

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：63904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870033

研究課題名（和文）植物の光環境適応による ATP 制御機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of ATP regulation mechanisms during photo-acclimation in plants

研究代表者

得津 隆太郎 (TOKUTSU RYUTARO)

基礎生物学研究所・環境光生物学研究部門・助教

研究者番号：60613940

研究成果の概要（和文）：

本研究では、植物が様々に変化する光環境下で行う『光環境適応機構』と、植物自身に必要な『生体内エネルギー(ATP)の生産制御』との関連性の解明を目的とした。ATP量変化を可視化する技術(ATeam蛍光プローブ)を応用することで、植物細胞中のATP量のリアルタイムイメージング技術確立し、光環境適応によるATP生産促進機構の解明を目指した。ATeamを緑藻クラミドモナスへの導入を試みたところ、細胞内でのATeam発現を有する変異体を獲得でき、細胞内で周辺環境の変化に伴うATeamの機能的なFRETが観察された。

研究成果の概要（英文）

In this study, I tried to investigate the ATP regulation mechanisms during photo-acclimation in the green photosynthetic alga *Chlamydomonas reinhardtii*. The protein ATeam, the molecular fluorescence probe for visualizing the ATP concentration in the living cell, was managed to install into the *C. reinhardtii*. Here, I finally succeeded to obtain the ATeam transgenic *C. reinhardtii*, and the cell showed functional FRET signals due to the modification of intracellular ATP concentration during environmental changes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：光合成、環境適応、エネルギー生産

1. 研究開始当初の背景

植物は、光を用いて光合成を行っているが自発的に動けないため、自然界では太陽光の強度や光質の変化に随時適応しなければならない。植物の葉緑体に存在するチラコイド膜中には、2つの光化学系(PS1、PS2)が存

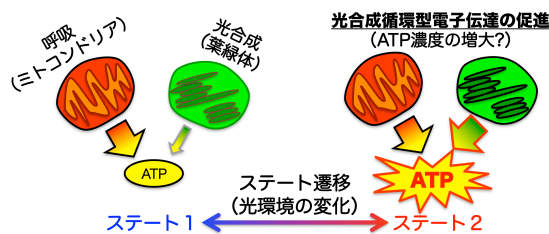
在するが、強光等でPS2が過剰に励起されると、活性酸素の発生を誘起して植物自身の損傷を招いてしまう。このようなストレスから身を守るため、植物はPS2に結合する集光アンテナタンパク質(LHC2)を利用し、ステート遷移と呼ばれる光環境適応を行う事が知

られている。

緑藻では、ステート遷移と光合成電子伝達経路の変化が深く関係しており、ステート2ではPS1が優先的に励起されることで、PS1を中心とした循環型電子伝達が駆動され、ATPが増産されると考えられている。しかし、光合成における循環型電子伝達の形成と、植物細胞内のATP濃度変化を直接的に観察した報告はなかった。

2. 研究の目的

自然界での光は、気象条件等に応じて刻々と強度・性質（波長）が変化するため、植物は様々な光環境に適応しなければならない。本研究では、植物が様々な光環境下で行う『光環境適応機構』と、植物自身に必要な『生体内エネルギー（ATP）の生産制御』との関連性の解明を目的とした。特に、『ステート遷移』と呼ばれる光環境適応機構は、光合成における循環型電子伝達の制御に深く関与しており、この機構の駆動によりATP生産が促進されると考えられている。しかし、実際にステート遷移中にATP量の変化を測定した報告は無く、その相関性は明らかではない。そこで本研究では、動物細胞中のATP量変化を可視化した技術を応用することで、植物細胞内におけるATPの濃度変化をリアルタイムで可視化することを目標とした。これにより、ステート遷移に伴う循環型電子伝達の促進による細胞内ATP濃度への影響の解明を試みた（仮説図参照）。



仮説図. ステート遷移による植物細胞内におけるATP制御メカニズム

3. 研究の方法

(1) ATPは、細胞内のあらゆる活動に必須の物質である。しかし、単一細胞内でATPが、どのように機能・制御されているのかを正確に解明した報告は殆どない。これは、一般的にATP量を確認する際、複数の細胞からの抽出産物の平均を見るため、単一細胞内での変化を見る事が出来ないためである。近年、単一のHela細胞内におけるATPの濃度変化を可視化する蛍光プローブ（ATeam）が開発された。本研究では、植物細胞でATeamを利用するため、ATeamコドン最適化と単細胞緑藻クラミドモナスへの導入を試みた。

(2) 植物の葉緑体には、外部から光エネルギーを受け取り、光合成を行うために必須であるクロロフィル色素が数多く存在している。このクロロフィルは、光を受け取った際に、それ自身で蛍光を発することが知られている（自家蛍光）。そのため、葉緑体内に外来遺伝子として蛍光タンパク質を発現させて顕微鏡観察を行う場合、目的の蛍光とクロロフィルからの自家蛍光を分離する必要がある。本研究では、動物細胞を用いた蛍光顕微鏡観察において確立されつつあるスペクトルアンミキシング法を利用し、クロロフィル自家蛍光の演算除去を試みた。

(3) 植物細胞を用いたステート遷移の研究では、通常、赤外光（720nm近傍）および青色光（470nm近傍）を照射し、それぞれステート1およびステート2を誘導する。しかし、本研究では、目的の蛍光プローブからの蛍光観察を行うため、外部からの光の影響を極力避ける必要がある。そこで、本研究では以前の研究で確立した生化学的解析手法を活かし、光を照射せずに薬剤を用いたステート遷移誘導を行った。この手法により、外部からの光の影響を排除し、光環境適応を誘導しながらATeam蛍光にリアルタイムイメージングを試みる。

4. 研究成果

(1) クラミドモナスでの外来遺伝子の発現は非常に困難であることが知られている。第1に、核遺伝子の相同組換え効率が著しく低いことが挙げられ、第2に、原因は解明されていないが、外来遺伝子の発現を抑制する要因が複数存在すると考えられている。

上記の問題を突破するために、まずATeam蛍光プローブのDNAをクラミドモナス用にコドン最適化を行った。さらに、先行研究にて作成された外来遺伝子を比較的効率良く発現できる変異クラミドモナスを用い、コドン最適化したATeamを形質転換した。結果として、ATeam（CFPおよびYFP蛍光）を効率良く発現している変異株は、おおよそ2万株に1-3個体程度の割合でしか得ることが出来なかった。しかし、この数個体のATeam導入株を得たことにより、顕微鏡によるクラミドモナスからの蛍光観察が可能となった（図1）。

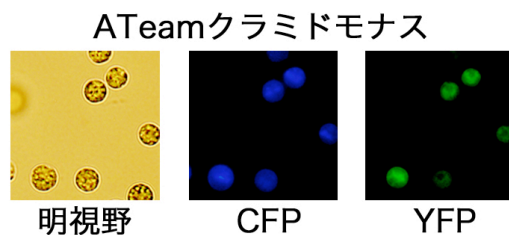


図1. ATeamクラミドモナスの蛍光観察

(2) クラミドモナスを含め、光合成生物の生細胞を蛍光観察する場合、クロロフィルからの自家蛍光が、目的の蛍光タンパク質を観察する際に影響を及ぼすため、自家蛍光の除去が必要になる。本研究では、スペクトルアンミキシングによるクロロフィル蛍光の除去を試みたが、蛍光タンパク質の励起光の照射により、クロロフィル蛍光自身の強度が変化してしまう（光合成をしてしまう）ため、アンミキシングは困難を極めた。

そこで、次なる対処法として全ての蛍光をプリズム分光し、必要な波長のみ検出器に露光する手法を用い、CFP、YFP、クロロフィルの分光を試みた。結果として、ほぼ完全にクロロフィル蛍光の影響を排除してCFPおよびYFPの蛍光観察が可能になった（図2）。

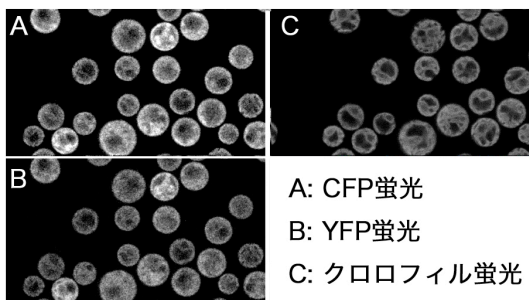


図2. プリズム分光による自家蛍光の分離

さらに、平面蛍光画像だけではなく、共焦点レーザー顕微鏡による立体蛍光画像の構築も試みた。ATeam 蛍光のブリーチングおよびクロロフィル蛍光の過剰励起に注意し、検出器を光子計測モードで観察を行った。結果として、露光時間を長くする必要が生じたものの、従来よりも高精度の立体蛍光画像構築に成功した（図3）。この手法を応用すれば、4次元（立体+時間）に蛍光タンパク質のリアルタイムイメージングが可能となる。

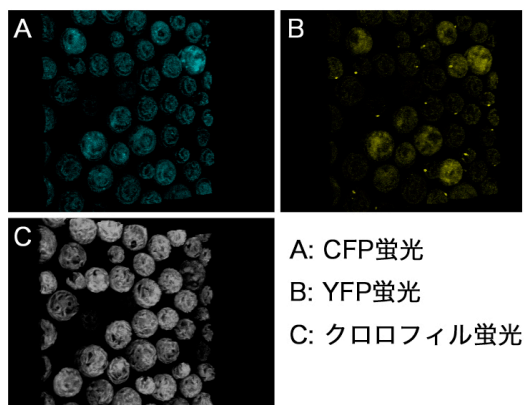


図3. ATeam クラミドモナスの立体蛍光画像の取得（蛍光局在の観察）

(3) ステート遷移に伴う ATP 量の変化を見積

もるため、上記(1)および(2)で確立した ATeam 導入株およびクロロフィル分離蛍光観察手法を利用し、生細胞リアルタイムイメージングを行った。

まず初めに蛍光観察中の外部光の影響を避けるために、薬剤によるステート遷移誘導を行った。しかし、使用した薬剤 (FCCP) はステート遷移を誘導するものの、葉緑体チラコイドを含め、ミトコンドリアなどのプロトンコンダクターであったため、ATP 合成酵素の活性を阻害し、ATP 量の変化を確認することが出来なかった。そこで、ステート遷移の誘導は、培養液中の好気・嫌気状態により制御できる点に注目し、蛍光観察中の試料のガス交換システムを構築した。窒素ガスの流入により観察試料中を嫌気状態にし、ATeam の蛍光色変化を観察したところ、好気条件時と比較して、YFP 蛍光の輝度の上昇が確認できた（図4）。

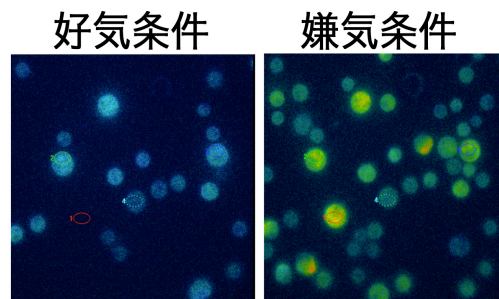


図4. 好気・嫌気条件における ATeam 蛍光色の変化。疑似色を用いて青・黄・赤の順番に ATP の量が多いように表示

この結果は、嫌気状態でミトコンドリアによる ATP 生産が阻害されるにも関わらず、細胞内の ATP 濃度が有意に上昇していることを示している。つまり、ステート遷移の誘導により ATP 生産が促進されることを直接的に捉えたと言える。しかし、蛍光の変化は非常に小さく、この変化がステート遷移のみに依存するものであるのか、他の細胞内現象により引き起こされているものであるのかを詳細に検討する必要がある。今後は、ステート遷移欠損株や、ミトコンドリア欠損株を利用し、同様の実験を行うことで、光環境適応による ATP 生産への評価を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

(1) *Allorent, G., *Tokutsu, R., Roach, T., Peers, G., Cardol, P., Girard-Bascou, J., Seigneurin-Berny, D., Petroustos, D., Kuntz, M., Breyton, C., Franck, F., Wollman, F. A., Niyogi, K. K., Krieger-Liszkay, A., Minagawa, J., and

Finazzi, G., A dual strategy to cope with high light in *Chlamydomonas reinhardtii*. **The Plant Cell** 25: pp. 545-557, 2013. *These authors equally contributed to this work. (査読有)

(2) Tokutsu, R., Kato, N., Bui, K. H., Ishikawa, T., and Minagawa, J., Revisiting the supramolecular organization of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. **J Biol Chem** 287: pp. 31574-31581, 2012. (査読有)

[学会発表] (計2件)

(1) 得津隆太郎、Guillaume Allorent、Giovanni Finazzi、皆川純、緑藻の複合的強光適応戦略、第54回日本植物生理学会、岡山大学、日本、2013年3月21-23日

(2) R. Tokutsu. and J. Minagawa., Formation of PSII-LHCII-LHCSR supercomplex under NPQ inducible conditions. 15th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*. Potsdam, Germany. 2012年6月5-10日

[その他]

ホームページ等

(1) 緑藻は二重の強光馴化により光合成器官をまもっている
<http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2013/03/15.html>

(2) 研究成果論文が科学誌に受理されました (2012-01)
<http://chlamynibb.blogspot.jp/2012/07/blog-post.html>

(3) 研究成果論文が科学誌に受理されました (2013-01)
http://chlamynibb.blogspot.jp/2013_02_01_archive.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

得津 隆太郎 (TOKUTSU RYUTARO)
基礎生物学研究所・環境光生物学研究部門・助教
研究者番号：60613940

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者