

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15509

研究課題名（和文）新たに見出した温度応答性葉緑体運動の実態と誘導機構の解明

研究課題名（英文）Temperature-dependent chloroplast movement and its induction mechanism

研究代表者

間合 絵里（MAAI, Eri）

東京農業大学・国際食料情報学部・助教

研究者番号：90804328

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：イネ科C4植物のシコクビエは、ヒマラヤの冷涼な高標高地など幅広い温度帯で栽培される有用な作物である。本研究では、シコクビエにおける温度応答性葉緑体運動の実態と誘導機構の解明を目的とした。シコクビエの葉緑体は低温および高温に応答して明条件下で凝集運動を起こすことが明らかになった。低温に応答した葉緑体凝集運動の誘導には青色光、アクチン、アブシジン酸が関与することが明らかになった。低温下の葉緑体配置は明条件と暗条件により全く異なり、暗条件では葉緑体が維管束鞘細胞側から離れる遠心配置をとることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度は植物の生存や生長に影響する環境要因であるが、環境応答の一種である葉緑体運動の研究の多くは光ストレスに着目しており、温度ストレスに対する葉緑体運動の知見は少なかった。本研究によって、種々の温度環境におけるシコクビエの葉緑体運動の実態が明らかになり、低温下での葉緑体凝集運動が光ストレス状態と関連があることを見出した。また、光合成が駆動しない低温・暗条件下で起きた葉緑体の遠心配置には、これまでに示されている光合成の最適化とは異なる、夜間の低温に対処するための新規の役割があると考えられた。本研究により植物の温度ストレス応答の一端が明らかになり、環境耐性の高い作物育種のための基礎知見を提供できた。

研究成果の概要（英文）：A C4 grass, finger millet, is a valuable cereal crop grown in a wide range of temperature zones, including the cool high altitudes of the Himalayas. This study aimed to elucidate chloroplast behaviors under various temperature conditions and the mechanism of temperature-dependent chloroplast movement in finger millet mesophyll cells. Under light condition, finger millet chloroplasts showed the aggregative movement in response to low and high temperatures. It was found that blue light, actin, and abscisic acid were involved in inducing the aggregative movement of chloroplasts under low temperatures. The arrangement of chloroplasts under low temperature differed under light and dark conditions. Under low temperature in the dark, mesophyll chloroplasts were newly found to be arranged in the centrifugal position.

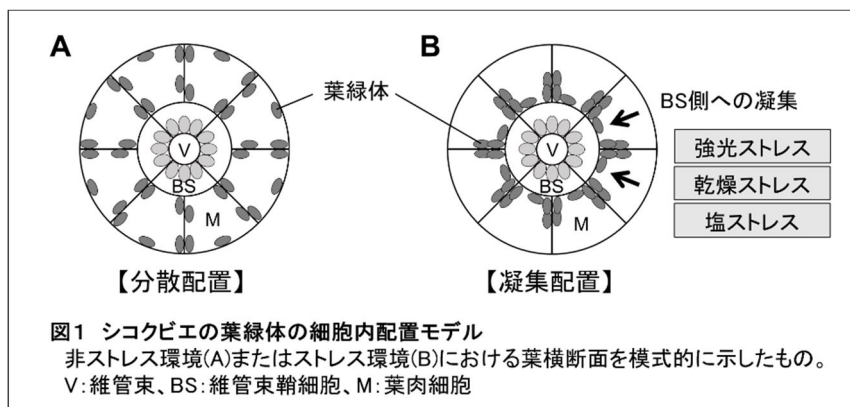
研究分野：植物生理学

キーワード：シコクビエ 葉緑体運動 温度 青色光 ストレス アブシジン酸 アクチン

### 1. 研究開始当初の背景

植物は一度根を張ると動けないため、環境の変化を感じ取り、対処するシステムを備えている。葉緑体運動はその一例であり、葉緑体は強光などの環境ストレスを受けると細胞内を移動することが知られる。葉緑体運動を示さないシロイヌナズナ変異株では、強光下で葉が傷害を受け枯死することから、葉緑体運動は環境ストレス下の植物の生存を左右する重要な応答と考えられている。イネ科  $C_4$  植物のシコクビエ (*Eleusine coracana*) では、非ストレス環境で細胞周縁に分散している葉緑体 (図 1A) が、強光や乾燥、塩ストレス下で維管束鞘細胞側へ向かって集まる「凝集運動」(図 1B) を起こすことが報告されている。これまで申請者は、シコクビエの葉緑体を示す凝集運動の誘導機構、および光合成活性との関連性を明らかにしてきた (Maai et al., 2011 *J Exp Bot*; Maai et al., 2020 *Plant Prod Sci*)。

シコクビエはアフリカの高温・半乾燥地だけでなく、ヒマラヤの冷涼な高標高地など幅広い温度帯で栽培される作物である。植物にとって高温や低温などの温度もストレスとなるが、温度に応答した葉緑体運動はシダやコケなど一部の植物で報告されているのみであり、シコクビエの葉緑体が温度に応答するかは未知であった。



### 2. 研究の目的

本研究では、シコクビエにおける温度応答性葉緑体運動の実態と誘導機構の解明を目的とした。低温から高温まで、種々の温度環境がシコクビエの葉緑体の細胞内配置に及ぼす影響を調査し、温度応答性葉緑体運動の誘導に関与する因子の特定を目指した。

### 3. 研究の方法

実験には栽培温室 (28 /明期 14 時間、20 /暗期 10 時間) で 3~4 週間育成したシコクビエを用いた。各調査は、最上位完全展開葉の中央部を対象に行った。シコクビエにおける温度応答性葉緑体運動の実態解明のために、まず低温 (5 ) から高温 (45 ) まで様々な温度処理を施したときの葉緑体の細胞内配置などを調査した。次に、温度応答性葉緑体運動の誘導に関わる光波長や生理活性物質を探索した。

#### (1) 温度処理に対する葉緑体の応答

人工気象器により低温 (5 ) から高温 (45 ) までの温度環境を段階的に作り出し、ポット植えのシコクビエを一定時間 (最長 12 時間) おいた後、葉を切り出してグルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液で化学固定した。川本法 (Kawamoto 2003) に基づき葉の凍結ブロックを作製し、クライオスタットを用いて葉横断切片を作製した。光学顕微鏡と付属 CCD カメラで葉緑体の細胞内配置を観察・撮影し、画像処理ソフトを用いて葉緑体の維管束鞘細胞側への分布度を定量した。凝集運動の発生程度は凝集配置指数 (Maai et al. 2011) によって評価した。葉緑体が維管束鞘細胞側に局在化する (凝集する) ほど、凝集配置指数は上昇する。

また、温度処理に伴って変化した葉緑体の配置が一過性のものではなく、処理前の分散配置へ復帰できるかを確かめるため、5 ・明条件下に 12 時間おいた後、20 ・暗条件に 12 時間おき、同様に顕微観察した。

#### (2) 温度処理に対する量子収率、光透過率の変化

温度処理前後にクロロフィル蛍光測定器を用いて量子収率を、ライトアナライザを用いて葉における赤色光域の光透過率を計測した。

#### (3) 温度応答性葉緑体運動に関する因子の探索

温度応答性葉緑体運動に対する光の影響を明らかにするため、人工気象器内で白色蛍光灯を点灯 (明条件) または消灯 (暗条件) し、4 時間の温度処理を行った。また、LED 光源を用いて

青単色光または赤単色光下で4時間の温度処理を行った。

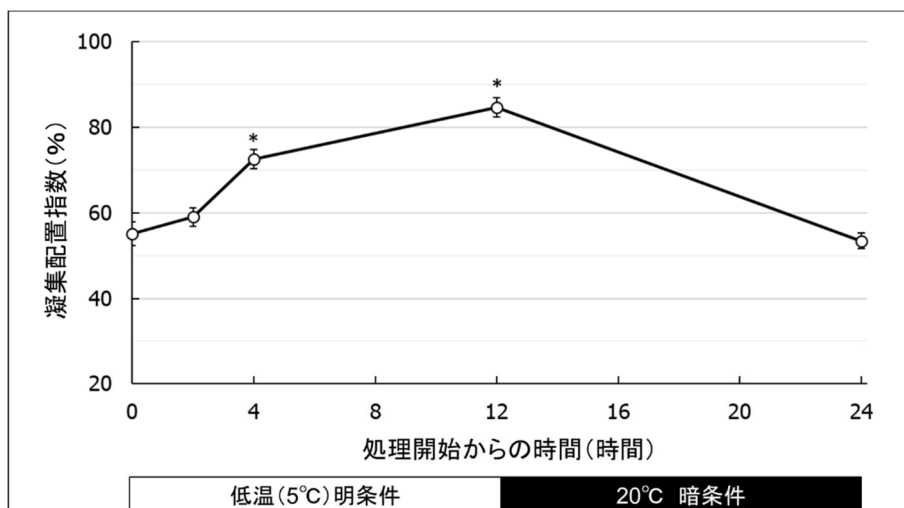
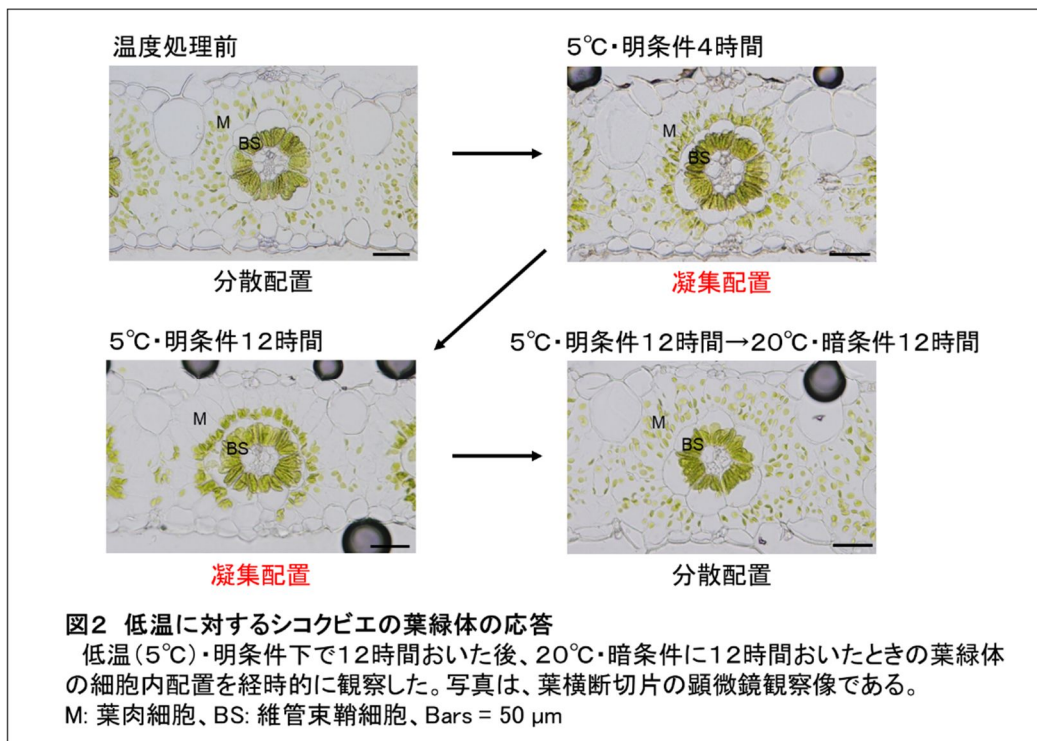
温度応答性葉緑体運動に対する生理活性物質の影響を明らかにするため、温度処理した葉を凍結乾燥し、粉碎した試料を用いて植物ホルモンのアブシジン酸含量を測定した。

また、温度応答性葉緑体運動の動力を明らかにするため、アクチン重合阻害剤として  $50 \mu\text{M}$  サイトカラシン B、ミオシン阻害剤として  $25 \text{ mM}$  2,3-ブタンジオンモノオキシム (BDM) を含む溶液中にそれぞれ葉片を沈め、減圧浸透させた後、葉片を各溶液上に浮かべて4時間の低温(5℃)処理を行った。対照区として、阻害剤の溶剤であるジメチルスルホキシド(0.5% DMSO)を含む溶液で同様の処理を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 温度がシコクビエの葉緑体配置に及ぼす影響

シコクビエの葉緑体は5℃の低温・明条件下で維管束鞘細胞側に凝集した(図2)。この低温・明条件下の葉緑体凝集運動は処理時間が長くなると明確になり、凝集配置指数は4時間の処理で有意に上昇した(図3)。12時間の低温処理によってより強固な凝集運動がみられ、凝集配置指数はさらに上昇した。その後、20℃の暗条件に12時間おくと葉緑体は分散配置に戻り、凝集配置指数は処理前と同等の値となった。これより、低温に反応した葉緑体の凝集配置は可逆的な配置であることが示唆された。



シコクビエを 15、25 または 35 にそれぞれ 4 時間おいた場合、光の有無にかかわらず凝集配置指数の上昇はみられなかった(図 4)。45 の高温処理(4 時間)によって、明条件で凝集配置指数が処理前と比べて有意に上昇し、凝集運動が観察された。なお、5 の低温・暗条件下では維管束鞘細胞側から遠ざかるような配置(後述)をとり、凝集配置指数の有意な低下がみられた。

以上より、低温および高温は明条件でシコクビエの葉緑体凝集運動を引き起こすことが明らかになった。また、低温・暗条件で葉緑体は独特の遠心配置をとることを見出した。

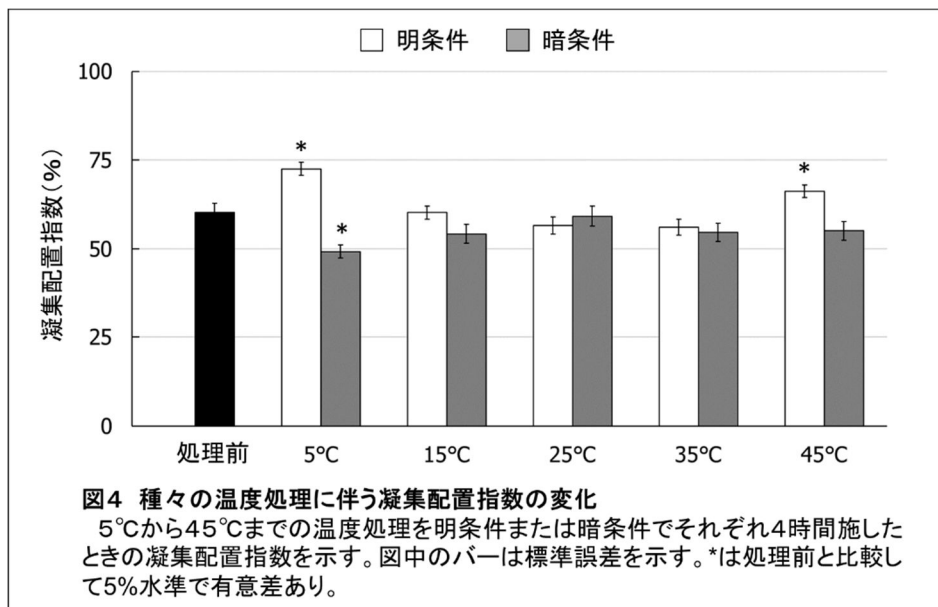


図4 種々の温度処理に伴う凝集配置指数の変化

5°Cから45°Cまでの温度処理を明条件または暗条件でそれぞれ4時間施したときの凝集配置指数を示す。図中のバーは標準誤差を示す。\*は処理前と比較して5%水準で有意差あり。

### (2)低温・明条件でみられた葉緑体の凝集配置

5 の低温・明条件では量子収率が低下し、ストレスホルモンであるアブシジン酸含量が処理前に比べて有意に増加した。低温下の葉緑体凝集運動の発生は、光ストレス状態であることと関連があると考えられた。植物は低温で光阻害を受けやすいことが報告されている。5 の低温・明条件下では葉の光透過率が上昇したことから、葉緑体が凝集配置をとり、葉緑体を受ける光を低減することで低温下の光ストレスに対処していると推察された。

低温・明条件において、対照区と BDM 添加区ではみられた葉緑体凝集運動は、サイトカラシン B 添加区ではみられなかった。また、低温に応答した葉緑体凝集運動は青単色光下でみられ、赤単色光下でみられなかった。本実験から、低温応答性凝集運動の誘導に青色光、アクチン、アブシジン酸が関与することが明らかになった。これらの因子は、過去に見出されている強光・乾燥・塩ストレス下の凝集運動(Yamada et al., 2009 *Plant Cell Phys*; Maai et al. 2011)の誘導因子と一致した。

### (3)低温・暗条件でみられた葉緑体の遠心配置

5 の低温・暗条件で葉緑体の凝集運動は起きなかったものの、維管束鞘細胞の近傍に配置する葉緑体数が減少し、葉緑体が独特の遠心配置をとることを見出した(図 5A)。

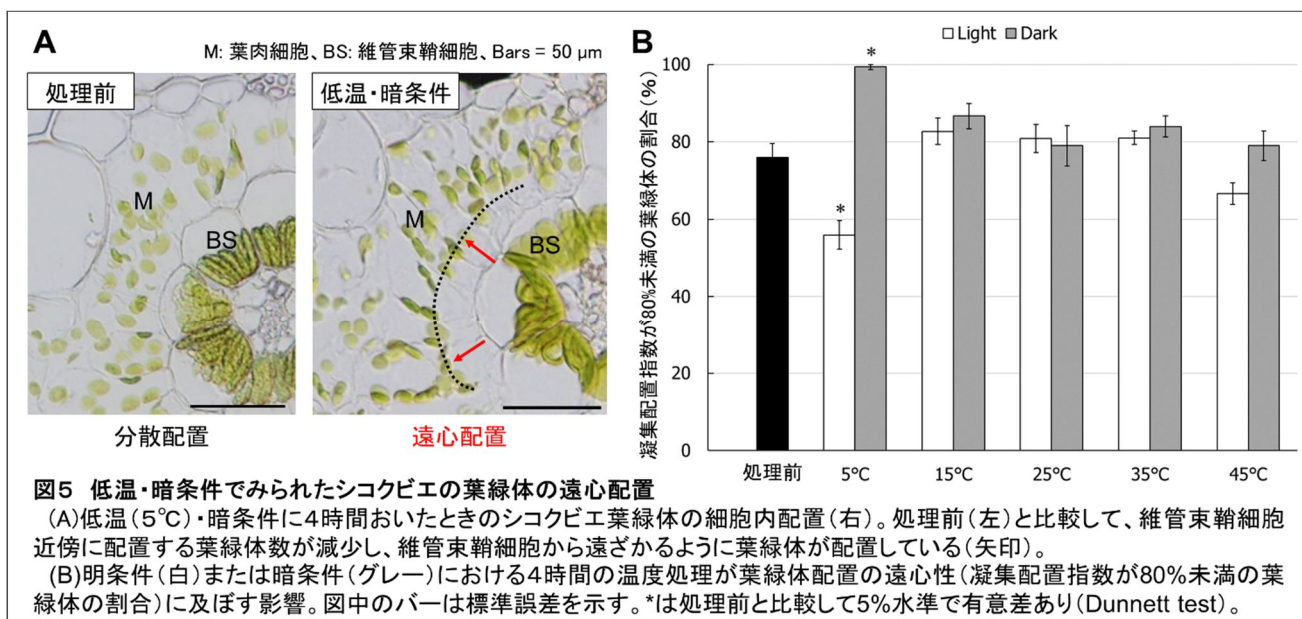


図5 低温・暗条件でみられたシコクビエの葉緑体の遠心配置

(A)低温(5°C)・暗条件に4時間おいたときのシコクビエ葉緑体の細胞内配置(右)。処理前(左)と比較して、維管束鞘細胞近傍に配置する葉緑体数が減少し、維管束鞘細胞から遠ざかるように葉緑体が配置している(矢印)。

(B)明条件(白)または暗条件(グレー)における4時間の温度処理が葉緑体配置の遠心性(凝集配置指数が80%未満の葉緑体の割合)に及ぼす影響。図中のバーは標準誤差を示す。\*は処理前と比較して5%水準で有意差あり(Dunnnett test)。

葉緑体の維管束鞘細胞側への局在度を表す凝集配置指数は、**100%**に近づくほど葉緑体が維管束鞘細胞の近傍に配置することを示すものである。そこで、葉緑体の遠心配置を定量的に評価するため、凝集配置指数が**80%**未満の葉緑体の割合（葉緑体配置の遠心性）を比較したところ、**5** の低温・暗条件で処理前より有意に増加した（図**5B**）。**15**～**45** の処理では葉緑体配置の遠心性に処理前と有意な差は認められなかった。また、**5** の低温・明条件で葉緑体配置の遠心性が有意に減少したことは、凝集運動による影響であると考えられた。

阻害剤を用いた実験では、サイトカラシン **B** 添加区、**BDM** 添加区、対照区のいずれも **5** の低温・暗条件で葉緑体の遠心配置がみられた。**25** の温度処理では明条件、暗条件ともにサイトカラシン **B** 添加区のみで葉緑体の遠心配置がみられた。また、低温・青単色光下で葉緑体の凝集配置がみられたのに対して、低温・赤単色光下では葉緑体の遠心配置がみられた。非ストレス時には、アクチンが葉緑体を維管束鞘細胞から遠い方向へ分散させる働き（**Kobayashi et al., 2009 Plant Cell Phys**）をしているが、青色光が存在しない低温ストレス下では何らかの要因によってアクチンによる葉緑体の分散機能が低下し、葉緑体が遠心配置をとる可能性が推察された。シコクビエの葉緑体配置の遠心性をもたらす要因について、今後さらに解析を進める必要がある。

本研究から、シコクビエの葉緑体は低温および高温に応答して明条件下で凝集運動を起こすことが明らかになった。シコクビエ葉緑体の低温応答性凝集運動は、過去に見出されている強光・乾燥・塩ストレス下の凝集運動と同じ機構により引き起こされることが明らかになり、シコクビエの葉緑体は同一のシステムで多様なストレスに対処していると考えられた。また、低温下の葉緑体配置は明条件と暗条件、とくに青色光の有無により全く異なり、暗条件では葉緑体が維管束鞘細胞側から離れる遠心配置をとることを見出した（論文投稿準備中）。葉緑体の凝集配置と遠心配置の制御には、青色光とアクチンを介した機構が関与する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Eri Maai, Kazusa Nishimura, Rihito Takisawa and Tetsuya Nakazaki
2. 発表標題 Diurnal changes in chloroplast positioning and photosynthesis in finger millet
3. 学会等名 10th Asian Crop Science Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 間合絵里・小嶋美紀子・竹林裕美子・榊原均
2. 発表標題 低温下でのシコクビエ葉緑体の配置変化とその要因
3. 学会等名 日本作物学会 第255回講演会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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