

機関番号：17102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21770049
 研究課題名（和文） フィトクロムBのN末端領域から発せられた光シグナルを受け取る相手因子の同定
 研究課題名（英文） Identification of signaling partners of the N-terminal domain of phytochrome B
 研究代表者
 松下 智直（MATSUSHITA TOMONAO）
 九州大学・大学院農学研究院・特任准教授
 研究者番号：20464399

研究成果の概要（和文）：

植物の主要な光受容体であるフィトクロム B (phyB) は、植物の光に対する様々な応答を制御している。我々は、phyB が受容した光の情報を植物細胞内で受け取り、光応答を引き起こすのに働く蛋白質を同定するために、光応答の低下したシロイヌナズナの変異体をスクリーニングし、その原因遺伝子を解析した。その結果、新奇の核局在性 RNA 結合蛋白質が phyB の光情報伝達に特異的に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Phytochrome B (phyB) is a plants' major photoreceptor regulating various light responses of plants. In order to understand the molecular mechanism of phyB signal transduction in plant cells, we conducted a forward-genetic analysis by screening less light-responsive mutants in Arabidopsis. As a result, we identified a novel nuclear-localized RNA binding protein which was involved specifically in phyB signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物光生理学

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、植物、光受容体、シグナル伝達、環境応答

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来のフィトクロム研究

「光情報をいかに受容して利用するか」は、生物学全体における普遍的かつ最も重要な問題の一つである。植物は、情報としての光を捉えるために、主にフィトクロム、クリプトクロム、フォトトロピンの三種類の光受容

体を進化させてきた。フィトクロムはその中で最も主要な働きを担う赤色光受容体であり、赤色光を介した植物の分化や生育制御に極めて重要な役割を果たす。一方、クリプトクロムはフィトクロムとほぼ同じ生理反応を制御する青色光受容体であり、またフォトトロピンは主に植物の運動を制御する青色

光受容体である。

フィトクロム分子は、光受容に働く N 末端領域と二量体化に働く C 末端領域の、二つのドメインから成る。従来、N 末端領域により受容された光シグナルは、C 末端領域のキナーゼ活性により下流の因子に伝達されると考えられてきた。そしてその考えに基づき、フィトクロムのシグナルパートナーを同定する目的で、C 末端領域と直接相互作用する因子が、酵母の two-hybrid 法などを用いてこれまで精力的に単離・解析されてきた (Ni ら 1998 年、Choi ら 1999 年、Fankhauser ら 1999 年、Kim ら 2002 年、Ryu ら 2005 年など)。

一方で、フィトクロムが光刺激により細胞質から核内に移行することが示されて以来 (Yamaguchi ら 1999 年)、フィトクロムの核内機能に焦点を当てた解析が進められてきた。そして、シロイヌナズナゲノム中の約 16% の遺伝子がフィトクロムによる発現制御を受けることが分かったが (Tepperman ら 2004 年)、その制御機構は不明である。

(2) 申請者のこれまでの研究成果

① ドグマの崩壊と今後の課題

このような背景のなか我々は、フィトクロムの最も主要な分子種である phyB が N 末端領域からシグナルを発すること、一方 C 末端領域はシグナル伝達に必要なばかりかむしろ阻害的に働くことなどを明らかにした (Matsushita et al., 2003 *Nature* 424: 571-574)。この発見は、フィトクロムは C 末端領域のキナーゼ活性によりシグナルを伝達するという従来の常識を覆すものであり、そのシグナル伝達機構を一から考え直す必要が生じた。フィトクロムの N 末端領域内にシグナル伝達や遺伝子発現制御に関わるモチーフはアミノ酸配列上見出されず、そのシグナル伝達機構は全く未知である。

② 大規模変異体スクリーニングによるシグナル発信ドメインの発見

そこで我々は、シグナル発信に直接関与するアミノ酸残基を同定するために、phyB N 末端領域をシロイヌナズナの *phyB* 欠損株にて過剰発現する形質転換植物を EMS により変異原処理し、通常の 10 倍以上の規模でスクリーニングを行い、光応答の低下した変異体を多数単離した。これらの変異体の解析から、phyB N 末端領域内のミスセンス変異で、分光光学的性質には影響せずシグナル伝達活性のみを低下させるものを同定したところ、それらは N 末端領域内の小領域にホットスポットを形成した。この小領域は、一部の細菌が持つ原始的なフィトクロム分子において、蛋白質間相互作用に関わる PAS ドメイ

ンの構造を取ることを示されている (Wagner ら 2005 年)。このことは、phyB がこの小領域を介して下流のシグナル伝達因子と直接相互作用し、光シグナルの受け渡しを行うことを示唆する (Oka et al., 2008 *PLoS Genet.* 4(8): e1000158)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、現在未知である phyB N 末端領域からの光シグナル伝達機構を解明するために、大規模な変異体スクリーニングによる順遺伝学的解析を行い、phyB N 末端領域の信号伝達において働く新奇下流因子を同定することである。

3. 研究の方法

これまでに我々が phyB N 末端領域の過剰発現体を EMS 処理して行った大規模な変異体スクリーニングから、赤色光特異的な表現型を持つ N 末端領域遺伝子外の変異体も得られており、その解析から phyB N 末端領域のシグナル伝達に関わる因子を同定できると期待される。

しかしながらここで、phyB 表現型の指標である胚軸長がそもそもエコタイプ間で異なることが問題となる。つまり、今後シロイヌナズナで順遺伝学を進める上で最も問題となるのが遺伝子機能の冗長性であり、新奇の機能喪失型劣性変異体は僅かな表現型しか持たないと予想されるが、微妙な胚軸長の差をもとにマッピングを進めることが上記の問題で困難となる (問題 1)。

また一般に、phyB 経路の変異体のスクリーニングは純赤色光条件にて行われる。これは、青色光が混入すると、フィトクロムと同様の生理反応を制御するクリプトクロムが活性化され、phyB 経路の変異が相補されてしまうためである。しかし、純赤色光下では重力屈性反応が阻害され胚軸がランダムな方向に伸長するため、微妙な胚軸長表現型しか持たない変異体を見つけることがそもそも非常に難しいという問題がある (問題 2)。

本研究では、これら 2 つの問題を解決するために、クリプトクロムの全分子種の機能を完全に欠く、シロイヌナズナの *cry1cry2* 二重変異体を背景としたアクティベーションタギングシステムを用いて、白色光下で胚軸徒長を示す変異体を選抜する。

アクティベーションタギング法を用いることで、機能上昇型の優性変異体の解析により遺伝子機能冗長性の問題が解決されるだけでなく、僅かな表現型しか持たない劣性変異体についても原因遺伝子クローニングが可能となり、しかもクローニングに要する時間が大幅に短縮できる (問題 1 の解決)。ま

た、白色光下でもクリプトクロムにより phyB 経路の変異が相補されることがなく、そして白色光下では胚軸は重力屈性と光屈性により真上に揃って伸びるため、胚軸長の違いを一目で把握でき、僅かな表現型しか持たない株の選抜が可能となる（問題2の解決）。

しかし T-DNA タギング法には、ゲノム内での T-DNA 挿入頻度にばらつきがあり、変異導入効率が低いという問題がある。そこでこの点を克服するために、通常の 20 倍以上の規模である、25 万系統という数のタギングラインを用いて、大規模な変異体スクリーニングを行う。

上記のアクティベーションタギング系統を用いて、以下の手順で解析を進めた。

1) *cry1cry2* 二重変異体背景のアクティベーションタギングラインのスクリーニング

cry1cry2 二重変異体背景のアクティベーションタギング系統約 25 万系統を用いて、T2 世代において、phyB により制御される光応答の 1 つである、芽生えの胚軸伸長抑制反応が、白色光条件にて低下した個体、つまり、胚軸の徒長を示した個体を一次選抜する。次に、次世代である T3 世代において白色光条件における胚軸徒長表現型の確認を行う（二次選抜）。そして、T2, T3 の両世代において一貫して白色光条件で胚軸徒長を示す変異系統を選抜し、それらに対して、赤色光・遠赤色光・暗所の三条件で胚軸長を測定し、赤色光条件のみで胚軸徒長を示すものを三次選抜する。

2) アクティベーションタギング変異体の原因遺伝子候補同定

実験 1) で単離された、赤色光条件特異的に胚軸徒長を示す優性もしくは劣性の変異体に対して、ウエスタンブロット解析を行い、親株と同程度の phyB 蛋白量を示す系統を選抜する。そして、選抜された変異株における T-DNA 挿入位置を、プラスミドレスキュー法や TAIL-PCR 法などにより明らかにし、原因遺伝子候補を同定する。

3) アクティベーションタギング変異体の原因遺伝子確認

まず、各変異体とその親株である *cry1cry2* 二重変異体との掛け合わせによる F2 集団を解析し、T-DNA と変異表現型との共分離や遺伝様式を確認する。次に、実験 2) で同定された原因遺伝子候補に対して、各変異体における発現量の変化を RT-PCR 解析により確認した上で、その過剰発現体を作製したり、米国 SALK 研究所のノックアウト系統を用いるなどして、赤色光特異的な胚軸徒長変異表現型

が再現されることを確認する。さらに劣性変異体に対しては、その原因遺伝子を含む野生型のゲノム DNA 断片を導入し、変異表現型が相補されることを確かめる。

4. 研究成果

上記の変異体スクリーニングの結果、赤色光条件特異的に胚軸徒長を示す系統を 37 系統選抜した。ウエスタンブロット解析により、そのうち 7 系統は phyB 蛋白質の蓄積を全く示さなかったため、*phyB* 変異体であると考えられた。この結果は、本スクリーニング系により、確かに phyB 経路特異的な変異体が単離可能であることを示す。そして、phyB 蛋白質蓄積量が正常であった残り 30 系統の中から、*reduced red-light responses in cry1cry2 background 1-1 (rrc1-1)* 変異体を 1 系統単離した。

さらに解析を進めた結果、*rrc1* 変異体においては、調べた限り全ての phyB 制御下にある光応答が低下しており、また、これらの変異表現型はいずれも *phyB* 変異体背景では全く観察されないことがわかった。これらの結果から、*rrc1* が phyB シグナル伝達に特異的に関わる変異体であること、そしてその原因遺伝子である RRC1 の光応答における機能は phyB に依存したものであることが示された。

rrc1 変異体の原因遺伝子を解析した結果、新奇の核局在性 RNA 結合蛋白質をコードする遺伝子の機能欠損型劣性変異体であることが分かった。これらの結果は、この新奇 RNA 結合蛋白質が phyB のシグナル伝達における正の因子として特異的に働くことを示し、RNA 代謝制御を介するフィトクロム信号伝達の新たな側面が示唆された。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 松下智直、フィトクロム B の N 末端領域の下流因子を同定するための挑戦的な劣性変異体スクリーニング法の開発、第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 22 日、宮城県仙台市
- ② 四方明格ら、フィトクロム B 経路特異的な異常を示す突然変異体の新規スクリーニング系による単離とその原因遺伝子の解析、日本植物学会第 74 回大会、2010 年 9 月 11 日、愛知県春日井市
- ③ 四方明格ら、フィトクロム B の N 末端領域と相互作用する光シグナル伝達因子の探索、日本植物学会第 73 回大会、2009 年 9 月 19 日、山形大学 (山形)
- ④ 松下智直、植物の主要な光情報受容体フィトク

ロムBの細胞内シグナル伝達機構の解析、日本
生物環境工学会 2009 年福岡大会、2009 年 9 月 6
日、九州大学（福岡）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 智直 (MATSUSHITA TOMONAO)

九州大学・大学院農学研究院・特任准教授

研究者番号：20464399