

シダ植物ノキシノブの葉緑体核様体に及ぼす シプロフロキサシンの影響

泉 好弘*・佐藤衣里**・金田沙弓**・倉富桃李**・酒井達彦**

【要 旨】 紅藻類や緑色植物の葉緑体は藍藻類が共生したものであるということは、一般に広く知られている。DNA の構造変化を触媒する DNA ジャイレースは、原核生物の DNA 複製の際に、重要な役割を果たしている。我々は、原核生物の DNA ジャイレース活性を阻害する抗生物質がシダ植物の葉緑体核様体に及ぼす影響を明らかにするため、抗生物質で処理された前葉体の葉緑体核様体の数を測定した。抗生物質で処理されていない前葉体では、小さな葉緑体核様体が葉緑体内に多数分布していた。一方、抗生物質で処理された前葉体の葉緑体には1または2個の大きな葉緑体核様体が存在した。これらの結果は、シダ植物の DNA ジャイレースは葉緑体内で核様体が分散する際に重要な役割を果たしていることを示唆している。

【キーワード】 葉緑体核様体 DNA ジャイレース 抗生物質 シダ植物

I はじめに

葉緑体の起源は、細胞内に共生した藍藻類であると考えられている (Margulis 1970, Cavalier-Smith 2000)。藍藻類を含む原核生物の細胞を構成する物質は真核生物のものと一部異なるため、原核生物のみに存在する酵素が多数存在する。これらの酵素の阻害剤は真核生物の成長には影響及ぼさないと考えられるため、抗生物質として利用されている。

原核生物では細胞質中に環状の DNA が存在するが、通常、その環状 DNA は複雑に絡み合っている。しかしながら、そのような状態では、DNA の複製が進行しないため、DNA を複製する際には DNA を弛緩した状態に戻す必要がある。このような DNA の構造変化に関与する酵素は一般に DNA トポイソメラーゼと呼ばれている。それらの中で DNA ジャイレースは、原核生物に特有の DNA トポイソメラーゼとして広く知られている。DNA ジャイレースの阻害剤を原核生物に作用させると DNA の構造変化が阻害され、DNA が複製できなくなり、最終的にその原核生物は死滅する。DNA ジャイレースは真核生物には存在しないと考えられていたため、DNA ジャイレースの阻害剤であるナリジクス酸やシプロフロキサシンは抗生物質とし

平成 18 年 10 月 31 日受理

*いずみ・よしひろ 大分大学教育福祉科学部生物学教室

**さとう・えり, かねだ・さゆみ, くらとみ・ももり, さかい・たつひこ 大分県立大分舞鶴高等学校

て利用されてきた。

このように DNA ジャイレースは真核生物には存在しないと考えられていたが、その後の研究で、植物の葉緑体において重要な働きをしていることが明らかになってきた。Itoh et al. (1997) は、DNA ジャイレースの阻害剤が紅藻類の葉緑体 DNA の複製と分配を阻害し、分裂によって核様体 (DNA) を持つ娘葉緑体と核様体を持たない娘葉緑体が生じることを報告した。この結果は、葉緑体の起源であると考えられている藍藻類に存在する DNA ジャイレースが紅藻類にも存在し、葉緑体に対して原核生物と同様の働きをしていることを示唆している。一方、Cho et al. (2004) は、タバコ属植物の DNA ジャイレース活性を阻害すると、DNA の複製は阻害されないが、本来葉緑体内に散在している核様体が中央部に密集するようになることを報告した。この結果は、被子植物の DNA ジャイレースは、葉緑体内において核様体が分散する際にのみ作用していることを示唆しており、進化の過程で DNA ジャイレースの役割が変化したのではないかと考えられる。

植物の葉緑体核様体に及ぼす DNA ジャイレース阻害剤の影響は、前述の紅藻類と被子植物以外の植物ではまだ調べられていない。緑藻類やコケ植物、シダ植物などの様々な植物で DNA ジャイレース阻害剤の影響を調べることにより、進化のどの段階で DNA ジャイレースの役割が変化したのかが明らかになる可能性がある。そこで今回の研究では、材料が入手しやすいシダ植物のノキシノブを用いて葉緑体核様体に及ぼす DNA ジャイレース阻害剤の影響を調べた。

II 材料と方法

1 実験材料

今回の実験に用いたノキシノブの胞子は、大分舞鶴高等学校内で採集した。ジャイレースの活性を阻害する抗生物質として、シプロフロキサシン塩酸塩 (和光) を用いた。

2 培養条件

1/2 の濃度の Knop 培地 (Knop 1865) を基本培地とし、抗生物質と 1%寒天を加えたものを培地として用いた。4 種類の濃度 (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mM) でシプロフロキサシンを加えた培地と抗生物質を加えていない培地 (コントロール) の計 5 種類の培地を実験に用いた。これらの培地にノキシノブの胞子を撒き、25°C、連続光下で 30 日間培養した。

3 前葉体の観察

成長した前葉体を NS 緩衝液 (Kuroiwa et al. 1981) に溶かした 2%グルタルアルデヒド溶液で 1 時間以上固定し、光学顕微鏡で観察した。前葉体の成長に及ぼすシプロフロキサシンの影響を調べるために、前葉体の長軸の長さを測定した。すべての測定には 100 個以上の前葉体を用いた。

4 葉緑体核様体の観察

固定した前葉体を 2% セルラーゼ “オノヅカ” RS (ヤクルト) 及び 0.3% ペクトリアーゼ Y-23 (キッコーマン) を含む酵素液に浸し、35°C で約 2 時間処理した後、再固定した。酵素処理された前葉体を 1 mg/l の濃度の 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) で約 10

分間染色し、蛍光顕微鏡で観察した。葉緑体核様体に及ぼすシプロフロキサシンの影響を調べるために、葉緑体内の核様体の数を測定した。すべての測定には100個以上の葉緑体を用いた。

Ⅲ 結果と考察

1 前葉体の成長に及ぼすシプロフロキサシンの影響

0.01 ~ 0.1 mM のシプロフロキサシンで処理されたノキシノブの前葉体は、シプロフロキサシンを含まない培地で培養されたものよりも若干小さくなっていたが、0.5 mM の場合ほどの著しい成長阻害は見られなかった(図1A~D及び2)。それに対して、0.5 mMのシプロフロキサシンで処理された場合では著しい成長阻害が見られ、発芽後、ほとんど成長していなかった(図1E)。高濃度のシプロフロキサシンはDNA ジャイレース以外の酵素の活性を阻害し、前葉体の成長を阻害すると考えられる。0.5 mMでは、前葉体がほとんど成長しなかったため、以後の観察は0.1 mM以下のシプロフロキサシンで処理された前葉体でのみ行った。

2 葉緑体核様体に及ぼすシプロフロキサシンの影響

シプロフロキサシンを含まない培地で培養された前葉体をDAPIで染色し、紫外光下で観察すると赤色に光るクロロフィルの自家蛍光の中に白色に光る小粒が多数観察された(図3A2)。その小粒は葉緑体核様体と呼ばれ、その小粒内には1~数コピーの葉緑体DNAが存在すると考えられている。シプロフロキサシンを含まない培地で培養された前葉体の葉緑体は3~10個の核様体を持つものが多く、核様体数の平均値は6.1(±2.9)であった(図4)。一方、0.05または0.1 mMのシプロフロキサシンで処理された前葉体の葉緑体は、強い蛍光を放つ大きな核様体を1または2個持つものが多く、平均値はいずれも1.4(±0.62, ±0.84)であった(図4)。0.01 mMの濃度で処理された前葉体の葉緑体は、1~3個の核様体を持つものが多く、平均値は2.7(±2.2)であった(図4)。これらの結果は、タバコ属植物の場合(Cho 2004)と同様に、ノキシノブにもDNA ジャイレースが存在し、シプロフロキサシンによって葉緑体内における核様体の分散が阻害されることを示唆している。Miyamura et al. (1986)は、コムギの発芽初期における葉緑体核様体の変化を調べ、発芽の初期段階では核様体は葉緑体の中央部に密集しているが、その後の葉緑体の発達とともに核様体は小さな顆粒となり、葉緑体全体にランダムに分布するようになることを報告した。ノキシノブにおいても孢子発芽の初期段階ではコムギと同様の現象が起り、核様体が葉緑体全体に分散する過程がシプロフロキサシンによって阻害されたと考えられる。

0.1 mMのシプロフロキサシンで処理した場合、核様体のない葉緑体が約14%存在した(図4)。この結果は、ノキシノブのDNA ジャイレースが葉緑体分裂の際のDNAの複製と分配に重要な働きをしている可能性があることを示唆している。しかしながら、紅藻類では、約0.02 mMの抗生物質濃度で葉緑体DNAの複製と分配が完全に阻害されている(Itoh et al. 1997)。そのため、ノキシノブに見られた核様体のない葉緑体は、高濃度のシプロフロキサシンがDNA ジャイレース以外の酵素の活性を阻害したために生じたのではないかと我々は考えている。

紅藻類の葉緑体では、原核生物の細胞分裂の場合と同様にDNA ジャイレースは葉緑体分裂の際のDNAの複製と分配に重要な働きをしている(Itoh et al. 1997)。一方、シダ植物のDNA ジャイレースは、被子植物の場合と同様に葉緑体内における核様体の分散に重要な働きをして

いることが今回の研究において明らかになった。本来、DNA ジャイレースは原核生物の細胞分裂の際の DNA の複製と分配に重要な働きをするものであるため、葉緑体分裂の際の DNA の複製と分配にも関与するはずであるが、シダ植物や被子植物では真核生物由来の DNA トポイソメラーゼが代わりに働いているのかもしれない。このように、シダ植物や被子植物では DNA ジャイレースの役割が変化して、葉緑体内で核様体を分散させる際にのみ DNA の構造変化を促進するようになったと考えられる。今後、コケ植物や緑藻類において同様の研究を行うことにより、進化のどの段階で DNA ジャイレースの役割が変化したのかが明らかになると考えられる。

IV 謝辞

本研究は、大分県立大分舞鶴高等学校の平成 18 年度スーパーサイエンスハイスクール事業の課題研究として行われた。記して謝意を表す。

参考文献

- Cavalier-Smith, T. (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends in Plant Science* **5**: 174-182.
- Cho, H., S., Lee, S., S., Kim, K., D., Hwang, I., Lim, J., S. and Park, Y. (2004) DNA gyrase is involved in chloroplast nucleoid partitioning. *The Plant Cell* **16**: 2665-2682.
- Itoh, R., Takahashi, H., Toda, K., Kuroiwa, H. and Kuroiwa, T. (1997) DNA gyrase involvement in chloroplast-nucleoid division in *Cyanidioschyzon merolae*. *Eur. J. Cell Biol.* **73**: 252-258.
- Knop, W. (1865) Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanze. *Die Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen.* **7**: 93-107.
- Kuroiwa, T., Nishibayashi, S., Kawano, S. and Suzuki, S. (1981) Visualization of DNA in various phages (T4, c, T7, f29) by ethidium bromide epi-fluorescent microscopy. *Experientia* **37**: 969-971.
- Margulis, L. (1970) *Origin of eukaryotic cells.* Yale Univ. Press, New Haven.
- Miyamura, S., Nagata, T., and Kuroiwa, T. (1986) Quantitative fluorescence microscopy on dynamic changes of plastid nucleoids during wheat development. *Protoplasma* **133**: 66-72.

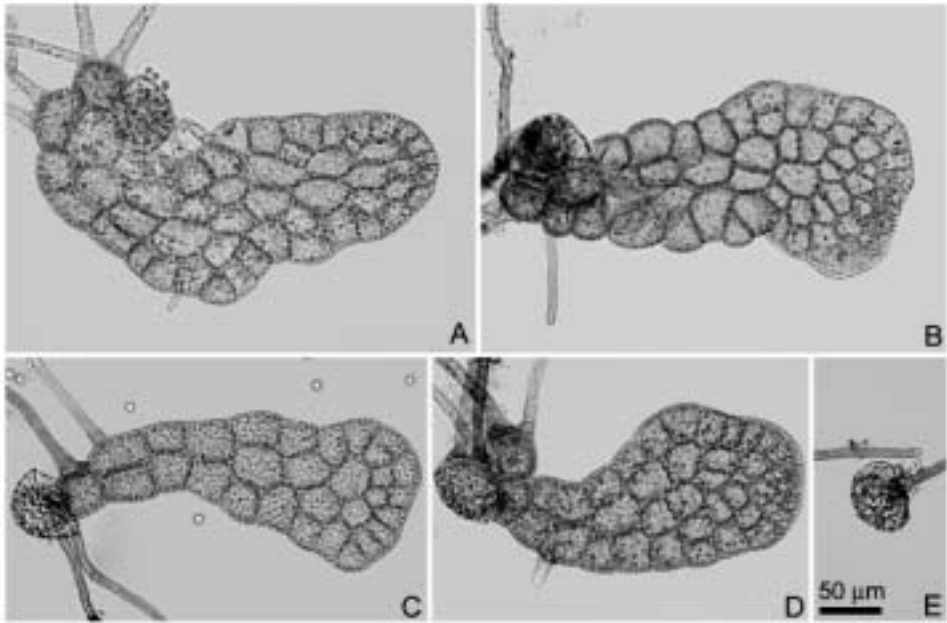


図1 抗生物質（シプロフロキサシン）で処理されたノキシノブ前葉体
Aはシプロフロキサシンを含まない培地で、Bは0.01 mM、Cは0.05 mM、Dは0.1 mM、Eは0.5 mMのシプロフロキサシンを含む培地で培養された前葉体の写真である。0.5 mMのシプロフロキサシンを含む培地で培養した場合、著しい成長阻害が見られた（E）。

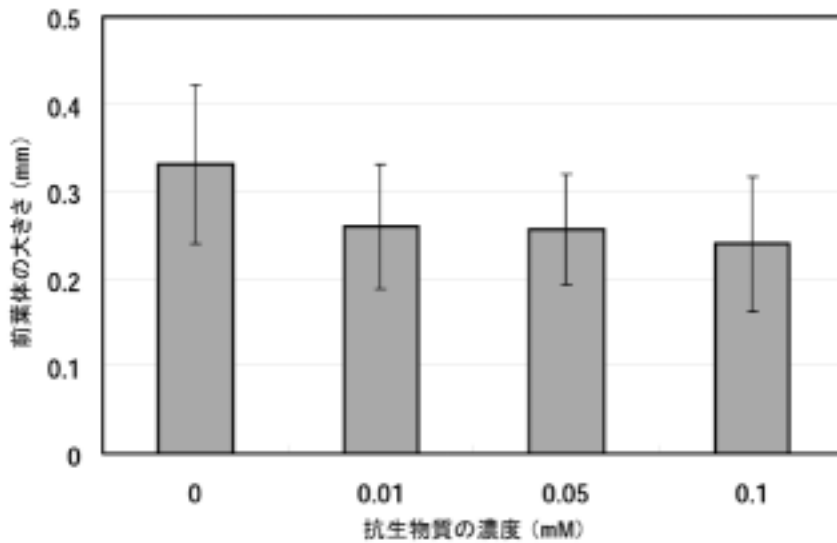


図2 抗生物質（シプロフロキサシン）で処理されたノキシノブの前葉体の大きさ（長軸の長さ）

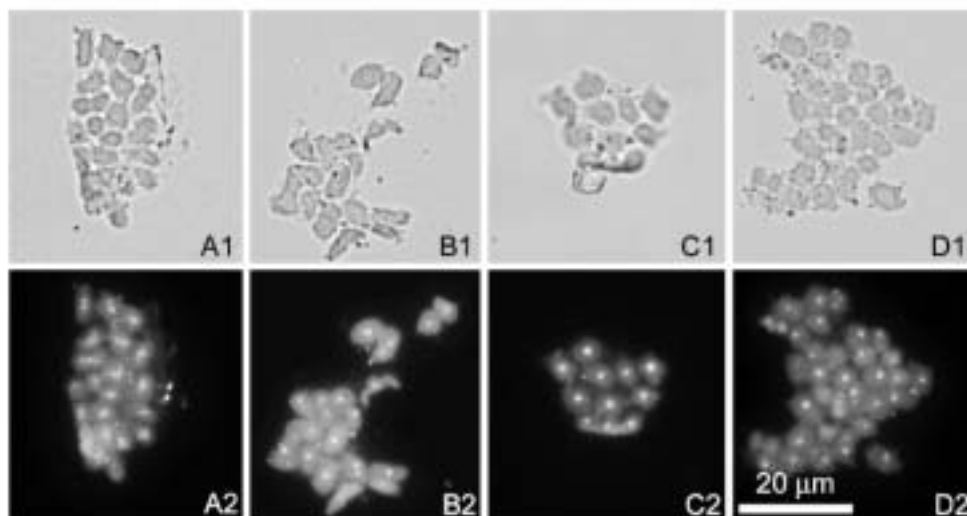


図3 抗生物質（シプロフロキサシン）で処理されたノキシノブ前葉体の葉緑体内の DAPI 染色像
 A1, B1, C1 及び D1 は透過光下で, A2, B2, C2 及び D2 は紫外光下で観察した像である。A1 及び A2 はシプロフロキサシンを含まない培地で, B1 及び B2 は 0.01 mM, C1 及び C2 は 0.05 mM, D1 及び D2 は 0.1 mM のシプロフロキサシンを含む培地で培養された前葉体の葉緑体の写真で, それぞれ同一の視野で観察されたものである。無処理の前葉体では, 小さな葉緑体核様体が葉緑体内に多数分布していたが (A2), 抗生物質で処理された前葉体の葉緑体には 1 または 2 個の大きな葉緑体核様体が存在した (C2 and D2)。

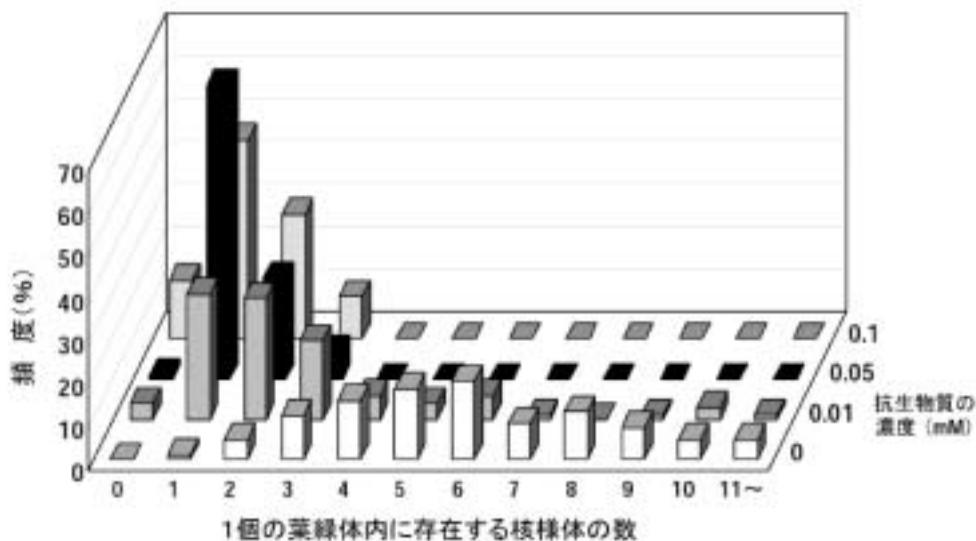


図4 抗生物質（シプロフロキサシン）で処理されたノキシノブ前葉体の 1 個の葉緑体内に存在する核様体の数

Effects of Ciprofloxacin on Chloroplast Nucleoids of the Pteridophyte *Lepisorus thunbergianus*

IZUMI, Y., SATO, E., KANEDA, S., KURATOMI, M. and SAKAI, T.

Abstract

It is well known that the ancestor of chloroplasts of red algae and green plants is a cyanobacterium. DNA gyrase, which catalyzes topological transformation of DNA, plays an essential role in DNA replication of prokaryotes. To determine the effects of antibiotics which inhibit the bacterial DNA gyrase activity on chloroplast nucleoids of pteridophytes, the numbers of plastid nucleoids in antibiotic-treated prothallia were counted. In untreated prothallia, many chloroplast nucleoids were randomly distributed in chloroplasts. On the other hand, chloroplasts of antibiotic-treated prothallia had 1 or 2 large chloroplast nucleoids. These results suggest that DNA gyrase of pteridophytes plays a critical role in chloroplast nucleoid dispersion.

【 Key words 】 Chloroplast nucleoid, DNA gyrase, Antibiotic, Pteridophyte