

機関番号：32670

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570061

研究課題名（和文） 多様な色素体分化に関連する遺伝子の機能予測をめざしたモルフォローム解析

研究課題名（英文） Morpholome analysis for prediction of gene functions that be involved in various plastid differentiations.

研究代表者

永田 典子（NAGATA NORIKO）

日本女子大学・理学部・准教授

研究者番号：40311352

研究成果の概要（和文）：私は、多様に分化する色素体の分化メカニズムを解明することを目的に、透過型電子顕微鏡を用いて網羅的に色素体を観察し、種々の組織や器官における「色素体分化地図」を作成することを提案した。シロイヌナズナ野生型と突然変異体の葉、及びトマトやトウガラシ品種の果実を用いて、色素体構造に関する情報を網羅的に蓄積した。これは将来的に、遺伝子機能の予測や色素体構造と内包成分との関係を示すための有用な情報となる。

研究成果の概要（英文）：To understand the mechanism of plastid various differentiation, I proposed to prepare a plastid-map using transmission electron microscopy. I analyzed the leaves of Arabidopsis mutants for a nuclear-encoded chloroplast protein exhibiting albino/pale-green and the tomato/pepper fruits exhibiting various color. In the future, this information will become helpful for prediction of gene functions that be involved in various plastid differentiations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：植物細胞形態学

科研費の分科・細目：基礎生物学、形態・構造

キーワード：色素体、電子顕微鏡、網羅的解析、分化、オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

私は以前より、植物の様々なステージにおける色素体分化について微細構造学的な解析を進めてきた。その研究過程で気がついたことは、色素体の電子顕微鏡観察は古くから行われているにも関わらず、その多くは単発的で、色素体分化の変遷を微細構造学的に網羅的に把握できる媒体がこれまで存在しないことであった。また、過去の報告では固定法が未熟であった時代の写真が多いが、最新の固定法を駆使することで、「これまで見え

なかったものを見せる」ことができると感じた。このことから、新しい固定法を用いた色素体分化地図を作成することを着想した。

一方、ゲノムプロジェクトの成果で、特定の色素体タンパク質の欠損した変異体が容易に入手できる時代となり、タンパク質機能に密接した形態変化として色素体形態を捉えることが可能となった。また、これまでに私は、一見野生型と変わらないように見える色素体タンパク質欠損変異体でも、色素体形態に変化が生じている事例も見いだしてき

た。このような流れを受けて、ポストゲノムの一貫として、色素体形態に着目したモルフオローム解析を行うことで、色素体分化制御に機能する遺伝子が新規に見つかるものとの着想に至った。

本研究は、平成 18,19 年度科学研究費補助金（若手 B）「多様な色素体分化の総括的理解のための網羅的形態解析」における研究を進展させたものである。この先行研究において、私は幾つかのステージにおいて色素体分化地図を作り、色素体形態に変化が生じている様々な事例を見いだすことができた。そこで、それを発展させ本格的なモルフオローム解析を行うことを提案するに至った。

2. 研究の目的

ポストゲノムとして、プロテオーム解析やメタボローム解析など、種々の網羅的解析法が提唱・実施されてきているが、国際的に競争の激しいポストゲノム時代を勝ち抜くためには、さらに新しい視点が必要である。そこで、私は、「細胞内構造を網羅的に解析する」という視点で、電子顕微鏡を用いたモルフオローム解析を行うことをここに提案した。

植物の豊かな細胞分化を支えるのに、多大な貢献をしているのが、「色素体」の存在である。色素体は、植物の生活環を通じて、多様にその構造と機能を変化させ、植物の営みを支えている。色素体の観察は古くから行われているが、色素体分化の全貌は、未だ明らかになっていない。そこで私は、モデル植物を用いて、多くの組織・細胞群で種々に分化した色素体の形態を電子顕微鏡学的に網羅的に解析し、「色素体分化地図」とよべるものを作成することを第 1 の目的とした。

シロイヌナズナに代表されるモデル植物においては、非常に多くの遺伝子破壊株が単離されている。これまでの私の先行研究から、色素体の構造異常が、破壊されたタンパク質機能に対応する形で、幾つかのパターンにグルーピングできることが明らかとなってきた。すなわち、その情報を用いれば、破壊株における色素体の形態を観察することで、機能未知タンパク質の機能予測ができる可能性がある。このように、遺伝子破壊株の色素体形態を網羅的に観察する、すなわち色素体変異のモルフオローム解析を行うことで、色素体タンパク質の機能予測に貢献することを、本研究の第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 色素体分化地図の作成

「色素体分化地図」の作成にあたり、①雄性配偶体形成過程、②胚発生から種子発芽過程、③果実成熟過程、の 3 つのステージに特

に着目し、透過型電子顕微鏡を用いて時空間的な色素体の形態変化を観察した。材料として、①②のステージにはシロイヌナズナを用い、③のステージにはトマト（マイクロトム）及びトウガラシを用いた。各ステージにおいて、固定濃度・時間・温度、樹脂包埋剤などの最適化を行った。

(2) 色素体異常変異体の網羅的観察

各植物種の突然変異体を用いて、各分化ステージにおける色素体の形態を観察した。具体的な観察対象としては、①不稔もしくは雄性配偶体致死の表現型がみとめられたシロイヌナズナ突然変異体の観察、②色素体タンパク質をコードする遺伝子破壊が確認されており、葉の色に変化がみとめられたシロイヌナズナ突然変異体の観察、③果実色に変化のあったトマト突然変異体およびトウガラシ品種の観察、の 3 つである。

4. 研究成果

(1) 色素体分化地図の作成

本研究においては、①雄性配偶体形成過程、②胚発生から種子発芽過程、③果実成熟過程、の 3 つのステージにおいて、時間的・空間的に詳細な電子顕微鏡観察を行い、野生型植物で行われている正常な色素体変遷を記録することで、色素体分化のしくみ解明への足がかりを得ることができた。

①雄性配偶体形成過程

高等植物の雄性配偶体は、細胞組織の深部に存在し、またわずかな時間で刻々と色素体形態が変化する動的な存在である。このことから、花粉形成に寄与する様々な色素体分化の詳細な構造形態を示すことは、公的にも有用な成果といえる。

高等植物の葯では、タペータム細胞内にタペトソームとエライオプラスト（脂質を蓄積した色素体）という特異な脂質系オルガネラが発達する。それらの脂質系オルガネラの含有脂質成分は、ポーレンコートを形成する。加圧凍結技法等を用いて TEM 観察を行ったところ、脂質系オルガネラの分化および細胞外分泌と花粉壁沈着のプロセス等の詳細が明らかとなった（図 1）。特に、タペータム細胞層の崩壊の時期がこれまで考えられていたよりも遅く、タペトソームとエライオプラストの融合時期が可視化できたことは大きな成果である。その他、葯内に花粉壁成分の重合体を作られることや、花粉壁成分の生産場所や輸送プロセスなどの詳細が明らかになった。その他、雄性配偶体内部のプロプラスチドや雄性配偶子内の退化する色素体等、種々の色素体の動態が明らかになった。

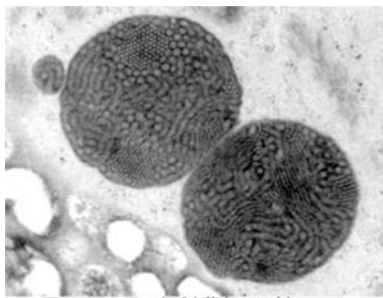


図1 シロイヌナズナ葉内のタベトソーム

②胚発生から種子発芽過程

種子内には、発芽後の根・胚軸・子葉・茎頂にあたる組織が存在しており、微小領域に多くの分化した細胞群が存在しているという点で、興味深い材料である。しかし、固定の難しさから、これまで種子中の色素体で良好な観察像はほとんど得られていない。私は先行研究(平成18,19年度 若手B)において、種々の固定法を検討した結果、良好な電子顕微鏡像を得ることに成功した。そこで今回は、種子中の未熟胚から乾燥種子、そして発芽後数日の時期に至るまで、経時的に色素体の分化の変遷を捉えることを目指した(図2)。その結果、未熟胚から乾燥種子に至るまでは、色素体内膜貫入に依存するチラコイド膜形成が多く観察されるが、乾燥種子から種子発芽に至るまではプロラメラボディ様構造からのチラコイド膜形成が主流であることなどが明らかになった。このように、同じように見える葉緑体形成において、チラコイド膜形成経路は複数存在することなどが示された。

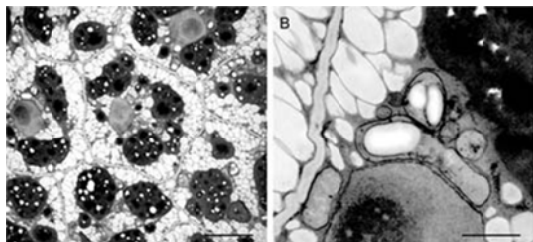


図2 未熟種子胚中の細胞内構造

③果実成熟過程

モデル植物シロイヌナズナの果実色は緑でしかないが、高等植物の中には多彩な色の果実を持つものが存在する。色素体分化の研究対象として、赤や黄色などの多彩な色の原因となるクロモプラストは、興味深い対象である。そこで私は、ナス科植物のモデル植物として最近注目されているトマト(マイクロトム)、及び多様な果実色を有するトウガラシを材料に用いて、果実成熟過程における葉緑体からクロモプラスト分化の観察を行った。その結果、それぞれの材料に最適な固定法を見つけ、良好な電子顕微鏡画像を取得することに成功した(図3)。

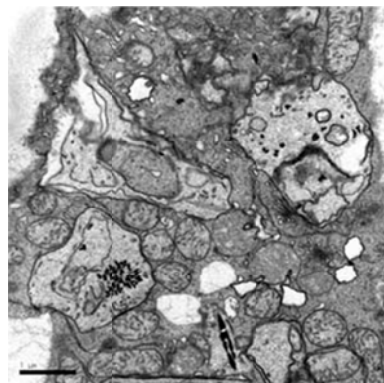


図3 トマト果実の色素体構造

(2) 色素体異常変異体の網羅的観察

種々の突然変異体を用いて、各分化ステージにおける色素体の形態を観察した。変異体と野生型の色素体形態とを詳細に比較することにより、色素体形成に貢献する遺伝子情報を蓄積した。

①不稔もしくは雄性配偶体致死の表現型がみとめられたシロイヌナズナ突然変異体の観察

葉緑体は正常だが、他の分化状態の色素体に異常がある、という個体は多数存在するはずである。例えば葯タペタム内のエライオプラストでのみ機能する遺伝子に原因があるものは、不稔になるかもしれない。このように、不稔や雄性配偶体致死など、限られたステージでのみ異常を示すものを選び観察することで、葉緑体以外の色素体分化と機能に関わる遺伝子候補を探し出すための解析を行った。

不稔形質を示す、*hmg1* 変異体、*ipil*、*ipi2* 二重変異体、*cer1* 変異体、*cas1* 変異体、花粉エキシン形成に異常を示す変異体等を広く入手し、葯の電子顕微鏡観察を行った。その結果、*hmg1*、*ipil*、*ipi2* において、葯タペタムのエライオプラストにおける形態異常を確認することができた。

②色素体タンパク質をコードする遺伝子破壊が確認されており、葉の色に変化がみとめられたシロイヌナズナ突然変異体の観察

例えば同じアルビノに見える個体であっても、電子顕微鏡レベルで観察すると、異常色素体の形態は様々である。また一方で、非常に似た形態異常を示すものもあり、突然変異体を網羅的に観察することで、異常色素体の形態ごとにグルーピングすることができると考えられる。子葉は既に種子の段階で形成されているので、これらの色素体の観察を胚発生段階に遡りつつ、構造情報を蓄積した。

理化学研究所所有のシロイヌナズナ突然変異体(Chloroplast Function Database)を材料に、葉緑体タンパク質をコードすると予想された核遺伝子にタグが挿入されたライ

ンのうち、アルビノ、ペールグリーン、斑入り等の葉の色の変化が記載されていたおよそ10ラインについての子葉の観察を行った。これは、将来的に葉緑体構造に関わる遺伝子の機能予測につながる情報となる。また、子葉と本葉における葉緑体分化メカニズムは、かなりの点で異なること等も明らかになった。

③果実色に変化のあったトマト突然変異体およびトウガラシ品種の観察

ナス科植物のモデル植物として最近注目されているトマト（マイクロトム）と、多様な果実色を有するトウガラシ品種を用いて、果実のクロモプラスト観察を行った。その結果、幾つかの新規構造体を見出すと同時に、その構造体の由来成分（カロテノイド）を推測することができた。将来的に、葉緑体以外の色素体形成に貢献する遺伝子の機能予測や、内包成分の予測に有用であると思われる。

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9件）

- ① 永田典子：被子植物の細胞質遺伝、Plant Morphology, 査読無, 23, 25-33 (2011)
- ② N. Nagata, Mechanisms for independent cytoplasmic inheritance of mitochondria and plastids in angiosperms. J. Plant Res., 査読有, 123, 193-199 (2010)
- ③ 鈴木優志、永田典子、脂質が制御するタペータムと雌性配偶体の形成、Plant Morphology, 査読無, 21(1), 55-62 (2009)
- ④ L. Y. Tang, N. Nagata, R. Matsushima, Y. Chen, Y. Yoshioka, W. Sakamoto, Visualization of plastids in pollen grains: involvement of FtsZ1 in pollen plastid division. Plant Cell Physiol., 査読有, 50(4), 904-908 (2009)
- ⑤ M. Suzuki, S. Nakagawa, Y. Kamide, K. Kobayashi, K. Ohyama, H. Hashinokuchi, R. Kiuchi, K. Saito, T. Muranaka, N. Nagata, Complete blockage of the mevalonate pathway results in male gametophyte lethality., J. Exp. Bot., 査読有, 60(7), 2005-2064 (2009)
- ⑥ F. Myouga, C. Hosoda, T. Umezawa, H. Iizumi, T. Kuromori, R. Motohashi, Y. Shono, N. Nagata, M. Ikeuchi, K. Shinozaki, A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in Arabidopsis., Plant Cell, 査読有, 20, 3148-3162 (2008)
- ⑦ M. Suzuki, K. Kobayashi, N. Nagata, O.

Matsuda, K. Iba, S. Yoshida, T. Muranaka, Novel root culture system using a recessive mutant with a rooty phenotype., Plant Biotech., 査読有, 25, 197-200 (2008)

- ⑧ 鈴木英理子、鈴木優志、大山清、村中俊哉、永田典子：ステロールがタペータム脂質系オルガネラとポーレンコート形成に果たす役割：ステロールメチルトランスフェラーゼ遺伝子欠損変異体の超微構造学的解析、日本女子大学紀要理学部、査読無、第16号、p29-33 (2008)
- ⑨ M. Garcia, F. Myouga, K. Takechi, H. Sato, K. Nabeshima, N. Nagata, S. Takio, K. Shinozaki, H. Takano, An Arabidopsis homolog of the bacterial peptidoglycan synthesis enzyme MurE has an essential role in chloroplast development., Plant J., 査読有, 53, 924-934 (2008)

〔学会発表〕（計28件）

- ① 金子謙佑、岡部佳弘、浅水恵理香、江面浩、永田典子、加藤雅也、本橋令子、トマトオレンジ果色変異体 *vivid orange* (vo) 変異体の解析、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月、要旨公開により学会成立
- ② 永田典子、佐藤由佳、藤原誠、吉田茂男、明賀史純、篠崎一雄、本橋令子、異常色素体と正常葉緑体が混在した細胞をもつシロイヌナズナ斑入り突然変異体の解析、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月、要旨公開により学会成立
- ③ 秋田佳恵、桧垣匠、小林恵、永田典子、上田貴志、朽名夏磨、馳澤盛一郎、シロイヌナズナ葉表皮細胞の形態形成における細胞内微細構造の電子顕微鏡解析、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月、要旨公開により学会成立
- ④ 伊藤隆、鈴木宗典、永田典子、坂智広、村中俊哉、トウガラシ属植物果実におけるカロテノイドプロファイルの比較解析、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月、要旨公開により学会成立
- ⑤ 永田典子、電子顕微鏡によるモルフォローム解析の提案、植物電子顕微鏡若手ワークショップ、2010年11月19日、横浜（招待講演）
- ⑥ Katayama K, Akbari H, Tanabashi S, Nagata N, Frentzen M, Wada H, Cardiolipin plays important roles in plant mitochondria and development, The 51st International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL), Spt. 7-11, 2010 Spain
- ⑦ 伊藤隆、鈴木宗典、永田典子、坂智広、村中俊哉、トウガラシ属植物果実におけるカロテノイドプロファイルの比較解析、第28回日本植物細胞分子生物学会大会、2010年9月2-3日、仙台

- ⑧ Suzuki M, Sasaki E, Okazaki Y, Ohyama K, Nagata N, Kamide Y, Hashinokuchi H, Takahashi C, Saito K, Shimada Y and Muranaka T, The Potential Regulatory Mechanisms of Plastid Differentiation and Function by Sterols., 19th International Symposium on Plant Lipids (ISPL), July 11-16, 2010, Australia
- ⑨ Motohashi R, Suzuki M, Takahashi S, Kaneko K, Fukatsu K, Dohra H, Kiriwa Y, Fujiwara M, Fukao Y, Nagata N, Plastid study of tomato fruits using the techniques of Arabidopsis research., 21th International Conference of Arabidopsis Research, June 6-10, 2010, Yokohama
- ⑩ 本橋令子, 鈴木美穂, 高橋祥子, 道羅英夫, 切岩祥和, 藤原正幸, 深尾陽一郎, 永田典子, マイクロトムを用いたクロモプラスト分化機構解明のためのプラスチドプロテオーム解析, 第 51 回日本植物生理学会, 2010 年 3 月 18 日, 熊本
- ⑪ 永田典子, シロイヌナズナ葯タペータム内の特異な脂質系オルガネラの分化, 第12回植物オルガネラワークショップ「ゲノム時代の植物オルガネラ研究」, 2010年3月17日, 熊本 (招待講演)
- ⑫ Nagami E, Ito T, Suzuki M, Nagata N, Muranaka T, Ban T, Characteristics of Genetic Resource of Capsicum spp. conserved in Kihara Institute for Biological Research., Japan Solanaceae Consortium 2010, Mar. 13-14, 2010, Sendai
- ⑬ Ito T, Nagami E, Suzuki M, Nagata N, Ban T, Muranaka T, Comparative analysis of carotenoid profile in fruits of Capsicum spp. conserved in Kihara Institute for Biological Research., Japan Solanaceae Consortium 2010, Mar. 13-14, 2010, Sendai
- ⑭ Suzuki M, Nagata N, Muranaka T, The role of isoprenoids from the MVA pathway on tapetum and male gametophyte development., International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction: from pollination to fertilization, Mar. 11, 2010, Nara
- ⑮ 永田典子, 高等植物の雄性配偶体形成過程における特異なオルガネラ分化に関する研究, 日本植物学会第73回大会, 2009年9月20日, 山形 (招待講演)
- ⑯ 棚橋沙由理, 松島良, 坂本亘, 永田典子, シロイヌナズナ雄性配偶子内のミトコンドリアの動態と母性遺伝, 日本植物学会第73回大会, 2009年9月19日, 山形
- ⑰ 朝長優美, 永田典子, 弱光条件下におけるシロイヌナズナ子葉のチラコイド膜重層化に関する解析, 日本植物形態学会第21回大会, 2009年9月17日, 山形
- ⑱ 佐藤由佳, 藤原誠, 吉田茂男, 永田典子, 斑入り突然変異体 *thfl* における色素体の細胞内分布に関する研究, 日本植物形態学会第21回大会, 2009年9月17日, 山形
- ⑲ Suzuki M, Ohyama K, Kamide Y, Tanabashi S, Saito K, Muranaka T, Nagata N, Isoprenoids are critical for the development of tapetum and male gametophyte, 9th International Meeting; Biosynthesis and Function of Isoprenoids in Plants, Microorganisms and Parasites (TERPNET2009), May 25-29, 2009, Tokyo
- ⑳ 鈴木優志, 大山清, 上出由希子, 棚橋沙由理, 斉藤和季, 村中俊哉, 永田典子, 葯タペータムと雄性配偶体形成を制御するステロールの役割, 第 50 回日本植物生理学会, 2009 年 3 月 22 日, 名古屋
- ㉑ 棚橋沙由理, 永田典子, タペータムおよび雄性配偶体内の脂質系オルガネラの形成とポーレンコート沈着に関する超微構造学的研究, 第 50 回日本植物生理学会, 2009 年 3 月 22 日, 名古屋
- ㉒ 浦野薫, 明賀史純, 庄野由里子, 永田典子, 篠崎一雄, シロイヌナズナにおけるポリアミン輸送関連タンパク質の機能解析, 第 50 回日本植物生理学会, 2009 年 3 月 22 日, 名古屋
- ㉓ 原美由紀, 松浦匡輔, 明賀史純, 庄野由里子, 永田典子, 篠崎一雄, 本橋令子, シロイヌナズナのタグラインを用いた DNA RNA 結合モチーフを持つ葉緑体タンパク質の解析, 第 31 回日本分子生物学会, 2008 年 12 月 9-12 日, 神戸
- ㉔ 鈴木優志, 大山清, 上出由希子, 橋之口裕美, 棚橋沙由理, 斉藤和季, 村中俊哉, 永田典子, 葯タペータムと雄性配偶体形成を制御するステロールの機能, 第21回植物脂質シンポジウム, 2008年11月28-29日, 札幌
- ㉕ 鈴木優志, 村中俊哉, 永田典子, 葯タペータムと雄性配偶体形成に果たすイソプレノイド系脂質の機能, 国立遺伝学研究所研究集会「高等植物の生殖過程を制御する因子の多様性と生殖隔離」, 2008年11月6日, 三島
- ㉖ 永田典子, 葯タペータム内の脂質系オルガネラの形成と機能, 日本植物学会第72回大会, 2008年9月25日, 高知
- ㉗ Suzuki M., Nakagawa S., Kamide Y., Tanahashi S., Saito K., Muranaka T., Nagata N, The Role of Isoprenoids on Male Gametophyte Development, The 18th International Symposium on Plant

Lipids (ISPL), July 20-25, 2008,
Bordeaux, France

⑳Katayama K., Tanabashi S., Nagata N. Wada
H., Cardiolipin synthase plays important
roles in plant morphology., The 18th
International Symposium of Plant Lipid
(ISPL), July 20-25, 2008, Bordeaux,
France

6. 研究組織

(1)研究代表者

永田 典子 (NAGATA NORIKO)

日本女子大学・理学部・准教授

研究者番号：40311352

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし