

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06779

研究課題名(和文) 酸素依存的な新規の植物二成分制御系の研究—進化の観点から—

研究課題名(英文) A novel oxygen-dependent plant two-component regulatory system - from an evolutionary perspective.

研究代表者

青木 摂之 (Aoki, Setsuyuki)

名古屋大学・情報学研究科・准教授

研究者番号：30283469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：蘚類ヒメツリガネゴケの2つのPASヒスチジンキナーゼ(PHK1/2)と、それらの下流の多段階リン酸リレー系(MSP)を各種解析法により研究した。その結果、(i)PHK1/2は核内で中継因子HPt1/2と結合し、この分布は赤色光により細胞質にも広がる；(ii)HPt1/2は時計タンパク質PRR1-3と核内で結合する；(iii)PHK1/2の局在およびHPt1/2との結合は日内制御を受け、夜には核で、昼には核細胞質で起きる；(iv)PHK1/2は概日時計や糖代謝に関係する遺伝子群の転写を制御する；等を明らかにした。こうして、PHK1/2に始まる新規MSP経路の概容を解明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PHK1とPHK2は低酸素環境化でコケ植物の生育を制御する因子です。この研究では、PHK1/PHK2に始まる細胞内の情報伝達の仕組みを研究しました。その結果、PHK1/PHK2は、中継因子を介して、体内時計の部品であるタンパク質の一部に情報を伝達し、さらに、体内時計の部品タンパク質をコードする遺伝子群や、また糖の代謝に関係する遺伝子群の転写レベルを制御することを明らかにしました。これにより、植物が低酸素環境や日内変動する環境に適応する仕組みの理解がすすみ、将来的には冠水条件や高地の低酸素条件でも効果的に生育する農作物の開発等につながると期待できます。

研究成果の概要(英文)：I have studied two PAS-histidine kinases (PHK1/2) and their downstream multi-step phosphorelay pathway in the moss *Physcomitrium patens*, and obtained the following results: (i) PHK1/2 interact with intermediate factors HPt1/2 in the nucleus, and upon red light irradiation, those distributions expanded to the nucleocytoplasm; (ii) HPt1/2 interact with "circadian clock" proteins PRR1-3 in the nucleus; (iii) PHK1/2 is diurnally regulated and they are localized and interact with HPt1/2 in the nucleus at night and in the nucleocytoplasm during the day; (iv) PHK1/2 regulate transcription of downstream genes, e.g., those related to the circadian clock and sugar metabolism. Thus, we have unveiled a unique and novel eukaryotic MSP pathway in this study.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：多段階リン酸リレー 概日時計 低酸素応答 ヒスチジンキナーゼ PASドメイン ヒメツリガネゴケ 時計タンパク質 糖代謝

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は植物の生物時計の分子機構とその進化に興味を持ち、モデル蕨類のヒメツリガネゴケを用いて研究してきた。その過程で、多段階リン酸リレー(MSP)のREC様ドメインを持つ被子植物の時計タンパク質 PRR に興味を持った。被子植物 PRR はリン酸化の基質 DDK モチフが変異し、リン酸転移能が失われているが、一方でコケの PRR は DDK モチフを保持し、さらに *in vitro* でリン酸転移能を示した(Satbhai ら, DNA Res., 2011)。DDK モチフを持つ PRR ホモログは、陸上植物ではコケの他に小葉類にのみ見つかる(龍ら, Plant Signal. & Behav., 2014)が、被子植物をはじめとするいわゆる大葉植物にはみられない。これらの結果から、古い起源の植物のみが持つ MSP とその入出力を同定し、様々な植物のゲノム情報・機能情報と対照させれば、陸上植物の多様化の要因を探ることができるのではないかと期待した。研究協力者の山篠貴史博士らはコケゲノムを精査し、被子植物にみられないドメイン構成のヒスチジンキナーゼ(HK)を洗い出した(石田ら, BBB, 2010)。それらのユニークな HK のなかでも、多様な環境因子の受容能が知られる PAS ドメインを持つ PAS-Histidine Kinase 1(PHK1)とそのパラログの PHK2 に着目し、研究を進めた。その結果、PHK1/2 は生活環の重要イベントである茎葉体形成を制御することを明らかにし(龍ら, J. Exp. Bot., 2018a; BBRC, 2018b)、進化的な観点でやはり興味深い因子であると考えられた。この成果のさらなる展開として、本計画の考案に至った。

2. 研究の目的

本研究は、(i)PHK1/2 に始まる MSP 経路とその入出力の分子機構を解明する、そして、(ii)植物の多様化に伴い、この機構に生じた変化を、他植物種のゲノム情報・機能情報との対照により理解する;これらの2点を大きな目的として計画した。具体的には、この経路の入力要因は何か、クロストークする他シグナル伝達系は何か、最終的に転写が制御される下流遺伝子群は何か、といった問題を調べることである。

3. 研究の方法

- (1) 酵母2ハイブリッドシステム(Y2H)による PHK1/2 の相互作用因子の解析 MSP において、Histidine-Phosphotransfer(HPt)タンパク質はヒスチジンキナーゼ(HK)からリン酸を受け取り、レスポンスレギュレーターに渡す中継因子として働く。ヒメツリガネゴケのゲノムには HPt のホモログ遺伝子は2つあるとされていた(Rashotte, Sem. Cell Dev. Biol., 2021等)が、最新のデータベース(*P. patens* v3.3, JGI)を対象に検索を行ったところ、ホモログの候補配列が3つ見つかった。これらを HPt1, HPt2, HPt3 と名付け、それらの cDNA をクローニングし、Y2H により PHK1/2 との相互作用を調べた。また PHK1/2 について、HK 同士の相互作用(PHK1 同士、PHK1-PHK2 間、PHK2 同士)があるかどうかを調べた。
- (2) Y2H による PRR タンパク質群と HPt1/2 の相互作用の解析 PHK1/2 と相互作用が認められた HPt1/2 (後述)と、時計タンパク質ホモログの PRR1/2/3 の相互作用を Y2H により調べた。
- (3) 二分子蛍光補完法(Bimolecular Fluorescence Complementation; BiFC法)による相互作用の細胞内分布の解析 (1), (2)により認められた相互作用を検証し、またその細胞内分布(とその動態)を明らかにするために、BiFC法による観察を行った。
- (4) 光環境の変化によるタンパク質間相互作用への影響の検証 青色光、赤色光、遠赤色光の照射条件下、あるいは12時間12時間の明暗サイクル条件下で BiFC 解析を行うことにより、これらの光条件下での PHK1/2-HPt1/2 間相互作用の細胞内分布への影響を調べた。
- (5) PHK1 PHK2 二重破壊株(DKO株)を用いた下流遺伝子群の同定 qRT-PCR(定量PCR)法により、DKO株と野生型株のあいだで各種の遺伝子(概日時計関係の遺伝子、糖代謝関係の遺伝子等)の転写産物蓄積量を比べ、それらの遺伝子が PHK1/2 に始まる MSP 経路の下流遺伝子である可能性を検証した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

暗条件における PHK1/2 と HPt1/2 の相互作用について 主に BiFC 解析の結果により、暗条件下において PHK1/2 は HPt1/2 と核内で相互作用することが分かった。なお、Y2H により PHK1-PHK2 ヘテロ二量体、PHK2-PHK2 ホモ二量体が形成されることも示唆された。

各色の光照射による相互作用の分布への影響について 赤色光照射により、PHK1/2-HPt1/2 間の相互作用の細胞内分布が核内から核細胞質へと拡大することが分かった。PHK1 については、赤色光照射により細胞内局在自体が核内から核細胞質へと変化したため、PHK1 の

局在変化が先行し、これに応じて相互作用の細胞内分布も変化するものと考えられた。一方で、青色光照射によっては PHK1/2 の細胞内局在と HPt1/2 との相互作用の分布は影響を受けず、核に分布するままであった。なお、予備的な観察結果であるが、PHK1/2 の細胞質への分布は、遠赤色光照射により強められることが示された。このことから、おそらく PHYA 型のフィトクロム（コケでは未同定である）がセンサーとして働き、PHK1/2 と HPt1/2 の間の相互作用の細胞内分布を制御している可能性が推測された。

PHK1-HPt1/2 間相互作用の細胞内分布にみられる日内制御 12時間 12時間の明暗サイクル条件下で継時的に GFP による局在解析を行い、PHK1/2 の細胞内局在に対する日内制御の可能性を探った。その結果、PHK1 の局在に日内制御が認められ、暗期には核に、明期には核と細胞質に分布することが分かった。一方で PHK2 は明暗の両条件下で核のみに局在した。そこで PHK1-HPt1/2 間の相互作用についても同じ明暗サイクル条件下で BiFC 解析を行ったところ、日内制御が認められ、暗期には核で、明期には核と細胞質で相互作用することが明らかになった。ただし連続条件下では局在・相互作用共に細胞内分布の変化がみられなかったため、概日時計による内因的な制御は働いていないと考えられた。

PHK1/2 の下流に位置付けられる遺伝子群の同定 複数の候補遺伝子について、PHK1 PHK2 DKO 株と野生型株のあいだで転写産物量の変化パターンを比較し、違いが見られたものを PHK1/2 の下流に位置付けられる遺伝子として同定した。まず時計遺伝子ホモログの *CCA1a*, *CCA1b* は、野生型株にくらべて日周条件下で転写リズムの振幅が低下することがわかった。ほかに *PRR1*, *PRR2*, *LUX1* などの時計遺伝子ホモログの転写パターンが変化した。さらにヘキソキナーゼ等の糖代謝の制御に関わるタンパク質をコードするいくつかの遺伝子についても、低酸素条件下で転写のパターンに変化が認められた。これらの結果から、PHK1/2 は MSP 経路を介して概日時計や糖代謝を制御していると考えられた。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

新たなシグナル伝達様式を持つ真核生物 MSP の発見 真核生物の MSP は被子植物、特にモデル植物種のシロイヌナズナで最も詳しく解析が行われてきた（名古屋大・山篠貴史博士、水野猛博士；大阪大・柿本辰男博士；ノースカロライナ大・J. Kieber 博士他）。その結果、(i) 調べられた多くの HK は膜タンパク質であり（一部は細胞質にも局在する）、環境からの入力を受け取ると、自己リン酸化～分子内のリン酸転移を経て、細胞質でパートナーの HPt にリン酸を転移する；(ii) リン酸化型の HPt は細胞質から核内へと移行し、さらにレスポンスレギュレーター (RR) にリン酸を転移する；(iii) これにより活性化した RR が下流遺伝子群の転写を制御する、という図式が受け入れられてきた。また、この図式は調べられた他の被子植物種にも大枠で当てはまること示されてきた。ヒメツリガネゴケでもサイトカイニンの受容体をコードする HK が調べられたが、この図式に沿う細胞内分布を示すことが示されている（Adelphi 大・A. Heyl 博士）。本研究により、暗条件下で HK が核内でパートナーの HPt と相互作用し、光条件によってこの細胞内分布が細胞質にも広がるということが明らかになった。これは、従来認められてきた上記の図式とは異なっており、MSP の新たな時空間的な組織化とその制御の様式を明らかにした点で、真核生物のシグナル伝達研究の進展に大きく貢献すると考えられる。

低酸素適応機構の観点から 研究代表者の過去の研究（名古屋大・山篠博士との共同研究）から、PHK1/2 は低酸素環境への適応において何らかの役割を持つことが示唆されていた。本研究によって、PHK1/2 はヘキソキナーゼ他の糖代謝の制御に関わる遺伝子群を出力遺伝子の一部として制御することが明らかとなった。この成果は、冠水条件や高地における低酸素条件下でも効果的に生育する作物の開発等につながる有用な手がかりとして期待できる。

概日時計の分子機構の進化の観点から ごく一部のタンパク質を除いて、概日時計の部品である「時計タンパク質」は、大きな生物分類群のあいだでほとんど類似性がみられず、時計機構の進化については未解明のままであった。被子植物の時計タンパク質のうち Pseudo-Response Regulator (PRR) (名古屋大・水野博士、南カリフォルニア大・S. Kay 博士) は、MSP の RR に類似するがリン酸転移能を持たないとされる。一方で、ヒメツリガネゴケの PRR ホモログがリン酸転移に必要なアミノ酸モチーフを保持し、また *in vitro* で実際にリン酸転移を受ける活性があることが名古屋大・山篠博士と研究代表者の共同研究により明らかになっていた（Satbhai ら、2011 年）。本研究の成果により、PHK1/2 が HPt1/2 を介してコケの PRR にリン酸転移をする HK であり、また概日時計の制御を行う因子でもある可能性が強く示された。シアノバクテリアでは SasA や RpaA (名古屋大・近藤孝男博士、早稲田大・岩崎秀雄博士) といったリン酸リレー因子が時計機構モデルに位置付けられており、また緑藻 (ブラシノ藻) のオストレオコッカスでは LOV ドメインを持つ HK が時計の光入力に関与する可能性が示されている (ソルボンヌ大・F-Y. Bouget 博士)。本研究の成果により、被子植物の PRR の進化的起源、時計機構における HK の制御機能、陸上植物と緑藻やさらにはシアノバクテリアの時計機構における進化的連続性の可能性が示された。概日時計の進化解明は時計の分子機構解明と表裏一体をなす重要課題であり、ポストゲノム時代において時計機構の進化・多様性の研究は今後ますます重要性を帯びると考えられる。本研究はその先駆けの一つとして重要性が高いと考えられる。

(3) 今後の展望

今後は次の課題の解明が重要である。

PHK1/2 に入力する環境要因の解析 本研究により、赤色光センサーのフィトクロムが PHK1/2 の制御に深く関与することが示唆されたが、その制御機構は未解明である。第一、フィトクロムは一般に赤色光を受けると細胞質から核へ移行し、転写調節因子と相互作用し、下流遺伝子群の発現を制御すると考えられており、これは PHK1(/2)のシグナル伝達様式と逆で、両者の働きを統一的に説明するのは一見難しくみえる。コケのフィトクロムの細胞内局在の変化、PHK1/2 との相互作用等を精査し、どのようにフィロクロムが PHK1/2 の働きを制御するかを調べる必要がある。PHK1/2 が他のタンパク質を介して間接的にフィトクロムと相互作用する可能性もあるので、PHK1/2 と直接相互作用するタンパク質を探索することも重要である。

低酸素適応における PHK1/2 の分子機能 野生型株よりも比べ、*PHK1 PHK2* DKO 株は低酸素条件下で原系体コロニーの生育が促進される、という現象が本研究計画の動機の一つであった。本研究の成果によっては、PHK1/2 からの情報が時計機構に着地したのち、どのように低酸素適応の制御に結びつくかが分からないので、この点はさらなる研究が必要である。また、本研究で示された MSP 経路と独立の経路で低酸素適応を制御するのかもしれない、この可能性を検討することも重要である。

PHK1/2 による概日時計の制御機構 本研究の成果により、PHK1/2 は、恐らく PRR を含む MSP 経路を介して、時計遺伝子群の発現を制御することがわかった。しかし PHK1/2 により時計機構のどの特性がどのように制御され、それが生理的にどのような意味を持つのかは未解明であるので、これらの点はこれからの重要な課題である。特に、本研究で解析した日周環境条件下だけでなく、連続的な環境条件下での各時計遺伝子の発現パターンに対する影響を調べることにより、位相、周期、振幅といった時計の具体的な特性に対する制御機能が明らかになると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Anami Shu, Yamashino Takafumi, Suzuki Ryo, Nakai Kota, Sato Kensuke, Wu Bowen, Ryo Masashi, Sugita Mamoru, Aoki Setsuyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Red light regulated interaction of Per Arnt Sim histidine kinases with partner histidine containing phosphotransfer proteins in <i>Physcomitrium patens</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 698 ~ 713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12878	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 Kikuchi Haruki, Yamashino Takafumi, Anami Shu, Suzuki Ryo, Sugita Mamoru, Aoki Setsuyuki	4. 巻 616
2. 論文標題 Diurnal control of intracellular distributions of PAS-Histidine kinase 1 and its interactions with partner proteins in the moss <i>Physcomitrium patens</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.05.070	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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木遼、杉田千恵子、一瀬瑞穂、青木撰之、杉田護
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケのPpPPR_32は光化学系I複合体の形成に関与する
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿南秀、山篠貴史、鈴木遼、龍昌志、中井皐太、佐藤健介、杉田護、青木撰之
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケのPAS-Histidine Kinaseの解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木遼、山篠貴史、阿南秀、龍昌志、中井皐太、吳博文、菊地陽貴、杉田護、青木撰之
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケのPAS-Histidine Kinases の機能解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 龍昌志、山篠貴史、佐藤健介、阿南秀、中井皐太、野本友司、青木撰之
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケのPASヒスチジinkinナーゼPHK1とPHK2の機能解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地陽貴、山篠貴史、鈴木遼、阿南秀、龍昌志、杉田護、青木撰之
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケのPASヒスチジinkinナーゼとそのパートナー因子の光応答
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木遼、山篠貴史、菊地陽貴、阿南秀、龍昌志、中井皐太、佐藤健介、杉田護、青木撰之
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケのPASヒスチジinkinナーゼの解析
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 呉博文、山篠貴史、鈴木遼、菊地陽貴、阿南秀、龍昌志、青木摂之
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケの二成分制御系因子機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

青木研ホームページ https://sites.google.com/view/aoki-lab/home
--

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
研究協力者	山篠 貴史 (Yamashino Takafumi)		

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