

令和元年5月20日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2018

課題番号：26711016

研究課題名(和文) 根の緑化応答から明らかにする葉緑体の発達メカニズムとその制御

研究課題名(英文) Study on root greening response reveals regulatory mechanism of chloroplast development

研究代表者

小林 康一 (Kobayashi, Koichi)

大阪府立大学・高等教育推進機構・准教授

研究者番号：40587945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体は、植物の生活環全体に深く関わる細胞内小器官である。報告者は先行研究により、地上部を失った根では葉緑体の発達がおこり、光合成効率が高まることを明らかにした。本研究では、切除根における葉緑体の発達や光合成の活性化機構を調べた。その結果、地上部を失ったシロイヌナズナの根ではサイトカイニンにより転写因子GNLが誘導され、その下流で核や葉緑体コードの光合成関連遺伝子の発現が活性化すること、それにより根の光合成収率が顕著に高まることを明らかにした。さらに、葉緑体発達時にはチラコイド膜脂質が合成されることがクロロフィルや光合成タンパク質の合成に必須であることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉緑体は植物の生活環全体に大きく関わる細胞内小器官であり、植物の生きるしくみを明らかにするには葉緑体の発達制御機構の解明が不可欠である。報告者は、地上部の喪失に反応して葉緑体分化を誘導する情報伝達経路を明らかにした。さらに、解明した情報伝達経路を人工的に改変することで野生株の20倍ものクロロフィルを蓄積しかつ光合成能力も高い根を持つシロイヌナズナ形質転換体を作成することに成功した。本研究の成果は、葉緑体分化機構の全容を明らかにするだけでなく、植物の多様な生活様式や生存戦略の解明にも大きく貢献するもので、光合成能力や生存能力を高めた植物の開発にもつながる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Chloroplasts are the organelles that perform photosynthesis and play crucial roles in plant growth. However, regulatory mechanisms of chloroplast development remain largely elusive. My research group previously reported that removal of shoots from Arabidopsis seedlings induces chloroplast development and photosynthetic activation in roots. In this project, I attempted to reveal signaling pathways involved in the shoot removal-induced root greening response. The results demonstrate that shoot removal induces upregulation of a transcription factor GNL via activation of a cytokinin signaling pathway, thereby increases expression of nuclear- and plastid-encoded photosynthesis-associated genes and photosynthetic efficiency. This project further revealed that biosynthesis of major thylakoid membrane lipids before and at the onset of chloroplast biogenesis is essential for biosynthesis of chlorophylls and thylakoid-associated photosynthesis proteins.

研究分野：植物生理学

キーワード：葉緑体 光合成 クロロフィル 根 植物ホルモン サイトカイニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

一部の例外を除き、植物の根は炭素源を葉で行われる光合成に依存している。そのため、根では葉緑体の発達は抑制され、通常ほとんど緑化しない。モデル植物であるシロイヌナズナにおいても根での葉緑体発達は抑制されているが、地上部を切除することで根の緑化が引き起こされ、光合成活性が顕著に高まることを報告者は見出した。そこで、根において葉緑体の発達を制御する仕組みを調べたところ、地上部から輸送される植物ホルモンのオーキシンが葉緑体分化を抑制することや、別の植物ホルモンであるサイトカイニンが根での葉緑体分化を促進することを先行研究により明らかにした。さらに、これらのホルモンの下流では転写因子の HY5 と GLK (GLK1 及び GLK2) が、相互作用しながら核にコードされた光合成遺伝子の発現を調節することも突き止めた (Kobayashi et al., 2012)。しかし、地上部を失ったシロイヌナズナの根で実際にどのようなしくみによって葉緑体の発達が誘導されるのかは明らかでなかった。また、葉緑体の発達を決定づけるチラコイド膜の発達にはクロロフィルや光合成タンパク質とともに膜のベースとなる脂質二重層が協調的に構築される必要があるが、これらの要素がどのように関連しながら葉緑体の形成を引き起こすのかもほとんど分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

葉緑体は、葉だけでなく植物の生活環全体に大きく関わる細胞内小器官であるが、その分化制御機構の全容は未だ明らかでなかった。報告者による先行研究により、地上部を失った根では葉緑体の分化・発達がおこり、さらに光合成効率が高まることが分かっていた。これは多くの植物に普遍的な現象であったため、ソース器官を失った植物体の生存戦略の一つと考えられるが、その詳細は明らかでなかった。本研究では、その過程における葉緑体分化の制御機構と光合成活性化の仕組みを解き明かし、葉緑体の分化・発達制御モデルを分子レベルで構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) クロロフィル定量

植物サンプルを液体窒素中で破砕し、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

植物サンプルを液体窒素中で破砕し、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。

### (3) 光合成活性測定

光化学系 II の光量子収率の測定は、イメージングパルス変調クロロフィル蛍光測定装置 (Imaging-PAM, Walz) 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。サンプルを破砕し、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。

### (4) 光合成タンパク質のウェスタンブロット解析

植物サンプルを液体窒素中で破砕し、トリスバッファーに懸濁し、膜画分を粗精製した。SDS サンプルバッファー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。Horseradish peroxidase を結合した二次抗体と一次抗体を反応させ、化学発光試薬 (Pierce Western Blotting Substrate Plus; Thermo Scientific) によってタンパク質の検出を行った。

### (5) 脂質定量

植物サンプルをクロロホルム - メタノール (2:1, v/v) 溶液中で破砕し、メタノールと 1% (w/v) KOH 水溶液の添加による二層分離により脂質画分を得た。脂質を薄層クロマトグラフィーにより分画後、脂肪酸を塩酸メタノール溶液によりメチルエステル化し、ガスクロマトグラフィー (GC-17A; Shimadzu) により定量した。

## 4. 研究成果

### (1) 傷害応答因子により活性化されるサイトカイニンシグナルによる根の緑化誘導

切除根の緑化にサイトカイニンが関わるかどうかを調べるため、サイトカイニンの情報伝達に関わる変異体の切除根の緑化応答を解析したところ、サイトカイニンの正の制御因子である type B ARR の変異体では地上部切除後の根の緑化がほとんど起こらないことが分かった。さらに、type B ARR の転写誘導活性を示す GFP レポーター解析から、地上部を切除した根では type B ARR の転写誘導活性が顕著に高まることも見出した。Iwase et al. (2011) の研究により、傷害応答因子である WIND1 が type B ARR の活性化を引き起こすことが知られていたため、切除根の緑化応答における WIND1 の関与を調べた。WIND1 の働きを人工的に抑制したところ、地上部

切除による根での type B ARR の活性化が弱くなり、また根の緑化も強く抑制された。このことから、地上部切除により誘導された WIND1 が type B ARR を活性化し、その下流の応答として根の緑化が引き起こされることが明らかとなった。

野生株と type B ARR 変異体 (*arr1 arr12*) で遺伝子発現解析を行ったところ、野生株では根における光合成関連遺伝子の発現が地上部切除で顕著に増加したのに対し、*arr1 arr12* ではそのような変化がほとんど起こらなかった (図 1)。この結果は、核にコードされた光合成関連遺伝子だけでなく、葉緑体コードの遺伝子でも見られたことから、傷害により誘導される type B ARR シグナリングは何かの因子を介して葉緑体コードの遺伝子発現にも大きな影響を与えることが明らかとなった。

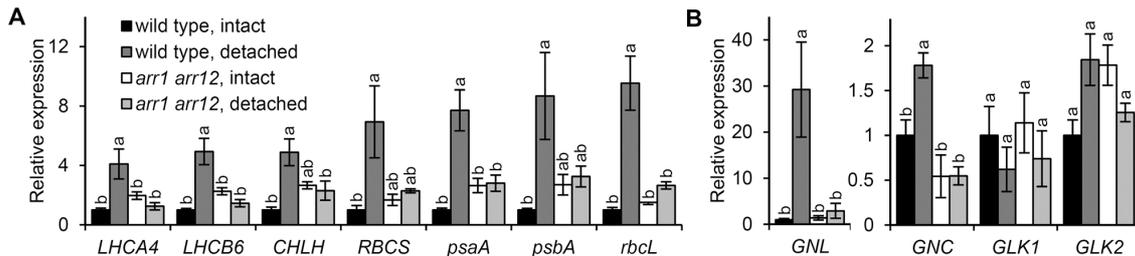
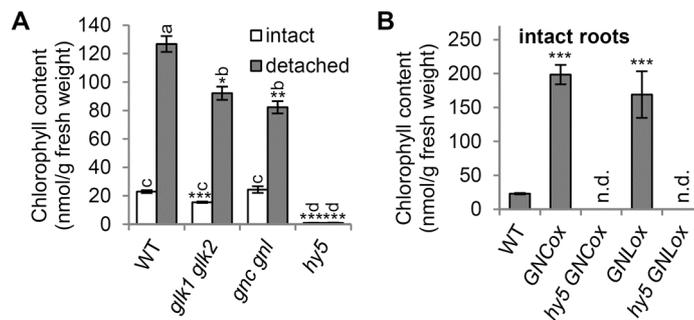


図 1. 野生株と *arr1 arr12* 変異体の根における (A) 光合成関連遺伝子および (B) 葉緑体分化に関わる転写因子の mRNA 蓄積量。"intact" は未切除の根、"detached" は地上部の切除処理をした根を示す。(Kobayashi et al., 2017 *Plant Physiol.* 173: 2340-2355 を改変)

### (2) サイトカイニンの下流で働く転写因子 GNC, GNL の根の緑化への関与

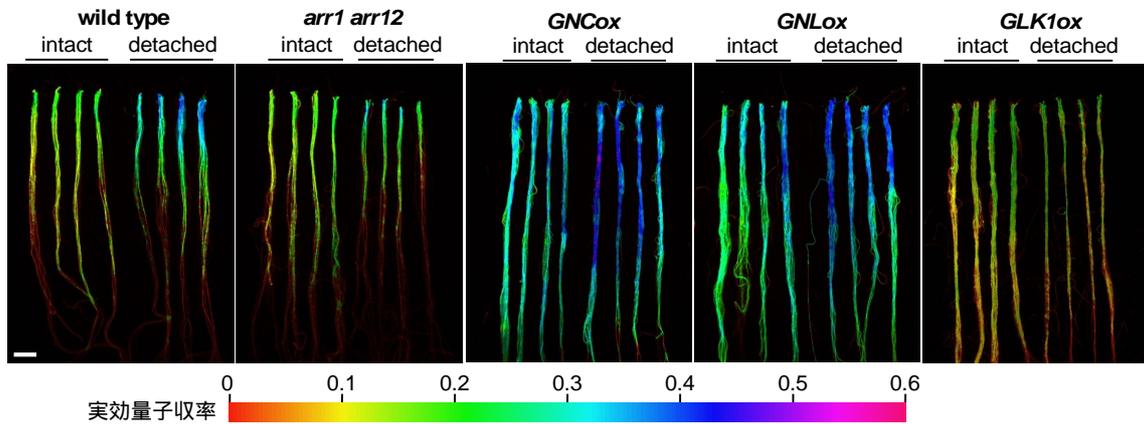
Chiang et al. (2012) の研究から、type B ARR の下流で転写因子の GNC および GNL が働き葉緑体分化を引き起こすことが報告されていた。実際、報告者による解析で、地上部を切除した根では特に GNL の転写が大きく誘導されることが明らかとなった (図 1)。そこでこれら二つの転写因子の二重変異体 (*gnc gnl*) を詳しく解析した結果、この変異体では地上部切除後の根の緑化応答が低下していることが分かった (図 2)。さらに、GNC や GNL を人為的に過剰発現させた植物体では根が顕著に緑化し (図 2)、根の光合成活性も大きく高まることが明らかとなった (図 3)。さらに、GNC や GNL は核の転写因子であるにもかかわらず、これらの転写因子の過剰発現体の根では、葉緑体にコードされた光合成関連遺伝子の発現誘導が顕著であることも分かった。以上の結果から、地上部を切除した根では傷害応答因子 WIND1 により type B ARR による情報伝達経路が活性化し、その下流で特に GNL が誘導され葉緑体分化を誘導するという経路が見出された。根の緑化に必須の因子である HY5 変異体で GNC や GNL を過剰発現させても根の緑化は引き起こされなかったことから (図 2)、GNC や GNL に葉緑体分化誘導は HY5 の機能に依存していることも明らかとなった。

図 2. 葉緑体分化に関わる転写因子の (A) 機能欠損変異体や (B) 過剰発現体の根におけるクロロフィルの蓄積量。"intact" は未切除の根、"detached" は地上部の切除処理をした根を示す。(Kobayashi et al., 2017 *Plant Physiol.* 173: 2340-2355 を改変)



### (3) 根の光合成機能の制御

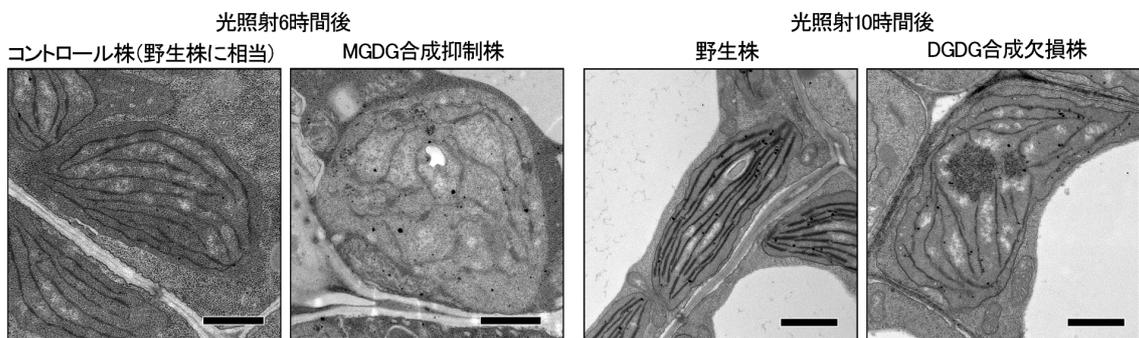
シロイヌナズナの根では光合成の光収率が葉と比べて低いが、切除根では光合成光収率も高まることが分かった (図 3)。そこで、この変化がどのように起こるのかを調べたところ、切除根ではプラストキノンプールが照射下では通常の根よりも酸化的に維持されることで光化学系 II の光量子収率がよく保たれることが明らかとなった。この現象がどのように引き起こされるのかを調べるため、根の緑化を誘導するサイトカイニン処理や GLK1、GLK2、GNC や GNL の過剰発現体の影響を調べたところ、GLK1 や GLK2 の過剰発現では根でのプラストキノンプールの酸化還元状態は改善されなかったが、サイトカイニン処理や GNC、GNL の過剰発現で切除根と同様に切除していない根でもプラストキノンプールが酸化的に保たれることが明らかとなった。さらに、GLK1 の過剰発現株と GNC や GNL の過剰発現株を掛け合わせどちらも過剰発現となった株を作成したところ、根でのクロロフィル量が野生株の 20 倍にまで高まり、さらに根の光合成光収率も GLK1 単独の過剰発現株よりも高くなるという結果を得た。このことから、クロロフィル量の増加が主な作用の GLK と異なり、GNC や GNL は光合成活性を高く保ったままクロロフィル様を増加させることが明らかとなった。GLK が核にコードされたクロロフィル合成関連遺伝子や光捕集複合体の遺伝子を持定的に誘導するのに対し、GNC や GNL は核コードの光合成関連遺伝子だけでなく、葉緑体にコードされた光合成遺伝子の転写産物も増加させることから、それにより光量子収率を下げることなく葉緑体分化を根で誘導できると考えられる。



**図 3. 疑似カラーで示した根における光合成実効量子収率の変化。** "intact"は未切除の根、"detached"は地上部の切除処理をした根を示す。(Ohnishi et al., 2018 *Photosynthetica* 56: 1–12 を改変)

#### (4) 葉緑体形成の協調的な制御

葉緑体は核からの発達制御を受けるとともに、葉緑体自身の各発達プロセスによる制約を受ける。特に、色素や光合成タンパク質の合成や組み立ては、チラコイド膜の脂質二重層の構築と協調する必要があり、これらのプロセス間には密接な関係があるはずだが、詳細は不明であった。チラコイド膜の構築は葉緑体の発達を決定づけるイベントであることから、脂質二重層の形成の観点からチラコイド膜構築過程を詳細に解析することで、葉緑体発達プロセスがどのように進むのかを調べた。チラコイド膜脂質の約 50%をモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) が、約 30%をジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG) が占めている。MGDG の合成を人工マイクロ RNA で人為的に抑制した植物体では、黄化芽生えで発達する暗所特有の色素体であるエチオプラストが葉緑体へと発達する初期の過程は起こっていたが、その後成熟した葉緑体になる過程が強く抑制された(図 4)。そこでその阻害過程を調べた結果、葉緑体発達の最初の段階からクロロフィルの合成が強く阻害されていることが明らかとなった。また、MGDG 合成抑制株では、核および葉緑体にコードされた光合成関連遺伝子の転写産物が光照射直後は上昇するが、数時間後には増加が抑えられることも分かった。それにより、脂質と共にチラコイド膜を構成する光捕集アンテナタンパク質が蓄積せず、チラコイド膜の構築が起こらないことが明らかとなった。同様に、DGDG を合成する酵素遺伝子の変異体も解析したところ、この変異体ではエチオプラストの内部に形成された膜構造が光照射後にチラコイド膜へと変換する過程に異常が生じるが(図 4) その後ゆっくりと回復し、2 日後には野生株に近いレベルに発達することが分かった。この変異体でもクロロフィル合成が阻害され、光捕集アンテナタンパク質の蓄積も非常に遅くなっていた。MGDG 合成の阻害と DGDG 合成の阻害で葉緑体発達過程に大きな違いが出たのは、単独で脂質二重層を形成できない MGDG とそれができる DGDG の特性上の違いが表れていると考えられる。



**図 4. チラコイド膜脂質の合成低下による葉緑体の発達阻害。** 暗所で発達した色素体の一種(エチオプラスト)が光照射後に葉緑体へと発達する過程を示す。スケールバーは 1.0  $\mu\text{m}$ 。(Fujii et al., 2019 *Plant Cell Physiol.* in press を改変)

#### < 引用文献 >

Chiang Y-H, Zubo YO, Tapken W, Kim HJ, Lavanway AM, Howard L, Pilon M, Kieber JJ, Schaller GE (2012) Functional characterization of the GATA transcription factors GNC and CGA1 reveals their key role in chloroplast development, growth, and division in Arabidopsis. *Plant Physiol* 160: 332-348

Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, Hiratsu K, Kojima M, Arai T, Inoue Y, Seki M, Sakakibara H, Sugimoto K, et al (2011) The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis. *Curr Biol* 21: 508-514

Kobayashi K, Baba S, Obayashi T, Sato M, Toyooka K, Keränen M, Aro E-M, Fukaki H, Ohta H, Sugimoto K, et al (2012) Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 24: 1081-1095

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Fujii, S., Nagata, N., Masuda, T., Wada, H. and Kobayashi, K. (2019) Galactolipids are essential for internal membrane transformation during etioplast-to-chloroplast differentiation. *Plant Cell Physiol.* in press. DOI:10.1093/pcp/pcz041. 査読有
2. Fujii, S., Kobayashi, K., Nagata, N., Masuda, T., and Wada, H. (2018) Digalactosyldiacylglycerol is essential for organization of the membrane structure in etioplasts. *Plant Physiol.* 177:1487-1497. DOI: 10.1104/pp.18.00227. 査読有
3. Ohnishi, A., Wada, H. and Kobayashi, K. (2018) Improved photosynthesis in Arabidopsis roots by activation of GATA transcription factors. *Photosynthetica* 56: 1-12. DOI: 10.1007/s11099-018-0785-9. 査読有
4. Kobayashi, K., Endo, K. and Wada, H. (2017) Specific distribution of phosphatidylglycerol to photosystem complexes in the thylakoid membrane. *Front. Plant Sci.* 8: 1991. DOI: 10.3389/fpls.2017.01991. 査読有
5. Fujii, S., Kobayashi, K., Nagata, N., Masuda, T. and Wada, H. (2017) Monogalactosyldiacylglycerol facilitates synthesis of photoactive protochlorophyllide in etioplasts. *Plant Physiol.* 174: 2183-2198. DOI: 10.1104/pp.17.00304. 査読有
6. Kobayashi, K. and Iwase, A. (2017) Simultaneous but spatially different regulation of non-photosynthetic callus formation and photosynthetic root development after shoot removal. *Plant Signal. Behav.* 12: e1338999. doi: 10.1080/15592324.2017.1338999. 査読有
7. Kobayashi, K., Ohnishi, A., Sasaki, D., Fujii, S., Iwase, A., Sugimoto, K., Masuda, T. and Wada, H. (2017) Shoot removal induces chloroplast development in roots via cytokinin signaling. *Plant Physiol.* 173: 2340-2355. DOI: 10.1104/pp.16.01368. 査読有
8. Kobayashi, K., Endo, K. and Wada, H. (2016) Multiple impacts of loss of plastidic phosphatidylglycerol biosynthesis on photosynthesis during seedling growth of Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 7: 336. DOI: 10.3389/fpls.2016.00336. 査読有
9. Kobayashi, K. (2016) Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J. Plant Res.* 129: 565-580. DOI: 10.1007/s10265-016-0827-y. 査読有
10. Kobayashi, K., Fujii, S., Sato, M., Toyooka, K. and Wada, H. (2015) Specific role of phosphatidylglycerol and functional overlaps with other thylakoid lipids in Arabidopsis chloroplast biogenesis. *Plant Cell Rep.* 34: 631-642. DOI: 10.1007/s00299-014-1719-z. 査読有
11. Fujii, S., Kobayashi, K., Nakamura, Y. and Wada, H. (2014) Inducible knockdown of

MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE 1 reveals roles of galactolipids in organelle differentiation in Arabidopsis cotyledons. *Plant Physiol.* 166: 1436-1449. DOI: 10.1104/pp.114.250050. 査読有

12. Kobayashi, K., Masuda, T., Tajima, N., Wada, H. and Sato, N. (2014) Molecular phylogeny and intricate evolutionary history of the three Isofunctional enzymes involved in the oxidation of protoporphyrinogen IX. *Genome Biol. Evol.* 6: 2141-2155. DOI: 10.1093/gbe/evu170. 査読有
13. Kobayashi, K., Fujii, S., Sasaki, D., Baba, S., Ohta, H., Masuda, T. and Wada, H. (2014) Transcriptional regulation of thylakoid galactolipid biosynthesis coordinated with chlorophyll biosynthesis during the development of chloroplasts in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 5: 272. DOI: 10.3389/fpls.2014.00272. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

1. Fujii, S., Nagata, N., Masuda, T., Wada, H. and Kobayashi, K. Distinct and overlapped roles of MGDG and DGDG in etioplasts of dark-grown Arabidopsis. 23<sup>rd</sup> International Symposium on Plant Lipids, 2018
2. 大西亜衣、和田元、小林康一「根が光合成を行うとき、その制御は葉とどのように違うのか？」日本植物学会第81回大会、2017
3. Kobayashi, K., Endo, K., Fujii, S. and Wada, H. Specific roles and functional overlaps of thylakoid anionic lipids. 22<sup>nd</sup> International Symposium on Plant Lipids. 2016
4. Kobayashi, K., Ohnishi, A., Sasaki, D., Fujii, S., Iwase, A., Sugimoto, K., Masuda, T. and Wada, H. Regulation of chloroplast differentiation in Arabidopsis roots in response to shoot removal. CSHA Symposium, Latest Advances in Plant Development & Environmental Response. 2016
5. 小林康一、大西亜依、藤井祥、和田元 「シロイヌナズナの根でみる光と植物ホルモンによる光合成の制御」日本植物学会第79回大会、2015
6. Kobayashi, K., Masuda, T. and Wada, H. Regulation of chloroplast differentiation in Arabidopsis roots. Japanese-Finnish Seminar 2014, Sapporo, Japan.
7. Kobayashi, K., Fujii, S., Nakamura, Y., Masuda, T., Ohta, H. and Wada, H. Coordination of galactolipid synthesis with formation of photosynthetic complexes and organelle differentiation. 21th International Symposium on Plant Lipids, 2014

〔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

<https://sites.google.com/view/kobayashi-lab/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。