

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840097

研究課題名(和文) マイクロドメインにおける光受容体フォトリポピンシグナリングの解明

研究課題名(英文) Analysis of signaling of a phototropin photoreceptor in microdomains

研究代表者

末次 憲之 (Suetsugu, Noriyuki)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：60514156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：青色光受容体フォトリポピンのシグナリングが細胞膜マイクロドメインで起こることを検証するため、シロイヌナズナとコケ植物ゼニゴケを用いて、フォトリポピン結合タンパク質であるBTB/POZタンパク質である、光屈性に関わるNPH3と葉緑体運動に関わるNCH1の解析をおこなった。これまでシロイヌナズナNPH3がマイクロドメイン様構造に局在することがわかっていたが、本研究によりシロイヌナズナとゼニゴケ両方においてNCH1もマイクロドメイン様構造に局在することを明らかにした。さらにNPH3同様にNCH1のフォトリポピン依存の青色光による脱リン酸化を検出した。

研究成果の概要(英文)：To examine the possibility that phototropin functions in microdomains on the plasma membrane, using *Arabidopsis thaliana* and the liverwort *Marchantia polymorpha*. I analyzed two phototropin-interacting BTB/POZ proteins NPH3 and NCH1, that regulate phototropism and chloroplast movement, respectively. Although I had found that NPH3 localized in microdomain-like structures on the plasma membrane in *A. thaliana*, I found the similar localization pattern of NCH1 in both *A. thaliana* and *M. polymorpha*. Furthermore, I detected the blue-light-dependent dephosphorylation of NCH1 in a phototropin-dependent manner, similar to that of NPH3.

研究分野：光反応

キーワード：葉緑体運動

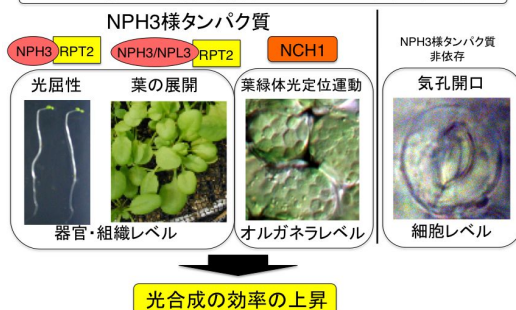
1. 研究開始当初の背景

フォトトロピンとよばれる細胞膜に局在する青色光受容体キナーゼは、光合成の効率化を促進する様々な生理現象を制御している。例えば、光屈性や葉の展開、気孔開口、葉緑体光定位運動など、器官・細胞・オルガネラレベルの光応答反応が知られている。フォトトロピンシグナリングの初期反応に関わる因子として、BTB/POZ ドメインとよばれるタンパク質結合ドメインを持つタンパク質 NPH3 (NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3) が同定された (Motchoulski and Liscum, 1999)。NPH3 は細胞膜に局在するフォトトロピン結合タンパク質であり、光屈性と葉の展開を制御する (Motchoulski and Liscum, 1999; Inoue et al., 2008)。NPH3 様 BTB/POZ ドメインタンパク質 (以後“NPH3 様タンパク質”とよぶ) はシロイヌナズナに 20 数種類存在するが、もう一つの NPH3 様タンパク質 RPT2 (ROOT PHOTOTROPISM 2) もまた細胞膜に局在しフォトトロピン結合能をもち、光屈性と葉の展開を制御している (Sakai et al., 2000; Harada et al., 2013)。しかし NPH3 と RPT2 どちらも葉緑体光定位運動と気孔開口に関与していない (Inada et al., 2004; Tsutsumi et al., 2013)。NPH3 も RPT2 フォトトロピンシグナリングの初期反応に関与している事は明らかであるが、発見から 10 年以上も経過した現在までその作用機構はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

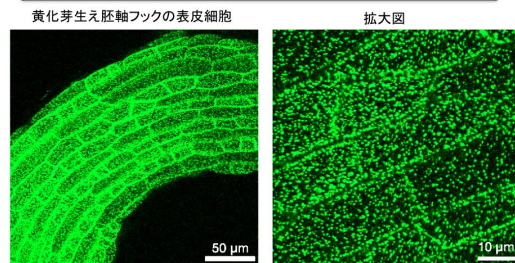
本研究でフォトトロピンシグナリングにおける NPH3 様タンパク質の機能を詳細に再検討した。その結果、NPH3 とともに葉の展開を制御する NPL3 (NPH3-LIKE 3) と、葉緑体光定位運動を制御する NCH1 (NPH3-LIKE PROTEIN for CHLOROPLAST MOVEMENT 1) の二つの NPH3 様タンパク質がフォトトロピンシグナリングに関与することを発見した (論文準備中) (図 1)。これらの結果から、主な複数のフォトトロピン依存の光応答反応の初期反応に NPH3 様タンパク質が関わり、現象特異的な NPH3 様タンパク質がそれぞれの光応答反応を制御する事が示唆された (図 1)。

図1. NPH3様タンパク質が制御するフォトトロピン依存の光応答反応



しかし最も重大な発見は、NPH3 (と NPL3) の GFP 融合タンパク質が細胞膜上で粒状の構造をとっていたことである (論文準備中)。

図2. NPH3-GFP の細胞膜におけるマイクロドメイン様局在



この構造は動物や菌類で知られる“マイクロドメイン”(あるいは“脂質ラフト”)と非常に良く似ていた (図 2)。マイクロドメインは細胞膜上での特別な部位であり、複数のシグナリング分子が一カ所に集まることにより相互作用の可能性を高め、信号伝達の迅速化と増幅を可能にしている。マイクロドメインは、最近植物でも存在が確認されており、動物や植物におけるマイクロドメインタンパク質として知られる“フロチリン”の GFP 融合タンパク質の局在は、NPH3-GFP の粒状の構造ときわめて良く似ていた。面白いことに、同じ NPH3 様タンパク質でありながら RPT2 は細胞膜に一樣に存在し NPH3 のような粒状の構造体をとらない。そして NCH1 は NPH3 と RPT2 の中間型で、細胞膜全体に一樣に存在するが一部粒状構造に局在した。この結果は、マイクロドメイン様局在の程度の差異が、制御する現象の特異化に関与していることを示唆する。岩手大学上村松生教授との連携により、マイクロドメインタンパク質が豊富に含まれることが知られる界面活性剤抵抗性細胞膜画分の解析を行ったところ、NPH3 様タンパク質だけでなく、フォトトロピンをはじめとした葉緑体運動や光屈性などフォトトロピンシグナリングに関与する多くの因子がこの画分に存在することが分かった。以上のことから、フォトトロピンシグナリングはマイクロドメイン上で行われている可能性が示唆され、その分子メカニズムの解明が光合成効率化を制御する光応答反応の深い理解につながり、将来的な応用にも貢献できると期待する。

本研究は、光受容体フォトトロピンが光合成の効率化を促進するという点では共通であるが、まったく反応様式が異なる光屈性、葉緑体光定位運動、気孔開口、葉の展開などを制御する初期反応を解明する包括的な研究である。申請者は、NPH3 様タンパク質がフォトトロピンシグナリング初期反応の共通点であり、かつそれぞれの反応の特異性が機能している NPH3 様タンパク質の種類によって説明できるという重要な発見をした。しかし、本研究のもっとも独創的で新規のアイデアは、フォトトロピンシグナリングの初期反応が細胞膜マイクロドメイン上で起こる信号伝達系を介しているということである。フォトトロピンは葉緑体運動等秒単位で起こりえる光反応を制御し、NPH3 様タンパク質をはじめとした様々なタンパク質と複合体を

形成する事が知られている。これは、マイクロドメインがタンパク質を一カ所に集合させる事によりシグナリングの迅速化と増幅を促す場として機能することと完全に一致している。本研究は、申請者らがこれまで行ってきた葉緑体光定位運動の研究だけでなく、世界中の光屈性や気孔開口の研究からもこれまで明らかにされず、予想もされていなかった観点からフォトリポピンシグナリングを解析するため、近年停滞しているフォトリポピン研究を飛躍的に推進すると期待している。

3. 研究の方法

マイクロドメインにおけるフォトリポピンシグナリングの検証とその構成物の解明のため、フォトリポピンシグナリングの必須因子である NPH3 様タンパク質(特に NPH3, NCH1 と RPT2)を中心とした解析を行う。明らかなマイクロドメイン様局在を示す NPH3-GFP の局在と動態の解析から、光刺激に対するフォトリポピンマイクロドメインの反応性を調べる。シロイヌナズナだけでなくコケ植物ゼニゴケも材料とすることで、陸上植物におけるマイクロドメインにおけるフォトリポピンシグナリングの普遍性を検証する。

(1) NPH3 マイクロドメイン様局在の解析。

NPH3-GFP の粒状構造が、フロチリンなどの植物マイクロドメインマーカーと共局在するか調べ、NPH3 のマイクロドメイン局在を検証する。また、マイクロドメイン構造に影響を与えることが知られるステロールキレーターなどの薬剤を用いて、NPH3-GFP のマイクロドメイン局在をさらに裏付ける。青色光受容体フォトリポピンによる制御を調べるため、光条件の変化あるいはさまざまなフォトリポピンシグナリングの変異体における NPH3 マイクロドメイン様構造の挙動を調べる。NCH1-GFP も一部粒状構造が見られるので、NPH3-GFP と同様の解析を行い、さらに NPH3 のマイクロドメイン様構造との共局在の可能性を検証する。

(2) マイクロドメイン局在と生理反応の関係

NPH3-GFP はほぼ粒状の構造だけに局在するが、NCH1-GFP は細胞膜全体と粒状の構造両方に局在する。NPH3 は光屈性を制御するが葉緑体光定位運動に関与しない。一方 NCH1 は葉緑体光定位運動を制御するが光屈性に関与しない。この局在の違いと制御する反応の違いとの関連を調べるため、これらの間のキメラタンパク質を各変異体で発現させることにより、キメラタンパク質の局在と変異体における光屈性と葉緑体光定位運動反応を調べる事により、マイクロドメイン局在と各変異体の生理現象の相関関係を調べる。また RPT2-GFP は細胞膜

全体に局在し粒状の構造を形成しないので、RPT2 と NPH3, NCH1 との間のキメラタンパク質を発現する形質転換体も作成し、同様の解析を行う。

(3) NPH3 マイクロドメイン様構造のプロテオーム解析

NPH3 マイクロドメイン様構造にはフォトリポピンシグナリングに関わる因子が存在する可能性が高いので、NPH3-GFP 形質転換体や抗体を利用して、細胞膜画分あるいは界面活性剤抵抗性細胞膜画分から NPH3 マイクロドメイン様構造に含まれるタンパク質のプロテオーム解析を行う。RPT2 と NCH1 でも同様の実験をおこなうことにより、光屈性、葉緑体光定位運動、葉の展開の各生理反応における信号伝達系の経路を明らかにし、フォトリポピンシグナリングの分岐点を明らかにする。

4. 研究成果

(1) RPT2 の葉緑体運動における機能の解明

nch1 変異体では野生型と比べて弱いものの集合反応が誘導されるので、NCH1 と冗長的に機能する NPH3 様タンパク質の存在が示唆された。多重変異体の解析から *nch1* と *rpt2* の二重変異体 (*rpt2nch1*) で集合反応を完全に欠損することがわかった。逃避反応を欠損する *phot2* 変異体との三重変異体 (*phot2rpt2nch1*) では、フォトリポピンを欠損する *phot1phot2* 二重変異体同様集合反応と逃避反応両方を欠損していた。これまで RPT2 は葉緑体運動に関与していないと報告されていたが、本研究により、RPT2 は NCH1 とともに集合反応を制御することが示された(論文投稿中)。

(2) NPH3, NCH1, RPT2 のフォトリポピンシグナリングにおける機能分担の解析

これまで NPH3 と RPT2 は光屈性と葉の展開に特異的で、葉緑体運動と気孔開口には関与しないと報告されていた。本研究により、NCH1 が葉緑体集合反応の制御因子として同定され、RPT2 も集合反応に関与することが示された。そこで NPH3, NCH1, RPT2 のフォトリポピンに制御される現象への関与を調べるために、*nph3*, *rpt2*, *nch1* の間の多重変異体を作成し、変異体における光屈性、葉緑体運動、気孔開口、葉の展開を解析した。

nph3 変異体は単独で光屈性を完全に失っているが、*rpt2* 変異体は弱い青色光下でわずかながら光屈性を示すことが知られている。*nch1* 変異体は野生型同様の光屈性を示し、*rpt2nch1* 二重変異体は *rpt2* 変異体と同程度の光屈性反応を示した。このことから、NCH1 は光屈性には関与しておらず、光屈性においては RPT2 と冗長的に機能しないことが示された。

葉の展開に関しても、*nch1* 変異体は野生型同様に葉が平に成長し、*rpt2nch1* 二重変異体は *rpt2* 変異体と同程度の葉のカーブを示したので、NCH1 は葉の展開にも関与していないことがわかった。

nph3, *rpt2*, *nch1* の間の多重変異体すべてで野生型同様の青色光依存の気孔開口反応を示した。このことから少なくともこれらの NPH3 様タンパク質は気孔開口反応に関与していないことがわかった。

上記のように *rpt2nch1* 二重変異体は集合反応を完全に欠損しているが、逃避反応はほぼ正常に起きる。逃避反応は *nph3rpt2nch1* 三重変異体でも *rpt2nch1* 二重変異体と同程度に見られたので、これらの NPH3 様タンパク質は葉緑体逃避反応に関与していないことがわかった (論文投稿中)。

(3) NPH3 と NCH1 の細胞膜におけるマイクロドメイン様局在の観察

シロイヌナズナを材料として NPH3 とそのホモログ NPL3 の GFP 融合タンパク質の細胞内局在を観察したところ、どちらのタンパク質も葉の表皮細胞の細胞膜上でマイクロドメイン様のドット状構造に局在することがこれまでわかっていた。本研究では、特に発現量が多く観察しやすい NPH3-GFP を中心に解析を行った。NPH3-GFP は葉の表皮細胞だけでなく、葉肉細胞や孔辺細胞、黄化芽生えの胚軸表皮細胞など観察したすべての細胞でマイクロドメイン様局在を示した。マイクロドメイン様構造は観察中大きな移動を示さないが、ブラウン運動様な動きを示した。さらに、レーザーによる光褪色後の蛍光が粒状構造があった同じ位置に回復したことから、NPH3-GFP はマイクロドメイン様構造内で絶えずタンパク質の交換を行っていることが示唆された。黄化芽生えの胚軸表皮における光照射実験で、光照射後一部の NPH3-GFP が細胞質中に局在変化を示した。この光照射後の細胞質への局在は、最近 PLANT CELL 誌に発表された Haga et al. (2015) で詳細に記載されている YFP-NPH3 の挙動と同じ現象であると考えられる。

RPT2-GFP では NPH3-GFP でみられたようなマイクロドメイン様構造は見られず、細胞膜に均一に分布する様子が観察された。一方 NCH1-GFP では、マイクロドメイン様構造が観察された。ゼニゴケの NCH1 ホモログ MpNCH1 と蛍光タンパク質シトリンの融合タンパク質 (MpNCH1-Citrine) をゼニゴケで発現させたところ、シロイヌナズナ NCH1-GFP 同様、MpNCH1-Citrine も細胞膜でマイクロドメイン様構造を形成することがわかった。ゼニゴケ *MpNCH1* のノックアウトラインはシロイヌナズナ *rpt2nch1* 二重変異体同様集合反応を欠損しているが、ノックアウトラインにおける MpNCH1-Citrine の発現により、集合反応の欠損が回復した。この結果から、MpNCH1-Citrine はゼニゴケにおいて機能的

であり、マイクロドメイン様局在は MpNCH1 の機能において重要な役割を果たすことが示唆された (論文準備中)。

(4) NCH1 のフォトリポピン依存の青色光による脱リン酸化の可能性

シロイヌナズナの NPH3 は暗黒下で未同定のキナーゼによりリン酸化されており、フォトリポピン依存で青色光により脱リン酸化されることが知られている。暗黒処理サンプルと青色光照射したサンプルで NCH1 タンパク質をウエスタンブロットにより調べたところ、野生型において暗黒下と比べて青色光照射後に NCH1 のバンドの移動度がわずかに速いことがわかった。光照射による NCH1 のバンドの移動度の差は *rpt2* 変異体では観察されたが、*phot1phot2* 二重変異体では検出されなかった。これらの結果から、NCH1 も NPH3 同様にフォトリポピン依存で青色光により脱リン酸化する可能性が示唆された。NCH1 バンドの移動度の差がリン酸化に起因しているか調べるため、フォスファターゼ処理により検証する予定である (論文準備中)。

(4) NPH3 と NCH1 のプロテオーム解析

シロイヌナズナの NPH3-GFP と NCH1-GFP ラインを用いて、GFP 抗体カラムにより精製する予定である。NPH3-GFP と NCH1-GFP ラインのウエスタンブロットの結果、分解産物と考えられる産物が検出されたので、精製条件を検討する必要がある。また、どちらのタンパク質も光によりリン酸化状態が変化するので、抽出時の光条件や、フォスファターゼ阻害剤の有無などを検討する必要性もある。ゼニゴケにおいても MpNPH3 と MpNCH1 のプロテオーム解析のため MpNPH3-Citrine と MpNCH1-Citrine ラインを作成した。上記のように MpNCH1-Citrine のマイクロドメイン様局在を観察できたが、GFP 抗体を用いたウエスタンブロットングにより NCH1-Citrine のバンドを検出できていないので、タンパク質の抽出の条件検討を行う予定である。

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7件)

Ishishita K, Suetsugu N, Hirose Y, Higa T, Doi M, Wada M, Matsushita T, Gotoh E, Functional characterization of blue-light-induced responses and *PHOTOTROPIN1* gene in *Welwitschia mirabilis*, J. Plant Res., 査読有, Vol.129, 2016, 175-187
DOI:10.1007/s10265-016-0790-7

Suetsugu N, Higa T, Kong SG, Wada M, PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1 and PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1-RELATED1 mediate

photorelocation movements of both chloroplasts and nuclei, *Plant Physiol.*, 査読有, Vol.196, 2015, 1155-1167
DOI:10.1104/pp.15.0021

Kasajima I, Suetsugu N, Wada M, Takahara K, Collective calculation of actual values of non-photochemical quenching from their apparent values after chloroplast movement and photoinhibition, *Am. J. Plant Sci.*, 査読有, Vol.6, 2015, 1792-1805
DOI:10.4236/ajps.2015.611180

松田 修、末次 憲之、内田 誠一、和田 正三、射場 厚、近接ハイパースペクトルイメージングに基づく植物遺伝学研究、*日本生態学会誌*、査読有、6 4 巻、2014、205 - 213
<http://www.esj.ne.jp/esj/JJE/index.html>

Komatsu A, Terai M, Ishizaki K, Suetsugu N, Tsuboi H, Nishihama R, Yamato KT, Wada M, Kohchi T, Phototropin encoded by a single-copy gene mediates chloroplast photorelocation movements in the liverwort *Marchantia polymorpha*, *Plant Physiol.*, 査読有, Vol.166, 2014, 411-427
DOI:10.1104/pp.114.245100

Higa T, Suetsugu N, Wada M, Plant nuclear photorelocation movement, *J. Exp. Bot.*, 査読有, Vol.65, 2014, 2873-2881
DOI:10.1093/jxb/ert414

Suetsugu N, Takami T, Ebisu Y, Watanabe H, Iiboshi C, Doi M, Shimazaki K, Guard cell chloroplasts are essential for blue light-dependent stomatal opening in *Arabidopsis*, *Plos ONE*, 査読有, Vol.9, 2014, e108374
DOI:10.1371/journal.pone.0108374

〔学会発表〕(計5件)

寺井 三佳、末次 憲之(発表者)、小松 愛乃、西浜 竜一、四井 いずみ、中神 弘史、河内 孝之、タイ類ゼニゴケにおけるフォトロピンキナーゼシグナリングのリン酸化プロテオーム解析、第57回日本植物生理学会年会、2016年3月19日、岩手大学(岩手)

Suetsugu N, Simple AGC kinase-NRL module signaling in the liverwort *Marchantia polymorpha*, *Marchantia Seminars: Welcome to the Marchantia world!*, 2016年3月3日、京都大学(京都)

末次 憲之、小松 愛乃、寺井 三佳、和田 正三、河内 孝之、苔類ゼニゴケにおけるキネシン様タンパク質 KAC の機能解析、第56

回日本植物生理学会年会、2015年3月17日、東京農業大学(東京)

Suetsugu N, Komatsu A, Kohchi T, KAC is essential for chloroplast movement and positioning in the liverwort *Marchantia polymorpha*, *Marchantia Workshop 2014*, 2014年12月9日、神戸大学(神戸)

末次 憲之、小松 愛乃、和田 正三、河内 孝之、陸上植物におけるキネシン様タンパク質 KAC による葉緑体の細胞内分布異常、第18回日本光生物学協会年会、2014年8月22日、大阪市立大学(大阪)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
末次 憲之(SUETSUGU, Noriyuki)
京都大学・生命科学研究科・特定助教
研究者番号：60514156

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし