

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18380200

研究課題名 (和文)

フィトクロム相互作用タンパク質の解析に基づく植物の光情報伝達機構の解明

研究課題名 (英文)

Studies on light signaling in plants by the analysis of phytochrome and its interacting proteins

研究代表者

河内 孝之 (京都大学・生命科学研究科・教授)

研究者番号：40202056

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：発生・分化制御、光形態形成、光受容体、光信号伝達、フィトクロム

1. 研究計画の概要

生存を光に依存する植物にとって、光環境の適切な認識と生理応答は個体の繁栄に重要である。植物の赤色光・遠赤色光受容体フィトクロムは、多重遺伝子族にコードされ、光量や光質を識別することにより、発芽から開花に到る多岐の生理応答を制御する。フィトクロムは光による立体構造の変換が機能発現の鍵となることが知られており、この構造の違いを識別する機構の解明が光によるシグナル伝達の本質的な理解につながると考えられる。

フィトクロムが受容した光シグナルを細胞内情報として発信する分子機構を、phyA または phyB が相互作用するタンパク質因子を同定することにより解明することを目指した。エピトープタグ付きフィトクロム発現系を活用し、光質特異的 phyB 相互作用因子を質量分析を利用したプロテオミクス手法によりタンパク質同定する。また、これを補完する手法として、酵母ツーハイブリッド法を利用し、盛んに成長する時期の相互作用タンパク質を同定する。

同定された相互作用タンパク質に対する突然変異体や遺伝子を改変し植物体へ導入した系統を解析することにより、そのタンパク質の生物学的評価を行い、植物体における役割を検証する。また、その機能発現の分子機構を明らかにする。

2. 研究の進捗状況

(1) フィトクロム相互作用因子の同定

突然変異体 *phyB1* に C 末端にエピトープタグとして FLAG ならびに HA ペプチドをタンデムに賦与した *PHYB* 遺伝子を導入したシロイヌナズナ個体は、*phyB0* の変異表現型を相補する光応答を示した。このタグ付き *phyB* 発現系を用

いて、タグに対する抗体を利用し *phyB* 複合体を精製した。タンパク質の質量分析による同定を試みたが *phyB* と複合体を形成することが期待されるタンパク質は同定できなかった。

次に、酵母ツーハイブリッド法を用いて、*phyA* と *phyB* に相互作用する因子をスクリーニングした。その結果、相互作用因子 VOZ が同定できた。大腸菌発現系を利用した *in vitro* ブルダウンアッセイの結果、フィトクロムとの相互作用が確認され、その親和性は光照射により変化することが示された。すなわち、フィトクロムの Pr、Pfr 型に特異性を示す因子である可能性が示された。

(2) 植物におけるタンパク質相互作用の評価

単離された因子が植物体でフィトクロムと相互作用をするかを評価した。因子は、核と細胞質で局在し、生体内においてフィトクロムと局在が一致する可能性が示された。現在、プロトプラストを利用した Split Luciferase アッセイ系を立ち上げている。

(3) 相互作用因子の機能解析

T-DNA 挿入系統を検索し、遺伝子破壊系統を取得した。単離した遺伝子が 2 遺伝子からなる遺伝子ファミリーを形成していたため、二重変異体を作成した。その系統は花成遅延を示した。*phyB* 変異体と 3 重変異体は、花成が遅延したため、この因子が *phyB* 下流にあることが示された。また、花成の遅延は FT 遺伝子の発現抑制が原因であることを明らかにした。

3. 現在までの達成度

② 概ね順調に進展している

(理由)

フィトクロム相互作用因子をプロテオミクス手法で単離するには至らなかったが、分子生物学的手法による新規の因子の単離に成

功し、遺伝学的手法を用いた生物学的役割の研究は順調に進展しているため。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 生化学的解析

フィトクロムとの相互作用について、Split Luciferase assay を用いて、赤色光および遠赤色光の効果を検討する。また、相互作用に対する光受容体発色団や光受容体の関与を明らかにするために、プロトプラストを当該遺伝子変異体、*hyl* 変異体、*phyA* および *phyB* 変異体から調製して、相互作用を解析する。

(2) 植物体における機能組織

フィトクロムは植物体全体で発現するが、花成に関する機能は葉肉細胞での *phyB* の働きが重要であることが示されている。同定した遺伝子の発現部位は、維管束に強く、葉肉細胞や茎の維管束以外の細胞でも検出可能なレベルで発現することが示された。

組織を分離して、発現レベルを定量的に調べる。また、どの細胞における発現が機能に重要であるかを、組織特異的プロモーターを利用して、葉肉細胞、維管束、茎頂で発現させ、花成時期を測定し、機能評価をする。

(3) 機能する細胞内局在

フィトクロムは光照射により核と細胞質の間で細胞内局在が変化することが知られている。当該遺伝子産物は核で機能することが予想されているが、フィトクロムとの相互作用の点からも、核で働くことを証明することは重要である。そこで、蛍光タンパク質 GFP と融合させ、細胞内局在を解析する。その時に、光による細胞内局在の変化があるかどうかを調べる。また、核局在シグナル NLS と核搬出シグナル NES を融合した遺伝子を変異体へ導入し、機能的に細胞内局在を評価する。

(4) 花成制御機構

フィトクロム経路の下流に花成誘導が存在する。これまでに、花成統合因子である FT の発現が低下することが花成遅延の原因であることがわかった。FT に統合される制御経路は複数明らかにされているが、この遺伝子がどの経路に存在するかを、遺伝学的、分子生物学的に調べる。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Sugishima, M., Kitamori, Y., Noguchi, M., Kohchi, T., and Fukuyama, K. Crystal structure of red chlorophyll catabolite reductase: enlargement of the ferredoxin-dependent bilin reductase family. *J. Mol. Biol.* (2009) in press 査読あり
2. 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 Cell Physiol.*, **49**, 1084-1091 (2008). 査読あり

3. Ishizuka, T., Narikawa, R., Kohchi, T., Katayama, M., and Ikeuchi, M. Cyanobacteriochrome TePixJ of *Thermosynechococcus elongatus* harbors phycoviolobin as a chromophore. *Plant Cell Physiol.* **48**, 1385-1390 (2007). 査読あり
4. Chiyoda, S., Linley, P. J., Yamato, K. T., Fukuzawa, H., Yokota, A., and Kohchi, T. Simple and efficient plastid transformation system for the liverwort *Marchantia polymorpha* L. suspension-culture cells. *Transgenic Res.* **16**, 41-49 (2007). 査読あり
5. Mukougawa, K., Kanamoto, H., Kobayashi, T., Yokota, A., and Kohchi, T. Metabolic engineering to produce phytochromes with phytochromobilin, phycocyanobilin, or phycoerythrobilin chromophore in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **580**, 1333-1338 (2006). 査読あり

[学会発表] (計 21 件)

1. Kohchi, T. Structure-activity studies of phytochrome chromophore in plants. 4th Asia Oceania Conference on Photobiology, Varanasi, India, 2008. 11. 24-26
2. 安居佑季子、硯亮太、向川佳子、佐藤雅彦、河内孝之：シロイヌナズナ転写因子 VOZ を介した花成制御機構の解析、日本植物生理学会年会、札幌、2008. 3. 20
3. 片岡秀夫、石崎公庸、大和勝幸、河内孝之：苔類ゼニゴケをモデルとしたフィトクロムシグナル伝達の解析、日本植物生理学会年会、札幌、2008. 3. 20
4. 硯亮太、向川佳子、安居佑季子、光田展隆、佐藤雅彦、河内孝之、シロイヌナズナのジンクフィンガータンパク質 VOZ の花成制御機能の解析、第 30 回日本分子生物学会、横浜、2007. 12. 11
5. 硯亮太、向川佳子、秋山昌子、光田展隆、佐藤雅彦、河内孝之、シロイヌナズナの花成制御に関わる VOZ 遺伝子の機能解析、日本植物生理学会年会、松山、2007. 3. 28