

機関番号：22604

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570041

研究課題名 (和文) シダ植物固有の光受容体における分子内シグナルプロセッシング機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of the molecular mechanisms of the fern photoreceptor

研究代表者

鐘ヶ江 健 (KANEKAE TAKESHI)

首都大学東京・理工学研究科・助教

研究者番号：70264588

研究成果の概要 (和文)：ホウライシダで発見された新規光受容体 PHY3 は、植物青色光受容体であるフォトトロピンに赤色光受容体フィトクロムの光受容部位が融合した構造をしている。その構造から、PHY3 はフォトトロピンと同様の分子機構で、受容した光シグナルをプロセッシングしていることが予想された。本研究の結果、PHY3 はフォトトロピンの機能に重要なアミノ酸を置換してもその機能に大きな影響を受けなかったことから、PHY3 独自の光シグナルプロセッシング機構が存在することが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：From its domain organization, phy3 seems to have same signal processing mechanisms as phototropins. As some amino acid residues that are important for its functions of phototropins are conserved in phy3, mutations were introduced into these residues of phy3 and transferred into *Arabidopsis phot1phot2*. These transgenic plants showed similar phototropic responses to the *Arabidopsis* expressing wild-type phy3; therefore, phy3 might have signal processing mechanisms different from one's of phototropins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：植物分子細胞生物学

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

植物は外界の光環境を、赤色光受容体 (フィトクロム) と青色光受容体 (クリプトクロムやフォトトロピン) によって感知している。これらの光受容体はそれぞれ個別のタンパク質であり、赤色光と青色光の情報を独立に感知している。植物は光環境に応じて、光屈性や葉の伸展、葉緑体の細胞内配置 (葉緑体

光定位運動) などの反応を制御しているが、これらの反応はいずれも個体・組織・細胞レベルで光合成のための光受容効率を上昇させるための機構であると考えられている。これらの光反応は、ほとんどの植物において青色光でのみ誘導され、フォトトロピンを光受容体とするシグナル伝達経路によって制御されていることが明らかになっている。一方、

シダ植物ではこれらの反応が青色光だけでなく赤色光でも誘導されることが知られている。これらの現象を広い波長域の光で制御できることが、シダ植物が弱光環境に適応できた一つの原因であると考えられる。シダ植物にはこのような赤色光依存の調節機構が存在することから、フィトクロピン以外の赤色光受容体によるシグナル制御機構の存在が推測されていた。シダ植物光受容体遺伝子の網羅的単離解析の中で、シダ植物固有の新規な光受容体が存在することを明らかにしてきている。フィトクロム3 (PHY3) と命名したこの光受容体は、N 末端側に赤色光受容体フィトクロムの光受容部位を、C 末端側にフィトクロピン全長を持つ構造をしている。PHY3 機能解析のこれまでの結果から、PHY3 がシダ植物において葉緑体光定位運動や光屈性などの現象の赤色光による制御を可能にしていることが判明した。さらにPHY3 は、青色光受容体フィトクロピンとしての機能を併せ持ち、赤色光情報と青色光情報がPHY3 分子内で相乗効果を生み、光感度が上昇することで非常に弱い光に応答できることが明らかになった。以上のように、PHY3 がシダ植物の弱光環境適応機構の一翼を担う鍵分子であることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

林床などの薄暗い場所で旺盛に繁茂することができるシダ植物は、その進化の過程で弱光環境適応の術を獲得・発展させてきたと考えられる。このシダ植物の持つ弱光環境適応機構解明の一端として、本研究課題ではシダ植物固有の光受容体 PHY3 の分子内光シグナルプロセッシング機構の解明を目的とする。また、PHY3 をシダ以外の植物種に導入し、宿主植物の光応答性に及ぼす影響を解析することで、PHY3 光センシングシステムによる弱光環境への適応機能獲得の可能性を検証する。シダ植物の弱光環境への適応機構の解明は、基礎学問的に非常に興味深いものであるとともに、応用面への展開も期待される領域である。本研究課題の対象であるPHY3 光センシングシステムは、これまでの植物の光センシングシステム概念に無かった新たなシステムである。その分子機能・動作機構を解明することができれば、環境応答や植物進化の分野に新たな知見を与えることが期待されるとともに、新たな機能分子の分子設計などの応用面にも情報を提供することが期待される。また、光合成効率を制御する生理現象を調節する光受容体であることから、PHY3 の持つ光応答性を他種有用植物に付与できれば、より低光量における光合成量の増大や光補償点をより弱光側にシフトさせることなどが可能になると予想される。

る。これらを実現されれば、大気中の CO₂ 濃度の削減や食糧増産にも貢献しうる可能性も期待される。

3. 研究の方法

PHY3 分子は赤色光受容部位と青色光受容部位が共存する形をとっており、いずれの光受容部位 (センサー部位) で受容された光シグナルも、C 末端側に位置するタンパク質キナーゼ領域のリン酸化活性の ON/OFF によってシグナルを下流にアウトプットしている。しかしながら、PHY3 の各センサー部位によるキナーゼ領域 ON/OFF の分子機構については不明である。さらに、別個のセンサー部位で受容された赤色光シグナルと青色光シグナルが、分子内でどのようにプロセスされ相乗効果を生むのかは、PHY3 分子の高い光感度特性を解明する上で非常に重要である。

シダ PHY3 分子がシロイヌナズナで機能することから、PHY3 からアウトプットされる信号はシロイヌナズナの信号伝達経路を利用していると考えられる。さらにPHY3 の構造から、PHY3 が受容した光情報はPHY3 のC 末端側を構成するフィトクロピン (phot) の分子機構を利用していると想像される。これまでのシロイヌナズナ phot1 による研究知見により、フィトクロピンの動作機構は (i) LOV ドメインの Cys 残基に発色団分子の FMN が青色光依存的に共有結合を形成 (ii) FMN と LOV2 内のアミノ酸残基との水素結合状態の変動 (iii) J- α ヘリックスと LOV2 の局所的構造変換 (iv) キナーゼドメインの暗所抑制状態からの解放 というステップであるとされている。ここで示される各ステップにおいて重要な機能を持つアミノ酸残基は、PHY3 でも保存されている。

上記シロイヌナズナのフィトクロピン研究での知見、さらにPHY3 分子の FTIR-NMR 等による構造解析の結果により、PHY3 キナーゼ領域の ON/OFF に関与するアミノ酸の候補が推定されている。そこで、分子内光シグナルのプロセッシングに関与すると思われるアミノ酸に変異を導入した改変 PHY3 分子を用い、光応答の生理反応を解析し分子内シグナルプロセッシング機構に関する知見を得る。

置換したアミノ酸残基：

Cys712: LOV1 ドメインの FMN 結合部位 (A1a に置換 C712A)

Cys966: LOV2 ドメインの FMN 結合部位 (A1a に置換 C966A)

Gln1029: LOV2 ドメインの FMN 水素結合形成部位 (Leu に置換 Q1029L)

これまでに、PHY3 部分発現組換えタンパク質を用いた FTIR 解析により、これらのアミノ酸置換が PHY3 の光依存の構造変換に影響を及ぼしていることが報告されている。

4. 研究成果

(1) 改変 PHY3 遺伝子の作成と導入

野生型 PHY3 を鋳型に、改変 PHY3 (C712A、C966A、C712A+C966A (二重置換)、Q1029L) を点突然変異導入法により作成した。得られた改変 PHY3 を CaMV35S プロモーター制御によるバイナリーベクター (pBI H1-IG または pPZP211/35Spro-NOSter) にクローニング、アグロバクテリウム GV3101 (pM90) に導入した。

(2) 形質転換シロイヌナズナ系統の確立
上記改変 PHY3 発現ベクター導入アグロバクテリウムを用いた Floral dipping 法により、シロイヌナズナ *phot1-5 phot2-1* に形質転換し T1 種子を得た。薬剤選抜により耐性 T1 植物体を選抜、自殖により T2 種子を回収した。T2 世代以降の自殖後代の形質転換ラインに対して、薬剤耐性による分離比を指標にホモ系統を選抜・確立した。得られたホモ系統について、改変 PHY3 タンパク質の発現レベルはウエスタンブロッティングにより調べた。抗 PHY3 ポリクローナル抗体を一次抗体として用い、化学発光法による検出を行った。以降の生理学的表現型解析には、一定量以上の改変 PHY3 タンパク質が蓄積していることを確認したホモ系統を供使用している。

(3) 改変 PHY3 の生理学的機能解析

改変 PHY3 導入シロイヌナズナを用いて、胚軸の光屈性を指標に光応答性を解析した。

①C712A

LOV1 ドメインの FMN 結合 Cys 残基を Ala 残基に置換したが、赤色光・青色光いずれの照射によっても野生型 PHY3 によるものと光応答性に差異は確認されなかった。このことより、LOV1 での Cys-FMN 結合形成は PHY3 分子内の光シグナルプロセッシングにとって必須ではないことが明らかになった。

②C966A

LOV2 ドメインの FMN 結合 Cys 残基を Ala 残基に置換したが、赤色光・青色光いずれの照射によっても野生型 PHY3 によるものと光応答性に著しい差異は確認されなかった。このことより、LOV2 での Cys-FMN 結合形成が PHY3 分子内の光シグナルプロセッシングにとって必須ではないことが明らかになった。青色光による反応にも影響がないという結果は、フォトトロピンとは異なるメカニズムが PHY3 には存在していることを示唆している。

③C712A+C966A

LOV1, LOV2 両方のドメインの FMN 結合 Cys 残基を Ala 残基に置換したが、この場合も赤色光・青色光いずれの照射によっても野生型 PHY3 によるものと光応答性に差異は確認されなかった。このことより、2つの LOV ドメインでの Cys-FMN 結合形成に冗長性は認められず、PHY3 分子内の光シグナルプロセッシングにとって必須ではないことが明らかになっ

た。これは、上記 C966A 単独の変異の結果に加えて PHY3 独自の分子内シグナルプロセッシング機構の存在を強く支持する結果となっている。

④Q029L

これまでのシロイヌナズナによる研究結果からは、フォトトロピンのタンパク質キナーゼ領域の活性化には J-alpha ヘリックスの関与が必須であると言われてきた。シロイヌナズナ *phot1* においてその構造変換に大きく関与することが示されている Gln 残基は PHY3 においても保存されていることから、PHY3 においても J-alpha ヘリックスの重要性が議論されてきた。この Gln 残基を Leu 残基に置換してその影響を調べたところ、赤色光・青色光いずれの照射によっても野生型 PHY3 によるものと光応答性に差異は確認されなかった。このことより、J-alpha ヘリックスは PHY3 分子内の光シグナルプロセッシングにとって必ずしも重要ではないことが明らかになった。この結果もまた、LOV ドメインにおける Cys-FMN 結合形成と同様に、PHY3 がフォトトロピンとは異なるシグナルプロセッシング機構を有していることを支持するものとなった。

(4) PHY3 のシグナルプロセッシング機構について

今回の研究課題遂行により得られた結果は、予想と大きく異なる新たな知見が得られることとなった。これまでに、PHY3 のフィトクロム光受容部位に変異 (Cys303Ser) を導入してフィトクロム機能を欠失させた場合、PHY3 はフォトトロピンとして青色光反応を誘導することを明らかにしている。すなわち、PHY3 は少なくともフォトトロピン部位ではフォトトロピンとして機能する、フォトトロピンと同じシグナルプロセッシングをすると期待していた。ところが、J-alpha ヘリックスだけでなく、フォトトロピンのシグナルプロセッシング初発段階である Cys-FMN 結合形成までが、PHY3 にとっては必須ではないという驚くべき結果となった。この結果の解釈として現時点では以下のことが考えられる。PHY3 においても青色光により Cys-FMN 結合形成は起こっており、それによって引き起こされる構造変換によるタンパク質キナーゼ部位の活性化は起きている。ただし、それ以外にも青色光によるキナーゼ部位の活性化をもたらす機構が PHY3 には存在している。赤色光によるキナーゼ部位の活性化の機構を考えると、この可能性は十分に考えられる。赤色光、すなわちフィトクロム光受容部位からキナーゼ部位の活性化がどのように導かれるのかは未だ不明である。C712A+C966A においても赤色光による光屈性が誘導されたことから、Cys-FMN 結合形成を必要としないキナーゼ部位活性化機構が存在しているこ

とは明らかであり、フィトクロム光受容部位から直接キナーゼ部位が活性化されると考えられる。フィトクロムの発色団であるフィトクロモビルンは、赤色光だけでなく、青色光領域にも吸収の二次ピークが存在することが知られており、このフィトクロムによる青色光反応が、Cys-FMN 結合形成を必要としない青色光依存のキナーゼ活性化機構である可能性が示唆された。

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)

[学会発表] (計2件)

① 鐘ヶ江 健、シダ光受容体PHY3/neo1 のプロテインキナーゼ活性調節機構の解明、日本植物生理学会、2011年3月、東北大学

② 鐘ヶ江 健、シダ光受容体PHY3/neo1 のプロテインキナーゼ活性調節機構の解明、日本分子生物学会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鐘ヶ江 健 (KANEGAE TAKESHI)
首都大学東京・理工学研究科・助教
研究者番号：70264588