

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 15 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25251033

研究課題名(和文) 葉緑体の運動推進力発生機構の解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism of motive force generation in chloroplast movement

研究代表者

和田 正三 (Wada, Masamitsu)

首都大学東京・理工学研究科・客員教授

研究者番号：60011681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,700,000円

研究成果の概要(和文)：光合成に依存して生活する陸上植物では、葉緑体は弱光には集合し、強光からは逃避する。その移動機構の詳細は未解明であるが、葉緑体の移動に伴い葉緑体の先端部には移動に特化した葉緑体アクチン繊維(cp-actin)が現れる。本研究では、cp-actinは葉緑体外膜に局在するタンパク質(CHUP1)によって重合されることを生化学的に証明するとともに、CHUP1 C末端側の結晶構造解析から、アクチン重合に必須なアミノ酸2箇所を特定し、CHUP1の機能を明らかにした。またcp-actinの消長は非常に速いが、1秒間に8コマの高速撮影に成功し、葉緑体の移動に伴うcp-actinの挙動が明らかになりつつある。

研究成果の概要(英文)：In most land plants, chloroplasts move towards weak light-irradiated area but escape from strong light, although the mechanisms are not well understood. Chloroplast actin filaments (i.e., cp-actin filaments) which are specific for chloroplast movement appear at the front side of moving chloroplasts. It was shown biochemically that CHUP1 C-terminus polymerizes actin filaments in vitro. The precise analysis of crystal structure of CHUP1 C-terminus predicted two important amino acids for the actin polymerization. The behavior of cp-actin filaments was analyzed by time lapse movie taken by con-focal microscopy.

研究分野：植物生理学

キーワード：葉緑体 葉緑体運動 フォトリポシン アクチン繊維 青色光

1. 研究開始当初の背景

光強度の変動が頻繁かつ大きな環境では、葉緑体光定位運動は必須の現象で、逃避運動欠損ナズナは死に至る (Kasahara et al 2002 Nature)。我々は、葉緑体運動の光受容体はフォトロピン (phot) であること (Kagawa et al 2001 Science、Sakai et al 2001 PNAS)、葉緑体運動には葉緑体特異的な cp-actin 繊維が必須であること (Kadota et al 2009 PNAS)、さらに cp-actin 繊維の制御因子として CHUP1 (Oikawa et al 2003 Plant Cell)、KAC (Suetsugu et al 2010 PNAS)、WEB1/PMI2 (Kodama et al 2010 PNAS) を発見した。一方、柵状組織細胞内で発現している主なミオシン XI 4 種を同時に欠損した四重変異体では原形質流動は停止し、ミトコンドリアなどのオルガネラ運動は完全に停止するが、葉緑体運動には全く影響がない (Suetsugu et al 2010 Plant Signal. Behav)。ミオシン VIII も関与していない。従って葉緑体は他のオルガネラとは異なる機構で動いていることが分った。以上の様に、我々は長年、本研究分野で世界の最先端の立場を保持してきた。

2. 研究の目的

cp-actin 繊維は常に、移動する葉緑体の先端部に構築される。また葉緑体の移動速度は一般的なアクチン繊維の重合速度とほぼ一致する。これらの事実から、葉緑体は cp-actin 繊維の重合力を利用して移動していると考えられる。しかし単に cp-actin 繊維の重合だけでは推進力は生まれない。重合された cp-actin 繊維が細胞膜など、回りの構造にアンカーされる必要がある。このアンカーには、actin 繊維と結合能のある THRUMIN 1 (Whippo et al 2011) や KAC1 (Suetsugu et al 2010) が関与していると考えられる。この他にも CHIP1 (Kong et al 未発表) など CHUP1 と結合能のある膜タンパク質や共有を示すタンパク質も考慮して、cp-actin 繊維の重合自体が推進力発生源になっていることを立証する。本研究では、cp-actin 繊維の重合過程を *in vitro* 系を使って生化学的に、また全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM)、高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) による構造学の面から詳細に解析し、cp-actin 繊維による葉緑体移動における推進力発生機構を 1 分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

CHUP1 C 末端の cp-actin 重合能および重合条件 CHUP1 C 末端側は非常に保存性の高い配列となっており、アクチン重合を促進するプロフィリンが結合するプロリンリッチな領域が存在することからアクチン重合に働くと考えられる。そこでこの部分におけるアクチン重合を生化学的に検証する。

結晶解析による機能解析 上記の実験と平行して結晶構造解析を行う。フォルミン

FH2 は二量体で G-アクチンと結合する。CHUP1 716-982 ドメインは二量体を形成し、CHUP1 と G-アクチンの結合は既存の事実である (Schmidt von Braun, Schleiff 2008)。そこで、G-アクチンとの結合に最適な CHUP1 C 末端の配列範囲を決定し、複合体の結晶化を進める。結晶構造解析から、アクチン結合に必須なアミノ酸残基を推定し、これらのアミノ酸に変異を持つ変異体を用いて、アクチン重合への影響を調べる。

CHUP1 複合体構成因子の探索 CHUP1 の全機能を知るためには、CHUP1 複合体の解析が必須である。遺伝学的解析から既に明らかになっている cp-actin 制御因子以外にも、CHUP1 複合体制御因子の存在が考えられる。そこで CHUP1-GFP 融合遺伝子の形質転換体を用いて CHUP1 複合体を単離し、LC-MS 解析により構成因子を推定する。

4. 研究成果

本研究では、cp-actin 繊維の重合過程を *in vitro* 系を使って生化学的に、また構造学の面から詳細に解析し、cp-actin 繊維による葉緑体移動における推進力発生機構を解明することを目的とした。

アクチン重合能を持つと予想される CHUP1 C 末端のアクチン重合に関わる機能解析を中心に解析を行った。まず、植物アクチンを用いた生化学的解析から CHUP1-C 末端はプロフィリン存在下でアクチン重合能を示すことを明らかにした。同様な結果はピレンアクチン系を用いたアクチン重合アッセイでも得られた (産総研上田太郎博士との共同研究)。一方電子顕微鏡観察 (産総研広瀬博士との共同研究) により、CHUP1 C 末端は、既存のアクチン繊維の先端または側面に結合すること、さらにアクチン繊維切断の活性も示すことも観察された。また CHUP1 C 末端の構造・機能解析から、CHUP1 C 末端は二量体を構成し、G-アクチンとの結合に重要なアミノ酸残基の変異を導入するとアクチン重合が阻害され、その変異体では葉緑体光定位運動も顕著に阻害されることが分かった。以上の結果は、CHUP1 C 末端の保存領域がアミノ酸配列上の相同性は見られないにもかかわらず、アクチン重合促進活性を持つフォルミンの FH2 ドメインに類似の構造と機能を持つことを意味している。CHUP1 は植物特異的進化の過程でフォルミンとは独立に作られた、葉緑体運動に特異的なアクチン重合に関わる核形成促進因子であることを示唆している。

また、CHUP1 の actin 繊維重合機能が CHUP1 の C 末端側の結晶構造解析 (九州大学生体防御医学研究所神田大輔教授との共同研究) から明らかになった。さらに構造解析からアクチン重合、および二量体化に重要と推測されるアミノ酸も特定され、そのアミノ酸を置換した CHUP1 C 末端では生化学的なアクチン重合も見られず、またこれらのアミノ酸置換変異 CHUP1 遺伝子の遺伝子導入個体では葉緑体

運動が誘導されないことが生理学的実験からも証明された。このことから、葉緑体の運動推進力は CHUP1 による cp-actin 繊維の重合が主要因であることが更に裏付けられた。

一方、重合された cp-actin 繊維が細胞膜に固定されていなければ、アクチン重合も葉緑体を押し出す力にはならない。そのためには、細胞膜に N 末端側で結合し、アクチンの束化因子である THRUMIN1 が重要な役割を担っていると考えられる。THRUMIN が青色光照射により phot2 依存的にリン酸化されることが *in vitro* 系で明らかになり (大阪府大徳富哲特任教授との共同研究)、THRUMIN のリン酸化によって cp-actin 繊維は細胞膜にしっかりと固定され、cp-actin 繊維が重合された分だけで移動するという、推進力発生モデルが補強された。青色光を受容して活性化された phot2 が CHUP1 のアクチン重合を開始させ、同時に THRUMIN をリン酸化することで、膜結合が強固になり、葉緑体は移動すると考えられる。

Cp-actin 繊維の重合により推進力が発生すると考えられたので、cp-actin 繊維の詳細な挙動を解析した (産総研加藤薫博士との共同研究)。強光の部分照射によってシロイヌナズナ葉緑体の逃避運動を誘導し、その時の cp-actin 繊維の詳細な挙動を 1 秒間に 8 コマのスピードで撮影した。その結果、cp-actin 繊維は約 1 μ m の長さを基本として葉緑体の進行方向にほぼ平行に位置し、非常に早い速度で消長を繰り返していることが明らかになった。

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 31 件)

Higa, T., Hasegawa, S., Hayasaki, Y., Kodama, Y and Wada, M. Temperature-dependent signal transmission in chloroplast accumulation response. *J Plant Research*. In press. DOI: 10.1007/s10265-017-0938-0 査読有

Suetsugu, N., T. Higa, M. Wada. Ferns, mosses, and liverworts as model systems for light-mediated chloroplast movements. *Plant Cell Environment*, 2017 in press. doi: 10.1111/pce.12867 査読有

Suetsugu, N., A. Takemiya, S.-G. Kong, A. Komatsu, K. Shimazaki, T. Kohchi and M. Wada. RPT2/NCH1 subfamily of NPH3-like proteins is essential for the chloroplast accumulation response in land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:10424-10429, 2016. doi: 10.1073/pnas.1602151113. 査読有

Suetsugu, N., T. Higa, E. Gotoh, and M. Wada. Light-induced movements of chloroplasts and nuclei are regulated in both cp-actin-filament-dependent and

-independent manners in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*, DOI: 10.1371/journal.pone.0157429 June 16, 2016 査読有

Higa, T., and M. Wada. Chloroplast avoidance movement is not functional under strong sunlight. *Plant Cell Environment*. 39: 871-882, 2016. Doi: 10.1111/pce.12681 査読有

Kijima, S., K. Hirose, S.-G. Kong, M. Wada, T. Q.P. Uyeda. Distinct biochemical properties of *Arabidopsis thaliana* actin isoforms. *Plant Cell Physiology* 57(1): 46-56, 2016. doi: 10.1093/pcp/pcv176. 査読有

Ishishita, K., N. Suetsugu, Y. Hirose, T. Higa, M. Doi, M. Wada, T. Matsushita, and E. Gotoh. Functional characterization of blue-light-induced responses and PHOTOTROPIN 1 gene in *Welwitschia mirabilis*. *J Plant Research* 129:175-187, 2016. DOI 10.1007/s10265-016-0790-7 査読有

Kong, S.-G. and Wada, M. Molecular basis of chloroplast photorelocation movement. *J Plant Research* 129: 159-166, 2016. 10.1007/s10265-016-0788-1 査読有

Suetsugu, N. and M. Wada. Evolution of the cp-actin-based motility system of chloroplasts in green plants. *Frontiers in Plant Science* (ICPP proceedings), 7:561, doi: 10.3389/fpls.2016.00561 査読有

Wada, M. Chloroplast and nuclear photorelocation movement. *Proceedings of Japan Academy, Series B*, 92:387-410, 2016. doi: 10.2183/pjab.92.387. 査読有

Higa, T. and M. Wada. Clues to the signals for chloroplast photo-relocation from the lifetimes of accumulation and avoidance responses. *J. Integrative Plant Biology* 57: 120-126, 2015. DOI: 10.1111/jipb.12310 査読有

⑫ Sutoh, K., K. Washio, R. Imai, M. Wada, T. Nakai, and D. Yamauchi. An N-terminal region of a Myb-like protein is involved in its intracellular localization and activation of a gibberellin-inducible proteinase gene in germinated rice seeds. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 2015, 1-13, 2015. DOI:10.1080/09168451.2014.998620 査読有

⑬ Kasajima, I., N. Suetsugu, M. Wada, and K. Takahara. Collective calculation of actual values of non-photochemical quenching from their apparent values after chloroplast movement and photoinhibition. *Amer. J. Plant Sciences* 6: 1792-1805, 2015. http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.611180 査読有

⑭ Suetsugu, N., T. Higa, S.-G. Kong, and M. Wada. PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1 and PLASTID MOVEMENT IMPAIRED-LIKE 1 mediate photorelocation

- movement of both chloroplasts and nuclei. *Plant Physiol* 169: 1155-1167, 2015. doi:10.1104/pp.15.00214. 査読有
- ⑮ Wada, M., and H. Tsuboi. Gene silencing by DNA interference in fern gametophytes. In Kirankumar S. Mysore and Muthappa Senthil-Kumar (eds.), *Plant Gene Silencing: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1287, 119-128, 2015. DOI 10.1007/978-1-4939-2453-0_8, Springer Science+Business Media New York 2015 査読有
- ⑯ Higa, T., N. Suetsugu, S.-G. Kong, and M. Wada. Actin-dependent plastid movement is required for motive force generation in directional nuclear movement in plants. *Proc. Natl Acad Sci USA* 111: 4327-4331, 2014. Doi:10.1073/pnas.1317902111 査読有
- ⑰ Komatsu, A., M. Terai, K. Ishizaki, N. Suetsugu, H. Tsuboi, R. Nishihama, K.T. Yamato, M. Wada, and T. Kohchi. Phototropin encoded by a single-copy gene mediates chloroplast photorelocation movements in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiol* 166: 411-427, 2014. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.245100> 査読有
- ⑱ Nakasone, Y., Y. Kawaguchi, S.-G. Kong, M. Wada and M. Terazima. Photo-induced oligomerization of *Arabidopsis thaliana* phototropin 2 LOV1. *J Physical Chemistry* 118: 14314-14325, 2014. Doi:10.1021/jp509448b z 査読有
- ⑲ Higa, T., N. Suetsugu, and M. Wada. Plant nuclear photorelocation movement. *J Exp Bot* 65: 2873-2882, 2014. doi: 10.1093/jxb/ert414 査読有
- ⑳ Kong, S.-G., and M. Wada. Recent advances in understanding the molecular mechanism of chloroplast photorelocation movement. *Biochi Biophys Acta* 1837:522-530, 2014. doi:10.1016/j.bbabi.2013.12.004 査読有
- ㉑ Suetsugu, N., S.-G. Kong, M. Kasahara and 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* 100:60-69, 2013. doi:10.3732/ajb.1200308 査読有
- ㉒ Kong, S.-G., T. Kagawa, M. Wada, and A. Nagatani. A carboxy-terminal membrane association domain of phototropin 2 is necessary for chloroplast movements. *Plant Cell Physiol* 54(1): 57-68, 2013. doi: 10.1093/pcp/pcs doi:10.1093/pcp/pcs132, 査読有
- ㉓ Kozuka, T., N. Suetsugu, M. Wada and A. Nagatani. Antagonistic regulation of leaf flattening by phytochrome B and phototropin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 54(1): 69-79, 2013. doi:10.1093/pcp/pcs134
- ㉔ Kong, S.-G., N. Suetsugu, S. Kikuchi, M. Nakai, A. Nagatani, and M. Wada. Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity. *Plant Cell Physiol* 54:80-92, 2013. doi:10.1093/pcp/pcs151 査読有
- ㉕ Kong, S.-G., Y. Arai, N. Suetsugu, T. Yanagida, and M. Wada. Rapid severing and motility of cp-actin filaments are required for the chloroplast avoidance response. *The Plant Cell* 25:572-590, 2013. doi:10.1105/tpc.113.109694 査読有
- ㉖ Tsuboi, H. and M. Wada. Chloroplasts continuously monitor photoreceptor signals during accumulation movement. *J Plant Research* 126:557-566, 2013. DOI: 10.1007/s10265-012-0542-2 査読有
- ㉗ Cazzaniga, S., L. Dall'Osto, S.-G. Kong, M. Wada, and R. Bassi. Interaction between avoidance of photon absorption, excess energy dissipation and zeaxanthin synthesis against photooxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant J* 76: 568-579, 2013. doi: 10.1111/tj.12314. 査読有
- ㉘ Suetsugu, N., and M. Wada. Evolution of three LOV blue light receptor families in green plants and photosynthetic stramenopiles: Phototropin, ZTL/FKF1/LKP2 and aureochrome. *Plant Cell Physiol* 54(1): 8-23, 2013. doi:10.1093/pcp/pcs165 査読有
- ㉙ Wada, M. Recent advances in the understanding of fern responses to light. *Fern Gazette* 19(4): 97-115, 2013. Edited by Bridget Laue & Adrian Dyer. 査読有
- ㉚ Wada, M. Chloroplast movement. *Plant Science* 210: 177-182, 2013. doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.05.016 査読有
- ㉛ Wada, M. and Suetsugu, N. Chloroplast motility. In: Assmann S., Liu B. (Ed.) *The Plant Sciences - Cell Biology*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. DOI:10.1007/SpringerReference_368 553 2013-10-01 07:42:21 UTC 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

和田正三. 葉緑体光定位運動における葉緑体の移動機構. 2017 年度大阪大学蛋白質研究所セミナー「真核細胞のオルガネラ研究最前線」2017 年 3 月 21-22 日.大阪(蛋白質研究所)
井上夏実, Liang Bao, 石川雅樹, 比嘉毅, 日渡祐二, 関根政実, 長谷部光泰, 和田正三, 藤田知道. ヒメツリガネゴケにおける CDKA の光応答反応. 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 16-18 日. 鹿児島(鹿児島大学)

比嘉毅、後藤真朋、後藤栄治、和田正三、葉緑体光定位運動を阻害する化合物のスクリーニング. 第58回日本植物生理学会年会, 2017年3月16-18日. 鹿児島(鹿児島大学)

Takeshi Higa, Satoshi Hasegawa, Yoshio Hayasaki, Yutaka Kodama and Masamitsu Wada. The effect of temperature on the signal transmission speed of chloroplast accumulation response. 葉緑体光定位運動における信号伝達機構の解析. 第80回日本植物学会年会. 2016年9月16-19日. 那覇(沖縄コンベンションセンター)

Wada, M. CHLOROPLAST PHOTO-RELOCATION MOVEMENT. The sophisticated and crucial phenomena for plant life. The 13th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, September 10 - 14, 2016. Kyoto.

孔三根, 和田正三. 葉緑体は光に応じてどのように細胞内を移動するのか? 第18回植物オルガネラワークショップ植物オルガネラの環境適応戦略. 2016年3月17日. 盛岡(岩手大学総合教育研究棟)

Wada, M. How to Raise the Motive Force for Chloroplast Relocation Movement. Gordon Research Conference. Photosensory Receptors & Signal Transduction. January, 24 - 29, 2016. Galveston, TX, USA.

Wada, M. CHUP1 is a key factor for polymerization of chloroplast actin filament mediating chloroplast photorelocation movement. 7th Asia and Oceania Conference on Photobiology, November 16-18, 2015. Academia Sinica, Taipei, Taiwan

孔三根、岡島公司、中神弘史、徳富哲、和田正三 葉緑体光定位運動におけるフォトリピンによる THRUMIN1 のリン酸化制御. 日本植物学会 2015年9月6-8日. 朱鷺メッセ 新潟

Wada, M. Photomorphogenesis in *Adiantum capillus-veneris* gametophytes. Smithsonian Symposium, June 1-5, 2015. Washington D.C., USA.

Wada, M Recent advancement on the mechanisms of light-induced chloroplast movement International Symposium on Plant Photobiology, May 23-28, 2015. University of Texas at Austin, TX, USA.

- ⑫ 末次憲之、小松愛乃、寺井三佳、和田正三、河内孝之。苔類ゼニゴケにおけるキネシン様タンパク質 KAC の機能解析. 日本植物生理学会 2015年3月16-18日 東京(東京農業大学)

(1)研究代表者

和田 正三 (WADA, Masamitsu)
首都大学東京・大学院理工学研究科・客員教授
研究者番号: 60011681

(2)研究分担者

孔 三根 (KONG, Sam Geun)
九州大学・生体防御研究所・助教
研究者番号: 70514157

後藤 栄治 (GOTOH, Eiji)
九州大学大学院・農学研究院・助教
研究者番号: 90614256

(3)研究協力者(7人)

神田 大輔 (KOHDA, Daisuke)
九州大学生体防御医学研究所・教授
CHUP1, KAC1 結晶構造解析

嶋田 睦 (SHIMADA, Atsushi)
九州大学生体防御医学研究所・准教授
CHUP1 結晶構造解析

上田 太郎 (Uyeda, Taro)
早稲田大学先進理工学部・教授
CHUP1 C末端領域のアクチン重合機能解析

広瀬 恵子 (HIROSE, Keiko)
産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員
アクチン繊維の電子顕微鏡観察

加藤 薫 (KATOH, Kaoru)
産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員
cp-actin 繊維の超高解像度解析

徳富 哲 (TOKUTOMI, Satoru)
大阪府立大学理学系研究科・特任教授
Thrumin1 のリン酸化実験

岡島 公司 (OKAJIMA, Koji)
慶應義塾大学・理工学研究科・特任助教
Thrumin1 のリン酸化実験