

令和元年5月19日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14758

研究課題名（和文）細胞内を伝播する信号とその伝達機構の解析

研究課題名（英文）Studies on the signal transferred in a cell and its transferring system

研究代表者

和田 正三（Wada, Masamitsu）

首都大学東京・理学研究科・客員教授

研究者番号：60011681

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は葉緑体集合反応において、光受容体から葉緑体まで伝達される信号の性質を明らかにすることである。

本研究により、信号伝達速度は温度依存性があり、10度上昇すると信号伝達速度は約2倍になることから、化学反応を介しており、単なる拡散ではないこと、また葉緑体と細胞膜間の狭い間を通過可能であること、葉緑体運動の光誘導には二酸化炭素の存在が必須であり、二酸化炭素不在の状態では光定位運動は起こらないことがわかった。このことは、二酸化炭素の持つ信号は光定位運動における信号および信号伝達機構とは異なっており、しかも二酸化炭素は光の信号伝達機構の上位にあることを意味している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内を流れる信号の伝達速度は非常に速く、その伝達機構は、現在分かっている限り、物質の拡散によると考えられている。一方、葉緑体光定位運動の場合にはその伝達速度が1分間に1ミクロンと非常に遅く、特殊であり、物質の拡散では考えられない。従って、その信号および伝達機構は全くわかっていない。しかし、葉緑体光定位運動同様に、遅い伝達機構を持つ反応は広範な生物の現象の中には必ずあるだろう。この未知の、遅い信号伝達機構が解明されれば、生命科学における大きな学術的発見になる。もしこのように遅い信号伝達の現象が医学分野の現象に見つかり、病気との関係があると分かった場合には、その社会的意義は計り知れない。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify the nature of signal that is transferred from a photoreceptor to a chloroplast in light-dependent chloroplast accumulation movement. It was found that the speed of signal transfer is depend on temperature, namely the speed was increased two times with a 10 °C increase, meaning that the signal is not transmitted by a simple diffusion of substances but mediated by chemical reactions. The signal could pass through the narrow area between the plasma membrane and chloroplasts without any delay. Involvement of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) on chloroplast movement is also found. Without CO<sub>2</sub> photoinduction of chloroplast movement did not occur, indicating that CO<sub>2</sub> is in a higher position to the light signal.

研究分野：植物生理学

キーワード：葉緑体 青色光 光情報 信号伝達 葉緑体運動 アクチン繊維 フォトリピニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の一部に微光束として照射された青色光はフォトトロピン (phot) に吸収され (Kagawa et al. 2001, Sakai et al. 2001)、何らかの情報となって細胞内を伝播し、葉緑体に到達する。シダ植物の場合は赤色光も有効で、ネオクロム(neo)によって受容される (Kawai et al. 2003) すると、葉緑体は光受容部に向けて移動を開始する (Wada 2013, Suetsugu and Wada 2013, Kong and Wada 2014)。この1細胞内の光受容体から葉緑体まで伝播する情報が何であるかは、全くわかっていない。カルシウムイオンであるとする説 (Banas 2014) もある。物質の拡散と考えるのがもっとも簡単な考え方であるが、信号伝達速度は、1分あたり約  $1\mu\text{m}$  の速度であり (Tsuboi & Wada 2014)、カルシウムイオンなどの低分子の拡散速度とは桁違いに遅い。生体膜上を流動する膜タンパク質の拡散速度や、細胞骨格上の移動速度に対しても極端に遅い。従って、細胞質内、あるいは細胞膜上の物質の単なる拡散とは考えられない。また、暗順応させたシダ前葉体細胞の中心に直径  $5\mu\text{m}$  ほどの赤色あるいは青色スポットを1分間照射した場合、その光情報は細胞の隅々まで到達し、全ての葉緑体が照射部に向かって移動する (Kagawa and Wada 1994)。もちろん光照射時の光漏れなどではない。すなわち、この光情報はあまり大きな減衰もなく、細胞全体に伝播される。このことから、光受容体から発せられた信号は次々に増幅されながら細胞膜近傍を波のように同心円の広がりとして伝播して行くと考えられる。これらの条件を満たす信号伝達系は今までに報告されておらず、全く未知の生理反応だと考えられる。

同心円状に伝播することから、一種の「波」と考えることができる。水面を伝播する波の場合、水そのものは上下動を繰り返しているだけで、波の表面を水が流れて行くわけではない。すなわち物質としての移動は無い。地震の縦揺れ、横揺れも波として伝播するが、物質の移動はない。従ってフォトトロピンからの情報が必ずしも物質の移動を伴う拡散である必要はなく、細胞膜の何らかの性質が将棋倒しのように、伝播されるだけなのかもしれない。理論物理学や実験物理学の研究者に意見を求めても、彼らにも可能性のある現象は思いつかないと言われる。

### 2. 研究の目的

移動のできない植物が正常な発達や生理反応をするためには、時事刻々変化する環境に素早く応答することが必要である。中でも光環境への応答は発芽から開花・結実に至るさまざまな段階に関わっている。光受容体に吸収された光情報は信号伝達系を経由して現象発現部位に伝達される。光屈性の場合、茎頂で感知された光情報は IAA として屈曲部に伝達される。花芽分化では葉で受容された光情報は FT として頂芽に伝達される。これらの場合は光情報が物質として細胞間、組織内を伝達される機構が明らかになってきた。一方、1細胞内でも光受容部位と現象発現部位が異なる場合もある。典型的な例が葉緑体光定位運動の集合反応の場合である。この場合の信号伝達速度は極端に遅く (約  $1\mu\text{m}/\text{min}$ )、単なる物質の拡散や細胞骨格に依存した移動では説明できない。本研究では伝達される信号とその伝達機構を推定する糸口を発見するための実験を行なう。

### 3. 研究の方法

低温下における信号伝達速度の解析。伝達される信号が生化学的反応に依存するものであれば、その反応速度は温度依存性を示さずである。そこで赤色光下で培養し、白色光で細胞分裂を誘導した2細胞系のシダ原系体を使用し、温度制御が可能な試料台を装備した微光束照射装置で、5、10、15、20、25、30で葉緑体運動を誘導し、その時の信号伝達速度を Tsuboi & Wada 2010 の方法で測定する。信号伝達速度の温度依存性の可否により、生化学的過程の関与の可否がわかる。本研究のために温度制御可能な顕微鏡ステージを購入する。

細胞骨格の関与の可否。葉緑体運動にはシロイヌナズナで明らかになった葉緑体運動に特異的な「葉緑体アクチン繊維」 (Kadota et al. 2009, Kong et al. 2013) がシダ配偶体の葉緑体運動にも関与しており (Tsuboi & Wada 2012)、微小管は無関係であることを我々はすでに明らかにしている。しかしシダ原系体細胞では信号伝達速度は極性に

依存する。原糸体には成長軸と平行に微小管とアクチン繊維が走っており、この細胞骨格に沿って原形質流動が起こる。従って、細胞骨格が信号伝達速度を制御している可能性はある。そこで微小管作用をコルヒチンなどで阻害した状態で、原糸体の部分照射により葉緑体集合反応を誘導して、その時の信号伝達速度を測定し、微小管の信号伝達への関与を検討する。

葉緑体運動の推進力は葉緑体アクチン繊維の重合であり(論文準備中)、ミオシンの関与はない(Suetsugu et al. 2010)。一方原形質流動など細胞質アクチン繊維はミオシンの相互作用で推進力を発する。そこで、細胞質アクチン繊維の信号伝達への関与を調べるために、ミオシン ATPase 阻害剤(BDM)存在下で葉緑体運動を誘導し、その時の信号伝達速度を計測する。

ケミカルスクリーニング。葉緑体運動に影響を与える化学物質の探索を行う。産総研が保有する数万の化合物を共同研究として使用させてもらう(有料)。産総研のスクリーニングは 384 穴のプレートを使用し、すべて自動で検査する。シダ胞子を植え込み、白色光下で培養し、well 一杯に増殖させる。このプレートに化合物を滴下し、細胞に浸透した時間を見計らって、白色強光を照射して逃避反応を誘導する。その後白色弱光を照射して集合反応を誘導する。逃避反応では葉緑体は細胞側壁に、集合反応では細胞表面に移動するので、各 well の赤外光の透過率を計測することによって化学物質の効果を認定できる。各化学物質の逃避反応、集合反応に対する効果を査定する。葉緑体運動に影響のある物質が見つかったも、葉緑体運動のあらゆる信号伝達過程への影響が考えられるので、すでに葉緑体運動の過程が詳しく解析されているシロイヌナズナに対する当該化合物の影響を明らかにし、信号に関するものを特定する。

phot-nch1複合体のリン酸化の解析と結合タンパク質の探索。フォトリポピン(phot)が活性型(S390)である間は、集合反応の情報は微光束照射部から出続けている。フィトクロムとフォトリポピンが融合したキメラ受容体であるネオクロムによる集合反応の場合にも、赤の微光束照射後、遠赤色光を照射するとネオクロムは不活性型になり葉緑体は移動を停止する。すなわち、葉緑体は常に信号をモニターしながら動いている。このことは、光リン酸化酵素であるフォトリポピンが基質をリン酸化し続けることで情報が出続けるのだと考えられる。集合反応を仲介するフォトリポピンの結合タンパク質nch1がリン酸化、あるいは脱リン酸化されることで、集合反応の信号が維持されるのだろう。そこで、nch1の結合タンパク質が信号放出に関与していると考え、phot-nch1複合体の単離、あるいはyeast two hybrid法でnch1結合タンパク質を探索する。

#### 4. 研究成果

1. ホウライシダ (*Adiantum capillus-veneris*) の単相世代の原糸体を使用し、葉緑体集合反応における信号伝達速度の温度依存性を調べた。生理学的に問題のない、15°Cから30°C の範囲で正確に温度制御された顕微鏡試料台上で赤色光により葉緑体の集合反応を誘導し、その時の信号伝達速度を計測した。その結果、温度が10度上昇すると信号の伝達速度が約2倍になった。このことから、単なる物質の拡散による伝播では無く、化学反応を介しながら信号は伝達されていることが分かった。またその信号は、シダ前葉体の葉緑体が細胞膜に密着している狭い領域でも、その伝播速度は減速されないことがわかった。これらの結果は、信号伝達には化学反応を介して行われていることをはっきり示しているが、その実態を解明するには至らなかった。実際にどのような実験をすれば信号伝達の解明につながるのかはわかっていない。
2. 原糸体細胞にはその極性に沿って微小管とアクチン繊維が平行に走っているが、微小管をoryzalinで脱重合させても、信号伝達速度には全く影響がなかった。
3. 信号伝達に影響を与える物質(阻害剤)を探す目的で、ケミカルスクリーニングをシダ前葉体における葉緑体運動を指標に行った。一次スクリーニングの段階では多くの葉緑体運動を異常にする物質が見つかったが、その多くの物質で前葉体は枯死し、葉緑体運動だけを阻害する有効な物質は今までのところ検出されていない。
4. 光受容体と葉緑体の間を伝達される物質は、光受容体で作られ、葉緑体まで伝達され

る。従って、光受容体側と葉緑体上の信号受容する側を調べれば、見つかるはずである。そこで光受容体に結合し、信号を放出していると考えられる因子、および葉緑体上にあり、信号を受容していると考えられる因子の複合体を探索するために、共同研究を行った。現在のところいくつかの可能性のあるタンパク質は見つかっているが確定されていない。

5. 上記の実験を行なっている間に、将来性のある新たな探索法が見つかった。葉緑体運動を詳細に観察した結果、光誘導による葉緑体運動より重要な要素として二酸化炭素の関与が考えられた。葉緑体の二酸化炭素への走性は20世紀初頭に記載されたまま、いまだに解決されていない。そこでゼニゴケの若い葉状体を使用し、二酸化炭素の存在下と非存在下での葉緑体の光定位運動を観察した。その結果、二酸化炭素の影響は光信号よりも上位にあり、二酸化炭素不在の状態では光定位運動は全く起こらないことが確認された。このことは、二酸化炭素への走性における信号および信号伝達機構は光定位運動における信号、および信号伝達機構とは異なっており、しかも光の信号伝達機構を規定する、いわゆる上位に位置していることがわかった。従って、二酸化炭素走性の信号伝達機構が解明されれば、光信号がいかなるものかを推測できる可能性が出てきた。現在二酸化炭素走性に関する実験を開始した段階である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Higa, T., Hasegawa, S., Hayasaki, Y., Kodama, Y and Wada, M. Temperature-dependent signal transmission in chloroplast accumulation response. *J Plant Research* 130 (4): 779-789, 2017. DOI: 10.1007/s10265-017-0938-0

Suetsugu, N., T. Higa, M. Wada. Ferns, mosses, and liverworts as model systems for light-mediated chloroplast movements. *Plant Cell Environment* 40: 2447–2456, 2017. doi: 10.1111/pce.12867

Gotoh, E., N. Suetsugu, T. Higa, T. Matsushita, H. Tsukaya and M. Wada. Palisade cell shape affects the light-induced chloroplast movements and leaf photosynthesis. *Scientific Reports* (2018) 8:1472 DOI:10.1038/s41598-018-19896-9.

Gotoh E, Suetsugu N, Yamori W, Ishishita K, Kiyabu R, Fukuda M, Higa T, Shirouchi B, Wada M Chloroplast accumulation response enhances leaf photosynthesis and plant biomass production. *Plant Physiology* 178: 1358-1369, 2018

Christie J.M., Suetsugu, N., Sullivan S., and Wada M. Shining light on the function of NPH3/RPT2-Like (NRL) proteins. *Plant Physiology*, Special issue on Light, Energy and Redox. *Plant Physiology* 176: 1015–1024, 2018.

Wada, M. Nuclear Movement and Positioning in Plant Cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 82: 17-24, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.001>

Wada, M. and Kong, S.-G. Actin-mediated movement of chloroplasts. *Journal of Cell Science*, Special Issue: *Plant Cell Biology* (2018) 131, jcs210310. doi:10.1242/jcs.210310

〔学会発表〕(計 13 件)

Takeshi Higa, Satoshi Hasegawa, Yoshio Hayasaki, Yutaka Kodama and Masamitsu Wada The effect of temperature on the signal transmission speed of chloroplast accumulation response 葉緑体光定位運動における信号伝達機構の解析<sup>n</sup> 第80回日本植物学会年会。2016-9-16-19 沖縄コンベンションセンター

Wada, Masamitsu My scientific career in plant research February 6, 2017, 韓国公州大学

井上夏実, Liang Bao, 石川雅樹, 比嘉毅, 日渡祐二, 関根政実, 長谷部光泰, 和田正三, 藤田知道 ヒメツリガネゴケにおける CDKA の光応答反応 第58回日本植物生理学会年会、2017年3月16-18日 鹿児島

比嘉毅, 後藤真朋, 後藤栄治, 和田正三, 葉緑体光定位運動を阻害する化合物のスクリーニング 第58回日本植物生理学会年会、2017年3月16-18日 鹿児島

和田正三 葉緑体光定位運動における葉緑体の移動機構 2017年度 大阪大学蛋白質研究所セミナー 真核細胞のオルガネラ研究最前線 2017年3月21-22日 大阪大学吹田キャンパス 蛋白質研究所

- Gotoh, Eiji, Noriyuki Suetsugu, Kazuhiro Ishishita, Ryota Kiyabu, Takeshi Higa, Bungo Shirouchi, Masamitsu Wada Chloroplast accumulation response enhances leaf photosynthesis and plant biomass production. Taiwan-Japan Plant Biology 2017 2017.11. 台北、台湾
- Wada, Masamitsu, Eiji Goto, Hiroaki Setoguchi, Ryota Kiyabu, Kana Magota, Atsushi Kume CHLOROPLAST PHOTO-ORIENTATION MOVEMENT IN PLANTS LOVING UNDER CANOPY. AOSP 2017-11-13, Seoul, Korea
- Higa, Takeshi, Satoshi Hasegawa, Yoshio Hayasaki, Yutaka Kodama, Masato Nakai and Masamitsu Wada. The effect of temperature on the signal transmission speed of chloroplast accumulation response. ISPP 2018, 2018, 1-15- 18, Matsue, Japan
- Gotoh E, Suetsugu, N, Yamamori W., Higa T., Shirouchi B., Wada, M Chloroplast movement regulates trade-off between light harvesting and photoprotection under a fluctuating light environment. ISPP 2018, 2018, 1-15- 18, Matsue, Japan
- 後藤栄治、石下和宏、比嘉毅、井上晋一郎、和田正三 葉緑体外膜に局在するフォトトロピンの機能解析 日本光生物学協会大会 2018-8-8～9日 京都
- Wada, M. The mechanism of chloroplast movement. Symposium in Honor of Winslow Briggs, San Francisco, April 19, 2018, California USA
- 和田正三『葉緑体運動とともに35年』日本光生物学協会功績賞受賞講演 第20回光生物学協会年会 2018年8月9日、京都大学
- 後藤栄治、石下和宏、比嘉毅、井上晋一郎、末次憲之、和田正三 Chloroplast outer membrane-localized phototropin induces the chloroplast avoidance response. 葉緑体外膜に局在するフォトトロピンは葉緑体逃避反応を誘導する. 日本植物生理学会 2019-3-15 名古屋

〔図書〕(計 3件)

- Suetsugu, N., and M.Wada Two coiled-coil proteins, WEB1 and PMI2, suppress the signaling pathway of chloroplast accumulation response that mediated by two phototropin-interacting proteins, RPT2 and NCH1, in seed plants. International Journal of Molecular Sciences, 18, 1469 (2017). Special Issue: Chloroplast Ed. Bartolome Sabater. doi:10.3390/ijms18071469 DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.18.00484>
- Wada, M. Determination of phototropism and polarotropism in fern protonemal cells. In: "Phototropism: Methods and Protocols", Methods in Molecular Biology, vol.1924 pp. 27-34, 2019. ed. Yamamoto K.. Springer Science+Business Media New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9015-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9015-3_3)
- Wada, M. Cytoskeleton observation in phototropism and polarotropism of Adiantum protonema. In: "Phototropism: Methods and Protocols", Methods in Molecular Biology, vol.1924 pp. 191-198, 2019. ed. Yamamoto K. Springer Science+Business Media New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9015-3\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9015-3_15)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：

取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：後藤栄治、比嘉毅、末次憲之、児玉豊、中井正人

ローマ字氏名：Eiji Gotoh, Takeshi Higa, Noriyuki Suetsugu, Yutaka Kodama, Masato Nakai

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。