

平成 31 年 4 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0254

研究課題名（和文）マイクロドメインにおける光受容体フォトリポピンシグナリングの解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Analysis of the signaling pathway of a phototropin photoreceptor in microdomain-like particles(Fostering Joint International Research)

研究代表者

末次 憲之（SUETSUGU, NORIYUKI）

京都大学・生命科学研究科・研究員

研究者番号：60514156

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 7,900,000円

渡航期間： 24ヶ月

研究成果の概要（和文）：青色光受容体フォトリポピンは光屈性、葉緑体運動、葉の発生など様々な光反応を制御する。フォトリポピン結合タンパク質であるRPT2とNCH1は葉緑体運動を制御することが知られているが、どのようにフォトリポピンがこれらタンパク質を制御するかはわかっていなかった。本国際共同研究では、RPT2とNCH1の機能に着目した。NCH1は青色光によるフォトリポピン依存のリン酸化制御を受けることがわかった。RPT2とNCH1は植物体内で互いに結合し、フォトリポピンとも結合する。さらにマス解析により、様々なフォトリポピンシグナリング因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フォトリポピンは植物における光合成反応の効率化を図りバイオマスの増産に必須な現象を制御する光受容体である。本研究で明らかになったフォトリポピンシグナリングの初期反応の分子メカニズムは、一つの光受容体が全く異なる現象を制御する分子機構を明らかにし植物学分野に新たな知見を与えるという学術的意義だけでなく、将来的な食糧不足の解決に不可欠である作物の効率の良いバイオマス増産法の開発研究にも重要な知見を与えるという社会的意義も持つ。

研究成果の概要（英文）：The blue light receptor phototropin regulates various light responses including phototropism, chloroplast movements, and leaf development. Two phototropin-interacting proteins RPT2 and NCH1 mediate phototropin-dependent chloroplast movements. However, how phototropins regulate these proteins remained to be determined. In this international collaborative program, I focus on the functional analysis of RPT2 and NCH1, we found that phototropins regulate blue-light-dependent dephosphorylation of NCH1. RPT2 and NCH1 interact with each other and with phototropins. Furthermore, we identified various candidate proteins that might be involved in phototropin signaling pathways.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：フォトリポピン

## 様式 F - 19 - 2

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) これまでの青色光受容体フォトリポピンのシグナリングメカニズムの理解

青色光受容体フォトリポピンは光屈性、葉の展開、葉緑体運動、気孔開口など光合成の効率化を促進する光応答反応を制御する。しかしながら、フォトリポピンがこれらの全く異なる光反応を制御するメカニズムはほとんど明らかになっていなかった。しかし、フォトリポピン結合タンパク質の解析から、その一端が明らかになりつつある。BTB/POZ ドメインを持つ NPH3/RPT2-like (NRL) タンパク質に属する二つのフォトリポピン結合タンパク質 NPH3 と RPT2 は光屈性や葉の展開など植物ホルモンオーキシンが関わる光反応を制御し、フォトリポピンの基質であるプロテインキナーゼ BLUS1 は、プロトンポンプの制御を介して気孔開口を制御する。これらの結果から、フォトリポピンは現象に応じて異なる結合タンパク質を利用することによって、各現象を制御することが示唆された。そのため、光屈性や気孔開口に関わる因子とは全く異なる結合タンパク質が葉緑体運動を制御することが示唆されていた。

#### (2) 葉緑体運動に関わる新規フォトリポピンシグナリング因子の発見

我々は葉緑体運動を制御するフォトリポピンタンパク質として NRL タンパク質である RPT2 とそのホモログ NCH1 を同定した(発表論文)。この結果から上記の予想と異なり、器官・組織レベルの現象である光屈性・葉の展開と細胞自律的な反応である葉緑体運動は、少なくともフォトリポピンシグナリングの初期反応において共通の分子メカニズムで制御されることが示唆された。RPT2 は光屈性・葉の展開と葉緑体運動を制御するが、NCH1 は葉緑体運動特異的であり、NPH3 は光屈性・葉の展開に特異的である。これら、3つの NRL タンパク質を詳細に解析すれば、フォトリポピンシグナリングの初期反応の分岐点のメカニズムが明らかになると考えられた(発表論文)。

### 2. 研究の目的

本国際共同研究では、世界の光受容体研究を最前線で推進している英国グラスゴー大学の John Christie 教授との共同研究により、NRL タンパク質 NPH3、RPT2、NCH1 を徹底的に解析することにより、フォトリポピンシグナリングの初期反応を明らかにすることを目的とする。Christie 教授がすでに NPH3 を解析していたので、本共同研究で申請者は特に葉緑体運動に関わる RPT2 と NCH1 の解析に集中した。シロイヌナズナの RPT2 と NCH1 だけでなく、コケ植物ゼニゴケの RPT2/NCH1 オルソログも並行して解析することにより、陸上植物に共通なフォトリポピンシグナリングの分子メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) RPT2 と NCH1 の信号発信ドメインの決定

RPT2 と NCH1 は冗長的に葉緑体運動を制御するホモログであるが、RPT2 は葉緑体運動だけでなく光屈性や葉の展開を制御できるという点で NCH1 と異なる。そこで、RPT2 と NCH1 の違いを決定する要因を明らかにするため、RPT2 と NCH1 のプロモータースワッピングあるいは RPT2 と NCH1 のドメインスワッピングラインを *rpt2nch1* 二重変異体バックグラウンドで作成し、その機能を調べる。タンパク質の発現や局在を解析するために、蛍光タンパク質 Citrine を N-末端につなげる。

#### (2) 青色光によるフォトリポピン依存の RPT2 と NCH1 の制御の解析

BLUS1 は青色光によりフォトリポピン依存でリン酸化されることが知られているが、NPH3 は逆に青色光によりフォトリポピン依存で脱リン酸化されることが知られている。RPT2 と NCH1 のリン酸化制御を調べるために、ウエスタンブロッティングで青色光によるバンドシフトを調べる。陸上植物におけるフォトリポピンシグナリングの保存性を調べるため、ゼニゴケの MpNCH1 に関しても同様の解析を行う。

#### (3) RPT2 と NCH1 結合タンパク質の同定

RPT2 と NCH1 がどのようにフォトリポピンの下流で光屈性、葉の展開や葉緑体運動を制御するか明らかにするため、上記の Citrine-RPT2 あるいは Citrine-NCH1 ラインを用いて、GFP 抗体カラムにより Citrine-RPT2 あるいは Citrine-NCH1 を精製し、それぞれ RPT2 あるいは NCH1 複合体をマスを解析することにより結合タンパク質を同定する。

### 4. 研究成果

#### (1) RPT2 と NCH1 の信号発信ドメインの決定

まず、RPT2 と NCH1 の制御する現象の違いが発現パターンの違いに起因するか調べるため、*rpt2nch1* 二重変異体バックグラウンドにおいて、RPT2 プロモーターで Citrine-NCH1 (RpN) あるいは NCH1 プロモーターで Citrine-RPT2 (NpR) を発現するプロモータースワッピングラインを作成し、その光屈性をコントロールである RPT2 プロモーターで Citrine-RPT2 (R) あるいは NCH1 プロモーターで Citrine-NCH1 (N) を発現するラインと比較した。NpR ラインでは Citrine-RPT2 タンパク質の検出はできなかったが(mRNA は検出できた)、光屈性の回復が見られた。しかし、RpN ラインでは Citrine-NCH1 タンパク質が R ラインにおける Citrine-RPT2 と同レベルで検出されたにも関わらず、光屈性を全く回復しなかった。この結果は、RPT2 と NCH1 の光屈性の制御における違いは各プロモーターによって制御される発現パターンの差異でなく、

そのタンパク質自身の違いにあることが示唆された。そこで、*RPT2* プロモーターで *RPT2* と *NCH1* の N-末端半分と C-末端半分を入れ替えたタンパク質 (*Citrine-RPT2-NCH1* あるいは *Citrine-NCH1-RPT2*) を発現するドメインスワッピングライン (RN あるいは NR) を作成し、同レベルで *Citrine* 融合タンパク質を発現するラインを選抜し、光屈性を調べた。*Citrine-NCH1-RPT2* を発現する NR ラインでは光屈性が回復したが、*Citrine-RPT2-NCH1* を発現する RN ラインでは、*NCH1* を発現する RpN ライン同様全く光屈性が観察できなかった。これらの結果から、光屈性の制御に必要なドメインは少なくとも *RPT2* の C-末端半分側に存在することが示唆された。現在さらに光屈性に必要な部分の絞り込みを行っている。

ゼニゴケの *RPT2/NCH1* のオルソログ *MpNCH1* と *Citrine* との融合タンパク質 *Citrine-MpNCH1* を発現する *rpt2nch1* 二重変異体は弱いながら光屈性を示した。この結果から、*RPT2/NCH1* の光屈性における機能は陸上植物で保存されていると考えられる。

## (2) 青色光によるフォトトロピン依存の *RPT2* と *NCH1* の解析

野生型の黄化芽生え (以降単に“芽生え”と呼ぶ) あるいは 2 週間白色光下で生育した植物体 (以降“ロゼット”と呼ぶ) における、青色光照射に応答した *NCH1* タンパク質の挙動 (量あるいはバンドシフトの変化) を *NCH1* 抗体によるウエスタンブロット法で調べた。芽生えとロゼット両方において、青色光照射したサンプルでは暗黒処理したサンプルと比べて *NCH1* バンドの移動速度の上昇がみられた。この光依存のバンドシフトがリン酸化によるものか調べるため、暗黒あるいは青色光処理した植物体からのタンパク質サンプルを脱リン酸化酵素で処理したところ、暗黒処理したサンプルのみ *NCH1* バンドの移動速度の上昇がみられたが、青色光処理したサンプルではさらなるバンドシフトは検出できなかった。これらの結果から、*NCH1* は暗黒下でリン酸化されており、青色光によって脱リン酸化することがわかった。この青色光による *NCH1* の脱リン酸化がフォトトロピンに依存しているか調べるため、フォトトロピン変異体 (*phot1*、*phot2*、*phot1phot2* 二重変異体) における *NCH1* のバンドシフトを調べた。その結果、*NCH1* の脱リン酸化はフォトトロピンに依存することが明らかとなり、さらに芽生えでは *phot1* だけに依存し、ロゼットでは *phot1* と *phot2* が冗長的に脱リン酸化を制御するという発現段階におけるフォトトロピン分子種の特異性が見られた。この特異性は芽生えでは *phot1* の発現量が多く、ロゼットでは *phot1* と *phot2* の両方が発現していることに起因すると考えられる。

所属研究室で行ったゼニゴケにおける青色光によりフォトトロピン依存でリン酸化状態の変化するタンパク質のプロテオーム解析の結果から、ゼニゴケ *MpNCH1* もシロイヌナズナの *NCH1* 同様青色光によりフォトトロピン依存で脱リン酸化することが示された。*MpNCH1* ノックアウト株はシロイヌナズナの *rpt2nch1* 二重変異体同様葉緑体運動に異常を持つ (発表論文)。プロテオーム解析で見つかった *MpNCH1* の C-末端側の 4 つのセリン残基をアラニンに置換したところ、野生型 *MpNCH1* と異なり、*MpNCH1* ノックアウト株の葉緑体運動の異常を回復することができなかった。この結果は、少なくともゼニゴケ *MpNCH1* では青色光によるフォトトロピン依存のリン酸化が葉緑体運動の制御に必須であり、陸上植物における *RPT2/NCH1* の機能と光制御が保存されていることを示唆する。

## (3) *RPT2* と *NCH1* 結合タンパク質の同定

*RPT2* プロモーターで *Citrine-RPT2* を発現する *rpt2* 変異体ライン、あるいは *NCH1* プロモーターで *Citrine-NCH1* を発現する *nch1* 変異体ラインを用いて、*RPT2* あるいは *NCH1* 結合タンパク質の同定を試みた。これらのラインでは変異体の形質が相補されており、*Citrine-NCH1* に関しては内在の *NCH1* 同様の青色光依存の脱リン酸化もみられた。そのため *Citrine-RPT2* と *Citrine-NCH1* は機能的であると考えられる。これら形質転換体のロゼットを暗黒処理したサンプルと青色光処理したサンプルからタンパク質を抽出し、GFP 抗体カラムを用いて *Citrine-RPT2* あるいは *Citrine-NCH1* 複合体を精製した。複合体をマス解析し、*RPT2* あるいは *NCH1* に結合するタンパク質を同定した。以前報告したように (発表論文)、*RPT2* と *NCH1* の結合と、フォトトロピンとの結合が確認された。さらに、独立した 2 実験で再現性を持って様々な結合タンパク質が検出されたので、これらのタンパク質の幾つかはフォトトロピンシグナリングにおける新規の因子の可能性がある。ロゼットのタンパク質で解析を行ったので、*RPT2* 結合タンパク質は葉の展開あるいは葉緑体運動、*NCH1* 結合タンパク質は葉緑体運動に関わる因子であると考えられる。現在、新規因子候補の *RPT2* あるいは *NCH1* との結合の確認を進めている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

Eiji GOTOH\*, Noriyuki SUETSUGU\*, Wataru YAMORI, Kazuhiro ISHISHITA, Ryota KIYABU, Masako FUKUDA, Takeshi HIGA, Bungo SHIROUCHI, Masamitsu WADA (\*These authors were equally contributed), Chloroplast accumulation response enhances leaf photosynthesis and plant biomass production, *Plant Physiol.*, 査読有、Vol. 178, No. 3, 2018, 1358-1369. doi:

10.1104/pp.18.00484.

Eiji GOTOH\*, Noriyuki SUETSUGU\*, Takeshi HIGA, Tomonao MATSUSHITA, Hirokazu TSUKAYA, Masamitsu WADA+ (\*These authors were equally contributed; +Corresponding authors), Palisade cell shape affects the light-induced chloroplast movements and leaf photosynthesis, *Sci. Rep.*, 査読有、 Vol. 8, No. 1, 2018, 1472. doi: 10.1038/s41598-018-19896-9.

<https://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/bitstream/2433/229084/1/s41598-018-19896-9.pdf>

John L. Bowman et al. (113 著者中 95 番目), Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome, *Cell*, 査読有、 Vol. 171, No. 2, 2017, 287-304. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.030.

<https://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/bitstream/2433/227477/1/j.cell.2017.09.030.pdf>

John M CHRISTIE\*, Noriyuki SUETSUGU, Stuart SULLIVAN, Masamitsu WADA, Shining light on the function of NPH3/RPT2-like proteins in phototropin signaling, *Plant Physiol.*, 査読有、 Vol. 176, No. 2, 2018, 1015-1024. doi: 10.1104/pp.17.00835.

Noriyuki SUETSUGU+, Masamitsu WADA (+Corresponding author), Two coiled-coil proteins, WEB1 and PMI2, suppress the signaling pathway of chloroplast accumulation response that is mediated by two phototropin-interacting proteins, RPT2 and NCH1, in seed plants, *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有、 Vol. 18, No. 7, 2017, E1469. doi: 10.3390/ijms18071469.

<https://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/bitstream/2433/226673/1/ijms18071469.pdf>

Masahiro KASAHARA, Noriyuki SUETSUGU, Yuki URANO, Chiaki YAMAMOTO, Mikiya OHMORI, Yuki TAKADA, Shujiro OKUDA, Tomoaki NISHIYAMA, Hidetoshi SAKAYAMA, Takayuki KOHCHI, Fumio TAKAHASHI, An adenylyl cyclase with a phosphodiesterase domain in basal plants with a motile sperm system, *Sci. Rep.*, 査読有、 Vol. 6, 2016, 1472. doi: 10.1038/srep39232.

Noriyuki SUETSUGU, Takeshi HIGA, Masamitsu WADA, Ferns, mosses and liverworts as model systems for light-mediated chloroplast movements, *Plant Cell Environ.*, 査読有、 Vol. 40, No. 11, 2017, 2447-2456. doi: 10.1111/pce.12867.

NORIYUKI SUETSUGU+, Atsushi TAKEMIYA, Sam-Geun KONG, Takeshi HIGA, Aino KOMATSU, Ken-ichiro SHIMAZAKI, Takayuki KOHCHI, Masamitsu WADA+ (+Corresponding authors), RPT2/NCH1 subfamily of NPH3-like proteins is essential for the chloroplast accumulation response in land plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 査読有、 Vol. 113, No. 37, 2016, 10424-10429. doi: 10.1073/pnas.1602151113.

<https://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/bitstream/2433/216419/1/pnas.1602151113.pdf>

[学会発表](計2件)

Noriyuki SUETSUGU, Stuart SULLIVAN, Takayuki KOHCHI, John M CHRISTIE, NCH1 is a key factor that specifically mediates phototropin-dependent chloroplast accumulation movement in land plants, *International Symposium on Plant Photobiology, 2018*, Matsue, Japan, Jan 15-18, 2018.

Noriyuki SUETSUGU, Stuart SULLIVAN, Takayuki KOHCHI, John M CHRISTIE, RPT2 and NCH1 are key factors for the blue-light receptor phototropin-signaling pathway in land plants, *The Society of Experimental Biology (SEB) meeting, From proteome to phenotype: Role of post-translational modifications*, Edinburgh, UK, Dec 11-13, 2017.

〔図書〕(計0件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名： John M. Christie

ローマ字氏名： John M. Christie

所属研究機関名： University of Glasgow

部局名： Institute of Molecular, Cell & Systems Biology

職名： Professor

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。