



Title	Actin-Dependent Chloroplast Anchoring Mechanism in Spinach Mesophyll Cells
Author(s)	Takamatsu, Hideyasu
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/26855">https://hdl.handle.net/11094/26855</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【53】

氏名	高松秀安
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 25215 号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Actin-Dependent Chloroplast Anchoring Mechanism in Spinach Mesophyll Cells (ホウレンソウにおけるアクチン細胞骨格に依存した葉緑体アンカー機構の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 小倉 明彦 (副査) 教授 関口 清俊 准教授 高木 慎吾 助教 浅田 哲弘

## 論文内容の要旨

植物細胞内における葉緑体の位置決定は、光合成の効率化や光障害の回避を実現する上で重要な過程である。葉緑体の位置決定にアクチン細胞骨格が関与していることが示唆されているが、その詳細な機構については未解明である。私は表層細胞質における葉緑体のアンカー・脱アンカーがアクチン細胞骨格によって制御されていると仮説を立てた。これについて検証するために、ホウレンソウ葉肉細胞を用いて解析を行った。

葉肉細胞の表層細胞質におけるアクチン構築に対する青色強光の影響について、凍結固定法により解析したところ、弱光条件下では葉緑体を取り囲むような網目状のアクチン繊維束が存在し、青色強光照射や  $\text{Ca}^{2+}$  処理によってその構築が消失することがわかった。さらに、カルモデュリン拮抗剤によって、青色強光や  $\text{Ca}^{2+}$  処理によって誘導される網目状構築の消失や青色強光に依存した葉緑体逃避運動が阻害されることがわかった。

表層細胞質における葉緑体アンカーとアクチン細胞骨格の関係について解析するために、細胞膜の細胞質側を露出させた細胞膜ゴーストを用いた。その結果、アクチン脱重合剤や  $1 \mu\text{M}$  以上の  $\text{Ca}^{2+}$  処理によって葉緑体近傍に存在するアクチン繊維束が消失し、葉緑体が脱離したことから、葉緑体アンカーがアクチン繊維に依存しており、 $\text{Ca}^{2+}$  による制御を受けている可能性が示された。 $\text{Ca}^{2+}$  処理の効果はカルモデュリンを阻害することによって抑制された。以上のことから、 $\text{Ca}^{2+}$  処理による葉緑体近傍のアクチン繊維束の消失及び葉緑体の脱離はカルモデュリンを介して起こることが示唆された。

細胞膜ゴーストにおける  $\text{Ca}^{2+}$  処理の効果に対して、 $\text{Ca}^{2+}$ -カルモデュリン感受性のアクチン

結合タンパク質であるピリンの関与を想定し、解析を行った。テッポウユリピリン P-115-ABP 及び P-135-ABP それぞれに対する抗体で細胞膜ゴーストを処理したところ、葉緑体の脱離が誘導された。葉からトリクロロ酢酸沈殿を調製し、上記抗体を用いて免疫ブロッティングを行ったところ、P-115-ABP 抗体は 120 kDa、P-135-ABP 抗体は 135 kDa のポリペプチドを認識した。DNaseI アフィニティカラムクロマトグラフィによって、これらのポリペプチドが  $\text{Ca}^{2+}$  に依存した G-アクチン結合能を持つことがわかった。さらに、これらのポリペプチドについて質量分析による解析を行ったところ、それぞれのピリンはシロイヌナズナのピリンと高いスコアを示した。また、葉肉細胞や単離葉緑体におけるピリン様タンパク質の局在を解析したところ、2種類のピリン様タンパク質の局在が異なることがわかった。

ホウレンソウ葉肉細胞において、葉緑体近傍のアクチン構築が  $\text{Ca}^{2+}$ -カルモデュリンの制御を受けていること、葉緑体近傍のアクチン繊維が葉緑体アンカーに寄与していることが強く示唆された。さらに、ホウレンソウには少なくとも2種類のピリン様タンパク質が存在し、それらが葉緑体アンカーの制御に機能している可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

高松秀安君は、陸上双子葉植物ホウレンソウを材料として、光合成を行なうオルガネラである葉緑体の細胞内分布を決定する仕組みに注目し、葉緑体アンカー機構についての解析に取り組んだ。まず、葉肉細胞における葉緑体周辺のアクチン細胞骨格の構築を調べ、青色強光およびカルシウム処理によって葉緑体を取り囲むアクチン構築が消失すること、これらの作用がカルモデュリン拮抗剤によって打ち消されることを示した。次に、葉肉細胞プロトプラストを破裂させた細胞膜ゴーストを用いたアッセイ系を確立し、アクチン脱重合剤やカルシウム処理が表層細胞質からの葉緑体の脱落およびアクチンシグナルの減少をもたらすこと、カルシウム処理の効果がカルモデュリン拮抗剤やカルモデュリンの除去によって打ち消されることを明らかにした。さらに、カルシウム感受性アクチン結合蛋白質がカルシウムの作用を介在すると想定し、テッポウユリで同定されていたピリン蛋白質に対する抗体が細胞膜ゴーストにおける葉緑体の脱落およびアクチンシグナルの減少をもたらすこと、質量分析などによりホウレンソウに少なくとも2種類の細胞内局在の異なるピリン様蛋白質が存在することを突き止めた。研究結果に基づき、細胞質のカルシウムレベルの変化に依存したピリン様蛋白質の活性制御を介して葉緑体のアンカー・脱アンカーが引き起こされるという仮説を提出した。

ユニークな細胞膜ゴーストアッセイ系を開発し、これまで知見の無かった葉緑体脱アンカー過程を詳細に解析した点、制御に関わる候補因子としてアクチン結合蛋白質ピリンを生化学的な手法により特定した点が高く評価された。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。