

## 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 4 日現在

機関番号：32621  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22780087  
 研究課題名（和文） シロイヌナズナ分裂組織におけるプロプラスチド分裂機構の解析  
 研究課題名（英文） Dissecting the mechanisms of proplastid replication in meristematic tissues of *Arabidopsis thaliana*  
 研究代表者  
 藤原 誠 (FUJIWARA MAKOTO)  
 上智大学・理工学部・准教授  
 研究者番号：90332345

研究成果の概要（和文）：種子植物では、成熟組織の色素体は分裂組織のプロプラスチドが増殖・分化することによって形成される。本研究では、シロイヌナズナの胚珠発生過程に着目しプロプラスチド増殖制御に関する細胞生物学的研究を行った。4 種の色素体分裂異常変異体を解析した結果、プロプラスチドと葉緑体では色素体表現型が大幅に異なることが示された。さらに、プロプラスチドには分裂装置が不全の際にもそれを克服する増殖システムが働くことが示唆された。

研究成果の概要（英文）： We investigated the regulatory mechanisms of proplastid division using meristematic tissues of *Arabidopsis*. Our results showed that terminal plastid phenotypes critically differ between proplastids and chloroplasts in several plastid division mutants. Furthermore, proplastids could replicate themselves with unknown mechanisms upon defects in the plastid division apparatus.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、応用生物化学

キーワード：色素体・葉緑体・シロイヌナズナ

## 1. 研究開始当初の背景

色素体は進化的にシアノバクテリアが宿主真核生物に細胞内共生して発生したオルガネラである。光合成組織の色素体（葉緑体）は一細胞当たり数十から数百個に達する。それらは茎頂分裂組織の少数のプロプラスチド（未分化な色素体）に由来する。90年代後半より、シロイヌナズナをはじめとする植物

ゲノム計画の成果により、バクテリアの細胞分裂遺伝子 *FtsZ* や *MinD*、*MinE* の相同遺伝子が植物核ゲノムに保持されていること、さらにそれらの産物が実際に葉緑体分裂制御因子として機能することが証明された。また、90年代に取得されたシロイヌナズナ葉緑体分裂異常変異体 *arc* の原因遺伝子が単離され、真核生物の膜分裂に関わるダイナミン様タ

ンパク質 (ARC5)、シアノバクテリアと植物に特有の膜タンパク質 (ARC6) が葉緑体分裂に関わることが明らかにされた。これらの成果により、葉緑体分裂は保存的機構と共生後の革新的機構とが協調して働くイベントであることが明らかとなった。

従来、色素体分裂研究は主に葉緑体を用いて進められてきた。その一方で、「葉緑体分裂制御は他の色素体にも普遍的か否か」という問いは当分野で長年議論されてきた。とりわけプロプラスチドは植物全組織における色素体形成の基本であり、その分裂制御は重要な課題となる。しかし、プロプラスチド分裂の研究は国内外いずれでもあまり進んでいない。理由として、プロプラスチドは約 1 $\mu$ m の無色オルガネラであり葉緑体と比較して検出困難であること、分裂組織は微小な細胞集団であり、Z 軸での細胞・オルガネラの識別が顕微鏡レベルで必ずしも容易でないことなどが挙げられる。

## 2. 研究の目的

研究代表者は近年、非光合成色素体の生体観察系の開発を独自に進めてきた。その結果、シロイヌナズナ胚珠形成時に表皮アミロプラスト (デンプン貯蔵色素体) の分化・増殖を蛍光タンパク質を用いて効率よく検出できることを見出した。さらに、発生ステージを遡ることにより、アミロプラスト前駆体のプロプラスチドにも拡張可能であることを予備的に確認した。この観察法は、シロイヌナズナの充実した変異体リソースと組み合わせれば、効果的なものとなる。本研究では、シロイヌナズナの色素体分裂異常変異体リソースと本観察法を用いてプロプラスチド分裂制御に関する研究を行うことにした。

## 3. 研究の方法

4 種の色素体分裂異常変異体のプロプラスチドを蛍光タンパク質により標識し、高感度蛍光観察によりその形態的特徴をプロフィール化することにした。

具体的には、

(A) 研究代表者らにより作出されたカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター制御下色素体 AtFtsZ1 ストロマ移行シグナル配列と YFP または CFP との融合タンパク質 (CaMV35Sp::TP-YFP, CaMV35Sp::TP-CFP) を安定に発現するシロイヌナズナ系統と、一連の変異体とを交配する。

(B) 交配 F3 世代を得て、通常シロイヌナズナ生育条件で培養し、雌蕊から胚珠を切開抽出する。

(C) 高感度蛍光検出装置により生体プロプラスチドをモニターする。これにより、特徴的なオルガネラ形態に関する基本情報を得る。

なお、研究代表者は研究開始年度に申請時とは異なる機関に異動した。モデル植物シロイヌナズナの実験設備などを新規整備しつつ計画を進める必要性が生じたため、本計画は当座可能な実験から着手することに変更したものである。

## 4. 研究成果

(1) 生体プロプラスチド標識シロイヌナズナ系統の作製

代表的な色素体増殖異常変異体 (*arc5*, *arc6*, *arc11*, *minE*) の種子を英・米・仏の種子ストックセンターから入手した。標準的実験法に基づき、各種シロイヌナズナ系統の栽培を行った。変異体を♀、色素体局在型蛍光タンパク質発現系統を♂として交配し、F3 世代以降を解析材料として用いた。なお、いずれの変異体も蛍光タンパク質発現の有無に関わりなく、安定な葉緑体分裂異常 (劣性) 表現型を示した。

(2) プロプラスチド分裂・形態表現型の解析

### ① 野生型

シロイヌナズナの外珠皮の細胞は受精後付近から顕著にデンプン粒を蓄積する。前過程の胚珠形成段階では、分裂活性を有した表皮細胞中にプロプラスチドが観察された (図 1)。

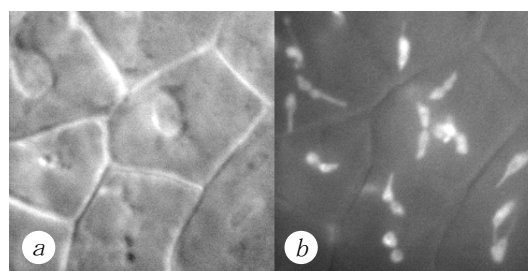


図 1. 野生型バックグラウンドにおけるプロプラスチド表現型. (a) 微分干渉像. (b) ストロマ蛍光像.

プロプラスチドでは管状の包膜構造ストロミュールが活発に伸縮するという、他の非光合成色素体と共通の特徴が見られた。また、二裂の形状のプロプラスチドはその構造の安定性などから二分裂の過程にあるものと推察された。

## ② *arc5* 変異体

ダイナミン様タンパク質遺伝子中に変異を持つ *arc5* は、分裂が途中停止したダンベル型の葉緑体を葉肉細胞中に蓄積する。しかしプロプラスチドに関しては、野生型と変異体の間に明瞭な違いが見られなかった (図2)。

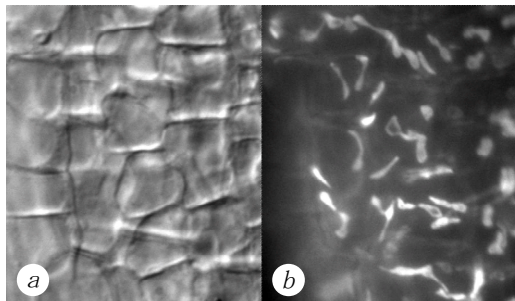


図2. *arc5* におけるプロプラスチド表現型。(a)微分干渉像。(b)ストロマ蛍光像。

プロプラスチドは ARC5 非依存的に増殖可能であることが示唆される。これと同様の傾向はアミロプラストでも観察された。

## ③ *arc6* 変異体

*arc6* 変異体は、葉緑体ストロマの FtsZ リング形成能を失っており、重篤な葉緑体分裂阻害表現型を示す。プロプラスチドでは、増殖阻害効果とともにストロミュールが異常に発達した様子が観察された (図3)。

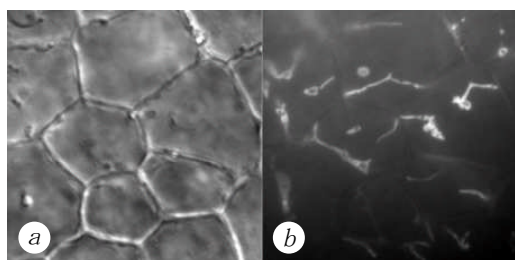


図3. *arc6* におけるプロプラスチド表現型。(a)微分干渉像。(b)ストロマ蛍光像。

## ④ *arc11* 変異体

*arc11* は保存的因子 *MinD* のミスセンス変異体であり、葉緑体において FtsZ リング形成の空間的異常を示す。プロプラスチドに関しては、野生型と同様の表現型であった (図4)。

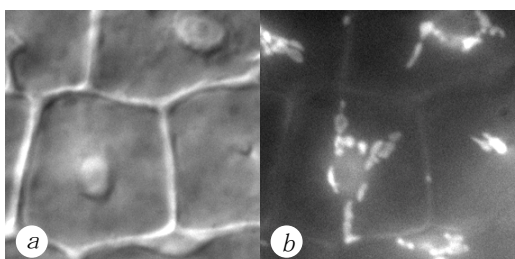


図4. *arc11* におけるプロプラスチド表現型。(a)微分干渉像。(b)ストロマ蛍光像。

## ⑤ *minE* 変異体

*minE* (*atminE1* 変異体) は *arc6* とともに重度の葉緑体分裂阻害を引き起こす。*minE* のプロプラスチドは、*arc6* に類似した異常表現型を示した。ミニプロプラスチドの形成とともに、巨大化プロプラスチドからストロミュール形成が活性化することが観察された (図5)。

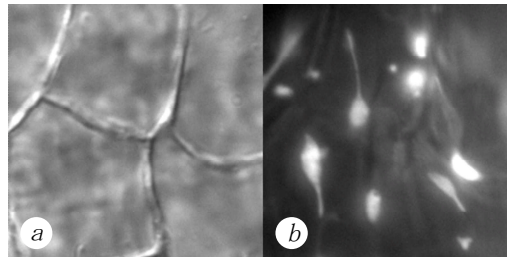


図5. *minE* におけるプロプラスチド表現型。(a)微分干渉像。(b)ストロマ蛍光像。

以上の結果は、色素体分裂異常変異が葉緑体とプロプラスチドに対し異なる結果をもたらすことを示している。興味深いことに、一葉肉細胞あたり一個または数個の葉緑体しか形成されない *arc6* や *minE* でも、プロプラスチドは一細胞あたり複数個存在し、しかも細胞分裂が活発な状況でも両娘細胞への (1 個以上の) 色素体分配は正常に働くことが示唆された。

## (3) 「非常時色素体増殖システム」の検証

これらの結果が示す、分裂装置不全 (FtsZ リング形成不全) の際でも増殖を可能にする「非常時色素体増殖システム」の概念を確定すべく、*ftsZ* 完全欠失変異体 (核コード *ftsZ* の三重遺伝子変異体。種子は分譲) におけるプロプラスチドの蛍光可視化を試みた。当初、他の変異体と同様に交配により目的植物の作製を進めたが、ホモ *ftsZ* 変異かつ蛍光タンパク質高発現の個体を得ることができなかった。そこでアグロバクテリウム感染により CaMV35Sp::TP-YFP 遺伝子を変異体に形質転換する実験を進めた。YFP 陽性の実生を一次選抜し、次世代で二次選抜した。T3 世代でも YFP 蛍光を維持していた系統を幾つか得ることができた。これらの系統のプロプラスチドをモニターする作業は現在進行中である。今後、さらにプロプラスチドの増殖・分化を発生系列で追い、色素体の形態・振る舞いの定量化に到達すれば、分裂装置の欠損を克服する新規制御の実体につながるのではないかと期待された。

## 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 6 件)

- ① Kazama Y, Fujiwara MT, Takehisa H, Ohbu S, Saito H, Ichida H, Hayashi Y, Abe T (2013) Characterization of a heavy-ion induced white flower mutant of allotetraploid *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Reports* 32:11-19. (査読有), DOI:10.1007/s00299-012-1336-7
- ② Kazama Y, Nishihara K, Bergero R, Fujiwara MT, Abe T, Charlesworth D, Kawano S (2012) *SIWUS1*: An X-linked gene having no homologous Y-linked copy in *Silene latifolia*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 2:1269-1278. (査読有), DOI:10.1534/g3.112.003749
- ③ Fujiwara MT, Yoshioka Y, Hirano T, Kazama Y, Abe T, Hayashi K, Itoh RD (2012) Visualization of plastid movement in the pollen tube of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 7:34-37. (査読有), DOI: 10.4161/psb.7.1.18484
- ④ Fujiwara MT, Hashimoto H, Kazama Y, Hirano T, Yoshioka Y, Aoki S, Sato N, Itoh RD, Abe T (2010) Dynamic morphologies of pollen plastids visualised by vegetative-specific FtsZ1-GFP in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 242:19-33. (査読有), DOI: 10.1007/s00709-010-0119-7
- ⑤ Itoh RD, Fujiwara MT (2010) Regulation of leucoplast morphology in roots: interorganellar signaling from mitochondria? *Plant Signaling & Behavior* 5:856-859. (査読有), DOI: 10.1111/j.1399-3054.2010.01352.x
- ⑥ Itoh RD, Yamasaki H, Septiana A, Yoshida S, Fujiwara MT (2010) Chemical induction of rapid and reversible plastid filamentation in *Arabidopsis thaliana* roots. *Physiologia Plantarum* 139:144-158. (査読有), DOI:10.1111/j.1399-3054.2010.01352.x

[学会発表] (計 2 件)

- ① Fujiwara M. 'Plastid replication in leaf epidermis: Insights from the *atminE1* mutant of *Arabidopsis thaliana*', 第 52 回日本植物生理学会年会, 2011 年 3 月 11 日, 仙台
- ② Fujiwara M. '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]

- ① 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  
藤原 誠 (FUJIWARA MAKOTO)  
上智大学・理工学部・准教授  
90332345