

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370020

研究課題名（和文） フィトクロム A による超高感度光応答の分子機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of molecular mechanisms underlying hyper sensitization of phytochrome A

研究代表者

長谷 あきら (NAGATANI AKIRA)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40183082

研究成果の概要（和文）：被子植物は、通常型のフィトクロム（phyB 型）に加え、より特殊化したフィトクロム A（phyA）をもつ。そこで、フィトクロムを N-PAS、GAF、PHY、および C-末端側領域全体の 4 つの領域に分け、それぞれの配列が phyA または phyB 配列になるようなキメラ・フィトクロム（合計 16 種類）を構築しその性質を組織的に調べた。その結果、phyA が示す複数の特殊機能はそれぞれ分子上の別の領域の phyA 配列によって決定されていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Plants have a specialized phytochrome, phyA, in addition to conventional phytochromes represented by phyB. We expressed chimeric phytochromes having a phyA or phyB sequence in each of 4 phytochrome domains, N-PAS, GAF, PHY and the C-terminus in transgenic Arabidopsis. Biochemical, cell biological and physiological analysis of those plants revealed a "modular" structure of phyA in which different phyA specific properties base on distinct parts of the molecule.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：フィトクロム、光応答、シグナル伝達、環境応答、蛋白構造

1. 研究開始当初の背景

被子植物は、フィトクロム B (phyB) を典型とする通常型 (PHYB 型) フィトクロムに加え、より特殊化したフィトクロム A (phyA) をもつ。phyA による応答は、活性型である Pfr がわずかししか生じないような少量の光でも引き起こされる一方 (高感度化)、Pfr 型が不安定で、光により活性化された phyA は速

やかに分解される (不安定化)。このような phyA の特徴は、種子植物が進化するにあたり、林床などの薄暗い環境での生存に有利に働いたと考えられている。

phyA と phyB 分子は共通の基本構造をもち、試験管内における分光光学的性質は良く似ている。フィトクロム分子は、大きく N-末と C-末端側領域に分けられ、これらの領域

を phyA と phyB の間で交換したキメラ分子の解析から、phyA の特殊性は、N-末端側領域の構造に起因することが知られていたが、その詳細は一切不明であった。一方、バクテリオフィトクロムの結晶構造が最近決定され、N-末端側領域内の細かいドメイン構造が明らかとなった。そこで、phyA と phyB の各ドメインをさらに細かく交換し、植物体における生理機能を解析することにより、phyA の機能的特殊化に寄与する分子上の領域を特定できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、特殊化したフィトクロムである phyA と基本型の phyB の間でキメラ分子を構築し、それを植物に遺伝子導入して生体内での生理機能を詳細に調べ、phyA の特殊化に関する分子的な基盤を明らかにする。これにより、植物における光応答、ひいては植物のシグナル伝達機構全般への理解を深めることができる。

3. 研究の方法

上記の目的に従い、phyA と phyB のキメラ・フィトクロム分子を構築し、シロイヌナズナの *phyAphyB* 二重変異体で発現させ、その生理機能を調べた。項目にわたった実際の実験内容は以下の通りである。

(1) 16 種のキメラ分子の構築と発現

フィトクロムを大きく N-末端側と C-末端側に分け、シグナル伝達に関わる N-末端側については、さらに N-PAS、GAF、PHY の 3 つの領域に分けた。これら合計 4 つの領域について phyA または phyB の配列を組み合わせて、全長キメラ・フィトクロム遺伝子を構築し (合計 16 種類)、蛍光タグである GFP を融合させた形でシロイヌナズナの *phyAphyB* 二重欠損変異株に導入した。得られた形質転換株より、十分に導入した遺伝子が発現している株を選別し、以下の実験に用いた。

(2) phyA/phyB キメラ分子の細胞内分布

本研究においては、キメラ分子は全て GFP 融合タンパク質として発現させ、その細胞内分布を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。植物材料としては、4 日間生育させた暗所芽生え、および、それに 24 時間の赤色あるいは遠赤色光処理を施したものを用いた。なお、phyA は遠赤色光と赤色光で、phyB は赤色光で細胞質から核へ移行することが知られている。

(3) 遠赤色光高照射応答 (FR-HIR)

phyA に特異的な生理機能として、連続遠赤色による光形態形成の誘導がある。暗所芽生えで見られるこの応答では、特に、胚軸伸長の阻害が顕著である。そこで、phyA/phyB キメラ分子を発現する植物の芽生えを発芽

直後から遠赤色光下に置き、5 日後に胚軸長を測定した。

(4) 赤色光照射で誘導される分解

phyA の重要な特徴の一つが、赤色光照射開始後の速やかな分解である。この応答は、GFP の観察や、免疫ブロッティングにより解析することができる。そこで、phyA/phyB キメラ分子を発現する植物の黄化芽生え (4 日間生育) を 24 時間赤色光処理し、その後の導入フィトクロムの蓄積量を、蛍光観察および免疫ブロッティングにより調べた。

(5) 連続赤色光応答

phyB の赤色光への応答は常に見られるが、phyA の赤色光への応答は、暗所芽生えを明所に移した際のごく初期にのみ見られる。これは、phyA が連続明条件では速やかに分解されてしまうためと考えられている。そこで、連続赤色光に対する胚軸応答をキメラ・フィトクロムと比較した。さらに、いくつかのキメラ・フィトクロムでは、赤色光への感度が上昇していることが分かったので、高強度応答曲線を求め、感度の上昇の程度を定量した。

(6) 核移行シグナル付加キメラ・フィトクロム

上記の実験の結果、連続遠赤色光による核移行と胚軸伸長阻害という phyA で特異的に見られる応答に必要な領域が異なることが示唆された。そこで、このことをさらに確認するため、核移行シグナルを付加したキメラ・フィトクロムを構築し、それが、連続赤色光と連続遠赤色光の両方に応答して胚軸伸長を阻害するかどうかを、シロイヌナズナの *phyAphyB* 二重変異体で発現させて調べた。

(7) ドメイン内配列交換実験

以上の実験の結果、遠赤色光下での核移行には、もともと N-末端側の N-PAS ドメインが、核内での胚軸応答の誘導には PHY ドメインが重要であることを示唆する結果が得られた。そこで、これらのドメインをさらに細分化し、シロイヌナズナの *phyAphyB* 二重変異体で発現させて調べた。

4. 研究成果

上記の実験を行った結果、各項目について以下のような結果が得られた。

(1) 16 種のキメラ分子の構築と発現

phyA と phyB 配列の相同性から予想された通り、16 種 (全長 phyA と phyB を含む) 全てのキメラ・フィトクロムについて、タンパク質の発現が確認された。ただし、暗所芽生えの phyA の発現量は比較的高いため、複数の系統を調べてもそのレベルに達しないキメラ・フィトクロムも存在した。そこで、全てのキメラについて、発現量の異なる複数の系統を確立し、それらを用いて以下の実験を行った。

(2) phyA/phyB キメラ分子の細胞内分布

phyA と phyB はともに、暗所では主に細胞質ゾルに存在する。予想通り、キメラ・フィトクロムも全て、同様の分布を示した。次に、phyA のみが核内に蓄積する遠赤色光処理を行った植物を観察したところ、N-PAS 領域が phyA 由来であれば、必ず遠赤色光で核内に蓄積し、phyB 由来の場合は蓄積しないことが分かった。すなわち、遠赤色光下に置ける核移行活性は、N-PAS ドメインのみによって決定されていた。一方、赤色光下での核移行については、この条件下では完全に分解する 4 種（下記参照）を除いて、全てのキメラ・フィトクロムで核内にシグナルが検出された。

(3) 遠赤色光高照射応答 (FR-HIR)

連続遠赤色光による胚軸伸長阻害は、phyA に特異的な反応である。16 種類のキメラ・フィトクロムについてこの応答の有無を調べたところ、まず、遠赤色光で核移行を示さない 8 キメラ (N-PAS が PhyB 配列のもの) では、予想通り、胚軸応答が見られなかった。さらに、残りの 8 種類のうち、PHY ドメインが phyA 配列である 4 種 (全長 phyA を含む) では全て応答が見られた。一方、phyB 配列であるものでは応答を示したのはただ 1 種であり、この応答に PHY ドメインが重要な役割を果たしていることが示唆された。

(4) 赤色光照射で誘導される分解

phyA に特徴的な応答として、赤色光下での Pfr 型の速やかな分解が挙げられる。この応答には、ユビキチン化に関わることが知られている。今回構築した 16 種のキメラ・フィトクロムを調べたところ、N-PAS と GAF ドメインの両方が phyA 配列である場合に限って速やかな分解が見られた。このことは、Pfr 型が細胞がもつ分解機構に認識され、実際に分解するためには、これらのドメインの構造が重要であることを示している。

(5) 連続赤色光応答

phyA と phyB はともに赤色光に応答する能力をもつが、phyA は速やかに分解されるため、連続赤色光に対する応答への寄与は少ないと考えられる。実際、赤色光で分解する上記 4 種のフィトクロム (全長 phyA を含む) では応答は見られなかった。また、N-PAS と GAF のどちらかが phyB 配列となることでフィトクロムは安定化されるが、特に GAF が phyB 配列であるものでは全て応答が見られた。一方、N-PAS が phyB 配列で GAF が phyA 配列のものでは、赤色光への応答が弱まっており、両者の組み合わせに何らかの問題があることが示唆された。また、GAF が phyB 配列である 8 種のキメラの中では、PHY 配列が phyA である 4 種において、顕著な光感度の上昇 (約 100 倍程度) が認められ、PHY ドメインの phyA 配列にフィトクロムを高感度化する働きがあることが分かった。

(6) 核移行シグナル付加キメラ・フィトクロム

上記の結果を受け、遠赤色光下での核移行活性を、外来の核移行シグナルで置き換えた場合に、PHY ドメインが phyA 配列のキメラ・フィトクロムで胚軸の遠赤色光応答が見られるかどうか調べた。その結果、核移行シグナルがあれば、N-PAS が phyA 配列でなくとも応答が見られた。したがって、核移行と核内でのシグナル伝達は、別のドメインによって決定されていることが分かった。

(7) PHY ドメイン内配列交換実験

phyA の PHY ドメイン配列が、フィトクロムの光感度を上昇させ、遠赤色光への応答を可能にすることが分かったため、PHY ドメインをさらに 3 つに分け、それぞれが phyA または phyB であるようなキメラ・フィトクロムをいくつか構築した。これをシロイヌナズナの *phyAphyB* 変異体で発現させたところ、PHY ドメインの“舌”構造とその C-末端側の残りの部位の両方が phyA 配列でないと高感度化能が見られないことが分かった。今後は、さらにこの領域を細かくわけて検討する計画である。

(8) 総合考察

以上の実験により、phyA の機能的特殊化に関する重要な知見が得られた。phyA には他のフィトクロムに無いいくつかの特徴が見れるが、それらが、phyA 分子上の別々の領域によって独立に決定されていることが分かった。実際、これを利用することにより、phyA の特徴を人為的に組み合わせたフィトクロムを作り出すことができた。今後は、それぞれの領域が具体的にどのような性質を決定しているのか、その分子機構を明らかにする必要がある。また、この知見は、phyA がどのようにして進化してきたかを調べるための基盤も提供している。phyA の個々の特徴がどのように協調的に進化してきたのかを、実験的に跡付けることで、植物の進化に関する重要な知見が得られるかもしれない。

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 7 件)

1. Aihara, Y., T. Yamamoto, K. Okajima, K. Yamamoto, T. Suzuki, S. Tokutomi, K. Tanaka and A. Nagatani, (2012) Mutations in the N-terminal flanking region of the blue-light sensing domain LOV2 disrupt its repressive activity on the kinase domain in the *Chlamydomonas* Phototropin. *J Biol. Chem.*, 査読有、287:9901-9909, doi:

- 10.1074/jbc.M111.324723
2. Kozuka, T., S-G. Kong, M. Doi, K. Shimazaki and A. Nagatani, (2011) Tissue-autonomous promotion of palisade cell development by phototropin 2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 査読有、23: 3684-95, doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.085852>
 3. A. Nagatani, (2010) Phytochrome: structural basis for its functions., *Curr. Opin. Plant Biol.*, 査読有、13: 565-570, doi:10.1016/j.pbi.2010.07.002
 4. Toledo-Ortiz, G., Y. Kiryu, J. Kobayashi, Y. Kim, H.G. Nam, N. Mochizuki and A. Nagatani, (2010) Subcellular sites of the signal transduction and degradation of phytochrome A, *Plant Cell Physiol.*, 査読有、51:1648-1660, doi: 10.1093/pcp/pcq121
 5. Jang, I. C., R. Henriques, H. S. Seo, A. Nagatani and N. H. Chua, (2010) *Arabidopsis* PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR proteins promote phytochrome B polyubiquitination by COP1 E3 ligase in the nucleus. *Plant Cell*, 査読有、22:2370-2383, doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.109.072520>
 6. Kozuka, T., J. Kobayashi, G. Horiguchi, T. Demura, H. Sakakibara, H. Tsukaya and A. Nagatani, (2010) Involvement of auxin and brassinosteroid in the regulation of petiole elongation under the shade. *Plant Physiol.*, 査読有、153:1608-1618, doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.156802>
 7. Kikis, E. A., Y. Oka, M. E. Hudson, A. Nagatani and P. H. Quail, (2009) Residues clustered in the light-sensing knot of phytochrome B are necessary for conformer-specific binding to signaling partner PIF3., *PLoS Genet*, 査読有、5:e1000352, doi:10.1371/journal.pgen.1000352
- [学会発表] (計 33 件)
1. Akira Nagatani, Modular structure of phytochrome A, The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing, 2012 年 3 月 19 日、東大寺総合文化センター (奈良県)
 2. 相原悠介 ほか、フォトトロピンの LOV2 領域・N 末端側近傍の変異によりキナーゼ活性の抑制機能が失われる、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 17 日、京都産業大学 (京都府)
 3. 小塚俊明 ほか、MALDI-FTMS を用いたシロイヌナズナ光応答のメタボローム解析、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都産業大学 (京都府)
 4. 後藤一也 ほか、フィトクロム A の作用機構の生化学的解析、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都産業大学 (京都府)
 5. 衣幡春映 ほか、Mg-Chelatase H サブユニット (CHLH/GUN5) の構造・機能解析を中心とした、プラスチドシグナル伝達の解析、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都産業大学 (京都府)
 6. Akira Nagatani, The molecular mechanism of growth regulation by phytochrome, Strategies of Plants against Global Environmental Change, 2011 年 12 月 9 日、倉敷市芸文館 (岡山県)
 7. 長谷あきら、フィトクロムの生理応答の時空間的解析、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21 日、京都国際会館 (京都府)
 8. Akira Nagatani, The structural basis for phyA-specific functions, 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology, 2011 年 7 月 31 日、奈良県新公会堂 (奈良県)
 9. Akira Nagatani, Spatio-temporal regulatory network controlling stem elongation under the shade, Interplay of Light, Photoperiodism and Circadian Clock Function in Plant Development, 2011 年 5 月 5 日, Barcelona, Spain
 10. 小林淳子 ほか、シロイヌナズナの避陰応答における器官間光シグナル伝達機構の解析、第 16 回日本光生物学協会年会、2010 年 8 月 11 日、大阪大学 銀杏会館 (大阪府)
 11. Akira Nagatani, Structural basis of phytochrome A specific functions, Symposium "Plant Signalling Mechanisms" on the occasion of the retirement of Eberhard Schafer, 2010 年 6 月 25 日, Freiburg, Germany
 12. Akira Nagatani, an organizer of the Plenary Session 2: Cell Biology, 21st International conference on Arabidopsis Research, 2010 年 6 月 6 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
 13. 鈴木友美 ほか、青色光受容体 phot による低分子量 G タンパク質 ARF1 の制御、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 18 日、熊本大学 (熊本県)

14. 望月伸悦 ほか、プラスチックシグナル伝達におけるテトラピロール合成の関わり、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 18 日、熊本大学 (熊本県)
15. 遠藤求 ほか、phyB シグナル伝達経路に関わる新奇因子 PHL、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 18 日、熊本大学 (熊本県)
16. 岡本圭史 ほか、ミオシンは光と重力に対する環境応答のブレーキとして働く、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 18 日、熊本大学 (熊本県)
17. 相原悠介 ほか、青色光受容体フォトトロピンの“Flippase-kinase”としての役割の解明、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 18 日、熊本大学 (熊本県)
18. 山本和彦 ほか、AGCVIII キナーゼ過剰発現植物体のフォトトロピン表現型の解析、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 18 日、熊本大学 (熊本県)
19. 小塚俊明 ほか、本葉扁平性を制御するフィトクロム生理機能の発見、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 18 日、熊本大学 (熊本県)
20. 小林淳子 ほか、シロイヌナズナの避陰応答における器官間光シグナル伝達の解析、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 18 日、熊本大学 (熊本県)
21. Y. Ono, Y. Oka et al., Structural basis for phyA-specific functions, Memorial Symposium for the 25th International Prize for Biology “Biology of Sensing”, 2009 年 12 月 2 日, 京都大学 芝蘭会館 (京都府)
22. Toshiaki Kozuka & Akira Nagatani, Phototropin-mediated regulation of polar elongation in palisade-tissue Cells, Memorial Symposium for the 25th International Prize for Biology “Biology of Sensing”, 2009 年 12 月 2 日, 京都大学 芝蘭会館 (京都府)
23. Nobuyoshi Mochizuki & Akira Nagatani, Plastid-to-nucleus signaling, Memorial Symposium for the 25th International Prize for Biology “Biology of Sensing”, 2009 年 12 月 2 日, 京都大学 芝蘭会館 (京都府)
24. Akira Nagatani, A structure/function study of phototropins, Memorial Symposium for the 25th International Prize for Biology “Biology of Sensing”, 2009 年 12 月 2 日, 京都大学 芝蘭会館 (京都府)
25. 長谷あきら、植物の光応答機構—光受容体理解に向けた 3 つのアプローチ、2009 年日本植物学会近畿支部大会、2009 年 11 月 14 日、神戸大学 (兵庫県)
26. 長谷あきら、フォトトロピンによる光応答～光受容から生理応答まで、科学研究費特定領域研究「LOV 光受容体による植物の運動制御機構」報告会、2009 年 9 月 26 日、京都リサーチパーク (京都府)
27. 小林淳子ほか、避陰応答における組織／器官間シグナル伝達の研究、第 15 回日本光生物学協会年会、2009 年 8 月 19 日、自然科学研究機構 岡崎コンフェレンスセンター (愛知県)
28. Yoshito Oka et al., Structural basis of phytochrome A-specific functions, The 3rd International Symposium of the Biodiversity and Evolution, 2009 年 7 月 24 日, 京都大学 (京都府)
29. Junko Kobayashi et al., Inter-organ/tissue communication in the shade avoidance response, The 3rd International Symposium of the Biodiversity and Evolution, 2009 年 7 月 24 日, 京都大学 (京都府)
30. Yusuke Aihara et al., Possible roles of plant's blue-light receptor, phototropin, as a “flippase-kinase”, The 3rd International Symposium of the Biodiversity and Evolution, 2009 年 7 月 24 日, 京都大学 (京都府)
31. Akira Nagatani, Structural basis of properites specific to phytochrome A, Seminar, 2009 年 7 月 15 日, Taipei, Taiwan
32. Akira Nagatani, Structural basis of phyA-specific properties, SEB Annual Main Meeting, 2009 年 6 月 28 日, Glasgow, UK
33. Akira Nagatani, Complex hierarchy of the shade avoidance response., 15th International Congress of Photobiology, 2009 年 6 月 18 日, Dusseldorf, Germany

[その他]

ホームページ等

<http://physiol2.bot.kyoto-u.ac.jp/~nagatani/HP3/>

<http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 あきら (NAGATANI AKIRA)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：40183082

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：