

## 多様な植物の生細胞に存在するデンプン顆粒の可視化に成功！

### -デンプン代謝の理解が飛躍的に深まる可能性-

#### ■発表のポイント

- ・蛍光色素フルオレセインを用いることで、様々な植物種の生細胞におけるデンプン顆粒の可視化に成功しました。
- ・フルオレセインはアミロースとアミロペクチンの空孔に入り込み、生細胞のデンプン顆粒や精製デンプンを染色できることが分かりました。

#### ■研究概要

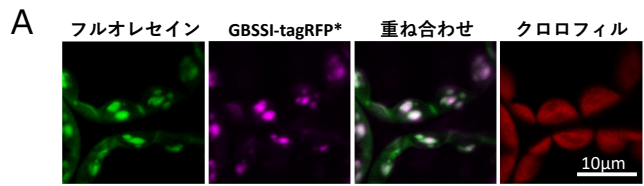
宇都宮大学地域創生科学研究科博士後期 1 年の市川晋太郎さんとバイオサイエンス教育研究センターの児玉豊教授らの研究グループは、さまざまな植物種の生細胞において、簡易的な方法でデンプン顆粒を可視化する技術を開発しました。本成果は 2023 年 10 月 4 日付で米国科学際誌 *Plant Physiology* に掲載されました。

#### ■研究背景

光合成によって産生されたデンプン顆粒は、植物のエネルギー源として葉緑体内部に蓄積され、エネルギー代謝やストレス応答など重要な役割を担っています。植物におけるデンプン顆粒の局在や挙動を可視化することは、デンプンの代謝研究を進める上で不可欠です。例えば私たちが小学校で必ず習うヨウ素デンプン反応は、200 年以上も前から使われているデンプンの可視化法です。しかし、これまでに開発されたデンプン顆粒の可視化法のほとんどが細胞の化学固定を伴うため、生きた植物細胞内では観察できない欠点がありました。一部のモデル生物では蛍光タンパク質を用いることで生細胞のデンプン顆粒の観察が可能なものの、形質転換体を作成できる植物種は限定的です。このような背景の中、市川さんと児玉教授らは様々な植物種の生細胞で葉緑体デンプン顆粒を可視化する方法を開発しました。

## ■研究成果

市川さんと児玉教授らは市販の蛍光色素試薬の中でも、広く使用されているフルオレセイン (Fluorescein) が植物の生細胞における葉緑体デンプン顆粒の局在や挙動の可視化に適していることを確認しました。実験では、デンプン顆粒マーカ (GBSSI-tagRFP) を用いた形質転換体をシロイヌナズナで作出し、葉片をフルオレセインで 10 分間ほど処理しました。その結果、デンプン顆粒マーカとフルオレセインの蛍光シグナルの局在が一致することが確かめられました (図 1A)。また、アルミ箔で 1 日覆った葉の一部をフルオレセインで染色した結果、遮光した部分ではデンプン顆粒の蛍光シグナルが弱まり、デンプンが暗条件下で分解される事実を反映する結果となりました (図 1B)。



\*デンプン顆粒内在性のアミロース合成酵素GBSSIに蛍光タンパク質RFPを融合したデンプン顆粒マーカ

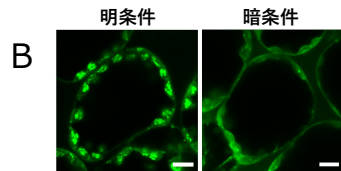


図1 シロイヌナズナの生細胞で可視化されたデンプン顆粒。

A) 形質転換体では、デンプン顆粒マーカとフルオレセインの蛍光シグナルの局在が一致。B) フルオレセインの蛍光シグナルは暗条件下で弱まる。

フルオレセインを用いたデンプン顆粒の可視化法はシロイヌナズナ以外の植物種でも適用が可能であり、汎用性の高い技術であることが示されました (図 2)。また、蛍光色素の中でもフルオレセインの派生体である FDA (Fluorescein diacetate) が最も強い蛍光シグナルを発することが確かめられ、植物ごとに生細胞におけるデンプン顆粒の実態を詳細に記載できることが示されました。

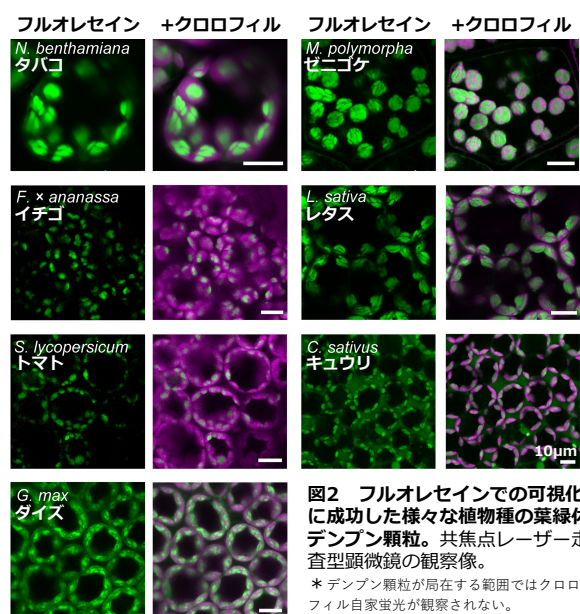


図2 フルオレセインでの可視化に成功した様々な植物種の葉緑体デンプン顆粒。共焦点レーザー走査型顕微鏡の観察像。

\* デンプン顆粒が局在する範囲ではクロロフィル自家蛍光が観察されない。

さらに今回の実験では、フルオレセインはヨウ素と同様に、アミロースとアミロペクチンの空孔に入り込むことで、生細胞の葉緑体デンプン顆粒に加えて精製デンプンも染色できることが明らかになりました。したがって、フルオレセインを用いたデンプン顆粒の可視化技術は、食品科学や材料科学的な面でも価値のある成果といえるでしょう。

## ■今後の展望

蛍光色素フルオレセインを用いた植物の生細胞におけるデンプン顆粒の可視化法を用いることにより、デンプン代謝制御に関する理解が飛躍的に深まることが期待できます。現在までに、生細胞の処理に用いられたフルオレセインは細胞質領域に蓄積されたあと、葉緑体に移動することがわかっています、しかし、フルオレセインが葉緑体に取り込まれる分子機構は不明であり、その輸送経路の解明は今後の課題です。

## ■論文情報

タイトル Fluorescein staining of chloroplast starch granules in living plants

掲載誌 *Plant Physiology*

DOI <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad528>

## ■研究支援

本研究は、文部科学省科学研究費 助成 学術変革領域研究(A)「不均一環境変動に対する植物のレジリエンスを支える多層的情報統御の分子機構」(児玉豊、課題番号:20H05905)、科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業 総括実施型研究(ERATO)「沼田オルガネラ反応クラスタープロジェクト(沼田圭司、児玉豊、課題番号:JPMJER1602)」の支援により実施されました。

## ■英文概要

Chloroplast starch granules (cpSGs) store energy harvested through photosynthesis in plants, and cpSG dynamics have important roles in plant energy metabolism and stress responses. To date, cpSGs have been visualized using several methods, such as iodine staining; however, no method can be used to specifically visualize cpSGs in living cells from various plant species. Here, we report a simple method to visualize cpSGs in living plant cells in various species by staining with fluorescein, a commonly used fluorescent dye. We show that fluorescein is taken up into chloroplasts and interacts with cpSGs similarly to iodine. Fluorescein also interacts with refined starch *in vitro*. Using a fluorescein derivative for ultra-bright cpSG imaging, we produced high-quality three-dimensional reconstructions of cpSGs and evaluated their accumulation in multiple plant species. As fluorescein is well-known and readily purchasable, our fluorescein-based staining method should contribute to all research regarding starch.

## ■本件に関する問い合わせ

国立大学法人 宇都宮大学 バイオサイエンス教育研究センター 教授 児玉 豊

TEL:028-649-5527 FAX:028-649-8651

E-mail:c-bio@cc.utsunomiya-u.ac.jp