

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 24 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570058

研究課題名（和文） 光屈性を制御するフォトトロピンシグナル伝達経路の解析

研究課題名（英文） Analysis of the phototropin signaling pathways controlling the phototropic responses.

研究代表者

酒井 達也 (SAKAI TATSUYA)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：10360554

研究成果の概要（和文）：植物の光屈性誘導機構を解明すべく研究を行った。光屈性を誘導する光受容体フォトトロピンは、ユビキチンプロテアゾーム経路によって暗条件下分解されている光屈性シグナル伝達因子 RPT2 のタンパク質安定化を誘導することを明らかにした。また光屈性に働くオーキシン輸送体 PIN の機能解析を行い、PIN1、PIN3、PIN7 に依存した光屈性誘導機構を明らかにし、さらに非依存的分子機構の存在を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have studied about the molecular mechanisms controlling the phototropic responses in plants. Our analyses have indicated that the blue-light photoreceptor phototropin stabilizes the signaling transducer RPT2 proteins, which are required for phototropism and degraded under the dark condition. Furthermore, we have revealed that PIN auxin efflux carriers are necessary for pulse-induced but not continuous light-induced phototropism in Arabidopsis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 23 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 24 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物、光、オーキシン、環境応答、分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

植物地上部が光をより多く吸収するために、成長方向を光にむける性質を光屈性という1)。光屈性は、オーキシンが軸器官の陰側に輸送され蓄積することによって光照射側と陰側の細胞伸長差が生まれ、その結果、器官全体の屈曲が生じる現象と考えられている。フォトトロピン（phot）は光源方向の認識に働く青色光受容体で、タンパク質キナーゼである。phot 光受容体は細胞膜に局在する PIN や ABCB とよばれるオーキシン輸送体ファミリーの機能を調節し、オーキシン分布パタ

ーンを変化させると考えられているが、未だその詳細は明らかになっていない。

我々は phot シグナル伝達経路解明を目指して研究を行い、phot の下流で働く光屈性シグナル伝達因子 RPT2 を同定した。RPT2 は N 末側に BTB ドメイン、C 末側に coiled-coil ドメイン、2 つのタンパク質相互作用に関与したドメインを有し、類似のタンパク質構造を持つ光屈性シグナル伝達因子 NPH3 とともに NRL（NPH3、RPT2-Like）ファミリーに属している。RPT2 は NPH3 および phot1 と生体内で複合体を形成しており、RPT2 及

び NPH3 は phot1 と他の何らかのタンパク質をつなぐアダプタータンパク質として機能することが示唆される。そこで我々は本研究において、phot の生化学的機能、特に NPH3、RPT2 との関係に焦点を絞り解析を行った。本研究をもとに、最終的には phot シグナリングがどのような分子機構によりオーキシン不均等勾配及び光屈性を誘導するのかについて明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

植物ホルモン・オーキシンは、植物細胞の伸長・分裂・分化・機能、様々な制御を行なっている。オーキシン分布パターンの調節機構は、植物形態形成のモルフォゲンとして唯一知られているオーキシンの機能調節に必須の分子機構だが、その詳細は未だ明らかになっていない。本研究は植物の環境刺激に応答したオーキシン分布調節機構の一つとして光屈性に着目し、その分子機構の解明を行った。具体的には、光屈性を誘導する光受容体フォトトロピンが、どのようなシグナル伝達経路を介してオーキシン輸送体の機能を制御し、オーキシン不等分布を誘導するのかを明らかにすべく研究を行った。本研究によって、オーキシンを介した植物細胞の機能調節メカニズムの理解に貢献することを目指した。

3. 研究の方法

(1) phot1 による RPT2 転写後発現誘導機構は、これまでの研究から phot1 シグナリングによる RPT2 タンパク質の安定化、もしくは RPT2 遺伝子の翻訳領域に依存した翻訳誘導のどちらかによってなされていると考えられた。タンパク質分解酵素阻害剤を用いた解析からは、暗条件下での RPT2 タンパク質の積極的な分解の可能性は示唆されていない。タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド処理、標識アミノ酸処理などにより、青色光照射による RPT2 タンパク質蓄積が新規タンパク質合成に依存するか否かを確認した。転写後発現誘導に必要な RPT2 翻訳領域を限定すべく、様々な大きさに分断した RPT2 の翻訳領域を GUS 及び GFP レポーター遺伝子に融合し、これをシロイヌナズナに遺伝子導入する。形質転換体の青色光照射に応答した GUS 活性及び GFP 蛍光強度の増加が RPT2 翻訳領域のどの部位に依存するか明らかにする

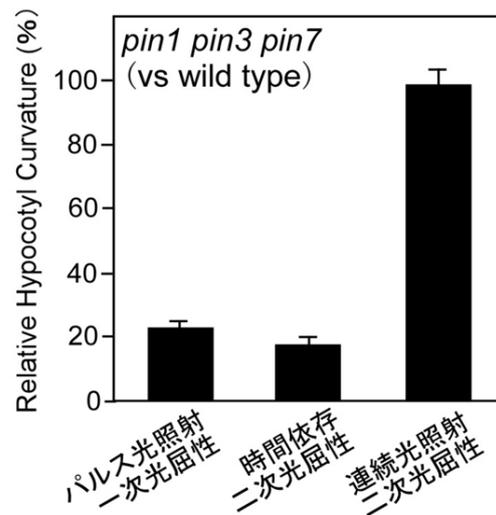
(2) フォトトロピンシグナル伝達経路下流で働くオーキシン輸送体を同定するため、オーキシン輸送体 PIN、ABCB の網羅的な機能解析を行った。各輸送体遺伝子シングル突然変異体、多重変異体の表現型を観察し、光屈性への関与を明らかにした。さらに詳細な光屈

性反応を観察するため、パルス光照射誘導の胚軸一次光屈性の解析を行った。また赤色光前照射の有り無しの条件下で光屈性を誘導し、赤色光前照射の光屈性促進効果を誘導する分子機構についても検討した。

4. 研究成果

(1) RPT2 は暗条件下ユビキチン化されており、プロテアゾーム依存的に分解されること、青色光照射によって phot 依存的に安定化することが明らかになった。YFP 融合タンパク質を用いた形質転換体発現解析の結果、RPT2 タンパク質分解及び phot1 によるタンパク質安定化は、どちらも RPT2 C 末端領域によって調節されていることが明らかになった。また興味深いことに、ユビキチン遺伝子の過剰発現が根の光屈性異常を引き起こすこと、この株においては RPT2 タンパク質の不安定化によって発現が著しく抑制されていることが明らかになった（未発表データのため、図を示さない）。

(2) *pin1*, *pin3*, *pin7* シングル突然変異体はそれぞれ連続光照射誘導の胚軸光屈性は野生型同様の屈曲を示したが、一方、パルス光照射誘導の光屈性は異常を示した。また *pin1 pin3 pin7* 三重変異体でも同様の結果を示した。その他の PIN の光屈性における機能は検出されなかった。このことから、PIN はパルス光照射の情報を記憶して光屈性を誘導する分子機構に必要なオーキシン輸送体であるが、連続光照射による光屈性誘導には必要ないことが明らかになった。すなわち、PIN 非依存的な光屈性誘導機構の存在を示唆する結果だった。その他の *pin2*, *pin4*, *pin5*, *pin6*, *pin8* については、今回の実験では光屈性誘導への関与を検出することはできなかった。本研究成果は、Plant Physiology 誌



及び Plant Signaling Behavior 誌にて発表された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Akiko Harada, Atsushi Takemiya, Shin-ichiro Inoue, Tatsuya Sakai and Ken-ichiro Shimazaki (2013) Role of RPT2 in leaf positioning and flattening and a possible inhibition of phot2 signaling by phot1. *Plant Cell Physiol.* 54, 36-47. DOI: 10.1093/pcp/pcs094. 査読有。
- ② Ken Haga and Tatsuya Sakai (2012) Differential roles of auxin efflux carrier PIN proteins in hypocotyl phototropism of etiolated Arabidopsis seedlings depend on direction of light stimulus. *Plant Signaling Behavi.* 8. DOI: 10.4161/psb.22556. 査読有。
- ③ Ken Haga and Tatsuya Sakai (2012) PIN auxin efflux carriers are necessary for pulse-induced but not continuous light-induced phototropism in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 160, 763-776. DOI: 10.1104/pp.112.202432. 査読有。
- ④ Tatsuya Sakai and Ken Haga (2012) Molecular genetic analysis of phototropism in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 53, 1517-1534. DOI: 10.1093/pcp/pcs111. 査読有。
- ⑤ Kiyoshi Mashiguchi, Keita Tanaka, Tatsuya Sakai, Satoko Sugawara, Hiroshi Kawaide, Masahiro Natsume, Atsushi Hanada, Takashi Yaeno, Ken Shirasu, Hong Yao, Paula McSteen, Yunde Zhao, Ken-ichiro Hayashi, Yuji Kamiya and Hiroyuki Kasahara (2011) The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 18512-18517. DOI: 10.1073/pnas.1108434108. 査読有。
- ⑥ Etsuko Tsuda, Haibing Yang, Takeshi Nishimura, Yukiko Uehara, Tatsuya Sakai, Masahiko Furutani, Tomokazu Koshiba, Masakazu Hirose, Hiroshi Nozaki, Angus S. Murphy, and Ken-ichiro Hayashi. (2011) Alkoxy-auxins are selective inhibitors of auxin transport mediated by PIN, ABCB and AUX1 transporters. *J. Biol. Chem.* 286, 2354-2364. DOI: 10.1074/jbc.M110.171165. 査読有。

[学会発表] (計 10 件)

- ① Tatsuya Sakai and Ken Haga (2013) Phototropism and auxin transports.

Tropism symposium, Japanese Society of Plant Physiology, Okayama. 岡山大学。2013年3月21日。

- ② 原田明子、武宮淳史、井上晋一郎、酒井達也、島崎研一郎 (2013) RPT2 は phot1 による葉の定位と平滑化に関与している。日本植物生理学会年会、岡山。岡山大学。2013年3月21日。
 - ③ 芳賀健、酒井達也 (2013) シロイヌナズナ胚軸の一次正光屈性および二次正光屈性におけるオーキシン排出輸送体 PIN の役割。日本植物生理学会、岡山。岡山大学。2013年3月21日。
 - ④ Ken Haga and Tatsuya Sakai (2012) PIN Auxin Efflux Carriers are Necessary for Pulse-Induced but not Continuous-Light-Induced Phototropism in Arabidopsis. *Auxin 2012*, Hawaii, USA. 2012年12月10日。
 - ⑤ Ken Haga, Tatsuya Sakai (2012) PIN-mediated hypocotyl phototropism in Arabidopsis. The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing. Nara, Japan. 奈良県新公会堂。2012年3月12日。
 - ⑥ 酒井達也、榎田(間山) 智子、上原由紀子、松井南 (2012) 光屈性シグナル伝達因子 RPT2 の phot1 による発現制御機構の解析。日本植物生理学会、京都。京都産業大学。2012年3月16日。
 - ⑦ 芳賀健、酒井達也 (2012) オーキシン排出体 PIN を介したシロイヌナズナ胚軸の光屈性。日本植物生理学会、京都。京都産業大学。2012年3月16日。
 - ⑧ Tatsuya Sakai, Tomoko Tsuchida-Mayama, Akitomo Nagashima, Ken Haga, Akiko Hanada, Yukiko Uehara, Kenishiro Hayashi, Shinjiro Yamaguchi (2011) Role of auxin and gibberellin in the phototropic response. Asia and Oceania Conference for Photobiology. Nara, Japan. Invited. 奈良県新公会堂。2011年7月30日。
 - ⑨ 芳賀健、酒井達也 (2011) オーキシン輸送体PINを介したシロイヌナズナ胚軸の光屈性。日本植物生理学会年会。仙台。東北大学。2011年3月11日。
 - ⑩ 酒井達也、榎田(間山) 智子、上原由紀子、松井南 (2011) 光屈性シグナル伝達因子 RPT2 の光による発現制御機構の解析。日本植物生理学会年会。仙台。東北大学。2011年3月11日。
- [図書] (計 2 件)
- ① 酒井達也、芳賀健 (2012) 光屈性におけるオーキシン輸送制御。植物の生長調節 47、85-92。日本植物化学調節学会。
 - ② 酒井達也 (2010) 光屈性におけるオーキシン

ンシグナリング。植物のシグナル伝達、柿本辰男・高山誠司・福田裕穂・松岡 信 編。共立出版。

〔その他〕

ホームページ等

<http://wiki.livedoor.jp/tsakai1969/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 達也 (SAKAI TATSUYA)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：10360554