

残基、およびそれに続く sClpP 由来の 2 アミノ酸残基までが消化されていた。精製過程において自己分解が起きている可能性が示唆されたが、His-tag 配列が検出される状態でも  $\text{Co}^{2+}$  カラムに吸着しなかったことや、ClpP 型プロテアーゼの活性中心が 7 量体リング構造の内部にあることなどを含め、自己分解については今後の詳細な検討が必要である。

#### 【今後の課題】

sClpP 組換え蛋白質の精製およびペプチダーゼ活性の確認までは行うことができたが、本プロテアーゼによる LDC/ODC 分解の確認には至っていない。ATP 結合サブユニット (ClpX) と推定される 2 種類の遺伝子産物の組換え体を取得し、sClpP との相互作用や組み合わせの違いによる基質特異性の差異などの特性も検討した上で、本プロテアーゼの L10 依存的な LDC/ODC 分解活性について検

証することが、今後の課題である。

最後になりましたが、本研究を遂行するにあたり、研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) Takatsuka, Y. and Y. Kamio. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1-19 (2004).
- 2) Kojima, S., K.-C. Ko, Y. Takatsuka, N. Abe, J. Kaneko, Y. Itoh, and Y. Kamio. *J. Bacteriol.*, **192**, 5953-5961 (2010).
- 3) Kojima, S., J. Kaneko, N. Abe, Y. Takatsuka, and Y. Kamio. *J. Bacteriol.*, **193**, 2347-2350 (2011).
- 4) Yamaguchi, Y., Y. Takatsuka, S. Matsufuji, Y. Murakami, and Y. Kamio. *J. Biol. Chem.*, **281**, 3995-4001 (2006).
- 5) <http://merops.sanger.ac.uk/>, 2009 年 11 月時点における Release 8.5 を使用した。
- 6) Woo, K. M., W. J. Chung, D. B. Ha, A. L. Goldberg, and C. H. Chung. *J. Biol. Chem.*, **264**, 2088-2091 (1989).

### 葉緑体分裂開始因子 FtsZ のライブイメージング解析

東京大学大学院総合文化研究科

(現 上智大学理工学部物質生命理工学科) 藤原 誠

#### 【背景と目的】

葉緑体に代表される二層膜オルガネラ色素体は、光合成、脂肪酸合成など植物細胞で多彩な機能を担う。色素体は、進化的にシアノバクテリアの祖先が派生したものであり、高等植物では組織や外界環境に応じて複雑に分化する。一般に一細胞あたりの色素体数は数十から数百に達し、それは既存の色素体の分裂によって決まる。過去十数年間、葉緑体の分子制御に関しては詳細な解析がなされてきた。結果、葉緑体分裂は原核生物由来の保存的機構と細胞内共生過程で得た膜分裂機構が協調してはたらくプロセスであること、分裂の初期イベントは核コード・原核型 FtsZ がストロマ側内包膜面上でリング構造 (FtsZ リング) を形成することなどが示されてきた<sup>1)</sup>。

近年、私たちは、核コード・FtsZ の一つ FtsZ1 と GFP との融合タンパク質 (FtsZ1-GFP) を発現するシロイスナズナ系統を用いて、葉緑体分裂開始メカニズムの研究を進めてきた<sup>2)</sup>。形質転換植物における GFP 使用の利点は、広範な組織の中から任意の場所を選び、時間軸に沿って分子やオルガネラの挙動を追跡できる点にある。私たちは偶然、シロイスナズナ花粉の中にも FtsZ1-GFP シグナルが存在することに気が付いた。多くの植物では色素体は母性遺伝し、それには花粉色素体と核様体 DNA の挙動が深く

関与している。2009 年当時、花粉色素体のライブ動態に関する知見はなかった。FtsZ1-GFP は葉緑体ストロマと FtsZ リング双方を標識しうることから<sup>2)</sup>、花粉の色素体解析にも有用であることが期待された。本研究は<sup>3)</sup>、FtsZ1-GFP を用いて花粉色素体の動態と FtsZ の役割を検証したものである。

#### 【結果】

##### 1. 花粉における FtsZ1-GFP の局在

花粉粒中の FtsZ1-GFP シグナルは微弱であったため、まず高感度蛍光観察条件を求めた。以下の実験はその条件に基づいて行った。FtsZ1-GFP の発現特異性及び細胞内局在を明らかにするため、蛍光色素 Hoechst 33342 により核染色を行った。FtsZ1-GFP は雄原細胞や精細胞では検出されず、花粉栄養細胞特異的であった。続いて電子顕微鏡により花粉色素体を検出し、GFP の蛍光パターンと比較した。色素体の大きさ・形は GFP が標識する構造と一致した。以上より、FtsZ1-GFP は基本的に色素体ストロマ全体に局在することが示唆された (図 1a)。

##### 2. 花粉色素体の増殖における FtsZ の役割

FtsZ1-GFP で標識された色素体は、栄養細胞全体に散らばっていた (図 1a)。成熟花粉の色素体は直径 0.3-3.1  $\mu\text{m}$ 、数は一細胞あたり 25-80 個であった。成熟前の花粉も調べたところ、色素体は直径 0.7-4.1  $\mu\text{m}$ 、数は一細胞あたり 27-93 個であった。即ち、花粉形成の後期過程で色素体数の劇的な増加は認められなかった。

花粉の成熟前後いずれでも FtsZ リングは検出された。この場合、FtsZ リングは色素体のさまざまな位置に 1 または数個形成された。これは中央赤道面に一つのリングが形成される葉緑体の場合とは対照的であった。FtsZ リングの一部は色素体の狭窄部位と一致し、包膜のくびれ形成に FtsZ リングが関与する可能性が示唆された。しかし、重要なことに、FtsZ リングの形成頻度と色素体数との間に有意な相関性は認められなかった。FtsZ リングを介した色素体分裂は低頻度で起こるもの、花粉間の色素体数の分散が大きく、明確な数値データとして現れないことが推測された。さらに、花粉色素体の増殖は、花粉形成プログラムの比較的初期の段階で活性化することが推測された。

### 3. 花粉色素体の形態ダイナミクス

花粉の形態形成にともなって、色素体はダイナミックに外形を変化することが判明した。まず花粉の成熟に伴い、色素体の大部分はロッド型から球体や楕円体へと変わった。さらに花粉管誘導培地で花粉管を発芽させたとこ

ろ、色素体の挙動に顕著な変化が起こった（図 1a-g）。(1) 花粉管発芽が誘導されると、原形質流動が活性化して、色素体は誘導前よりも活発に細胞内を動き回るようになる（図 1a,b）。(2) 発芽が始まると、色素体の大部分は花粉粒に留まる一方で、少数が徐々に花粉管内へ移動できるようになる（図 1c, d）。(3) 発芽が進むと、花粉粒と花粉管の間で原形質流動が活性化する。それに付随して、色素体ボディの伸張とストロミュールと呼ばれる色素体包膜由来のチューブ状構造も検出されるようになる（図 1e-g）。(4) さらに花粉管伸張が進行すると、色素体が秒単位で不規則に変形する状況が増えた。図 2 では、ストロミュールを伸ばした色素体ボディーが一度円い形を失い、ストロミュールに沿って移動した後、再び球形を探るといった変形を見せた。このような色素体のアーベー様運動は、従来報告が無かった。一方、花粉管先端では色素体は殆ど検出されなかった。これは比較的大きいオルガネラは何らかのフィルター機能によって花粉管先端には達しないという、これまでの分野の知見と一致するものであった。

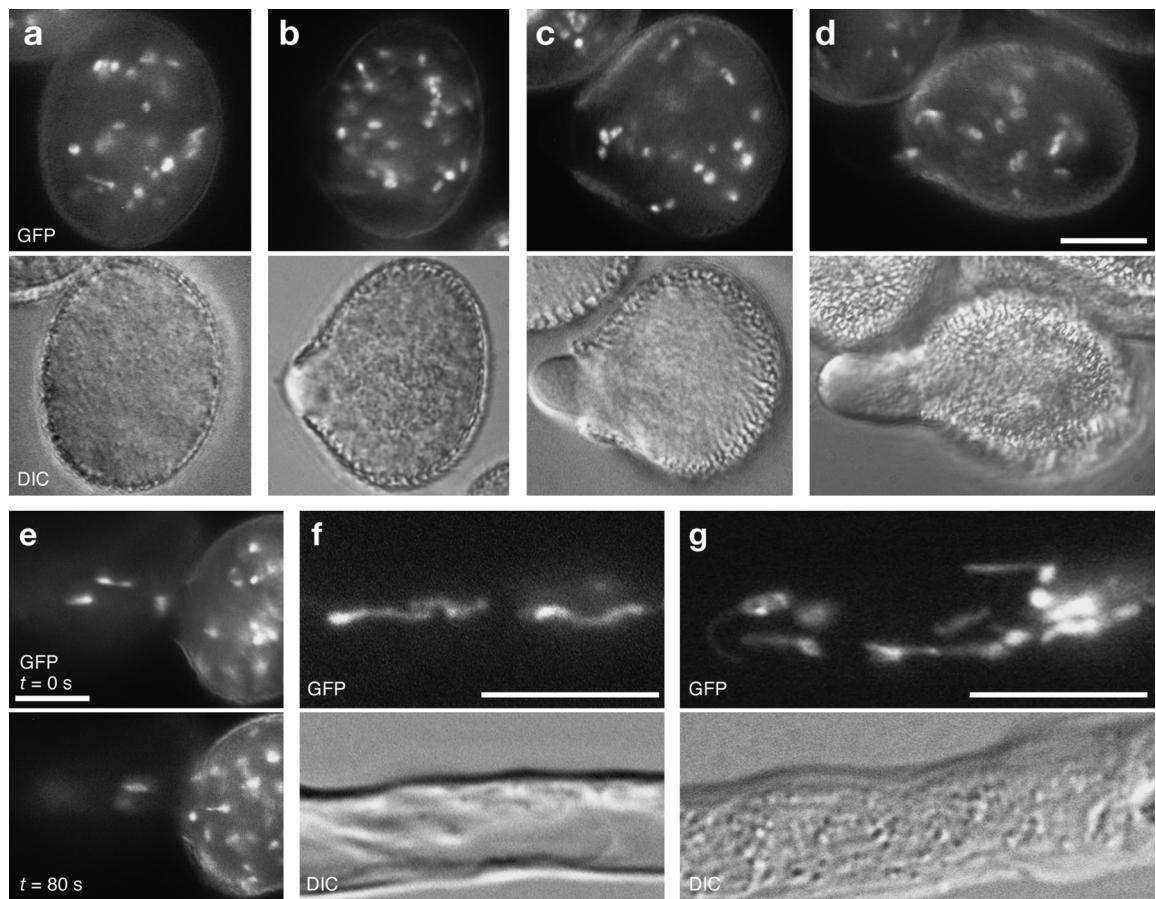


図 1 シロイヌナズナの花粉管発芽過程における FtsZ1-GFP 蛍光像と微分干渉 (DIC) 像。 (e) は FtsZ1-GFP のタイム・ラプス像を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。

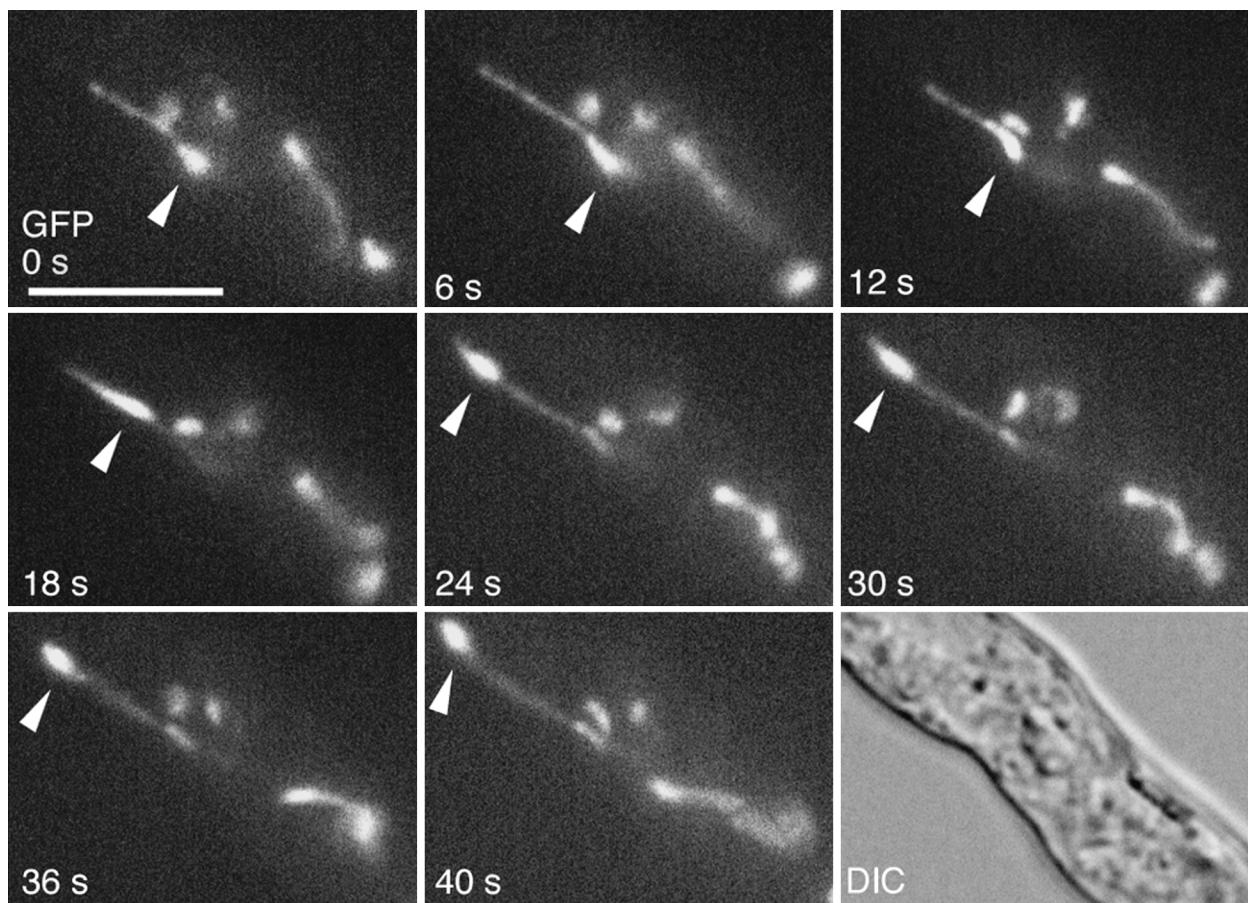


図2 シロイヌナズナ花粉管におけるFtsZ1-GFP蛍光像と微分干渉(DIC)像。蛍光像は6秒ごとのタイム・ラプス像である。矢頭は色素体ボディの位置を示す。スケールバーは10 μm。

### 【考察】

花粉管伸長は植物の細胞伸長の中で最速であり、オルガネラ運動の研究にも利用されている。この点からも、花粉色素体の挙動は長年興味を持たれてきた。今回示された、シロイヌナズナ花粉色素体のサイズ、数、形、分布、運動の情報は、今後、色素体の機能とその制御を理解していく上で基礎になると思われる。とりわけ、花粉管における色素体の挙動は興味深い。これまでにストロミュールの伸縮運動や、葉緑体の光定位運動に関する知見は豊富に蓄積されてきた。花粉管色素体の変形・アメーバ運動は過去に類のないタイプのものであり、今回非常に粗いながら、色素体の変形の度合いと原形質流動活性化との間には相関性が認められた。このことから、原形質流動が色素体包膜のストレッチを継続的に引き起こし、色素体の顕著な伸張と運動性をもたらしたのではないかと推測された。

これまで光学・蛍光顕微鏡、電子顕微鏡を駆使して、さまざまな組織・発生ステージの色素体が記述してきた。色素体の形態多様性(可塑性)は他のオルガネラと比べて際だっており、それを支える分子メカニズムはどのような

ものか興味が持たれる。今回の花粉の事例が、他の体細胞に対してどれだけ一般性を持つかは未だ不明だが、今後花粉を用いた研究が発展することで、解決への有効な手がかりが得られるのではないかと期待される。

### 【謝辞】

若手研究者の研究費確保は深刻な問題であり、本研究助成金は貴重なものです。本研究をご理解、ご援助下さいました農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。また実験と執筆においてご支援下さいました共同研究者の方々にも厚くお礼申し上げます。

### 参考文献

- 1) Lopez-Juez E, Pyke KA. *Int. J. Dev. Biol.*, **49**, 557-577 (2005).
- 2) Fujiwara MT, Sekine K, Yamamoto YY, Abe T, Sato N, Itoh RD. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 1116-1126 (2009).
- 3) Fujiwara MT, Hashimoto H, Kazama Y, Hirano T, Yoshioka Y, Aoki S, Sato N, Itoh RD, Abe T. *Protoplasma*, **242**, 19-33 (2010).