

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06211

研究課題名（和文）光屈性におけるシグナル伝達因子レベルの光順応機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of photosensory adaptation at the level of signaling factors in phototropism.

研究代表者

酒井 達也（Sakai, Tatsuya）

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：10360554

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は双子葉植物シロイヌナズナ芽生え胚軸の光屈性応答における光屈性シグナル伝達因子 NPH3 のリン酸化修飾の機能を分子遺伝学的研究手法によって明らかにした。本研究が同定した NPH3 天然変性ドメインのリン酸化修飾は光照射によって細胞膜から解離した NPH3 の細胞膜への再会合の速度、すなわち定常状態へ戻る速度を規定し、これが芽生えの光感受性の調節に働くことを明らかにした。この結果は、光照射側組織と陰側組織における光受容体 phot1 と NPH3 の複合体形成の差が光源方向認識に働くことを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は植物の光源方向認識の分子基盤を提案する内容である。「目のない植物がどのように光源方向を認識しているのか」、さらに「植物の光屈性応答はどのように生物の光応答の中でもとりわけ光強度のダイナミックレンジが広いのか」という問いに答える内容であり、植物の光屈性応答にとどまらず、広範な生物の光環境適応機構の理解に貢献しうる知見となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study tried to elucidate the function of phosphorylation modification of the phototropic signaling factor NPH3 in the phototropic responses of Arabidopsis shoot hypocotyls by using molecular genetic techniques. The activation level of phot1 and the corresponding phosphorylation level of intrinsic disordered regions of NPH3 determine the reassociation rate of NPH3 on the plasma membrane. This mechanism may moderately maintain the active state of phot1 signaling across a broad range of BL intensities and contribute to the photosensory adaptation of phot1 signaling during the phototropic response in hypocotyls.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：植物 光環境応答 光屈性 フォトリポリン タンパク質リン酸化 NPH3

## 1. 研究開始当初の背景

植物の芽生えは発芽後、効率よく光合成を行うために地上部を光源方向に向かって成長させ、根は発芽後の乾燥を避け水分や栄養を吸収するために光源方向を避けるように大地方向に向かって成長させる、いわゆる光屈性を示す(図1)。光屈性は植物の環境適応のための個体統御能力の一つであり、芽生えの確立期の生存に決定的な性質である (Taiz et al. [2015] Plant physiology and development 6th ed., Sinauer associates Inc.)。被子植物の光屈性は器官の光照射側と陰側の光刺激の差が、細胞内の光シグナリングの強弱の差を生み、光照射側と陰側の偏差成長を誘導する反応と考えられている (Sakai & Haga, 2012)。

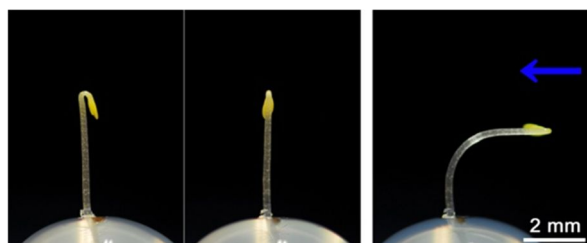


図1 シロイヌナズナ黄化芽生え胚軸の光屈性  
横から青色光を照射すると、3時間後には胚軸は光源方向へと屈曲する(右)。

光屈性刺激を受容する青色光受容体としてフォトロピン (phot) が同定されている。シロイヌナズナには phot1、phot2 の 2 分子種が存在する。PHOT タンパク質は C 末端側に Ser/Thr 型キナーゼドメインを有し、青色光受容によって自己リン酸化活性を示す。少なくともトウモロコシ子葉鞘においては、陰側組織は光照射側に比べ青色光の光強度が半分程度に減衰しており、陰側の phot1 は光照射側よりも自己リン酸化修飾の度合いが低いことが確認されている (Suzuki et al. 2019)。すなわち光屈性応答における光源方向の認識は、phot1 (もしくは phot2) の活性化の勾配に依存していると考えられる。

我々が注目するのは、胚軸光屈性を誘導する青色光の光強度のダイナミックレンジである。細胞内に発現する phot1 分子集団は一定以上に強い光を受ければほぼすべての光受容体が活性化して飽和し、光照射側と陰側の活性勾配を作れなくなることが予想される。しかしながらシロイヌナズナ黄化芽生えの場合、少なくとも  $10^{-5} \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  の微弱な青色光から  $10^3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  の強い青色光まで、phot1 が光屈性を誘導することが可能なことを我々は明らかにした (Haga et al. 2015)。ほぼ暗闇にも等しい微弱な青色光を受容して光屈性反応を誘導しうる phot1 が、まぶしいほどの強さの光を受けても光照射側と陰側で光シグナリングの勾配を形成するためには、光が弱いときには活性を増幅し、光が強いときには活性化を抑制し飽和を抑える、堅牢な光順応システムが必要であると考えられた。本研究課題の核心となる学術的「問い」は、光強度の様々な異なる光環境において、生物はどのようにして常に光源方向を認識しうるのかである。

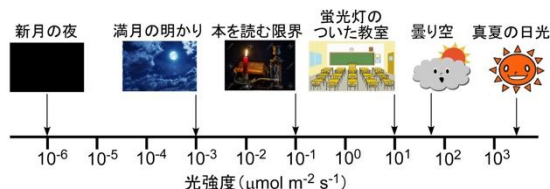


図2 シロイヌナズナ胚軸光屈性応答における青色光受容体 phot1、phot2 と、phot 結合タンパク質 RPT2、NPH3 の光強度依存的な働き。  
光センサーレベルの光順応 (これまで明らかにしてきた独創的研究)  
光高感受性 phot1  
RPT2  
光低感受性 phot1  
phot1 分解  
phot2 機能  
リン酸化NPH3  
シグナル伝達因子レベルの光順応 (本研究で検証する分子機構)  
脱リン酸化NPH3

## 2. 研究の目的

本研究は、植物の光源方向の認識に基づく光屈性誘導の分子機構を明らかにすることを目的に行う。我々研究グループはこれまで光屈性誘導機構、特に光屈性における光順応システムについて独創的な研究を進めてきた。その結果、光感受性の異なる2つの青色光受容体、phot1、phot2 による光強度依存的な機能分担様式 (Kagawa and Sakai et al. 2001, Sakai et al. 2001)、及び光誘導性タンパク質 RPT2 による phot1 光感受性変換機構 (Sakai et al. 2000, Inada et al. 2004, Haga et al. 2015, Kimura et al.

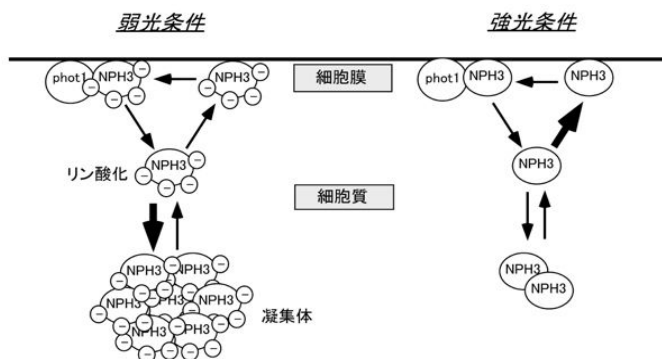


図3 NPH3 リン酸化調節による光順応機構の仮説モデル  
Phot1 は青色光吸収により活性化すると、NPH3 と解離しシグナル伝達をおこす。弱光条件ではリン酸化した NPH3 と phot1 と解離した活性化状態が維持されやすくシグナルが流れやすい。強光下では脱リン酸化した NPH3 が phot1 と結合した定常状態をとりやすく、シグナルが流れにくい (Kimura et al., 2021)

2020)、という光センサーレベルの光順応に分類される分子機構を解明することに成功している(図2)。最近我々は光屈性に必須なシグナル伝達因子 NPH3 の機能解析を行い、NPH3 リン酸化修飾調節が光センサーレベルとは異なる、シグナル伝達因子レベルの光順応を導くことを示唆する結果を得た(図3)。本研究においては、我々が着想を得た NPH3 リン酸化調節による光順応機構の作業仮説を検証するとともに、そこから示唆された NPH3 機能の可能性について検討を進めることを計画している。植物において、これほど堅牢な光順応システムの報告例は類がなく(図3)、植物が動物の視覚同様に複数の分子機構からなる高度な光順応システムを駆使していることを示す学術的独自性の高い研究内容である。フォトトロピンはオーキシン輸送調節を介した偏差成長ばかりでなく、モータータンパク質・アクチン機能を介した葉緑体光定位運動、細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase を介した気孔開口運動等も制御しており、本研究成果による phot1 シグナリング初期応答の理解が、他の光環境応答やオーキシン濃度勾配を介した発生の理解を生み出す創造性が期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) NPH3 リン酸化修飾の分子遺伝学的解析

NPH3 リン酸化修飾の生理的役割を明らかにするため、NPH3 リン酸化修飾部位の同定を試みた。YFP 融合 NPH3 の免疫沈降後の質量分析によって、7箇所のセリン残基にリン酸化修飾がおきていることを明らかにした(図4)。同定したセリン残基がリン酸化修飾を受けないアラニン残基に置換された非リン酸化 NPH3<sup>SA</sup>、リン酸化修飾を模倣したグルタミン酸残基に置換した NPH3<sup>SE</sup>、それぞれをコードする *nph3*

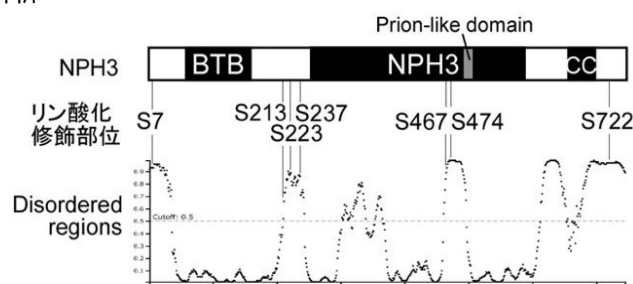


図4 NPH3 タンパク質の構造解析

変異体遺伝子を作成し、それぞれを *nph3* 突然変異体に遺伝子導入してその表現型を観察した。またリン酸化修飾がおきる天然変性ドメインに着目し、これを欠失した *nph3* 変異体を作成し、同様に表現型を観察した。また作成した *nph3* 変異体タンパク質は、YFP を融合した蛍光タンパク質としても発現させ、光屈性刺激前後の細胞内局在の変化を観察した。

#### (2) phot1 より解離した NPH3 の機能解析

光屈性刺激により一過的に細胞膜から解離した NPH3 の機能を明らかにするため、NPH3 N 末端にミリストレイル化、C 末端にファルネシル化がおきる *nph3* 変異体を作成し、細胞膜から解離しない NPH3 の機能を解析した。また NPH3 に相互作用を示すタンパク質を探索すべく、酵母ツーハイブリッド選抜、TurboID を用いた近位標識法による質量分析解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) NPH3 リン酸化修飾が光屈性応答に与える影響

天然変性ドメインにリン酸化修飾を受けない NPH3<sup>SA</sup> 変異は極弱い青色光に応答した胚軸光屈性を弱める一方、通常もしくは強い青色光に対する反応異常は起きなかった。逆にリン酸化模倣 NPH3<sup>SE</sup> 変異は強い青色光に応答した光屈性に異常を示す一方、極弱い青色光への応答には異常を示さないことが明らかになった。すなわち我々が同定した天然変性ドメイン7箇所のセリン残基リン酸化修飾調節は光屈性応答の光感受性調節、光順応に働くことが示された。暗い環境下では NPH3 はリン酸化修飾を受けることで弱い青色光にも応答して光屈性を示す一方、明るい環境下では脱リン酸化されることによって光感受性を下げて光屈性応答を示すことが明らかになった (Kimura et al. 2021)。

#### (2) NPH3 リン酸化修飾の NPH3 細胞内局在に与える影響

NPH3 天然変性ドメインのリン酸化は細胞膜局在に働き、青色光照射による脱リン酸化は細胞膜から細胞質への解離と凝集体形成に働くことが示唆されていた (Haga et al. 2015)。YFP 融合 NPH3<sup>SA</sup> 及び NPH3<sup>SE</sup> の細胞内局在を観察した結果、予想に反し、NPH3 の暗所における細胞膜局在及び青色光照射誘導の細胞膜への解離には NPH3 天然変性ドメインのリン酸化修飾は影響を与えないことが明らかになった。一方、解離した YFP-NPH3 が細胞膜に再局在するには天然変性ドメインの脱リン酸化が必要であること、リン酸化修飾を受けない YFP-NPH3<sup>SA</sup> は細胞質に解離してもすみやかに細胞膜に再局在することが明らかになった (Kimura et al. 2021)。本研究成果を発表後、NPH3 の細胞膜からの解離は phot1 による NPH3 C 末端セリン残基のリン酸化修飾に依存することが他研究グループによって報告された。すなわち青色光受容体 phot1 は活性化すると NPH3 の C 末端をリン酸化することによって NPH3 を解離し、細胞質に放出して活性化する一方、phot1 の活性化の度合いに応じて NPH3 天然変性ドメインのリン酸化修飾の度合いを調節し、弱い青色光下では phot1 の活性が低いので NPH3 天然変性ドメインの脱リン酸化の度合いも小さくなり細胞膜への再局在が遅くなって結果として活性化状態の継続時



間が長くなって光感受性が高くなる。一方、強い青色光下では phot1 の活性が高いので NPH3 天然変性ドメインの脱リン酸化が進行して細胞膜への再局在が早くなり、結果として phot1-NPH3 複合体形成による定常状態回復が早くなって光感受性が低くなる、という分子機構が存在することが強く示唆された(図5)。本研究成果は光屈性における光シグナリングが光照射による活性化ばかりでなく強光照射でも常に活性化していない定常状態の分子を維持するための光順応システムとして理解ができ、このような光照射側組織と陰側組織の間の光シグナリングの勾配維持が植物が幅広いダイナミックレンジをもった光源方向認識システムの分子基盤であることが強く示唆された。本仮説を過去の成果とともにまとめ、2023 年 J. Exp. Bot. 誌の総説にて発表した (Haga and Sakai, 2023)。

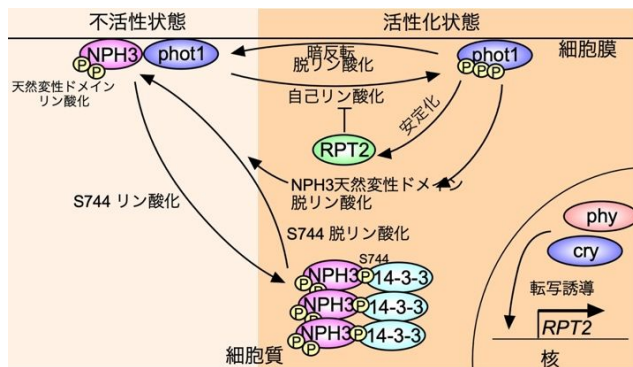


図 2 植物の光源方向認識システムとしての phot1-NPH3 解離勾配仮説。光によって活性化した phot1 は自己のタンパク質キナーゼ活性抑制因子 RPT2 の転写後発現誘導を行い、負のフィードバック調節を行う。また青色光照射下、phot1 は NPH3 C 末端 S744 のリン酸化を行う。これは NPH3 と 14-3-3 の結合を促進する一方、phot1 との複合体解離を誘導し、NPH3 は細胞質内で 14-3-3 依存的に凝集体を形成する。一方、phot1 の活性化は NPH3 天然変性ドメインの脱リン酸化を誘導して NPH3 の細胞膜への再局在を促進し、phot1-NPH3 複合体解離に対する負のフィードバック調節を行う。同時に 2 つの負のフィードバック調節が様々な光強度環境において、phot1-NPH3 複合体の適度な解離

と解離状態の勾配維持を可能とし、光源方向に向けた偏差成長を導くと考えられる (Haga and Sakai 2023)。

### (3) NPH3 脂質修飾変異体の解析 (未発表)

光屈性刺激により一過的に細胞膜から解離した NPH3 の機能を明らかにするため、NPH3 N 末端にミリストレイル化、C 末端にファルネシル化がおきる *nph3* 変異体を作成し、細胞膜から解離しない NPH3 の機能を解析した。脂質修飾が実際にはおきないネガティブコントロールのペプチド付与した *nph3* 変異体でも変異体の光屈性応答を回復できず、NPH3 の N 末端及び C 末端へのペプチド付与そのものが困難だった。すなわち、本解析では NPH3 の細胞質への解離の生理的意義を明らかにすることができなかった。

### (3) NPH3 天然変性ドメインの機能解析 (未発表)

NPH3 が細胞質中で凝集体を形成すること、天然変性ドメインがしばしばタンパク質の凝集体形成調節に働くことが報告されていることから、NPH3 の天然変性ドメインのリン酸化修飾が凝集体形成調節に働く可能性があった。また他研究グループによる報告では NPH3 C 末端の天然変性ドメインには細胞膜局在に働く両親媒性ヘリックス及び細胞膜からの解離に働く C 末端リン酸化セリン残基が存在しており、これを欠失すると NPH3 の細胞膜局在がおきなくなる可能性も示唆された。そこで NPH3 天然変性ドメインを欠失した変異体シリーズを作成し、その機能及び細胞内局在を観察した。

天然変性ドメインをすべて欠失した *nph3* 変異体は、暗所では細胞膜に一部局在し、青色光照射によって一部凝集体を形成し、強光による光屈性応答を若干示すという予想外の結果を示した(未発表)。この結果は、NPH3 の細胞膜局在及び解離のメカニズムが C 末端天然変性ドメインに存在する両親媒性ヘリックス及び C 末端セリン残基のリン酸化に依存するという過去の知見を指示する一方、それ以外の分子機構も存在しており、そのメカニズムによって NPH3 天然変性ドメインをすべて欠失しても光屈性誘導活性が一部残っている可能性が示唆された(未発表)。また NPH3 の凝集体形成能は天然変性ドメインに依存するというよりも、細胞質に解離した NPH3 の蓄積の結果として起きている可能性が示唆された。

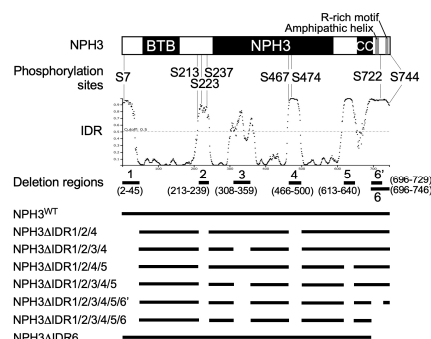


図 3 NPH3 天然変性ドメイン(IDR)の機能解析

NPH3 アミノ酸配列から予測された IDR を欠失した *nph3* 突然変異体シリーズの解析。C 末両親媒性ヘリックス (Amphipathic helix) が細胞膜局在に正に働く。S744 の phot1 によるリン酸化が 14-3-3 結合、細胞膜からの解離、細胞質における凝集体形成促進に働く。

### (4) NPH3 の新たな相互作用因子の探索 (未発表)

NPH3 タンパク質は酵母内において転写誘導活性を示すドメインを持つため、酵母ツーハイブリッド選抜による相互作用因子探索はこれまで困難だった。(3) の解析で天然変性ドメインを欠失した *nph3* 変異体でも光屈性誘導活性を一部残していることがわかったので、天然変性ドメインを欠失した *nph3* 変異体を用いた酵母ツーハイブリッド選抜を試みた。結果として天然変性ドメインを欠失した変異体は転写誘導活性を示さなくなったことから、酵母ツーハイブリッド選抜法を適用できると判断され、実際にシロイヌナズナ cDNA ライブラリーから天然変性ドメイン欠失 *nph3* タンパク質に結合する因子の探索を行った。その結果、一つの転写因子の結

合の再現性が確認できた。今後、*in vivo* における複合体形成の可能性について検証する必要がある。

TurboID を NPH3 N 末端に融合した *nph3* 突然変異体は光屈性応答を回復せず、作成された変異体は機能的なタンパク質ではないと判断され、近位標識法を用いた相互作用因子探索が研究期間内では行うことができなかった。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Haga Ken, Sakai Tatsuya	4. 巻 74
2. 論文標題 Photosensory adaptation mechanisms in hypocotyl phototropism: how plants recognize the direction of a light source	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 1758 ~ 1769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/erad015	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 Kimura Taro, Haga Ken, Nomura Yuko, Higaki Takumi, Nakagami Hirofumi, Sakai Tatsuya	4. 巻 187
2. 論文標題 Phosphorylation of NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL3 affects photosensory adaptation during the phototropic response	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 981 ~ 995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiab281	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 Kimura Taro, Haga Ken, Sakai Tatsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 The phosphorylation status of NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL3 affects phot2-dependent phototropism in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Signaling and Behavior	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2022.2027138	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村太郎、芳賀健、酒井達也
2. 発表標題 シロイヌナズナ胚軸光屈性における NPH3 リン酸化調節の機能解析
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022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			
ドイツ	Max Planck Institute			