

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440140

研究課題名(和文) 葉緑体光定位運動におけるCHUP1シグナリング複合体構成因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of the factors of CHUP1 signaling complex involved in chloroplast photorelocation movement

研究代表者

孔 三根 (KONG, SAMGEUN)

九州大学・学内共同利用施設等・助教

研究者番号：70514157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体光定位運動は周りの光環境変化に応じて、光合成の効率化と強光下での光傷害回避に必須の生理反応である。葉緑体は常に光の強度と方向を感じながら、葉緑体外包膜上で葉緑体アクチン繊維(chloroplast actin filament, cp-actin)が再構築することでどちらの方向へも移動し得る。本研究では、cp-actinを制御するCHUP1シグナリング複合体の分子間相互作用、青色光刺激によって葉緑体外包膜上で起こるダイナミックな制御機構を解析した。葉緑体の細胞膜への定着とcp-actinの束化はCHUP1シグナリング複合体の青色光依存的phot2によるリン酸化で可逆的に制御されている。

研究成果の概要(英文)：Chloroplast photorelocation movement is an essential physiological response for plants to optimize their photosynthetic ability and to avoid photodamage under fluctuating environmental light conditions. Chloroplasts can move to any directions according to the intensity and direction of incident light. Chloroplast movement is dynamically mediated by rapid reorganizations of chloroplast actin filament (cp-actin) on a chloroplast outer envelope. In this study, I analyzed the regulation mechanism of dynamic reorganizations of cp-actin filaments that taking place on the chloroplast outer envelope through the blue-light-dependent interaction between the molecules of the CHUP1 signaling complex. Chloroplast anchoring to the plasma membrane and bundling of cp-actin filaments were reversibly regulated by the blue-light-dependent phosphorylation of the CHUP1 signaling complex that were regulated by phot2.

研究分野：植物生理

キーワード：葉緑体運動 青色光 光受容体 フォトリロビン アクチン繊維 信号伝達

## 1. 研究開始当初の背景

植物の葉緑体は、周りの光環境変化に応じて光合成の効率化、および強光による光傷害回避のために細胞内の最適な光条件下へ移動する、いわゆる「葉緑体光定位運動」を示す (Wada et al. 2003)。葉緑体光定位運動は100年以上前から知られている現象であり、様々な植物における葉緑体光定位運動の生理現象が知られている。近年、シロイヌナズナを材料としての葉緑体光定位運動の変異体の単離・解析から、葉緑体光定位運動に関わる因子が明らかにされて来た (Kong and Wada 2011)。それらの因子は、青色光受容体であるフォトトロピン1、2 (phot1, phot2) (Kagawa et al. 2001, Sakai et al. 2001)、下流信号伝達機構に関わる J-domain Protein Required for Chloroplast Accumulation Response 1 (JAC1) (Suetsugu et al. 2005)、Plastid Impaired Movement 1 (PMI1) (DeBlasio et al. 2005)、PMI2 (Luesse et al. 2006)、Weak Chloroplast Movement under Blue Light 1 (WEB1) (Kodama et al. 2010)、更にアクチン依存の葉緑体運動系に関わる cp-actin (Kadota et al. 2009) と cp-actin の維持や制御に関わる Chloroplast Unusual Positioning 1 (CHUP1) (Oikawa et al. 2003, Kadota et al. 2009)、Kinesin-like Protein for Actin-based Chloroplast Movement 1, 2 (KAC1, 2) (Suetsugu et al. 2010)、THRUMIN1 (Whippo et al. 2011) などである。以上の因子の同定は葉緑体光定位運動機構の知見を大きく広げたが、これらの因子の詳細な機能はまだ明らかにされていない。

葉緑体は細胞膜にアンカーされており、光の方向と強度を常に認識しながら細胞内の最適な場所を求めて移動する。アクチン依存の葉緑体光定位には従来知られていた cortical actin とは全く違う構造と制御機構を示す cp-actin が使用されている (Kadota et al. 2009)。Cp-actin は葉緑体と細胞膜の間に存在し、葉緑体の細胞膜へのアンカーおよび葉緑体運動に必須である。葉緑体が移動せず定着している一定の光強度下では、cp-actin は葉緑体の周縁部にほぼ均等に分布し、葉緑体を細胞膜にアンカーさせる役割

を担っている。しかし葉緑体運動を誘導すると、cp-actin は葉緑体上の移動方向前方に重合され、偏在する。その偏在程度は集合反応の場合にはあまり大きくないが、逃避反応の際には極端である。すなわち、強光による誘導される逃避運動の際には移動方向の尾部では cp-actin の脱重合が優先的に起こって完全に消え、移動方向の先端側(強光下の外)のみに再重合される。この強光照射による cp-actin の瞬時の消失によって葉緑体前後の cp-actin の量比は短時間で大きく変わり、その結果「光が強ければ強いほど速い速度で逃避する」という移動速度との相関関係を示す (Kadota et al. 2009)。さらに、TIRF 顕微鏡による cp-actin の解析から、強光下における cp-actin 消失には葉緑体上での cp-actin の断片化と運動性の増加が必須であり、phot2 に制御される (Kong et al. 2013)。以上のような cp-actin の青色光依存の可逆的ダイナミクスは、葉緑体がどの方向でも速やかに動くための重要な機能を持たせる。

CHUP1 は葉緑体外包膜に局在し、葉緑体の細胞膜へのアンカーに働くと共に cp-actin 依存の葉緑体運動に機能する重要な蛋白質である (Oikawa et al. 2003, Kadota et al. 2009)。特に、CHUP1 が cp-actin 重合を制御する重要な因子であることは、chup1 変異体では cp-actin が無いこと、CHUP1 の局在が cp-actin の挙動と一致することから明らかにされた (Kong et al. 準備中)。CHUP1 は暗所や弱光では葉緑体と細胞膜の間に粒状の CHUP1 複合体で局在するが、強い青色光を照射すると粒は散らばり、葉緑体外包膜全体に分散する。さらに、青色光照射によって葉緑体同士が接触する部位に集まり1~2 μm 程度の大きさの構造体 (CHUP1 body と命名) として出現する。このような光依存的 CHUP1 シグナリング複合体の局在変化は明暗処理によって1分以内の短時間内に消長を繰り返し、葉緑体の運動方向や cp-actin の重合・脱重合の動態と完全に一致する。

更に、葉緑体光定位運動の制御因子 phot2, KAC1, PMI1, PMI2, WEB1 などは cp-actin の制御のみならず、CHUP1 局在の制御にも関わる。特に、kac1 や pmi1 変異体の細胞では弱

光下でも CHUP1 body が形成されるが、*web1* や *pni2* 変異体の細胞では CHUP1 粒状から CHUP1 body への移行が弱まっている。

しかし、葉緑体光定位運動に関わる CHUP1 の分子機構は、未だにその実体は明らかにされていない。従って、CHUP1 シグナリング複合体がいかにして光受容体から発信された信号を受容し、活性化されるのか、すなわち、CHUP1 シグナリング複合体の cp-actin 制御機構を明らかにすることは葉緑体光定位運動機構の解明に必須である。

## 2. 研究の目的

本研究では、cp-actin を制御する「CHUP1 シグナリング複合体」の分子間相互作用に着目し、青色光刺激によって葉緑体外包膜上で起こる CHUP1 シグナリング複合体の構築原理、局在制御、さらに cp-actin の制御メカニズムを明らかにし、光受容から葉緑体運動に至る一連の葉緑体光定位運動に関わる信号伝達機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

細胞膜にアンカーされている葉緑体が速やかに動くためには、葉緑体外包膜上に局在する CHUP1 は青色光依存的にダイナミックな局在変化を伴い様々な因子との可逆的な相互作用が必要である。CHUP1 シグナリング複合体因子間の特異的な相互作用は、葉緑体を細胞膜にアンカーするための細胞膜蛋白質との相互作用や、葉緑体運動のための cp-actin 重合・脱重合の制御に関わる。

本研究では、葉緑体光定位運動に関わる因子同士の分子間相互作用を細胞生物学や生化学の手法を用いて調べた。また、CHUP1 シグナリング複合体の構成因子が CHUP1 機能（葉緑体アンカー及び cp-actin 重合活性）にどのように関わっているかの分子機構を植物生理学や分子遺伝学的手法を用いて調べた。さらに、CHUP1 シグナリング複合体の構成因子の生理機能、および *phot2* を介した構成因子のリン酸化がどのようにして CHUP1 シグナリング複合体の制御に関わっているかを *in vitro* リン酸化系を用いて調べた。

## 4. 研究成果

### (1) CHUP1 の新規複合体因子 CHIP1 の機能解析

CHUP1 の複合体因子として葉緑体の細胞膜へのアンカーに必須の CHIP の詳細な分子機構をシロイヌナズナで解析するために、CHIP1 ホモログである CHIL1, CHIL2 のノックアウトを構築した。CHIP1 ホモログの2重欠損変異体は、野生型より葉緑体運動の速度が低下していることを確かめた。さらに、*chip1* 変異体に CHIP1-GFP と CHIP1-RFP 遺伝子を導入した形質転換体を構築した。これらの形質転換体は、内在性 CHIP1 タンパク質並みの CHIP1-GFP と CHIP1-RFP 発現量を示し、欠損変異体の機能を回復した。また、CHUP1 と KAC1 が示す青色光依存的細胞内局在の変化を確かめた。

葉緑体の細胞膜へのアンカーに必須の CHIP の詳細な分子機構をシロイヌナズナで解析するためには、CHIP1 ホモログの欠損変異体が必要である。そこで、CRISP/Cas9 システムを用いて CHIP1 ホモログである CHIL1, CHIL2 のノックアウトの構築を試みた。それぞれ 30~50 ラインの T2 世代についてノックアウトを探したが、CHIP1 ホモログの多重欠損変異体は未だ得られてない。形質転換体の western blot 解析から、Cas9 の低い発現量がその原因である可能性が示唆された。

CHIP1 と CHUP1 の結合には、CHUP1-N と CHIP1 の同士の結合に因るものであることを Y2H システムにより分子間相互作用を用いて確定した。

### (2) CHUP1 複合体因子の相互作用

CHUP1 複合体因子の *phot2* 依存的相互作用を確かめるため、*chip1* 変異体に CHIP1-GFP と CHIP1-RFP 遺伝子を導入した形質転換体を作製し、内在性 CHIP1 タンパク質並みの発現量を示すラインを選抜した。CHIP1-GFP と CHIP1-RFP は青色光依存的細胞内局在を示しており、その挙動は CHUP1 とも一致してした。

タンパク質因子間の *in vitro* における相互作用を調べるために、CHUP1 複合体因子の組み替えタンパク質の精製条件を検討した。

### (3) CHUP1 複合体因子のリン酸化制御

CHUP1 シグナリング複合体の制御に phot2 からのリン酸化がどのように関わっているかを調べた。特に、CHIP1 と THRUMIN1 は試験管内で青色光依存的に phot2 によって直接リン酸化される、phot2 の基質であることを明らかにした。

phot2 の基質である THRUMIN1 と CHIP1 の phot2 特異的リン酸化サイトに変異を導入し、リン酸化の不活性型及び活性型の形質転換体を作成した。

### (4) CHUP1 複合体因子の構造解析

CHUP1 複合体因子である CHUP1-N、CHIP1、THRUMIN1 の組み替えタンパク質の精製条件を確立した。

THRUMIN1 の C 末端はタンパク質結晶構造解析に成功した。THRUMIN1 は C 末端領域を介して二量体を形成した。さらに、Cys-rich 領域は Zinc と結合するモチーフであった。

### 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 9 件)

Kong S.-G., Okajima K. (2016) Diverse photoreceptors and light responses in plants. *J Plant Res* 129 (2): 111-114. 査読の有 Doi: 10.1007/s10265-016-0792-5.

Kong S.-G., Wada M. (2016) Molecular basis of chloroplast photorelocation movement. *J Plant Res* 129 (2): 159-166. 査読の有 Doi: 10.1007/s10265-016-0788-1.

Kijima S., Hirose K., Kong S.-G., Wada M., Uyeda T. (2016) Distinct biochemical properties of *Arabidopsis thaliana* actin isoforms. *Plant & Cell Physiology*. 57 (1): 46-56. 査読の有 Doi: 10.1093/pcp/pcv176.

Suetsugu N., Higa T., Kong S.-G., and Wada M. (2015) PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1 and PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1-RELATED1 mediate photorelocation movements of both chloroplast and nuclei. *Plant Physiology*.

169 (2), 1155-1167. 査読の有 Doi: 10.1104/pp.15.00214.

Kong S.-G. and Wada M. (2014) Recent advances in understanding the molecular mechanism of chloroplast photorelocation movement. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*. 1837 (4): 522-530. 査読の有 Doi: 10.1016/j.bbabi.2013.12.004.

Nakasone Y., Kawaguchi Y., Kong S.-G., Wada M., and Terazima M. (2014) Photo-induced oligomerization of *Arabidopsis thaliana* phototropin 2 LOV1. *Journal of Physical Chemistry B*. 118 (49): 14314-14325. 査読の有 Doi: 10.1021/jp509448b.

Higa T., Suetsugu N., Kong S.-G., and Wada M. (2014) Actin-dependent plastid movement is required for motive force generation in directional nuclear movement in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 111 (1): 4327-4331. 査読の有 Doi: 10.1073/pnas.1317902111.

Kong S.-G. and Wada M. (2013) Observation of chloroplast-actin filaments in leaves of *Arabidopsis*. *Bio-protocol*. 3 (24): e1008. <http://www.bio-protocol.org/e1008>. 査読の有

Cazzaniga S., Dall'Osto L., Kong S.-G., Wada M., and Bassi R (2013) Interaction between avoidance of photon absorption, excess energy dissipation and zeaxanthin synthesis against photooxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 76 (4): 568-579. 査読の有 Doi: 10.1111/tpj.12314.

[学会発表](計 6 件)

孔三根 葉緑体は光に応じてどのように細胞内を移動するのか? 第18回植物オルガネラワークショップ 2016年3月17日、盛岡

孔 三 根 Molecular dynamics in chloroplast photorelocation movement 第 39 回日本分子生物学会年会、2015 年 1 月 2 日-2015 年 1 月 4 日、神戸

孔三根 葉緑体光定位運動の分子機構 第 1 回 plant cytoskeleton 2015、2015 年 1 月 27 日-2015 年 1 月 28 日、遺伝子研究所 (三島)

Kong S.-G., Kijima S., Shimada A., Suetsugu N., Hirose K., Takahashi F., Kohda D., Uyeda T., Wada M. The biochemical role of CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING 1 in chloroplast photorelocation movement 第 56 回日本植物生理学会、2015 年 3 月 16 日-2015 年 3 月 18 日、東京農業大学 (東京都)

Kong S.-G., Kijima S., Shimada A., Suetsugu N., Hirose K., Takahashi F., Kohda D., Uyeda T., Wada M. Chloroplast Unusual Positioning 1 is a plant-specific class of actin nucleator for chloroplast photorelocation movement 第 2 回 International Symposium on Plant Environmental Sensing 2015 年 3 月 13 日-2015 年 3 月 15 日、産業技術総合研究所 (東京都)

孔 三 根 Regulation mechanism of CHUP1 signaling complex for chloroplast photorelocation movement 第 78 回日本植物学会年会、2014 年 9 月 12 日-2014 年 9 月 14 日、明知大学 (東京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

孔 三 根 (KONG SAMGEUN)

九州大学・動的構造生命科学・助教

研究者番号：70514157