

葉緑体運動における光受容体フォトトロピンによるリン酸化ネットワークの解析

Analysis of phosphorylation network underlying chloroplast movements dependent on the photoreceptor phototropin

代表研究者 東京大学 末次 憲之 The University of Tokyo Noriyuki SUETSUGU
協同研究者 グラスゴー大学 John Christie University of Glasgow John CHRISTIE

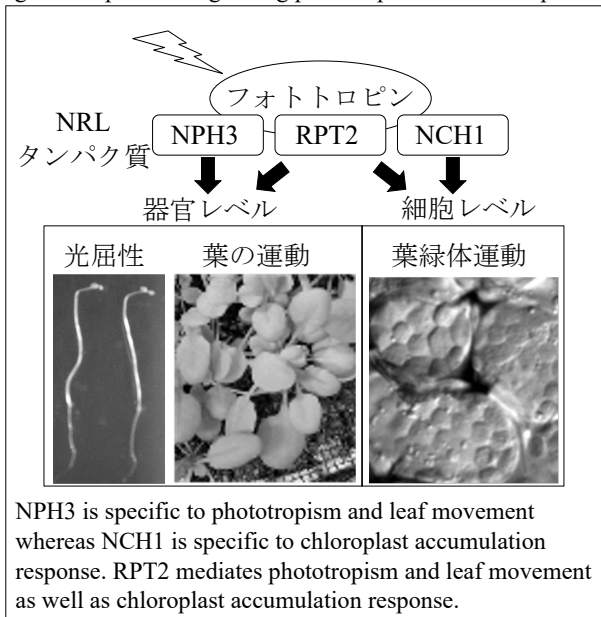
Chloroplasts move to weak light (the accumulation response) and escape from strong light (the avoidance response) to efficiently use light for photosynthesis. The blue light receptor kinase phototropin regulates these chloroplast movements. The phototropin also mediates phototropism, leaf movement, and stomatal opening. Although phototropin should regulate these responses by phosphorylating the substrates, the phototropin substrates that mediate phototropism, leaf movement, and chloroplast movements remained to be unidentified. Three phototropin-interacting proteins, NPH3, RPT2, and NCH1, belong to NPH3/RPT2-like (NRL) protein family and mediate phototropism, leaf movement, and chloroplast movements. NPH3 is specific to phototropism and leaf movement whereas NCH1 is specific to chloroplast accumulation response. RPT2 mediates phototropism and leaf movement as well as chloroplast accumulation response. However, how phototropin regulates these NRL proteins to mediate phototropism, leaf movement, and chloroplast accumulation response remained to be determined. We revealed that phototropins directly phosphorylate these NRL proteins in a blue-light-dependent manner and the phototropin-dependent phosphorylation of these NRL proteins is required for the regulation of phototropism, leaf movement, and chloroplast accumulation response. We focus on analysis of the mechanism how the phototropin-dependent phosphorylation of RPT2 and NCH1 regulate chloroplast accumulation response.

研究目的

フォトトロピンは光屈性や葉の運動、葉緑体運動、気孔開口など、光合成に必要な光の受容効率と二酸化炭素の利用効率を最適化するための光応答反応を制御する光受容体キナーゼ（AGCキナーゼの一種）であり、青色光で活性化される(1)。それぞれの生理反応に特異的に働く基質がフォトトロピンにより直接リン酸化されることが、各生理反応の信号伝達系の初期反応であると考えられる。しかしながら、これまでにフォトトロピンによるリン酸化されることが信号伝達

系の初期反応に重要であるとわかった基質は気孔開口に働くBLUS1のみであった(2)。シロイヌナズナにおいて、BTB/POZドメインをもつNPH3/RPT2-like (NRL) タンパク質ファミリーに属する3つのフォトトロピン結合因子（NPH3、RPT2、NCH1）が光屈性や葉の運動、葉緑体運動の信号伝達系の初期過程で機能することが知られている(Fig.1) (3)。光屈性と葉の運動はNPH3とRPT2により制御され、葉緑体運動はRPT2とNCH1が必須である(3,4)。これらのNRLタンパク質がフォトトロピンによりリン酸化さ

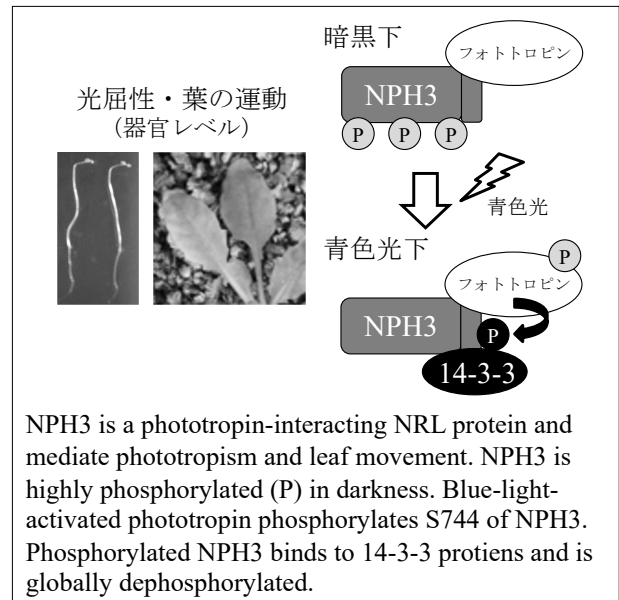
Fig.1 NRL proteins regulating phototropin-mediated responses



れるかは不明であった。実際に、NPH3は青色光によりフォトトロピン1 (*phot1*) 依存で脱リン酸化されるという、リン酸化とは逆の現象が観察されていた(5)。最近申請者らは、NRLタンパク質であるNPH3の末端付近の744番目のセリン残基 (S744) がフォトトロピンにより直接リン酸化されることを発見し、さらにフォトトロピンによるS744のリン酸化がフォトトロピン信号伝達系において重要な役割を担うことを明らかにした(Fig.2) (6)。NPH3のS744以外の多くのサイトがフォトトロピン非依存的に暗黒下でリン酸化されているが、青色光により活性化したフォトトロピンがS744をリン酸化すると、14-3-3タンパク質の結合と伴って暗黒下でリン酸化されていたサイト全体の脱リン酸化が起こる(Fig.2)。NPH3のS744はAGCキナーゼのリン酸化モチーフR_xSの一部であり、このモチーフはRPT2とNCH1を含めたいくつかのNRLタンパク質に保存されている。これらのことから、NPH3のホモログでありフォトトロピンと結合するRPT2とNCH1も、フォトトロピンによりリン酸化され、そのリン酸化が葉緑体運動の信号伝達系の初期反応である可能性が示唆された。

さらに、葉緑体運動に特異的に関わる他の多くの因子(例えばPMI1やWEB1)なども青色光依存的にリン酸化されるので、これらもフォトトロピンの基質である可能性がある。本研究では、葉緑体運動関連因子のフォトトロピンによる青色光依存的なリン酸化を詳細に解析することにより、フォトトロピンが制御する葉緑体運動の信号伝達系のリン酸化ネットワークの全体像を明らかにすることを目的とする。助成期間の1年間は、特にフォトトロピン結合因子で葉緑体運動の信号伝達系の初期反応に関わるRPT2とNCH1のリン酸化に集中して研究を行った。

Fig.2 Phototropin directly phosphorylates NPH3



研究経過

NCH1のリン酸化状態を調べるために、2週間白色光で培養した野生型およびフォトトロピン変異体 (*phot1*、*phot2*、*phot1phot2*) を暗黒下に置いたサンプルと、その後青色光照射したサンプルからタンパク質を抽出し、NCH1抗体を用いてウエスタブロットングを行った。GFP抗体によるウエスタ NCH1は暗黒下サンプルよりも光照射サンプルでバンドの移動度が速いことがわかった。この光依存的な移動度の違いは *phot1* と *phot2* 変異体では検出されたが、*phot1phot2* 二重変異体

では検出されなかった。暗黒下サンプルにフォスファターゼ処理すると、バンドの移動度が光照射サンプルと同程度まで早くなった。これらの結果から、NCH1は暗黒下でリン酸化されており、青色光により phot1 と phot2 の両方に依存して脱リン酸化されることがわかった。この青色光による脱リン酸化反応は NPH3 と同様であるが、NPH3 の脱リン酸化は phot1 のみに依存し、NCH1 の脱リン酸化は phot1 と phot2 の両方に依存する点異なる。一方、RPT2 は先行研究と同様(7)、青色光によるバンドの移動度の変化は見られなかった。RPT2 では暗黒下でのリン酸化が起きないか、バンドの移動度の変化が検出できないレベルのリン酸化しか起きていないことが示唆された。

RPT2 および NCH1 がフォトトロピンの基質であるか調べるために、フォトトロピン (phot1 あるいは phot2) と共に RPT2 あるいは NCH1 をコムギ胚芽抽出液無細胞発現系で同時に発現し、リン酸化アッセイを行った。フォトトロピンのキナーゼドメインの ATP 結合ポケットの一番奥に位置するゲートキーパー部位のアミノ酸残基に変異を導入し、ATP によるリン酸化の代わりに *N*⁶-benzyl-ATP_γS によるチオリン酸化を行う方法を用いた(8)。この方法は放射性同位体を用いないという点で *in vitro* での実験を簡便にし、実際に前述の NPH3 のリン酸化の検出における実績がある(6)。このアッセイ系により phot1 と phot2 の両方が、青色光に反応して RPT2 および NCH1 をリン酸化することが示された(9、未発表)。この青色光依存のリン酸化は、NPH3 の S744 に対応する RPT2 の S591 および NCH1 の S602 をアラニン置換すると検出されなかった。RPT2 の S591 および NCH1 の S602 に対するリン酸化抗体を作出し、野生型およびフォトトロピン変異体を暗黒下に置いたサンプルと、その後青色光照射したサンプルからタンパク質を抽出し、リン酸化抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、植物体においても phot1 と phot2 の両方が青色光により RPT2 の S591 および NCH1 の S602 をリン酸化することが明らかとなった(9、未発表)。また、蛍光タ

ンパク質シトリンに RPT2 あるいは NCH1 融合したタンパク質(それぞれ Citrine-RPT2 あるいは Citrine-NCH1)を発現する形質転換体(それぞれ *rpt2* 変異体あるいは *nch1* 変異体バックグラウンド)を作出し、暗黒下に置いたサンプルと、その後青色光照射したサンプルからタンパク質を抽出し、GFP 抗体を用いた免疫沈降により RPT2 あるいは NCH1 に結合するタンパク質をマス解析(IP-MS 解析)により同定した。この解析から、NPH3 同様、14-3-3 が RPT2 と NCH1 に青色光依存で結合することが示された(9、未発表)。

S591 をアラニンに置換した RPT2 (Citrine-RPT2_S591A)を発現する形質転換体(*rpt2* 変異体バックグラウンド)を作出し、フォトトロピンに依存した青色光反応(光屈性、葉の運動、葉緑体運動)に関して野生型 Citrine-RPT2 ラインと比較解析した。*rpt2* 変異体では光屈性と葉の運動が著しく弱まり、葉緑体運動のうち弱青色光による集合反応が弱まっているが、Citrine-RPT2 の発現によりこれらの反応の異常は回復した。しかし、Citrine-RPT2_S591A を発現する個体では、光屈性と葉の運動の形質は部分的に回復したが、集合反応の形質はまったく回復しなかった。これらの結果から、青色光依存のフォトトロピンによる RPT2 の S591 のリン酸化は集合反応に必須であり、光屈性と葉の運動の制御には部分的に必要なことが示された(9)。S602 をアラニンに置換した NCH1 (Citrine-NCH1_S602A)を発現する形質転換体(*nch1* 変異体バックグラウンド)に関しては作出済みであり、現在野生型 Citrine-NCH1 ラインと葉緑体運動に関して比較解析している。

考察

本研究により、フォトトロピン信号伝達系は各現象に関わるフォトトロピン結合因子、すなわち光屈性と葉の運動では NPH3 と RPT2、葉緑体集合反応では RPT2 と NCH1、気孔開口では BLUS1 のフォトトロピンによる青色光依存のリン酸化が、各現象の制御における信号伝達系の初期反応であり分岐点であることが明らかとなった。3つの NRL タンパク質は光屈性と葉の運動という器官レベルの青色光反応と葉緑体集合反応という細胞レベルの信号伝達系の両

方に関わる。NPH3 は器官レベルの反応特異的であり、NCH1 は細胞レベルの反応に特異的である一方、NCH1 のホモログである RPT2 はどちらの反応にも関与する。今までのところ、これら3つのNRLタンパク質のどのような性質の違いが、制御する現象の特異性を生むかは不明である。先行研究と本研究により、これら3つのNRLタンパク質において全体的なリン酸化レベルの制御に違いがあることが明らかとなった。現象特異的なNPH3とNCH1は暗黒下で多くの箇所がリン酸化され、フォトトロピンにより特定のセリン残基がリン酸化されると全体的に脱リン酸化されるというダイナミックなリン酸化状態の光制御が起こる。完全に脱リン酸化されたNPH3は不活性だが、部分的にリン酸化されたNPH3は活性化状態であるとの報告があるので(10)、NPH3とおそらくNCH1のリン酸化状態の程度が、光屈性(と葉の運動)と葉緑体集合反応のそれぞれの信号伝達系の活性状態を制御していることが示唆された。一方、RPT2のリン酸化状態は光によって大きく変化しなかった。一方、どちらの現象にも関わるRPT2のリン酸化状態は光によって大きく変化しなかった。RPT2はNPH3とNCH1が各現象を制御するためのハブとして機能する可能性が考えられる。実際にRPT2はNPH3とNCH1両方に結合することが知られている(4、7)。

NPH3とNCH1の青色光依存の脱リン酸化は、それぞれフォトトロピンによるNPH3のS744とNCH1のS602のリン酸化に依存している(6、未発表)。脱リン酸化と同じタイムコースで14-3-3がNPH3とNCH1に結合するが、同様にRPT2もフォトトロピンによるS591のリン酸化に依存して14-3-3が結合する(9)。これらの結果から、14-3-3の結合は3つのNRLタンパク質のフォトトロピンによるリン酸化後の共通の反応であるが、現象の特異性やリン酸化状態の違いを決める要因ではないことが示唆された。14-3-3は青色光依存で3つのNRLタンパク質に結合するので、フォトトロピン依存の現象に関与することが期待されるが、14-3-3はシロイヌナズナに13種類存在するため、遺伝学的に14-3-3のフォトトロピン依存の現象への関与を解析するのは困難である。

Citrine-RPT2_S591Aは*rpt2*変異体における

葉緑体集合反応の欠損を全く回復しないので、フォトトロピンによるRPT2のS591のリン酸化が葉緑体集合反応に必須であることが示された(9)。一方、Citrine-RPT2_S591Aは*rpt2*変異体における光屈性と葉の運動の欠損を部分的にしか回復できなかった。この結果は、フォトトロピンはRPT2のS591Aのリン酸化だけでなく、他のメカニズムによりRPT2の制御を介して光屈性と葉の運動を制御することを示唆する(9)。Citrine-RPT2の結果と同様に、GFP-NPH3は*nph3*変異体における光屈性と葉の運動の欠損をほぼ完全に回復できるが、S744をアラニン置換したGFP-NPH3_S744Aは光屈性と葉の運動の欠損を部分的にしか回復できなかった(6)。これらの結果から、光屈性と葉の運動の信号伝達系において、フォトトロピンはNPH3のS744やRPT2のS591のリン酸化に加えて、別のメカニズムでNPH3およびRPT2の活性を制御していることが示唆された。フォトトロピンがNPH3のS744やRPT2のS591以外のサイトをリン酸化する可能性も考えられるが、GFP-NPH3_S744AやCitrine-RPT2_S591Aでは青色光による14-3-3の結合が完全に失われるので、14-3-3が認識しないリン酸化あるいはリン酸化以外のメカニズムの関与が示唆された。

以上のように、光屈性、葉の展開と葉緑体集合反応において、フォトトロピンによる3つのNRLタンパク質のリン酸化が共通の信号伝達系の初期反応であることが明らかとなったが、器官レベルの反応(光屈性と葉の展開)と細胞レベルの反応(葉緑体集合反応)における信号伝達系の分岐メカニズムに関しては全くわかっていない。14-3-3の結合を発見したきっかけとなった、GFP-NPH3、Citrine-RPT2、Citrine-NCH1のIP-MS解析から、それぞれのNRLタンパク質特異的に結合する新規タンパク質や、既知の光屈性や葉緑体運動に関わる因子が見つまっている。それらタンパク質とNRLタンパク質と結合の特異性、リン酸化状態や局在変化などを詳細に調べることにより、本研究の目的である葉緑体運動の信号伝達系のリン酸化ネ

ネットワークの全体像を明らかにできると期待する。

参考文献

1. J.M. Christie: Phototropin blue-light receptors, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **58**, 21-45, 2007.
2. A. Takemiya, N. Sugiyama, H. Fujimoto, T. Tsutsumi, S. Yamauchi, A. Hiyama, Y. Tada, J.M. Christie, K. Shimazaki: Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening, *Nat. Commun.*, **4**, 2094, 2013.
3. J.M. Christie, N. Suetsugu, S. Sullivan, M. Wada: Shining light on the function of NPH3/RPT2-like proteins in phototropin signaling, *Plant Physiol.*, **176**, 1015-1024, 2018.
4. N. Suetsugu, A. Takemiya, S.G. Kong, T. Higa, A. Komatsu, K. Shimazaki, T. Kohchi, M. Wada: RPT2/NCH1 subfamily of NPH3-like proteins is essential for the chloroplast accumulation response in land plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 10424-10429, 2016.
5. U.V. Pedmale, E. Liscum: Regulation of phototropic signaling in Arabidopsis via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3, *J. Biol. Chem.*, **282**, 19992-20001, 2007.
6. S. Sullivan, T. Waksman, D. Paliogianni, L. Henderson, M. Lütkemeyer, N. Suetsugu, J.M. Christie: Regulation of plant phototropic growth by NPH3/RPT2-like substrate phosphorylation and 14-3-3 binding, *Nat. Commun.*, **12**, 61294, 2021.
7. K. Haga, T. Tsuchida-Mayama, M. Yamada, T. Sakai: Arabidopsis ROOT PHOTOTROPISM2 contributes to the adaptation to high-intensity light in phototropic responses, *Plant Cell*, **27**, 1098-1112, 2015.
8. J. Schnabel, P. Hombach, T. Waksman, G. Giuriani, J. Petersen, J.M. Christie: A chemical genetic approach to engineer phototropin kinases for substrate labeling, *J. Biol. Chem.*, **293**, 5613-5623, 2018.
9. T. Waksman, N. Suetsugu, P. Hermanowicz, J.

Ronald, S. Sullivan, J. Labuz, J.M. Christie: Phototropin phosphorylation of ROOT PHOTOTROPISM 2 and its role in mediating phototropism, leaf positioning, and chloroplast accumulation movement in Arabidopsis, *Plant J.*, **114**, 390-402, 2023.

10. S. Sullivan, E. Kharshiing, J. Laird, T. Sakai, J.M. Christie: Deetiolation enhances phototropism by modulating NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL3 phosphorylation status, *Plant Physiol.*, **180**, 1119-1131, 2019.

研究の発表

口頭発表

1. 末次憲之：葉緑体運動におけるフォトトロピン信号伝達系の解析、第25回植物オルガネラワークショップ、仙台、2023年3月。

誌上発表

1. C. Yamamoto, F. Takahashi, N. Suetsugu, K. Yamada, S. Yoshikawa, T. Kohchi, M. Kasahara: The cAMP signaling module regulates sperm motility in the liverwort *Marchantia polymorpha*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **121**, e2322211121, 2024.
2. S.G. Kong, Y. Yamazaki, A. Shimada, S.T. Kijima, K. Hirose, K. Katoh, J. Ahn, H.G. Song, J.W. Han, T. Higa, A. Takano, Y. Nakamura, N. Suetsugu, D. Kohda, T.Q.P. Uyeda, M. Wada: CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING 1 is a plant-specific actin polymerization factor regulating chloroplast movement, *Plant Cell*, **36**, 1159-1181, 2024.
3. T. Waksman, N. Suetsugu, P. Hermanowicz, J. Ronald, S. Sullivan, J. Labuz, J.M. Christie: Phototropin phosphorylation of ROOT PHOTOTROPISM 2 and its role in mediating phototropism, leaf positioning, and chloroplast accumulation movement in Arabidopsis, *Plant J.*, **114**, 390-402, 2023.