包膜に局在し、低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度下では束化を介してアクチン繊維を安定化、高  $\text{Ca}^{2+}$  濃度下ではアクチン繊維の切断・脱重合をもたらすことにより、葉緑体アンカーの制御に関与している可能性が強く示唆された。

### 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)

Iida M., Takano T., Matsuura T., Mori IC, Takagi S. Circumnutation and distribution of phytohormones in *Vigna angularis* epicotyls. *Journal of Plant Research* 査読有 131 (2018): 165-178.

DOI: 10.1007/s10265-017-0972-y

Sakai Y., Takagi S. Roles of actin cytoskeleton for regulation of chloroplast anchoring. *Plant Signaling and Behavior* 査読有 12 (2017): 10, e1370163.

DOI: 10.1080/15592324.2017.1370163

Iwabuchi K., Hidema J., Tamura K., Takagi S., Hara-Nishimura I. Plant nuclei move to escape ultraviolet-induced DNA damage and cell death. *Plant Physiology* 査読有 170 (2016): 678-685.

DOI: 10.1104/pp.15.01400

Sakai Y., Inoue S., Harada A., Shimazaki K., Takagi S. Blue-light-induced rapid chloroplast de-anchoring in *Vallisneria* epidermal cells. *Journal of Integrative Plant Biology* 査読有 57 (2015): 93-105.

DOI: 10.1111/jipb.12284

Sakai Y., Inoue S., Takagi S. *In vitro* phosphorylation assay of putative blue-light receptor phototropins using microsomal and plasma-membrane fractions prepared from

*Vallisneria* leaves. Bio-protocol 査読有 5 (2015): e1647.

Sakai Y., Takagi S. Observation of chloroplast movement in *Vallisneria*. Bio-protocol 査読有 5 (2015): e1646.

〔学会発表〕(計 22 件)

小島崇裕、石田泰浩、高木慎吾「シロイヌナズナの向背軸変異体における葉緑体光定位運動」第 59 回日本植物生理学会年会 (2018 年、札幌)

宮武ゆう子、段中瑞、中野明彦、高木慎吾、伊藤光二、富永基樹「オルガネラ運動におけるシロイヌナズナミオシン XI-I の役割」第 69 回日本細胞生物学会大会 (2017 年、仙台)

飯田幹之、松浦恭和、森泉、高木慎吾「アズキ上胚軸の回旋運動と植物ホルモンの分布 II」日本植物学会第 81 回大会 (2017 年、野田)

横田悦雄、新免輝男、高木慎吾「リボソームに結合した植物ピリンと F-アクチンの相互作用」第 58 回日本植物生理学会年会 (2017 年、鹿児島)

飯田幹之、松浦恭和、森泉、高木慎吾「アズキ上胚軸の回旋運動と植物ホルモンの分布」日本植物学会第 80 回大会 (2016 年、沖縄)

宮武ゆう子、段中瑞、中野明彦、高木慎吾、伊藤光二、富永基樹「低速のシロイヌナズナミオシン XI-I の機能解析」日本植物学会第 80 回大会 (2016 年、沖縄)

甲斐卓、森井真美、高木慎吾「シロイヌナズナ単離葉緑体におけるアクチン構築機構の解析」第 57 回日本植物生理学会年会 (2016 年、盛岡)

大西厚輝、Islam MS、富永基樹、高木慎吾「シロイヌナズナにおける青色光依存的なミトコンドリアの運動促進とミオシン  $\alpha$ -i の関与について」2016 生体運動研究合同班会議 (2016 年、京都)

Islam MS, Nguyen VT, Tominaga M, Kato Y, Sakamoto W, Takagi S. 「Regulation of mitochondrial behavior by phototropins, photosynthesis, and myosin XI-I in *Arabidopsis thaliana*」IM WS on Plant Sciences(2015, Himeji, Japan)

高松秀安、森井真美、横田悦雄、高木慎吾「ハウレンソウのピリン様蛋白質が葉緑体アンカーに果たす役割」日本植物学会第 79 回大会 (2015 年、新潟)

Harada A, Okazaki Y, Kinoshita T, Nagai R, Takagi S. 「Role of proton motive force in red-light-induced cytoplasmic streaming in *Vallisneria* mesophyll cells」EWRAS Aquatic Plants Meeting (2015, Edinburgh, UK)

横田悦雄、織井秀文、田原寛、森安裕二、新免輝男、高木慎吾「アクチン結合蛋白質ピリンの活性はリン脂質により修飾される」第

56 回日本植物生理学会年会 (2015 年、東京)  
小畑響子、田中怜、高木慎吾「シロイヌナズナ葉肉細胞の核は弱光定位運動を示す」日本植物学会第 78 回大会 (2014 年、神奈川)  
Islam MS、Nguyen VT、富永基樹、高木慎吾「シロイヌナズナにおける青色光に依存したミトコンドリアの移動速度調節について」第 18 回日本光生物学協会年会 (2014 年、大阪)

〔図書〕(計 3 件)

高木慎吾 朝倉書店「光と生命の事典」(2016) pp. 136-137.

Sakamoto Y., Takagi S., Springer, Nuclear lamina localized at the nuclear periphery in interphase and at chromosomes in mitotic phase. Atlas of Plant Cell Structure (2014) pp. 6-7.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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  
[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・教授  
研究者番号：10192626

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )