

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06232

研究課題名（和文）暗黒下におけるエチレン合成依存的・非依存的な葉老化制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of Ethylene-Dependent and Independent Mechanisms of Leaf Senescence Under Darkness

研究代表者

小塚 俊明 (Kozuka, Toshiaki)

金沢大学・生命理工学系・特任准教授

研究者番号：20402779

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）：植物の老化は能動的なプログラム細胞死であり、重要な環境応答機構の一つです。特に、光合成を行う本葉は日陰に長期間置かれると老化が誘導され、細胞内小器官やクロロフィルが分解されて葉色が黄変します。分解産物は新たな窒素栄養源として再利用されます。植物は複数の光受容体によって光環境の変化を識別しますが、光受容体下流における老化制御機構の詳細は不明な点が残されて。本研究では、フィトクロムとクリプトクロムがエチレン合成を制御するメカニズムを解析しました。その結果、フィトクロムB下流因子PIFによるエチレン合成酵素遺伝子の転写制御や、クリプトクロム2のシグナル伝達機構が明らかになりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、フィトクロムとクリプトクロムがエチレン合成を抑制し、植物の老化を調節するメカニズムを解明しました。特に、フィトクロムB下流因子PIFがエチレン合成酵素遺伝子を抑制し、クリプトクロム2が青色光応答で葉老化を抑制することを明らかにしました。これにより、光環境を管理しエチレンシグナリングを調整することで、作物の老化を遅らせ、収穫量の増加や品質維持が可能となります。また、気候変動に強い作物の育成や収穫後の損失を減少させ、食糧安全保障の強化にも貢献します。この知見を活用することで、農業生産の最適化が図られます。

研究成果の概要（英文）：Plant senescence is a process of programmed cell death and an essential environmental response. Specifically, when photosynthetic organs, such as leaves, are exposed to prolonged periods of shade, senescence is induced. This leads to the rapid degradation of intracellular organelles and chlorophyll, causing the leaves to turn yellow. The degradation products are then reused as new nitrogen sources for the development of new organs. Plants recognize changes in the light environment through multiple photoreceptors, but the detailed mechanisms of senescence regulation downstream of these photoreceptors remain unclear. This study analyzed the mechanisms by which phytochromes and cryptochromes control ethylene synthesis. As a result, the transcriptional regulatory mechanism of ethylene synthesis enzyme genes by phytochrome B downstream factor PIF was elucidated, along with the signal transduction mechanism of cryptochrome 2, which suppresses leaf senescence in response to blue light.

研究分野：植物生理学

キーワード：老化 エチレン フィトクロム クリプトクロム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の学術的背景

暗黒老化は植物の重要な環境適応機構の一つである。暗黒下では、光受容体フィトクロムの不活性化により、bHLH 型転写因子 PIF4、PIF5、PIF7 が機能して葉老化が誘導される。暗黒下においてエチレン内成量の上昇が老化を誘導すると考えられており、PIF5 の過剰発現によりエチレン合成遺伝子 ACS8 の発現が上昇することが報告されている。また、主要なエチレンシグナル伝達因子 EIN3 は、活性型フィトクロム B と結合して分解され、フィトクロムが不活性化すると安定化することが報告されている。一方、青色光応答による葉老化制御については不明な点が多く残されていた。

(2) これまでの研究成果と研究課題

フィトクロムを不活性化する赤外光照射により、ACS8 遺伝子が顕著に発現上昇することが見出された。さらに、ゲノム編集技術で作成した ACS8 遺伝子のノックアウト変異体ではフィトクロム不活性化によるエチレン内成量の上昇が顕著に阻害されることが示された。しかし、acs8 変異体および、シロイヌナズナがもつ 9 つの ACS 遺伝子のうち 8 個の ACS 遺伝子を欠損した acs 多重変異体では、同条件においてエチレン量が増加しないにも関わらず、葉老化が野生型と同様に誘導されることが確認された。このことから、暗黒下における葉老化制御には ACS8 以外の ACS 遺伝子が関与するエチレン依存的な葉老化制御と、ACS によるエチレン合成が関与しないエチレン非依存的な制御機構との、両方の可能性が考えられた。さらに、フィトクロムを不活性化した状態で青色光照射すると葉老化が抑制されたことから、フィトクロムとは異なる経路で葉老化が青色光シグナルによって制御されることが推測された。

2. 研究の目的

本研究は、暗黒下における葉老化制御機構における光受容体フィトクロムとクリプトクロムのシグナル伝達機構の解明を目的とした。特に、(1) フィトクロム下流におけるエチレン合成制御機構、(2) 9 遺伝子から構成される ACS 遺伝子ファミリーの機能解析、(3) 青色光応答による葉老化制御機構におけるクリプトクロムの役割、これらに焦点を当てた解析を行った。

3. 研究の方法

(1) ACS8 遺伝子の時空間的発現解析

ACS8 遺伝子のプロモーター配列 (ProACS8) 下でルシフェラーゼ (LUC) の発現をコントロールする LUC レポーター系統 (ProACS8:LUC) を作成した。この系統を用いて、フィトクロム不活性化による ACS8 発現の時空間的な変化を解析した。さらに、ProACS8 により -グルクロノシダーゼを発現する GUS レポーター系統 (ProACS8:GUS) を作成し、組織的な ACS8 遺伝子の発現部位を解析した。

(2) ACS8 プロモーターによる LUC トランジェント発現解析と ChIP-qPCR 解析

ACS8 遺伝子の発現制御機構を明らかにするために、PIF7 をエフェクター、ProACS8:LUC をレポーターとした葉肉プロトプラストによるトランジェントアッセイを行った。さらに、プロモーターのデリベーションシリーズを作成して、フィトクロム不活性化による遺伝子発現上昇に必要な G-box 配列領域を特定した。さらに、上記 G-box 配列に PIF7 が相互作用することを ChIP-qPCR 解析により確認した。

(3) エチレン合成欠損変異体によるエチレン合成欠損および葉老化制御機構の解析

エチレン合成に依存的・非依存的な老化経路を解析するために、シロイヌナズナゲノムに存在する全 9 個の ACS 遺伝子を欠損した九重変異体 (acs 九重変異体) を作出した。これまでに作出していた acs8 変異体、acs 八重変異体、acs 九重変異体の本葉において、フィトクロム不活性化によるエチレン放出量の変化と老化表現型を解析した。一方、エチレンシグナル伝達経路の主要因子 EIN3 の機能欠損変異体ではフィトクロム不活性化による葉老化の促進が強く阻害される。このことから、エチレンシグナル伝達による葉老化の促進制御機構が示唆された。そこで、フィトクロム不活性化によるエチレン誘導性遺伝子発現変動を RNA シーケンスにより解析した。

(4) 青色光応答による葉老化制御機構の解析

青色光応答による葉老化制御機構を解析するために、青色光受容体であるクリプトクロムの遺伝子機能欠損変異体とクリプトクロム過剰発現体とを用いて、青色光応答による葉老化の制御機構を解析した。さらに、本葉におけるクリプトクロムの下流遺伝子を特定するため、RNA シーケンスと GO 解析を実施した。また、クリプトクロムの下流因子として知られる PIF4/5 と HY5 の葉老化制御における機能解析も行った。

4. 研究成果

(1) ACS8 依存的なフィトクロム不活性化によるエチレン内成量の増加

シロイヌナズナのゲノムに存在する 9 個の ACS 遺伝子の中で、最も重要な ACS 遺伝子を特定するため、各 ACS 遺伝子の発現解析を行い、光環境に応答して発現が変動する 2 個の ACS 遺伝子

(ACS2 と ACS8) に絞り込んだ。さらに、ゲノム編集により作出した機能欠損型変異体を用いた本葉エチレン放出量の測定解析から、ACS8 遺伝子が最も重要であることが示唆された。

活性型フィトクロムは、bHLH 型転写因子 PIF と直接相互作用して転写活性を抑制的に制御すること、PIF4/5/7 は避陰応答に関与することが報告されている。そこで、これらの PIF 遺伝子の機能欠損変異体におけるエチレン量に測定を行った。その結果、pif7 変異体では顕著にフィトクロム不活性化によるエチレン内成量の増加が阻害されることが示された。上記の結果をまとめて、避陰応答におけるエチレン合成上昇には PIF7-ACS8 機能モジュールが大きく関すると考えられた。

一方、全ての ACS 遺伝子機能を欠損した ACS9 重変異体を作成し、この九重変異体ではフィトクロム不活性化によるエチレン内成量の上昇がほぼ完全に消失することを確認した。これらの変異体を用いて、エチレン合成促進の適応的意義を明らかにするため、暗黒下における葉老化の表現型を解析した。しかし予想に反して、エチレン合成を欠損した九重変異体でも暗黒下における葉老化の促進が野生型と同様に進行することが明らかになった。これらの結果から、暗黒下における葉老化の促進には、フィトクロム活性が消失することによるエチレン合成の増加を必要としない可能性が示された。

(2) フィトクロム下流における ACS8 転写制御

ACS8 遺伝子が PIF7 のターゲットである可能性を調べるため、葉肉プロトプラスト細胞を用いて ACS8 プロモーターのルシフェラーゼアッセイを実施した。まず、約 5kbp の ACS8 プロモーター下でルシフェラーゼを発現するベクター (ProACS8:LUC) に加えてプロモーター配列のデリションシリーズを作成し、ProACS8:LUC ベクターと PIF7 過剰発現ベクター (Pro35S:PIF7) と同時に葉肉プロトプラスト細胞に導入した。ルシフェラーゼ活性を測定した結果、ACS8 プロモーター上に bHLH 型転写因子の結合配列として知られる G-box 配列が含まれていれば、PIF7 を導入することでルシフェラーゼ活性は上昇することが示された。さらに ChIP-qPCR 解析により、この G-box 配列領域に PIF7 が結合することが示された。これら解析から、フィトクロムシグナル伝達因子である PIF7 が ACS8 遺伝子のプロモーターに相互作用した結果として、ACS8 遺伝子の転写が調節されることが明らかになった。

次に、植物内における ACS8 発現の時空間的パターンを解析するため、ProACS8:LUC ベクターを導入したシロイヌナズナ遺伝子組替体を作成して、フィトクロム活性を局所的に失活させることが可能なスポットライト赤外光 LED による微小部位照射実験を行った。その結果、ルシフェラーゼ発光は赤外光照射部位のみで誘導され、他の領域では発現しなかったことが確認された。これにより、ACS8 遺伝子の発現は器官自律的に誘導されており、光シグナル輸送の関与は示唆されなかった。この結果は、フィトクロムが PIF7 を介して直接的に ACS8 遺伝子の発現を制御するという仮説と矛盾しない。これにより、避陰応答におけるエチレン合成の促進制御機構に関与する新たなフィトクロムシグナル伝達機構の解明に向けて大きく前進した。

(3) 青色光応答による葉老化の抑制

フィトクロムが不活性化した状態でも、青色光照射によって葉老化の進行が阻害されることが光生理学実験により示された。この結果から、青色光シグナルがフィトクロムシグナルとは異なる経路で葉老化を制御することが示唆された。そこで主要な青色光受容体であるクリプトクロムに着目して、シロイヌナズナにおけるクリプトクロム変異体の葉老化における青色光応答を解析した。シロイヌナズナのゲノムには 2 つのクリプトクロム遺伝子 (CRY1 と CRY2) があるが、cry2 変異体では葉老化を阻害する青色光の効果が減少した。さらに、CRY2 過剰発現体では、わずかな青色光に応答して強い葉老化の阻害効果が認められた。これらの結果から、CRY2 によって葉老化が抑制されていることが示唆された。さらに、シーケンス解析による遺伝子発現解析の結果、クリプトクロム下流ではエチレンや老化に関連する遺伝子の発現が抑制されていたことから、CRY2 シグナル伝達制御による葉老化制御機構が示唆された。

(4) CRY2 下流における葉老化の抑制制御機構

フィトクロム不活性化によるエチレン放出量の増加は青色光照射によって阻害された。さらに cry1cry2 変異体ではこの阻害が認められなかったことから、クリプトクロム下流においてエチレン合成が制御されていると推測された。そこで、クリプトクロム下流の正のシグナル因子として報告された CIB ファミリー遺伝子の五重変異体をゲノム編集により作出した。しかし、この変異体では正常な葉老化表現型がみられた。次に、フィトクロムとクリプトクロムに共通する下流因子として、正のシグナル因子 HY5 と負のシグナル因子 PIF4/5 に着目した。これらの変異体の葉老化表現型における青色光応答を解析した。その結果、pif4pif5 二重変異体ではわずかな青色光に応答して強い葉老化の阻害効果を示し、一方 hy5 変異体では青色光感受性が減少していた。これらの結果より、CRY2 下流では HY5 と PIF4/5 が機能して葉老化を制御すると示唆された。これらの解析結果より、葉老化は CRY2 シグナル下流で青色光依存的に抑制されることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kozuka Toshiaki, Oka Yoshito, Kohzuma Kaori, Kusaba Makoto	4. 巻 191
2. 論文標題 Cryptochromes suppress leaf senescence in response to blue light in Arabidopsis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 2506 ~ 2518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiad042	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小塚俊明, 下谷祐貴, 坂本昌吾, 福田智代, 山谷浩史, 草場信
2. 発表標題 光受容体フィトクロムによるエチレン合成制御機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本昌悟, 小塚俊明, 福田智代, 山谷浩史, 草場信
2. 発表標題 暗黒誘導性エチレン生合成の制御機構の解析
3. 学会等名 第77回中国四国植物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小塚俊明, 坂本昌悟, 福田智代, 山谷浩史, 草場信
2. 発表標題 避陰応答によるエチレン合成制御機構の解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
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
---------	---------