

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20870030

研究課題名（和文） 葉緑体運動の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Analyses of molecular mechanism of chloroplast movement

研究代表者

末次 憲之（SUETSUGU NORIYUKI）

九州大学・大学院理学研究院・学術研究員

研究者番号：60514156

研究成果の概要（和文）：我々は葉緑体運動に関わる因子を多数同定したが、それらの機能は全く分かっていなかった。本研究では葉緑体運動に必須なタンパク質の細胞内局在、複合体形成、アクチン繊維の調節への関与を調べることにより、機能を類推することを目的とする。本研究では、JAC1, KAC, WEB1, WEB2 の細胞内局在、複合体形成、アクチン繊維の調節への関与を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Although we identified many components involved in chloroplast movement, their functions remained to be determined. The purpose of this work is to analyze sub-cellular localization, complex formation and the involvement in actin filament regulation of the proteins essential for chloroplast movement. This work revealed sub-cellular localization, complex formation and the involvement in actin filament regulation of JAC1, KAC, WEB1, and WEB2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

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：葉緑体運動、フォトトロピン、細胞骨格

## 科学研究費補助金研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体における代謝反応や葉緑体の生合成に関する研究は近年盛んに行われてきたが、それに比して「葉緑体光定位運動」は100年以上も前から知られている現象であるにもかかわらず、ほとんど研究がなされていなかった。光定位運動の意義は証明されているが、葉緑体の特異的な位置をとることが細胞内あるいは細胞外での物質代謝・輸送にどのように影響しているかは全く考慮されてこなかった。申請者の所属する研究室（九州大学 和田研究室）では、葉緑体光定位運動を仲介する光受容体を同定するため、シロイヌナズナを材料として葉緑体光定位運動の変異体を単離・解析してきた。その結果、光屈性の青色光受容体として知られていたフォトトロピンが葉緑体光定位運動の光受容体であることを明らかにした。また、葉緑体の運動・定位に必須であり、葉緑体外膜に局在しアクチン結合能をもつ CHUP1 を同定したが、光受容体より下流の情報伝達系や運動・定位に関わるアクチン繊維を制御するメカニズムに関してはほとんど明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

モデル植物シロイヌナズナにおける葉緑体光定位運動の研究から、光受容体だけでなく葉緑体の細胞内定位に関わるいくつかの因子を同定された。本研究ではこれらの因子の多面的な解析により、葉緑体が周囲の光環境に応じて細胞内を自由に移動し適切な位置をとるメカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

## (1) 葉緑体光定位運動に関わる因子の解析

4 種類の因子 (JAC1, KAC, WEB1, WEB2) はそれぞれ特徴的なドメイン (JAC1; J-ドメイン、KAC; キネシンモータードメイン、WEB1 と WEB2; coiled-coil ドメイン) をもつ蛋白質であり、過去の知見やゲル濾過による解析等から、これらの蛋白質は複合体として機能している可能性が高い。すでに作製した GFP との融合遺伝子を導入した形質転換体およびそれぞれの蛋白質に対する抗体を使用することによって、因子間の結合と複合体のサイズを調べ、その機能を推定する。

光受容体であるフォトトロピンは細胞膜に局在し、CHUP1 は葉緑体外膜に局在する。上記 4 種類の因子の細胞内局在を GFP 融合遺伝子の形質転換体と抗体を用いて調べる事により、それぞれの因子が光受容体側か葉緑体上で機能するかを調べる。

## (2) 葉緑体上のアクチンフィラメントの解析

GFP-Talin の形質転換体の蛍光顕微鏡による解析から、葉緑体の運動と定位には従来考えられてきた細胞質中のアクチンの束ではなく、葉緑体外膜上で絶えず重合・脱重合を繰り返す細かいアクチン繊維 (cp-actin) が必須である事がわかった。そこで、GFP-Talin 遺伝子を様々な変異体 (*jac1*, *kac*, *web1*, *web2* やこれらの多重変異体) に導入したラインを作成し、JAC1, KAC, WEB1, WEB2 等の因子が cp-actin の生成と動態にどのように関わっているかを観察する。

## 4. 研究成果

## ① JAC1 J-ドメインの機能解析

JAC1 J-ドメインの機能解析のため、J-ドメインの機能に必須であることが知られて

いる HPD トリペプチドに変異をいれた GFP-JAC1、あるいは野生型 GFP-JAC1 を *jac1* 変異体で発現させたラインの間で葉緑体運動を比較したところ、野生型 GFP-JAC1 を発現したラインでは葉緑体集合反応が回復したが、HPD に変異をいれたラインでは全く回復していなかった。この結果は JAC1 の J-ドメインは葉緑体運動に重要な機能を果たしていることを示している。(投稿中)

#### ②KAC の機能解析

ウエスタンブロットにより KAC は可溶性画分と膜画分両方に見られ、GFP-KAC1 あるいは KAC-GFP の蛍光は細胞内で細胞膜と細胞質両方で観察された。KAC1 のモータードメインは微小管と結合せず、ATPase 活性も検出されなかった。KAC はマイナス端側に移動するモーター分子を含むキネシン 14 ファミリーに属するが、マイナス端側への方向性に必須なアミノ酸に変異をもつ KAC1 を発現するラインでは、葉緑体運動の方向性に変化はみられなかったが、葉緑体の運動速度が減少した。この速度減少は変異 KAC1 タンパク質の蓄積が野生型 KAC1 に比べて少ないためであった。植物の KAC の中で保存性の高い C-末端ドメインは F-actin に結合した。(発表論文②)

#### ③WEB1, WEB2 の機能解析

特異的抗体を用いたウエスタンブロットにより、WEB1 は可溶性画分に検出された。WEB1 タンパク質の量は様々な葉緑体運動の変異体で野生型と同程度存在するので、それら変異体における葉緑体運動の異常は WEB1 の量の制御における異常に起因しないことが示唆された。ゲル濾過により WEB1 は複合体を形成していることが示唆された。GFP 融合タンパク質の細胞内局在解析によ

り、WEB1 と WEB2 は細胞質に局在していることが明らかとなった。*web1* と *web2* 変異体は葉緑体運動に関する形質が似ており、*web1web2* 二重変異体も *web1* あるいは *web2* と形質がかわらないので、WEB1 と WEB2 は協調的に機能している可能性が高い。実際に、WEB1 と WEB2 は相互作用することが確認された。(投稿準備中)

#### ④cp-actin の観察

GFP-Talin 遺伝子を *jac1*, *kac*, *web1*, *web2* に導入したラインを作成し、葉緑体上のアクチンフィラメント (cp-actin 繊維) を観察した。*jac1* と *kac1* 変異体では弱い青色光照射下で cp-actin 繊維の変化がみられず、集合反応も誘導されなかった。*kac1* 変異体では cp-actin 繊維が野生型よりも少なく、*kac1kac2* 二重変異体では cp-actin 繊維が検出されず、結果として葉緑体光定位運動を欠損しているだけでなく、葉緑体の細胞膜への結合にも異常がみられた。野生型では強い青色光照射後すぐに cp-actin 繊維が消失しその後移動方向の前端側に現れるが、*web1*, *web2* と *web1web2* 変異体ではどれらの反応が弱まっており、葉緑体運動の速度が遅かった。(発表論文①②、投稿準備中)

#### 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 2 件)

- ① Kadota A, Yamada N, Suetsugu N 他 7 名、Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 査読有, 106, 2009, 13106-13111.
- ② Suetsugu N 他 6 名、Two kinesin-like proteins mediate actin-based chloroplast movement in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA, 査読有, 107, 2010, 8860-8865.

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① 末次 憲之 他 3 名、シロイヌナズナのミオシン破壊株における葉緑体光定位運動の解析、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 21 日、熊本
- ② 孔 三根、末次 憲之、和田 正三、Analysis of chloroplast actin filament dynamics in *Arabidopsis thaliana*、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 21 日、熊本
- ③ 末次 憲之 他 6 名、Two KAC proteins mediate actin-based chloroplast movement in *Arabidopsis thaliana*、Memorial Symposium for the 25<sup>th</sup> International Prize for Biology Celebrating Dr. Winslow R Briggs、2009 年 12 月 3 日、京都
- ④ 児玉 豊、末次 憲之 他 2 名、葉緑体運動を制御するコイルドコイルタンパク質ファミリー、日本植物学会第 73 回大会、2009 年 9 月 18 日、山形
- ⑤ 末次 憲之、和田 正三、葉緑体光定位運動におけるフォトトロピンによるアクチン繊維の制御、第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 24 日、名古屋
- ⑥ 児玉 豊、末次 憲之、和田 正三、葉緑体の運動速度を制御するタンパク質複合体、第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 22 日、名古屋
- ⑦ 桂 ひとみ、鍋野 美香、末次 憲之、他 3 名、シロイヌナズナ phot2 LOV2 ドメインの光シグナル伝達に関わる二つのアミノ酸、第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 22 日、名古屋
- ⑧ 市川 智史、末次 憲之、他 2 名、シロイヌナズナ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変化の解析、第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 22 日、名古屋
- ⑨ 末次 憲之、シロイヌナズナにおける葉緑体光定位運動の解析、特定領域研究「LOV 光受容体による植物の運動制御機構」第 2 回若手ワークショップ、2008 年 12 月 18 日、京都
- ⑩ 末次 憲之 他 6 名、シロイヌナズナにおける葉緑体運動制御因子 KAC1 の機能解析、日本植物学会第 72 回大会、2009 年 9 月 25 日、高知

〔図書〕(計 1 件)

Suetsugu N and Wada M. Chloroplast photorelocation movement. In The Chloroplasts. Plant Cell Monographs Series (Sandelius AS, Aronson H. Eds). 2009, 235-266.

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://wadalab.biology.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

末次 憲之 (SUETSUGU NORIYUKI)  
九州大学・大学院理学研究院・学術研究員  
研究者番号：60514156