

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007~2008

課題番号:19570045

研究課題名(和文)葉緑体光定位運動機構の多様性と共通性

研究課題名(英文)Mechanisms of chloroplast photorelocation movement
- Their similarity and diversity among the plants

研究代表者

門田 明雄(KADOTA AKEO)

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号:60152758

研究成果の概要:

被子植物シロイヌナズナの葉緑体光定位運動の解析から、葉緑体には特異的なアクチンフィラメントが存在し、これが葉緑体の細胞内での運動、光定位の分子メカニズムとして働くことが明らかになっている。本研究ではコケ植物のヒメツリガネゴケ、ゼニゴケの葉緑体光定位運動を解析し、系統進化的に離れた蘚類、苔類の細胞においても被子植物と共通した葉緑体アクチンによるメカニズムが存在していること、しかし、葉緑体アクチンフィラメントの形態・機能等、異なる面を持ち、多様性を示すことを明らかにした。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:生物学

科研費の分科・細目:基礎生物学・植物生理・分子

キーワード:環境応答、光運動反応

1. 研究開始当初の背景

動物のように移動することができず静的に見える植物も実は非常に動的で、周囲の光環境の変化に対して迅速に対応し、光形態形成・光運動反応を示す。光合成装置である葉緑体は光に依存したエネルギー獲得装置であり、周囲の

光環境に依存して細胞内で光定位運動反応を示し、細胞内でより多くの光が当たる場所へ迅速に集合する。また、光合成系の阻害を起こすような強い光からは逃避する。一般に、この光定位運動は青色光により誘導され、フォトトロピン(phot1, phot2)を光受容体とすることが明らかに

されている(Jarillo et al 2001, Kagawa et al 2001, Sakai et al 2001)。しかし、その運動メカニズムは解明されておらず、原形質流動の研究に基づき、「ミオシンコートされた葉緑体が細胞質のアクチンフィラメント上を動くもの」と想定されてきた。しかし、我々は最近、アラビドプシスの GFP-talin 発現株を用いて、葉緑体の光定位運動に伴うアクチンフィラメントの変化を調べた結果、葉緑体の動きが従来知られていない新規のメカニズムによることを明らかにした。すなわち、原形質流動とは異なり、細胞質中に見られる大半のアクチンフィラメントは全く役割を持たず、葉緑体上に存在する特異的なアクチンフィラメント(葉緑体アクチンフィラメント)に依存する新規の運動機構が存在することがわかった。

2. 研究の目的

上記のアラビドプシスにおいて明らかになった葉緑体アクチンフィラメントによる新規運動メカニズムが系統進化的に離れたコケ植物、シダ植物の葉緑体光定位運動でも同様に存在するのか、あるいは異なるメカニズムを持つのかを調べ、アクチンによる葉緑体光定位運動メカニズムの共通性と多様性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒメツリガネゴケ、ゼニゴケ、ホウライシダの tdTomato-talin あるいは GFP-talin 発現株を用い、青色光微光束照射による葉緑体光定位運動に伴うアクチン構造の変化を調べた。また、ゼニゴケにおいては葉緑体光定位運動を誘導する光受容系が知られていないので、赤色光、青色光の光定位運動に対する作用を調べた。

微光束照射下でのアクチンフィラメントの観察には微光束照射装置を装備した倒立蛍光顕微鏡 (Axiovert 200M 改造、特注) を用いた。青色微光束はハロゲンランプの光を干渉フィルター (ピーク波長 451 nm, 半値幅 32 nm,

Optical Coatings Japan, Tokyo, Japan) を通して得た。微光束の光強度は照射光路に ND フィルター (Fujitoku Co.) を挿入することにより変えた。また、顕微鏡透過光源の光を赤外フィルター (IR85, Hoya Glass Works, Tokyo) あるいは赤色干渉フィルター (ピーク波長 662.2 nm, 半値幅 5 nm, Optical Coatings Japan, Tokyo) に透過させて得た光により透過光像を記録した。

4. 研究成果

シロイヌナズナのアクチン可視株 (GFP-talin 発現株) を用いたアクチン蛍光連続観察実験の結果から、葉緑体上の細胞膜側には特異的な短いアクチンフィラメントが存在し、光定位により一方向に運動をしている葉緑体では進行方向の周縁上にこの葉緑体アクチンフィラメントが偏在することがわかっている。この偏在した葉緑体アクチンと葉緑体外因子との間で力が発生し、運動が生じると考えられる。ヒメツリガネゴケ、ゼニゴケ、ホウライシダの tdTomato-talin 発現株を用いて葉緑体に特異的なアクチンフィラメントの存在を調べた結果、ホウライシダでは明確ではないが、ヒメツリガネゴケ、ゼニゴケでは葉緑体に特異的な短いアクチンフィラメントが存在することが明らかとなった。以降の実験では藓類ヒメツリガネゴケ、苔類ゼニゴケの細胞を用いて行った。

ヒメツリガネゴケでは青色光によりフォトロピン依存の葉緑体光定位運動が誘導される。そこで、tdTomato-talin 発現株を用いて、青色微光束照射により、葉緑体の強光逃避運動、弱光集合運動を起こし、葉緑体周辺の葉緑体アクチンフィラメントの変化を解析した。光照射前には細胞質のアクチンフィラメントが見られるのみで、葉緑体上に葉緑体アクチンはほとんど見られないが、逃避運動、集合運動の誘導とともに光定位部位に到達した葉緑体の葉緑体上には分枝した短いアクチンフィラメントが急速に出現し、光定位部位の

葉緑体数が増加するにつれ、細胞内の葉緑体定位領域全体にメッシュワーク構造が出現することがわかった。このアクチンは葉緑体周縁部位から伸長し、活発なダイナミクスを示してメッシュワーク構造を形成する。このアクチンは葉緑体の定位部位への繫留に働くと考えられる。また、移動中の葉緑体では前端部への葉緑体アクチン偏在が観察される場合があり、運動機構としても働くと考えられる。

ゼニゴケ細胞では葉緑体光定位運動に働く光質、運動がアクチン系、微小管系のいずれによるか、知られていないので、まず、その解析をおこなった。

暗所に保持し、葉緑体が葉状体表面に垂直な細胞壁面にそって分布する dark position をとった細胞に、青色光を葉状体表面に垂直方向から照射すると、葉緑体は短時間で照射方向に垂直な細胞壁面に移動することがわかった。青色光を側方から照射すると、照射方向に向かう葉緑体運動が見られ、葉緑体はやはり細胞内で照射方向に垂直な面に位置した。従って、青色光は光の方向に依存した方向性を持つ葉緑体運動を誘導する。これに対し、赤色光は短時間照射ではほとんど葉緑体運動を誘導しなかったが、長時間照射下では光の方向に依存しない運動を誘導することがわかった。この長時間の赤色光照射による葉緑体運動は DCMU により阻害されることから、光合成に依存する反応と考えられる。一般に葉緑体光定位運動は青色光によって誘導され、フォトロピンを光受容体とすることが、シロイヌナズナ、ヒメツリガネゴケ、ホウライシダで知られており、ゼニゴケ細胞においてもフォトロピンが光受容体として働いていることが示唆された。ヒメツリガネゴケ、ホウライシダなどでは赤色光もフィトクロムを介して光の方向に依存下葉緑体光定位運動を誘導するが、ゼニゴケではこの光受容系は働いていないと考えられる。また、細胞骨格阻害剤 (cytochalasin D, Oryzalin) 処

理により調べた結果、青色光により誘導される葉緑体運動はアクチンフィラメントに依存することが示された。青色微光束による細胞部分照射で葉緑体運動を誘導すると、従来、他の植物で知られていると同様、光強度に依存して、弱光による集合反応、強光による逃避反応が誘導された。

tdTomato-talin 発現株を用いて、細胞内のアクチン構造を調べると、細胞質の太く長いアクチンフィラメントとともに、葉緑体上には細く短いアクチンフィラメントが見られ、葉緑体アクチンが存在することがわかった。この葉緑体アクチンフィラメントは青色光照射開始前の、暗条件の細胞でも認められ、ヒメツリガネゴケの場合と対照的である。また、この葉緑体アクチンは活発なダイナミクスを示し、伸長、短縮、他のフィラメントとの束化、他のフィラメントへの付着等を行う。この葉緑体アクチンの出現部位を調べると、シロイヌナズナ、ヒメツリガネゴケの場合と同様、葉緑体の周縁部から葉緑体内へ向かって重合していることがわかる。

青色微光束照射により、逃避運動、集合運動を誘導し、アクチンフィラメントの構造変化を調べたところ、シロイヌナズナと同様に、いずれの運動においても、葉緑体の運動方向前端に葉緑体アクチンフィラメントが偏在し、運動が生じることがわかった。このアクチンフィラメントの偏在は、運動速度の大きい葉緑体で顕著であり、シロイヌナズナで知られている葉緑体アクチン偏在と運動速度の定量的関係がと適用されると考えられる。従って、ゼニゴケにおいても葉緑体アクチンの偏在が葉緑体運動に働くことが示された。シロイヌナズナおよびヒメツリガネゴケでは上記のように、光定位部位の葉緑体上で均等に分布する葉緑体アクチンフィラメントの量が増加することが知られているが、ゼニゴケでもアクチン量の増加が認められる場合が多い。

以上のように、ヒメツリガネゴケ、ゼニゴケい

れにおいても、葉緑体上に特異的な短いアクチンフィラメント、すなわち、葉緑体アクチンフィラメントが存在することが明らかになった。さらに、青色光による逃避運動、集合運動に際し、いずれの細胞でも葉緑体アクチンフィラメントが葉緑体の進行方向前端に偏在化し、運動メカニズムに役割を持つと考えられる。定位部位に移動し、運動を停止した葉緑体上では、葉緑体アクチンフィラメントの偏在が解消し、フィラメント量が増加する。この変化は葉緑体を光定位部位に繫留することに役割を持つと考えられる。従って、被子植物シロイヌナズナの葉緑体アクチンフィラメントに依存した葉緑体光定位運動のメカニズムが系統進化的に離れたコケ植物でも共通して存在することが明らかとなった。しかし、蘚類ヒメツリガネゴケでは運動に伴う葉緑体アクチンの偏在化はそれほど明瞭ではなく、光定位後のアクチン量の増加が顕著であった。これに対し、苔類ゼニゴケではその逆の傾向を示した。さらに、葉緑体アクチンフィラメントの形状そのものがシロイヌナズナとは多少異なり、分枝した形態を持つこと、しかし、その分枝の程度もヒメツリガネゴケとゼニゴケで異なるなど、植物種による多様性も存在することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

- ① Oda, Y., A. Hirata, T. Sano, T. Fujita, Y. Hiwatashi, Y. Sato, A. Kadota, M. Hasebe and S. Hasezawa (2009) Microtubules Regulate Dynamic Organization of Vacuoles in *Physcomitrella patens*. Plant Cell Physiol. in press, 査読あり
- ② Uenaka, H. and A. Kadota (2008) Phototropin-dependent weak and strong light responses in the determination of branch position in the moss *Physcomitrella patens*. Plant Cell Physiol. 49, 1907–1910, 査読あり

[学会発表] (計 7件)

- ① 尾関文隆、石崎公庸、鐘ヶ江健、河内孝之、門田明雄 (2009) ゼニゴケ葉緑体光定位運動時に見られるアクチンフィラメントの動態、第50回日本植物生理学会年会 (名古屋)
- ② 杉山由香、門田明雄(2009) ホウライシダ前葉体の赤色光による葉緑体光定位運動 — phy3/neo1 に依存しない光運動反応の存在、第50回日本植物生理学会年会 (名古屋)
- ③ 市川智史、末次憲之、和田正三、門田明雄 (2009) シロイヌナズナ葉緑体逃避運動における葉緑体アクチンフィラメント変化の解析、第50回日本植物生理学会年会 (名古屋)
- ④ Kadota, A. and Kanegae, T. (2008) Chloroplast photorelocation movement, 首都大バイオコンファレンス(東京)
- ⑤ Ozeki, F., Kanegae, T., Ishizaki, K., Kouchi, T. and Kadota, A. (2008) Chloroplast photorelocation in the liverwort, *Marchantia polymorpha*. 首都大バイオコンファレンス(東京)
- ⑥ Sugiyama, Y. and Kadota, A. (2008) phy3/neo1 mutant in fern *Adiantum* still have red light-induced photorelocation movement — Existence of non-directional photorelocation movement. 首都大バイオコンファレンス(東京)
- ⑦ 末次憲之、山田岳、加川貴俊、米倉恒、上田太郎、門田明雄、和田正三 (2008) シロイヌナズナにおける葉緑体運動制御因子 KAC1の機能解析、日本植物学会第72回大会(高知)

6. 研究組織

(1)研究代表者

門田 明雄 (KADOTA AKEO)

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号:60152758

(2)研究協力者

尾関 文隆 (OZEKI FUMITAKA)

首都大学東京・大学院理工学研究科・博士前

期課程2年