

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 1日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570047

研究課題名（和文）葉緑体アクチンフィラメント機能の統合的理解

研究課題名（英文）Analyses on the functions of chloroplast actin filaments

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・教授

研究者番号：60152758

研究成果の概要（和文）：

葉緑体は細胞内で青色光受容体であるフォトトロピンに依存した光定位運動を示し、弱い光に対しては集合し、強い光からは逃避する。我々はシロイヌナズナを用いてこの運動に葉緑体アクチンフィラメントが関与することを示したが、本研究では同様の運動メカニズムが系統進化的に離れた最初の陸上植物である苔類、蘚類の細胞でも見られることを明らかにした。シロイヌナズナと異なり、これらの細胞では赤色光による光定位運動も見られることから、光受容体の異なる運動反応における葉緑体アクチンフィラメントの関与についても調べ、その役割の統合的理解を目指した。

研究成果の概要（英文）：Chloroplasts relocate in the cell in response to environmental light condition. The chloroplast photorelocation response is generally mediated by the blue light receptor, phototropin. We have been shown in Arabidopsis cells that the chloroplast movement utilizes short chloroplast actin filaments (cp-actin filaments), which are different from cytoplasmic actin filaments and unique to chloroplast. In this work, we showed that the novel cp-actin filaments-mediated movement mechanism of chloroplasts are also found in cells of liverwort and moss which are considered to be the first land plants and evolutionally distant from Arabidopsis. In liverwort and moss cells, chloroplast photorelocation are also regulated by receptors other than phototropin, cp-actin dynamics are analyzed in these responses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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・植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答、光運動反応

## 1. 研究開始当初の背景

光合成装置である葉緑体は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、光合成阻害を起こす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って誘導され、細胞膜に存在するフォトトロピン（phot1, phot2）を光受容体とする（Jarillo et al

2001, Kagawa et al 2001, Sakai et al 2001)。

我々はシロイヌナズナの葉緑体の光定位運動には葉緑体上に特異的に存在するアクチンフィラメント(cp-actin filaments)働いており、新規の運動機構が存在することを明らかにした。さらに、この cp-actin filaments に依存した新規運動メカニズムは系統進化的に離れたコケ植物苔類(ゼニゴケ)、蘚類(ヒメツリガネゴケ)にも存在することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究ではフォトトロピンによる青色光誘導葉緑体光定位運動における cp-actin filaments の役割をシロイヌナズナで調べるとともにゼニゴケ、ヒメツリガネゴケ、シダ類ホウライシダで詳細に調べた。後者ではフォトトロピン依存の運動とともにフィトクロム依存、光合成依存の赤色光による光定位運動が存在し、これらの運動反応における cp-actin filaments の関与を調べた。さらに、これらの植物から葉緑体を単離し、in vitro での cp-actin filaments の形成、運動の誘導を試みた。

## 3. 研究の方法

ヒメツリガネゴケ、ゼニゴケ、シロイヌナズナの tdTomato-talin あるいは GFP-talin 発現によるアクチン可視化株を用い、青色光、赤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。ホウライシダでは遺伝子導入による生細胞でのアクチン観察ができないため、アクチン抗体を用いた蛍光抗体法でアクチンフィラメントを観察した。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を用いた。

## 4. 研究成果

(1)シロイヌナズナ野性株、変異体を用いて、強光による葉緑体逃避運動の運動開始と cp-actin filaments 偏在のタイミングを詳細に調べた結果、偏在の形成後に運動が起こる

こと、フォトトロピン1が阻害的に働くことなどがわかった。

(2)シロイヌナズナでは、細胞骨格阻害剤処理により葉緑体の運動そのものを阻害しても cp-actin filaments の偏在が起こることがわかっているが、ゼニゴケ、ヒメツリガネゴケでも同様に、運動そのものを阻害しても cp-actin filaments の偏在が起こり、cp-actin filaments 偏在が運動の結果ではなく運動に先立つ現象であることが示唆された。

(3)シロイヌナズナでは変異体の解析から cp-actin filaments の生成に CHUP1 タンパクが働くことが示唆されている。ヒメツリガネゴケの CHUP1 ホモログを GFP ラベルし、葉緑体光定位運動時のダイナミクスを調べたところ、cp-actin filaments の変化と同様の変化を示すことがわかり、ヒメツリガネゴケでも CHUP1 が cp-actin filaments の形成に関わることが示唆された。

(4)ヒメツリガネゴケの葉緑体光定位運動では青色光によるフォトトロピン依存の反応とともに赤色光によるフィトクロム依存の葉緑体光定位運動が知られている。後者は運動系として微小管を使うことが特徴であるが、この運動反応時の cp-actin filament の挙動を調べた。その結果、青色光の場合とは異なる変化を示すことがわかった。

(5)ホウライシダでは青色光によるフォトトロピン依存葉緑体光定位運動とともに赤色光によるネオクロム1依存の反応が知られている。しかし、ネオクロム1変異体においてもなお、赤色光により葉緑体の光定位運動が起こることを見いだした。この現象は葉緑体が光の方向とは無関係に動くことが特徴である。この反応の光受容体を調べた結果、光合成に依存することがわかった。この光合成に依存する赤色光誘導の無指向的葉緑体

光定位運動はゼニゴケでも認められる。ゼニゴケ細胞を用いて cp-actin filament の挙動を解析中であるが、現在までのところ、光照射にともない、ダイナミクスが変化し、ターンオーバーが激しくなるが、進行方向への局在は見られないことがわかった。ダイナミクスの増大がランダムな方向への運動（無指向的な運動）を誘導していると考えられる。

(6) 単離葉緑体を用いた *in vitro* システムでの cp-actin filament の形成、葉緑体運動の誘導をコケ、シダ、シロイヌナズナの各細胞を用いて様々な条件で行ったが達成することはできなかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- (1) Sato, Y. and A. Kadota (2012) Fluorescence time-lapse imaging system equipped with a microbeam irradiator revealed a unique actin-based mechanism for chloroplast movement. *Plant Morphology* 24: 19-22 査読なし
- (2) Yamashita, H., Y. Sato, T. Kanegae, T. Kagawa, M. Wada and A. Kadota (2011) Chloroplast actin filaments organize meshwork on the photorelocated chloroplasts in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* 233:357-368 査読あり
- (3) Matsuda, S., T. Kajizuka, A. Kadota, T. Nishimura, T. and T. Koshihara (2011) *NPH3*- and *PGP-like* genes are exclusively expressed in apical tip region essential for blue-light perception and lateral auxin transport in maize coleoptiles. *J Exp Bot* 62:3459-3466 査読あり

- (4) Sugiyama, Y. and A. Kadota (2011) Photosynthesis-dependent but neochrome 1-independent light positioning of chloroplasts and nuclei in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Plant Physiol* 155:1205-1213 査読あり
- (5) Ichikawa, S., N. Yamada, N. Suetsugu, M. Wada and A. Kadota (2011) Red light, phot1 and JAC1 modulate phot2-dependent reorganization of chloroplast actin filaments and chloroplast avoidance movement. *Plant Cell Physiol* 52: 1422-1432 査読あり
- (6) Yamada, N. Suetsugu, M. Wada and A. Kadota (2011) Phototropin-dependent biased relocalization of cp-actin filaments can be induced even when chloroplast movement is inhibited. *Plant Signal Behav* 6: 1651-1653 査読あり
- (7) 門田明雄 (2011) 葉緑体の運動メカニズム バイオメカニズム学会誌 35: 245-250 査読なし
- (8) Suetsugu, N., N. Yamada, T. Kagawa, H. Yonekura, T. Q. P. Uyeda, A. Kadota, and M. Wada (2010) Two kinesin-like proteins mediate actin-based chloroplast movement in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 8860-8865 査読あり

[学会発表] (計 15 件)

- (1) 松田さとみ、梶塚友美、西村岳志、門田明雄、小柴共一 (2012) トウモロコシ幼葉鞘の光屈性における IAA 偏差分布の形成部位および、光受容後のシグナル伝達経路の検討 第53回日本植物生理学会年会(京都)
- (2) 中村美里、笠原賢洋、門田明雄 (2012) ヒメツリガネゴケの葉緑体光定位運動に

- ともなうCHUP1の動態 日本植物学会第76回大会
- (3) 近江泰明、門田明雄 (2012) ヒメツリガネゴケのフィトクロム依存葉緑体光定位運動時のアクチンフィラメント変化解析にともなう問題点 首都大バイオコンファレンス2012 (八王子)
- (4) 豊田麻那、門田明雄 (2012) 赤色光による無指向的な葉緑体光運動時のアクチンフィラメントの変化 首都大バイオコンファレンス2012 (八王子)
- (5) 木村泉美、門田明雄、鐘ヶ江健 (2012) フィトクロム3の細胞内における局在部位の解明 首都大バイオコンファレンス2012 (八王子)
- (6) 尾関文隆、石崎公庸、鐘ヶ江健、河内孝之、門田明雄 (2011) ゼニゴケ葉緑体光定位運動における葉緑体アクチンフィラメントの動態 第52回日本植物生理学会年会 (仙台)
- (7) 近江泰明、門田明雄 (2011) ヒメツリガネゴケ細胞の赤色光による葉緑体光定位運動とアクチンフィラメントの変化 第52回日本植物生理学会年会
- (8) 梶塚友美、松田さとみ、門田明雄、西村岳志、小柴共一 (2011) トウモロコシ幼葉鞘の光屈性において光受容部位である幼葉鞘先端 (0-2mm) に特異的に発現するNPH3-, PGP-like遺伝子 第52回日本植物生理学会年会 (仙台)
- (9) 尾関文隆、石崎公庸、鐘ヶ江健、河内孝之、門田明雄 (2011) ゼニゴケ葉緑体光定位運動における葉緑体アクチンフィラメントの動態 首都大バイオコンファレンス2011 (八王子)
- (10) 近江泰明、門田明雄 (2011) ヒメツリガネゴケのフィトクロム依存葉緑体光定位運動とアクチンフィラメントの変化 首

- 都大バイオコンファレンス2011 (八王子)
- (11) 中村美里、笠原賢洋、門田明雄 (2011) ヒメツリガネゴケの葉緑体光定位運動にともなうCHUP1 顆粒の動態 首都大バイオコンファレンス2011 (八王子)
- (12) 豊田麻那、門田明雄 (2011) ホウライシダ前葉体における光合成依存の葉緑体運動時のアクチンフィラメント変化 首都大バイオコンファレンス2011 (八王子)
- (13) 尾関文隆、石崎公庸、鐘ヶ江健、河内孝之、門田明雄 (2010) ゼニゴケにおける葉緑体光定位運動とアクチンフィラメント 首都大バイオコンファレンス2010 (八王子)
- (14) 近江泰明、門田明雄 (2010) ヒメツリガネゴケの赤色光による葉緑体光定位運動にともなう細胞骨格の変化とその役割 首都大バイオコンファレンス2010 (八王子)
- (15) 中村美里、笠原賢洋、門田明雄 (2010) ヒメツリガネゴケの葉緑体光定位運動におけるCHUPタンパク質の役割 首都大バイオコンファレンス2010 (八王子)

## 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・教授

研究者番号：60152758