

平成 23 年 5 月 26 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17084002

研究課題名（和文） フォトトロピンによる運動制御の分子機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the molecular mechanism for movement regulation by phototropin

研究代表者

長谷 あきら（NAGATANI AKIRA）

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40183082

研究成果の概要（和文）：フォトトロピンは、分子量10万前後の色素タンパク質で、光屈性、葉緑体定位、気孔開口など、多様な青色光応答を制御している。本研究では、フォトトロピンによる運動制御の分子機構を明らかにする目的で、フォトトロピン分子の構造／機能解析を進め、機能に関わる重要な部位とその役割を明らかにした。また、フォトトロピンの下流で働くシグナル因子候補について解析を進め、小胞輸送がフォトトロピン応答に関わることを示した。

研究成果の概要（英文）：Phototropin is a chromoprotein of about 100 kDa mediating various blue-light responses such as phototropism, chloroplast positioning and stomata opening. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanism by which phototropin regulates the plant movement. For this purpose, we conducted a structure/function study of phototropin to identify important substructures of the molecule and their functions. In addition, we investigated putative signaling components of the phototropin signal transduction and have found that vesicle trafficking plays a crucial role in these responses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	18,400,000	0	18,400,000
2006年度	18,400,000	0	18,400,000
2007年度	18,400,000	0	18,400,000
2008年度	24,250,000	0	24,250,000
2009年度	18,400,000	0	18,400,000
総計	97,850,000	0	97,850,000

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：遺伝子、細胞・組織、シグナル伝達、植物、蛋白質

1. 研究開始当初の背景

フォトトロピンは、屈性、葉緑体定位、気孔開口など、多様な生理反応を制御する植物に特有の青色光受容体である。一見するとこれらの生理反応に共通性は無いように見えるが、これらはすべて比較的短時間で起こる

反応であり、どれも植物の「運動」に関係している。

フォトトロピンは、分子量10万前後の色素タンパク質で、発色団としてフラビンモノヌクレオチド(FMN)を非共有的に結合する。フォトトロピン分子は大きく N-末端側の光

受容ドメインと C-末端側のキナーゼ・ドメインに分かれ、光受容体ドメインのフラビンが光を吸収することにより、C-末端側にあるキナーゼが活性化される。さらに、発色団結合部位である LOV ドメインについては、その詳しい立体構造が明らかにされている。

研究開始当時のシグナル伝達機構に関する具体的知見としては、フォトトロピンが細胞膜に存在すること（米国 Briggs 博士ら）が示され、フォトトロピンと相互作用する新規の因子として NPH3（米国 Liscum 博士ら）、RPT2（日本、岡田・酒井博士ら）が同定されたこと、などが挙げられるが、シグナル伝達の機構については全く不明であった。

フォトトロピンの生理機能と分子構造に関する研究は、その発見以来、急速に進展したが、上にも述べたように、細胞内シグナル伝達機構に関する知見は限られていた。例えば、フォトトロピンがキナーゼであることから、何らかの基質をリン酸化することでシグナルを伝達していると想定されるが、基質を含めてその詳細は全く不明であった。また、フォトトロピンがどのようにして、性質の異なる多様な生理反応を制御するかについても謎であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、フォトトロピンによる運動制御の分子機構を解明することである。フィトクロムやクリプトクロムなどのフォトトロピン以外の植物の光受容体は、核内で遺伝子発現を制御しているが、フォトトロピンは、主に細胞膜に存在することや、その生理作用の特質から考えて、遺伝子発現を直接制御している可能性は極めて低い。すなわちフォトトロピンは、フィトクロムに代表される従来の植物の光受容体とは全く異なる機構でシグナル伝達を行っていると思定される。

我々は、フォトトロピンが小胞輸送に関わる ARF1 タンパク質と結合することを最近、見いだした（当時、未発表）。ARF タンパク質は小胞体（ER）からの小胞輸送に関与しており、細胞膜機能の維持と調節に深く関わる。そこで本研究では、「フォトトロピンは小胞輸送を介して膜機能を制御する」という作業仮説の証明を目指す。

植物の小胞輸送研究は動物や酵母に関する研究に比べて遅れているが、細胞膜に存在するオーキシンの輸送体の分布に小胞輸送が関わることなどが報告され注目を集めている。フォトトロピンの生理作用は多岐に渡り、そこに共通のシグナル伝達機構を想定することは一見困難であるが、小胞輸送が細胞膜タンパク質の分布を調節しているとすれば、フォトトロピンの生理作用を小胞輸送から説明することは十分可能である。

また、上記のアプローチに加えて、フォト

トロピンの細胞内分布、フォトトロピン分子の構造と機能の関係などについて解析を進める。また、分子生物学的手法により、キナーゼであるフォトトロピンが基質とする分子の更なる探索を進める。さらに、シグナル伝達に関する理解の幅を広げるため、フォトトロピン欠損型変異体の新しい形態的表現型を探る。

3. 研究の方法

まず、ARF1 とフォトトロピンの関係については、以下のように研究を進めた。第一に、フォトトロピンが ARF1 を光依存的にリン酸化するかどうか、大腸菌で発現させた組換えタンパク質を用いて試験管内で調べた（大阪府大・徳富哲博士らと共同）。また、GFP などの蛍光性タンパク質をタグとして付加させた ARF1 を発現する形質転換植物を作出し、ARF1 の細胞内分布が光条件やフォトトロピンの有無でどのように変化するか調べた。さらに、ARF1 の活性がフォトトロピンによる生理応答にどのように影響するかを調べるため、野生型に加えて、ドミナントネガティブ、およびドミナントポジティブ型の ARF1 を発現する形質転換植物を作出し、その光応答などを詳しく調べた。

フォトトロピンの細胞内分布については、phot2-GFP 融合タンパク質遺伝子を構築し、植物に導入して細胞内分布の変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。構造／機能相関については、phot2 のキナーゼ領域だけにした断片、phot1 と phot2 の間で N-末端側と C-末端側の領域を入れ替えたキメラタンパク質などを形質転換により植物で発現させ、その生理活性を調べた。フォトトロピンの基質については、リン酸化プロテオーム解析など、いくつかの方法を試みた。

以上に加えて、酵母菌ではフォトトロピンと類似性を示すキナーゼが、膜リン脂質輸送体であるフリッパーゼをリン酸化し活性化することに注目し、同様の活性がフォトトロピンにもあるかどうかを、酵母菌と植物体の両方で調べた（北大・田中博士のグループ、京大・梅田博士のグループと共同）。また、フォトトロピン欠損の新しい表現型を明らかにする目的で、青色光による柵状組織の発達を観察した。

4. 研究成果

「研究の方法」で述べたそれぞれの実験について、以下、簡潔に成果を説明する。

ARF1 については、1) 試験管内でフォトトロピンが光依存的に ARF1 をリン酸化すること（大阪府大・徳富哲博士らと共同）、2) 青色光照射により、ARF1 の細胞内分布がフォトトロピン依存的かつ一過的に変化すること、3) ARF1 の機能を阻害すると、フォト

ロピンによる生理応答に影響がみられること、などを明らかにした。これは、フォトトロピンの下流で ARF1 が働き、その結果、小胞輸送が制御されるという我々の仮説を支持する重要な結果である（投稿準備中）。

フォトトロピンの細胞内分布については、光照射により、フォトトロピンの一部がゴルジ体に移行することを見出した（京大・西村博士らと共同）(Kong et al., 2006)。ARF1 の結果と合わせて、この結果はフォトトロピンが小胞輸送に関わることを強く示唆している。

さらに、フォトトロピンにおける構造／機能相関を進め、キナーゼ領域単独でフォトトロピンのシグナルが流れること (Kong et al., 2007)、フォトトロピンの光感受性は N-末端側の構造によって決まること (Aihara et al., 2008) などを示した。さらに、酵母菌を用いたアッセイ系を開発し、フォトトロピン分子の活性を変化させる変異を探索した（投稿準備中）。

フォトトロピンがフリッパーゼの機能を制御している可能性については、植物において、フリッパーゼ活性の測定を試みたが、期待される結果は得られなかった。一方、植物は多数のフリッパーゼ遺伝子をもつが、そのうちの一つを欠損するシロイヌナズナの変異体で、フォトトロピンと関係する表現型を示すことを確認したが、フリッパーゼがフォトトロピンのすぐ下流で働くことを証明することはできなかった。

フォトトロピン変異体が生ずる新しい表現型については、フォトトロピンが青色光にตอบสนองして柵状組織の発達を促すことを見出した。さらに、この応答の細胞・組織自律性について調べ、この応答には組織間シグナル伝達は関与しないことを示した（投稿中）。

以上まとめると、本研究により、フォトトロピン分子の構造と機能に関する基礎的知見が多数得られた。さらに重要なことに、フォトトロピンのシグナル伝達の謎を解く鍵になるような成果、すなわち小胞輸送の関与を示す様々な結果が得られた。特に後者は、フォトトロピン研究を次のステージに進めるような大きな成果である。

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 17 件）

1. Nagatani, A., Phytochrome: structural basis for its functions, *Curr. Opin. Plant Biol.* 査読有、Vol.13, 2010, 565-570
2. Toledo-Ortiz, G., Y. Kiryu, J. Kobayashi, Y. Kim, H.G. Nam, N. Mochizuki and A. Nagatani, Subcellular sites of the signal

transduction and degradation of phytochrome A, *Plant Cell Physiol.*, 査読有、Vol.51, 2010, 1648-1660

3. Jang, I.C., R. Henriques, H.S. Seo, A. Nagatani and N.H. Chua, Arabidopsis PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR proteins promote phytochrome B polyubiquitination by COP1 E3 ligase in the nucleus., *Plant Cell*, 査読有、Vol.22, 2010, 2370-2383
4. Kozuka, T., J. Kobayashi, G. Horiguchi, T. Demura, H. Sakakibara, H. Tsukaya and A. Nagatani, Involvement of auxin and brassinosteroid in the regulation of petiole elongation under the shade., *Plant Physiol.*, 査読有、Vol.153, 2010, 1608-1618
5. Kikis, E.A., Y. Oka, M.E. Hudson, A. Nagatani and P.H. Quail, Residues clustered in the light-sensing knot of phytochrome B are necessary for conformer-specific binding to signaling partner PIF3., *PLoS Genet.*, 査読有、2009, Vol.5, e1000352
6. Y. Aihara 他 4 名, Molecular basis of the functional specificities of phototropin 1 and 2, *Plant J.*, 査読有、Vol.56, 2008, 364-375
7. Y. Oka 他 4 名, Mutant screen distinguishes between residues necessary for light-signal perception and signal transfer by phytochrome B., *PLoS Genet.*, 査読有、Vol.4, 2008, e1000158
8. Kong, S.-G. and A. Nagatani, Addenda: Where and how does phototropin transduce light signals in the cell?, *Plant Signaling & Behavior*, 査読無、Vol.3, No.4, 2008, 275-277,
9. Endo, M. and A. Nagatani, Addenda: Flowering regulation by tissue specific functions of photoreceptors., *Plant Signaling & Behavior*, 査読無、Vol.3, 2008, 47-48
10. Kong, S.-G., T. Kinoshita, K.-I. Shimazaki, N. Mochizuki, T. Suzuki and A. Nagatani, The C-terminal kinase fragment of Arabidopsis phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses., *Plant J.*, 査読有、Vol.51, 2007, 862-873
11. Endo, M., N. Mochizuki, T. Suzuki and A. Nagatani, CRYPTOCHROME2 in Vascular Bundles Regulates Flowering in Arabidopsis, *Plant Cell*, 査読有、Vol.19, 2007, 84-93
12. Usami, T., T. Matsushita, Y. Oka, N.

- Mochizuki and A. Nagatani, Roles for the N- and C-terminal domains of phytochrome B in the physiological interactions between phytochrome B and cryptochromes., *Plant Cell Physiol*, 査読有、Vol.48、2007、423-433、
13. Iwama, A., T. Yamashino, Y. Tanaka, H. Sakakibara, T. Kakimoto, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, A. Nagatani, and T. Mizuno、AHK5 Histidine Kinase Regulates Root Elongation Through an ETR1-Dependent Abscisic Acid and Ethylene Signaling Pathway in *Arabidopsis thaliana*.、*Plant Cell Physiol*, 査読有、Vol.48、2007、375-380
 14. Kong, S.-G., T. Kinoshita, K.-I. Shimazaki, N. Mochizuki, T. Suzuki and A. Nagatani, The C-terminal kinase fragment of *Arabidopsis* phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses, *Plant Journal*.、査読有、Vol.51、No.5、2007、862-873
 15. Kong SG、Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus., *Plant J*.、査読有、Vol.45、No.6、2006、994-1005
 16. Endo M.、Phytochrome B in the mesophyll delays flowering by suppressing FLOWERING LOCUS T expression in *Arabidopsis* vascular bundles., *Plant Cell*, 査読有、Vol.17、No.7、2005、1941-1952
 17. Nakamura M、Activation of the cytochrome P450 gene, CYP72C1, reduces the levels of active brassinosteroids in vivo., *J Exp Bot*.、査読有、Vol.56、No.413、2005、833-840

[学会発表] (計 36 件)

1. A. Nagatani、Structural basis of phytochrome A specific functions、Symposium "Plant Signalling Mechanisms" on the occasion of the retirement of Eberhard Schafer、2010年6月25日、Freiburg, Germany
2. A. Nagatani、an organizer of the Plenary Session 2: Cell Biology、21st International conference on *Arabidopsis* Research、2010年6月6日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
3. 鈴木友美ほか、青色光受容体 phot による低分子量 G タンパク質 ARF1 の制御、第 51 回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学 (熊本県)
4. 望月伸悦ほか、プラスチドシグナル伝達におけるテトラピロール合成の関わり、第 51 回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学 (熊本県)
5. 遠藤求ほか、phyB シグナル伝達経路に関わる新奇因子 PHL、第 51 回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学 (熊本県)
6. 岡本圭史ほか、ミオシンは光と重力に対する環境応答のプレーキとして働く、第 51 回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学 (熊本県)
7. 相原悠介 ほか、青色光受容体フォトトロピンの "Flippase-kinase" としての役割の解明、第 51 回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学 (熊本県)
8. 山本和彦ほか、AGCVIII キナーゼ過剰発現植物体のフォトトロピン表現型の解析、第 51 回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学 (熊本県)
9. 小塚俊明ほか、本葉扁平性を制御するフィトクロム生理機能の発見、第 51 回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学 (熊本県)
10. 小林淳子ほか、シロイヌナズナの避陰応答における器官間光シグナル伝達の解析、第 51 回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学 (熊本県)
11. Y. Ono, Y. Oka et al.、Structural basis for phyA-specific functions、Memorial Symposium for the 25th International Prize for Biology "Biology of Sensing"、2009年12月2日、京都大学 芝蘭会館 (京都府)
12. T. Kozuka & A. Nagatani、Phototropin-mediated regulation of polar elongation in palisade-tissue Cells、Memorial Symposium for the 25th International Prize for Biology "Biology of Sensing"、2009年12月2日、京都大学 芝蘭会館 (京都府)
13. N. Mochizuki & A. Nagatani、Plastid-to-nucleus signaling、Memorial Symposium for the 25th International Prize for Biology "Biology of Sensing"、2009年12月2日、京都大学 芝蘭会館 (京都府)
14. A. Nagatani、A structure/function study of phototropins、Memorial Symposium for the 25th International Prize for Biology "Biology of Sensing"、2009年12月2日、京都大学 芝蘭会館 (京都府)
15. 長谷あきら、植物の光応答機構—光受容体理解に向けた3つのアプローチ、2009年日本植物学会近畿支部大会、2009年11月14日、神戸大学 (兵庫県)
16. 長谷あきら、植物の光応答機構—光受容体理解に向けた3つのアプローチ、2009年日本植物学会近畿支部大会、2009年11月14日、神戸大学 (兵庫県)
17. 長谷あきら、フォトトロピンによる光応答～光受容から生理応答まで、科学研究費特定領域研究「LOV光受容体による植物の運動制御機構」報告会、2009年9月26日、京都市リサー

- チパーク (京都府)
18. 小林淳子ほか、避陰応答における組織／器官間シグナル伝達の研究、第15回日本光生物学協会年会、2009年8月19日、自然科学研究機構 岡崎コンフェレンスセンター (愛知県)
 19. Y. Oka et al.、Structural basis of phytochrome A-specific functions、The 3rd International Symposium of the Biodiversity and Evolution、2009年7月24日、京都大学 (京都府)
 20. J.Kobayashi et al.、Inter-organ/tissue communication in the shade avoidance response、The 3rd International Symposium of the Biodiversity and Evolution、2009年7月24日、京都大学 (京都府)
 21. Y. Aihara et al.、Possible roles of plant's blue-light receptor, phototropin, as a "flippase-kinase".、The 3rd International Symposium of the Biodiversity and Evolution、2009年7月24日、京都大学 (京都府)
 22. A. Nagatani、Structural basis of properites specific to phytochrome A、Seminar、2009年7月15日、Taipei, Taiwan
 23. A. Nagatani、Structural basis of phyA-specific properties、SEB Annual Main Meeting、2009年6月28日、Glasgow, UK
 24. A. Nagatani、Complex hierarchy of the shade avoidance response.、15th International Congress of Photobiology、2009年6月18日、Dusseldorf, Germany
 25. 長谷あきら、フィトクロム分子種間の機能分化とその構造的基盤、第50回日本植物生理学会年会、2009年3月24日、名古屋大学 (愛知)
 26. 小塚俊明ほか、青色光受容体フォトトロピンによる組織特異的な本葉形態制御、第50回日本植物生理学会年会、2009年3月23日、名古屋大学 (愛知)
 27. 高野雄也ほか、シロイヌナズナの葉肉プロトプラストを用いた避陰応答における光信号伝達と植物ホルモンの相互作用の解析、第50回日本植物生理学会年会、2009年3月23日、名古屋大学 (愛知)
 28. 岡本圭史ほか、ミオシン変異体の葉柄は光と重力に過敏に応答して屈曲する、第50回日本植物生理学会年会、2009年3月23日、名古屋大学 (愛知)
 29. 小野裕也ほか、フィトクロムAとBの機能分化の構造的基盤、第50回日本植物生理学会年会、2009年3月22日、名古屋大学 (愛知)
 30. 岡 義人ほか、Phytochrome BのN末端領域内の結び目構造は PIF3 との相互作用に関わる、第50回日本植物生理学会

- 年会、2009年3月22日、名古屋大学 (愛知)
31. 小林淳子ほかシロイヌナズナの避陰応答における器官・組織間光シグナル伝達、第50回日本植物生理学会年会、2009年3月21日、名古屋大学 (愛知)
 32. 長谷あきら、植物の光センサー分子、京都サイエンスカフェ「化学で見る動物の目・植物の目」、2008年12月6日、京都大学 (京都)
 33. A. Nagatani、Structural basis for functional differences between phytochromes A and B、4th Asia Oceania Conference on Photobiology、2008年11月24日、Varanasi, India
 34. A. Nagatani、Roles of different functional moieties of phototropins、Photobiology in Asia、34th Meeting of the American Society for Photobiology、2008年6月20日、Burlingame, CA, USA
 35. A. Nagatani、Structural basis for functional differences between phytochrome A and B、Twenty-Fifth Annual Missouri Plant Bio Symposium - Plant Photobiology、2008年5月28日、Columbia, MO, USA
 36. 長谷あきら、植物の光応答機構：フィトクロムとフォトトロピンを中心として、東京大学大学院理学系研究科生物科学セミナー、2008年5月14日、東京大学 (東京)

〔図書〕 (計1件)

長谷あきら、化学同人、「基礎生物学テキストシリーズ7 植物生理学」三村徹郎 他編、「光形態形成」2009、129-146

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://physiol2.bot.kyoto-u.ac.jp/~nagatani/HP3/>

<http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 あきら (NAGATANI AKIRA)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：40183082

(2) 研究分担者

望月 伸悦 (MOCHIZUKI NOBUYOSHI)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：60280939
鈴木 友美 (SUZUKI TOMOMI)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：10362435

(3) 連携研究者

()

研究者番号：