

青色光受容体フォトトロピンに依存した植物の生長制御

九州大学・理学研究院

井上晋一郎、武宮淳史、島崎研一郎

はじめに

植物は太陽光を光合成に必要なエネルギー源として利用するのみならず、光の質と量の違いを環境情報として利用することにより、刻々と変化する光環境下において生長が最適となるよう応答する。光を感知する受容体には、フィトクロム、クリプトクロム、フォトトロピン等がある。このうち、フィトクロムは主に赤色光と遠赤色光を、クリプトクロムは青色光を受容し、多様な光形態形成反応に関与する。これに対し、青色光を受容するフォトトロピンは光屈性、葉緑体の光定位運動、気孔の開口、葉の平坦化、葉の光定位運動などを誘導する。フォトトロピンが制御するこれらの応答は、植物が光を出来るだけ多く吸収し、光合成を増大させる働きを持つ。本稿では、フォトトロピンが青色光をシグナルとして利用し、植物の生長を促進する機構について概説する。また、最近明らかになりつつあるフォトトロピン自身の活性制御についてもふれる。

1. フォトトロピンに依存した植物の生長促進

フォトトロピン(*phot1*、*phot2*)は植物特有の青色光受容体で、青色光に依存して上記の生理反応を誘導する(図1)¹⁻³⁾。光屈性、葉の光定位運動(個々の葉が、青色光に対し垂直に葉面を向ける運動)は、植物体が光の方向に向かって成長・運動し、葉面を光に垂直に向ける反応である。葉緑体光定位運動は、弱い光のもとでは葉緑体が光と垂直な細胞面に集まり、強い光のもとでは葉緑体が光と平行な細胞面に逃げる反応である。気孔開口は、大気と植物体内とのガス交換に用いられる表皮の穴「気孔」を開かせる反応である。葉の平坦化とは、葉が巻くのを防ぎ、平らにする反応である。これらの反応は、植物が光合成に必要な光を効率よく集め、炭酸固定に用いる二酸化炭素をより多

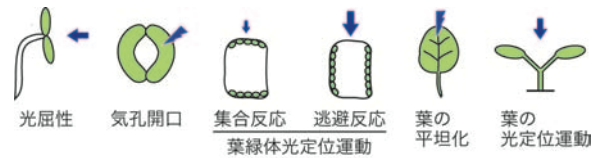


図1 フォトトロピンが制御するシロイヌナズナの青色光反応

図中の青い矢印は、方向性のある青色光を示し、その大小で青色光強度を表している。青い稲妻は、方向性のない青色光を示す。

く取り込むための応答であると考えられてきた。しかしながら、実際にフォトトロピンを介した反応が植物の光合成を向上させるかどうかの直接的証拠は得られていなかった。我々はフォトトロピン変異株を用い、フォトトロピンが実際に光合成を増大させ、植物の生長を促進することを実験的に示した⁴⁾。

シロイヌナズナの野生株を $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の赤色光下と、同じ強さの赤色光に $0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の微弱な青色光を添加した混合光条件下で4週間生育させ、生重量を比較した。その結果、混合光下で生育させた植物は、赤色光のみで生育させた植物に比べ生重量が約3倍増加した(図2)。この微弱な青色光による劇的な生長促進は、フィトクロムやクリプトクロム変異株でも観察されるが、*phot1 phot2* 二重変異株では観察されず、フォトトロピンにより仲介されていることが分かる。この光条件下では、青色光によって野生株では葉緑体が光と垂直な細胞面に集まり、気孔が開き、葉が平らに展開したのに対し、*phot1 phot2* 二重変異株ではこれらの反応が全く見られなかった。このフォトトロピンに依存した生長促進は、照射する赤色光の強度が増加するにつれ減少した。つまり、フォトトロピンは上記の生理応答を同時に誘導することにより植物の光合成を最大にし、弱い光環境のもとで生長を促進す

* 連絡先 E-mail: kenrcb@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

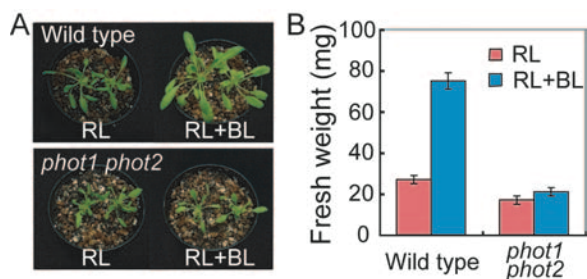


図2 青色光に依存した生長促進

(A) 赤色光 $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (RL)、赤色光 $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と青色光 $0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の混合光 (RL+BL) 条件下で5週間生育させたシロイヌナズナ (野生株、*phot1 phot2* 二重変異株) の写真

(B) 同光条件下で4週間生育させた植物における生重量比較
phot1 phot2 はフォトリポピンを欠く変異株。

ることが示された。

2. 各フォトリポピン生理応答の生長への寄与

フォトリポピンは複数の生理応答を同時に誘導することで、光合成の増大・生長を促進するが、どの反応が最も生長促進に貢献しているのか、手がかりが得られつつある。以前に著者らは、葉の光定位運動が損なわれた変異株のスクリーニングを行い、*nph3* (*NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL3*) 変異株を単離した²⁾。この変異株は、胚軸の光屈性の変異株としてすでに単離されていたものであったが、葉の光定位運動にも関与していることが明らかになった。

*nph3*変異株を前述した混合光条件下で生育させると、赤色光のみの条件下で生育させた場合と比較して、1.5倍程度しか生長が促進されなかった(図3)。*nph3*変異株では、この条件下で正常な葉緑体光定位運動と気孔の開口反応が観察されるが、葉の平坦化は誘導されず、下向きにカールした葉の形になった²⁾。つまり、葉の平坦化と葉の光定位運動が損なわれるだけで、野生株で観察された劇的な生長促進は大きく減少するのである。この結果は、葉の平坦化と光定位が弱光下での生長促進に大きく貢献していることを示している。今のところ、葉緑体光定位運動や気孔開口の生長に対する正確な貢献度は明らかでなく、おそらく、生育条件における光強度の違いによって各反応の貢献度も異なるものと思われる。一方、フォトリポピンを介する情報伝達においてNPH3が葉の平坦化や光定位運動に関与するものの、葉緑体光定位運動や気孔開口に関与しないことは明らかである。今後、フォ

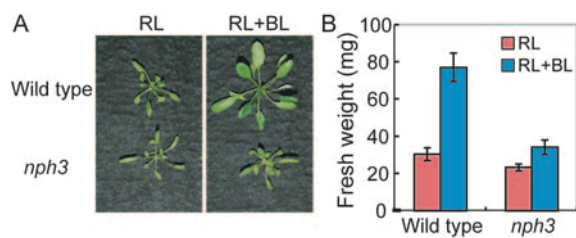


図3 *nph3* 変異株の青色光に依存した生長促進

図2と同じ光条件下で5週間生育させた*nph3* 変異株の写真(A)と生重量比較(B)。

トリロピンが制御する各々の生理応答に特有の情報伝達因子を同定することがこの機構の解明において重要であり、各生理応答の生長促進への寄与の理解にも役立つだろう。

3. フォトリロピンの自己リン酸化と生理応答

フォトリロピンは、N末端に青色光を受容する2つのLOVドメイン(LOV1、LOV2)を持ち、C末端にはSer/Thrキナーゼドメインを持つ受容体型のキナーゼである(図4-A)⁵⁾。最近、大阪府立大学の徳富グループは、以下のようなフォトリロピン分子の活性化モデルを提唱した^{6, 7)}。暗黒下ではLOV2ドメインがキナーゼドメインに結合し、キナーゼ活性を阻害している。青色光の受容によってLOV2ドメインがキナーゼドメインから解離すると、同時に阻害も解除され、キナーゼドメインが活性化される。青色光を受容して活性化したフォトリロピンのキナーゼドメインは、自身をリン酸化する「自己リン酸化」反応を示すようになる(図4-B)^{8, 9)}。フォトリロピンは元来、青色光に依存してリン酸化される蛋白質として細胞膜中に発見された。そして、この自己リン酸化の程度が、光屈性反応や気孔開口に関わる反応と正の相関を示すことから¹⁰⁻¹³⁾、自己リン酸化自体が生理応答に必須であると考えられてきたが、長い間この自己リン酸化の生理学的意味は不明のままであった³⁾。最近筆者らは、この問題を解決すべく、フォトリロピンの植物体内における自己リン酸化部位を同定し、機能解析を行った。

青色光を照射したシロイヌナズナの芽生えから免疫沈降法等により*phot1*蛋白質を単離し質量分析を行い、*phot1*の自己リン酸化部位を8箇所同定した(図4-A)¹⁴⁾。そのうち3つがLOV1ドメインより上流のN末端領域に、3つがLOV1とLOV2の間のHinge 1領域に、1つ(または2つ)がキナーゼドメインに、1つがキナー

ぜより下流のC末端領域に位置していた。キナーゼドメインのリン酸化は、質量分析の結果からはSer-849とSer-851のどちらがリン酸化されているのか区別出来なかった。以前の間接的な方法を用いた研究から、オートムギのphot1aにおいて、N末端とHinge 1領域が複数箇所ずつ自己リン酸化されるとされていたが¹⁵⁾、今回得られたものとその部位は異なっていた。今回の研究で初めてC末端側のキナーゼドメインの中にもリン酸化部位が同定され、その部位はキナーゼドメインの特にアクティベーションループに位置していた。このようにして決定されたphot1のリン酸化部位の役割を以下のように解析した。まず、同定されたリン酸化部位に1つずつ、または2つ以上同時にアミノ酸置換を導入したphot1蛋白質を発現するための遺伝子コンストラクトを作製する。ついで、この遺伝子を、フォトトロピンを欠いた *phot1 phot2* 二重変異株で発現させ、変異phot1蛋白質が上記の生理応答を正常に誘導できるか調べた。もし、正常な反応が回復されれば、変異させたリン酸化部位は重要な役割を果たしていないことになる。その際、リン酸化部位をAlaに置換し、そのアミノ酸の脱リン酸化状態をミミックし、Aspに置換することにより、擬似リン酸化状態とした。その結果、今回同定されたリン酸化部位のうち、キナーゼドメインのアクティベーションループに位置するSer-849とSer-851を同時にAlaに置換したphot1発現株 (S849A S851A-6株) のみが光屈性、気孔開口、葉緑体光定位運動、葉の平坦化の全てを回復しなかった。また、意外なことに、リン酸化部位のうちSer-849とSer-851以外の全てをAlaに置換した変異phot1蛋白質は、野生型phot1と同様にどの生理応答も正常に誘導した。さらに、Ser-849とSer-851の両方をAspに置換したphot1擬似リン酸化株 (S849D S851D-3株) では、どの生理応答もほぼ正常に誘導した。これらの結果は、多くのフォトトロピンの自己リン酸化部位の中で、アクティベーションループの自己リン酸化のみが下流に情報を伝達するために必須で、フォトトロピンが制御する生理応答に共通して必要であることを意味している。

4. アクティベーションループの自己リン酸化とキナーゼ活性の制御

一般的に、プロテインキナーゼのアクティベーションループのリン酸化は、触媒活性の増加と基質蛋白質

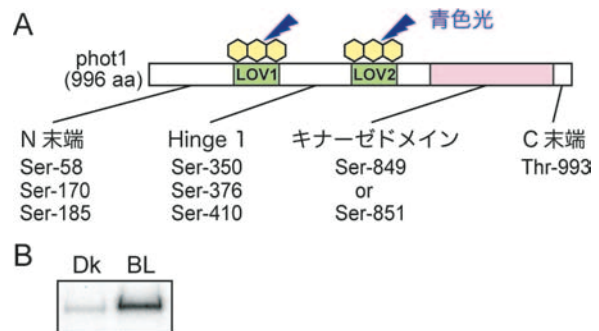


図4 シロイヌナズナのphot1で同定された自己リン酸化部位 (A) フォトトロピンのドメイン構造と同定された自己リン酸化部位

N末端側には2個のLOV (Light, Oxygen, Voltage) ドメインが、C末端側にはセリン/スレオニンキナーゼドメインがある。LOV1より上流をN末端、LOV1とLOV2の間をHinge 1、キナーゼドメインより下流をC末端と呼ぶ。青色光を照射した植物体からphot1蛋白質を集めて質量分析にかけ、リン酸化部位を同定した。

(B) フォトトロピンの自己リン酸化反応を示すオートラジオグラフィ

シロイヌナズナの野生株の黄化芽生えを³²P正リン酸でラベルし、青色光 (100 μmol m⁻² s⁻¹, 30秒) を照射した。phot1蛋白質を免疫沈降法で集め、SDS-PAGEにかけ、オートラジオグラフィでリン酸化を検出した。

の認識に重要であることが知られている¹⁶⁾。S849A S851A-6株では、生理応答がほとんど誘導されないにも関わらず、この変異phot1は植物体内でほとんど正常な自己リン酸化活性を有していた (図5-A)¹⁴⁾。つまり、この部位の変異は、キナーゼ触媒活性そのものには影響を与えず、下流への情報伝達に影響を与えていることを示唆している。このことから、phot1においてアクティベーションループのリン酸化は、下流の基質蛋白質を認識し、リン酸化するために重要な役割をもっていると考えられる。

さらに、このアクティベーションループ中のSer-851のリン酸化を、特異的抗体を用いて確認した。Ser-851は、暗黒下でもある程度リン酸化されているが、青色光に依存して1分以内にリン酸化レベルが増加した (図5-B)。また、触媒活性を無くした変異phot1蛋白質においては、この青色光に依存したSer-851のリン酸化が観察されず¹⁴⁾、情報伝達に重要なアクティベーションループのSer-851は青色光に依存して自己リン酸化されることが確かめられた。phot1擬似リン酸化株S849D S851D-3では、アクティベシ

ンループの自己リン酸化状態をミミックしたが、この株の変異 $phot1$ 蛋白質は暗黒下ではどの部位も自己リン酸化活性を示さず(図5-A)、どの生理応答も誘導しなかった¹⁴⁾。これらの結果は、フォトトロピンの情報伝達には青色光によるアクティベーションループの自己リン酸化が必要であるが、この自己リン酸化だけでは不十分であり、リン酸化されてかつ青色光が当たっている必要があることを示している。青色光によるフォトトロピンの自己リン酸化とLOVドメイン等の構造変化が同時に起こることが、下流の基質蛋白質のリン酸化に必要なのかもしれない。

5. フォトトロピンの自己リン酸化と生長促進

最後に、S849A S851A-6株とS849D S851D-3株における通常生育条件(50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色光)下の生長を示した(図6)。野生型 $phot1$ を発現するWT-11株では、野生株と変わらない生長を示した。これに対し、S849A S851A-6株では、 $phot1 phot2$ 二重変異株と差が見られない程生長が著しく損なわれた。S849D S851D-3株ではWT-11と差が見られない。以上のことは、自己リン酸化反応が、調べた全てのフォトトロピ

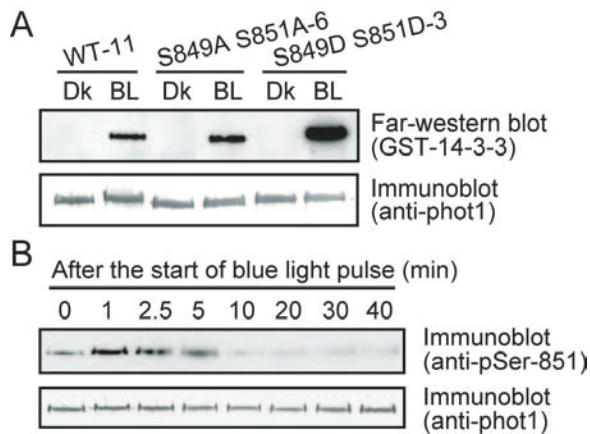


図5 アクティベーションループの自己リン酸化とキナーゼ活性への影響

(A) アクティベーションループのリン酸化変異株における自己リン酸化活性

各植物の黄化芽生えに青色光(100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、30秒)を照射して、植物体内における $phot1$ の自己リン酸化反応を測定した。 $Phot1$ が自己リン酸化すると14-3-3蛋白質と結合することを利用し、 $phot1$ に結合する14-3-3蛋白質の量をFar-Western blotでモニターした。

(B) リン酸化されたSer-851を特異的に認識するpSer-851抗体を用い、青色光(100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、30秒)に対するこの部位のリン酸化の変化をImmunoblotにより調べた。

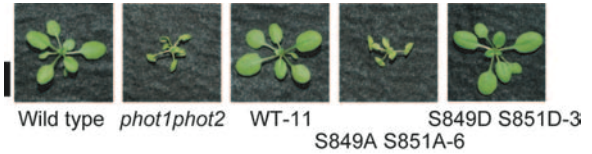


図6 アクティベーションループのリン酸化変異株における生長

全ての植物は、白色光50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で3週間生育させた。黒いバーは、1 cmを示す。

ン依存の反応に必要であるという結果に対応していた。一方、S849A S851A-6株の生長の低減が $phot1 phot2$ 二重変異株と同じであることは、アクティベーションループのリン酸化が損なわれると、全てのフォトトロピン制御応答が起らず、光合成活性が低下してしまい、生長が損なわれることを示唆している。

おわりに

フォトトロピンは青色光に依存して多様な反応を制御し、これらの全てが光合成を増大させ、生長促進に寄与することが証明され、とりわけ、葉の平坦化と光定位運動が大きな役割を果たしていることが分かった。しかし、同じフォトトロピンという光受容体が異なる反応を引き起こす機構は謎に満ちている。例えば、最も良く解明されている気孔開口と葉緑体光定位運動を比較すると、今までのところフォトトロピン以外の共通因子は見いだせない。各反応はフォトトロピンの直下の成分から分岐しているのだろうか、それともフォトトロピン以外の共通成分が存在するのだろうか。研究の焦点の一つはこの反応分岐のメカニズムである。もう一つの重要な課題はフォトトロピンのリン酸化の基質探しである。世界中の多くの研究者の努力にも拘わらず、フォトトロピンの基質と呼べるものは未だ同定されておらず、この基質の解明がこの分野にブレークスルーをもたらすと期待されている。

参考文献

1. Briggs, W, R., Christie, J, M. (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends. Plant. Sci.* 7, 204-210.
2. Inoue, S., Kinoshita, T., Takemiya, A., Doi, M., Shimazaki, K. (2008) Leaf positioning of *Arabidopsis* in response to blue light. *Mol. Plant* 1, 15-26.
3. Christie, J, M. (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 21-45.
4. Takemiya, A., Inoue, S., Doi, M., Kinoshita, T.,

- Shimazaki, K. (2005) Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* 17, 1120-1127.
5. Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I-S., Larsen, E., Briggs, W. R. (1997) *Arabidopsis* NPH1: A protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278, 2120-2123.
 6. Matsuoka, D., Tokutomi, S. (2005) Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 13337-13342.
 7. Tokutomi, S., Matsuoka, D., and Zikihara, K. (2008) Molecular structure and regulation of phototropin kinase by blue light. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 133-142.
 8. Christie, J. M., Reymond, P., Powell, G., Bernasconi, P., Railbekas, A. A., Liscum, E., Briggs, W. R. (1998) *Arabidopsis* NPH1: A flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 282, 1698-1701.
 9. Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T. E., Christie, J. M., Briggs, W. R., Wada, M., Okada, K. (2001) *Arabidopsis* nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6969-6974.
 10. Reymond, P., Short, T. W., Briggs, W. R., Poff, K. L. (1992) Light-induced phosphorylation of a membrane protein plays an early role in signal transduction for phototropism in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4718-4721.
 11. Palmer, J. M., Short, T. W., Briggs, W. R. (1993) Correlation of blue light-induced phosphorylation to phototropism in *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 102, 1219-1225.
 12. Salomon, M., Zacherl, M., Rüdiger, W. (1997) Asymmetric, blue light-dependent phosphorylation of a 116-kilodalton plasma membrane protein can be correlated with the first- and second-positive phototropic curvature of oat coleoptiles. *Plant Physiol.* 115, 485-491.
 13. Kinoshita, T., Emi, T., Tominaga, M., Sakamoto, K., Shigenaga, A., Doi, M., Shimazaki, K. (2003) Blue-light- and phosphorylation-dependent binding of a 14-3-3 protein to phototropins in stomatal guard cell of broad bean. *Plant Physiol.* 133, 1453-1463.
 14. Inoue, S., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Nakayama, K., I., Doi, M., Shimazaki, K. (2008) Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5626-5631.
 15. Salomon, M., Knieb, E., von Zeppelin, T., Rüdiger, W. (2003) Mapping of low- and high-fluence autophosphorylation sites in phototropin 1. *Biochemistry* 42, 4217-4225.
 16. Nolen, B., Taylor, S., Ghosh, G. (2004) Regulation of protein kinases: controlling activity through activation segment conformation. *Mol. Cell.* 15, 661-675.