

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770040

研究課題名(和文) 光を求めて動く植物の仕組み：光による小胞輸送制御の解明

研究課題名(英文) The mechanism of a plant moving toward the light: Elucidation of vesicular transport regulated by light

研究代表者

鈴木 友美 (Suzuki, Tomomi)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10362435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：温室効果ガスの一つであるCO₂削減を目標に、光合成の効率化に関わる青色光受容体フォトトロピン(phot)情報伝達系の解明を試みた。本研究課題では、photの相互作用因子として小胞輸送関連因子であるARF1を取得し、このARF1がphotによって制御されるという断片的な結果を幾つか得ることに成功した。最終目標である「光合成効率が向上した植物の作出」までには至らなかったが、生物のホメオスタシスの維持に重要な役割を担っている小胞輸送が、光環境刺激によって調節を受けるという新規概念提唱の足がかりを作ること成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to clarify the signal transduction phototropin (phot), in order to reduction of a greenhouse gas, CO₂. Phototropin is known as a blue-light receptor involving the efficiency photosynthesis such as phototropism, chloroplast accumulation, Chloroplast avoidance, stomatal opening, and so on. We succeeded to identify ARF1, a factor related to vesicular transport, interacting with phot. Furthermore, we obtained a part of result that phot regulate ARF1. It was unable to reach the ultimate goal of creating plant improved in the efficiency photosynthesis. However, we succeeded in getting a foothold for suggesting new idea which light stimulation regulates the activity of vesicular transport.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答 小胞輸送 光情報伝達

1. 研究開始当初の背景

化石燃料の使用や森林減少などによって、CO₂をはじめとする温室効果ガスが大量に増加しており、それによって地球規模での気候が変わりつつある。その対策として、工業的には温室効果ガスを排出しないようなクリーンエネルギーの利用や設備の開発が進められており、我々の植物分野では光合成活性の上昇による CO₂ の削減を目指した研究が進められている。

光合成は、光エネルギーを利用して空気中の CO₂ からデンプンなどの炭水化物を合成する反応である。この反応の装置やメカニズムを解明することで、光合成そのものの活性を上昇させる研究が多数行われているが、同時に光合成の効率化に寄与する植物の応答解明も重要な研究課題である。光合成の効率化という点に分かりにくい、例えば、弱光下で光を十分吸収できるように植物を光の方向に伸長させる「光屈性」や細胞内の葉緑体を葉の表面側に集める「葉緑体集合反応」、逆に強光下では光による障害を避けるために葉緑体を細胞の側面に移動させる「葉緑体逃避反応」、さらに CO₂ を取り込むため光に応じて気孔開口を調節する応答などがそれに相当する。そして、これら効率化応答の全てに光受容体であるフォトトロピン (phot) が関与していることが既に分かっている。

フォトトロピン分子は主に細胞膜に局在する光依存性のキナーゼであり、細胞膜周辺で機能すると考えられている。近年我々は、一部のフォトトロピンが青色光依存的にゴルジ体に移行することを見出したが、ゴルジ体における生理的役割に関しては不明である。遺伝学的解析からフォトトロピン応答に関与する因子が、これまでに幾つか見つかっているが、その中にリン酸化基質となり得るものはほとんど見つかっておらず、膜局在様式を含めフォトトロピンの情報伝達機構に関しては全く明らかとなっていない。そこで、我々はモデル生物であるシロイヌナズナを用いて分子レベルでのフォトトロピン情報伝達機構の解明を試みた。

先ず酵母 Two-hybrid 法にてフォトトロピンと相互作用する因子を検索したところ、小胞輸送に関与する低分子量 G 蛋白質 ARF1 (ADP ribosylation factor) の取得に成功した。ゲノム配列からシロイヌナズナでは22種類のARF遺伝子の存在が明らかになっているが、動物のそれほど詳細な解析は進んでおらず、その生理的役割は不明である。しかし、植物においてもARF1はゴルジ体に局在することが既に報告されており、このことは、フォトトロピンが青色光依存的にゴルジ体に移行することと関連があると考えた。本研究課題では、ARF1のフォトトロピン応答における分子機構を調べることで「青色光による小胞輸送の制御」について明らかにする。

2. 研究の目的

光合成効率の向上は、温室効果ガスの一つである CO₂ の吸収など地球規模の環境改善だけでなく、炭素固定による食料生産性の向上にも繋がると考えられる。光合成に必要な光はクロロフィルによって受容される一方、光

の種類や強弱などの光環境はフィトクロム、クリプトクロム、フォトトロピンなどの光受容体によって感知されることが知られている。

光受容体の中でも青色光を受容するフォトトロピンは、「葉緑体定位運動・光屈性・気孔開口・葉の偏平化」など光合成の効率化に寄与する応答に関わっている。フォトトロピンが関わる応答の分子機構を明らかにする課程で、我々はフォトトロピンと相互作用する因子として小胞輸送関連因子 ARF1 を取得した。現在、この取得した小胞輸送関連因子がフォトトロピンによって制御されるという断片的な結果を幾つか得ている。本研究課題では、フォトトロピン応答における小胞輸送関連因子の分子機構を調べることで「青色光による小胞輸送の制御」について明らかにする。このメカニズムが明らかになることで、強光下でも光障害を受けにくく、弱光下でも効率良く光を吸収し、光合成活性が上昇するような植物の生産を期待している。

さらに生物学的な見地としては、生物のホメオスタシスの維持に重要な役割を担っている小胞輸送が、光環境刺激によって調節を受けるという新規概念は非常に興味深く、フォトトロピン情報伝達機構の解明だけに留まらない生命現象の解明に貢献できる可能性があると考えている。

3. 研究の方法

真核細胞に保存された基本的な機構である「小胞輸送」が光によって制御されているのかを明らかにするために、本研究課題では以下の3つの項目に焦点をあて、解析を進めた。

(1) 小胞輸送関連因子 ARF1 のフォトトロピン応答における役割解明

フォトトロピンと ARF1 が相互作用することは既に確認済みだが、基本的な細胞機構の一つである小胞輸送の重要因子である ARF1 が本当に光応答に関与しているのかを明らかにするため、変異体を用いた機能解析を行う。先ず、ARF1 の恒常的活性型・不活性型変異体を用いてフォトトロピン応答に対する影響を観察する。さらに、変異型 ARF1 を用いることで基本的な細胞機能にも影響が出る可能性があるため、ARF1 との相互作用に関わるフォトトロピン側の変異体も取得し、その解析を行う。

(2) 青色光による小胞輸送制御の分子機構解明

フォトトロピンによる ARF1 の活性制御 Ser/Thr キナーゼであるフォトトロピンと低分子量 G タンパク質である ARF1 が相互作用することで、相互にどのように関わっているのか、生化学的手法を用いて解析する。この解析によって、フォトトロピン情報伝達における ARF1 の分子レベルでの役割が明らかになると考えられる。

フォトトロピン及び ARF1 の細胞内局在における光の影響

フォトトロピンは暗所では細胞質膜に局在するが、青色光照射によりゴルジ体等に移行する。

植物の ARF1 は、動物や酵母の ARF1 と同様にゴルジ体に局在し、小胞輸送に関与していることが既に明らかとなっている。青色光照射によって活性化された phot がゴルジ体で何をしているのか、相互作用の相手である ARF1 とゴルジ体でどのように関わっているのかを詳細に解析する。

(3) フォトリポピン情報伝達系の解明

フォトリポピンのリン酸化基質の検索

フォトリポピン分子は Ser/Thr キナーゼ領域を有し、生理機能にキナーゼ活性を必要とするにも拘わらず、その基質はほとんど見つからない。そこで、フォトリポピン情報伝達経路の下流因子を取得する目的でフォトリポピン依存的にリン酸化されるタンパク質を生化学的に同定する。

フォトリポピンの細胞質膜結合に関わる因子の検索

フォトリポピン分子は膜局在に関わる領域を有していないにも拘わらず、フォトリポピンは暗所で細胞質膜に存在する。その局在は青色光依存的に変化し、ゴルジ体等に移行する。フォトリポピンが機能する細胞内場及び、フォトリポピンの局在変化機構を明らかにするため、細胞内局在が異常になった変異体の取得を行い、その解析を行う。

4. 研究成果

フォトリポピンに関わる応答の分子機構を明らかにする過程で、フォトリポピンと相互作用する因子として小胞輸送関連因子 ARF1 を取得した。(1)小胞輸送関連因子 ARF1 のフォトリポピン応答における役割解明、(2)青色光による小胞輸送制御の分子機構解明、(3)フォトリポピン情報伝達系の解明、の3つの研究項目を設定し、各々について解析を進めた。

(1)に関しては、各種変異体を用いた解析を行った。ARF1 の恒常的活性型・不活性型変異体を用いた解析においては、一部のフォトリポピン応答において ARF1 が関与するという結果を得た。さらに、ARF1 との相互作用に関与する phot 変異体の取得にも成功し、相互作用に関わる phot の分子内領域を明らかにした。今後は、変異 phot を用いた植物の応答及び生化学的な解析を進めることで、より詳細な ARF1 の役割を明らかにする。

(2)に関しては、植物体におけるフォトリポピンと ARF1 の局在について詳細に解析をした結果、両因子が光依存的に細胞内においても相互作用することを明らかにした。現在、生化学的な解析を進めており、フォトリポピンによる ARF1 の活性制御について分子レベルの機構が明らかになると考えられる。

(3)に関しては、リン酸化基質のプロテオーム解析、変異源処理による遺伝学的スクリーニング、酵母 Two-hybrid スクリーニング、などの解析によって得た幾つかの因子について解析をすすめることが出来た。また、フォトリポピンの細胞質膜結

合に関わる phot 分子内変異を酵母 Cyto-trap 法を利用して取得することに成功した。現在、これら変異 phot の細胞内局在及び表現型について詳細な解析を行っており、フォトリポピンの細胞質膜局在及び光依存的局在変化機構、それに関わる因子について明らかになると考えられる。

本研究課題では、最終目標である「光合成効率が向上したシロイヌナズナの取得」にまでは至らなかったが、その第一歩である情報伝達機構解明については多くの結果を得ることができた。

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3件)

Yamamoto K, Suzuki T, Aihara Y, Haga K, Sakai T, Nagatani A. 「The phototropic response is locally regulated within the topmost light-responsive region of the Arabidopsis thaliana seedling」 Plant Cell Physiol., 2014, 55(3), 497-506, 査読有

DOI: 10.1093/pcp/pct184

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, Tokutomi S. 「Light-induced conformational changes of LOV1 (light oxygen voltage-sensing domain 1) and LOV2 relative to the kinase domain and regulation of kinase activity in Chlamydomonas phototropin」 J Biol Chem., 2014, 289(1), 413-422, 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M113.515403.

Aihara Y, Yamamoto T, Okajima K, Yamamoto K, Suzuki T, Tokutomi S, Tanaka K, Nagatani A. 「Mutations in N-terminal flanking region of blue light-sensing light-oxygen and voltage 2 (LOV2) domain disrupt its repressive activity on kinase domain in the Chlamydomonas phototropin」 J Biol Chem., 2012, 287(13), 9901-9909, 査読有

DOI: 10.1074/jbc.M111.324723.

[学会発表](計10件)

鈴木 友美、長谷 あきら、「青色光受容体 phot の膜局在メカニズム」、日本植物生理学会年会、2014年3月18日、富山大学五福キャンパス

小林 幹康、Yu Zhanqin、鈴木 友美、細川 陽一郎、長谷 あきら、「シロイヌナズナ表皮細胞における力学的刺激に応

答した細胞質ゾルタンパク質の動態変化」近畿植物学会、2013年12月7日、帝塚山大学

亀井 保博、浦和 博子、山本 和彦、兼子 拓也、木村 英二、斎田(谷口) 美佐子、鈴木 友美、長谷 あきら、島田 敦子、武田 洋幸、「モデル植物へのIR-LEGO(赤外線による局所遺伝子発現)応用研究 基生研共同利用研究例の紹介」、日本植物生理学会年会、2013年3月21日、岡山大学

小林 幹康、鈴木 友美、長谷 あきら、「力学的刺激に应答して形成されるフィトクロム A の細胞質顆粒」、日本植物生理学会年会、2013年3月22日、岡山大学
山本 和彦、相原 悠介、鈴木 友美、長谷 あきら、「シロイヌナズナにおける光屈性情報伝達機構の空間的解析」、日本植物生理学会年会、2013年3月23日、岡山大学

相原 悠介、山本 隆晴、岡島 公司、山本 和彦、鈴木 友美、徳富 哲、田中 一馬、長谷 あきら、「フォトリピンのLOV2領域・N末端側近傍の変異によりキナーゼ活性の抑制機能が失われる」、日本植物生理学会年会、2012年3月17日、京都産業大学

後藤 一也、鈴木 友美、藤原 正幸、深尾 陽一郎、長谷 あきら、「フィトクロム A の作用機構の生化学的解析」、日本植物生理学会年会、2012年3月16日、京都産業大学

山本 和彦、鈴木 友美、長谷 あきら、「光屈性における青色光情報伝達機構の空間的な解析」、Global COE joint Symposium、2012年1月21日、東京大学
亀井 保博、浦和 博子、山本 和彦、兼子 拓也、木村 英二、出口 友則、弓馬 俊輔、北野 健、尾田 正二、三谷 啓志、蟹江 裕太、斎田(谷口) 美佐子、鈴木 友美、長谷 あきら、島田 敦子、武田 洋幸、岡田 清孝、「赤外レーザーによる遺伝子発現システム(IR-LEGO)の様々なモデル生物への応用」、日本分子生物学会年会、2011年12月、パシフィコ横浜

Yamamoto K, Suzuki T, Okajima K, Tokutomi S, Nagatani A, 「How does phototropins regulate auxin distribution in phototropism?」 The 5th International Symposium of the Biodiversity and Evolution Global COE project、2011年7月9日-10日、京都大学

〔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://physiol2.bot.kyoto-u.ac.jp/~nagatani/HP3/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 友美 (SUZUKI, Tomomi)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号: 10362435

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし