

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770048

研究課題名（和文） 植物の光受容体フィトクロム B の N 末端領域が形成する光信号伝達複合体の生化学的解析

研究課題名（英文） Biochemical analysis of the light signaling complex that contains the N-terminal domain of phytochrome B

研究代表者

松下 智直（MATSUSHITA TOMONAO）

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：20464399

研究成果の概要（和文）：

植物の主要な光受容体であるフィトクロム B (phyB) は、植物の光に対する様々な応答を制御している。我々は、phyB が受容した光の情報を植物細胞内で伝達する分子機構を解明するために、phyB のシグナル発信ドメインと相互作用する他の蛋白質を生化学的に同定した。その結果、活性型の phyB のシグナル発信ドメインに特異的に結合する因子として、スプライシング関連の因子が複数同定された。

研究成果の概要（英文）：

Phytochrome B (phyB) is a plants' major photoreceptor that regulates various light responses in plants. In order to understand the molecular mechanism of phyB signal transduction, we performed a biochemical analysis to isolate proteins that interact with phyB *in vivo*. As a result, we identified several splicing-related factors as novel components of phyB signaling complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物光生理学

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：フィトクロム、植物、光受容体、シグナル伝達、環境応答

1. 研究開始当初の背景

植物は、光を光合成のためのエネルギー源としてだけではなく、周辺環境を把握するための情報としても利用している。そのために、植物はいくつかの光情報受容体を進化させてきたが、フィトクロムはその中でも中心的な役割を果たす赤色光成分の受容体であり、種子の光発芽から芽生えの緑化、花成の光周性に至るまで、植物の生活環を通して様々な光応答を制御する極めて重要な色素蛋白質である。

フィトクロム分子は、発色団を結合し光受容に働く N 末端領域と、二量体化に働きキナーゼ様配列を持つ C 末端領域の、2つの領域

に大きく分けることができ、従来フィトクロムは C 末端領域内のキナーゼ活性により下流へシグナルを伝達すると信じられてきた。そしてその考えに基づき、フィトクロムの直下で働くシグナル伝達因子を同定する目的で、C 末端領域の相互作用因子が、主に酵母の two-hybrid 法を用いてこれまで精力的に単離・解析されてきた (Ni ら 1998 年、Choi ら 1999 年、Fankhauser ら 1999 年、Ryu ら 2005 年など)。

このような背景のなか申請者は、フィトクロムの最も主要な分子種であるフィトクロム B (phyB) が N 末端領域からシグナルを発すること、一方 C 末端領域はシグナル伝達に

必要でないばかりかむしろ阻害的に働くことなどを明らかにした (Matsushita et al., 2003 *Nature* 424: 571-574)。この発見により、フィトクロムのシグナル伝達機構を一から考え直す必要が生じたが、フィトクロムのシグナル伝達に関する従来の研究は、専ら C 末端領域に着目したものであり、またフィトクロムの N 末端領域内にシグナル伝達や遺伝子発現制御に関わるモチーフはアミノ酸配列上見出されず、そのシグナル伝達機構は全く未知である。

そこで申請者は、大規模な変異体スクリーニングから phyB のシグナル伝達活性を低下させる N 末端領域内のミスセンス変異を解析し、シグナル発信に直接関与するアミノ酸残基が N 末端領域内の小領域に集中することを発見した (Oka et al., 2008 *PLoS Genet.* 4(8): e1000158)。この小領域は、細菌やラン藻のフィトクロム分子において、蛋白質間相互作用に関わる PAS ドメインの構造を取ることが示されており (Wagner ら 2005 年など)、phyB がこの小領域を介して下流のシグナル伝達因子と直接相互作用し、光シグナルの受け渡しを行う可能性が示唆された。

次に、上記の変異体スクリーニングによる順遺伝学的解析の結果発見された phyB N 末端領域内の PAS 様ドメインが、phyB のシグナル発信ドメインであることを確かめるために、このドメイン断片をシロイヌナズナにおいて過剰発現させ、光生理学的表現型解析を行ったが、光応答の変化は何ら観察されなかった (未発表)。このことは、phyB N 末端領域内の PAS 様ドメインが、シグナル伝達ならびに下流因子との相互作用に必要なことはあるが、十分ではないことを意味する。

当初は、phyB N 末端領域内の PAS 様ドメインと相互作用する因子を単離することにより、phyB の直下で働くシグナル伝達因子が同定できるのではないかと期待されたが、上述の結果によりこのドメインが下流因子との結合には不十分であることが示され、異なる手法で下流因子同定を進める必要が生じた。

2. 研究の目的

本研究では、現在未知である phyB の N 末端領域からの光シグナル伝達機構を分子レベルで解明することを目的として、phyB N 末端領域と相互作用する因子を生化学的手法により同定し、その生理機能を明らかにする。

3. 研究の方法

phyB の直下で働くシグナル伝達因子の生化学的同定がこれまで困難であったのは、1) C 末端領域がシグナル発信ドメインであると信じられていた、2) phyB の活性型立体構造

が不安定なため下流因子との結合が一過的である、といった理由が主に考えられる。本研究では、C 末端領域を完全に欠く phyB N 末端領域断片との相互作用因子を同定することにより上記問題点 1) を解決し、またその際に phyB N 末端領域の立体構造を恒常的に活性型へと固定するミスセンス変異を導入することで上記問題点 2) を解決する。さらに、発色団との結合能を失わせるミスセンス変異を導入し不活性型へと固定した phyB N 末端領域をネガティブコントロールとして用いることで、活性型分子に特異的に結合する因子の選抜が可能となる。

4. 研究成果

タグ配列を付けた phyB の N 末端領域に、その立体構造を恒常的に活性型へと固定するミスセンス変異 Y276H もしくは、発色団との結合能を失わせ立体構造を不活性型へと固定する C357A 変異を導入し、それぞれシロイヌナズナの phyB 変異体において過剰発現させた。その結果、phyB N 末端領域のシグナル伝達活性が、Y276H 変異によって光の有無に関わらず恒常的に活性化される一方で、C357A 変異によっては完全に失われることが確認できた。下流因子との結合が、Y276H 変異では安定化され強固なものとなり、一方 C357A 変異では完全に失われると考えられるため、これらの形質転換植物は、活性型の phyB N 末端領域と特異的に相互作用する因子の単離に有用であることが示される。

次に、上記形質転換植物のそれぞれから、タグ配列を利用して phyB N 末端領域を含む複合体を精製し、質量分析によりその構成因子を解析し、両者を比較した。ここで、Y276H 変異導入系統でのみ検出される因子は、活性型の phyB N 末端領域に特異的に結合する因子の候補であると考えられる。その結果、活性型の phyB N 末端領域に特異的に結合する因子として、スプライシング関連の因子が複数同定された。

我々は最近、大規模な変異体スクリーニングによる順遺伝学的解析により、選択的スプライシング制御に関わる新奇 SR 蛋白質 RRC1 が phyB シグナル伝達に必要なことを明らかにした (Shikata et al., 2012)。さらに、phyB が赤色光に応答して、RRC1 依存的に、いくつかの遺伝子に対して選択的スプライシング制御を行うことも明らかにした (Shikata et al., 2012)。以上の結果から、phyB は、これまで考えられていた転写制御だけではなく、選択的スプライシング制御も行うことにより、光シグナルを伝達し、植物の様々な光応答を引き起こすことが示唆された。本研究における結果は、この可能性を支持するものであり、今後、本研究で同定され

たスプライシング関連因子が、phyBによるスプライシング制御に関わるかどうか、また、phyBによる光シグナル伝達に関わるかどうかを、それぞれ分子生物学・生化学的解析と、光生理学的解析を行うことで、明らかにしていきたい。

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 5 件)

- ① Shikata H, Nakashima M, Matsuoka K, and Matsushita T, Deletion of the RS domain of RRC1 impairs phytochrome B signaling in Arabidopsis, *Plant Signaling & Behavior* 7: 933-936 (2012). (査読あり)
- ② Shikata H, Shibata M, Ushijima T, Nakashima M, Kong SG, Matsuoka K, Lin C, and Matsushita T, The RS domain of Arabidopsis splicing factor RRC1 is required for phytochrome B signal transduction, *The Plant Journal* 70: 727-738 (2012). (査読あり)
- ③ Inoue S, Matsushita T, Tomokiyo Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Kinoshita T, Shimazaki K, Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in Arabidopsis, *Plant Physiology*, 156, 117-128 (2011). (査読あり)
- ④ Oka Y, Kong SG, Matsushita T, A non-covalently attached chromophore can mediate phytochrome B signaling in Arabidopsis, *Plant & Cell Physiology*, 52: 2088-2102 (2011). (査読あり)
- ⑤ Matsushita T, A versatile method to prevent transcriptional gene silencing in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Biotechnology*, 28: 515-519 (2011). (査読あり)

[学会発表] (計 13 件)

- ① 四方明格・松下智直, フィトクロムは選択的スプライシングを調節する, 第54回日本植物生理学会年会, 2013年3月, 岡山.
- ② 柴田磨己・四方明格・牛島智一・大川恭行・久原哲・松下智直, RNA-seq解析によるフィトクロムBの選択的スプライシング制御の標的遺伝子同定とその機能推定, 日本分子生物学会第35回年会, 2012年12月, 福岡.
- ③ 四方明格・牛島智一・柴田磨己・中嶋萌子・孔三根・松岡健・Chentao Lin・松下智直, Phytochrome B controls alternative pre-mRNA splicing through Arabidopsis splicing factor RRC1, 10th International Congress on Plant Molecular Biology, 2012年10月, Jeju (Korea).

④ 松下智直, 植物の光情報受容体フィトクロムによる細胞内シグナル伝達機構の解析, 第17回2012年日本光生物学協会年会, 2012年8月, 大阪.

⑤ 四方明格・牛島智一・柴田磨己・中嶋萌子・孔三根・Ken Matsuoka・Chentao Lin・松下智直, Red Light-dependent Alternative Splicing in Phytochrome B Signaling, The 23rd International Conference on Arabidopsis Research, 2012年7月, Vienna (Austria).

⑥ 牛島智一・柴田磨己・四方明格・大川恭行・松岡健・久原哲・松下智直: フィトクロムによる選択的スプライシング制御の解析, 日本育種学会第121回講演会, 2012年3月30日, 宇都宮.

⑦ 四方明格・柴田磨己・牛島智一・中嶋萌子・孔三根・松岡健・Chentao Lin・松下智直, The SR-like splicing factor RRC1 is required for phytochrome B signal transduction in Arabidopsis, The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing, 2012年3月, Nara (Japan).

⑧ 牛島智一・柴田磨己・四方明格・大川恭行・松岡健・久原哲・松下智直, Alternative splicing regulation by phytochrome B in Arabidopsis, The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing, 2012年3月, Nara (Japan).

⑨ 四方明格・柴田磨己・牛島智一・中嶋萌子・孔三根・松岡健・Chentao Lin・松下智直, シロイヌナズナ RRC1 蛋白質を介した新奇フィトクロム B シグナル伝達機構の解析, 第53回日本植物生理学会年会, 2012年3月, 京都.

⑩ 牛島智一・柴田磨己・四方明格・大川恭行・松岡健・久原哲・松下智直, フィトクロムBによる選択的スプライシング制御の解析, 第53回日本植物生理学会年会, 2012年3月, 京都.

⑪ 松下智直・岡義人・孔三根, フィトクロムBは非共有結合により取り込んだ発色団を用いてシグナルを伝達しうる, 第53回日本植物生理学会年会, 2012年3月, 京都.

⑫ 松下智直, Phytochrome B signal transduction in Arabidopsis, International Symposium "Strategies of Plants against Global Environmental Change", 2011年12月, Kurashiki (Japan).

⑬ 松下智直, 選択的スプライシング制御を介した phytochrome B の光シグナル伝達, 岡田学術創成研究主催 阿蘇フロンティアサミット, 2011年8月, 阿蘇.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 智直 (MATSUSHITA TOMONAO)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：20464399