

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06314

研究課題名(和文)非緑色プラスチド独自の形態維持機構：ストロミュール過剰形成変異体を用いた解析

研究課題名(英文) Morphology maintenance of non-green plastids: characterization of the stromule-overproducing Arabidopsis mutants

研究代表者

伊藤 竜一 (Itoh, Ryuichi)

琉球大学・理学部・准教授

研究者番号：50322681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物の非光合成プラスチドにおいてはストロミュールと呼ばれる細管状構造が高頻度で形成される。本研究では葉の敷石細胞においてストロミュールの形成が過剰なシロイヌナズナ変異体 suba1 の解析を通じてストロミュール形成機構の解明を試みた。suba1 の原因遺伝子 TGD5 (プラスチド包膜の脂質輸送因子をコード) の変異が、様々な非葉肉細胞のプラスチドでストロミュール過剰形成や内膜形成不全などの多面的な影響を及ぼすのに対し、葉肉葉緑体の形態・形成には僅かな影響しか与えないことが明らかとなった。この結果は、葉肉葉緑体と非葉肉プラスチドとで正常形態維持機構に根本的な差異があることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストロミュールは、古くは19世紀後半から文献記載(スケッチ)がありながら(Schimper (1883) 等)、未だその形成機構は解明されていない。suba1 変異体の原因遺伝子である TGD5 がコードするタンパク質は小胞体(ER) からプラスチドへの脂質輸送に関与していることから、非葉肉プラスチドではER-プラスチド間脂質輸送が正常形態維持に必須であること、葉肉細胞葉緑体と非葉肉プラスチドとでは、脂質合成経路の違いを反映して形態維持の仕組みも異なること、が示唆された。本研究成果は、140年来の謎であるストロミュール形成機構について「ERからの脂質輸送」という新たな角度から光を当てるものである。

研究成果の概要(英文)：Tubular structures called stromules are frequently formed in non-photosynthetic plastids of higher plants. In this study, we attempted to elucidate the mechanism of stromule formation by analyzing the Arabidopsis mutant suba1, which exhibits excessive stromule formation in pavement cells. The suba1 mutation in the causal gene TGD5 (encoding a lipid transport factor in the plastid envelope) was found to cause stromule formation in various non-mesophyll cells. Furthermore, it was found that while there are multifaceted effects, such as stromule hyperformation and poorer development of the internal membranous system in non-mesophyll tissues, there is only a slight effect on morphology and formation of mesophyll chloroplasts. These results suggest a fundamental difference in the mechanism of normal morphological maintenance between mesophyll chloroplasts and non-mesophyll plastids.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：プラスチド

1. 研究開始当初の背景

プラスチド(色素体)は植物特有のオルガネラであり、特に光合成機能を発達させた緑色のプラスチドは葉緑体と称される。高等植物においては、主要な光合成の場は葉の葉肉組織であり、葉肉細胞は1細胞あたりおよそ一定数の葉緑体を含んでいる。これらの葉緑体の形態は一様かつ単純な楕円球形であり、そのサイズはほぼ均一である。このような葉緑体形態の一様性・均一性は、葉緑体が既存の葉緑体の均等分裂によって増殖することに起因する。我々は、原核生物由来の葉緑体蛋白質 *MinE1* が葉緑体分裂の均等性を担う主因子であることを発見し、*MinE1* とそのパートナー蛋白質 *MinD1* が協働して葉緑体分裂位置を制御することを解明した。一方、高等植物のプラスチドは組織や環境に応じて可逆的に分化する性質(可塑性)を有しており、植物個体全体の機能を理解する上で、非緑色(非光合成)プラスチドの形成機構を解明することは不可欠である。非緑色プラスチドには、デンプンを蓄積するアミロプラスチド、色素を蓄積するクロモプラスチドなど、組織の役割に応じた様々な分化型が存在し、これらの分化型は全て、分裂組織に含まれる未分化なプロプラスチド(原色素体)から派生している。顕微鏡技術の進歩によって、これらの非緑色プラスチドは、葉緑体とは全く異なる複雑かつ多様な形態をとり、ダイナミックな変化を見せることが明らかにされてきた。非緑色プラスチドにおいて最も顕著な形態形質は、プラスチド本体から伸びる細管状構造「ストロミュール」の発達である。ストロミュールは、プラスチドの2枚の包膜で仕切られた構造であり、直径は0.3~0.8 μm 、長さは数 μm から最長220 μm に及ぶ。ストロミュールの形成を制御する分子機構は不明であるが、ストロミュールの形成頻度や伸長度は、細胞の分化状態や発生段階等に依存することが知られている。一般的傾向として、非緑色または未成熟・未分化のプラスチドでは発達したストロミュールが高頻度で見られるのに対し、葉肉細胞の成熟葉緑体では長いストロミュールは殆ど見られない。更に我々は、呼吸阻害剤アンチマイシンAが、根の皮層でプラスチドの異常伸長を誘起するという現象を発見した。この現象は、調べた範囲内では根においてのみ観察され、緑色組織では見られない。このような我々の発見を含めた過去の知見から、「非緑色プラスチドは、葉緑体とは別個の、独自の形態維持機構をもつ」という仮説が導かれる。我々は、シロイヌナズナの本葉表皮細胞のプラスチドを「非緑色プラスチドのモデル系」として活用し、上記仮説の検証に取り組んできた。その一環として、葉表皮プラスチドでストロミュールの形成・伸長が過剰な *suba* (*stromule biogenesis altered*) 変異体を2種取得し、その原因遺伝子を同定することにより、非緑色プラスチドの特徴であるストロミュール形成の機構を理解することを目指してきた。*suba1* 変異体の原因遺伝子は未確定であるが、候補遺伝子はいくつかに絞られており、いずれも、従来プラスチド形態との関連は想定されていなかったタンパク質をコードしていた。一方、*suba2* 変異体の原因遺伝子は、葉緑体分裂位置決定因子 *PARC6* をコードしていた。我々は、*minE1* 変異体の葉表皮でもストロミュール過剰伸長を確認していることから、葉緑体分裂位置決定因子のストロミュール形成制御への関与が強く示唆された。

2. 研究の目的

ストロミュールは1997年に「再発見」され、以後20年にも渡り多数の観察報告がなされてきた。しかし、ストロミュールの発生機構、非緑色細胞で顕著に伸びることの生理学的意義、等の基本的問題は全て未解明である。本研究は、かくある状況を打破すべく、*suba* 変異体の原因遺伝子の同定と機能追究により、ストロミュール形成制御因子についての決定的な情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *suba1* 変異体の原因遺伝子の特定

SSLP/dCAPSによるマッピングによって絞り込まれた複数の候補遺伝子に関して、既存変異体との交配(アレリズム・テスト)および遺伝子レスキュー実験を実施し、*suba1*の原因遺伝子を特定する。

(2) *suba1* および *suba2* 変異体の各組織・細胞におけるプラスチド形態の詳細な解析

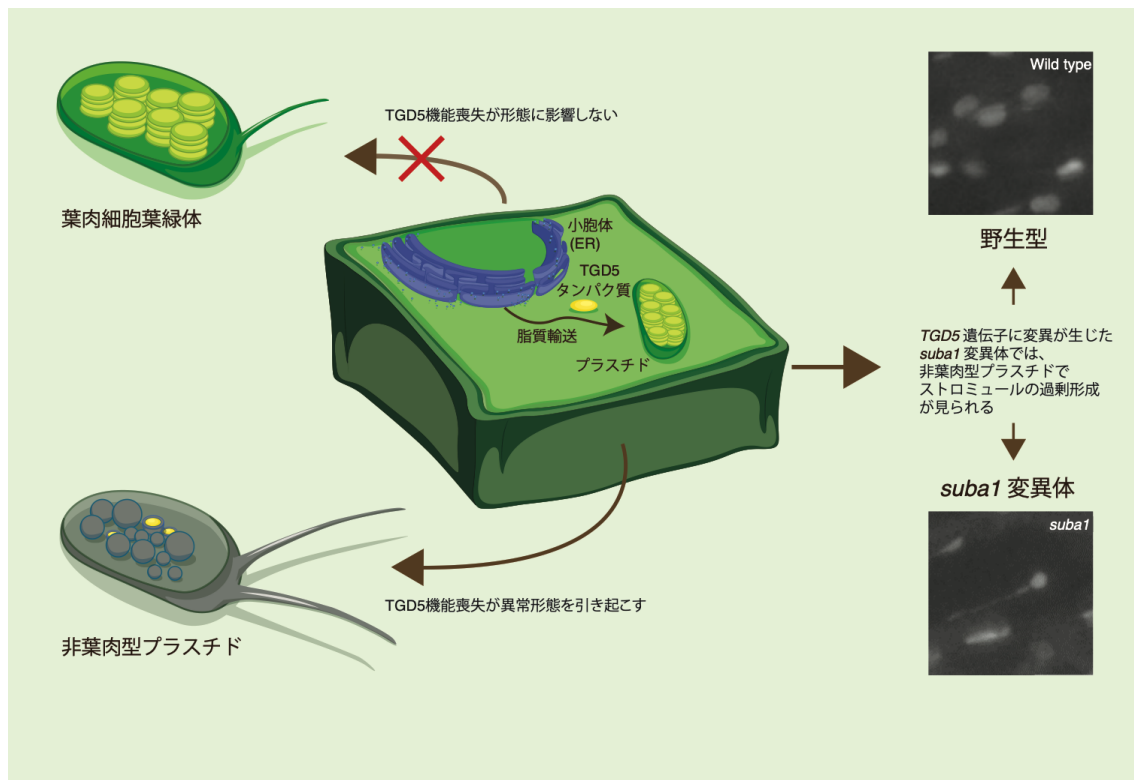
プラスチド(ストロマ)をGFPやCFPなどの蛍光タンパク質で標識した遺伝子組換えラインを用いることにより、様々な組織の生細胞におけるプラスチドの形態と挙動を観察する。また、透過型電子顕微鏡により、プラスチド微細構造(膜系の発達など)についての詳細なキャラクターゼーションをおこなう。

4. 研究成果

(1) *suba1* 変異体の原因遺伝子の特定

我々が行ってきた解析により、*suba1* 変異体の原因遺伝子の候補は第1染色体上のいくつかの遺伝子に絞られていた。各候補遺伝子の野生型アレルを*suba1* 変異体に導入し、この形質転換体で表現型が相補されているかを確認することにより、原因遺伝子を既知遺伝子 *TGD5* と特定するこ

とができた. *TGD5* 遺伝子が T-DNA で破壊された既存変異体 (*tgd5-3*) への蛍光タンパク質遺伝子導入によるプラスチド形態の観察, 同既存変異体との人工交配によるアレイズム・テストの結果は, どちらも上記の結論を支持するものであった. この変異は, 第2イントロンのスプライス部位保存配列 [G]T/AG 中の [G] が A に変わるという稀な変異であり, 遺伝子同定が難航した原因ともなっていた. RT-PCR などの方法により, 実際に mRNA からの第2イントロンの切り出しが起こっておらず, 仮に翻訳が正常に行われるとしても, 正常タンパク質よりも短縮したポリペプチドしか生成され得ないことを確かめることができた. *TGD5* 遺伝子がコードするタンパク質は, 小胞体 (ER) からプラスチドへの脂質輸送に関与していると考えられていることから, 非葉肉型プラスチドでは ER→プラスチド間脂質輸送が正常形態維持に必須であること, 光合成を盛んに行う葉肉細胞葉緑体と, 光合成が不活発な非葉肉型プラスチドとでは, 脂質合成経路の違いを反映してストロミュール形成の起こりやすさが異なること, が示唆された.



(2) *suba1* 変異体の各組織・細胞におけるプラスチド形態の詳細な解析

① *suba1* 変異体は葉緑体分裂変異体か?

これまでの我々および他グループの研究により, *suba2*(*parc6*) 変異体を含む葉緑体分裂変異体の多くがストロミュールを過剰形成することが示されてきた. 一方, *suba1* 変異体では, 一般的な葉緑体分裂変異体で見られるような葉肉葉緑体のサイズ増大, 数の減少, 複数の狭窄 (= 多分裂), 不均等分裂などは確認されていなかった. *suba1* 変異体の葉肉葉緑体分裂が正常に起こっているかを定量的に確認するため, 葉肉葉緑体のサイズ, 細胞あたりの個数, 細胞サイズと葉緑体の個数との相関について, 野生型と *suba1* 変異体とで比較した. その結果, 両者の間に統計的に有意な差は見られなかった. これにより, *suba1* 変異体は「様々な非葉肉型プラスチドにおいて形態異常を呈するにも関わらず, 葉肉葉緑体の形態・分裂増殖が正常」という, これまでに報告の無いユニークな表現型をもつ変異体であることを確認することができた.

② *suba1* 変異体のプラスチド形態の特徴と, その他の細胞表現型

suba1 変異体と既知の葉緑体分裂変異体との差異を探るため, 複数の葉緑体分裂変異体に CaMV35S プロモーターと接続したプラスチド移行型 GFP 遺伝子を導入し, 花弁, 萼片, 子葉, 本葉, 葉柄, 根, 孔辺細胞, 幼芽, 幼根の各組織 (細胞) で, 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いた比較観察を実施した. その結果, それぞれの変異体に固有の組織特異的表現型が確認された. 特筆すべき点として, *suba1* 変異体の孔辺細胞において, 葉緑体の分解 (クロロファジー) と推定される興味深い像が蛍光顕微鏡および TEM によって観察された. また, *suba1* 変異体においては, 敷石細胞やトライコーム細胞などで油滴状の球体が観察された. 野生型との比較から, この球体の出現が *suba1* 固有の表現型であることを確かめた. 系統的な組織染色実験により, この球体は *suba1* 特異的な中性脂質含有構造であることを突き止めた. *suba1* 表皮細胞の TEM 観察では, 油滴状の球体が液胞に取り込まれる様子 (ミクロオートファジー様の像) がしばしば観察

された。これらの結果は、ストロミュール形成とオートファジーとの間の関連を示唆するものである。

(3) *suba2*(*parc6*) 変異体の各組織・細胞におけるプラスチド形態の詳細な解析
suba2(*parc6*) 変異体の敷石細胞，トライコーム細胞，孔辺細胞の葉表皮細胞 3 種について，蛍光顕微鏡および透過型電子顕微鏡による詳細な観察をおこなった。敷石細胞においては，プラスチドのブドウ状クラスター（凝集）という新規表現型を見いだした。同様のクラスターはトライコーム細胞においても観察された。孔辺細胞においては，葉緑体の減少と巨大化，ストロミュールの過剰形成が見られたが，敷石細胞やトライコーム細胞で観察されたようなブドウ状クラスターは確認されなかった。この結果は，発生上の起源を一にするこれら 3 種の細胞内において，PARC6 がプラスチド形態形成に果たす役割に差異があることを示すものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujiwara Makoto T., Sanjaya Alvin, Itoh Ryuichi D.	4. 巻 10
2. 論文標題 Arabidopsis thaliana Leaf Epidermal Guard Cells: A Model for Studying Chloroplast Proliferation and Partitioning in Plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01403	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 Ishikawa Hiroki, Yasuzawa Mana, Koike Nana, Sanjaya Alvin, Moriyama Shota, Nishizawa Aya, Matsuoka Kanae, Sasaki Shun, Kazama Yusuke, Hayashi Yoriko, Abe Tomoko, Fujiwara Makoto T., Itoh Ryuichi D.	4. 巻 10
2. 論文標題 Arabidopsis PARC6 Is Critical for Plastid Morphogenesis in Pavement, Trichome, and Guard Cells in Leaf Epidermis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01665	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 Sanjaya Alvin, Muramatsu Ryohsuke, Sato Shiho, Suzuki Mao, Sasaki Shun, Ishikawa Hiroki, Fujii Yuki, Asano Makoto, Itoh Ryuichi D., Kanamaru Kengo, Ohbu Sumie, Abe Tomoko, Kazama Yusuke, Fujiwara Makoto T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Arabidopsis EGY1 Is Critical for Chloroplast Development in Leaf Epidermal Guard Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 1254 ~ 1254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10061254	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 Itoh Ryuichi D., Nakajima Kohdai P., Sasaki Shun, Ishikawa Hiroki, Kazama Yusuke, Abe Tomoko, Fujiwara Makoto T.	4. 巻 107
2. 論文標題 TGD5 is required for normal morphogenesis of non mesophyll plastids, but not mesophyll chloroplasts, in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 237 ~ 255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15287	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤竜一, 中島耕大, 名護しほ, 吉川忠希, 藤原誠
2. 発表標題 ストロミュールを過剰形成するシロイヌナズナ変異体suba1の単離と解析
3. 学会等名 日本植物形態学会第31回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 名護しほ, 森山彰太, 小池菜奈, 藤原誠, 伊藤竜一
2. 発表標題 シロイヌナズナ葉緑体分裂変異体における非光合成色素体および孔辺細胞葉緑体の形態
3. 学会等名 日本植物形態学会第31回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原誠, 安澤愛, 湖城恵, 丹羽康夫, 阿部知子, 吉田茂男, 中野雄司, 伊藤竜一
2. 発表標題 シロイヌナズナ葉緑体分裂異常変異体arc5とarc6の葉表皮色素体の形態解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎 梨菜, 名護 しほ, 窪園 雅人, 村松 亮輔, 伊藤 竜一, 藤原 誠
2. 発表標題 シロイヌナズナの気孔形成過程における葉緑体の増殖・分配解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 篠原 万由子, 宮崎 梨菜, Sanjaya Alvin, 村松 亮輔, 安澤 愛, 名護 しほ, 伊藤 竜一, 藤原 誠
2. 発表標題 シロイヌナズナの葉緑体分裂位置異常変異体における孔辺細胞葉緑体の表現型解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022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
研究協力者	藤原 誠 (Fujiwara Makoto)		

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
---------	---------