

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 5 月 31 日現在

機関番号：12201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870002

研究課題名（和文）植物低温応答の細胞内ダイナミクス

研究課題名（英文）Intracellular dynamics of plant cell under cold conditions

研究代表者

児玉 豊 (KODAMA YUTAKA)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・助教

研究者番号：00455213

研究成果の概要（和文）：本研究では、植物細胞の低温応答機構を明らかにするため、苔類ゼニゴケを用いて低温誘導性の細胞小器官運動の解析を行った。その結果、低温処理後のゼニゴケ細胞では、葉緑体および核、ペルオキシソームが同調的に細胞内配置を変化することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To understand intracellular dynamics of plant cell under cold conditions, cold-induced organelle relocation movements were studied in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. Our findings revealed that chloroplasts, nucleus and peroxisomes concurrently change their positions in the cell after cold treatments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
23 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
24 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：植物細胞、低温応答、細胞小器官、蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

我々は、以前、低温誘導性の葉緑体定位運動（低温定位運動）に関して報告しており、現在、運動様式や分子機構の解明を目指している (Kodama et al. 2008 J Plant Res)。低温定位運動とは、低温処理によって細胞内の葉緑体配置が変化する現象のことであり、シダやコケなどの植物で発見されている。たとえば、ホウライシダの配偶体である前葉体を 25℃・弱光下で処理した場合、葉緑体は効率良く光に当たるために細胞表面に集合するが、前葉体を 4℃・

弱光下で処理した場合、葉緑体は弱光にも関わらず細胞接着面に定位することが知られている（図 1）。しかしながら、細胞小器官の低温定位運動の詳細については、ほとんどわかっていない。

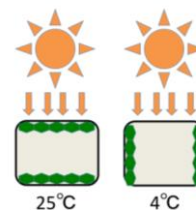


図 1. 葉緑体の低温定位運動

2. 研究の目的

本研究では、植物の生細胞を用いて葉緑体を含む様々な細胞小器官の低温定位運動を詳細に解明することを目的とした。具体的には、以下の2つの実験を行った。

- (1) 温度制御可能な顕微鏡装置の開発
- (2) 蛍光を用いた生細胞イメージング

3. 研究の方法

(1) 温度制御可能な顕微鏡装置の開発

温度制御可能な顕微鏡装置の開発は、サムトロン株式会社（本社：宇都宮市）と共同で開発した。

(2) 蛍光を用いた生細胞イメージング

生細胞イメージングには、近年、新興モデル植物として注目されている苔類ゼニゴケを実験材料として用いた（図2）。葉緑体をクロロフィル蛍光で、葉緑体以外の細胞小器官を蛍光タンパク質で可視化し、低温処理後の細胞内配置変化について解析した。蛍光タンパク質の可視化には、形質転換が必要であったが、ゼニゴケではアグロバクテリウムを介した形質転換法が確立されていたため、それを利用した。



図2. 胞子を播種して10日後のゼニゴケ葉状体

4. 研究成果

(1) 温度制御可能な顕微鏡装置の開発

温度を±0.1℃の誤差で制御することができる温度制御顕微鏡ステージを開発した。また温度制御装置だけでなく、微束光照射装置も構築した。本装置を用いて、今後、低温定位運動の詳細な運動様式が明らかにできると考えている。

(2) 蛍光を用いた生細胞イメージング

ゼニゴケにおいてペルオキシソーム、ミトコンドリア、核を可視化するため、黄色蛍光タンパク質遺伝子に細胞小器官移行配列を付加したキメラ遺伝子を構築し、植物発現用バイナリーベクターに挿入した。次に、アグロバクテリウムを介した形質転換法によって、黄色蛍光タンパク質がそれぞれの細胞小器官に蓄積した形質転換ゼニゴケを作出した（図3, 図4, 図5）。

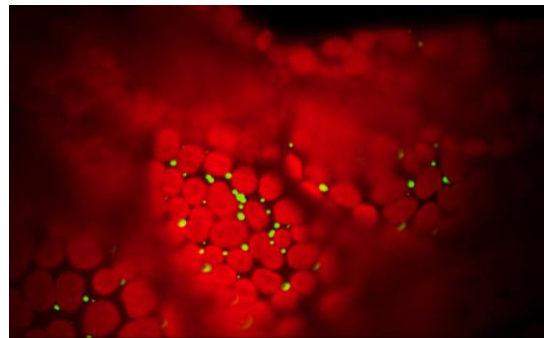


図3. 黄色蛍光タンパク質を用いたペルオキシソームの可視化

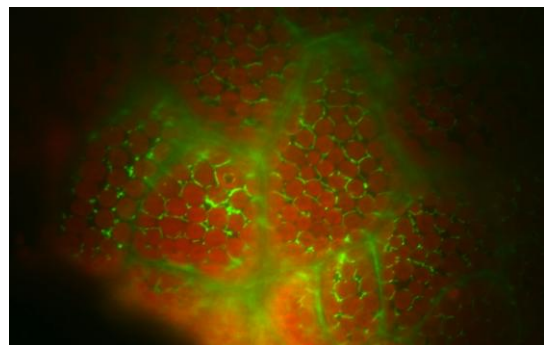


図4. 黄色蛍光タンパク質を用いたミトコンドリアの可視化

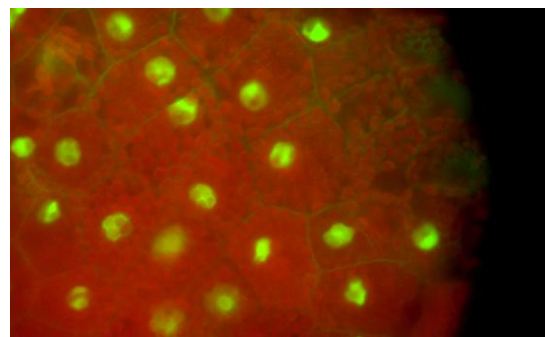


図5. 黄色蛍光タンパク質を用いた核の可視化

また葉緑体は、クロロフィル蛍光を利用して可視化した (図 6)。

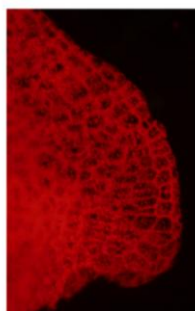


図 6. クロロフィル蛍光を利用した葉緑体の可視化

これらの形質転換ゼニゴケを用いて詳細な解析を行ったところ、葉緑体および核、ペルオキシソームは低温処理に応答して、細胞表面から細胞接着面へと配置を変化する運動を持つことがわかった (Ogasawara et al. 2013 *Plant Cell Environ*)。特に、葉緑体とペルオキシソームは、物理的に相互作用しており、同調的に運動が誘導されることがわかった。また、ミトコンドリアには低温応答運動が無いこともわかった。植物は、このような細胞小器官運動を介して、低温環境に適応しているのかもしれない。

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 3 件)

Ogasawara Y, Ishizaki K, Kohchi T and Kodama Y (2013) Cold-induced organelle relocation in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant, Cell & Environment* (印刷中) 査読有

Kodama Y and Hu CD (2013) Bimolecular fluorescence complementation analysis of protein-protein interaction: How to calculate signal-to-noise ratio. *Methods in Cell Biology* 113:107-121. 査読無

Kodama Y and Hu CD (2012) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. *BioTechniques* 53:285-298. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

Kodama Y “Organelle cryorelocation in *Marchantia polymorpha* L.” International *Marchantia* Workshop 2012・Aso, Japan・November 2012

Kodama Y “A rapid and simplified genetic transformation method for *Marchantia polymorpha* L.” International *Marchantia* Workshop 2012・Aso, Japan・November 2012.

小笠原有香、石崎公庸、河内孝之、児玉豊 “ゼニゴケを用いた細胞小器官の低温応答運動の解析” 第 30 回日本植物細胞分子生物学会大会・生駒・8 月・2012 年

児玉豊 “高輝度かつ正確なタンパク質間相互作用イメージングを目指した二分子蛍光補完法の改良” 第 53 回日本植物生理学会・シンポジウム「最先端イメージングが拓く植物科学の新時代」・京都・3 月・2012 年

児玉豊 “緑色二分子蛍光補完(BiFC)法の高輝度化” 第 29 回日本植物細胞分子生物学会大会・福岡・9 月・2011 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

研究室ホームページ

<http://c-bio.mine.utsunomiya-u.ac.jp/lab/kodama.html>

宇都宮大学研究拠点創成ユニット (UU-COE)

<http://c-bio.mine.utsunomiya-u.ac.jp/uu-coe/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 豊 (KODAMA YUTAKA)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・助教

研究者番号：00455213