

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570065

研究課題名(和文)植物に広く存在する機能未知青色光受容体様LOVタンパク質の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of a putative plant photoreceptor, LLP

研究代表者

笠原 賢洋(Kasahara, Masahiro)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：70361748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：光は、植物が生育環境に適応する上で最も重要な環境情報である。光情報は光受容体によってセンシングされる。植物ではこれまでに数タイプの光受容体が同定され解析がすすむ一方、陸上植物に普遍的に存在するが、生理機能が未解明のLOV/LOVタンパク質(LLP)と名付けた光受容体様タンパク質が存在する。本研究では、ヒメツリガネゴケのLLP遺伝子破壊株を利用したトランスクリプトーム解析などの結果から、LLPは、PHYやCRYのような大規模な遺伝子発現変化を介して光情報を生理現象へ媒介するのではなく、PHOTのように特定のタンパク質の活性調節により、光情報を生理現象へつなげる光受容体であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：For plants, light is one of the most important environmental stimuli to adapt to their growth environment. Plants use several kinds of photoreceptors to sense the light stimuli and the light responses mediated by the photoreceptors have been well characterized. LOV/LOV protein (LLP) consists of two LOV domains showing the typical photochemical properties of well-characterized LOV domains like those in phototropins and is proposed to act as a photoreceptor. However, although LLP is universally distributed in land plants, moss to flowering plant, the physiological function of LLP has not been appeared yet. In this project, the physiological function of LLP was analyzed using LLP disruptants of the moss *Physcomitrella patens*. The results obtained from this project will be important clues for elucidating the function of LLP in plants.

研究分野：生物学

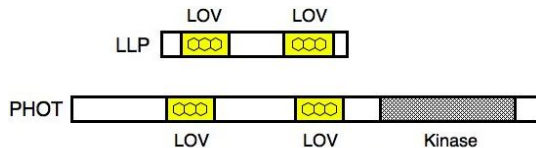
科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：光環境応答

### 1. 研究開始当初の背景

植物は生育環境に適応するために光環境変化を環境情報として利用する。この光情報は光受容体によって受容される。これまでに数種類の光受容体が同定されており、その中でフォトトロピンは、光屈性、葉緑体光定位運動、気孔開口、葉の伸展など、光を効率よく利用して光合成を最適化するための生理反応に働いている。フォトトロピンや ZTL/LKP ファミリータンパク質をはじめ、アカパンカビの WC-1 と VVD、フシナシミドロの AUREO、バクテリアの LOV-HK など、LOV ドメインを光受容部位に持つタンパク質 (LOV タンパク質) が陸上植物から藻類、菌類、バクテリアまで多数見つかっており、光受容体として働いていることが明らかになっている。

シロイヌナズナのゲノムには、フォトトロピンと ZTL/LKP ファミリータンパク質に加え、もう1つ生理機能不明の LOV タンパク質が存在する (図)。この LOV タンパク質をドメイン構造に基づいて LOV/LOV protein (LLP) と名づけた。さらに、LLP が被子植物からコケ植物までに広く存在すること、2つの LOV ドメインそれぞれに FMN が結合すること、フォトトロピンと同様な光反応性を示し、光受容体として働きうるタンパク質であることをトマトとヒメツリガネゴケの LLP で示した。LOV タンパク質の多くが光受容体として働くことから、LLP も光受容体ではないかと推測される。しかし、生理機能の解明には至っていない。



い。

### 2. 研究の目的

LLP が、シロイヌナズナからヒメツリガネゴケまでに存在するという事は、LLP が植物に普遍的な生理現象に働いていると考えられ、LLP の機能の解明が、植物種を越えた共通の光応答メカニズムの発見につながると考えられる。本研究の目的は、LLP の生理機能を解明し、植物の新しい光応答機構を発見することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒメツリガネゴケ *LLP1LLP2* 二重遺伝子破壊株の表現型の解析

ヒメツリガネゴケ *LLP1LLP2* 二重遺伝子破壊株を、光条件や培地成分などを変えて培養し、生育への影響を調べた。

#### (2) ヒメツリガネゴケ *LLP1LLP2* 二重遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析

*LLP* の遺伝子発現調節への関与を調べるために、ヒメツリガネゴケ *LLP1LLP2* 二重遺伝

子破壊株のトランスクリプトームの比較を行った。

野生株と *LLP1LLP2* 二重遺伝子破壊株の原系体を赤色連続光 ( $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で3日間処理し、その後、赤色光の背景で青色光 ( $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) を2時間照射し、青色光照射前と照射後の細胞から RNA を抽出した。次世代シーケンサー (Illumina HiSeq) を用いて転写産物の塩基配列を網羅的に読み、ゲノム配列にマッピングして各遺伝子の転写産物の蓄積量を比較した。

#### (3) MDH の酵素活性に与える LLP の影響の解析

酵母 2 ハイブリッドスクリーニングで、*LLP1* と *LLP2* のいずれとも結合するタンパク質として得られたリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) の酵素活性へ、LLP がどのような影響を与えるかを調べた。まず大腸菌で、ヒメツリガネゴケ MDH、*LLP1*、*LLP2* の組換えタンパク質を発現させ、精製した。MDH と LLP を混ぜ、MDH のリンゴ酸生成反応と逆反応のオキサロ酢酸生成反応の速度を、基質である NADH の 340 nm の吸収の減少、または増加を経時的に測定して調べた。

#### (4) シロイヌナズナを材料とした LLP の解析

シロイヌナズナ LLP の機能解析をすすめるために、LLP プロモーター-GUS ( $P_{LLP}$ -GUS) 株と RNAi による LLP 遺伝子ノックダウン株の構築を行った。pFAST-G04 (インプラントイノベーション社製) の GUS 遺伝子上流に、シロイヌナズナ LLP の上流約 2.6 kb の DNA 配列をプロモーター領域として挿入した。また、pFAST-G03 (インプラントイノベーション社製) のクローニングサイトに LLP ORF 中の約 500 bp の配列を逆向きに繰り返して挿入した。完成した2つのベクターの T-DNA 部分をアグロバクテリウム法でシロイヌナズナゲノムに挿入し、遺伝子組換え株を作製した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒメツリガネゴケ *LLP1LLP2* 二重遺伝子破壊株の表現型の解析

光条件に関して、光強度、光質 (白色光、赤色光、青色光)、明暗サイクル (連続光、長日条件、短日条件)、栄養条件に関して、窒素源 (硝酸塩、アンモニウム塩) の種類と濃度、炭素源 (グルコース) の有無、植物ホルモンの影響に関して、オーキシン、サイトカイニン、ABA の培地への添加、環境ストレスの影響に関して、乾燥処理、低温処理、高塩処理を行い、原系体の生育や茎葉体の形成について観察を行った。その結果、連続明条件下で培養することで、コロニーサイズがわずかに大きくなった。さらに注意深い解析が必要であるが、LLP が原系体の伸長成長に影響を与える可能性が考えられた。

## (2) ヒメツリガネゴケ *LLP1LLP2* 二重遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析

青色光照射前後の野生株と *LLP1LLP2* 二重遺伝子破壊株のそれぞれから約5千万リードの配列データを得た。これらをゲノムデータにマッピングし、それぞれの条件での遺伝子ごとの転写産物量を調べた。その結果、野生株において、651 遺伝子が青色光照射により転写産物量が3倍以上に増加した。*LLP1LLP2* 二重遺伝子破壊株においても同様に転写産物量が増加しており、野生株との顕著な違いはなかった。このことから、LLP は大規模な遺伝子発現変化を介した生理機能調節は行っていないことが明らかとなった。LLP は、シロイヌナズナのクリプトクロム (CRY) やフィトクロム (PHY) のように遺伝子発現調節により光情報を生理現象へとつなげる光受容体として機能するのではなく、むしろフォトトロピン (PHOT) のように特定のタンパク質や酵素の活性を特異的に調節することで、光情報を生理現象へとつなげる光受容体として機能すると考えられた。

## (3) MDH の酵素活性に与える LLP の影響の解析

大腸菌で発現、精製した MDH へ、LLP1 または、LLP2 を加え、MDH のリンゴ酸生成反応と逆反応のオキサロ酢酸生成反応の酵素活性を調べたが、LLP の有無でいずれの活性にも違いは見られなかった。酵母2ハイブリッド解析により、LLP と MDH は暗所で結合し、青色光下で解離するという結果が得られていたことから、青色光照射の影響も調べたが、青色光照射の有無で MDH のいずれの活性にも違いは見られなかった。これらの結果から、LLP1 と LLP2 は、MDH の酵素活性に影響を与えないと考えられた。

## (4) シロイヌナズナを材料とした LLP の解析

LLP プロモーター-GUS ( $P_{LLP}$ -GUS) 株に関し、独立した4ラインを構築した。これらをGUS染色したところ、葉、茎、根、花の全ての器官がGUS染色された。この結果から、LLP はシロイヌナズナのこれらの主な器官で発現していることが示唆された。また葉においては、若い葉で染まり、展開して成熟した葉では染まらなくなることから、若い成長している細胞・組織でLLPが機能することが示唆された。

RNAiによるLLPのノックダウン(LLP-RNAi)株に関しては、現在、独立した14ラインのT<sub>3</sub>世代から今後の解析に使用可能なラインを選抜中である。これまでシロイヌナズナLLPの突然変異株は見つかっておらず、現在選抜中のラインから信頼できるLLP-RNAi株を見つけ出せれば、今後の解析に非常に有用である。

## 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 4件)

著者名: Tsukatani Y., Yamamoto H., Harada J., Yoshitomi T., Nomata J., Kasahara M., Mizoguchi T., Fujita Y., Tamiaki H., 論文表題: An unexpectedly branched biosynthetic pathway for bacteriochlorophyll *b* capable of absorbing near-infrared light, 雑誌名: Sci. Rep., 査読: 有, 巻: 3, 発行年: 2013, ページ: 1217, 10.1038/srep01217

著者名: Suetsugu N., Kong SG., Kasahara M., Wada M., 論文表題: Both LOV1 and LOV2 domains of phototropin2 function as the photosensory domain for hypocotyl phototropic responses in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), 雑誌名: Am. J. Bot., 査読: 有, 巻: 100, 発行年: 2013, ページ: 60-69, 10.3732/ajb.1200308

著者名: Usami H., Maeda T., Fujii Y., Oikawa K., Takahashi F., Kagawa T., Wada M., Kasahara M., 論文表題: CHUP1 mediates actin-based light-induced chloroplast avoidance movement in the moss *Physcomitrella patens*, 雑誌名: Planta, 査読: 有, 巻: 236, 発行年: 2012, ページ: 1889-1897, 10.1007/s00425-012-1735-6

著者名: Suetsugu N., Sato Y., Tsuboi H., Kasahara M., Imaizumi T., Kagawa T., Hiwatashi Y., Hasebe M., Wada M., 論文表題: The KAC family of Kinesin-like proteins is essential for the association of chloroplasts with the plasma membrane in land plants, 雑誌名: Plant Cell Physiol., 査読: 有, 巻: 53, 発行年: 2012, ページ: 1854-1865, 10.1093/pcp/pcs133

[学会発表](計 9件)

発表者名: 池田美恵、笠原賢洋、高橋文雄、発表表題: 黄金色藻オクロモナス光応答反応とその青色光受容体の解析、学会名等: 第55回日本植物生理学会年会、発表年月日: 2014年3月18日、発表場所: 富山大学(富山県)

発表者名: 田郷寿樹、富川直樹、奥田修二郎、高橋文雄、笠原賢洋、発表表題: LOV-HTHによる光に応答した遺伝子発現制御の解析、学会名等: 第8回日本ゲノム微生物学会年会、発表年月日: 2014年3月7日、発表場所: 東京農業大学(東京都)

発表者名: 田郷寿樹、富川直樹、奥田修二郎、高橋文雄、笠原賢洋、発表表題: *Novosphingobium aromaticivorans* の

LOV-HTH の機能解析、学会名等：第 36 回  
日本分子生物学会年会、発表年月日：2013  
年 12 月 3 日、発表場所：神戸ポートアイ  
ランド（兵庫県）

発表者名：池田美恵、笠原賢洋、高橋文  
雄、発表表題：褐藻ヤハズグサの青色光  
で誘導される葉状体形成、学会名等：日  
本植物学会第 77 回大会、発表年月日：  
2013 年 9 月 13 日、発表場所：北海道大  
学（北海道）

発表者名：新田拓也、佐藤雅彦、笠原賢  
洋、発表表題：ストレス応答制御因子 V0Z  
のヒメツリガネゴケにおける機能解析、  
学会名等：第 54 回日本植物生理学会年会、  
発表年月日：2013 年 3 月 23 日、発表場  
所：岡山大学（岡山県）

発表者名：山本晃司、中井良和、笠原賢  
洋、発表表題：ヒメツリガネゴケの PHOT  
過剰発現プロトプラストを用いた葉緑体  
光定位の解析、学会名等：第 54 回日本植  
物生理学会年会、発表年月日：2013 年 3  
月 23 日、発表場所：岡山大学（岡山県）

発表者名：山本晃司、笠原賢洋、発表表  
題：ヒメツリガネゴケの PHOT 過剰発現プ  
ロトプラストを用いた赤色光依存的な葉  
緑体光定位の解析、学会名等：日本植物  
学会第 76 回大会、発表年月日：2012 年 9  
月 16 日、発表場所：兵庫県立大学（兵庫  
県）

発表者名：宮崎翔吾、大隅一範、鳥井真  
由美、東江千明、笠原賢洋、発表表題：  
ヒメツリガネゴケ青色光受容体様タンパ  
ク質 LLP の機能解析、学会名等：第 53 回  
日本植物生理学会年会、発表年月日：2012  
年 3 月 16 日、発表場所：京都産業大学（京  
都府）

発表者名：大隅一範、宮崎翔吾、小川祥  
平、笠原賢洋、発表表題：ヒメツリガネ  
ゴケ LLP の結合タンパク質の検索と相互  
作用の解析、学会名等：第 53 回日本植物  
生理学会年会、発表年月日：2012 年 3 月  
16 日、発表場所：京都産業大学（京都府）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笠原 賢洋 (KASAHARA MASAHIRO)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：70361748