

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05024

研究課題名（和文）フィトクロムを介した赤色光シグナルによる無機栄養獲得と利用機構の解明

研究課題名（英文）Study on the molecular mechanisms underlying phytochrome-mediated red-light signaling regulation of nutrient acquisition and use

研究代表者

櫻庭 康仁（Sakuraba, Yasuhito）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：80792192

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,000,000円

研究成果の概要（和文）：モデル植物のシロイヌナズナにおいて、赤色光受容体フィトクロムB(phyB)が根からのリン酸イオンや硝酸態窒素の獲得促進に関わることを明らかとし、phyBの下流では赤色光シグナルの正の制御因子HY5と負の制御因子PIF転写因子が根からのリン酸イオンや硝酸態窒素の獲得の制御に関与していることを明らかとした。また、主要作物のイネにおいてもphyBを介した赤色光シグナルがリン酸イオンの獲得の制御に重要な働きを担っていることを明らかにした。さらに、接木体を用いた解析により地上部に局在するHY5やPIF転写因子が根における無機栄養の獲得や利用に関わる遺伝子の発現に影響を与えていることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光シグナルはこれまで幅広く研究され、植物のさまざまな成長プロセスの制御に関わるということが報告されてきたが、根で起こる無機栄養の吸収との関係性についてはこれまで殆ど未解明であった。本研究では、phyBを介した赤色光シグナルが根からのリン酸や硝酸態窒素の獲得の促進に関わることを示唆され、これまでほとんど分かっていなかった光シグナルの新たな機能の一面が明らかになった。本研究課題で得られた成果は、貧栄養環境において赤色光を強化した光の使用による農業生産の増大方法の開発やリン酸の吸収能力の高い作物品種の作出などの契機となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In model plant Arabidopsis, I revealed that phytochrome B (phyB)-mediated red-light signaling is involved in the promotion of uptake and utilization of phosphate ion and nitrogen compounds. Under the downstream of phyB, HY5 and PIF transcription factors regulate the expression of genes associated with uptake of phosphate ion and nitrogen compounds in roots. I also revealed that phyB-mediated red-light signaling in rice also has an important role in the promotion of phosphate uptake. Furthermore, the grafting experiment using Arabidopsis seedlings revealed that shoot localized HY5 and PIF transcription factors affect the expression of genes associated with uptake and utilization of phosphate ion and nitrogen compounds in roots.

研究分野：植物栄養学

キーワード：光シグナル フィトクロム 植物栄養

1. 研究開始当初の背景

植物は外部環境に合わせて効率よく、バランスよく必要な無機栄養素を吸収して生長する。窒素とリンは植物の多量必須元素であり、土壌中の窒素化合物やリン酸イオンの量がしばしば植物の生長を制限する要素である。一方で、光も植物の生長調節に極めて重要な外部要因であり、植物の様々な生長プロセスに影響を及ぼす。しかし、根で起こる無機栄養の吸収と地上部の葉に照射される光の関係性はほとんど未解明であった。

申請者は、先行研究において、赤色光シグナルが無機栄養素の吸収と利用の制御に関わっていることを示唆する興味深い実験事実を得た。自然突然変異に由来する遺伝的多様性に基づいてリン酸イオンの吸収能力に違いがあるかを明らかにするために約 150 系統のシロイヌナズナの野生系統(エコタイプ)のリン酸イオンの吸収能力を放射性同位体(^{33}P)を用いたイメージング技法によって評価したところ、Lm-2 というエコタイプでリン酸イオンの吸収が低下していることを見出した(図 1A)。このエコタイプでは、PHYB 遺伝子に自然突然変異が起きていることから、シロイヌナズナの *phyB* 欠損株のリン酸イオンの吸収を調べたところ、*phyB* 欠損株でも野生株に比べて顕著に吸収が低いことが確認された。

2. 研究の目的

本研究では、赤色光シグナルが無機栄養素の吸収や利用の調節に関わっていることを明らかにし、さらに、その分子メカニズムを解明することを目的とする。具体的には、シロイヌナズナのフィトクロムを介した赤色光応答を制御している PIF 転写因子群の中のいずれの PIF 転写因子が無機栄養の吸収と利用機構の制御において重要な役割を担っているのかを明らかにし、その PIF 転写因子の標的遺伝子を同定することを目的とする。また、赤色光シグナルの正の制御因子である HY5 の無機栄養の吸収と利用機構への関与の可能性についても検証する。さらに、本研究では、主要作物のイネにおいても赤色光シグナルが無機栄養の獲得の促進に関わるかも検証する。

3. 研究の方法

窒素とリンの吸収や利用の赤色光による制御を赤色光育成装置を用いてシロイヌナズナを栽培することにより検証する。この制御に係わるフィトクロムと PIF 転写因子を同定するために、ノックアウト変異株や過剰発現株を入手または作製し、 ^{33}P 放射性同位体を用いたリン酸吸収能力の評価を行う。この制御に関わるフィトクロムや PIF 転写因子が同定された場合、この PIF 転写因子の標的遺伝子候補をトランスクリプトーム解析によって選定し、特に興味深い遺伝子に関しては、そのプロモーター領域を用いて EMSA アッセイ、クロマチン免疫沈降アッセイ、ルシフェラーゼ蛍光レポーターを用いたトランジェントアッセイなどのより、PIF 転写因子の標的遺伝子であることを確定する。一方、イネにも類似のメカニズムが存在することを、イネのフィトクロムや PIF 変異体を用いて確かめる。

4. 研究成果

(1)本研究ではまず、赤色光が植物のリン酸イオンの吸収や蓄積にどのように関与するかを検証した。シロイヌナズナの芽生えに波長の異なる光(赤色光、遠赤色光、青色光)を照射させ、根からのリン酸イオンの吸収に対する影響を調べたところ、赤色光を照射した芽生えでのみリン酸吸収能力およびリン酸の蓄積量が顕著に上昇していた。また、芽生えの地上部あるいは地下部のみに赤色光を照射した場合のリン酸イオンの吸収能力も調べ、地上部にのみ赤色光を照射した場合にリン酸イオンの吸収能力が顕著に上昇していたことから、葉に照射される赤色光が根におけるリン酸イオンの吸収を促進させていることが示唆された。

(2)次に、赤色光受容体フィトクロム、赤色光シグナルの負の制御因子である PIF 転写因子および正の制御因子 HY5 の欠損株や過剰発現株を異なるリン酸栄養条件で栽培し、 ^{33}P 放射性同位体を用いたリン酸吸収能力の評価を行い、フィトクロムの中では *phyB* が、さらに *phyB* の下流では、PIF4、PIF5、および HY5 転写因子が根からのリン酸の獲得に関わっていることを明らかにした。

(3)シロイヌナズナにおいて、*phyB* は葉と根のどちらにおいても重要な働きを担っていることが知られているため、葉と根に局在する *phyB* のどちらが根におけるリン酸イオンの吸収の促進に重要かを明らかにするために、*phyB* ノックアウト変異株と Col-0 野生型株を穂木あるいは台木として用いた接木体を作製し、 ^{33}P 放射性同位体を用いてその接木体のリン酸吸収能力を調べた。結果、穂木に *phyB* 変異株、台木に Col-0 野生型株を用いた接木体、および穂木に Col-0 野

生型株、台木に *phyB* 変異株を用いた接木体のいずれにおいてもリン酸吸収能力の顕著な低下が見られ、葉と根に局在する *phyB* の両方が、根からのリン酸イオンの吸収に影響を与えていることが示唆された。

(4)リン酸の獲得制御機構において PIF 転写因子の下流標的遺伝子を同定するために、通常育成条件および低リン育成条件で生育した Col-0 野生型株および *pif4 pif5* 二重変異株を用いて、DNA マイクロアレイ解析を行った。結果、特に低リン育成条件において、リン酸イオンの獲得や利用に関わる複数の遺伝子の発現が *pif4 pif5* 二重変異株において上昇していた。本研究では、その中でも特に発現が顕著に上昇していた、高親和性リン酸輸送体をコードする *PHT1;1* に着目して研究を進めた。クロマチン免疫沈降アッセイおよびルシフェラーゼ蛍光レポーターを用いたトランジェントアッセイにより、PIF4 および PIF5 が *PHT1;1* の PIF 転写因子の結合モチーフを含むプロモーター領域に結合し、その発現を抑制することが示唆された。一方、*PHT1;1* の発現量は、*hy5* ノックアウト変異株や *HY5* 過剰発現株でも顕著に変化していた。そこで、PIF 転写因子の場合と同様の実験を行った結果、*HY5* が *PHT1;1* のプロモーターに結合しその発現を直的に上昇させていることが示唆された。(1)から(4)の一連の結果により、シロイヌナズナにおいて、*phyB* を介した赤色光シグナルによるリン酸イオンの吸収調節の分子メカニズムの一端が明らかとなった。先行研究で葉に照射された光が遺憾そくを通して根に局在する *phyB* を活性化させることが報告されていることから、根で赤色光により活性化された *phyB* による PIF 転写因子の蓄積の低下と *HY5* 転写因子の蓄積の増大が起こることで、根における *PHT1;1* 遺伝子の発現が上昇すると考えられた。また、葉に局在する *phyB* も赤色光により活性化し、葉に局在する *HY5* 転写因子の蓄積を増大させ、その一部は根に移行することが報告されているので、地上部から移行してきた *HY5* 転写因子も *PHT1;1* の発現の上昇に寄与している可能性が考えられる。したがって、葉に照射された赤色光は複数のシグナル伝達経路を介して、根における *PHT1;1* の発現量を上昇させていると考えられる。

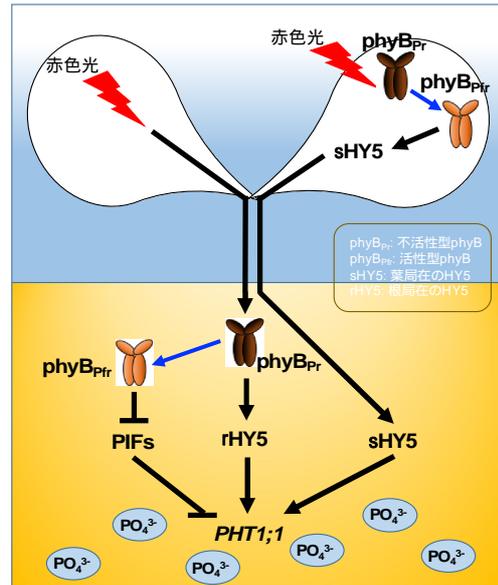


図 1. *phyB* を介した赤色光シグナルによるリン酸イオンの吸収調節の分子機構

(5)本研究では、主要作物であるイネにおいても赤色光シグナルが根からのリン酸イオンの吸収を促進させることを明らかにした。シロイヌナズナの場合と同様に、イネの芽生えの地上部のみに赤色光を照射すると根におけるリン酸イオンの吸収が顕著に上昇した。また、イネの *phyB* ノックアウト変異株は、シロイヌナズナの *phyB* ノックアウト変異株と同様に、リン酸イオンの吸収能力が野生型株よりも顕著に低かった。さらにイネ *phyB* ノックアウト変異株の根では複数のリン酸輸送体遺伝子の発現量が低下していることも明らかにし、イネにおいても *phyB* を介した赤色光シグナルが根からのリン酸イオンの吸収の促進に重要な役割を担っていることが示唆された。

(6)本研究では、*phyB*、PIF4 および *HY5* を介した赤色光シグナルが根からの窒素栄養の獲得にも寄与していることを明らかにした。シロイヌナズナの野生型株の芽生を赤色光処理したときの無機イオンの蓄積量をイオンクロマトグラフィーを用いて調べたところ、リン酸イオンに加えて硝酸イオンの蓄積も顕著に上昇しており、赤色光シグナルはリン酸イオンだけでなく硝酸イオンの吸収および蓄積も促進させていることが示唆された。PIF4 や *HY5* のノックアウト変異株や過剰発現株を用いて作製した接木体を用いた遺伝子発現解析から、地上部に局在する PIF4 や *HY5* が根における窒素栄養の獲得や利用に関わる遺伝子の発現に影響を与えていることも明らかにした。

<引用文献>

- Sakuraba, Y., Kanno, S., Mabuchi, A. *et al.* (2018) *Nat. Plants* 4: 1089-1101
 Lee, H.J., Ha, J.H., Kim, S.G., *et al.* (2016) *Sci. Signal.* 9: ra106.
 Chen, X., Yao, Q., Gao, X., *et al.* (2016) *Curr. Biol.* 26: 640-646.
 Sakuraba, Y. and Yanagisawa, S. (2020) *Soil Sci. Plant Nutr.* 66: 745-754.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Zhuo Mengna, Sakuraba Yasuhito, Yanagisawa Shuichi	4. 巻 32
2. 論文標題 A Jasmonate-Activated MYC2-Dof2.1-MYC2 Transcriptional Loop Promotes Leaf Senescence in Arabidopsis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 242-262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1105/tpc.19.00297	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 Sakuraba Yasuhito, Chaganzhana, Mabuchi Atsushi, Iba Koh, Yanagisawa Shuichi	4. 巻 4
2. 論文標題 Enhanced NRT1.1/NPF6.3 expression in shoots improves growth under nitrogen deficiency stress in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01775-1	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 Sakuraba Yasuhito	4. 巻 22
2. 論文標題 Light-Mediated Regulation of Leaf Senescence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3291-3291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22073291	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 Sakuraba Yasuhito, Yanagisawa Shuichi	4. 巻 66
2. 論文標題 Effect of phytochrome-mediated red light signaling on phosphorus uptake and accumulation in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 745-754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00380768.2020.1798205	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 Mengna Zhuo, Yasuhito Sakuraba, Shuichi Yanagisawa	4. 巻 32
2. 論文標題 A Jasmonate-Activated MYC2-Dof2.1-MYC2 Transcriptional Loop Promotes Leaf Senescence in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 242-262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1105/tpc.19.00297	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 Yasuhito Sakuraba, Shuichi Yanagisawa	4. 巻 83
2. 論文標題 Light signalling-induced regulation of nutrient acquisition and utilisation in plants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 123-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcdb.2017.12.014	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 Maeda Yoshie, Konishi Mineko, Kiba Takatoshi, Sakuraba Yasuhito, Sawaki Naoya, Kurai Tomohiro, Ueda Yoshiaki, Sakakibara Hitoshi, Yanagisawa Shuichi	4. 巻 9
2. 論文標題 A NIGT1-centred transcriptional cascade regulates nitrate signalling and incorporates phosphorus starvation signals in Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-03832-6	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 Sakuraba Yasuhito, Kanno Satomi, Mabuchi Atsushi, Monda Keina, Iba Koh, Yanagisawa Shuichi	4. 巻 4
2. 論文標題 A phytochrome-B-mediated regulatory mechanism of phosphorus acquisition	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 1089-1101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-018-0294-7	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7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 櫻庭康仁、Gunheung An, 柳澤修一、Nam-Chon Paek
2. 発表標題 イネのABA により誘導される葉の老化機構における膜結合型 NAC 転写因子ONAC054の多層制御の役割
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾上佑真、櫻庭康仁、柳澤修一
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける赤色光による硝酸態窒素獲得の調節
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻庭康仁、馬淵敦士、射場厚、柳澤修一
2. 発表標題 シロイヌナズナの窒素栄養飢餓応答に関わるABCタンパク質の機能解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年度静岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhito Sakuraba
2. 発表標題 The regulation of nutrient starvation-induced leaf senescence by light signaling
3. 学会等名 East Asian Symposium on Senescence and Chronobiology (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 櫻庭康仁、柳澤修一
2. 発表標題 赤色光シグナルによる植物栄養獲得の調節
3. 学会等名 「植物の栄養研究会」第4回研究交流会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhito Sakuraba, Satomi Kanno, Atsushi Mabuchi, Keina Monda, Koh Iba, Shuichi Yanagisawa
2. 発表標題 Both phytochrome B proteins in shoots and roots are involved in the regulation of phosphorus acquisition
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhito Sakuraba, Satomi Kanno, Atsushi Mabuchi, Keina Monda, Koh Iba, Shuichi Yanagisawa
2. 発表標題 A phytochrome B-mediated regulatory mechanism of phosphorus acquisition
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学生物生産工学研究センター植物機能工学部門ホームページ
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/ppk/home/>
 Google scholar (Yasuhito Sakuraba)
<https://scholar.google.com/citations?user=50qsIIAAAAAJ&hl=ko&oi=ao>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------