

葉緑体光定位運動における新規アクチン構造の機能解析 Functional Analysis of Newly-found Actin Structure Involved in 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

葉緑体光定位運動は光合成を効率良く且つ安全に行なうための、植物の生存にとって重要な生理作用である。我々は葉緑体運動に特異的な新規の葉緑体アクチン繊維(cp-actin 繊維)を発見したが、その構造や機能には不明の点が多い。本研究では、葉緑体運動に伴う cp-actin 繊維の挙動と cp-actin 繊維の消長に働く各種タンパク質因子の機能を明らかにする。

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, 光定位運動, アクチン繊維, 青色光, シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

葉緑体は光合成の効率化と光阻害回避のため、光強度に応じて集合反応と逃避反応を示す。我々はその青色光受容体がフォトトロピンであること、葉緑体と細胞膜の間には葉緑体運動に特異的に働くアクチン微繊維(cp-actin 繊維)が局在し、葉緑体移動時には、葉緑体の移動方向前方にだけ出現することなどを発見すると共に、cp-actin 繊維の重合(または維持)にはCHUP1タンパク質が必須であることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

cp-actin 繊維は最近我々が発見した構造で、詳細は分っていない。そこでcp-actin 繊維が異なる光環境(すなわち集合反応時と逃避反応時)でどのような挙動を示すかを詳細に観察する。またcp-actin 繊維の重合(または維持)に関与するCHUP1の機能、さらには光依存的挙動を明らかにする。cp-actin 繊維が葉緑体を牽引する力を如何にして発揮するかを検討する。

3. 研究の方法

GFP-talinで可視化したcp-actin 繊維の、葉緑体運動に伴う挙動の詳細な観察、さらにcp-actin 繊維の制御因子の探索とその機能の解明、cp-actin 繊維の重合(維持)に関与するCHUP1タンパク質の機能解析などを分子生物的手法、細胞生物学的手法で解析する。

4. これまでの成果

葉緑体光定位運動は概ね下記の機構で起こることが分った。葉緑体は光条件に応答した集合反応、逃避反応、暗黒定位において、葉緑体自身の方向転換や回転を伴わず、移動すべき方向どちらへも即座に移動可能である(Tsuboi et al 2009, Tsuboi, Wada 2011, Tsuboi, Wada 未発表)。その移動方向は光受容体から約1 μ m/minの速度で伝達される信号が、葉緑体の前と後に到達する時間差として認識されている(Tsuboi, Wada 2010)。葉緑体のこの俊敏な動きには、葉緑体と細胞膜間の葉緑体進行方向前半部に出現するcp-actin 繊維が働いており(Kadota et al 2009)、このcp-actin 繊維の重合・維持にはCHUP1(Oikawa et al 2008), KAC1, KAC2(Suetsugu et al 2010)が、さらに葉緑体運動の速度調節にはWEB1, PMI2(Kodama et al 2010), JAC1(Suetsugu, Wada 2009)が関与していることを明らかにした。また、柵状組織で主に発現しているミオシン XIの四重変異体では、ミトコンドリアなどのオルガネラ運動は完全に阻害されるが、葉緑体運動は正常なことから、ミオシンは関与せず、葉緑体運動にはcp-actin 繊維が直接的に関与していると考えられる(Suetsugu et al 2010)。葉緑体逃避反応におけるcp-actin 繊維の消長は非常にダイナミックであり、phot2に制御されている(Kong et al 未発表)。またCHUP1の挙動は、cp-actin 繊維の挙動とほぼ一致しており、phot1, phot2で制御されている。

さらに、CHUP1 と phot2 は酵母 Two-Hybrid 系で結合すること等から葉緑体運動の信号伝達系は、phot1, phot2 → CHUP1/KAC 1, KAC 2 → cp-actin 繊維である事が示めされた (Kong et al 未発表)。

次に個々の結果を記す。

cp-actin繊維の挙動解析 弱光下で葉緑体周縁部にわずかに存在するcp-actin繊維は、青色光照射によって葉緑体周辺部から中心部に向かって重合する。それに強光青色光を照射すると、cp-actin繊維は1分以内に完全に消失するが暗黒下に移すと再度求心的重合が起こる。この強光照射による消失では、cp-actin繊維はまず約0.5μm程度に切断され、その後消失する。

CHUP1の細胞内分布変化の解析 弱光下ではCHUP1は葉緑体が細胞膜と接する外包膜周縁部に点在するが、強光青色光照射によって、phot2依存的に点状から葉緑体外包膜全体に均等に分散する。その後葉緑体同士が接する領域に一つの粒状(CHUP body)となって集合する。このCHUP bodyは暗黒下で脱リン酸化反応によって解消され、葉緑体と細胞膜の間に太い線状の構造となって出現する。

CHUP1の構造と機能の解析 CHUP1の各ドメインをchup1変異体に発現させ、機能解析をした。N末端側1-322アミノ酸部域は、細胞膜との接着、葉緑体外包膜上でのフォトリポシン依存の初期の挙動は正常に起こる。一方C末端側部域は光条件に関わらずCHUP bodyとなる。

cp-actin繊維とCHUP1の細胞内分布変化の同時観察 CHUP1-tdTomatoと GFP-mTalinをchup1変異体で同時発現させ、葉緑体逃避反応を誘導すると、CHUP1は移動する葉緑体周縁部の先端部に点在し、それに接するようにcp-actin繊維が観察される。このことは、CHUP1によるcp-actin繊維の重合が葉緑体運動の推進力と考える我々のモデルに一致する。

KAC1機能と細胞内分布変化の解析 KAC1はキネシン様アミノ酸配列をしているが、モーター活性は無く、アクチン繊維と結合し、微小管には結合しない。kac1kac2二重変異体ではchup1変異体同様に、cp-actin繊維は全く観察されない。またKAC1はCHUP1に類似した、光依存的な細胞内分布を示す。

WEB1/PMI2複合体の機能解析 葉緑体運動速度の遅い2つの変異体から同定した因子WEB1とPMI2が、酵母Two-Hybrid法及びBiFC法により互いに細胞質内で結合することを示した。web1, pmi2両変異体は、特に逃避反応に異常を示し、JAC1と共に葉緑体の移動速度の調節因子であることが分かった。

5. 今後の計画

CHUP1複合体、KAC複合体の単離と機能解析
cp-actin繊維の重合(または維持)に関与しているCHUP1とKAC1,2をそれぞれ複合体として単離し、cp-actin繊維重合能を生化学的、構造学的に調べる。

CHUP1とcp-actin繊維の相関関係の解析

CHUP1-tdTomatoとGFP-mTalinを同時発現させ、CHUP1とcp-actin繊維の葉緑体運動に伴う相互関係を調べる。さらにg-actin-GFPをCHUP1-YFPラインで発現させ、cp-actin繊維上のg-actin-GFPの移動、CHUP1との関係から、運動の推進力を出す機構を考察する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

- ① Tsuboi H, Wada M. Chloroplasts can move in any direction to avoid strong light. J. Plant Research 124: 201-210, 2011.
- ② Yamashita H, Sato Y, Kanegae T, Kagawa T, Wada M, Kadota A. Chloroplast actin filaments organize meshwork on the photorelocated chloroplasts in the moss Physcomitrella patens. Planta 233:357-368, 2011.
- ③ 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 107: 19591-19596, 2010.
- ④ Suetsugu N, Yamada N, Kagawa T, Yonekura H, Uyeda TQP, Kadota A, Wada M. Two kinesin-like proteins mediate actin-based chloroplast movement in Arabidopsis thaliana. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 8860-8865, 2010.
- ⑤ Takano A, Suetsugu N, Wada M, Kohda D. Crystallographic and functional analyses of J-domain of JAC1 essential for chloroplast photo relocation movement in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol. 51:1372-1376, 2010.
- ⑥ Tsuboi H, Wada M. Speed of signal transfer in the chloroplast accumulation response. J. Plant Research 123: 381-390, 2010.
- ⑦ Kadota A, Yamada N, Suetsugu N, Hirose M, Saito C, Shoji K, Ichikawa S, Kagawa T, Nakano A, Wada M. Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:13106-13111, 2009.
- ⑧ 2009年3月 ドイツ・フンボルト財団「Humboldt Research Award」受賞
- ⑨ 2009年4月 みどりの学術賞 受賞

ホームページ等

<http://wadalab.biology.kyushu-u.ac.jp/>