

識別番号 P 4

2012 年度完了学内共同研究

研究課題 花粉管における色素体の動態解析

研究代表者 藤原 誠（理工学部物質生命理工学科）

共同研究者 神澤信行（理工学部物質生命理工学科）

Summary Plastid dynamics in the plant male gametophyte has received attention for its importance in cytoplasmic inheritance. Here, we monitored the movement of pollen tube plastids with an *actin1* promoter-driven, stroma-targeted yellow fluorescent protein (YFP) in the model plant *Arabidopsis thaliana*. In elongating pollen tubes, most plastids localized to the tube shank, where they displayed either retarded and unsteady motion, or fast, directional, and long-distance movement along the tube polarity. Efficient plastid tracking further revealed a population of tip-forwarding plastids that undergo a fluctuating motion(s) before traveling backwards. These data might support future analyses on pollen plastids in *Arabidopsis* mutant plants defective in plastid functions and development.

1. 研究の目的及び背景

葉緑体に代表される植物オルガネラ色素体は、CO₂ 固定、窒素同化、脂肪酸合成など植物代謝の中心的な場である。色素体機能の強化は光合成能力の増強や物質生産性の向上に直結する。従って、色素体の研究は環境・食糧問題の解決に有効な方策を与えうる。

色素体は植物組織や環境に応じて複雑に分化する。とりわけ多くの作物器官に見られる非光合成色素体は応用的観点から興味深い。しかし、非光合成色素体は葉緑体と比べて検出が困難であり、その動態に関しては未だ不明な点が多い(Pyke (1999) *Plant Cell* 11:549-56)。

近年、代表者は非光合成色素体の解析器官として花粉に着目した (Fujiwara et al. (2010) *Protoplasma* 242:19-33)。花粉は種子植物の雄性配偶体であり、生殖時、柱頭に付いた花粉粒は花粉管を発芽・伸長させ雌性配偶体（胚嚢）に精細胞 2 個を送り込む。これまで花粉管伸長における小胞体、ゴルジ体、輸送小胞、液胞、ミトコンドリアなどのオルガネラの挙動は詳細に調べられてきたものの、色素体に関する情報は殆ど得られていなかった (Cai & Cresti (2009) *J. Exp. Bot.* 60: 495-508)。本研究では、花粉管細胞における色素体のライブ動態を明らかにすべく解析を進めた。

2. 研究の方法・内容

モデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) の花粉管色素体を研究対象とした。植物栽培、分子生物学的操作、植物形質転換、*in vitro* 花粉管培養、蛍光顕微鏡観察は全て常法に従った。代表者がシロイヌナズナ取扱い・形質転換植物の作出・蛍光観察を担当し、共同研究者が薬剤実験を分担する研究計画とした。

3. 研究の結果

(1) 花粉色素体が蛍光標識されたシロイヌナズナ系統の作出

特定の細胞構造や分子などを生体で解析するために、一般に蛍光タンパク質による標識法

が用いられる。花粉で高いプロモーター活性を示す*ACTIN1*プロモーター制御下で色素体移行配列と黄色蛍光タンパク質（YFP; Yellow Fluorescent Protein）との融合タンパク質を発現するT-DNAコンストラクトを作製した。続いて、アグロバクテリウムC58株を介してそのT-DNAをシロイヌナズナ野生型に形質転換した。実生におけるYFP強度を指標に、計12の系統がビジュアル選抜された。蛍光顕微鏡観察を行ったところ、YFPはいずれの系統でも色素体ストロマに局在し、最終的に花粉におけるYFP強度が高い2系統を解析に用いた。

(2) 花粉色素体の蛍光タイムラプス観察

花粉管発芽・伸長を寒天培地上で誘導し、花粉管伸長過程における色素体の挙動をタイムラプス蛍光観察法により解析した。今回、YFP 高発現系統の使用により、時・空間レベルで従来の測定を上回る精度で色素体の形・分布・運動を可視化することができた（図1）。

- a) 方向性のある長距離移動（図1・水色矢頭、平均速度 $1.5 \pm 0.8 \mu\text{m/s}$ 、最高速度 $4.5 \mu\text{m/s}$ ）
- b) 花粉管中央部に時々見られる不安定な運動（図1・桃・黄色丸印、最高速度 $1.3 \mu\text{m/s}$ ）
- c) 花粉管先端付近において顕著な振動性の運動（平均速度 $1.4 \mu\text{m/s}$ ）

以上の3つの色素体運動パターンが見出された。興味深いことに、花粉管先端に向かう色素体は先端部約5-7 μm の領域には入れなかった。先端部数十 μm で色素体が皆無の例も多数あった。

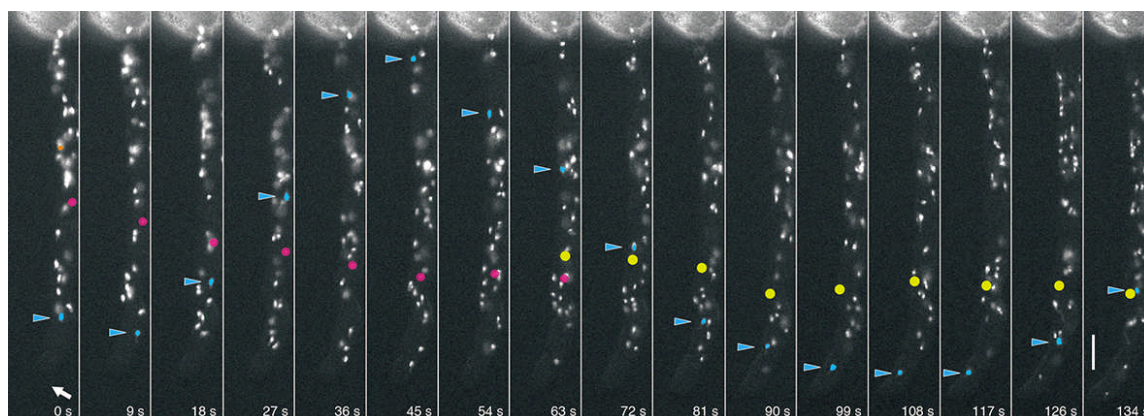


図1. シロイヌナズナの花粉管伸長時における色素体運動

YFP で標識した花粉管色素体を蛍光顕微鏡により観察した。矢頭または丸印はそれぞれ1つの色素体をマークしており、経時変化の中で追跡したものである。スケールは10 μm 。

4. まとめ

本研究の意義は、花粉管色素体の秒単位の運動・変形が初めて示された点である。歴史的には、80年代末-90年頃のDIC-ビデオ顕微鏡法により、花粉管のデンプン粒には2パターンの運動性があることが示された。90年代に入ると、アミロプラスト（デンプン貯蔵型色素体）の存在・形態的特徴が透過型電子顕微鏡により検出された。これらにも関わらず、花粉管色素体の振る舞いの全体像は不明であった。今回、蛍光タンパク質を用いて色素体の形態ダイナミクスが明示され、従来の研究を検証・相補しつつ、新知見に至ることができた。今回の野生型植物のデータは様々な変異体解析の基礎になるものと思われる。今後は、色素体分裂異常変異体などのリソースを用いて解析を進めたい。

本共同研究期間中、両研究室は合同ミーティングを開催し、植物研究に携わる大学院生・学部生の育成に努めた。研究終了後も、技術交換により研究の進展を図っている。