

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06705

研究課題名(和文) フィトクロム分子種の機能分化の分子基盤解明

研究課題名(英文) Functional differentiation of phytochrome molecular species

研究代表者

長谷 あきら (Nagatani, Akira)

京都大学・理学研究科・名誉教授

研究者番号：40183082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：フィトクロムのphyAとphyBの間には大きな性質の違いがある。本研究において我々は、phyAで見られる光高感度化が、フィトクロム分子内の舌構造と呼ばれる小領域に起因することを、phyA/phyBキメラ分子やアミノ酸置換分子の生理機能を解析することで明らかにした。さらに、フィトクロム分子の系統解析を行い、この構造変化が被子植物が分岐した後に生じたこと推定した。加えて、phyAによる避陰応答抑制には、高感度化は不要で、別のドメインの働きよることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は光環境を感知し適切に応答する能力を発達させてきた。本研究により、植物特有の光受容体であるフィトクロム分子において、そのアミノ酸配列を一部変換するだけで例えば光感度などの性質を大きく変化させることができることが示された。この結果は、進化的、生態学的側面から興味深いだけでなく、フィトクロム分子を植物生産向上に応用する上でも、またフィトクロム分子を光受容体として取り出して利用する上でも重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Phytochrome is a plant photoreceptor regulating a wide range of physiological processes. PhyA and phyB are two major molecular species of phytochrome, which share similar structures but respond to light quite differently.

By analyzing hybrid molecules between phyA and phyB, we have identified a few amino acid residues that are critical to determine the light sensitivity of phytochrome. A phylogenetic analysis inferred that modification of these residues occurred after branching of angiosperm plants. In addition, we have found that the phyA N-PAS domain confers responsiveness to continuous light irradiation independent of the Pr/Pfr spectral states.

These findings proved deeper insights into how plants cope with environmental changes by modifying the structure of sensor molecules. The knowledge would help to develop various applications of phytochrome.

研究分野：植物生理学

キーワード：フィトクロム 分子種 舌構造 N-PASドメイン 光感度調節 避陰応答抑制 植物進化 野外光環境

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の主要な光受容体フィトクロムには phyA と phyB という機能が大きく異なる分子種が存在する。植物は進化の過程で、両者のアミノ酸配列の一部を変化させ両者による機能分担を実現した。phyA の生理機能については不明の点が多かったが、植物が作る日陰で phyB が不活性化されることによって生じる「避陰応答」を phyA が逆に抑制することや、花芽形成を phyB とはおそらく別経路で制御していることなどが明らかにされ、注目を集めていた。

我々は、フィトクロムの構造機能解析に長年にわたり取り組んできた。すでに、シロイヌナズナの *phyAphyB* 欠損変異体において、様々な変異を導入した phyA や phyB タンパク質を発現させ、その生理機能を様々な光条件下で検定する実験系を確立し、様々な解析を行ってきた。中でも本研究に関係する成果として、phyA と phyB の分子をいくつかのドメインに分け、それを交換したキメラ分子を網羅的に作成し、phyA と phyB の機能の違いが、フィトクロム分子内のどのドメインに由来するかを明らかにした (Oka et al., 2012)。

フィトクロムの原子レベルでの分子構造については、長い間謎のままであったが、バクテリア由来のフィトクロムの結晶構造に続いて植物由来のフィトクロムの結晶構造も明らかにされ、フィトクロムにおいても原子レベルでアミノ酸残基と分子機能の関係について議論することが可能になった。上記の成果との関連でいえば、phyA を光高感度化する PHY ドメインが、一次構造上は離れた発色団ポケットと相互作用しうることが明らかになり、変異導入フィトクロムに関して我々が得た知見を新しい光のもとに解釈することが可能となった。

さらに、様々な植物種でゲノム配列や発現遺伝子の配列が網羅的に解読され、フィトクロムの一次構造の多様性について膨大なデータが集積された。このことにより、例えば特定の部位にあるアミノ酸残基が進化の過程でどのように変化してきたかをたどることが可能になり、その生理生態学的意義について議論することが可能になった。

フィトクロムの分子レベルでの情報伝達機構についても、多くの知見が集まりつつあった。フィトクロムの下流の因子としては、PIF と呼ばれる転写因群が関わることを示された。PIF 転写因子は、光形態形成を負に制御する因子であり、光で活性化されたフィトクロムは、核内でこの PIF 転写因子を分解することで光形態形成を促進する。さらに、PIF とは逆に光シグナルを促進する転写因子 HY5 とそれを分解する COP1 で構成されるシグナル系に対しても、PIF を介する経路や PIF とは独立の経路でフィトクロムからシグナルが流れることが示されつつあった。

2. 研究の目的

phyA と phyB は N-末端側から順に、N-PAS、GAF、PHY、C-末端側領域という基本構造を取る。我々はこれらのドメインについて phyA と phyB の間で交換実験を行い、phyA がもつ特異な活性について、遠赤色光下での核移行には N-PAS ドメインが、赤色光下での分解には N-PAS と GAF ドメインが、光高感度化には PHY ドメインが関わることを見出している。そこで本研究では、PHY ドメインによる光高感度化について、phyA 配列と phyB 配列で部分置換をやアミノ酸残基置換を進め、高感度化に関わるアミノ酸残基を明らかにし、立体構造上にマップすることで、その分子構造的な作用機構について考察する。さらに、これらの解析で明らかになったアミノ酸残基や部分構造について、広く様々な植物種でどのように保存され変化しているかを明らかにし、phyA 機能が進化した道筋について考察する。

また、これまで作成したドメイン交換システムを用いて、まだ解析の進んでいない phyA 機能について、それがどのドメインの phyA 配列によってもたらされるかを検討する。対象とする生理機能としては、温度応答、花芽形成制御、避陰応答抑制などとする。以上に加えて、phyA の野外における機能についても調べる。研究のこの部分は、長年にわたりシロイヌナズナの近縁種であるハクサンハタザオの野外トランスクリプトーム解析を行っている京都大学・生態学研究センターの工藤洋教授らと共同で行う。すでに博士らは数年分の光強度の推移とトランスクリプトーム解析の結果を取得しており、本研究ではこれを用いて、phyA が野外で作動していることが確認できるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 植物材料; シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) Landsberg erecta 株 (Ler) を用いて全ての実験を行った。形質転換の親株には *phyA-201phyB-5* 二重変異体 (Ler 背景) (Jason W. Reed, 1994) を用いた。phyAphyB ドメインスワップ株の一部は、岡等が作出した株 (Oka et al., 2012) を用いた。その他の形質転換株は本研究で作出した。

(2) 変異導入フィトクロム遺伝子による形質転換; 本研究で作出した形質転換株は、1) PHY ドメイン内をさらに 3 部位に分けて phyAphyB ドメインスワップを行った株、2) PHY ドメイン内の舌構造におけるアミノ酸置換株である。用いた株の概要を図 1 に示す。形質転換用プラスミドは、pPZP211 をベースに常法に従って構築した。C-末端側には GFP 配列を融合させた。植

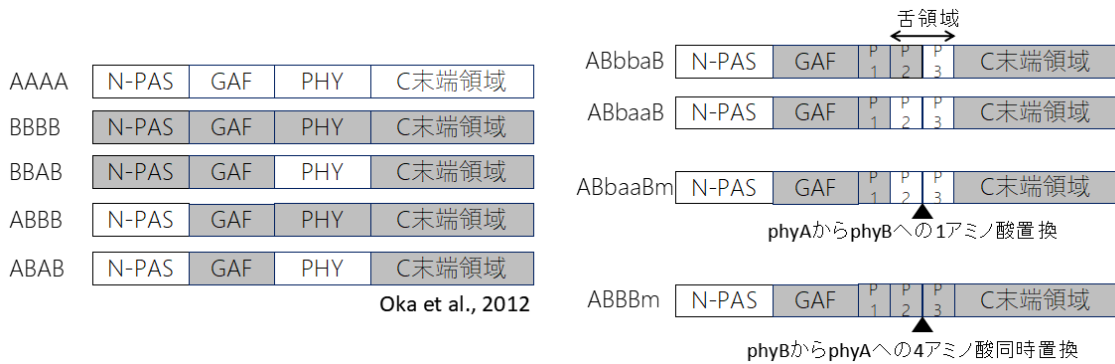


図1;形質転換に用いたプラスミド

物の形質転換は、floral-dip 法により *phyA-201phyB-5* 二重変異体に対して行った。得られた系統から、発現量が適切なものを選抜し実験に用いた。

(3) 生理機能解析; 光処理の光源は、赤色、青色、遠赤色光 LED 光源を適宜混合して用いた。通常の栽培は白色蛍光灯下で行った。胚軸長は、寒天培地上に播種し 5 日間光処理したのち測定した。花芽形成については、白色光で植物を生育させ、花芽形成後が認められた日数を記録した。GFP 観察は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。導入フィトクロムのタンパク質検出は、抗フィトクロム単クローン性抗体を用いた western blot 法により行った。

(4) 系統学的配列解析; フィトクロムの系統解析は、Li et al., 2015 で報告されたフィトクロム配列をもとに、注目するアミノ酸残基について系統毎の推移を調べ、必要に応じて他のゲノム情報を参照した。

(5) 野外トランスクリプトーム解析; ハクサンハタザオの野外トランスクリプトーム解析については、長期フィールド研究サイトにおいて Kudoh et al. (2018 等) が得たデータの供与を受け行った。データ解析には、R 言語および各種 library を用いて行った。予備的な光環境測定は、ハクサンハタザオの自生地において、携帯スペクトル測定器、自動照度測定器などを用いて行った。

4. 研究成果

(1) phyAphyB 間配列交換による光高感度化領域の絞込み

phyA の PHY ドメイン配列にフィトクロムを光高感度化する働きがあることがすでに知られていた (Oka et al., 2012)。フィトクロムの立体構造を見ると、この PHY ドメイン内からは、舌構造と呼ばれる突出部が発色団を結合した GAF ドメインに対して伸び出ている。フィトクロムの活性状態を左右する発色団に対して伸び出たこの構造が関与すると推定し、舌構造を phyB 配列から phyA 配列に置き換えた改変フィトクロムを発現させ、それが示す光感度を測定した。その結果、高感度化には舌構造全体が phyA 配列である必要があった。以上により、PHY ドメイン内の光高感度化領域を舌構造まで絞り込むことができた。

(2) アミノ酸置換による光高感度化に関与するアミノ酸残基の特定

舌構造内のどのアミノ酸残基が光高感度化に関与するかを調べるため、多くの phyA の舌構造配列で保存され、phyB では変異しているアミノ酸残基を特定し、そのうちの 9 個について、一つ一つ phyB 配列のアミノ酸残基に置き換えた改変フィトクロムを構築し、形質転換植物で発現させ、その光感度を測定した。その結果、4 つのアミノ酸残基で部分的な光感度の低下が観察された。次に、これら 4 つのアミノ酸残基にフィトクロムを高感度化する働きがあるかどうかを確認するため、phyB の舌構造に 4 つのアミノ酸置換を同時に導入した改変フィトクロムを構築し発現させた。その結果、4 つのアミノ酸残基を置換するだけで、phyA の PHY ドメインが示す高感度化機能を概ね回復することができた。以上により、PHY ドメインによる光高感度化に関わる重要な 4 アミノ酸残基を特定することができた。

(3) 光高感度化に関わるアミノ酸の系統解析

上記の 4 アミノ酸残基が、フィトクロムが進化する過程でどのように変遷してきているかを、系統的に多様な既知フィトクロム配列を広範囲に比較することで検討した (図 2)。種子植物におけるフィトクロムは、大きく PHYA/N, PHYC/Q, PHYE/P の 3 ファミリーに別れる。phyA と phyB に光感度上の変化をもたらしたアミノ酸置換は、比較的最近、種子植物が被子植物と裸子植物に分岐した後に祖先配列から変化

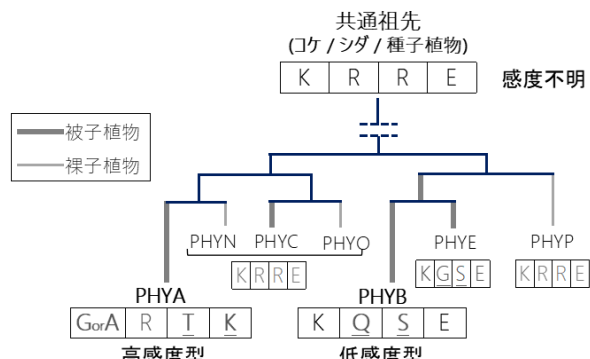


図 2; 感度調節に関わるアミノ酸残基の進化

したことで生じたことが推定された。興味深いことに、4 残基のうち第 1 , 第 4 残基の置換は被子植物の phyA でのみ見られたが、一方、第 3 残基では phyA と phyB の両方で祖先配列からの変化が見られ、第 2 残基では phyB でのみ置換が起こっていた。以上の結果、おそらく中程度の感度をもつ保存された舌構造が、phyA では高感度化の方向へ、phyB では低感度化の方向へ変化したのではないかと想像される。これらの変化が、被子植物の進化にどのように寄与したのが興味深い。

(4) phyA の N-PAS ドメインが示す避陰応答抑制機能の解析

phyB が温度応答のセンサーとして機能することが報告され注目を集めた。そこで本研究では、ドメイン交換フィトクロムについて温度応答を調べ、どのドメインが温度感知に関わるかを明らかにしようとした。しかしながら、予備実験において、温度応答を簡便に検出する条件を見つけることができず、この計画は断念した。次に、花芽形成について調べたところ、N-PAS が関わることを示唆する結果を得たが、明確な結果を得るには至らなかった。そこで、3 つめの phyA の生理機能である避陰応答に対する抑制活性について調べ、以下の結果を得た。

植物の陰においては、R:FR が低下することをフィトクロムが感知し、茎の伸長促進をはじめとしたいわゆる避陰応答が引き起こされる。これは、フィトクロムの光平衡が不活性型に偏るためとされている。phyA、phyB 単独変異体や二重変異体を用いた解析から、phyA には低 R:FR 条件下で避陰応答を抑制する働きがあることが示されている。我々は、この phyA 特殊機能に高感度化が関わると想定していた。しかしながら、本研究において様々な phyAphyB キメラフィトクロムでこの応答を比較したところ、低感度型であるキメラフィトクロムにおいても、N-PAS ドメインが phyA 型であれば避陰応答抑制を起こすのに十分であることを見出した。そこでパルス光照射の実験などを行った結果、この避陰応答抑制には、連続光の照射が必要であることがわかった。すなわち、phyA の N-PAS ドメインには、連続光を何らかの機構で感知し Pr/Pfr 光変換とは独立してシグナルを発信するような機能をフィトクロムに付与することが示唆された。これは、従来の Pfr 型フィトクロムがシグナルを発信するという考え方とは異なり、非常に興味深い。

(5) 野外における phyA 応答の検出

上記の phyA による避陰応答の抑制は、主に実験室内における人工光のもとで行われた実験結果に基づく。しかしながら、自然条件下で生育する植物でこのような応答がみられるかどうかは、不明である。そこで、シロイヌナズナの近縁であるハクサンハタザオの野外集団の分子応答を解析している京都大学・生態学研究センターの

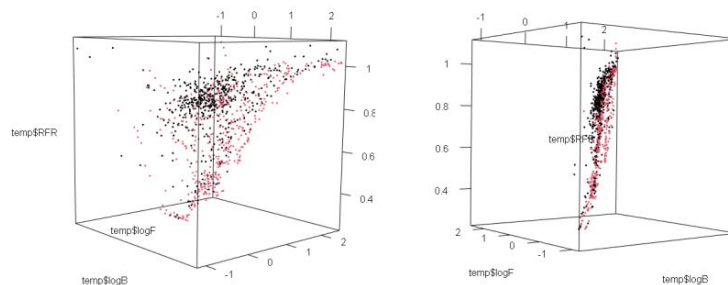


図 3; 野外における logFR, logB, R/FR 値の三次元プロット

工藤洋教授らとの共同研究を開始した。まず、ハクサンハタザオの生息地で光環境測定を行ったところ、R/FR 比が低下するのは晴天時に限られ、比較的まれな条件であることがわかった (図 3)。現在、工藤らが取得した野外トランスクリプトームデータと照度データをもとに、phyA のシグナル伝達に関わる遺伝子の発現が野外でどのように変動するかを調べている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ikeda Hajime, Suzuki Tomomi, Oka Yoshito, Gustafsson A. Lovisa S., Brochmann Christian, Mochizuki Nobuyoshi, Nagatani Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 Divergence in red light responses associated with thermal reversion of PHYTOCHROME B between high and low latitude species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.17381	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長谷あきら、伊東杏花里、杉阪次郎、本庄三恵
2. 発表標題 野外に生育するハクサンハタザオの光応答の季節性
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会、札幌（オンライン）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長谷あきら、伊東杏花里、杉阪次郎、本庄三恵
2. 発表標題 ハクサンハタザオが野外で経験する光環境変動とそれに対する応答
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会、京都
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akira Nagatani, Misato Kikuchi, Yukiko Yoshikawa, Kanako Shinohara, Tomomi Suzuki, Nobuyoshi Mochizuki
2. 発表標題 The Origin of the Phytochrome A Functions
3. 学会等名 19th Congress of the European Society for Photobiology, Salzburg (on line) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kanao Shinohara, Nobuyoshi Mochizuki, Tomomi Suzuki
2. 発表標題 Suppression of the shade avoidance response by the N-PAS domain of phyA
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会、つくば（オンライン）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷あきら
2. 発表標題 フィトクロムが相分離して形成される細胞質と核のphotobody
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関