

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06287

研究課題名(和文)ゼニゴケのアクチン結合蛋白質ビリンの解析

研究課題名(英文)An actin-binding protein villin in *Marchantia polymorpha*

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ビリンは動植物に保存されたカルシウムイオン感受性アクチン結合蛋白質で、アクチン繊維の束化、切断、重合・脱重合など、多様なアクチン修飾活性を持つ。しかし、植物ビリンに関する研究は被子植物に限られており、特に、その多機能性に注目して植物細胞における役割を調べた例は無い。基部陸上植物の苔類であるゼニゴケにはビリン遺伝子が1つ存在し、その破壊株では、強光によって誘導される葉緑体の逃避反応の開始が遅くなった。また、葉状体が光に対して平坦に成長する異常が見られた。ゼニゴケビリンは、葉緑体近傍に局在して、その細胞内分布を制御するだけでなく、光に依存した器官の形態形成にも関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで被子植物でしか研究されていなかったアクチン結合蛋白質ビリンの苔類ゼニゴケにおける役割を解析し、被子植物で提唱してきた葉緑体の細胞内分布の制御、特に葉緑体のアンカー状態からの解除を誘導する可能性を確認し、ゼニゴケビリンが葉緑体近傍に局在することも明らかにした。さらに、遺伝子破壊株の葉状体の成長パターンに異常が認められたことから、光に依存した器官の形態形成という高次の現象において、植物ビリンが機能する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Villin is a calcium-sensitive actin-binding protein conserved in plants and animals, which possesses multiple actin-modifying activities to polymerize, depolymerize, sever, and bundle actin filaments. However, intracellular functions of plant villins have been studied only in angiosperms, and the roles of multiple activities have been scarcely understood.

We found that the liverwort *Marchantia polymorpha*, one of the basic land plants, harbors one villin gene. In the knocked-out plants, light-induced chloroplast avoidance response was significantly retarded. Unexpectedly, the thalli of the knocked-out plants exhibited more flattened growth to light.

*Marchantia polymorpha* villin is localized in the vicinity of chloroplasts to regulate their intracellular distribution patterns, and moreover, may also be involved in the photomorphogenic responses of organs.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：ビリン 葉緑体運動 ゼニゴケ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ピリンは小腸微絨毛において発見されたカルシウムイオン感受性のアクチン結合蛋白質で (Bretscher and Weber 1979、Matsudaira and Burgess 1979)、動植物に広く保存されている。アクチン繊維の束化、切断、キャッピング、重合・脱重合など、アクチン細胞骨格の構築変化に直接関わる多様な活性を持ち、それらがカルシウムイオン濃度、リン脂質結合、リン酸化などによって制御される (Khurana and George 2009、Huang et al. 2015)。動物では主に上皮系組織に発現し、細胞の遊走、成長因子に依存したシグナル伝達、アクチン細胞骨格の再編成による細胞の浸潤に関わることが示唆されている (Athman et al. 2005、Khurana and George 2009)。一方、植物では組織、器官を問わず普遍的に発現することから (Klahre et al. 2000)、基本的かつ重要な細胞機能の制御に関わると予想されている。シロイヌナズナの 5 つのピリン分子種 (AtVLN1-5) を中心に、多面的な解析が進められている (Huang et al. 2015)。

我々は、特定の環境条件下で葉緑体を特定の位置に保持することを介して光合成の最適化に寄与する葉緑体アンカーの仕組みを研究している (Takagi et al. 2009)。葉緑体が表層細胞質中でアクチン繊維によってアンカーされていること、カルシウムイオン濃度の上昇が、アクチン繊維の切断/脱重合と共に葉緑体のアンカー状態からの解除を誘導することなどを示し (Takamatsu and Takagi 2011、Sakai et al. 2015)、葉緑体脱アンカーが環境変化に応じた葉緑体の分布変化に不可欠の初期過程であることを提唱した (Sakai and Takagi 2017)。

環境変化に伴う細胞質カルシウムイオン濃度の上昇を受けてアクチン繊維の切断/脱重合をひき起こし、葉緑体脱アンカーを導く因子としてピリンに注目した。これまでに、ホウレンソウ 135-kDa ピリン様蛋白質、シロイヌナズナ AtVLN2 が葉緑体外包膜に局在し、葉緑体近傍のアクチン構築をカルシウムイオン依存的に不安定化して脱アンカーをもたらし、一方で、ホウレンソウ 120-kDa ピリン様蛋白質、シロイヌナズナ AtVLN4 がアクチン繊維束を安定化して葉緑体アンカーに寄与することを示唆する結果を得ている。

これまでの植物ピリンの機能解析は被子植物に限られ、それら以外の系統の植物における知見は無い。我々は京都大学・河内孝之教授グループとの共同研究により、基部陸上植物であるゼニゴケが単一のピリン様遺伝子を持つことを見出し、研究を開始した。ゼニゴケピリンが葉緑体の細胞内分布の制御に関与するか、また、植物アクチン細胞骨格の普遍的制御因子と考えられるピリンが、ゼニゴケの環境応答反応においてどのような役割を果たすのかについて検証する。

### 2. 研究の目的

ゼニゴケピリン遺伝子 (MpVLN1) の破壊株において、葉緑体の細胞内分布がどのような影響を受けるのかを明らかにする。MpVLN1 可視化株を作製し、細胞内局在を解析する。特に、葉緑体近傍にどのように局在するかを明らかにする。葉緑体の細胞内分布以外の現象について、遺伝子破壊の影響を解析する。植物ピリンの細胞内機能についての研究は、アクチン繊維の束化活性に注目したものがほとんどで、花粉管や根毛など、太いアクチン繊維束を持つ細胞に限られる。ピリンの多機能性に裏づけられた、環境変化のシグナルをアクチン細胞骨格に伝える局面での解析を行なう。

### 3. 研究の方法

#### (1) ゼニゴケピリン様遺伝子の同定、遺伝子破壊株、相補可視化株の作製

シロイヌナズナ AtVLN2 の遺伝子配列を元に、京都大学ゼニゴケ遺伝子データベースを用いて BLAST 解析を行ない、MpVLN1 を同定した。

Sugano et al. (2014) に従って、MpVLN1 のゲルゾリン 1 ドメインと推測される塩基配列内にガイド RNA を設計し、CRISPR/Cas9 法により遺伝子破壊株を作製した。

MpVLN1 の上流約 6 kbp の配列を自己プロモータとし、MpVLN1 コーディング配列、蛍光蛋白質 (tagRFP もしくは tdTomato) をつないだコンストラクトを遺伝子破壊株に導入、相補可視化株を作製した。

#### (2) 葉緑体光定位運動の解析

約 1 ヶ月育てた G1 世代の葉状体から無性芽 (G2 世代) を 3 日間連続白色光下で育てた。この際、無性芽は杯状体の下の方から選ぶとともに、極端に大きい、または小さい無性芽は避けた。その後、24 時間青色光下 (青色 LED MIL-B18、光源コントローラー MIL-C1000T、470 nm、約 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ ) で育てた。G2 葉状体をスライドガラスにマウントし、青色強光 (青色 LED ISL-150X150-HBB、CSS、470 nm、約 190  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ )、22°C で 0、30、60 分間処理した。観察には共焦点顕微鏡 (LSM710 ZEN、ZEISS) を用い、葉状体の先端から 2-3 列目の細胞を選択した。また、相補可視化株を用いて、蛍光シグナルの局在を共焦点顕微鏡により解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) ゼニゴケピリン様遺伝子の同定

シロイヌナズナ AtVLN2 の遺伝子配列を元に、京都大学ゼニゴケ遺伝子データベースを用い

てBLAST解析を行なったところ、6つのゲルゾリンドメイン、C末端のヘッドピースドメインを持つ典型的なピリン様遺伝子配列が1つ見つかり、MpVLN1と命名した。CRISPR-Cas9法によりジーンターゲットングを行ない、2系統のMpVLN1破壊株を得た。そのうち一方の破壊株に、自己プロモータによってMpVLN1と蛍光蛋白質との融合遺伝子を発現させた相補可視化株を作製した。

### (2) 葉緑体光定位運動の解析

野生株、遺伝子破壊株、相補可視化株において、青色強光によって誘導される葉緑体逃避反応を解析した。無性芽から連続白色光下で3日間育てた後、青色光(470 nm、約60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ )を24時間照射して集合反応を誘導した葉状体に、青色強光(約190  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ )を連続照射し、共焦点顕微鏡により観察した。逃避反応は葉緑体占有率(細胞上面に存在する葉緑体の面積の総和/細胞上面の面積)によって評価した。

全ての株において、青色強光照射開始時の葉緑体占有率は約65%で、有意差は無かった。野生株および相補可視化株では、青色強光照射30分で葉緑体占有率が約56%へ有意に減少したが、遺伝子破壊株では有意な変化は見られなかった。野生株および相補可視化株では、青色強光照射30分間以内に逃避反応が開始したが、遺伝子破壊株では開始しなかったと考えられる。遺伝子破壊株では、青色強光照射60分において葉緑体占有率が約57%へ有意に減少したことから、青色強光照射30-60分間に逃避反応が開始したと考えられる。以上より、MpVLN1は逃避反応の開始に寄与することが示唆された。

相補可視化株の葉状体において葉緑体集合反応を誘導した際、蛍光シグナルは葉緑体の周縁部に局在しており、特に葉緑体同士が隣接する細胞質部分に蓄積していたが、葉緑体が存在しない細胞質部分には検出されなかった。MpVLN1は集合反応時に葉緑体間に局在することが示唆された。

### (3) 葉状体の成長様式

野生株および相補可視化株の葉状体は光の入射方向に向かってV字型に成長したのに対して、遺伝子破壊株の葉状体は平坦に成長した。10日間育てた葉状体を横から撮影して測定した、培地表面に対する葉状体の角度は、野生株の約43°に対して、相補可視化株は約36°で有意差は無く、遺伝子破壊株では約24°と有意に低下していた。仮根を観察すると、野生株および相補可視化株の仮根は太く、多くが地上部(培地上)に存在して葉状体を支えていたのに対し、遺伝子破壊株の仮根は細く、多くが寒天培地中に存在していた。

相補可視化株の無性芽および葉状体を共焦点顕微鏡で観察すると、細胞膜を裏打ちするような蛍光シグナルが植物体全身で観察された。特に、無性芽では仮根原基で、葉状体では仮根の先端やカロール栓様の構造で強いシグナルが検出された。仮根では繊維状のシグナルも観察された。以上より、MpVLN1は仮根の先端成長を介して葉状体の成長様式の制御にも関与することが示唆された。

### <引用文献>

- Athman R, Fernandez M-I, Gounon P, Sansonetti P, Louvard D, Philpott D, Robine S (2005) *Shigella flexneri* infection is dependent on villin in the mouse intestine and in primary cultures of intestinal epithelial cells. *Cellular Microbiology* 7: 1109-1116.
- Bretscher A, Weber K (1979) Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus. *Proceedings of Natural Academy of Science USA* 76: 2321-2325.
- Huang S, Qu X, Zhang R (2015) Plant villins: versatile actin regulatory proteins. *Journal of Integrative Plant Biology* 57: 40-49.
- Khurana S, George SP (2009) Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: villin's perspective. *FEBS Letter* 582: 2128-2139.
- Klahre U, Friederich E, Kost B, Louvard D, Chua N-H. (2000) Villin-like actin-binding proteins are expressed ubiquitously in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122: 35-48.
- Matsudaira PT, Burgess DR (1979) Identification and organization of the components in the isolated microvillus cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* 83: 667-673.
- Sakai Y, Inoue S-I, Harada A, Shimazaki K-I, Takagi S (2015) Blue-light-induced rapid chloroplast de-anchoring in *Vallisneria* epidermal cells. *Journal of Integrative Plant Biology* 57: 40-49.
- Sakai Y, Takagi S (2017) Roles of actin cytoskeleton for regulation of chloroplast anchoring. *Plant Signaling & Behavior*, 12:10, e1370163.
- Sugano SS, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Shimada T, Hara-Nishimura I, Kohchi T (2014) CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant & Cell Physiology* 55: 475-481.
- Takagi S, Takamatsu H, Sakurai-Ozato N (2009) Chloroplast anchoring: its implications for the regulation of intracellular chloroplast distribution. *Journal of Experimental Botany* 60: 3301-3310.
- Takamatsu H, Takagi S (2011) Actin-dependent chloroplast anchoring is regulated by  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin in spinach mesophyll cells. *Plant & Cell Physiology* 52: 1973-1982.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 稲田 のりこ、岡田 松美、林 晃之、内山 聖一	4. 巻 56
2. 論文標題 細胞内の温度を可視化する 細胞内温度イメージングの実践	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植物の生長調節 (Regulation of Plant Growth & Development)	6. 最初と最後の頁 112-116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Sakamoto, Mayuko Sato, Yoshikatsu Sato, Akihito Harada, Takamasa Suzuki, Chieko Goto, Kentaro Tamura, Kiminori Toyooka, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Ohkawa, Ikuko Hara-Nishimura, Shingo Takagi, Sachihito Matsunaga	4. 巻 11
2. 論文標題 Subnuclear gene positioning through lamina association affects copper tolerance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5914 (1-12)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19621-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Md Sayeedul Islam, Toan Van Nguyen, Wataru Sakamoto, Shingo Takagi	4. 巻 62
2. 論文標題 Phototropin and photosynthesis dependent mitochondrial positioning in Arabidopsis thaliana mesophyll cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Integrative Plant Biology	6. 最初と最後の頁 1352-1371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jipb.12910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Akiko Harada, Yoshiji Okazaki, Toshinori Kinoshita, Reiko Nagai, Shingo Takagi	4. 巻 9
2. 論文標題 Role of proton motive force in photoinduction of cytoplasmic streaming in Vallisneria mesophyll cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 376 (1-16)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants9030376	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 稲田のりこ、林晃之、内山聖一
2. 発表標題 細胞内温度イメージングの植物細胞への適用を目指して
3. 学会等名 第31回日本バイオイメーjing学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高木慎吾
2. 発表標題 葉緑体の位置決定要因について
3. 学会等名 近畿植物学会第11回講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本勇貴、高木慎吾
2. 発表標題 核と葉緑体の接着に関わるタンパク質の探索
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土田康太、高木慎吾、坂本勇貴
2. 発表標題 暗黒下におけるオルガネラの動態解析に向けた実験系の開発
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加瀬佑介、山田祥大、國安恭平、林晃之、石田咲子、西浜竜一、河内孝之、高木慎吾
2. 発表標題 ゼニゴケの葉緑体逃避反応におけるピリンの役割
3. 学会等名 2022年 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田彩、坂本勇貴、檜垣匠、富永基樹、高木慎吾
2. 発表標題 異なる光条件で生育したシロイヌナズナにおける葉緑体光定位運動の解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加瀬佑介、山田祥大、國安恭平、林晃之、石田咲子、西浜竜一、河内孝之、高木慎吾
2. 発表標題 ゼニゴケにおけるアクチン結合タンパク質ピリンの役割
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田彩、高木慎吾
2. 発表標題 シロイヌナズナの陽葉型と陰葉型にみられる葉緑体光定位運動の相違II
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本勇貴、佐藤繭子、豊岡公德、佐藤良勝、高木慎吾、松永幸大
2. 発表標題 核ラミナタンパク質CRWNが環境応答遺伝子の発現を制御するメカニズムの解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋尾圭祐、増永花梨、飯田幹之、高木慎吾
2. 発表標題 アズキ上胚軸における回旋運動の光誘導：波長依存性と重力屈性の抑制
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧野 晃司、工藤 大彰、高橋 知愛、坂本 勇貴、石田 咲子、松田 頼子、西浜 竜一、河内 孝之、高木 慎吾
2. 発表標題 ゼニゴケの核形態制御における核ラミナタンパク質CRWNの役割
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chihoko Nomoto, Yuya Tosaka, Kosei Iwabuchi, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi, Shingo Takagi
2. 発表標題 A possible involvement of phytochrome in blue-light-regulated nuclear photorelocation in <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名 Marchantia Workshop 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Takino, Hiroaki Kudo, Chinaru Takahashi, Yuki Sakamoto, Sakiko Ishida, Yoriko Matsuda, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi, Shingo Takagi
2. 発表標題 Roles of nuclear lamina protein CRWN for the regulation of nuclear morphology in Marchantia polymorpha
3. 学会等名 Marchantia Workshop 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本勇貴、高木慎吾、松永幸大
2. 発表標題 植物核ラミナの構造と機能の解析
3. 学会等名 2019年度近畿植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大垣七海、増田彩、高木慎吾
2. 発表標題 観葉植物はなぜ室内環境で成長できるのか？
3. 学会等名 2019年度近畿植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧野晃司、工藤大彰、高橋知愛、坂本勇貴、石田咲子、松田頼子、西浜竜一、河内孝之、高木慎吾
2. 発表標題 陸上植物の核形態制御におけるゼニゴケCRWNの役割
3. 学会等名 2019年度近畿植物学会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 瀧野晃司、工藤大彰、高橋知愛、坂本勇貴、石田咲子、松田頼子、西浜竜一、河内孝之、十川太輔、大和勝幸、高木慎吾
2. 発表標題 ゼニゴケにおける植物核ラミナタンパク質CRWNの機能解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王穎祺、大西厚輝、Md. Sayeedul Islam、宮武ゆう子、段中瑞、富永基樹、高木慎吾
2. 発表標題 シロイヌナズナのミトコンドリアの運動におけるミオシンXI-Iの役割
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田彩、高木慎吾
2. 発表標題 シロイヌナズナの陽葉型葉と陰葉型葉における葉緑体運動のタイムラプス解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田悦雄、新免輝男、高木慎吾
2. 発表標題 PIP2を介してリポゾームに結合したピリンは、F-アクチンと相互作用することができる
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田彩、高木慎吾
2. 発表標題 シロイヌナズナの陽葉型と陰葉型にみられる葉緑体光定位運動の相違
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本勇貴、佐藤繭子、鈴木孝征、豊岡公德、高木慎吾、松永幸大
2. 発表標題 核ラミナタンパク質CRWNは銅輸送遺伝子座の核内配置を制御する
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島崇裕、甲斐卓、石田泰浩、横田悦雄、高木慎吾
2. 発表標題 シロイヌナズナの向背軸変異体における葉緑体暗黒定位の制御
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chihoko Nomoto, Yuya Tosaka, Kosei Iwabuchi, Shingo Takagi
2. 発表標題 A Possible Involvement of Phytochrome in Blue-Light-Induced Nuclear Photorelocation in <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	林 晃之  (Hayashi Teruyuki)  (90408716)	甲子園大学・栄養学部・准教授   (34505)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------