

令和元年6月10日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14552

研究課題名(和文)リン酸化プロテオミクスによるフォトトロピンの新奇リン酸化基質の同定

研究課題名(英文) Identification of novel substrates of phototropin kinases by phosphoproteomic analysis

研究代表者

武宮 淳史 (Takemiya, Atsushi)

山口大学・大学院創成科学研究科 准教授

研究者番号：80448406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：青色光受容体フォトトロピンは植物の光合成機能の最適化や成長の促進に関わる多様な光応答を制御する。フォトトロピンは光受容により活性化される光受容体キナーゼであり、下流の因子をリン酸化することでシグナルを伝達すると考えられる。しかし、その実体については不明な点が多い。本研究ではリン酸化プロテオームと *in vitro* キナーゼアッセイにより、フォトトロピンによって直接リン酸化される新奇基質候補タンパク質を複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フォトトロピンによって感知された光情報は、光屈性や葉緑体運動、気孔開口、葉の展開など、様々な光応答を引き起こし、光合成を増大させる。本研究では、フォトトロピンによる光情報の変換過程の解明を目的として、光受容体キナーゼであるフォトトロピンの新奇リン酸化基質の探索を行い、複数の基質候補タンパク質を同定した。今後、これらの因子の機能を詳しく解析することにより、フォトトロピン応答の初期過程や反応多様性のメカニズムの解明など、生命の光情報変換の理解において重要な知見をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Phototropins are plant-specific blue light receptors that mediate a wide range of responses that maximize the photosynthetic efficiency and promote plant growth. Since phototropins are light-activated receptor kinases, it is most likely that phototropins transduce light signals by phosphorylating downstream substrates, resulting in various physiological responses. However, the molecular identity of proteins phosphorylated by phototropins remained largely elusive. In this study, we performed large-scale phosphoproteomic analysis and *in vitro* phosphorylation assay, and identified several proteins that are directly phosphorylated by phototropin kinases.

研究分野：植物生理学

キーワード：青色光 フォトトロピン プロテオーム リン酸化 シグナル伝達

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

フォトリポピン (*phot1*, *phot2*) は植物に特有な青色光受容体で、光屈性、葉緑体光定位運動、気孔開口、葉の伸展など、光合成の最適化や成長の促進に関わる多様な光応答を制御する (Christie, 2007)。フォトリポピンは N 末端側に光受容に関わる 2 つの LOV (Light, Oxygen, or Voltage) ドメインを、C 末端側に Ser/Thr キナーゼドメインをもつ光受容体キナーゼであり、光の受容に伴い活性化し、何らかの基質をリン酸化することでシグナルを伝達すると想像されてきた。しかし、その実体についてはいずれの光応答においても不明であり、この基質の解明はフォトリポピン研究の最重要課題となっている。また、フォトリポピンは孔辺細胞、葉肉細胞、表皮細胞など、多様な細胞において異なる応答を制御するが、ひとつの光受容体がこのような応答の多様性を導くメカニズムについても不明であった。

このような背景の中、我々は気孔開口のシグナル伝達機構の解明を目指した研究を行い、独自に開発した変異体選抜法を用いて、気孔開口の必須因子として働く BLUS1 キナーゼを同定した (Takemiya et al., 2013)。さらに、孔辺細胞を用いた生化学的解析から、BLUS1 がフォトリポピンと相互作用すること、BLUS1 が青色光依存的にフォトリポピンによって直接リン酸化されることを証明し、BLUS1 が長らく不明であったフォトリポピンのリン酸化基質であることを明らかにした。

BLUS1 の遺伝子発現部位を解析したところ、この遺伝子は孔辺細胞に特異的に発現することが分かった。さらに、*blus1* 変異体における気孔開口以外の表現型を調べた結果、いずれの応答も正常であることが分かった。このことは、他のフォトリポピン応答には BLUS1 以外の未知の基質が存在する可能性を示唆しており、フォトリポピンが多様な基質を持つことが応答の多様性を生み出すメカニズムであると考えられた。

[参考文献]

- ① John M. Christie (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 21-45.
- ② Atsushi Takemiya, Naoyuki Sugiyama, Hiroshi Fujimoto, Toshifumi Tsutsumi, Shota Yamauchi, Asami Hiyama, Yasuomi Tada, John M. Christie, Ken-ichiro Shimazaki (2013) Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nat. Commun.* 4, 2094.

2. 研究の目的

上記の研究背景をもとに、本研究では、植物の光シグナル伝達の研究に最先端のリン酸化プロテオミクス的手法を取り入れ、フォトリポピンの新奇リン酸化基質の同定に挑む。これにより、BLUS1 以外のリン酸化基質の存在を示し、フォトリポピン応答の反応多様性のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

- (1) シロイヌナズナ黄化芽生えを対象としたリン酸化プロテオーム解析を行い、青色光に応答してリン酸化されるタンパク質を網羅的に同定する。
- (2) *In vitro* キナーゼアッセイにより、フォトリポピンにより直接リン酸化される因子を絞り込む。
- (3) 当該因子の機能欠損変異体入手・作製し、フォトリポピン応答に異常を示すかを調べる。また、アミノ酸置換体的手法を用いて、リン酸化の機能的意義を解明する。

4. 研究成果

(1) フォトリポピンの新奇リン酸化基質を同定するため、本研究ではフォトリポピンが制御する光屈性の研究材料として知見が集積しているシロイヌナズナ黄化芽生えを対象としたリン酸化プロテオーム解析を行い、青色光に応じてリン酸化されるタンパク質の網羅的な解析を行った。リン酸化ペプチドの濃縮には、リン酸化ペプチドに対して高い選択性と親和性をもつ HAMMOC (hydroxyl acid modified metal oxide chromatography) 法を用い (Sugiyama et al. 2007; Kyono et al. 2008)、得られたリン酸化ペプチドをナノ液体クロマトグラフィー-質量分析 (nanoLC-MS/MS) にて測定し、リン酸化ペプチドの量と配列の情報を得た。また、実験材料にはシロイヌナズナの野生株に加え、*phot1* と *phot2* の両方を欠く *phot1 phot2* 二重変異体を用い、野生株において青色光に応答してリン酸化され、且つ *phot1 phot2* 二重変異体では変化しないものを選抜した。これらの結果を比較解析することにより、青色光およびフォトリポピンに依存してリン酸化されるタンパク質を多数同定することに成功した。

(2) リン酸化プロテオームから選抜されるタンパク質の中には、フォトリポピンの直接の基質とフォトリポピンの下流でリン酸化されるものの両方が含まれるはずである。これらの中から直接の基質を絞り込むには、*in vitro* において両者を反応させ、フォトリポピンによって直接リン酸化される因子を絞り込むことが有効である。本研究では、我々が発見した気孔開口におけるフォトリポピンのリン酸化基質である BLUS1 を用い、フォトリポピンキナーゼによるリン酸化を調べる最適なアッセイ系の確立を行った。シロイヌナズナの *phot1* タンパク質の全長を大腸菌の系を用いて作製し BLUS1 と反応させたところ、青色光依存的なリン酸化がみられた。フォトリポピンの LOV ドメインは光受容に関与するのみならず、キナーゼドメインの不活性

化にも関わる (Matsuoka and Tokutomi, 2005)。そこで phot1 の LOV ドメインを含む N 末端領域を欠損させ、C 末端のキナーゼドメインのみの断片タンパク質を作製したところ、このタンパク質は青色光の有無に関わらず BLUS1 を恒常的にリン酸化することが分かった。さらにこの phot1 のキナーゼ断片タンパク質は BLUS1 を非常に強くリン酸化することから、フォトトロピンによる基質のリン酸化を調べる有用なツールとなることが示唆された。これらの結果は国際誌である *Plant Cell Physiol* 誌に報告された (Takemiya et al., 2016)。

(3) 上記で確立した *in vitro* キナーゼアッセイ系を用いて、リン酸化プロテオームにおいて青色光依存的にリン酸化されるタンパク質の中から、フォトトロピンによって直接リン酸化される因子の絞り込みを行った。基質候補因子については、大腸菌の系を用いて全長の組換えタンパク質を作製し、キナーゼアッセイに用いた。全長タンパク質が作製できなかったものについては、*in vivo* のリン酸化部位を含む断片タンパク質を作製し反応させた。その結果、これまでにフォトトロピンによって直接リン酸化されるタンパク質を複数同定することに成功した。これらの因子はこれまでフォトトロピン応答への関与は報告されておらず、*in vivo* と *in vitro* の両系においてリン酸化が見られたことから、フォトトロピンの新奇リン酸化基質の可能性が示唆される。

今後はシロイヌナズナの機能欠損変異体や、フォトトロピンによるリン酸化部位を非リン酸化・疑似リン酸化させた形質転換体の解析を行い、フォトトロピン応答を正に制御する新奇リン酸化基質を明らかにしたい。

[参考文献]

- ① Naoyuki Sugiyama, Takeshi Masuda, Kosaku Shinoda, Akihiro Nakamura, Masaru Tomita and Yasushi Ishihama (2007) Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. **Mol. Cell Proteomics** 6: 1103-1109.
- ② Yutaka Kyono, Naoyuki Sugiyama, Koshi Imami, Masaru Tomita, Yasushi Ishihama (2008) Successive and selective release of phosphorylated peptides captured by hydroxy acid-modified metal oxide chromatography. **J. Proteome Res.** 7: 4585-4593.
- ③ Daisuke Matsuoka, Satoru Tokutomi (2005) Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 102: 13337-13342.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Asami Hiyama, Atsushi Takemiya, Shintaro Munemasa, Eiji Okuma, Naoyuki Sugiyama, Yasuomi Tada, Yoshiyuki Murata, Ken-ichiro Shimazaki (2017) Blue light and CO₂ signals converge to regulate light-induced stomatal opening. **Nat. Commun.** 8, 1284. 査読有り
- ② Shin-ichiro Inoue, Nozomi Iwashita, Yohei Takahashi, Eiji Gotoh, Eiji Okuma, Maki Hayashi, Ryohei Tabata, Atsushi Takemiya, Yoshiyuki Murata, Michio Doi, Toshinori Kinoshita, Ken-ichiro Shimazaki (2017) Brassinosteroid Involvement in Arabidopsis thaliana Stomatal Opening. **Plant Cell Physiol.** 58, 1048-1048. 査読有り
- ③ Atsushi Takemiya, Ken-ichiro Shimazaki (2016) Arabidopsis phot1 and phot2 phosphorylate BLUS1 kinase with different properties in stomatal opening. **J. Plant Res.** 129, 167-174. 査読有り
- ④ Atsushi Takemiya, Ayaka Doi, Sayumi Yoshida, Koji Okajima, Satoru Tokutomi, Ken-ichiro Shimazaki (2016) Reconstitution of an initial step of phototropin signaling in stomatal guard cells. **Plant Cell Physiol.** 57, 152-159. 査読有り
- ⑤ Stuart Sullivan, Atsushi Takemiya, Eros Kharshiing, Catherine Cloix, Ken-ichiro Shimazaki, John M. Christie (2016) Functional characterization of Arabidopsis phototropin 1 in the hypocotyl apex. **Plant J.** 88, 907-920. 査読有り
- ⑥ Noriyuki Suetsugu, Atsushi Takemiya, Sam-Geun Kong, Takeshi Higa, Aino Komatsu, Ken-ichiro Shimazaki, Takayuki Kohchi, and Masamitsu Wada (2016) RPT2/NCH1 subfamily of NPH3-like proteins is essential for the chloroplast accumulation response in land plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 113, 10424-10429. 査読有り
- ⑦ Shota Yamauchi, Atsushi Takemiya, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Toshifumi Tsutsumi, Toshinori Kinoshita, Ken-ichiro Shimazaki (2016) The plasma membrane H⁺-ATPase AHA1 plays a major role in stomatal opening in response to blue light. **Plant Physiol.** 171, 2731-2743. 査読有り

[学会発表] (計 20 件)

- ① Atsushi Takemiya, Signaling network of phototropin-regulated stomatal opening, Japan-Taiwan Plant Biology, 2019
- ② Atsushi Takemiya, Shota Yamauchi, Asami Hiyama, Ken-ichiro Shimazaki, Molecular mechanism

- of blue light signaling for stomatal opening、Japan-Finland Seminar、2018
- ③ Atsushi Takemiya、Asami Hiyama、Ken-ichiro Shimazaki、Early phototropin signaling in blue light-dependent stomatal opening、International Symposium on Plant Photobiology、2018
 - ④ 武宮淳史、青色光に応答した気孔開口のシグナル伝達機構、三学会合同福岡例会、2016
 - ⑤ 武宮淳史、青色光に応答した気孔開口の情報伝達機構、日本植物学会第78回大会、2016
 - ⑥ 武宮淳史、島崎研一郎、phot1 と phot2 による BLUS1 のリン酸化能の違いが気孔開口の光応答性を制御する、第57回日本植物生理学会年会、2016
- 他 14 件

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.yamaguchi-u.ac.jp/ja/sci/stafflist/bio/take.pcs>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし