

平成 21 年 3 月 25 日現在

研究種目：特定領域研究  
研究期間：2004～2008  
課題番号：16085207  
研究課題名（和文）  
配偶子形成におけるプラスチドの役割と葉緑体への分化・維持に関する研究  
研究課題名（英文）  
Studies on chloroplast biogenesis and the role of plastids in male gametogenesis  
研究代表者  
坂本 亘（SAKAMOTO WATARU）  
岡山大学・資源生物科学研究所・教授  
研究者番号：20222002

## 研究成果の概要：

植物に固有の細胞内小器官(オルガネラ)であるプラスチドは、原核生物型の分裂様式により細胞内で増殖しながらダイナミックに形態や機能を変化させ、植物の器官形成・環境変動などに対応する。本研究では、①花粉(雄性配偶体)におけるプラスチドの役割と、②葉緑体におけるチラコイド分化、に関わる突然変異体の解析をモデル植物により進め、プラスチド機能に関わる未知の分子機構を明らかにする研究を行った。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度	16,600,000	0	16,600,000
2005 年度	16,700,000	0	16,700,000
2006 年度	16,600,000	0	16,600,000
2007 年度	12,500,000	0	12,500,000
2008 年度	12,500,000	0	12,500,000
総計	74,900,000	0	74,900,000

研究分野：植物分子生物学・遺伝学

科研費の分科・細目：(分科)基礎生物学 (細目)植物分子生物・生理学

キーワード：色素体機能・光合成、オルガネラ、植物分子機能、オルガネラ工学

## 1. 研究開始当初の背景

プラスチドは光合成細菌の細胞内共生に由来する植物独自のオルガネラであるが、陸上植物への進化に伴ってその機能を大きく変換し、光合成だけでなく、植物の環境適応機能にも大きな役割を果たすことが近年の研究により明らかにされつつある。プラスチドはその形態や機能により様々なタイプに分類され

る。例えば、葉においてプラスチドが光によりチラコイド膜を発達させて葉緑体へと分化することで、クロロフィルによる光エネルギーを吸収し光合成を行う。また、果実では葉緑体がカロテノイドを蓄積してクロモプラストとなりその他の二次代謝産物を蓄積する。これらの他にも、デンプンを蓄積するアミロプラストなど、様々なプラスチドタイプが主

に形態と機能に基づき分類されているが、これらのプラスチドタイプがどのように分化し、かつダイナミックな機能転換を担う分子機構には不明の点が多く、加えてそれらを明らかにする手法が限られていた。

植物の分裂細胞内にあるプラスチドの前駆体プロプラスチドは、光により分化して葉緑体を形成する。葉緑体が発達し光合成機能を獲得することは、植物の生長に必須であるだけでなく、地球温暖化の原因でもある二酸化炭素の吸収を植物が行うためにも重要な生物現象といえる。このように、プラスチドの分化、機能転換、それらの伝達機構を理解することは私たちの地球環境維持にも重要な知見を提供する。

## 2. 研究の目的

本研究では、プラスチドが分化して様々な機能を発揮するために必要な未知の分子メカニズムを明らかにするため、モデル植物を用いた分子遺伝学的研究を行った。すなわち、モデル植物としてゲノム解析などの遺伝情報が集積したシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を材料に、以下の2つの現象に関連する突然変異体を単離し、変異の原因となる遺伝子を同定し、原因遺伝子およびそれらがコードするタンパク質の機能解析を通してプラスチドの新たな機能を解明することとした。

### (1) 配偶子におけるプラスチドの役割に関する研究

プラスチドは細胞内共生に由来するためにゲノムDNAを持つが、それらは核ゲノムとは別の遺伝(片親遺伝)をすることが知られているが、それらに関連する生物学的意義は明らかではない。そこで本研究では、雄性配偶体である花粉におけるプラスチドに着目し、それ

らの動態を可視化して調べるとともに、新たな変異体(後述)の単離から現象の解明を試みた。

### (2) 葉緑体におけるチラコイド膜分化のシステム解明

チラコイド膜は葉緑体内に存在する独自の膜構造で、膜内に光受容に関与する光合成装置を合成して光エネルギーを化学エネルギーに転換する。チラコイド膜の発達は光に依存することが知られているが、分化をつかさどる分子の実体については不明の点が多い。本研究では、チラコイド膜分化の欠損として植物の葉に「斑入り」を起こす突然変異に着目し、葉緑体分化を制御する分子機構を明らかにする研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 花粉におけるプラスチド機能の解析

本研究ではまず、これまでに未知の部分が多い花粉のプラスチド機能を明らかにするために、以下の研究を行った。

#### ① 生細胞におけるプラスチドの可視化

花粉で発現するプロモーターの制御下でプラスチドに局在する蛍光タンパク質(GFP)を発現させ、成熟花粉で直接プラスチドを可視化するシステムを確立した。これらの方法を用いてプラスチドの形態に関わる変異体のスクリーニングを進めた。

#### ② プラスチドDNAの挙動に関する変異体の単離と解析

これまでに我々が確立した花粉の解析により、シロイヌナズナの花粉ではプラスチドとミトコンドリアのDNAが検出されないことがわかっている。花粉におけるこれらオルガネラDNAの挙動は、オルガネラの遺伝様式(父親から遺伝しないこと)とも関連するために興味深い現象である。このため、本研究ではプラスチドDNAの挙動が変化した突然変異体の

単離を進めた。すなわち、花粉の栄養細胞ではプラスチドDNAが分解されるとの仮定のもとに、プラスチドDNAが分解されない変異体をスクリーニングした。EMSにより変異処理を施したシロイヌナズナM1個体の種子を用い、これまでに確立した押しつぶし法により花粉をDAPI染色してDNAを検出し、プラスチドDNAの残存する変異体を選抜した。得られた変異体については、更なる遺伝解析により原因となる変異と遺伝子の同定を進めた。

## (2) チラコイド膜形成不全変異体の解析

### ①斑入り変異とその抑制変異の解析

これまでにシロイヌナズナの葉に斑入りを生じる変異体として *yellow variegated 2* (*var2*) を単離している。この変異体の原因遺伝子は葉緑体局在のメタロプロテアーゼ FtsH2 をコードすることが明らかになっており、FtsHは光合成タンパク質の品質管理とチラコイド膜の形成に重要な役割をすることが示唆されていた。本研究では、この斑入り変異体をさらにEMSで変異処理し、斑入りを抑制する変異体の単離を試みた。斑入り抑制変異は、葉に斑入りを積極的に起こす因子を同定できると考えられ、そのような因子を通してチラコイド膜の分化について新たな知見を得られると考えた。

### ②斑入り変異 *var2* の網羅的解析

上述した *var2* 変異における緑色セクター（正常な葉緑体を蓄積する）と白色セクター（異常なプラスチドを蓄積する）において何らかの物質蓄積に差があるかどうかを調べた。このため、本研究では遺伝子発現、タンパク質蓄積、その他の物質蓄積について様々な解析を行い、斑入り組織で差の見られる分子を特定した。

## 4. 研究成果

### (1) 花粉におけるプラスチド突然変異体の解析

葉緑体局在型 GFP を成熟花粉で発現させる融合遺伝子 *LAT52-PT-GFP* を導入した形質転換シロイヌナズナでは、花粉の栄養細胞で個々のプラスチドを観察することができ、プラスチドの形態・数・動きを直接観察することができた。この個体を用いて、プラスチドの分裂に関わる FtsZ1 タンパク質が花粉でも機能することを明らかにした。今後、プラスチド解析の有用なツールとなることが期待できる。

前述の押しつぶし法による花粉のスクリーニングにより、栄養細胞内にオルガネラDNAが残存する劣性の変異体を数系統得た。変異体は *dpd* (*defective in pollen organelle DNA degradation*) と名付けた。野生型ではオルガネラDNAは検出できないことから、*dpd* 変異体では花粉におけるDNA代謝に何らかの異常が生じていると考えられた。得られた系統のうち、*dpd1* 及び *dpd2* についてマップベースクローニング法により変異の入った遺伝子を同定した。

まず *dpd1* の原因遺伝子 *DPD1* は、原核生物型のエキソヌクレアーゼ様タンパク質をコードしており、他の系統もこの遺伝子に変異を生じていること、ゲノムDNAによる相補実験でオルガネラDNAの残存が消失することから、*DPD1* タンパク質がオルガネラDNAの分解を担うヌクレアーゼであることが示唆された。大腸菌で発現させた *DPD1* タンパク質がヌクレアーゼ活性を持つこと、*DPD1* タンパク質がシロイヌナズナ細胞で強制発現させると葉緑体とミトコンドリアの両方に局在することもわかり、これらの結果から、花粉では実際にオルガネラDNAが積極的に分解されていることが明らかとなった。得られた知見は非常に新奇性が高く、今までに知られていない現象を明らか

にした一方で、オルガネラDNAが分解される生物学的意義は明らかでなくこれらの解明が今後の展望として残された。

*dpd2*の原因遺伝子*DPD2*は、細胞内のヌクレオチド合成に関わる律速段階の酵素である ribonucleoside reductase (RNR) の大サブユニットをコードすることが明らかとなった。この遺伝子は葉の形態に異常を示す*CLS8*として英国のグループが報告している遺伝子と同一であった。我々の単離した*dpd2*も葉に斑入り及び形態異常を示すこと、*cls8*でも花粉オルガネラDNAの残存が観察されること、さらにRNRの他のサブユニットによる変異体でも花粉オルガネラDNAの残存が観察されることが明らかとなった。RNRの変異がなぜオルガネラDNAの分解を遅延させるかは不明であるが、細胞内のヌクレオチドレベルがこれらの現象に関わることが示唆された。DNA分解と合成の相互作用について今後更に解析する必要があると思われる。

## (2) チラコイド膜形成不全変異体の解析

斑入り変異*var2*の斑入りを抑制する変異体を多数得た中から、1系統に着目し解析を進めた(斑返り *fugaeril: fug1*)。この変異は劣性であり*var2*と共存した際に斑入りを抑制する。マップベースクローニング法により遺伝子を同定したところ、原因遺伝子である*FUG1*は、葉緑体のタンパク質翻訳開始に関わる因子IF2をコードしていることが明らかとなった。*fug1*ではIF2の機能低下により葉緑体タンパク質合成が遅延していた。*var2*はFtsHプロテアーゼの欠損によることから、葉緑体におけるタンパク質の合成と分解のバランスにより斑入りが生じると推察した。IF2以外に翻訳伸長に関わる因子EF-Gの欠損も*var2*の斑入りを回復するため、このバランスモデルは一般的であると考えた。

上記の研究に加え、本研究では、*var2*の斑入りセクターにおいて高レベルで蓄積する物質を探索し、緑色組織の葉緑体で高レベルの活性酸素が蓄積することを明らかにした。

FtsHは光化学系IIの修復サイクルに重要なプロテアーゼとして働き、その欠損が光合成活性に影響を及ぼす。電子伝達に異常が生じた結果、蓄積する還元力が活性酸素を生じると考えられた。活性酸素生成と連動して*var2*では活性酸素消去に関わる酵素群の遺伝子が上昇していることも明らかとなり、斑入り形成との関連性も示唆された。*var2*における活性酸素生成とそれらの生体内での働きについてはまだ解析途中であるが、近年、葉緑体におけるレドックスが抵抗性などの自然免疫や環境応答などのストレス応答に関与する可能性が示されつつあり、解析のモデルシステムとして有用であると考えられた。

## 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 12 件)

- ① Matsushima, R., Hamamura, Y., Higashiyama, T., Arimura, S., Sodmergen, Tsutsumi, N., and Sakamoto, W. (2008) Mitochondrial dynamics in plant male gametophyte visualized by fluorescent live imaging. *Plant Cell Physiol.*, 49: 1074-1083. 査読あり.
- ② Matsushima, R., Hu, Y., Toyoda, K., Sodmergen, and Sakamoto, W. (2008) The model plant *Medicago truncatula* exhibits biparental plastid inheritance. *Plant Cell Physiol.*, 49: 81-91. 査読あり.
- ③ Ostersetzer, O., Kato, Y., Adam, Z., and Sakamoto, W. (2007) Multiple intracellular locations of Lon protease in Arabidopsis: Evidence for the localization of AtLon4 to chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 48: 881-885. 査読あり.
- ④ Kato, Y., Miura, E., Matsushima, R., and Sakamoto, W. (2007) White leaf sectors in *yellow variegated 2* are

- formed by viable cells with undifferentiated plastids. *Plant Physiol.*, 144: 952-960. 査読あり.
- ⑤ Miura, E., Kato, Y., Matsushima, R., Albrecht, V., Laalami, S., and Sakamoto, W. (2007) The balance between protein synthesis and degradation in chloroplasts determines leaf variegation in *Arabidopsis yellow variegated* mutants. *Plant Cell*, 19: 1313-1328. 査読あり.
  - ⑥ Takanashi, H., Arimura, S., Sakamoto, W., and Tsutsumi, N. (2006) Differences in DNA amount in each mitochondrion in tobacco cultured cell and rice root. *Genes Genet. Syst.* 81: 215-218. 査読あり.
  - ⑦ Sakamoto, W. (2006) Protein degradation machineries in plastids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57: 599-621. 査読なし.
  - ⑧ Feng, X., Arimura, S., Hirano, H.Y., Sakamoto, W., and Tsutsumi, N. (2004) Isolation of mutants with aberrant mitochondrial morphology from *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet. Syst.*, 79: 301-305. 査読あり.
  - ⑨ Sakamoto, W., Miura, E., Kaji, Y., Okuno, T., Nishizono, M., Ogura, T. (2004) Allelic characterization of the leaf-variegated mutation *var2* identifies the conserved amino acid residues of FtsH important for ATP hydrolysis and proteolysis. *Plant Mol. Biol.*, 56: 705-716. 査読あり.

[学会発表] (計 30 件)

- ① 松島良・坂本亘：花粉における細胞質ゲノムの分解機構に関する研究・国立遺伝学研究所研究集会「高等植物の生殖過程を制御する因子と生殖機構」・三島・2008年11月5日.
- ② Sakamoto W. Functional analysis of chloroplast FtsHs involved in protein quality control. Gordon Research Conference on Mitochondria and Chloroplasts. Biddeford, Maine, USA, August 13, 2008
- ③ 加藤裕介・三浦栄子・坂本 亘：葉緑体 FtsH プロテアーゼによる D1 分解機構・日本植物生理学会第 49 回年会・札幌・2008 年 3 月 20 日.
- ④ Sakamoto W. The balance between protein synthesis and degradation as an important factor of chloroplast biogenesis: an overview of genetic

- studies in organelle FtsH metalloproteases. International Congress on Plant Mitochondrial Biology, ICPMB2007, Nara, Japan, June 26, 2007.
- ⑤ 三浦栄子・加藤裕介・松島良・坂本亘：シロイヌナズナ斑入り変異抑制におけるメカニズムの解明・日本植物生理学会第 48 回年会・松山・2007 年 3 月 27 日.
  - ⑥ 加藤裕介・三浦栄子・松島良・坂本亘：斑入り変異体 *var2* に生じる白色セクターは生細胞により構築される・日本植物生理学会第 48 回年会・松山・2007 年 3 月 27 日.
  - ⑦ Sakamoto W. Genetic dissection of leaf variegation: a study in the *Arabidopsis var2* mutant. The 53rd National Institute of Basic Biology Conference. Okazaki, Japan, July 17, 2006.
  - ⑧ 松島良・服部千恵子・蘇都莫日根・坂本 亘：モデル植物系を用いたオルガネラ DNA の母性遺伝に関する研究・日本植物生理学会第 47 回年会・つくば・2006 年 3 月 19 日.
  - ⑨ 三浦栄子・松島良・坂本亘：斑入り突然変異体 *var2* では高レベルの活性酸素が蓄積する・日本植物生理学会第 47 回年会・つくば・2006 年 3 月 19 日.
  - ⑩ 久保美和・松島良・服部千恵子・坂本亘：花粉におけるオルガネラ DNA 量の制御に異常を示す変異体の解析・日本植物生理学会第 47 回年会・つくば・2006 年 3 月 19 日.
  - ⑪ Sakamoto W. Chloroplast metalloproteases in *Arabidopsis* - an overview of genetic and biochemical studies. 15th Symposium of Malaysian Society of Molecular Biology and Biotechnology. Kuala Lumpur, Malaysia, April 5, 2005.
  - ⑫ Sakamoto W. FtsH metalloproteases VAR1 and VAR2 involved in the repair cycle of Photosystem. 13th International Congress of Photosynthesis. Montreal, Canada, August 30, 2004.

[図書] (計 3 件)

- ① Sakamoto, W., Miyagishima, S., and Jarvis, P. (2008) Chloroplast biogenesis: Plastid division, inheritance, regulation, protein import and proteome. *The Arabidopsis Book* (American Society of Plant Biologists), [/www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0110](http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0110), 1-30
- ② 坂本 亘 (2005) 葉緑体分化とタンパク質分解系-ATP 依存性プロテアーゼと葉緑体ダイナミクス。蛋白質核酸酵素増刊号, 二層膜オルガネラの遺伝学 (林純一・杉山

- 康雄・坂本亘・田中寛・正木春彦編，共立出版） 50（14）：1892-1895.
- ③ 坂本 亘（2005）葉緑体の膜プロテアーゼによるタンパク質の品質管理。生化学（日本生化学会） 77： 335-339.

〔その他〕

本研究の成果として発表した Miura et al. (2007) の論文は、アメリカ化学会の週刊誌「Chemical & Engineering News」において紹介された。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂本 亘 (SAKAMOTO WATARU)  
岡山大学・資源生物科学研究所・教授  
研究者番号：20222002

### (2) 研究分担者

松島 良 (MATUSHIMA RYO)  
岡山大学・資源生物科学研究所・助教  
研究者番号：80403476

富田 祐子(半場 祐子) (TOMITA YUKO)  
岡山大学・資源生物科学研究所・助手  
研究者番号：90314666

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

加藤 裕介 (KATO YUSUKE)  
岡山大学・資源生物科学研究所・技術職員  
研究者番号：10437569

三浦 栄子 (MIURA EIKO)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・博士後期課程3年  
研究者番号：なし

蘇都莫日根 (SODMERGEN)  
中国・北京大学・生命科学学院・教授  
研究者番号：なし