

# 研究報告書

## 「光環境に応じた光呼吸の新規適応機構の解明とその改変による植物生産性の向上」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 松下 智直

### 1. 研究のねらい

光呼吸は、Rubisco のオキシゲナーゼ活性により生じた 2-ホスホグリコール酸(2PG)などの有害な産物を代謝し、その炭素をカルビン回路へと戻すための経路として、大気条件下での植物の生存に不可欠な反応である。しかしこの反応にはエネルギーと還元力の消費が伴うため、様々な環境の変化に応じて厳密にコントロールされる必要があるが、その制御機構の多くは不明である。

グリセリン酸キナーゼ(GLYK)は、光呼吸の最終ステップである、グリセリン酸(Glycerate)から 3-ホスホグリセリン酸(3PGA)への変換を触媒する、光呼吸に必須の酵素であり、その欠損株では光呼吸回路が完全に停止し、有毒な 2PG が蓄積するなどして致死となる。

これまで、GLYK の細胞内局在は葉緑体内のみに限られると考えられてきたが、我々はこれまでの研究により、シロイヌナズナにおいて、暗所や日陰など条件において、GLYK が細胞質にも現れることを発見した。

本研究では、光呼吸における細胞質局在型 GLYK の生理機能、ならびに、それが日陰などの光環境で発現することの生理学的意義を解析することで、GLYK の細胞内局在制御を介した光呼吸の新規適応機構を明らかにする。そして、その改変により、光呼吸経路を人為的に制御し、光呼吸による二酸化炭素固定速度の低下を防ぐことで、植物生産性の向上をねらう。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

我々はこれまでに、シロイヌナズナを用いた順遺伝学的解析から、フィトクロムのシグナル伝達におけるポジティブレギュレーターとして、新奇の選択的スプライシング制御因子である RRC1 を同定していた。この結果から、フィトクロムが、RRC1 を介して光シグナル依存的に選択的スプライシング制御を行うことで、光応答を引き起こしているという可能性が示唆された。そこで我々は mRNA-seq 解析を行い、その結果、フィトクロムが転写制御に加えて、それとほぼ同じ規模でゲノムワイドに選択的スプライシング制御も行うことで、光シグナルを伝達することを明らかにした(Shikata et al., PNAS 2014)。そして、フィトクロムによる選択的スプライシング制御の標的遺伝子の1つであるグリセリン酸キナーゼ(GLYK)は、光呼吸に必須の酵素であり、これまででもっぱら葉緑体のみに局在し、光呼吸の最終ステップであるグリセリン酸から 3-ホスホグリセリン酸への変換を触媒すると考えられてきた。しかしながら我々は、フィトクロム活性が低下する日陰の条件において、GLYK が細胞質にも現れ、それが光呼吸の細胞質

バイパス経路を構成することで、変動光条件における光阻害を低減させることを明らかにした。他の植物の日陰では、木漏れ日による変動光に晒される危険性が高まると考えられるため、植物は、日陰条件をフィトクロムにより感知し、GLYK の選択的スプライシングパターンを制御して細胞質型 GLYK を発現することで、変動光による光阻害に備えていると考えられる。以上のように、本研究の結果我々は、GLYK の細胞内局在制御を介した光呼吸の新規適応機構を明らかにすることに成功した。

## (2) 詳細

フィトクロムによる選択的スプライシング制御の標的遺伝子をシロイヌナズナのゲノム内で網羅的に同定する目的で、次世代シーケンサーを用いた mRNA-seq を行い、フィトクロムシグナル依存的にスプライシングパターンを変化させる遺伝子をゲノムワイドに解析した。その結果、シロイヌナズナゲノム内にて、1000 を超える遺伝子が、定常状態での mRNA 量を変化させることなく、その選択的スプライシングパターンを、フィトクロム依存的に、赤色光に応じて 1 時間以内に素早く変化させることが明らかとなった。さらに、Gene Ontology 解析を行った結果、フィトクロムによる転写制御の主な早期標的遺伝子が、過去の報告通り転写因子であるのに対して、フィトクロムによる選択的スプライシング制御を赤色光照射後 1 時間以内に受ける主な遺伝子は RNA スプライシング関連遺伝子であることが明らかとなった。これらの結果から、フィトクロムは、赤色光受容後 1 時間以内に、転写因子遺伝子に対して転写制御を、そして RNA スプライシング関連因子遺伝子に対して選択的スプライシング制御を、それぞれ別々に行うことで、赤色光に応じた転写カスケードと選択的スプライシングカスケードをゲノムワイドに誘導するというモデルが示唆された(Shikata et al., PNAS 2014)。そしてこの研究の結果、フィトクロムによる選択的スプライシング制御の標的遺伝子の1つとして、グリセリン酸キナーゼ(GLYK)が同定された。

GLYK は、光呼吸に必須の酵素であり、これまでもっぱら葉緑体のみに局在し、光呼吸の最終ステップであるグリセリン酸から 3-ホスホグリセリン酸への変換を触媒すると考えられてきた。しかしながら我々は、フィトクロム活性が低下する日陰の条件において、GLYK 遺伝子の選択的スプライシングパターンが変化することで、N 末端のプラスチド移行シグナルを失った細胞質局在型の GLYK が発現することを明らかにした。

次に、細胞質局在型 GLYK の機能を調べるために、GLYK のプロモーター領域とコーディング領域のいずれをも含むゲノム DNA 断片の 3' 末端に、GFP 遺伝子を融合させ、それを *glyk* 変異体に導入した gGLYK-GFP 形質転換植物を作製した。さらに、gGLYK-GFP 形質転換植物と同様に *glyk* 変異体背景で、葉緑体局在型 GLYK(以後 ptGLYK)もしくは細胞質局在型 GLYK(以後 cytGLYK)のみを発現する ptGLYK-GFP 形質転換植物もしくは cytGLYK-GFP 形質転換植物も作製し、それらの表現型を詳細に観察した。その結果、日陰条件で発現する cytGLYK が、光呼吸回路における細胞質バイパス経路を構成することで、変動光条件における光阻害を低減させることを明らかにした。他の植物の日陰では、木漏れ日による変動光に晒される危険性が高まると考えられるため、植物は、日陰条件をフィトクロムにより感知し、GLYK の選択的スプライシングパターンを制御して cytGLYK を発現することで、変動光による光阻害に備えているのではないかと考えられた。

以上のように、本研究の結果我々は、GLYK の細胞内局在制御を介した、光呼吸の光環境に応じた新規適応機構を明らかにすることに成功した。

### 3. 今後の展開

本研究で発見した事実は、植物のみならず、ありとあらゆる真核生物において普遍的に存在する機構である可能性が高く、今後この分子機構の詳細を解明することで、自然科学における一分野を新たに開拓することが可能になると考えられる。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

##### (研究者)

本研究の目的は、タイトルにある通り、「光環境に応じた光呼吸の新規適応機構を解明し、その改変によって植物生産性の向上を図る」ことであった。そのうちの前半部分に関しては、目標を達成することができたと考える。しかしそれを達成する過程で、思いがけない大きな発見に恵まれ、その内容を解明し論文として報告するために、残りの研究期間が費やされてしまった。そのため、本来の目的の後半分は達成することができなかったが、この判断は正しかったと考えており、総じて、予想を遥かに上回る成果が得られたものと評価する。

平成 24 年 10 月に現研究機関にてテニュアを獲得し、学生の指導教官となる資格を得た。しかしながら、現在に至るまで、学部学生に対して教育する権利が与えられておらず、今後も学生の配属は全く期待できない。従って、マンパワーの面で十分な国際的競争力を得るためには、実験補助員の雇用が不可欠であり、そのために、本研究費の大部分が人件費として有効に利用された。そしてその結果、学生の全くいない状況にもかかわらず、実験補助員 2 名と私の合計 3 名体制で研究を進め、これだけの成果を挙げられたことに関しては、極めて高いコストパフォーマンスを発揮できたものとする。またその際には、本さきがけ研究領域内において、素晴らしい共同研究者の数々に恵まれたことが、成功の大きな要因であった。ここで築き上げた共同研究者との絆は、今後の研究生涯に渡っての最大の財産になるものと確信する。

本研究で発見した事実は、植物のみならず、ありとあらゆる真核生物において普遍的に存在する機構である可能性が高く、今後この分子機構の詳細を解明することで、あらゆる事象の生物反応の人為的制御に繋がるという応用面での波及効果にとどまらず、科学における一分野を新たに開拓し、さらにその成果は科学的啓蒙という観点からも社会・国民に広く還元されるべきものと考えられる。

#### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

##### (研究総括)

光合成による二酸化炭素固定速度を低下させる光呼吸について、松下氏が自ら発見した光環境変化に対する新たな適応機構を解明し、その改変により植物生産性を向上させることを目的に研究がすすめられた。その結果、フィトクロームシグナルに由来する一連の遺伝子群の選択的転写開始点制御現象を見出し、光呼吸経路のキー酵素であるグリセリン酸キナーゼの細胞内局在が変化することを明らかにした。また領域内のネットワークを活かし、多く

の共同研究により研究を推進した点も評価できる。今後、グリセリン酸キナーゼの葉緑体と細胞質の二重局在性の現象とその生理的意義の解明という、本研究の骨子の部分についてさらに研究を発展させ、早急に論文として取りまとめていくことを期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Shikata, H., Hanada, K., Ushijima, T., Nakashima, M., Suzuki, Y. and Matsushita, T. (2014)  
Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in *Arabidopsis*. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 111: 18781–18786.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### <国際学会での招待講演>

##### 1. Tomonao Matsushita

“Light-dependent control of gene expression by phytochrome”

2016 Plant Science Annual Meeting and Symposium, Taiwan Society of Plant Biologists  
(Taichung, Taiwan, November 2016)

##### 2. Tomonao Matsushita

“Molecular mechanism of phytochrome signal transduction in higher plants”

7th Asia and Oceania Conference on Photobiology (Taipei, Taiwan, November 2015)

##### 3. Tomonao Matsushita

“Light-dependent dual regulation of gene expression by phytochrome”

2015 International Symposium on Plant Sciences & the Annual Conference of the Korean Society of Plant Biologists (Daejeon, Korea, November 2015)

##### 4. Tomonao Matsushita

“Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in *Arabidopsis*”

The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing (Tokyo, Japan, March 2015)

##### 5. Tomonao Matsushita

“Phytochrome controls alternative splicing in *Arabidopsis*”

Academia Sinica Institutional Seminar (Taipei, Taiwan, February 2014)

##### 6. Tomonao Matsushita

“Phytochrome regulates alternative splicing in *Arabidopsis*”

Korean Society of Photoscience, Plant Photobiology Colloquium 2013 (KAIST, Daejeon, Korea, November 2013)

7. Tomonao Matsushita

“Phytochrome regulates alternative splicing in Arabidopsis”

The 6<sup>th</sup> Asia & Oceania Conference on Photobiology (Sydney, Australia, November 2013)

<国際学会での受賞>

1. Tomonao Matsushita

“Molecular mechanism of phytochrome signal transduction in higher plants”

Asia and Oceania Society for Photobiology (AOSP) Award for Young Scientist (2015)

<プレスリリース等>

1. 松下智直

毎日新聞(朝)2014年12月16日「植物光応答遺伝子1505個」