

ピンポイント照射装置を用いた 光変換蛍光タンパク質の細胞内動態解析

森 祥伍（基礎生物学研究所 技術課）

MORI Shogo: Observation of the subcellular translocation of LZY using the pinpoint irradiation system and the photoconversion method

In *Arabidopsis*, LZY proteins is polarly localized to the amyloplasts and plasma membrane (PM) proximal to amyloplasts in the columella cells of lateral roots. After gravistimulation by reorientation of plants, LZY appeared on the PM of the new lower side at the same time as amyloplast displacement. In this study, I report the observation and quantitative analysis of the subcellular translocation of LZY using the pinpoint irradiation system that enables laser irradiation targeting cell organelles and the photoconversion method.

1. 目的

シロイヌナズナの根は重力の方向に屈曲する正の重力屈性を持っている。この重力屈性に関与する LZY タンパク質の機能を解析するために重力感受細胞内での動態を解析している。LZY は根の重力感受細胞においてアミロプラストとその近傍の細胞膜上に局在している。重力刺激によってアミロプラストが沈降すると速やかに細胞膜上の蛍光の位置も新しい重力方向に変化する（図 1）。この時 LZY は細胞膜上を直接移動しているのか、細胞膜上から一度分解され、アミロプラスト上の LZY が新たに細胞膜に供給されているのかを明らかにしたい。

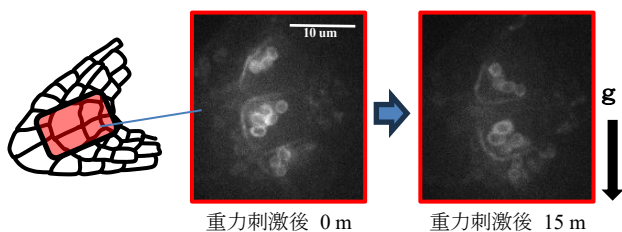


図 1. LZY4p::LZY4-mScarlet / lzy4 のライブイメージング

2. 方法

LZY タンパク質に光変換蛍光タンパク質 mEos2 を結合したタンパク質を発現する系統を用いる。mEos2 は通常 488 nm の光によって励起される緑色蛍光を示すが、405 nm の紫外線を照射すると光スイッチングにより、561 nm の光によって励起される赤色蛍光に蛍光波長を変換できる。この植物体を通常の顕微鏡を横倒しにすることで試料の重力方向を保持したまま観察が行える垂直ステージ共焦点顕微鏡上で観察し、細胞小

器官レベルで 405 nm の紫外線をレーザー照射できるピンポイント照射装置によって光スイッチングを行った（図 2）。アミロプラスト上の mEos2 のみを光スイッチングによって赤色蛍光に変換し、その後赤色蛍光を経時観察することでアミロプラスト上の LZY のみの細胞内動態を解析できることを期待した。

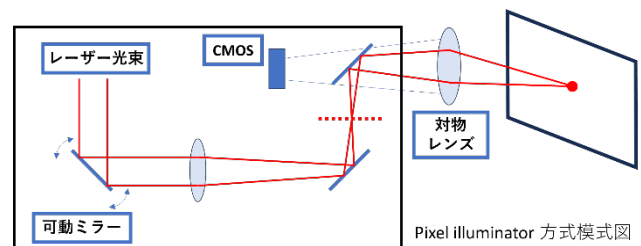


図 2. 垂直ステージ共焦点顕微鏡及びピンポイント照射装置概要

3. 結果

(1) 観察結果

ピンポイント照射装置による 405 nm 紫外線照射によりアミロプラスト上の mEos2 のみを光変換することに成功した（図 3）。図 3 の左図が照射直前の緑色蛍光の画像を示し、画像中の白色の点は照射位置を示す。赤枠の画像は照射後 0 m（中央）と 1 m（右）の赤色蛍

光の画像を示す。

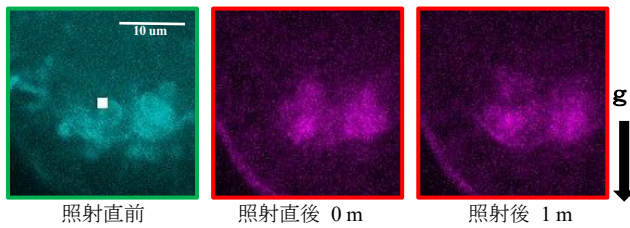


図 3. LZY-mEos2 の蛍光画像

照射直後、赤色蛍光はアミロプラスト上にだけ存在し、細胞膜上には観察されなかった。照射後 1 m の画像では細胞膜上にライン状に赤色蛍光が局在している様子が観察された。

(2) 定量結果

観察結果を定量するために 0 m と 1 m における細胞膜上の 1 pixel の赤色蛍光の輝度に着目した箱ひげ図で表した (図 4)。0 m では蛍光輝度が低いが、1 m では蛍光輝度が上昇し有意に差があることが示された。このことからアミロプラスト上に存在する LZY タンパク質は細胞膜上へ移動していることが統計的に示された。

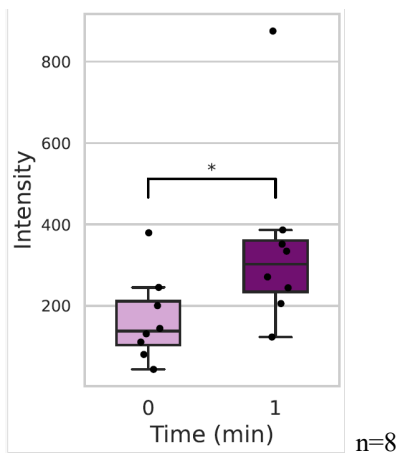


図 4. 細胞膜上の赤色蛍光の輝度

4. 考察

アミロプラストはデンプンが蓄積した色素体の一種で比重が高いため、細胞内で重力方向に沈降する。このことがシロイヌナズナにおいて重力の方向を認識する重力感受を担っていると考えられている。また、重力屈性において根ではオーキシンのという植物ホルモンが偏差分布する。オーキシンの濃度差によって根の伸長領域の上側の細胞と下側の細胞とで偏差成長を起こすことによって重力屈性が起こる。このアミロプラストの沈降という物理的な刺激を、オーキシンの偏差分

布という生化学的なシグナルに変換するプロセスを重力シグナリングと呼んでいる。本研究では、LZY タンパク質がアミロプラスト上に存在し、重力刺激によってアミロプラストが沈降した後、アミロプラスト上に存在する LZY が近傍の細胞膜へ輸送されている可能性を示している。つまりアミロプラストの細胞内での位置情報を、細胞膜上の LZY の極性局在に変換していることになり、今まで未知であった重力シグナリングの機構の解明につながる足掛かりになる結果である。

今回の結果は少なくともアミロプラスト上の LZY が細胞膜上に移動している可能性を示唆するものであり、LZY が細胞膜上を直接輸送されている可能性を否定するものではない。したがって今後の研究ではさらに詳細な LZY の細胞内動態を解析し、また細胞膜上で LZY が極性局在を形成することが、実際にオーキシンの偏差分布形成に重要であるかどうかを解析したい。

謝辞

ピンポイント照射装置の設置をしていただいたピンポイントフォトニクス株式会社の木島公一朗様と、定量解析について相談に乗ってくださった熊本大学の檜垣匠教授と、ご指導くださった植物環境応答研究部門の皆様にご感謝いたします。

参考文献

- 1) Nishimura T, Mori S, Shikata H et al (2023) Cell polarity linked to gravity sensing is generated by LZY translocation from statoliths to the plasma membrane. *Science* 381:1006–1010.
- 2) S. A. McKinney, C. S. Murphy, K. L. Hazelwood, M. W. Davidson, L. L. Looger (2009) A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nat. Methods* 6, 131–133.
- 3) M. Nakamura, M. Toyota, M. Tasaka, M. T. Morita (2015) Live cell imaging of cytoskeletal and organelle dynamics in gravity-sensing cells in plant gravitropism. *Methods Mol. Biol.* 1309, 57–69.