

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：12201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06666

研究課題名(和文)植物細胞内におけるレドックス状態変化の時空間ライブイメージング

研究課題名(英文)Spatio-temporal imaging of redox state in plant cell.

研究代表者

田中 裕之(Tanaka, Hiroyuki)

宇都宮大学・学内共同利用施設等・研究員

研究者番号：60782042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物における細胞内レドックス変化の時間的・空間的挙動を明らかにすることを目的として、ROS応答性蛍光プローブを用いた生細胞タイムラプスイメージング技術の開発に取り組んだ。研究の結果、植物細胞でのROS検出に最適な蛍光プローブと、蛍光検出条件を確立した。本条件を用いることで、培養条件の違いによって、ROS生成の空間的挙動の違いを見いだすことが可能になった。

研究成果の概要(英文)：In order to analyze the spatio-temporal patterns of cellular redox state in plant cell, I developed imaging technique using reactive oxygen species (ROS)- responsive fluorescence probes in planta. I founded useful ROS-responsive fluorescence probes and observation condition for ROS detection in plant cells.

研究分野：植物生理学

キーワード：活性酸素 ライヴセルイメージング 環境応答 植物

## 1. 研究開始当初の背景

自ら移動することができない植物は、強光、乾燥、温度変化、浸透圧などの環境ストレスに対応することで、植物にとって不都合な環境下でも生存しようとする。各環境ストレスは、それぞれ特有の影響を植物に与えるだけでなく、全てのストレスに共通して活性酸素種 (ROS) を過剰生させる。ROS は強い酸化力を持っており、タンパク質、脂質、核酸などを酸化することで、細胞機能障害や細胞死を引き起こす。一方、ROS の蓄積によって細胞内の酸化物質と還元物質のバランス (細胞内レドックス状態) が変化することがわかっており、この変化が遺伝子・タンパク質の発現や活性を制御することも明らかになってきた。したがって、ROS の増減による細胞内レドックス状態の制御は、植物の環境応答に必要な不可欠である。

ROS はエネルギー代謝の副産物として生成されるため、植物細胞の中では、葉緑体、ミトコンドリア、ペルオキシソームなどのオルガネラが主要な発生源として知られている (Shigeoka et al., 2002)。また環境条件によって ROS が生成されるオルガネラが異なることがわかっている。たとえば、光合成の場である葉緑体は、強光条件下において、他のオルガネラに比べて大量の ROS が生成される。ROS が生成されるオルガネラの違いによって、それぞれ異なる信号伝達を引き起こすことが、近年のオミクス解析によって示されつつある (Gadjev et al., 2006)。つまり、レドックス状態が変化した細胞内の場所が、信号伝達の違いを作り出しており、植物細胞内におけるレドックス状態の空間情報が、植物の環境ストレス応答・防御機構の解明に重要であると考えられる。しかしながら、植物の細胞内レドックス状態に関する先行研究の多くは、破壊組織からの抽出物を試料とする生化学 (in vitro) 解析が中心であり、生きた細胞内 (in vivo) の各オルガネラにおいて、いつ、どこで、レドックス状態が変化するか、といった情報に関しては、不明な点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物における細胞内レドックス状態の時空間変化を明らかにするため、ROS 応答性蛍光プローブを用いたライブイメージング解析を行う。具体的には、共焦点レーザー顕微鏡の上で環境ストレス条件を再現し、ROS 応答性の蛍光プローブによって可視化した ROS を経時観察することで、生成するタイミングとオルガネラ局在性を明らかにする。イメージングを用いた本研究の完成によって、植物の細胞内レドックス研究の新たな基盤技術となる。

## 3. 研究の方法

生細胞イメージングには、細胞が大きく観察が容易な特徴を持つ、モデル植物 苔類ゼニゴケを実験材料とした (図 1)。ゼニゴケ標準系統 Takaragaike-1 (Tak-1) の無性芽を Gamborg B5 培地で 2 日間培養し、実験に使用した。

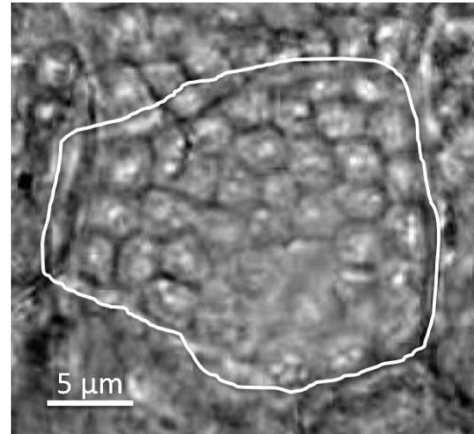


図 1. ゼニゴケ葉肉細胞

細胞観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica, SP-8) を使用した (図 2)。本顕微鏡は、微弱蛍光のライブセルイメージングに最適な超高感度検出器 HyD と、470~670 nm までの励起波長領域において、任意の波長で励起が可能となるホワイトライトレーザーを搭載している。



図 2. 共焦点レーザー顕微鏡 (Leica, SP-8)

## 4. 研究成果

これまでに、多種類の ROS 特異的なケミカルプローブが開発されている。それらは、励起波長・蛍光波長、光安定性などが異なっているが、主に動物細胞での利用を前提に作製されたものであり、自家蛍光の強い植物細胞での適正は不明である。特に、光合成生物である植物での利用においては、励起光照射により活性酸素の生成や葉緑体自家蛍光が刺激されることも考えられるため、それらを刺激しない波長で、蛍光観察することが理想である。そこで、植物細胞内での ROS 生成の観察に最適な波長を選定するために、ROS 応答性蛍光プローブ (H2DCF-DA、最大

Ex/Em=492/517)を処理したゼニゴケ細胞に、各波長のレーザーを照射した。3分毎に蛍光画像を撮影した(励起波長 490 nm、検出領域を 495~540 nm)。その時の ROS 応答性蛍光プローブのシグナルを数値化した。10種類の波長を検討した時の代表的な結果を図3に示した。500 nm以下の短波長の光を励起した時は、照射直後から蛍光シグナルの増加が認められた。以上の結果から、500 nm以上の波長を用いることで、励起光照射による ROS 生成を抑制できることがわかった。

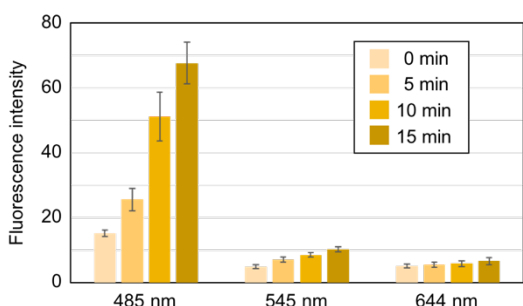


図3. 各波長の光照射による ROS 生成への影響

次に、葉緑体自家蛍光が検出される波長領域を検討した。ROS 応答性蛍光プローブを処理していないゼニゴケに、545 nmの励起光を照射し、550~700 nmの蛍光を観察した。その結果、600 nm以下を蛍光検出領域として設定することで、葉緑体自家蛍光を検出しないことがわかった。

そこで、500~600 nmの波長領域が細胞内レドックス状態のタイムラプスイメージングに有用であることを確認するために、最大 Ex/Em を 500~600 nm の波長領域内に有する ROS 応答性蛍光プローブをゼニゴケに処理し、励起波長 545 nm、検出領域を 550~600 nm として、蛍光画像の連続撮影(5秒/1枚)を行った。また、比較対象として、H2DCF-DA を処理したゼニゴケを励起波長 490nm、検出領域を 495~545 nm として連続撮影(5秒/1枚)した。その結果、H2DCF-DA を使用した場合、蛍光シグナルは経時的に増加し、3分後には飽和天に達した。一方で、最大 Ex/Em を 500~600 nm の波長領域内に有する ROS 応答性蛍光プローブを使用した場合、蛍光シグナルの増加はわずかであり、60分後においても顕著な差は認められなかった(図4)。以上の結果から、細胞内 ROS のタイムラプス観察には、最大 Ex/Em を 500~600 nm の波長領域内に有する ROS 応答性蛍光プローブの使用が最適であることがわかった。今後、本条件を用いてタイムラプス観察することで、植物細胞内におけるレドックス変化の時間的・空間的挙動を明らかにすることが可能になる。

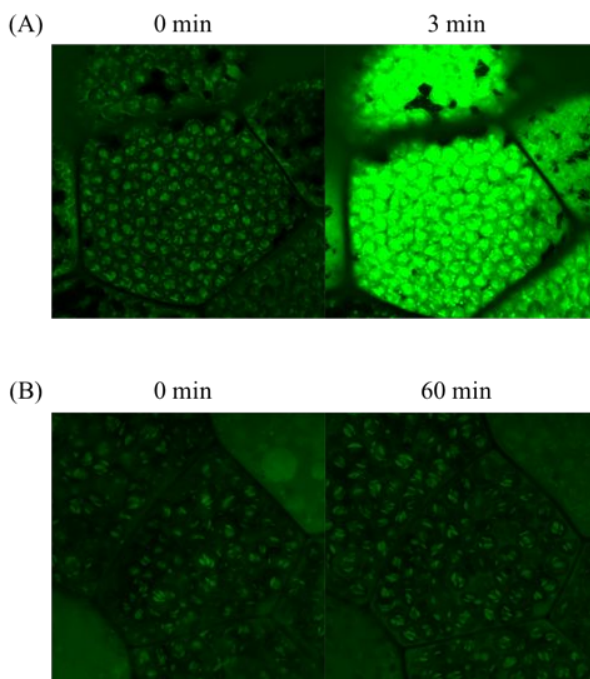


図4. ROS 応答性蛍光プローブを用いたタイムラプス観察 (A) H2DCF-DA (B) 最大 Ex/Em を 500~600 nm の波長領域内に有する ROS 応答性蛍光プローブ

#### 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 1 件)

- (1) Tanaka H, Sato M, Ogasawara Y, Hamashima N, Buchner O, Holzinger A, Toyooka K, Kodama Y. Chloroplast aggregation during the cold-positioning response in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. (2017) *Journal of Plant Research*, 130, 1061-1070. 査読有

[学会発表](計 2 件)

- (1) Tanaka H, Kodama Y. Aggregation of chloroplasts during the cold-positioning response in *Marchantia polymorpha* L. Gordon Research Conference: Chloroplast Biotechnology, Ventura, USA, January 8-13, 2017.
- (2) 田中裕之、佐藤繭子、小笠原有香、豊岡 公徳、児玉豊  
葉緑体寒冷定位運動における葉緑体凝集反応のイメージング解析  
第 58 回植物生理学会年会、鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市) 2017 年 3 月

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.sangaku.utsunomiya-u.ac.jp/de  
p-cdi/index-cdi.html](http://www.sangaku.utsunomiya-u.ac.jp/de<br/>p-cdi/index-cdi.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

田中 裕之 (TANAKA, Hiroyuki)  
宇都宮大学・地域共生研究開発センター・  
博士研究員  
研究者番号：60782042