

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570032

研究課題名（和文）子葉と本葉において異なる葉緑体形成機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the different chloroplast biogenesis
in cotyledon and leaf

研究代表者

島田 裕士 (HIROSHI SHIMADA)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：80301175

研究成果の概要（和文）：

シロイヌナズナ子葉特異的葉緑体形成因子 CYO1 のホモログである緑色組織葉緑体形成因子 CYO2 がシロイヌナズナ At3g47650 である事を明確にした。*cyo2* 変異体は Pale-green の表現型を示し、光合成の光化学系 II の活性が著しく低下していた。また、多くの葉緑体構成遺伝子群の発現も低下していた。CYO1 は光照射下の子葉のみで発現しているが、CYO2 は光照射下の緑色組織のみでなく暗所生育下の子葉においても発現が観察され、エチオプラストの形成にも寄与している事が示唆された。酵素活性においても CYO1 と CYO2 では違いが観察され、発現部位と酵素活性の違いにより CYO1 と CYO2 は子葉と本葉における葉緑体形成機構の違いに寄与している事が示された。

研究成果の概要（英文）：

Arabidopsis chloroplast biogenesis factor CYO2/At3g47650 is a cotyledon-specific chloroplast biogenesis factor CYO1 homolog. The *cyo2* mutant showed pale-green leaves, and the maximum quantum yield of photosystem II in the mutant was much decreased. The expression of many photosynthetic genes was significantly decreased in the mutant. CYO1 expressed in only seedlings grown under light conditions, however, CYO2 expressed in not only all green tissues but also seedlings grown under dark conditions. It was also observed that the difference of characteristics of CYO1 and CYO2 reductase activity of protein disulfide isomerase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：色素体・葉緑体・エチオプラスト・光合成・シロイヌナズナ・Protein disulfide isomerase・子葉・本葉

1. 研究開始当初の背景

子葉と本葉は共にその細胞内に葉緑体を持ち光合成を行なう組織であるが、葉緑体の

形成機構はそれぞれの組織において異なっている。本葉においては、葉緑体は茎頂分裂組織でプロプラステッドから葉緑体への分

化が行なわれると同時に、既に出来上がっている葉緑体の分裂でその数を増やしている。一方、子葉においては胚発生において色素体の分化・発達が見られるが、その後種子の成熟と休眠によってその発達は停止する。その後給水と光照射によって、子葉内の色素体は葉緑体へと発達する。一般に子葉における葉緑体は本葉における葉緑体に比べてその発達が悪く、チラコイド膜の発達も悪い事が知られている。

葉緑体の Biogenesis に関する因子はこれまでに国内外で多くが単離・同定されてきたが、そのほとんどが本葉の葉緑体における因子であった。子葉と本葉における葉緑体の形成機構が異なる事はいくつかの子葉特異的アルビノ変異体の存在からも示唆されているが、子葉特異的葉緑体形成機構はほとんど解析されておらず、本葉と子葉における葉緑体形成機構の違いも未解明の部分が多く残されていた。

申請者は子葉特異的アルビノ（子葉以外は通常の緑色）変異体 *cyo1* をシロイヌナズナから単離・同定した(Shimada et al.2007, Plant Cell 19:3157-3169)。CYO1 ホモログは双子葉植物だけでなく、単子葉植物も含んだ多くの高等植物において保持されている。CYO1 タンパク質は葉緑体チラコイド膜の内蔵タンパク質であり、光化学系 I・II と相互作用している事がこれまでの研究から明らかになっている。また、CYO1 タンパク質は Protein disulfide isomerase(PDI)活性があり、光合成装置の構築に関与する分子シャペロンとして機能している事を示した。CYO1 は子葉特異的に発現しており、本葉ではその発現は確認されない事から、CYO1 は子葉特異的な葉緑体 Biogenesis に関与する重要な因子であり、本葉では CYO1 以外の PDI が葉緑体の Biogenesis に関与していると考えられる。この本葉で機能する CYO1 ホモログを同定し、CYO1 との違いを明らかにする事で、子葉と本葉における葉緑体形成機構の違いを明らかにする事が重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は大きく分けて次に挙げる二つの事を明らかにする事である。

I. 子葉における CYO1 に対応する、本葉で機能している PDI の単離・同定

CYO1 タンパク質のホモログのうち、プロテオーム解析によって明らかになっている葉緑体チラコイド膜局在のタンパク質を選別し、これらの破壊株の表現型解析を行ない、本葉で機能している因子の同定を行なう。

II. CYO1 と上記で取られた PDI の酵素学的・

組織化学的解析

CYO1 と新規本葉特異的 PDI の酵素としての特性（基質特異性・至適温度・至適 pH・Km 値等）を明らかにする。また、それぞれのタンパク質の組織化学的解析を行なう。これらの結果より、子葉と本葉における葉緑体の Biogenesis の違いを分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

シロイヌナズナ CYO1 は大腸菌の分子シャペロンであり PDI 活性のある DnaJ のシステインリッチ領域とよく似た配列を有している。DnaJ におけるこの領域は Zn1 と Zn2 という Zn-finger motif を 2 つ有するが、CYO1 はその内 Zn2 だけを有している。シロイヌナズナには多数の DnaJ ホモログがあるが、Zn2 だけを有する遺伝子は CYO1 1 つだけしか存在せずその他は全て Zn1 と Zn2 の 2 つを有する遺伝子である。このうち、プロテオーム解析によって CYO1 と同様に葉緑体のチラコイド膜に存在する事が知られている遺伝子は 11 である。これらのホモ破壊株から本葉が Pale-green になる株の単離を行い、本葉において機能するシロイヌナズナ CYO1 ホモログ(CYO2)の同定を行う。得られた CYO2 破壊株における各種葉緑体遺伝子の転写量・タンパク質量を解析し、葉緑体形成における CYO2 の機能を明らかにする。

次に、CYO2 タンパク質の組織化学的解析を行う。CYO1 タンパク質の発現はノーザンハイブリダイゼーションとウエスタンブロッティングで子葉特異的である事が既に示されている。CYO1 と CYO2 遺伝子の発現部位の違いを明らかにする事を目的に、CYO2 promoter-GUS の融合遺伝子導入シロイヌナズナを作成し、CYO2 遺伝子の発現組織を観察する。

また、CYO1 と CYO2 タンパク質の酵素学的違いを明らかにし 2 つのタンパク質の違いを明確にする。CYO1 タンパク質の大腸菌による発現系は既に確立しており、その条件を参考に新たに同定された CYO2 の大腸菌による発現を行なう。CYO1 タンパク質ではインシュリンの還元活性を指標に Protein disulfide isomerase (PDI)活性を示したが、同様の事を CYO2 についても解析し、それぞれのタンパク質における至適温度・至適 pH 等を解析する。

これらの事より、CYO1 と CYO2 の違いを明らかにして子葉と本葉における葉緑体形成機構の違いを明らかにする。

4. 研究成果

①本葉において機能するシロイヌナズナ

CY01 ホモログ(CY02)の同定

シロイヌナズナのゲノム情報とプロテオーム解析 (Jean-Benoit Peltier et al. 2004, J. Biol. Chem. 47: 49367-49383., Giulia Friso et al. 2004, Plant Cell 16: 478-499.) によるタンパク質の細胞内局在情報をもとに、シロイヌナズナ遺伝子群から CY01 ホモログ候補である 11 の遺伝子を抽出し、これらの遺伝子破壊株をストックセンターより入手した。11 の遺伝子のうち、At3g47650 の破壊株 FLAG_098H10 は緑色組織が Pale-green で矮化していた。FLAG_098H10 について、変異源である T-DNA に保有している Km 耐性と Pale-green の表現型における分離比解析を行った。その結果、FLAG_098H10 の Pale-green の表現型と T-DNA 挿入は強い相関を示した ($\chi^2=0.460$, $P>0.05$)。更に、Genomic PCR によって FLAG_098H10 の Pale-green 表現型が At3g47650 遺伝子のホモ破壊株による事も確認した。これらの結果より At3g47650 を CY02 と名付けて以下の解析を行った。

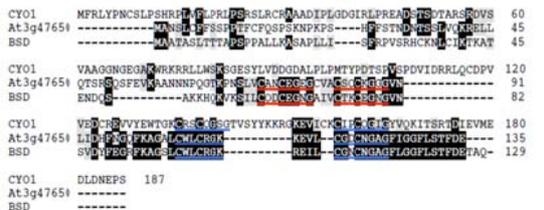
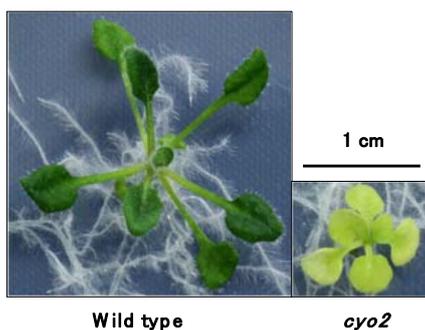


図1: CY01, CY02 (At3g47650), Maize BSD のアミノ酸配列。下線部は Zn finger ドメイン。CY01 は 1ヶ所のみ存在するが、CY02 は BSD や DnaJ と同じく 2ヶ所存在する。

Maize BSD…トウモロコシ Rubisco large subunit transcript (rbcl) の翻訳後調節に関わる因子として報告されているが、詳細は不明。

② *cyo2* の光合成活性測定

cyo2 ホモ個体は 1/2MS 寒天培地 (1.5% スクロース含) 上で生育可能であるが、野生株と比較して成長が極端に遅く、矮化していた。播種後 21 日目のクロロフィル含量は野生型が 16.65 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fresh weight に対して 11.30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ と約 2/3 程度であった。*cyo2* の表現型から光合成活性が阻害されていると推測され、PAM (Pulse Amplitude Modulation) 法を用いて光合成活性を測定した。



Wild type

cyo2

図2: 1/2MS 培地 (1.5%スクロース含) 上で 3 週間生育させた植物体

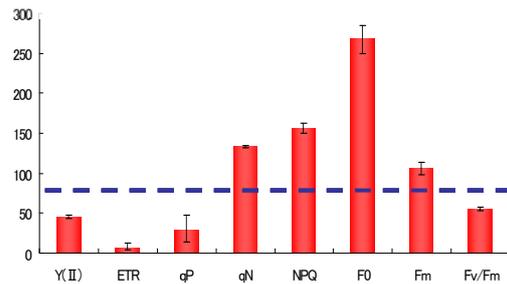
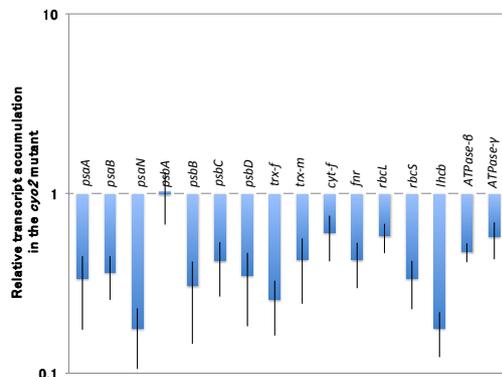


図3: 野生型に対する *cyo2* 変異体の各種光合成パラメータの総対比

これらの結果から、*cyo2* の葉緑体では光化学反応が減少し、熱放散が増大していることが示された。また、光化学系 II 反応中心の D2 タンパク質に結合している電子受容体 (Q_A) の酸化還元状態から、*cyo2* は光合成の電子伝達活性 (Y (II)), 光化学系 II の最大活性 (Fv/Fm) が低下していることも示された。

③ *cyo2* 変異体における葉緑体構成遺伝子群の発現解析

1/2MS 寒天培地 (1.5% スクロース含) 上で播種後 3 週間生育させた野生型と *cyo2* 変異体のロゼット葉における葉緑体構成遺伝子群の転写量を qPCR を用いて解析した。なお、全て平均 1 細胞における転写量比を示している (Shimada et al. Plant Methods 2010



6:1-9)。

図4: *cyo2* 変異体における葉緑体構成遺伝子群の転写量解析

これらの結果より、調べた葉緑体構成遺伝子は *psbA* を除いて全て *cyo2* 変異体では転写量が減少していることが示された。

次に、*cyo2* 変異体における葉緑体構成タンパク質の蓄積量を各種抗体を用いて解析した。なお、全て同細胞数 (1×10^6) におけるタンパク質量を示している (Shimada et al. Plant Methods 2010 6:1-9)。

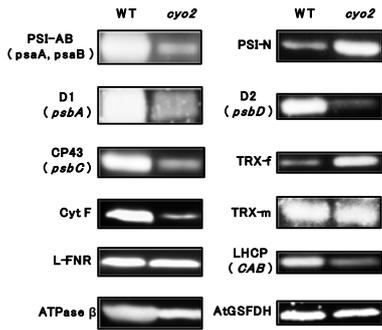


図 5: *cyo2* 変異体における葉緑体構成タンパク質群の蓄積量解析。AtGSFDH (シロイヌナズナグルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素) はコントロールとして使用。

これらの結果より、多くの葉緑体構成タンパク質量は *cyo2* 変異体において野生型に比べて減少していたが、PSI-N と TRX-*f* (チオレドキシシン *f*) は *cyo2* 変異体においてむしろ上昇していることが示された。

④CYO2 遺伝子の発現組織の解析

CYO1 タンパク質の発現はノーザンハイブリダイゼーションとウエスタンブロッティングで子葉特異的である事が既に示されている (Shimada et al. 2007, Plant Cell 19:3157-3169)。CYO1 と CYO2 遺伝子の発現部位の違いを明らかにする事を目的に、CYO2 promoter-GUS の融合遺伝子を野生型シロイヌナズナに導入し、CYO2 遺伝子の発現組織を GUS 染色により観察した。

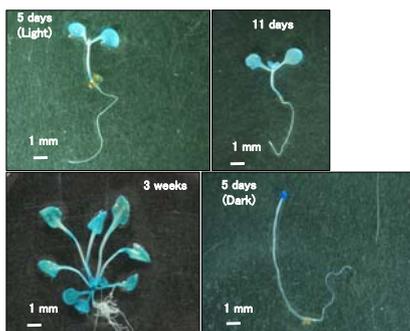


図 6: CYO2 promoter-GUS による CYO2 遺伝子の発現組織解析

連続光照射下で 5 日間、11 日間、3 週間生育させた CYO2 promoter-GUS 導入シロイヌナズナを GUS 染色し、CYO2 遺伝子の発現組織を観察した。その結果、CYO2 遺伝子は子葉を含む緑色組織全体で GUS による染色が観察された。興味深い事に、CYO2 遺伝子は暗所で 5 日間生育させた場合においても、子葉において GUS による染色が観察された。これは、暗所生育

子葉では CYO1 遺伝子の発現が観察されない事と異なり、CYO2 遺伝子は緑色組織における葉緑体形成因子であるだけでなく、暗所におけるエチオプラスト形成にも寄与している事を示唆している。

⑤CYO1 と CYO2 の酵素学的特徴の解析

CYO1 と CYO2 タンパク質の酵素学的違いを明らかにする事を目的に、インシュリンの還元活性を指標に CYO1 と CYO2 タンパク質の PDI 活性を測定した。用いたタンパク質はそれぞれ大腸菌で発現・精製したタンパク質である。

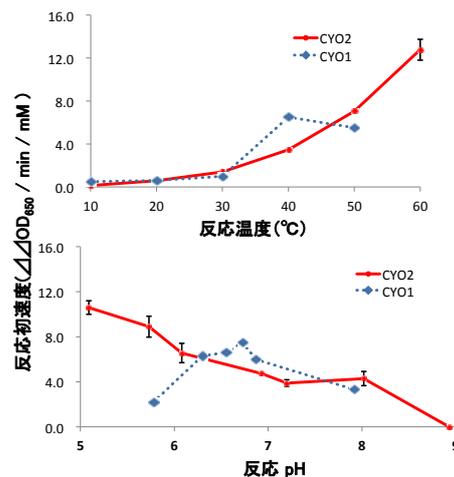


図 7: CYO1 と CYO2 のインシュリン還元活性の温度依存性と pH 依存性

CYO1 タンパク質の PDI 活性の至適温度・至適 pH はそれぞれ 40°C と pH6.7 であったのに対し、CYO2 タンパク質では明確な至適温度・至適 pH は示されず、温度上昇・pH の減少に伴って酵素活性の上昇が観察された。このことは、CYO1 と CYO2 の違いは発現組織の違いのみでなく、酵素活性の違いも有している事を示している。

植物において子葉と本葉は形態・性質が著しく異なる事が多く、光合成を行なう葉緑体についても二つの組織では多くの点で異なる事が古くから知られていた。しかし、葉緑体についての解析は今までは本葉の葉緑体についての研究がほとんどであり、子葉特異的な葉緑体の機能・Biogenesis は未解明のまま残されていたが、本研究遂行によって子葉と本葉における葉緑体形成機構の違いがはじめて明らかになった。今後はこの研究分野の更なる開拓・発展が期待される。また、発芽後本葉が発生するまでの実生の期間は植物にとって死亡率の高い時期として知られている。これは植物体が本葉発生に必要とされるエネルギーや代謝産物をまかなう為高い栄養要求性を示す為であり、子葉にお

るより早い葉緑体の形成とそれに伴う光合成の開始は植物個体の生存にとって決定的な時期である。子葉における葉緑体形成の機構の解明とその応用は、植物を育てる農業・林業分野において非常に重要であると考えられ、今後の更なる研究の発展が期待される。

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)

1. Shimada, H., Obayashi, T., Takahashi, N., Matusi M. and Sakamoto A. Normalization using ploidy and genomic DNA copy number allows absolute quantification of transcripts, proteins and metabolites in cells (2010) *Plant Methods* 6: 1-9. [査読有](#)
2. Watanabe, S., Nakagawa, A., Izumi, S., Shimada, H., and Sakamoto A. RNA interference-mediated suppression of xanthine dehydrogenase reveals the role of purine metabolism in drought tolerance in Arabidopsis (2010) *FEBS Lett.* 584: 1181-1186. [査読有](#)
3. Kusumi, K., Chono, Y., Shimada, H., Gotoh, E., Tsuyama, M. and Iba, K. Chloroplast biogenesis during the early stage of leaf development in rice (2010) *Plant Biotech.* 27: 85-90. [査読有](#)
4. Kusumi, L, Hirotsuka, S., Shimada, H., Chono, Y., and Iba, K. Contribution of chloroplast biogenesis to carbon-nitrogen balance during early leaf development in rice (2010) *J. Plant Res.* 123: 617-622. [査読有](#)

[学会発表] (計 10 件)

1. 島田裕士, 大林武, 高橋直紀, 松井南, 坂本敦 ゲノムコピー数と倍数性に基いた ABCD (Analysis Based on Copy number of genomic DNA)法による細胞 1 個当たりの mRNA 数, タンパク質数, 代謝産物数の絶対定量法の開発, 第 52 回日本植物生理学会年会, 2011 年 3 月 22 日, 東北大学
2. 室屋誠人, 伊東千賀子, 村中厚子, 水谷春香, 坂本敦, 島田裕士 緑色組織におけるシロイヌナズナ葉緑体形成因子 CYO2 の解析, 第 52 回日本植物生理学会年会, 2011 年 3 月 20 日, 東北大学
3. 渡邊俊介, 杉本高文, 前田智美, 島田裕士, 坂本敦 シロイヌナズナのストレス応答におけるプリン分解代謝の生理的役割, 第 52 回日本植物生理学会年会, 2011

年 3 月 20 日, 東北大学

4. Shimada, H., Obayash, T., Sakamoto, A. ABCD, Analysis Based on Copy number of genomic DNA, method reveals the number of transcripts, proteins and metabolites in a cell of Arabidopsis. 21st International conference on Arabidopsis research, 2010 年 6 月 7 日, パシフィコ横浜
5. Watanabe, S., Nakagawa, A., H. Shimada, H., Sakamoto A. Physiological contribution of purine metabolism in drought acclimatization of Arabidopsis. 21st International conference on Arabidopsis research, 2010 年 6 月 7 日, パシフィコ横浜
6. 島田裕士, 大林武, 坂本敦 細胞 1 個当たりの mRNA 数, タンパク質数, 代謝産物数の簡易同定方法の開発 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010 年 3 月 20 日, 熊本大学
7. 渡邊俊介, 中川彩美, 島田裕士, 坂本敦 シロイヌナズナの乾燥ストレス適応におけるプリン代謝の生理機能の解析 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010 年 3 月 20 日, 熊本大学
8. 村中厚子, 坂本敦, 島田裕士 シロイヌナズナ子葉特異的葉緑体形成因子 CYO1 の酵素学的解析 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010 年 3 月 19 日, 熊本大学
9. 渡邊俊介, 中川彩美, 島田裕士, 坂本敦 乾燥ストレス適応におけるシロイヌナズナ・キサントシン脱水素酵素の機能解析 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009 年 3 月 22 日, 名古屋大学
10. 西村崇, 宮木洋一, 高橋美佐, 森川弘道, 泉俊輔, 島田裕士, 坂本敦 シュウ酸酸化活性を有するツツジ GLP を過剰発現するタバコ培養細胞の重金属感受性 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009 年 3 月 22 日, 名古屋大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/mpb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 裕士 (HIROSHI SHIMADA)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：80301175

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：