

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657036

研究課題名(和文)シグナル伝達及び光合成の時空間イメージングによる葉緑体の個性についての研究

研究課題名(英文)Studies on chloroplast personalities by visualizing cellular signal transduction processes and photosynthesis.

研究代表者

椎名 隆 (Shiina, Takashi)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：10206039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：色素体は組織によって異なる機能や形態をもつ。本研究では、組織によって色素体の免疫応答における役割や色素体Ca<sup>2+</sup>シグナルの発生が異なることを明らかにした。まず、根と葉の色素体で、ストレスに応答して、異なった色素体Ca<sup>2+</sup>シグナルが生じることを明らかにした。また、表皮細胞の色素体が免疫応答におけるサリチル酸合成で特有な役割を果たしている可能性を示した。さらに、下胚軸の表皮細胞の葉緑体で、ABAやサリチル酸によるストロミュール誘導がCa<sup>2+</sup>やROSシグナルによって制御されていることも明らかにした。これらの研究から、色素体が組織別に特有の機能を持つことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Different tissues contain various types of plastids that differ in function and morphology. This study revealed that plastids have distinct functions in plant immunity and Ca<sup>2+</sup> signaling in a tissue-specific manner. Plastids in leaves and roots evoked distinct Ca<sup>2+</sup> signals in response to biotic and abiotic stresses such as salt and osmotic stresses. Furthermore, we found that plastids in epidermis have a specific role in biosynthesis of salicylic acid in plant immunity. Interestingly, we demonstrated that Ca<sup>2+</sup> and ROS signaling play critical roles in the induction of stromules in chloroplasts in epidermal cells of hypocotyles. These results imply that plastids in distinct tissues have specialized roles.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物分子・生理科学

キーワード：葉緑体 Ca<sup>2+</sup> ROS 表皮 免疫 ストロミュール

### 1. 研究開始当初の背景

高等植物細胞は、組織ごとに形態や機能が異なった色素体をもつ。また、1細胞内に複数の葉緑体を持つ。しかし、組織ごとに異なる細胞で色素体が個別にどのような機能を有しているのか、1細胞中の葉緑体が全て同じ機能を有するのか、個別に異なる機能を持つのかははっきり分かっていない。例えば、植物免疫応答に葉緑体が重要な働きをしていることを研究代表者等が明らかにしているが、表皮細胞や葉肉細胞の葉緑体の役割分担は分かっていなかった。また、葉緑体にもストレス応答  $Ca^{2+}$  シグナルが生じることが分かっているが、根などの非光合成色素体の  $Ca^{2+}$  シグナルについても情報が無かった。また、葉緑体間のコミュニケーションに働いていると考えられる構造にストロミュールと呼ばれるチューブ様構造が知られている。ストロミュールはストレスによって誘導されるが、その誘導機構も良く分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

高等植物細胞は、組織ごとに形態や機能が異なった色素体をもつ。また、1細胞内に複数の葉緑体を持つ。本研究の目的は、葉緑体が組織や細胞内で、異なった機能を持つ可能性を検証し、さらに葉緑体間のコミュニケーションの可能性を検討することである。特に、葉緑体が“個”として独立して振る舞うのか？それとも、互いにコミュニケーションを取り“集団的”に行動するのかを明らかにすることにを目標とした。盛んに融合を繰り返すミトコンドリアや膜輸送系で時空間的に連続している単膜系オルガネラと異なり、植物の葉緑体は独立性が高いと思われているが、そのエビデンスは乏しい。葉緑体のコミュニケーションを直接検証する。また、 $Ca^{2+}$  スパイク、ROS シグナルなどの単一葉緑体イメージング系を確立を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 植物免疫応答における葉緑体の組織別機能

サリチル酸輸送体の候補である EDS5 の C 末端に GFP をつないだ融合タンパク質を発現させた形質転換植物を作成し、GFP 蛍光の細胞内局在を解析した。この際、EDS5 自己プロモータおよび 35S 恒常発現プロモータから融合遺伝子を発現する植物をそれぞれ作成し実験に用いた。形質転換体のサリチル酸量は HPLC によって、遺伝子発現量は qPCR 法により測定した。また、クロロフィル蛍光寿命の測定は、蛍光寿命顕微鏡によって測定した。

#### (2) 葉緑体 $Ca^{2+}$ シグナルの組織特異性

葉緑体のストロマに  $Ca^{2+}$  センサータンパク質イクオリンを発現させた形質転換植物を作成し、ストロマ  $Ca^{2+}$  濃度のダイナミクスを測定した。

#### (3) 葉緑体ストロミュールの解析

葉緑体からのびるチューブ様構造ストロミュールは、GFP を葉緑体中で発現する葉緑体形質転換植物 KH6 を用いて可視化した。実生の下胚軸では、ABA や SA に応答してストロミュールが誘導される。ABA や SA によるストロミュール誘導に対して  $Ca^{2+}$  や ROS 阻害剤を用いた薬理的解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 植物免疫応答における葉緑体の組織別機能

葉緑体は葉肉細胞で最も発達しており、活発な光合成反応を行っている。一方、孔辺細胞や表皮細胞にも、それぞれ異なった機能や形態の葉緑体が存在する。例えば、孔辺細胞の葉緑体は主に ATP 合成に特化して機能していると考えられている。表皮細胞には、サイズが小さくクロロフィル蛍光も低い未発達の色素体が存在するが、その機能については十分に分かっていない。

当該研究室では、葉緑体が植物免疫応答で重要な働きをしていることを明らかにしている (Nature commun. 2012)。葉緑体は  $Ca^{2+}$  結合タンパク質 CAS 依存的な逆行性シグナルを発信し、免疫応答遺伝子群の発現を制御していると考えられた。CAS 依存遺伝子の一つにサリチル酸輸送体の候補遺伝子 EDS5 がある。サリチル酸は植物免疫応答において中心的に働くシグナル分子で、シロイヌナズナでは葉緑体で合成され、細胞質に輸送されて働く。EDS5 は MATE タイプの輸送体ホモログで、サリチル酸輸送に関わっていると考えられていた。本研究では、EDS5 の細胞内局在や組織特異的発現について解析し、EDS5 が葉緑体包膜に局在する膜タンパク質であることを明らかにした。葉緑体から細胞質へのサリチル酸輸送に関係していると考えられる。また、EDS5::GFP 融合タンパク質の自己プロモータからの発現ラインの解析から、EDS5 が表皮細胞の葉緑体で特異的に発現していることも見いだした。この事実は、表皮細胞の葉緑体が、サリチル酸合成において特異的な役割を果たしている可能性を示唆する。

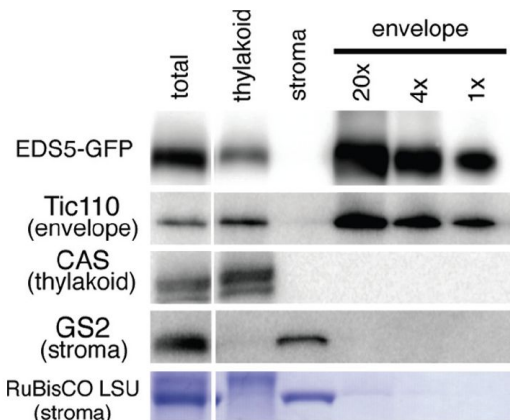


図1 EDS5-GFP の葉緑体包膜局在

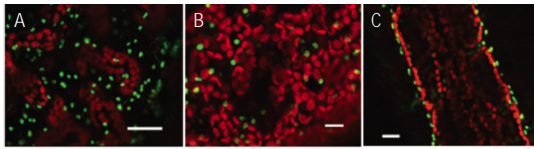


図2 EDS5-GFP の表皮特異的発現  
(A)葉の表皮細胞、(B)葉の羊肉細胞、(C)花茎における GFP 蛍光測定

上記の発見を遺伝子発現レベルで検証するために、表皮細胞特異的な遺伝子発現を定量化する手法の開発にも取り組んだ。粘着テープを用いて表皮細胞をはがす手法を用いて、葉肉細胞の混入のほとんどない表皮細胞/孔辺細胞票品を得ることができた。この標品の RNA 発現を分析したところ、EDS5 を初めとする免疫応答遺伝子の発現レベルが葉肉細胞よりも高いことを見いだした。ただしこの手法では表皮細胞に少なくない機械的ダメージが生じているので、より穏和な表皮細胞単離法の開発を継続して進めている。

以前の研究で、孔辺細胞と葉肉細胞の葉緑体で、光化学系 I と II の存在比率が異なることを明らかにしている (PCP 2010)。今回、葉の各組織におけるクロロフィル蛍光寿命を測定したところ、葉肉細胞、表皮細胞、孔辺細胞で異なった蛍光寿命が観察された。また、免疫応答遺伝子発現の制御に光合成の電子移動活性が関与することを明らかにしており、交合整形の違いが、免疫応答における組織ごとの葉緑体の役割の違いと関係している可能性が考えられた。

### (2) 葉緑体 $Ca^{2+}$ シグナルの組織特異性

葉の葉緑体は、病原菌 PAMP や様々な環境ストレスに応答して  $Ca^{2+}$  シグナルを生じる。根にはクロロフィルを持たない色素体 (白色体、アミロプラスト) が存在するが、これらの組織でも同様な  $Ca^{2+}$  シグナルが生じる可能性を検証した。その結果、細胞質と同様に、根の色素体においても塩ストレスや浸透圧ストレスに応答して  $Ca^{2+}$  シグナルが生じることを明らかにした。塩ストレスに対しても浸透圧ストレスに対しても、数十秒の持続時間のスパイク状のシグナル応答が見られた。さらに BAPTA やルテニウムレッドを用いた阻害剤実験の結果、塩ストレスに応答した色素体の  $Ca^{2+}$  シグナルについては、細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入および細胞質  $Ca^{2+}$  ストアからの放出が関係していることが分かった。これら根の色素体で生じる  $Ca^{2+}$  シグナルがどのような働きをしているかはこれからの研究課題である。

### (3) 葉緑体ストロミュールの解析

葉緑体からストロミュールと呼ばれるチューブ状構造が伸びている場合がある。ストロミュールは葉緑体間およびミトコンドリアなどの他の細胞小器官とのコミュニケーションや物質輸送に関係していると考えら

れるが、その機能は不明である。ストロミュールは乾燥などのストレスに応答して ABA を介して制御されていることが分かっている。本研究では、ストロミュールが ABA ばかりでなく SA によっても誘導されることを明らかにした。乾燥や病原体感染などのストレスに応答して個別の葉緑体が、葉緑体間あるいは他のオルガネラとの相互作用を行っている可能性が示唆された。

さらに本研究では、ストロミュール誘導におけるシグナル伝達機構について薬理的解析を行った。ABA によるストロミュール誘導は、細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入をブロックする BAPTA や  $La^{3+}$  によって阻害され、逆に  $Ca^{2+}$  イオノフォアであるイオノマイシンによって誘導された。また、ストロミュール誘導に活性酸素や一酸化窒素シグナルが関係していることも明らかにした。一方、 $Ca^{2+}$  シグナルや ROS シグナルがストロミュールを誘導する分子機構についてはまだ明らかにされていない。

## 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 6 件)

- 1) Yamasaki K, Motomura Y, Yagi Y, Nomura H, Kikuchi S, Nakai M, Shiina T. (2013) Chloroplast envelope localization of EDS5, an essential factor for salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* 8, e23603
- 2) Nakahira Y, Ishikawa K, Tanaka K, Tozawa Y, Shiina T. (2013) Overproduction of hyperthermostable -1,4-endoglucanase from the archaeon *Pyrococcus horikoshii* by tobacco chloroplast engineering. *Biosci Biotechnol Biochem.* 77, 2140-3
- 3) Kumazaki S, Akari M, Hasegawa M. Transformation of thylakoid membranes during differentiation from vegetative cell into heterocyst visualized by microscopic spectral imaging. *Plant Physiol.* 161, 1321-1333
- 4) Yagi, Y and Shiina, T. (2014) Recent advances in the study of chloroplast gene expression and its evolution. *Front. in Plant Sci.* 5:61. eCollection 2014.
- 5) Nomura, H. and Shiina, T. (2014) Calcium signaling in plant endosymbiotic organelles: mechanism and role in physiology. *Mol. Plant (in press)*
- 6) Radka Slovak, Christian Göschl, Xiaoxue Su, Koji Shimotani, Takashi Shiina and Wolfgang Busch (2014) A

scalable open-source pipeline for large-scale root phenotyping. Plant Cell (in press)

〔学会発表〕(計 18 件)

本村幸也, 八木祐介, 中平洋一, 戸澤謙, 椎名隆 葉緑体光転写制御におけるコムギ葉緑体 RNA ポリメラーゼ複合体の DNA 結合動態の解析 第 53 回日本植物生理学会 2013 年 3 月(京都)

石崎陽子, 岡本嘉明, 佐藤貴彦, 大藪泰, 椎名隆 ウルシノキのトランスクリプトーム解析 第 53 回日本植物生理学会 2013 年 3 月(京都)

山口咲希, 八木祐介, 椎名隆ミトコンドリア Ca<sup>2+</sup> センサータンパク質 AtMICU1 の機能解析 第 53 回日本植物生理学会 2013 年 3 月(京都)

下谷紘司, 神田ゆい, 中平洋一, 椎名隆 チラコイド膜 CAS タンパク質が制御する防御関連転写因子群の解析 第 53 回日本植物生理学会 2013 年 3 月(京都)

中井香奈, 金麗花, 中平洋一, 椎名隆 光条件に依存する植物病理応答遺伝子の発現解析 第 53 回日本植物生理学会 2013 年 3 月(京都)

野村裕也, 藤原正幸, 深尾陽一朗, 椎名隆, 吉岡博文 植物免疫における葉緑体ラジカル制御タンパク質 CAS の下流で働く因子の単離と解析第 53 回日本植物生理学会 2013 年 3 月(京都)

Shiina, T. "Chloroplast Ca<sup>2+</sup> and plant immunity" 3rd International Symposium on Chloroplast Genomics and Genetic. 2013 年 5 月 8-11 日 ニューブルンスウィック 米国

Yomogihara, S., Harada, N., Asakura, C., Yamaguchi, S., Ichikawa, M., Furuichi, T., Shiina, T. (2013) Functional Characterization of Mitochondrial Mechanosensitive Channel MSL1 in *Arabidopsis thaliana*. 第 24 回国際シロイヌナズナ研究会議 2013 年 6 月 24-28 日 シドニー オーストラリア

Shimotani1, K., Nakai1, K., Nomura, H., Yoshioka, H., Shiina, T. (2013) Control of defense gene expression via chloroplast Ca<sup>2+</sup> sensor protein CAS in *Arabidopsis*. 第 24 回国際シロイヌナズナ研究会議 2013 年 6 月 24-28 日 シドニー オーストラリア

艾原佐紀, 原田尚実, 市川美恵, 椎名隆 ミトコンドリア機械受容チャネル MSL1 の機能

解析 日本植物学会第 77 回大会 2013 年 9 月 13-15 日 札幌

石崎陽子, 木寅翔太, 新村周一, 椎名隆 葉緑体 accD 遺伝子プロモータの進化 日本植物学会第 77 回大会 2013 年 9 月 13-15 日 札幌

下谷紘司, 中井香奈, 山崎加奈子, 佐野智, 椎名隆 葉緑体 Ca<sup>2+</sup> センサー-CAS による植物の免疫応答制御の解析 日本植物学会第 77 回大会 2013 年 9 月 13-15 日 札幌

椎名隆, 金麗花 葉緑体ストロミュールの ABA による誘導機構 日本植物学会第 77 回大会 2013 年 9 月 13-15 日 札幌

Shiina, T. "Role of chloroplasts in plant defense responses" International Closing Meeting of the Research Unit 804, 'Retrograde Signaling in Plants' 2013 年 10 月 13-16 日 ミュンヘン ドイツ

Shiina, T. "A role for chloroplast Ca<sup>2+</sup> sensor protein CAS in regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and plant defense responses" Indo-Japan Joint Workshop on "Signal sensing and transduction in photosynthetic organisms-from cyanobacteria to land plants" 2013 年 12 月 16-18 日 ハイデラバード インド

青山真夕, 中井香奈, 下谷紘司, 佐野智, 椎名隆 AMP が誘導する病害抵抗遺伝子発現と光合成電子伝達 第 55 回日本植物生理学会 2014 年 3 月 18-20 日 富山

下谷 紘司, 青山 真夕, 中井 香奈, 佐野智, 椎名 隆 葉緑体 Ca<sup>2+</sup> センサー-CAS を介した防御応答遺伝子発現の制御 第 55 回日本植物生理学会 2014 年 3 月 18-20 日 富山

艾原佐紀, 原田尚実, 市川美恵, 古市卓也, 椎名隆 ミトコンドリア局在機械受容チャネル MSL1 の機能解析第 55 回日本植物生理学会 2014 年 3 月 18-20 日 富山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎名隆 (SHIINA, Takashi)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究

科・教授  
研究者番号：10206039

(2)研究分担者

熊崎茂一 (KUMAZAKI, Shigeichi)  
京都大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：40293401