

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770038
 研究課題名（和文）ヒメツリガネゴケをモデル系とした植物光受容体フォトトロピン
 シグナル系の解析
 研究課題名（英文）Analysys of the phototropin signaling system in *Physcomitrella patens*

研究代表者
 笠原 賢洋（KASAHARA MASAHIRO）
 立命館大学・生命科学部・准教授
 研究者番号：70361748

研究成果の概要：植物の光受容体であるフォトトロピンの光情報受容とシグナル伝達機構の解明を目指し、ヒメツリガネゴケをモデル系として研究を行った。これまでに、ヒメツリガネゴケのフォトトロピンを大腸菌、またはヒメツリガネゴケで発現させる系を構築した。今後、リン酸化活性の測定系、タンパク質精製系を改良することによって、フォトトロピンシグナル系の解析に有用な研究基盤になると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：フォトトロピン、光応答、光受容体、ヒメツリガネゴケ、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

植物は生育環境に適応するために光環境変化を環境情報として利用する。この光情報は光受容タンパク質によって受容されるが、これまでに数種類の光受容タンパク質が同定されている。その中でフォトトロピンは光屈性、葉緑体光定位運動、気孔開口、葉の伸展など、光を効率よく利用して光合成を最適化するための生理反応に働いている。これらのフォトトロピン制御の生理反応のうち、葉緑体光逃避反応は、植物が強光によるダメージから身を守り、自然光環境に適応するためにきわめて重要な反応であることが明らかとなっている。

フォトトロピンはN末端側の光受容部位（LOV ドメイン）と、C末端側にタンパク質リン酸化酵素部位（キナーゼドメイン）から成る。これまでに、フォトトロピンは光照射により自己リン酸化すること、光受容色素がフラビン的一种である FMN であることが明らか

にされ、光受容部位である LOV ドメインの光反応が詳細に調べられてきた。フォトトロピンの自己リン酸化はその強度が、光屈性の強度および屈曲位置と一致するため、フォトトロピンが下流へ情報を伝えるときに重要な働きがあると考えられるが、研究開始当初、その生理的機能については不明であった。また、LOV ドメインのみの光反応は詳細に調べられてきたが、キナーゼドメインを含んだフォトトロピン全長での解析は、良好なタンパク質発現系が構築されていないために遅れていた。生理反応に至るシグナル伝達経路の解明も課題であった。フォトトロピンは青色光照射依存的に自己リン酸化するタンパク質として発見された経緯から、自己リン酸化活性が注目されがちだが、フォトトロピンから下流へのシグナル伝達を考えると、フォトトロピンのキナーゼの基質となるタンパク質の発見が、シグナル伝達経路の解明に重要である。

フォトリポピンはシロイヌナズナで最初に発見されたが、その後、シダ植物（ホウライシダ）コケ植物（ヒメツリガネゴケ）、緑藻（クラミドモナス）からも遺伝子が単離された。ヒメツリガネゴケには少なくとも4種類のフォトリポピン遺伝子が存在する。これまでに、これらのヒメツリガネゴケフォトリポピンの遺伝子破壊株を使った葉緑体光定位運動の解析から、シロイヌナズナと同様に、ヒメツリガネゴケでもフォトリポピンが葉緑体光定位運動を制御する光受容体であることが明らかとなっている。

2. 研究の目的

フォトリポピンの光受容と下流のシグナル経路へ情報を出力するメカニズム、フォトリポピンシグナル伝達経路に関する新しい知見を得ることを研究の目的とした。

植物のシグナル伝達系の研究はこれまで主にシロイヌナズナを材料とした遺伝学的解析で行われてきた。フォトリポピンに関しても例外ではない。一方、ヒメツリガネゴケでは大規模なEST解析が行われ、全ゲノム配列が解読されるなど、モデル生物としてシロイヌナズナに劣らぬ、情報や実験系が整備されてきている。EST解析によると発現している遺伝子の7割はシロイヌナズナと相同なものであり、多くの生理現象が植物全体に共通した分子メカニズムで行われていると考えられる。実際、葉緑体光定位運動では、いずれの植物でもフォトリポピンが光受容体として働いている。ヒメツリガネゴケは、生活環、構造が単純で観察が容易、高頻度に遺伝子相同組換えが起こる、生育速度が速く培養が容易など材料として多くのアドバンテージを有している。よって、シロイヌナズナでは得られない知見が得られる可能性が大いにあり、ヒメツリガネゴケがフォトリポピンシグナル系の解析に良い材料であると考え、ヒメツリガネゴケをモデル系として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒメツリガネゴケフォトリポピンのタンパク質発現系の構築

ヒメツリガネゴケにはフォトリポピンをコードする遺伝子が少なくとも4コピー（*PHOTA1*, *PHOTA2*, *PHOTB1*, *PHOTB2*）存在する。これらのcDNAを大腸菌のタンパク質発現ベクターにクローニングした。構築したプラスミドで大腸菌を形質転換し、タンパク質発現を行った。

(2) ヒメツリガネゴケフォトリポピンの精製

ヒメツリガネゴケの細胞で発現したフォ

トリポピンを精製する系の構築を目指した。まず、*PHOTA2*のcDNAをCaMV35Sプロモーター、またはアクチンプロモーターの下流につなげた組換えDNAを作製し、ヒメツリガネゴケ*PHOTA2*破壊株に導入した。後の精製を簡単にするために、*PHOTA2*のN末端には、Hisタグを付加した。

*PHOTA2*過剰発現株を液体培養し、集めた細胞をホモジナイザーで破碎した後、20,000 x g で遠心した上清を100,000 x gで遠心し、水溶性画分とマイクロソーム画分に分画した。マイクロソーム画分を種々の界面活性剤で処理し、*PHOTA2*の可溶化を行った。

(3) 酵母2ハイブリッド法を利用した相互作用タンパク質の検索

フォトリポピンと相互作用する因子の取得を目指した。特に、フォトリポピンのリン酸化酵素部位と相互作用する因子の取得をねらい、リン酸化酵素部位をbaitにしたスクリーニングを行った。フォトリポピンは*PHOTA2*を用いた。

リン酸化酵素と結合する相互作用因子はそれがリン酸化基質タンパク質である場合、リン酸化された後に、リン酸化酵素部位から解離すると考えられる。これでは相互作用因子の取得は不可能である。従ってbaitは、リン酸化活性に必須なアミノ酸を置換し（*PHOTA2*の898番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換）三次構造を維持したままリン酸化活性を失った変異リン酸化酵素部位を使用した。酵母2ハイブリッド法はクローンテック社のキット化された試薬を用いて、プロトコールに従って行った。

4. 研究成果

(1) ヒメツリガネゴケフォトリポピンのタンパク質発現系の構築

ヒメツリガネゴケの4種類のフォトリポピン（*PHOTA1*, *A2*, *B1*, *B2*）を大腸菌で発現させ精製したところ、*PHOTA1*の精製度がもっとも高かった（図1）。*PHOTA1*の精製タンパク質を用いて蛍光励起スペクトルを測定したところ、370 nm と 450 nm 付近にピークを持つ、典型的なフォトリポピンのスペクトルを示した（図1）。得られた*PHOTA1*タンパク質はFMNを結合し、光を受容すると考えられた。そこで、*PHOTA1*の光依存的な自己リン酸化活性を、リン酸化タンパク質検出試薬であるPro-Q Diamondを使用して測定した。ところが、精製標品が大腸菌内ですでにリン酸化されており、自己リン酸化活性への光照射の効果を検出できなかった。暗所でタンパク質の発現と精製を行うなど、発現・精製方法を精査したが、改善されなかった。また、*PHOTA1*精製標品を脱リン酸化するためにフォスフ

アターゼ処理を行ったところ、PHOTA1 が不溶化した。PHOTA1 は脱リン酸化状態では凝集して不溶化すると考えられた。

QuickTimey C2
TIFFAia êkC»CuAj êLiÉvÉçÉOÉâÉÄ
Ç™Ç±ÇÄEsENE EÉÇ%â@ÇÉÇZÇ½Ç...ÇÖiKóvÇ-Ç Äi

図1 PHOTA1 の精製と励起スペクトル

(2) ヒメツリガネゴケフォトトロピンの精製

ヒメツリガネゴケの PHOTA2 過剰発現株を作製した。PHOTA2 抗体を用いたウエスタンブロットティングで見積ると、約 10 倍量の PHOTA2 を蓄積していた(図2)。また、主にミクロソーム画分に分画されたことから、ヒメツリガネゴケでもシロイヌナズナのフォトトロピンと同様に細胞膜に PHOTA2 が局在すると推測された。

ミクロソーム画分に分画された PHOTA2 を精製するために、界面活性剤を用いた可溶化を行った。界面活性剤は、コール酸ナトリウム、ドデシルマルトシド、CHAPS、Triton X-100、シュークローズモノラウレート、オクチルグルコシドを試した。シロイヌナズナのフォトトロピンは Triton X-100 でミクロソーム画分から良好に可溶化できるのに対し、PHOTA2 は上記の6種の界面活性剤ではどれを用いても再現性よく可溶化できる条件を見つけないことができなかった。細胞の培養条件、可溶化の条件などの検討が必要である。

QuickTimey C2
TIFFAia êkC»CuAj êLiÉvÉçÉOÉâÉÄ
Ç™Ç±ÇÄEsENE EÉÇ%â@ÇÉÇZÇ½Ç...ÇÖiKóvÇ-Ç ÄB

図2 PHOTA2 の検出

野生株(WT)とPHOTA2過剰発現株(OX)を破碎後、20,000gで遠心し、上清(sup)と沈殿(ppt)に分画した。さらにこの上清を100,000gで遠心し、上清と沈殿に分画した。それぞれの画分をPHOTA2抗体を用いて、ウエスタンブロットティングを行った。

(3) 酵母2ハイブリッド法を利用した相互作用タンパク質の検索

ヒメツリガネゴケ原系体からRNAを調製し、cDNAライブラリーを構築した。PHOTA2のタンパク質キナーゼ部位(898番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換)をbaitにし、酵母2ハイブリッド法を用いて相互作用タンパク質のスクリーニングを行った。約17万クローンをスクリーニングしたが、陽性クローンを得ることができなかった。スクリーニングの規模を増やす必要があると考えられる。または、タンパク質キナーゼと基質タンパク質の相互作用が弱く、酵母2ハイブリッド法では、基質タンパク質は相互作用因子として検出できない可能性が考えられる。

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4件)

Takahashi F., Yamagata D., Ishikawa M., Fukamatsu Y., Ogura Y., Kasahara M., Kiyosue T., Kikuyama M., Wada M., and Kataoka H. AUREOCHROME: a newly found novel photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2007) 104: 19625-19630. 査読有

Gao JS., Sasaki N., Kanegae H., Konagaya K., Takizawa K., Hayashi N., Okano Y., Kasahara M., Matsushita Y., and Nyunoya H. The TIR-NBS but not LRR domains of two novel N-like proteins are functionally competent to induce the elicitor p50-dependent hypersensitive response. Physiol. Mol. Plant Pathol. (2007) 71: 78-87. 査読有

Yokokawa R., Miwa J., Tarhan MC., Fujita H., and Kasahara M. DNA molecule manipulation by motor proteins for its analysis in single molecule level. Anal. Bioanal. Chem. (2008) 391: 2735-2743. 査読有

Oikawa K., Yamasato A., Kong SG., Kasahara M., Nakai M., Takahashi F., Ogura Y., Kagawa T., and Wada M. Chloroplast outer envelope protein CHUP1 is essential for chloroplast anchorage to the plasma membrane and chloroplast movement. Plant Physiol. (2008) 148: 829-842. 査読有

[学会発表](計3件)

T. Takemoto and M. Kasahara, "Light

green phenotype of a phototropin triple disruptant of *Physcomitrella patens*,” International Symposium on Biosynthesis of Tetrapyrroles, 2007年12月8日, 草津

M.Kasahara, “Phototropin and LOV proteins,” International Symposium on Biosynthesis of Tetrapyrroles, 2007年12月8日, 草津

津森康一郎、丹生谷博、笠原賢洋、ヒメツリガネゴケにおけるブラシノステロイドの働き, 日本植物生理学会年会, 2009年3月22日, 名古屋

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ritsumei.ac.jp/lifescience/skbiot/kasahara/LAB.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 賢洋 (KASAHARA MASAHIRO)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：70361748

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし