

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770035

研究課題名（和文） フィトクロムによる植物成長相転換制御の基本メカニズム

研究課題名（英文） Phytochrome-mediated 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）：

陸上植物は、光情報（日長、光質）を感知して栄養成長から生殖成長への総転換を制御する。本研究は、植物の赤色光・遠赤色光受容体フィトクロムによる成長相転換調節の基本プログラムとその進化を理解することを目的とし、現存する種の中で、陸上植物進化の基部に位置する“苔類ゼニゴケ”をモデルとし研究を行った。ゼニゴケのフィトクロムが核で機能し、遺伝子発現を制御することを示す結果を得た。ゼニゴケのフィトクロムが転写因子 *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF)* の相同遺伝子を介して光応答を制御すること、また細胞周期の調節因子サイクリン D の発現調節に関わることを示唆する結果を得ている。フィトクロムによる核内遺伝子発現を介した細胞分裂制御が、ゼニゴケの成長相転換制御に関与する可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

Plants regulate their growth phase transition in response to light environment such as day-length and light qualities. We focused on a red/far-red receptor, phytochrome, as a key regulator of growth phase transition, and investigated the phytochrome-mediated signaling mechanism in the liverwort *Marchantia polymorpha*. We showed that phytochrome is translocated to nucleus in response to light. A series of transgenic approaches suggested that phytochrome regulates gene expression via a homologue of transcription factor, *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF)*. Our results also implied that the active-form phytochrome up-regulated the expression cyclin D, a core regulator of cell cycle progression. Taken together, phytochrome in *Marchantia* could regulate the growth phase transition by regulating, possibly via PIF, the nuclear gene expression of cell cycle gene such as cyclin D.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
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・植物分子生物学・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子孫を残すための栄養成長相から生殖成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、適切な生殖成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、植物において生殖成長相転換のタイミングを決定する上で、重要な環境因子である。シロイヌナズナやイネにおいて、フィトクロムによる花成制御機構が精力的に研究されて来た。シロイヌナズナには、A から E の 5 つのフィトクロム分子種が存在し、花成応答においては、phyA が促進的に、phyB が抑制的に機能することが知られている。これまでフィトクロム下流の成長相転換制御因子として花成ホルモン FT が報告されている。しかし顕花植物における光シグナル伝達は複雑であり、フィトクロムから FT に到る花成制御の分子機構は未だ解明されていない。

(2) ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) は、陸上植物進化の基部に位置し、半数体優勢の生活史や遺伝的冗長性の低さなど、分子遺伝学の実験モデルとして数々の利点を備えている。近年、ゲノム解析プロジェクトが始動したことに加え、申請者によりアグロバクテリウムを介した高頻度形質転換系 (*Plant Cell Physiol* 49, 1084-91, 2008) や、ジーンターゲット法など、分子レベルの実験基盤が急速に整備されてきた。

(3) 雌雄異株のゼニゴケは、栄養成長時には雄株、雌株で形態的な差異はないが、生殖成長へと移行すると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、40-50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 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ตอบสนองし生殖成長相に移行すること、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)照射によって生殖器官を形成することが報告されていた。

(4) 申請者らの研究により、連続白色光(蛍光灯)照射に加え、15~40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 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)照射では栄養成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)照射より生殖成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成長相転換制御の重要

因子であることを示唆している。

(5) 申請者らにより、ゼニゴケのフィトクロム遺伝子(*MpPHY*) が単離され、ゲノム中に 1 コピーしか存在しないこと。その一次構造と *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明らかとなった。また恒常的活性型 *Mpphy* 発現株および *MpPHY* 発現抑制株を用いた解析により、ゼニゴケにおいて、活性型フィトクロムが栄養成長から生殖成長への転換を抑制するモデルが推定された。

2. 研究の目的

ゼニゴケの成長相転換におけるフィトクロム機能メカニズムを解明する。そのためフィトクロムによる、ゼニゴケ形態形成制御の分子メカニズムを解析する。

3. 研究の方法

(1) *Mpphy* 特異的抗体の作出と、それを用いた *Mpphy* 諸性質の解析

(2) 蛍光タンパク質を用いたフィトクロム細胞内挙動の観察

(3) 逆遺伝学的解析によるフィトクロム下流シグナル伝達因子の単離と機能解析

(4) 細胞分裂の主要制御因子の単離と、フィトクロム制御に関する解析

4. 研究成果

(1) *Mpphy* 特異的抗体を用いて *Mpphy* タンパク質の安定性評価を行った。*Mpphy* タンパク質の蓄積量が暗所において増加し、明所でも比較的安定に存在する被子植物における II 型フィトクロムに近い性質を持つことを見出した。

(2) *35Spro::MpPHY-Citrine* 発現株を用いた細胞内局在化移籍により、*Mpphy* が赤色光だけでなく、遠赤色光や青色光にもตอบสนองして短時間で核内に移行することを示した。(1)の結果と総合し、ゼニゴケフィトクロムが光に安定な II 型フィトクロムの性質と、赤色光のみならず遠赤色光や青色光にもตอบสนองして核移行する I 型フィトクロムの性質も併せ持つことが示唆された。

(3) *Mpphy* の核内でのシグナル伝達機構に関与すると考えられる、ゼニゴケ PIF3 相同遺伝子 (*MpPIF-like*; *MpPIL*) の単離と機能解析を行った。*MpPILpro::GUS* 発現株を用いた発現組織解析を行ったところ、*MpPIL* の発現組織は *MpPHY* の発現組織と重複していた。また、*MpPIL* 過剰発現株、および *MpPIL* ノックアウト株を作出し、野生株および恒常活性型 *Mpphy*^{Y241H} 発現株とともに無性芽から葉状体

への形態形成について解析を行った。*MpPIL* 過剰発現株では赤色光下や青色光下において野生株より立ち上がって慎重成長した表現型を示した。一方 *MpPIL* ノックアウト株では赤色光下において野生株と大差ない表現型を示した。これに対し青色光下においては光の照射方向に伸長せず、葉状体が扁平に成長した。さらに、遠赤色光下において、無性芽が成長を開始し、扁平に成長した。これらの表現型は *Mpphy*^{Y241H} 発現株の表現型に類似しており、*MpPIL* がゼニゴケの赤色光シグナル伝達機構を負に制御する因子であることが示唆された (図1)。

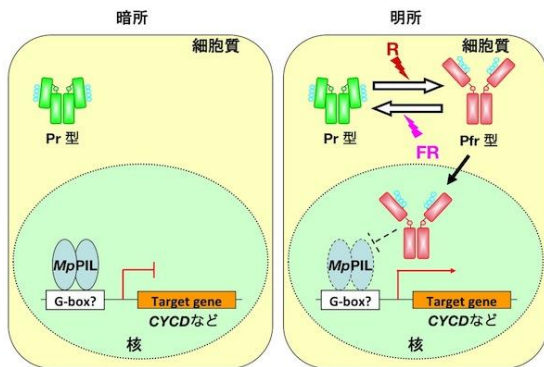


図1、フィトクロムによる核内転写制御
フィトクロムは光照射により核内へ移行し、転写抑制因子 PIL に作用して下流遺伝子の転写を制御するモデルが推定された。

以上から、光形態形成を負に制御する転写因子を介したフィトクロムシグナル伝達機構が陸上植物進化の最も基部に位置する苔類の時点で既に獲得された形質であることが明らかとなった。

(4) ゼニゴケのゲノム・EST データベースを用いて代表的な細胞周期制御因子の探索を行った。その結果、B タイプサイクリンが2種見つかリ、*CYCB;1* には分解認識配列の Destruction box があるが *CYCB;2* にはないことがわかった。それ以外の *CDKA*, *CDKB*, *CYCA*, *CYCD*, *E2F*, *DEL*, *DP*, *RBR*, *KRP*, *CCS52* はそれぞれ1分子種のみ存在することが推測された。各遺伝子について、その他植物の相同遺伝子と配列比較を行ったところ、ゼニゴケのほとんどの細胞周期遺伝子はその他植物と同様に保存モチーフや機能ドメインを保持していることが明らかとなった。以上のことから、ゼニゴケにおいても基本的な細胞周期制御機構が存在することが示唆された (図2)。

	被子植物		シダ(小葉類)		コケ植物	
	<i>A. thaliana</i>	<i>S. moellendorffii</i>	<i>P. patens</i>	<i>M. polymorpha</i>		
<i>CDKA</i>	1	1	2	1		
<i>CDKB</i>	4	2	7	1		
<i>CYCA</i>	10	3	8	1		
<i>CYCB</i>	11	1	2	2		
<i>CYCD</i>	10	3	2	1		
<i>RBR</i>	1	2	3	1		
<i>E2F</i>	3	2	4	1		
<i>DP</i>	2	1	3	1		

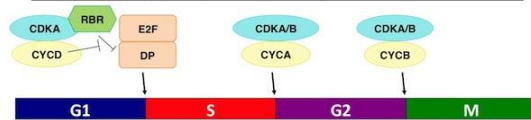


図2、ゼニゴケにおける細胞周期制御因子
ゼニゴケゲノム情報から、細胞周期制御の主要因子を探索した。ゼニゴケは植物と同様であるが冗長性の低い細胞周期制御システムを持つことが示唆された。

次に、ゼニゴケ細胞周期遺伝子の発現を赤色光が制御しているかどうかを検討した。まず、白色光下で培養したゼニゴケ葉状体において、遠赤色光照射とそれに続く暗処理により、*CYCD* (推定 G1 サイクリン)、*CYCB;1* (推定 G2 サイクリン) の発現がほぼ完全に抑制されることを見出した。この状態から赤色光を短時間照射すると、*CYCD* の発現が2時間以内に誘導されること。*CYCB;1* の発現は、*CYCD* の発現上昇よりも遅れて (6時間以降) 誘導された (図3)。このことから、赤色光はフィトクロムの活性化を通じて、D タイプサイクリンの転写を誘導することにより、静止細胞を細胞周期に進入させることが示唆された。

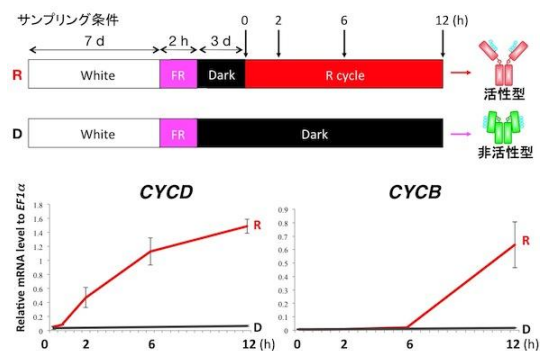


図3、赤色光による細胞周期因子の転写制御

ゼニゴケ葉状体を暗処理後、赤色光 (R) または暗所 (D) で処理し、経時的にサンプリング後、*CYCD* と *CYCB* 遺伝子の RNA 量をリアルタイム PCR 法により計測した。赤色光後短時間で *CYCD* の転写量が上昇していることが明らかとなった。

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6件)

- ① Ishizaki K, Nonomura M, Kato H, Yamato KT, and Kohchi T, Visualization of auxin-mediated transcriptional activation using a common auxin-responsive reporter system in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *JPlant Res* in press, (2012) 査読有 DOI: 10.1007/s10265-012-0477-7
- ② Okumura M, Inoue SI, Takahashi K, Ishizaki K, Kohchi T, and Kinoshita T, Characterization of the plasma membrane H⁺-ATPase in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiol* in press (2012) DOI: dx.doi.org/10.1104/pp.112.195537
- ③ Araujo WL, Ishizaki K, Nunes-Nesi A, Tohge T, Larson TR, Krahnert I, Balbo I, Witt S, Dormann P, Graham IA, Leaver CJ, and Fernie AR, Analysis of a range of catabolic mutants provides evidence that phytanoyl-CoA does not act as a substrate of the ETF/ETFQO complex in *Arabidopsis thaliana* during dark induced senescence. *Plant Physiol* 157, 55-59. (2011) 査読有 DOI: dx.doi.org/10.1104/pp.111.182188
- ④ Araujo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, and Fernie AR, Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trend Plant Sci* 16, 489-498. (2011) 査読有 DOI: 10.1016/j.tplants.2011.05.008
- ⑤ Araujo WL*, Ishizaki K*, Nunes-Nesi A, Larson TL, Tohge T, Krahnert I, Witt S, Obata T, Schauer N, Graham IA, Leaver CJ, and Fernie AR, Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenase as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of *Arabidopsis* mitochondria. *Plant Cell* 22, 1549-1563. (2010) 査読有 *These authors contributed equally to this work. DOI: dx.doi.org/10.1105/tpc.110.075630
- ⑥ Tougane K, Komatsu K, Bhyan SB, Sakata Y, Ishizaki K, Yamato KT, 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 Physiol* 152, 1529-1543. (2010) DOI: dx.doi.org/10.1104/pp.110.

[学会発表] (計6件)

- ① 井上佳祐、中村衣里、保坂将志、石崎公庸、西浜竜一、河内孝之、赤色光は苔類ゼニゴケの細胞分裂を制御する、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月25日、京都・京都女子大学
- ② 井上佳祐、石崎公庸、岡義人、河内孝之、苔類ゼニゴケは転写因子 PIF を介する赤色光シグナル伝達機構をもつ、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月17日、京都・京都産業大学
- ③ 石崎公庸、大和勝幸、河内孝之、遺伝子機能を自在に研究できるモデルヘーゲノム・突然変異体・形質転換-、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月16日、京都・京都産業大学
- ④ 久保田茜、喜多祥吾、久保田佐綾、村中智明、石崎公庸、大和勝幸、青木摂之、小山時隆、河内孝之、基部陸上植物ゼニゴケにおける概日時計関連因子の比較ゲノム解析、第84回日本生化学会大会、2011年9月22日、京都・国際会館
- ⑤ 石崎公庸、井上佳祐、保坂将志、片岡秀夫、大和勝幸、河内孝之、基部陸上植物の光応答-フィトクロムを介した光形態形成の分子機構-日本植物学会第75回大会、2011年9月18日、東京・東京大学駒場キャンパス
- ⑥ Ishizaki K, Matsuda A, Saida Y, Ueda M, Yamato KT, and Kohchi T, Transgenesis of the liverwort *Marchantia polymorpha* and its application to developmental genetics. XVIII International Botanical Congress, 2011年7月25日、Melbourne, Australia

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所・助教
研究者番号: 00452293

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし