

平成23年 5月19日現在

機関番号： 82401  
 研究種目： 研究活動スタート支援  
 研究期間： 2009～2010  
 課題番号： 21870047  
 研究課題名（和文）  
 ヒメツリガネゴケの巨大葉緑体を用いた光合成タンパク質イメージング技術の開発  
 研究課題名（英文）  
 Development of live-cell imaging for photosystem proteins by using the *Physcomitrella patens* giant chloroplasts  
 研究代表者  
 岩井 優和 (Iwai Masakazu)  
 独立行政法人理化学研究所・ライブセル分子イメージング研究チーム・基礎科学特別研究員  
 研究者番号： 80553768

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、光合成研究において、未開拓となっているイメージング技術の開発に取り組んだ。コケ植物ヒメツリガネゴケを用いて行い、葉緑体に存在するコケ特有の集光アンテナタンパク質（LHCB9）に緑色蛍光タンパク質（GFP）の導入を相同組換えによって成功させた。アンピシリン投与による巨大葉緑体の生体イメージングの条件検討も行い、生きた細胞の葉緑体内に存在する LHCB9-GFP の可視化に初めて成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

We developed the imaging technique using a confocal microscopy to observed photosynthetic proteins in live plant cells. Using a moss *Physcomitrella patens*, whose rate of homologous recombination of the nuclear genes is extremely high, we fused a green fluorescent protein (GFP) to the C-terminal region of LHCB9, a moss specific light-harvesting antenna protein. As a result, we visualized the LHCB9-GFP in the giant chloroplast thylakoid membranes in live plant cells for the first time. The results obtained here will be useful for the visualization of other important proteins related to the light energy transfer in chloroplast thylakoid membranes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

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：ライブセルイメージング・光合成研究・巨大葉緑体・ヒメツリガネゴケ・集光アンテナタンパク質・光環境適応機構

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに、我々は植物細胞から葉緑体を取り出し、光合成に関連する様々なタンパク質複合体を精製し、試験管内で生化学的解析を行ってきた。その結果、環境が変化すると同時に、それらのタンパク質複合体が脱離・結合といった再編成を行い、新しい環境に適応していることを見出だしてきた。しかし、試験管内での解析では、そのようなタンパク質の再編成を生で観察することができないため、その実態は明らかとなっていなかった。そこで、我々は生きた植物の葉緑体内でも同じようにタンパク質の再編成が起きているかどうかを検証し、その仕組みと意義を明らかにするため、共焦点顕微鏡を用いた生体イメージング技術の開発に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、植物細胞の葉緑体が環境の変化に適応する際、どのような仕組みで光エネルギー伝達の制御を行っているのかを生きた植物細胞を用いて直接観察するための光合成タンパク質イメージング技術を確認することである。

これまで光合成タンパク質の可視化はクロロフィル分子の自家蛍光によって困難とされてきたが、本研究の成果は、その困難を打ち破る手段を見出すことで、今後、より詳細な現象の可視化へと繋がって行くことが期待できる。

### 3. 研究の方法

植物の一つの細胞には通常20〜30個の葉緑体が存在しており、その大きさは約10ミクロン程度である。更に、葉緑体内にはチラコイド膜が張り巡るよう存在しており、複雑な三次元構造を形成している。光合成を行う重要なタンパク質複合体はチラコイド膜に局在する膜タンパク質であり、それらは数十から数百ものクロロフィル分子を含んでいる。通常共焦点レーザー顕微鏡などでは、クロロフィル自家蛍光が強く、GFPなどの蛍光タンパク質の観察が困難だと考えられている。

本研究では、これらを打開するため、コケ植物ヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* を用いて、光合成タンパク質イメージング技術の確立を試みた。*P. patens* を用いることは、以下3点の特徴から、本研究にとって最適である：1) 核遺伝子の相同組換え効率が高いため、内在性の光合成タンパク質に蛍光タンパク質を導入することができる唯一の植物である；2) ヒメツリガネゴケの細胞はシンプルな構造をしており、葉緑体の観察に適している；3) 抗生物質（アンピシ

リンなど）を含む培地で生育させることで、通常よりも約20〜30倍ほど巨大な葉緑体を形成するので、詳細な時空間的イメージング解析が可能である。これらの特徴を生かして、以下を行った。

(1) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察条件の設定を行った。葉緑体内のチラコイド膜は三次元的に複雑な構造を形成しているため、三次元観察は必須である。そこで、まず100 nmの蛍光ビーズを観察し、点像分布関数 (PSF: 微小領域から出た光が顕微鏡中でどれだけ広がるかを示す3次元関数) を様々な観察条件で取得した。これによって、観察で得られた三次元画像から焦点ボケを除くデコンボリューション演算を行い、空間分解能を飛躍的に改良することができる。

次に、*P. patens* 原糸体細胞をアンピシリンを含んだ培地で育てることで、巨大葉緑体の形成を誘導し、その三次元リアルタイム観察の条件を検討した。この時、通常と葉緑体と光合成能（特に我々が研究を行ってきたステート遷移能）に変化がないことを確認した。

(2) GFP 導入変異体の作成を行った。クロロフィルの自家蛍光に埋もれる目的のタンパク質を可視化するため、GFPを導入する必要がある。上述した *P. patens* の特徴である核遺伝子の相同組換えによって、内在する光合成タンパク質に GFP を導入することで、より安定した発現を得ることができる。本研究では、最も重要な光合成タンパク質の一つ LHC に着目し、コケ植物特有の LHCB9 の C 末に GFP を導入することを試みた。

### 4. 研究成果

(1) デコンボリューション演算による *P. patens* 巨大葉緑体チラコイド膜構造の高解像度三次元画像を得ることに成功した (図1)。まず、通常の葉

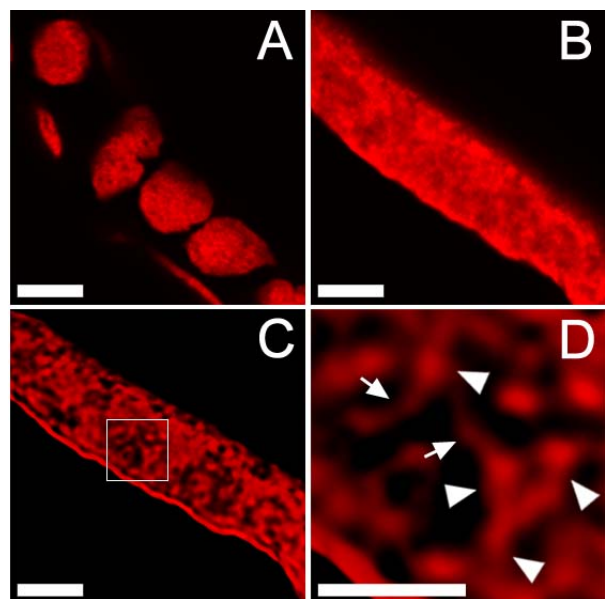


図1. チラコイド膜の高解像度三次元画像

緑体の場合(図1A:スケールバー, 10  $\mu\text{m}$ ), 大きさが10ミクロンと小さいため, 内部構造を捉えることが困難である. アンピシリンを含む培地で育てることで, 通常より約20倍大きい巨大葉緑体を形成させる(図1B:スケールバー, 10  $\mu\text{m}$ ). それでも, クロロフィル自家蛍光が強いため, 内部構造を詳細に観察することは困難である. 次に蛍光ビーズを観察することで得られたPSFを用いて, デコンボリューション演算を行った(図1C:スケールバー, 10  $\mu\text{m}$ :矢じりがグラナチラコイド, 矢印がストロマチラコイドと思われる構造). その結果, 焦点ボケが除去され, チラコイド膜の複雑な三次元構造を確認することができた. 更に, チラコイド膜構造の中でも, 数層に重なったグラナチラコイドと重なりが無いストロマチラコイドの構造も捉えることに成功した(図1D:スケールバー, 5  $\mu\text{m}$ ). これは植物の生細胞内でチラコイド膜構造を観察した初めての例である. この観察条件によって, GFPを導入したLHCB9の観察を行った.

(2) コケ特有の光を集めるタンパク質(LHCB9)にGFPを導入した形質転換体(LHCB9-GFP)の観察を行った(図2). 上述したイメージング技術を用いて, コケ巨大葉緑体内のチラコイド膜に局在するLHCB9-GFPを観察すると, クロロフィル自家蛍光とGFP蛍光の分離をうまく行うことに成功した(図2:赤, クロロフィル蛍光;緑, GFP蛍光:スケールバー, 5  $\mu\text{m}$ ). 更に, 三次元リアルタイム観察を行ったところ, LHCB9-GFPがチラコイド膜を繋ぐような様子で動いているのが観察された(図2:数字は経過秒数).

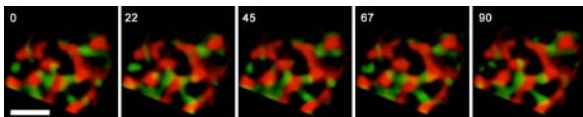


図2. LHCB9-GFPの3Dリアルタイム観察

この結果は, 生細胞内の葉緑体内のチラコイド膜局在タンパク質をリアルタイムで観察した初めての例である. また, LHCB9の挙動が示されたのも初めてである.

本研究によって確立した光合成タンパク質イメージング技術を応用すれば, 今後, 葉緑体チラコイド膜に局在する様々な重要タンパク質の可視化が実現することが考えられる. それによって, これまでは現象のある一点での情報でしか検証できなかったものが, ダイナミックに働く現象をリアルタイムで検証することができるようになるため, 様々な光合成に関する機構の解明へ向けて, 大きく進展することが期待することができる.

## 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2件)

- ①岩井優和, 皆川純, 蛍光寿命イメージングを光合成に応用する, 化学と生物, 印刷中, 査読無し.
- ②Iwai, M., Yokono, M., Inada, N., and Minagawa, J. Live-cell imaging of photosystem II antenna dissociation during state transitions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 2337-2342, 2010, 査読有り.

[学会発表] (計4件)

- ①岩井優和, 武仲能子, 中野明彦, 葉緑体チラコイド膜タンパク質のナノスケールイメージング, 第52回日本植物生理学会年会, 2011年3月20日, 仙台.
- ②岩井優和, ナノスケールイメージングから考察するチラコイド膜タンパク質間相互作用の実態, 大阪大学蛋白研セミナー, 2011年3月9日, 大阪.
- ③岩井優和, 光化学系タンパク質複合体のクロロフィル蛍光寿命ライブイメージング, 特定領域研究-NAIST植物科学研究教育推進事業「見る生物学4-進化するイメージング-」, 2009年11月24日, 生駒.
- ④岩井優和, 光化学系タンパク質複合体のクロロフィル蛍光寿命イメージング, 第10回エクストリーム・フォトニクス研究会, 2009年1月4日, 蒲郡.

[その他]

- ①日刊工業新聞, “ライブセルイメージングで解き明かす光合成の謎”, 2011年2月1日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 優和 (IWAI MASAKAZU)

独立行政法人理化学研究所・ライブセル分子  
イメージング研究チーム・基礎科学特別研究  
員

80553768

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者