

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03694

研究課題名(和文) タンパク質リン酸化修飾を介した光屈性制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanisms of phototropism through protein phosphorylations

研究代表者

酒井 達也 (Sakai, Tatsuya)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：10360554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物は光源方向を認識し、成長方向を調節する光屈性を示す。光屈性はフォトトロピン青色光受容体が誘導する成長反応であることが明らかになっているが、その下流で働くシグナル伝達経路は理解が進んでいない。本研究はフォトトロピンシグナル伝達経路を理解するために、シグナル伝達活性化におけるタンパク質リン酸化調節に焦点を絞り研究を行った。その結果、phot1 青色光受容体、アダプタータンパク質 RPT2 及び NPH3、それぞれのリン酸化を介した機能調節の仕組みを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の芽生えは照射側と陰側の光強度の差を認識し、光源方向に向けて地上部が成長する光屈性を示す。光屈性を誘導する光センサーシステムのダイナミックレンジは幅広いことが知られている。本研究で明らかになった知見は、タンパク質リン酸化調節を介したフォトトロピンシグナル伝達の強度調節であり、新たな光寛容システムの発見となった。本研究テーマは、光屈性におけるフォトトロピン分子機能の理解と発見を通じて、動くことができない植物が持っている柔軟かつ堅牢な光環境適応能力を学ぶとともに、将来、分子デバイスとして光遺伝学等のバイオテクノロジー分野のツール開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Plant life is strongly dependent on light and *Arabidopsis thaliana* phototropin1 (phot1) is a blue-light photoreceptor, i.e. a blue-light-activated Ser/Thr-protein kinase that mediates various light responses including phototropism. Our research goal is an understanding of the phototropin signaling system. In this research, we were focusing on the protein phosphorylation of signaling factors in the phot1 signaling. Our study has revealed that RPT2 suppresses the phot1 autophosphorylation activity and that the phosphorylation status of NPH3 is involved in the photoadaptation mechanism of phototropism as an effector adaptation mechanism.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：光屈性 フォトトロピン タンパク質リン酸化 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

被子植物の光屈性は器官の光照射側と陰側の光刺激の差を植物ホルモン・オーキシンの濃度勾配に変換し、細胞壁の伸展性に変化を与えて光照射側と陰側の細胞伸長差(偏差成長)を誘導する反応と考えられている。光屈性を誘導する青色光受容体としてフォトトロピンが同定されている。フォトトロピンタンパク質は細胞膜内側に局在しており、N末端側に光受容に關与するLOVドメインを2つ有し、C末端側にSer/Thr型キナーゼドメインを有する。フォトトロピンと複合体を形成する光屈性シグナル伝達因子NPH3タンパク質がユビキチンE3リガーゼ活性を示すことから、フォトトロピンによるタンパク質のリン酸化もしくはNPH3によるユビキチン化修飾を介して光屈性誘導のシグナル伝達が行われていると考えられている。

応募者ら研究グループはこれまでシロイヌナズナ突然変異体を用いて、光屈性制御に働くシグナル伝達因子の探索を行ってきた。その結果、光屈性に關与する複数のオーキシン関連因子の同定に成功した。またフォトトロピンと複合体を形成する光屈性シグナル伝達因子NPH3及びRPT2がリン酸化修飾によって機能調節を受けることを発見した。NPH3はフォトトロピン活性化依存的に脱リン酸化されており、これが光屈性反応に影響を与える可能性が示唆された。一方、RPT2はフォトトロピン活性化依存的にタンパク質安定化がおきてシグナル伝達に働くこと、RPT2C末端セリン残基がタンパク質安定化に必須であり、このセリン残基はリン酸化修飾を受けていることを明らかにした。光屈性反応におけるNPH3及びRPT2リン酸化制御の意義、及びリン酸化・脱リン酸化に關与する酵素の同定とフォトトロピンによる活性制御の仕組みを明らかにすることが、フォトトロピンシグナル伝達経路の初期応答の理解に重要であることが示唆された。これらの研究成果を踏まえ、光屈性誘導に働くシグナル伝達経路解明にはシグナル伝達経路で働く各因子のタンパク質リン酸化修飾の有無、その生理的意義、そしてリン酸化制御機構の理解が必須であると考え、本研究計画の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究課題において研究期間内に明らかにする研究目標は以下の3点とする。

- (1) 光屈性に關与するPINオーキシン輸送体、AGCVIIIメンバー及びPP6活性制御タンパク質のフォトトロピン活性化依存的なリン酸化修飾の有無の解明
- (2) 光屈性シグナル伝達因子タンパク質のリン酸化修飾の生理的意義の解明
- (3) NPH3、RPT2のリン酸化・脱リン酸化に働く酵素の同定

3. 研究の方法

シロイヌナズナの光屈性に關与することが遺伝学的に示されたPINオーキシン輸送体、PINリン酸化酵素AGCVIIIキナーゼ、PIN脱リン酸化酵素PP6、フォトトロピン結合タンパク質NPH3、RPT2、それぞれについて、フォトトロピン活性化依存的なリン酸化修飾の有無を検証する。リン酸化修飾の調節がおきているシグナル伝達因子については、リン酸化部位の同定からアミノ酸置換変異体を作成し、各因子機能欠失変異体で発現させて光屈性表現型の相補性を観察することにより、リン酸化の生理的意義を明らかにする。またリン酸化を指標に、リン酸化・脱リン酸化に關与する酵素を探索・同定し、リン酸化修飾の分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 光屈性に關与するPINオーキシン輸送体、AGCVIIIメンバー及びPP6活性制御タンパク質のフォトトロピン活性化依存的なリン酸化修飾の有無の解明

本研究計画の着想に至ったAGCVIIIタンパク質キナーゼファミリー及びPP6フォスファターゼの光屈性への關与について、改訂作業を加えながら論文として発表した(Haga et al. 2018, Haga and Sakai 2018)。

光屈性に關与するPIN3、PIN7、D6PK、AGC1-12、PP6サブユニット、それぞれの光及びphot依存的リン酸化修飾制御の有無について検討を試みた。PINについてはリン酸化そのものは検出できたが、phot1依存的なリン酸化は検出できなかった。他のタンパク質についてそれぞれを特異的に認識するポリクローナル抗体作成や、タンパク質キナーゼは活性ドメインの既知のリン酸化アミノ酸を認識するリン酸化ペプチド抗体の作成を試みたが成功しなかった。YFP融合タンパク質によるイムノプロット解析を行ったが、Auto2D及びPhos-tag SDS-PAGEを用いた方法ではリン酸化修飾の有無については明らかにすることができずに終わっている。

他の研究計画で明らかにした新たな光屈性関連因子として PP2C を本研究に組み込み、リン酸化の有無について検討を行った。抗体作成後、イムノプロット解析を行った結果、リン酸化そのものは検出できたが、phot に依存したリン酸化は検出できなかった。

(2) 光屈性シグナル伝達因子タンパク質のリン酸化修飾の生理的意義の解明

光屈性誘導に働く phot1 シグナル伝達経路を明らかにするため、phot1 青色光受容体と結合して働くアダプタータンパク質 RPT2 および NPH3 タンパク質の生化学的機能を解析した。光によって発現が上昇する RPT2 は phot1 の光感受性調節に関与する LOV1 ドメインと結合し、phot1 のタンパク質キナーゼ活性を抑制することを発見した。一方、phot1 は RPT2 タンパク質の分解を抑制することで、青色光条件下、RPT2 発現誘導を行うことを示した。すなわち、phot1 の活性化は自身の活性化抑制を行う RPT2 を誘導することによって、常に過剰な活性化がおきないようにネガティブ・フィードバック調節を行っていることを明らかにした。以上の成果は Kimura et al. [2020] Plant Cell にて発表された。

本研究計画当初、予定していた RPT2 C 末のリン酸化の意義については、以下のように進めた。リン酸化修飾検出のため、リン酸化ペプチド抗体作成を試みたがウサギポリクローナル抗体はうまく作成できず、RPT2 リン酸化の phot1 依存性、光照射依存性を明らかにする試みは進んでいない。

RPT2 が phot1 活性を直接抑制することより (Kimura et al. 2020) phot1 依存的な NPH3 タンパク質の脱リン酸化、細胞膜からの遊離及び細胞質内での凝集体形成に対する RPT2 の効果は phot1 を介しており、直接 NPH3 の機能を調節するわけではないことが強く示唆された。NPH3 は phot に依存した光屈性に必須のタンパク質であり、その機能調節が光屈性誘導の引き金になる可能性が高いことから、次に NPH3 リン酸化状態調節の役割を調べた。NPH3 リン酸化部位は過去の研究によって 1 領域 3 箇所同定していたが (Tsuchida-Mayama et al. [2008] Plant Sci. 174, 626-633)、さらに 3 領域 4 箇所のリン酸化部位の同定した。全てのリン酸化部位にアミノ酸置換変異を入れた nph3 変異体の表現型解析を行った結果、NPH3 の脱リン酸化反応は細胞膜から細胞質への遊離と凝集体形成によって phot1 シグナリングの過度の活性化を防止し、光寛容に貢献することが示唆された (Kimura et al., submitted)。一方、青色光照射によって一過的に形成される NPH3 凝集体は胚軸照射側により多く存在することを共同研究によって明らかにした (Sullivan et al. 2019)。以上の結果は、NPH3 の細胞膜局在調節こそが、

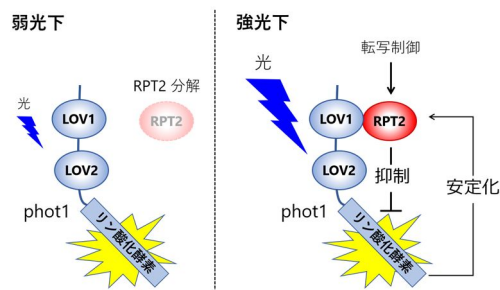


図1 RPT2 分子可変抵抗器による phot1 活性調節機構のモデル図

弱光下：RPT2 タンパク質量が低く、phot1 が活性化しやすい。phot1 はわずかな光の入力から最大限のシグナルを出力できるため、微弱な刺激から光屈性が起こる。強光下：RPT2 タンパク質量が上昇し、phot1 が活性化しづらくなる。光が大量に入力してきても phot1 はシグナルを過剰に出力しないため、下流のシグナル伝達が飽和せずに光屈性が起こる。

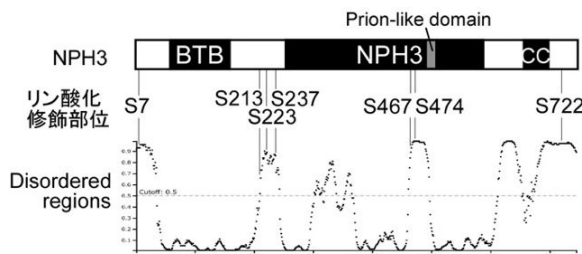


図2 NPH3 タンパク質の構造解析

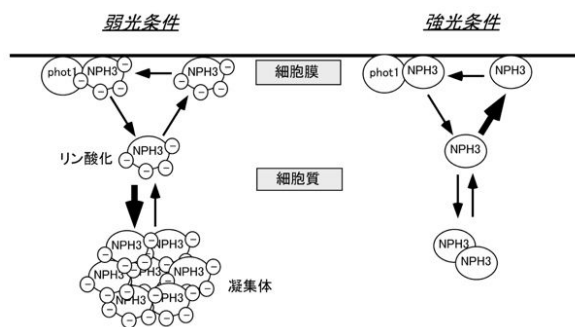


図3 NPH3 リン酸化調節による光寛容機構の仮説モデル
Phot1 は青色光吸収により活性化すると、NPH3 と解離しシグナル伝達をおこす。弱光条件ではリン酸化した NPH3 と phot1 と解離した活性化状態が維持されやすくシグナルが流れやすい。強光下では脱リン酸化した NPH3 が phot1 と結合した定常状態をとりやすく、シグナルが流れにくい (Kimura et al., submitted)。

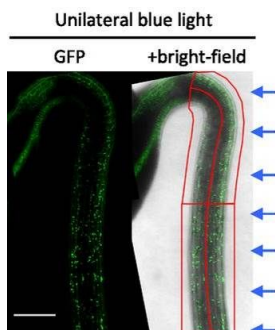


図4 シロイヌナズナ黄化芽生胚軸を片側から青色光照射したときの GFP-NPH3 凝集体分布パターン。光照射側でより多く凝集体が形成される (Sullivan et al. 2019)。

phot1 シグナリングの決定的役割を演じている可能性を示唆した。

(3) NPH3、RPT2 のリン酸化・脱リン酸化に働く酵素の探索

(2) の解析より、RPT2 リン酸化の phot1 依存性が明らかになっていないこと、またその機能は phot1 の機能調節にあって、phot1 下流のシグナル伝達経路の理解につながらないことが示唆されたことから、RPT2 リン酸化酵素探索は研究計画からはずすこととした。

(2) の解析より、NPH3 リン酸化酵素の探索は、YFP 融合 NPH3 の凝集体形成パターンの異常を示す突然変異体を探索するよりも、phot1 突然変異体の強光下の光屈性に異常を示す突然変異体を選抜するほうが作業が圧倒的に楽になることが明らかになった。そこで、本の研究計画内容から変更し、phot1 変異体に EMS 変異原処理を行い、突然変異体集団を現在作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Sullivan Stuart, Kharshing Eros, Laird Janet, Sakai Tatsuya, Christie John	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 De-etiolation Enhances Phototropism by Modulating NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3 Phosphorylation Status	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1104/pp.19.00206	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 -
1. 著者名 Suzuki Hiromi, Koshiba Tomokazu, Fujita Chiharu, Yamauchi Yoshio, Kimura Taro, Isobe Toshiaki, Sakai Tatsuya, Taoka Masato, Okamoto Takashi	4. 巻 70
2. 論文標題 Low-fluence blue light-induced phosphorylation of Zmphot1 mediates the first positive phototropism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 5929 ~ 5941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/JXB/ERZ344	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 -
1. 著者名 Haga Ken, Frank Lena, Kimura Taro, Schwechheimer Claus, Sakai Tatsuya	4. 巻 59
2. 論文標題 Roles of AGCVIII Kinases in the Hypocotyl Phototropism of Arabidopsis Seedlings	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1060 ~ 1071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/PCP/PCY048	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 -
1. 著者名 Haga Ken, Sakai Tatsuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Involvement of PP6-type protein phosphatase in hypocotyl phototropism in Arabidopsis seedlings	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 e1536631-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15592324.2018.1536631	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 -

1. 著者名 Kimura Taro, Tsuchida-Mayama Tomoko, Imai Hirotatsu, Okajima Koji, Ito Kosuke, Sakai Tatsuya	4. 巻 32
2. 論文標題 Arabidopsis ROOT PHOTOTROPISM2 Is a Light-Dependent Dynamic Modulator of Phototropin1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 2004~2019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1105/tpc.19.00926	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 木村太郎、間山 (槌田) 智子、酒井達也
2. 発表標題 シロイヌナズナ胚軸光屈性において RPT2 が phot1 の光感受性を調節する仕組み
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村太郎、芳賀健、野村有子、中神弘史、酒井達也
2. 発表標題 シロイヌナズナ黄化芽生え胚軸光屈性におけるNPH3脱リン酸化の意義
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村太郎、間山 (槌田) 智子、今井大達、岡島公司、伊東孝祐、酒井達也
2. 発表標題 シロイヌナズナ胚軸光屈性においてRPT2がphot1の光感受性を調節する仕組み
3. 学会等名 日本植物学会年会
4. 発表年 2019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
連携研究者	芳賀 健 (Haka Ken) (50382031)	日本工業大学・工学部・准教授 (32407)	