苔類ゼニゴケにおいて光合成依存的に リン酸化される Raf 様キナーゼの機能解析

小出 絵理

目次

要旨	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 2	2
略語	表	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 2	4
序論	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• (5
結果	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	13
考察	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 2	46
材料	と	方	法	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• :	51
文献	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• {	59
謝辞	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• ′	70

要旨

植物の適切な生育にはエネルギーの生産と消費、貯蔵のバランスをとることが重要であ る。そのためには、エネルギー生産源の光合成活性を認識して、それに応じて細胞成長や 細胞分裂などの様々な細胞活動を調節する必要がある。例として、光合成の電子伝達系の 酸化還元状態に依存した遺伝子発現制御や、光合成産物の糖がシグナルとして細胞周期を 制御することなどが知られている。しかし、植物の成長を光合成と調和させるシグナリン グ機構については依然不明な点が多い。そこで、本研究では光合成の刺激に応答するシグ ナル伝達因子を同定するために、モデル植物の苔類ゼニゴケ Marchantia polymorpha を用 いてリン酸化プロテオーム解析を行った。暗処理した植物体に光照射することでリン酸化 レベルが変動し、かつ光合成阻害剤存在下ではその変動が見られないリン酸化ペプチドを 探索した。同定したリン酸化ペプチドの中には、過去に光合成依存的なリン酸化が報告さ れているものが実際に含まれていた。シグナル伝達因子候補として新奇プロテインキナー ゼに注目し、PHOTOSYNTHESIS-RELATED RAF (MpPRAF) と名付けた Raf 様キナーゼの 機能解析を行った。MpPRAF はゼニゴケでは唯一 B4 グループに分類された。他の植物に おいて B4 グループの Raf 様キナーゼについて光合成に関連した機能は報告されていなか った。多くの B4 グループのキナーゼと同様に MpPRAF は N 末端側にタンパク質相互作用 に機能することが予想される PB1 ドメインを、C 末端側にプロテインキナーゼドメインを もつ。

MpPRAF のリン酸化状態について詳細に解析するため抗 MpPRAF 抗体を作製した。生 化学的解析を行い、光合成活性依存的な MpPRAF のリン酸化を確かめた。また、光照射に よってリン酸化された MpPRAF は、暗所において脱リン酸化されることを明らかにした。 MpPRAF のリン酸化状態は光合成活性に応答して制御されていることが示唆された。

次に、生理的な機能を調べるために相同組換えとCRISPR/Cas9 ゲノム編集システムにより Mppraf 変異株を作出した。Mppraf 変異株では成長遅延がみられた。炭水化物の測定により、Mppraf 変異株のデンプンの高蓄積とスクロースの減少が示された。デンプンの高蓄積が Mppraf 変異株の表現型の原因か確かめるために Mppraf 変異株背景でデンプン生合成 に重要な葉緑体局在型ホスホグルコムターゼ (MpPGM1)の変異株を作出した。Mppraf Mppgm1 二重変異株において、デンプン高蓄積の表現型は抑圧されたが、成長遅延とスクロース減少は抑圧されなかった。そのため、Mppraf 変異株におけるデンプン高蓄積はスクロース減少の二次的な効果であることが示唆された。さらに、スクロース添加により野生型株では内生のスクロース量が増加したが、Mppraf 変異株では増加がみられなかった。スクロース添加培地においても Mppraf 変異株の成長はさほど回復せず、スクロース非含有培地における野生型株に比べてずっと遅いままだった。Mppraf 変異株ではスクロースの生合成と蓄積の両方が著しく損なわれていることが示唆された。また、Mppraf 変異株では光合成電子伝達が低下しており、多面的な表現型がみられた。

MpPRAF の分子的な機能を調べるために、キナーゼ活性を不活性化させる変異としてよ く用いられるアミノ酸置換を加えた変異型 MpPRAF^{D1540N}を用いて相補実験を行った。野 生型 MpPRAF を導入すると成長遅延やデンプンの高蓄積といった Mppraf 変異株の表現型 は相補されたが、キナーゼ失活型の MpPRAF^{D1540N}を導入した場合は相補されなかった。 そのため、MpPRAF は生体内でプロテインキナーゼとして機能することが必要であること が示唆された。また、光照射をしても MpPRAF^{D1540N} のリン酸化は誘導されなかった。 MpPRAF 自身のキナーゼ活性が光合成依存的なリン酸化にも必要であることが示唆され た。

この研究において MpPRAF は光合成の刺激によりリン酸化されることと、糖代謝を制御 するプロテインキナーゼであることを明らかにした。今後プロテインキナーゼである MpPRAF の活性化因子と基質を同定することで、MpPRAF の関わる光合成シグナル経路の 解明が進むことが期待される。

略語表

ADG1	ADP-GLUCOSE PYROPHOSPSHORYLASE 1
ADPG	ADP-glucose
AGPase	ADP-glucose pyrophosphorylase
b	base
BHP	BLUE LIGHT-DEPENDENT H ⁺ -ATPASE PHOSPHORYLATION
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	base pair
Cas9	CRISPR-associated endonuclease 9
CBC	CONVERGENCE OF BLUE LIGHT AND CO ₂
CCFL	cold cathode fluorescent lamp
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DCMU	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
EF	ELONGATION FACTOR1 ALPHA
ETR	electron transport rate
F1,6BPase	fructose-1,6-bisphosphatase
F1,6BP	fructose-1,6-bisphosphate
F2,6BPase	fructose-2,6-bisphosphatase
F2,6BP	fructose-2,6-bisphosphate
F6P	fructose-6-phosphate
F6P,2K	fructose-6-phosphate-2-kinase
FASP	filter-aided sample preparation
FLV	flavodiiron proteins
G1P	glucose-1-phosphate
G6P	glucose-6-phosphate
gRNA	guide RNA
HA	H ⁺ -ATPase
hpt	hygromycin phosphotransferase
HT1	HIGH LEAF TEMPERATURE 1
kDa	kilo dalton
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LED	light emitting diode
MBP	maltose-binding protein
NADH	nicotinamide-adenine dinucleotide reduced form

NDH	NADH dehydrogenase-like
NPQ	nonphotochemical quenching
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAM	protospacer adjacent motif
PB1	Phox and Bem1
PFD	photon flux density
PGI	phosphoglucoisomerase
PGM	phosphoglucomutase
phot	phototropin
Pi	inorganic phosphoric acid
PRAF	PHOTOSYNTHESIS-RELATED RAF
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RT-PCR	reverse transcription-PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate
SMART	simple modular architecture research tool
SPP	sucrose-phosphate phosphatase
SPS	sucrose phosphate synthase
SS	starch synthase
STY	Ser/Thr/Tyr kinase
S6P	sucrose-6-phosphate
TEM	transmission electron microscopy
TP	triose phosphate
TPT	TRIOSE PHOSPHATE/PHOSPHATE TRANSLOCATOR
TOR	TARGET OF RAPAMYCIN
UDPG	UDP-glucose
UGPase	UDP-glucose pyrophosphorylase

序論

<u>光合成や光合成産物からのシグナル</u>

植物において光は不可欠なエネルギー源である。光合成によって ATP や還元力が産生さ れ、その化学エネルギーが炭素固定に利用され、デンプンやスクロース、細胞壁多糖のよう な炭水化物がつくられる。炭水化物は分解されて化学エネルギーを産生したり、細胞骨格の 炭素源となったりして細胞分裂や成長など様々に利用される。最適な成長を実現するため に、植物はエネルギーと炭水化物の生産と消費、貯蔵の均衡をとる必要がある。光合成活性 に関連して調節される様々な応答が知られている。例えば、空気の出入り口として光合成に も重要な気孔について、光合成が進行していると気孔がより開口すること (Suetsugu et al., 2014) や、機能的な葉緑体が気孔の開閉に不可欠であること (Negi et al., 2018)が報告されて いる。また、光合成産物である糖がシグナル分子としても機能している。気孔開口、細胞伸 長、細胞内 pH の恒常性維持などの多様な反応に関与する細胞膜プロトンポンプ (Duby and Boutry, 2009)を糖が活性化する (Okumura et al., 2012; 2016)。さらに、糖は腋芽の成長制御 因子であり、頂芽優勢に影響する (Mason et al., 2014)。子葉由来の光合成産物のスクロース は地上部だけでなく根の伸長も促進する (Kircher and Schopfer, 2012)。光合成産物のグルコ ースも TARGET OF RAPAMYCIN (TOR) シグナリングを駆動して根端メリステムを活性化 する (Xiong et al., 2013)。

光合成からのシグナルにはレトログレードシグナルもある。例えば、チラコイド膜中のプ ラストキノンプールの還元状態により、特にスプライシング関連因子の選択的スプライシ ングが制御され、多くの核コード遺伝子の選択的スプライシングが変わる (Petrillo et al., 2014)。また、強光ストレスにより葉緑体でつくられる活性酸素種が細胞死またはストレス 順化を引き起こす (Ramel et al., 2012)。このように光合成の過程や光合成産物からの刺激に 対して植物は応答している (図 1)。



図 1 光合成の過程や光合成産物が影響を与える反応

炭素分配の制御

スクロースやデンプンの量は光合成活性と関連して制御されている。シロイヌナズナを 含む多くの植物が昼間、葉にデンプンを蓄積し、炭素を供給するために夜間にデンプンを分 解する (図 2; Caspar et al., 1985; Gibon et al., 2004; 2009; Streb and Zeeman, 2012)。光合成が盛 んなときのスクロース合成のオーバーフローとしてデンプンが合成される種もあるが、光 合成活性が低いときにもデンプン合成酵素を活性化して合成する種もある。オーバーフロ ーモデルでは、葉において高濃度のスクロースが蓄積するとフルクトース 2,6-ビスリン酸 (F2,6BP) も増加し、フルクトース 1,6 ビスホスファターゼ (F1,6BPase) が阻害される。フル クトース 1,6 ビスリン酸 (F1,6BP) のフルクトース 6 リン酸 (F6P) と無機リン酸 (Pi) への 加水分解が阻害された結果、細胞質の Pi が減少する。光合成産物の葉緑体外への輸送は主 に triose phosphate/phosphate translocator (TPT) によるトリオースリン酸 (TP) と Pi の交換輸 送に担われている。そのため、Pi が不足すると葉緑体内に光合成産物がとどまることにな り、デンプンの合成が促進される (Stitt et al., 1983; 1984; Flügge et al., 2003)。

デンプン欠乏変異体の遺伝学的スクリーニングにより、phosphoglucomutase (PGM) や ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) といったデンプンの合成に重要な酵素遺伝子が単 離されている (Caspar et al., 1985; Lin et al., 1988)。デンプン合成の調節のために、光やスク ロースが AGPase の還元依存的な活性化を引き起こす (Michalska et al., 2009)。また、主要穀 物を含む他の植物では、葉における主な貯蔵物質としてスクロースを使っているものもあ る。Sucrose phosphate synthase (SPS) はスクロース生合成に重要な酵素である。イネ (Hashida et al., 2016) とシロイヌナズナ (Bahaji et al., 2015) において、SPS 活性の低下はデンプンの 蓄積を引き起こす。反対に SPS の過剰発現は、シロイヌナズナにおいてスクロース/デンプ ン比を上昇させる (Signora et al., 1998)。SPS 活性はアロステリック制御と可逆的なリン酸化 により制御されている (Huber and Huber, 1992a; 1992b; 1996)。このように光合成活性の変化 に適応するために、デンプンとスクロース間の炭素分配は代謝物による競合阻害や生合成 酵素の翻訳後修飾といった多段階の制御を受けている。



図 2 デンプンの代謝とスクロース合成の模式図

昼 (A) のデンプンとスクロースの合成と夜 (B) のデンプンの分解の代謝物を黒色で、酵素 を下線付きの橙色で示す。Streb and Zeeman (2012) と Bahali et al.(2015) をもとに作成した。 ADPG: ADP グルコース、AGPase: ADP グルコースピロホスホリラーゼ、F1,6BPase: フルクト ース 1,6 ビスホスファターゼ、F2,6BPase: フルクトース 2,6 ビスホスファターゼ、F1,6BP:フ ルクトース 1,6 ビスリン酸、F2,6BP: フルクトース 2,6 ビスリン酸、F6P: フルクトース 6 リ ン酸、F6P,2K: フルクトース 6 リン酸 2 キナーゼ、G1P: グルコース 1 リン酸、G6P: グルコー ス 6 リン酸、PGI:ホスホグルコイソメラーゼ、PGM:ホスホグルコムターゼ、Pi: 無機リン酸、 SPP: スクロースリン酸ホスファターゼ、SPS: スクロースリン酸シンターゼ、S6P: スクロース 6 リン酸、SS: スターチシンターゼ TP: トリオースリン酸、TPT: トリオースリン酸トランスロ ケーター、UDPG: UDP グルコース、UGPase: UDP グルコースピロホスホリラーゼ。

苔類ゼニゴケ

本研究において、陸上植物の基部に位置する苔類ゼニゴケ(Qiu et al., 2006; Puttick et al., 2018)を用いて光合成からのシグナルを伝達する新規因子の同定を目指した。ゼニゴケを用いた研究から、植物の進化における応答や制御メカニズムの保存性と多様性、また進化的な起源を解明する糸口が得られている。例えば、最近では植物ホルモンのオーキシンまたは祖先的なジャスモン酸シグナリングや、赤色光/遠赤色光シグナリングが報告されている。 (Monte et al., 2018; Mutte et al., 2018; Inoue et al., 2019)。多くの制御遺伝子ファミリーの遺伝的冗長性の低さとゲノム情報の整備、効率的な形質転換法(Ishizaki et al., 2013; 2015; 2016; Bowman et al., 2017; Sugano and Nishihama, 2018; Sugano et al., 2018)によりゼニゴケは分子生物学のモデル植物に適している。

苔類ゼニゴケの光合成電子伝達や、光合成が関わる応答についても報告されている。被子 植物において、光化学系 I と超複合体を形成し、循環的電子伝達経路や葉緑体呼吸を仲介す る NADH dehydrogenase-like (NDH) 複合体の構成因子はゼニゴケにも一部保存されている。 被子植物とは異なり、NDH 複合体が光化学系 I 複合体と相互作用しないが、ゼニゴケの NDH 複合体はシロイヌナズナと同様の電子伝達を行うことが示唆されている (Ueda et al., 2012)。 基部陸上植物のゼニゴケは、シアノバクテリアと同様に flavodiiron proteins (FLV) を保持し、 光化学系 I を活性酸素種から保護するための代替的電子伝達反応も駆動する (Shimakawa et al., 2017)。紫外線や強い光合成有効放射によって光阻害が誘導され、クロロフィル量とカロ テノイド量が減少するという報告がある (Soriana et al., 2019)。また、光照射や光合成産物の 糖によって、細胞膜プロトンポンプのリン酸化が誘導され活性化される (Okumura et al., 2012; 2016)。光合成由来の糖は胞子の最初の細胞分裂も促進する (Nakazato et al., 1999)。ま た、糖と光受容体由来のシグナルの協調による葉状体の再生のための細胞周期への再進入 (Nishihama et al., 2015) の促進も報告されている。このように光合成由来のシグナリングは ゼニゴケの成長においても重要である。

Raf 様キナーゼの光合成に関連した機能

以下に述べるように、光合成依存的な応答の制御に関連した機能をもつ rapidly accelerated fibrosarcoma (Raf) 様キナーゼが報告されている。Raf は最初に動物で同定されたセリン/スレオニンキナーゼであり、成長因子由来の細胞分裂シグナルを伝達する (Daum et al., 1994)。シロイヌナズナのゲノムには、Raf と相同性のあるキナーゼドメインをもつ Raf 様プロテインキナーゼが 49 分子種コードされている。キナーゼドメインの N 末端側が長い B グループ4 種類 (B1-B4) と、比較的 N 末端側が短い C グループ 7 種類 (C1-C7) に分かれている (MAPK group, 2002)。苔類ゼニゴケにおいては Raf 様キナーゼが 20 分子種コードされ、B1-B4 と C1-C7 の 11 種類に分類されている (Bowman et al., 2017; 図 3A)。

Α





図 3 キナーゼドメイン部分のアミノ酸配列に基づいた Raf 様キナーゼの系統樹 Bowman et al., 2017 を改変。(A) B グループと C グループ全体の系統樹。(B) 拡大した B4 グループの枝。系統樹内の数字はブートストラップ確率を、バーはアミノ酸の置換率を示 す。

それらのうち、シロイヌナズナの孔辺細胞で高発現している HIGH LEAF TEMPERATURE 1 (HT1) と BLUE LIGHT-DEPENDENT H⁺-ATPASE PHOSPHORYLATION (BHP) 、 CONVERGENCE OF BLUE LIGHT AND CO₂ 1 (CBC1) と CBC2 が気孔開閉の制御に関わる ことが報告されている。HT1 (C5 グループ) は CO₂、BHP (C1 グループ) は青色光と CO₂、 C7 グループの CBC1 と CBC2 は青色光に応答する (Hashimoto et al., 2006; Hayashi et al., 2017; Hiyama et al., 2017)。また、C2 グループに分類される Raf 様キナーゼの Ser/Thr/Tyr kinase 8

В

(STY8)、STY17、STY46 が葉緑体輸送ペプチドをリン酸化すること (Martin et al., 2006) と 葉緑体分化を制御すること (Lamberti et al., 2011) が報告されている。以上のように、多様 なグループの Raf 様キナーゼの、気孔開閉と葉緑体に関係した機能が解明されつつある。

本研究では、光合成からのシグナルの伝達因子を同定し、光合成による植物の成長制御を 解明することを目的に研究を行った。還元力の産生や糖の合成など、光合成は複数の段階に 分けられる。本研究では複数の段階からのシグナルを検出できるように、光化学系 II の電 子伝達を阻害する 3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea (DCMU) を処理してリン酸化プロ テオーム解析を行った。DCMU の有無によってリン酸化レベルが異なる光合成依存的なリ ン酸化制御を受ける新規因子を探し、Raf 様キナーゼを同定した。さらに、変異体の解析に より、同定した Raf 様キナーゼが成長と炭素代謝の制御に重要な役割を果たすことを明ら かにした。

結果

光合成刺激に応答してリン酸化制御される Raf 様キナーゼ MpPRAF の同定

光合成からのシグナルを伝達する因子を同定するためのリン酸化プロテオーム解析を行うにあたり、対照として用いる DCMU による光合成阻害条件を設定するため、ゼニゴケの Fv/Fm (光化学系 II 最大量子収率であり、光化学系 II の光阻害 の指標となる; Butler and Kitajima, 1975) に対する様々な濃度の DCMU の効果を調べた。恒常白色光下で 14 日間生育 させ、暗所に移した野生型株に DCMU を与えたところ、濃度依存的な Fv/Fm の低下が見ら れた (図 4)。リン酸化プロテオーム解析のサンプルには、顕著に光合成の電子伝達を阻害し た 10 μM DCMU を用いることにした。



図 4 DCMU による光合成の阻害効果

未処理の葉状体の Fv/Fm に対する DCMU 処理した葉状体の Fv/Fm の割合。グラフは 5 個 体の平均値、バーは標準誤差を示した。野生型株を恒常白色光下で 14 日間生育させ、暗 所に移した。暗処理 2 日目に溶媒の 0.1%エタノールまたは、1、10、100 μM の DCMU を 添加し 1 日暗所での培養を続けた。暗処理 3 日目に青色光(110 μmol photons m⁻² s⁻¹) を 10 分間照射した。光照射後、暗所に 30 分以上置いてからクロロフィル蛍光を測定した。

7日間恒常白色光下で生育させ3日間暗処理したゼニゴケ葉状体と、暗処理後に青色光を 10分または30分照射した葉状体を用いて、リン酸化プロテオーム解析を行った。対照とし て、光照射1日前にDCMU処理したサンプルを用いた。得られたリン酸化プロテオーム解 析結果の妥当性を評価するために、既知のリン酸化タンパク質の挙動を最初に確認した。ゼ ニゴケの青色光受容体フォトトロピン (Mpphot) は青色光依存的に、細胞膜プロトンポンプ (MpHAs) は光合成依存的にリン酸化されることが報告されている (Komatsu et al., 2014; Okumura et al., 2012)。Mpphot 由来のリン酸化ペプチドは DCMU 処理に関係なく、青色光照 射によってリン酸化レベルが上昇した (図 5A)。一方で、細胞膜プロトンポンプの一つであ る MpHA2 由来のリン酸化ペプチドは青色光照射によりリン酸化レベルが上昇するが、 DCMU 処理によりリン酸化レベルの上昇が抑制された (図 5B)。これらのリン酸化ペプチド の挙動が過去の知見と一致していたため、実験条件と得られたデータセットの妥当性が確 認できた。



в



図 5 Mpphot と MpHA2 のリン酸化制御

Mpphot の 478 番目のセリン (A) と MpHA2 の 956 番目のスレオニン (B) のリン酸化レベ ル。野生型株を恒常白色光下で7日間生育させ、暗所に移し3日間おいた。暗処理2日目 に一部のサンプルに 10 μ M DCMU を与え (+)、残りは未処理のまま (-)1日培養を続け、 青色光 (110 μ mol photons m⁻² s⁻¹)を 10 分または 30 分間照射した。定量したリン酸化レベ ルは2を底とした対数軸に図示した。丸は生物学的3反復の中央値を、バーはリン酸化レ ベルの範囲を示す。グラフの上部に、タンパク質の名称と同定と定量が行われたリン酸化 ペプチドの配列を示す。pS と pT はリン酸化が予測された残基を示す。

MpHA2のように、DCMU未処理の場合にのみリン酸化レベルが変動する新奇リン酸化ペ プチドの探索を行った。その中から、光照射 10 分の短時間でリン酸化レベルが変化した、 プロテインキナーゼをコードする Mapoly0013s0150 由来のリン酸化ペプチドに注目した (図 6A)。Mapoly0013s0150 は Raf 様プロテインキナーゼの B4 グループに分類される (Bowman et al., 2017; 図 3B)。ゼニゴケ属の遺伝子命名法 (Bowman et al., 2016) に従って Mapoly0013s0150 を PHOTOSYNTHESIS-RELATED RAF (MpPRAF) と名付けた。SMART (Schultz et al., 1998) によるドメイン検索により、MpPRAF はN末端側に Phox and Bem1 (PB1) ドメイン、C 末端側にキナーゼドメインを保持することが予測された (図 6B)。PB1 ドメイ ンはタンパク質相互作用に機能する動物、菌類、植物に広く保存されたドメインである (Sumimoto et al., 2007)。シロイヌナズナ、アンボレラトリコポダ、ヒメツリガネゴケとクレ ブソルミディウムの B4 グループの Raf 様キナーゼも MpPRAF と共通して、N 末端側に PB1 ドメイン、C 末端側にキナーゼドメインが予測された (図 7)。SOSUI (Hirokawa et al., 1998) や ChloroP (Emanuelsson et al., 1999) の予測プログラムからは、MpPRAF の配列中にシグナ ルペプチドや膜貫通領域、葉緑体輸送ペプチドは見い出されなかった。質量分析解析により リン酸化が予測された 1248 番目のセリン (セリン-1248) は保存性のない PB1 ドメインとキ ナーゼドメインの中間領域に位置しており、キナーゼドメインの140アミノ酸ほど上流だ った (図 6B, 図 7C)。



図 6 MpPRAF のリン酸化制御と MpPRAF の構造

(A) MpPRAF の 1248 番目のセリンのリン酸化レベル。図4と同様に、野生型株を恒常白色 光下で7日間生育させ、暗所に移し3日間おいた。暗処理2日目に一部のサンプルに10µM DCMUを与え(+)、残りは未処理のまま(-)1日培養を続け、青色光(110µmol photons m⁻² s⁻¹)を10分または30分間照射した。定量したリン酸化レベルは2を底とした対数軸に図示 した。丸は生物学的3反復の中央値を、バーはリン酸化レベルの範囲を示す。グラフの上部 に、タンパク質の名称と同定と定量が行われたリン酸化ペプチドの配列を示す。pS はリン 酸化が予測されたセリンを示す。(B) MpPRAF タンパク質の模式図。Phox and Bem1()ド メインを縞模様の四角形、キナーゼドメインを市松模様の四角形で示す。黒丸はリン酸化プ ロテオーム解析においてリン酸化が予測された1248番目のセリンを、両矢印は抗原として 用いた718番目のセリンから946番目のアラニンの領域を示す。

•		1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
А	MpPRAF	MVVRE AM I VP QT VQGGGKGVNGCSL VSNYQNSRDL CL QSAAME QKSKGV I ENCNL GP HD VGVGWKRNSSE GS I SSMDSLP CGE T VF SP SDP HNS VF RKP RRL GV SE SDDEISV I DQS(
	kfl00667_0030	MAASRSSSGR I SVRQL QE KGNENLEEP YSTSVATL QL RNGQQ T SWNGP DT GVANAG YP YSRE VRVGQHSGVDKSFL VE GSD I D
	Phpat.009G095700.1	F SE DE DAL DL T (
	Phpat.015G092300.1	MSLFSED@DAQELT(
	AmTr_00019.236	MCKHEL GSL RS
	AmTr_00026.90	RIAL YOR ROOK AND A A A A A A A A A A A A A A A A A A
	AmTr_00039.196	MRPLEGLKEQRNAYMWMNPSCPTMSGSAPKPTS
	At1g04700_Raf16	MRMEFPGSSNQHLGRDRFNGEVGCGNNCSQTGE E FSNEFLF
	At1g16270_Raf18	MDRNRPPHPFQQHAMEPGYV-NDSVPQGFTPDQTGLSNANVRPNPADVK-PGLHYSIQTGEEFSLEFLF
	At1g79570_Raf20	MDKARHQQLFQHSMEPGYR-NETVPQPFMPDQTGSASANMRPPNSNGSDVK-AVHNFSIQTGE
	At2g35050_Raf24	MDQAKGYEHVRYTAPDPRDEGLGSINQRFSHDSSTNVNTYVRPPDYGVSTPARPVLNYSIQTGEEFAFEFMF
	At3g24715_Raf40	MSDRWARQNAE RP ATTL AE RRNVNKNVSL QT GE EF SMEFL F
	At3g46920_Raf42	MAHEP SSP SSNL VSNP ANL SA
	At5g57610_Raf35	
		120 130 140 150 <u>160 170 180 190 200 210 220 230</u>
	MpPRAF	EESLLRKSKRSVMGGTVOPHSAMAQSVDE <u>GDLEAGLVSIRRAHVGFEEGKFVGHHPTWFHSSKSNSSRLDHYIECLGTODAFVPRRYTPSAKADGSSLSKAHTDAESLLNS</u>
	kfl00667_0030	TEDGARQWSELAVQASAPPGEESASRRSALAGLENEDPVWGVEQRTRRPSSELS
	Phpat.009G095700.1	DGSPMSHSRRRKHAGYPQAHLNVLTNFND
	Phpat.015G092300.1	DGSP I SHSRRRKHAGHPL AHL NVF TNF ND
	AmTr_00019.236	SQSETTPIADQAVSTMENSSND
	AmTr_00026.90	TESMVTGL SGLLP I SSSA IE IL GSF NAFAGNG NEPL TDRFP YDMAQGRSF TL KSNASDSQS NN VHQHQRQT SVP
	AmTr_00039.196	KDSVRSPSNQNEMNKEVPTQTTCEDLTGILGLGRMVSGNGSDMPIFLGERGSSDEIEQMGYSDTKNI-SKSRRLSANSLGEYSTDQAPITPI
	At1g04700_Raf16	DF GAQRRL QHG GVNRNVE GNYNNRHL VYE DF NR IL GL QRVD SNMSE G I NSSNG YF A
	At1g16270_Raf18	DRVISQRSANPIAAGD-INYPTGYNGHAGSEFGSDVSRMSMVGNGIRQYERT-NPPVHEFGNKLGHIHSAPEASLCC
	At1g79570_Raf20	DRVIPQRSSNPNGAGD-MNYNTGYMELRGLIGISHTGSECASDVSRFSTVENGTSDIERPQRSSNPNGAGD-MNYNTGYMELRGLIGISHTGSECASDVSRFSTVENGTSDIERPQRSSNPNGAGD-MNYNTGYMELRGLIGISHTGSECASDVSRFSTVENGTSDIERPQRSSNPNGAGD-MNYNTGYMELRGLIGISHTGSECASDVSRFSTVENGTSDIERPQRSSNPNGAGD-MNYNTGYMEL
	At2g35050_Raf24	DRV1MRPQF1PNVYGEHSGMPVSVNLSALGMVHPMSESGPNATVLN1EEKRQSFEHE-RKPPSR1EDKTYHELVQSAPV1S-
	At3g24715_Raf40	DH IP VQSP I VAGR I HNDVHRF GDL YYQNDP QGYDSAARF HEL RR IE SE CP SDAYDF GRDP RS I IRLE NGGYMP HF NAYHNVGCDKE V I I -RKAF GE I NSNRGD V I GMSAP
	At3g46920_Raf42	SNKKYSDG115GFGSEUVS1DA
	At5g57610_Raf35	MDSGSVNSSVISL vSSL ND
		240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350
	мрекан	IRNOSDAH VGACSVENGSAAP DHSSTP SDDERDE P-SSRVEF MOSE GEREILIDE PESDOU RAVGGODRITI GINRDVIE SEI RRIWRESE GOCTE KVOLPDED DAL VI VSSDED EI M
	kfl00667_0030	
	Phpat.009G095700.1	AVTPDELSTREEYS - HRWR. USYGEKID PAPTDNG, RAVGEENKLITYSRDISYH UV RWGLFSH HITKYY PE HU DAUWYSSN DU AND
	Phpat.015G092300.1	
	Am1r_00019.236	
	Am Ir_00020.90	
	Am1r_00039.196	SULAPP ISHSRYSPSGSRPTGLG ISDNAU GKMGL USSGCGCUP PPSDGKLKNVGGE UNIV IVSKD ISWHD WKILSVHNVTH I KYCPG OD DALVSVSSOD DUV
	Atig04700_Railo	ESTIMATION OF A CONTRACT OF CONTRACT OF A CO
	Attg10270_Railo	
	At1g75570_Rai20	
	At2034715 Raf40	
	At2o46920 Raf42	
	At5o57610 Raf25	
	Alogoro Io_Naloo	
	MpPRAF	
	kfl00667 0030	
	Phpat.009G095700.1	
	Phpat.015G092300.1	
	AmTr_00019.236	
	AmTr_00026.90	
	AmTr_00039.196	M 🖬 YN GL E N V DG S GRU 🕅 I 🖬 I S GNE S D T G SF D M - RAAR RN S DL Q YYV 🕅 V 🕅 G I L E Q S L R K
	At1g04700_Raf16	I I I WOE AE TKAG-SORI IVII V STESSESPKIFHERNMN I NRNTNOOTD I DHYQWYSAL IIG I VDVSPOK
	At1g16270_Raf18	M 🖬 🖬 M M M M M M M M M M M M M M M M
	At1g79570_Raf20	L 💵 YN E M E N R G 🗗 - S O K U R M TUF IS I S D M D D A L L G V N K N D G D S E F O YYV 🖾 V 🛛 G M D I G S G K N
	At2g35050_Raf24	M 🖬 C I VFGN-G🗹-SEKP 🕅 M 📲 SSSD I E E AQF VM-E HAE GD SE VQ 🎞 V 🖾 V 🖾 GMDL SSRRS
	At3g24715_Raf40	I TER MAGU – – ERLE 🔄 – S Q RP 🗛 – TU IP I GEPERK – – – – – – – AQQN IP DC – – – – – – Q W AA 🗛 – N CNADP NP RN – – – – – – – – – – – – – – – – – –
	At3g46920_Raf42	M <u>11</u> FEKLVERSSD <mark>0-SGKL12v 11 FDAS<mark>S</mark>SEVDDSFGILE-YGDGVDIGQRYYE<u>G</u>VMGVVVSKESV</mark>
	At5g57610_Raf35	M = MDKLGSGDG+FTRURI = FBCDGSLHYVE-RDDQRESERRMMDALNNLIEGTDFR
		<u>470</u> <u>480</u> <u>490</u> <u>500</u> <u>510</u> <u>520</u> <u>530</u> <u>540</u> <u>550</u> <u>560</u> <u>570</u> <u>580</u>
	мрекан	THHDPNLTHQVPVAHPVSALTGNLSNRSNAPSAPSSAPSSPPLLARNLHGKLPLVGELHQFQYLQDSQFKGVGPQYTGMPSEVAHQDSESYGGSGGSSAASQHEM
	RI00007_0030	IYHE DOVE ORP GI GP OT GHOGAT SAGPPRL DL GGL SAE HL QUQUQHKL HQL QAF DE
	Phpat 015G092200.1	SUDVASL THRVP VALP VSSTPPASAPSSAPSSPPLEP RVL RANGE IPE MKLPF HP DUHP NNSGHUTN V VUVDGNVLE TENY GGKL V IG-TNVHE H
	AmTr 00019 228	SQUVASE I HHVP VALP VSSIPPAPSSSAPSSPPLEPRVERVAGF IPDMRCPF HE QHSNMSQHQTI V VQADGNVEEI DNF QVNE SIA-SIE HDH
	AmTr 00028.90	
	AmTr 00020.00	CONTRACT AND A CONTRA
	At1o04700_Raf18	
	At1o16270 Rof19	
	At1o79570 Raf20	
	At2n35050 Raf24	
	At3g24715 Raf40	
	At3o46920 Raf42	
	At5o57610 Raf35	
		590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
	MpPRAF	HYR-STDSRRGPESPKKFHDALHODHPITVEORRLSGTKMPRIGSHGKLTRLSE-HSELAPSSRVDSGOMPDIHMAPGFIORIFPOOVPLOOTIWP-HAMDTOOT
	kfl00667_0030	L WHAH-OHADGRPPE HARP DL P SRTSPP AST DE AGML RYRSRDNL ARL GDMAALE GHP RSTNSSP RHDDDAAAAAF AAAGHGDP YTP HPI PP RPP SGO
	Phpat.009G095700.1	VYN-TL DMHRGSE S IN I QHE GDFL GGQQEL AARDDL RRLPE VRMPRVP SHGKL TRL SE QHSE AT SSTR
	Phpat.015G092300.1	L YN-ASDMHRGSE S IN INGHE GDL VGGQQDL AARE DL RRL SE VR IPRVP SHGKL TRL SE QHL E AT SSAR
	AmTr_00019.236	OLA-MPHQRSGHCSTRYGDMETPWSPAYYSSSHI
	AmTr_00026.90	L RL ANDAP SVVNDAP RSANDA RFANGDP RL ANGDT RL AYRFP NOL IF GE DAASSSAAS VNT SGP SEP MP MCSML RL GOTHSVDP AVRPEE DHL HAK VDNL SAMI NL P VYGL ST SP S
	AmTr_00039.196	HFL-HNAVKSPSSS PMSPLPKLSKIPRERSFDRLSQKLSKIPRERSFDRLSQ
	At1g04700_Raf16	HKDSNS2TFM
	At1g16270_Raf18	DFQ-QSSMQYSESA TSFAQ
	At1g79570_Raf20	GFQ-QTSAQQSESI 🕑 SSSLH
	At2g35050_Raf24	AGNE SL @ASQTSQPVTGFSTGNE
	At3g24715_Raf40	
	At3g46920_Raf42	SN-FSPQTYHSNVSRLVPPDPRS5
	At5g57610_Raf35	QRGNE 1 2 TAQYSNRYGE VE GTWSPFYSPRHH(

図 7 B4 グループの Raf 様キナーゼのアミノ酸のアライメント

(A) アライメント 1-702 番目。紫色の四角形は選択的スプライシングを受ける配列、赤色の四角形は PB1 ドメインを示す。AmTr: Amborella trichopoda、At: Arabidopsis thaliana、kfl: *Klebsormidium nitens*、Mp: Marchantia polymorpha、Phpat: Physcomitrella patens。同一のアミノ酸は黒色、相同性が 80%以上 100%未満のアミノ酸は濃い灰色、60%以上 80%未満のアミノ酸は薄い灰色で強調している。

_		710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810
в	MpPRAF	SY-RRPDMLQSSGAQPAVSG00QQGYQPQQQLQH-LFRSGLSQTGANHEGAY-RQGDQQQQSQQFQEDLHVNPNYIPRSVSSHAIAAGIAAGQSTSYHGSAPSSP
_	kfl00667_0030	QQGRL GQHMQSE SAL DL QE GQF GSRL P QPP SMP QL HAGL A GVPL KL NL HSEP ASP GYAHGQYKR A GGL GEF GE SA SP HE TP RYGRRH TA VDGSSPP MAD SHVQHPP SHVE AF RRQ
	Phpat.009G095700.1	LYGRRVEYMOPTSDVMVOPIAPMOQQQQQQOPHFRVPFQNVLSASPIDOPIYRPVEHHSQVQGEEVFAPFMHRSVSATVCNTVGPLGSTAVSSYNVGAGSAPSSP
	Phpat.015G092300.1	VY-RRVEL VQSTSDVL VQP I AP GQQQQL PHF RSPF QNIL TASP I DQL I YRP ADHL SQVQGEE VF APF MQRS I SANTMGP VGSTAAVSYNVGAGSAPTSP
	AmTr_00019.236	NPHDSRP GSEFP SSP SGGRYRV-AF GDVQDNF SDR I HEE T GYP VGQF AP MNNL AHYE HQPPP YVDKP MNNLAHYE HQP SP YVDNVVWVQHGP
	AmTr_00026.90	ERPNISSTLVDCRPEGQQMPQ-IEAHASLVDVRPPPTYVHGYVGAHPSAYNLSSYSPYNNSDIRISPESMNASQSSSLSAQQSVVHVASVIGVAGVSYPFÅ
	AmTr_00039.196	EDENYTILTARPPQYSRAMDELGSIPKSTMSPQFLPMVSRSGKIVGSPAKPPLEVVGSPAKPPLEVV
	At1g04700_Raf16	PRNSF GQ
	At1g16270_Raf18	PQSIPHNGAFQFQQAVPPNATLQYAPSNPPSSSVHYPQSILPNSTLQYSILPNSTLQY
	At1g79570_Raf20	Y\$Q\$ IPL NAAYQL QQ\$VPP\$\$AL HYPQ\$ I TPG\$SL QYPQ\$ IP G\$SL QYPQ\$ I TPG\$SYQY\$
	At2g35050_Raf24	PFSOPYLGQQLQFPGLGNHQ-IYTSGHMASIGYIDERRSAPLHVQPQPHYIPYSVNPETPLESLVPHYPQK
	At3g24715_Raf40	Py CKR I P GUM RLDA I AMR/ NPL F NGVQ YNMAS YP SPP VYP SP SP F QPP VP SP SP SP F QPP VP SP SP F Q
	At3g46920_Raf42	
	At5g57610_Raf35	HHDPRIFQEFPSSPSSARTRM-PTGEIPDKGLDRMPEETVRPQASHHPFTEHQAHIPDSVVWVPAGAMPPESKGGF
	MoDRAE	
	M00887 0030	
	Rhost 009G095700 1	
	Phoat 015G092300 1	RFPF NMUP USUL UVUL RT TGAP NH VE USU-UNIL R-HATTAD UT TRADE VISUAL REPAIRS AND A VERY
	AmTr 00019 236	
	AmTr 00026 90	
	AmTr 00039.196	
	At1o04700 Raf16	
	At1g16270 Raf18	
	At1g79570_Raf20	POSTIPGSASSYGTYPOYYGHVV0HGER-ERPT -YPDHSSNYSATGETTSSIPTOGHVS00GGWAEGYPYPGSTERKSTAALAFEOK
	At2g35050 Raf24	
	At3g24715_Raf40	
	At3g46920_Raf42	STSLF SQQPF QDSPL SVSSHOFLP AAHMSMAPL -NSQ I SSTP VL I NP VMQTQE NL L GNYHAAQKL VPL PTEPRNTAYQGT
	At5g57610_Raf35	PGNVLHGGPGGYEGGNGCENCR-VPYHR-NHQLLEQSNIGNNGFPPVHCAHCPPNRESFLLN
		940 950 960 970 980 990 1,000 1,010 1,020 1,030 1,040 1,050
	MpPRAF	QAQY-DLVPRP0VP0YKGHNPF0EKITSF0DH0EVGDIRRHVL00GKDN0LL4G0QHLHSIL0P0RIDY0ESLK00GD0SIPIHPRF0DG0EKVAEWMV0ERAL
	kfl00667_0030	YEAAHGGP AGGGDQRVHRWL DGQSGE RDAHYGDSGGRMP RSASQRQL QE GEP YWQAK TE REL RQDSGARDGLP GL AGSWDE GRRDVYPE DHGE GASEP WQDGRRVPL SW
	Phpat.009G095700.1	HGQYAE GVTRGQVPQYLGHNPFQDGPSGFSESNYSEIQDGGDGRRQRERIPQQSYQSSHFNAREDFQDHNIPSAEPLTAPSRFQDKPKDWVVQQRGR
	Phpat.015G092300.1	HSQYTE GVTRAQVP QYL GHNPF QDGSGGF SE SYYSGTLDDKP MDWVHQCGR
	AmTr_00019.236	
	AmTr_00026.90	DKVSILEDCFMCQKALPHAHSDTLIQERVNPVPETNSALQSHHSDGSLRLMASPRVAGALGEGSAAPPVEHWLGMGRGAVAR
	Am1r_00039.196	STP SE SE SD G Y TLY G Q P VL Q E R V Y R SE F Y P R Q Q
	At1g04/00_Raf16	P QL HDE SQ I NNGLE AF TKQP WK IL RKNL
	At1g162/0_Rat18	YVEPSING VEPSING AND A A A A A A A A A A A A A A A A A A
	At1g/95/0_Rat20	
	At2g35050_Rat24 At3g24715_Rat40	
	At3o46920 Ref42	
	At5o57610 Raf35	
		1,060 1,070 1,080 1,090 1,100 1,110 1,120 1,130 1,140 1,150 1,160 1,17
	MpPRAF	-EEEEARKRVLGRIRQAELEEEAAAEAVVSQHKDTHQ-GVYAGLHLPNDEDLLTSSLGDYPSGNRRNERLESSISNAFPFRHLPPSVLGGYTAPKSRVNP-
	kfl00667_0030	GQDVGRGGMPRRGSNQDLHRTAGDSGQAGPDAPFFVEEGREAASLLQRRGSRRELLGPLALPPAAPWYGGGPEELRASPRDMATTKPPDFDFPQQLPPRGVSPPTAIPLPASGFQPS
	Phpat.009G095700.1	-DVEE IRTWRSGRARTGQNEHGNDGGGADLE AP REGFF HSPE DSDDLL AMSDSYLHKNGE IVE GTV SQSHAL TT
	Phpat.015G092300.1	-DAEETRPWRSGRACTGQNENAKEGYGVDSEAPKVFFLHLPEDSEDLLAMSDSYLLRNSDVVESPIPNNQHSRGTGTQSYAVGPQPS
	AmTr_00019.236	THL TGRVSDRHVVDGSIHNAPFPHGFEHGLEGPKDQKVGVGPYMHVPVREDAGIRFDNLSSSSIKEDFYQASRVSASPHAMRLKAQNP-
	AmTr_00020.90	FQGNGGSHAKLNIPVKSTEELPKTKPFGFTHVDKSTEELQKTEPL
	Atta04700 Baf18	L SDSHLQIHVRESIYRFHEGIPIDCANIPGUSI-DSFCSFVGUNILREGLVUPQRYKEMAGAMYQAIQPLIKEMAGAMYQAIQPLI
	Attg04700_Raf10	-RVVAIS
	At1079570 Raf20	
	At2o35050 Raf24	
	At3g24715 Raf40	
	At3g46920 Raf42	
	At5g57610_Raf35	
		1.180 1.190 1.200 1.210 1.220 1.230 1.240 1.250 1.260 1.270 1.280
	MpPRAF	TETSHVAQYVSRPVDTDYLAVAGLRGGGNGQDMRS-AALF-EVNGLQQTSGYQMPSGPHRLMEERLMPSAFNPITQLQKLRI-NDNLALNNDMRWSGSEDV-
	kfl00667_0030	E A YP AL GD TPPPP AELL OL SAGSSSQSRPPP HPL SP GNSGAP RP SASP VNAP YSDGP APLPL SL AAL TRPE AV SQNGV VQE AP S I TSD VNSL GP MAGRGGKP VYL P SP GK AP SPP VL
	Phpat.009G095700.1	AL GQSAVDLPQVPSFAGRKNEPGFFAESLPRSVEVLPVLEDKPAVTEASHLHSETSFNQLASQKDTDDKAAVGAYNSLVSHLSGTSSTRLGNAEPTNPAELRWRGLNDAN
	AmTr. 00010 228	TL GQVAVDMPQIPSIVGRKNESAFFAKPQPKL IEVLPDHESKPAGTLVNHLSSDSSSNKLASQMETDDKAAVVAFDNLFHHLSDTSNVRLGNIELTNSAELRWGGINDAN
	AmTr 00028 90	MRAPLPESSVFLPHSNGSSNSGFSRGAEQGGSPRFSRVGVEDQNSWVRQHGSSHAGGAFDVAAPDVLAQLTLHGGQNQ-
	AmTr 00039 198	DF THYDNAYNKYGADDVRPLYDPF SSNHSF F HOE DAF YMPHSQYRQE VARDR I I GID I PLE NSLLF P SAEP CDL DSSHDF A I KDVCL NSL SP DN YK I L DGRL SAF P YNSSGL SSG
	At1o04700 Raf16	ATSTSERLGSENLFYHTDFUEGRESMLLTGEPHRTEEUGTASNTGLGYHCUEPYSSUAAVNFTGEEGLLSPUDKVRPFTN
	At1o16270 Raf18	DUATKAUUGSNONSSESENTE SENTE OF NHUF AAUTISS
	At1g79570 Raf20	
	At2o35050 Raf24	
	At3g24715_Raf40	
	At3g46920_Raf42	
	At5g57610_Raf35	FGRSHISNVGRPNDHYTPDYPVSNYPI GGRAGHEISNEGEHDKPI GGTPI SANRSAFERGEHYGNNI YPPGPDSHISAGHS
		1,290 1,300 1,310 1,320 1,330 1,340 1,350 1,360 1,370 1,380 1,390 1,400
	MpPRAF	RNEPSIPARDRMGGIYEDHHQGLPGLTLGRSAGKLSRPSSNTSIPNLLDETIGEGSLLPSGPSYGTQAQGTNLI-DITQSISAIDNPLYSTSYASRLSNTSLG
	kn0000/_0030	LEL QDPSLPQLNL GRPLVGGPLLPSPDLAMARPSPVSILQQPEPVVPVPSLVFDGFPSPLGHLSVGPPVAPLESVL-SMDPHYGIPPSLAPPASGPLPSIPPIAENS
	Enpat.009G095700.1	ESRVESSLQTRDGTNNQDCFQRSSGSGITQGRQSGHSSGTRMDVSDEVALQRSHTNSIIAQGNGTLAKEEIGSSTYSFHNLVLTNGMSPPTAQ
	AmTr 00049 236	ESKVESSLQIRDKTNKQDRFQHSSGSEVPQGGQSRPSSGTRIEVSEDITSQRLHNNSIISQGNDALATEDISSTAYSFHNLILPDGMSPPVAQ
	AmTr 00038 90	F MNAGMSSPDSRRYGVFAHGPGNL-SSTPEIAKLDILGGPAHPEATNVLHPS
	AmTr 00039 198	IDUSKLPIWMNLDHGVKENQLSGRTQTSETSVVANVNAVREERLNVQPQVTLDSIRVTDPFSEPGIVMSAGYVNPGQPSINNAQSADPSAALPL-IGNPSVSHEMLNNKAT
	At1o04700 Raf18	VISSPILESSSPRLESKIPDSHRKLPDHEDIKKLSSNFIASSOKSAID000NLEGILKGVL-GTNDEETKPTELSSRDFPGIATLDKAF
	At1o16270 Raf18	DWSLDILIRSHEKFNGUMVFLRDEPM
	At1g79570 Raf20	USH IVNUVE NEW AVAILABLE ARE ARD ST
	At2g35050 Raf24	
	At3g24715_Raf40	
	At3g46920_Raf42	
	At5g57610_Raf35	HMHHP OP NIWONVSNPIAGPPCLP NO INGTVNQTVIRNPIETAPRYSTGMENOGVLVGSPQRISGFDGMSSLGOPSYPNPHLODRAPPLDPNW

図 7 B4 グループの Raf 様キナーゼのアミノ酸のアライメント

(B) アライメントの 703-1404 番目。黄緑色の四角形は抗体の抗原として用いた領域を示

す。

		1.410	1420 143) 1.440	1.450	1.460	1.470	1480 14	90 1.500	1.510	1.520
С	MpPRAF kfl00667_0030 Phpat.009G095700.1 Phpat.015G092300.1 AmTr_00019.236	LDSPLVTSGGM LAEPVPLFRASPP LSVSTAQAQVM LSVSTAQTQVV PSLMDEDLVTLIL	I-LNSSLEGTSFS- QSPTSGVSSGISA I-QPVTTRVTSFTI '-QPMTTRVTSFTI -PPINLS	YYK I KMGDDLPN WTAAL AVSDSP- PLSIKVSTELS- ALSITVSTELS- KIDSNSTGEIG-	AKMPSSKIPSAE HTSTC IPTIPSVS IPTLPSAS MPLEC	EDNL SRSSSSSL GE AADWAATRL A SANTSASVGTS I SANTGTSVGTS I DATEE SCQTKL	.SEL NE DMAAAVL QSPL TE QE ATSMGSLL TE QE ATSMGSLL .VD	SKSGS KAPPL GQPE VTA FKP GP I IPR ISE FNP GS I APR ISE	EDGLGGQLTM AHGSAVVGASKQ TDISGLIGQNAD AAVDGSTGQNVD	DQRTVDMVV MGTGVGERLPV LGRKDNKLF PGRK-GNRF DFSSISTFT	AAL DL D SI APL RIL
	AmTr_00026.90 AmTr_00039.196 At1g04700_Raf16 At1g16270_Raf18 At1g79570_Raf20	VP CGDSSCVNTH DSD I KQDL ANNKY IPRHDL IPEKQTSSGVL IPEE QASL QGD IL	ENPSQEWRVEGPQ -QEENTSSCLLPT ETNSDDSDTQKSLI -IDINDRFPQ -IDINDRFPR	NFTRGAINNVTV- IFPEGIIIPDGF- PRESIHYSGLP- DFLSEIFAKALS- DFLSEIFSQAIS-	PMNC PTTF 	CNSE TVIL DP GL RAGADSEL SSLL 	.GN KT NHD PHD		GKKRD TPVSAFDD LRK	ITAASNLPF RGSMDWPFF VGSRETTFM -GAGVSLNV -GAAVSMNV	GP SGL D AT SGV IH T QG SD /E NH DP K /QNH DR K
	At2g35050_Raf24 At3g24715_Raf40 At3g46920_Raf42 At5g57610_Raf35	KAVP QGHNE KGD I I AANTP NEEPE SF VP TQSPL L GNP GL VP SE NP TV HNE HL 1,530	VVDINDRFPR 	FLADILKTKES- FISKRVVSDEN- -YLQSLVGGQQF- PLLQTNLTAAPI- 1,550 1,56		LNFPGLGPLH 	IAD \YD . AQ 1,590	1,600	VVE STF GGE QF NY 1,610 1,	-GAGVSLNI FLF DAANLPSSL VNTGISNGVPY 320 1.6	QNNDP K S I SSNP-D QDKP QP 30
	MpPRAF k100667_0030 Phpat.005G095700.1 Phpat.015G092300.1 AmTr_00028.90 AmTr_00028.90 AmTr_00039.196 At1g04700_Raf18 At1g04700_Raf18 At1g0570_Raf20 At2g245050_Raf24 At3g24715_Raf40 At3g24920_Raf42	RSGSVV0- EPEWGTPHS-GLH AGHLAE AGHLAE RWDLHGVPVF DGVQRTEVS DFFKS -NWSYFRN NWSYFRN ASSPNS AANLPSSLSSS		KEASL SESVHDH RTQSGAVAGADG EMIVPEPSTNNL DML APPSSNNNL CHL SGSPQL SD- SFMMGLPIEDHM KAEDASL VQSAH KLL GPQL IVEDV AYID	SL GKL GSVVG-S E QQVGAE AAVVV RAE DKGNWLP YS QVE DKGK CL PF S VSRGNL GNL GL 1 QNT VDGHVHVV RKDGGE SS	SVGTQSVWP- /P VSKGP GF VK / SQDTSV 10 SQDTSV 10 SQDTSV 10 SQDTSV 10 FILGL DGGL KDSS /EDVTDKVPS RLP VSS RLP VSS RLP IMDL RL 10 NGC RLP VSS RLP VSS 	LDSAPŤLAAGL HPEEGKVLSPSI SNLCHAPTGASI SNLCHALSFGASI DLMASAKRAALE DLOSSPATVPH SNLSATIVPOV DMEDGGIARL LSRDGISTNLAI SMTNTNGVPID NOPATASET KVILENDLIGIS	WEKKL DE AGMTE OERVI DE ORLPS WUDAVONL TDVNA VUDAVONL TDVNA VUEP WOQSHVKS /LHEE I DDAPV VRE SDDDHK IQVAPL TENRV PQL TL GQDYG /SVPPL DSEKVAS /SLKTPRED	ETFERHITSDGT RSSADKLPASLG EDDDPT KKVDDNPT SCDEYIKQELQA SCDEYIKQELQA GNFSEKDGG SQIHPQIHFDGN EEHIKQELQN	IFEEL TADDHÉ TP SPAPSLASE GTPD I I I QOKD VILD I TGOEED KMEDKANAGN VTEDVTASVLC GTGS IPPALEN IKPDVST	VLAS LPAAPPEQ LDFHSPAI UDLGYSHSLMN SSTSSVPS EEMPYPRI SYTRE POMKVTES IEQMKVTES IEQMKVTES STPSIPH SSTPSYHE
	At5g57610_Raf35 MpPRAF kf100687_0030 Phpat.009G095700.1	L AGGKKD 1,640 1,650 TVDKE NQEE VRTO PSKE AAQAVQHAO AEEEPTIEEPAAE	-MGNL VE VNP SA- 1,660 L DEP ADE DKA APEP QSP AAEE GG AAASNHE DL KKGS	-ATLEGAELSVE- 1.670 ISTGL RAAGVLQQAGGAG SNSGT	1,680 1 SPAGVSLHSEQL	RL SFL PE	L ME SVKRAALE (00 1.710 GOSQLL SE TP SA	GAAE VKAHP 1.720 GS DP AE DAGAGAGP S	1,730 DPAA-K A IAR AAQAEK EA KYA AEDAEA EA IRS	1,740	EEAKDQVR 1,750 IT IKNAD E IF DGD IT IL NAD
	Phpatt015G0922007 AmTr_00019.238 AmTr_00028.90 AmTr_00028.90 At1g04700_Raf16 At1g16270_Raf18 At1g79570_Raf20 At1g26550_Raf24 At1g24715_Raf40 At1g62920_Raf42 At1g567610_Raf25	VEEPTVEPTAK KGSSPHELDPPNF ASVTGMNGSVLDJ SDVGSVSSESDSE KEITNADHESEME EEFGAMVENLRTS EEFGAMVENLRTF PDLNTVDTQEDYS AKITSGDTIFLSE PPIKVDEYAFNSF PELVENESEHMM	IAGAGNHE DL TKGF IP VEP DE OHDNENT ID GE 01 OEL KAOAS DAK I DNRD I DE SI E KYKKSRNTDDSF ID CE QE DE KSE T IO SEP KOEK TE GSO I KGAE STDATI E AEAN TGOKE MSF IGE V SRNDE MKOQS IO DEPE I DSDSDNP	NTGT SNSKI TDAAI EAAM RNAGL NAGV DTLF THF KD HF KD				EC	AEDA EAEMAIRS® IPTNAEAEMALAM® INVKILEKPNP® AEIEMAGIY® VGPSLADYDTS® PLGSEFDYS® IDFMAADSGMRS VEMEMASY® IRNQLLERLNF® OTKAEAEMAKS®®	L AL SDG I DN C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	TTIL NADUG TTIKNDOLE JIIKNSOLE JIIKNADLE JIIKNTOLE JIIKNTOLE JIIKNTOLE TIIKNTOLE JIIKNSOLE SIRNDOLE
	MpPRAF ki00067_030 Phpat.0096095700.1 Phpat.015G092300.1 AmT_00019.238 AmT_00028.90 AmT_00028.90 AmT_00028.90 At1g04700_Raf16 At1g18270_Raf12 At1g79570_Raf20 At1g24715_Raf40 At3g4924715_Raf40 At3g4927610_Raf32	1,760 31 R 34 G 56 G 7 G 1 31 R 34 G 7 G 7 G 1 31 R 34 G 7 G 7 G 7 31 R 34 G 7 G 7 31 R 34 G 7 3	1.770 1.784 MIGWING DVALK MIGWING DVALK	1,750 1,630 a.6 1,6430 a.6 2,6430 a.6 2,6430 a.6 2,6440 a.	1.800 DKTDGNMHSGDI	1.810	1,820 1 KRRONKE VGP SF V	1.840 1.840	0 1.880 ISP VRVPA VV I A ISP VRVPA VV I A 	1,880 DWR EACN GH DWR FAC LSS DWR FAC LSS DWR FAC TSS DWR FAC TSS	1.870 L HHP NVVA L HHP NVVA
	MpPRAF ki00667_0030 Phpat.009G095700.1 Phpat.009G095700.1 Phpat.015G092300.1 AmTr_00019.238 AmTr_00028.90 AmTr_00028.90 AmTr_00028.90 Attg04700_Raft0 Attg0450_Raf20 Attg0450_Raf20 At3g42715_Raf40 At3g4520_Raf22 At5g57610_Raf25	YGVVA DP CGTL YGVVKD-KCPP Q YGVVRDP CGTL YGVVRDP CGTL YGVVRDP DBTL YGVVRDP CGTL YGVVDP CGTL YGVVDP CGTL YGVVDP CGTL YGVVKDP CGTL YGVVKDP CGTL YGVVRDP CGTL YGVVRDP CGTL YGVRDP CGTL YGVRDP CGTL YGVRDP CGTL YGVRDP CGTL YGVRDP CGTL YGVRDP CGTL YGVRDP CGTL		VUOKKORTIDR VUOKKORTIDR VUOKKORTIDR VUOKKORTIDR VUOKKORTIDR VUOKKORTIDR VUOKKORTIDR VUOKKORTIDR VUOKKORTIDR VUOKKORLDR VUVKROBLDR VUVKKOBLDR VUVKKOBLDR VUVKKOBLDR VUVKKOBLDR VUVKKORLDR VUVKKORLDR VUVKKORLDR VUVKKORLDR VUVKKORLDR	KRLL LANDAAF C KRIL LANDAAF C KRLL LANDAAF C KRL LANDAAF C		IF DLKGPILLVN IF DLKGPILLVN	1.20 (3.3 (4.3 (4.3 (4.3 (4.3 (4.3 (4.3 (4.3	2.000 2.015K17KK00C 2.015K734000 2.015K734000 2.015K734000 2.015K734000 2.015K734000 2.015K734000 2.015K73400 2.015K17K000 2.015K17K000 2.015K17K000 2.015K17K000 2.015K730000 2.015K730000 2.015K730000 2.015K730000 2.015K73000000000000000000000000000000000000	SGGVRGTLPW SGGVRGTLPW SGGVRGTLPW SGGVRGTLPW SGGVRGTLPW SGGVRGTLPW SGGVRGTLPW SGGVRGTLPW SGGVRGTLPW SGGVRGTLPW SGGVRGTLPW SGGVRGTLPW	APELLIGI APELLIGS APELLIGS APELLIGS APELLIGS APELLIGS APELLIGS APELLIGS APELLIGS APELLIGS APELLIGS APELLIGS
	MpPRAF ki00067_0030 Phpat.005005700.1 Phpat.0150092300.1 AmT_00028.90 AmT_00028.90 AmT_00028.90 AmT_00028.90 Attg04700_Raft0 Attg0450_Raft2 Attg0450_Raft2 At3g24715_Raf40 At3g4520_Raft2 At3g457610_Raft3	1,990 2,000 SSL UT 3K (0V18) SSL UT 3K (0V18)		2.000 DKM YQALI GGI TANM YQALI GGI	2.050 2.07 VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU VINITERPIPU	40 2,00 COP AURS LIE COP AURS LIE COP EURS LIE COPE URS LIE COPE URS LIE COPE URS LIE COPADURE ME COPADURE LIE COPADURE LIE COPE URK		2.070 SDIAKE IGINAA KHISOOLAKAIYA SBYASE IGWAA AHISOKI BKUSA AHISOKI BKUSA TBYADI BSUA TBUVER IBUSA THITRE ISUSA THITRE ISUSA	2,000 AL OP KTO AOTOG AL SKP GRT AL OP KG NA* AL OP KG NA SL OP KG NA SL OP KG NA SL OP KG NA AL OP KRRT* AAT STO SKP SAH SAVH TKP HAVNH EV VT KS KRRE NK. KL P SKE OGSTOG AMNL K*	2.090 2 QSHP HP QMQ I V A OP QOP R* S DL SG* S SL SG* DI HK* DI HK* Q S*	

図 7 B4 グループの Raf 様キナーゼのアミノ酸のアライメント

(C) アライメントの1405-2098 番目。青色の四角形は光合成依存的なリン酸化が予測された 1248 番目のセリン、黄色の四角形はキナーゼドメインを示す。橙色のアスタリスクはキナ ーゼ失活型変異体の作製に用いた、保存されたアスパラギン酸を示す。

MpPRAF の光合成依存的なリン酸化をさらに検証するために、718-946 番目の MpPRAF 部分タンパク質を抗原として抗体を作製した (図 6B, 図 7B)。抗 MpPRAF 抗体を用いた免 疫ブロットにより、ゼニゴケの全タンパク質抽出液から特異的な 2 本のバンドが検出され た (図 10E 参照)。 トランスクリプトームデータ (Bowman et al., 2017) から、 MpPRAF には コーディング領域に選択的スプライシングを受ける配列が予想されていた (図 8A)。そこで、 第2イントロンを挟むプライマーセット (MpPRAF_cds_F/MpPRAF_GT5_R) で RT-PCR を 行ったところ、スプライシングを受けて短いバリアント1(786b)と、長いバリアント2(489 b) に相当する2本のバンドが検出された (図8B)。2種類のスプライシングバリアントが同 程度発現していることは、免疫ブロットで検出された抗 MpPRAF 抗体特異的な 189 kDa 程 度の2種類のタンパク質が同程度検出されたことと一致している。短いバリアント1から は184 kDa、バリアント2では、PB1 ドメインのN 末端側に99 残基分バリアント1 よりも 長い 195 kDa の分子量のタンパク質が予想される (図 8C)。このバリアント2 特異的な配列 は、PB1 ドメインとキナーゼドメインの中間領域と同様に、シロイヌナズナやヒメツリガネ ゴケと相同性がなかった (図 7A)。後述の Mppraf 変異株に対して選択的スプライシングを 受ける第2イントロンを除いた改変型ゲノム断片を導入した短いバリアント1のみを発現 する株 (MpPRAF^{svl}発現株)を作出し、全タンパク質抽出液を用いて抗 MpPRAF 抗体で免 疫ブロット解析を行ったところ、MpPRAF^{sv1}発現株では1本のバンドのみが検出された (図 8D)。以上の結果から、野生型株においてはスプライシングバリアントに由来する2種類の MpPRAF が存在し、作製した抗 MpPRAF 抗体は両方のバリアントを認識できることが明ら かになった。



図 8 MpPRAF の選択的スプライシング

(A)トランスクリプトームデータに基づく MpPRAF のスプラシングバリアントの模式図。四 角形はエキソンを、横線はイントロンを示す。矢頭は(B)で用いたプライマーセット MpPRAF_cds_F(F)/MpPRAF_GT5_R(R)の位置を示す。(B)MpPRAFの選択的スプライシン グ部位の RT-PCR 解析。レーン1 にサイズマーカーを、レーン2 に RT-PCR 反応液を泳動し た。(C) スプライシングパターンから予測されるタンパク質構造の模式図。(D)抗 MpPRAF 抗体による免疫ブロット解析。Mppraf^{ko}、variant 1 のみを発現する改変型ゲノム断片を導入 した proMpPRAF:MpPRAF^{sv1}-3xFLAG/Mppraf^{ko}株(MpPRAF^{sv1}-FLAG/Mppraf^{ko})、野生型の MpPRAF ゲノム断片を導入した proMpPRAF:MpPRAF-3xFLAG/Mppraf^{ko}、野生型の MpPRAF ゲノム断片を導入した proMpPRAF:MpPRAF-3xFLAG/Mppraf^{ko} 株(MpPRAF-FLAG /Mppraf^{ko})の恒常白色光下で14日間生育させた葉状体からタンパク質を抽出した。 MpPRAF-FLAG 株では黒色と白色の矢頭で示す2本のバンドが検出されたが、MpPRAF^{sv1}-FLAG/Mppraf^{ko}では低分子側の白色の矢頭が示すバンドのみが検出された。抗 Mpphot 抗体 (Komatsu et al., 2014) はローディングコントロールとして用いた。 リン酸化プロテオーム解析と同様の暗処理サンプルと光処理サンプルを用いて、抗 MpPRAF 抗体による免疫ブロット解析を行ったところ、光照射により MpPRAF タンパク質 の SDS-PAGE ゲルでの移動度が低下することが観察された (図 9A)。DCMU 処理条件では、 光照射サンプルと暗処理サンプルで MpPRAF タンパク質の移動度に差がなかった。一方で Mpphot は、DCMU 処理に関わらず青色光照射による移動度の低下が検出されたことから、 DCMU は青色光による Mpphot のリン酸化を妨げないことが明らかになった。また、赤色光 を照射すると、Mpphot の移動度の低下は検出されなかったのに対し、MpPRAF の移動度の 低下は検出され、それは DCMU 処理により阻害された (図 9B)。移動度の低下が MpPRAF のリン酸化を反映しているかどうかを知るために、脱リン酸化処理を行った。抽出タンパク 質を活性のあるアルカリホスファターゼと反応させると、光照射による MpPRAF の移動度 の低下が検出されなくなった (図 9C)。熱処理によって不活性化させたホスファターゼと反 応させたときは、光照射サンプルでの MpPRAF の移動度の低下は残っていた。これらの結 果から、MpPRAF は光質に関係なく、光合成の刺激に応答してリン酸化を受けることが示 された。

次に、MpPRAF のさまざまな光量に対する応答性を調べた。100 µmol photons m⁻² s⁻¹以上 の強度の青色光は 10 分以内に明確な MpPRAF の移動度の低下を引き起こしたが、10 µmol photons m⁻² s⁻¹以下の光量では移動度が変化しなかった (図 9D)。一方で、Mpphot は 10 µmol photons m⁻² s⁻¹の青色光により中間的な移動度の変化を示し、100 µmol photons m⁻² s⁻¹以上の 強さの青色光でより大きい移動度の低下を示した。この結果から MpPRAF の 10 分以内の短 時間でのリン酸化には 100 µmol photons m⁻² s⁻¹程度の強さの光が必要であることが示唆され た。さらに、暗所での MpPRAF のリン酸化状態を調べるために、暗処理後に青色光を照射 した葉状体を暗所に戻し、経時的にサンプリングし免疫ブロット解析を行った。大半の MpPRAF タンパク質の移動度は、暗所に移して 1 時間以内に、光照射していないサンプル の MpPRAF タンパク質と同程度に戻った (図 9E)。この結果から、暗所において MpPRAF は脱リン酸化されることが示唆された。



図9 MpPRAF タンパク質の光によるリン酸化制御

(A) と (B) 抗 MpPRAF 抗体による免疫ブロット解析。Mpphot をローディングコントロー ルと青色光処理の有効性を示すために、抗 Mpphot 抗体を用いて検出した。図 5A のリン酸 化プロテオーム解析と同様に、野生型株を恒常白色光下で7日間生育させ、暗所に移し3日 間おいた。暗処理2日目に一部のサンプルに10 μ M DCMU を与え (+)、残りは未処理のま ま (-)1日培養を続け、青色光 (110 μ mol photons m² s⁻¹)を10または30分間照射し、サン プリングを行った。(B) (A) と同様に生育させた DCMU 処理サンプルと未処理サンプルに 対して、青色光 (BL; 110 μ mol photons m⁻² s⁻¹)または赤色光 (RL; 80 μ mol photons m⁻² s⁻¹)を 10分間照射した。 (C) 脱リン酸化処理の MpPRAF タンパク質への影響。抽出したタンパク 質 (A と同様に生育させ青色光を10分間照射した葉状体)をトリクロロ酢酸沈殿により脱 塩し、活性のある calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)、または熱により不活性化した CIAP と反応後、免疫ブロット解析を行った。(D)異なる光量に対する MpPRAF タンパク質 の応答性。(A) と同様に暗処理した葉状体に対して青色光 (2、5、10、100、800 μ mol photons m⁻² s⁻¹)を10分間照射した。 (E) 暗所での脱リン酸化。(A) と同様に暗処理し、青 色光 (110 μ mol photons m⁻² s⁻¹)を10分間照射した葉状体を暗所に1、2、4または8時間お いた。D は暗処理終了直後のサンプルを示す。

MpPRAF は成長の最適化に寄与する

MpPRAF の生理的な役割を調べるために、MpPRAF 遺伝子の相同組換えによる遺伝子破壊(Ishizaki et al., 2013)により機能欠損株を作出した。MpPRAF 遺伝子の PB1 ドメインをコードしている領域を欠失させ、薬剤耐性遺伝子発現カセットと置き換えるように設計したベクターを導入し、設計通りの組換えを起こした個体 (Mppraf^{ko})を PCR により選抜した(図 10A, B)。しかし、抗 MpPRAF 抗体を用いた免疫ブロット解析により、Mppraf^{ko} 変異株では 100~150 kDa と推定される部分的な MpPRAF タンパク質が翻訳されていることが明らかになった(図 10E)。相同組換えにより欠失させた PB1 ドメインより C 末端側のメチオニンから、抗原に用いた領域(718 番目のセリンから 946 番目のアラニン)とキナーゼドメインを含む部分タンパク質(図 6B,図 7)が翻訳されていることが示唆される。完全な機能欠損株を得るために、ニッカーゼ型 CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集(Hisanaga et al., 2019)により、MpPRAF 遺伝子座全域が欠損している変異体を作出した(図 10C, D)。翻訳開始メチオニンコドンの上流約5 kb から転写終結点の下流約1 kb までの領域を欠失させるようにガイド RNA (gRNA)を設計し、形質転換体ゲノム由来断片のダイレクトシーケンスにより遺伝子座の大規模欠損を起こした個体(Mppraf^{ld})を選抜した。Mppraf^{ld} 変異株では抗 MpPRAF 抗体による免疫ブロット解析においてバンドが検出されなかった(図 10E)。







図 10 Mppraf 変異株の作出

(A) Mppraf^{ko}変異株を作出するための相同組換えによる遺伝子破壊の模式図。黒色の四角形 はエキソンを、紫色の四角形は選択的スプライシングサイトを、黒色の横線はイントロンあ るいは非転写領域を、矢印は組換えを確認するために(B)で用いたプライマーセットの位 置を示す。Mppraf^{ko}変異株では選抜のために hygromycin phosphotransferase (*hpt*)遺伝子が MpELONGATION FACTOR1 ALPHA のプロモーター (*pro*MpEF)制御下で発現する。(B) Mppraf^{ko} 変異株の遺伝子型判定。(C) Mppraf^{ld} 変異株を作出するためのニッカーゼ型 CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集による大規模遺伝子欠損の模式図。矢印は gRNA の標的 配列の位置を示す。(D) (C)に示す MpPRAF 遺伝子の標的配列周辺のシーケンス解析結果。 gRNA 標的配列に下線を引き、PAM 配列を太字で示した。Mppraf^{ld} 変異株において欠損し ている塩基対数と置換している塩基対数を下部に示す。(E)抗 MpPRAF 抗体による免疫ブ ロット解析。恒常自色光下で7日間生育させた野生型株、Mppraf^{ko}変異株、Mppraf^{ld}変異株 を用いた。Mpphot をローディングコントロールとして抗 Mpphot 抗体により検出した。 MpPRAF 遺伝子の変異の影響を調べるために、恒常白色光 50-60 µmol photons m⁻²s⁻¹、22°C、 糖を含まない 1/2Gamborg's B5 培地上で成長を比較したところ、Mppraf^{ko}変異株と Mppraf^{ld} 変異株の両方とも野生型株に比べて成長が遅かった (図 11A, B)。変異株に対して MpPRAF 遺伝子を含むゲノム断片、または短いスプライシングバリアント (MpPRAF^{svl})のみを発現 する改変型ゲノム断片を導入すると MpPRAF タンパク質の発現が確認され (図 8D)、成長 速度が回復した(図 11)。この結果から、成長遅延の原因が MpPRAF 遺伝子の変異であるこ とが確認できた。また、Mppraf^{ko}株で発現している PB1 ドメインより C 末端側の部分長 MpPRAF タンパク質は機能的でないことが明らかになった。Mppraf^{ld}株に比べて Mppraf^{ko} 株の成長速度の回復が遅い原因は、相補遺伝子の不十分な発現、部分長の MpPRAF タンパ ク質による野生型 MpPRAF タンパク質機能の優性阻害、Mppraf^{ld}変異株と Mppraf^{ko}変異株 の遺伝的背景の違い、など複数考えられた。

次に、様々な光量の恒常白色光下、22°C、糖を含まない 1/2Gamborg's B5 培地上で野生型 株と Mppraf^{1d}変異株を生育させ成長を比較した。80 µmol photons m⁻² s⁻¹ までは光量の上昇に 伴い野生型株と Mppraf^{1d}変異株の生鮮重の差が大きくなったが、600 µmol photons m⁻² s⁻¹ で は 80 µmol photons m⁻² s⁻¹ に比べ差が小さくなった (図 12)。野生型株の生鮮重は 40 µmol photons m⁻² s⁻¹ の光量で育てたときに比べて 80 µmol photons m⁻² s⁻¹ のとき 2.5 倍程度に増加し ていたが、より強い 600 µmol photons m⁻² s⁻¹ で育てると 80 µmol photons m⁻² s⁻¹ のときと同程 度だった。ゼニゴケのクロロフィル量とカロテノイド量が低光量 (67.1 µmol photons m⁻² s⁻¹) に比べて高光量 (226 µmol photons m⁻² s⁻¹) で減少するという報告 (Soriano et al., 2019) と一 致して、強光によって光阻害が起こっていることが示唆された。一方で、Mpprafrd変異株は 600 µmol photons m⁻² s⁻¹ で生育させるとばらつきが大きいものの生鮮重が増加し、80 µmol photons m⁻² s⁻¹ で生育させたときには存在しなかった無性生殖器官の無性芽が生育 14 日目で 形成されていた (図 12A)。これらの結果から MpPRAF タンパク質は成長の調節に重要な働 きをすることが示された。

27



図 11 Mppraf 変異による成長遅延

(A)と(C) 恒常白色光下で14日間生育させた葉状体の写真。野生型株(WT)、Mppraf^{ko}変異株、proMpPRAF:MpPRAF-3xFLAG/Mppraf^{ko}株(MpPRAF-FLAG/Mppraf^{ko})、Mppraf^{ld}変異株、proMpPRAF:MpPRAF-3xFLAG/Mppraf^{ld}株(MpPRAF-FLAG/Mppraf^{ld})、proMpPRAF:MpPRAF^{sv1}-3xFLAG/Mppraf^{ko}株(MpPRAF^{sv1}-FLAG/Mppraf^{ko})を示す。バーは1cmを示す。(B)と(D) 生鮮重。バーは5個体の平均値を示す。



図 12 野生型株と Mppraf^{ld} 変異株の成長への光量の影響

(A) 野生型株 (WT)、Mppraf^{ld}変異株、proMpPRAF:MpPRAF-3xFLAG/Mppraf^{ld}株 (MpPRAF-FLAG/Mppraf^{ld})の写真。恒常白色光下で 14 日間生育させた。バーは 1 cm を示す。(B) 生鮮重。バーは 5 個体の平均値を示す。

29

MpPRAF の欠損によるデンプンの高蓄積とスクロース濃度の低下

SPS、細胞質局在 AGPase、PGM などの糖代謝の重要な酵素のいくつかは明暗によってリン酸化レベルが影響を受けることが報告されている (Boex-Fontvieille et al., 2014; Abadie et al., 2016)。本研究で行ったリン酸化プロテオーム解析においても、上記の酵素由来のリン酸化ペプチドが検出された。そこで、デンプン、スクロース、グルコース、フルクトースといった炭素代謝物の定量を行った (図 13)。恒常白色光下で 15 日間生育させた葉状体において、Mppraf 変異株は野生型株に比べてデンプンが高蓄積していた。反対に、スクロース濃度は野生型株に比べて有意に低下していた。グルコース濃度は野生型株と Mppraf 変異株で

ヨウ素によるデンプン染色を行ったところ、デンプンの定量結果と一致して、野生型株で は染色は見られなかった一方、Mppraf 変異株では強い染色が見られ、特にメリステムの外 側のよく発達した光合成組織を持つ領域でデンプンの蓄積が示された (図 14A)。様々な光 量で育てたところ、Mppraf^{td}変異株では 10 µmol photons m⁻² s⁻¹の光量においてもデンプンの 染色がみられた (図 14B)。Mppraf 変異株におけるデンプン蓄積の表現型は、MpPRAF ゲノ ム断片または MpPRAF^{svl} 改変型ゲノム断片の導入により回復した (図 14A)。透過型電子顕 微鏡 (TEM) 観察を行ったところ、野生型株や相補株の葉緑体にはデンプン粒がまったく見 られないか小さなデンプン粒が形成されている一方で、Mppraf^{td}変異株の葉緑体には野生型 株に比べて大きなデンプン粒が複数形成されていることが観察された (図 14C)。これらの 結果から MpPRAF は炭素のデンプンとスクロースへの分配に重要な役割を果たすことが示 唆された。



図 13 Mppraf 変異株におけるデンプンとスクロースの不均衡

デンプン、スクロース、フルクトース、グルコースの定量結果。恒常白色光下で15日間生 育させた野生型株 (WT)、Mppraf^{ko}変異株、Mppraf^{ld}変異株を用いた。丸は中央値を示す。 バーは生物学的3連 (野生型株のスクロース、フルクトース、グルコースは2連)の値の範 囲を示す。バーの上の記号はTukey-Kramer 検定において P < 0.05 で有意差のあるグループ を示す。



В



С

Mp*praf*^{Id}

MpPRAF-FLAG /Mppraf^{id}



図 14 Mppraf 変異株におけるデンプンの高蓄積

(A) 恒常白色光下 (50-60 µmol photons m⁻² s⁻¹) で 14 日間生育させた葉状体のヨウ素染色像。 野生型株 (WT)、Mppraf^{ko} 変異株、 $_{pro}$ MpPRAF:MpPRAF-3xFLAG/Mppraf^{ko} 株 (MpPRAF-FLAG/Mppraf^{ko})、 $_{pro}$ MpPRAF:MpPRAF: $_{3xFLAG}$ /Mppraf^{ko} 株 (MpPRAF- $_{5xl}$ -G/Mppraf^{ko})、 Mppraf^{ld} 変異株、 $_{pro}$ MpPRAF:MpPRAF- $_{3xFLAG}$ /Mppraf^{ld} 株 (MpPRAF-FLAG/Mppraf^{ld}) を用 いた。矢頭はメリステムを示す。バーは 1 cm を示す。(B) 様々な光量 (10、20、40、80 µmol photons m⁻² s⁻¹) の恒常白色光下で 14 日間生育させた葉状体のヨウ素染色像。バーは 1 cm を 示す。(C) (A) と同様に生育させた葉状体の同化糸内の葉緑体の透過型電子顕微鏡画像。s は デンプン粒を示す。Mppraf^{ld} 変異株は 1 個のデンプン粒を代表として示す。上段のバーは 5 µm、下段のバーは 1 µm を示す。

MpPRAF はスクロース代謝を介して成長調節に関与する

Mppraf 変異株におけるデンプンの異常蓄積が成長遅延の原因であるかどうかを調べるために、Mppraf^{ko}変異株においてデンプン合成阻害を引き起こし、その影響を調べた。まず、シロイヌナズナでデンプン合成に重要なことが知られている葉緑体局在型 PGM (Caspar et al., 1985)のオルソログを Mppraf^{ko}変異株背景で破壊することにした。ゼニゴケのゲノムデータベースに対してシロイヌナズナの AtPGM1の配列を用いて BLAST 検索を行い、相同性が高い配列として葉緑体輸送ペプチドを含む Mapoly0202s0014.1と葉緑体輸送ペプチドを含まない Mapoly0048s0016.1の2分子種を発見した。葉緑体輸送ペプチドを保持する Mapoly0202s0014 を MpPGM1、他方の Mapoly0048s0016 を MpPGM2 と名付けた (図 15)。CRISPR/Cas9 システムに基づくゲノム編集 (Sugano and Nishihama 2018; Sugano et al., 2018) により MpPGM1の変異株を得るために、酵素活性に重要な保存された金属結合部位と触媒反応中心 (Periappuram et al., 2000)に gRNA 標的配列を設計した (図 15)。得られた形質転換体由来のゲノム断片のダイレクトシーケンスにより、Mppraf^{ko} 変異株背景と野生型株背景の双方で MpPGM1 遺伝子にフレームシフト変異が生じた系統を複数確立した (図 16)。



図 15 ゼニゴケとシロイヌナズナの PGM アミノ酸配列のアライメント

3 分子種で同一のアミノ酸は黒色で、2 分子種で同一のアミノ酸は灰色で強調している。下 線部は ChloroP によって予想された葉緑体輸送ペプチドを示す。黄色い枠は触媒活性中心 を、緑色の枠は金属結合部位 (Periappuram et al., 2000) を示す。

WT	5'-cgagccaca ~ <u>ctttggagcagccagtga</u> cgg-3'
Mp <i>pgm1</i> ^{ge} #1	5'-CTCA ~TGACGG-3' 1,838-bp deletion and 3-bp substitutions
WT	5'- <u>ctttggagcagccagtga</u> cgg-3'
Mppgm1 ^{ge} #2	5'-CTTTGGAGCAGCCAGACGG-3' 2-bp deletion
WT	5'- <u>ctttggagcagccagtga</u> cgg ~ atgttatg-3'
Mp <i>praf^{ko}Mppgm1^{ge}#</i> 1	5'-CTTTGGAGCAGCCAG ~ATG-3' 95-bp deletion
WT	5'- <u>ctttggagcagccagtga</u> cgg-3'
Mp <i>praf^{ko} Mppgm1^{ge}#</i> 2	5'-CTTTGGAGCAGCCAGTAAGACGG-3' 2-bp insertion
WT	5'- <u>ggtggaccaaagtacgac</u> tgg-3 '
Mp <i>praf^{ko}Mppgm1^{ge}#</i> 3	5'-GGTGGACCAAAGTACTGGGTTCC~GTGGACCTGACTGG-3' 31-bp insertion

図 16 Mppgm1^{ge}変異株の作出

MpPGM1 遺伝子座のシーケンス結果。gRNA 標的配列に下線を引き、PAM 配列を太字で示す。変異の詳細は右側に示す。

期待していたように、MpPGM1 遺伝子の変異は Mppraf^{ko} 変異株のデンプンの高蓄積を抑 圧した (図 17A, B)。この結果から、Mppraf^{ko} 変異株のデンプンの合成は MpPGM1 を介して いることが明らかになった。しかし、Mppraf^{ko} 変異株の成長遅延は、Mppgm1 変異によって は抑圧されなかった (図 17C, D)。そのため、Mppraf 変異株の成長が遅い主要な原因は、デ ンプンの過剰蓄積以外にあることが示唆された。



図 17 Mppraf 変異株の表現型への Mppgm1 変異の影響

(A), (B)ヨウ素染色像。恒常白色光下で 14 日間生育させた野生型株 (WT)、Mppgm1^{ge} 変異株、Mppraf^{ko}変異株、Mppraf^{ko}Mppgm1^{ge}二重変異株を用いた。バーは 1 cm を示す。(C), (D) 生鮮重を図示した。バーは 5 個体の平均値を示す。(C) では 1%スクロース含有 (+) または 非含有 (-) の培地上、恒常白色光下で 14 日間生育させた。丸の上部の記号は Tukey-Kramer 検定において P<0.05 で有意差のあるグループを示す。(C) 以外はスクロース非含有培地で 生育させた。(A), (C) では MpPGM1 の金属結合部位の gRNA 標的配列を、(B), (D) では触 媒反応中心の gRNA 標的配列をそれぞれ利用して作出した変異株を用いた。 Mppraf 変異株ではデンプンの高蓄積の表現型の他にスクロースとフルクトース濃度の低 下がみられていたため、Mppraf^{ko} Mppgm1^{ge}二重変異株でも炭水化物の定量を行った (図 18)。 Mppraf^{ko} Mppgm1^{ge}二重変異株はそれぞれの単変異株と同様に、野生型株と同程度のグルコ ース濃度を示した。興味深いことに、Mppraf^{ko} Mppgm1^{ge}二重変異株でも Mppraf^{ko} 変異株と 同様にスクロース濃度が低下していた。一方で Mppraf^{ko} Mppgm1^{ge} 二重変異株のフルクト ース濃度は、野生型株と同程度であった。つまり、Mppraf 変異株においてはデンプン合成 を阻害してもスクロース濃度は回復しなかった。

次に、Mppraf 変異株の表現型がスクロース不足に起因するか調べるために、1%スクロー ス添加培地でMppraf 変異株を生育させた。スクロースの外部添加により、野生型株とMppraf 変異株のどちらも生鮮重の増加が見られた。しかし、Mppraf 変異株の生鮮重は野生型株レ ベルには回復しなかった (図 17C, 19A)。Mppraf 変異株における生鮮重増加は、MpPRAF の 機能とは関係なくスクロース添加が生育を増強した効果によることが考えられた。また炭 水化物定量を行ったところ、スクロース添加条件で野生型株においては内在性のスクロー ス濃度が上昇したが、Mppraf 変異株では変化せず、かつスクロース不含培地上の野生型株 より低かった (図 19B)。野生型株と Mppraf 変異株ともに、スクロースの添加でデンプンの 濃度は変化しなかったが、グルコースとフルクトースの濃度は上昇した (図 19B)。これら の結果から、Mppraf 変異体におけるスクロースの生成または蓄積の不全が、成長遅延と関 係していることが示唆された。



図 18 Mppraf^{ko} Mppgm1^{ge} 二重変異株での糖の定量

野生型株 (WT)、Mppgm1^{ge}変異株、Mppraf^{ko}変異株、Mppraf^{ko}Mppgm1^{ge}二重変異株を恒常 白色光下で14日間生育させ、スクロース、グルコース、フルクトースの定量を行った。丸 は中央値を示す。バーは生物学的3連 (Mppraf^{ko}Mppgm1^{ge}#1のスクロースのみ2連)の値 の範囲を示す。バーの上部の記号はTukey-Kramer 検定においてP<0.05で有意差のあるグ ループを示す。左側のグラフはMpPGM1の金属結合部位のgRNA 標的配列を、右側のグラ フは触媒反応中心のgRNA 標的配列を利用して作出した変異株の結果を示す。左右のグラ フはそれぞれ異なる日に生育させた植物体を用いて、同様の手法で定量を行った。





(A) 1%スクロース含有(+)または非含有(-)の培地で、恒常白色光下で15日間生育させた野生型株(WT)、Mppraf^{ko}変異株、Mppraf^{dd}変異株の生鮮重。バーは5個体の平均値を示す。
(B)デンプン、スクロース、グルコース、フルクトースの定量結果。丸は中央値を示す。バーは生物学的3連の値の範囲を示す。バーの上部の記号はTukey-Kramer検定においてP<0.05で有意差のあるグループを示す。

MpPRAF 欠損による葉緑体電子伝達の異常

炭水化物代謝の異常が光合成の電子伝達に負の影響を与えることが報告されていたため (Schmitz et al., 2012)、クロロフィル蛍光測定により光化学系 II のパラメーターを測定した。 本研究におけるゼニゴケの基本的な生育環境 (恒常白色光 50-60 µmol photons m⁻² s⁻¹、22°C、 糖を含まない 1/2Gamborg's B5) での野生型株と Mppraf^{ko} 変異株の光合成最大量子収率 Fv/Fm には有意差は認められなかった (図 20A)。しかし、電子伝達速度 (ETR; Genty et al., 1989) は Mppraf^{ko} 変異株で有意に低下していた (図 20B)。野生型株では~400 µmol photons m⁻² s⁻¹程度の光量まで光量依存的に ETR が増加したのに対し、Mppraf^{ko} 変異株では~200 µmol photons m⁻² s⁻¹程度の野生型株よりも低いレベルで飽和していた。野生型株と Mppraf^{ko} 変異株の光化学系 II からの熱放散の指標である非光化学的消光 (NPQ; Bilger and Björkman, 1990) には有意差がなかった (図 20C)。一方で、プラストキノンプールの還元状態の指標で ある 1-qL (Miyake et al., 2009) が Mppraf^{ko} 変異株で 8 µmol photons m⁻² s⁻¹照射後は低下して いたが、91 µmol photons m⁻² s⁻¹以上では上昇していた (図 20D)。これらの結果から Mppraf 変異が電子伝達に負の影響を与えることが示唆された。

Mppraf^{ko} 変異株での光化学系 II の異常が、Mppgm1 変異によるデンプンの合成阻害によってさらに悪化した。Mppgm1 変異のみでは Fv/Fm に影響を与えないが、Mppraf 変異と Mppgm1 変異の組み合わせにより Fv/Fm が低下したことから (図 20A)、Mppraf^{ko} Mppgm1^{se} 二重変異株では本研究の生育条件において光化学系 II が光阻害を受けていることが示唆さ れた。さらに、Mppraf^{ko} Mppgm1^{se} 二重変異株の ETR はそれぞれの単変異株よりも低く、ま た~200 µmol photons m⁻² s⁻¹程度の Mppraf^{ko} 変異株より低い光量で飽和し、より強光下で低 下した (図 20B)。Fv/Fm と ETR に対する Mppraf 変異と Mppgm1 変異の合成的な影響がみ られたことから、Mppraf^{ko} 変異株の電子伝達の低下は、光合成産物の糖代謝異常により引き 起こされた電子伝達への二次的な影響と考えられる。二重変異株の NPQ は 91 µmol photons m⁻² s⁻¹では野生型株に比べて低下していた (図 20C)。本研究の基本的な光環境である恒常自 色光 50-60 µmol photons m⁻² s⁻¹において二重変異株は熱放散も抑制されている可能性がある。 また、1-qL に関しては Mppgm1 ^{ge} 変異株が 166 µmol photons m⁻² s⁻¹以上では上昇していた (図 20D)。Mppraf^{ko} 変異株の 1-qL の上昇の表現 型が部分的に二重変異株で抑圧されており、二重変異株の光阻害による光化学系 II の活性 低下が原因と考えられる。



図 20 MpPRAF 欠損による光化学系 II の電子伝達の低下

(A) Fv/Fm と (B) 電子伝達速度 (ETR)、 (C) 非光化学的消光 (NPQ)、 (D) 1-qL。野生型株 (WT)、Mppraf^{ko}変異株、Mppgm1^{ge}変異株、Mppraf^{ko} Mppgm1^{ge}二重変異株を恒常白色光下 で 14 日間生育させ、30 分間以上暗所に順化させた後、クロロフィル蛍光を測定した。生物 学的 3 連の平均値を図示した。バーは標準偏差を示す。バーの上部の記号は各光量で野生型 株と変異株を比較した Tukey-Kramer 検定において P<0.05 で有意差のあるグループを示す。

MpPRAFの機能に対する 1248 番目のセリンのリン酸化の意義

本研究のリン酸化プロテオーム解析において、MpPRAFのセリン-1248の光合成依存的な リン酸化が検出された。そのリン酸化の生理的な意義を調べるため、セリン-1248と、それ に隣接するセリン-1246をアラニンに置換した (S1246AS1248A) 変異型 MpPRAF 遺伝子を 用いた相補性試験を行った。Mppraf^{ko}変異株に S1246AS1248A 変異型を導入したところ、 変異株のデンプンの高蓄積の表現型が相補された (図 21A)。この結果から、セリン-1248の リン酸化は、デンプンの代謝に関係する MpPRAF の機能への寄与は小さいことが示唆され た。

また、光合成依存的なリン酸化状態を調べるために、暗処理したサンプルと光照射したサンプルで免疫ブロット解析を行ったところ、MpPRAF^{S1246AS1248A}タンパク質の移動度の低下が光照射によって誘導された (図 21B)。この結果から、MpPRAF はセリン-1248 (とセリン-1246) 以外にも光合成依存的なリン酸化部位を持っていることが示唆された。



図 21 リン酸化部位の変異型 MpPRAF の相補性試験

(A) 恒常白色光下で 14 日間生育させた野生型株 (WT)、*pro*Mp*PRAF*:Mp*PRAF*-3*xFLAG*/Mp*praf^{ko}*株 (Mp*PRAF*-FLAG/Mp*praf^{ko}*)、*pro*Mp*PRAF*:Mp*PRAF*^{S1246AS1248A}-3*xFLAG*/Mp*praf^{ko}*非 リン酸化型発現株 (Mp*PRAF*^{S1246AS1248A}-FLAG/Mp*praf^{ko}*)、Mp*praf^{ko}*変異株のヨウ素染色像。 バーは 1 cm を示す。(B) 免疫ブロット解析。図に示す植物体を恒常白色光下で 7 日間生育 させ、3 日間暗所におき、青色光 (110 µmol photons m⁻² s⁻¹) を 10 分間照射した。

MpPRAF の機能に対するキナーゼ活性の必要性

MpPRAF の分子機能について明らかにするために、キナーゼ活性の重要性について調べた。キナーゼ失活型変異としてよく用いられる (Hanka and Hunter, 1995; Porceddu et al., 2011; Komatsu et al., 2014)、1540 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換した(D1540N) 変異型 MpPRAF を Mppraf^{ko}変異株に導入した。キナーゼ失活型 MpPRAF^{D1540N} は、Mppraf^{ko}変 異株の成長遅延とデンプン高蓄積の表現型を相補できなかった (図 22A, B)。これらの結果から、MpPRAF は正銘の触媒活性のあるキナーゼとして生体内で働いていることが示唆された。

さらに、MpPRAF^{D1540N} タンパク質が光合成依存的なリン酸化制御を受けるのか調べたところ、MpPRAF^{D1540N} は光照射による移動度の低下を示さなかった (図 22C)。この結果から、 MpPRAF 自身のキナーゼ活性が光合成に誘導される MpPRAF のリン酸化に必要であること が示唆された。



図 22 MpPRAFの機能におけるキナーゼ活性の重要性

(A) 恒常白色光下で14日間生育させた野生型株(WT)、Mppraf^{ko}変異株、proMpPRAF:
MpPRAF-3xFLAG/Mppraf^{ko}株(MpPRAF-FLAG/Mppraf^{ko})、proMpPRAF:Mppraf^{D1540N}-3xFLAG
/Mppraf^{ko}キナーゼ失活型発現株(MpPRAF^{D1540N}-FLAG/Mppraf^{ko})の生鮮重。バーは5個体の平均値を示す。(B) ヨウ素染色像。バーは1cmを示す。(C) 抗 MpPRAF 抗体を用いた免疫ブロット。恒常白色光下で7日間生育させ、3日間暗所においた植物体に青色光(110 µmol photons m⁻² s⁻¹)を10分間照射した。抗 Mpphot 抗体 (Komatsu et al., 2014) はローディングコントロールと青色光照射を示すために用いた。

考察

MpPRAFのリン酸化制御について

本研究において、リン酸化プロテオーム解析により、光照射に応答してリン酸化が誘導さ れる Raf 様キナーゼの MpPRAF を同定した。免疫ブロット解析から、青色光と赤色光のど ちらの照射によっても MpPRAF のリン酸化が引き起こされるが、光合成阻害剤処理によっ てリン酸化が阻害されることが明らかになった。これらの結果から、光合成の刺激が MpPRAF のリン酸化の引き金となっていることが示された。短時間の光照射では、弱光に は応答せず、80 µmol photons m⁻² s⁻¹以上の強光により MpPRAF がリン酸化されたため、光 合成活性と MpPRAF のリン酸化レベルには比例的な関係があるかもしれない。また、光を 照射して MpPRAF をリン酸化した後、暗所に植物体を置くと MpPRAF が脱リン酸化された ことから、MpPRAF が可逆的なリン酸化制御を受けることが示唆された。以上のことから、 MpPRAF のリン酸化と脱リン酸化が、昼夜に対応している可能性がある。MpPRAF のリン 酸化を引き起こす刺激は、本研究で用いた DCMU の作用点であるプラストキノンの光化学 系 II への結合より下流の電子伝達の過程か、光合成産物に由来すると考えられる。シロイ ヌナズナにおいて2つの光化学系間の励起バランス調整に重要なSTN7は、低光量 (20 μmol photons m⁻² s⁻¹) ではリン酸化されて活性化されるが、高光量 (1,000 μmol photons m⁻² s⁻¹) で は脱リン酸化されて分解される (Trotta et al., 2016)。ゼニゴケにおける STN7 ホモログ (MpSTN7) がシロイヌナズナ STN7 と同様な光感受性を持っているならば、10 µmol photons m⁻² s⁻¹の低光量より 800 μmol photons m⁻² s⁻¹の高光量のほうが強く誘導された MpPRAF のリ ン酸化は、MpSTN7 には依存しないことが予想される。今後、MpPRAF のリン酸化を引き 起こす直接の刺激を明らかにすることが、MpPRAFの制御を考える上で重要である。

リン酸化プロテオーム解析において光合成依存的なリン酸化が予測されたセリン-1248と 近傍のセリン-1246をアラニンに置換した MpPRAF^{S1246AS1248A}も、光照射によるリン酸化が 誘導された。セリン-1246とセリン-1248以外の残基も光合成の刺激によるリン酸化制御を 受けていることが示唆された。一方で、よく用いられるキナーゼ失活型の変異を加えた MpPRAF^{D1540N}は、光照射によるリン酸化が誘導されなかった。キナーゼ活性が MpPRAF 自 体のリン酸化に必要であると示唆された。本研究で観察された光照射による MpPRAF のリ ン酸化は、自己リン酸化か MpPRAF によって活性化された下流のキナーゼによるフィード バックのリン酸化の可能性が高い。複数のリン酸化が知られている Atphot1 についてはキナ ーゼドメインの活性化ループ内のセリンのリン酸化がシグナル伝達に重要なことが報告さ れている (Inoue et al., 2008)。MpPRAF には活性化ループ内に2 個のセリン残基と2 個のス レオニン残基が存在しており、これらはリン酸化による活性制御の候補である。本研究にお いて光合成からの刺激を受けて MpPRAF がリン酸化されることが明らかになったが、 MpPRAF の光合成依存的なリン酸化を受ける 1248 番目のセリン以外の残基と、MpPRAF の リン酸化状態とキナーゼ活性の相関を調べることが今後の課題である。

<u>MpPRAF</u>による糖代謝制御

Mppraf 変異株は多面的に、成長遅延、デンプンの蓄積、スクロース濃度の低下、光合成 電子伝達の低下を示した (図 23)。野生型 MpPRAF ゲノム断片の導入により、成長と適切な デンプン蓄積が回復したが、キナーゼ失活型 MpPRAF ^{D1540N} ゲノム断片を導入しても表現型 は相補されなかった。そのため、MpPRAF は生体内でプロテインキナーゼとして機能して いることが示唆された。

変異体の表現型のうち、MpPRAF が一次的に制御しているのはどの反応なのだろうか。 定量とヨウ素染色、TEM を用いた観察から Mppraf 変異株におけるデンプンの高蓄積が示 された。デンプン合成が不能な Mppraf Mppgm1 二重変異株も成長遅延を示したため、Mppraf 変異株の成長遅延の主要因はデンプンの蓄積ではないことが示唆された。興味深いことに、 Mppraf Mppgm1 二重変異株の内生スクロース濃度も、Mppraf 変異株と同様低下したままで あった。そのため、MpPRAF は一次的にスクロース代謝の制御に必要で、Mppraf 変異株の デンプンの高蓄積はスクロース代謝の異常の二次的な影響の可能性が高い。これに合致し て、シロイヌナズナの4分子種のSPSの欠損によってスクロース生合成が著しく阻害され ると、デンプンの高蓄積と成長異常がみられることが報告されている (Bahaji et al., 2015)。 また、スクロース生合成に重要な細胞質局在の F1,6BPase の antisense による変異体 (antifbp) は野生型株と比べて昼の終わりのスクロース量が低下し、デンプンが高蓄積している (Strand et al., 2000)。ガス交換測定による光合成速度が、高光量かつ高 CO2 濃度の場合に野 生型株よりも anti-fbp 株で低下していた (Strand et al., 2000)。F1,6BPase の活性が低いと、糖 リン酸が増加して無機リン酸の循環が滞るため、ATP 合成に必要な葉緑体内の無機リン酸 が不足し、光合成の律速となる (Sharkey, 1985; Stitt, 1990)。Mppraf 変異株においてもスクロ ース生合成の途中の糖リン酸が蓄積し、葉緑体のリン酸が律速となって電子伝達を抑制し ている可能性がある。

スクロースを外部添加しても、Mppraf 変異株の成長の遅延や内生スクロース濃度の低下 の表現型を抑圧できなかった。一方で、シロイヌナズナの細胞質ゾルの炭水化物が不足する TRIOSE PHOSPHATE/PHOSPHATE TRANSLOCATOR (TPT) と ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 1 (ADG1) の二重変異株 (Attpt adg1) の成長の遅い表現型と電子伝 達の低下は、スクロースまたはグルコースの外部添加によって抑圧される (Hattenbach et al., 1997; Schneider et al., 2002; Häusler et al., 2009; Schmitz et al., 2012)。この外部添加したスクロ ースに対する Mppraf 変異株と Attpt adg1 二重変異株の応答の違いは、Mppraf 変異株の表現 型が単にスクロース生合成の障害によって生じているわけではないことを意味しているか もしれない。デンプンが合成できない Mppraf Mppgm1 二重変異株は、Mppraf 変異株と異な り野生型株並みにまでフルクトース量が回復したことから、Mppraf 変異株はスクロースを 蓄積することができないが、フルクトースを合成することができることが明らかになった。 また、Mppraf 変異株にスクロースを添加するとフルクトースとグルコースが増加するが、 スクロースの減少は解消されないことから、Mppraf 変異株に添加したスクロースがフルク トースとグルコースに代謝された可能性が示唆される。以上から、MpPRAF はスクロース の合成の促進と、スクロースの異化の抑制の両方を制御している可能性がある。Mppraf 変 異株におけるスクロース生合成酵素と分解酵素の活性を測定することで、より詳細に MpPRAF の機能に迫ることができる。シロイヌナズナにおいて SPS や F1,6BPase を阻害す る炭素分配の制御物質である Fru2,6BP の分解と合成活性を併せ持つ F2,6BPase/F6P,2K (Stitt, 1990)、スクロースを分解するインベルターゼのリン酸化が明暗で変動することが報告され ている (Boex-Fontvieille et al., 2014)。MpPRAF は葉緑体移行シグナルや膜貫通領域をもたな いことから細胞質局在が予想される。細胞質局在のスクロース代謝酵素はキナーゼである MpPRAF の基質候補でもある (図 24)。基質の同定が MpPRAF のかかわるシグナル経路を 明らかにするために今後の大きな課題である。



図 23 表現型のまとめ

野生型株 (WT)、Mppraf 変異株、Mppgml 変異株、Mppraf Mppgml 二重変異株の恒常白色 光条件で解析した表現型の比較。



図 24 MpPRAF と糖代謝のモデル図

MpPRAF ホモログの機能について

MpPRAF はゼニゴケでは唯一、B4 グループの Raf 様キナーゼに属している (Bowman et al., 2017)。シロイヌナズナには7分子種のB4グループのRaf様キナーゼが存在し、HCR1 (At3g24715) は低酸素応答の制御転写因子 RAP2.12 をリン酸化して安定化することにより、 低酸素応答と根の吸水を制御することが示されている (Shahzad et al., 2016)。また、 At1g16270 は浸透圧ストレスに応答して (Stecker et al., 2014)、At1g79570 は TOR に制御され る形でスクロース添加により (Van Leene et al., 2019)、リン酸化状態が変わることがリン酸 化プロテオーム解析において示されている。別のリン酸化プロテオーム解析から、シロイヌ ナズナの B4 グループの Raf 様キナーゼ7分子種のうち6分子種が高浸透圧により、リン酸 化レベルが上がることが報告された (Lin et al., 2020)。七重変異体の解析や in vitro リン酸化 実験から B4 グループの Raf 様キナーゼが SnRK2.1/4/5/9/10 のリン酸化と活性化を引き起こ し、浸透圧ストレス応答に重要であることが示された (Lin et al., 2020)。本研究から、MpPRAF と同様な機能をもつB4 グループのRaf様キナーゼが維管束植物に存在する可能性が考えら れる。 シロイヌナズナの B4 グループの Raf 様キナーゼの七重変異体は成長が異常になるこ とが報告されており (Lin et al., 2020)、浸透圧応答が異常になっている以外にも矮小化して いる原因があるかもしれない。また、MpPRAF が低酸素や浸透圧ストレスなど他の刺激に も応答する可能性がある。ゼニゴケと他の植物でさらに研究を進めれば、B4 グループの Raf 様キナーゼ間の保存性と多様性が明らかになると期待される。

材料と方法

使用した植物体と培養条件

野生型株として Takaragaike-1 (Tak-1) (Okada et al., 2000; Ishizaki et al., 2008) を用いた。形 質転換には Takaragaike-2 (Tak-2) と Tak-1 を交配した F1 胞子を用いた。特に断らない限り、 ゼニゴケは 1%寒天を含有した 1/2×Gamborg's B5 培地 (Gamborg et al., 1968) 上、22°C、恒常 白色光条件 (50-60 µmol photons m⁻² s⁻¹; CCFL, OPT-40C-N-L, Optrom) で培養した。

<u>光源</u>

青色光と赤色光の光源として、それぞれ青色 LED (MIL-B18, SANYO Electric; VBL-SD150-RB, Valore 図 7Dのみ) と赤色 LED (MIL-R18, SANYO Electric) を用いた。光量は 1830-C Optical Power Meter (Newport) を用いて測定し、青色光を 450 nm、赤色光を 657 nm として 計算した。図 10 の 10–80 µmol photons m⁻² s⁻¹ の白色光の光源として LH-80CCFL-6CT (NK system) に備え付けの CCFL を、600 µmol photons m⁻² s⁻¹の白色光の光源として白色光 LED (3LH-484, NK system) を用いた。白色光の光量を LA-105 light meter (NK system) で測定した。

<u>アミノ酸配列のマルチプルアライメントの作製</u>

MpPRAF のホモログのアミノ酸配列は MarpolBase (http://marchantia.info/) 内の *A. thaliana* (TAIR10)、 *Amborella trichopoda* (version 1.0)、 *Picea abies* (version 1.0)、 *Physcomitrella patens* (version 3.0)、 *Klebsormidium nitens* (version 1.0) と RAP-DB (https://rapdb.dna.affrc.go.jp/tools/blast) 内の *Oryza sativa* に対して BLASTP 検索を行って集め た。 B4 グループの Raf 様キナーゼまたは PGM ホモログのアミノ酸配列のマルチプルアラ イメントは Geneious software (version 6.1.8; Biomatters; http://www.geneious.com/) の MUSCLE (Edgar, 2004) を用いて作成した。 B4 グループの Raf 様キナーゼ の PB1 ドメインと kinase ドメインを SMART (Schultz et al., 1998) (http://smart.embl-heidelberg.de) を用いて予測した。

形質転換体の作出

• Mppraf^{ko}

MpPRAF の機能欠損株を得るために相同組換えを用いた。野生型株のゲノム DNA を鋳型 に MpPRAF の PB1 ドメインをコードしている領域の 5'側および 3'側の相同領域をそれぞれ MpPRAF_GT5_F/MpPRAF_GT5_R と MpPRAF_GT3_F/MpPRAF_GT3_R のプライマーセット を用いて PCR で増幅した。プライマーの配列は表 1 にまとめている。5'側および 3'側の相 同領域を pJHY-TMp1 ベクター (Ishizaki et al., 2013) の AscI と PacI サイトに In-Fusion HD cloning kit (TaKaRa) を用いてクローニングした。得られたプラスミドはアグロバクテリウ ムを介して F1 胞子に形質転換し (Ishizaki et al 2008)、得られた形質転換体から相同組換え が起きた個体を PCR で選抜した (Ishizaki et al., 2013)。スクリーニングに MpPRAF_GTcheck_F/MpPRAF_GTcheck_Rused というプライマーセットを用いた。

• Mppraf^{ld}

MpPRAF 遺伝子座全体の大規模欠失株を作出するためにニッカーゼ型の CRISPR/Cas9 ゲ ノム編集システムを用いた。gRNA 標的配列を MpPRAF のプロモーター領域の上流と予測 転写終結点の下流に設計した。gRNA 配列に対応するアニールした oligo DNA 二本鎖 (5MpPRAF_1A/MpPRAF_1B5、 MpPRAF_2A/MpPRAF_2B、 MpPRAF_3A/MpPRAF_3B、 MpPRAF_4A/MpPRAF_4B) をそれぞれ pMpGE_En04、pBC-GE12、 pBC-GE23、pBC-GE34 の BsaI サイトにクローニングした。3 種類の pBC-GE ベクターの gRNA 発現カセットは続 いて pMpGE_En04 ベクターの BgII サイトに統合した。得られた4 種類の gRNA 発現カセットは続 いて pMpGE_En04 ベクターに LR Clonase II (Thermo Fisher Scientific) を用いて移した。 pMpGE_En04、pBC-GE12、 pBC-GE23、pBC-GE34 と pMpGE018 ベクターは京都大学の井 上佳祐博士から提供いただいた。最終的に得られたプラスミドを野生型株の葉状体切断片 に対して形質転換した (Kubota et al., 2013)。得られた形質転換体から大規模欠失株の選抜の ために、設計した gRNA 標的配列周辺を MpPRAF_LDcheck_F/MpPRAF_KD_GT3_R という プライマーセットを用いて PCR を行って増幅した。PCR 産物は PCR に用いたプライマー と BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific) を用いて配列を確かめた。

• proMpPRAF:MpPRAF-3xFLAG/Mppraf^{ko} \geq proMpPRAF:MpPRAF-3xFLAG/Mppraf^{ld}

Mppraf 変異株の相補株を得るために野生型株のゲノム DNA を鋳型に MpPRAF プロモー ター領域と翻訳領域を、それぞれ MpPRAF_c5_F/MpPRAF_c5_R と MpPRAF_cds_F/MpPRAF_cds_R2 というプライマーセットを用いて PCR で増幅した。増幅 した断片は pENTR/D-TOPO ベクターにクローニングした。プロモーター領域を含むプラス ミドの SfiI-AscI 断片と翻訳領域を含むプラスミドの SfiI-AscI 断片を連結した。得られた pENTR/D-TOPO_MpPRAF を pMpGWB309 ベクター (Ishizaki et al., 2015) に LR Clonase II (Thermo Fisher Scientific)を用いて移した。最終的に得られた pMpGWB309_MpPRAF プラス ミドを Mppraf^{ko} および Mppraf^{ld}の葉状体切断片に形質転換した。

• proMpPRAF:MpPRAF^{sv1}-3xFLAG/Mppraf^{ko}

短いスプライシングバリアント 1 型のみを発現する株を作出するために pENTR/D-TOPO_MpPRAF を鋳型にプライマーセット MpPRAF_sv1_F/MpPRAF_sv1_R を用いて PCR を行い、選択的スプライシングを受ける配列を欠失させた。MpPRAF^{sv1}配列を pMpGWB309 に LR Clonase II を用いて移して、得られたプラスミドを Mppraf^{ko}の葉状体切断片に形質転 換した。 • proMpPRAF:MpPRAF^{S1246AS1248A}-3xFLAG/Mppraf^{ko}

MpPRAF の 1248 番目と 1246 番目のセリンをアラニンに置換するために、pENTR/D-型 \mathbb{F} TOPO MpPRAF を 鋳 に プラ イ 7 -セ ッ MpPRAF_S1246AS1248A_F/MpPRAF_S1246AS1248A_R を用いて PCR を行い、点変異を加 えた。MpPRAF^{S1246AS1248A} 配列の 5.6 kb の BamHI 断片と pMpGWB309 MpPRAF の 16.6 kb の BamHI 断片を連結した。得られたプラスミドを Mppraf^{ko} 変異株の葉状体切断片に形質転換 した。

• proMpPRAF:MpPRAF^{D1540N}-3xFLAG/Mppraf^{ko}

MpPRAF の 1540 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換するために、pENTR/D-TOPO_MpPRAF を鋳型にプライマーセット MpPRAF_D1540N_F/MpPRAF_gD1540N を用い て PCR を行い、点変異を加えた。MpPRAF^{D1540N}配列の 2.4 kb の AvrII 断片と 19.8 kb の AvrII 断片を連結した。得られたプラスミドを Mppraf^{ko}変異株の葉状体切断片に形質転換した。

・ Mppgm1^{ge} と Mppraf^{ko} Mppgm1^{ge}

MpPGM1 変異株を作出するために gRNA 標的配列を触媒反応中心と金属結合部位 をコ ードする領域周辺に設計した。アニールした oligo DNA 二本鎖 (MpPGM1_1A/MpPGM1_1B または MpPGM1_2A/MpPGM1_2B) を pMpGE_En03 (Sugano and Nishihama 2018; Sugano et al., 2018) の Bsal サイトにクローニングした。得られた gRNA 発現カセットそれぞれを LR Clonase II を用いて pMpGE011 ベクター (Sugano and Nishihama 2018; Sugano et al., 2018) に 移した。得られたプラスミドを野生型株と Mppraf^{ko} の葉状体切断片に形質転換した。形質 転換体から MpPGM1 にゲノム編集が起きた株を単離するために、gRNA 標的配列を含む領 域を形質転換体のゲノム DNA を鋳型に MpPGM1_check_F/MpPGM1_check_R のプライマー セットを用いて増幅した。PCR 産物は BigDye Terminator v3.1 とプライマー (触媒反応中心 の周辺には MpPGM1_check_F、金属結合部位の周辺には MpPGM1_check_R) を用いて配列 を確かめた。

リン酸化プロテオーム解析

リン酸化プロテオーム解析のサンプルとして、野生型株を恒常白色光で7日間生育させ、 3日間暗所に移し、青色光 (MIL-B18, 110 μmol photons m⁻² s⁻¹)を10分または30分照射し、 ただちに液体窒素で凍結させた葉状体を用いた。DCMU処理サンプルとしては、ゼニゴケ を生育させている9 cm プレートに対して培地の表面が覆われるように5 mLの10 μM DCMU (0.1%(v/v) ethanol)を暗処理2日目に加え、1日暗所に置いた後、青色光を10分または30 分照射した葉状体を用いた。各条件について3反復のサンプルを用意した。

以降の操作は中神弘史博士、野村有子氏、Sara Christina Stoltz 博士に行っていただいた。 凍結したゼニゴケサンプルを Shake Master Neo (Bio Medical Science) を用いて破砕した。破 砕した植物体に直ちに 4% SDS、0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) 溶液に懸濁し 95°C で 3 分間保温した。16,000×g で 10 分間遠心し、上清を回収した。抽出物のタンパク質濃度を bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定し、filter-aided sample preparation (FASP) method (Wiśniewski et al., 2009) によってタンパク質を分解し、トリプシン消化したペプチドを回収した。Nakagami (2014)と同様に、ペプチドを C18 Empore disc membranes (3M)のついた StageTips (Rappsilber et al., 2007)を用いて脱塩し、Ti-HAMMOC (Sugiyama et al., 2007)を用いてリン酸化タンパク質を濃縮した。liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)解析のためにサンプルを再度、脱塩した。

EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific) と連続した LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) を nano-LC-MS/MS 解析に用いた。解析用のカラムは Ishihama et al. (2002) と同様のものを使った。スプレーボルテージを 2,400 V とし、MS スキャン範囲を m/z 300-1400 とした。MS スキャンにおいて上位 10 個の前駆イオンを選択し、引き続き MS/MS 解析に供した。

生データを label-free quantification (LFQ) と iBAQ (Tyanova et al., 2016a) が可能な MaxQuant software (version 1.6.3.4, http://www.maxquant.org/) (Cox and Mann, 2008) を用いて処 理した。 MS/MS スペクトルをゼニゴケ (primary transcripts; http://marchantia.info/download/download/Mpolymorphav3.1.primaryTrs.pep_annot.fa.gz) と一般 的な混入物、デコイの配列を含むデータベースに対して Andromeda 検索エンジンにより検 索した。システインのカルバミドメチル化を定型的な修飾に設定した一方、セリン、スレオ ニンまたはチロシンのリン酸化、メチオニンの酸化とタンパク質の N 末端のアセチル化は 可変的な修飾に設定した。スペクトルに一致したペプチドとタンパク質の偽陽性率 1%未満 とした。MaxLFQ 値の統計解析に Perseus (version 1.5.8.5, http://www.maxquant.org/). (Tyanova et al., 2016b) を用いた。

リン酸化部位から得られた強度の統計解析に Perseus を用いた。定量したリン酸化部位の 強度は log2 変換した。処理条件によりサンプルをグループ分けした後、少なくとも 1 処理 条件で 3 反復とも適当な値をとったリン酸化部位を次の解析に供した。データは中央値と の引き算により規格化した。欠損値は Perseus の初期設定 (width = 0.3, downshift = 1.8, separately for each column) を用いて正規分布から補完した。2 標本の t 検定を並べ替えに基 づいて偽陽性 5%にして行った。データは jPOST (accession number: JPST000685; Okuda et al., 2017) に預けた。

<u>抗 MpPRAF</u>抗体の作製

抗 MpPRAF 抗体の抗原として MpPRAF タンパク質の他のゼニゴケのタンパク質と相同 性の低い領域 (718–946) を選び、コードする cDNA 断片を MpPRAF_antigen_F/MpPRAF_antigen_R のプライマーセットを用いて Mp*PRAF* の cDNA を 鋳型に PCR で増幅した。Mp*PRAF* の cDNA は野生型株から Inoue et al.(2016) を参考に RNA 抽出と逆転写を行い、MpPRAFcDNA を MpPRAF_cds_F/MpPRAF_cds_R1 のプライマーセットを用いて PCR で増幅して pENTR/D-TOPO にクローニングした。増幅した MpPRAF⁷¹⁸⁻⁹⁴⁶をコードする配列は N 末端に maltose-binding-protein (MBP) タグ、C 末端に 6xHis タグが融合するタンパク質発現ベクターpIN055 (井上佳祐博士提供)の NdeI-XbaI 断片に In-Fusion HD cloning kit を用いてクローニングした。MBP-MpPRAF⁷¹⁸⁻⁹⁴⁶-6His タンパク質は大腸菌 Rosetta2(DE3)株で発現させ、0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside を添加して 15°C で24時間誘導した。大腸菌を遠心して集菌し、バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 8))、150 mM NaCl、10% glycerol、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 mM dithiothreitol) に懸濁した。その後、ソニケーションによって細胞を溶解し、組み替えタンパク質をアミロースレジン (New England Biolabs)を用いてアフィニティー精製した。MBP タグは PreScission Protease (GE Healthcare)で切断し、MpPRAF⁷¹⁸⁻⁹⁴⁶-6xHis タンパク質を cOmplete His-Tag Purification Resin (Roche)を用いてアフィニティー精製した。二段階で精製したタンパク質を抗原として紀和動物実験所に送付しウサギポリクローナル抗体を作製した。抗 MpPRAF 血清を 0.45 μm フィルター (Pall Corporation)でろ過し、ろ液を抗 MpPRAF 抗体として用いた。

タンパク質抽出と免疫ブロット解析

ゼニゴケを7日間白色光で生育させ3日間暗処理し、DCMU処理または未処理で図の説 明文で示した様々な光照射を行った。処理後の植物体を液体窒素で凍結し、乳鉢で破砕した。 破砕サンプルに等量の2×SDS sample buffer (0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)、10% (v/v) 2mercaptoethanol、4% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)、10% (w/v) sucrose、0.004% (w/v) bromophenol blue)を加え、95°Cで5分間変性させ、10,000×gで15分間遠心した上清を用 いた。MpPRAFの検出には4%アクリルアミドゲルで、Mpphotの検出には5%または6%ア クリルアミドゲルで、SDS-PAGEを行い、polyvinylidene fluoride 膜 (Bio-Rad Labolatories) に 転写した。一次抗体として、1,000倍希釈した抗 MpPRAF 抗体と5,000倍希釈した抗 Mpphot 抗体 (Komatsu et al., 2014)を用いた。二次抗体として10,000 倍希釈した ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab (GE Healthcare)を用いた。タンパク質の検出には ECL Prime reagent (GE Healthcare)を用いて、化学発光をシグナルとして ImageQuant LAS 4010 (GE Healthcare) に よって検出した。

脱リン酸化処理

上記の方法で抽出したタンパク質溶液をトリクロロ酢酸沈殿によって脱塩した。タンパ ク質溶液に等量の 20% (w/v) トリクロロ酢酸水溶液を加え、撹拌し 4°C で 30 分静置した。 4°C、 15,000×g で 10 分間遠心し、沈殿を氷冷アセトンで洗った。再び、4°C、 15,000×g で 10 分間遠心し、沈殿を風乾後、calf intestine alkaline phosphatase (CIAP, Takara) に付属の CIAP buffer に懸濁した。脱塩したタンパク質サンプルを、等量の 10 mM EDTA とともに 65°C で 30 分間、熱処理して不活性化した CIAP または活性のある CIAP と 37°C で 1 時間反応させ た。脱リン酸化反応は反応液と等量の 2×SDS sample buffer を加えて 95°C で 5 分間変性させることで止めた。変性した脱リン酸化処サンプルを免疫ブロットに用いた。

クロロフィル蛍光測定

恒常白色光で14日間生育させ30分以上暗順応させた植物体のクロロフィル蛍光をMINI-PAM portable chlorophyll fluorometer (Walz)を用いて測定した。Maxwell and Johnson (2000)に 従って、NPQ を(Fm-Fm')/Fm'、Fv/Fm を(Fm-Fo)/Fm、 Φ_{PSII} を(Fm'-Fs)/Fm'として計算した。 ETR は $\Phi_{PSII} \times PFD$ として計算した (Genty et al., 1989)。qL を(Φ_{PSII} /(1- Φ_{PSII})) × ((1-Fv/Fm)/(Fv/Fm)) × (NPQ+1)として計算した (Miyake et al., 2009)。

<u>デンプン、スクロース、グルコース、フルクトースの定量</u>

恒常白色光で 14 日間または 15 日間生育させた植物体 50 mg 程度を Freezone 2.5 (LABCONCO) で凍結乾燥し、Multi-Beads Shocker (Yasui Kikai) を用いて破砕した。破砕し た植物体に 500 µL の 80% (v/v) エタノールを加え、95°C で 5 分間加熱して、15°C、12,000×g で 15 分間遠心した。沈殿に対して再度エタノールを加えて加熱し、遠心を行い、上清を 1 回目の上清と統合した。沈殿と上清を乾燥させた。デンプン測定のために、沈殿に 1 mL の 0.2 M KOH を加えて 95°C で 30 分間加熱し、200 µL の 1 M 酢酸を加えて pH 5.5 に調整し た。沈殿サンプルから TOTAL STARCH Assay Kit (AMYLOGLUCOSIDASE/ α -AMYLASE METHOD; Megazyme) を用いてデンプン測定を行った。乾燥させた上清に 200 µL の水を加 えて懸濁し、SUCROSE, D-FRUCTOSE and D-GLUCOSE assay Kit (Megazyme) を用いてスク ロース、グルコース、フルクトースの測定を行った。

<u>ヨウ素染色</u>

恒常白色光で 14 日間生育させた植物体を脱色液 (80% (v/v) ethanol、0.1% (v/v) 2mercaptoethanol) に浸して 80°C で脱色した。Hostettler et al. (2011) に従い、脱色したサンプ ルに対して、Lugol solution (0.34% (w/v) I₂、0.68% (w/v) KI) を加えて 5 分間染色し、水に浸 して 2 分間洗った。水を交換して再度サンプルを洗い、観察した。

<u>TEM 解析</u>

サンプルの固定及び観察を岩野恵博士に行っていただいた。恒常白色光で14日間生育さ せた植物体の葉状体の基部側を切り出して固定液 (2.5% (v/v) glutaraldehyde、2% (w/v) paraformaldehyde、50 mM phosphate buffer (pH 7.2))を加えて4℃で一晩固定した。サンプル を 50 mM phosphate buffer で洗い、2% (w/v) osmium tetroxide 水溶液を加えて室温で2時間、 後固定を行った。固定後、25、50、80、99、100% (v/v) ethanol へ順に交換して脱水しエポキ シ樹脂に包埋した。ダイヤモンドナイフと ultramicrotome (Ultracut UCT, Leica) を用いて超 薄切片を作製し、銅製のグリッドに乗せて 2% (w/v) uranyl acetate 染色と鉛染色を行った。 観察には透過型電子顕微鏡 (H-7650, HITACHI; JEM-1011, JEOL) を用いた。

表1 プライマー配列

名前	配列(5'-3')
MpPGM1_1A	CTCGGGTGGACCAAAGTACGAC
MpPGM1_1B	AAACGTCGTACTTTGGTCCACC
MpPGM1_2A	CTCGCTTTGGAGCAGCCAGTGA
MpPGM1_2B	AAACTCACTGGCTGCTCCAAAG
MpPGM1_check_F	AAAATTGCTGCAGGAAATGG
MpPGM1_check_R	GACCCAACTCCTTTGCGACC
MpPRAF_1A	CTCGTGGCGTTATGGATAAGACT
MpPRAF_1B	AAACAGTCTTATCCATAACGCCA
MpPRAF_2A	CTCGTCACCAACTAGATTAGCTC
MpPRAF_2B	AAACGAGCTAATCTAGTTGGTGA
MpPRAF_3A	CTCGCTACGACGTTCAGAGAGAT
MpPRAF_3B	AAACATCTCTCTGAACGTCGTAG
MpPRAF_4A	CTCGGCATGGAACCAGTCCACTT
MpPRAF_4B	AAACAAGTGGACTGGTTCCATGC
MpPRAF_antigen_F	CCTCAGCAGGTCATATGAGTGAAGAACGACTACACAG
MpPRAF_antigen_R	GACCAGCGCTTCTAGAAGCAGTGTAACCTCCCAGAAC
MpPRAF_c5_F	CACCTGTCATAAGGTCGAGCTTCC
MpPRAF_c5_R	GGTGAAGTTCGCCGACAAGG
MpPRAF_cds_F	CACCATGGTTGTGAGAGAAGCAATGATAGTTCC
MpPRAF_cds_R1	CTACACGATCTGCATCTGTGGATGA
MpPRAF_cds_R2	CACGATCTGCATCTGTGGATGAGG
MpPRAF_D1540N_F	GTAATTTGGGGTTATCAAAGGTGAAGC
MpPRAF_gD1540N_R	CCACCTAAACATCCACGGCA
MpPRAF_GT3_F	GCCCGGGCAAGCTTATTCGGAGCAACGGTATGTCG
MpPRAF_GT3_R	CTAAGGTAGCGATTATCCGAGTCCTGTACTGTTCG
MpPRAF_GT5_F	TTATCCCTAGGCGCGCATAGCATTGCGATGGTGTG
MpPRAF_GT5_R	TAAACTAGTGGCGCGTCGGACGGTGTAGAACTGTG
MpPRAF_GTcheck_F	AGCAAGGCACATACGGATGC
MpPRAF_GTcheck_R	AGTTAGGGTCGTGATGAGTG
MpPRAF_KD_GT3_R	CTAAGGTAGCGATTAACCGTCTGTAGTTAGTGTCC
MpPRAF_Ldcheck_F	TCTGCCAAACACATACAACG
MpPRAF_S1246A_R	GCGATCCAGATCTAGTGCCG
MpPRAF_S1246AS1248A_F	GCCGGAGCAGTTGTTCAGAGCG
MpPRAF_sv1_F	CGGCGCCAGATCACAGTTCT
MpPRAF_sv1_R	CTTCATCCACTGACTGAGCC

文献

Abadie, C., Mainguet, S., Davanture, M., Hodges, M., Zivy, M., and Tcherkez, G. (2016) Concerted changes in the phosphoproteome and metabolome under different CO₂/O₂ gaseous conditions in Arabidopsis rosettes. *Plant Cell Physiol.* 57: 1544–1556.

Bahaji A., Baroja-Fernández E., Ricarte-Bermejo A., Sánchez-López Á.M., Muñoz F.J., Romero, J.M., Ruiz, M.T., Baslam, M., Almagro, G., Sesma, M.T., and Pozueta-Romero, J. (2015) Characterization of multiple *SPS* knockout mutants reveals redundant functions of the four Arabidopsis sucrose phosphate synthase isoforms in plant viability, and strongly indicates that enhanced respiration and accelerated starch turnover can alleviate the blockage of sucrose biosynthesis. *Plant Sci.* 238: 135–147.

Bilger, W., and Björkman, O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25: 173–185.

Boex-Fontvieille, E., Davanture, M., Jossier, M., Zivy, M., Hodges, M., and Tcherkez, G. (2014) Photosynthetic activity influences cellulose biosynthesis and phosphorylation of proteins involved therein in *Arabidopsis* leaves. *J. Exp. Bot.* 65: 4997-5010

Bowman, J.L., Araki, T., Arteaga-Vazquez, M.A., Berger, F., Dolan, L., Haseloff, J., Ishizaki, K., Kyozuka, J., Lin, S.S., Nagasaki, H., Nakagami, H., Nakajima, K., Nakamura, Y., Ohashi-Ito, K., Sawa, S., Shimamura, M., Solano, R., Tsukaya, H., Ueda, T., Watanabe, Y., Yamato, K.T., Zachgo, S., and Kohchi, T. (2016) The naming of names: Guidelines for gene nomenclature in *Marchantia. Plant Cell Physiol.* 57: 257–261.

Bowman, J.L., Kohchi, T., Yamato, K. T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., Yamaoka, S., Nishihama, R., Nakamura, Y., Berger, F., Adam, C., Aki, S.S., Althoff, F., Araki, T., Arteaga-Vazquez, M.A., Balasubrmanian, S., Barry, K., Bauer, D., Boehm, C.R., Briginshaw, L., Caballero-Perez, J., Catarino, B., Chen, F., Chiyoda, S., Chovatia, M., Davies, K.M., Delmans, M., Demura, T., Dierschke, T., Dolan, L., Dorantes-Acosta, A.E., Eklund, D.M, Florent, S.N., Flores-Sandoval, E., Fujiyama, A., Fukuzawa, H., Galik, B., Grimanell, i D., Grimwood, J., Grossniklaus, U., Hamada, T., Haseloff, J., Hetherington, A.J., Higo, A., Hirakawa, Y., Hundley, H.N., Ikeda, Y., Inoue, K., Inoue, S.I., Ishida, S., Jia, Q., Kakita, M., Kanazawa, T., Kawai, Y., Kawashima, T., Kennedy, M., Kinose, K., Kinoshita, T., Kohara, Y., Koide, E., Komatsu, K., Kopischke, S., Kubo, M., Kyozuka, J., Lagercrantz, U., Lin, S.S., Lindquist,

E., Lipzen, A.M., Lu, C.W., De Luna, E., Martienssen, R.A., Minamino, N., Mizutani, M., Mizutani, M., Mochizuki, N., Monte, I., Mosher, R., Nagasaki, H., Nakagami, H., Naramoto, S., Nishitani, K., Ohtani, M., Okamoto, T., Okumura, M., Phillips, J., Pollak, B., Reinders, A., Rövekamp, M., Sano, R., Sawa, S., Schmid, M.W., Shirakawa, M., Solano, R., Spunde, A., Suetsugu, N., Sugano, S., Sugiyama, A., Sun, R., Suzuki, Y., Takenaka, M., Takezawa, D., Tomogane, H., Tsuzuki, M., Ueda, T., Umeda, M., Ward, J.M., Watanabe, Y., Yazaki, K., Yokoyama, R., Yoshitake, Y., Yotsui, I., Zachgo, S., and Schmutz, J. (2017) Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell* 171: 287–304.e15.

Butler, W.L., and Kitajima, M. (1975) Energy transfer between photosystem II and photosystem I in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*. 396: 72–85.

Caspar, T., Huber, S.C., and Somerville, C. (1985) Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiol.* 79: 11–17.

Cox, J., and Mann, M. (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26: 1367–1372.

Daum, G., Eisenmann-Tappe, I., Fries, H.W., Troppmair, J., and Rapp, U.R. (1994) The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem. Sci.* 19: 474–480.

Duby, G., and Boutry, M. (2009) The plant plasma membrane proton pump ATPase: A highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 457: 645–655.

Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792–1797.

Emanuelsson, O., Nielsen, H., and von Heijne, G. (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8: 978–984.

Flügge, U.I., Häusler, R.E., Ludewig, F., and Fischer, K. (2003) Functional genomics of phosphate antiport systems of plastids. *Physiol. Plant.* 118: 475–482.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151–158.

Genty, B., Briantais, J. M., and Baker, N. R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87–92.

Gibon, Y., Bläsing, O.E., Palacios-Rojas, N., Pankovic, D., Hendriks, J.H., Fisahn, J., Höhne, M., Günther, M., and Stitt, M. (2004) Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADPglucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant J.* 39: 847–862.

Gibon, Y., Pyl, E.T., Sulpice, R., Lunn, J.E., Höhne, M., Günther, M., and Stitt, M. (2009) Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant Cell Environ.* 32: 859–874.

Hanks, S. K., and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9: 576–596.

Hashida, Y., Hirose, T., Okamura, M., Hibara, K., Ohsugi, R., and Aoki, N. (2016) A reduction of sucrose phosphate synthase (SPS) activity affects sucrose/starch ratio in leaves but does not inhibit normal plant growth in rice. *Plant Sci.* 253: 40–49.

Hashimoto, M., Negi, J., Young, J., Israelsson, M., Schroeder, J. I., and Iba, K. (2006) *Arabidopsis* HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nat. Cell Biol.* 8: 391–397.

Hattenbach, A., Müller-Röber, B., Nast, G., and Heineke, D. (1997) Antisense repression of both ADP-glucose pyrophosphorylase and triose phosphate translocator modifies carbohydrate partitioning in potato leaves. *Plant Physiol*. 115: 471-475.

Häusler, R.E., Geimer, S., Kunz, H.H., Schmitz, J., Dörmann, P., Bell, K., Hetfeld, S., Guballa, A., and Flügge, U.I. (2009) Chlororespiration and grana hyperstacking: How an Arabidopsis double mutant can survive despite defects in starch biosynthesis and daily carbon export from chloroplasts. *Plant Physiol.* 149: 515–533.

Hayashi, M., Inoue, S., Ueno, Y., and Kinoshita, T. (2017) A Raf-like protein kinase BHP mediates blue light-dependent stomatal opening. *Sci. Rep.* 7: 45586.

Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14: 378–379.

Hisanaga, T., Okahashi, K., Yamaoka, S., Kajiwara, T., Nishihama, R., Shimamura, M., Yamato, K.T., Bowman, J.L., Kohchi, T., and Nakajima, K. (2019) A *cis*-acting bidirectional transcription switch controls sexual dimorphism in the liverwort. *EMBO J.* 38: e100240.

Hiyama, A., Takemiya, A., Munemasa, S., Okuma, E., Sugiyama, N., Tada, Y., Murata, Y., and Shimazaki, K. (2017) Blue light and CO₂ signals converge to regulate light-induced stomatal opening. *Nat. Commun.* 8: 1284.

Hostettler, C., Kölling, K., Santelia, D., Streb, S., Kötting, O., and Zeeman, S.C. (2011) Analysis of starch metabolism in chloroplasts. *Methods Mol. Biol.* 775: 387–410.

Huber, J.L. and Huber, S.C. (1992a) Site-specific serine phosphorylation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase. *Biochemical J.* 283: 877–882.

Huber, S.C., and Huber, J.L. (1992b) Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiol.* 99: 1275–1278.

Huber, S.C., and Huber, J.L. (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 431–444.

Inoue, K., Nishihama, R., Kataoka, H., Hosaka, M., Manabe, R., Nomoto, M., Tada, Y., Ishizaki, K., and Kohchi, T. (2016) Phytochrome signaling is mediated by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell* 28: 1406–1421.

Inoue, K., Nishihama, R., Araki, T., and Kohchi, T. (2019) Reproductive induction is a far-red high irradiance response that is mediated by phytochrome and PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR in *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol*. 60: 1136–1145.

Inoue S., Kinoshita T., Matsumoto M., Nakayama K. I., Doi M., and Shimazaki K. (2008) Blue lightinduced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 5626–5631.

Ishihama, Y., Rappsilber, J., Andersen, J.S., and Mann, M. (2002) Microcolumns with self-assembled particle frits for proteomics. *J. Chromatogr. A.* 979: 233–239.

Ishizaki, K., Chiyoda, S., Yamato, K.T. and Kohchi, T. (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. *Plant Cell Physiol.* 49: 1084–1091.

Ishizaki, K., Johzuka-Hisatomi, Y., Ishida, S., Iida, S., and Kohchi, T. (2013) Homologous recombination-mediated gene targeting in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Sci. Rep.* 3: 1532.

Ishizaki, K., Nishihama, R., Ueda, M., Inoue, K., Ishida, S., Nishimura, Y., Shikanai, T., and Kohchi, T. (2015) Development of gateway binary vector series with four different selection markers for the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLOS ONE* 10: e0138876.

Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K. T., and Kohchi, T. (2016) Molecular genetic tools and techniques for *Marchantia polymorpha* research. *Plant Cell Physiol.* 57: 262–270.

Kircher, S., and Schopfer, P. (2012) Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in *Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 11217–11221.

Komatsu, A., Terai, M., Ishizaki, K., Suetsugu, N., Tsuboi, H., Nishihama, R., Yamato, K.T, Wada, M., and Kohchi, T. (2014) Phototropin encoded by a single-copy gene mediates chloroplast photorelocation movements in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiol*. 166: 411–427.

Kubota, A., Ishizaki, K., Hosaka, M., and Kohchi, T. (2013) Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 167–172.

Lamberti, G., Gugel, I. L., Meurer, J., Soll, J., and Schwenkert, S. (2011) The cytosolic kinases STY8, STY17, and STY46 are involved in chloroplast differentiation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 157: 70–85.

Lin, T., Caspar, T., Somerville, C., and Preiss, J. (1988) Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADPglucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol.* 86: 1131–1135.

Lin Z., Li Y., Zhang Z., Liu X., Hsu C. C., Du Y., Sang T., Zhu C., Wang Y., Satheesh V., Pratibha P., Zhao Y., Song C. P., Tao W. A., Zhu J. K., and Wang P. (2020) A RAF-SnRK2 kinase cascade mediates early osmotic stress signaling in higher plants. *Nat. Commun.* 11: 613.

MAPK group. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* 7: 301-308.

Martin, T., Sharma, R., Sippel, C., Waegemann, K., Soll, J., and Vothknecht, U. C. (2006) A protein kinase family in *Arabidopsis* phosphorylates chloroplast precursor proteins. *J. Biol. Chem.* 281: 40216–40223.

Mason, M.G., Ross, J.J., Babst, B.A., Wienclaw, B.N., and Beveridge, C.A. (2014) Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 6092-6097. Maxwell, K., and Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659–668.

Michalska, J., Zauber, H., Buchanan, B.B., Cejudo, F.J., and Geigenberger, P. (2009) NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 9908–9913.

Miyake, C., Amako, K., Shiraishi, N., and Sugimoto, T. (2009) Acclimation of tobacco leaves to high light intensity drives the plastoquinone oxidation system-relationship among the fraction of open PSII centers, non-photochemical quenching of Chl Fluorescence and the maximum quantum yield of PSII in the dark. *Plant Cell Physiol.* 50: 730–743.

Monte, I., Ishida, S., Zamarreño, A.M., Hamberg, M., Franco-Zorrilla, J.M., García-Casado, G., Gouhier-Darimont, C., Reymond, P., Takahashi, K., García-Mina, J.M., Nishihama, R., Kohchi, T., and Solano R. (2018) Ligand-receptor co-evolution shaped the jasmonate pathway in land plants. *Nat. Chem. Biol.* 14: 480–488.

Mutte, S.K., Kato, H., Rothfels, C., Melkonian, M., Wong, G.K.S., and Weijers, D. (2018) Origin and evolution of the nuclear auxin response system. *eLife* 7: 1–25.

Nakagami, H. (2014) StageTip-based HAMMOC, an efficient and inexpensive phosphopeptide enrichment method for plant shotgun phosphoproteomics. *Methods Mol. Biol*.1072: 595–607.

Nakazato, T., Kadota, A., and Wada, M. (1999) Photoinduction of spore germination in *Marchantia polymorpha* L. is mediated by photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 40: 1014–1020.

Negi, J., Munemasa, S., Song, B., Tadakuma, R., Fujita, M., Azoulay-Shemer, T., Engineer, C.B., Kusumi, K., Nishida, I., Schroeder, J.I., and Iba, K. (2018) Eukaryotic lipid metabolic pathway is essential for functional chloroplasts and CO₂ and light responses in Arabidopsis guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115: 9038–9043.

Nishihama, R., Ishizaki, K., Hosaka, M., Matsuda, Y., Kubota, A., and Kohchi, T. (2015) Phytochrome-mediated regulation of cell division and growth during regeneration and sporeling development in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J. Plant Res.* 128: 407–421.

Okada, S., Fujisawa, M., Sone, T., Nakayama, S., Nishiyama, R., Takenaka, M., Yamaoka S, Sakaida M, Kono K, Takahama M, Yamato KT, Fukuzawa H, Brennicke A, and Ohyama, K. (2000) Construction of male and female PAC genomic libraries suitable for identification of Y-chromosome-specific clones from the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant J*. 24: 421–428.

Okuda, S., Watanabe, Y., Moriya, Y., Kawano, S., Yamamoto, T., Matsumoto, M., Takami, T., Kobayashi, D., Araki, N., Yoshizawa, A.C., Tabata, T., Sugiyama, N., Goto, S., and Ishihama, Y. (2017) jPOSTrepo: an international standard data repository for proteomes. *Nucleic Acids Res.* 45: D1107–D1111.

Okumura, M., Inoue, S., Takahashi, K., Ishizaki, K., Kohchi, T., and Kinoshita, T. (2012) Characterization of the plasma membrane H⁺-ATPase in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiol*. 159: 826–834.

Okumura, M., Inoue, S., Kuwata, K., and Kinoshita, T. (2016) Photosynthesis activates plasma membrane H⁺-ATPase via sugar accumulation. *Plant Physiol.* 171: 580–589.

Periappuram, C., Steinhauer, L., Barton, D.L., Taylor, D.C., Chatson, B., and Zou, J. (2000) The plastidic phosphoglucomutase from Arabidopsis. A reversible enzyme reaction with an important role in metabolic control. *Plant Physiol.* 122: 1193–1200.

Petrillo, E., Herz, M. A. G., Fuchs, A., Reifer, D., Fuller, J., Yanovsky, M. J., Simpson, C., Brown, J.W., Barta, A., Kalyna, M., and Kornblihtt, A.R. (2014) A chloroplast retrograde signal regulates nuclear alternative splicing. *Science* 344: 427–430.

Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J.-P., Segers, G., De Veylder, L., de Pinho Barrôco, R., Casteels, P., Van Montagu, M., Inzé, D., and Mironov, V. (2001) A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G₂/M progression in plants. *J. Biol. Chem.* 276: 36354–36360.

Puttick, M.N., Morris, J.L., and Williams, T.A. (2018) The interrelationships of land plants and the nature of the ancestral embryophyte. *Curr. Biol.* 28: 733-745.

Qiu, Y. L., Li, L., Wang, B., Chen, Z., Knoop, V., Groth-Malonek, Dombrovska, O., Lee, J., Kent, L., Rest, J., Estabrook, G.F., Hendry, T.A., Taylor, D.W., Testa, C.M., Ambros, M., Crandall-Stotler, B., Duff, R.J., Stech, M., Frey, W., Quandt, D., and Davis, C.C. (2006) The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 15511–15516.

Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylidès, C., and Havaux, M. (2012) Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 5535–5540.

Rappsilber, J., Mann, M., and Ishihama, Y. (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, prefractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* 2: 1896–1906.

Schmitz, J., Schöttler, M., Krueger, S., Geimer, S., Schneider, A., Kleine, T., Leister, D., Bell, K., Flügge, U.I., and Häusler, R.E. (2012) Defects in leaf carbohydrate metabolism compromise acclimation to high light and lead to a high chlorophyll fluorescence phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 12: 8.

Schneider, A., Häusler, R. E., Kolukisaoglu, Ü., Kunze, R., Van der Graaff, E., Schwacke, R., Catoni, E., Desimone, M., and Flügge, U.I. (2002) An *Arabidopsis* thaliana knock-out mutant of the chloroplast triose phosphate/phosphate translocator is severely compromised only when starch synthesis, but not starch mobilisation is abolished. *Plant J.* 32: 685–699.

Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5857–5864.

Shahzad, Z., Canut, M., Tournaire-Roux, C., Martinière, A., Boursiac, Y., Loudet, O., and Maurel, C. (2016) A potassium-dependent oxygen sensing pathway regulates plant root hydraulics. *Cell* 167: 87–98.

Sharkey, T. D. (1985) 0₂-insensitive photosynthesis in C3 plants. *Plant Physiol.* 78: 71–75.

Shimakawa, G., Ishizaki, K., Tsukamoto, S., Tanaka, M., Sejima, T., and Miyake, C. (2017) The liverwort, *Marchantia*, drives alternative electron flow using a flavodiiron protein to protect PSI. *Plant Physiol.* 173: 1636–1647.

Signora, L., Galtier, N., Skot, L., Lucas, H., and Foyer, C. H. (1998) Over-expression of sucrose phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* results in increased foliar sucrose/starch ratios and favours decreased foliar carbohydrate accumulation in plants after prolonged growth with CO₂ enrichment. *J. Exp. Bot.* 49: 669–680.

Soriano, G., Del-Castillo-Alonso, M.Á., Monforte, L., Tomás-Las-Heras, R., Martínez-Abaigar, J., and Núñez-Olivera, E. (2019) Photosynthetically-active radiation, UV-A and UV-B, causes both common and specific damage and photoprotective responses in the model liverwort *Marchantia polymorpha* subsp. *ruderalis*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 18: 400–412.

Stecker, K.E., Minkoff, B.B., and Sussman, M.R. (2014) Phosphoproteomic analyses reveal early signaling events in the osmotic stress response. *Plant Physiol.* 165: 1171–1187.

Streb, S., and Zeeman, S. (2012) Starch metabolism in Arabidopsis. Arabidopsis Book e0160.

Stitt, M., Gerhardt, R., Kürzel, B., and Heldt, H.W. (1983) A role for fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of sucrose synthesis in spinach leaves. *Plant Physiol*. 72: 1139–1141.

Stitt, M., and Heldt, H.W. (1984) Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6bisphosphate. *Plant Physiol.* 79: 599–608.

Stitt, M. (1990) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 41: 153–185.

Suetsugu, N., Takami, T., Ebisu, Y., Watanabe, H., Iiboshi, C., Doi, M., and Shimazaki, K. (2014) Guard cell chloroplasts are essential for blue light-dependent stomatal opening in Arabidopsis. *PLOS ONE* 9: e0108374

Sugano, S.S. and Nishihama, R. (2018) CRISPR/Cas9-based genome editing of transcription factor genes in *Marchantia polymorpha. Methods Mol. Biol.* 1830: 109–126.

Sugano, S.S., Nishihama, R., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Ishida, S., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Osakabe, K., and Kohchi, T. (2018) Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*. *PLOS ONE* 13: e0205117.

Sugiyama, N., Masuda, T., Shinoda, K., Nakamura, A., Tomita, M., and Ishihama, Y. (2007) Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Mol. Cell. Proteomics*. 6: 1103–1109.

Sumimoto H., Kamakura S., and Ito T. (2007) Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants. *Sci. STKE* 401: re6

Trotta A., Suorsa M., Rantala M., Lundin B., and Aro E. M. (2016) Serine and threonine residues of plant STN7 kinase are differentially phosphorylated upon changing light conditions and specifically influence the activity and stability of the kinase. *Plant J.* 87: 484-494

Tyanova, S., Temu, T., and Cox, J. (2016a). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat. Protoc.* 11: 2301–2319.

Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M., and Cox, J. (2016b) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* 13: 731–740.

Ueda, M., Kuniyoshi, T., Yamamoto, H., Sugimoto, K., Ishizaki, K., Kohchi, T., Nishimura, Y., and Shikanai, T. (2012) Composition and physiological function of the chloroplast NADH dehydrogenaselike complex in *Marchantia polymorpha*. *Plant J*. 72: 683–693.

Van Leene, J., Han, C., Gadeyne, A., Eeckhout, D., Matthijs, C., Cannoot, B., De Winne, N., Persiau,G., Van De Slijke, E., Van de Cotte, B., Stes, E., Van Bel, M., Storme, V., Impens, F., Gevaert, K,

Vandepoele, K., De Smet, I., and De Jaeger, G. (2019) Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. *Nat. Plants* 5: 316–327.

Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* 6: 359–362.

Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., and Sheen, J. (2013) Glucose–TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496: 181–186.

謝辞

本研究は京都大学生命科学研究科遺伝子特性学分野で行われました。指導教員である西 浜竜一准教授に多くのご指導とご鞭撻を賜り、心より感謝申し上げます。研究を行う機会を 与えていただき、ご指導を賜った河内孝之教授に深く御礼申し上げます。末次憲之博士には 多くのご助言や論文執筆についてご提言いただきました。岩野惠博士には TEM による観察 を行っていただきました。深く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多くの方にご協力いただきました。本研究の出発点となったリン 酸化プロテオーム解析は理化学研究所の野村有子さん、理化学研究所 (現 Max Planck Institute)の中神弘史博士、Max Planck Instituteの Sara Christina Stolze 博士に行っていただき ました。中神博士には論文執筆にあたっても的確なご助言をいただきました。クロロフィル 蛍光測定の機器を鹿内利治教授 (京都大学理学研究科) に使わせていただきました。蛍光測 定については後藤栄治助教(九州大学農学研究院)にご指導いただきました。鹿内教授と後 藤助教には実験結果の議論にもご協力いただきました。後藤助教には論文執筆のご助言も いただきました。伊福健太郎准教授 (京都大学生命科学研究科) には強光のグロースチャン バーを使わせていただき、また、実験のアドバイスもいただきました。京都大学生命科学研 究科の新川はるか博士にデンプンと糖の定量をご指導いただきました。井上佳祐助教 (京都 大学生命科学研究科) にはタンパク質発現用ベクターとニッカーゼ型 CRISPR/Cas9 ゲノム 編集システムのベクターを分与いただき、手法についてもご指導いただきました。電子顕微 鏡について京都大学医学研究科の幸田晴康さんと古田敬子さんと、京都大学理学研究科の 河本恭子さんと嶋田知生講師にご協力いただきました。心より感謝申し上げます。また福澤 秀哉教授(京都大学生命科学研究科)と増田誠司准教授(京都大学生命科学研究科)には副 指導教員としてご指導いただきました。深く御礼申し上げます。

本研究が行われました遺伝子特性学分野の皆様には多くのご助言とご協力をいただきま した。特に新宅明日架さんとは協力して MpPRAF の機能を研究し、様々な知見を得ること ができました。心より感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Eri Koide, Noriyuki Suetsugu, Megumi Iwano, Eiji Gotoh, Yuko Nomura, Sara Christina Stolze,

Hirofumi Nakagami, Takayuki Kohchi and Ryuichi Nishihama

Regulation of Photosynthetic Carbohydrate Metabolism by a Raf-Like Kinase in the Liverwort *Marchantia polymorpha*

Plant and Cell Physiology, pcz232 (2020). https://doi.org/10.1093/pcp/pcz232.