

平成22年 3 月 31日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17084006
 研究課題名（和文） 葉緑体光定位運動における phot2 の情報発現機構の解析
 研究課題名（英文） Analytical studies on signal transduction pathways of phot2 in 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・特任教授
 研究者番号：60011681

研究成果の概要（和文）：青色光受容体であるフォトトロピン2（phot2）は葉緑体光逃避反応の光受容体である。しかし phot2 は phot1 と共に葉緑体集合反応の光受容体でもある。この phot2 の相反する作用がどのようにして起こりうるのかを明らかにするのが本研究の目的である。本研究では葉緑体逃避反応に作用する phot2 は葉緑体上に、集合反応を誘導する phot2 は細胞膜上に分かれて作用していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Phototropin2 is a blue light receptor mediating chloroplast avoidance response but at the same time it mediates chloroplast accumulation response as phot1 does. The purpose of this work is to clarify how phot2 can mediate the both contradictory phenomena. Our results suggest that phot2 locates both on the plasma membrane and on chloroplast envelope but the only latter one can mediate chloroplast avoidance response.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	31,500,000	0	31,500,000
2006年度	18,000,000	0	18,000,000
2007年度	18,000,000	0	18,000,000
2008年度	18,000,000	0	18,000,000
2009年度	18,000,000	0	18,000,000
総計	103,500,000	0	103,500,000

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、青色光、光受容体、葉緑体、運動、フォトトロピン

1. 研究開始当初の背景

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、我々の研究で明らかになった(Kasahara et al 2002, Nature)。葉緑体は強光下では光から逃げ（逃避運動）、弱

光では光に集まる（集合運動）。逃避反応の光受容体は青色光受容体フォトトロピン2（phot2）であり(Kagawa et al 2001, Science)、集合反応(Sakai et al 2001, PNAS)、葉の伸展(Sakai et al 2001, PNAS)、気孔開口(Kinoshita et al 2001, Nature)では phot1 と phot2 が光受容体として光合成の活性化に

重要な役割をしていることも我々は明らかにした。一方シダ植物ではフォトトロピンとフィトクロムの融合したキメラ受容体フィトクロム3 (phy3)が、赤色光で誘導される逃避運動、集合運動、光屈性の光受容体であることも明らかになった(Kawai et al 2003, Nature)。これらの結果、phot2 (および phy3) は弱光下では集合反応、強光下では逃避反応という、相反する現象の光受容体として働いていることが分かった。しかし phot2 (および phy3) という同一光受容体から発せられる情報がどのようにして、相反する信号と成り得るのかは全く不明である。

2. 研究の目的

本研究の最も重要な課題は、phot2 の相反する二つの作用がどのようにして誘導されているかである。気孔の開口、光屈性など phot2 が光受容体である現象で phot2 が二通りの作用を誘導するものは葉緑体の強光反応以外にない。そこで phot2 および phy3 から発せられる集合反応と逃避反応の信号伝達系と、その後の葉緑体の運動機構を解明することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝学的解析にはシロイヌナズナの柵状組織細胞を、細胞生物学的解析には主にホウライシダの配偶体細胞を使用した。Phot2 依存の強光による逃避運動の解析をさらに進めるため、シロイヌナズナを使用し、従来行って来た葉緑体運動欠損変異体の選抜をさらに進めた。シロイヌナズナで明らかになった遺伝子機能をシダにおいても明らかにするために、シダの遺伝子クローニングのために EST ラインを作製した。

シロイヌナズナを用いた遺伝学的解析には、一般的な分子生物学的手法によった。従って詳細は割愛する。Cp-actin 繊維の可視化、CHUP1 の可視化に関しては、それぞれアクチン結合因子である talin、CHP1 と GFP あるいは YFP 等の融合遺伝子をシロイヌナズナ野生型、または葉緑体運動を欠損した各種変異体に導入・発現させ、観察した。

葉緑体光定位運動の誘導には、葉、または配偶体の組織全体照射と細胞の一部または葉緑体の一部を微光束照射装置によって照射する方法を用いた。

葉緑体運動の観察およびデータ化は、主に時間経過に伴う細胞内の葉緑体移動を顕微鏡下で連続撮影したものを解析する方法、および、微弱光が葉を透過する透過率を連続的に計測する方法によった。前者は葉緑体運動そのものを観察するので、葉緑体の細かい挙動の解析には優れており、一方葉の透過率の測定は、葉緑体の移動以外の影響も受ける可能性があるが、非常に微弱な変化も用意にデ

ータ化することが出来るので、大量の試料の解析には優れている。我々は両者の良い所を有効に使用することで、解析効率と正確さを確保した。

4. 研究成果

予備実験の結果、phot2 は細胞内で、それ自体が四量体を形成している可能性が高くなった。また N 末端側を順次除去して行くと四量体から二量体、単量体へと変化することから、N 末端領域が多量体形成に重要な役割を担っている事が明らかになった。そこで多量体の形成が逃避反応や集合反応にどのように影響するかを調べるために、phot1phot2 二重変異体に四量体型、二量体型、単量体型を形成するような改変 phot2 を発現させ、それぞれの生理現象に対する影響を調べた。単量体を示すコンストラクトを導入したラインでは全ての生理現象において全く回復が見られないか、見えても光屈性反応は非常に低下していた。二量体を形成するコンストラクトを導入したラインでは光屈性や葉の展開は回復したが、phot2 の特異的な生理機能である葉緑体の暗黒定位と強光による逃避反応の回復は非常に弱かった。

そこでさらに葉緑体運動に関する多量体の影響を調べた。LOV1 ドメインを含む N 末端側 0-236 アミノ酸を削除して四量体と二量体が混在する構造になると集合反応は見られなくなったが、強光反応は正常であった。0-357 アミノ酸を削除した二量体型は弱光下での集合反応は示さず、強光下での逃避運動はわずかに回復する、しかしこの 2 量体型の N 末端側に四量体を形成する DsREDexpress を繋ぐと、強光下でも集合反応を示し、強光反応は示さなくなった。単量体型では集合反応も逃避反応も起こらなかった。以上により、phot2 の機能には少なくとも二量体以上の構造が必要であり、また四量体形成に重要な LOV1 ドメイン側の領域は分子スイッチとして phot2 が逃避反応のみならず集合反応に機能するためにも重要であることが分かった。

これらの結果は phot2 が機能を示すためには少なくとも二量体以上の複合体構造が必要であり、また phot2 の四量体構造形成に重要である LOV1 ドメイン側は葉緑体光定位運動において phot2 が逃避反応のみならず集合反応に機能するためにも重要な機能を持つことが明らかになった。

葉緑体と細胞膜の間に存在して、葉緑体運動に機能するアクチン繊維 (cp-actin filament) を発見し、さらにその消長を制御するタンパク質 CHUP1 (chloroplast unusual positioning1) を明らかにしたので、この cp-actin 繊維と CHUP1 に対する phot2 の関与

を調べた。Cp-actin 繊維は弱光下で葉緑体周縁部に存在するが、強光照射によって急速に消失した後、再度葉緑体の先端部に偏在して出現し、葉緑体は逃避する。一方、CHUP1 は葉緑体の外包膜上に存在し、YFP によって可視化した CHUP1 は粒状であり、強光照射によって先ず細分化し、葉緑体が逃避する方向の葉緑体先端部に移行する。この cp-actin 繊維の消長と CHUP1 の挙動はほとんど同時に進行し、両者ともに phot2 変異体では起こらないこと、すなわち phot2 によって制御されていることが分かった。

葉緑体の光逃避反応は、葉緑体に強光が当たった時に誘導されること、さらにこの現象は phot2 変異体では起こらないことが明らかになったので、phot2 の葉緑体上での存在を GFP 融合タンパク質の蛍光によって調べた。その結果、phot2 は葉緑体上と細胞膜の両方に局在することが分かった。この結果 (phot2 の葉緑体上での存在) を生化学的に確認するため、シロイヌナズナの葉から無傷の葉緑体を単離し、抗 phot2 抗体、抗 phot1 抗体を使用して調べた。その結果、予想通りに phot2 は葉緑体の外包膜上に存在することが示唆された。

そこで phot2 のどのドメインが葉緑体外包膜への移行に関与しているかを調べた結果、phot2 の葉緑体外包膜への移行には、phot2 の C 末端側約 80 アミノ酸が必要かつ十分であることが分かった。Phot2 が細胞膜上に存在することはすでに明らかになっているので、phot2 が葉緑体外包膜上と細胞膜上に存在することが phot2 の相反する二つの作用の原因であることが強く示唆された

Phot2 の詳細な機能解析を行うために、シロイヌナズナと並行してシダ配偶体での phot2 の作用を解析した。

シダの葉緑体光逃避運動に関与する各種因子の遺伝子を探るための、前葉体および胞子体から RNA を単離し、EST ラインを複製し、解析を行った。

葉緑体同様に核も光定位運動を行うが、シダにおいても強光により核も逃避運動をすることが明らかになった。さらにこの運動には phot2 及び neochrome が関与していることが分かった

シダの前葉体を低温下に移すと、細胞表面の葉緑体は光条件下でも暗黒定位同様な様相を呈し、細胞同士が接触した細胞壁へ移動することが分かった。さらにシダの phot2 欠損変異体で行った結果、phot2 が必須であることが分かった。

緑藻ヒザオリにシダ neochrome とは独立に発生したと考えられる類似の光受容体 (Msneochrome1, 2) を発見した。

5. 主な発表論文等

(1) [雑誌論文] (計 16 件)

- ① Tsuboi, H. and M. Wada. The speed of intracellular signal transfer for chloroplast movement. *Plant Signal & Behavior* in press, 2010. 査読無
- ② Tsuboi, H., H. Yamashita, M. Wada. Chloroplasts do not have a polarity for light-induced accumulation movement. *J. Plant Research* 122: 131-140, 2009. 査読有
- ③ Kodama, Y., M. Wada. Simultaneous visualization of two protein complexes in a single plant cell using multicolor fluorescence complementation analysis. *Plant Mol. Biol.* 70:211-217, 2009. 査読有
- ④ Kadota, A., N. Yamada, N. Suetsugu, M. Hirose, C. Saito, K. Shoji, S. Ichikawa, T. Kagawa, A. Nakano, M. Wada. Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:13106-13111, 2009. 査読有
- ⑤ Kagawa, T., M. Kimura, M. Wada. Blue light-induced phototropism of inflorescence stems and petioles is mediated by phototropin family members phot1 and phot2. *Plant Cell Physiol.* 50:1774-1785, 2009. 査読有
- ⑥ Tsuboi, H., M. Wada. Speed of signal transfer in the chloroplast accumulation response. *J. Plant Research* 123: in press (published online 2 December 2009). 査読有
- ⑦ Ogura, Y., A. Komatsu, K. Zikihara, T. Nanjo, S. Tokutomi, M. Wada, T. Kiyosue. Blue light diminishes interaction of PAS/LOV proteins, putative blue light receptors in *Arabidopsis thaliana*, with their interacting partners. *J. Plant Research* 121: 97 - 105, 2008. 査読有
- ⑧ 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. 査読有
- ⑨ 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. 査読有
- ⑩ Ogura, Y., S. Tokutomi, M. Wada, T.

- Kiyosue. PAS/LOV proteins: A proposed new class of plant blue light receptor. *Plant Signaling Behavior* 3: 966-968, 2008. 査読無
- ⑪ Wada, M. Fern as a model system to study photomorphogenesis. *J. Plant Research* 120:3-16, 2007. 査読有
- ⑫ Suetsugu, N., M. Wada. Phytochrome-dependent photomovement responses mediated by phototropin family proteins in Cryptogam plants. *Photochem. Photobiol.* 83:87-93, 2007. 査読有
- ⑬ Suetsugu, N., M. Wada. Chloroplast photorelocation movement mediated by phototropin family proteins in green plants. *Biological Chemistry* 388:927-935, 2007. 査読有
- ⑭ 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. 査読有
- ⑮ Takahashi, F., D. Yamagata, M. Ishikawa, Y. Fukamatsu, Y. Ogura, K. Kasahara, T. Kiyosue, M. Kikuyama, M. Wada. H. Kataoka. AUREOCHROME a photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 19625-19630, 2007. 査読有
- ⑯ Doi, M., M. Wada, K. Shimazaki. The fern *Adiantum capillus-veneris* lacks stomatal responses to blue light. *Plant Cell Physiol.* 47: 748-755, 2006. 査読有
- ⑰ 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. 査読有
- ⑱ Kanegae, 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. 査読有
- ⑲ 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. 査読有
- ⑳ Suetsugu, N., T. Kagawa, M. Wada. An auxilin-like J-domain protein, JAC1, regulates phototropin-mediated chloroplast movement in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 139:151-162, 2005. 査読有
- ㉑ Suetsugu, N., F. Mittmann, G. Wagner, J. Hughes, M. Wada. A chimeric photoreceptor gene, NEOCHROME, has arisen twice during plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:13705-13709, 2005. 査読有
- (2) [学会発表] (計 52 件)
- ① Wada, M. The Mechanisms of Chloroplast Photorelocation Movement, Keystone Symposium 'Plant Sensing, Response and Adaptation to the Environment', Big Sky, Montana, USA, January 11-16, 2009.
- ② Wada, M. Chloroplast photorelocation movement. Chloroplast Workshop at Goeteborg, Sweden, June 8-13, 2009.
- ③ Wada, M. Chloroplast move towards or away from light, why and how? 15th International Congress on Photobiology, Dusseldorf, Germany, June 18 - 23, 2009. (Presidential lecture)
- ④ Wada, M. Precise analyses of chloroplast behavior during chloroplast photorelocation movement. 13th Congress of European Society for Photobiology, Wroclaw, Poland, September 5 - 10, 2009
- ⑤ Wada, M. The mechanism of chloroplast photorelocation movement. 9th IPMB Congress, St. Louis, Missouri, USA, October 25 - 30, 2009
- ⑥ Wada, M. CHLOROPLAST MOVEMENT is mediated by phototropin family proteins, but how? Comemorative symposium for International Prize for Biology, Kyoto, Japan, November 2-3, 2009.
- ⑦ Wada, M. Phototropin function in chloroplast movement through chloroplast actin. Gordon Research Conference at Ventura, California, USA. January 27- February 2, 2008.
- ⑧ Wada, M. Chloroplasts can move back and forth, why? 25th Annual Missouri Symposium: Plant Photobiology, University of Missouri, May 28-31, 2008.
- ⑨ Wada, M. How actin works in chloroplast photorelocation movement? Symposium: Photobiology in Asia (Org. P. S. Song). Annual meeting of American Society of Photobiology, Burlingame, CA. USA, June 20-25, 2008.
- ⑩ Kodama, Y., H. Tsuboi, T. Kagawa, M. Wada Low temperature-induced chloroplast relocation is mediated by a blue light receptor, phototropin 2, in

- fern gametophytes. Annual meeting of American Society of Plant Biologists. Merida, Mexico, June 26-July 1, 2008.
- ⑪ Wada, M. Photoreceptors and their downstream targets for chloroplast movement in *Physcomitrella patens*. Tampere, Finland, August 18, 2008.
- ⑫ Wada, M. Chloroplast can move to any direction, How? Symposium 28 Plant Cell Biology, The 9th International Congress on Cell Biology 'Challenge of Life Sciences: Molecules and Cells', COEX, Seoul, Korea, October 7-10, 2008.
- ⑬ Wada, M. Photoperception and the mechanism of chloroplast photorelocation movement. The Ins and Outs of Chloroplasts, Osaka University, Osaka, October 14, 2008.
- ⑭ Wada, M. The mechanism of chloroplast photo-orientation movement. 4th AOCF, Varanasi, India, November. 24, 2008.
- ⑮ Wada, M. 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.
- ⑯ Wada, M., N. Suetsugu, S.-G. Kong, Molecular mechanism of chloroplast photorelocation movement. The 18th International Conference on Arabidopsis Research, Beijing, China, June 22, 2007.
- ⑰ Wada, M. Chloroplast photorelocation movement: its photoperception and moving mechanisms. International Congress on Plant Mitochondrial Biology, Nara, Japan, June 25 - 29, 2007.
- ⑱ Wada, M. The mechanism of chloroplast photorelocation movement. International symposium on "Light and Life". Hyderabad, India. August 29 - 31, 2007.
- ⑲ 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.
- ⑳ 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
- ㉑ Wada, M. The Importance and the Mechanisms of Chloroplast Photorelocation Movement. GRC on Mitochondria and Chloroplast at Magdalen College, Oxford, August 15, 2006.
- ㉒ Wada, M. The function of phototropins and their signal transduction pathways. International Congress of Plant Molecular Biology, Adelaide, Australia. August 21, 2006.
- ㉓ Wada, M. The mechanism of chloroplast photorelocation movement. 3rd AOCF at Beijing, November 17-20, 2006.
- ㉔ 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.
- ㉕ Wada, M. Photoreceptors of chloroplast photo-orientation movement. The 21st Symposium in Conjunction with Award of International Prize of Biology Awardee: Prof. Nam-Hai Chua (Rockefeller University), Noyori Conference Hall. Nagoya University, 30 November - 1 December 2005.
- (3) [図書] (計5件)
- ① Suetsugu, N., M. Wada. Chloroplast photorelocation movement. *In: Plant Cell Monographs, The Chloroplast - Interaction with Environment.* Ed. A.S. Sandelius and H. Aronsson, Springer, Berlin Heidelberg. Pp. 235-266, 2009.
- ② Wada, M. Photoresponses in fern gametophytes. *In: The Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes* Ed. Tom A. Ranker and Christopher H. Haufler, Cambridge Univ. Press. Pp. 3-48, 2008.
- ③ Kanegae, T., M. Wada. Photomorphogenesis of Ferns. *In: Photomorphogenesis in Plants 3rd Edition.* Ed. Schafer and Nagy, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.515-536, 2006.
- ④ 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.
- ⑤ Wada, M. Chloroplast movement. *In: Light Sensing in Plants,* Ed. Wada, M., K. Shimazaki, M. Iino. Springer-Verlag, Tokyo. pp. 193-199, 2005.
- (4) [その他]
- ①ホームページ
<http://wadalab.biology.kyushu-u.ac.jp/>

②報道関連情報

- 1) 西日本新聞 2010年1月12日 子育て夢
ひろば[4]学校教育・NIE 「理科大好き＝葉
緑体」
- 2) 岐阜新聞 2010年1月7日夕刊 サイエ
ンス 「強い光から逃げる葉緑体」
- 3) 山形新聞 2009年12月28日科学欄 「葉
緑体で字が書けた 強い光に逃げる性質利
用」
- 4) Science 326: 1058, 2009年11月20日号
NEWS FOCUS 欄 「Chloroplast shuffle」
- 5) 朝日新聞朝刊科学欄 2009年8月11日号
「葉緑体に新たな運動機構」
- 6) 日刊工業新聞 2009年3月6日号 「みど
りの学術賞」和田氏／矢原氏に
- 7) EIC ネット国内ニュース 2009年3月5
日号 平成21年(第3回)「みどりの学術
賞」受賞者決定

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・理工学研究科・助教
研究者番号：70264588