

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580498

研究課題名(和文) 光スイッチシグナルの抑制機構の解明と管理された光環境に適した植物の開発

研究課題名(英文) Elucidation of inhibitory mechanisms of transcriptional light switch for development of plants specialized for growth in artificial light.

研究代表者

清水 正則 (SHIMIZU, Masanori)

常葉大学・健康プロデュース学部・准教授

研究者番号：40468236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体における2つの光化学系の量的調節は、様々な光環境下で高効率に光合成を行うために重要である。この量的調節は、プラストキノンのレドックスシグナルによって転写調節因子のSIG1をリン酸化することによって制御される。この光スイッチ機構の解明を目指し、SIG1のリン酸化酵素および脱リン酸化酵素の同定、および、循環的電子伝達に關与するPGR5、ステート遷移を担うSTN7、さらに、光合成抑制因子であるSUG102に対する変異体における光スイッチ機構への影響を解析した。これらの結果、PGR5とSUG102は光スイッチを制御している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Transcriptional light switch in chloroplasts was regulated by a modification of sigma factors based on the redox state of the plastoquinone. This switching mechanism was responsible for maintaining the photosynthetic efficiency in different light conditions. To elucidate the molecular mechanism in the light-switch pathway, we were attempting to identify the proteins related to this pathway by genome-wide screening and transgenic analysis. In this study, we identified 2 kinases and 6 phosphatases for SIG1, and analyzed the influence of PGR5 related to cyclic electron flow, STN7 related to state transition and SUG102 which were selected as genes suppressed photosynthesis in greening calli, on transcriptional light switch. These results were shown that PGR5 and SUG102 play critical roles in this switching mechanism. Our findings would be useful for development of plants acquiring high-photosynthetic activity in different artificial lights.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：光合成 光スイッチ 転写制御 シグマ因子 レドックス制御

## 1. 研究開始当初の背景

食糧の品質と量の安定供給には究極的には植物工場のような最適化された条件下で栽培する必要がある。植物は強光下で生育できるように複数の光ストレス防御機構を進化させた。本申請者は、これらの防御機構のうち光合成を高効率に維持する機能を持つ光化学系の量的調節が光条件を感知した葉緑体遺伝子発現制御系(光スイッチ機構)によって行われていることを見出した。この光スイッチ機構と他の光ストレス防御機構との相互作用を解明することによって光スイッチ機構の抑制を解除できれば管理された光環境に最適化した高効率に光合成を行う植物体の開発が可能となる。

## 2. 研究の目的

光合成を高効率に維持するために働く光スイッチを抑制あるいは促進する機構を解明し、光スイッチをより効率化させることによって光合成効率を向上させる。

## 3. 研究の方法

光防御機構を抑制した植物における光スイッチ機構および光合成活性への影響を明らかにする。そのために、光スイッチ機構および光防御機構に關与する遺伝子発現を抑制した変異体を作製し、光スイッチ機構および光合成活性への影響を検討した。光スイッチ機構は、PQの酸化還元状態(レドックス)をシグナルとして制御されている。実験では酸化型PQは700nm光照射、または3-(3',4'-dichloro phenyl)-1,1'-dimethyl urea (DCMU) 処理により、還元型は680nm光照射、または2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone (DBMIB) を用いて生育した植物を用いた。光スイッチ機構への影響は、psaAとpsbAの発現解析によって行った。

### (1) 光スイッチ機構に關与するシグマ因子および光条件の決定:

光スイッチは転写調節因子SIG1の修飾によって制御している。シロイヌナズナに存在する6種のシグマ因子の光スイッチに対する効果を検討した。SIG1のリン酸化部位と同様の位置にリン酸化部位が予測されたSIG3およびSIG5の遺伝子破壊システムを作成した。また、リン酸化部位に変異を導入した強制発現体を作成した。さらに、小麦無細胞タンパク質翻訳系により合成したタンパク質を用いて、SIG1のリン酸化酵素および脱リン酸化酵素をスクリーン法および*in vitro*リン酸化によって同定した。

光スイッチが効率的に働く光条件を決定するため480nm、680nm、690nm、700nm、720nmの波長のLED光を用いて植物を生育させた際の光スイッチ機構への影響を検討した。

### (2) 光スイッチ機構に及ぼす循環的電子伝達系(CEF)およびステート遷移の役割:

光スイッチは2つの光化学系から励起される電子の量を調節する機能を持つ。CEFやステート遷移は、同じように光化学系に流れる電子の流れを調節する機能を担う。そのためCEFやステート遷移は光スイッチ機構を保護する一方で、必要な光シグナルを減衰させてしまう光防御機構であると考えられた。しかし、CEFやステート遷移と光スイッチとの関連は明らかでない。そこでCEFにおいて機能する*proton gradient regulation 5 (pgr5)*とステート遷移に關与する*state transition 7 (stn7)*の遺伝子破壊システムを用いて、これらの光防御系が働かない際の光スイッチ機構への影響を検討した。

### (3) 新規の光防御機構に關与するsug変異システムの光スイッチ機構への關与:

4種類の変異システム(*sug*)は、アクチベシ

ヨンタギング法を用いて緑化カルスを誘導する培地においても光合成ができなくなった変異系統であり、当研究グループにおいて選抜された。これらの原因遺伝子は光合成を抑制する光防御機構であることが期待される。これら変異体における原因遺伝子を同定し、これらの遺伝子破壊系統および強制発現系統を解析することによって光スイッチ機構への影響を検討した。また、原因遺伝子の機能解析を行うため小麦無細胞タンパク質翻訳系により合成したタンパク質を用いてプルダウンアッセイを行い、これに結合するタンパク質を検索した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 光スイッチ機構に關与するシグマ因子および光条件の決定:

6種類のシグマ因子のうちSIG1と同様のリン酸化部位を持つSIG3とSIG5のT-DNA挿入系統(KO系統)を得た。各系統の生育は、SIG5において致死、SIG1およびSIG3では、野生系統と同様であった。それぞれのSIGに存在するリン酸化部位に変異を導入し光スイッチへの影響を検討したところはSIG1のT170Vの変異が最も影響が大きいことが明らかとなった。次に、SIG1に対するリン酸化および脱リン酸化する酵素の同定を行った。小麦無細胞タンパク質翻訳系により合成したSIG1とシロイネナズナRAFLクローンのうちリン酸化酵素と機能予測される約700クローンとの結合をスクリーン法を用いて検出した。強く結合したのから48クローンを用いてSIG1およびSIG1-T170に対する*in vitro*リン酸化実験を行った。その結果、SIG1のT170のリン酸化酵素として2クローン(SOPK1、SOPK2)を同定することができた(図1)。

次に、SOPK1のKO系統を作製し、700nmを24時間照射後、RNAを調整し葉緑体遺伝子発現制御系として*psaA*および*psbA*の発

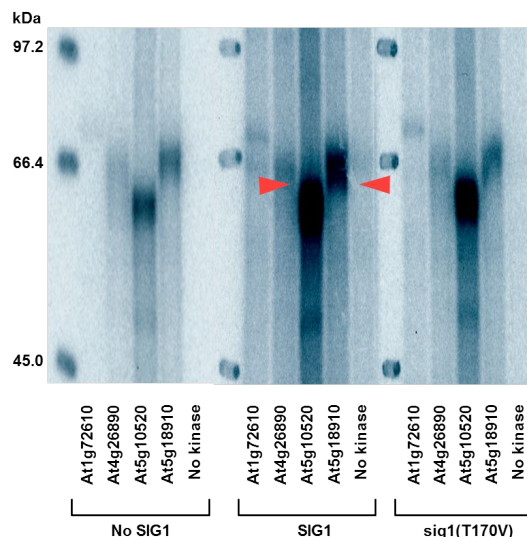


図1. リン酸化酵素の同定: αスクリーンによって選抜したクローンによるSIG1およびsig1(T170V)のリン酸化反応を行った。矢印はリン酸化されたSIG1のバンドを示す。

現解析を行った。その結果、SOPK1は光スイッチにおける転写を抑制することが確認された。(図2)。SOPK2については適切なKO系統が存在しなかったため今後は、RNA干渉法等を用いて解析していく必要がある。

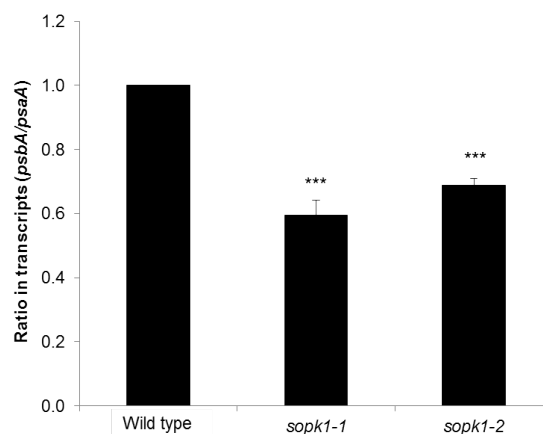


図2. SOPK1による光スイッチへの影響. 2週間生育させた野生系統とSOPK1-KO系統の個体に700nmの光を24時間照射後、RNAを調整し*psaA*および*psbA*の発現解析を行った。\*\*\* $P < 0.001$

次に、SIG1に対する脱リン酸化酵素をスクリーン法を用いて選抜したが、候補は得ることができなかった。原因として脱リン酸化酵素の基質特異性は低い可能性が考えられたため、変異体解析を行った。シロイネナズナゲノム中に予測される脱リン酸化酵素のうち葉緑体に局在予測されるものに対してKO系統を入手した。KO系統における光スイッチへの影響を調べたところ、6系統(SOPH1~6)で*psaA*あるいは*psbA*の発現に変化が見られた。さらに解析を進め光スイ

チとの関連を検討する必要がある。

SOPK1 と SOPK2 の局在を GFP により調べた結果、細胞質あるいはゴルジ体の可能性が示唆された。以上の結果から、SIG1 は細胞質あるいはゴルジ体においてリン酸化されたのちに葉緑体に輸送され、光スイッチの制御を行う PQ レドックスシグナルは SOPH 活性のみを制御していると考えられた。

今後、SIG1 のリン酸化を行う SOPK と SOPH の機能を解析するとともに、光スイッチに参与することが報告された CSK による活性制御機構を明らかにすることによって光スイッチの分子機構を解明していく。

また、光スイッチが働く波長光を検討した結果、700nm だけでなく 480nm においても光スイッチ機構が働くことが明らかとなった。この結果は、光スイッチを利用した物質生産に応用する際に重要な成果となる。光スイッチに 680nm と 700nm 用いる場合、LED によるシャープな波長を要求する点で今後の課題となるが、680nm と 480nm を使用する場合には光源の波長域の制約はそれほど厳密である必要はないことから商業化の観点から重要な成果となった。

## (2) 光スイッチ機構に及ぼす循環的電子伝達系 (CEF) およびステート遷移の役割:

CEF において機能する PGR5 の KO 系統とステート遷移に参与する STN7 の KO 系統における光スイッチへの影響を検討した (図 3)。その結果、STN7 は光スイッチに影響を与えないことが明らかとなった。一方、PGR5 の機能不全によって光スイッチによる『OFF』が機能しないことから CEF は光スイッチにおいて SIG1 のリン酸化を促進する、あるいは脱リン酸化酵素を阻害する役割があることが示唆された。また、光スイッチにおいて報告されていた CSK は脱リン酸化酵素の活性化を行う可能性が示唆された (図 3)。これらの結果は、CEF や CSK による光ス

witch の制御機構を分子レベルでの解明するために重要な成果となった。

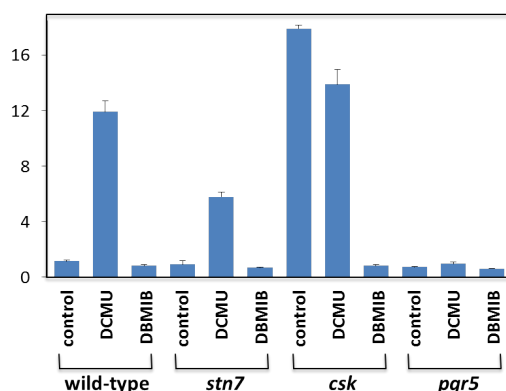


図3. PQレドックスシグナルに影響を及ぼす因子の影響。10日間生育後、水、DCMU溶液およびDBMB溶液中で2日生育した。RNAを調整しpsaAおよびpsbAを定量した。

## (3) 新規の光防御機構に参与する sug 変異系統の光スイッチ機構への関与:

緑化カルス誘導培地において緑化不能となった SUG102 変異体の原因遺伝子を同定したところ動物神経系に存在する CRIPT のシロイヌナズナオーソログであった。SUG102 の KO 系統および強制発現系統を作製し、光スイッチ機構への影響を調べた (図 4)。その結果、KO 系統において *psaA* の発現は上昇がみられた。この結果から、SUG102 が光スイッチ機構に参与することが明らかとなったため、SUG102 の機能解析を行った。SUG102 強制発現系統はカルス誘導培地において野生系統に比べ黄色色素の沈着が見られた。この黄色色素の成分分析の結果、クロロフィルの分解産物の可能性が示唆された。また、SUG102 は動物において CRIPT は PDZ ドメインを持つ PSD-95 に結合することが報告されていることから、シロイヌナズナデータベースから PDZ ドメインを持つクローンを選抜した。これらのうち RAFL クローンが存在している 18 種類を小麦無細胞タンパク質合成系によって合成し、SUG102 に対する結合実験を行った。その結果 1 種類が SUG102 に結合することが示唆された。さらに解析を進めることによって SUG102 の光スイッチに対する抑制機構が明らかにな

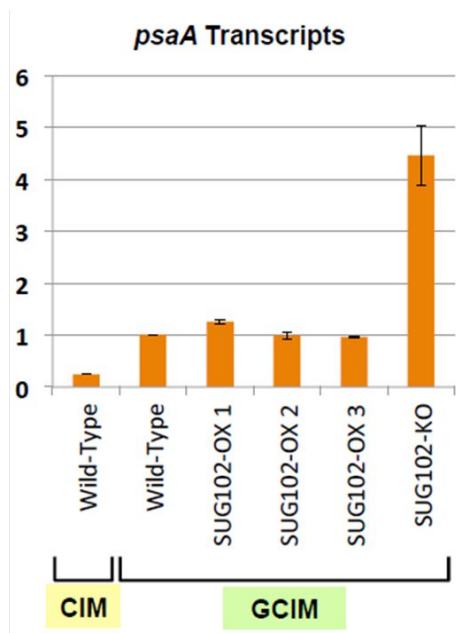


図4. SUG102の光スイッチへの影響. 緑化カルス誘導培地においてSUG102のKO系統と強制発現系統を生育し、RNAを調整後、*psaA*の発現解析を行った。

ると期待する。

今後は、光スイッチを調節することが明らかとなった SOPK、SOPH、PGR5、CSK がどのように光スイッチと関連しているのか詳細に検討し、分子レベルで光スイッチ機構を解明することによって、管理された光条件下では必要ない光防御機構を除去した場合の光合成効率への効果を検討していく。

## 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)

〔学会発表〕(計 8件)

青木亮裕、清水 正則、小林 京子、細谷 孝博、熊澤 茂則、小林 裕和、シロイヌナズナの緑化を抑制する動物神経系CRIPT相同タンパク質の機能. 日本農芸化学会2015大会、2015年3月28日、岡山県・岡山市。

柴田 考世、CHUENWARIN Paweena、山本 峻資、清水 正則、小林 裕和、外来性タンパク質を葉緑体で高蓄積させるための「光スイッチ」の機構と応用. 日本農芸化学会2015大会、2015年3月28日、岡山県・岡山市。

Chuenwarin Paweena、島崎 あづみ、清水 正則、勝又 政和、小林 裕和、A Protein Phosphatase Involved in Light-Regulated Expression of Photosynthesis Genes in Arabidopsis Chloroplasts. 第55回日本植物生理学会年会 2014年3月19日 岡山県・富山市。

青木亮裕、清水 正則、澤崎 達也、小林 裕和、動物神経系CRIPTと相同なシロイヌナズナ緑化抑制タンパク質. 第55回日本植物生理学会年会 2014年3月19日 岡山県・富山市。

小林裕和、清水正則、澤崎達也、タンパク質合成系としての優位性とその活用 --- 因子キナーゼおよびbHLH標的DNAの探索. 第54回日本植物生理学会年会 2013年3月23日 岡山県・岡山市。

山本峻資、清水正則、小林裕和、葉緑体における光色依存遺伝子発現「光スイッチ」. 第54回日本植物生理学会年会 2013年3月22日 岡山県・岡山市。

Chuenwarin P, Kato A, Shimizu M, Sawasaki T and Kobayahsi H, Components involved in phosphorylation cascade of sigma factor1 in Arabidopsis. 第54回日本植物生理学会年会 2013年3月22日 岡山県・岡山市。

小林裕和、太陽エネルギー依存物質生産系である植物「葉緑体」のエンジニアリング. 新技術説明会 2013年1月25日 愛知県・名古屋市

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 目的遺伝子を発現させるための光学スイッチ

発明者: 小林裕和、清水正則、小川剛史、中西幹育

権利者: 同上

種類: 特許権

番号：特願 2013-050728

出願年月日：2013 年 3 月 13 日

国内外の別： 国内

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

清水 正則 (SHIMIZU, Masanori)

常葉大学・健康プロデュース学部・准教授

研究者番号：40468236

### (3)連携研究者

小林 裕和 (KOBAYASHI, Hirokazu)

静岡県立大学・食品栄養環境科学研究

院・教授

研究者番号：80170348