

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ~ 2008
 課題番号：19760550
 研究課題名 (和文)
 光受容体フィトクロムをバイオ光スイッチとして利用するための基礎的な研究
 研究課題名 (英文)
 A basic study for utilization of photoreceptor phytochrome for bio-photoswitch
 研究代表者
 岡澤 敦司 (OKAZAWA ATSUSHI)
 大阪大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号：10294042

研究成果の概要：光の有無によって、核へと光シグナルを伝える事が出来るシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)由来の赤色/遠赤色光受容体フィトクロム A と相互作用するタンパク質の候補をシロイヌナズナの cDNA ライブラリよりスクリーニングし、数個の候補タンパク質を得た。これらの候補タンパク質を DsRED と融合させ、フィトクロム A-GFP 融合タンパク質と共発現させることでこれらのタンパク質の細胞内の共局在 (光照射下での核局在)を確認した。尚、これらの候補タンパク質はこれまで機能未知のタンパク質であった。また、フィトクロム A が制御する代謝に関して新しい知見を得た。即ち、ポリアミンのうちプトレシン量が光による制御を受けている事を明らかにした。さらに、非光合成性植物ヤセウツボ (*Orobanche minor*)のフィトクロム A が光合成植物のフィトクロム A の機能解明に有用であることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：工学

キーワード：光スイッチ, フィトクロム, 大腸菌 two-hybrid

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物の光受容体フィトクロムは植物生理学の古典的かつ中心的な研究対象であり、その研究の歴史は古い。近年の分子生物学技術の発展により、フィトクロム分子が光の on/off によって、細胞質—核間を移動することで転写を制御する分子スイッチであることが示された。光がフィトクロムを介してどのように植物の生理応答を制御しているか

について国内外で非常に多くの研究がなされている。しかし、光による細胞内局在および転写の制御という機構を応用した例は未だない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、フィトクロムを外部からの光によって転写の on/off 制御の出来るバイ

オ光スイッチとして利用するための基礎的な研究を指向する。

(2) フィトクロムの信号伝達は以下の図のように3つの過程に分けることが出来る。過程1では、光エネルギーが化学エネルギー（フィトクロムタンパク質の構造変化）へと変換される。過程2では活性化されたフィトクロムが核へと輸送される。過程3で核内の下流の遺伝子の発現が誘導される。



(3) 過程1, 3についてはこれまでの研究で多くのことがわかっている。特に、過程3でフィトクロムと相互作用する転写因子については多数の報告がなされている。

(4) 本研究では、これまでに知見のない過程2についての情報、特に、フィトクロムを核に輸送するタンパク質についての情報を得ることを目的とした。

(5) また、メタボロミクスによってシロイヌナズナ中でフィトクロム A の制御する代謝について新しい知見を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナのフィトクロム A をベイト、シロイヌナズナの cDNA ライブラリをプレイとして、大腸菌を用いた two-hybrid スクリーニングを行った。大腸菌を用いることで、特に核外で相互作用するタンパク質を得ることを期待した。

(2) スクリーニングされたタンパク質については、DsRED の融合タンパク質として、GFP とフィトクロムタンパク質と共発現させ、その局在を暗所かおよび遠赤色光下で蛍光顕微鏡にて観察した。

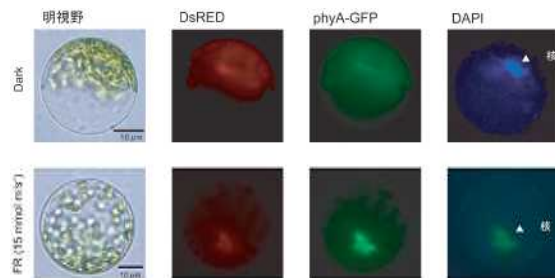
4. 研究成果

(1) シロイヌナズナのフィトクロム A をベイト、cDNA ライブラリをプレイとして大腸菌を用いた two-hybrid スクリーニングを行った。ポジティブコントロールとして既にフィトクロム A との相互作用が確認されているフィトクロム相互作用因子 PIF3 をプレイとして用いた場合に、選択培地上においてコロニーが確認出来、この系でフィトクロ

ム A の相互作用タンパク質をスクリーニング出来る事が示された。

(2) 大腸菌 two-hybrid スクリーニングの結果、これまでにフィトクロム A との相互作用が知られておらず、かつ植物中での機能が明らかでないキナーゼ様タンパク質等 10 程度の候補タンパク質遺伝子を得た。

(3) DsRED との融合タンパク質と GFP と融合させたフィトクロム A との共発現による細胞内局在解析の結果、二つの候補タンパク質（キナーゼ様タンパク質ならびに転写因子様タンパク質）についてフィトクロム A との共局在（光照射化での核局在）を確認できた（下図）。



(4) また、このうちの転写因子様タンパク質はフィトクロム A の下流で遠赤色光によって発現制御を受けていることを明らかにした。

(5) これらの研究と関連し、フィトクロム A の下流で制御されている代謝経路を明らかにした。即ち、光はポリアミン代謝経路中のアルギニンデカルボキシラーゼ遺伝子 *ADC2* の発現調節を介してプロレシンの量を制御を行っている事が明らかになった。

(6) また、光合成を行わない寄生植物ヤセウツボ (*Orobancha minor*) より通常の植物とは機能の異なるフィトクロム A を単離し、その機能について解析をしたところ、このフィトクロム A が植物のフィトクロム A の機能解明に有力な遺伝子源となることを確認した。

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5件)

Jumtee, K., Okazawa, A., Harada, K., Fukusaki, E., Takano, M., Kobayashi, A., Comprehensive metabolite profiling of *phyA phyB phyC* triple mutants to reveal their associated metabolic phenotype in

rice leaves, *J. Biosci. Bioeng.*, in press, 査読有り

Takagi, K., Okazawa, A., Wada, Y., Mongkolchaiyaphruek, A., Fukusaki, E., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Kobayashi, A., Unique phytochrome responses of the holoparasitic plant *Orobancha minor*, *New Phytol.*, **182**, 965-974, 2009, 査読有り

Jumtee, K., Bamba, T., Okazawa, A., Fukusaki, E., Kobayashi, A., Integrated metabolite and gene expression profiling revealing phytochrome A regulation of polyamine biosynthesis of *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp. Bot.*, **59**, 1187-1200, 2008, 査読有り

Okazawa, A., Trakulnaleamsai, C., Wada, Y., Fukusaki, E., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Kobayashi, A., Effect of light on the growth of *Orobancha minor* Sm., *Sudan J. Agric. Res.*, **10**, 115-119, 2007, 査読無し

岡澤敦司, 植物といえば光合成? 寄生植物の光合成能喪失とフィトクロムの変異の解析からわかること *化学と生物*, **45**, 674-6, 2007

[学会発表](計9件)

高木一輝, 岡澤敦司, 馬場健史, 福崎英一郎, 米山弘一, 竹内安智, 小林昭雄, 非光合成植物ヤセウツボ由来フィトクロム A の機能解析, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 09.3.27-29, 福岡

岡澤敦司, 高木一輝, 馬場健史, 福崎英一郎, 米山弘一, 竹内安智, 小林昭雄, 全寄生植物ヤセウツボのフィトクロム A はシロイヌナズナで機能するか? 第 50 回日本植物生理学会年会, 09.3.21-24, 名古屋

高木一輝, 岡澤敦司, 馬場健史, 福崎英一郎, 米山弘一, 小林昭雄, 非光合成植物ヤセウツボ由来フィトクロム A の機能解析, 第 26 回日本植物細胞分子生物学会, 08.9.1-2, 大阪

Jumtee, K., Bamba, T., Okazawa, A., Fukusaki, E., Kobayashi, A., Integrated metabolic profiling and gene expression profiling revealing phytochrome A

regulation of polyamine biosynthesis of *Arabidopsis thaliana*, 第 26 回日本植物細胞分子生物学会, 08.9.1-2, 大阪

高木一輝, 岡澤敦司, 馬場健史, 福崎英一郎, 米山弘一, 小林昭雄, 非光合成植物ヤセウツボ由来フィトクロム A の機能解析, 第 60 回日本生物工学会大会, 08.8.27-29, 仙台

Takagi, K., Okazawa, A., Trakulnaleamsai, C., Fukusaki, E., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Kobayashi, A., Photoresponse analysis of phytochrome A in a non-photosynthetic plant, *Orobancha minor* Sm., 5th International Weed Science Congress, 08.6.23-27, Vancouver, BC, Canada

北卓郎, 岡澤敦司, Narumol Saksamran, 平岡幸浩, 澤田竜太郎, 土井智子, 福崎英一郎, 杉本幸裕, 小林昭雄, 寄生植物 *Striga hermonthica* の光受容体フィトクロム相同遺伝子の単離および光応答の解析, 第 49 回日本植物生理学会年会, 08.3.20-22, 札幌

北卓郎, 岡澤敦司, Narumol Saksamran, 平岡幸浩, 福崎英一郎, 杉本幸裕, 小林昭雄, 寄生植物 *Striga hermonthica* 由来光受容体フィトクロム相同遺伝子の単離, 第 25 回日本植物細胞分子生物学会, 07.8.8-9, 千葉

Takagi, K., Okazawa, A., Wada, Y., Trakulnaleamsai, C., Fukusaki, E., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Kobayashi, A., Photoresponse analysis of phytochrome A in the non-photosynthetic parasitic plant; *Orobancha minor* Sm., 9th World Congress on Parasitic Plants, 07.6.3-7, Charlottesville, VA, USA

[その他]
ホームページ等

<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/pl/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡澤 敦司 (OKAZAWA ATSUSHI)
大阪大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 10294042

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし