

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06721

研究課題名(和文) RPT2の細胞自律的機能の解明によるフォトトロピン信号発信機構の統一的理解

研究課題名(英文) Unraveling mechanism underlying phototropin signaling based on cell-autonomous function of RPT2

研究代表者

末次 憲之(Noriyuki, Suetsugu)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：60514156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では青色光受容体であるフォトトロピンが、葉緑体運動と光屈性や葉の平滑化など異なる細胞・組織・器官レベルの現象をどのように制御するか明らかにするために、光屈性・葉の展開と葉緑体運動を制御するROOT PHOTOTROPISM 2 (RPT2)と葉緑体運動特異的なNRL PROTEIN FOR CHLOROPLAST MOVEMENT 1(NCH1)の違いを生むドメインを探索し、それぞれの現象の信号伝達系に必須な部分を決定した。さらにRPT2とNCH1のリン酸化ステータスの違いやRPT2とNCH1の複合体の解析など下流因子の探索により、フォトトロピンシグナリングの解明を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は光合成に必要な光の利用効率を最適化する現象である光屈性、葉の平滑化、葉緑体運動を制御する青色光受容体フォトトロピンの信号伝達系を明らかにすることにより、弱光環境下でも効率よく光を利用し最大限光合成を行いバイオマスを増進できる植物の作出に関する応用研究に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：To know how a phototropin (phot), a green-plant-specific blue-light photoreceptor, regulates blue-light responses at the cellular, tissue, and organ levels (i.e., chloroplast movement, phototropism, and leaf flattening), I analyzed two phototropin-interacting proteins, ROOT PHOTOTROPISM 2 (RPT2) and NRL PROTEIN FOR CHLOROPLAST MOVEMENT 1 (NCH1). Although RPT2 and NCH1 are highly similar, RPT2 mediates chloroplast movement, phototropism, and leaf flattening whereas NCH1 is specific to chloroplast movement. So, I examined the difference in the domains and the phosphorylation status between RPT2 and NCH1. Furthermore, I analyzed RPT2 and NCH1 complexes to reveal the mechanism underlying a phototropin signaling pathway.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：フォトトロピン

## 1. 研究開始当初の背景

青色光受容体フォトトロピンは光屈性、葉緑体運動、気孔開口、葉の平滑化など、光合成に必要な光の利用効率の最適化に寄与する光応答反応を制御する。フォトトロピン結合因子である3つのNONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL3 (NPH3)、ROOT PHOTOTROPISM 2 (RPT2)、NRL PROTEIN FOR CHLOROPLAST MOVEMENT 1 (NCH1)はNPH3/RPT2-like (NRL) タンパク質に属し、NPH3は器官レベルの反応である光屈性と葉の平滑化に特異的で、NCH1は細胞レベルの反応である葉緑体運動に特異的だが、RPT2は光屈性、葉の平滑化と葉緑体運動を制御する。これらのNRLタンパク質がどのように各現象の信号伝達系を制御し使い分けるメカニズムが未解明のままであった。

## 2. 研究の目的

本研究では、RPT2およびそのホモログであるNCH1の機能解析を徹底的に行うことで、RPT2を介したフォトトロピンによるシグナル発信の本質を解明することを目的とする。

これまでフォトトロピンや他のAGCキナーゼはNRLタンパク質とともにシグナリングモジュール形成し、オーキシンの輸送制御を介したメカニズムによって器官や組織レベルの成長や発生を制御することが知られていたが、申請者らによるRPT2とNCH1が細胞・オルガネラレベルの葉緑体運動を制御するという発見により、NRLタンパク質がオーキシンの依存しない細胞自律的な反応をも制御するという全く新しい知見が得られた (Suetsugu et al., PNAS 2016)。本研究の目的は、光屈性、葉の展開、葉緑体運動を制御するRPT2と葉緑体運動特異的なNCH1を詳細に解析することにより、フォトトロピンが全く異なるこれらの反応の信号伝達系を制御する分子メカニズムを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

本研究ではフォトトロピンシグナリングの本質理解のために、まずRPT2とNCH1の機能の特異性を決定するドメインを探索し、光屈性・葉の展開と葉緑体運動の信号伝達系に必須な部分を決定する。その結果をもとにRPT2とNCH1の細胞内局在とリン酸化ステータスの違いをドメインレベルで詳細に解析する。最終的に、RPT2とNCH1の複合体の解析など下流因子の探索により、フォトトロピンシグナリングの解明を目指す。詳細を下記に示す。

### (1) RPT2とNCH1の各現象を制御するドメインの決定

これまでの結果からRPT2とNCH1の機能の違いはその発現パターンでなくタンパク質の性質の違いであることがわかっている。そこで、RPT2とNCH1のドメインスワッピングラインを作成し(下記の実験で利用するため蛍光タンパク質Citrineをタグとする)RPT2特異的な光屈性と葉の展開の信号伝達、そしてRPT2とNCH1に共通な葉緑体運動の信号伝達に必要なドメインを決定する。

### (2) RPT2とNCH1の局在の解析

これまでの申請者の研究により、RPT2は細胞膜上に均等に局在するが、NPH3とNCH1は細胞膜上でドット様構造に局在することが明らかになっている。上記で作成したドメインスワッピングラインを用いることにより、NCH1のドット様局在に必要なドメインを探索する。NPH3は、フォトトロピン依存で青色光により局在パターンが変化することが知られていることから、NCH1とRPT2において光による局在の制御が起こるかどうかを確認する。

### (3) RPT2とNCH1のリン酸化ステータスの解析

申請者はNCH1がNPH3同様にフォトトロピン依存で青色光により脱リン酸化することを見つけた。NCH1のリン酸化サイトを決定するため暗黒処理あるいは青色光照射したサンプルからCitrine-NCH1を免疫沈降しリン酸化プロテオーム解析により、リン酸化サイトを決定する。特に青色光依存でリン酸化状態の変化するサイトに関しては、アラニン置換による非リン酸化あるいはアスパラギン酸置換による偽リン酸化状態のNCH1を作成し、そのリン酸化サイトの葉緑体運動の制御と局在への影響を調べる。RPT2についてもリン酸化プロテオーム解析によりフォトトロピン依存の青色光による脱リン酸化の可能性を探る。

### (4) RPT2/NCH1信号伝達因子の同定

上記のリン酸化プロテオームと同様に暗黒処理あるいは青色光照射した黄化芽生えあるいはロゼット葉から Citrine-RPT2 あるいは Citrine-NCH1 の免疫沈降し、プロテオーム解析することにより、光依存あるいは光非依存で RPT2 と NCH1 に結合するタンパク質を同定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) RPT2とNCH1の各現象を制御するドメインの決定

作成し RPT2 と NCH1 のドメインスワッピングラインを作成し、RPT2 特異的な光屈性と葉の展開の信号伝達、そして RPT2 と NCH1 に共通な葉緑体運動の信号伝達に必要なドメインを決定した（論文投稿準備中）。

##### (2) RPT2とNCH1の局在の解析

ドメインスワッピングラインで NCH1 と RPT2 において光による局在の制御が起こるかどうかを確認中。

##### (3) RPT2とNCH1のリン酸化ステータスの解析

申請者は NCH1 が NPH3 同様にフォトロピン依存で青色光により脱リン酸化することを見つけた。この解析の間 NPH3 の C 末端側のフォトロピンによるリン酸化サイトが発見されたため、NCH1 と RPT2 についても同様の解析を行なっている（論文投稿準備中）。

##### (4) RPT2/NCH1信号伝達因子の同定

暗黒処理あるいは青色光照射した黄化芽生えあるいはロゼット葉から Citrine-RPT2 あるいは Citrine-NCH1 の免疫沈降し、プロテオーム解析することにより、光依存あるいは光非依存で RPT2 と NCH1 に結合するタンパク質を同定した（論文準備中）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwasaki M, Kajiwara T, Yasui Y, Yoshitake Y, Miyazaki M, Kawamura S, Suetsugu N, Nishihama R, Yamaoka S, Wanke D, Hashimoto K, Kuchitsu K, Montgomery SA, Singh S, Tanizawa Y, Yagura M, Mochizuki T, Sakamoto M, Nakamura Y, Liu C, Berger F, Yamato KT, Bowman JL, Kohchi T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Identification of the sex-determining factor in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i> reveals unique evolution of sex chromosomes in a haploid system.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 5522-5532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.10.023.	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 Sullivan S, Waksman T, Paliogianni D, Henderson L, Lutkemeyer M, Suetsugu N, Christie JM.	4. 巻 12
2. 論文標題 Regulation of plant phototropic growth by NPH3/RPT2-like substrate phosphorylation and 14-3-3 binding.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26333-5.	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 該当する
1. 著者名 Kihara M, Ushizima T, Yamagata Y, Tsuruda Y, Higa T, Abiko T, Kubo T, Wada M, Suetsugu N, Gotoh E	4. 巻 133
2. 論文標題 Light-induced chloroplast movements in <i>Oryza</i> species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 525-535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-020-01189-w.	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 Ishishita K, Higa T, Tanaka H, Inoue S, Chung A, Ushizima T, Matsushita T, Kinoshita T, Nakai M, Wada M, Suetsugu N, Gotoh E	4. 巻 183
2. 論文標題 Phototropin 2 contributes to the chloroplast avoidance response at the chloroplast-plasma membrane interface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 304-316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.00059.	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 Koide E, Suetsugu N, Iwano M, Gotoh E, Nomura Y, Stolze SC, Nakagami H, Kohchi T, Nishihama R	4. 巻 61
2. 論文標題 Kinase in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i> ; A photosynthesis-dependent kinase for carbon metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell & Physiology	6. 最初と最後の頁 631-643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz232	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 Suetsugu N, Wada M	4. 巻 29
2. 論文標題 Signalling mechanism of phototropinmediated chloroplast movement in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Plant Biochem. Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 580-589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13562-020-00594-5	査読の有無 無
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1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Suetsugu N
2. 発表標題 Elucidating the mechanism underlying phototropin signaling. How do phototropins regulate chloroplast movement?
3. 学会等名 9th Asia and Oceania Conference for Photobiology "AOC2019" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	University of Glasgow			