

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5月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2008～2012

課題番号：20227001

研究課題名（和文） 葉緑体光定位運動における新規アクチン構造の機能解析

研究課題名（英文） Functional Analysis of Newly-found Actin Structure Involved 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）：葉緑体光定位運動、特に逃避運動について、移動に伴う cp-アクチン繊維とその重合・維持に関与する蛋白質因子、運動に関わる因子の詳細な解析を行った。その結果、cp-アクチン繊維は細胞質のアクチン繊維とは異なる構造と挙動を示すこと、葉緑体運動にはミオシン分子は関与しないこと、逃避反応を仲介する光受容体 phot2 は葉緑体包膜上に存在すること、早急な逃避運動には cp-アクチン繊維の急速な消失が必要であり、最終的には 0.3 μ m の断片まで短くなって消失すること、等を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cp-actin filaments that involved in chloroplast movement and CHUP1 that mediates cp-actin filament polymerization were analyzed by a confocal laser scanning fluorescence microscopy and total internal reflection fluorescence microscopy in detail. Cp-actin filaments' behavior was different from that of cytoplasmic actin cables. They were severed and fragmented into about 0.3 μ m and disappeared. Myosin molecules might not be involved in chloroplast movement. Phot2 that involved in chloroplast avoidance movement might be localized on the chloroplast outer membrane. Other new findings were obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	47,800,000	14,340,000	62,140,000
2009年度	28,000,000	8,400,000	36,400,000
2010年度	28,000,000	8,400,000	36,400,000
2011年度	28,000,000	8,400,000	36,400,000
2012年度	28,000,000	8,400,000	36,400,000
総計	159,800,000	47,940,000	207,740,000

研究分野：植物生理学

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：葉緑体、アクチン繊維、光応答、フォトリロピン、シロイヌナズナ、シダ

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。我々は葉緑体の運動を誘導する新しいアクチン構造が葉緑体と細胞膜の間に

存在することを明らかにし、cp-アクチン繊維と命名した。またこのアクチン繊維の重合には CHUP1 と呼ばれるタンパク質が関与していることも明らかにした。強光照射下では、アクチン構造はまず脱重合し、その後、逃避運動方向の先端部に再度重合される。集合反応

の場合には、最初の脱重合が起こらずに移動方向先端部にアクチン繊維が重合される。このアクチン繊維の働き、機能の詳細は不明であった。また重合に関与していると考えられる CHUP1 の働きの詳細も分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では葉緑体の運動を制御する葉緑体上のアクチン微繊維の働き、アクチン繊維の重合/脱重合に関与すると考えられる CHUP1 の機能解析を主課題とし、アクチン繊維の重合過程、力の発生機構、JAC1, KAC1, KAC2 などのアクチン繊維の重合、脱重合に関与すると考えられる諸因子の作用機能を解析し、葉緑体運動に関与している機構の解析を行い、葉緑体運動の全体像を明らかにするのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

蛍光蛋白質で可視化された cp-アクチン繊維や CHUP1 を顕微鏡画像として連続撮影し、時間経過に伴う cp-アクチン繊維および CHUP1 等蛋白質の挙動を観察した。このために遺伝学、生化学、細胞生物学、光生物学などの方法を併用した。本研究費初年度の経費により購入したライカ SP5 共焦点蛍光顕微鏡で cp-アクチン繊維とその重合・維持に関わる CHUP1 等が、生葉の柵状組織で観察可能になった。さらに CHUP1:YFP と GFP-talin の形質転換体から、cp-アクチン繊維と CHUP1 の同時観察可能な植物を作製した。cp-アクチン繊維の速い消失の解析には大阪大学の柳田敏雄教授と、蛋白質の結晶構造解析には九州大学の神田大輔教授と共同研究を行った。

4. 研究成果

- ①葉緑体逃避運動を仲介する phot2 は葉緑体外包膜上に存在することが生化学的解析により示された。従って、逃避運動では葉緑体上の phot2 が光受容体として作用していると考えられた。
- ②葉緑体の逃避反応では、phot2 依存的リン酸化によって CHUP1 が葉緑体移動方向前半部に分布を移し、その結果 cp-actin 繊維の重合位置が規定されることが明らかになった。
- ③変異体の解析により同定した多数の因子 (KAC, JAC, WEB など) の機能・相互作用から、phot による光受容から葉緑体の運動に至る信号伝達の概要を明らかにした。
- ④cp-アクチン繊維の重合に携る CHUP1 の N 末端側は葉緑体を細胞膜に接着すること、さらに光反応に関与していることを明らかにした。
- ⑤CHUP1 の C 末端側の結晶構造を明らかにした。アクチン重合に関与することが強く示唆された。

⑥葉緑体を細胞膜に接着していると考えられる因子として CHIP1 を酵母ツーハイブリッド系により同定した。

⑦葉で発現している主なミオシンの三重変異体では、原形質流動など、細胞内の運動はほとんど停止するが、葉緑体運動は正常であり、葉緑体運動にはミオシンは関与していないこと、他のオルガネラ運動とは異なる系を使用していることが強く示唆された。cp-アクチン繊維の新規性を示した。

⑧葉緑体逃避運動には cp-アクチン繊維の早急な消失と先端方向での再重合が必須である。cp-アクチン繊維の消失の詳細を全反射顕微鏡により解析した。その結果、細胞質の actin 繊維とは全く異なる挙動を示すこと、短く切断され、最終的には約 0.3 μ m の断片になって消失することが分かった。

その他にも cp-アクチン繊維に関する多くの知見を得た。

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 3 3 件)

- ① Tsuboi, H., M. Wada Chloroplasts continuously monitor photoreceptor signals during accumulation movement. *J. Plant Research* 査読有 in press 2013 DOI: 10.1007/s10265-012-0542-2
- ② Kong, S.-G., Y. Arai, N. Suetsugu, T. Yanagida, M. Wada Rapid severing and motility of cp-actin filaments are required for the chloroplast avoidance response. *Plant Cell* 査読有 25:572-590, 2013. DOI: org/ 10.1105/tpc.113.109694
- ③ Suetsugu, N., S.-G. Kong, M. Kasahara, M. Wada Both LOV1 and LOV2 domains of phototropin2 function as the photosensory domain for hypocotyl phototropic response in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Amer. J. Bot.* 査読有 100:60-69, 2013. DOI:10.3732/ajb.1200308
- ④ Kong, S.-G., T. Kagawa, M. Wada, A. Nagatani A carboxy-terminal membrane association domain of phototropin 2 is necessary for chloroplast movements. *Plant Cell Physiol.* 査読有 54: 57-68, 2013. DOI:10.1093/pcp/pcs132,
- ⑤ Kozuka, T., N. Suetsugu, M. Wada, A. Nagatani Antagonistic regulation of leaf flattening by phytochrome B and phototropin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 査読有 54: 69-79, 2013. DOI:10.1093/pcp/pcs134
- ⑥ Kong, S.-G., N. Suetsugu, S. Kikuchi, M.

- Nakai, A. Nagatani, M. Wada Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity. *Plant Cell Physiol.* 査読有 54:80 - 92, 2013. DOI:10.1093/pcp/pcs151
- ⑦ Suetsugu, N., M. Wada Green plants and photosynthetic stramenopiles evolved the specific LOV blue light receptor protein families: Phototropin, ZTL/FKF1/LKP2, and Aureochrome. *Plant Cell Physiol.* 査読有 54: 8 - 23, 2013. DOI:10.1093/pcp/pcs165
- ⑧ Wada, M. Recent advances in the understanding of fern responses to light. *Fern Gazette* 査読有 19: 97-115, 2013. DOI、URL 不明
- ⑨ Tsuboi, H., M. Wada Chloroplasts move towards the nearest anticlinal walls under dark condition. *J. Plant Research* 査読有 125:301-310, 2012. DOI: 10.1007/s10265-011-0433-y
- ⑩ Tsuboi, H., M. Wada Distribution pattern changes of actin filaments during chloroplasts movement in *Adiantum capillus-veneris*. *J. Plant Research* 査読有 125:417-428, 2012. DOI: 10.1007/s10265-011-0444-8
- ⑪ Tsuboi, H., S. Nakamura, E. Schäfer, M. Wada Red light-induced phytochrome relocation into the nucleus in *Adiantum capillus-veneris*. *Molecular Plant* 査読有 5:611-618, 2012. DOI:10.1093/mp/ssr119
- ⑫ Tsuboi, H., K. Sutoh, M. Wada Epigenetic memory of DNAi mediated by cytosine methylation and histone modification in fern. *Plant Signal. Behav.* 査読有 7:1477-1483, 2012. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.21974>
- ⑬ Suetsugu N., Y. Sato, H. Tsuboi, M. Kasahara, T. Imaizumi, T. Kagawa, Y. Hiwatashi, M. Hasebe, M. Wada The KAC family of kinesin-like proteins is essential for the attachment of chloroplasts to the plasma membrane in land plants. *Plant Cell Physiol.*, 査読有 53: 1854-1865, 2012. DOI:10.1093/pcp/pcs133
- ⑭ Usami, H., T. Maeda, Y. Fujii, K. Oikawa, F. Takahashi, T. Kagawa, M. Wada, M. Kasahara CHUP1 mediates actin-based light-induced chloroplast movement in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* 査読有 236:1889-1897, 2012. DOI:10.1007/s00425-012-1735-6
- ⑮ Kodama, Y., N. Suetsugu, M. Wada Novel protein-protein interaction family proteins involved in chloroplast movement response. *Plant Signal. Behav.* 査読有 6: 483-490, 2011. DOI:10.4161/psb.6.4.14784
- ⑯ Tsuboi, H., M. Wada Chloroplasts can move in any direction to avoid strong light. *J. Plant Research* 査読有 124: 201-210, 2011. DOI: 10.1007/s10265-010-0364-z
- ⑰ Yamashita, H., Y. Sato, T. Kanegae, T. Kagawa, M. Wada, A. Kadota Chloroplast actin filaments organize meshwork on the photorelocated chloroplasts in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* 査読有 233:357-368, 2011. DOI: 10.1007/s00425-010-1299-2
- ⑱ Ichikawa, S., N. Yamada, N. Suetsugu, M. Wada, A. Kadota Red light, phot1 and JAC1 modulate phot2-dependent reorganization of chloroplast actin filaments and chloroplast avoidance movement. *Plant Cell Physiol.* 査読有 52: 1422-1432, 2011. DOI:10.1093/pcp/pcr087
- ⑲ Yamada, N., N. Suetsugu, M. Wada, A. Kadota Phototropin-dependent biased relocalization of cp-actin filaments can be induced even when chloroplast movement is inhibited. *Plant Signal. Behav.* 査読有 6:1651-1653, 2011. DOI: 10.4161/psb.6.11.17767
- ⑳ Tsuboi, H., M. Wada Speed of signal transfer in the chloroplast accumulation response. *J. Plant Research* 査読有 123: 381-390 2010. DOI:10.1007/s10265-009-0284-y
- ㉑ Suetsugu, N., N. Yamada, T. Kagawa, H. Yonekura, T. Q. P. Uyeda, A. Kadota, M. Wada Two kinesin-like proteins mediate actin-based chloroplast movement in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読有 107: 8860-8865, 2010. DOI:10.1073/pnas.0912773107
- ㉒ Takano, A., N. Suetsugu, M. Wada, D. Kohda Crystallographic and functional analyses of J-domain of JAC1 essential for chloroplast photorelocation movement in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 査読有 51: 1372-1376, 2010. DOI:10.1093/pcp/pcq089
- ㉓ Kodama, Y., N. Suetsugu, S.-G. Kong, M. Wada Two interacting coiled-coil proteins, WEB1 and PMI2, maintain the chloroplast photorelocation movement velocity in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読有 107:19591-19596, 2010. DOI:10.1073/pnas.1007836107
- ㉔ Tsuboi, H., M. Wada The speed of

- intracellular signal transfer for chloroplast movement. *Plant Signal. Behav.* 査読無 5: 433-435, 2010. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.5.4.11338>
- ②⑤ Suetsugu, N., V.V. Dolja and M. Wada Why have chloroplasts developed a unique motility system? *Plant Signal. Behav.* 査読無 5: 1190-1196, 2010. DOI: 10.4161/psb.5.10.12802
- ②⑥ Suetsugu, N., A. Takano, D. Kohda, and M. Wada Structure and activity of JAC1 J-domain implicate the involvement of the cochaperone activity with HSC70 in chloroplast photorelocation movement. *Plant Signal. Behav.* 査読無 5: 1592-1596, 2010. DOI:10.4161/psb.5.12.13915
- ②⑦ 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.* 査読有 50:1774-1785, 2009. DOI: 10.1093/pcp/pcp119
- ②⑧ Tsuboi, H., H. Yamashita, M. Wada Chloroplasts do not have a polarity for light-induced accumulation movement. *J. Plant Research* 査読有 122: 131-140, 2009. DOI:10.1007/s10265-008-0199-z
- ②⑨ Kodama, Y., M. Wada Simultaneous visualization of two protein complexes in a single plant cell using multicolor fluorescence complementation analysis. *Plant Mol. Biol.* 査読有 70:211-217, 2009. DOI:10.1007/s11103-009-9467-0
- ③⑩ 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* 査読有 106:13106-13111, 2009. DOI:10.1073/pnas.0906250106
- ③⑪ 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* 査読有 121: 97 - 105, 2008. DOI:10.1007/s10265-007-0118-8
- ③⑫ 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* 査読有 121: 441-448, 2008. DOI: 10.1007/s10265-008-0165-9
- ③⑬ 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.* 査読有 148: 829-842, 2008. DOI:org/10.1104/pp.108.123075
- [学会発表] (計 60 件)
- ① Wada, M. How to deal with a plant material? In the case of *Adiantum capillus-veneris*. Marchantia Workshop 2012 at Aso, Aso, Japan. Nov. 15-17, 2012.
- ② Wada, M. Phototropin Function in Chloroplast Movement. 10th International Congress on Plant Molecular Biology, S29:Plant Photobiology of Blue Light Responses. Jeju, Korea. October 24 2012.
- ③ Wada, M. Molecular mechanism of chloroplast photorelocation movement. The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing, Todaiji Culture Center, Nara, Japan. March 19-21, 2012.
- ④ Wada, M. Phototropin involvement in chloroplast movement. GRC Photosensory Receptors & Signal Transduction, Galveston, TX, USA. January 22-27, 2012.
- ⑤ Wada, M. How chloroplasts use cp-actin filaments for their light-dependent movement? The 5th Asia and Oceania Conference on Photobiology. Nara, Japan. July 30 - August 1, 2011.
- ⑥ Wada, M. Chloroplast actin filaments are involved in chloroplast photorelocation movement. The 2011 International Symposium on Plant Photobiology, Peking University, Beijing, China. July 2-6, 2011.
- ⑦ Wada, M. "Chloroplast actin filaments are involved in chloroplast photorelocation movement", International Conference on Plant Science in Post Genomic Era, Sambalpur University, Orissa, India. February 17, 2011.
- ⑧ Kong, S.-G., Y. Arai, T. Yanagida, M. Wada. Phototropin-dependent chloroplast actin filament dynamics in *Arabidopsis thaliana*. GRC on Plant & Microbial Cytoskeleton, Andover, USA. Aug. 8-13, 2010.
- ⑨ Wada, M. Chloroplast movement: From behavior to mechanism. Sommerworkshop,

Universität Würzburg, Würzburg, Germany.
July 22, 2010.

- ⑩ Wada, M. How chloroplasts behave under ambient light conditions? Freiburg University, Biologie II. Freiburg, Germany. July 12, 2010.
- ⑪ Wada, M. Finally I could collaborate with Prof. Dr. Eberhard Schäfer on the nuclear transport of fern phytochrome and the chloroplast movement. Kolloquium "Plant Signalling Mechanisms" Freiburg, Germany. June 25, 26, 2010
- ⑫ Wada, M., Factors controlling the existence of chloroplast actin filaments involved in chloroplast movement. Gordon Research Conference on "Photosensory Receptors & Signal Transduction" Il Ciocco, Italy. April 18 -23, 2010
- ⑬ Wada, M. Chloroplast movement is mediated by phototropin family proteins, but how? Commemorative symposium for International Prize for Biology, Kyoto, Japan. November 2-3, 2009.
- ⑭ Wada, M. The mechanism of chloroplast photorelocation movement. 9th IPMB Congress, St. Louis, Missouri, USA. October 25 - 30, 2009.
- ⑮ Wada, M. Precise analyses of chloroplast behavior during chloroplast photorelocation movement. 13th Congress of European Society for Photobiology, Wroclaw, Poland. September 5 - 10, 2009.
- ⑯ Wada, M. Chloroplast move towards or away from light, why and how? 15th International Congress on Photobiology, Dusseldorf, Germany. June 18 - 23, 2009.
- ⑰ Wada, M. The Mechanisms of Chloroplast Photorelocation Movement. Keystone Symposium 'Plant Sensing, Response and Adaptation to the Environment', Org. by S. Kay & J. Chory, Big Sky, Montana, USA. January 11-16, 2009.
- ⑱ Wada, M. The mechanism of chloroplast photo-orientation movement. 4th AACP, Varanasi, India. Nov. 24, 2008.
- ⑲ Wada, M. Photoperception and the mechanism of chloroplast photorelocation movement. The Ins and Outs of Chloroplasts, Osaka University, Osaka. October 14, 2008.
- ⑳ 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. Oct. 7-10, 2008.
- ㉑ Wada, M. Photoreceptors and their downstream targets for chloroplast movement in *Physcomitrella patens*. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. Tampere, Finland. August 18, 2008.
- ㉒ 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.
- ㉓ Wada, M. How actin works in chloroplast photorelocation movement? Symposium: Photobiology in Asia. Annual meeting of American Society of Photobiology, Burlingame, CA. USA. June 20-25, 2008.
- ㉔ Wada, M. Chloroplasts can move back and forth, why? 25th Annual Missouri Symposium: Plant Photobiology, University of Missouri, Columbia, USA. May 28-31, 2008.
- ㉕ Wada, M. Phototropin function in chloroplast movement through chloroplast actin. Gordon Research Conference at Ventura, California, USA. January 27- Feb. 2, 2008.

[図書] (計 5 件)

- ① Suetsugu, N., M. Wada (2012) Chloroplast photorelocation movement: a sophisticated strategy for chloroplasts to perform efficient photosynthesis. In: *Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects*, p. 215-234, Edited by M. M. Najafpour, Published by InTech, Croatia, pp. 588. ISBN 978-953-307-928-8
- ② Suetsugu N., M. Wada Innovation of novel actin-based mechanism for chloroplasts to move. In; Special Bulletin of ICPSPE-2011, Plant Science in Post Genomic Era. Edited by B. Biswal and J. Panigrahi, Orissa, India, pp. 7-12, 2011.
- ③ Wada, M., S.-G. Kong Analysis of chloroplast movement and relocation in Arabidopsis. *Methods in Molecular Biology, "Chloroplast Research in Arabidopsis"* Volume 1. Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp. 87-102, 2011.
- ④ Suetsugu, N., M. Wada Chloroplast photorelocation movement. In: *Plant Cell Monographs, The Chloroplast - Interaction with Environment*. Edited by A. S. Sandelius and H. Aronsson, Springer, Berlin Heidelberg. Pp. 235-266, 2009.

- ⑤ 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.

[その他]

ホームページ等

<http://wadalab.biology.kvushu-u.ac.jp/>

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

門田 明雄 (KADOTA AKEO)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：60152758

鐘ヶ江 健 (KANEGAE TAKESHI)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：70264588