

平成22年5月18日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2008～2009  
 課題番号： 20770030  
 研究課題名 (和文) 光情報による陸上植物生長相転換制御メカニズムの研究

研究課題名 (英文) Light signaling and growth phase transition in land plants

## 研究代表者

石崎 公庸 (ISHIZAKI KIMITSUNE)  
 京都大学・大学院生命科学研究所・助教  
 研究者番号： 00452293

## 研究成果の概要 (和文)：

植物は周囲の環境 (温度、光など) を感知して、栄養生長から生殖生長への移行、つまり花など生殖器官の形成時期を決定する。本研究では、陸上植物進化の基部に位置するゼニゴケにおいて、赤色光/遠赤色光受容体フィトクロムが生長相転換を制御する鍵因子であることを示した。またフィトクロムが光環境に応じて核へ移行し、細胞分裂を間接的あるいは直接的に制御することで形態形成に関与する可能性を示唆した。

## 研究成果の概要 (英文)：

In the liverwort, *Marchantia polymorpha*, the transition from vegetative into reproductive phase is repressed under white fluorescent light, but we found that *M. polymorpha* rapidly develops into reproductive phase under far-red-rich light conditions. A series of reverse genetic approaches indicated that Pfr-type *Mpphy* represses the growth phase transition from vegetative to reproductive. I have also got several results suggesting that *Mpphy* was functional in the nucleus, and also alternate morphogenesis directly or indirectly through regulation of cell division.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 基礎生物学 植物分子生物・生理学

キーワード： 環境応答

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物のライフサイクルにおいて、最も重要なイベントは栄養生長相から生殖生長

相への転換である。動くことの出来ない植物は、異なる個体間での交配を可能にするため、適切な生殖生長相移行時期を認識する精巧

な制御機構を進化させてきた。中でも日長と光質は、生殖生長相への転換時期を決定する上で、重要な環境因子である。植物における生殖生長相移行メカニズムの研究は、主に顕花植物をモデルとして行われてきた。しかしながら顕花植物では、光受容体が重複して存在し、花芽形成を促進するフィトクロムと抑制するフィトクロム両方が存在するなど、光受容体の機能分化が進んでおり、光受容体の働きと生長相転換の関係は極めて複雑である。そのため陸上植物の生長相転換制御における光受容体の働きについて、統一的な理解には至っていない。

(2) 陸上植物進化の基部に位置する苔類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) は、雌雄異株であり、雄株、雌株でそれぞれ異なる形状の生殖器官を発生させる。実験室における培養条件、22°C、 $\sim 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の連続白色光 (蛍光灯) 照射下では生殖器官を形成しない。野外では、長日条件に応答し生殖生長相に移行すること (Amer J Bot 12, 307-18, 1925)、また長日条件においても、蛍光灯 (遠赤色光を含まない) ではなく、白熱灯 (遠赤色光を含む) 照射によってのみ生殖器官を形成すること (Phytochem Phytobiol 5, 441-7, 1966) が報告されていた。

(3) 近年、申請者らの研究により連続白色光 (蛍光灯) 照射に加え、 $15\sim 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の遠赤色光 (LED) を連続的に照射することにより、生殖器官が形成されることが判明した。さらに赤色 LED 光+暗黒の繰り返しパルス (間歇) 照射では栄養生長を続けるのに対して、赤色 LED 光照射後に遠赤色 LED 光照射+暗黒の繰り返しパルス (間歇) 照射より生殖生長相に移行することが観察された。これらの結果は、赤色光/遠赤色光受容体であるフィトクロムがゼニゴケ生長相転換制御の重要因子であることを示唆していた。

(4) ゼニゴケからフィトクロム遺伝子を単離し、ゲノム中に1コピーのみ存在すること、一次構造や光可逆性といった *in vitro* での機能は高等植物のフィトクロムと良く似ていることが調べられた。

(5) 連続白色光照射条件下においても生殖器官を形成する変異株 *bonobo* が単離された (Sex. Plant Reprod. 16, 253-7, 2004)。変異株 *bonobo* は *MpPHY* 遺伝子に異常はなく、生殖生長相への転換制御のみに影響がある。また遠赤色光の照射なしに、生殖生長相に移行することから、フィトクロムによる生長相転換制御のシグナル伝達経路に異常があると考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) 基部陸上植物ゼニゴケをモデルとし、光情報による生長相転換制御の分子メカニズムを解析する。

## 3. 研究の方法

(1) *MpPHY* 遺伝子の過剰発現、機能改変、発現抑制などの逆遺伝学的手法

(2) 蛍光タンパク質を用いた細胞内タンパク質挙動の観察およびライブイメージング

## 4. 研究成果

(1) 生長相転換制御におけるフィトクロムの機能を解析するため、ゼニゴケフィトクロム遺伝子 *MpPHY* に着目した逆遺伝学的解析を行った。まず光可逆性を失い恒常的に活性型として機能する点変異を導入した *MpPHY*<sup>241H</sup> 発現コンストラクトを作成し、ゼニゴケに形質転換した。野生株や *MpPHY* 発現株は、遠赤色光補光条件において生殖成長へと移行するのに対し、*MpPHY*<sup>241H</sup> 発現株は、遠赤色光補光条件においても生殖生長へ移行しない結果を得た。

さらに RNAi による *MpPHY* の発現抑制コンストラクトを作製し、ゼニゴケに形質転換した。作製した *MpPHY*RNAi 株では、*MpPHY* 遺伝子の転写産物が顕著に減少していた。野生株は連続白色光照射条件において生殖生長へと移行しないが、*MpPHY*RNAi 株では、連続白色光照射条件において生殖成長へと移行する株が複数得られた。このことからゼニゴケにおいて、活性型フィトクロムが栄養生長から生殖生長への移行を抑制しているモデルが考えられた (図1)。

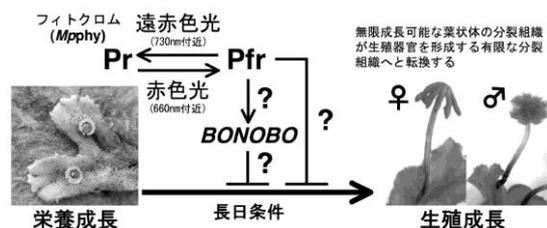


図1: 基部陸上植物ゼニゴケにおけるフィトクロムによる生長相転換制御モデル

顕花植物においても、フィトクロムは、花成制御の重要因子の一つとして古くから知られ、フィトクロムBの変異体は生殖生長への移行が早まる早咲きの表現型を示す。約4億年以上前に分岐した苔類ゼニゴケと顕花植物に、共通する生長相転換制御の機構を見出すことができたことは大変興味深い。今後、顕花植物よりもシンプルな制御系を持つと考えられるゼニゴケをモデルに、光情報から生長相転換制御の分子メカニズムの解析が進むと期待される。

(2) ゼニゴケの形態形成制御の中で、フィトクロムがどのように機能するのか、さらに詳細に解析した。まず蛍光タンパク質 *Citrine* を *MpPHY* および *MpPHY*<sup>X241H</sup> に融合し発現させるコンストラクト *MpPHY::Citrine* および *MpPHY*<sup>X241H</sup> *::Citrine* を作製し、ゼニゴケに形質転換した。まず *MpPHY::Citrine* 形質転換株は、暗所および遠赤色光照射条件において細胞質に蛍光が観察され、白色光または赤色光を照射すると、数時間で核内部にドット状の蛍光が観察された。また *MpPHY*<sup>X241H</sup> *::Citrine* 発現株では暗所および遠赤色光照射条件においても核内部にドット状の蛍光が観察された。ゼニゴケのフィトクロムは赤色の光を吸収すると Pfr 型に、遠赤色光を吸収すると Pr 型に相互変換される(図 1)。この細胞内局在の結果から、*Mpphy* は光質により細胞内局在を変えること、不活性型である Pr 型は細胞質に主に局在するが、赤色光を吸収し活性型である Pfr 型になると核に移行する(図 2)ことが示された。

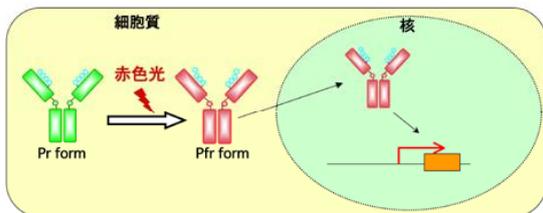


図 2 : *Mpphy* は赤色光により核へ移行する

(3) 赤色光が細胞分裂や分裂組織の形成に与える影響を解析するため、ヒストン H2B サブユニット遺伝子に蛍光タンパク質 *tdTomato* を融合させた遺伝子 *H2B::tdTomato* をゼニゴケに形質転換し、染色体動態を可視化した。その結果、葉状体切断面からの再生過程において細胞分裂頻度の増加が赤色光依存的に生じ、その効果が遠赤色光により打ち消されることを確認した。

さらに野生株および *MpPHY*<sup>X241H</sup> 発現株について、フローサイトメトリーにより核 DNA 量を評価した。野生株では、生長初期では 1C の細胞のみが顕著であるのに対し、白色光下培養 3 週間後には成長にともなう核相の上昇が進み、ほぼ 2C の細胞のみとなった。一方 *MpPHY*<sup>X241H</sup> 発現株では、3 週間後においても 1C の細胞が 2C の細胞と同程度存在していた。このことから、ゼニゴケの成長後期においては細胞が核相 2C である細胞周期 G2 期で停止すること、活性型 *Mpphy* が G2 期から M 期の移行を正に制御している可能性が考えられた。

以上を総合して、このように、苔類ゼニゴケのフィトクロムが主として核で機能し、細胞分裂の間接的/直接的制御を行うことで、ゼニゴケの生長相転換を制御することが示

唆された(図 3)。今後、フィトクロム直下の生長相転換制御因子の解析を進めることで、光情報による植物形態形成メカニズムの理解が深まると期待される。

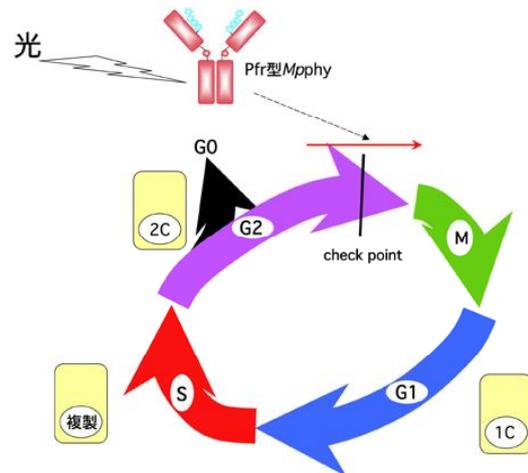


図 3 : 苔類ゼニゴケにおいてフィトクロムは細胞周期を間接的/直接的にコントロールすることで形態形成を制御する

## 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 5 件)

- ① Tougane K., Komatsu K., Bhyan S.B., Sakata Y., Ishizaki K., Yamato K.T., Kohchi T., and Takezawa D. Evolutionarily conserved regulatory mechanisms of abscisic acid signaling in land plants: characterization of ABSCISIC ACID INSENSITIVE1-like type 2C protein phosphatase in the liverwort *Marchantia polymorpha.*, *Plant Physiology* 152, 査読有、2009、1529-1543
- ② Era A., Tominaga M., Ebine K., Awai C., Saito C., Ishizaki K., Yamato K.T., Kohchi T., Nakano A., and Ueda T. Application of Lifeact reveals F-actin dynamics in *Arabidopsis thaliana* and the liverwort, *Marchantia polymorpha.*, *Plant and Cell Physiology* 50, 査読有、2009、1041-1048
- ③ Ohyama K., Takemura M., Oda K., Fukuzawa H., Kohchi T., Nakayama S., Ishizaki K., Fujisawa M., and Yamato K. Gene content, organization and molecular evolution of plant organellar genomes and sex chromosomes: insights from the case of the liverwort *Marchantia polymorpha.*, *Proceeding of the Japan Academy Series B* 85, 査読有、2009、108-124
- ④ Ishizaki K., Chiyoda S., Yamato K.T., and

Kohchi T. Agrobacterium-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology., *Plant and Cell Physiology* 49, 査読有、2008、1084-1091

- ⑤ Chiyoda S, Ishizaki K, Kataoka H, Yamato KT, and Kohchi T. Direct transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. by particle bombardment using immature thalli developing from spores., *Plant Cell Report* 27, 査読有、2008、1467-1473

〔学会発表〕(計8件)

- ① 保坂将志、石崎公庸、井上佳祐、片岡秀夫、大和勝幸、松永幸大、河内孝之、苔類ゼニゴケを用いたフィトクロムを介する細胞応答の調節機構の解析、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18-21日、熊本
- ② 増田晃秀、石崎公庸、大和勝幸、河内孝之、苔類ゼニゴケにおける分子遺伝学の基盤整備 V: 核ゲノム情報解析と T-DNA タグライン、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18-21日、熊本
- ③ 石崎公庸、増田晃秀、友金寛和 大和勝幸、河内孝之、基部陸上植物ゼニゴケにおける分子遺伝学の基盤整備、第82回日本生化学会大会、2009年10月21-24日、神戸
- ④ 保坂将志、片岡秀夫、石崎公庸、大和勝幸、河内孝之、苔類ゼニゴケのフィトクロムを介する光応答、第82回日本生化学会大会、2009年10月21-24日、神戸
- ⑤ 石崎公庸、千代田将大、大和勝幸、河内孝之、苔類ゼニゴケをモデルとしたオルガネラ研究の可能性、第11回植物オルガネラワークショップ、2009年3月20日、名古屋
- ⑥ 保坂将志、片岡秀夫、石崎公庸、大和勝幸、河内孝之、苔類ゼニゴケのフィトクロムを介する光応答、第50回日本植物生理学会年会、2009年3月21-24日、名古屋
- ⑦ 石崎公庸、湯川嘉康、増田晃秀、大和勝幸、河内孝之、苔類ゼニゴケにおける分子遺伝学の基盤整備 IV <Gateway バイナリーベクターと T-DNA タグライン>、第50回日本植物生理学会年会、2009年3月21-24日、名古屋
- ⑧ Ishizaki K., Functional analysis of phytochromes in the liverwort *Marchantia polymorpha*., 4th Asia Oceania Conference on Photobiology, 2008年11月26日、Varanasi India

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0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  
なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石崎 公庸 (ISHIZAKI KIMITSUNE)  
京都大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号：00452293

(2) 研究分担者

なし ( )  
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )  
研究者番号：