

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440152

研究課題名(和文) プラスチドの分化に伴うストロミュールの形成制御機構

研究課題名(英文) Regulation of stromule formation and its relation to plastid differentiation

研究代表者

伊藤 竜一 (ITO, 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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：非緑色プラスチドにおいては、ストロミュールの高度な発達を観察される。本研究代表者は、葉表皮においてストロミュールが過剰に形成するシロイヌナズナ変異体subaを2種取得した。これらの変異体を材料として実施した本研究では、(i) SUBA1が植物全体において広汎にストロミュール制御に関与していること、(ii) SUBA2とMind/Eとの新規相互作用の可能性、(iii) suba変異は花粉および花粉管のプラスチド形態・運動にも影響を及ぼすこと、等の知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Generally, non-green plastids tend to possess highly developed stromule(s). In our previous study, the author obtained two mutants of Arabidopsis in which overformation of stromules were observed in leaf epidermis. Using these mutants, the author studied the regulation of stromule formation and obtained some insights as follows: (i) SUBA1 is involved in the regulation of stromule formation globally over various tissues, (ii) SUBA2 might interact with Mind/E, (iii) suba mutations affect plastid morphology and/or movement in pollen grains and tubes.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：プラスチド

### 1. 研究開始当初の背景

プラスチド(色素体)は植物細胞特有のオルガネラであり、特に光合成機能を発達させた緑色のプラスチドは葉緑体と称される。高等植物においては、主要な光合成の場は葉の葉肉組織であり、各々の葉肉細胞は1細胞あたり概ね一定数の葉緑体を含んでいる。これらの葉緑体の形態は一様かつ単純な球形～楕円形であり、そのサイズは直径3~6 μmでほぼ均一である。このような葉緑体の形態・サイズの一様性・均一性は、葉緑体が既存の葉緑体の均等分裂によって増殖することに起因する。申請者らは、原核生物由来の葉緑体タンパク質 MinE1 が葉緑体分裂の均等性を担う主要因子であることを発見し (Itoh *et al.* 2001, Itoh & Yoshida 2001), MinE1 とその相互作用因子 MinD1 が協働して葉緑体分裂位置を制御していることを解明してきた (Fujiwara, Itoh *et al.* 2004, 2008, 2009a, 2009b, Kojo, Itoh *et al.* 2009)。

一方、高等植物のプラスチドは組織や環境に応じて可逆的に分化する性質(可塑性)を有しており、植物個体全体の機能を理解する上で、葉緑体のみならず非緑色(非光合成)プラスチドの形成機構を解明することは不可欠である。非緑色プラスチドには、デンプンを蓄積するアミロプラスチド、赤や黄の色素を蓄積するクロモプラスチドなど、組織の役割に応じた様々な分化型が存在し、これらの分化型(葉緑体を含む)は全て、分裂組織に含まれる未分化なプロプラスチド(原色素体)から派生している。顕微鏡イメージング技術の進歩によって、これらの非緑色プラスチドは、葉緑体とは全く異なる複雑かつ不均一な形態をとり、ダイナミックな時間変化を見せることが明らかにされてきた (Fujiwara, Itoh *et al.* 2010, 2012 他)。

非緑色プラスチドにおいて最も顕著な形態形質は、プラスチド本体から伸びる細管状構造「ストロミュール」の高度な発達である。ストロミュールは、プラスチドの2枚の包膜で仕切られたストロマ含有構造であり、直径は0.3~0.8 μm、長さは数μmから最長220 μmにまで及ぶ。ストロミュールは極めてダイナミックな構造であり、伸長、収縮、分枝、分離など、様々な挙動を示すが、その分子機構は不明である。また、ストロミュールの形成頻度や伸長度は、細胞の分化状態、発生段階、プラスチド密度、生育温度、栄養状態、植物ホルモン(特にABA)、ウイルス感染などの諸要因に依存する。一般的傾向として、非緑色プラスチドでは発達したストロミュールが高頻度で見られるのに対し、葉肉細胞の葉緑体では長いストロミュールは殆ど見られない。申請者らは、呼吸阻害剤の一種であるアンチマイシンAが、根のプラスチド(白色体)でストロミュールの過剰形成を誘起するという現象を発見した (Itoh *et al.* 2010, Itoh & Fujiwara 2010)。これらの研究は、ストロミュールの形成・伸長が、ある種の「細

胞内環境」を感知して起こる反応であることを示すものであるが、プラスチドが如何にして環境情報を感知し、形態変化を誘起するかは未解明である。

申請者は、ストロミュール形成の制御機構を解明すべく、本葉の表皮細胞においてストロミュールの形成・伸長が過剰なシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の変異体 (*stromule biogenesis altered [suba]* 変異体) を2種取得し(未発表)、その原因遺伝子 (*SUBA1, 2*) の同定を進めた。このうち、*SUBA2* の候補遺伝子の一つとして、葉緑体分裂位置決定因子として *MinE1, MinD1* とともに働く既知のタンパク質、*PARC6* をコードする遺伝子が浮上した。

### 2. 研究の目的

上記の研究背景に基づき、本研究は、*SUBA1* および *SUBA2/PARC6* の機能解析を通してストロミュール形成の制御機構を解明することを目指した。具体的には、以下のような研究を実施した。

(1) *suba1* および *suba2* 変異体の原因遺伝子を最終確定する。

(2) 本葉表皮以外の様々な組織において、蛍光および電子顕微鏡を用いて *suba1* 変異体と野生型のプラスチド形態を比較観察し、*SUBA1* の影響が及ぶ組織の範囲を明らかにする。

(3) *suba2 minE1, suba2 minD1, minE1 minD1* の各2重変異体、および3重変異体を作出し、それらの非緑色プラスチドを観察することにより、ストロミュール形成における *SUBA2/PARC6, MinE1, MinD1* の遺伝的相互作用を解明する。これにより、葉緑体分裂位置決定システム (cpMin system) がストロミュール形成において果たす役割についての新たなモデルを構築する。

### 3. 研究の方法

上記の目的(1)~(3)に対応して、主として以下の方法で研究を進めた。

(1) 本研究開始当初、*suba1* および *suba2* 変異体それぞれについて、染色体マッピングなどの結果から、2ないし3の原因遺伝子候補が存在していた。そこで、以下の①~③の方法を用いて、各 *suba* 変異体の原因遺伝子の確定を試みた。

既存の入手可能なシロイヌナズナ変異体 (T-DNA 挿入変異体、トランスポゾン (Ds) 挿入変異体、など) と *suba* 変異体との人工交配 (アレリズムテスト)

上記の既存変異体へのプラスチド移行型蛍光蛋白質発現ベクター導入による非緑色プラスチドの可視化と形態観察 (*suba* 変異体と同様のプラスチド形態表現型 (ストロミュール過剰形成・過剰伸長) が見られるか否かの確認のため)

候補遺伝子の野生型アリルを、ネイティブプロモーターで発現するベクターを構築

し、それらを各 *suba* 変異体へ導入することによる遺伝子相補試験 (genetic complementation assay)

(2) 本葉表皮以外の非緑色組織として、特に花粉に着目した *suba* 変異体のプラスチドはカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター制御下で構成的に強発現する CFP (シアン色蛍光タンパク質) で標識されているが、花粉細胞内では 35S プロモーターによる外来 CFP 遺伝子の発現 (蛍光) はほとんど検出できない。そこで、花粉細胞内で強く発現する遺伝子のプロモーターにプラスチド移行配列融合型 CFP 遺伝子を接続した発現ベクターを構築し、これを *suba* 変異体に導入することにより、*suba* 変異体の花粉細胞内におけるプラスチドの形態を蛍光顕微鏡で観察した。さらに、寒天培地上での *in vitro* (および *semi in vitro*) 花粉管伸長系を利用することにより、両 *suba* 変異体の花粉管伸長時における花粉管内プラスチドの形態およびダイナミクスのタイププラス観察を実施した。

(3) *suba2 minE1*, *suba2 minD1*, *minE1 minD1* の各二重変異体、および三重変異体を人工交配により作出し、それらの非緑色プラスチドを蛍光顕微鏡で観察することにより、ストロミュール形成における *SUBA2/ PARC6*, *MinE1*, *MinD1* の遺伝的相互作用の解明を目指した。さらに、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いたツーハイブリッド法により、酵母細胞内でのこれら 3 種のタンパク質の物理的相互作用についても併せて検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *suba2* 変異体の原因遺伝子の最終確定

*suba1* 変異体については、3 つの原因遺伝子候補が存在していた。このうち、研究当初、原因遺伝子と考えていた遺伝子について、T-DNA 挿入変異体、トランスポゾン (*Ds*) 挿入変異体と *suba1* 変異体とのアレリズムテストを実施したところ、交配第一世代の表現型は野生型となった。また既存変異体のプラスチドを蛍光蛋白質遺伝子導入により可視化したところ、プラスチド形態は野生型と同様であった。更に、野生型アレルの *suba1* 変異体への導入の結果、表現型の回復は見られなかった。以上の結果から、この候補遺伝子は、3 遺伝子中ただ一つ葉緑体局在性タンパク質をコードしているものであることが実験的に確認されたものの、原因遺伝子から除外された。第 2 の候補として、核内転写因子をコードする遺伝子についても、上記の実験を進めた。アレリズムテスト、プラスチド形態の観察結果は共にネガティブなものであった。遺伝子相補試験は本研究期間内に未了となった。第 3 の候補として、核内複合体のサブユニットをコードする遺伝子については、既存変異体の生育上の問題から「研究の方法」

および は実施できなかった。遺伝子相補試験は本研究期間内に未了となった。現時点

では、(消去法により) 第 3 の候補遺伝子が *suba1* 原因遺伝子の最有力候補と考えている。

*suba2* 変異体については、2 つの原因遺伝子候補が存在していたが、これまでの葉緑体形態研究の知見から、2 つのうち *PARC6* 遺伝子が原因遺伝子である可能性が極めて高いと考えられた。そこで「研究の方法」を *PARC6* 遺伝子について実施し、そのすべてにおいて *suba2* が *PARC6* の新規アレルであることを示す結果を得ることができた。この結果から、*suba2* の原因遺伝子は *PARC6* であると結論した。*PARC6* タンパク質は葉緑体分裂因子の一つであり、特に葉緑体分裂位置決定に重要な役割を果たすことが知られている。この結果から、葉緑体の分裂位置決定システム (cpMin system) が、非緑色細胞のプラスチドにおいてはストロミュール形成制御に関与している可能性が示唆された。

##### (2) *suba* 変異体の花粉・花粉管プラスチドの観察

*suba1*, *suba2* 両変異体の花粉細胞内のプラスチドを、上記「研究の方法」により蛍光標識・可視化し、観察をおこなった。*suba1* 変異体では、花粉プラスチドにおいてもストロミュールの過剰形成・過剰伸長が観察された。葉表皮細胞と花粉という、まったく異なる細胞内で同様のプラスチド形態表現型が観察されたことから、*SUBA1* 遺伝子の変異によるプラスチド形態の変化は間接的なものではなく、*SUBA1* 遺伝子がストロミュール形成制御 (抑制) に対して直接的かつ特異的な関与をしていることが推定された。一方、*suba2* 変異体では、花粉プラスチドの巨大化、不均一化、凝集 (クラスター形成) などが観察された。これらの表現型は、プラスチドの分裂阻害、不完全分裂、分裂位置異常を示唆するものであり、*SUBA2* (*PARC6*) が植物の様々な組織においてグローバルにプラスチドの分裂制御に関与していることを示唆している。

両変異体の花粉管伸長時のプラスチドのリアルタイム観察も実施した。プラスチド形態そのものは、花粉細胞 (花粉粒) 内のものと同様であったが、花粉管細胞質中のプラスチドの運動については、*suba2* 変異体において、巨大化や凝集によるものと思われる運動停滞が観察された。いっぽう *suba1* 変異体における花粉管細胞質中のプラスチド運動は野生型と同様であった。花粉管伸長時のプラスチド運動の生物学的意義は不明である。*suba2* 変異体で観察されたようなプラスチド運動遅滞はこれまで報告が無かったため、本変異体は、花粉管伸長時のプラスチド運動の意義について研究する上で有用な材料になると思われる。なお、このようなプラスチド運動遅滞にもかかわらず、*suba2* 変異体の花粉管伸長速度や稔性 (種子形成) などの諸性質は野生型と同等であった。このことから、正常なプラスチド運動は花粉管の伸長

や受精などには必ずしも必要ではないという、植物の生殖過程に関する新たな知見を得ることができた。

### (3) *SUBA2/ PARC6*, *MinE1*, *MinD1* の遺伝的相互作用

これらの3遺伝子の突然変異体間で人工交配を行うことにより、可能な組み合わせすべての多重(二重,三重)変異体を作成し、その本葉表皮の細胞におけるプラスチド形態を蛍光顕微鏡を用いて観察した。さらに、画像解析ソフトウェア ImageJ を用いてそのサイズ、細胞内分布の均一性、形態複雑性などの形態的指標を定量化し、ライン間での比較検討をおこなった。その結果、本葉表皮の非緑色プラスチドの形態に関しては、三者間で従来知られていなかった相互作用が存在する可能性が示唆された。酵母を用いたツーハイブリッド解析もこの結果の一部を支持するものであった。これらの結果から、非緑色プラスチドにおけるストロミュール形成制御システムと葉緑体分裂位置決定システム(cpMin system)との間で、共通の構成要素(タンパク質)が働いている可能性が考えられた。

### 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4件)

Ryouhei Morita, Mayu Nakagawa, Hinako Takehisa, Yoriko Hayashi, Hiroyuki Ichida, Sachiko Usuda, Katsunori Ichinose, Hiroshi Abe, Yuki Shirakawa, Tadashi Sato, Makoto T. Fujiwara, Ryuichi D. Itoh, Tomoko Abe (2017) Heavy-ion beam mutagenesis identified an essential gene for chloroplast development under cold stress conditions during both early growth and tillering stages in rice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 81: 271-282. DOI: 10.1080/09168451.2016.1249452. 査読有。

Makoto T. Fujiwara, Kei H. Kojo, Yusuke Kazama, Shun Sasaki, Tomoko Abe, Ryuichi D. Itoh (2015) The Arabidopsis *minE* mutation causes new plastid and FtsZ1 localization phenotypes in the leaf epidermis. *Frontiers in Plant Science* 6: 823. DOI: 10.3389/fpls.2015.00823. 査読有。

Makoto T. Fujiwara, Emi Kobayashi, Mikako Kanazawa, Ryuichi D. Itoh (2015) Observation of colourless idioblasts in *Egeria densa* leaves by conventional UV-excitation fluorescence microscopy. *Cytologia* 80: 131-132. DOI: 10.1508/

*cytologia*.80.131. 査読有。

Takuya Hara, Emi Kobayashi, Kohei Ohtsubo, Shogo Kumada, Mikako Kanazawa, Tomoko Abe, Ryuichi D. Itoh, Makoto T. Fujiwara (2015) Organ-level analysis of idioblast patterning in *Egeria densa* Planch. leaves. *PLOS ONE* 10: e0118965. DOI: 10.1371/journal.pone.0118965. 査読有。

[学会発表](計10件)

石川浩樹, 佐々木駿, 平野智也, 風間裕介, 阿部知子, 伊藤竜一, 藤原誠. シロイヌナズナ葉緑体分裂変異体を用いた花粉発生過程における色素体増殖の解析. 日本農芸化学会2017年度大会, 2017年3月17日, 京都女子大学(京都府・京都市).

中島耕大, 佐々木駿, 石川浩樹, 藤原誠, 伊藤竜一. シロイヌナズナ葉緑体分裂変異体の花粉及び花粉管における色素体の形態観察. 日本植物形態学会第28回大会, 2016年9月15日, 琉球大学(沖縄県・中頭郡西原町).

三家本梨央, 高橋史, 笹川展幸, 藤原誠, 伊藤竜一. アンチマイシンA誘発シロイヌナズナ根色素体の形態変化. 日本農芸化学会2016年度大会, 2016年3月27日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

佐々木駿, 石川浩樹, 鈴木麻央, 風間裕介, 阿部知子, 伊藤竜一, 藤原誠. シロイヌナズナにおける花粉色素体増殖の遺伝的制御解析. 日本農芸化学会2016年度大会, 2016年3月27日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

石川浩樹, 佐々木駿, 平野智也, 風間裕介, 阿部知子, 伊藤竜一, 藤原誠. シロイヌナズナ花粉体細胞分裂時における色素体の増殖. 日本農芸化学会2016年度大会, 2016年3月27日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

佐々木駿, 石川浩樹, 加賀谷奨, 風間裕介, 阿部知子, 伊藤竜一, 藤原誠. シロイヌナズナ花粉色素体の増殖制御機構の解析. 日本農芸化学会関東支部2015年度支部大会, 2015年9月26日, お茶の水女子大学(東京都・文京区).

石川浩樹, 佐々木駿, 鈴木麻央, 平野智也, 風間裕介, 阿部知子, 伊藤竜一, 藤原誠. シロイヌナズナ花粉発生過程における色素体増殖の解析. 日本農芸化学会関東支部2015年度支部大会, 2015年9月26日, お茶の水女子大学(東京都・文京区).

佐々木駿，石川浩樹，加賀谷奨，風間裕介，阿部知子，伊藤竜一，藤原誠．シロイヌナズナ葉緑体分裂異常変異体における花粉色素体の解析．日本農芸化学会 2015 年度大会，2015 年 3 月 26 日，岡山大学（岡山県・岡山市）．

石川浩樹，佐々木駿，鈴木麻央，平野智也，風間裕介，阿部知子，伊藤竜一，藤原誠．シロイヌナズナ花粉発生過程における色素体増殖の解析．日本農芸化学会 2015 年度大会，2015 年 3 月 26 日，岡山大学（岡山県・岡山市）．

佐々木駿，加賀谷奨，石川浩樹，鈴木麻央，伊藤竜一，藤原誠．シロイヌナズナ花粉色素体の増殖制御機構の解析．日本農芸化学会関東支部 2014 年度支部大会，2014 年 10 月 18 日，埼玉大学（埼玉県・さいたま市）．

〔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〕

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 竜一 ( ITOH, Ryuuichi )  
琉球大学・理学部・准教授  
研究者番号：5 0 3 2 2 6 8 1

### (2) 研究分担者

なし

### (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：9 0 3 3 2 3 4 5