

葉緑体光定位運動における信号伝達と運動機構の解析

Studies on the signal transduction and the mechanism of chloroplast photorelocation movement

和田 正三 (WADA MASAMITSU)
九州大学・大学院理学研究院・特任教授



研究の概要

植物の効率的な光合成や強光下での生存に重要な葉緑体光定位運動のメカニズムを解析した。葉緑体運動に必須のアクチン微繊維構造を新発見し、その重合や調節に関与すると考えられる CHUP1、KAC1、KAC2、JAC1 などの因子の機能解析を行った。また光受容体が発する信号の細胞内伝達速度の解析から、葉緑体の移動方向認識機構を推察した。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：オルガネラ 環境応答 植物分子

1. 研究開始当初の背景

葉緑体運動は 19 世紀から既存の生理現象であるが、生理学的な意味や機構は不明であった。我々は葉緑体運動が欠損した変異体を多数選抜し、その解析から葉緑体逃避運動は植物の生死に関わる必須の現象であること、光受容体はフォトトロピンであること、CHUP1 タンパク質が葉緑体運動には必須であることなどを明らかにしていた。

2. 研究の目的

葉緑体運動の重要性と光受容体や関連因子の一部は明らかになったが、その機構は分かっていない。そこで、光受容体から発せられる信号は何か、細胞内を如何に伝達されるか、アクチン繊維が関与するか、その機構は何か、我々が明らかにした CHUP1、KAC、WEB などの因子はどう働くかなど、葉緑体運動の信号伝達すべてを分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

材料には遺伝学的方法に最適なシロイヌナズナの変異体と形質転換体を、生理学的・光生物学的方法に最適なシダ配偶体を使用した。アクチン微繊維及び CHUP1 の細胞内分布は GFP-talin と CHUP1-GFP で行い、その蛍光観察用に平成 16 年度には蛍光顕微鏡を、17 年度には観察結果の記録用に顕微鏡用デジタルカメラを購入した。17 年度にはさらに、CHUP1 の葉緑体外包膜上の存在を生化学的に明らかにするために微量高速遠心機、多用途小型遠心機を、18 年度には葉緑体単離のために高速冷却遠心機を購入した。

4. 研究の主な成果

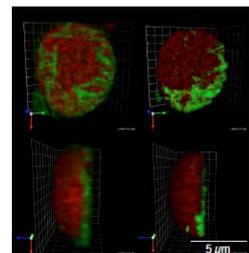
(1) 移動に伴う葉緑体の挙動の解析

暗順応させ、細胞表面に葉緑体が数個しか存在しない状態にしたシダ前葉体細胞の葉緑体近傍に、微光束を照射して葉緑体の集合運動を誘導した。葉緑体が動き出した後、別の場所に次の微光束を照射して移動方向を変更させても、葉緑体は光照射開始時の向きと細胞との接着面を保ったまま、あらゆる方向に動き得ることが分かった。この事実は既存のアクチン繊維を使って葉緑体が動くという従来の説では説明できない。

(2) 移動に働くアクチン微繊維の消長

そこでシロイヌナズナのアクチンを GFP-talin で可視化して詳細に観察した結果、葉緑体と細胞膜との間の葉緑体周縁部に短いアクチン繊維の構造が発見され、葉緑体アクチン繊維 (cp アクチン繊維) と命名した。強光照射で葉緑体の逃避運動を誘導すると、この構造は一旦消失し、数分以内に葉緑体の移動方向側にもみ再出現する。この消失はフォトトロピン 2 (phot2) で制御されていた。cp アクチン

図。緑の蛍光(GFP-talin)によって静止状態(左)と移動中(右)の葉緑体の cp アクチン繊維を示す。下は横から見た図で、cp アクチン繊維が細胞膜側に存在することが分かる。赤は葉緑素の蛍光。



[4. 研究の主な成果 (続き)]

繊維の消失と再重合は葉緑体が細胞膜と接する葉緑体最外部で起こり、cp アクチン繊維の重合位置を示唆している。

(3) CHUP1 タンパク質の細胞内局在

cp アクチン繊維の存在には CHUP1 蛋白質が必須であり、その構造から CHUP1 が cp アクチン繊維を重合していることが示唆された。抗体を使用した生化学的解析と CHUP1-GFP の細胞内分布の解析から CHUP1 は葉緑体外包膜に N 末端の疎水性領域で結合していること、N 末端のアミノ酸配列は CHUP1 自身の機能には無関係であること、coiled-coil の部分で細胞膜に結合していることなどが明らかになった。

(4) 信号伝達速度と移動方向認識機構の解析

葉緑体が強光から逃避する場合も弱光へ集合する場合も、葉緑体は最短(最適)ルートで移動する。すなわち葉緑体は移動方向を情報の濃度差あるいは伝達速度で感知している。その機構を知るために光受容体から発せられる情報の伝達速度をシダの配偶体細胞で測定した。先端成長をする原糸体では先端方向への移動は約 2.3 $\mu\text{m}/\text{min}$ 、基部方向へは約 0.7 $\mu\text{m}/\text{min}$ 、前葉体細胞では約 1.0 $\mu\text{m}/\text{min}$ であった。この速度は細胞内のイオンの拡散速度に比べると非常に遅い。この信号伝達速度で信号が約 5 μm の葉緑体を横切るには数分間掛かること、cp アクチン繊維の再出現は数分内に開始されることから、葉緑体は信号の伝達速度の遅いものを利用して移動方向を認識していることが示唆された。

(5) その他の因子の機能解析

phot2、CHUP1 以外の、我々が選抜した葉緑体運動に関わる変異体の原因遺伝子を確定し、機能解析を行った。JAC1 が異常な *jac1* 変異体は集合反応と暗黒定位反応を完全に欠損しているが、逃避反応は起こる。ただし移動速度が遅い。野生型では強光によってアクチン微繊維が一過的に脱重合するが、*jac1* 変異体ではこの現象が起こらない。KAC については、シロイヌナズナには KAC1、KAC2 のホモログがあり、この二重変異体では葉緑体運動は完全に欠損し、葉緑体は細胞膜から脱離する。二重変異体ではその葉緑体上のアクチン微繊維が重合されない。以上の結果から、JAC1、KAC1、KAC2 はアクチンの重合あるいは葉緑体の移動と細胞膜への結合に重要な機能を持つタンパク質であることが示唆された。

(6) ヒザオリの neochrome の発見

隠花植物では、葉緑体運動は青色光のみならず赤色光でも誘導される。進化程度の高いシダ植物ではフィトクロムとフォトトロピンの融合した neochrome が赤色光依存の葉緑体運動を制御している。我々は今回シダの neochrome と起源は異なるが構造

を同じくし、シダで機能するキメラ光受容体 neochrome1, 2 を緑藻類のヒザオリに発見した。同じ構造と機能を持つキメラ光受容体の創成現象が植物の進化過程で二度独立に起こったことを示した。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

我々が発見した cp-アクチン繊維の構造とその役割は全く新しい概念であったため、国際会議での発表には大きな反響があった。また葉緑体は移動に際してどの方向にも滑って動くという事実も、単純であるが新たな発見であり、このインパクトも非常に大きかった。我々の研究成果は日本国内、世界においても最先端を先導している。

6. 主な発表論文

- ① Suetsugu, N., M. Wada, Chloroplast photorelocation movement. *In: Plant Cell Monographs, The Chloroplast – Interaction with Environment.* Ed. A.S. Sandelius and H. Aronsson, Springer,-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp. 235-266, 2009.
- ② Tsuboi, H., H. Yamashita, M. Wada, Chloroplasts do not have a polarity for light-induced accumulation movement. *J. Plant Research* 122: 131-140, 2009.
- ③ 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.* 148: 829-842, 2008.
- ④ Kanegae, T., E. Hayashida, C. Kuramoto, M. Wada, A single chromoprotein with triple chromophores acts as both a phytochrome and a phototropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:17997-18001, 2006.
- ⑤ Suetsugu, N., T. Kagawa, M. Wada, An auxilin-like J-domain protein, JAC1, regulates phototropin-mediated chloroplast movement in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 139: 151-162, 2005.
- ⑥ Suetsugu, N., F. Mittmann, G. Wagner, J. Hughes, M. Wada, A chimeric photoreceptor gene, NEOCHROME, has arisen twice during plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 13705-13709, 2005.
- ⑦ Kagawa, T., M. Wada, Chloroplast avoidance movement rate is fluence dependent. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3: 592- 595, 2004.