

# 研究報告書

## 「ライブセルイメージングによる光環境適応機構の実態解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 岩井 優和

### 1. 研究のねらい

太陽の光エネルギーから化学エネルギーを創り出す光合成反応は、植物の生存において不可欠な化学反応である。一連の光合成反応には複数のタンパク質が密接に関与しており、その多くは相互にコミュニケーションを取り合うように連動し、複雑な物理化学反応を制御していることが近年明らかとなってきた。このことから、植物は光合成反応を積極的に制御し、且つ環境変化に応じて反応効率を適切に調節していると考えられている。

葉緑体チラコイド膜に存在する光化学系(PS)複合体は、光合成反応で最も重要な酵素であり、PSI 複合体と PSII 複合体の2種類がある。PS 複合体が効率良く酵素反応を行うには、同じくチラコイド膜に存在する集光アンテナ(LHC)タンパク質からの励起エネルギーが必要である。LHC タンパク質は、吸収した光エネルギーを PS 複合体へと伝達するのに重要であるが、その一方で、過剰な光エネルギーを吸収した場合、それを熱として消散することで、PS タンパク質の分解を防いでいることも知られている。

これまでの先行研究から、PSII 複合体に結合する LHC(LHCII)タンパク質の機能が最も重要視されている。その制御因子の一つが、チラコイド膜を介したプロトン濃度勾配と密接に関与しており、それに伴う LHCII 内のカロテノイドの修飾とその他のタンパク質間相互作用によって、過剰なエネルギーの熱変換効率を高めていると考えられている。その他に、LHCII がリン酸化修飾されることで PSII 複合体と PSI 複合体との親和性が逆転し、PSII 複合体では制御しきれないエネルギーを PSI 複合体で効率良く消費していることも示唆されている。従って、LHCII の翻訳後修飾による機能変換によって、吸収した光エネルギーの伝達と熱変換の割合が積極的に調節され、各 PS 複合体での光合成反応を制御していると考えられている。しかし、LHCII を含む複数のタンパク質がチラコイド膜内で、どのようにして光合成反応の調節を行っているかは分かっておらず、その分子機構の実態も不明である。

本研究では、葉緑体で働く光合成反応を制御するタンパク質の挙動を生きた植物細胞内で直接観察(ライブセルイメージング)することで、植物がどのようにして光環境の変化に適応しているのかを明らかにすることを目的とする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

植物細胞には、さまざまな細胞内器官があるが、そのうちのひとつ葉緑体の中で光合成反応が行われている。葉緑体の長辺は約 5 から 10  $\mu\text{m}$  の大きさで、一つの細胞に 30 から 50 個存在している。電子顕微鏡による解析によって、葉緑体の内部にはチラコイド膜と呼ばれる脂質二重膜があることが分かっており、その膜が幾層にも重なった「グラナ構造」と、膜の重なりを持たない「ストロマラメラ構造」が存在する。また後者は前者同士の間を繋ぐように存在してい

ることも明らかとなっている。なぜチラコイド膜がそのような膜構造を形成しているのかは未だ不明であるが、このような複雑な構造を形成するチラコイド膜に、PS 複合体と LHC タンパク質及び、多くの光合成関連タンパク質が存在している。これまでの研究によって、PS 複合体と LHC タンパク質が関与するタンパク質間相互作用や、タンパク質超複合体の再編成による光環境変化への適応機構が示唆されており、またチラコイド膜の構造との密接な関係も注目されている。上述した電子顕微鏡による解析では、チラコイド膜内のタンパク質や、複雑な膜構造の違いなどの特徴を明らかにすることができるが、そのためには、細胞を化学固定する必要があり、タンパク質の挙動や振る舞いに関する情報を得ることができない。そこで本研究では、生きた植物細胞の葉緑体内で実際に働くタンパク質の動的な挙動の変化を解析するため、以下の項目を行った。

- A) 葉緑体ライブセルイメージング技術の確立
- B) チラコイド膜の構造ダイナミクスの解析
- C) チラコイド膜タンパク質の拡散速度の解析
- D) 超解像顕微鏡によるチラコイド膜の立体構造ライブセルイメージング解析
- E) シロイヌナズナ変異体の単離葉緑体チラコイド膜の立体構造タイムラプス解析
- F) ヒメツリガネゴケ特有の LHC タンパク質の生化学的解析

本研究では、ライブセルイメージング技術に最も適した生物としてヒメツリガネゴケを主に用いている。しかし、ヒメツリガネゴケの光合成機能についてはまだ未解明な点が多く、緑藻型と高等植物型、両方のタンパク質を有していることも最近明らかとなってきていることから、ヒメツリガネゴケは特有の光合成機能を保持していることが考えられる。従って、ヒメツリガネゴケを用いてライブセルイメージング解析を行う場合、光合成関連タンパク質の詳細な解析が必要不可欠であった。そのため項目 F では、ヒメツリガネゴケ特有の LHC タンパク質を詳細に解析するため、ライブセルイメージング解析ではなく、生化学的手法を主軸とした解析を行った。

## (2) 詳細

### A) 葉緑体ライブセルイメージング技術の確立

本研究では、生きた植物細胞を観察し、且つ 10  $\mu\text{m}$  以下の葉緑体内部を鮮明に観察する必要性があり、またチラコイド膜の構造を詳細に解析することが重要である。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ライブセルイメージング解析を行う際、PS 複合体や LHC タンパク質に含まれるクロロフィル(Chl)色素を励起し、約 680 nm をピークに持つ蛍光を観察する。本研究では、研究目的に応じて、様々な観察条件を考慮した。まず汎用されている共焦点レーザー顕微鏡を用いたヒメツリガネゴケの原系体細胞の生育環境と顕微鏡観察時における条件検討を行い、研究項目 B で応用した。次に、チラコイド膜内のタンパク質の拡散速度を測定するため、蛍光相関顕微鏡での観察条件の検討を行い、研究項目 C で応用した。そして、超解像顕微鏡を用いた観察に向けて条件検討し、研究項目 D を達成した。同じく、シロイヌナズナの単離葉緑体を用いた超解像顕微鏡での観察条件を確立し、研究項目 E で活用した。詳細は、各項目で述べる。

## B) チラコイド膜の構造ダイナミクスの解析

汎用されている共焦点レーザー顕微鏡で 10  $\mu\text{m}$  以下の葉緑体内部をライブセルイメージング観察するため、ヒメツリガネゴケの原糸体細胞を用いた。ヒメツリガネゴケは、アンピシリンなどの抗生物質を投与することで、一つの巨大な葉緑体(図 1A)を形成することが知られており、その特徴を利用して観察を行った。また平面画像を縦方向に複数枚取得し、縦方向に広がる蛍光シグナル

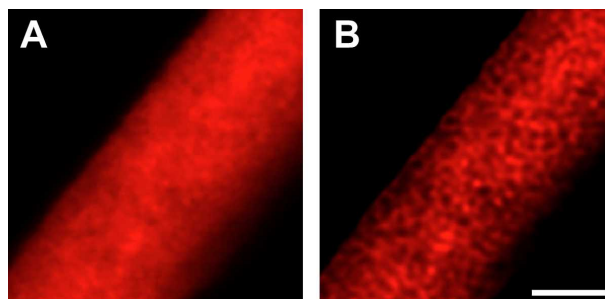


図1. 巨大葉緑体のチラコイド膜構造のライブセルイメージング

ルの非焦点ボケを3次元(3D)デコンボリューション解析することで除去し画像構築することで、葉緑体内部のチラコイド膜の複雑な構造を可視化することができた(図 1B)。これを複数回繰り返し画像取得することで、生きた植物細胞の葉緑体内部のチラコイド膜構造のタイムラプス観察を行った。その結果、グラナは細かく揺れ動く比較的安定した膜構造で、ストロマラメラは約 10 秒間隔で激しく揺れ動く膜構造をしていることが明らかとなった。この結果は、細胞を固定する必要がある電子顕微鏡観察では明らかにすることができない成果であり、初めてチラコイド膜の構造ダイナミクスを可視化した結果である(研究成果リスト3)。

## C) チラコイド膜タンパク質の拡散速度の解析

チラコイド膜には複数の光合成関連タンパク質が存在している。これまでに PS 複合体と LHC タンパク質が関与したタンパク質間相互作用や超複合体の再編成による光環境変化への適応機構が示唆されている。しかし、チラコイド膜内のこれらの光合成関連タンパク質の挙動については不明な点が多い。共焦点レーザー顕微鏡を用いたレーザー

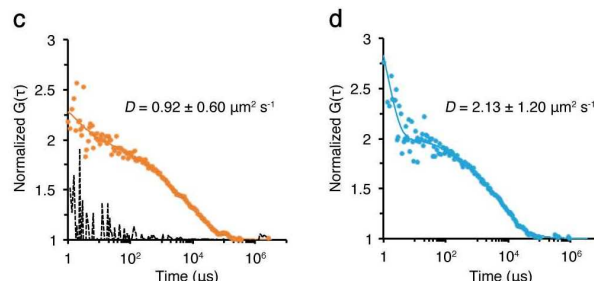


図2. FCS 解析によるリン酸化修飾が及ぼすタンパク質拡散速度の変化

光刺激による蛍光退色後の蛍光回復(FRAP)を解析する先行研究では、チラコイド膜内のタンパク質の挙動はかなり制限されていると示唆されている。しかし FRAP による解析では広範囲の視野を観察し、蛍光強度の強い Chl の場合、退色前後の強度差が大きすぎるため回復レベルが低く見積もられることがあり、退色後の弱い蛍光シグナルを検出するのが難しい。そこで、本研究項目では、共焦点レーザー顕微鏡による蛍光相関分光法(FCS)を用いて、チラコイド膜内のタンパク質の拡散速度の解析を行った。FCS は、回折限界体積中のタンパク質の拡散を測定することができ、速い速度の計測が可能である。ここでは、チラコイド膜の複雑な構造がタンパク質の拡散速度に影響を及ぼすことを懸念し、緑藻クラミドモナスの葉緑体から精製したチラコイド膜を観察用カバーガラス表面に電荷的に固定し緩衝液中で解析を行った。その結果、FRAP で測定された拡散速度の約100倍の数値を示すタンパク質拡散が

チラコイド膜内に存在していることが分かった。また、LHC タンパク質のリン酸化修飾によって、拡散速度が約2倍速くなることが確認できた(図2)。このことから、チラコイド膜は従来の考えよりも局所的に速く拡散する膜環境であることが示唆された(研究成果リスト1)。

#### D) 超解像顕微鏡によるチラコイド膜の立体構造ライブセルイメージング解析

汎用されている共焦点レーザー顕微鏡では、3D 画像を取得するための平面画像の取得時間と縦方向の移動時間が長く、タイムラプス観察の不連続性が大きい。そのため、葉緑体全体の解析とチラコイド膜の構造ダイナミクスの追跡も困難である。そこで所属チームで開発が進められている超解像ライブイメージング顕微鏡(SCLIM)を用いて解析を行った。SCLIMは、スピニングディスクによる平面画像の高速スキャンとピエゾアクチュエータによる縦方向の高

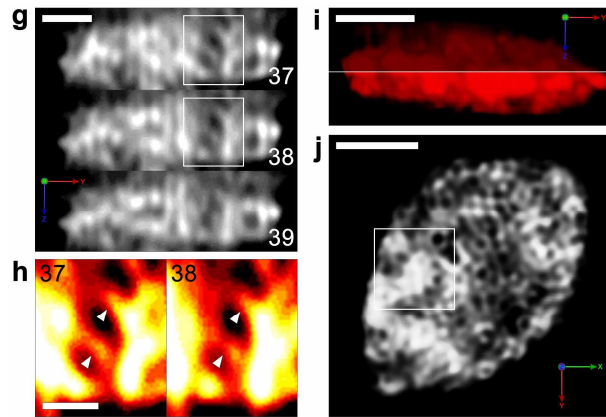


図3. SCLIMによる葉緑体チラコイド膜構造の立体構造ライブセルイメージング

速移動を可能とすることで3D画像の取得時間を極限まで短縮することができる。SCLIMによる観察の結果、ヒメツリガネゴケの原糸体細胞を巨大にすることなく、通常の大サイズの葉緑体全体を網羅し、内部の複雑なチラコイド膜構造を詳細に観察することができた(図3)。また、緑色蛍光タンパク質(GFP)を葉緑体のストロマ領域に発現させ、Chl 蛍光と GFP 蛍光の局在の違いから Chl 蛍光で観察するチラコイド膜構造が真実であることを証明することができた。従って、SCLIMによる生きた細胞の葉緑体内部のチラコイド膜全体像を初めて詳細に可視化することができた。また、SCLIMによるタイムラプス解析の結果、過剰な光エネルギーを熱に変換する際に、グラナ構造が分離している様子を観察することができた。また、ストロマラメラのダイナミックな挙動も明確に観察することができた。これらのことから、光エネルギーを制御する際にチラコイド膜に存在する光合成関連タンパク質の動態だけでなく、膜構造自体のダイナミックな挙動も関連していることが示唆された(原著論文は投稿中)。

#### E) シロイヌナズナ変異体の単離葉緑体チラコイド膜の立体構造タイムラプス解析

これまでの先行研究によって、シロイヌナズナの光エネルギー伝達に関連する変異体の単離が進んでいる。本研究で確立した観察条件を応用し、葉から無傷葉緑体を単離し、SCLIMを用いて直接タイムラプス解析を行った。LHCII タンパク質と PSII 複合体のリン酸化修飾をそれぞれ担う二つのキナーゼ(STN7 と STN8)を欠損した二重変異体(stn7stn8)と LHCII タンパク質の脱リン酸化修飾を担うフォスファターゼ(TAP38)の欠損株(tap38)を観察したところ、前者はグラナ構造が後者に比べて約5倍近く大きくなっていることが分かった。また、タイムラプス解析を行うと、野生型と比べて、両者共にストロマラメラ構造のダイナミクスが少ないことが分かった。これまでの先行研究で、グラナ構造には PSII 複合体が、ストロマラメラ構造には PSI 複合体が別々に局在していることが示唆されており、LHCII が各 PS 複合体間を移動する際、膜構造に何らかの影響を与えていると考えられている。SCLIMによる解析結果から、LHCII

や PSII に働きかけるキナーゼとフォスファターゼのリン酸化修飾の競合に伴ってチラコイド膜構造のダイナミクスが起きていることが示唆される(原著論文は投稿準備中)。

#### F)ヒメツリガネゴケ特有の LHC タンパク質の生化学的解析

ライブセルイメージング技術によって、現象の変化を追跡解析し、またその変化の速度と度合いを三次元的に解析することが可能であるが、生化学的解析による実態に伴った裏付け検証も必要不可欠である。ヒメツリガネゴケのチラコイド膜に存在する光合成関連タンパク質に

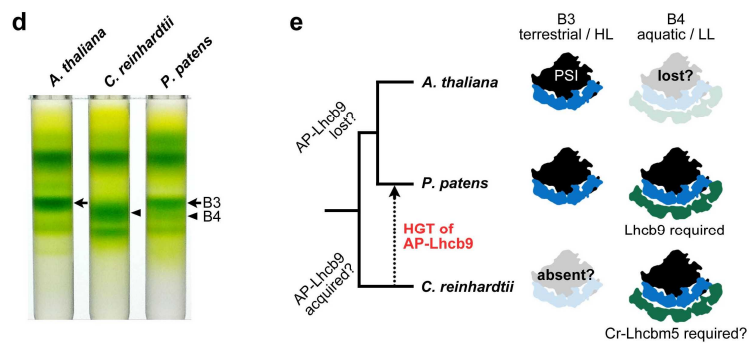


図4. ヒメツリガネゴケ特有 LHC タンパク質(Lhc9)の生化学的解析と系統樹解析

ついてはまだ研究が進んでいなかった。そこで本研究では、欠損株や His タグ変異体を作成し、ヒメツリガネゴケの PS 複合体と LHC タンパク質について詳細な生化学的解析を行った。その結果、ヒメツリガネゴケには、緑藻型と高等植物型の PSI 超複合体が存在していることが明らかとなった(図4)。また、ヒメツリガネゴケ特有の LHC タンパク質(Lhc9)が緑藻型 PSI 超複合体に必須であることも明らかにした。また、LHC の系統樹解析によって、Lhc9 由来の遺伝子が緑藻の祖先から水平伝播によってヒメツリガネゴケの祖先に取り込まれたことが示唆された。そして、光環境の変化に応じて、Lhc9 を含む緑藻型 PSI 超複合体の形成が変化することも分かった。これらの結果から、Lhc9 の獲得によって、緑藻型 PSI 超複合体の形成が可能となり、ヒメツリガネゴケ特有の光環境への適応を成し遂げたと考えられる(研究成果リスト4)。

### 3. 今後の展開

本研究では、葉緑体ライブセルイメージング技術によって、葉緑体内部に存在するチラコイド膜の構造に着目し、その構造ダイナミクスと光環境変化との関連を明らかにすることができた。またシロイヌナズナ変異体の解析から、リン酸化修飾によるタンパク質の状態(電荷的・構造的)変化と構造ダイナミクスが強く関連していることも分かった。しかし、個々のタンパク質のライブイメージング観察にはまだ至っていない。本研究で確立した葉緑体ライブセルイメージング技術を基盤とし、Chl 結合タンパク質の励起方法や蛍光の検出様式を改変することでより複雑なタンパク質の挙動変化を追跡することができると考えられる。例えば、蛍光寿命測定を各ピクセルで連続的に行うことで、Chl 蛍光シグナルを蛍光寿命の違いで識別することができる。本研究で行った超解像顕微鏡レベルで、高速スキャンによる3D 構造を蛍光寿命の違いで識別することができれば、個々のタンパク質を追跡して解析ができ、また光エネルギーの移動方向も知る事が可能となる。そのためには、周波数領域法による蛍光寿命解析が最適な手法であり、スピニングディスクとピエゾアクチュエータによる高速3D スキャンと周波数可変型励起・検出器の連動制御システムの構築が達成の鍵となる。

本研究によって葉緑体ライブセルイメージングの有用性を十分に見出だすことができた。生きた細胞内で起こる現象を追跡解析することの重要性も明らかにすることができた。今後の課題として、本研究で得られた基盤技術をライブプロテインイメージング技術の確立へと発展させ、個々のタンパク質と現象との関連性を解き明かす必要がある。また、光合成反応特有の光エネルギーと熱エネルギーの変換効率を可視化するライブイメージング技術も重要である。それらの技術によって、太陽からの光エネルギーがどのように化学エネルギーへと変換され、植物が創り出す有機資源へと繋がっているのかといった根本的な問題に迫ることができる。そして、その問題解決によって、将来の人工的な有機資源生産の効率化に役立つと考えられる。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本研究によって、葉緑体ライブセルイメージング技術の実用性が確認できたことは非常に大きい。また、複数の光合成関連タンパク質に数多く存在する Chl を、自家蛍光としての蛍光強度の揺らぎの大きさ、そして光合成特有の光エネルギー伝達機構を考慮した蛍光観察において、生きた細胞の葉緑体内部の微細なチラコイド膜構造を、電子顕微鏡レベルの空間分解能に近づく領域まで迫ることができたことも非常に大きな成果である。

本研究では、ヒメツリガネゴケが主なモデル植物であったが、他にもシロイヌナズナとクラミドモナスを用いた解析を行った。ライブセルイメージング技術の応用を目指すためには、さらに多くのモデル植物の解析を推進する必要がある。また、研究対象が植物であるため、生育維持・管理と変異体作成などの研究実施体制の整備を充実させることが研究目標の達成に重要である。

光合成研究分野では、まだ広く普及していないライブセルイメージング技術を本研究で確立できたことは非常にインパクトが大きい。その重要性については、今後の成果発表でさらに広まること多いに期待できる。百聞は一見に如かずであり、葉緑体内部のチラコイド膜の生きた挙動を実際に目の当たりにするだけで、これまでの常識を考え直すきっかけとなる。また、分子レベルだけでなくタンパク質レベルにおける相互作用やネットワークの存在、そして、それらの動態変化に伴う現象の検証など、分子機構を解き明かすための重要な手掛かりを導きだせる技術である。本研究は、その研究基盤技術をさきがけて確立することができ、今後、タンパク質レベルのライブイメージングの実現に向けて、より一層の研究開発の推進を行いたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

植物における二酸化炭素資源化の根源である光合成について、その状況をライブセルイメージングという手法で可視化する方法の確立を目標として研究が進められた。この研究課題では、モデル植物としてヒメツリガネゴケの生きた葉緑体のチラコイド膜のイメージング技術を確立し、多くの新知見を得て、優れた論文を数多く発表してきており、この分野の国際的な研究者として認知されている。このように、科学技術上の優れた研究成果、また、研究者としての発展という観点からも、十分にさきがけ研究の目的を達成したと判断する。

今後は、本技術を、ルビスコなどの光合成にかかわるタンパク質のイメージング技術や、光環境に対する応答を解析する技術の開発などにつなげ、また、高等植物にこの技術を活用できるように、研究を発展させて欲しい。それらは今後の光合成反応の分子機構の研究に大きく貢献することとなろう。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

|  |
|--|
| 1. Iwai, M., Pack, C.-G., Takenaka, Y., Sako, Y., Nakano, A. Photosystem II antenna phosphorylation-dependent protein diffusion determined by fluorescence correlation spectroscopy. <i>Scientific Reports</i> 3, 2833; DOI:10.1038/srep02833 (2013).              |
| 2. Iwai, M., Imaging chlorophyll fluorescence at multiple spatiotemporal scales, <i>News Letters of the Japanese Society of Photosynthesis Research</i> , Vol. 23, Dec. (2013).  |
| 3. Iwai, M., Yokono, M., Nakano, A. Visualizing structural dynamics of thylakoid membranes. <i>Scientific Reports</i> 4, 3768; DOI:10.1038/srep03768 (2014).   |
| 4. Iwai, M., Yokono, M., Kono, M., Noguchi, K., Akimoto, S., Nakano, A. Light-harvesting complex Lhcb9 confers a green alga-type photosystem I supercomplex to the moss <i>Physcomitrella patens</i> . <i>Nature Plants</i> 1; DOI: 10.1038/NPLANTS.2014.8 (2015). |
| 5. Iwai, M., Yokono, M., Nakano, A. Toward understanding the multiple spatiotemporal dynamics of chlorophyll fluorescence. <i>Plant Signaling &amp; Behavior</i> ; DOI:10.1080/15592324.2015.1022014 (2015).   |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 学会発表

1. 岩井優和, 葉緑体チラコイド膜構造の超解像ライブイメージング, 第56回日本植物生理学会年会, 2015年3月16日, 世田谷区.
2. 岩井優和, ライブセルイメージングで葉緑体チラコイド膜についてどこまで理解できるのか, 第17回植物オルガネラワークショップ「オルガネラ機能の最適化メカニズム」, 2015年3月15日, 目黒区. 【招待講演】
3. 岩井優和, “too famous but too unknown”を打破するために必要なことは何か? 第4回光合成学会年会シンポジウム, 2013年5月31日, 名古屋市. 【招待講演】
4. Iwai, M., Live Cell Imaging of Chloroplast Internal Structure Dynamics, Okayama University International Symposium “Structure and Dynamics of Photosynthetic Systems” 2012年10月22-23日, 岡山市.
5. Iwai, M., Visualizing chloroplast internal activities by using live cell imaging techniques, Japanese-Finnish Seminar 2012 “Photosynthetic research for sustainable energy production” 2012年9月9日, Naantali, Finland.

6. Iwai, M., Visualizing thylakoid membrane structure dynamics, Photosynthesis Gordon Research Conference, 2012 年 7 月 8 日, NC, USA.
7. Iwai, M., Enlarging the moss chloroplasts to see what happens inside, MOSS 2012, 2012 年 6 月 15 日, NY, USA.

### プレスリリース

8. 葉緑体内部のダイナミックな構造変化を生きのまま観察, 2014 年 1 月 20 日.
9. コケ植物の光化学系I複合体の集光アンテナ調節機構を解明, 2015 年 1 月 20 日.

### メディア記事掲載

10. 日本経済新聞電子版, 2014 年 1 月 20 日付.
11. 植物葉緑体内部構造変化, 日刊工業新聞, 2014 年 1 月 22 日付.
12. 葉緑体の構造変化を可視化, 化学工業日報, 2014 年 1 月 23 日付.
13. Viewing the light harvest in plant cells, Biome, 2014 年 1 月 24 日付.

### 共同研究

14. 白燦基準教授, Gacheon University of Medicine and Science.
15. 武仲能子主任研究員, 産業技術総合研究所.
16. 横野牧生博士, 北海道大学.
17. 秋本誠志准教授, 神戸大学.
18. 野口航准教授, 東京大学.

### 科学アウトリーチ活動

19. 招待講演, NIC International College in Japan, 2014 年 7 月 27 日, 新宿区.
20. 招待講義, 清真学園中学校, 2014 年 7 月 12 日, 鹿嶋市.
21. 招待講演, NIC International College in Japan, 2014 年 6 月 17 日, 新宿区.
22. 招待講演, NIC International College in Japan, 2014 年 4 月 24 日, 大阪市.
23. 招待講演, NIC International College in Japan, 2013 年 7 月 28 日, 新宿区.
24. 科学技術の美パネル展, 2012 年 4 月 16—22 日, 科学技術振興機構.