

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14830

研究課題名(和文)光受容体の改変による避陰応答の回避と密集地での生産性向上への挑戦

研究課題名(英文)Challenge to escape shade avoidance responses of plants by modification of photoreceptor to improve productivity of crops

研究代表者

吉原 静恵 (Yoshihara, Shizue)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20382236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物は、赤・遠赤色光受容体フィトクロムを利用して木陰を感知すると、胚軸の徒長や光合成抑制などの避陰応答を示す。本研究では、フィトクロムB (phyB)の吸収波長を木陰光にシフトさせることにより、生長促進と生産性向上を目指した。(1) フィトクロムの吸収特性を決定する分子内領域の一つはGAFドメインであり、GAFの置換によって吸収特性の入れ替えが可能である事を示した。(2) 緑色光によって活性化されるブラシノ藻のフィトクロムPHY1のGAFドメインをphyBのGAFドメインと置換したシロイヌナズナは、明らかな胚軸伸長阻害を示し、phyB機能の相補を確認した。

研究成果の概要(英文)：When a plant senses shade of shade using the red / far-red photoreceptor phytochrome, it shows shade-avoidance responses such as hypocotyl length and photosynthesis suppression. In this study, we aimed to promote growth and productivity by shifting the absorption wavelength of phytochrome B (phyB) to tree shade light. (1) One of the intramolecular regions that determine the absorption characteristics of phytochrome is a GAF domain, and it has been shown that absorption characteristics can be switched by substituting GAF. (2) Substitution of the GAF domain of phyB with the GAF domain of green algal PHY1, which can be activated in the shade, resulted in a clear suppression of hypocotyl elongation of Arabidopsis thaliana, confirming a complementation of phyB function.

研究分野：動植物環境応答

キーワード：フィトクロム 避陰応答 光受容体 GAF

1. 研究開始当初の背景

(1) 太陽光に含まれている可視光の中で赤色光は光合成に利用されるため、木陰に届く光は赤色を含まない。植物は、光受容体フィトクロムを利用して赤色光と木陰に届く遠赤色光の比率を測り、日なたか木陰かを識別している。フィトクロムは、赤色光 (600~700 nm) を吸収する Pr と、遠赤色光 (600~700 nm) を吸収する Pfr の間を光によって可逆的に変換し、Pfr が活性型として機能する。つまり、日なたでは Pfr 型が遺伝子転写調節を介して光合成を活性化し頑強に生育するが、木陰では Pr 型が光合成を抑制し、光を求めて伸長する避陰応答を示す。

(2) 避陰応答を示した農作物は見た目が悪く栄養価が下がるため、避陰応答を回避する試みが多くなされてきた。それらの一つが、フィトクロム過剰発現系の導入である。フィトクロムを過剰発現させて Pfr 型を増やした結果、ジャガイモやサツマイモでは避陰応答が極端に抑制され、生産性が向上した (1, 2, 3)。一方、イネ、トマトでは、矮性化した結果、植物体あたりの収量はむしろ減少するなど課題が残されている (4, 5)。

申請者は、シロイヌナズナが持つ phyA~phyE の中で、phyC は他の分子種よりも短波長の光で活性化されることを見出した (図 1)。phyC の吸収特性に関わる分子機構を明らかにすることによって、避陰応答に関わる phyB の吸収特性を改変できると考えた。

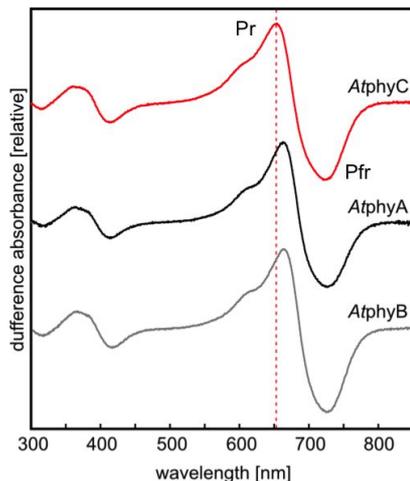


図1. シロイヌナズナ (*A. thaliana*) phyA~phyC の吸収差スペクトル。Pr の吸収極大波長が、AtpHyC は AtpHyA と AtpHyB よりも短波長側にシフトしている

1. Thiele A et al. 1999, *Plant Physiol.*, 120, 73-82.
2. Boccalandro HE et al. 2003, *Plant Physiol.*, 133, 1539-1546.
3. Kim JI et al. 2009, *Korean J. Crop Sci.*, 54, 422-426.
4. Kong SG et al. 2004, *Mol. Breed.*, 14, 35-45.
5. Garg AK et al. 2006, *Planta*, 223, 627-636.

2. 研究の目的

避陰応答を制御する光受容体の吸収特性を改変することによって、避陰応答を回避する植物の構築を目指す。将来的には、面積あたりの生産性が高い植物の創出につながる

ことが期待される。具体的には、(1) 吸収特性に関わる特異的アミノ酸部位の同定、(2) 吸収特性を改変した光受容体を植物に導入した植物体の避陰応答の評価、を目指す。

3. 研究の方法

アミノ酸配列の比較から見出した phyC に特徴的な部位を phyA、phyB に導入することによって、フィトクロムの吸収波長特性を決める領域を同定する。

phyC の吸収特性を phyA、phyB に導入して活性化の波長依存性を調べる。

緑色光で活性化される藻類フィトクロムの吸収特性を phyA、phyB に導入する。

で作成した改変 phyA、phyB をシロイヌナズナ phyB 欠損体に導入し、避陰応答への影響を調べる。

4. 研究成果

(1) 吸収特性を決定する分子内領域の決定

Pr 型 phyC の吸収極大波長が短波長側にシフトする性質の保存性を調べるために、トマトとトウモロコシの phyA~phyC をクローニングして、リコンビナントタンパク質の吸収スペクトルを解析した。

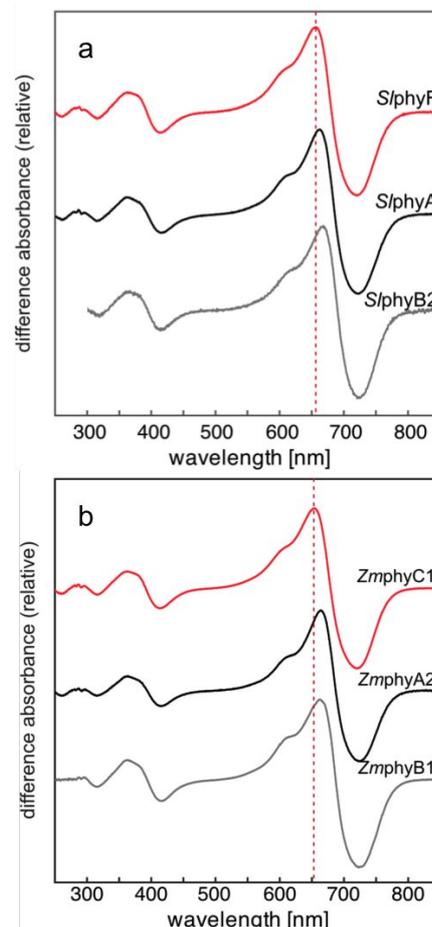


図2. (a) トマト (*S. lycopersicum*) phyA~phyF (phyC ホモログ)、(b) トウモロコシ (*Z. mays*) の吸収差スペクトル。phyC の Pr の吸収極大波長が phyA と phyB よりも短波長側にシフトする性質は、保存されている

その結果、双子葉のトマト、単子葉のトウモロコシでも Pr 型 phyC は短波長側に吸収領域がシフトしていることが分かった (図 2a, b)。

フィトクロムの発色団フィトクロモビルン (PΦB) は、PAS-GAF-PHY という 3 つのドメインが形成するポケットに存在し、GAF ドメインに保存された Cys 残基に共有結合している。シロイヌナズナ phyB Pr 型の結晶構造と、様々な植物フィトクロムのアミノ酸配列をもとに、phyC 固有の吸収特性を与える残基や領域を推察した。PΦB に近接する残基は、すべて植物フィトクロムの中で高度に保存されていた。

PΦB と直接相互作用しないが、phyC 固有の残基をすべて phyA または phyB の間で置換したタンパク質の吸収スペクトルを調べた結果、PHY ドメインから PΦB に伸びるループ構造上の残基が phyC 特性を与えることを明らかにした (図 3 S621E/AtphyB)。このループ構造は上記の結晶構造では不安定性ゆえ特定できていないが、変異タンパク質の吸収スペクトルが短波長にシフトする、Pfr への光変換効率が下がるなどの報告があるため、フィトクロムの光スイッチ機能に重要な領域である。

(2) PΦB を結合する GAF ドメインを phyC と phyB の間で置換した結果、phyC の GAF ドメインをもつ phyB は phyC の吸収特性を、

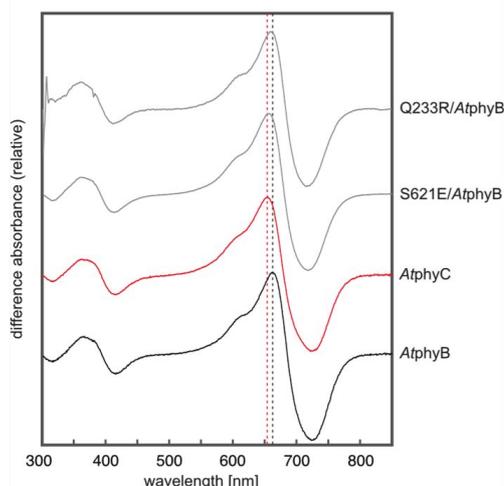


図3 アミノ酸置換を導入したシロイヌナズナphyB、野生型phyBとphyCの吸収差スペクトル Q233Rは、233番目のグルタミン(Q)をアルギニン(R)に置換したことを意味する。Pr型 phyCの吸収極大波長を赤点線で、Pr型phyBの吸収極大波長を黒点線で示す。

phyB の GAF ドメインをもつ phyC は phyB の吸収特性を示した (図 4)。

これらの結果は、GAF ドメインと PHY ドメインのループ構造が phyC の吸収特性を決定していることを示している。GAF ドメインを入れ替えることによって、フィトクロムの吸収波長を改変することができる考えた。

(3) フィトクロム改変植物の作成と避陰応答

木陰で活性化される phyB をシロイヌナズナで発現させるために、緑色光で活性化する

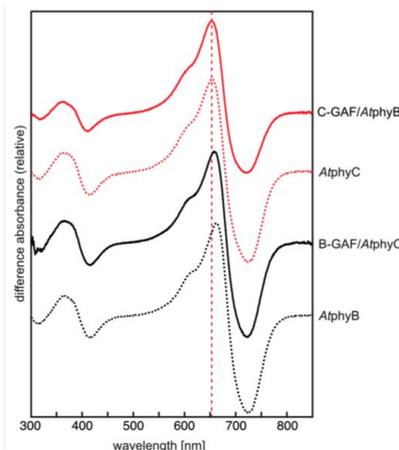


図4. GAFドメインを置換したシロイヌナズナphytochromeの吸収差スペクトル C-GAF/AtphyBは、AtphyBのGAFドメインをAtphyCのGAFと置換した。

プラシノ藻のフィトクロム PHY1 の GAF ドメインを phyB の GAF ドメインと置換した (PHY1-GAF/AtphyB)。

大腸菌で PHY1-GAF/AtphyB タンパク質を発現させた結果、大腸菌破碎液内では緑色光吸収を示したが、精製過程で PHY1-GAF/AtphyB タンパク質は不溶化したため高解像度の吸収スペクトルは得られていない。

一方、改変 phyB をシロイヌナズナ phyB 欠損株に導入した結果、植物は明らかな胚軸伸長抑制を示し、phyB の機能を相補した。

以上の結果を発表すべく、論文投稿の準備を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. K. Kurahashi, K. Hisada, M. Kashiwagi, S. Yoshihara, T. Nomura, H. Tokumoto, “Analysis of the continuous bioconversion of glycerol by promotion of highly glycerol-resistant glycerol-degrading bacteria.”, Waste and Biomass Valorization, 査読あり, <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0344-4> (2018).
2. 徳本 勇人, 倉橋 健介, 吉原 静恵, “嫌気性微生物を用いたグリセリンの有効利活用プロセスの構築”, オレオサイエンス, 査読なし, 17, 295-304 (2017).
3. S. Kashojiya, S. Yoshihara, K. Okajima, S. Tokutomi, “The Linker between LOV2-Ja and STK plays an essential role in the kinase activation by blue light in Arabidopsis phototropin 1, a plant blue light receptor.”, FEBS Lett., 査読あり, 590, 139-147 (2016).

[学会発表](計 5 件)

1. 吉原 静恵, 山本 花純, 岡野 凌一, 村松 順子, 徳本 勇人, MiSeqを駆使したin lab

植物トランスクリプトーム解析, 日本植物学会, 2017, 千葉

2. 山本 花純, 中島 淑乃, 竹田 恵美, 吉原 静恵, 野村 俊之, 徳本 勇人, 酸化亜鉛ナノ粒子を用いたカルスに対する光合成機能向上技術の構築, 2017, 千葉
3. Shizue Yoshihara, Kasumi Yamamoto, Koji Okajima, Hayato Tokumoto and Satoru Tokutomi, Absorption spectral properties of phyC activated with blue-shifted red light are conserved among angiosperms., Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 台北
4. 吉原 静恵, 石黒 志保, 田中 大樹, 大久保 陽子, 加川 貴俊, 桂 ひとみ, 西塚 順子, 岡島 公司, 徳富 哲, phyCの短波長吸収特性のメカニズム、保存と意義, 日本植物学会, 2016, 沖縄
5. 山本 花純, 中島 淑乃, 竹田 恵美, 吉原 静恵, 野村 俊之, 徳本 勇人, 金属酸化物ナノ粒子が植物細胞に及ぼす影響, 日本植物学会, 2016, 沖縄

〔図書〕(計 1 件)

シアノバクテリオクロム. 吉原静恵, **光と生命の事典**, 朝倉書店, 日本光生物学協会 光と生命の事典 編集委員会 編, 152-153, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 植物細胞培養用の液体培地および植物細胞の培養方法

発明者: 徳本勇人、竹田恵美、吉原静恵、野村俊之、中島淑乃、山本花純

権利者: 大阪府立大学

種類: 特許

番号: 2016-155754

出願年月日: 2016. 8. 8

国内外の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉原 静恵 (YOSHIHARA, Shizue)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号: 20382236

(2)研究分担者

徳本 勇人 (TOKUMOTO, Hayato)・大阪府立大学・大学院理学系研究科・講師

研究者番号: 20382236

(3)連携研究者

岡島 公司 (OKAJIMA, Koji)・慶應義塾大学・理工学研究科・特任助教

研究者番号: 20438245