

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570061

研究課題名(和文)シダPHY3光受容体の青色光反応を制御するフィトクロム光センシング機構の解明

研究課題名(英文)Studies on a blue-light sensing system of fern Adiantum PHY3 photoreceptor

研究代表者

鐘ヶ江 健(Kanegae, Takeshi)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：70264588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題はシダ光受容体PHY3のフィトクロム光センシング部位(PCM)の青色光シグナル受容メカニズムの解明に向けて新たな知見を得る事を目的とした。その結果、シダPHY3のPCMはシロイヌナズナのフィトクロムの相当部分との互換性が無いことが明らかとなり、PHY3に特異的なアミノ酸配列構造がPHY3の特徴的な光応答性、特に青色光への応答を制御している可能性が示唆された。またPHY3からの青色光シグナル伝達経路を明らかにするために、遺伝子探索のためのハウライシダESTデータベースAcESTを構築し、公開した。

研究成果の概要(英文)：Adiantum photoreceptor PHY3 acts as both a phytochrome and a phototropin. PHY3 includes "Photosensory Core Module" (PCM) of phytochromes and PHY3 PCM could perceive not only red- but also blue-light signals. To study blue-light sensing molecular mechanisms of PHY3 PCM, I substituted PHY3 PCM to Arabidopsis phytochrome PCMs. These chimeric photoreceptors can induce blue-light dependent hypocotyl phototropic response, however, no significant red-light induced hypocotyl bending toward the light source was observed. Hence, PHY3 PCM could not be interchangeable to a corresponding region of either phyA or phyB of Arabidopsis. I compared PHY3 PCM amino acid sequence to other phytochrome PCMs and found the PHY3 specific gaps in PCM region. These results suggest that such a PHY3 characteristic gaps in PCM could confer blue-light sensing ability to PHY3 PCM region.

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：光受容体 フィトクロム フォトトロピン ハウライシダ 光屈性

### 1. 研究開始当初の背景

植物は外界の光環境を、赤色光受容体(フィトクロム)と青色光受容体(クリプトクロムやフォトトロピン)によって感知している。これらの光受容体はそれぞれ個別のタンパク質であり、赤色光と青色光の情報を独立に感知している。植物は光環境に応じて、光屈性や葉の伸展、葉緑体の細胞内配置(葉緑体光定位運動)などの反応を制御しているが、これらの反応はいずれも個体・組織・細胞レベルで光合成のための光受容効率を上昇させるための機構であると考えられている。これらの光反応は、ほとんどの植物において青色光でのみ誘導され、フォトトロピンを光受容体とするシグナル伝達経路によって制御されていることが明らかになっている。一方、シダ植物ではこれらの反応が青色光だけでなく赤色光でも誘導されることが知られている。これらの現象を広い波長域の光で制御できることが、シダ植物が弱光環境に適応できた一つの原因であると考えられる。シダ植物にはこのような赤色光依存の調節機構が存在することから、フォトトロピン以外の赤色光受容体によるシグナル制御機構の存在が推測されていた。

申請者はシダ植物光受容体遺伝子の網羅的単離解析の中で、シダ植物固有の新規な光受容体が存在することを発見した。フィトクロム3(PHY3)と命名したこの光受容体は、N末端側に赤色光受容体フィトクロムの光センシング部位を、C末端側にフォトトロピン全長を持つ構造をしている。

申請者によるPHY3機能解析の結果から、PHY3がシダ植物において葉緑体光定位運動や光屈性などの現象の赤色光による制御を可能にしていることが判明した。またPHY3はフォトトロピンとして青色光反応を制御していることも明らかになり、一分子で赤色光受容体フィトクロムと青色光受容体フォトトロピンとして働く二重機能性の光受容体であることが判明した。さらに赤色光/青色光同時照射実験により、赤色光シグナルと青色光シグナルがPHY3分子内で相乗効果を生み、光感度が上昇することで非常に弱い光に応答できることが明らかになった。

以上のように、PHY3の特異な光受容システムがPHY3に高い光感度をもたらしていること、そしてPHY3がシダ植物の弱光環境適応機構の一翼を担う鍵分子であることを明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

申請者の最近の研究により、PHY3フィトクロム光センシング部位は、赤色光/遠赤色光受容部としてだけでなく青色光受容部としても光シグナルを受容し、光生理反応を誘導する機能を有していることが判明した。これまで想定していたフォトトロピン光受容部位による青色光シグナルとは異なる、フィトクロム光センシング部位における青色光シ

グナル受容機構は、PHY3の特徴である赤色光・青色光シグナルの分子内相乗効果の新たな要因の可能性を示唆する。本研究課題では、新たに明らかになったPHY3のフィトクロム光センシング部位の青色光受容機構に着目し、PHY3の青色光シグナル受容メカニズム、さらには赤色光/青色光シグナルの分子内相乗効果メカニズムの解明に向けて新たな知見を得ることを目的とする。さらに、PHY3を介した青色光シグナル伝達経路の解明に向けた遺伝子探索も目指している。

### 3. 研究の方法

本研究課題ではフィトクロム光センシング部位における青色光受容機構を解明することを目的とするため、PHY3に存在するフォトトロピン光受容部位に依存した青色光応答は、目的とする解析を困難にする。申請者はフォトトロピンの光吸収発色団であるFMNの結合能を欠失したPHY3(Cys712Ala, Cys966Ala 2重置換)を用いることにより、フォトトロピン光受容部位に依存した青色光反応が失われることを確認している。そこで本課題ではこの2重置換PHY3(C712AC966A)をもとに改変PHY3を構築し、その光応答性を解析することでフィトクロム光受容部位だけに依存した青色光反応をモニタリングする。

植物フィトクロムの光センシング部位Photosensory Core Module(PCM)は、PAS, GAF, PHYと呼ばれる3つのサブドメインで構成される。モデル植物であるシロイヌナズナを中心としたこれまでの研究から、PCM領域が各フィトクロムの誘導する光生理反応の波長依存性を決定していることが示されている。PHY3のフィトクロム光センシング部位はこのPCM領域全域を含んでおり、今回着目している青色光受容の仕組みもこの領域に存在すると考えられる。そこで、この部位を構成する3つのサブドメインを、青色光反応を誘導しない植物フィトクロムのものと置き換えた改変PHY3を構築する。この改変PHY3を導入した形質転換植物体を用いて、PHY3が制御する青色光反応にどのような影響がでるかを調べることにより、PHY3のフィトクロム光センシング部位における青色光受容にとって機能的に重要な領域を特定する。

(1)PHY3 PCMが制御する青色光反応の解析  
C712AC966Aを発現する形質転換体を用いて、PHY3 PCMが制御する青色光反応の特性を詳細に解析する。

(2)PHY3 PCMと置き換えるPCM供与フィトクロムの探索  
青色光反応を誘導しない植物フィトクロムのPCMとの置換のため、モデル植物シロイヌナズナのフィトクロムA(PHYA)PCMとフィトクロムB(PHYB)PCMと置き換えた改変PHY3を構築し、その光応答性を解析する。

(3) PCM サブドメインを置換した改変 PHY3 の構築と光応答性の検討  
C712AC966A をもとに、PCM の3つのサブドメインを置換した改変 PHY3 を構築し、その光応答性を解析する。

(4) PHY3 による青色光シグナル伝達関連遺伝子の探索  
PHY3 からの青色光シグナル伝達経路を明らかにするために、ホウライシダにおける関連遺伝子を EST データから探索する。

#### 4. 研究成果

(1) PHY3 PCM が制御する青色光反応の解析するために、C712AC966A 変異を持つ PHY3 を導入した形質転換植物体から、高発現の系統を複数単離することに成功した。発現レベルは抗 phy3 ポリクローナル抗体を用いたウエスタンプロット法により解析し、導入遺伝子座についてホモ接合型であることをカナマイシン耐性分離比により確認した。

(2) 新たに単離した C712AC966A 高発現シロイヌナズナ系統では、phy3 調節の赤色光依存の胚軸光屈性の誘導が認められた。また、青色光依存の光屈性も誘導され、PHY3 PCM 制御の青色光反応を確認できた。また、いくつかの系統の青色光依存の胚軸光屈性において、変異を導入していない PHY3 と同程度の光強度依存性が観察された。このことから、PHY3 の制御する青色光応答性は、PHY3 PCM が主要な調節機能を果たしている可能性が示唆された。

(3) PHY3 PCM と置き換える PCM 供与フィトクロムとして、機能解析が最も進んでいるシロイヌナズナの PHVA と PHVB を候補とした。それぞれの遺伝子から PHY3 PCM に対応する領域を PCR 法により増幅し、PHY3 PCM と置き換えた改変 PHY3 を構築した。塩基配列決定により、目的の改変 PHY3 配列であることを確認している。この PHVA-PHY3 と PHVB-PHY3 を、植物形質転換用のバイナリーベクターにクローニング、アグロバクテリウムに導入後、宿主植物のシロイヌナズナ phot1-5 phot2-1 変異体に感染することで形質転換を行った。薬剤選抜により形質転換体を単離し、それぞれの改変 PHY3 において導入遺伝子座についてホモ接合型の系統を単離することに成功した。

(4) PHA-PHY3 および PHVB-PHY3 の融合型 PHY3 が、生物学的機能を保持しているかどうかを確認するため、それぞれの形質転換体における胚軸の光屈性を解析した。ここで解析する PHVA-PHY3 および PHVB-PHY3 の PHY3 部分は変異導入していないフォトリポピン部分を有しているため、フォトリポピン依存の青色光反応は維持されていることが期待さ

れた。解析の結果、PHVA-PHY3、PHVB-PHY3 と青色光による胚軸の光屈性が誘導され、これら融合型 PHY3 は光屈性誘導のためのシグナルを発信する機能があることが確認された。

一方、PHVA PCM、PHVB PCM による赤色光応答があるかどうかを、赤色光による胚軸の光屈性反応で解析したところ、両融合型 PHY3 と光屈性反応の誘導が見られないことが明らかとなった。このことから、高等植物シロイヌナズナのフィトクロム PCM 領域は、シダ植物の PHY3 PCM との互換性が無いことが示唆された。この結果を受け、PCM サブドメインの置換実験の実施は中止することとした。

(5) 高等植物の PCM が PHY3 PCM として機能しない可能性が示されたことから、シダ PHY3 PCM には特別な構造があると推測される。これまで PHY3 相同遺伝子の報告が極めて少なかったため、配列比較による PHY3 特異的部位の推定は困難であったが、2014 年に複数の PHY3 相同遺伝子配列が報告された。そこで、それらの配列と高等植物フィトクロムの PCM 領域のアミノ酸配列比較を行ったところ、PCM を構成する3つのドメインのうちの PAS 領域に PHY3 特異的な10アミノ酸程度のギャップが存在することが明らかになった。さらにフィトクロムの発色団であるフィトクロモビルン結合部位のある GAF 領域にも、5アミノ酸程度のギャップが PHY3 特異的に存在していることが明らかになった。これらは光センシングノットと呼ばれるフィトクロム光受容、シグナル伝達に重要な構造部分にあることから、機能的に極めて重要である事が推測される。これらの PHY3 特異的な構造が、PHY3 PCM の特徴的な光応答性、特に青色光への応答を制御している可能性が示唆された。

(6) PHY3 PCM が調節する青色光反応のシグナル伝達経路を解明するためには、青色光シグナリングの関連遺伝子を単離・解明していく必要がある。ホウライシダではゲノム情報などのリソースは存在していないので、研究室に蓄積していた EST 配列データを利用可能な状態にする必要がある。そこで 30,540 の EST 配列をもとに、文部科学省統合データベースプロジェクトの一環である TogoDB システムを利用してデータベースを構築した。このデータベースはホウライシダ EST データベース AcEST として公開した。さらにライフサイエンス統合データベースセンター (DBCLS) の「生命科学系データベースアーカイブ」よりデータのダウンロードサービスを可能にした。この AcEST を利用して、細菌から高等植物、動物などの広範な生物種で明らかにされている青色光シグナリング関連遺伝子の探索を行い、相同遺伝子群の単離に成功している。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Hiromi Suzuki, Ai Okamoto, Akane Kojima, Takeshi Nishimura, Makoto Takano, Takatoshi Kagawa, Akeo Kadota, Takeshi Kanegae, Tomokazu Koshiba, Blue-light regulation of ZmPHOT1 and ZmPHOT2 gene expression and the possible involvement of Zmphot1 in phototropism in maize coleoptile, *Planta*, 査読有、DOI: 10.1007/s00425-014-2082-6

### 〔学会発表〕(計4件)

鐘ヶ江健、シダ光受容体 PHY3/neo1 によって誘導される光屈性に対する遠赤色光照射の効果、日本植物生理学会、2012年3月18日、京都産業大学

鐘ヶ江弘美、鐘ヶ江健、シダ EST データベース AcEST の構築、日本植物生理学会、2013年3月21日、岡山大学

鐘ヶ江弘美、鐘ヶ江健、DBCLS のサービスを利用した非モデル生物のデータ解析およびデータベース構築、日本分子生物学会、2013年12月6日、神戸ポートアイランド

木村泉美、鐘ヶ江健、フィトクロム3の細胞内における局在部位の解明、日本植物生理学会、2014年3月20日、富山大学

### 〔その他〕

ホームページ等

ホウライシダ EST データベース AcEST

<http://togodb.dbcls.jo/acest/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

鐘ヶ江 健 ( KANEGAE, Takeshi )

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：70264588