

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570042

研究課題名(和文)可塑的な葉緑体分化の分子機構

研究課題名(英文)Molecular Mechanism of Chloroplast development Plasticity

研究代表者

増田 建(Masuda, Tatsuru)

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号：00242305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で可塑的な葉緑体分化の分子機構の解明に取り組んだ。地上部から切り離された根で、オーキシンとサイトカイニンにより緑化が誘導されるを見出した。そのメカニズムとして、地上部を喪失した根ではオーキシンによる抑制が減少し、さらに傷害部におけるサイトカイニンシグナルが活性化され、緑化が誘導されることを明らかにした。

この葉緑体分化は光合成関連遺伝子群の協調的な転写活性化を伴っており、転写因子のHY5とGLKが、相互作用しながら光合成関連遺伝子の発現を活性化させることを明らかにした。さらに、GLKを過剰発現した根では葉緑体の分化が強く誘導され、野生株と比べ高い光合成活性を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have studied the molecular mechanism of chloroplast development plasticity. We found that in excised Arabidopsis roots, chloroplast differentiation is activated through auxin- and cytokinin-signal transduction pathways. By excision of roots, suppression of chloroplast development by auxin, which is supplied from aerial tissues, is attenuated, while the cytokinin signal is activated by wounding, resulting in significant chloroplast development in excised roots. For this chloroplast development, coordinated transcriptional activation of nuclear-encoded photosynthesis genes is involved. We found transcription factors, HY5 and GLK, are actually involved in this activation. Interestingly, overexpressors of GLK showed pronounced induction of chloroplast development in intact roots and they showed higher photosynthetic competency when compared to that of wild type.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：葉緑体分化 転写因子 転写制御 光合成

1. 研究開始当初の背景

葉緑体は、シアノバクテリアの細胞内共生により誕生し、単細胞藻類から高等植物に至るまで、光合成反応の場として光エネルギー変換を担っている。一方、陸上植物へと進化する過程で、植物は葉緑体を様々な色素体へと分化させ、多様な環境に適応していった(図1)。実際、高等植物の葉肉細胞では葉緑体が発達する一方、根や花弁などの非光合成器官の色素体では葉緑体形成は抑制され、アミロプラストやクロモプラストに分化している。

植物は高度な多細胞系へと進化する過程で、細胞や組織の役割に応じて葉緑体の分化を誘導または抑制する機構を獲得してきたと考えられるが、その詳細な制御機構は未だに不明である。特に、葉緑体発達に関わる研究は専ら葉など光合成器官で行われ、非光合成器官・組織における葉緑体分化抑制機構についてはほとんど考慮されてこなかった。そこで申請者は、可塑的な葉緑体分化機構の解明には、非光合成器官における葉緑体分化抑制機構の解明が重要であるとの着想のもと、シロイヌナズナの根をモデルに研究を行ってきた。

シロイヌナズナの根は炭素源をソースである地上部に依存しており、通常緑化は抑制されている。しかし申請者らは、地上部から切り離された根では葉緑体分化が誘導され、光照射下で新たな光合成組織の構築が促進されることを見出した。実際、タンポポの切除根などでは、緑化に引き続き地上部の再生が容易に観察されることから、これは植物の生存戦略の1つと捉えることができる。さらに、この葉緑体分化誘導には植物ホルモンである

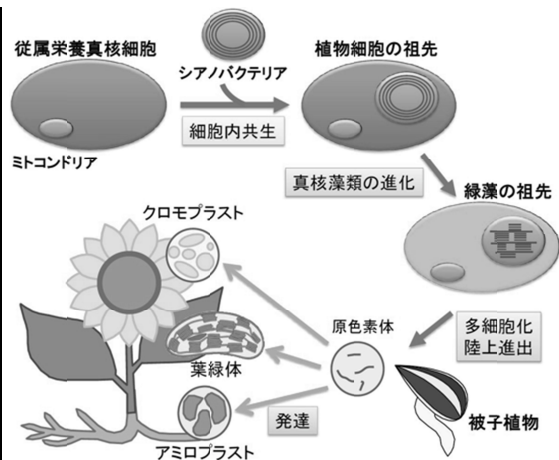


図1 植物進化における葉緑体獲得と、多細胞化に伴う色素体分化制御。

オーキシンとサイトカイニンが関与していることを明らかにした。通常、根では地上部から輸送されるオーキシンにより葉緑体分化が強く抑制されている。しかしこの抑制は、地上部を喪失した根で減少し、同時に傷害部におけるサイトカイニンシグナルの促進により、葉緑体分化が誘導されることが明らかとなってきた。実際、サイトカイニン処理やオーキシンシグナルの変異により、根での葉緑体分化が誘導(脱抑制)され、クロロフィルの蓄積や葉緑体チラコイド膜が発達すると共に、光合成電子伝達反応が増大することを明らかにした。

さらに、この葉緑体分化における光合成光化学系の構築には、核コードのクロロフィル合成および光合成関連遺伝子の協調的な転写活性化を伴うことを明らかにした。実際、光シグナルの転写因子 HY5 と植物ホルモンシグナルの転写因子 GLK(GLK1 及び GLK2 が、これら遺伝子の協調的な転写活性化に関与していることを見出した。驚くべき事に、GLK1 の過剰発現により、根の維管束周辺細胞にお

いて顕著な葉緑体分化が誘導され(図2)、新鮮重辺りで葉の約10%に達するクロロフィルを蓄積できることを明らかにしている。以上のように、申請者らの解析により、非光合成器官である根においても、葉緑体分化を誘導できることが明らかとなってきた。

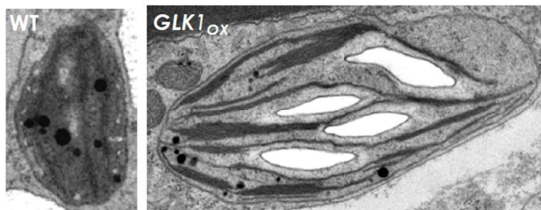


図2 GLK1 過剰発現株の根における色素体の微小構造。左：野生株、右：GLK1 過剰発現株。

2. 研究の目的

本研究では、上記の研究をさらに発展させるため、研究期間内に(1)葉緑体分化抑制機構の解明、(2)葉緑体分化に関わる転写因子の同定・遺伝子導入、および(3)葉緑体分化に伴う光合成能力の評価に取り組み、可塑的な葉緑体分化の分子機構の解明にさらに迫ることとした。

3. 研究の方法

- (1) 根での葉緑体分化に関与する組織特異的なシグナル伝達因子を変異体解析や遺伝子導入実験による解析を行った。
- (2) 葉緑体分化に関与する複数の転写因子について、トランスクリプトーム解析ならびに qRT-PCR による発現解析を行った。
- (3) 根において分化した葉緑体における光合成光化学系の構築について、光化学系タンパク質の蓄積、クロロフィル蛍光分析、およ

び色素分析による評価を行った。

4. 研究の成果

- (1) 根の葉緑体分化抑制にはオーキシンとサイトカイニンが深く関与している。通常、根では地上部から輸送されるオーキシンにより葉緑体分化が強く抑制されている。しかし、地上部を喪失した根ではオーキシンによる抑制が減少し、それと同時に傷害部におけるサイトカイニンシグナルが活性化され、緑化が誘導されることを明らかにした。さらにシロイヌナズの変異体や形質転換体解析により、その情報伝達には、傷害応答に関与する WIND1 によるサイトカイニン合成誘導が、タイプB ARRである ARR1, ARR12 を介して、サイトカイニン応答性転写因子である GLK2 や CGA1 を活性化して、葉緑体の分化を促進すること、またオーキシンはその脱抑制に働くことを明らかにした(図3)。

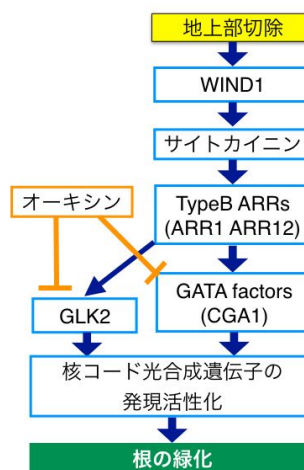


図3 根における葉緑体分化抑制機構の情報伝達系

- (2) 葉緑体分化において、複数の転写制御因

子が共同して光合成装置形成に関わる遺伝子群を協調的に転写調節するメカニズムが存在する。実際、20以上の光合成遺伝子が共発現しており、これらのプロモーター領域には共通したシス配列が保存されていることを見出した。さらにサイトカニン処理やオーキシン変異体 (*slr-1*) において、緑化した根で発現が誘導されている転写因子のトランスクリプトーム解析およびqRT-PCRによる個別解析を行った。さらにシロイヌナズの変異体や形質転換体解析により、これらの転写因子がGLKやHY5とは独立に活性化されることを明らかにした。

(3) GLKを過剰発現した根では葉緑体の分化が強誘導され、野生株と比べ高い光合成活性を有することを明らかにした。GLKを過剰発現した根では、GLKの直接のターゲット遺伝子だけでなく、その他の核コード光合成関連遺伝子や葉緑体コードの光合成遺伝子も高い発現を示したことから、葉緑体の機能や光合成に関わる遺伝子の発現を協調的に制御する仕組みが働いていることが明らかとなった。

以上のように、本研究では研究計画に則り研究を行い、研究期間中(H24~H27)に有意義な成果を治めることに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Listiawan DA, Tanoue R, Kobayashi K, Masuda T (2015) Expression analysis of transcription factors involved in chloroplast differentiation.

Procedia Chem. 14: 146-151. (査読有)

doi:10.1016/j.proche.2015.03.021

Kobayashi K, Masuda T, Tajima N, Wada H, Sato N (2014) Molecular phylogeny and intricate evolutionary history of the three isofunctional enzymes involved in the oxidation of protoporphyrinogen IX. *Genome Biol. Evol.* 6: 2141-2155. (査読有)

doi:10.1093/gbe/evu170

Kobayashi K, Fujii S, Sasaki D, Baba S, Ohta H, Masuda T, Wada H (2014) Transcriptional regulation of thylakoid galactolipid biosynthesis coordinated with chlorophyll biosynthesis during the development of chloroplasts in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 5: Article272. (査読有)

doi: 10.3389/fpls2014.00272

Kobayashi K, Sasaki D, Noguchi K, Fujinuma D, Komatsu H, Kobayashi M, Sato M, Toyooka K, Sugimoto K, Niyogi KK, Wada H, Masuda T (2013) Photosynthesis of root chloroplasts developed in *Arabidopsis* lines overexpressing GOLDEN2-LIKE transcription factors. *Plant Cell Physiol.* 54: 1365-1377. (査読有)

doi:10.1093/pcp/pct086

Kobayashi K, Narise T, Sonoike K, Hashimoto H, Sato N, Kondo M, Nishimura M, Sugimoto K, Masuda T, Ohta H (2012) Role of galactolipid

biosynthesis in coordinated development of photosynthetic complexes and thylakoid membranes during chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 73: 250-261. (査読有)

doi: 10.1111/tpj.12028

Kobayashi K, Obayashi T, Masuda T (2012) Role of the G-box element for regulation of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis* root. *Plant Signal. Behavior*, 7: 922-926. (査読有)

doi: 10.4161/psb.20760

Kobayashi K, Baba S, Obayashi T, Keranen M, Aro EM, Fukaki H, Ohta H, Masuda T (2012) Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24: 1081-1095. (査読有)

doi: 10.1105/tpc.111.092254

[学会発表](計2件)

Masuda T (2014) Plastid differentiation controlled by coordinate transcriptional regulation of nuclear-encoded photosynthetic genes. International Conference on Natural Sciences (ICON2014), Indonesia.

Masuda T (2014) Chloroplast differentiation. Academia Synica Symposium, Taiwan.

[図書](計1件)

理系総合のための生命科学 第3版
(2013)東京大学生命科学教科書編集委員会、羊土社、分担執筆

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

<http://webpark1435.sakura.ne.jp/wp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田建 (MASUDA, Tatsuru)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号: 00242305

(2) 連携研究者

小林康一 (KOBAYASHI, Koichi)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号: 40587945