

平成23年 5月31日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17084007

研究課題名（和文） イネの光運動を制御するシグナル伝達系の解明

研究課題名（英文） Investigating the signal transduction mechanisms for photomovements in rice

研究代表者

飯野 盛利 (IINO MORITOSHI)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：50176054

研究成果の概要（和文）：2つの遺伝子ホモログによりコードされるイネのフォトトロピン 1 (phot1) は幼葉鞘と幼根の光屈性と葉緑体の集合反応に光受容体として関与することを遺伝学的に証明した。また、幼葉鞘と幼根の光屈性ではほぼ唯一の光受容体であること、幼葉鞘の光屈性に見られる光量反応曲線の多相性は全て phot1 を光受容体とし CPT1 を必須な因子とするシグナル伝達の性質を反映することを明らかにした。さらに、幼葉鞘の光屈性が特異的に低下した突然変異体 *cpt2* の原因遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated genetically (1) that rice phototropin 1 (phot1), encoded by two gene homologs, serves as a photoreceptor in phototropisms of coleoptiles and primary roots and in photoaccumulation response of chloroplasts, (2) that phot1 is nearly the sole photoreceptor for the phototropisms, and (3) that the multiphasic fluence-response curve of coleoptile phototropism represents almost entirely the properties of phot1 signaling, in which CPT1 functions as a critical component. Furthermore, we identified the gene responsible for *cpt2* mutation that results in specifically impaired coleoptile phototropism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	18,000,000	0	18,000,000
2006年度	18,000,000	0	18,000,000
2007年度	18,000,000	0	18,000,000
2008年度	18,000,000	0	18,000,000
2009年度	18,000,000	0	18,000,000
総計	90,000,000	0	90,000,000

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・生理学

キーワード：イネ、運動、フォトトロピン、光屈性、光シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

種子植物の芽ばえで観察される光屈性は

既に 19 世紀から研究され、青色光が最も有効であること、作用スペクトルは青色光域と近紫外域に特徴的な形をもつこと、植物ホル

モンのオーキシンが関与することなどが明らかにされた。20世紀末になると、シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的研究が活発になされるようになり、光屈性に働く光受容と光シグナル伝達の分子機構が浮き彫りになってきた。まず、芽ばえ胚軸の光屈性が欠損した突然変異体の解析から、光屈性の主要な光受容体としてフォトトロピン1 (phot1) が発見され (Huala et al. 1997)、次いでそのホモログ phot2 が強光による光屈性に関与する光受容体として同定された (Sakai et al. 2001)。さらに、シグナル伝達に関与するタンパク質 NPH3 (Motchoulski and Liscum 1999) とそのホモログ RPT2 (Sakai et al. 2000) が明らかにされた。また、phot1、phot2 は葉緑体光定位運動 (Kagawa and Wada 2000, Sakai et al. 2001) や光依存の気孔開口運動 (Kinoshita et al. 2001) にも主要な光受容体として関与することが明らかにされた。

シロイヌナズナを用いた研究が進展する以前は、オートムギ・トウモロコシなどのイネ科植物の幼葉鞘が光屈性の研究に頻繁に用いられ、光屈性のもつ生理学的性質についての知見が蓄積された。本代表者も 1980 年代の初めから、トウモロコシ幼葉鞘を主な材料にして光屈性の研究を進め、光屈性にはオーキシンの不均等分が実際に関与していること、光受容機構には感覚順応の性質が備わっていること、光屈性の光量反応曲線は多相的であること、光屈性の発現はフィトクロムの調整を受けていることなどを明らかにした (Iino 2001)。

本代表者らは、本研究課題を開始する数年前から、ゲノム解読が進められていたイネを用いた研究を始めた。イネを用いることにより、イネ科植物で得られた従来の研究成果と分子遺伝学的研究手法をより直接的に結び付けることができると考えた。さらに、シロイヌナズナとは系統的に離れたイネを用いることにより、シグナル伝達機構の普遍性 (あるいは特異性) に関する知見が得られると期待され、また、シロイヌナズナでは困難な研究も可能になると思われた。

イネ芽生えを光屈性の研究材料にするにあたって、その成長特性を調べるなど、多くの基礎的研究を行い、同時に、光屈性が欠損した突然変異体を分離する作業を進めた。イネの光屈性は、オートムギやトウモロコシに比較すると弱く、パルス照射による反応が解析できないなどの問題が生じたが、連続照射を用いて、光屈性が欠損あるいは低下した突然変異体をいくつか分離することができた。そのうちのひとつの原因遺伝子 (*CPT1*) を同定するなど、ようやく成果が見込めるようになった。

2. 研究の目的

本研究は、イネの光運動に関与するシグナル伝達機構を、光屈性を中心に、分子遺伝学的手法を用いて明らかにすることを目的とした。このため、まず、イネの phot1 が欠損した突然変異体を分離し、それを用いて光屈性および他の光運動への phot1 の関与を調べ、また、幼葉鞘の光屈性が特異的に欠損した突然変異体 *cpt2* の原因遺伝子を同定することにした。本研究ではさらに、光屈性の光量反応曲線が多相性を示す理由を形質転換体・突然変異体を利用して解析するなどして、光運動の調節にかかわる分子機構を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) イネの光運動への phot1 の関与

イネは配列が極めて類似した二つの *PHOT1* 遺伝子ホモログ (*OsPHOT1a*、*OsPHOT1b*) をもつ。*OsPHOT1a* の *Tos17* 挿入株 (*phot1a* 突然変異体) を入手し、これを *OsPHOT1a* 機能の解析に用いた。さらに、2つのホモログの発現を RNAi で抑えた形質転換体を作出した。また、 γ 線で突然変異を誘発した *phot1a* 突然変異体から *OsPHOT1a*・*OsPHOT1b* の二重突然変異体を分離し、これらを phot1 機能の解析に用いた。二重突然変異体を野生型品種 (ニホンバレ) に戻し交配し、その後代から *OsPHOT1b* 単独の突然変異体 (*phot1b*) を分離して、*OsPHOT1b* 機能の解析に用いた。

(2) イネ突然変異体の解析

幼葉鞘の光屈性が特異的に低下した *cpt2* 突然変異体の原因遺伝子を同定するため、*cpt2* 突然変異体とインディカ品種を掛け合わせた F2 集団 (約 7,000 個体) を用いて、マップベースクローニングによる突然変異領域の絞り込みを行った。原因遺伝子は組み換え率が極めて低い領域に存在することから、280 kb の領域に絞り込んだ段階で、マップベースクローニングによる更なる絞り込みが困難になった。そこで、*cpt2* 突然変異体の BAC クローンライブラリーを構築し、上記領域を含む BAC クローンを分離して、全領域の塩基配列を解読した。この配列を野生型の配列と比較することにより候補遺伝子を同定した。正常な候補遺伝子を *cpt2* 突然変異体に導入して相補性検定を行った。

(3) 光屈性のフィトクロム制御の解析

暗所で育てた芽ばえの幼葉鞘は大きな回旋運動をしているため、光屈性を測定するのが困難であることが判明した。そこで、光屈性のフィトクロム制御を解明するために、種々の条件を検討し、暗順応しても回旋運動

を示さない実験系を確立した。この実験系とフィトクロム欠損突然変異体 (*phyA*, *phyB*, *phyC*, およびそれらの二重突然変異体) を用いて、光屈性に対するフィトクロムの作用を解析した。

(4) イネの重力屈性突然変異体 *lazy1* を用いた光屈性の解析

lazy1 突然変異体の芽ばえを用いて、幼葉鞘に誘発される光屈性の光量反応曲線を解析した。実験には、アクリルキュベット (0.7%寒天) に播種し、赤色光下で播種から 2.5 日間培養して得られた芽ばえを用いた。次いで、*phot1a/phot1b* 二重突然変異体および *cpt1* 突然変異体を *lazy1* 突然変異体と交配して作出した二重・三重突然変異体を用いて、光量反応曲線を同様に求め、光量反応曲線で分離される反応と *phot1* および *CPT1* の関係を解析した。

(5) シロイヌナズナを用いた光屈性の解析

野生型シロイヌナズナ (Columbia-0) の胚軸に誘発される光屈性の光量反応曲線を求めた。実験には、リアルタイム PCR チューブ (0.7%寒天) に播種し、暗黒下で 2 日間培養したのち、赤色光下に順応させて得られた芽ばえを用いた。青色光の方向は芽ばえのフックの面に垂直になるようにし、屈曲反応は青色光照射開始から 4 時間後に測定した。次いで、シロイヌナズナの突然変異体 (*phot1*, *phot2*, *phot1phot2*, *nph3*, *rpt2*, *pk1*, *pk2*, *pk3*, *pk4*, *pk1pk2*, *pk1pk3*, *pk1pk4*, *pk1pk2pk3*) を用いて、同様に光量反応曲線を求め、野生型の光量反応曲線と比較した。

4. 研究成果

(1) イネ *phot1* の機能解析

イネでは 4 塩基のみが異なる 2 つの *PHOT1* 遺伝子ホモログ (*OsPHOT1a*, *OsPHOT1b*) と 1 つの *PHOT2* 遺伝子ホモログをもつことが明らかになった。*Tos17* 挿入による *OsPHOT1a* 欠損変異体の幼葉鞘は野生型とほぼ同様の光屈性を示した。この結果を受けて *OsPHOT1a* と *OsPHOT1b* の両方の発現を抑えた RNAi 形質転換体を作成し、また γ 線を照射した *PHOT1a* 欠損突然変異体から *phot1a/phot1b* 二重突然変異体を分離して、光屈性への *phot1* の関与を調べた。これらの系統は、片側からの連続青色光照射 ($0.01\text{--}100\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) に対して、幼葉鞘と幼根の光屈性を全く示さなかった。また、*phot1a/b* 二重変異体と野生型との戻し交配により得られた *phot1b* 突然変異体は野生型に近い光屈性を示した。これらの結果は、イネ芽生えの光屈性には冗長的に働く 2 つの *phot1* ホモログが関与すること、また、*phot1* が光屈性のほぼ唯一の光受容体であること

を示した。さらに葉緑体の光定位運動を解析する方法を検討し、*phot1a/phot1b* 二重突然変異体を用いて解析した。その結果、*phot1* はイネにおいてもシロイヌナズナ同様、葉緑体の光定位運動に関与していることが明らかになった。

(2) *cpt2* 突然変異体の解析

cpt2 突然変異体は幼葉鞘の光屈性が低下した突然変異体として、すでに代表者らによって分離されていた (図 1)。この突然変異体の性質を詳細に調べたところ、根の光屈性は正常で、幼葉鞘の先端部における光屈性が特異的に欠損していることを明らかになった。*cpt2* 突然変異体の原因遺伝子を同定するために、*cpt2* 突然変異体とインディカ品種とを交配した F2 世代を用いてマップベースクローニングを行った。その結果、原因遺伝子の存在範囲を 280 kb まで絞り込むことができたが、それ以上の絞り込みには相当数の F2 個体を準備しなければならないことが判明した。これは、この領域は組み換え率が極めて低いことによると考えられた。そのため、この領域を含む *cpt2* 突然変異体の BAC クローンを分離し、280kb 領域の全 DNA 配列を解読して、候補遺伝子を同定した。この遺伝子は新規のタンパク質をコードし、葉緑体移行シグナルとタンパク質キナーゼ領域をもつことが明らかになった。この結果をもとに、CaMV 35S RNA プロモーターの下流に *CPT2* cDNA を配した融合遺伝子を *cpt2* 突然変異体に導入して、相補性検定を行った。作出した形質転換体は正常な光屈性を示したことから、この候補遺伝子が *CPT2* 遺伝子であると結論づけた。

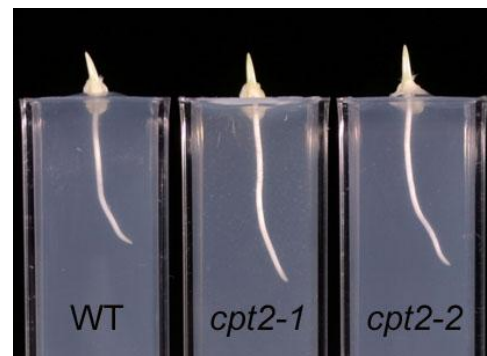


図 1 イネ *cpt2* 突然変異体。

連続青色光で誘導された野生型品種 (WT、ニホンマサリ) と突然変異体の芽ばえの光屈性。 *cpt2-1* と *cpt2-2* は突然変異アリル。青色光は左側から照射。突然変異体の根は正常な光屈性を示すが、幼葉鞘の光屈性が低下している。特に先端部が屈曲しない。

(3) 光屈性のフィトクロム制御とその分子機構

トウモロコシ幼葉鞘で明らかにした光屈性のフィトクロムの制御をイネ幼葉鞘で調べる目的で、暗黒条件で培養した芽ばえを光屈性実験に用いたところ、幼葉鞘は規則正しい回旋運動を行っていることが分かった。この性質のため暗黒条件で成育した芽ばえを用いた光屈性の研究が困難になった。そこで、種々の条件を検討して、回旋運動を示さない実験系を確立した。この実験系とフィトクロム欠損突然変異体を用いて、光屈性(40分の青色光照射によって誘導される時間依存光屈性)の反応の大きさはフィトクロムの制御を受けていることを明らかにした。なお、*phyA* は超低光量反応に関与し、少なくとも暗順応させた芽ばえでは超低光量反応にのみ関与していると考えられているが、フィトクロム欠損突然変異体を用いて得られた上記結果は、*phyA* は超低光量反応に加え、低光量反応(赤色光の効果が遠赤色光により打ち消される反応)にも働いていることを示した。

(4) 重力屈性突然変異体 *lazy1* を利用した光屈性の解析

重力屈性が低下した突然変異体として古くから知られていた *lazy* (*lazy1*) 突然変異体は、幼葉鞘の回旋運動も欠損していることを見出し、その原因遺伝子 (*LAZY1*) を新規遺伝子として同定した。この突然変異体では重力により誘導されるオーキシンの不均等勾配も欠損していることから、重力屈性に特異的なシグナル因子として働いていると考えられた。

lazy1 突然変異体の幼葉鞘は、野生型品種の幼葉鞘よりも大きな光屈性を示し(図2A)、パルス照射による光屈性も解析できることが分かった。そこで、*lazy1* 突然変異体の幼葉鞘を用いて光屈性の光量反応曲線を求めた。その結果、イネ幼葉鞘は、トウモロコシ幼葉鞘の場合と同様に、パルス照射によって誘導される一次光屈性と二次光屈性、および照射時間に依存する光屈性を示すことが確認された(図2B)。次いで、*lazy1* と *phot1a/b* 二重突然変異体を交配して作出した三重突然変異体、*lazy1* と *cpt1* 突然変異体を交配して作出した二重突然変異体を用いて解析したところ、光量反応曲線で分離される全ての反応成分は、*phot1/CPT1* 光受容系に依存することが明らかになった。このことは、光屈性の光量反応曲線にみられる多相性は、複数の光受容体の関与ではなく、*phot1* シグナル伝達系のもつ性質を反映していることを示した。

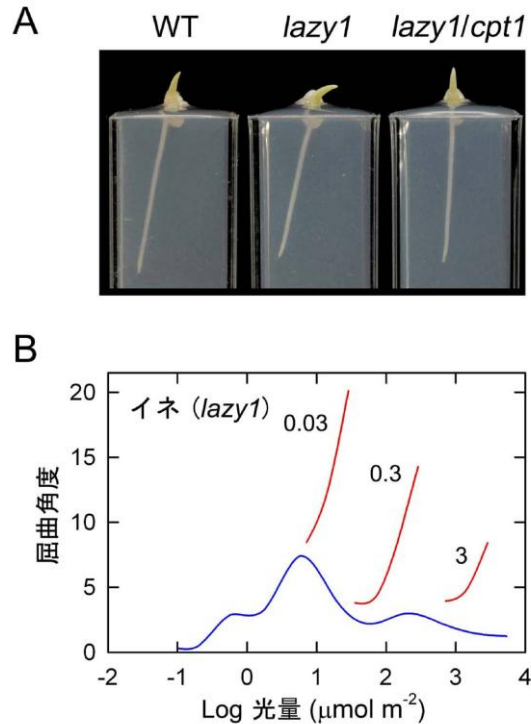


図2 イネ *lazy1* 突然変異体の光屈性。

(A) 連続青色光で誘導された野生型品種(WT)と突然変異体の芽ばえの光屈性。青色光は右側から照射。*lazy1* 突然変異体の幼葉鞘は大きな光屈性を示す。*CPT1* が欠損するとこの光屈性は消失する。

(B) 幼葉鞘の光屈性の光量反応曲線。青線はパルス照射(3分以内)で誘導した光屈性、赤線は図に示した光強度($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)で誘導した時間依存光屈性を示す。

(5) シロイヌナズナ胚軸を用いた光量反応曲線の解析

光屈性の光量反応曲線で分離される光屈性反応成分と光受容体およびシグナル伝達因子との関係をさらに詳細に解析するため、シロイヌナズナを用いた研究を行った。まず、シロイヌナズナ胚軸の光屈性を高精度で測定する方法を確立した。この方法を用いて、野生型(Col-0)の光量反応曲線を解析し、シロイヌナズナ胚軸もパルス照射で誘導される一次光屈性と二次光屈性、および時間依存光屈性を示すことを確認した。次に全ての反応は *phot1* 突然変異体(および *phot1/phot2* が二重突然変異体)と *nph3* 突然変異体で消失していることを見出した。*phot2* 突然変異体は野生型と同様の光量反応曲線を示した。これらの結果は、イネの幼葉鞘で明らかにされたように、光量反応曲線の多相性は *phot1*

を光受容体とし、NPH3 を必須な因子とするシグナル伝達の性質を反映していることを示した。さらに、*rpt2* 突然変異体はパルス誘導の光屈性を示すが、時間依存光屈性を示さないことが明らかになった。この結果は、RPT2 が光屈性の感覚順応に関与するタンパク質であることを示唆した。光量反応曲線の解析では *phot1* 突然変異体はどの条件でも光屈性を示さなかった (*phot2* の関与は認められなかった) が、*phot1* 突然変異体は強光で連続照射すると弱い光屈性を示した。光強度と反応の関係を解析した結果、*phot2* は *phot1* の存在しない条件では強光に反応して弱い光屈性を引き起こすことができるが、野生型胚軸の光屈性にはほとんど関与していないと考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① 飯野盛利、吉原毅、芳賀健、イネ芽生えの成長とその光・重力制御、植物の生長調節、査読無、Vol.44、2009、142-153
- ② Yoshihara, T., Iino, M. Identification of the gravitropism-related rice gene *LAZY1* and elucidation of *LAZY1*-dependent and -independent gravity signaling pathways. *Plant Cell Physiol.* 査読有、Vol.48、2007、678-688
- ③ 飯野盛利 植物は感じて動く No.3 重力屈性と光屈性、遺伝、査読無、Vol.61、2007、14-15
- ④ Haga, K., Iino, M. Asymmetric distribution of auxin correlates with gravitropism and phototropism but not with autostraightening (autotropism) in pea epicotyls. *J. Exp. Bot.* 査読有、Vol.57、2006、837-847
- ⑤ Yoshihara, T., Iino, M. Circumnutation of rice coleoptiles: its relationships with gravitropism and absence in *lazy* mutants. *Plant Cell Environ.* 査読有、Vol.29、2006、778-792
- ⑥ Iino, M. Toward understanding the ecological functions of tropisms: interactions among and effects of light on tropisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 査読無、Vol.9、2006、89-93
- ⑦ Haga, K., Takano, M., Neumann, R., Iino, M. The rice *COLEOPTILE PHOTOTROPISM1* gene encoding an ortholog of Arabidopsis NPH3 is required for phototropism of coleoptiles and lateral translocation of auxin. *Plant Cell* 査読有、Vol.17、2005、

103-115

- ⑧ Yoshihara, T., Iino, M. Circumnutation of rice coleoptiles: its occurrence, regulation by phytochrome, and relationship with gravitropism. *Plant Cell Environ.* 査読有、Vol.28、2005、134-146
- ⑨ He, G., Tarui, Y., Iino, M. A novel receptor kinase involved in jasmonate-mediated wound and phytochrome signaling in maize coleoptiles. *Plant Cell Physiol.* 査読有、Vol.46、2005、870-883

[学会発表] (計 13 件)

- ① Iino, M. Photomorphogenesis and phototropism of rice seedlings: molecular genetic approaches. International symposium: Plant signalling mechanisms. 2010年6月26日 Freiburg, Germany.
- ② 鈴木光宏、吉原毅、高野誠、飯野盛利 イネ (*Oryza sativa*) におけるフォトトロピン 1 の機能 第 51 回日本植物生理学会年会 2010年3月20日 熊本大学
- ③ 西村朋晃、鈴木光宏、飯野盛利 シロイヌナズナ胚軸の光屈性：光量反応曲線で分離される反応成分と光受容体フォトトロピン 1,2 およびシグナル因子 NPH3, RPT2 との関係 第 51 回日本植物生理学会年会 2010年3月20日 熊本大学
- ④ Suzuki, M., Yoshihara, T., Takano, M., Iino, M. Phototropin1 mediates coleoptile and root phototropisms and photonastic leaf movement in rice. Memorial symposium for the 25th international prize for biology 2009年12月3日 京都大学
- ⑤ Zhang, B., Wu, W., Iino, M. Molecular basis of the multiphasic fluence-response relationship in the phototropism of rice coleoptiles. Memorial symposium for the 25th international prize for biology 2009年12月3日 京都大学
- ⑥ Nishimura, T., Suzuki, M., Iino, M. Molecular basis of the multiphasic fluence-response relationship in the phototropism of Arabidopsis hypocotyls. Memorial symposium for the 25th international prize for biology 2009年12月3日 京都大学
- ⑦ Iino, M. Investigating the mechanisms of phototropism in rice coleoptiles. Memorial symposium for the 25th international prize for biology 2009年12月2日 京都大学
- ⑧ 西村朋晃、鈴木光宏、飯野盛利 シロイヌナズナ胚軸の光屈性：パルス照射法と突然変異体を用いた解析 第 15 回日本光生物学協会年会 2009年8月20日 岡崎コンファレンスセンター、愛知

⑨Yoshihara, T., Spalding, E., Iino, M. *LAZY1* belongs to a novel class of genes involved in gravitropic signal transduction in monocot and dicot plants. Plant Biology 2009 (The American Society of Plant Biologists) 2009年7月21日 Honolulu, Hawaii

⑩張博、飯野盛利 イネ幼葉鞘の光屈性におけるフォトトロピン信号伝達系と光量反応曲線の因果関係 第50回日本植物生理学会年会 2009年3月22日 名古屋大学

⑪Iino, M. Molecular genetic analysis of rice coleoptile phototropism with special interest in fluence-response relationships. The 4th Asia Oceania Conference on Photobiology 2008年11月24日 Varanasi, India

⑫吉原毅、飯野盛利、イネの重力屈性と回旋運動を制御する新規遺伝子 *LAZY1* の同定と重力シグナル伝達におけるその役割 日本植物学会第71回大会 2007年9月7日 東京理科大学野田キャンパス、千葉

⑬Iino, M. Phototropism and phototropin signaling in rice. The 3rd Asia and Oceania Conference on Photobiology, 2006年11月19日, Beijing, China

[図書] (計2件)

①飯野盛利、朝倉書店、回旋運動、就眠運動、植物の百科事典 (石井龍一他編集)、2009、552 (分担:40-42)

② Iino, M., Haga, K. Springer-Verlag Tokyo, Roles played by auxin in phototropism and photomorphogenesis. In Light Sensing in Plants. (Eds. Wada, M., Shimazaki, K., Iino, M.), 2005, 370(269-276)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯野 盛利 (IINO MORITOSHI)
大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：50176054

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

芳賀 健 (HAGA KEN)
大阪市立大学・大学院理学研究科・博士研究員
研究者番号：50382031

高野 誠 (TAKANO MAKOTO)
農業生物資源研究所・植物科学研究グルー

プ・光環境応答研究ユニット・ユニット長
研究者番号：20355754

矢野 昌裕 (YANO MASAHIRO)
農業生物資源研究所・基盤研究領域 QTL ゲノム育種研究センター・センター長
研究者番号：50355749