

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

◆ 記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		WADA MASAMITSU					
①研究代表者氏名		和田 正三		②所属研究機関・部局・職		基礎生物学研究所・光情報研究部門・特任教授	
③研究課題名	和文	葉緑体光定位運動における信号伝達と運動機構の解析					
	英文	Studies on the signal transduction and the mechanism of chloroplast photorelocation movement					
④研究経費		平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	平成20年度	総合計
18年度以降は内約額 金額単位：千円		16,200	16,000	16,000	16,000	16,000	80,200
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
和田 正三	基礎生物学研究所・光情報研究部門・特任教授	光生物学		研究の統括と細胞生物学的、生理学的研究			
鐘ヶ江 健	首都大学東京・理学研究科・助手	分子生物学		分子生物学的研究とその解析			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>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。我々は葉緑体運動を仲介する青色光受容体がフォトトロピンであること、シダにおける赤色光受容体はフィトクロム3であることを明らかにした。しかし受容された光情報がどのような信号となり、細胞内をどのように伝わり、個々の現象が誘導されているのか、という細胞下レベルの知見は全く分かっていない。そこで我々は、葉緑体運動におけるこれらの光受容体の信号伝達系を明らかにしたい。さらに葉緑体はどのように移動を始めるのか、その運動の方向はどのように、何によって決められているのか、さらにどのような運動機構で移動するのかを明らかにしたい。本研究課題では、分子生物学的研究に適したシロイヌナズナと細胞生物学的研究に適したシダの配偶世代を併用し、フォトトロピンおよびフィトクロム3からの信号伝達とその後の葉緑体の運動機構を解明することを目的とする。</p>							

⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

(1) **chup1 タンパク質の細胞内局在** chup1 タンパク質はそのN末端側に疎水性のアミノ酸が多い部分があり、葉緑体膜に存在することが GFP の蛍光から示唆されていたが、確証がないため、葉緑体を単離し、その外包膜の生化学的な解析を行った。シロイヌナズナの野生型および *chup1* 突然変異体から葉緑体を単離し、外包膜から得られたタンパク質を *chup1* の抗体により検出した結果、野生型に見られる *chup1* のバンドは *chup1* 突然変異体から得られたサンプルには見られなかった。また野生型の葉緑体を性質の異なる数種のタンパク質分解酵素で処理した後、抗体による *chup1* の存在を調べた結果、*chup1* タンパク質は外包膜上に存在していることが明らかになった。現在論文投稿の準備中である。

(2) **移動に働くアクチン繊維の消長** 葉緑体の移動にはアクチン繊維が関与することが示唆されて来たが、確たる証拠はなかった。また既存のアクチン繊維を使用しているのか、あるいは葉緑体の移動にともない重合されるのかどうかも、分かっていなかった。そこで、まず葉緑体が、細胞内のあらゆる方向に移動できること、同じ場所で往復運動が出来ることを明らかにした。この結果は、「既存のアクチン繊維」説で説明するのは難しい。光照射後にアクチンが重合されるならば、光照射部位での重合か、葉緑体上での重合かのどちらかである。そこで GFP_{actin} を導入したシロイヌナズナの形質転換体でアクチン繊維の分布を詳細に調べた結果、短く細いアクチン繊維が葉緑体の移動方向の先端部で、短時間内に出現しては消える「消長」を繰り返していることを発見した。このアクチン繊維は葉緑体運動が起こらない *chup1* 突然変異体の葉緑体上には存在しないことも明らかにした。これらの実験結果から、*chup1* タンパク質がアクチン繊維の重合脱重合を介して、葉緑体の移動に関与していることが強く示唆された。現在論文投稿に向けて最後の詳細なデータの解析中である。

(3) **jac1 タンパク質の解析** 葉緑体の集合反応の欠損した変異体をシロイヌナズナから単離し、その原因遺伝子を確定し、その性質を解析した。この遺伝子には C 末端側に J ドメインがあるがその機能は不明である。その他には機能が推定できるようなドメイン構造は見つからない。また葉緑体運動に関与する既存のタンパク質とは、少なくとも酵母の two hybrid system では反応が見られない。*jac1* 変異体は集合反応は起こさないが、逃避反応は野生型同様正常に起こる。従って集合反応特異的な信号伝達に関係した因子である。Jac1-GFP を細胞内で発現させると細胞内全体に均一な GFP の蛍光が見られるので、恐らく細胞膜に沿って存在しているものと推察される。2005 年に Plant Physiology に発表した。

(4) **ヒザオリの neochrome の発見** 進化したシダ類にのみ存在するフィトクロムとフォトトロピンのキメラ遺伝子 phy3 と酷似した構造をもつ光受容体を緑藻のヒザオリに発見し、neochrome と命名した。neochrome はシダの phy3 欠損変異体の phy3 機能を回復することがわかり、同じ構造を持つキメラ遺伝子が植物の進化の過程で二度作られたことが分かった。2005 年に Pro Natl Acad Sci USA に発表した。

(5) **kac1 タンパク質の解析** 葉緑体の集合反応が欠損した変異体をもう一つシロイヌナズナから単離し原因遺伝子を確定した。この変異体も逃避反応は正常であるので、集合反応特異的な因子であるが、そのドメイン構造からして移動に重要な機能を持つ可能性がある。現在のところまだその具体的な機能は不明であるが、論文投稿の準備を進めている。

(6) **葉緑体が移動方向を認識する機構の解析** 葉緑体が逃避する場合、安全な場所へより速く移動できるように最短のルートを選択する。集合反応の場合も同様である。従って葉緑体は最も効果的なルートを感じ、移動していることになる。その機構を解析する第一歩として光受容体から発せられる信号の伝達速度を測った。その結果、シダ原糸体では約 0.8~1.2μm/min であった。このことから、信号が葉緑体の先端部に到達した後、後端に達するまでに数分の時間差があることが分かった。信号の来る方向を信号物質の濃度差として葉緑体が察知するためには、葉緑体の前後で非常にわずかな濃度差を判別しなければならず、小さな葉緑体にとっては非常に難しいと思われるが、信号の移動が遅いために葉緑体は信号の濃度差を時間差として感知することで、実際の信号物質の濃度差を非常に大きな差として感知していることと思われる。

(7) **葉緑体運動欠損突然変異体の選抜** 上記に述べた以外に二つの突然変異体を選抜し、一つは遺伝子が確定されたが、新規な遺伝子であり、その機能は不明である。もう一方は現在遺伝子確定のための最後の詰めを行っている。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

(1) 葉緑体運動を仲介する新規アクチン微細繊維の発見 今年度までに行った研究結果のなかで、特記すべきものは「葉緑体上でのアクチン繊維の消長」の発見である。葉緑体の移動は、従来、「葉緑体は、細胞膜上の既存のアクチン繊維上を、葉緑体に結合したミオシンを使用して滑って行く」と考えられてきた。しかしシロイヌナズナに GFP-talin を発現させ、葉緑体移動中のアクチン繊維を詳細に観察した結果、従来のモデルとは全く逆の、「アクチンは葉緑体が移動する方向前方の葉緑体上に限って重合される」という新事実を発見した。

この結果は細胞中のオルガネラの移動に関する全く新しいモデルを提唱することになる。またこの消長に関与していると考えられる *chup1* 遺伝子を同定した。

これらの知見は、「葉緑体の移動」という限られた現象に関するだけのものかもしれないが、植物のオルガネラとしては代表的な、また光合成を効率的に行うためにも、植物にとって極めて重要な葉緑体の移動様式であり、今後の植物科学に大きな足跡となると考えている。

(2) フィトクロムとフォトトロピンのキメラ遺伝子 *neochrome* を緑藻ヒザオリ中に発見 シダ植物の進化の途上で非常に重要な役割を果たしたと考えられるキメラ遺伝子 *phy3* を、我々は1998年に発見し、その機能とシダ植物における重要性を2002年に *nature* に発表した。最近この *phy3* と同じ構造を持つキメラ光受容体遺伝子を緑藻のヒザオリ中に発見した。生物の進化の過程で種々の遺伝子の組み換えが起こり、新しい機能を持つ遺伝子が作られて、生物は進化することができたと考えられるが、別起源で同一な機能をもつ新規の遺伝子が異なる生物集団で発見されたことは非常に珍しい(我々が検索した結果では、このような例は見つからなかった)。ヒザオリとシダに独立に作られた *neochrome* の発見は、生物界において、ある同一構造をもった新規遺伝子が作出される頻度は比較的高いこと、またその遺伝子が生物にとって非常に有効に働く場合には、容易に種内に受け継がれることを意味しており、当該研究課題からは、多少離れた成果ではあるが、生物の進化研究における知見としては非常に重要な発見である。

(3) 葉緑体運動関連遺伝子の確定 葉緑体光定位運動に関連した突然変異株は我々が研究を開始するまでは全く取られていなかったが、我々は今までに6種の異なる突然変異体を選抜した。アメリカの研究者が我々が選抜できなかった突然変異株の一つを選抜したが、我々の研究成果は全世界的観点から見ても他の研究グループを大きく引き離しており、これらの遺伝子の役割と作用機作はすでにかなり解析されて来た。我々は現在世界のこの分野を牽引しているが、この傾向は今後さらに拡大されると考えられる。光受容から葉緑体の運動機構までの一連の信号伝達系が我々によって全面的に解明される日も遠くないと思っており、植物生理学分野に大きな足跡を残すことになる。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

原著論文

Kagawa, T., M. Kasahara, T. Abe, S. Yoshida and M. Wada

Function analysis of Acphot2 using mutants deficient in blue light-induced chloroplast avoidance movement of the fern *Adiantum capillus-veneris* L. *Plant Cell Physiol.* 45: 416-426, 2004.

Kagawa, T. and M. Wada

Chloroplast avoidance movement rate is fluence dependent *Photochemical & Photobiological Sciences* 3:592-595, 2004.

○ Kasahara, M., T. Kagawa, Y. Sato, T. Kiyosue and M. Wada

Phototropins mediate blue and red light-induced chloroplast movements in *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* 135:1388-1397, 2004.

Kawai-Toyooka, H., C. Kuramoto, K. Orui, K. Motoyama, K. Kikuchi, T. Kanegae and M. Wada

DNA interference: a simple and efficient gene-silencing system for high-throughput functional analysis in the fern *Adiantum*. *Plant Cell Physiol.* 45: 1648-1657, 2004.

Yamauchi, D., K. Sutoh, H. Kanegae, T. Horiguchi, K. Matsuoka, H. Fukuda, and M. Wada

Analysis of expressed sequence tags in prothallia of *Adiantum capillus-veneris*. *J. Plant Research* 118: 223-227, 2005.

○ Suetsugu, N., T. Kagawa, and M. Wada

An auxilin-like J-domain protein, JAC1, regulates phototropin-mediated chloroplast movement in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 139:151-162, 2005.

○ Suetsugu, N., Mittmann, F., Wagner G., Hughes, J., and M. Wada

A chimeric photoreceptor gene, NEOCHROME, has arisen twice during plant Evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:13705-13709, 2005.

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

国際誌、本等における総説

Wada, M., and N. Suetsugu

Plant organelle positioning. *Current Opinion of Plant Biology* 7:626-631, 2004.

Kasahara, M. and M. Wada

Chloroplast avoidance movement. *In: Plastids, Annual Plant Reviews, Volume 13* Edited by Simon Geir Moller, Blackwell, pp. 267-282, 2004.

Suetsugu, N., and M. Wada

Photoreceptor Gene Families in Lower Plants. *In, Handbook of Photosensory Receptors.* Edited by W.R. Briggs and J.L. Spudich Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Pp.349-369, 2005.

Wada, M.

Chloroplast movement. *In: Light Sensing in Plants*, edited by M. Wada, K. Shimazaki, and M. Iino. Springer-Verlag, Tokyo. pp. 193-199, 2005.

Kanegae, T. and M. Wada

Photomorphogenesis of Ferns. *In: Photomorphogenesis in Plants 3rd Edition* Edited by E. Schafer and F. Nagy, Springer pp. 515-536, 2006.

- ⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

国際会議等招待講演

- Wada, M. “Signal transduction of chloroplast photorelocation movement”,
The 58th Yamada Conference, Okazaki, June 9, 2004.
- Wada, M. “The mechanism of chloroplast photorelocation movement”
14th International Congress of Photobiology, Jeju, Korea, June 14, 2004.
- Wada, M. “Chloroplast movement to avoid photodamage of photosynthetic apparatus: A cellular mechanism for photoprotection”
14th International Congress of Photobiology, Jeju, Korea, June 14, 2004.
- Wada, M. “Cytoskeletal basis of chloroplast photo-orientation movement”
Gordon Research Conference, Andover, USA, August 15-20, 2004.
- Wada, M. “Chloroplast photorelocation movement --Photoreceptors and mechanisms--”
NCCR Plant Survival, Environmental Control NCCR Plant Survival. Environmental Control of Chloroplast Biogenesis and Function of Chloroplast Biogenesis and Function, Neuchatel, Switzerland. October 7-9, 2004.
- Wada, M. “Light-Induced Chloroplast Relocation Movement”.
Keystone Symposia. Plant Cell Signaling: In vivo and omics Approaches, (Organized by S, Assmann & A Jones,) Santa Fe, New Mexico, USA. February 4, 2005.
- Wada, M. “DNA interference in fern gametophytes”.
Japan-US workshop, RNA therapy, Bethesda, Maryland, USA, February 24, 2005.
- Wada, M. “Chloroplast photorelocation movement”,
Seminar at University of Maryland, Maryland, USA. February 25, 2005.
- 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.
- Wada, M. “What is the Mechanism of Chloroplast Movement?”
EMBL at Heidelberg, Germany, July 4, 2005.

国内の学会における最近の発表

- 和田正三 葉緑体光定位運動の光受容体と運動機構の解析 日本植物生理学会賞受賞講演
第47回日本植物生理学会年会（筑波大学）2006年3月19日～21日
- 末次憲之、和田正三 シロイヌナズナにおいてフォトトロピン依存の葉緑体光定位運動を制御する Auxilin様J-ドメインタンパク質JAC1の解析 第47回日本植物生理学会年会（筑波大学）
2006年3月19日～21日
- 門田明雄、山田岳、佐藤良勝、及川和聡、中井正人、小倉康裕、笠原賢洋、加川貴俊、末次憲之、和田正三 シロイヌナズナ葉緑体光定位運動におけるアクチンフィラメントの役割 第47回日本植物生理学会年会（筑波大学）2006年3月19日～21日
- 及川和聡、小倉康裕、中井正人、高橋文雄、笠原賢洋、加川貴俊、和田正三 CHUP1は葉緑体上で機能する 第47回日本植物生理学会年会（筑波大学）2006年3月19日～21日
- 鐘ヶ江健、倉本千裕、林田恵美、和田正三 シダフィトクロム3の機能解析 第47回日本植物生理学会年会（筑波大学）2006年3月19日～21日
- 山下弘子、鐘ヶ江健、末次憲之、和田正三、門田明雄 シダ・コケ細胞におけるtdTomato-talinを用いたアクチンフィラメントの可視化 第47回日本植物生理学会年会（筑波大学）2006年3月19日～21日
- 坪井秀憲、末次憲之、和田正三 ホウライシダ仮根細胞における負の光屈性 第47回日本植物生理学会年会（筑波大学）2006年3月19日～21日