

平成22年 4月 1日現在

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)
 Mechanism of light sensing and signaling mediated by phytochrome and its interacting proteins in plants
 研究代表者
 河内 孝之 (KOHCHI TAKAYUKI)
 京都大学・大学院生命科学研究所・教授
 研究者番号： 40202056

研究成果の概要 (和文)： シロイヌナズナの赤色光・遠赤色光受容体フィトクロムの相互作用タンパク質として機能未知のジンクフィンガータンパク質を単離した。その遺伝子に対するタグ挿入突然変異体を用いた遺伝学的解析によって **phyB** の下流、**FT** 遺伝子の下流で成長相制御に関与することがわかった。時空間的発現特異性解析、突然変異体の表現型相補を指標に機能的な解析によって、この遺伝子の維管束における核内で作用することが重要であることが示された。光環境と成長相制御をつなぐ制御因子であることが示された。

研究成果の概要 (英文)： The novel zinc finger proteins were identified by protein interaction screening with phytochromes. The mutants having T-DNA insertion in the corresponding genes showed late flowering phenotype. The genetic analysis indicated the genes regulated *FT* expression as downstream factors of phytochrome B. The studies of temporal and spatial expression, phenotypic complementation with the modified genes indicated the proteins functioned in the nucleus in vascular tissue. Our finding gives insight on the link between light environment and development in growth control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2007年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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、タンパク質間相互作用、植物光信号伝達、光受容体、フィトクロム、環境応答

1. 研究開始当初の背景

(1) 移動能を持たない植物にとって、与えられた環境に自らを適応させることは、生

存に関わる必要不可欠な能力である。このため、植物は周囲の環境を敏感に感知し、適応するための多様な機能を進化の

過程で獲得してきた。光は植物の生長に欠かせない光合成の源であると同時に、外部環境を認識するための情報としても重要であり、植物に最も影響を与える要因の一つである。植物は光の強度、波長、方向、周期性などを正確に把握し、これを体内で生体情報へと変換する。光環境に対応して、植物体内では適切なシグナルが流れ、生理応答を制御する。光形態形成は植物の光感知から始まる。光感知を正確に行うため、植物は複数種の光受容体を有している。陸上植物において幅広く保存されている光受容体として、主に赤色光 (R : 660 nm 付近) / 遠赤色光 (FR : 730 nm 付近) を吸収するフィトクロムは、植物の発芽から始まり、胚軸伸長抑制、脱黄化、子葉の展開・開閉、花成、結実と幅広い機能を持つ。フィトクロムは植物の生涯を通して、生理応答を制御する重要な因子である。

- (2) フィトクロムは、光に依存して細胞内局在が変わるタンパク質であり、局在の変化によりシグナル発信の調節が行われていると考えられる。phyA は暗所において細胞質に蓄積するが、光を吸収することでその一部が核内へ移行することが知られている。赤色光を吸収すると、phyA は短時間で核内へ移行し、核内で顆粒状構造体を形成するが、数分の内に分解される。phyB も暗所では細胞質に局在し、赤色光の受容によって核に移行するこのように、フィトクロムは光に依存して細胞内局在を変化させるため、細胞質、核とそれぞれに存在するフィトクロム相互作用因子と相互作用をすることでシグナルを下流に伝達していることが考えられる。
- (3) 植物の花成制御にも光は大きな影響を与える。光周性経路では、概日時計により GI-CO タンパク質により長日条件下において FT の発現が誘導され、転写・翻訳された FT タンパク質がロゼット葉から茎頂へ運ばれ花成が促進される。光質経路とは、光周性経路により制御され発現した CO、FT に光受容体が、概日時計を通さず直接作用する経路を指す。光質経路の実体に関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

- (1) これまでに報告されているフィトクロム相互作用因子の多くは、種子発芽や胚軸伸長抑制など生長初期の応答を指標に単離されている。しかし、フィトクロムは植物の生涯を通して機能する分子

であり、それ以後の成長段階における応答特異的に関わる因子が存在することが考えられる。そこで、成熟した植物個体を用いて、光シグナル発信の鍵となる新規相互作用因子を単離することを目指した。

- (2) 単離した遺伝子がコードするタンパク質は、植物体内の生理的な条件でフィトクロムと相互作用することが重要である。単離した遺伝子がコードするタンパク質とフィトクロムの結合能、相互作用の光質特異性を評価した。生化学的な相互作用の検出に加えて、突然変異体を用いた遺伝学的な手法を用いて解析することによって、生体内における機能性を評価した。
- (3) 単離した因子の理解には信号伝達の役割を分子として明らかにすることが重要である。このために、VOZ の細胞内局在解析と VOZ の下流因子の解析を行い、シグナル伝達における VOZ の役割とその下流因子を明らかにした。
- (4) シロイヌナズナを用いている最大の利点は、解析している因子と関連しそうな突然変異体の利用や遺伝子導入によって分子遺伝学的に機能を解析できることにある。上流と考えられる光受容体や現象に近い下流因子との関係を遺伝的に解析した。

3. 研究の方法

- (1) 新規フィトクロム相互作用因子の単離と相互作用の確認：Y2H 法により、bait に全長のフィトクロム遺伝子を用いて、スクリーニングを行った。相互作用は、in vitro の結合解析によって確認した。
- (2) 表現型の解析：T-DNA 挿入変異体入手してバッククロス後、表現型の解析に利用した。使用したのは、voz1-1、voz1-2、voz2-1、voz2-2 とそれらの二重変異体である (図 1)。胚軸伸長抑制応答、緑化抑制応答、花成時期の測定などを解析した。また、ゲノム断片の導入による相補性検定株を作成して利用した。
- (3) 因子の遺伝的位置づけ：フィトクロム変異体や花成関連変異体との多重変異体を作成し表現型解析を行うとともに、遺伝子発現を定量的に検出することによって遺伝的な位置づけを明らかにする。
- (4) VOZ の細胞内局在部位：VOZ2 に GFP を融合したコンストラクトを作製し、植物に形質導入した。この融合遺伝子が機能的であることは変異体を相補することで検証した。光質条件を変化させて GFP 蛍光観察を行うことで、光質に依存した GFP-VOZ2 の局在の解析を試みた。

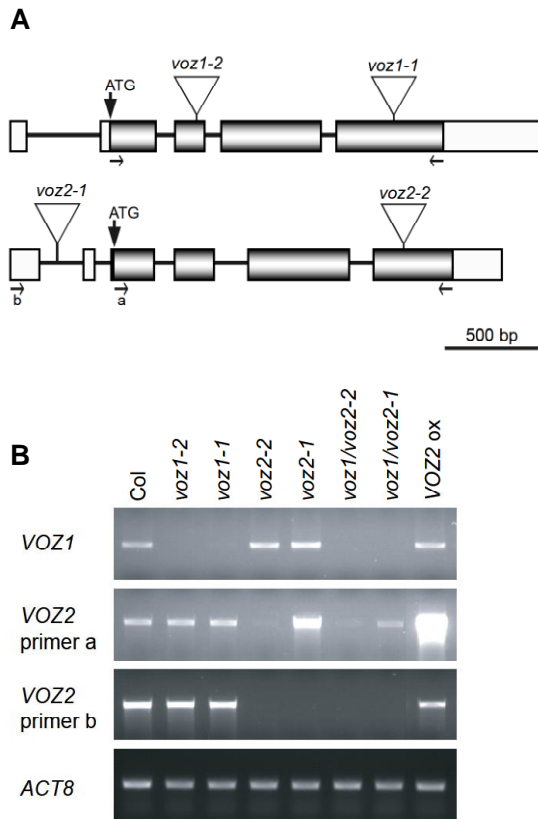


図1 *voz* 変異体における T-DNA 挿入部位と *VOZ* の発現量の確認

A. *voz* 変異体における T-DNA 挿入部位を示した模式図

上段は *VOZ1* 遺伝子、下段は *VOZ2* 遺伝子の一次構造を示す。実線部はイントロン、ボックスはエキソンを示し、白色部は非翻訳領域、灰色部は翻訳領域を示す。白色の三角は T-DNA 挿入部位である。また、B の RT-PCR に用いたプライマーの位置を矢印で示した。

B. RT-PCR 法を用いた *voz* 変異体における *VOZ* 遺伝子の発現量解析

最上段は *VOZ1* 遺伝子のコーディング領域、二段目は *VOZ2* 遺伝子のコーディング領域、三段目は *VOZ2* 遺伝子の 5'側の非翻訳領域とコーディング領域、最下段はコントロールであり、*ACT8* 遺伝子の発現量である。

(5) *VOZ* の細胞内機能部位の同定：*VOZ* はフィトクロム相互作用因子であることから、細胞質または核において機能する可能性が高い。シグナル伝達において、*VOZ* が機能的に働く細胞内局在を特定するため核移行シグナル (NLS)、核搬出シグナル (NES) をそれぞれ *VOZ2* に付加したコンストラクトを用いて、*VOZ* が機能する細胞内局在の解析を行った。

4. 研究成果

(1) *PHYA*、*PHYB* のどちらを Bait とした場合でも、単離された遺伝子は類似しており、*TCP* ファミリーに属する数種類の遺伝子と *VOZ* (*V*ascular plant *O*ne *Z*inc finger, Mitsuda et al., 2004) 遺伝子が複数含まれていた。*VOZ1* は 486 アミノ酸

残基、*VOZ2* は 450 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードし、アミノ酸配列において互いに約 53 % の相同性を示した。アミノ酸配列の相同性検索の結果、短日植物、中性植物、長日植物に関わらず、ほぼ全ての植物に広く保存されていた。一方、植物以外に相同タンパク質は見つからなかったため、*VOZ* は植物に特有の遺伝子であり、植物特異的で重要な役割を果たしていると考えられた。2004年、Mitsuda らにより、*Vacuolar H⁺-pyrophosphatase (V-PPase)* をコードする *AVP1* のプロモーター領域に結合するタンパク質として単離され、*in vitro* の研究から、C-X4-C-X13-C-X3-H の新奇 Zinc finger motif を有し、転写活性化能があること、このモチーフに亜鉛が配位すること、GCGT (N×7) ACGC の DNA 配列に結合することが報告されている。しかしながら、これらの研究は、植物における *VOZ* の機能を調べたものではなく、*VOZ* の生理的な役割は未だ明らかになっていないといえる。

フィトクロムと *VOZ* の相互作用を検証するために、*in vitro* においてフィトクロムと *VOZ* の結合アッセイを行った。その結果、*VOZ1*、*VOZ2* とともに全長の *PHYA* および *PHYB* との結合が検出された。同様に *VOZ1* と *PHYA*、*PHYB* の N 末端領域が結合することも明らかとなった。次に、相互作用の光特異性を調べるために、だいにしょうで我々が構築した発現系により合成した光受容能をもつ組換えフィトクロムと *GST-VOZ* 融合タンパク質を用いて、結合アッセイを行った。*in vitro* で *VOZ1*、*VOZ2* タンパク質は、フィトクロム A、B と相互作用し、フィトクロム A に対するタンパク質間相互作用の親和性が高いことが示唆された。また、*Pfr* 型よりも *Pr* 型の *phyA* に対する親和性が高いことも示唆された。

(2) 突然変異体の表現型解析では芽生えの胚軸伸長抑制、FR 依存緑化抑制、葉柄の伸長抑制などは野生型と違いが見つからなかった。長日条件下と短日条件下で花成時期を調べたところ、*voz1/voz2* 二重変異体が長日条件下でのみ遅咲きを示した。相補性テストの結果、*voz1/voz2* 二重変異体にプロモーター領域を含む *VOZ1*、あるいは *VOZ2* のゲノム断片を導入すると遅咲きの表現型が回復することも確認された。よって、*VOZ1*、*VOZ2* が重複して長日条件下での花成を促進していることが明らかになった。*VOZ* が長日条件下でのみ機能することから、フィトクロムと同じ花成シグナル伝達経路で機能していることが示唆された。また、白色光下で

葉が立つ表現型が観察された。フィトクロムは、R/FRの比により日陰を感知して、葉の重なりを避けるように葉を立てる日陰回避応答を調節していることが知られている。*voz1/voz2*二重変異体も、常に野生型よりも葉は立っているものの、野生型同様に葉の角度が変化した。よって、*voz1/voz2*二重変異体は、R/FRの比を認識できていると判断した。また、この表現型は全日長、長日条件、短日条件でも観察されたため、日長とは無関係であることが示唆され、VOZが関与すると予想される花成経路とは別の経路でVOZが機能することが示唆された。

- (3) 花成促進経路における *phyA*、*phyB* と *VOZ* の関係を遺伝学的に調べるため、各フィトクロムと *VOZ1*、*VOZ2* の多重変異体の長日条件下での花成時期を調べた。その結果、*phyA/voz1/voz2*、*phyB/voz1/voz2* の三重変異体は、*voz1/voz2* と同様に遅咲きであり、*VOZ* が *phyA*、*phyB* の下流で機能していることが明らかになった (図 2)。また、*phyB/voz1/voz2* の葉の形態は *phyB* と変化がなく、*VOZ* が花成促進経路で特異的に機能していることが示唆された。フィトクロムを初発とする花成のシグナル伝達経路において、*CO* と *FT* が主要な役割を果たしている。*VOZ* と *CO*、*FT* との関わりを明らかにするために、*voz1/voz2* 二重変異体における光周期依存的な *CO*、*FT* の発現量の変動パターンを調べた。その結果、*CO* 遺伝子の変動パターンは野生型と同様であり、*VOZ* が *CO* 遺伝子の発現調節には関わっていないことが示唆された。一方、*FT* 遺伝子は、*voz1/voz2* において、暗期前の発現上昇が起らず、

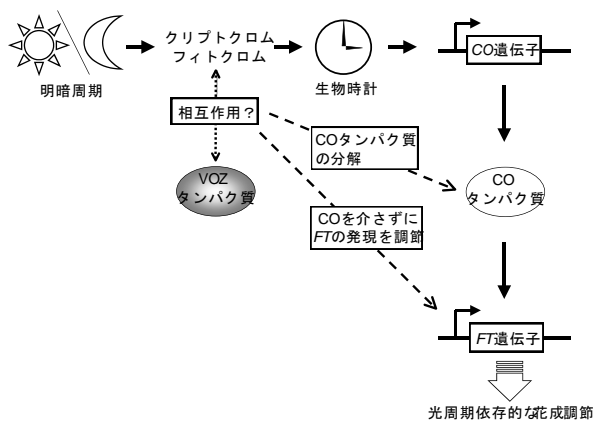


図 2 光依存的な花成促進経路における VOZ の位置づけ

VOZ と光受容体の関係は明らかではないが、光周期依存的な促進経路において、CO タンパク質の分解調節、あるいは CO を介さない新たな経路で *FT* の発現を誘導し、花成を促進していると考えられる。

これが遅咲きの直接的な原因であることが明らかになった。よって、*VOZ* は *CO* の転写制御には関与しないが、*VOZ* が *FT* の上流で機能することが明らかになった。

- (4) *GFP-VOZ2 / voz1 voz2* 株で融合タンパク質が *VOZ* として機能的であることを検証するため、花成時期は、抽苔までの栽培日数と抽苔時のロゼット葉の枚数を指標に測定した。その結果、*VOZ2p:GFP-VOZ2 / voz1 voz2* 株では、*voz1 voz2* 二重変異体の遅咲きの表現型を完全に相補し、機能的であることが明らかになった。*35S:GFP-VOZ2 / voz1 voz2* では、細胞質に蛍光が強く見られた。次に、光質条件を変化させて細胞内局在の解析を行った結果、光質条件に関わらず、細胞質に蛍光が観察される傾向があった。更にプロトプラスト化して GFP 蛍光を観察したところ、細胞質に局在しているものが多かったが、20% 程度の細胞で核と思われる場所で GFP 蛍光が観察された。このことから、*GFP-VOZ2 / voz1 voz2* において *GFP-VOZ2* の局在は細胞によって異なり、細胞質または核に局在していることが示唆された。
- (5) *35S:GFP-VOZ2-NLS* および *35S:GFP-VOZ2-NES* のコンストラクトにより *voz1 voz2* 二重変異体の遅咲きの表現型が相補されるかを解析した。*35S:GFP-VOZ2-NLS / voz1 voz2* では、*voz1 voz2* 二重変異体の遅咲きの表現型を相補した。このことから核に局在する *VOZ* が花成経路において重要な機能を果たしていることが考えられる。これに対し、*35S:GFP-VOZ2-NES / voz1 voz2* では、遅咲きの表現型が相補されなかったことから、細胞質に局在する *VOZ* では花成におけるシグナルを正しく伝達することはできないと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) Gisk, B., Yasui, Y., Kohchi, T., and Frankenberg-Dinkel, N. Characterization of the heme oxygenase protein family in *Arabidopsis thaliana* reveals a diversity of functions. 査読有 *Biochem. J.* **425**, 425-434 (2010).
- 2) 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. 査読有 *J. Mol. Biol.* **389**, 376-387 (2009).
- 3) 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. 査読有 *Plant Cell Physiol.* **49**, 1084-1091 (2008).

- 4) Narikawa, R., Kohchi, T., and Ikeuchi, M. Characterization of the photoactive GAF domain of the CikA homolog (SyCikA, Slr1969) of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. 査読有 *Photochem Photobiol Sci.* **7**, 1253-1259 (2008).
- 5) Ishizuka, T., Narikawa, R., Kohchi, T., Katayama, M., and Ikeuchi, M. Cyanobacteriochrome TePixJ of *Thermosynechococcus elongatus* harbors phycoviolobin as a chromophore. 査読有 *Plant Cell Physiol.* **48**, 1385-1390 (2007).
- 6) 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*. 査読有 *FEBS Lett.* **580**, 1333-1338 (2006).
- 7) Yoshihara, S., Shimada, T., Matsuoka, D., Zikihara, K., Kohchi, T. and Tokutomi, S. Reconstitution of blue/green reversible photoconversion of a cyanobacterial photoreceptor. PixJ1 in phycocyanobilin producing *E. coli*. 査読有 *Biochem.* **45**, 3775-3784 (2006).
- 8) Linley, P. J., Landsberger, M., Kohchi, T., Cooper, J. B., and Terry, M. J. The molecular basis of heme oxygenase deficiency in the *pcd1* mutant of pea. 査読有 *FEBS J.* **273**, 2594-2606 (2006).

[学会発表] (計 8 件)

1. 安居佑季子、西谷亜依子、上本允大、硯亮太、向川佳子、中井勇介、中平洋一、佐藤雅彦、河内孝之、フィトクロムシグナル伝達において機能する花成促進因子 VOZ の局在解析、第 51 回日本植物生理学会年会、平成 22 年 3 月 19 日、熊本大学 (熊本市)
2. 西谷愛依子、安居佑季子、硯亮太、上本允大、向川佳子、中井勇介、中平洋一、佐藤雅彦、河内孝之、シロイヌナズナ花成制御における VOZ 遺伝子の機能解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、平成 22 年 3 月 28 日、東京大学 (東京都)
3. 安居佑季子、硯亮太、西谷亜依子、向川佳子、佐藤雅彦、河内孝之、花成制御に関わるフィトクロム相互作用因子 VOZ の細胞内局在解析、第 50 回日本植物生理学会年会、平成 21 年 3 月 22 日、名古屋

大学 (名古屋市)

4. 久保田茜、小松愛乃、片岡秀夫、石崎公庸、大和勝幸、河内孝之、苔類ゼニゴケにおける青色光応答の解析、第 50 回日本植物生理学会年会、平成 21 年 3 月 22 日、名古屋大学 (名古屋市)
5. Kohchi, T., Structure-activity studies of phytochrome chromophore in vivo, 4th Asia Oceania Conference on Photobiology, 2008. 11. 24-26, Varanasi, India
6. 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、第 49 回日本植物生理学会年会、平成 19 年 3 月 22 日、札幌国際会議場 (札幌市)
7. 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、第 48 回日本植物生理学会年会、愛媛大学 (松山市)、平成 18 年 3 月 23 日
8. 硯亮太、向川佳子、光田展隆、佐藤雅彦、河内孝之、シロイヌナズナの転写因子 VOZ の花成制御への関与、日本分子生物学会 2006 フォーラム、平成 17 年 12 月 6 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)

[図書] (計 3 件)

1. 大和勝幸、石崎公庸、河内孝之、ゼニゴケの培養法、低温科学 (Low Temperature Science) , **67**: 23-29 (2009).
2. 石崎公庸、河内孝之、アグロバクテリウムによるゼニゴケ核ゲノム形質転換法、低温科学 (Low Temperature Science) , **67**: 597-600 (2009).
3. 千代田将大、河内孝之、ゼニゴケの培養細胞と植物体のプラスチド形質転換法、低温科学 (Low Temperature Science), **67**: 601-606 (2009).

[その他]

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/plantmb/index.php?cID=65>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河内 孝之 (KOHCHI TAKAYUKI)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：40202056

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大和 勝幸 (YAMATO T. KATSUYUKI)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：50293915