

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07451

研究課題名(和文)植物の光順応性を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms involved in plant light adaptation

研究代表者

芳賀 健 (Haga, Ken)

日本工業大学・基幹工学部・准教授

研究者番号：50382031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：植物は、光合成に必要な光エネルギーを効率的に獲得するため、茎などの地上部では青い光の方向に伸長する性質をもつ。この反応は、非常に広範囲な強さの青色光によって誘導されることが知られているが、その詳しい分子メカニズムは長い間不明であった。本研究では、その仕組みを明らかにするために、モデル植物であるシロイヌナズナの突然変異体などを用いて研究を行った。光の情報伝達の必須因子であるNONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL3 (NPH3) に注目して研究を行った結果、植物が広範囲の強さの光に応答するためにNPH3のリン酸化状態がうまく調節されていることが重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

広範囲な光の強さに対応できる光順応の仕組みが植物に備わっていることは古くから知られていたが、その分子メカニズムは明らかにされていなかった。本研究により、植物の光順応性にはNONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL3のリン酸化状態の調節が重要であることが初めて裏付けられたことは、学術的な意味において非常に意義の高い研究成果であると考えられる。本研究成果を手掛かりにして、植物の光順応性の分子メカニズムが更に明らかにされることで、作物を育てる際の効率的な光環境の整備や育種においても役立つ情報が得られる可能性が高い。その意味では、社会的な意義においても高く評価される研究成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Plant shoots grow toward the light source in response to a wide range of blue light to capture light energy for photosynthesis. Although such light adaptation responses have been well-studied, molecular mechanisms were not clarified so far. This study investigated how plants acclimate to a variety of light environment using Arabidopsis mutants. The present study focused on molecular functions of NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL3 (NPH3), which is a critical component for phototropic blue light signaling, in light adaptation and found that blue light-induced dephosphorylation of NPH3 protein is very important especially for establishment of a light signaling system to respond to a strong blue light. The results supported a view that plants can respond to a wide range of blue light through regulation of phosphorylation status of NPH3 protein.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：光環境応答 光順応性 光屈性 光寛容 シロイヌナズナ リン酸化制御 胚軸 NRLファミリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は動物のように自由に移動することができないので、様々な環境適応能力を発達させている。特に光に対する反応についてみると、植物は非常に広範囲な光の強さに順応するメカニズムを進化させてきた。例えば、動物の視覚には光環境に順応するためのメカニズム、いわゆる明順応および暗順応のシステムが備わっているように、植物にも同様な適応機構が備わっていることが古くから示唆されてきた。このような仕組みなどを利用して、植物は光に向かって成長し光合成に必要な光エネルギーを効率的に獲得していると考えられている。しかしながら、未だにその分子メカニズムは不明であり、植物の光生物学分野における謎の一つとして残されていた。我々は、これまで植物の光屈性について生理学的な研究を行い、連携研究者は光屈性に働く青色光受容体(フォトトロピン[phot])やそのアダプタータンパクであるNONPHOTOTROPIC

HYPOCOTYL3 (NPH3)、ROOT PHOTOTROPISM2 (RPT2) を同定してきた。NPH3 や RPT2 の生理機能はこれまで不明であったが、我々が行った研究により(Haga et al., [2015] Plant Cell, 27, 1098-1112)、RPT2 が植物の光順応に必須な因子であることが示された(図1)。先行研究の成果により、これまで不明であった植物の光環境適応メカニズムの解明の糸口が得られたことから本研究の計画に至った。また、新たな知見として RPT2 と NPH3 が含まれる NPH3/RPT2-like (NRL)ファミリーの中から、葉緑体運動に係る因子が報告された(Suetsugu et al., [2016] PNAS, 113, 10424-10429)。この因子は RPT2 と結合することで機能することが明らかにされており、NRL ファミリーを中心とした研究は植物の光順応のメカニズムを解明する上で非常に重要であると考えられた。

青色光受容体やそのシグナル伝達因子である NPH3 については、主に Briggs 教授や Liscum 教授などの海外の研究グループによって精力的に研究されている。特に Liscum 教授らのグループは、NPH3 に注目した研究を行い、青色光に依存した NPH3 の脱リン酸化反応が光屈性の初期応答には重要であることや、NPH3 がユビキチン E3 複合体の構成因子であることなどを明らかにしている(Roberts et al., [2011] Plant Cell, 23, 3627-3640)。また、Briggs 教授らのグループは、青色光受容体の膜局在性が光照射によって調節され、そのメカニズムが光順応に関係することを報告している(Han et al., [2008] Plant Cell, 20, 2835-2847)。しかしながら、これらの研究結果は必ずしも植物の生理反応と密接に関連しているとは言えず、今のところ光順応に働く分子機構の核心には迫っていない。国内では、大阪市立大学のグループが主にイネを用いた光屈性の研究を進めているが、分子メカニズムの解明には至っていない。

2. 研究の目的

動物のように自由に移動することのできない植物は、非常に広範囲な光条件に順応する機構を備えている。しかし、その分子メカニズムは未だに解明されておらず、この分野における謎の一つであった。我々の研究グループは、青色光シグナル伝達因子である NPH3 の機能制御に、RPT2 が働くことを明らかにし、その分子機構が植物の光順応に重要な働きを担っていることを世界で初めて示した。本研究は、RPT2 及び NPH3 が働く青色光シグナル伝達系を中心に研究を進めることで、植物の光環境順応メカニズムを分子レベルで解明することを目的として計画された。

3. 研究の方法

phot を介した青色光シグナル伝達の必須因子である NPH3 は、青色光照射によって脱リン酸化される。先行研究により、NPH3 の膜局在は過剰な脱リン酸化により阻害されること、その反応は RPT2 によって緩和されることをすでに明らかにしている。つまり、NPH3 が持つ青色光のシグナル伝達機能を正常な状態に維持するには RPT2 が必要であり、それにより植物は様々な光環境に順応することができると考えられる。本研究ではシロイヌナズナを用いて、そのモデルの妥当性を検証するとともに、どのような制御機構が働き、青色光シグナル伝達にどのような因子が働くのかを突き止めることで、進化の過程で植物が獲得した光順応の分子メカニズムの解明を目指した。

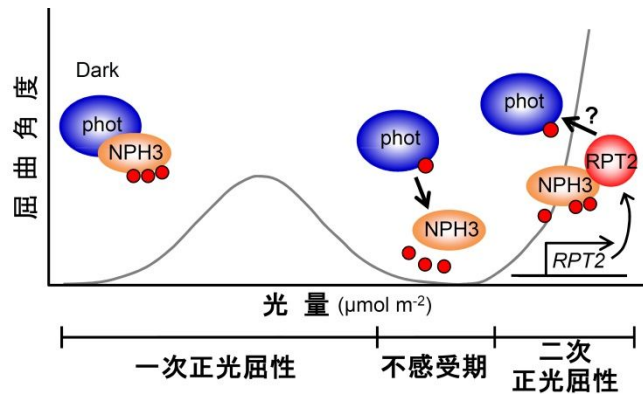


図1 光屈性における光順応の分子モデル。一次正光屈性と二次正光屈性の間に存在する不感受期では、NPH3 が過剰に脱リン酸化されるために、NPH3 が phot 複合体から離れ粒状になる。二次正光屈性を誘導するためには、長時間の光照射によって発現誘導された RPT2 が NPH3 と結合し、NPH3 の過剰な脱リン酸化を防ぐことで NPH3 の粒状化が緩和され、再び phot 複合体に組み込まれることが必要であると推測された。

(1) 青色光による NPH3 のリン酸化制御の生理学的意味

すでに、青色光照射によって脱リン酸化される NPH3 の部位が報告されているが(Tsuchida-Mayama et al., [2008] Plant Science, 174, 626-633)、先行研究の結果から重要な NPH3 のリン酸化部位は未同定である可能性が高いことが示唆された。そこで、YFP-NPH3 を過剰発現させたシロイヌナズナの組換え体を用いて、青色光による脱リン酸化を誘導した個体からタンパクを抽出し、質量分析機器によって未同定のリン酸化部位の特定を進めた。次に、特定した NPH3 のリン酸化部位について、野生型の NPH3 遺伝子を用いてアミノ酸置換を行い、恒常的疑似リン酸化タイプと恒常的脱リン酸化タイプの NPH3 に改変し、それらを *nph3* 突然変異体に導入した。その際、青色光に反応した NPH3 の局在変化について解析する必要も考えて、YFP を付けたコンストラクトにした。プロモーターについては、YFP のシグナル強度の問題があるので、*35S* プロモーターを用いた。

(2) 光屈性に働く NRL ファミリーの同定

RPT2 が光屈性における光寛容、つまり、より強い光に反応できるシステムの構築に必要な因子であるということが先行研究から明らかにされている。暗黒下で育てたシロイヌナズナ芽ばえに青色光を 1 ~ 3 時間照射すると、RPT2 が誘導されることで新たな青色光シグナル伝達機構ができあがる。ところが、RPT2 を欠損しているシロイヌナズナの突然変異体でも、青色光を 1-2 時間以上照射することで胚軸の光屈性は誘導される。このことは、RPT2 以外の因子が光寛容に関係していることを示唆している。その有力な候補として挙げられるのが、RPT2 が含まれる NRL ファミリーに属する NRL PROTEIN FOR CHLOROPLAST MOVEMENT1 (NCH1) である(Suetsugu et al., [2016] PNAS, 113, 10424-10429)。NCH1 は、RPT2 と結合することで phot を介した青色光シグナルを下流に伝え、葉緑体運動の集合反応に働くことが明らかにされている。また、シロイヌナズナの場合、RPT2 と NCH1、NCH1-Like (NCL1) はアミノ酸配列の相同性が高く(図 2)、胚軸光屈性において冗長的に働く可能性が考えられた。そこで、それらの多重突然変異体を作製し、胚軸の光屈性を高精度な生理学的解析方法を用いて調べた。

NRL18/NCL1	CRLDLEKRMGLQLRQAVIDLLIPYYSFNGDNTMLD	298
NRL31/NCH1	CRLDLENRMGLQLGQAVLDDLLIPSYSTGDHSMFD	339
RPT2	CKNELEKRIISVVLHVSVDDLLIPSFTYDGE-RLLD	331

図 2 RPT2、NCH1、NCL1 のアミノ酸配列を用いたアライメント。NRL ファミリーの中では同じクレードに属する。

4. 研究成果

(1) 青色光による NPH3 のリン酸化制御の生理学的意味

光屈性における光情報伝達の必須因子である NPH3 は青色光によって脱リン酸化され、先行研究により 3 か所の脱リン酸化部位が同定されていたが、今回行った質量分析機器による解析により、新たに 4 か所が同定された。それらは、NPH3 の N 末端側に 1 か所、C 末端側に 3 か所であった。したがって、NPH3 には青色光によって脱リン酸化される部位が 7 か所存在することが明らかにされた(図 3、Kimura et al., submitted)。

次に、アミノ酸置換の方法によって、同定したすべてのリン酸化部位について恒常的疑似リン酸化タイプの NPH3 と恒常的脱リン酸化タイプの NPH3 のコンストラクトを作製した。さらに、それらのコンストラクトをそれぞれ *nph3* 突然変異体に導入し、形質転換体を作製した。青色光による NPH3 のリン酸化制御の生理学的働きを明らかにするために、それらの形質転換体を用いて詳細に胚軸の光屈性を調べた。暗黒下で育てたシロイヌナズナの芽ばえに、片側から青色光を短時間照射することによって誘導されるパルス誘導型の一次正光屈性について調べると、恒常的脱リン酸化タイプの NPH3 で組換えた形質転換体では、ほとんど野生型と同じ反応を示した。一方、恒常的疑似リン酸化タイプの NPH3 で組換えた形質転換体では、より強い光量に反応するようになっていた。したがって、パルス誘導型の一次正光屈性においては、NPH3 のリン酸化は青色光に対して低感度になるように働くと考えられた(Kimura et al., submitted)。

青色光を長時間照射することによって誘導される照射時間依存型の二次正光屈性について調べると、恒常的脱リン酸化タイプの NPH3 で組換えた形質転換体では、どの強さの青色光を用いた場合でも、ほぼ野生型と同じ反応を示しており、非常に広範囲の光強度に反応して胚軸の光屈性が誘導された。それに対して、恒常的疑似リン酸化タイプの NPH3 で組換えた形質転換体では、非常に弱い青色光では胚軸光屈性が誘導されるものの、強い青色光ではほとんど光屈性が誘導されなかった。これらの結果から、シロイヌナズナの芽ばえが広範囲の青色光に反応するには、NPH3 の脱リン酸化が必要であると考えられた(Kimura et al., submitted)。

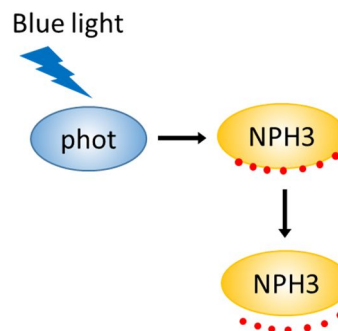


図 3 NPH3 のリン酸化部位の同定。赤い丸は NPH3 のリン酸化される部位を模式的に示している。これまでに同定された 3 か所に加え、新たに 4 か所が同定された。

先行研究によって、細胞膜に均一に局在する NPH3 は、青色光によって粒状化し細胞膜から離脱することが分かっている。興味深いことに、恒常的脱リン酸化タイプの NPH3 でも、恒常的疑似リン酸化タイプの NPH3 でも、暗黒下で育てた芽ばえでは細胞膜に均一に局在し、青色光による粒状化および細胞膜からの離脱反応は、ほぼ野生型と同様な反応を示していた (Kimura et al., submitted)。したがって、青色光による NPH3 の粒状化と細胞膜からの離脱反応には、NPH3 のリン酸化状態はほとんど関係ないと考えられた。

青色光によって粒状化し細胞膜から離脱した NPH3 は、青色光を長時間照射すると部分的に粒状化が解消され細胞膜へ再局在するようになり、青色光の光シグナルを下流に伝えることができるようになる。恒常的脱リン酸化タイプの NPH3 では、青色光の長時間照射によって、NPH3 の部分的な粒状化の解消と細胞膜への再局在が確認できており、ほとんど野生型と同じような反応を示した。一方で、恒常的疑似リン酸化タイプの NPH3 では、粒状化の解消および再局在が顕著に阻害されていた。これらの結果から、青色光による NPH3 の脱リン酸化は、NPH3 の粒状化の解消と細胞膜への再局在化に対して重要な働きをしていると考えられた (図 4、Kimura et al., submitted)。

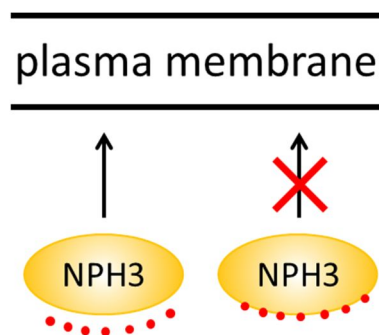


図 4 NPH3 の細胞膜への再局在化と NPH3 のリン酸化状態の関係。青色光による NPH3 の細胞膜からの離脱には、NPH3 のリン酸化状態には関係しないが、細胞膜への再局在化には、NPH3 の脱リン酸化が必要であることが明らかになった。

(2) 光屈性に働く NRL ファミリーの同定

アミノ酸配列の比較から (図 2)、RPT2 と NCH1 および NCL1 は冗長的に働いている可能性が考えられたので、それらの多重変異体を作製した。最近の研究では、RPT2 は直接 phot1 に結合することで phot1 を介した青色光の感度を低くすることが明らかにされている (Kimura et al., in press)。暗黒下で育てた *rpt2 nch1* 二重変異体と *rpt2 ncl1* 二重変異体に片側から青色光を照射すると、*rpt2 ncl1* 二重変異体ではほとんど *rpt2* 変異体と同様な胚軸光屈性を示した。一方、*rpt2 nch1* 二重変異体では、非常に弱い青色光において胚軸の光屈性が部分的に弱まっていた。このことから、胚軸光屈性における NCL1 の働きは不明であるが、NCH1 も RPT2 と同様に青色光に対する感度調節に働く可能性が示唆された。

本研究において活用された光屈性における高精度な生理学的解析方法は、「Phototropism: Methods & Protocols」に掲載された (Haga and Kimura, [2019] Methods Mol. Biol., 1924: 3-17; Yamamoto and Haga, [2019] Methods Mol. Biol., 1924: 223-234)。また、この解析方法は本研究期間中に本研究以外にも用いられ、シロイヌナズナにおける光屈性の分子メカニズムの解明に役立てることができた (Kimura et al., [2018] Plant and Cell Physiol., 59, 828-840; Haga et al., [2018] Plant and Cell Physiol., 59, 1060-1071; Haga and Sakai, [2018] Plant Sig. Behav., 13: e1536631)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Haga, K., and Sakai, T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Involvement of PP6-type protein phosphatase in hypocotyl phototropism in Arabidopsis seedlings.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 e1536631
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1536631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ken Haga, Lena Frank, Taro Kimura, Claus Schwechheimer, Tatsuya Sakai	4. 巻 59
2. 論文標題 Roles of AGCVIII Kinases in the Hypocotyl Phototropism of Arabidopsis Seedlings	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant & Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1060-1071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1093/pcp/pcy048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Taro Kimura, Ken Haga, Yasushi Shimizu-Mitao, Yumiko Takebayashi, Hiroyuki Kasahara, Ken-ichiro Hayashi, Tatsuo Kakimoto, Tatsuya Sakai	4. 巻 59
2. 論文標題 Asymmetric Auxin Distribution is Not Required to Establish Root Phototropism in Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant & Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 828-840
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1093/pcp/pcy018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 木村太郎、芳賀 健、野村有子、中神弘史、酒井達也
2. 発表標題 シロイヌナズナ光屈性シグナル伝達因子NPH3のリン酸化修飾の機能解析
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚祐太, 芳賀 健, 酒井達也, 塚谷裕一
2. 発表標題 青色光に応じてねじれる葉の三次元形態解析
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川浦圭太, 吉岡真美, 芳賀 健, 酒井達也
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるPIN非依存的な光屈性誘導機構の分子遺伝学的解析
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚祐太, 芳賀 健, 酒井達也, 塚谷裕一
2. 発表標題 青色光に応じた葉のねじれ運動の遺伝子基盤
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Otsuka, Y., Haga, K., Sakai, T., Tsukaya, H.
2. 発表標題 The role of auxin in the blue-light-directed twisting of the Arabidopsis leaves.
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村太郎、芳賀 健、野村有子、中神弘史、酒井達也
2. 発表標題 シロイヌナズナ光屈性シグナル伝達因子NPH3のリン酸化修飾の機能解析
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大塚祐太、綿引雅昭、芳賀 健、酒井達也、塚谷裕一
2. 発表標題 青色光に応じて葉身で生じるオーキシン応答の偏りの3次元観察
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚祐太、綿引雅昭、芳賀 健、酒井達也、塚谷裕一
2. 発表標題 青色光に応じた葉柄運動におけるオーキシン輸送の多面的な役割
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村太郎、芳賀 健、野村有子、中神弘史、酒井達也
2. 発表標題 シロイヌナズナ黄化芽生え胚軸光屈性における NPH3 脱リン酸化の意義
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Haga, K. and Kimura, T.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 15
3. 書名 Physiological characterization of phototropism in Arabidopsis seedlings. Phototropism: Methods and Protocols.	

1. 著者名 Yamamoto, K.T. and Haga, K.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 12
3. 書名 Quantitative measurements of curvature along the growth axis in tropic responses using free software environments. Phototropism: Methods and Protocols.	

〔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
連携研究者	酒井 達也 (Sakai Tatsuya) (10360554)	新潟大学・自然科学研究科・教授 (13101)	