

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22120002

研究課題名（和文）光に対する植物の細胞応答機構の解析

研究課題名（英文）Analysis on plants' cellular responses to light

研究代表者

長谷 あきら（NAGATANI, akira）

京都大学・理学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：40183082

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 127,100,000円

研究成果の概要（和文）：植物は、植物に特有の光受容体によって光情報を感知している。本研究では、分子・細胞レベルの光応答の個体レベルへの統合機構を理解するため、従来の手法に加え、レーザー顕微手術、などを利用した新しいタイプの研究を推進した。その結果、1) 光受容体の分子構造と機能、2) 光受容体のシグナルの細胞内伝達機構、3) 陰刺激に対する芽生え各部の応答と器官間シグナル伝達、4) 細胞変形に対する細胞応答、などの項目について、様々な知見が得られ、植物の光刺激や他の刺激に対する分子機構についての理解が進んだ。

研究成果の概要（英文）：Plant perceives light environments through multiple photoreceptors characteristic to plants. This study aimed to reveal the mechanisms by which molecular and cellular responses to light are integrated into the whole plant responses. For this purpose, new techniques such as laser micro-dissection were employed in addition to conventional methods. We investigated subjects such as 1) structure/function relationships in photoreceptor molecules, 2) intra-cellular light signal transduction mechanisms, 3) differential responses of various parts of the seedling and underlying mechanisms, 4) cellular responses to deformation of the cell. The work deepened our understanding about the molecular mechanisms for the plant responses to light and other stimuli.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：環境応答 光受容体 植物 細胞 シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

植物は、植物に特有の光受容体によって光情報を感知している。その分光受容体分子の構造や機能、あるいは細胞内しぐなる伝達の仕組みに関しては、様々なことが明らかにされてきた。一方、光受容体から発信されるシグナルが、細胞レベルの応答を経て、個体の応答としてどのように統合されるのか、その分子機構については、研究が立ち遅れている。そこで本研究では、新学術領域研究の枠組みを利用し、上記の目的に適った新技術を開発し、分子・細胞レベルの光応答が、個体としての応答へ統合されるまでの各段階について研究を展開することとした。

### 2. 研究の目的

本研究では、分子・細胞レベルの光応答の個体レベルへの統合機構を理解するため、これまでの実績に基づき研究をさらに深めるとともに、レーザー顕微鏡手術、一細胞遺伝子発現計測、質量顕微鏡などを利用した新しいタイプの研究を強力に進め、この統合過程で中心的役割を果たす組織/器官間シグナル伝達過程に関する新奇性の高い成果を上げることを目指す。また、これをもって、領域が目指す新分野開拓の先駆けとする。加えて、我々が最近発見した、細胞変形に対する細胞応答や力学応答と光応答のクロストークに関する解析を進める。これらの研究により、植物の環境感覚に関する新奇性・独創性の高い成果をあげることを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 光受容体の構造と機能、細胞内シグナル伝達：研究対象とした光受容体分子は、フィトクロム、フォトトロピン、細胞内シグナル伝達機構では、フィトクロム、フォトトロピン関連とプラスチドシグナル関連について、モデル植物であるシロイヌナズナを材料に、変異体、遺伝子導入植物などを用いた分子生物学的解析、細胞生物学的解析、生化学的解析、生理学的解析などを総合的に進めた。

(2) 光受容体機能の組織特異性：主にフォトトロピンによる葉や組織の形態の制御機構について、フォトトロピンを組織特異的に発現する形質転換シロイヌナズナを各種作出し、得られた植物によるフォトトロピン応答を比較した。また、同じ領域の公募研究代表者・浦和博子博士(基生研)らと共同で、博士らが開発した赤外線レーザーによる局所的遺伝子発現誘導法(IR-LEGO)について、光屈性研究への応用可能性について検討した。

(3) 光応答の器官特異性と器官間シグナル伝達：部分照射装置を用いる従来のアプローチに加えて、フェムト秒レーザーによる顕微鏡手術法、微細組織片における遺伝子発現解析法による解析を行った。対象とした光応答は

避陰応答(フィトクロム)による胚軸伸長促進、遺伝子発現制御と、青色光(フォトトロピン)による光屈性である。

フェムト秒レーザーについては、同じ領域の計画研究代表者・細川陽一郎博士(奈良先端大)らの協力を仰ぎ、周りの組織への影響を最小限にシロイヌナズナの芽生えに穿孔する方法を開発した。微細組織片の解析においては、計画研究代表者・神原秀記博士(日立製作所)らのグループと新技術を開発し、解析に用いた。

(4) 光刺激に対する代謝応答の空間構造の解析：シロイヌナズナの光による脱黄化の初期過程(光照射開始後24時間以内)について、理化学研究所の平井優美博士らと共同で、ワイド・ターゲット型の質量分析により調べた。また、これと並行して、同じ領域の計画研究代表者・高橋勝利博士(産総研)が開発したイメージング質量分析器を用いて、代謝物の変動の空間分布を網羅的に調べた。さらに、ここから得た情報をもとに、発見された代謝物応答について、変異体なども用いた分子生物学的な解析を進めた。

(5) 細胞の外力応答と光応答のクロストーク：まず同じ領域の計画研究代表者・三村徹郎博士(神戸大)の連携研究者である西村いくこ博士(京都大)の協力を得て、光刺激や力学刺激に対する細胞応答を、同博士が保有する各種のGFP標識植物を用いて探索した。

また、その結果見出された外力に対する細胞応答について、顕微鏡ステージ上で細胞を圧迫する器具を組み立て、これを用いた各種実験を行った。また、フィトクロム分子種phyAが外力に対し光依存的に応答することが分かったので、単色光などを用いた光生理学解析を行った。

さらに、別のタイプの外力として、フェムト秒レーザー刺激に対する細胞応答を、計画研究代表者・細川陽一郎博士(奈良先端大)と協力して進めた。

### 4. 研究成果

(1) 光受容体の構造と機能、細胞内シグナル伝達：フィトクロムAとフィトクロムBの間の顕著な機能分化に注目し、両者の間でドメイン交換した各種キメラ・フィトクロムを遺伝子導入シロイヌナズナで発現させ、その生理機能を比較した。その結果、フィトクロムA分子の異なる領域が、フィトクロムAがもつ異なる特徴と対応していることが分かった(Oka et al., 2012)。またフォトトロピンの分子内に変異を導入し、LOV1とLOV2ドメインの間に存在するヘリックスが活性制御に重要であることを示し(Aihara et al., 2012)。これがトマトでも成り立つことを示した(Sharma et al., 2014)。さらに、計画研究代表者・徳富哲博士(大阪府大)らのグループによるクラミドモナスのフォト

トロピンの構造解析において、フォトトロピンの調整を担当した(Okajima et al., 2014)。また、細胞膜で働くとしてされているフォトトロピンの細胞内分布を決定する分子内領域を特定し(Kong et al., 2013b)。フォトトロピンが葉緑体胞膜にも結合することを示した(Kong et al., 2013a)。また、フィトクロム A に核移行シグナルを付加し、その核内機構について調べた(Toledo-Ortiz et al., 2010)。

光応答の細胞内伝達機構については、光受容体の二重変異体などを駆使し、フォトトロピンによるとされていた光による葉の偏平化について、フィトクロム B も重要な役割を果たすことを示した(Kozuka et al., 2013)。また光による花芽形成制御に異常をきたす変異体を単離し、その原因タンパク質がフィトクロムと相互作用することを示した(Endo et al., 2013)。この他に、フォトトロピンが *in vitro* で小胞輸送に関わる ARF1 タンパク質と相互作用することを見出し、これがフォトトロピンの細胞内シグナル伝達にどのように関わるかを、分子生物学的手法によって調べた(Suzuki 未発表)。また、色素体が核内における遺伝子発現を制御する機構について、GUN1, GUN5 タンパク質に注目した分子生物学的解析を進めた(Mochizuki 未発表)。

(2) 光受容体機能の組織特異性：フォトトロピンはロゼット葉において、葉の偏平化と柵状組織の分化を促進する。これらのフォトトロピン機能が、葉内のどの組織に発現するフォトトロピンによるのかを明らかにするため、フォトトロピンを組織特異的に発現する植物を遺伝子操作により作出し、その解析を行うことで、偏平化は表皮細胞の、柵状組織は葉肉組織のフォトトロピンが制御していることが明らかとなった(Kozuka et al., 2011)。また、局所的に誘導したフォトトロピンがどのような生理作用を示すかを調べるため、公募研究代表者・浦和博士(基生研)らと共同で、フォトトロピンを特定の表皮細胞で誘導することに成功した(Yamamoto et al., 未発表)。

(3) 光応答の器官特異性と器官間シグナル伝達：光刺激に対する遺伝子発現応答を、細胞・組織毎に詳しく調べるため、計画研究代表者・神原秀記博士(日立製作所)らのグループと共同で技術開発を進め、100  $\mu\text{m}$  以下のサイズの組織片における遺伝子発現パターンを RNA-seq 法により網羅的に調べる技術を開発した(Kajiyama et al., 2015)。さらに、この技術を応用し、陰刺激に対するシロイヌナズナの各部位の遺伝子発現応答を調べ、従来いわれていた遺伝子発現応答の多くは、子葉ではなく茎頂/胚軸で起こること、これらの発現応答は、子葉における光受容によって制御されることなどを示した(Nito et al., 2015)。また、青色光による光屈性について、

シロイヌナズナ芽生えに部分照射を行う装置を開発し、シロイヌナズナの芽生えの光屈性では、光受容と屈曲が近接した場所で起こることなどを示した(Yamamoto et al., 2014)。

また、シロイヌナズナ芽生えの避陰応答による胚軸伸長促進について、部分照射実験から子葉が光受容部位であること、24 時間の明暗サイクルにおいて、夕方の刺激を受けて胚軸伸長が促進されるのは明け方であることなどを見出した。さらに、計画研究代表者・細川陽一郎博士(奈良先端大)らと開発したレーザー穿孔法を用いて、この反応においては、子葉と胚軸の維管束による接続が重要であることを、またオーキシンの添加実験によって、子葉から胚軸へオーキシン以外のシグナルが比較的ゆっくりと伝わることなどを見出した(Kobayashi et al. 未発表)。

(4) 光刺激に対する代謝応答の空間構造の解析：計画研究代表者・高橋勝利博士(産総研)による植物組織切片におけるイメージング質量分析の手法開発に協力し、シロイヌナズナの黄化芽生えの脱黄化過程における代謝物の変動をイメージング質量分析法で調べた(Takahashi et al., 2015)。また、これを補完する目的で、理化学研究所の平井優美博士らと共同で、ワイド・ターゲット型の質量分析を行い、脱黄化過程における代謝物変動を調べた(Kozuka 未発表)。また、脱黄化過程のイメージング質量分析による解析により、子葉における脂質の分解と糖代謝の変動が顕著であることが分かったので、変異体や生化学的手法を用いてこの過程をさらに詳しく調べた(Kozuka 未発表)。

(5) 細胞の外力応答と光応答のクロストーク：計画研究代表者・三村徹郎博士(神戸大)の連携研究者である西村いくこ博士(京都大)の協力を得て、光刺激や力学刺激に対する細胞応答を探索し、外力に応じて、一過的に細胞質ゾルの動きが低下することを見出した(Yu 未発表)。さらに、phyA は細胞質で光依存的に顆粒状の分布を示すことが知られていたが、この応答は外力による細胞変形に依存して生じることを見出した(Kobayashi 未発表)。また、計画研究代表者・細川陽一郎博士(奈良先端大)に協力して、シロイヌナズナの胚軸断片にフェムト秒レーザーで外から衝撃波を加えた場合に起こる胚軸の微細な屈曲を観察し、それが胚軸の状態を反映する可能性を示した(Takenaka et al., 2014)。

## 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 21 件)

Nito K, Kajiyama T, Unten-Kobayashi J, Fujii A, Mochizuki N, Kambara H, and

Nagatani A (2015) Spatial regulation of the gene expression response to shade in Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Physiol.* 56, 1306-1319. 査読有. doi: 10.1093/pcp/pcv057.

Kajiyama T, Fujii A, Arikawa K, Habu T, Mochizuki N, Nagatani A, and Kambara H (2015) Position-specific gene expression analysis using a microgram dissection method combined with on-bead cDNA library construction. *Plant Cell Physiol.* 56, 1320-1328. 査読有. doi: 10.1093/pcp/pcv078.

Takahashi K, Kozuka T, Anegawa A, Nagatani A, and Mimura T (2015) Development and application of high resolution imaging mass spectroscope for the study of plant tissues. *Plant Cell Physiol.* 56, 1329-1338. 査読有. doi: 10.1093/pcp/pcv083.

Sharma S, Kharshiing E, Srinivas A, Zikihara K, Tokutomi S, Nagatani A, Fukuyama H, Bodanapu R, Behera RK, Sreelakshmi Y, and Sharma R (2014) A dominant mutation in the light-oxygen and voltage2 domain vicinity impairs phototropin1 signaling in tomato. *Plant Physiol.* 164, 2030-44. 査読有. doi: 10.1104/pp.113.232306.

Van Buskirk EK, Reddy AK, Nagatani A, and Chen M (2014) Photobody localization of phytochrome B is tightly correlated with prolonged and light-dependent inhibition of hypocotyl elongation in the dark. *Plant Physiol.* 165, 595-607. 査読有. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.236661>

Takenaka M, Iino T, Nagatani A, and Hosokawa Y (2014) Nanoscale bending movement of biological micro-object induced by femtosecond laser impulse and its detection by atomic force microscopy. *Appl. Phys. Express* 7, 087002. 査読有. doi: 10.7567/APEX.7.087002.

Ibata H, Nagatani A, and Mochizuki N (2014) Perforated-tape epidermal detachment (PED): A simple and rapid method for isolating epidermal peels from specific areas of Arabidopsis leaves. *Plant Biotechnol.* 30, 497-502. 査読有. doi: 10.5511/plantbiotechnology.13.0903b

Mano S, Nakamura T, Kondo M, Miwa T, Nishikawa SI, Mimura T, Nagatani A, and Nishimura M (2014) The Plant Organelles

Database 3 (PODB3) update 2014: Integrating electron micrographs and new options for plant organelle research. *Plant Cell Physiol.* 55:e1(1-9). 査読有. doi: 10.1093/pcp/pct140.

Okajima K, Aihara Y, Takayama Y, Nakajima M, Kashojiya S, Hikima T, Oroguchi T, Kobayashi A, Sekiguchi Y, Yamamoto M, Suzuki T, Nagatani A, Nakasako M, and Tokutomi S (2014) Light-induced conformational changes of LOV (Light Oxygen Voltage-sensing domain) 1 and LOV2 relative to the kinase domain and regulation of kinase activity in *Chlamydomonas phototropin*. *J. Biol. Chem.* 289, 413-422. 査読有. doi: 10.1074/jbc.M113.515403.

Yamamoto K, Suzuki T, Aihara Y, Haga K, Sakai T, and Nagatani A (2014) The phototropic response is locally regulated within the topmost light-responsive region of the Arabidopsis thaliana seedling. *Plant Cell Physiol.* 55, 497-506. 査読有. doi: 10.1093/pcp/pct184.

Endo M, Tanigawa Y, Murakami T, Araki T, and Nagatani A (2013) PHYTOCHROME-DEPENDENT LATE-FLOWERING accelerates flowering through physical interactions with phytochrome B and CONSTANS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 18017-18022. 査読有. doi: 10.1073/pnas.1310631110.

Chen J, Sonobe K, Ogawa N, Masuda S, Nagatani A, Kobayashi Y, and Ohta H (2013) Inhibition of Arabidopsis hypocotyl elongation by jasmonates is enhanced under red light in phytochrome B dependent manner. *J. Plant Res.* 126, 161-168. 査読有. doi: 10.1007/s10265-012-0509-3.

Kong SG, Suetsugu N, Kikuchi S, Nakai M, Nagatani A, and Wada M (2013a) Both phototropin 1 and 2 localise on the chloroplast outer membrane with distinct localisation activity. *Plant Cell Physiol.* 54, 80-92. 査読有. doi: 10.1093/pcp/pcs151.

Kozuka T, Suetsugu N, Wada M, and Nagatani A (2013) Antagonistic regulation of leaf flattening by phytochrome B and phototropins in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 54, 69-79. 査読有. doi: 10.1093/pcp/pcs134.

Kong SG, Kagawa T, Wada M, and Nagatani

A (2013b) A carboxy-terminal membrane association domain of phototropin 2 is necessary for chloroplast movement. *Plant Cell Physiol.* 54, 57-68. 査読有. doi: 10.1093/pcp/pcs132.

Oka Y, Ono Y, Toledo-Ortiz G, Kokaji K, Matsui M, Mochizuki N, and Nagatani A (2012) Arabidopsis phytochrome A is modularly structured to integrate the multiple features that are required for a highly sensitized phytochrome. *Plant Cell*, 24, 2949-2962. 査読有. doi: 10.1105/tpc.111.094201.

Park E, Park J, Kim J, Nagatani A, Lagarias JC, and Choi G (2012) Phytochrome B inhibits binding of Phytochrome-Interacting Factors to their target promoters. *Plant J.* 72, 537-546. 査読有. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05114.x.

Aihara Y, Yamamoto T, Okajima K, Yamamoto K, Suzuki T, Tokutomi S, Tanaka K, and Nagatani A (2012) Mutations in the N-terminal flanking region of the blue-light sensing domain LOV2 disrupt its repressive activity on the kinase domain in the *Chlamydomonas* Phototropin. *J Biol. Chem.* 287, 9901-9909. 査読有. doi: 10.1074/jbc.M111.324723.

Kozuka T, Kong SG, Doi M, Shimazaki K, and Nagatani A (2011) Tissue-autonomous promotion of palisade cell development by phototropin 2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 3684-95. 査読有. doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.085852>.

Toledo-Ortiz G, Kiryu Y, Kobayashi J, Kim Y, Nam HG, Mochizuki N, and Nagatani A (2010) Subcellular sites of the signal transduction and degradation of phytochrome A. *Plant Cell Physiol.* 51, 1648-60. 査読有. doi: 10.1093/pcp/pcq121.

④ Nagatani A (2010) Phytochrome: structural basis for its functions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 565-570. 査読有. doi: 10.1016/j.pbi.2010.07.002.

[学会発表](計 73 件)

Nagatani A, Spatiotemporal regulation of the hypocotyl elongation in response to the shade stimulus, The International Symposium on Plant Photobiology (ISPP 2015), Austin, TX, USA, May 26-31, 2015.

招待講演

Nagatani A, Inter-organ communications underlying the whole plant response to the shade, 16th International Congress on Photobiology, Cordoba, Argentina, Sep 8-12, 2014. 招待講演

Nagatani A, Spatio-temporal regulation of the shade-avoidance response?, International Symposium on Plant Photobiology, Edinburgh, UK, Jun 3-6, 2013. 招待講演

長谷あきら、植物生理学研究のための超高速レーザー細胞プロセス、超短パルスレーザー細胞プロセス研究会、奈良、2012年4月 招待講演

Nagatani A, et al, Spatio-temporal regulatory network controlling stem elongation under the shade, International Symposium on "Interplay of Light, Photoperiodism and Circadian Clock Function", Barcelona, Spain, May 4-6, 2011. 招待講演

Nagatani A, Evolution of photosensing in plants, The 4th International Symposium of the Biodiversity and Evolution Global COE project. ", Kyoto, Japan, Sep 11-12, 2010. 招待講演

[図書](計 5 件)

長谷あきら (2012) 「植物の光応答とフィトクロム」, 「生き物たちのつづれ織り[上] 多様性と普遍性が彩る生物模様」阿形清和、森哲監修、pp.131-141.

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://physiol2.bot.kyoto-u.ac.jp/HP3/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 あきら (NAGATANI, Akira)  
京都大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 40183082