

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450136

研究課題名(和文) FtsZ非依存的色素体増殖機構の研究

研究課題名(英文) Mechanism of FtsZ-independent plastid replication in plants

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：色素体はストロマのFtsZリング形成を初期イベントとする二分裂によって増殖する。シロイヌナズナのftsZ変異体は、実験室内で野生型と大差ない成長と生殖を示し、しかもどの体細胞にも基本的に色素体が存在することが知られている。本研究では、ストロマ局在性蛍光タンパク質及びシロイヌナズナ珠皮を用いて、FtsZ非依存的色素体増殖に関する解析を行った。その結果、ftsZ変異体のアミロプラストは珠皮の発達過程を通じて細胞内で増殖不能であることが示された。一方、ftsZ原色素体は珠皮の細胞増殖期において両娘細胞に分配可能な細胞内形態・配置を採ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the cellular mechanisms of plastid replication in the ftsZ-null mutant of *Arabidopsis thaliana*. Fluorescence microscopy analysis of both early- and late-developing ovule integuments indicated that ftsZ amyloplasts had no activity of division during the post-mitotic cell maturation, while ftsZ proplastids could be replicated during the cell proliferation stage, overcoming the defects of the plastid division apparatus.

研究分野：植物分子生物学

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

(1)色素体はシアノバクテリア祖先種を起源とする細胞内共生体(細胞小器官)であり、種子植物では葉緑体、有色体、白色体、アミロプラスト、原色素体など、植物組織や外界環境に応じて複雑に機能分化する。色素体は内外二層の包膜により囲まれ、多くの場合、オルガネラ中央赤道面で狭窄を形成し二分増殖を行う。

(2)色素体分裂はバクテリア由来の核コード FtsZ (Filamenting temperature-sensitive Z)タンパク質が色素体中央のストロマ側内包膜表面でリング構造(FtsZリング)を形成することにより開始される。色素体分裂装置は、FtsZリングが基礎となり内包膜、外包膜、細胞質においてそれぞれ特有のリング構造が形成及び多重化したものであり、その収縮力が色素体狭窄の駆動力となる。

(3)従来、色素体の分裂装置を介した増殖は、植物個体の全色素体の形成に必須であると仮定されてきた。ところが2009年になり、シロイヌナズナ核ゲノムにコードされる3つのFtsZ相同遺伝子の変異体(*ftsZ*変異体)は実験室内で正常な成長及び生殖を示すことが報告された。しかもどの葉肉細胞にも基本的に葉緑体は存在していた。このことから、色素体は完全に分裂装置を欠損した状況でも、細胞分裂時に少なくとも一度は複製されることが示唆された。しかし、その具体的な過程は現在も不明であり、*ftsZ*色素体の増殖と分配は当研究分野で興味深い課題の1つとなっている。

2. 研究の目的

(1)研究代表者は以前からシロイヌナズナの胚珠形成期に着目し、外珠皮(表皮組織)に存在する非緑色色素体の分裂制御の解析を行ってきた(科学研究費補助金・若手研究(B)、2010年度採択課題)。発達中の珠皮では原色素体からアミロプラストへの分化が起こることが知られており、それらは胚珠発達段階に応じたサンプリングにより比較的容易に追跡することができる。

(2)研究成果の一つとして、葉緑体分裂が完全に阻害される*AtMinE1*と*ARC6*の変異体では、アミロプラストや原色素体の増殖は完全には阻害されないことが明らかになった。この2つの変異体は、葉緑体分裂に関しては*ftsZ*変異体と同等の表現型を示すため、本研究開始時点では*ftsZ*変異体のアミロプラストや原色素体の分裂阻害状況は、*atminE1*や*arc6*のものと同様である可能性が考えられた。しかし、非緑色色素体に特徴的な未知分裂制御が存在することも否定出来ず、*ftsZ*変異体において新規の表現型が観られる可能性も考えられた。

(3)以上の背景の下、本研究ではシロイヌナズナの珠皮を主に用い非緑色色素体のFtsZ非依存的増殖機構に関する研究を行った。

3. 研究の方法

(1)珠皮アミロプラストの可視化

シロイヌナズナ*ftsZ*変異体(核コードFtsZ相同遺伝子(*AtFtsZ1-1*, *AtFtsZ2-1*, *AtFtsZ2-2*)のT-DNAによる三重変異体、譲渡により入手)バックグラウンドで、カリフラワーモザイクウイルス35S(CaMV35S)プロモーター下流でストロマ移行配列を融合した黄色蛍光タンパク質(YFP)を発現する形質転換シロイヌナズナを用いた。本植物は、先述の科学研究費補助金採択課題で作出されたものである。

(2)珠皮原色素体の可視化

シュート表皮特異的プロモーターの1つであるシロイヌナズナ*PDF1*(*PROTODERMAL FACTOR1*)プロモーターの制御下でストロマ局在性緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現する形質転換シロイヌナズナを作出した。作出に際しては、発現遺伝子カセットを作製後、野生型及び*ftsZ*変異体にアグロバクテリウム法により導入した。安定GFP発現植物を選抜した後、顕微鏡解析に供した。

(3)花粉色素体の可視化

次項4(4)の花粉末色素体の解析においても、上記と同様に*ACT1*(*ACTIN1*)プロモーターの制御下でストロマ局在性GFPを発現するシロイヌナズナ野生型及び*ftsZ*変異体を作出し解析に供した。

(4)顕微鏡解析

研究期間を通じて、植物生体観察は標準的な倒立型落射蛍光顕微鏡を用いて行った。蛍光タンパク質を発現する植物体の作出・維持においては、蛍光実体顕微鏡も用いた。透過型電子顕微鏡解析は、グルタルアルデヒド-四酸化オスmiumを用いた化学固定法により行った。

4. 研究成果

(1)*ftsZ*変異体の遺伝子型

最初に、シロイヌナズナ*ftsZ*変異体の遺伝子型を検証した。その結果、*AtFtsZ2-2*においてのみ、通常のT-DNA変異の他に新奇変異がゲノム中に付加的に生じていることが判明した。それは*AtFtsZ2-2*コード領域中の欠失変異であり、元々*AtFtsZ2-2*のT-DNA挿入変異生成時にDNA重複が起こり、その際生じたものと推測された。2種類の*atftsZ2-2*変異存在下でも、*ftsZ*変異体はnull変異体であることが確認されたため、本研究では以後これを用いた。

(2)*ftsZ*変異体のアミロプラスト表現型

ストロマ局在性YFPを利用した蛍光顕微鏡観察により、*ftsZ*変異体における珠皮アミロ

プラストの分化・増殖を解析した。その結果、*ftsZ* 変異体の外珠皮では一細胞あたり平均 2 個の巨大アミロプラストが形成されること、それらはアミロプラストの全分化過程を通じて増殖しないことが明らかになった。また、発達中のアミロプラストからは、ストロミュール (stromule; stroma filled tubule) が顕著に形成されていた。この点で *ftsZ* 変異体は既存の *arc6* 変異体や *atminE1* 変異体と同様のアミロプラスト分化過程を辿ることが示唆された。

(3) *ftsZ* 変異体の原色素体表現型

PDF1 プロモーター制御下でストロマ局在性 GFP を発現する T-DNA コンストラクトを作製し、シロイヌナズナ野生型及び *ftsZ* 変異体に形質転換した。どちらの場合も安定な形質転換体が得られ、少なくとも実生ロゼット葉では表皮葉緑体に特異的な GFP 蛍光の蓄積が確認された。

作出された形質転換体を用いて珠皮形成期の原色素体を観察した。野生型では、過去の観察知見と一致して、1 μm あるいはそれ以下の大きさの原色素体が存在し、その一細胞あたりの数は珠皮の発生過程で一定に維持されることが明らかになった。*ftsZ* 変異体では一細胞あたりの原色素体数が減少すると共に、ストロミュールが顕著に伸張している様子が観察された。これらは珠皮アミロプラストと同様の異常形態であり、色素体分裂阻害に伴うストロミュール形成の昂進は、色素体タイプを越えた現象であることが示唆された。

一方、研究計画で予定した細胞分裂における原色素体の経時観察は達成することが出来なかった。しかしながら細胞質分裂期の原色素体の観察により、*ftsZ* 原色素体は細胞板を隔てて両側に局在または橋渡しする形で存在し、両娘細胞に分配可能な細胞内形態・配置を採ることが示唆された。

(4) 色素体増殖解析系の探索

珠皮原色素体の長時間観察が技術的に困難であったため、計画を変更し、非緑色色素体増殖解析に適した植物組織を探索した。その結果、色素体増殖が実際に起こり細胞発生の観察が可能な花粉が注目された。

珠皮の場合と同様に、花粉で活性化する *ACT1* プロモーター制御下でストロマ局在性 GFP を発現するシロイヌナズナ野生型及び *ftsZ* 変異体を用いて、成熟花粉粒を観察した。その結果、野生型では既往の報告通り、栄養細胞中に 1 μm 前後のアミロプラストが分散して存在していた。一方、*ftsZ* 変異体では多数の色素体が形成されており、しかも色素体同士が時折集合した状態を採っていた。さらに透過型電子顕微鏡法により、*ftsZ* 成熟花粉の超微細構造を観察したところ、GFP 蛍光で可視化された色素体の表現型が同様に再現された。

過去の *ftsZ* 変異体の解析では、葉肉組織で一細胞あたり 1-2 個の巨大葉緑体形成が観察されている。同様の傾向は本研究の珠皮アミロプラストの観察でも認められた。これらは共に FtsZ の欠損による重篤な色素体分裂阻害効果を説明するものであった。しかし今回の花粉色素体の最終表現型は、既存の植物オルガネラ分裂研究の知見では説明困難であり、興味深い現象であると考えられた。今後、野生型及び *ftsZ* 変異体の花粉発生過程を対象に詳細な色素体形態解析が為されることにより、新規の細胞内制御の解明に至るものと期待された。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 6 件)

Morita R, Nakagawa M, Takehisa H, Hayashi Y, Ichida H, Usuda S, Ichinose K, Abe H, Shirakawa Y, Sato T, Fujiwara MT, Itoh RD, Abe T (2017) Heavy-ion beam mutagenesis identified an essential gene for chloroplast development under cold stress conditions during both early growth and tillering stages in rice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 81:271-282. (査読有) , DOI: 10.1080/09168451.2016.1249452

Tateishi M, Misaka R, Fukumoto Y, Fujiwara M, Hashimoto H (2016) Oil body formation in the Klebsormidiophyceae alga *Klebsormidium flaccidum*. *Science Journal of Kanagawa University* 27:67-71. (査読有)

Fujiwara MT, Kojo KH, Kazama Y, Sasaki S, Abe T, Itoh RD (2015) The *Arabidopsis minE* mutation causes new plastid and FtsZ1 localization phenotypes in the leaf epidermis. *Frontiers in Plant Science* 6:823. (査読有) , DOI: 10.3389/fpls.2015.00823

Fujiwara MT, Kobayashi E, Kanazawa M, Itoh RD (2015) Observation of colorless idioblasts in *Egeria densa* leaves by conventional ultraviolet-excitation fluorescence microscopy. *Cytologia* 80:131-132. (査読有) , DOI: 10.1508/cytologia.80.131

Hara T, Kobayashi E, Ohtsubo K, Kumada S, Kanazawa M, Abe T, Itoh RD, Fujiwara MT (2015) Organ-level analysis of idioblast patterning in *Egeria densa* Planch. leaves. *PLOS ONE* 10:e0118965. (査読有) , DOI: 10.1371/journal.pone.0118965

Kazama Y, Fujiwara MT, Takehisa H, Ohbu S, Saito H, Ichida H, Hayashi Y, Abe T (2013) A DFR-deficient mutant of *Nicotiana tabacum* induced by C-ion beam irradiation. *RIKEN Accelerator Progress Report* 46:264. (査読有)

〔学会発表〕(計 18 件)

森田 竜平 他、重イオンビームで誘発したイネ温度感受性 *virescent* 変異体 *csv1* の原因遺伝子同定と特性解析、日本育種学会第 131 回講演会、2017 年 3 月 30 日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

石川 浩樹 他、シロイヌナズナ葉緑体分裂異常変異体を用いた花粉発生過程における色素体増殖の解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都府・京都市)

福本 悠 他、緑藻クレブソルミEDIUMの生長とオイルボディ形成過程、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都府・京都市)

藤井 春希 他、水生植物オオカナダモの異型細胞分化とその役割、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都府・京都市)

大谷 友佑 他、水生植物 *Egeria* 属と *Elodea* 属における異型細胞形成の再評価、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都府・京都市)

山岸 茜 他、植物毒素 foeniculoxin の全合成、第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016、2016 年 11 月 15 日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

中島 耕大 他、シロイヌナズナ葉緑体分裂変異体の花粉及び花粉管における色素体の形態観察、日本植物形態学会第 28 回大会、2016 年 9 月 15 日、琉球大学(沖縄県・西原町)

佐々木 駿 他、シロイヌナズナにおける花粉色素体増殖の遺伝的制御解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 29 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

石川 浩樹 他、シロイヌナズナ花粉発生過程における色素体増殖の解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 29 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

三家本 梨央 他、アンチマイシン A 誘発シロイヌナズナ根色素体の形態変化、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 29 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

篠塚 舞 他、オオカナダモにおける異型細胞形成パターンの解析、日本農芸化学会関東支部 2015 年度支部大会、2015 年 9 月 26 日、お茶の水女子大学(東京都・文京区)

佐々木 駿 他、シロイヌナズナ花粉色素体の増殖制御機構の解析、日本農芸化学会関東支部 2015 年度支部大会、2015 年 9 月 26 日、お茶の水女子大学(東京都・文京区)

石川 浩樹 他、シロイヌナズナ花粉発生過程における色素体増殖の解析、日本農芸化学会関東支部 2015 年度支部大会、2015 年 9 月 26 日、お茶の水女子大学(東京都・文京区)

佐々木 駿 他、シロイヌナズナ葉緑体分裂異常変異体における花粉色素体の解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学(岡山県・岡山市)

石川 浩樹 他、シロイヌナズナ花粉発生過程における色素体増殖の解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学(岡山県・岡山市)

小林 永実 他、オオカナダモ葉緑体欠失細胞における細胞生物学的解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学(岡山県・岡山市)

佐々木 駿 他、シロイヌナズナ花粉色素体の増殖制御機構の解析、日本農芸化学会関東支部 2014 年度支部大会、2014 年 10 月 18 日、埼玉大学(埼玉県・さいたま市)

金澤 美加子 他、オオカナダモにおける異型細胞形成パターンの解析、日本農芸化学会関東支部 2014 年度支部大会、2014 年 10 月 18 日、埼玉大学(埼玉県・さいたま市)

〔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://rscdb.cc.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

研究者番号: 90332345

(2) 研究分担者

箸本 春樹 (HASHIMOTO, Haruki)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号: 90134410

(3) 研究分担者

伊藤 竜一 (ITOH, Ryuuichi)

琉球大学・理学部・准教授

研究者番号: 50322681