

平成 21 年 1 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2004～2008

課題番号：16107002

研究課題名(和文) 葉緑体光定位運動における信号伝達と運動機構の解析研究

(英文) Studies on the signal transduction and the mechanism of chloroplast photorelocation movement

研究代表者

和田正三 (WADA MASAMITSU)

九州大学・大学院理学研究院生物科学研究部門・特任教授

研究者番号：60011681

研究成果の概要：

植物は効率良く光合成を行うために、光条件によって細胞内の葉緑体の分布を変えている。弱光に向かって集合し、強光からは逃避する。この現象を葉緑体光定位運動と呼ぶ。我々は葉緑体が光の強弱を感知する光受容体を以前に確定した。本研究では光受容後葉緑体がどのような機構で運動するかを調べ、関与する数種のタンパク質を同定するとともに、葉緑体が移動するために必須な、従来知られていなかったアクチン微繊維構造を発見した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
17 年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
18 年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
19 年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
年度			
総計	64,200,000	19,260,000	83,460,000

研究分野：植物生理学

科研費の分科・細目：5703

キーワード：葉緑体 光定位 運動 シロイヌナズナ アクチン繊維

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内外の研究に対する位置づけ

本研究課題の開始前から、葉緑体運動に関して我々より研究が進んでいるグループは世界中どこにもない。フォトトロピンの生理作用に関しても、そのほとんどを我々とその共同研究者が発見したのであり、他の追従を許さない状況にあった。フォトトロピン分子の生化学的な研究は米国のBriggs教授のグ

ループが優位に立っているが、シダ前葉体における一過的発現系を駆使した我々のフォトトロピンの機能ドメインや重要アミノ酸の研究では我々が優位に立っていた

(2) 研究遂行前の準備状況

葉緑体光定位運動は光合成の活性化・効率化に重要であるのみならず、夏の日中のような強光下での植物の生存をも左右する重要な反応であることが、我々の最近の研究で明らかになった (Kasahara et al 2002, Nature)。

また我々は強光下における逃避運動を仲介する青色光受容体がフォトトロピン2 (phot2) であること (Kagawa et al 2001, Science) をはじめ、フォトトロピン1 (phot1) と2 (phot2) が、葉の伸展、気孔開口 (Kinoshita et al 2001, Nature) など光合成の活性化の光受容体として重要な役割を担っていることも明らかにした。葉緑体光定位運動の過程は、光受容、信号伝達、葉緑体移動の3つの素過程に分けて解析することができるが、我々は本研究開始前に、光受容体の決定とその作用ドメイン等、光受容に関する研究を集中的に行い、かなりの成果を得ていた。しかし「信号とその伝達」、「葉緑体の移動に伴う運動様式」に関してはほとんど手の付けられていない状態であった。一方、我々はすでに葉緑体の運動に関与していると考えられる突然変異体 (*chup1*, *jac1*, *kac1*) をシロイヌナズナから選抜しており、その遺伝子も確定していた。*KAC1*のキネシン様ドメイン(未発表)、*JAC1*と*KAC1*の結合(未発表)、*CHUP1*とアクチンとの結合(Plant Cell, 2003)、などの知見はこれらの遺伝子産物が運動機能に関与していることを示唆している。

葉緑体の運動にはアクチンとミオシンが関与していることが報告されていたが、これらの運動性タンパク質が葉緑体の移動に伴いどのような挙動をするかを視覚的に捉え解析する必要があり、我々はGFP-talinを導入したシロイヌナズナとヒメツリガネゴケの形質転換体を得て、その葉緑体運動に伴うアクチン繊維の消長の解析を始めていた。

(3) 研究の獨創性

葉緑体光定位運動が欠損した突然変異体は従来全く採られていなかったが、我々は独自に開発した方法によってシロイヌナズナ、ホウライシダから多数の変異体を選抜し解析した結果、本研究開始までに7つの葉緑体運動に関連した遺伝子を明らかにしていた。このうち3遺伝子に関してはすでにScience誌(シロイヌナズナの*phot2*)、Nature誌(ホウライシダの*phy3*)、Plant Cell誌(シロイヌナズナの*CHUP1*)に発表していた。残りは、遺伝子配列は明らかにしたもののその機能は不明な新規な遺伝子である。現在未発表のこれらの結果を含めて、我々の一連の研究結果は、光受容、信号伝達、細胞骨格、運動系に

かかわる非常に学際的なものである。

(4) 研究環境

本研究課題の遂行に必要な知識・技術は分子生物学と細胞生物学さらに光生物学であるが、これらに関する必要備品、操作技術はすべて修得されていた。特筆すべきは、「研究の方法」で述べる、本研究開始前年に我々が開発した蛍光顕微鏡である。さらに、30年来我々が専門としてきた光生物学的な知識・技術・装置が本研究遂行に十分な環境を整えていた。

2. 研究の目的

上述のように植物の光合成活性に重要な現象を制御する光受容体としてフォトトロピンの作用が我々の研究によってかなり明らかになってきたが、受容された光情報がどのような信号となり、細胞内をどのように伝わり、個々の現象が誘導されているか、という細胞下レベルの知見は全く分かっていない。フォトトロピンはいくつもの異なる生理現象を制御しており、当然各現象の最終段階における信号伝達経路は互いに異なっているはずである。我々はフォトトロピンに制御されている生理現象の中でも、我々が長年取り組んできた葉緑体運動を中心に、フォトトロピンの信号伝達系の一つを明らかにしたい。つまり、光受容体から発せられ、葉緑体まで伝わる信号はどのような物質であるか、その信号を得て、葉緑体はどのように移動を始めるのか、その運動の方向はどのように、何によって決められているか、を明らかにする。我々は、シダではフォトトロピンの他に、フィトクロムとフォトトロピンのキメラ遺伝子フィトクロム3 (*phy3*、現 *neochrome1*) が存在し、赤色光依存の光屈性、葉緑体運動の光受容体であることも明らかにした (Kawai et al 2003, Nature)。本研究課題では、分子生物学的研究に適したシロイヌナズナと細胞生物学的研究に適したシダの配偶世代をうまく併用し、フォトトロピンおよび *neochrome1* からの信号伝達とその後の葉緑体の運動機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

葉緑体運動の研究手法の主なものは、まず各種の光学顕微鏡を駆使して、実際に葉緑体が

どのような動きをするか、その場合の細胞骨格の動態はどうか、これらの知見が葉緑体運動に関する変異体ではどうなっているか、などを、詳細に観察し、解析することである。

我々は、葉緑体、またはその一部や、細胞の一部のみに光照射のできる微光束照射装置を駆使して実験をしている。本研究では、本研究課題開始前年に完成した微光束照射装置を組み込んだ特注の蛍光顕微鏡を駆使し、葉緑体移動に伴う細胞骨格の動態を調べた。この顕微鏡には冷却 CCD カメラが搭載されており、ごく微弱な蛍光をも短時間で収録し、連続再生によってアクチン繊維の挙動をほぼ連続的に観察することができる。これによって我々が明らかにしてきた各遺伝子産物の光照射にとまらぬ挙動が明らかになってきた。

葉緑体運動の変異体や、遺伝子組み換え株を使用した分子生物学的な研究には特段の工夫もなく、特別に開発した特殊技術も使用していない。

4. 研究成果

(1) CHUP1タンパク質の細胞内局在

CHUP1タンパク質はそのN末端側に疎水性のアミノ酸が多い領域があり、その部分で葉緑体外包膜に結合していることを、単離した葉緑体から生化学的に、また疎水領域を削除したCHUP1 cDNAや葉緑体外包膜の存在が既知のOEP7タンパク質のN末端疎水領域を結合したCHUP1 cDNAを *chup1* 変異体へ導入し、機能回復実験から明らかにした。

(2) 葉緑体の移動方向の解析

葉緑体の移動にはアクチン繊維が関与することが示唆されて来たが、確たる証拠はなかった。また既存のアクチン繊維を使用しているのか、あるいは葉緑体の移動にとまらぬ新たに重合されるのかも、分かっていなかった。そこで、まず葉緑体が、細胞内のあらゆる方向に移動できるか否かを、葉緑体の前後に微光束を連続的に数回照射することによって、葉緑体があらゆる方向に動きうることを明らかにした。この結果は、葉緑体の移動を「既存のアクチン繊維」で説明するのは難しく、光照射後にアクチンが重合されることを示唆した。

(3) 移動に働くアクチン繊維の消長

GFP_{tal}inを導入したシロイヌナズナの形質転換体でアクチン繊維の分布を詳細に調べた結果、短く細いアクチン繊維が葉緑体の移動方向の先端部に、短時間内に出現しては消える「消長」を繰り返していることを発見した。このアクチン繊維は葉緑体運動が起こらない *chup1* 突然変異体の葉緑体上には存在しないことも明らかにした。これらの実験結果から、CHUP1タンパク質がアクチン繊維の重合脱重合を介して、葉緑体の移動に関与していることが強く示唆された。

(3) JAC1タンパク質の解析

葉緑体集合反応が欠損した変異体をシロイヌナズナから単離し、その原因遺伝子を確定し、その性質を解析した。この遺伝子にはC末端側にJドメインがあるがその機能は不明である。その他には機能が推定できるようなドメイン構造は見つからない。また葉緑体運動に関与する既存のタンパク質とは、少なくとも酵母のtwo hybrid systemでは反応が見られない。JAC1変異体は集合反応は起こさないが、逃避反応は野生型同様正常に起こる。従って集合反応特異的な信号伝達に関係した因子である。JAC1-GFPを細胞内で発現させると細胞内全体に均一なGFPの蛍光が見られるので、恐らく細胞膜に沿って存在しているものと推察される。

(4) ヒザオリのneochrome の発見

進化したシダ類にのみ存在するフィトクロムとフォトトロピンのキメラ遺伝子 *phy3* と酷似した構造をもつ光受容体を緑藻のヒザオリに発見し、neochrome1, 2 (*neo1*, *neo2*) と命名した。neochromeはシダの *phy3* 欠損変異体の *phy3* 機能を回復することがわかり、同じ構造を持つキメラ遺伝子が植物の進化の過程で二度作られたことが明らかとなった。

(5) kac1タンパク質の解析

葉緑体の集合反応が欠損した変異体をもう一つシロイヌナズナから単離し原因遺伝子を確定した。この変異体も逃避反応は正常であるので、集合反応特異的な因子であるが、そのドメイン構造からして移動に重要な機能を持つ可能性がある。現在のところまだその具体的な機能は不明である。

(6) 葉緑体が移動方向を認識する機構の解析

葉緑体が逃避する場合、安全な場所へより速く移動できるように最短のルートを選択する。集合反応の場合も同様である。従って葉緑体は最も効果的なルートを感知し、移動していることになる。その機構を解析する第一歩として光受容体から発せられる信号の伝達速度を測った。その結果、シダ原糸体では約0.8~1.2 μ m/minであった。このことから、信号が葉緑体の先端部に到達した後、後端に達するまでに数分の時間差があることが分かった。信号の来る方向を信号物質の濃度差として葉緑体が察知するためには、葉緑体の前後で非常にわずかな濃度差を判別しなければならず、小さな葉緑体にとっては非常に難しいと思われるが、信号の移動が遅いため葉緑体は信号の濃度差を時間差として感知することで、実際の信号物質の濃度差を非常に大きな差として感知していることと思われた。

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 16 件)

- ① Tsuboi, H., H. Yamashita, M. Wada Chloroplasts do not have a polarity for light-induced accumulation movement. J. Plant Research 122: 131-140, 2009.
- ② Kodama, Y., H. Tsuboi, T. Kagawa, M. Wada Low temperature-induced chloroplast relocation mediated by a blue light receptor, phototropin 2, in fern gametophytes. J. Plant Research 121: 441-448, 2008.
- ③ Oikawa, K., A. Yamasato, S.-G. Kong, M. Kasahara, M. Nakai, F. Takahashi, Y. Ogura, T. Kagawa, M. Wada Chloroplast outer envelope protein CHUP1 is essential for chloroplast anchorage to the plasma membrane and chloroplast movement. Plant Physiol. 148: 829-842, 2008.
- ④ Tsuboi, H., N. Suetsugu, H. Kawai –Toyooka, M. Wada Phototropins and neochrome1 mediate nuclear movement in the fern *Adiantum capillus-veneris*. Plant Cell Physiol. 48: 892-896, 2007.
- ⑤ Doi, M., M. Wada, K. Shimazaki The fern *Adiantum capillus-veneris* lacks stomatal responses to blue light. Plant Cell Physiol. 47: 748-755, 2006.
- ⑥ Tsuboi, H., N. Suetsugu, M. Wada Negative phototropic response of rhizoid cells in the fern *Adiantum capillus-veneris*. J. Plant Research 119:505-512, 2006.
- ⑦ T., E. Hayashida, C. Kuramoto, M. Wada A single chromoprotein with triple chromophores acts as both a phytochrome and a phototropin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:17997-18001, 2006.
- ⑧ Yamauchi, D., K. Sutoh, H. Kanegae, T. Horiguchi, K. Matsuoka, H. Fukuda, M. Wada Analysis of expressed sequence tags in prothallia of *Adiantum capillus-veneris*. J. Plant Research 118: 223-227, 2005.
- ⑨ Suetsugu, N., T. Kagawa, M. Wada An auxilin- like J-domain protein, JAC1, regulates photo- tropin-mediated chloroplast movement in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 139: 151- 162, 2005.
- ⑩ Suetsugu, N., Mittmann, F., Wagner, G. , Hughes, J., Wada, M. A chimeric photoreceptor gene, NEOCHROME, has arisen twice during plant evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 13705-13709, 2005.
- ⑪ Kawai-Toyooka, H., C. Kuramoto, K. Orui, K. Motoyama, K. Kikuchi, T. Kanegae and M. Wada DNA interference: a simple and efficient gene- silencing system for high-throughput functional analysis in the fern *Adiantum*. Plant Cell Physiol. 45: 1648-1657, 2004.
- ⑫ Kagawa, T. and M. Wada Chloroplast avoidance movement rate is fluence dependent. Photochem. Photobiol. Sci. 3: 592- 595, 2004.
- ⑬ Kasahara, M., T. Kagawa, Y. Sato, T. Kiyosue and M. Wada Phototropins mediate blue and red light-induced chloroplast movements in *Physco- mitrella patens*. Plant Physiol. 135:1388-1397, 2004.
- ⑭ Srinivas, A., RK Behera, T. Kagawa, M. Wada, and R. Sharma High pigment1 mutation negatively regulates phototropic signal transduction in tomato seedlings. Plant Physiol.134: 790-800, 2004.
- ⑮ Lamparter, T., T. Kagawa, G. Brucker and M. Wada Positive and negative tropic curvature induced by microbeam irradiation of protonemal tip cells of the moss *Ceratodon*

- purpureus*. Plant Biology 6: 165-170, 2004.
- ⑩ Kagawa, T., M. Kasahara, T. Abe, S. Yoshida and M. Wada Function analysis of Acph2 using mutants deficient in blue light-induced chloroplast avoidance movement of the fern *Adiantum capillus-veneris* L. Plant Cell Physiol. 45: 416-426, 2004.
- [学会発表] (計 49 件)
- ① M. Wada. What is the mechanism of chloroplast photoorientation movement? Origin and Evolution of Mitochondria and Chloroplasts. FEBS Advanced Lecture Course 2007, Acquafredda di Maratea, Italy, March 24 - 29, 2007.
- ② Wada, M., N. Suetsugu, S. Kong. Molecular mechanism of chloroplast photorelocation movement. The 18th International Conference on Arabidopsis Research, Beijing, China, June 22, 2007.
- ③ Wada, M. Chloroplast photorelocation movement: its photoperception and moving mechanisms. International Congress on Plant Mitochondrial Biology, Nara, Japan, June 25 - 29, 2007.
- ④ Wada, M. The mechanism of chloroplast photorelocation movement. International symposium on "Light and Life". Hyderabad, India. August 29 - 31, 2007.
- ⑤ Wada, M. Neochrome, a chimera photoreceptor of phytochrome and phototropin, in fern and *Mougeotia*. International Plant Photobiology Meeting, Carre des Sciences, Paris, France. April 24-28, 2006.
- ⑥ Wada, M. How to move chloroplast using actin filaments. Gordon Research Conference, Photosensory Receptors & Signal Transduction, Il Ciocco, Barga, Italy. April 30-May 5, 2006.
- ⑦ Wada, M. The Importance and the Mechanisms of Chloroplast Photorelocation Movement. GRC on Mitochondria and Chloroplast at Magdalen College, Oxford, August 15, 2006.
- ⑧ Wada, M. The function of phototropins and their signal transduction pathways. International Congress of Plant Molecular Biology, Adelaide, Australia. August 21, 2006.

- ⑨ Wada, M. The mechanism of chloroplast photorelocation movement. 3rd AOCPP at Beijing, Nov.17-20, 2006.
- ⑩ Wada, M. Light-Induced Chloroplast Relocation Movement. Keystone Symposia. Plant Cell Signaling: In vivo and omics Approaches, Santa Fe, New Mexico, USA. February 4, 2005.
- ⑪ Wada, M. DNA interference in fern gametophytes. Japan-US workshop, RNA therapy, Bethesda, Maryland, USA, February 24, 2005.
- ⑫ Wada, M. Diversity of photoreceptors and motility systems in chloroplast movement. Annual meetings of American Society of Plant Biology. Seattle, Washington, USA. July 20, 2005.
- ⑬ Wada, M. Chloroplast movement, Phototropin Meeting, NIBB, 17-18, November, 2005.
- ⑭ Wada, M. Photoreceptors of chloroplast photo-orientation movement. Memorial Symposium of International Prize for Biology 2005, Nagoya University, 1, December, 2005.

[図書] (計 7 件)

- ① Suetsugu, N., and Wada, M. Chloroplast photorelocation movement. *In: Plant Cell Monographs, The Chloroplast - Interaction with Environment*. Ed. A.S. Sandelius and H. Aronsson, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp. 235-266, 2009.
- ② Wada, M. Photoresponses in fern gametophytes. *In: The Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes* Edited by Tom A. Ranker and Christopher H. Haufler, Cambridge Univ. Press. Pp. 3-48, 2008.
- ③ Suetsugu, N., M. Wada, Chloroplast photorelocation movement mediated by phototropin family proteins in green plants. *Biological Chemistry* 388:927-935, 2007.
- ④ Kanegae, T., Wada, M. Photomorphogenesis of Ferns. *In: Photomorphogenesis in Plants* 3rd Edition. Ed. E. Schafer and F. Nagy, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.515-536, 2006.
- ⑤ Suetsugu, N., M. Wada Photoreceptor Gene Families in Lower Plants. *In: Handbook of*

Photosensory Receptors. Ed. W.R. Briggs and J.L. Spudich Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Pp. 349-369, 2005.

⑥ Wada, M. Chloroplast movement. *In: Light Sensing in Plants*, Ed. M. Wada, M., K. Shimazaki, M. Iino. Springer-Verlag, Tokyo. pp. 193-199, 2005.

⑦ Kasahara, M. 、 M. Wada Chloroplast avoidance movement. *In: Plastids, Annual Plant Reviews*, Volume 13 Ed. S. G. Moller, Blackwell, pp. 267-282, 2004.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 正三 (WADA MASAMITSU)
九州大学・大学院理学研究院・特任教授
研究者番号：60011681

(2) 研究分担者

鐘ヶ江 健 (KANEGAE TAKESHI)
首都大学東京・大学院理学研究科・助教
研究者番号：70264588

菊池 一浩 (KIKUCHI KAZUHIRO)
Cornell University・Boyce Thompson
Institute・博士研究員
研究者番号：50332177