

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570060

研究課題名（和文） 緑藻クレブソルミディウムのペルオキシソームと微小管の GFP による可視化

研究課題名（英文） Visualization of peroxisomes and microtubules by GFP marker in a green alga *Klebsormidium*

研究代表者

著本 春樹（HASHIMOTO HARUKI）

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：90134410

研究成果の概要（和文）：

緑藻クレブソルミディウムのペルオキシソームと微小管の GFP による可視化を目的として、パーティクルボンバードメント法を用いた GFP マーカー遺伝子の導入を試み、GFP 蛍光を発する細胞の有無を調べたところ、ミカヅキモの *CABI* プロモーターまたは *CMV35S* プロモーター、0.4 μm の金粒子、ガス圧 450psi、金粒子の細胞までの到達距離 12cm の条件で GFP 蛍光を発する細胞が 2 個確認することができた。

研究成果の概要（英文）： Exogenous expression of GFP marker genes by particle bombardment methods were employed in order to visualize peroxisomes and microtubules in a green alga *Klebsormidium flaccidum*. Two GFP-fluoresced cells were observed under the following settings: the *Closterium CABI* or *CMV 35S* promoters, 0.4 μm particles, 650 psi pressure, and a 12 cm distance for the gold particle bombardment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学，形態・構造

キーワード：クレブソルミディウム・形質転換・GFP・ペルオキシソーム・微小管

1. 研究開始当初の背景

オルガネラの複製と分配は核分裂（染色体の複製と分配）と並ぶ、いわば細胞質分裂の両輪である。ミトコンドリアと色素体の分裂の分子細胞生物学的研究の進展は著しい。一方、ペルオキシソームについては、クレブソルミディウムのペルオキシソームの分裂周期全体を通して中心体がペルオキシソームに常に結合しており、中心体とそこから射出する微小管がペルオキシソームの分裂と分配

に関与することを示した筆者らの研究（Honda and Hashimoto 2007）があるが、ペルオキシソームの分裂と伝播の機構の研究はミトコンドリアや色素体に比べて立ち遅れている。上記のような背景から、筆者はペルオキシソームの分裂と分配の過程とその機構を明らかにしたいと考え、そのための方法として、GFP の融合タンパク質をコードする遺伝子を導入し、発現させることによってペルオキシソームや微小管を GFP 蛍光によ

可視化し、ペルオキシソームの分裂と分配の過程を生細胞で連続観察可能にすることを試みた。

2. 研究の目的

本研究は植物細胞の細胞質分裂におけるオルガネラの複製と分配の過程とその機構を明らかにするための研究の一環である。本研究計画はペルオキシソームを1個だけ持つ緑藻 *Klebsormidium flaccidum* の細胞を形質転換することによって、ペルオキシソームと微小管を可視化することである。すなわち、ペルオキシソームについては、ペルオキシソーム輸送シグナル配列と GFP の融合タンパク質をコードする遺伝子を導入し、発現させることによってペルオキシソームを GFP 蛍光によって可視化し、分裂と分配の過程を生細胞で連続観察可能にする。微小管は、tubulin-GFP 融合タンパク質を発現する形質転換細胞内で可視化し、ペルオキシソームの分裂と分配との関連を調べる。将来的には、様々なオルガネラの動態を可視化するための実験系としての形質転換体を、各オルガネラについて確立することが目標である。

3. 研究の方法

(1) GFP 遺伝子をマーカー遺伝子にした DNA コンストラクトの作成

Closterium の安定形質転換体の作出のために日本女子大学関本研究室で開発された下記のコンストラクト (Abe et al. 2008) を *K. flaccidum* の形質転換に用いた。

5' *CpCAB1::ble-cgfp* (pSA106; Abe et al. 2008)

CaMV35Sp::*blecgfp* (pSA226; Abe et al. 2008)

このコンストラクトにはマーカーとして GFP とフレオマイシン耐性遺伝子が組み込まれている。

(2) パーティクルボンバードメント法による遺伝子導入

パーティクルボンバードメント実験は Bio-Rad 社の Bioloistic PDS-1000/He を用いて行った。実際には、寒天平板培地上で培養した細胞に、表 1 に示す金粒子のサイズ、ヘリウムのガス圧、ラプチャーディスクから細胞までの距離の3つのパラメータのすべての組み合わせについて数回ずつ行った。

表 1. パーティクルボンバードメント実験で検討したパラメータ

パラメータ	条件
レポーターとプロモータ	5' <i>CpCAB1::ble-cgfp</i> (pSA106)
	CaMV35Sp:: <i>blecgfp</i> (pSA226)
金粒子の直径	0.4 μ m, 0.6 μ m

ヘリウムのガス圧 (ラプチャーディスクの耐圧度)	450 psi, 650 psi, 1100 psi
ラプチャーディスクから 細胞までの距離	6cm 9 cm 12 cm

(3) 形質転換体の選別

- ① GFP 蛍光の有無を蛍光顕微鏡で観察することによって形質転換体細胞を検出した。
- ② 金粒子を撃ち込んだ後、フレオマイシンを含む培地で培養した。

4. 研究成果

本研究計画の遂行において突破口となる最も重要で、かつ困難な実験は遺伝子導入のための実験であるが、予想以上の困難に遭遇した。その困難のひとつは、クレブソルミディウムからの非特異的な擬陽性の蛍光に起因した。擬陽性の蛍光は、金粒子の撃ち込みによる障害や培養細胞の加齢などによって強くなる傾向があった。そのため形質転換体細胞の選別が非常に困難で、擬陽性か否かの判定に多くの時間を要した。また、得られた形質転換体細胞の頻度も低かった。

フレオマイシン耐性についても、原因は不明だが培地の条件によって、金粒子が撃ち込まれていない *Klebsormidium* 細胞でも耐性を示す場合があり、今回の研究では結局フレオマイシン耐性を選別に利用しなかった。

上に述べたように、非特異的な蛍光によって形質転換体細胞の選別に困難があったが、非特異的蛍光のパターンを比較分類し、擬陽性か否かの判定を確かなものになるように努めた。

その結果、パラメータの 36 通りの組み合わせについて数回ずつのボンバードメント実験を行った結果、擬陽性の蛍光像とは明らかに異なる蛍光を発する細胞が少なくとも 2 個確認できた (図 1)。その蛍光は GFP と同様の波長域を持ち、*ble* 遺伝子の産物が核に局在することが知られているが、同様に核に局在していた。一方擬陽性の蛍光は、細胞内の様々な部位から発し、その波長域は GFP 蛍光のそれと重なりはあるものの、広い波長域で GFP 蛍光と異なっていた。

以上の結果から、現段階では、形質転換体細胞の作出と選別を効率よく行えてはいないが、*Klebsormidium flaccidum* において少なくともパーティクルボンバードメント法による外来遺伝子の導入が可能であることを示すことができた。本研究計画の当初の研究目的であるペルオキシソームと微小管の GFP による可視化までには至らなかったが、

今後の研究によって、その目的を果たす可能性を示すことができた。

クレブソルミEDIUMは、陸上植物につながる進化系統学的位置にあること、そして地球上の広汎な地域で異なる環境下に生存し、乾燥耐性を持つなど、進化系統学上でも細胞生理学的にも強い関心が持たれている。cにおいてパーティクルボンバードメント法による外来遺伝子の導入が可能であることを示した本研究の成果は、細胞生物学的研究だけでなく、クレブソルミEDIUMの進化系統学的研究と細胞生理学的研究の発展に大きく寄与するものと考えられる。

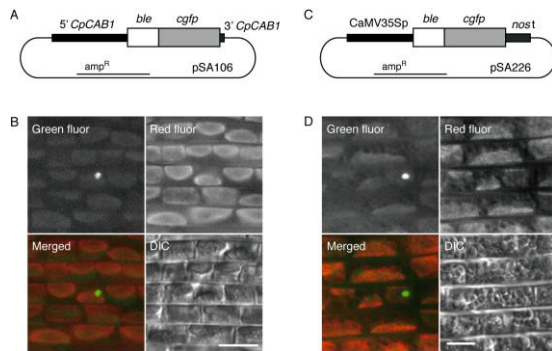


図1. GFP 蛍光を発する *Klebsormidium flaccidum* の一過性形質転換細胞。

(A, B) pSA106 vector で形質転換した細胞。
(C, D) pSA226vector で形質転換した細胞。
(B, D) 左上, 緑色蛍光. 右上, 赤色蛍光.
左下, 緑色蛍光と赤色蛍光の像を重ねた像.
右下, 微分干渉顕微鏡像. スケールバーは 10 μ m を示す。

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 7 件)

- ① Kobayashi, K., Narise, T., Sonoike, K., Hashimoto, H. 他. (13 名, 4 番目)
Role of galactolipid biosynthesis in coordinated development of photosynthetic complexes and thylakoid membranes during chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*.
The Plant Journal 73: 250-261. (2013) 査読有.
- ② Kazama Y, Fujiwara MT, Takehisa H, Ohbu S., Saito H, Ichida H, Hayashi Y, Abe T. 他 (8 名, 2 番目)
Characterization of a heavy-ion induced white flower mutant of allotetraploid *Nicotiana tabacum*.

Plant Cell Reports 32(1):11-19. (2013) 査読有. DOI:10.1007/s00299-012-1336-7

- ③ Kazama Y, Nishihara K, Bergero R, Fujiwara MT. 他. (7 名, 4 番目)
SIWUSI; An X-linked gene having no homologous Y-linked copy in *Silene latifolia*.
G3: Genes, Genomes, Genetics 2(10):1269-1278. (2012) 査読有, DOI:10.1534/g3.112.003749
- ④ Fujiwara MT, Yoshioka Y, Hirano T. 他. (7 名, 1 番目)

Visualization of plastid movement in the pollen tube of *Arabidopsis thaliana*.

Plant Signaling & Behavior 7(1):34-37. (2012) 査読有. DOI:10.4161/psb.7.1.18484

- ⑤ Fujiwara, M.T., Hashimoto, H., Kazama, Y. 他. (9 名, 1 番目, 2 番目)
Dynamic morphologies of pollen plastids visualized by vegetative-specific FtsZ1-GFP in *Arabidopsis thaliana*.
Protoplasma 242: 19-33. (2010) 査読有. DOI: 10.1007/s00709-010-0119-7
- ⑥ Itoh RD, Fujiwara MT.
Regulation of leucoplast morphology in roots: interorganellar signaling from mitochondria?
Plant Signaling Behavior 5(7):856-859. (2010) 査読有. DOI:10.1111/j.1399-3054.2010.01352.
- ⑦ Itoh RD, Yamasaki H, Septiana A, Yoshida S, Fujiwara MT.
Chemical induction of rapid and reversible plastid filamentation in *Arabidopsis thaliana* roots.
Physiologia Plantarum 139(2):144-158. (2010) 査読有. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2010.01352.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 箸本春樹
細胞内共生説に魅せられて
日本植物形態学会第 24 回大会 (2012 年 9 月 14 日) 姫路
日本植物形態学会学会賞受賞講演
- ② 山本弘貴, 箸本春樹
緑藻 *Klebsormidium flaccidum* の細胞周期における微小管の動態
日本植物形態学会第 23 回大会 (2011 年 9 月 16 日)
- ③ Hashimoto, Haruki
Electron microscopic study on division of secondary plastids surrounded by four membranes in chromophyte algae.

VI European Congress of Protistology
(2011年7月25日) ベルリン

- ④ Fujiwara MT, et al.
'Plastid replication in leaf
epidermis: Insights from the *atminE1*
mutant of *Arabidopsis*'
第52回日本植物生理学会年会, 2011年3
月22日, 仙台
- ⑤ Fujiwara MT, et al.
'Plastid replication in leaf
epidermis: Insights from the *atminE1*
mutant of *Arabidopsis*'
The 21st International Conference on
Arabidopsis Research (ICAR2010), 7
June 2010, Yokohama

[その他]

ホームページ情報 (上智大学内教員教育研究
情報データベース) :

<http://librsh01.lib.sophia.ac.jp/Profiles/70/0006951/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

箸本 春樹 (HASHIMOTO HARUKI)
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授)
研究者番号 : 90134410

(2) 研究分担者

藤原 誠 (FUJIWARA MAKOTO)
上智大学・理工学部・准教授
研究者番号 : 90332345