

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770050

研究課題名（和文） 葉緑体光定位運動に関わる小胞輸送制御因子の解析

研究課題名（英文） Studies on vesicle trafficking factors involving in chloroplast photorelocation movement

研究代表者

孔 三根（KONG SAMGEUN）

九州大学・大学院理学研究院・学術研究員

研究者番号：70514157

研究成果の概要（和文）：

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（集合反応）、強光からは逃避する（逃避反応）、葉緑体光定位運動を示す。本研究では光信号の受容からアクチン依存の葉緑体運動までの葉緑体光定位運動の信号伝達系に関わる因子（phot2, ARF1, JAC1, CHUP1）の細胞内局在、小胞輸送における細胞内での機能、さらにそれぞれの因子間の相互作用を明らかにした。さらに、青色光によって制御される葉緑体外包膜上のアクチン微繊維（chloroplast actin filament）ダイナミクスの制御にCHUP1が関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To optimize their photosynthetic ability, chloroplasts change their positioning in cells in response to fluctuating environmental light. Chloroplasts move toward low intensity light (photoaccumulation response), conversely they avoid from the incident strong light (photoavoidance response). In this study, the signaling factors (phot2, ARF1, JAC1, CHUP1) involving in the signal transduction mechanism from blue light perception to actin-based chloroplast movements were demonstrated on their subcellular localizations, cellular functions in vesicle trafficking, and molecular interactions, respectively. Furthermore, it was also suggested that CHUP1 plays a pivotal role in the regulation of chloroplast actin filament dynamics in response to blue light.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、青色光、信号伝達、フォトトロピン、キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

固着生活をする植物は、周りの光環境変化に応じて効率よく光合成を行う必要があります、

葉緑体は細胞内の最適な光条件下へ移動する。すなわち、光が弱い場合には細胞表面に集まり（集合反応）、光が強すぎると逃避す

る（逃避反応）、いわゆる葉緑体光定位運動を示す。シロイヌナズナには二つのフォトトロピン（phot1 と phot2）が存在し、葉緑体光定位運動のみならず、光屈性、気孔開口、葉の伸展などの生理応答を制御している。

葉緑体逃避運動の光受容体 phot2 は光刺激によって細胞膜からゴルジ体へ移行すること、phot2 の C 末端側である Ser/Thr キナーゼドメインはゴルジ体への移行に必要かつ十分であること、小胞輸送の阻害剤であるブレフェルジン A (BFA) を与えるとこの分布が変化すること (Kong et al., 2006 ; Kong and Nagatani, 2008)、さらにキナーゼドメインだけを発現させた植物では、暗闇でも光条件下と同じ反応を示すこと (Kong et al., 2007) が明らかになっている。また、免疫沈降と LC-MS 分析や酵母 two-hybrid 系により small G protein である ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) が phot2 の信号複合体であることが確認されている (Kong et al., 未発表 ; Sullivan et al., 2009; Suzuki et al., 学会発表)。ゴルジ体に局在し小胞輸送に重要な役割を示す ARF1 が phot2 キナーゼドメインと特異的に相互作用する事実は、小胞輸送系がフォトトロピンのシグナル伝達機構の初期段階に関わっている可能性を示唆している。

葉緑体光定位運動は、①フォトトロピンによる光受容、②信号伝達、③葉緑体運動の3段階に分けて考えることができる。このうち信号伝達に関してはほとんど分かっていないが、近年、当該研究室によって葉緑体光定位運動に関わる変異体が単離・解析され、信号伝達機構の実体がようやく明らかになりつつある。例えば単離された因子のうち、J-domain Protein Required for Chloroplast Accumulation Response 1 (JAC1) (Suetsugu et al., 2006) と Chloroplast Unusual

Positioning 1 (CHUP1) (Oikawa et al., 2003) は分子構造や生理機能から判断して、信号伝達系の下流因子として機能している可能性が高い。

JAC1 は葉緑体集合反応及び暗黒定位に機能する因子であり、その C 末端側は Auxilin の J-ドメインと高い相同性を示す (Suetsugu et al., 2005)。Auxilin は酵母や動物細胞ではゴルジ体に存在し、ARF1 依存の小胞輸送経路で Clathrin-uncoating factor として機能する (Gall et al. 2002)。このことは、葉緑体光定位運動の下流信号系にも小胞輸送系が関わっている可能性を示唆している。

葉緑体外包膜に局在する CHUP1 は、アクチン結合能を示すとともに葉緑体上の細かいアクチン微繊維 (cp-actin) の重合にも機能する可能性が高い (Oikawa et al., 2008 ; Kadota et al., 2009)。CHUP1 は暗所では葉緑体外包膜全体に粒状で局在するが、強い青色光を照射すると粒は消え、葉緑体外包膜全体に分散する。光による CHUP1 局在変化は、明暗処理によって短時間内に消長を繰り返えし、葉緑体運動方向の制御や葉緑体光定位運動に必須である cp-actin の重合・脱重合の動態とよく一致する。おそらく、粒状になった CHUP1 から cp-actin が重合され、できた cp-actin が葉緑体運動の方向を決めるとともに、動力を発していると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では葉緑体光定位運動に関わる小胞輸送制御因子を解析し、光受容から葉緑体運動までの葉緑体光定位運動における一連の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

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因子として、光受容体 (phot2)、光受容体の相互作用因子 (ARF1)、さらに下流因子 (JAC1, CHUP1) について、細胞内分布の詳細及び細胞内機能を下記の手法により解析した。

まず、phot2 全長または phot2 キナーゼドメインにタグを融合した形質転換植物の膜分画から phot2 複合体を分離し、phot2 と ARF1 の相互作用を確認した。また、小胞輸送が葉緑体光定位運動に関与している可能性を調べるため、BFA を処理した葉において葉緑体光定位運動を観察した。

葉緑体光定位運動に関わる下流因子らの青色光依存的 CHUP1 局在の制御を調べるため、CHUP1-YFP ラインを下流因子の変異体に掛け合せし、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。また、phot2 キナーゼ部位を活性型、不活性型とした形質転換体を用いて、葉緑体光定位運動に関わる信号伝達因子のリン酸化を電気泳動移動度の差を調べることから判断した。そして、CHUP1 がフォトリポピンの基質か否か酵母 two hybrid 系を用いて調べた。

#### 4. 研究成果

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因子の細胞内分布の詳細及び機能、そして cp-actin と CHUP1 制御にどのように関わっているかを調べた。

phot2 全長または phot2 キナーゼドメインにタグを融合した形質転換植物の膜分画から phot2 複合体を分離し、phot2 と ARF1 の相互作用を確認した。一方、BFA を処理した葉の細胞では、葉緑体運動は大幅に阻害されるが、完全には阻害されなかった。また、*jac1* 変異体における phot2 と CHUP1 の青色光刺激により細胞内局在変化には野生型と差が得られなかった。このことから集合反応の制御

に関わる JAC1 を介した小胞輸送系は逃避反応の光条件で誘導される phot2 と CHUP1 の細胞内局在の制御に関わっていないことが分かった。

phot2 キナーゼ部位を活性型、不活性型とした形質転換体における葉緑体光定位運動に関わる信号伝達因子のリン酸化を調べた。その中、phot2 キナーゼの活性型特異的に CHUP1 の電気泳動移動度および細胞内局在への影響が得られた。さらに、CHUP1 が phot2 のみならず phot1 との相互作用が酵母 two hybrid 系から得られた。従って、phot1 と phot2 両者による CHUP1 のリン酸化が葉緑体光定位運動における重要なシグナリング伝達機構であることを明らかにした。また、葉緑体が細胞膜に定位するのに重要な機能を示す CHUP1 N 末端の coiled-coil 領域でも青色光依存的な CHUP1 の細胞内局在の初期反応を見られることから、フォトリポピンからのリン酸化がこの領域を介して行う可能性が強く示唆された。

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因子が、CHUP1 の細胞内局在と葉緑体アクチン繊維の制御にどのように関わっているかを解析した。まず、CHUP1-YFP ラインを葉緑体光定位運動の制御因子である *jac1*, *web1*, *pml1*, *pml2*, *kac1kac2* の変異体に掛け合せし、これらの変異体における CHUP1 の青色光依存的な局在を調べた。その中 *web1*, *pml1*, *pml2*, *kac1kac2* の変異体では CHUP1 の青色光依存的な局在が野生型と比べ大きく異なることから、これらの因子は葉緑体光定位運動における信号伝達に関わる因子として、葉緑体アクチン繊維の制御のみならず CHUP1 の制御にも関わっていることが明らかになった。この結果は、CHUP1 が葉緑体上でアクチン繊維のダイナミクス制御に機能している因子である

可能性をさらに強く示唆している。

#### 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 Wada M. and Kong SG. Analysis of chloroplast movement and relocation in Arabidopsis. Methods in Molecular Biology: Chloroplast Research in Arabidopsis: Methods and Protocols. Edited by Jarvis R. Paul, 査読無, Vol 774, in press, 2011.

② Kodama Y., Suetsugu N., Kong SG., Wada M. 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 (45) 19591-19596, 2010.

[学会発表] (計7件)

① 児玉 豊, 末次 憲之, 孔 三根, 和田 正三 WEB1/PMI2 による青色光依存的葉緑体アクチン繊維動態の制御 第52回日本植物生理学会 2011年3月20日 東北大学

② 孔 三根, 和田 正三 Molecular mechanism of chloroplast photorelocation movement 視る生物学5 2010年11月25日 奈良先端科学技術大学院大学

③ 川口 雄輝, 孔 三根, 和田 正三, 寺嶋正秀 光センサー蛋白質 Phot2LOV1 の光反応の解明 第4回分子化学討論会 2010年9月14-17日 大阪大学

④ Kong SG., Arai Y., Yanagida T., Wada M. Phototropin-dependent chloroplast actin filament dynamics in *Arabidopsis thaliana* Gordon Research Conference: Plant & Microbial Cytoskeleton 2010年8月8-13日 Proctor Academy (USA)

⑤ 孔 三根, 末次 憲之, 和田 正三 Analysis of chloroplast actin filament dynamics in *Arabidopsis thaliana* 植物生理学会 2010年3月21日 熊本大学

⑥ Kong SG., Wada M. Functional roles of the N-terminal photosensory domain of phototropin 2 Memorial Symposium for the

25<sup>th</sup> International Prize for Biology “Biology of Sensing” Celebrating Dr. Winslow R. Briggs. 2009年12月2-4日、京都大学

⑦ 児玉 豊, 末次 憲之, 孔 三根, 和田 正三 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 植物学会 2009年9月18日 山形大学

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

孔 三根 (KONG SAMGEUN)

九州大学・大学院理学研究院・学術研究員  
研究者番号: 70514157