

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570037

研究課題名（和文）植物ビリリンに依存した葉緑体の細胞内位置決定機構

研究課題名（英文）Intracellular positioning mechanism of chloroplasts mediated by plant villin

研究代表者

高木 慎吾（TAKAGI SHINGO）

大阪大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10192626

研究成果の概要（和文）：葉緑体は光合成を営むオルガネラであり、環境の変化に応じて細胞内での分布パターンを変えることにより、常に最適の光合成速度を保つ。葉緑体の分布パターンの変化は、脱アンカー、移動、再アンカーを経て実現する。環境変化に対する初期応答である葉緑体の脱アンカーが、カルシウム-カルモデュリン制御を受けるアクチン細胞骨格の再編制によって引き起こされることを明らかにし、その仕組みにアクチン結合蛋白質ビリリンが関与する可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Advantageous distribution pattern of photosynthesizing organelle chloroplasts is crucial to maintain optimal photosynthesis under different environmental conditions. Redistribution of chloroplasts induced by environmental fluctuations entails de-anchoring, relocation movement, and re-anchoring of chloroplasts. In this study, we revealed that de-anchoring of chloroplasts, the initial step of their redistribution, is brought about through reorganization of actin cytoskeleton under the control of calcium-calmodulin. We further raised a possibility that an actin-binding protein villin is involved in the mechanism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：環境応答、葉緑体

1. 研究開始当初の背景

光合成を営むオルガネラである葉緑体は、環境条件の変化に応じて細胞内での分布パターンを変えることにより、個葉および植物体レベルでの光合成の最適化に寄与している。例えば、葉緑体は細胞同士が隣り合う場所の細胞壁ではなく、細胞間隙に接した細胞壁に沿うことにより、光合成の基質である

CO₂を効率的に吸収する。また、葉緑体は弱光下では光の入射方向に対して直角な細胞壁に沿うことによって受光量を増やして光合成速度を上げ、強光下では光の入射方向と平行な細胞壁に沿うことによって受光量を減らして光傷害を回避する。

我々は、葉緑体が表層細胞質において積極的にアンカーされることによって特定の分

布パターンが保たれること、分布パターンの変化は葉緑体の脱アンカー、移動、再アンカーを経て実現することを提唱してきた。葉緑体アンカー機構の実体についての知見はほとんど無いが、多くの植物において、葉緑体がアクチン繊維と密接に相互作用していること、葉緑体の分布変化に伴ってアクチンの細胞内構築が変化することが報告されている。また、葉緑体の分布変化の制御に Ca^{2+} が関与することが生理学的な実験より示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は、葉緑体アンカーに対するアクチン細胞骨格の関与の直接的検証、その制御様式の解析、制御機構に關するアクチン結合蛋白質の特定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L. cv. Torai)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* エコタイプ Columbia) の野生株およびピリン遺伝子破壊株を明暗周期で栽培し、緑葉を以下の実験に用いた。

(2) 間接蛍光抗体法

さまざまな条件下に置いた葉切片を液体プロパン中で急速凍結後、パラホルムアルデヒド固定、酵素処理、抗体処理を行なった。一次抗体として、アクチン抗体、カルモデュリン抗体、チューブリン抗体、二種類のテッポウユリピリン抗体を用いた。細胞膜ゴーストはホルムアルデヒド固定後、抗体処理を行なった。観察は、共焦点レーザー顕微鏡、蛍光顕微鏡により行なった。

(3) 細胞膜ゴーストの調製

葉から酵素処理によって葉肉細胞プロトプラストを単離し、ポリリジンコートしたカバースリップに貼り付けた後、ナイロンメッシュによって破裂させ、バッファで洗浄した。この操作により、細胞膜直下の表層細胞質を露出した細胞膜ゴーストを調製することができる。葉緑体アンカーの指標として、各細胞膜ゴーストの光学画像より、細胞膜の面積に占める葉緑体の総面積の比を算出した。

(4) DNase I アフィニティクロマトグラフィ

葉を Ca^{2+} 存在下で破碎した後、破碎液を DNase I アフィニティカラムにかけ、 Ca^{2+} を含むバッファ、EGTA を含むバッファ、ホルムアミドを含むバッファで順に溶出をかけた。各溶出画分を電気泳動し、テッポウユリピリン抗体による免疫プロットングを行なった。

(5) 質量分析

DNase I アフィニティクロマトグラフィの EGTA 溶出画分のポリペプチドをゲルから切り出し、液体クロマトグラフィタンデム質量分析を行なった。

4. 研究成果

(1) 青色強光は Ca^{2+} -カルモデュリンを介してアクチン細胞骨格再編成を誘導する

弱光下に置いたホウレンソウ葉肉細胞では、葉緑体を取り囲むような網目状のアクチン構築が観察された。青色強光もしくは二価カチオノフォア存在下に高濃度の Ca^{2+} 溶液で処理すると、網目状のアクチン構築は消失し、太い直線的なアクチン束が顕著となった。青色強光および Ca^{2+} 処理の効果はカルモデュリン拮抗剤によって抑制された。カルモデュリン拮抗剤は、青色強光によって誘導される葉緑体の分布変化も抑制した。以上より、青色強光が Ca^{2+} 動員をひき起こし、カルモデュリンを介して葉緑体近傍のアクチン細胞骨格の再編成を誘導することが示唆された。

(2) 葉緑体アンカーはアクチン依存で Ca^{2+} -カルモデュリンの制御を受ける

弱光下に置いたホウレンソウ葉から葉肉細胞細胞膜ゴーストを調製したところ、多数の葉緑体が付着していた。葉緑体の周囲には間接蛍光抗体法によるアクチンのシグナルが濃縮していた。アクチン脱重合剤もしくは $1 \mu\text{M}$ 以上の Ca^{2+} 存在下で細胞膜ゴーストを調製すると、細胞膜ゴーストから葉緑体が脱落し、アクチンシグナルは減少した。 Ca^{2+} 処理の効果はカルモデュリン拮抗剤によって抑制された。一方、微小管破壊剤存在下で細胞膜ゴーストを調製しても葉緑体の脱落は誘導されなかった。

間接蛍光抗体法によるカルモデュリンシグナルは細胞膜ゴーストの葉緑体上に局在し、高濃度の抗体によってカルモデュリンを除いた後に Ca^{2+} 処理を行なっても、葉緑体の脱落およびアクチンシグナルの減少は誘導されなかった。以上より、表層細胞質における葉緑体アンカーがアクチンに依存し、 Ca^{2+} -カルモデュリンの制御を受けることが強く示唆された。環境刺激によって誘導される葉緑体の分布変化に Ca^{2+} -カルモデュリンが関与する可能性は示唆されていたが、その標的がアクチン細胞骨格の再編成を介した葉緑体の脱アンカーであることを明確に示したのは初めてである。

(3) ホウレンソウには二種類のピリン様蛋白質が存在する

Ca^{2+} -カルモデュリンの制御を受ける葉緑体アンカー機構に Ca^{2+} 感受性アクチン結合蛋白質であるピリンが関与すると想定し、検証

を進めた。ピリンは小腸微絨毛で発見されたアクチン結合蛋白質で、低 Ca^{2+} 条件下ではアクチン繊維束化活性を、高 Ca^{2+} 条件下ではアクチン繊維切断・脱重合活性を示す。テッポウユリ花粉管で同定された二種類のピリン P-115-ABP、P-135-ABP に対する各々の抗体の存在下で細胞膜ゴーストを調製すると、葉緑体の脱落およびアクチンシグナルの減少が誘導された。

そこで、G-アクチン結合蛋白質の単離に使用される DNase I アフィニティクロマトグラフィにより、ホウレンソウ葉破碎液を分画した。EGTA によって溶出される画分に、P-115-ABP 抗体によって認識される 120 kDa のポリペプチド、P-135-ABP 抗体によって認識される 135 kDa のポリペプチドが検出された。従って、両ポリペプチドは Ca^{2+} に依存した G-アクチン結合能を持つと考えられる。これらのポリペプチドを切り出して液体クロマトグラフィタンデム質量分析を行なったところ、120-kDa ポリペプチドはシロイヌナズナのグループ III に属するピリン AtVNL4 と、135-kDa ポリペプチドはグループ II に属する AtVNL2、3 と、各々高いスコアを示した。以上に基き、これらのポリペプチドはホウレンソウのピリンであると結論した。

テッポウユリピリンに対する抗体を一次抗体として間接蛍光抗体法を行なったところ、120-kDa 蛋白質のシグナルは細胞質中にランダムに分布するドット状の局在を示し、135-kDa 蛋白質のシグナルは葉緑体の周囲に濃縮していた。そこで単離葉緑体について間接蛍光抗体法を行なったところ、葉緑体外包膜上に 135-kDa 蛋白質のシグナルのみが検出された。以上より、ホウレンソウ葉肉細胞中に、局在の異なる複数種類のピリンが存在することが示唆された。植物ピリンについては、組換え蛋白質を用いて主に生化学的な解析がなされてきたが、同一細胞中に異なるグループに属する分子種が存在する報告や、それらが環境刺激によって引き起こされる細胞レベルでの応答に関与するという報告は全く無く、きわめて独創的な成果である。

(4) シロイヌナズナピリンは葉緑体アンカーに關与する

シロイヌナズナ葉肉細胞から調製した細胞膜ゴーストにおいて、アクチン脱重合剤もしくは $1 \mu M$ の Ca^{2+} 処理によって葉緑体の脱落が誘導されること、これらの効果が細胞膜ゴーストをアクチン繊維安定化剤で前処理しておくことによって抑制されることを示した。シロイヌナズナにおいても、葉緑体アンカーがアクチン依存で Ca^{2+} 制御を受けることが示唆された。

DNase I アフィニティクロマトグラフィおよび質量分析により、葉に特定のピリン分子

種が発現していることを確認した。各遺伝子破壊株を入手して細胞膜ゴーストアッセイを行ない、特異的な過程が異常になっていることを示唆する結果を得た。現在、各ピリン遺伝子をクローニングし、蛍光蛋白質との融合蛋白質として各遺伝子破壊株に発現させた形質転換株を作製中である。今後、各ピリン分子種の局在、葉緑体アンカー機構において果たす役割の解明に取り組む。

(一部の未発表データでは遺伝子名を明記していない)

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 9 件)

Takamatsu H., Takagi S., Actin-dependent chloroplast anchoring is regulated by Ca^{2+} -calmodulin in spinach mesophyll cells. *Plant and Cell Physiology* 52: 1973-1982. (2011) 査読有

Takagi S., Islam M.S., Iwabuchi K., Dynamic behavior of double-membrane-bound organelles in plant cells. *International Review of Cell and Molecular Biology* 286: 181-222. (2011) 査読無

高木慎吾、植物オルガネラは忙しい、生産と技術 63: 74-76. (2011) 査読無

Iwabuchi K., Takagi S., Actin-based mechanisms for light-dependent intracellular positioning of nuclei and chloroplasts in Arabidopsis. *Plant Signaling and Behavior* 5: 1010-1013. (2010) 査読無

Takagi S., Takamatsu H., Sakurai-Ozato N., Chloroplast anchoring: its implications for the regulation of intracellular chloroplast distribution. *Journal of Experimental Botany* 60: 3301-3310. (2009) 査読有

[学会発表](計 25 件)

Ishida Y., Takagi S., Regulation of chloroplast positioning by light and CO_2 . The 5th Asia Oceania Conference on Photobiology, 2011.7.30-8.1, 奈良県新公会堂

高松秀安、高木慎吾、ホウレンソウ葉肉細胞のアクチン細胞骨格と葉緑体アンカーは Ca^{2+} -カルモデュリンによって制御される、2011 年植物科学談話会、2011.7.17、大阪市立大学付属植物園

貴傳名亮太、高松秀安、横田悦雄、新免輝男、高木慎吾、シロイヌナズナ細胞膜ゴ-

ストを用いた葉緑体アンカーの解析、2011年
生体運動研究合同班会議、2011.1.7-9、大阪市
立大学

高松秀安、横田悦雄、新免輝男、高木慎
吾、ハウレンソウ葉肉細胞における細胞膜ゴ
ーストを用いた葉緑体アンカーの解析、2010
年生体運動研究合同班会議、2010.1.9-11、中
央大学

石田泰浩、高木慎吾、シロイヌナズナに
おける葉緑体の分布に対する背腹性と二酸
化炭素濃度の影響、日本植物学会第73回大
会、2009.9.18-20、山形大学

高松秀安、横田悦雄、新免輝男、高木慎
吾、ハウレンソウ葉肉細胞における葉緑体の
アンカー機構に対するピリンの関与、第50回
日本植物生理学会年会、2009.3.21-24、名古屋
大学

石田泰浩、高木慎吾、シロイヌナズナ葉
肉細胞プロトプラストの葉緑体の配置に及
ぼす二酸化炭素の影響、2008年度日本植物
学会近畿支部会、2008.12.13、神戸大学

〔図書〕(計2件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/
lab_page/takagi/index.html](http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/takagi/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 慎吾 (TAKAGI SHINGO)

大阪大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10192626

(2) 研究協力者

高松 秀安 (TAKAMATSU HIDEYASU)

大阪大学・大学院理学研究科・大学院生