

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440137

研究課題名(和文)細胞増殖分化に関する色素体機能の解明

研究課題名(英文)A study of plastid functions that are involved in cell proliferation and differentiation in plants

研究代表者

吉岡 泰 (Yoshioka, Yasushi)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：60202397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体は光合成を行うだけではなく、様々な物質の合成を通じて植物の細胞増殖や細胞分化を支えている。私たちはシロイヌナズナにおいて、主に葉緑体に存在する機能未知のタンパク質が植物の細胞の増殖や分化に関与することを明らかにしてきた。この研究ではこのタンパク質を解析することによって、葉緑体のどのようなはたらきが植物の細胞増殖、分化に関与するのかを解析した。その結果、この機能未知のタンパク質が葉緑体とミトコンドリアにおける一酸化窒素の生成に関与しており、それを通して根の成長に関与することが示唆された。また、このタンパク質は葉緑体へのタンパク質輸送を介して、種子の形成に関与する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified a gene, designated CRL, encoding a protein of unknown function that is mainly localized in plastids in *Arabidopsis thaliana*. Defects in *crl* gene cause pleiotropic abnormalities on plants' growth and cell differentiation. This suggests that CRL protein is required for plastids' functions that are important for plant cell proliferation and cell differentiation. In this study, we aimed to identify plastid functions that are involved in plant cell proliferation and differentiation by analyzing molecular functions of CRL. As a result, it was suggested that CRL protein is involved in the generation of nitric oxide in chloroplasts and mitochondria. Reduction of endogenous level of nitric oxide may be a cause of root growth retardation in *crl* mutant. CRL was also suggested to be involved in plastid protein import and reduction of the efficiency of plastid protein import could be a cause of sterility of *crl* mutant.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：葉緑体 細胞増殖 細胞分化 オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

色素体(葉緑体)は細胞分化の制御や細胞分裂の制御を通じて個体発生の様々な局面に関与する。例えば、細胞周期はエネルギーが十分にある状態でしか進行しないが、葉緑体で行われる光合成によって、細胞周期に必要なエネルギーが生産される。しかし、色素体がどのように細胞分化や細胞分裂制御に関与するののかに関しては不明な点が多い。色素体とミトコンドリア両方の DNA 複製の完了が核ゲノムの複製に必須である事が単細胞藻類とタバコの培養細胞で示されているが、未分化な色素体を多数含む植物個体の分裂組織においても、このようなチェックポイントが細胞周期に存在するののかについては議論の余地がある。

我々がこれまで研究してきたシロイヌナズナの CRL タンパク質は細胞の分化と分裂の両方に関与する色素体局在タンパク質である。CRL タンパク質が主に色素体外包膜に存在することや、*crl* 変異体では色素体の様々な代謝機能が低下している事などから、*crl* 変異体で低下している色素体機能が、細胞分化や細胞増殖に必要である可能性が考えられる。しかし、CRL がどのようにして、細胞分裂と分化に関与しているのは不明であった。

2. 研究の目的

色素体(葉緑体)が植物の細胞分化・増殖制御に深く関与するが、その分子機構については不明な点が多い。本研究の目的は CRL タンパク質の機能の詳細を知ることから、一般的な細胞分化・増殖制御に関与する色素体機能の解明を試みることである。

3. 研究の方法

(1) タグ配列を付加した CRL タンパク質を発現しているシロイヌナズナより、タグに対するアフィニティーを利用して、CRL と相互作用するタンパク質を濃縮し、質量分析等によって CRL と相互作用するタンパク質を同定する。さらに、試験管内で合成したタンパク質を用いるなどしてタンパク質間相互作用を確認する。

(2) CRL タンパク質と相互作用するタンパク質の機能を抑圧・過剰発現し、細胞増殖や細胞分化に異常が見られるかを調べる。

(3) 上記で作製した遺伝子変異体、過剰発現体を用い、網羅的遺伝子発現解析によって発現量が変化している細胞増殖制御遺伝子、細胞分化制御遺伝子を明らかにする。それら遺伝子の変異体と、*crl* との遺伝学的相互作用を調べる事で、色素体機能が細胞増殖や細胞分化のどこに作用するのかを明らかにする。

(4) シロイヌナズナ *crl* 変異体のエンハンサー変異、サプレッサー変異を単離し、それらの原因遺伝子の同定を行い、細胞増殖や細胞分化に関与していると思われる色素体機

能を推定する。遺伝子変異体や遺伝子過剰発現を用いることによって、推定した色素体機能を変化させ、実際に細胞増殖や細胞分化に異常が見られることを検討する。

(5) *crl* 変異体で見られる色素体を持たない細胞において、細胞周期マーカーの発現を調べ、植物個体の細胞周期において、オルガネラ DNA 複製の完了が核 DNA 複製の開始に必須であるのかを検討する。

(6) 同定された細胞増殖や細胞分化に関与している色素体機能に関与する遺伝子をヒメツリガネゴケで抑圧し、分裂細胞の性質が変化するかを検討する。これによって、細胞増殖や細胞分化に関与する色素体機能の陸上植物における普遍性を検証する。

4. 研究成果

タグを付加した CRL タンパク質を発現しているシロイヌナズナより、タグに対する抗体を用いて、CRL タンパク質を含むタンパク質複合体を精製した。質量分析によって、CRL と相互作用しているタンパク質候補を数種類同定した。CRL と相互作用しているタンパク質候補の内、2種類については試験管内において転写、翻訳したタンパク質を用いて、CRL タンパク質との相互作用を確認した。CRL と相互作用するタンパク質の1つは一酸化窒素(NO)の生成に関与することが知られているミトコンドリア局在タンパク質であった。CRL タンパク質はミトコンドリアにも少量局在するが、*crl* 変異体の根における NO 量を測定した結果、*crl* 変異体においては内在 NO 量、酸化ストレスによって生成される NO 量いずれも低下しており、さらに、低濃度の NO 投与によって *crl* 変異体の根の成長が有意に促進された。この結果から、*crl* 変異体で見られる根の伸長阻害の原因の一つが内在 NO 量の低下であることが示唆された。NO 生成にはミトコンドリアと葉緑体が独立に関与することが知られていたが、NO 生成関連遺伝子の変異体を用いた遺伝学的な解析から、CRL 遺伝子はミトコンドリア、色素体いずれの NO 生成にも関与することが示唆された。

CRL タンパク質と相互作用するもう1つのタンパク質は葉緑体へのタンパク質輸送に関係するものであった。葉緑体に輸送されるシグナルを付加した GFP タンパク質の細胞内局在を *crl* 変異体で調べた。その結果、*crl* 変異体では細胞質にも GFP タンパク質が局在しており、*crl* 変異体では葉緑体へのタンパク質輸送能が低下していることが示唆された。また、この葉緑体へのタンパク質輸送に関係するタンパク質の過剰発現によって、*crl* 変異体が示す不稔性が部分的に回復した。これらの結果から、*crl* 変異体が示す稔性低下の原因の一つが葉緑体へのタンパク質輸送と関連する可能性が考えられた。今後 *crl* 変異体でどのようなタンパク質が色素体へ輸送されにくくなっているのかを解析することによって、植物の発生成長に重要な色素

体、ミトコンドリア機能に関する手がかりが得られる可能性があると考えられる。

CRL タンパク質と相互作用するタンパク質の解析結果から、CRL タンパク質は組織によって異なるタンパク質と相互作用して、それらの機能に影響を与えている可能性が示唆された。また、CRL タンパク質は植物における NO 生成、色素体へのタンパク質輸送に関連する新規な因子である可能性が示唆された。

crl 変異体のエンハンサー変異、サプレッサー変異のスクリーニングによって、9 系統のサプレッサー変異体が出た。それらはすべて優性もしくは半優性の一遺伝子座変異であった。また、すべてのサプレッサー系統において個体の成長と葉緑体分裂の両方がほぼ野生型同様に回復した。*crl* 変異体は多面的な異常を示すが、得られたサプレッサー変異がほぼすべての異常を回復させたことから、単離したサプレッサーは CRL 遺伝子の機能に密接に関係した遺伝子の変異であると考えられた。遺伝学的手法によってサプレッサー変異の原因遺伝子同定を行ったが、得られたサプレッサー変異がすべて優性、半優性であったため、遺伝子の同定に時間がかかり遺伝子の同定は至らなかった。今後得られたサプレッサー変異体の原因遺伝子を同定する事によって、CRL タンパク質の分子機能解明に迫ることができると考えられる。

crl 変異体の根において DNA を合成している細胞を調べる実験によって、色素体を持たない細胞が色素体を持つ細胞と同程度に S 期に入れることが明らかとなった。しかし、シロイヌナズナの根端分裂組織において色素体を持たない細胞を同定することが難しいため、色素体を持たない細胞の細胞周期の解析は、ヒメツリガネゴケの CRL 相同遺伝子である *PpCRL* 遺伝子破壊株を用いて行うことにした。

ヒメツリガネゴケの *PpCRL* 破壊株を用いて、葉緑体を持たない細胞が生じる過程を調べる実験を行った際に、*PpCRL* 破壊株における葉緑体増殖過程を解析した。その解析によって *PpCRL* 破壊系統では分裂した葉緑体が細い繊維状構造でつながっており、この構造体を介して再び 1 つの葉緑体に戻る様子が観察された。同様の 2 つの葉緑体が 1 つに戻る現象はシロイヌナズナでも観察された。これらの結果から、CRL 遺伝子は分裂した葉緑体が完全に 2 つに分かれる過程に必要な可能性があると考えられた。この結果は当初の研究計画では想定していないものであるが、分裂した葉緑体が細い繊維状の構造でつながった状態に留まり、さらにそれが 1 つの葉緑体に戻るとい現象はこれまでに報告がない新たなものである。今後 CRL 遺伝子がどのように葉緑体分裂に関与するかを詳しく調べることによって、これまでに知られていない葉

緑体分裂過程に関する知見が得られる可能性が考えられる。

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 1 件)

Hudik E, Yoshioka Y, Domenichini S, Bourge M, Soubigout-Taconnat L, Yi D, Bujaldon S, Hayashi H, De Veylder L, Bergounioux C, Benhamed M, Raynaud C., The *Arabidopsis* crumpled leaf mutant reveals the influence of chloroplast-derived signals on cell cycle regulation. *Plant Physiology*, 査読有、vol.166, 2014, p.152-167, DOI:10.1104/pp.114.242628.

[学会発表](計 4 件)

柳瀬 里奈, 杉田 千恵子, 杉田 護, 吉岡 泰, Study of chloroplast division of the *PpCRL1*, 2 double knock out line of *Physcomitrella patens* using time-lapse live-cell imaging, 第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 16 日鹿児島大学(鹿児島市)

Pongthai Prapaporn, Hiroyoshi Takano, Yasushi Yoshioka, Tomomichi Fujita, Effect of ABA on chloroplast division of the moss *Physcomitrella patens*, 第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 16 日鹿児島大学(鹿児島市)

柴田 奨梧, 村田 綾, 青木 雄哉, 氏原 麻衣, 野元 美佳, 多田 安臣, 吉岡 泰, シロイヌナズナ CRUMPLED LEAF タンパク質と相互作用するタンパク質の同定と解析, 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 日岩手大学(盛岡市)

村田 綾, 青木 雄哉, 氏原 麻衣, 吉岡 泰, シロイヌナズナ CRUMPLED LEAF 変異体の根の生長に対する一酸化窒素の影響, 第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 17 日東京農業大学(東京都)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 泰 (YOSHIOKA, Yasushi)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：60202397

(2) 研究分担者

()

(3) 連携研究者

杉田 護 (SUGITA, Mamoru)

名古屋大学・遺伝子実験施設・教授

研究者番号：70154474

(4) 研究協力者

()