

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07405

研究課題名(和文)植物の老化を制御する新奇光シグナル分子機構の解析

研究課題名(英文)New insight into the regulation of leaf senescence by light signalings

研究代表者

小塚 俊明(Toshiaki, Kozuka)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・助教

研究者番号：20402779

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文):老化は、植物の適応度増大につながる重要な生理現象である。特に葉は光合成器官であることから、光環境応答によって積極的な老化制御を行う。これまでに、光受容体フィトクロムによる葉老化の抑制的制御が報告されているが、青色光受容機構や光受容体シグナル伝達機構について不明な点が多い。そこで本研究では、光受容体フィトクロムのシグナル伝達機構と青色光受容体とに着目して、葉老化を制御する青色光応答機構を解析した。その結果、フィトクロム下流で機能する転写因子が葉老化に関わること、クリプトクロムシグナル伝達により葉老化が制御されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により得られる知見は、農業生産性に大きく関与することから、得られた知見を応用することにより、植物の生産力を最大限に活用して農業生産性の向上が期待される。さらに、これらの知見を応用することにより、作物輸送時においてポストハーベスト劣化を防ぐための技術革新やコスト削減につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文): During senescence, leaves turn yellow through the degradations of chlorophyll and photosynthetic proteins to effectively salvage the nutrient sources from the dispensable organs. Although the photoreceptors, including phytochrome and cryptochrome, are considered to be probably responsible for the regulation of leaf senescence, little is known about the physiological functions and molecular signaling mechanisms. In this study, we examined the role of the photoreceptors, phytochrome and cryptochrome, in the regulation of leaf senescence. Consequently, we confirmed that the red and blue lights were strongly effective to suppress leaf senescence in a phytochrome- and cryptochrome-dependent manner, respectively. Furthermore, the CAGE-seq analysis of the wild type of photoreceptor mutants treated with light conditions revealed a novel candidate relationship between light signals and phytohormones to control the leaf senescence in response to light stimulus.

研究分野：植物生理学

キーワード：フィトクロム クリプトクロム 葉老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は隣接した他の植物が作った日陰に入ると、避陰応答による葉老化を誘導することが知られている。葉老化により、植物は光合成効率の低い葉での不必要な葉緑体タンパクやクロロフィルを代謝分解して、それらを養分として新しい器官へ再分配する。このように葉老化は、植物の生存競争力を高めるための重要な生理応答である。

これまでに、植物の日向・日陰環境を識別するために光受容体フィトクロムが葉老化の制御に大きく働くことが知られている。また、葉老化の誘導により葉緑体を中心とした一次代謝が大きく変動すると推測されている。しかし、フィトクロムシグナル伝達の詳細な仕組みや代謝変動の制御など、また青色光受容体による葉老化制御への関与について不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、光受容体シグナルによる新たな葉老化制御機構の解明を目的として、フィトクロム下流のシグナル伝達制御機構と、青色光受容体による葉老化制御について解析した。そのため、フィトクロム下流で機能する転写因子として知られる PIF ファミリーと ATHB2 の葉老化制御における機能について詳細な解析を行った。また、シロイヌナズナの青色光受容体の機能欠損変異体を用いて、青色光応答による葉老化制御に関わる光受容体を解析した。

一方、これまでに光受容体フィトクロムによる代謝制御については研究がほとんど進展していないため、まずはフィトクロム依存的に変動する代謝産物を網羅的に明らかにすることが重要であると考えられた。

3. 研究の方法

(1) 本葉の主要なフィトクロムである phytochromeB (phyB) は、赤色光を吸収すると活性化し、近赤外光を吸収すると不活性化する。さらに、この光可逆的反応は何度でも繰り返し起こすことができる。そこでまず、赤色光と近赤外光とを交互に繰り返し照射することで葉老化の阻害と促進とを可逆的にコントロールできるかどうか検討する。さらに、フィトクロムシグナル伝達による葉老化制御機構を解析するため、シグナル伝達因子として働く PIF や ATHB2 の葉老化制御における機能解析を上記検討した条件下で行う。

(2) フィトクロムの下流で変動する代謝制御を網羅的に調べるため、理研との共同研究によりワイドターゲットメタボローム解析を行う。近年のフィトクロム研究では、シロイヌナズナ芽生えを用いたトランスクリプトーム解析による豊富な遺伝子発現情報データがウェブ上で公開されている。そこで、本研究ではこれらを活用するため、芽生えの遺伝子発現データベースとシロイヌナズナ芽生えを用いたメタボローム解析データとを照合して速やかに研究を進展させる。

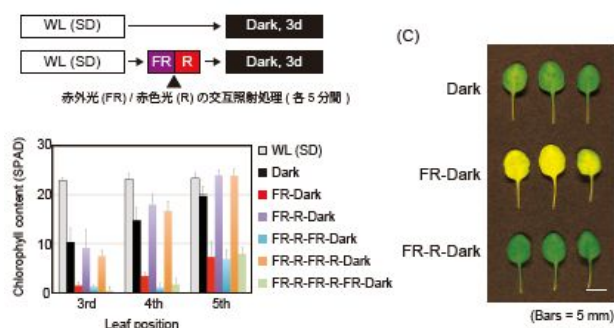
(3) 青色光照射による葉老化制御を解析するため、以下の光条件の検討を行う。過去の葉老化研究の多くは、白色光で生育した植物の葉をそのまま暗黒処理しているが、白色光照射により活性化されたフィトクロムは暗黒下におかれても活性化状態を長時間維持している。つまり、純粋な青色光照射の影響を調べるためには、暗黒処理の直前にフィトクロムを不活性化させる必要がある。そこで、葉に近赤外光照射を短時間処理することでフィトクロムを素早く不活性化させて、その後に様々な光処理実験を行う。また、青色光応答によるゲノムワイドな遺伝子発現の変動を明らかにするため、CAGE シーケンス解析により青色光シグナル下流で葉老化制御に関与する遺伝子の選抜を行う。

4. 研究成果

(1) フィトクロムシグナルによる葉老化制御機構の解析

暗黒条件において誘導される葉老化は、光受容体シグナルによって厳密に制御されている。本研究では、葉老化制御に関わる新たなフィトクロムシグナル伝達因子を解析した。まず始めに、フィトクロムによって効率良く葉老化をコントロールできる条件を検討した結果、暗黒処理を行う直前に、各5分間の赤色光 (R) と近赤外光 (FR) を交互に照射すると、葉老化の抑制と阻害とを効率的に誘導できることがわかった(下図)。詳しく説明すると、三日間の暗黒処理 (Dark) では葉のクロロフィル量はそれほど減少しないが、暗黒処理の直前に FR 照射 (FR-Dark) すると大きくクロロフィル量が減少して葉は黄変した。つまり、FR 照射処理によって葉の老化が促進されたと考えられる。さらに、FR 照射してからすぐに R 照射 (FR-R-Dark) すると FR 照射の効果が打ち消された。この FR 照射と R 照射を交互に繰り返すと、可逆的なクロロフィルの増減が認められた。このように、フィトクロムによる典型的な光可逆反応が認められたことから、次に同じ実験条件においてフィトクロムシグナル伝達因子の各変異体を用いた葉老化解析を進めた。

フィトクロムは bHLH 型転写因子 PIF と直接相互作用してシグナルを発信する。7 遺伝子の PIF ファミリーメンバーが、シロイヌナズナのゲノム中に存在するが、PIF4/5 が葉老化の促進に関わることが報告されている。そこで、他の PIF



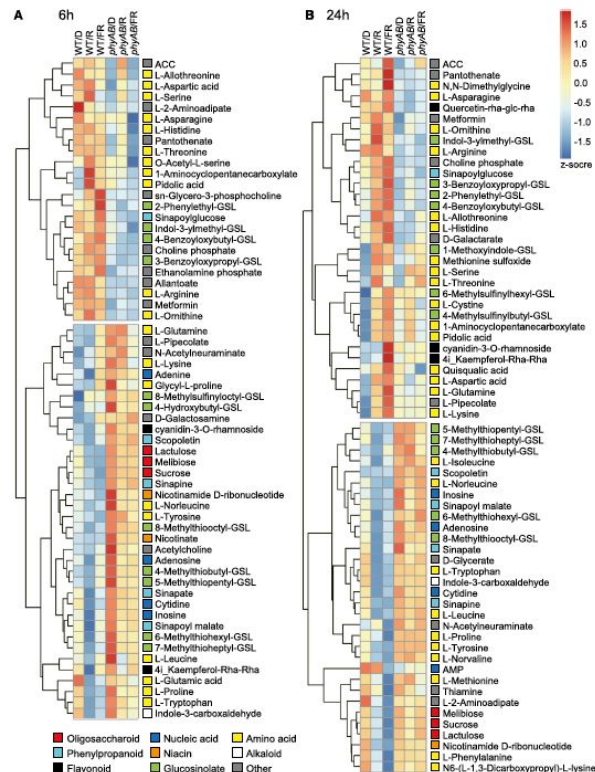
について機能欠損型変異体により解析したところ、*pif7* 変異体は上記（上図）の FR-Dark 条件において顕著に葉老化が阻害されることがわかった。一方、Dark 条件（上図）ではほとんど野生型と変わらなかった。このことから、PIF7 はフィトクロムが不活性化されると葉老化を促進すると示唆された。さらに、アルコール誘導性プロモーターを用いた *PIF7* 遺伝子発現の誘導系を作出して、アルコール処理により *PIF7* 発現量を増加させることで葉老化が促進されることを確認した。従って、PIF7 のターゲット遺伝子によって葉老化が促進されている可能性が推測された。

そこで、PIF のターゲット遺伝子の一つである HD-ZIP 型転写因子 *ATHB2* を過剰発現させると葉老化が促進されたが、過剰発現体では葉形態が細くなるなど葉老化以外にも影響がでた。そこで、過剰発現による二次的な影響をできるだけ排除するため、*ATHB2* 遺伝子についてもアルコール誘導性発現系を作出したが、アルコール誘導しても顕著な葉老化表現型を示さなかった。これらのことから、*ATHB2* 遺伝子は直接的に葉老化を誘導していないと考えられた。現在は、PIF7 のターゲット遺伝子として葉老化の促進的制御に関わる NAC ファミリー遺伝子やエチレン関連遺伝子に着目して解析を進めている。

(2) フィトクロムによる代謝制御機構の解析

フィトクロム下流で変化する代謝産物を網羅的に明らかにするため、理研・基生研・岩手大学・京都大学らと共同でワイドターゲットメタボローム解析を行った。その結果、フィトクロムが活性化することにより、中心代謝も二次代謝も共に大きく変動することが分かった (Kozuka et al., 2020; 右図)。さらに、糖に着目したところ、フィトクロム依存的に細胞内のショ糖やグルコース、フルクトースのレベルが大きく減少することがわかった。

発芽後のシロイヌナズナ芽生えでは、種子貯蔵脂脂肪酸が酸化により分解されることで糖新生経路が働きだし、最終的にショ糖が合成される。フィトクロムは、この貯蔵脂脂肪酸の分解を大きく促進し、さらに生合成された細胞内の糖を使って葉緑体チラコイド膜の素早い発達を促すことがわかった。これらの解析から、フィトクロムは葉緑体の発達に関わる中心代謝制御に大きく関与することが示唆された。



(3) 青色光応答による葉老化制御機構の解析

葉老化はフィトクロムによって抑制されており、青色光照射による葉老化の影響を調べるためには、(1) で示したような FR 照射処理によりフィトクロムの不活性化が必要である。そこで、青色光照射の直前に短時間の FR 照射 (FR-Blue) 処理を行った。すると、FR-Blue 処理によりシロイヌナズナ野生型で葉老化が抑制された。さらに、青色光受容体の機能欠損変異体を用いて解析したところ、クリプトクロム 1 と 2 との二重変異体 (*cry1cry2*) では、青色光感受性が大きく低下した。さらに、*cry1cry2* 背景で *CRY2* を過剰させることにより青色光による葉老化の抑制効果が回復すること、さらに暗所でも活性を示す *CRY2*-GFP の過剰発現により、FR-Dark 処理による葉老化が阻害された。これらの結果から、葉老化は *CRY2* によって制御されていると示唆された。

さらに、*CRY2* のシグナル伝達因子として *CRY2* と直接相互作用する bHLH 型転写因子 *CIB* のファミリー多重変異体と、機能抑制型 *CIB4*-SRDX 過剰発現体では、FR-Dark 処理による葉老化が抑制されることがわかった。従って、*CIB* は葉老化の促進因子であり、*CRY2* は *CIB* の機能を抑制することで葉老化を制御していると考えられた。また、CAGE シーケンスによるトランスクリプトーム解析を行い、青色光応答によってクリプトクロム依存的に発現変動する遺伝子群の中から、*CIB* の下流で機能する葉老化制御遺伝子を選別し、葉老化における機能解析を進めている。これらの解析により、今後新たな青色光シグナルによる葉老化制御機構が解明されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kozuka Toshiaki, Sawada Yuji, Imai Hiroyuki, Kanai Masatake, Hirai Masami, Yokota, Mano Shoji, Uemura Matsuo, Nishimura Mikio, Kusaba Makoto, Nagatani Akira	4. 巻 182
2. 論文標題 Regulation of Sugar and Storage Oil Metabolism by Phytochrome during De-etiolation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1114 ~ 1129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.19.00535	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Hiroaki, Ito Takeshi, Inoue Ryouhei, Masuda Yu, Nagashima Yumi, Kozuka Toshiaki, Kusaba Makoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetic Interaction Among Phytochrome, Ethylene and Abscisic Acid Signaling During Dark-Induced Senescence in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00564	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小塚俊明, 花田俊樹, 草場信, 嶋村正樹
2. 発表標題 青色光応答によるフタバネゼニゴケ無性芽の不等成長制御
3. 学会等名 中国四国植物学会第75回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小塚俊明, 下野起将, 岡義人, 草場信
2. 発表標題 青色光応答による葉老化制御機構の解析
3. 学会等名 第20回日本光生物学協会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小塚俊明、下野起将、渡部綾子、井上良平、草場信
2. 発表標題 Analysis of the regulation of leaf senescence by plant photoreceptors
3. 学会等名 Taiwa-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小塚俊明、下野起将、渡部綾子、井上良平、草場信
2. 発表標題 Regulation of leaf senescence by plant photoreceptors
3. 学会等名 International Symposium on Plant Photobiology, 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiaki Kozuka, Yukimasa Shimono, Ayako Watanabe, Ryohei Inoue, Makoto Kusaba
2. 発表標題 Regulation of leaf senescence by phytochrome and blue-light photoreceptors
3. 学会等名 第58回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考