

博士論文

イネ・フィトクロム遺伝子の発現特性と 光受容機能の相関についての研究

笠井（馬場） 晶子

目次

目次	2
略称	5
緒論	6
第1章 イネ・フィトクロム遺伝子の制御領域のクローニングと生理機能 評価 12	
序論	12
材料と方法	14
1. 植物材料と生育条件	14
2. フィトクロム遺伝子の発現制御領域のクローニング	17
3. 形質転換ベクターの構築とイネの形質転換	18
4. 光形態形成能（幼葉鞘の伸長）の評価	19
5. 出穂期（開花到達日数）の評価	19
6. 統計処理	20
結果	21
1. 光形態形成能におけるフィトクロム発現制御領域の生理機能評価	21
2. 出穂制御におけるフィトクロム発現制御領域の生理機能評価	23
考察	25
1. フィトクロム発現制御領域のクローニング領域の決定と生理機能評価	25
2. <i>PHYB:PHYB</i> が cFR での光形態形成に寄与するメカニズム	26
3. 長日条件の人工気象器における <i>phyB</i> 変異体と <i>phyC</i> 変異体の出穂期の不 一致と <i>PHYA:PHYA</i> による <i>phyAphyB</i> 二重変異の相補	27
図表	29
第2章 イネ・フィトクロムの発現量と光受容機能との相関	35
序論	35
材料と方法	38
1. 植物材料と生育条件	38
2. 形質転換ベクターの構築とイネの形質転換	39
3. 光形態形成能（幼葉鞘の伸長）の評価	41

4. 出穂期（開花到達日数）の評価	41
5. ウェスタンブロットティング	41
結果	43
1. cRでの光形態形成において <i>PHYB</i> :変異型 <i>PHYB</i> の中に変異型 <i>phyB</i> が <i>phyA</i> のように機能する個体が現れた	43
2. 変異型 <i>phyB</i> が <i>phyA</i> の様に機能する個体においては、 <i>phyB</i> タンパク質の発現量が低かった	44
3. <i>PHYB</i> :野生型 <i>PHYB</i> のサイレンシング系統も cRでの光形態形成において <i>phyB</i> が <i>phyA</i> 変異を相補したかのような表現型を示した	44
4. cRでの幼葉鞘の伸長抑制において <i>PHYA</i> : <i>PHYB</i> は <i>phyB</i> 変異を相補するが、 <i>PHYB</i> : <i>PHYA</i> は <i>phyA</i> 変異を相補できない	46
5. cFRでの幼葉鞘の伸長抑制においても <i>PHYA</i> : <i>PHYB</i> は <i>phyB</i> 変異を相補するが、 <i>PHYB</i> : <i>PHYA</i> は <i>phyA</i> 変異を相補できない	47
6. 出穂期の制御においては <i>PHYB</i> : <i>PHYA</i> は <i>phyA</i> 変異を一部相補する	48
考察	49
1. 低発現量の <i>phyB</i> は <i>phyA</i> の赤色光受容機能を模倣する	49
2. ヒンジ領域でのアミノ酸置換が <i>phyB</i> タンパク質の安定性に影響する可能性について	50
3. 発現制御領域を交換した <i>PHYA</i> : <i>PHYB</i> と <i>PHYB</i> : <i>PHYA</i> の対照的な結果について	52
図表	54
第3章 イネ・フィトクロム遺伝子の発現特性とフィトクロム Bによるフィトクロム A 遺伝子の発現制御	64
序論	64
方法	67
1. 植物材料と生育条件	67
2. 形質転換ベクターの構築とイネの形質転換	68
3. GUS染色	69
4. <i>In situ</i> hybridization 解析	70
結果	72
1. フィトクロムプロモーター： <i>GUS</i> による遺伝子発現の組織化学的解析	72
2. 暗所芽生えと明所芽生えにおける <i>PHYA</i> : <i>GUS</i> の発現パターンの比較.....	74

3. <i>In situ</i> hybridization による内在性 <i>PHYA</i> mRNA の発現組織解析と <i>PHYA:GUS</i> 発現パターンとの比較	75
4. 光環境が <i>PHYA:GUS</i> の発現パターンに与える影響	76
5. <i>PHYA:GUS</i> 遺伝子を発現抑制する光の受容体は phyB である	78
6. <i>In situ</i> hybridization による <i>PHYB</i> および <i>PHYC</i> mRNA の発現組織解析 79	
考察	81
1. イネ・フィトクロム遺伝子は分子種に応じて異なる組織特異性を持つ	81
2. <i>PHYA</i> 発現制御領域の光応答性と組織特異性との関連	82
3. <i>PHYA</i> mRNA と <i>PHYA:GUS</i> の発現パターンは一致している	83
4. 幼葉の葉肉細胞では Pfr 型の phyB により <i>PHYA</i> 遺伝子発現が抑制される 84	
図表	86
結論	98
図表	101
謝辞	102
参考文献	103
付録	115

略称

フィトクロムの表記

<i>PHY</i>	野生型フィトクロム遺伝子
<i>phy</i>	変異型フィトクロム遺伝子 あるいはフィトクロム変異体
PHY	フィトクロムアポタンパク質
phy	発色団が結合したフィトクロムタンパク質

フィトクロムの命名法については、Quail ら、1994 に詳細が記述されている。

その他

GUS	β -グルクドニダーゼ
GFP	green fluorescent protein: 緑色蛍光蛋白質
LED	light-emitting diodes
R-light	red-light: 赤色光
FR-light	far-red-light: 遠赤色光
Pr	R-light-absorbing: 赤色光吸収型
Pfr	FR-light-absorbing: 遠赤色光吸収型
cD	continuous dark: 連続暗条件
cW	continuous white light: 連続白色光照射条件
cR	continuous red light: 連続赤色光照射条件
cFR	continuous far-red light: 連続遠赤色光照射条件
cB	continuous blue light: 連続青色光照射条件

緒論

生存に適した環境へ移動、あるいは逆に、不利な環境からの脱出が出来ない植物にとって、生息地点の環境を感知することは死活問題である。なかでも光は、植物にとって、生存の土台を成す重要な環境シグナルである。植物は光を光合成によりエネルギー源として利用する一方で、光強度によって自らの生えている場所の地理的な条件を、光質によって自らを取り囲む他植物の分布を、そして、日長の変化によって来るべく季節を知ることができる。こうして、光は、発芽から栄養生長・生殖生長を経て結実までの植物の一生を通じて常にモニタリングされ、生長制御に反映されている。光環境をモニタリングしてそれに適応するために、植物は多様な光受容体を発達させてきた。これらの光受容体は受容する波長域（紫外、青色、赤色）に応じて3つに分けることができ、UV-B受容体としてUVR8 (Rizzini ら、2011)、青色光受容体としてはフォトトロピン (Huala ら、1997)、クリプトクロム (Ahmad ら、1993)、赤色光受容体としてフィトクロム (Butler ら、1959) が単離、同定されている。

フィトクロムは、赤色光照射がレタスの種子休眠を打破して発芽を促す一方で、遠赤色光照射によって発芽誘導がキャンセルされる、赤・遠赤色光可逆性と呼ばれる特性に基づき、植物のシグナル伝達因子としては異例とも言える早さで発見された (Borthwick ら、1952)。1959年のButler らによる単離・同定以降、その分子特性が解析され、植物界に広く存在する単量体分子量約11万の可溶性色素タンパク質で2量体を形成していること、発色団として開環テトラピロールであるフィトクロモビルン1分子とシステイン残基を介して共有結合していること、などが分かった。さらに、1990年代以降の遺伝学的・分子生物学的な研究の結果、1) フィトクロムは細胞質内において不活性型で

ある Pr 型として合成されるが、赤色光を吸収すると、まず、発色団であるフィトクロモビリンがシス-トランスの異性化を起こし、この異性化によってフィトクロムタンパク質の立体構造変化がミリ秒の早さで引き起こされ Pfr 型となる 2) この立体構造の変化が引き金となって、Pfr 型フィトクロムは細胞核に移行することができるようになり、赤色光シグナルを核に伝える (Nagatani, 2004 ; Li ら, 2012 ; Rockwell ら, 2006) 3) 核内で、フィトクロムは様々な転写因子と相互作用をすることにより、光形態形成、光合成遺伝子の発現制御、花芽形成などの光応答反応に関わる遺伝子群の発現を制御する (Quail, 2002 ; Wang と Deng, 2003) 等について膨大な知見が蓄積された。

維管束植物のフィトクロムは、植物種に応じて小さな遺伝子ファミリーを形成している (Clack ら, 1994 ; Mathews と Sharrock, 1997)。被子植物では、モデル双子葉植物のシロイヌナズナに 5 種類 (*PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD*, *PHYE*) のフィトクロム遺伝子 (Clack ら, 1994 ; Sharrock と Quail, 1989) が存在しており、モデル単子葉植物のイネでは *PHYA*, *PHYB*, *PHYC* の 3 種類の遺伝子が存在する (Basu ら, 2000 ; Dehesh ら, 1991 ; Kay ら, 1989a)。一方、裸子植物のマツでは 4 種類 (*PHYP1*, *PHYP2*, *PHYN*, *PHYO*)、イチョウには 3 種類 (*PHYP*, *PHYN*, *PHYO*) の遺伝子が存在している。系統学的な解析から、フィトクロムの祖先遺伝子は種子植物が多様化する前に 2 つに分岐したことが示されており (Mathews と Sharrock, 1997)、現存する種子植物の全てのフィトクロムは、*PHYA* グループ (被子植物における *PHYA/PHYC* と裸子植物における *PHYN/PHYO* を含む) と *PHYB* グループ (被子植物における *PHYB* およびその派生と考えられる *PHYD*, *PHYE* などと裸子植物における *PHYP*) とに 2 分される。しかしながら、系統学的なグループ分けは、フィトクロム分子種の分子特性や機能に必ずしも一致するものではない。

個々のフィトクロム分子種はその分子特性において、互いに相違点と類似点を持って

いる。phyA は光に対して不安定な特性を持つが、他のフィトクロム分子種は光に対して安定である (Abe ら、1985 ; Furuya、1989 ; Tokuhisa ら、1985)。光に対する安定性の違いが原因となり、黄化芽生えにおいて最も大量に存在するフィトクロムは phyA であるが、明所で育った植物体では phyB やその他のフィトクロムが優位である。光安定性以外では、phyC タンパク質の安定性について、phyB 変異体において phyC 発現量が劇的に減少することがシロイヌナズナとイネの両方で観察されている (Monte ら、2004 ; Takano ら、2005)。生化学的な解析の結果、シロイヌナズナの phyA はホモダイマーのみしか形成できないが、phyB およびその他のフィトクロムでは、ホモダイマーに加え、お互いにヘテロダイマーを形成することが報告されている (Sharrock ら、2003)。最近になって、イネにおいても同様に、phyA はホモダイマーとしてのみ存在するが、phyB と phyC についてはそれぞれのホモダイマーに加えて、phyB / phyC のヘテロダイマーが存在することが示された (Xie ら、2014)。フィトクロムのヘテロダイマー形成の機能的な意義は長い間の疑問であったが、phyC についてはホモダイマーには生理的な機能はなく、phyB とのヘテロダイマーとしてのみ機能を持つこと、および、phyB とのヘテロダイマー形成が phyC タンパク質の安定性に必須であることが示され (Clack ら、2009 ; Xie ら、2014)、phyC の機能発現においては phyB とのヘテロダイマー形成が不可欠であることが判明した。

フィトクロム分子種はその受光特性についても、互いに相違点と類似点を持っている。シロイヌナズナのフィトクロム変異体の研究から、原則として、phyA は超低光量反応と遠赤色光-高照射反応を伝える光受容体であること (Dehash ら、1993 ; Nagatani ら、1993 ; Shinomura ら、1996 ; Whitelam ら、1993)、一方、phyB を代表とする phyA 以外のフィトクロムは、典型的な赤・遠赤色光可逆性を示す低光量反応の受容体であること

(Reed ら、1993 ; Reed ら、1994) など大きな相違点が示された。ところが近年になって、非常に高照射な条件あるいは暗条件から光条件への転換点においては、phyA も赤色光受容体として機能できること (Franklin ら、2007 ; Tepperman ら、2006) や、発芽時には phyE も遠赤色光-高照射反応を伝える (Hennig ら、2002) などの、類似点についても報告された。さらに、イネにおいては、遠赤色光-高照射反応は phyA と phyC、低光量反応については phyA と phyB が機能しており、受光特性に重なりがあることが分かっている (Takano ら、2005)。

個々のフィトクロムの生理機能についても、互いに重なりを持ちつつ異なる役割を担っていることが知られている。イネでは、全てのフィトクロムが、芽生えの脱黄化に関与しており、成熟期においては長日条件 (非誘導条件) での開花を遅らせるなど (Takano ら、2005)、多くの生理機能に重なりが見られる。その一方で、短日条件 (誘導条件) での開花制御については、phyB は開花を遅延するが、phyA は、特に phyB が存在しない *phyB* 欠失変異の遺伝的背景において、開花を誘導する (Takano ら、2005) など、phyA と phyB の機能に相違が見られる。シロイヌナズナでは、phyA と phyB の両方が発芽と脱黄化に関与するが、遠赤色光下では phyA、赤色光下では phyB と役割が分担されている。また、phyB は R:FR 比が高い光条件で避陰反応を阻止するが、phyA は R:FR 比が低い光条件での過剰な避陰反応を回避する役割を担う。開花誘導については、phyA が開花を誘導する一方で phyB は開花を遅延する (Franklin ら、2007 ; Reed ら、1994)。以上に例示した通り、フィトクロム分子種間の相違点と類似点は、植物種によって複雑に異なっており、系統学的なグループ分けから予想される分子特性とは必ずしも一致しないものも多い。

全ゲノムシーケンス時代の到来により、植物においても 2000 年にシロイヌナズナ、

2004年にはイネの全ゲノム情報が公開された。これにより、イネのフィトクロム遺伝子は *PHYA*, *PHYB*, *PHYC* の3つのみであることが明らかとなり、フィトクロムについて分子種毎の特性を研究するには、代表的なモデル双子葉植物であるシロイヌナズナに比べて有利であることが判明した。この利点がイネ・フィトクロム変異体の単離、2重変異体、3重変異体（赤色光に対して完全不感受性）の作製を加速し、イネ・フィトクロムの分子種ごとの生理機能についての理解は最近の10年間で飛躍的に深まった。その結果、前段でも紹介したように、イネのフィトクロムのうちどの分子種が、どのようにして、発芽後の光形態形成や日長に応答した出穂期制御（花性誘導）などを制御しているかについて、相当量の知見を得ることができた (Takano ら、2001 ; Takano ら、2005 ; Takano ら、2009)。また、*PHYB* の単独変異体を連続赤色光下で発芽させると、野生型より長い幼葉鞘と薄緑色の葉の表現型を示すことなどから、イネの主な赤色光受容体は *phyB* で、典型的な赤・遠赤色光可逆性を示す低光量反応 (low fluence response: LFR) に関与していることが示された (Takano ら、2005)。さらに、*PHYA* の単独変異体を連続遠赤色光下で発芽させると、暗所芽生えに匹敵する長い幼葉鞘を持ち、黄化した第1葉を抽出することなどから、主な遠赤色光受容体は *phyA* で、暗所における高蓄積や光受容により分解する光不安定性など、*phyA* タンパク質として典型的な特性を示し、シロイヌナズナやトマトなど他植物の *phyA* 同様に超低光量反応 (very low fluence response: VLFR) と高照射反応 (high irradiance response :HIR) に関与することが分かった (Nagatani ら、1993 ; Parks と Quail、1993 ; Reed ら、1994 ; Takano ら、2001 ; van Tuinen ら、1995 ; Whitelam ら、1993)。ところが、イネの *phyA* は赤色光受容体としても機能することができ、フィトクロムを介した光シグナルにおいて、下流遺伝子にあたる集光性クロロフィル a/b 結合タンパク質 *LHCB* 遺伝子の発現制御において赤・遠赤色光可逆

性を示す (Takano ら、2005)。これは、シロイヌナズナやトマトなど他植物には例を見ないイネの phyA に特有な特性である。

このような phyB と phyA の光受容機能の相違と類似は何に起因するのであろうか？

本研究ではこの複雑な問いに

- 1) 質：タンパク質構造の相違もしくは類似性
- 2) 量：フィトクロム遺伝子の発現量や局在性の相違もしくは類似性

に単純化して答えを出すことを試みた。

解析手段としては、形質転換イネによる逆遺伝学的手法を用いることとし、イネ・フィトクロム遺伝子の発現制御領域のクローニング及びその下流に当該フィトクロム cDNA を配したベクター (フィトクロム発現制御領域: cDNA コンストラクト) の作製とフィトクロム欠損変異体への導入を通じて、それらの生理機能を評価することから研究を始めた。

第1章 イネ・フィトクロム遺伝子の制御領域のクローニングと生理機能 評価

序論

本研究以前のイネ・フィトクロムの研究は、フィトクロム分子の cDNA およびゲノム DNA のコード領域を用いたもの、あるいは、フィトクロム欠損変異体の解析に限られており、遺伝子発現制御領域に関するものは公開されている全ゲノム塩基配列情報のみであった。そこで、フィトクロム遺伝子の発現制御領域のクローニングから研究を始めた。また、単離した発現制御領域の妥当性評価には、以下に述べるイネ・フィトクロム欠損変異体の表現型回復を指標にするのが適切と考えて、フィトクロム欠損変異体を用いた相補性解析を進めることとした。

イネのフィトクロム変異体の光形態形成における表現型は、1) *phyA* 単独変異体：超低光量反応 (very low fluence response: VLFR) に非感受性。高照射反応 (high irradiance response :HIR) に部分的に非感受性となり、遠赤色光連続照射条件 (cFR) では野生型より長い幼葉鞘と第1葉葉鞘を持ち、黄化した第1葉を抽出する。2) *phyAphyC* 2重変異体：HIR に対して、完全に非感受性となり、cFR では *phyA* より長い幼葉鞘を持ち、暗所芽生えとほとんど同じ形態を示す。1) および2) から、*phyA* と *phyC* の2分子種のフィトクロムがイネにおける cFR の光受容体であると考えられている (Takano ら、2001 ; Takano ら、2005 ; Xie ら、2006)。

また、低光量反応 (low fluence response: LFR) については、3) *phyB* 単独変異体および *phyBphyC* 2重変異体：部分的に非感受性である。赤色光連続照射条件 (cR) で野生

型より長い幼葉鞘と薄緑色の葉の表現型を示す。4) *phyAphyB* 2重変異体: 完全に非感受性になる。*phyB*、*phyBphyC* より長い幼葉鞘を持ち、暗所芽生えとほとんど同じ形態を示す。3) と4) から、LFR および cR の受容について *phyA* と *phyB* とは重複した役割を持つことが明らかとなっている (Takano ら、2001; Takano ら、2005; Xie ら、2006)。

短日植物であるイネにおいて、フィトクロムは出穂期制御 (開花制御) に関与しており、変異体の表現型は誘導条件である短日より非誘導条件である長日で顕著に現れる。長日条件での出穂期は、1) *phyA* 単独変異体: 野生型とほぼ同じである。2) *phyB* 単独変異体と *phyC* 単独変異体、そして、*phyBphyC* 2重変異体: 野外圃場 (自然光) では、3系統とも野生型 (開花到達日数: 約97日) より12日程度の早咲きとなる。この3種のフィトクロム変異体の間に出穂期の違いはない。3) *phyAphyB* 2重変異体と *phyAphyC* 2重変異体: 開花到達日数は約45日と野生型に比べて超早咲きとなる。なお、野生型を誘導条件 (短日) で栽培した場合の開花到達日数も約45日であることから、日長応答性を完全に失っていると解釈される (Takano ら、2005)。

上述のように、イネ・フィトクロムの生理機能は分子種間で重複しており、これを反映して欠損変異体の表現型は2重変異体において鮮明なものとなる。そこで、本研究では主に2重変異体背景のイネを材料として相補性解析を進めた。

材料と方法

1. 植物材料と生育条件

1.1 植物材料

イネ (*Oryza sativa. L*) の以下の系統を実験に用いた

非遺伝子組み換えイネ

栽培品種 日本晴

phyA 変異体 *phyA-4* (Takano ら, 2001; 無発現変異、日本晴背景)

phyB 変異体 *phyB-1* (Takano ら, 2005; 無発現変異、日本晴背景)

phyC 変異体 *phyC-1* (Takano ら, 2005; 無発現変異、日本晴背景)

phyAphyC 変異体 *phyA-4/phyC-1* (Takano ら, 2005; 日本晴背景)

phyBphyC 変異体 *phyB-1/phyC-1* (Takano ら, 2005; 日本晴背景)

phyAphyB 変異体 *phyA-4/phyB-1* (Takano ら, 2005; 日本晴背景)

遺伝子組み換えイネ

PHYA promoter :: *PHYA* cDNA(*PHYA:PHYA*)発現体 (背景 : *phyA-4*, *phyA-4/phyB-1*)

本研究で作製した系統。外来 DNA 断片 *PHYA* promoter::*PHYA* cDNA(日本晴由来)およびハイグロマイシン耐性遺伝子が挿入されている。アグロバクテリウム法によって DNA 断片を導入した形質転換当代 (T_0) から 1 世代後の T_1 あるいは 2 世代後の T_2 世代を使

用した。外来遺伝子の作製法とイネの形質転換については第3項と第4項に詳細を記載した。

PHYB promoter :: *PHYB* cDNA(*PHYB:PHYB*)発現体 (背景 : *phyB-1, phyA-4/phyB-1*)

本研究で作製した系統。外来 DNA 断片 *PHYB* promoter::*PHYB* cDNA(日本晴由来)およびハイグロマイシン耐性遺伝子が挿入されている。アグロバクテリウム法によって DNA 断片を導入した形質転換当代 (T_0) から1世代後の T_1 あるいは2世代後の T_2 世代を使用した。外来遺伝子の作製法とイネの形質転換については第3項と第4項に詳細を記載した。

PHYC promoter :: *PHYC* cDNA(*PHYC:PHYC*)発現体 (背景 : *phyC-1, phyA-4/phyC-1*)

本研究で作製した系統。外来 DNA 断片 *PHYC* promoter::*PHYC* cDNA(日本晴由来)およびハイグロマイシン耐性遺伝子が挿入されている。アグロバクテリウム法によって DNA 断片を導入した形質転換当代 (T_0) から1世代後の T_1 あるいは2世代後の T_2 世代を使用した。外来遺伝子の作製法とイネの形質転換については第3項と第4項に詳細を記載した。

1.2 生育条件

出穂期(開花到達日数)の調査および増殖用のイネは、遺伝子組み換え体あるいは非遺伝子組み換え体を問わず、種子を脱粒せずに有効塩素 5~6%の次亜塩素酸溶液で20分間消毒した後に水道水を5回交換して洗浄、6回目にそのまま浸種して、28°C設定の恒温器内で2日間の吸水を行い発芽誘導した。1年以上低温で保存した種子を用いたため、休眠打破は行わなかった。発芽した種子は培養土(30% ボンソル2号、70% ボン

ソル1号;共に住友化学)を入れた1/10,000アールポットに移植した。出穂期調査用のイネは湿度70%の人工気象室(富士医科産業株式会社)で生育した。光源にはメタルハライドランプ(光合成光量子束密度 $390 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$)を用い、日長条件は短日条件を10時間日長、長日条件を14時間日長に設定、温度も日長条件に合わせて明期を 28°C 、暗期を 24°C に設定した。増殖用のイネは遺伝子組み換え体用の閉鎖温室で生育した。湿度70%で、光条件は自然光。温度条件は $29^\circ\text{C}/14$ 時間、 $26^\circ\text{C}/10$ 時間であった。

光形態形成能の評価に用いたイネは、遺伝子組み換え体あるいは非遺伝子組み換え体を問わず、脱粒した種子を70%エタノール溶液で1分間殺菌後に脱イオン水で5回洗浄した後、有効塩素5~6%の次亜塩素酸溶液を加えて20分間消毒した。これを滅菌水で5回洗浄の後、クリーンベンチ内で植物用の固形培地(0.5×ムラシゲ・スグーグ培地用混合塩類(和光) pH5.8、4% ゲルライト(和光))に播種、暗箱に納めて低温室(4°C)に入れ、1~2日間吸水させた。吸水後の種子は、連続暗条件や単色光を照射するための小型の人工気象器(SANYO)に移して 28°C 恒温で9日間生育した。単色光連続照射における赤色光、遠赤色光および青色光光源にはLEDパネル(順に、Model LED-R、Model LED-FR、Model LED-B; 全てEYELA)を用いた。それぞれの光量は $15 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ であった。白色光の光源としては、蛍光灯(FL40SN-SDL; NEC; 光量は $40 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$)を用いた。連続暗処理は植物体を暗箱に入れ、光源のスイッチを切った人工気象器内で生育することにより行った。光処理用の人工気象器は全て暗室内に設置されており、播種後の種子の移動は暗箱を用いて行った。

2. フィトクロム遺伝子の発現制御領域のクローニング

イネ・フィトクロム遺伝子(*PHYA*, *PHYB*, *PHYC*)の発現制御領域の塩基配列情報は KOME (<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>) または RAP-DB (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) の2つのデータベースより入手した。この情報をもとに PCR プライマー (表 1) を設計、野生型イネ (日本晴) のゲノム DNA を鋳型とした PCR を TaKaRa LA Taq と GC バッファー (TAKARA) を用いて付属の説明書に準じて行い、*PHYA* 発現制御領域 (AP; 4,997 bp)、*PHYB* 発現制御領域 (BP; 2,752 bp)、*PHYC* 発現制御領域 (CP; 3,005 bp) の DNA 断片を得た。3つの発現制御領域は全て3'末端にフィトクロム遺伝子コーディング領域の1stメチオニンを含み、*PHYA* 発現制御領域については、1stメチオニン(2nd エキソン内)の上流に非翻訳の1stエキソンと遺伝子発現制御に必須であることが知られている1stイントロンを含んでいる。これらの DNA 断片は pGEM-T Easy Vector (Promega) にクローニングの後に塩基配列を確認、以降の形質転換ベクター構築に用いた。

表 1

プライマー名	塩基配列
PHYAP F1	5'-TTTCCTGCAGGCCACAGGAGCTAGGATCAG-3'
PHYAP R5	5'-CATCTTCTGCCTTGATTAC CTGAATCA-3'
PHYBP F1	5'-AAATTCATCCGCCTCCTAGC-3'
PHYBP R3	5'-CCATGGCGCCGATGCGGTGGAT-3'
PHYCP F1	5'-GAAGGGTGC ACTACA ACTCCA-3'
PHYCP R3	5'-CGACGACGACATCTCCACAAC-3'

3. 形質転換ベクターの構築とイネの形質転換

認識配列が 8bp である *SbfI* サイトを付加するために、pBluescript ベクター上にクローニングされていた *PHYA* cDNA (3,866 bp) を pMCS5 ベクター (MoBiTec) の *Bam*HI サイトと *KpnI* サイトの間にサブクローニングし直した。これに、第 2 項でクローニングした *PHYA* 発現制御領域を *PHYA* cDNA の内在性 *Bst*11707I サイトと *SbfI* の間に挿入して *PHYA* promoter :: *PHYA* cDNA (*PHYA:PHYA*) を作製した (図 1-1)。

同様に、pBluescript ベクター上にクローニングされていた *PHYB* cDNA (4,223 bp) を pMCS5 ベクターの *XbaI* サイトと *KpnI* サイトの間にサブクローニングし直して *SbfI* サイトを付加した。これに、第 2 項でクローニングされた *PHYB* 発現制御領域を *PHYB* cDNA の内在性 *BspI* サイトと *SbfI* の間に挿入して *PHYB* promoter :: *PHYB* cDNA (*PHYB:PHYB*) を作製した (図 1-1)。

PHYC cDNA (4,002 bp) についても、pMCS5 ベクターの *ApaI* サイトと *XmaI* サイトの間にサブクローニングし直して *SbfI* サイトを付加した後に、*PHYC* 発現制御領域を *PHYC* cDNA の内在性 *SacII* サイトと *SbfI* の間に挿入して *PHYC* promoter :: *PHYC* cDNA (*PHYC:PHYC*) を作製した (図 1-1)。

3つのコンストラクトをそれぞれ、*SbfI* サイトと *AscI* サイトを用いて pMCS5 ベクターから切り出し pSMAH バイナリーベクター (生物研 市川博士より分与) に挿入した。完成したバイナリーベクターをエレクトロポレーション法 (MicroPulser electroporator; Bio-Rad) を用いて *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 に導入、このアグロバクテリウムをイネの形質転換に用いた。

イネの形質転換法は Hiei ら、1994 を改良した Toki ら、1997 に準じて行った。形質転

換当代 (T_0) の葉より抽出したゲノム DNA を用いて、外来遺伝子の挿入をゲノミック PCR で確認した後に、形質転換当代 (T_0) の自家受粉により T_1 を作出した。アグロバクテリウム法によって導入される外来 DNA は個体ごとにゲノム DNA 上の挿入箇所が異なるため、 T_0 世代においては 1 個体を 1 系統として扱い、 T_1 世代以降は、同じ T_0 個体由来の種子は全て同じ系統として扱った (Hiei ら、1994)。各コンストラクトにつき 5~10 以上の T_0 系統を作出し、1 世代後の T_1 あるいは 2 世代後の T_2 世代を解析に使用した。

4. 光形態形成能（幼葉鞘の伸長）の評価

光形態形成能の評価においては、cR あるいは cFR 条件の人工気象器 (28°C 恒温) に移動した日を播種日 (0 日目)、その翌日を播種後 1 日目とカウントして、9 日目に幼苗の全体像をスケールとともに写真により記録した。後日、写真をもとに生育した幼苗の幼葉鞘の長さを画像解析ソフト Image J により算出、この値を光形態形成能の評価に用いた。形質転換体の評価には、少なくとも異なる 3 系統からそれぞれ 3 個体以上のデータをとるようにし、3 回の独立した実験から合計で 10 個体以上のデータを取得した。対照区として用いた非形質転換体イネについては 3 回の独立した実験から合計で 20 個体以上のデータを取得した。

5. 出穂期（開花到達日数）の評価

出穂期の評価においては、主稈の穂が止葉の葉鞘から抽出される日を出穂日と定義し

た。イネ種子を浸種した日を播種日（0日目）とし、翌日を播種後1日目とし、出穂日までの日数を出穂期（開花到達日数）とした。形質転換体の評価には、少なくとも異なる3系統からそれぞれ3個体以上のデータをとるようにし、2回の独立した実験から合計で12個体分のデータを取得した。

6. 統計処理

幼葉鞘の伸長と開花到達日数のデータは、テューキー・クレーマー法による分散分析を行い、その平均値に有意差があるか否かを判定した。有意水準 $\alpha=0.05$ 、幼葉鞘の伸長では $N=10\sim 20$ 、開花到達日数は $N=12$ である。

結果

1. 光形態形成能におけるフィトクロム発現制御領域の生理機能評価

クローニングしたイネ・フィトクロムの発現制御領域が十分な生理機能を持つか否かを検討するために、*PHYA* promoter :: *PHYA* cDNA (以降 *PHYA:PHYA*)と *PHYB* promoter :: *PHYB* cDNA (以降 *PHYB:PHYB*) に対しては *phyAphyB* 二重変異体に導入した形質転換系統 (以降順に、*PHYA:PHYA/phyAphyB*、*PHYB:PHYB/phyAphyB*)を、*PHYC* promoter :: *PHYC* cDNA (以降 *PHYC:PHYC*)に対しては *phyAphyC* 二重変異体に導入した形質転換系統(以降 *PHYC:PHYC/phyAphyC*)を用い、それらの後代 (T_1 または T_2) について、連続単色光照射環境 (連続赤色光 : cR あるいは連続遠赤色光 : cFR) における光形態形成能を形態と幼葉鞘の伸長抑制に着目して、野生型イネ (WT: 日本晴) および各種フィトクロム変異体 (*phyA*, *phyB*, *phyC*, *phyAphyB*, *phyBphyC*) との比較により評価した。

PHYA:PHYA/phyAphyB を播種後 9 日間の cR あるいは cFR で生育した結果は図 1-2 のようになり、cR では *phyAphyB* 2 重変異の *phyA* 変異を相補して *phyB* 変異体に良く似た薄緑色の表現型となった。*phyB* 変異体においてはこの表現系が葉緑体の発達不全に起因すること考えられている (Takano ら、2005)。一方、cFR の表現系は野生型イネに良く似たものとなったが、これはイネにおける主要な遠赤色光受容体が *phyA* であることに関連しており、実際には *phyAphyB* 2 重変異のうち *phyA* 変異のみを相補していると考えられた。

PHYB:PHYB/phyAphyB を播種後 9 日間の cR あるいは cFR で生育した結果は図 1-3 のようになり、cR での表現型は野生型イネに良く似たものとなったが、これはイネにお

ける主要な赤色光受容体が *phyB* であること (Takano ら、2005) に関連しており、実際には *phyAphyB* 2 重変異のうち *phyB* 変異のみを相補していると考えられた。一方、*cFR* の表現型は *phyAphyB* 2 重変異の *phyB* 変異を相補して *phyA* 変異体に良く似た表現型となった。Takano らの 2005 年の報告によると、イネの *phyB* は R/FR 可逆性の低光量反応だけを伝える赤色光受容体なので、*cFR* で *PHYB:PHYB* が生理機能を持つのは、一見、この報告と矛盾する。しかしながら、同報告には *phyB* 変異により *phyC* タンパク質が顕著に減少することも記載されており、*cFR* での *PHYB:PHYB* による光形態形成能の回復は、*phyB* タンパク質が供給されることにより、*phyC* タンパク質の分解が抑えられて *phyC* による FR 受容が回復した結果を反映しているものであると考えられる (Xie ら、2014)。

PHYC:PHYC/phyAphyC を播種後 9 日間の *cR* あるいは *cFR* で生育した結果は図 1-4 のようになり、*cR* での表現型は野生型イネに良く似たものとなったが、イネにおける主要な赤色光受容体が *phyB* であること (Takano ら、2005) から、*phyAphyC* 2 重変異体自体 *cR* では野生型イネと変わらないことを考えると、*cR* における *PHYC:PHYC* の生理機能はこの手法では評価できないことが分かる。一方、*cFR* の表現型は *phyAphyC* 2 重変異の *phyC* 変異を相補して *phyA* 変異体に良く似た表現型となった。

以上の結果を、光による幼葉鞘の伸長抑制という光形態形成の一部の現象に焦点を絞り、*cR* あるいは *cFR* における各系統 (WT, *phyA*, *phyB*, *phyC*, *phyAphyB*, *phyBphyC*, *PHYA:PHYA/phyAphyB*, *PHYB:PHYB/phyAphyB*, *PHYC:PHYC/phyAphyC*) の幼葉鞘の長さを測定してグラフ化して比較した結果が図 1-5-A (*cR*) あるいは 図 1-5-B (*cFR*) である。結果は形態的な特徴 (図 1-2, 1-3, 1-4) から類推された事項を定量化したものとなり、光形態形成においては、*PHYA:PHYA* が *phyA*、*PHYB:PHYB* が *phyB*、そして *PHYC:PHYC*

が *phyC* として十分な機能を持つことを示すものであった。

2. 出穂制御におけるフィトクロム発現制御領域の生理機能評価

成熟したイネの光受容についても、幼苗期同様に、クローニングしたイネ・フィトクロムの発現制御領域が十分な生理機能を持つか否かを検討するため、短日条件（10時間日長）と長日条件（14時間日長）における出穂期（開花期）の早晩性について、野生型イネ（WT: 日本晴）および各種フィトクロム変異体（*phyA*, *phyB*, *phyC*, *phyAphyB*, *phyBphyC*）と *PHYA:PHYA/phyAphyB*、*PHYB:PHYB/phyAphyB* そして *PHYC:PHYC/phyAphyC* の形質転換イネ（T₁）とを比較した（図 1-6）。

フィトクロム変異体およびフィトクロム発現制御領域：cDNA 形質転換体の野生型（WT）である日本晴は、典型的な短日性の栽培種で、短日条件では早生（開花到達日数：45日）、長日条件下では晩生（開花到達日数：93日）となる（図 1-6）。しかしながら、2つのフィトクロム遺伝子に欠損変異の入った *phyAphyB* と *phyBphyC* では日長応答性が WT とは大きく異なる。*phyAphyB* 二重変異体は短日条件より長日条件下の方が出穂が早くなり、開花到達日数は順に 72日と 53日であった（図 1-6）。これに対して、*phyBphyC* 二重変異体は日長応答性を失ったような表現型となり、短日条件でも長日条件でも同様に早生（開花到達日数：50日前後）である。

PHYA:PHYA を *phyAphyB* 二重変異体に導入する（*PHYA:PHYA/phyAphyB*）と短日条件下での出穂は早まり、長日条件下での出穂は遅くなった。*PHYA:PHYA* の導入によって *phyAphyB* 二重変異体の表現型が *phyB* 単独変異体と似た表現型に回復したことから、この結果は、*PHYA:PHYA* により *phyA* 変異が相補されたことを示している。同様に、

PHYB:PHYB を *phyAphyB* 二重変異体に導入する (*PHYB:PHYB/phyAphyB*) と短日条件下での出穂は早まり、長日条件下での出穂は遅くなった。この結果は、*PHYB:PHYB* の導入により *phyAphyB* 二重変異体の表現型が *phyA* 単独変異体と似た表現型に回復することを示しており、*phyB* 変異が相補されたと考えられる。*PHYC:PHYC* を *phyAphyC* 二重変異体に導入した形質転換イネ (*PHYC:PHYC/phyAphyC*) は日長応答性を回復して、*phyA* 単独変異体と似た表現型：短日条件下で早生（開花到達日数：49日）、長日条件下で晩生（開花到達日数：94日）、となった。この結果は、*PHYC:PHYC* により *phyC* 変異が相補されたことを示している。以上、全ての結果は、本研究でクローニングしたフィトクロム遺伝子の発現制御領域が、成熟したイネの光受容についても十分な生理機能を持つことを示している。

考察

1. フィトクロム発現制御領域のクローニング領域の決定と生理機能評価

本研究でイネ・フィトクロム遺伝子の発現制御領域としてクローニングした配列の長さは、*PHYA* 発現制御領域として約 5.0kb、*PHYB* および *PHYC* 発現制御領域については約 3.0kb であった。これに対して、ゲノム上の隣接遺伝子までの距離（巻末の付録 1、2、3 参照）は、*PHYA* の場合は約 6.0kb でほぼ十分な長さをクローニングしたと考えられたが、*PHYB* では約 8.5kb、*PHYC* 発現制御領域の場合は、すぐ上流に EST は見つかるものの ORF が極端に短いことからこれを除外して考えると、隣接遺伝子まで約 12.0kb と距離が長く、クローニングした領域（約 3.0kb）だけで充分か否かには疑問が残った。しかしながら、その後の解析、とくに植物の形質転換に用いる際の利便性と *PHYA* 発現制御領域（約 5.0kb）の内、約 4.0kb が 5'非翻訳領域であることを考慮して、*PHYB* および *PHYC* 発現制御領域については暫定的に 3.0kb と決め、充分か否かはフィトクロム発現制御領域：cDNA が対応するフィトクロム変異を相補するか否かで判断することとした。

フィトクロム発現制御領域：cDNA 形質転換フィトクロム変異体の種子を cR または cFR で発芽および生育させて光形態形成能を評価した結果は、本研究でクローニングした *PHYA*、*PHYB*、*PHYC* 発現制御領域は全て、光形態形成時の赤色光および遠赤色光応答に関して十分な生理機能を持つことを立証するものであった。また、上記形質転換イネを長日条件（14 時間日長）あるいは短日条件（10 時間日長）で出穂するまで栽培して出穂期制御能について評価した結果も、フィトクロム発現制御領域：cDNA により該

当するフィトクロム変異が相補されて、日長に応じた出穂早晩生が回復しており、クローニングした全ての発現制御領域が十分な生理機能を持つことを立証するものであった。

2. *PHYB:PHYB* が cFR での光形態形成に寄与するメカニズム

Takano ら (2005 年) の報告によると、イネの *phyB* は R/FR 可逆性の低光量反応を伝える赤色光受容体であり、赤色光受容による Pfr 型のみが下流にシグナルを伝え、遠赤色光受容により Pr 型に構造変化することによって、シグナル伝達は終息する。そうであれば、cFR における光形態形成で *PHYB:PHYB* が *phyAphyB* の *phyB* 変異を相補するというのは、*PHYB:PHYB* により産出された *phyB* が遠赤色光受容体として機能しているかのようであり、この報告と矛盾する。

しかしながら、Hirschfeld ら (1998) は、シロイヌナズナの *phyB* 単独変異体においては、*phyC* タンパク質の蓄積量が大幅に減少していると報告している。さらにイネにおいても、前出の Takano ら (2005) に *phyB* 変異により *phyC* タンパク質の安定性が失われて蓄積量が顕著に減少することが報告されている上に、ごく最近になって、*phyB* 変異イネに *PHYB:PHYB* を導入すると、イネでは、*PHYB:PHYB* で *phyB* 変異を相補すると *phyB* タンパク質が補給されて *phyC* タンパク質が蓄積し、遠赤色光受容能が回復することが Xie ら (2014) によって示された。従って、本研究において *phyAphyB* 2 重変異イネに導入された *PHYB:PHYB* も、Xie ら (2014) の報告同様に、*phyB* タンパク質を補給することにより *phyC* タンパク質の安定化と蓄積を促すことにより、*phyC* タンパク質による遠赤色光受容を回復したと考えられる。

3. 長日条件の人工気象器における *phyB* 変異体と *phyC* 変異体の出穂期の不一致と

PHYA:PHYA による *phyAphyB* 二重変異の相補

上で述べたように、*phyB* 単独変異体は実質的には *phyBphyC* 2重変異体になっている。それにも関わらず、圃場での出穂期（長日条件下）は、*phyB* 単独変異体と *phyC* 単独変異体で同じであった（Takano ら、2005）。*phyB* と *phyC* はそれぞれホモダイマーとヘテロダイマーを形成することが報告されている（Sharrrock ら、2004）が、*phyC* ホモダイマーには生理活性がないと考えられている（Clack ら、2009；Xie ら、2014）。また、イネの出穂期制御においては *phyB* ホモダイマーも機能しておらず（Takano ら、2005；Osugi ら、2011；Xie ら、2014）、*phyBphyC* ヘテロダイマーのみが関与していると考えられおり、これが、*phyB* と *phyC* の出穂期が一致する理由であると理解されてきた。

ところが、人工気象器で生育したイネにおいては、*phyB* と *phyC* の出穂期が不一致となる現象が発見され（Inagaki ら、未発表データ）、本研究においても同じ現象が観察された（図 1-6）。原因については未解明であるが、光強度あるいは光質が影響していると考えられ、*phyB* ホモダイマーの関与が疑われる。

この件との関連は不明だが、*PHYA:PHYA* が導入された形質転換 *phyAphyB* 二重変異体は、*phyA* 変異が相補された結果として、*phyB* 単独変異体よりも *phyC* 単独変異体と似た出穂期となった。本研究で用いた人工気象器の長日条件では *phyAphyB* は極早生であり、*phyB* は早生、*phyC* は *phyB* より晩生であることを考えると、*PHYA:PHYA* の効果（晩生に回復する）が予想以上に強く出ている（内生の *PHYA* mRNA より発現が強い）という懸念もある。

しかしながら、形質転換種子の発芽および初期生育は野生型およびフィトクロム変異イネより遅く、成熟イネの出穂期の調査はこの遅延の影響を受けて、対照区より晩生になる傾向があった。また、*phyA* と *phyB* および *phyC* の出穂制御における作用点は異なっている (Osugi ら、2011) ことから、仮に、*phyAphyB* 二重変異体で *PHYA:PHYA* が本来の *PHYA* より強く発現したとしても、*phyBphyC* 二重変異における *phyB* の代用となることは論理的には考えにくい。

以上の考察と、光形態形成能の検定で示された *PHYA:PHYA* による *phyA* 変異の回復というデータを合わせて検討した結果、本研究でクローニングした *PHYA* 発現制御領域は、この後の生理機能解析に用いるに十分なものであると判断した。同様に *PHYB* 発現制御領域と *PHYC* 発現制御領域についても、本来の生理機能を持つものと判断した。

図表

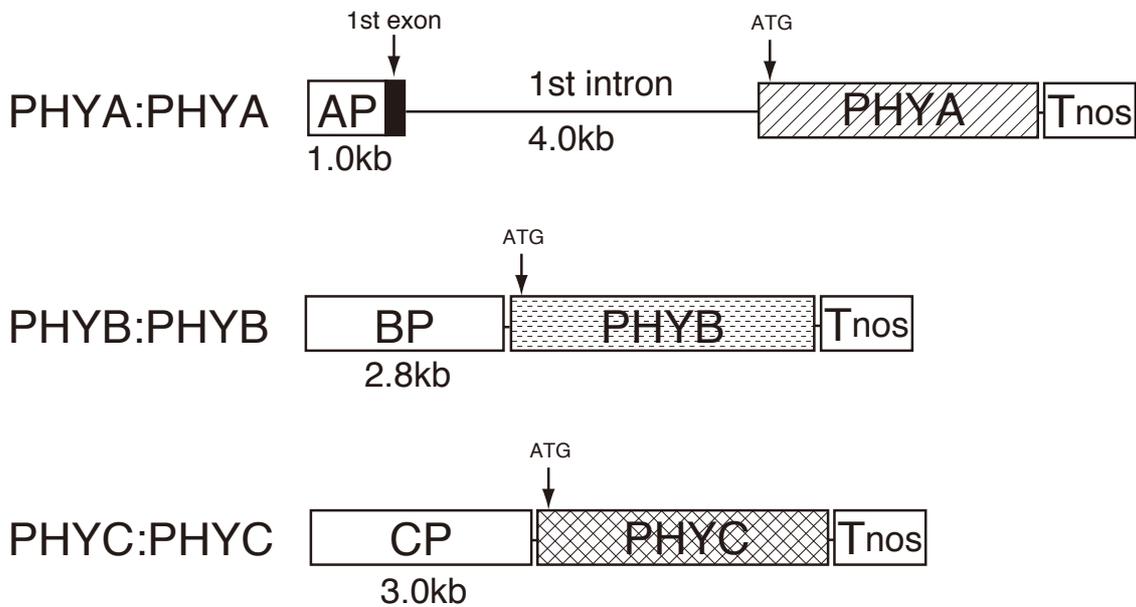
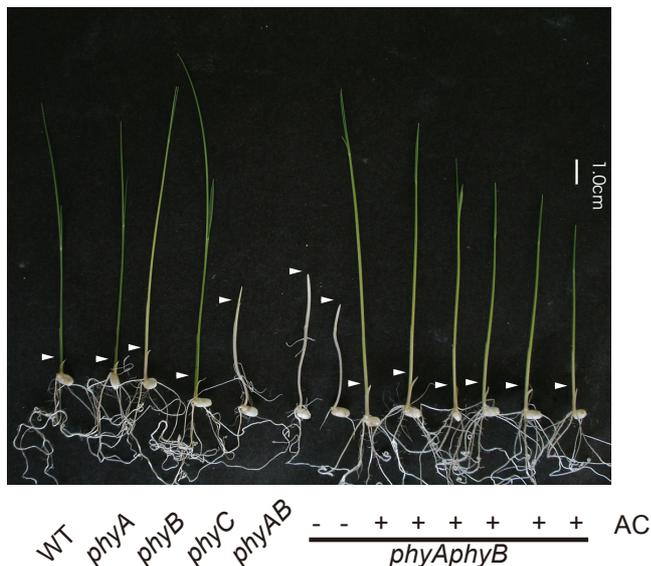
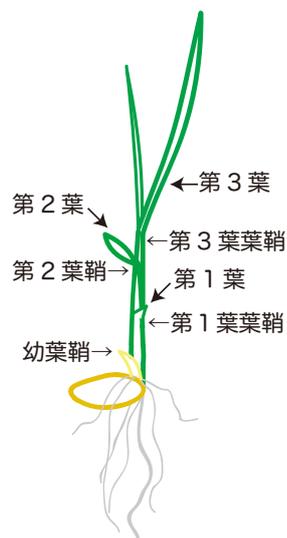


図 1-1. 実験に用いたフィトクロム発現制御領域：cDNA コンストラクトの模式図
AP: 非翻訳領域である第1エクソンと第1イントロンを含むイネ *PHYA* 発現制御領域；BP: イネ *PHYB* 発現制御領域；CP: イネ *PHYC* 発現制御領域；Tnos: アグロバクテリウムのノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター

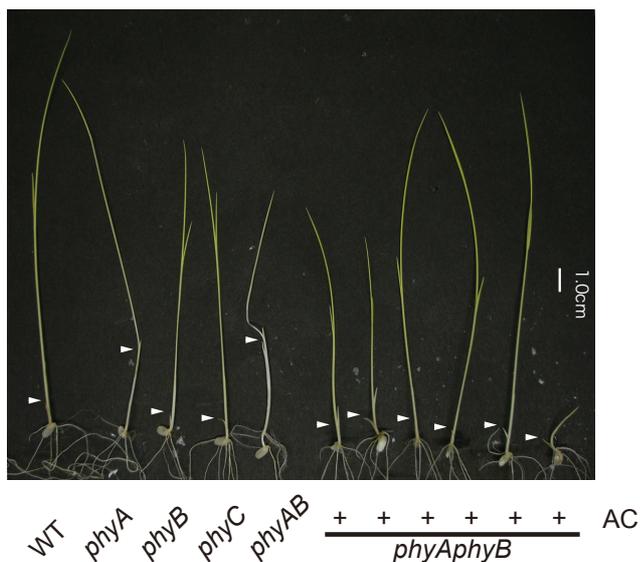
A) cR 9days seedling



C) 明所芽生え



B) cFR 9days seedling



D) 暗所芽生え

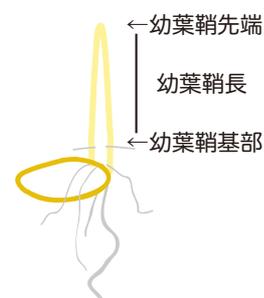
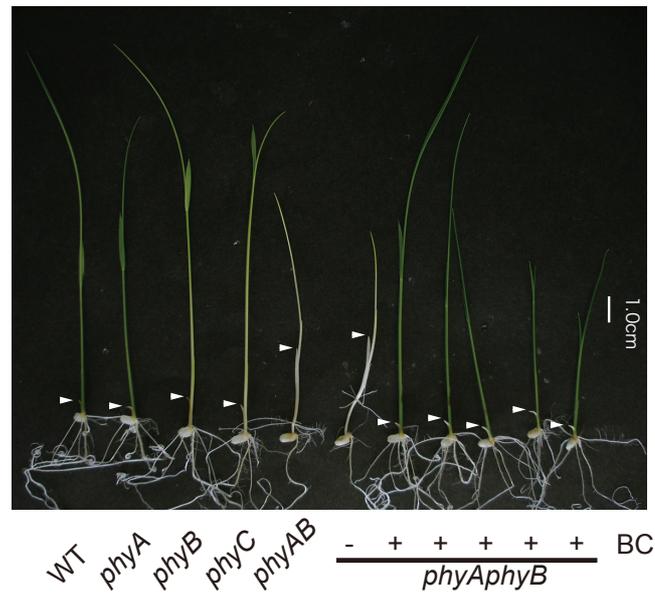


図 1-2. *PHYA:PHYA* 形質転換 *phyAphyB* 二重変異体の光形態形成能

PHYA:PHYA イネと対照区である野生型イネ（日本晴）および各種フィトクロム変異イネを (A) cR（連続赤色光照射）(B) cFR（連続遠赤色光照射）で9日間生育後に、光形態形成能について比較した。形質転換体の写真の下には導入遺伝子（AC）の有無（ある場合に+）とフィトクロム変異の遺伝型を示した。矢尻は幼葉鞘の先端を示す。また、写真観察の参考に (C) 明所芽生え（野生型イネ）における地上部組織の名称と位置 (D) 暗所芽生えにおける幼葉鞘長の範囲 を図示する。

A) cR 9days seedling



B) cFR 9days seedling

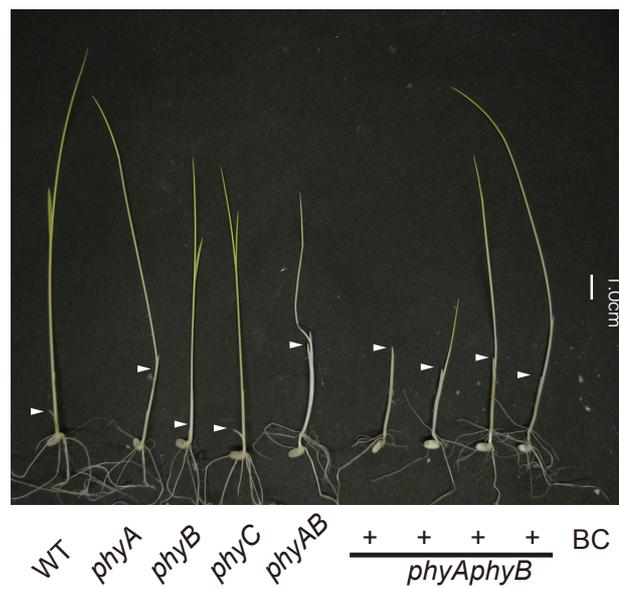
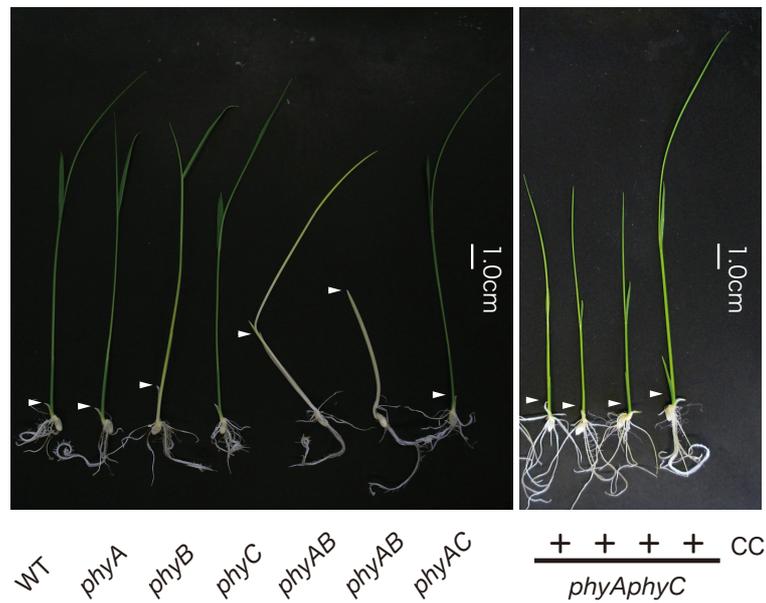


図 1-3. *PHYB:PHYB* 形質転換 *phyAphyB* 二重変異体の光形態形成能
PHYB:PHYB イネと対照区である野生型イネ（日本晴）および各種フィトクロム変異イネを (A) cR（連続赤色光照射）あるいは (B) cFR（連続遠赤色光照射）で9日間生育後に、光形態形成能について比較した。形質転換体の写真の下には、PCRにより確認した、導入遺伝子（BC）の有無（ある場合に+）とフィトクロム変異の遺伝型を示した。矢尻は幼葉鞘の先端を示す。

A) cR 9days seedling



B) cFR 9days seedling

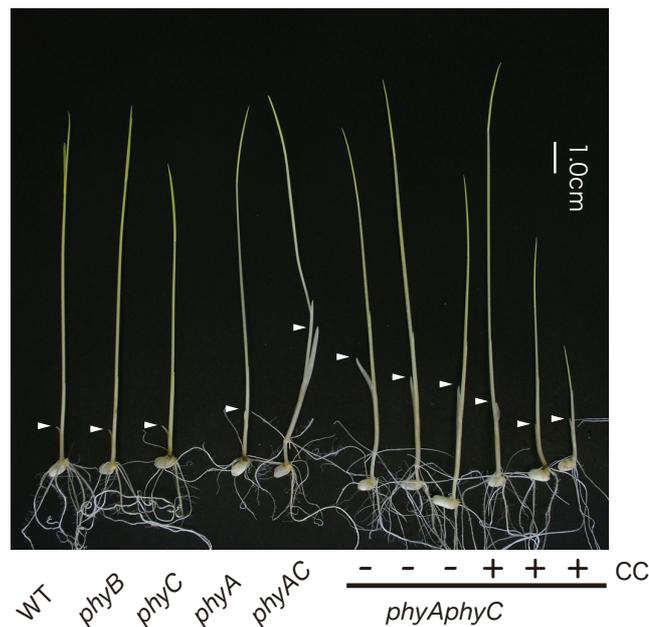
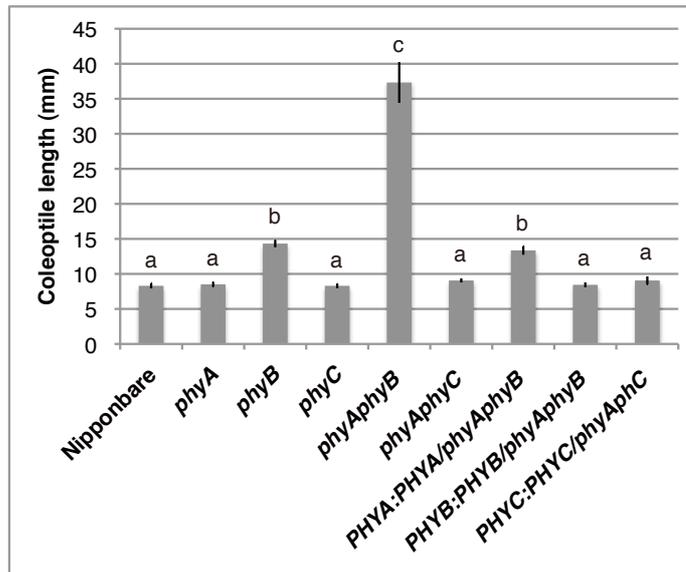


図 1-4. *PHYC:PHYC* 形質転換 *phyAphyC* 二重変異体の光形態形成能
PHYC:PHYC イネと対照区である野生型イネ（日本晴）および各種フィトクロム変異イネを (A) cR（連続赤色光照射）あるいは (B) cFR（連続遠赤色光照射）で9日間生育後に、光形態形成能について比較した。形質転換体の写真の下には、PCRにより確認した、導入遺伝子（CC）の有無（ある場合に+）とフィトクロム変異の遺伝型を示した。矢尻は幼葉鞘の先端を示す。

A) 連続赤色光照射



B) 連続遠赤色光照射

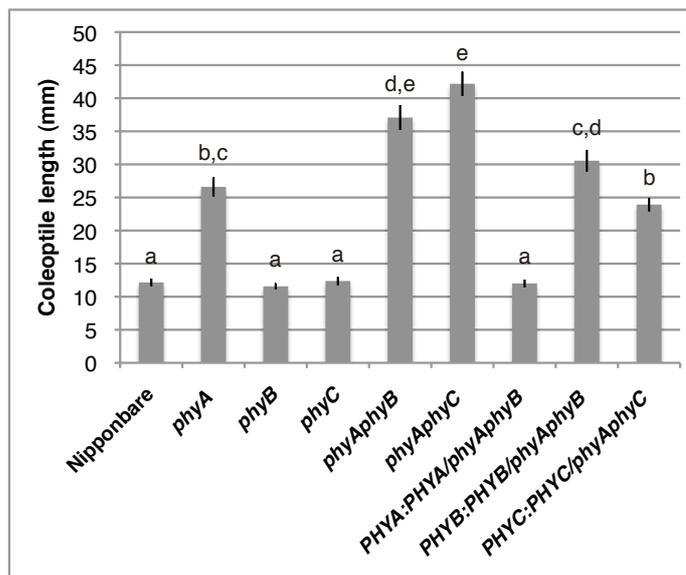


図 1-5. フィトクロム発現制御領域：cDNA による光形態形成能の回復

3種の *PHY*: *PHY* cDNA イネと対照区である野生型イネ（日本晴）および各種フィトクロム変異イネを (A) cR あるいは (B) cFR で 9 日間生育後に、幼葉鞘の長さを測定、光による伸長阻害を光形態形成能の回復として評価した。野生型とフィトクロム変異イネについては 20 個体以上、形質転換イネについては独立した 3 系統から合計 10 個体以上からデータを取り平均値を出した。棒グラフのアルファベットが異なるものは、有意水準 5% の検定で有意差が認められたものである。

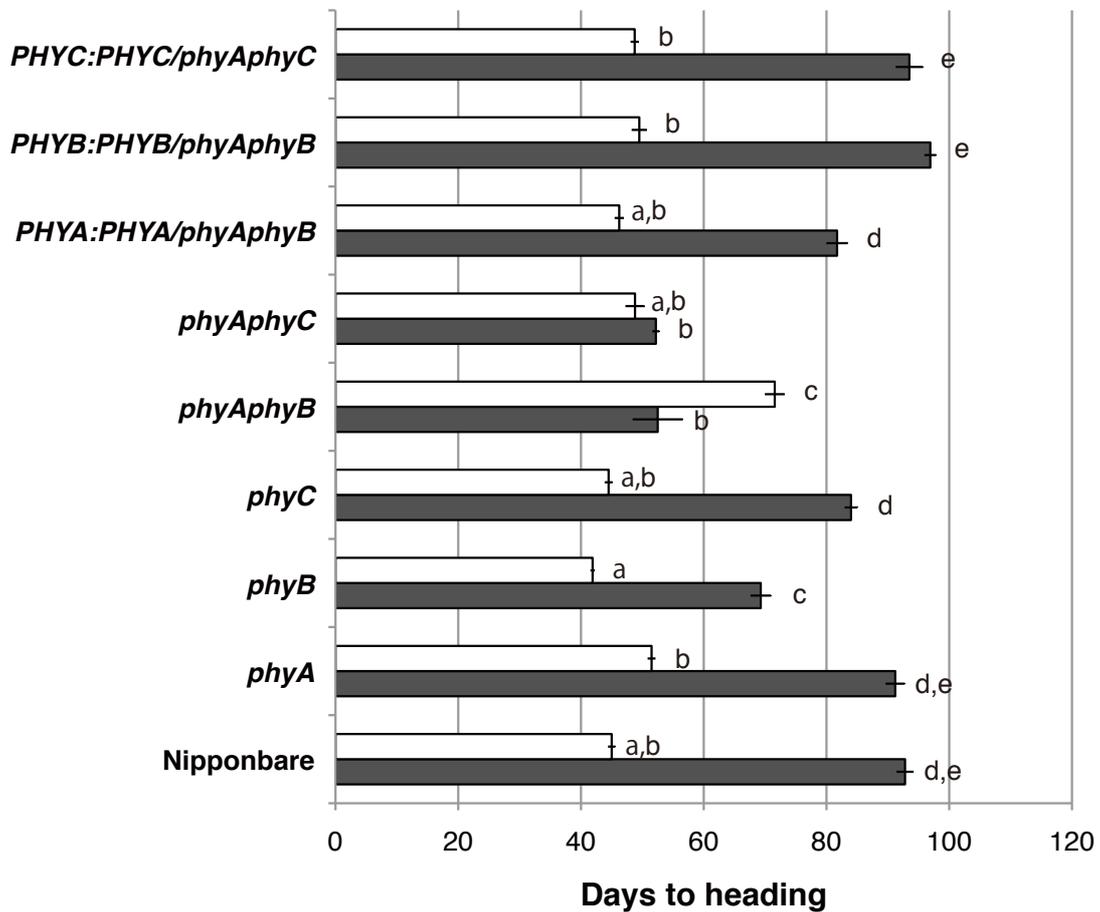


図 1-6. フィトクロム発現制御領域：*PHY* cDNA による出穂制御能の回復
 3種の *PHY:PHY* cDNA イネと対照区である野生型イネ（日本晴）および各種フィトクロム変異イネを、短日条件（10L/14D；白抜き棒グラフ）あるいは長日条件（14L/10D；黒塗り棒グラフ）で生育して、出穂期（開花到達日数）を調べた。野生型とフィトクロム変異イネについては20個体以上、形質転換イネについては独立した3系統から合計10個体以上からデータを取り平均値を出した。棒グラフのアルファベットが異なるものは、有意水準5%の検定で有意差が認められたものである。

第2章 イネ・フィトクロムの発現量と光受容機能との相関

序論

緒論で設定した問いに答えるために、まず、フィトクロム分子種の質の違い、つまり、タンパク質構造の相違に着目した解析を行うことにした。

フィトクロムは比較的大きなタンパク質(単量体分子量約11万の可溶性色素タンパク質)であり、大まかにN-末端側とC-末端側の2つの領域に分けられる。この2つの領域を高次構造の自由度が高いヒンジ領域がつないでいる。フィトクロムは不活性型であるPr型として合成され、赤色光を吸収することにより活性型であるPfr型に変換される。また、Pfr型は遠赤色光を吸収することで不活性化されPr型に戻る。有名な赤/遠赤色光可逆性はフィトクロムのもつこの性質の現れである。また、赤色光と遠赤色光の比率に応じてPfrとPrの間の光平衡が変化し、植物はこの変化を認識して避陰反応を引き起こす。フィトクロムの分光光学的活性はN-末端側が担っており、セリン/スレオニンリッチなNTE (N-terminal extension)、タンパク質相互作用に関与するPAS [Per (period circadian protein), Amt (Ah receptor nuclear translocator protein) and Sim (single-minded protein)], 発色団が結合するGAF (cGMP-stimulated phosphodiesterase, *Anabaena* adenylate cyclases and *Escherichia coli* FhlA)、PHYの4つのドメインからなり、発色団として開環テトラピロールであるフィトクロモビルンがシステイン残基を介して共有結合している。一方、C-末端側は2量体化能と核移行活性をもち、2つのPASドメインとヒスチジンキナーゼ様領域の3つのドメインからなる (Montgomery と Lagarias, 2002 ; Rockwell ら, 2006、Li ら, 2011)。

農業生物資源研究所の生体分子研究ユニット 山崎博士と大阪大学タンパク質研究所 児嶋准教授らとの共同研究より、イネ・フィトクロムのヒンジ領域（N 末側の受光領域と C 末側の 2 量体形成および核移行能領域に挟まれた部分）に phyA と phyB の 2 量体形成能の違いに寄与する配列があることが明らかとなった（巻末付録 4）。共同研究者らの解析結果から、phyB のヒンジ領域（647 から 782 アミノ酸残基）のペプチド断片に対して、1) 663 のアルギニン を phyA 型のセリンに置換 (R663S)、あるいは、2) 663 のアルギニンを電荷が逆転するようにグルタミン酸に置換(R663E)、3)として 2)に加えて 653 のアルギニンも電荷が逆転するようにグルタミン酸に置換(R653E) した場合に、このペプチドのダイマー形成能が著しく低下してモノマーとなることが分かった。これらのアミノ酸置換によって、N 末側受光領域の自由度が上がり、受光特性が phyA に類似する可能性が考えられた。

この結果を応用すれば、phyA と phyB の光受容機能の相違に 1) 質：タンパク質構造の相違が関与している可能性について 1 つの答えを出すことができるかもしれない。そこで、第 1 章で作製した *PHYB:PHYB* コンストラクトにこれらのアミノ酸置換変異を導入、*phyAphyB* 2 重変異背景イネを形質転換して、その機能を評価した。

さらに、phyA と phyB の光受容機能の相違に 2) 量：遺伝子発現パターンの相違が関与している可能性について検討するために、第 1 章で作製した *PHYA:PHYA* および *PHYB:PHYB* の発現制御領域を交換した *PHYA:PHYB* と *PHYB:PHYA* を作製、*phyAphyB* 2 重変異背景イネを形質転換して、その機能を評価した。*PHYA* 発現制御領域および *PHYB* 発現制御領域については、双子葉植物における組織特異性の解析からは、どちらも全体的に強く発現する組織特異性のない発現制御領域であることが報告されており (Goosey ら、1997 ; Somers と Quai、1995)、光応答性以外の違いはないものと想定され

た。しかしながら、単子葉植物におけるトランジェントアッセイ実験の結果からこれら 2 種類の発現制御領域は光応答性に関して差があることが知られており (Christensen と Quail, 1989 ; Kay ら, 1989a ; Kay ら, 1989b ; Lissemore ら, 1987 ; Lissemore と Quail, 1988 ; Sato, 1988 ; Sharrock と Quail, 1989 ; Tomizawa ら, 1986)、その光応答性が *PHYA* および *phyA* の特徴の 1 つと考えられていたので、変異型 *phyB* に *phyA* 類似の機能が付加された場合、*PHYA* 発現制御領域下流にこれを配することにより、*phyA* 類似の表現型を示すことが期待された。

材料と方法

1. 植物材料と生育条件

1.1 植物材料

イネ (*Oryza sativa*. L) の以下の系統を実験に用いた

非遺伝子組み換えイネ

栽培品種 日本晴

phyA 変異体 *phyA-4* (Takano ら、2001; 無発現変異、日本晴背景)

phyB 変異体 *phyB-1* (Takano ら、2005; 無発現変異、日本晴背景)

phyAphyB 変異体 *phyA-4/phyB-1* (Takano ら、2005; 日本晴背景)

遺伝子組み換えイネ (図 2-1 および 2-6)

PHYB promoter :: mutant *PHYB* cDNA (*PHYB:PHYB*(S), *PHYB:PHYB*(E), *PHYB:PHYB*(2E))

発現体 (背景 : *phyA-4/phyB-1*)

本研究で作製した系統。外来 DNA 断片 *PHYB* promoter :: mutant *PHYB* cDNA (日本晴由来)およびハイグロマイシン耐性遺伝子が挿入されている。アグロバクテリウム法によって DNA 断片を導入した形質転換当代 (T₀) から 1 世代後の T₁あるいは 2 世代後の T₂ 世代を使用した。外来遺伝子の作製法については第 2 項に詳細を記載した。

PHYB promoter :: *PHYB* cDNA (*PHYB:PHYB*)発現体 (背景 : *phyB-1*, *phyA-4/phyB-1*)

本研究第1章で作製した系統。第2章では *phyB* タンパク質の発現が低くサイレンシング系統と考えられた2系統 (No. 7 と No. 72) を用いた。

PHYB promoter :: *PHYA* cDNA (*PHYB:PHYA*)発現体 (背景 : *phyA-4, phyA-4/phyB-1*)

本研究で作製した系統。外来 DNA 断片 *PHYB* promoter :: *PHYA* cDNA (日本晴由来)およびハイグロマイシン耐性遺伝子が挿入されている。アグロバクテリウム法によって DNA 断片を導入した形質転換当代 (T_0) から1世代後の T_1 あるいは2世代後の T_2 世代を使用した。外来遺伝子の作製法については第2項に詳細を記載した。

PHYA promoter :: *PHYB* cDNA (*PHYA:PHYB*)発現体 (背景 : *phyA-4/phyB-1*)

本研究で作製した系統。外来 DNA 断片 *PHYA* promoter :: *PHYB* cDNA (日本晴由来)およびハイグロマイシン耐性遺伝子が挿入されている。アグロバクテリウム法によって DNA 断片を導入した形質転換当代 (T_0) から1世代後の T_1 あるいは2世代後の T_2 世代を使用した。外来遺伝子の作製法については第2項に詳細を記載した。

1.2 生育条件

第1章 「材料と方法」の 1.2 生育条件と同様。

2. 形質転換ベクターの構築とイネの形質転換

PHYB promoter :: 変異型 *PHYB* cDNA (*PHYB:mPHYB*)は第1章で作製した

PHYB:PHYB (図 1-1) に、大阪大学 児嶋准教授より分与して頂いた3種類の変異型

PHYB 部分塩基配列を *PHYB* cDNA 内部の制限酵素認識配列 (*BlpI*) を利用して組み入

れることにより作製した。

分与された変異型 *PHYB* 部分塩基配列は 3 種類で、pDEST32 ベクター上にサブクローニングされた *PHYB* 647-782bp 部分塩基配列に対して(1) R663S 置換(2) R663E 置換(3) R653E 置換と R663E 置換 と 3 種類のアミノ酸変異を導入したものであった。これらを *PHYB:PHYB* の *BlpI* サイトに組み入れた後にシーケンスにより確認、順に、R663S 置換を持つ *PHYB:PHYB* を *PHYB:PHYB* (S)、R663E 置換のものを *PHYB:PHYB* (E)、R653E と R663E 置換を 2 つ持つものを *PHYB:PHYB* (2E) と名付けた (図 2-1)。

発現制御領域のスワップ実験に用いたコンストラクトは、第 1 章で作製した *PHYA:PHYA* および *PHYB:PHYB* (図 1-1) の フィトクロム cDNA 配列内 N 末端近傍に存在している制限酵素認識配列を利用して、*PHYA* cDNA と *PHYB* cDNA とをスワップすることで作製した。具体的な制限酵素認識配列は、*PHYA* cDNA は *Bst1107I* (平滑末端)、*PHYB* cDNA は *BspEI* (粘着末端→平滑化) を用いた。この結果として、作製した *PHYA promoter :: PHYB cDNA(PHYA:PHYB)* の phyB タンパク質 N 末端側には phyA N 末端ペプチド 20 アミノ酸残基が融合、*PHYB promoter :: PHYA (PHYB:PHYA)* の phyA タンパク質 N 末端側には phyB N 末端ペプチド 34 アミノ酸残基が融合した形となった (図 2-6)。

上記のコンストラクト合計 5 種類をそれぞれ、*SbfI* サイトと *AscI* サイトを用いて pMCS5 ベクターから切り出し pSMAH バイナリーベクター (生物研 市川博士より分与) に挿入した。完成したバイナリーベクターをエレクトロポレーション法 (MicroPulser electroporator; Bio-Rad) を用いて *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 に導入、このアグロバクテリウムをイネの形質転換に用いた。

3. 光形態形成能（幼葉鞘の伸長）の評価

第1章 「材料と方法」の 4. 光形態形成能の評価と同様。

4. 出穂期（開花到達日数）の評価

第1章 「材料と方法」の 5. 出穂期の評価と同様。

5. ウェスタンブロッティング

5.1 植物サンプルの採取

連続赤色光下で生育したイネ1個体からサンプリング時の最上位展開葉を採取した。

9日間生育した幼苗の場合、最上位展開葉は、通常、第4葉であった。

5.2 タンパク質抽出

液体窒素中で破碎したイネのサンプルに変性タンパク質抽出バッファー（100mM Tris-HCl pH8.0, 20mM EDTA pH8.0, 0.2% 2'-メルカプトエタノール, プロテアーゼ阻害剤 complete mini EDTA-free (Roche)）を加えて懸濁後、遠心分離(15,000rpm, 20min, 4°C)を行い、上清に40%飽和硫酸アンモニウムを加えて1時間氷上で静置し、タンパク質を沈殿させた。遠心分離(15,000rpm, 20min, 4°C)を行い、ペレットを変性タンパク質抽出バ

ッファーに再懸濁したものをタンパク質抽出液とした。Bradford 法に準じたタンパク質定量染色液 (Coomassie Plus; Pierce) を用いて抽出液のタンパク質濃度を測定した。

5.3 ウェスタンブロットティング

SDS サンプルバッファーを加えて変性させた 5 μ g のタンパク質抽出液を SDS-PAGE によって分離した。セミドライ式電気トランスファー法によって、アクリルアミドゲルから PDVF メンブレン (Millipore) にタンパク質を転写した。タンパク質の転写されたメンブレンを 5% スキムミルク/TBS-T(100mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl、0.1% Tween20) に浸して 4 $^{\circ}$ C で一晩静置した。TBS-T でメンブレンを洗浄した後に、抗 phyB 抗体を含む一次抗体反応液に浸して室温で 60 分間振とうした。TBS-T でメンブレンを洗浄した後に、アルカリホスファターゼ標識の抗ラビット IgG 抗体を含む二次抗体反応液に浸して室温で 60 分間振とうした。TBS-T でメンブレンを洗浄した後に、発色基質 BCIP/NBT を加えてシグナルを検出した。

結果

1. cR での光形態形成において *PHYB*:変異型 *PHYB* の中に変異型 *phyB* が *phyA* のように機能する個体が現れた

形質転換実験に用いた導入遺伝子については、図 2-1 に模式図を示した。これ以降、
1) 663 番目のアルギニンが *phyA* 型のセリンに変換 (R663S) した変異型 *PHYB* コンストラクトとこれを導入したイネを *PHYB:PHYB(S)* 2) 663 番目のアルギニンを電荷が逆転するようにグルタミン酸に変換(R663E)した変異型 *PHYB* コンストラクトとこれを導入したイネを *PHYB:PHYB (E)* 3) 2) に加えて 653 番目のアルギニンも電荷が逆転するようにグルタミン酸に変換(R653E)した変異型 *PHYB* コンストラクトとこれを導入したイネを *PHYB:PHYB (2E)*と表記する。

これらを、*phyAphyB* 2 重変異イネに導入して形質転換イネを作製し、幼苗を用いて第 1 章同様に、連続赤色光(cR)あるいは遠赤色光照射(cFR)下における光形態形成でその生理機能を評価したところ、cR においてのみ、変異型 *phyB* が *phyA* として機能する可能性が示唆された。具体的には、cR で生育した *PHYB:PHYB(S)*系統と *PHYB:PHYB(2E)*系統の中に、*phyAphyB* 2 重変異体に変異型 *PHYB* 遺伝子の導入されていることが PCR で確認されているにもかかわらず、幼葉鞘の長さが *phyA* ではなく *phyB* の表現型を示す(すなわち、変異型 *phyB* が *phyA* の機能を獲得したかのように見える) 個体が出現した(図 2-2 ; 赤い破線で囲んだものが *phyB* の表現型を示したもの)。

しかしながら、この現象は形質転換系統の一部でのみ観察されることと、
*PHYB:PHYB(S)*系統と *PHYB:PHYB(2E)*系統の中に出現するにも関わらず *PHYB:PHYB*

(E)系統では観察されなかったことから、単純に導入したアミノ酸変異によって変異型 phyB が phyA として機能したとは考えにくかった。

2. 変異型 phyB が phyA の様に機能する個体においては、phyB タンパク質の発現量が低かった

同じ形質転換系統内で表現型に差が出る原因として、エピジェネティック変異などにより導入遺伝子の発現が安定していない可能性が考えられたので、図 2-2 の *PHYB:PHYB(S)* 系統と *PHYB:PHYB(2E)* 系統について、導入した phyB タンパク質の発現量をウエスタン解析で確認した。その結果、導入遺伝子により回復した表現型 (*phyA*=WT 型あるいは *phyB* 型) と phyB タンパク質の発現量との間に相関関係が見られた (図 2-3)。図 2-3 は図 2-2 で示した幼苗について、タンパク質を抽出して抗 phyB 抗体によるウエスタン解析を行った結果で、*phyAphyB* 背景に *PHYB*:変異型 *PHYB* を導入したにもかかわらず *phyB* の表現型を示した個体 (変異型 phyB が phyA として機能したかのように見える個体) では、導入された変異型 phyB の発現量が他の個体 (変異型 phyB が *phyB* 変異を相補した個体) に比べて、極端に少なかった。

これらの結果から、変異型 phyB が phyA の様に機能するという現象が、導入したアミノ酸置換=「質」の変化ではなく、発現タンパク質の「量」を原因として起きている、という仮説を持つに至った。

3. *PHYB*:野生型 *PHYB* のサイレンシング系統も cR での光形態形成において phyB が *phyA* 変異を相補したかのような表現型を示した

先の結果から生じた仮説を検証するために、第1章で作製した野生型 *PHYB* 遺伝子を *phyAphyB* 2重変異体に導入したイネの30系統の中から、*phyB* タンパク質の発現が著しく低くなったもの（サイレンシング系統 2系統）を選出して、**cR** での光形態形成を観察した。その結果、変異型 *phyB* 導入の一部の個体同様に、*PHYB:PHYB* 遺伝子が導入されていることが確認されたにも関わらず、*phyB* の回復によって予想される *phyA* 単独変異の表現型ではなく、*phyB* 単独変異の表現型を示した（図 2-4）。このことは、*PHYB:PHYB* により発現した *phyB* タンパク質の量が少なかったために、*phyAphyB* 2重変異の *phyB* 変異分を相補することはできなかったが、その代わりに、*phyAphyB* 2重変異の *phyA* 変異分を相補した結果として、*phyB* 単独変異の表現型を示したと考えられる。

この現象をより明確に把握するために、幼葉鞘の伸長を測定することにより *phyB* 変異の表現型を定量化した（図 2-5）。変異型 *phyB* 導入系統の中で、導入遺伝子の発現が内在性の *phyB* と同等レベルだったもの（*PHYB:PHYB(S)a/ab* あるいは *PHYB:PHYB(2E)a/ab* と表記）では、幼葉鞘の長さについても *phyA* 単独変異体、あるいは、*PHYB:PHYB* 導入により相補された系統(*PHYB:PHYB/ab*)と同じ長さで、*phyB* 変異が相補されたことが確認できたが、導入遺伝子の発現が非常に少なかったもの

（*PHYB:PHYB(S)b/ab* あるいは *PHYB:PHYB(2E)b/ab* と表記）では、*phyB* 単独変異体と同様に長い幼葉鞘を持つことが分かり、*phyA* 変異分しか相補できていないことが確認された（図 2-5-A）。

このことは、*PHYB*: 野生型 *PHYB* 導入系統のサイレンシング系統についても同様で、サイレンシング系統（*PHYB:PHYB_7/phyAphyB* あるいは *PHYB:PHYB_72/phyAphyB*）の幼葉鞘は、ちょうど *phyB* 単独変異体と同じ長さとなっていることが確認できた（図

2-5-B)。

以上の結果より、*phyB* 分子のアミノ酸変異ではなく、*phyB* タンパク質の存在量の低下が、赤色光受容において *phyB* が *phyA* として機能したように見えた (*phyAphyB* 2重変異体の表現型が *phyA* ではなく *phyB* になった) 原因であることが推察された。

4. cR での幼葉鞘の伸長抑制において *PHYA:PHYB* は *phyB* 変異を相補するが、

PHYB:PHYA は *phyA* 変異を相補できない

前節までの結果は、赤色光受容における *phyA* と *phyB* の生理機能の違いは分子構造の違いよりも発現量の違いに起因する可能性を示唆するものであった。フィトクロムの発現量に生物学的意義があるのならば、*PHYA* と *PHYB* の発現制御領域を入れ替えたなら何が起こるだろうか？

この疑問に答えるために、*PHYA* 発現制御領域に *PHYB* 遺伝子及び *PHYB* 発現制御領域に *PHYA* 遺伝子をつないだ発現制御領域のスワップコンストラクトを作製し (図 2-6)、フィトクロム欠損変異イネに導入した。これ以降、*PHYA* 発現制御領域に *PHYB* cDNA をつないだコンストラクトとこれを導入したイネを *PHYA:PHYB*、*PHYB* 発現制御領域に *PHYA* cDNA をつないだコンストラクトとこれを導入したイネを *PHYB:PHYA* と表記する。*PHYA:PHYB* については *phyAphyB* 2重変異体に導入した形質転換系統のみを解析に用いたが、*PHYB:PHYA* については *phyAphyB* 2重変異体以外にも、*phyA* および *phyB* 単独変異体に導入した系統も解析した。

それぞれの形質転換イネの後代 (T1) について、cR での光形態形成能の回復の有無を観察した (図 2-7)。*PHYA:PHYB* を導入した *phyAphyB* 2重変異イネは導入遺伝子依存

的に *phyA* 単独変異体の表現型に回復し、*PHYA:PHYB* が *phyB* として十分に機能することが示唆された (図 2-7-B)。一方、*PHYB:PHYA* イネは、その遺伝的背景が *phyAphyB* 2重変異、*phyA* 単独変異、*phyB* 単独変異のいずれの場合でも、フィトクロム変異を相補できなかった (図 2-7-C)。

この結果を、幼葉鞘の伸長抑制で評価してグラフ化すると図 2-9-A のようになる。*PHYA:PHYB* を導入した *phyAphyB* 2重変異イネは *phyB* 変異を相補して、*phyA* 単独変異体や野生型と同様に短い幼葉鞘を持つが、*PHYB:PHYA* イネでは相補は見られず、導入した遺伝的背景のままに幼葉鞘が伸長した。

5. cFR での幼葉鞘の伸長抑制においても *PHYA:PHYB* は *phyB* 変異を相補するが、

PHYB:PHYA は *phyA* 変異を相補できない

PHYA:PHYB および *PHYB:PHYA* について、それぞれの形質転換イネの後代 (T1) の cFR での光形態形成能の回復に関しても解析した (図 2-8)。結果は、*PHYA:PHYB* を導入した *phyAphyB* 2重変異イネが、導入遺伝子依存的に *phyA* 単独変異体の表現型に回復して、*PHYA:PHYB* が *phyB* として十分に機能することを示した (図 2-8-B) 一方で、*PHYB:PHYA* イネは、*phyA* 変異を相補できなかった (図 2-8-C)。

この結果を、幼葉鞘の伸長抑制で評価してグラフ化すると図 2-9-B のようになる。*PHYA:PHYB* を導入した *phyAphyB* 2重変異イネは、導入遺伝子依存的に *phyA* 単独変異体の形態に回復し、2重変異体より短い幼葉鞘となったが、*PHYB:PHYA* イネは *phyA* 変異を相補することはなく、*PHYB:PHYA* は *phyA* として機能できないことが示された。

6. 出穂期の制御においては *PHYB:PHYA* は *phyA* 変異を一部相補する

成熟したイネの光受容について、発現制御領域のスワップが与える影響について検討するため、長日条件（14 時間日長）と短日条件（10 時間日長）とにおける出穂期（開花期）の早晚性について、発現制御領域のスワップ形質転換イネ（ T_1 ）と野生型イネ（WT: 日本晴）および各種フィトクロム変異体（*phyA*, *phyB*, *phyAphyB*）、そして形質転換体のポジティブコントロールとして *PHYA:PHYA/phyAphyB*、*PHYB:PHYB/phyAphyB* の T_1 とを比較した（図 2-10-A：長日条件；図 2-10-B：短日条件）。

長日条件での開花制御能の回復（図 2-10-A）は幼苗期における光形態形成能の回復と同じ結果で、*PHYA:PHYB* を導入した *phyAphyB* 2 重変異イネは、導入遺伝子依存的に *phyAphyB* 2 重変異による早生の表現型を回復して *phyA* 単独変異体と同等の出穂期まで遅延した。この効果は、*PHYB:PHYB* を導入した場合とほとんど等価であり、*PHYA:PHYB* は *phyB* として十分な機能を持つことが示された。一方、*PHYB:PHYA/phyAphyB* イネは導入遺伝子非依存的に *phyAphyB* 2 重変異と同じ早生の表現型を示し、*PHYA:PHYA/phyAphyB* イネにおける導入遺伝子のない分離集団 *PHYA:PHYA(-)/phyAphyB* と同等であった。このことから、長日条件での開花制御において *PHYB:PHYA* は *phyA* として機能できないことが示された（図 2-10-A）。

短日条件での開花制御能の回復（図 2-10-B）については、*PHYA:PHYB/phyAphyB* は予想通り、*phyAphyB* 2 重変異による晩生の表現型を回復して *phyA* 単独変異体と同等にまで出穂期が早まった。このことから、長日条件同様に、短日条件においても *PHYA:PHYB* は *phyB* として十分な機能を持つことが示された。予想外であったのは、*PHYB:PHYA/phyAphyB* イネで、*phyAphyB* 2 重変異の晩生を一部回復して出穂期を早め

ることができた。*PHYA:PHYA/phyAphyB* イネや *PHYA:PHYA(-)/phyAphyB* イネの出穂期と比較すると、*PHYB:PHYA/phyAphyB* イネの出穂期はちょうど両者の中間であった (図 2-10-B)。

考察

1. 低発現量の phyB は phyA の赤色光受容機能を模倣する

イネの *phyB* 単独変異体の種子を cR で発芽・生育すると、暗所芽生えとこれに類似した *phyAphyB* 2 重変異体や、野生型とこれに類似した *phyA* あるいは *phyC* 単独変異体とは、明らかに異なる特徴的な形態を示す。最も顕著な特徴は葉緑体の発育不全に起因する薄緑色の地上部で、次に全ての葉鞘が伸長することによる徒長した形態が挙げられる (Takano ら、2005)。このことから、第 1 章においても *phyAphyB* 2 重変異体にフィトクロム発現制御領域：cDNA を導入した時の形態が *phyB* 単独変異に回復すれば導入遺伝子は *phyA* として機能、*phyA* 単独変異に回復すれば導入遺伝子は *phyB* として機能していると評価した。

この評価方法に則れば、本章の結果で *PHYB*:変異型 *PHYB* を導入した *phyAphyB* 2 重変異体の *phyB* 単独変異に回復する個体が出現したということは、変異型 *phyB* が *phyA* として機能したということになる (図 2-2)。現在までに、主にシロイヌナズナを用いて、数多くのアミノ酸置換変異 *phyA* および *phyB* が単離されているが、そのほとんどが機能喪失変異あるいはサイレント変異であり (Fry ら、2002 ; Quail ら、1995 ; Rockwell ら、2006 ; Xu ら、1995)、機能獲得変異として報告されているのは数例のみである (Dieterle

ら、2005 ; Su ら、2007 ; Weller ら、2004)。このような背景から、アミノ酸置換によって *phyB* に *phyA* 的な性質を付加できるかもしれないという期待はあったが、1 あるいは 2 アミノ酸置換のみで変異型 *phyB* が完全に *phyA* を模倣することは予想していなかった。しかしながら、同一形質転換系統内で表現型が分離することから、アミノ酸置換の効果よりも、エピジェネティックな変異により発現量に異常が生じている可能性を疑い、表現型と変異型 *phyB* の発現量との関連をウェスタンブロットで解析した(図 2-3)。

その結果、変異型 *phyB* が *phyA* として機能しているかのように見える個体では、他の正常なものに比べ、*phyB* の発現量が極端に低いことが判明した。そこで、第 1 章で作製した *PHYB:PHYB* イネの中からサイレンシング系統を選出して *cR* での幼葉鞘の伸長抑制を定量した結果 (図 2-5)、*PHYB:PHYB* のサイレンシング系統と変異型 *phyB* が *phyA* 変異を相補している個体、*phyB* 単独変異体との間に差はなく、全く同じ表現型と考えられた。これらの結果は、イネ *phyA* に特徴的な光形態形成反応における赤色光受容は、低発現量のイネ *phyB* によって模倣されることを示しており、光による幼葉鞘の伸長抑制はフィトクロムタンパク質の構造ではなく発現量によってコントロールされていることを示唆している。

2. ヒンジ領域でのアミノ酸置換が *phyB* タンパク質の安定性に影響する可能性について

本研究で作製した形質転換イネで変異型 *phyB* が低発現量になる原因としては、1) 形質転換イネにおける *PHYB*:変異 *PHYB* 遺伝子のジーンサイレンシング あるいは 2) 導入したアミノ酸置換による *phyB* タンパク質の不安定化 の 2 つの可能性が考えられ

る。1)の場合、転写型サイレンシングと転写後サイレンシングの2種が考えられるが、光形態形成のような全身的な表現型が出ていること、導入遺伝子に RNAi を誘導する配列は含まれていないことなどから、転写型サイレンシングの可能性が高いと考えている。転写型サイレンシングであるならば、変異型 *phyB* が低発現量であった個体の後代に対して、表現型の分離の有無や変異型 *PHYB* mRNA の発現量などを解析することから、結論を得ることができると考える。

もう1つの可能性2)についてだが、先行研究の中にこの仮説を支持するような報告がいくつかある。*phyA* タンパク質は赤色光受容により Pfr 型となると、ユビキチン化と 26S プロテアソームによる分解を受ける(Clough と Vierstra, 1997; Hennig ら, 1999)。このユビキチン化には Cullin-RING 型 E3 ユビキチンリガーゼが関与しており(Debrieux ら, 2013 ; Quint ら, 2005)、CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 (COP1) E3 ユビキチンリガーゼの関与が指摘されている(Debrieux ら, 2013 ; Seo ら, 2004)。*phyA* のヒンジ領域はこのユビキチン化の標的となっている(Shanklin ら, 1989)ことから、*phyA* の安定性に影響していると考えられる。また、エンバクの *phyA* のヒンジ領域には Pfr 型の時に特異的にリン酸化されるセリン残基(Ser-598)があり(Lapko ら, 1996 ; Lapko ら, 1997 ; Lapko ら, 1999 ; McMichael と Lagarias, 1990)、アラニンに置換してリン酸化されないようにしたエンバクの *phyA* は形質転換シロイヌナズナにおいて光過敏性の表現型を示す(Kim ら, 2004)。当初の期待通りに本研究のアミノ酸置換が *phyB* のヒンジ領域を *phyA* のような自由度の高い状態に変えるものならば、この領域のユビキチン化やリン酸化が促進されて変異型 *phyB* タンパク質が不安定化する可能性がある。1)、2)の何れにしても、今後、さらなる解析が必要である。

3. 発現制御領域を交換した *PHYA:PHYB* と *PHYB:PHYA* の対照的な結果について

本章における、低発現量の *phyB* が *phyA* による赤色光受容の生理機能を模倣するという結果は、イネの赤色光受容における *phyA* と *phyB* の機能分担にはフィトクロムタンパク質の発現量が重要であることを示唆していた。そうであるならば、*PHYA* 発現制御領域下流に *PHYB* を配した遺伝子は *phyA* 変異を相補する可能性がある。そう期待して、*PHYA* と *PHYB* の発現制御領域を交換するプロモータースワップ実験を行った。

結果は期待と全く異なり、*PHYA:PHYB* は、光形態形成においても出穂期制御においても、*PHYB:PHYB* と全く同様に、*phyB* として機能した (図 2-7, -8, -9, -10)。一方、*PHYB:PHYA* は光形態形成については機能を全くもたず、出穂期制御においても、長日条件では機能を持たず、短日条件でのみ *phyAphyB* 2 重変異の晩生を一部回復して出穂期を早めたに過ぎなかった (図 2-7, -8, -9, -10)。

この2つのコンストラクトとその結果の意味するところは何であろう? *PHYA:PHYB* が *PHYB:PHYB* と同じ機能を果たしたことから、*PHYA* 発現制御領域と *PHYB* 発現制御領域の発現特性に違いはない、と仮定できる (仮説 1)。実際に、シロイヌナズナやタバコなどの双子葉植物を用いたプロモーター:*GUS* 研究から、*PHYA* の発現制御領域と *PHYB* の発現制御領域の発現パターンが似ていることが報告されている (Adam ら、1994 ; Adam ら、1996 ; Goosey ら、1997 ; Komeda ら、1991 ; Somers と Quail、1995)。さらに前節の低発現量の *phyB* が *phyA* による赤色光受容の生理機能を模倣するという結果と合わせて考えると、*PHYA:PHYB* において *PHYB* が *phyB* として機能しているということは、*PHYA* 発現制御領域からの発現量は決して少なくないこと、第 1 章において *PHYA:PHYA* が *phyA* としての機能を持つのは、*PHYA* 発現制御領域の発現特性に加

えて phyA の光に対して不安定なタンパク質特性の影響が大きいことが推測された。

一方、*PHYB:PHYA* が殆ど機能しなかったことから、phyA が機能するためには *PHYA* 発現制御領域の発現特性が必須であり、これが *PHYB* 発現制御領域とは異なる、という 1 と全く逆の仮説が提示される（仮説 2）。

仮説 1 と 2 の矛盾に対して何らかの解答を得ることを目的として、第 1 章でクローニングしたフィトクロム発現制御領域について、レポーター遺伝子として β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を用いてその発現特性を解析したので、次章ではこれについて述べることにする。

図表

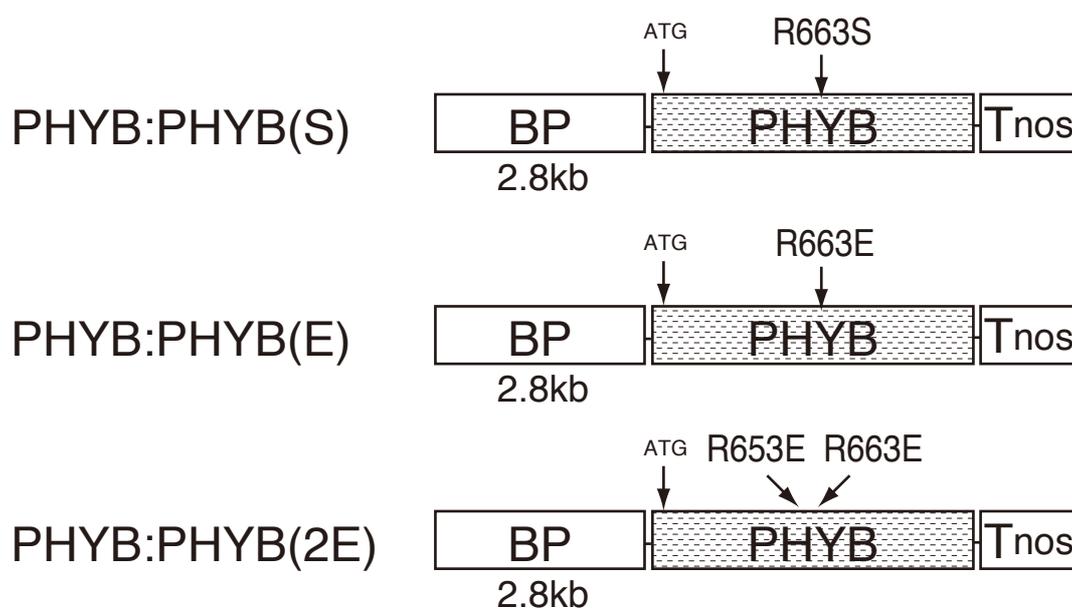
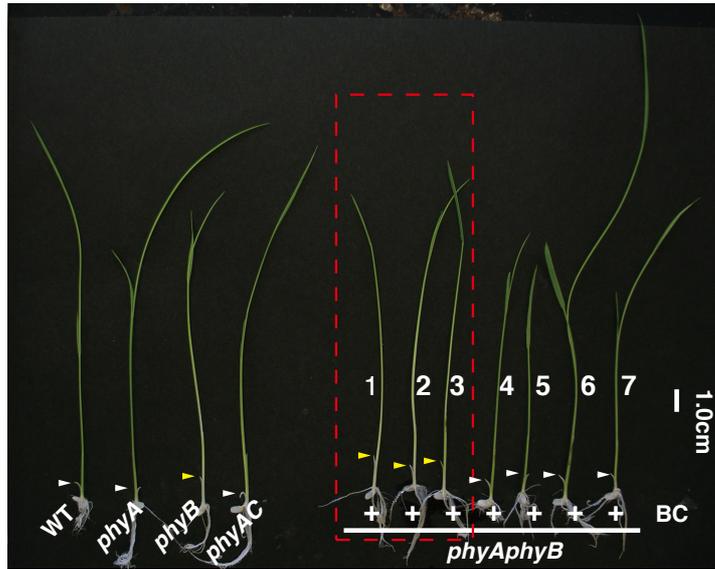


図 2-1. 実験に用いた *PHYB* : 変異型 *PHYB* コンストラクトの模式図

図 1-1 の *PHYB:PHYB* の *PHYB* cDNA 部分に大阪大学児嶋准教授より分与して頂いた 3 種類の変異型 *PHYB* の部分塩基配列 (408bp: ヒンジ領域をカバーする) を *PHYB* cDNA 内部の制限酵素認識配列 (*Bsp*I) を利用して組み入れた。R663S 置換を持つ *PHYB:PHYB* を *PHYB:PHYB* (S)、R663E 置換のものを *PHYB:PHYB* (E)、R653E と R663E 置換を 2 つ持つものを *PHYB:PHYB* (2E) と名付けた。

A) *PHYB:PYHB(S)*



B) *PHYB:PYHB(2E)*

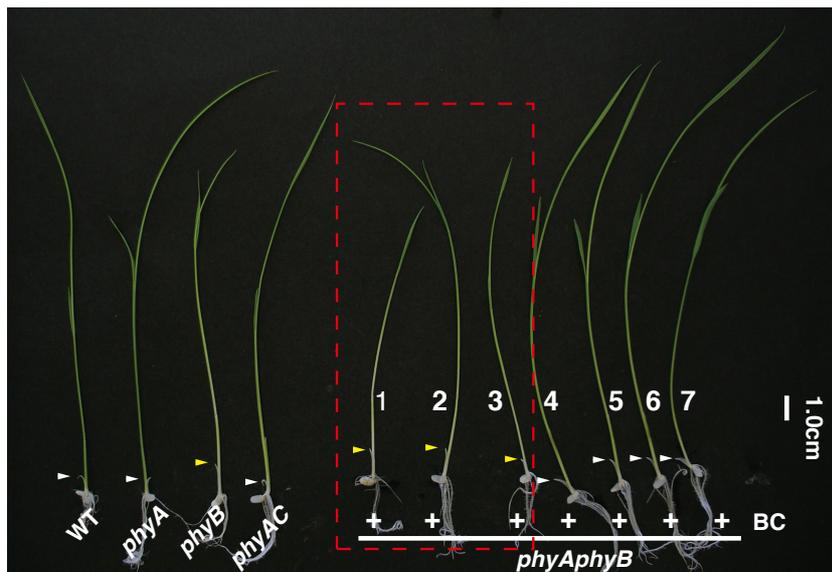


図 2-2. *PHYB* : 変異型 *PHYB* 系統において cR での光形態形成能で導入遺伝子により *phyA* 変異が相補されて *phyB* 変異体の表現形を示す個体が出現する *PHYB* : 変異型 *PHYB* イネと対照区である野生型イネ（日本晴）および各種フィトクロム変異イネを cR（連続赤色光照射）で9日間生育後に、光形態形成能について比較したところ、*PHYB:PYHB(S)* と *(2E)* において、遺伝子型と異なる表現形を示す個体が出現した（赤い破線で囲ったもの）。形質転換体には左から個体番号を振り、PCR により確認した導入遺伝子（BC）の有無（ある場合に+）とフィトクロム変異の遺伝型を下に示した。矢尻は幼葉鞘の先端を示す。

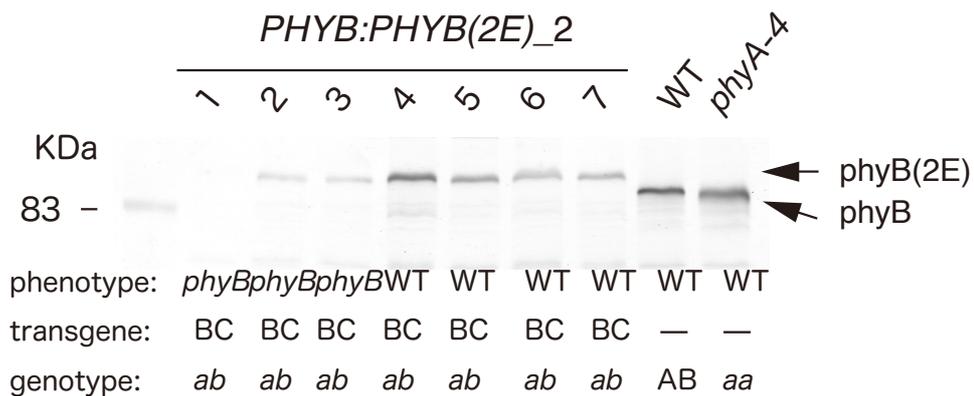
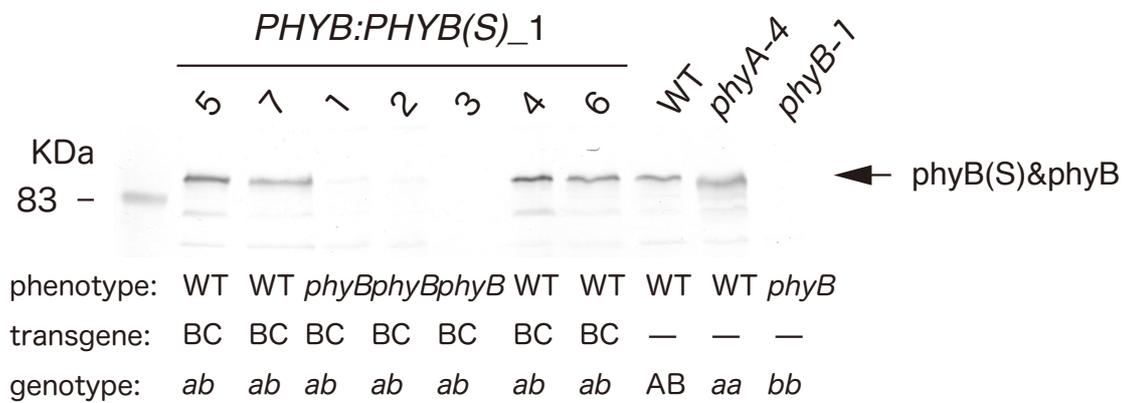


図 2-3. 幼葉鞘の伸長抑制において *PHYB*: 変異型 *PHYB* が *phyA* 様に機能する個体における *phyB* タンパク質のウェスタン解析

図 2-2 の *PHYB:PHYB(S)* 系統と *PHYB:PHYB(2E)* 系統について、導入した *phyB* タンパク質の発現量をウェスタン解析で確認した。系統名の下に数字は個体番号で図 2-2 での形質転換体の並び順（左から）に対応している。抗 *phyB* 抗体により検出されるバンドを矢印で示した。*phyB(2E)* は野生型 *phyB* より移動度が遅い。表現形は WT (= *phyA*) 型あるいは *phyB* 型に分類。その下の欄に、PCR により確認した、導入遺伝子の有無（ある場合に BC）、フィットクロム変異の遺伝型を示した。

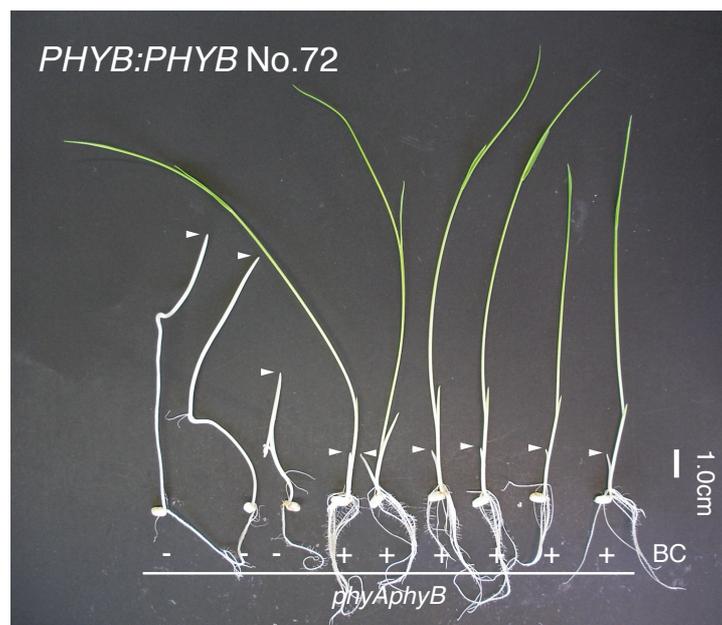
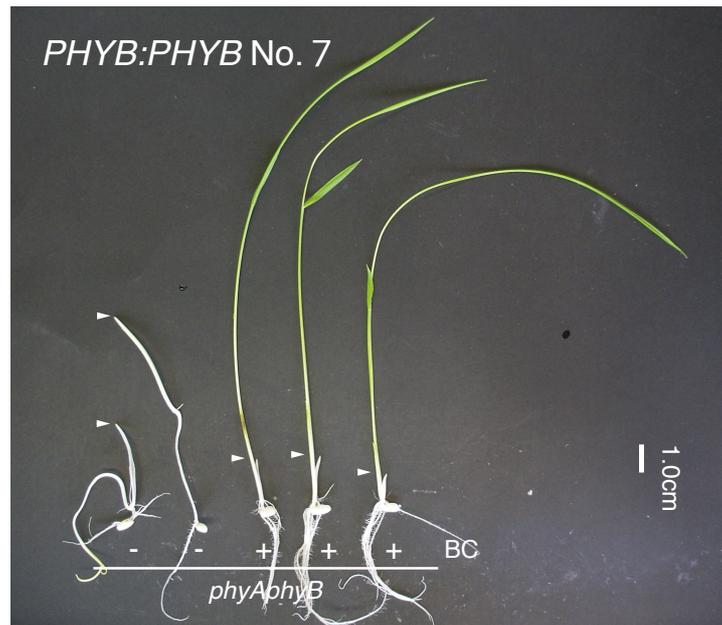
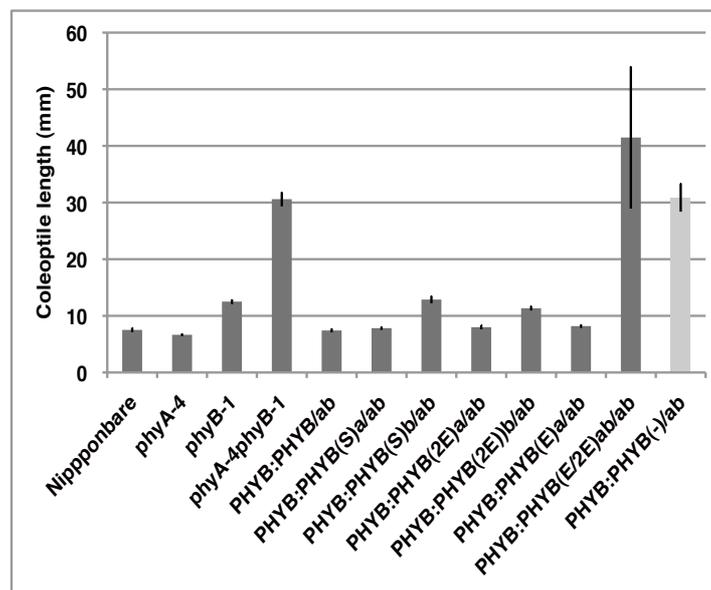


図 2-4. *PHYB* : 野生型 *PHYB* のサイレンシング系統においても cR での光形態形成で *PHYB:PHYB* により *phyA* 変異が相補される
 第 1 章で作製した *PHYB* : *PHYB* イネ系統に出現したサイレンシング系統 (No.7 と No.72) を連続赤色光照射下で 9 日間生育、光形態形成能について評価した。導入遺伝子 (BC) の有無 (ある場合に+) とフィトクロム変異の遺伝型はゲノミック PCR により確認して形質転換体の写真の下に示した。矢尻は幼葉鞘の先端を示す。

A) *PHYB* : 変異型 *PHYB* 系統



B) *PHYB* : *PHYB* サイレンシング系統

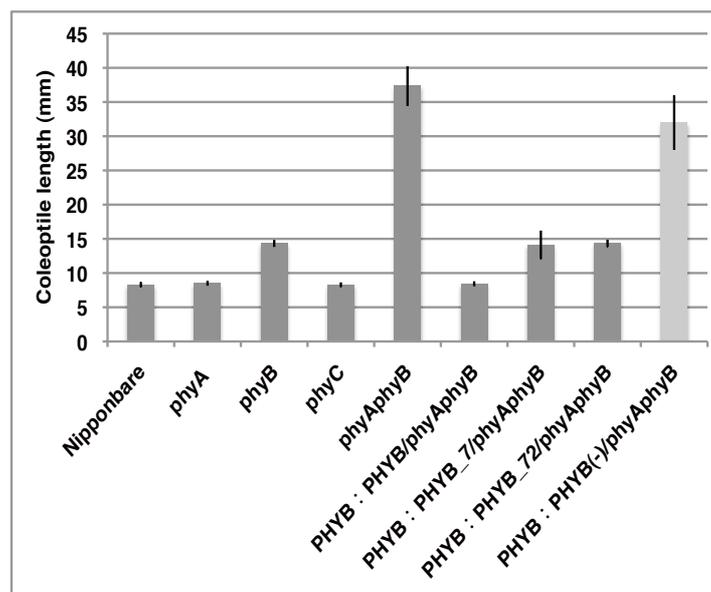


図 2-5. 低発現の *PHYB* は cR での幼葉鞘の伸長抑制において *phyA* 変異を相補する形質転換イネ系統 (A) *PHYB* : 変異型 *PHYB* 系統 (B) *PHYB* : *PHYB* サイレンシング系統と対照区である野生型イネ (日本晴) および各種フィトクロム変異イネを cR で 9 日間生育後に、幼葉鞘の長さを測定、光形態形成能の回復を評価した。(A) の形質転換系統名の後の小文字アルファベット a, b, ab は表現形 (*phyA*, *B*, *phyAphyB*) を、(-) は導入遺伝子の抜けた分離集団であることを示し、フィトクロム変異の遺伝的背景は / の後に示した。

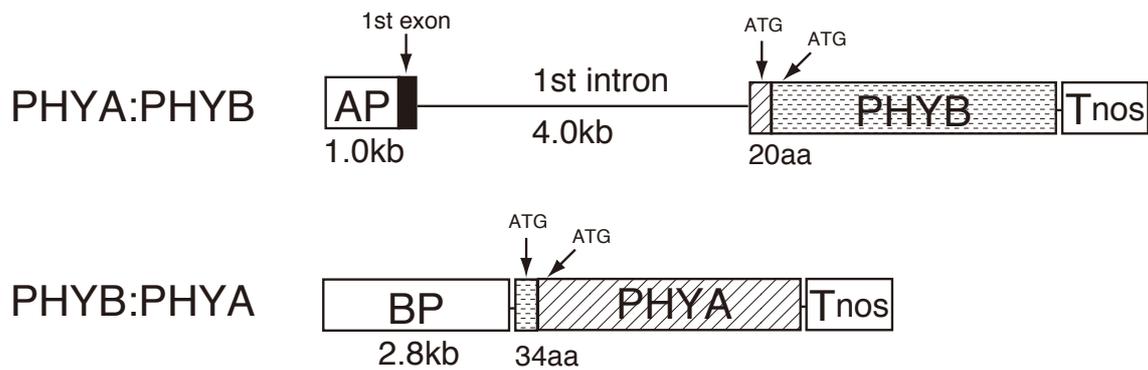
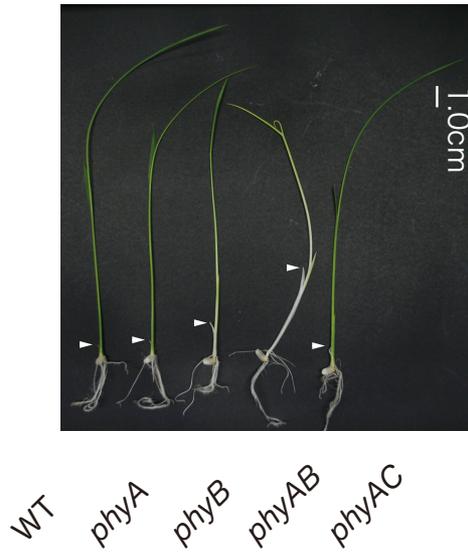


図 2-6. プロモータースワップ実験に用いたコンストラクトの模式図

PHYA:PHYB および PHYB:PHYA はそれぞれ、第 1 章で作製した PHYA:PHYA および PHYB:PHYB (図 1-1) のフィトクロム cDNA 配列を、PHYA cDNA は *Bst*1107I、PHYB cDNA は *Bsp*EI を用いてスワップすることで作製した。この結果として、作製した PHYA:PHYB の phyB タンパク質 N 末端側には phyA N 末端ペプチド 20 アミノ酸残基が融合、PHYB:PHYA の phyA タンパク質 N 末端側には phyB N 末端ペプチド 34 アミノ酸残基が融合した形となった。

A) Control

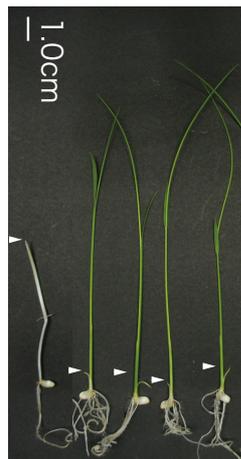


B) *PHYA:PHYB*



+ + + BC
phyB

C) *PHYB:PHYA*



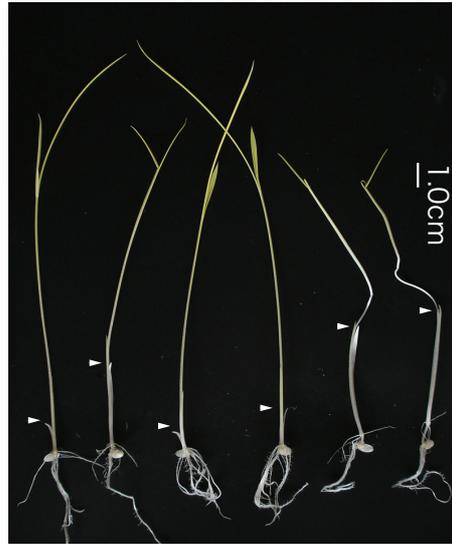
(B) + + + + AC
phyAB *phyA*



+ + + AC
phyB

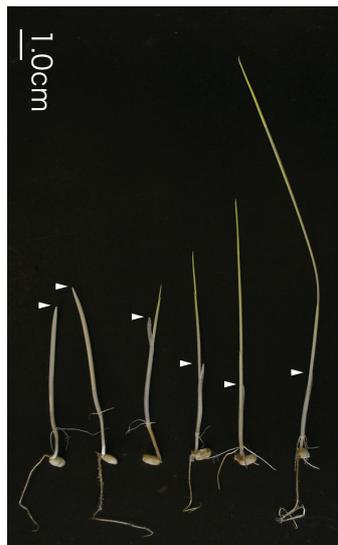
図 2-7. cR での幼葉鞘の伸長抑制において *PHYA:PHYB* は *phyB* 変異を相補するが、*PHYB:PHYA* は *phyA* 変異を相補できない
スワッププロモーターイネ ((B) *PHYA:PHYB* (C) *PHYB:PHYA*) と対照区 ((A) 野生型イネ (日本晴) および各種フィトクロム変異イネ) を連続赤色光照射で9日間生育後に、光形態形成能について比較した。形質転換体の写真の下には、PCRにより確認した、導入遺伝子(BC あるいは AC)の有無(ある場合に+)とフィトクロム変異の遺伝型を示した。矢尻は幼葉鞘の先端を示す。

A) Control



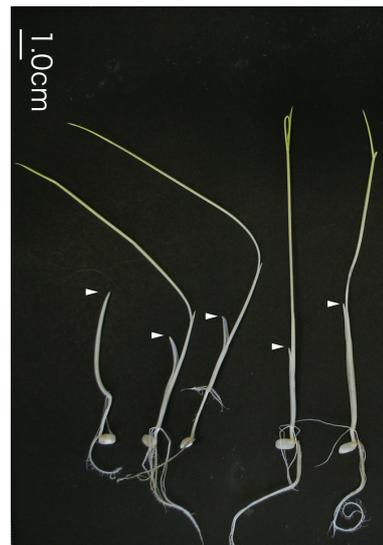
WT phyA phyB phyC phyAC phyAB

B) *PHYA:PHYB*



- - + + + + BC
phyAB

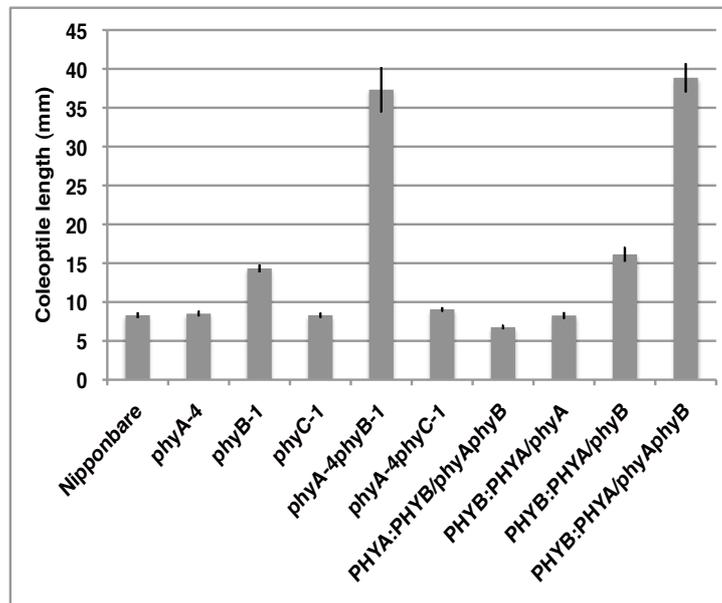
C) *PHYB:PHYA*



+ + + + AC
phyAB phyA

図 2-8. cFR での幼葉鞘の伸長抑制において *PHYA:PHYB* は *phyB* 変異を相補するが、*PHYB:PHYA* は *phyA* 変異を相補できない
スワッププロモーターイネ ((B) *PHYA:PHYB* (C) *PHYB:PHYA*) と対照区 (A) を連続遠赤色光照射で9日間生育後に、光形態形成能について比較した。形質転換体の写真の下には、PCRにより確認した、導入遺伝子 (BC あるいは AC) の有無 (ある場合に+) とフィトクロム変異の遺伝型を示した。矢尻は幼葉鞘の先端を示す。

A) 連続赤色光照射



B) 連続遠赤色光照射

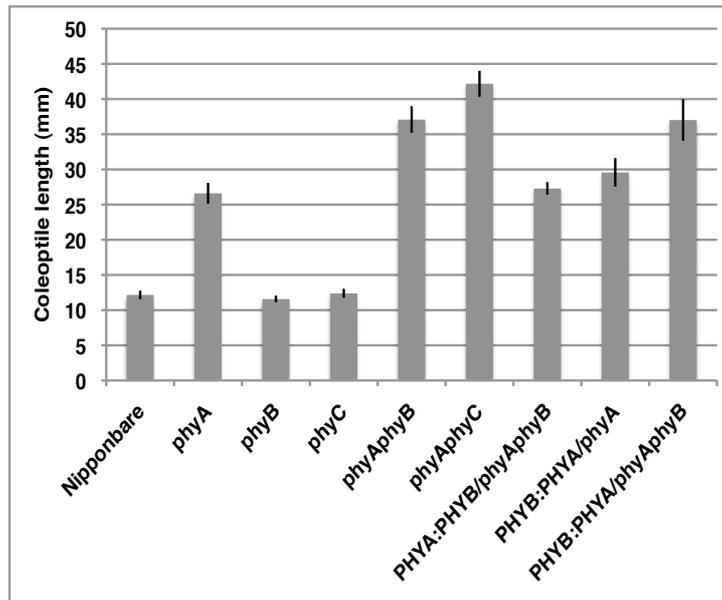
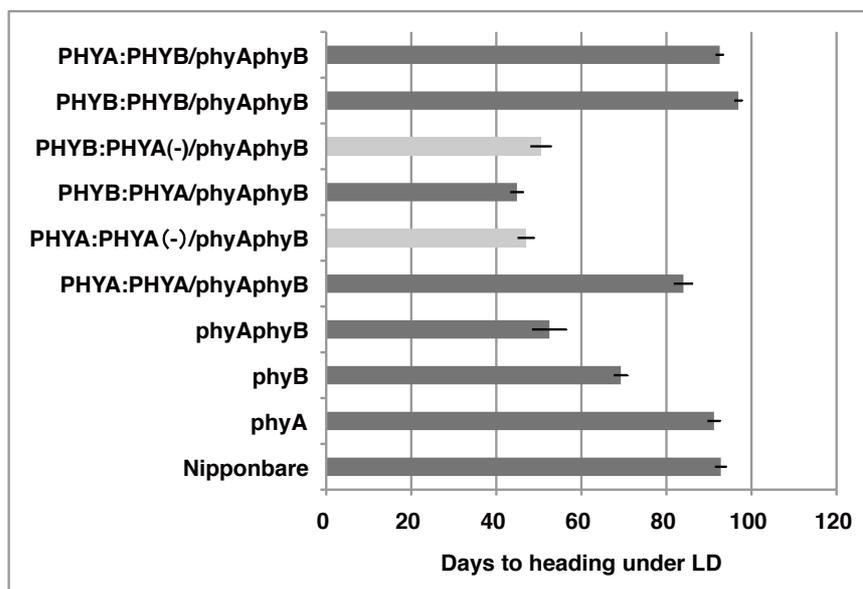


図 2-9. スワッププロモータによる幼葉鞘の伸長抑制の回復

スワッププロモーター形質転換イネと対照区のイネ（日本晴および各種フィトクロム変異イネ）を (A) cR あるいは (B) cFR で 9 日間生育後に、幼葉鞘の長さを測定、光形態形成能の回復を評価した。対照区のイネについては 20 個体以上、形質転換イネについては独立した 3 系統合計 10 個体以上からデータを取り平均値を出した。形質転換系統のフィトクロム変異背景は / の後に示した。

A) 長日条件 (14L/10D)



B) 短日条件 (10L/14D)

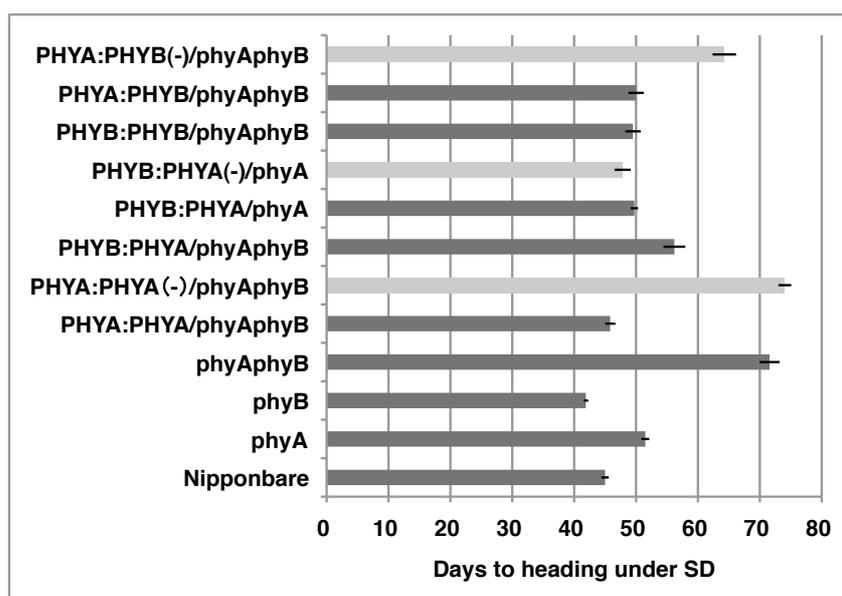


図 2-10. スワッププロモータによる出穂制御能の回復

スワッププロモーター形質転換イネと対照区のイネ（日本晴および各種フィトクロム変異イネ）を (A) 長日条件あるいは (B) 短日条件で生育して、出穂期（開花到達日数）を調べた。対照区のイネについては 20 個体以上、形質転換イネについては独立した 3 系統合計 10 個体以上からデータを取り平均値を出した。形質転換体の系統名の後の (-) は導入遺伝子の抜けた分離集団であることを示し、フィトクロム変異の遺伝的背景は / の後に示した。

第3章 イネ・フィトクロム遺伝子の発現特性とフィトクロム B によるフィトクロム A 遺伝子の発現制御

序論

フィトクロム遺伝子の発現はフィトクロム自身を介して光によって制御されている。この発見により、1980年代の終わりから1990年代始めまで、フィトクロム遺伝子の発現制御機構の研究が盛んに行われた。その結果として、研究された全ての *PHYA* 遺伝子が、暗所では高い発現量を示し、光により急速にその発現を抑制されること (Christensen と Quail, 1989; Kay ら, 1989a; Kay ら, 1989b; Lissemore ら, 1987; Lissemore と Quail, 1988; Sato, 1988; Sharrock と Quail, 1989; Tomizawa ら, 1986)、*PHYB* および *PHYC* 遺伝子は、発現量は低いが恒常的に発現して光環境の影響を受けないことが明らかとなった (Dehesh ら, 1991; Sharrock と Quail, 1989)。また、*PHYA* 遺伝子の光による発現抑制については、一般的に、単子葉植物の方が双子葉植物に比べて強いことが報告され (Christensen と Quail, 1989; Kay ら, 1989a; Kay ら, 1989b; Lissemore ら, 1987; Lissemore と Quail, 1988; Quail ら, 1987; Sato, 1988; Sharrock と Quail, 1989)、*PHYA* 遺伝子の光応答性発現に関与する制御配列やこれに結合する転写因子を同定する目的で、多くの一過的発現実験が単子葉植物 (イネやエンバク) を用いて行われた (Bruce ら, 1991; Bruce と Quail, 1990; Dehesh ら, 1990; Martínez-García と Quail, 1999; Nieto-Sotelo ら, 1994)。これらの成果として、いくつかの候補領域や候補タンパク質が単離されたが、光による *PHYA* 遺伝子の発現抑制に本質的に関わる制御配列や転写因子は未だに同定されていない。1990年当時には、単子葉植物においては安定的に遺伝子を導入して

形質転換植物を作ることができなかったこと、そして、単子葉におけるフィトクロム変異体の単離が進んでいなかったこと、等が研究の妨げになったと考えられる。

フィトクロム遺伝子の組織特異的発現については、発現制御領域下流にレポーター遺伝子として β -グルクロニダーゼ(*GUS*)遺伝子を配したコンストラクトを導入した遺伝子組み換えペチュニア、タバコ、シロイヌナズナなど、双子葉植物を用いて解析された (Adam ら、1994 ; Adam ら、1996 ; Goosey ら、1997 ; Komeda ら、1991 ; Somers と Quai、1995)。シロイヌナズナでは5種類のフィトクロム遺伝子の内4種類:*PHYA*、*PHYB*、*PHYD*、*PHYE* について *PHY pro:GUS* を導入した野生型のシロイヌナズナを用いて、発現の組織特異性および光応答性が解析された (Goosey ら、1997; Somers と Quai、1995)。その結果は、*PHYA:GUS* および *PHYB:GUS* は、いずれも、広範囲に渡って強く発現しており、組織特異性や生育ステージ特異性の乏しいものであった。また、光応答性もほとんど観察されなかった。一方で、*PHYD* および *PHYE* はそれらの祖先遺伝子である *PHYB* と比べると、発現パターンに特異性が観察された。*PHYE:GUS* はロゼット葉の主に維管束で発現しており、*PHYD:GUS* は主に根で発現していて、その発現は光により誘導されることが分かった。これらの結果は、*phyA* や *phyB* の様に主要な遠赤色・赤色光受容体は植物体の全体に常に発現しているが、*phyD* や *phyE* の様に主要ではない光受容体は特異的な発現パターンを示すということを意味しているのかもしれない。

現在では、イネの形質転換実験は比較的簡単にできる様になり、イネ・フィトクロムについても全ての組み合わせの変異体が使える様になった (Takano ら、2001 ; Takano ら、2005 ; Takano ら、2009)。そこで、イネの3分子種のフィトクロムについて、それぞれの発現制御領域を *GUS* 遺伝子の上流に配したプロモーター:*GUS* を作製して野生型のイネ(日本晴)に導入して形質転換イネを作製し、*GUS* 活性の局在性より *PHYA*、*PHYB*、

PHYC 遺伝子発現の組織特異性について調べた。その結果、双子葉植物での報告とは異なり、イネの *PHYA* と *PHYB* 遺伝子はその発現パターンが大きく異なることが分かった。また *PHYC* 遺伝子については、本論文の結果が初めての報告例であるが、*phyB* 依存的なタンパク質の機能を反映するかの様に *PHYB* と良く似た発現パターンであることが分かった。これらプロモーター:*GUS* の結果が内生のフィトクロム遺伝子の発現 (mRNA) と一致していることは、*in situ hybridization* 実験により確認した。また、光存在下で生育したイネにおける *PHYA* 遺伝子の維管束特異的な発現パターンが、*phyB* を介した赤色光による *PHYA* 遺伝子の発現抑制の結果であることを明らかにしたので、本章ではこれらについて報告する。

方法

1. 植物材料と生育条件

1.1 植物材料

イネ (*Oryza sativa. L*) の以下の系統を実験に用いた

非遺伝子組み換えイネ

栽培品種 日本晴

phyA 変異体 *phyA-2*、*phyA-4* (Takano ら、2001; 無発現変異、日本晴背景)

phyB 変異体 *phyB-1*、*phyB-2* (Takano ら、2005; 無発現変異、日本晴背景)

phyAphyB 変異体 *phyA-4/phyB-1* (Takano ら、2005; 日本晴背景)

遺伝子組み換えイネ (図 3-1)

PHYA promoter :: *GUS* (*PHYA:GUS*) 発現体 (背景 : 日本晴、*phyA-2*、*phyA-4*、*phyB-1*、*phyB-2*、*phyA-4/phyB-1*)

本研究で作製した系統。外来 DNA 断片 *PHYA* promoter :: *GUS* およびハイグロマイシン耐性遺伝子が挿入されている。アグロバクテリウム法によって DNA 断片を導入した形質転換当代 (T_0) から 1 世代後の T_1 あるいは 2 世代後の T_2 世代を使用した。外来遺伝子の作製法については第 2 項に詳細を記載した。

PHYB promoter :: *GUS* (*PHYA:GUS*) 発現体 (背景 : 日本晴)

本研究で作製した系統。外来 DNA 断片 *PHYB promoter :: GUS* およびハイグロマイシン耐性遺伝子が挿入されている。アグロバクテリウム法によって DNA 断片を導入した形質転換当代 (T_0) から 1 世代後の T_1 あるいは 2 世代後の T_2 世代を使用した。外来遺伝子の作製法については第 2 項に詳細を記載した。

PHYC promoter :: GUS (PHYC:GUS) 発現体 (背景 : 日本晴)

本研究で作製した系統。外来 DNA 断片 *PHYC promoter :: GUS* およびハイグロマイシン耐性遺伝子が挿入されている。アグロバクテリウム法によって DNA 断片を導入した形質転換当代 (T_0) から 1 世代後の T_1 あるいは 2 世代後の T_2 世代を使用した。外来遺伝子の作製法については第 2 項に詳細を記載した。

1.2 生育条件

第 1 章 「材料と方法」の 1.2 生育条件と同様。

2. 形質転換ベクターの構築とイネの形質転換

第 1 章 3. 形質転換ベクターの構築で pMCS5 ベクター上に構築した *PHYA promoter :: PHYA cDNA* から *PHYA cDNA* の内在性 *XmaI* サイト (1st ATG より 61bp 下流) とベクター側の *SacI* サイトを利用して *PHYA cDNA* を除去、代わりに、pBI101 ベクターから *XmaI* と *SacI* で切り出した *GUS* 遺伝子を組み込んで、*PHYA promoter :: GUS (PHYA:GUS)* を作製した (図 3-1)。同様に、MCS5 ベクター上に構築した *PHYB promoter :: PHYB cDNA* から *PHYB cDNA* の内在性 *BmgBI* サイト (1st ATG より 61bp 下流) とベクター側の *SacI*

サイトを利用して *PHYB* cDNA を除去、代わりに、pBI101 ベクターから *SmaI* と *SacI* で切り出した *GUS* 遺伝子を組み込んで、*PHYB promoter :: GUS (PHYB:GUS)* を作製した (図 3-1)。 *PHYC promoter :: GUS (PHYC:GUS)* についても同様で、 *PHYC promoter :: PHYC cDNA* から *PHYC cDNA* の内在性 *BmgBI* サイト (1st ATG より 32bp 下流) とベクター側の *SacI* サイトを利用して *PHYB cDNA* を除去、代わりに、pBI101 ベクターから *SmaI* と *SacI* で切り出した *GUS* 遺伝子を組み込んで作製した (図 3-1)。

3つのコンストラクトをそれぞれ、*SbfI* サイトと *AscI* サイトを用いて pMCS5 ベクターから切り出し pSMAH バイナリーベクター (生物研 市川博士より分与) に挿入して、植物形質転換用のベクターを構築した。

完成したバイナリーベクターはエレクトロポレーション法 (MicroPulser electroporator; Bio-Rad) を用いて *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 に導入、イネの形質転換にはこのアグロバクテリウムを用いた。

3. GUS 染色

GUS 染色による遺伝子発現部位の組織化学的解析は、Kosugi ら (1990) の手法に若干の変更を加えて行った。播種後 3 ~ 9 日目の幼植物については一部無傷のまま染色したが、その他は徒手あるいはプラントマイクロトーム MTH-1 (日本医化器械製作所) で切片にした後に染色反応に供した。植物の組織片を GUS 染色液 (50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0、1mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-gluc)、0.5mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 、0.5mM $K_4[Fe(CN)_6]$ 、5% (v/v) methanol、10 μ g ml⁻² cycloheximide) に浸し、真空ポンプを用いて 30~60 分間減圧することにより染色液を組織内部に浸透させた。そ

の後、37°Cに設定した恒温器内に移し酵素反応を活性化することにより呈色反応を促した。37°Cでの反応時間はフィトクロム発現制御領域からの遺伝子発現強度に応じて決め、*PHYA:GUS* 形質転換イネの場合は0.5~3時間、*PHYB:GUS* や *PHYC:GUS* 形質転換イネでは24時間とした。*X-gluc* と *GUS* の反応生成物は溶液中で拡散しやすい性質を持つので、24時間以上反応させたものからはデータを取得しなかった。*GUS* 反応の停止は50%エタノール液に浸透させることにより行い、染色後の組織は50%-70%-90%-100%のエタノール上昇系列の溶液交換により葉緑素など内在性の色素の脱色を行った。脱色後の組織は100%-90%-70%-50%-30%-0%のエタノール下降系列の溶液交換により再び水和した後、50%グリセロール溶液をマウント液としてプレパラート作製に供し、顕微鏡 (BX51; オリンパス) により観察と写真撮影を行った。*GUS* 染色の観察は1コンストラクトにつき4系統以上の形質転換植物で行い、これらの中で代表的と考えられる画像を結果として本論文中に掲載した。

4. *In situ* hybridization 解析

イネ・フィトクロム mRNA の *In situ* hybridization 解析は Iwamoto ら (2009) の手法に準じて行った。サンプルは、4% (w/v) paraformaldehyde と 0.25% (v/v) glutaraldehyde を含むリン酸緩衝生理食塩水を真空ポンプによる減圧脱気により組織内に浸透して固定した。固定後のサンプルを、エタノールと2-メチル-2プロパノールの混合上昇系列により脱水の後に、2日間のパラフィン透徹を経て、パラフィンブロックに包埋した。常法に従いパラフィン切片 (厚さ 10 μ m) を作製、APS (アミノシラン) コートスライドガラス (松浪硝子工業) に貼付けて *In situ* hybridization 解析に供した。Hybridization

プローブにはフィトクロム遺伝子の cDNA を鋳型として、ジゴキシゲニン (DIG) で標識されたセンス (ネガティブコントロール)あるいはアンチセンス RNA を生成させて用いた。Hybridization シグナルはアルカリホスファターゼ標識された抗ジゴキシゲニン抗体 (ロシュ) と発色基質である BCIP/NBT により検出した。

結果

1. フィトクロムプロモーター：*GUS*による遺伝子発現の組織化学的解析

第2章の結果は、イネ・フィトクロム遺伝子の発現特性について解析する必要性を強く示すものであった。そこで、*PHYA*、*PHYB*そして*PHYC*遺伝子発現の組織特異性を解析するために、 β -*GLUCURONIDASE* (*GUS*)遺伝子をレポーター遺伝子としてそれぞれの発現制御領域の下流に配した *PHY promoter::GUS* 融合遺伝子を野生型（日本晴）に導入して形質転換イネを作製、*GUS* 活性による呈色反応を利用した組織化学的解析（*GUS* 染色）に供した。プロモーター：*GUS* 形質転換体（ T_1 もしくは T_2 を解析に用いた）は *PHYA::GUS* については5系統以上、*PHYB::GUS*、*PHYC::GUS* については10系統以上を解析し、典型的と考えられる写真を、種子から幼植物期のデータを図3-2に、成葉、花茎、穎花（花）など成熟期の植物のデータを図3-3に示した。

幼植物期の発現パターンとしては、*PHYA::GUS* は、成熟した種子（図3-2-A）において胚と果皮で強く発現していた（図3-2 A-a, 矢じりは黒が胚を白が果皮を示す）。*PHYC::GUS* もまた、胚である程度の発現が認められたが、果皮においては全く発現していなかった（図3-2 A-c : 矢じりは黒が胚を白が果皮を示す）。一方、*PHYB::GUS* については、種子での発現は確認できなかった（図3-2 A-b）。播種後3日目の暗所芽生え（図3-2-B）では、*PHYA::GUS* は全体的で強い発現を示し（図3-2 B-a）、播種後9日目の明所芽生え（図3-2-C）においても、幼葉鞘、抽出したばかりの若い葉の先端、根等で強く発現していた（図3-2-C -a, d : 矢印は幼葉鞘を示す）。対照的に、*PHYB::GUS*、*PHYC::GUS* は、播種後3日目の暗所芽生えでは全く発現が検出されず（順に図3-2-B-bと-c）、播種

後 9 日目の明所芽生えにおいても葉鞘の基部に僅かな発現が認められるのみであった (図 3-2-C-b, e または c, f)。

成熟期の発現パターンとして、まず *PHYA:GUS* については、成熟葉で維管束と毛茸で強い発現が認められた (図 3-3-A-a, 矢印は維管束、矢じりは毛茸を示す)。維管束特異的な発現は花茎の節および節間 (図 3-3-B-a, d, g) や穎花 (図 3-3-C-a) でも観察された。花茎の縦断切片は *PHYA:GUS* が節網維管束や節間や分蘖芽付近の葉鞘の大維管束で非常に強く発現していることを明らかにした (図 3-3 B-d, 矢じりおよび矢印)。また、穎花の横断切片から、*PHYA:GUS* が鱗被で強く発現していることが明らかとなった (図 3-3-C-a, f, 矢印) が、これは、鱗皮という組織に維管束管が多数集まっているためと考えられた。さらに、子房や花糸の維管束にも強く発現していた (図 3-3-C-f, 黒い矢じりは子房の、白い矢じりは花糸の維管束を示す)。維管束以外の発現組織としては、興味深いことに、葯壁、特に葯の裂開に重要な葯壁溝の周辺に強い発現が認められた (図 3-3-C-d)。

成熟期においても *PHYB:GUS* と *PHYC:GUS* の発現パターンは *PHYA:GUS* と対照的で、全体的に発現が弱く組織特異性の低いものであった。*PHYB:GUS*、*PHYC:GUS* ともに成熟葉での発現は検出されず (図 3-3 A-b, c)、花茎や穎花においても弱くて広がった染色パターンを示し組織特異性を決定することはできなかった。(図 3-3 B-b, e & c, f, 図 3-3-C-b & c)。花茎の横断切片では、成長の著しい伸長域の細胞に *PHYB:GUS* と *PHYC:GUS* が強く発現しているものが散見された (図 3-3 B- h & i)。細胞種特異性の同定を目的に、横断面を連続的に観察した結果、節からの発達に応じて発現している細胞の種類 (柔細胞、維管束柔細胞、など) が変化する様子が観察された。これらのデータは、*PHYB:GUS* と *PHYC:GUS* の発現が細胞の何らかの生理状態を反映している可能性

を想起させたが、実証には至らなかった。

2. 暗所芽生えと明所芽生えにおける *PHYA:GUS* の発現パターンの比較

前項の図 3-2 に示したように、*PHYA:GUS* は暗所芽生えでは全体的に発現しているが、一方で明所芽生えでは器官特異的な発現パターンを示す。また、これに加えて、自然光環境下で生育した成熟イネでは、図 3-3 に示したように、維管束特異的な発現パターンを示す。これらの結果は、光環境が *PHYA:GUS* の発現パターンに影響することを示唆している。そこで、播種後 3 日目の暗所芽生え（図 3-4-A）と 9 日目の明所芽生え（図 3-4-B）について、連続的な横断切片を作製し、これを GUS 染色後に比較した。

暗所芽生えの幼葉鞘では、*PHYA:GUS* は維管束で強く発現している他に表皮でもある程度の発現が認められた。*PHYA:GUS* は未抽出の第 1 葉と第 2 葉を含む基部（幼葉鞘節近傍）で強く発現しており（図 3-4-A-d）、幼葉鞘先端に向かうにつれて第 1 葉葉鞘での発現は弱くなり、最終的には破生間隙を形成する運命の細胞での発現は消失する（図 3-4-A-c、矢印）。これらの観察結果は、*PHYA:GUS* は細胞の生理活性が喪失することが運命づけられた細胞以外は全細胞で発現しうることを示唆している。

明所芽生えでは、*PHYA:GUS* は全ての組織で維管束において特に強く発現しており（図 3-4-B）、成熟個体において観察された発現パターンと類似していた。興味深いことに、第 1 葉葉鞘に包まれた未発達な葉身や葉鞘（図 3-4-B-c）そして幼葉鞘節近傍の基部（図 3-4-B-d）では、*PHYA:GUS* の発現が葉肉細胞や表皮においても認められた。

3. *In situ* hybridization による内在性 *PHYA* mRNA の発現組織解析と *PHYA:GUS* 発現パターンとの比較

PHYA:GUS の発現パターンが、維管束特異的な組織応答性や光応答性を示す興味深いものだったので、これが内在性の *PHYA* mRNA の分布と一致しているかどうかを *in situ* hybridization 解析により確認した。

播種後 3 日目の暗所芽ばえにおける *PHYA* mRNA 蓄積の様子 (図 3-5-A-a, b, c) は前節で示した *PHYA:GUS* の発現パターン (図 3-4-A-a, b, c) と非常に良く一致していた。*PHYA* mRNA の強いシグナルが幼葉鞘およびその内側の未熟な葉鞘と葉身、全ての組織の維管束に観察された (図 3-5-g, 順に矢じり (白)、(黒)、矢印で示した)。これに対して、播種後 9 日目の明所芽生えにおける *PHYA* mRNA の蓄積レベルは暗所芽生えに比べてかなり低く、*in situ* hybridization 解析では明所芽生えの外側に露出した組織から *PHYA* mRNA のシグナルを検出することはできなかった。しかしながら、外側の組織に囲まれた内側の未抽出で未熟な葉身および葉鞘では、明所芽生えにおいても維管束特異的な *PHYA* mRNA の発現を確認することができた (図 3-6-A、矢じり (黒))。

成熟した組織を用いた解析では、*PHYA* mRNA のシグナルは穎花においてのみ検出することができ (図 3-5-B-a, b, c)、成葉および花茎では、おそらく、バックグラウンドノイズが高かったことが原因で、検出することは出来なかった (図 3-7)。穎花においては、明確な *PHYA* mRNA シグナルが子房、花糸、鱗被それぞれの維管束で検出された (図 3-5-B-b, 順に矢印、矢じり (黒)、(白) で示した)。これらのシグナルは前節で示した穎花における *PHYA:GUS* の発現パターン (図 3-3-C-f) と非常に良く一致していた。蒴の横断切片は *PHYA* mRNA の発現が蒴壁と花糸の維管束に特異的で花粉では発現して

いないことを明らかにした（図 3-5-B-b, 順に矢じり（黒）、矢印、矢じり（白）で示した）。以上の結果のすべてが、*PHYA:GUS* の発現パターンは内在性の *PHYA* mRNA の発現パターンを反映したものであることを示しており、*PHYA:GUS* 形質転換イネを *PHYA* 遺伝子の発現制御の解析に用いることを支持していた。

4. 光環境が *PHYA:GUS* の発現パターンに与える影響

第 2 節の図 3-4 で解析した播種後 3 日目の暗所芽生えは典型的なイネの黄化芽生えであり、葉は全て幼葉鞘に包まれた状態で、播種後 9 日目の明所芽生えの展開葉とは形態的にも生育ステージ的にも違いが大きかった。明所芽生えにおいても、第 1 葉葉鞘に包まれた未発達な葉身（図 3-4-B-c）や幼葉鞘節近傍の基部（図 3-4-B-d）では暗所芽生えと類似した発現パターンが認められたため、暗所芽生えの葉身で観察された葉肉細胞や表皮など維管束以外の組織での *PHYA:GUS* の発現が光環境の影響ではなく形態や生育ステージによるという可能性を否定できなかった。そこで、播種後 9 日目の暗所芽生えを用いて、長く伸長した第 2 葉鞘の先端からわずかに抽出した第 3 葉と第 4 葉を、同じく 9 日目の明所芽生えの展開した第 3 葉と抽出したての第 4 葉とを比較、発育ステージの影響を極力排除して光環境の影響のみを観察するように工夫した。その結果、生育ステージに関わらず、暗所芽生えの葉身では維管束以外にも葉肉細胞や表皮などの全ての組織で発現が認められたのに対して、明所芽生えの展開葉では発現が維管束に限られていた。これらの結果は、光シグナルが *PHYA:GUS* の葉肉細胞における発現を抑制していると云う考えを支持している（図 3-8）。

いくつかの先行研究で、イネ科単子葉植物の *phyA* を双子葉植物で発現させた場合、

phyA の N 末端に光受容体としての生理活性に影響する領域が存在することが報告されている(Cherry ら, 1992; Jordan ら, 1995; Stockhaus ら; 1992)。さらに、Trupkin ら (2007) は、この N 末端領域がシロイヌナズナ phyA のタンパク質としての安定性に関わることを、同じシロイヌナズナの系を用いて立証した。これらの報告は、本研究のコンストラクションにおいて GUS タンパク質の N 末端側に付加することとなったイネ phyA の N 末端領域が *PHYA:GUS* の光安定性に影響している可能性を示唆するものであった。そこで、この可能性を検証するために、暗所で 4 日間生育した後に連続光照射下に移動した *PHYA:GUS* 形質転換イネから経時的にタンパク質を抽出、phyA と GUS に対してウェスタンブロット解析を行った (図 3-9)。その結果として、黄化芽生えに大量に蓄積していた内在性の phyA が、連続光照射下に移動すると急速に減少して、光照射後 2 時間以内には完全に消失するのに対して、本研究で作製したイネ phyA の N 末端領域の一部を付加した GUS タンパク質は連続光照射下においても安定であることが明らかとなった。このことは本研究で付加したイネ phyA の N 末端領域は GUS タンパク質の光安定性に影響していないこと、従って、光が制御しているのは *PHYA:GUS* 遺伝子の発現であって、GUS 融合タンパク質の安定性ではないことを明示している。

生育ステージの影響および phyA N 末端領域の付加による GUS タンパク質の不安定化の可能性が排除されたことから、光シグナルが *PHYA* 遺伝子の葉肉細胞における発現を抑制していることが確実となった。この光抑制がフィトクロム自身を介して起きているのか、それとも他の光レセプターを介しているのかを検討するために、*PHYA:GUS* 形質転換イネ (遺伝的背景は WT) の幼苗を LED による連続単色光照射環境 (cR; continuous red light, cFR; continuous far-red light, cB; continuous blue light) で生育して幼葉を GUS 染色した結果を、連続白色光照射 (cW; continuous white light) および暗所 (cD; continuous

dark) の結果と比較した (図 3-10-A)。その結果、cW と cR の幼葉では *PHYA:GUS* は維管束特異的に発現しており葉肉細胞での発現は検出されないが、cFR や cB では cD 同様に葉肉細胞でも維管束でも強く発現して全体的な発現パターンを示すことが明らかになった。これらの結果から、光による葉肉細胞での *PHYA* 遺伝子の発現抑制は、赤色光シグナルおよび赤色光受容体であるフィトクロムを介して起きていること、そして、遠赤色光と遠赤色光受容体としての *phyA* は関与していないことが示唆された。

5. *PHYA:GUS* 遺伝子を発現抑制する光の受容体は *phyB* である

葉肉細胞での *PHYA* 遺伝子の発現抑制に関わるフィトクロムの分子種を同定するために、*PHYA:GUS* 遺伝子を *phyA* 単独変異体、*phyB* 単独変異体、*phyAphyB* 二重変異体に導入した形質転換イネ (以降順に、*PHYA:GUS/phyA*、*PHYA:GUS/phyB*、*PHYA:GUS/phyAphyB*) を作製した。これらを cW、cR、cFR そして cD の条件で 9 日間生育、最上位展開葉を採取して GUS 染色に供した (*phyAphyB* 二重変異体背景のものは cR、cFR の形態が cD と殆ど変わらないので、展開した葉を用いることは不可能であった)。

その結果、*phyA* 単独変異背景では *PHYA:GUS* 遺伝子の光抑制パターンは図 3-10-A に示した野生型背景のものと同じく cW と cR 条件で葉肉細胞における発現が抑制されたが、*phyB* 単独変異背景では cW と cR 条件での抑制が外れて、全ての光条件下で *PHYA:GUS* 遺伝子が全体的に発現するようになった (図 3-10-B)。*phyAphyB* 二重変異背景は *phyB* 単独変異背景と同じであった (図 3-10-B)。これらの結果は、幼葉においては、*phyB* が葉肉細胞における *PHYA:GUS* 遺伝子の発現を抑制する赤色光受容体である

ことを示し、*phyA* 自身はこれに関与していないことを示唆している。

成熟葉での *PHYA:GUS* 遺伝子の維管束特異的発現にも同じ機構が関わっているのではあるか？この疑問に答えるために、温室の自然光下で1ヶ月生育した *PHYA:GUS/phyA*、*PHYA:GUS/phyB*、*PHYA:GUS/phyAphyB* について、最上位展開葉を採取して GUS 染色に供した (図 3-10-C)。幼葉の結果から予想された通りに、*phyA* 単独変異背景は野生型背景と同様に維管束特異的な発現パターンを示した。予想外であったのは *phyB* 単独変異背景でも、野生型背景と同様の維管束特異的な発現パターンを示したことで、*phyAphyB* 二重変異背景においてのみ葉肉細胞も含む全ての細胞で *PHYA:GUS* 遺伝子が発現するようになった。これらの結果は、成葉においてもフィトクロムを介した光シグナルにより *PHYA* 遺伝子の葉肉細胞や表皮細胞における発現が抑制されること、維管束特異的な発現パターンはこれを反映した結果であること、を明示すると同時に、成葉では幼葉とは異なり *phyA* 自身による *PHYA* 遺伝子発現の光抑制が起きていること、を示している。残念ながら、成葉についての単色光照射実験系が確立されていないことから、この *phyA* 自身による *PHYA* 遺伝子発現抑制に関わる光が赤色光なのか遠赤色光なのか、は検討することが出来なかった。

6. *In situ* hybridization による *PHYB* および *PHYC* mRNA の発現組織解析

PHYB および *PHYC* 遺伝子の葉における発現組織について、*PHYB:GUS* と *PHYC:GUS* イネを用いた GUS 染色から結果を得ることが出来なかった (図 3-3 A-b, c) ので、*in situ* hybridization 解析による内在性 mRNA の検出を試みた。その結果、展開した成葉を用いた解析では、センスプローブによるバックグラウンドシグナルに阻害されて、いずれの

フィトクロム遺伝子に対しても明確なシグナルを得ることが出来なかった(図 3-11-A)。
そこで、若い植物の未抽出葉を用いて解析を行った結果、バックグラウンドを低く抑える
ことができ、*PHYB* および *PHYC* 遺伝子は葉身の組織全体で発現していることが明らか
となった(図 3-11-B)。

考察

1. イネ・フィトクロム遺伝子は分子種に応じて異なる組織特異性を持つ

第1章でクローニングした3種類のフィトクロムの発現制御領域について、*GUS* 遺伝子をレポーターとしたプロモーター：*GUS* を栽培種野生型（日本晴）に導入した形質転換イネを用いて、*PHYA*、*PHYB* そして *PHYC* について、組織特異的あるいは生育ステージ特異的な発現パターンの有無を調査した。その結果、イネのフィトクロム遺伝子の発現パターンは、これまで報告されてきた双子葉植物、シロイヌナズナ、タバコなどとは大きく異なることが明らかとなった。

イネの *PHYA:GUS* は観察した全ての生育ステージの全ての組織で維管束に強く発現していた。一方、*PHYB:GUS* および *PHYC:GUS* の発現は弱く拡散したパターンで、組織特異性を決定するのは困難であった。*PHYB:GUS* および *PHYC:GUS* 発現は幼苗の地上部と根の境界、茎長のある部分（図 2-C）と、伸長中の稈（花茎）の節と節間（図 3-B）、未熟な穎花の先端（図 3-C）で観察されたが、*GUS* 反応による染色が弱くて、発現細胞種の特定には至らなかった。先行論文によると、シロイヌナズナ、タバコなど双子葉植物における *PHYA:GUS* および *PHYB:GUS* の発現パターンは良く似ていて、ともに植物体のほぼ全組織で強く発現する（Adam ら、1994； Adam ら、1996； Goosey ら、1997； Somers ら、1995）。従って、*PHYA* と *PHYB* の発現は単子葉であるイネと、双子葉であるシロイヌナズナやタバコで、異なる発現制御を受けていると考えられる。*PHYC* については、レポーター遺伝子を用いた発現解析の報告例は過去にはなく、本研究の *PHYC:GUS* が初めての報告例である。結果は、*PHYB:GUS* の発現パターンと非常に良く

似たもので、これは、phyC タンパク質の安定性に phyB が必須であること、phyC はホモダイマーとしては機能を持たず、phyB とのヘテロダイマーとして機能するという報告 (Clack ら、2009 ; Sharrock と Clack、2004 ; Xie ら、2014) を裏付けるものである。

2. *PHYA* 発現制御領域の光応答性と組織特異性との関連

図4に示したように、暗所芽生えにおいては *PHYA:GUS* は葉の全組織で発現しているが、明所芽生えの展開葉においては維管束特異的な発現パターンを示す。これらの観察は、光シグナルのない環境下では *PHYA* 遺伝子は全組織で発現しているが、光シグナルがあると維管束を除く全ての組織での発現が抑制される、ということを示唆している。

興味深いことに、明所芽生えであっても、葉鞘から未抽出の未熟葉においては維管束に加えて葉肉細胞においても *PHYA:GUS* の発現が認められる。このことは、*PHYA* 遺伝子が局所的な光環境に応答して発現している可能性を示しており、その結果、外環境の光の届かない植物内部の組織においては、*PHYA* 遺伝子は発現抑制されずに全ての細胞で発現していると考えられた。

植物体内部の光環境に応じた発現パターンの帰結が、*PHYA* 遺伝子発現の組織特異性であると仮定すると、外部の光環境が暗所でも明所でも、維管束では常に発現している事実はどう説明できるだろうか？図8の結果で明らかとなったように *PHYA* 遺伝子の発現は赤色光を受容した Pfr 型の phyB によって抑制される。維管束では光環境を問わず恒常的に発現しているということは、1) 維管束では *PHYB* は発現せず、phyB が欠失している。2) 維管束の内部に届く光は遠赤色光に偏っていて phyB は Pr 型 (不活性型) になっている

3) 維管束特異的な未知の転写促進因子がある の3つが考えられる。3) については根拠となる論文およびデータがある訳ではなく、1) と2) の両方が否決された時の補償に過ぎない。1) については後節で詳しく述べるが、図 3-11 に示した *in situ hybridization* 解析の結果から、*PHYB* は全体的に発現していて維管束にも *phyB* は存在すると考えている。一方、2) については肯定的な論文が、近年になって発表されている。この論文によれば維管束の内部に伝わる光は 710nm - 940nm の遠赤色光波長域に偏っている (Sun ら、2003; Sun ら、2005)。維管束の内部が常に上記のような光環境であるならば、*phyB* のほとんどが Pr 型となり *phyB* からの赤色光シグナルは伝わらず、*PHYA* 遺伝子が強く発現することが期待される。

3. *PHYA* mRNA と *PHYA:GUS* の発現パターンは一致している

PHYA:GUS の染色パターンが内在性の *PHYA* mRNA の実際の発現パターンを反映しているかどうか、*in situ hybridization* 解析により検討した。暗所芽生えの場合は、内在性の *PHYA* mRNA の発現パターンと *PHYA:GUS* のパターンとは良く一致していた。

ところが、明所芽生えや自然光のもと生育した成熟イネの光に露出した組織では、*in situ hybridization* で *PHYA* mRNA のシグナルを検出することは難しかった。一方で、光環境下で生育したイネにおいても、葉鞘に包まれた内側の未熟葉においては、*PHYA* mRNA のシグナルが検出されて *PHYA:GUS* のパターンと一致した。

PHYA mRNA の代謝速度は光環境に関わらず非常に速いことが知られており (Seeley ら、1992)、露光した組織ではこれに発現抑制が加算されるが故に *PHYA* mRNA が速やかに消失、*in situ hybridization* で検出することができなかつたと推測された。これとは

対照的に、GUS タンパク質は比較的安定である（代謝が遅い）ことが報告されている（Jefferson ら、1987 ; Weinmann ら、1994）ことから、*PHYA:GUS* のパターンは内在性の *PHYA* mRNA のリアルタイムでの局在ではなく、mRNA の発現パターンの痕跡であると考えられる。*PHYA:GUS* の GUS 染色結果も *PHYA* mRNA の *in situ* hybridization 解析の結果も、光シグナルがイネ・*PHYA* 遺伝子を組織あるいは部位特異的に抑制することを明示している。

4. 幼葉の葉肉細胞では Pfr 型の *phyB* により *PHYA* 遺伝子発現が抑制される

LED 照明による単色光照射実験の結果、*PHYA* 遺伝子発現の光抑制には、cR は cW 同様の効果を示すが、cFR や cB は無効であることが明らかとなりフィトクロムの関与が示唆された（図 3-10-A）。そこで、*PHYA:GUS* をフィトクロム変異イネのシリーズ (*phyA*, *phyB*, *phyAphyB*) に導入して、*phyA* と *phyB* どちらの分子種がこの発現抑制に関与しているかについて検討した。

その結果、光による *PHYA* 遺伝子の発現制御には、成熟イネでは *phyA* と *phyB* の両者が関与している（図 3-10-C）ものの、幼苗期においては *phyB* のみを介した赤色光シグナルによって発現が抑制されていること（図 3-10-B）が明らかとなった。

Endo ら（2005）によると、シロイヌナズナでは葉肉細胞特異的な発現特性を持たせた *phyB-GFP* は *phyB* 変異の早咲きの表現型を相補することができるが、維管束特異的な発現特性を持たせた *phyB-GFP* は相補できない。彼らの結果は *phyB* が機能するために適切な発現部位は葉肉細胞であることを示唆している。残念ながら、本研究では *PHYB* 遺伝子の展開した成葉における発現部位について、*PHYB:GUS*（図 3-3-A）と *in situ*

hybridization (図 3-11-A)のいずれの手法でも明確なシグナルを得ることが出来なかったが、若い植物の未抽出葉を用いた *in situ* hybridization 解析からイネの *PHYB* 遺伝子が葉身の組織全体で発現している(図 3-11-B)ことを示すことは出来た。従って、イネにおいてもシロイヌナズナ同様に *PHYB* 遺伝子の本質的な発現部位は葉肉細胞であって、少なくとも幼苗では、葉肉細胞で発現している *phyB* の Pfr 型が *PHYA* 遺伝子の発現を抑制していると考えられる。この推測を模式的に表すと図 3-12 のようになる。フィトクロム自身には DNA 結合活性は認められないことから、*phyB* は未知の転写抑制因子 X の転写あるいは活性化を促すことを介して *PHYA* 遺伝子の発現を抑制していると想定される。

図表

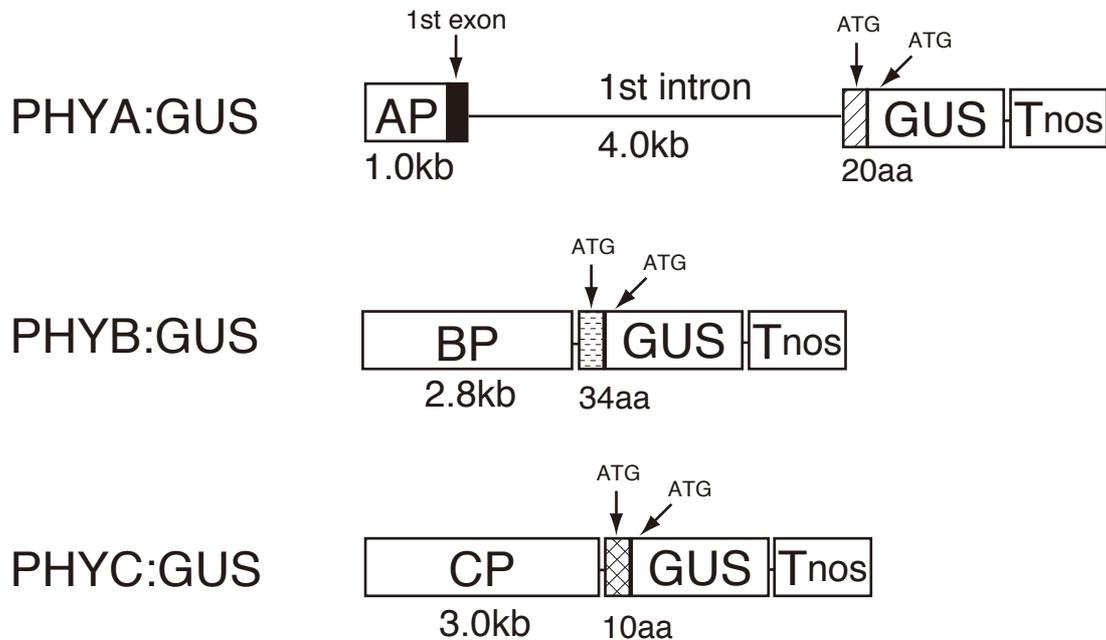


図 3-1. 実験に用いたフィトクロームプロモーター: GUS コンストラクトの模式図

PHYA:GUS と *PHYB:GUS* そして *PHYC:GUS* はそれぞれ、第 1 章の *PHYA:PHYA*、*PHYB:PHYB*、*PHYC:PHYC* のフィトクローム cDNA 部分を GUS 遺伝子に置き換えることにより作製した。その結果として、*PHYA:GUS* は phyA タンパク質 N 末端の 20 アミノ酸残基、*PHYB:GUS* は phyB N 末端の 34 アミノ酸残基、*PHYC:GUS* は phyC N 末端の 10 アミノ酸残基と GUS (β -glucuronidase) との融合タンパク質を発現する

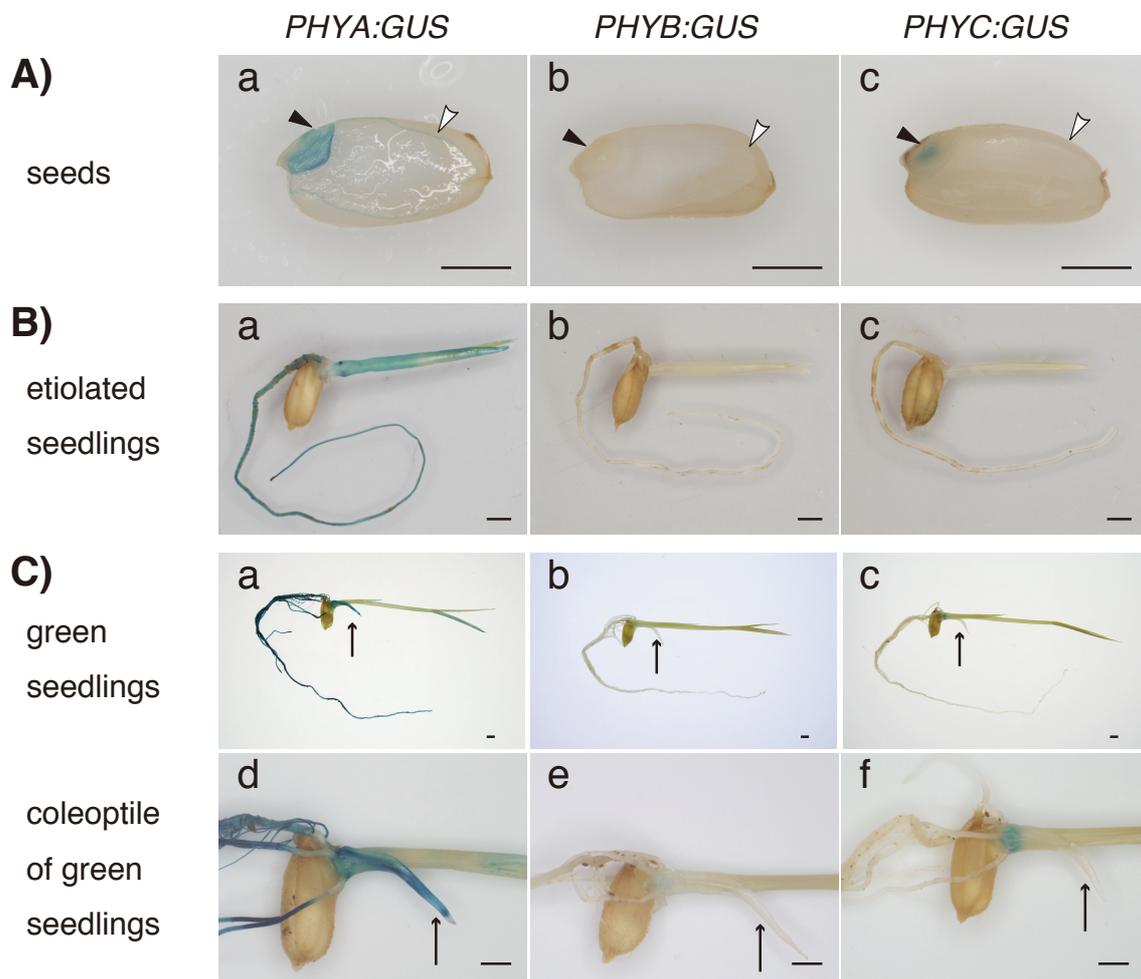


図 3-2. 幼植物期 (WT) におけるフィトクロムプロモーター GUS の組織特異性の解析

A) 成熟種子断面；矢じり（黒あるいは白）は順に胚および果皮を示す；(a) *PHYA:GUS*、(b) *PHYB:GUS* (B,C についても同様)；染色条件は 37°C で、順に、1 時間、24 時間、24 時間 (B,C についても同様) B) 暗所芽生え (播種後 3 日目) C) 明所芽生え (播種後 9 日目)；(d)、(e)、(f) は順に (a)、(b)、(c) の高倍率画像；矢印は幼葉鞘を示す

各形質転換系統で典型的な染色パターンをデータとして掲載した。スケールバーは全て 2.0mm を示す

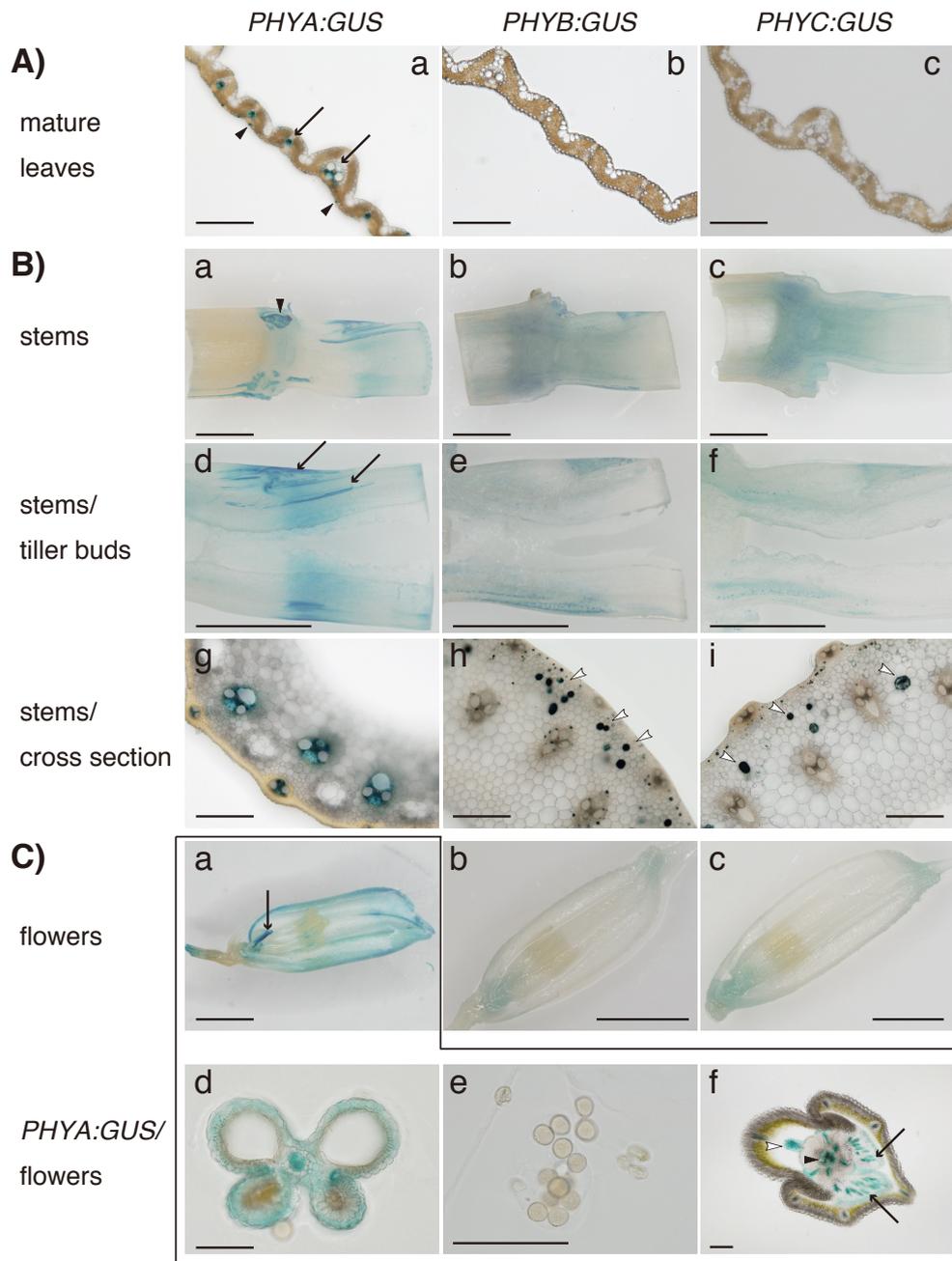


図 3-3. 成熟期 (WT) におけるフィトクロムプロモーター GUS の組織特異性の解析
 A) 成熟葉 ; (a) *PHYA:GUS*、(b) *PHYB:GUS*、(c) *PHYC:GUS* (B,C についても同様) ;
 矢印は維管束を矢じりは毛茸を示す ; Bars = 0.2 mm B) 花茎 ; 縦断切片 (a-f)、横
 断切片 (g-i) ; (d)、(e)、(f) は順に (a)、(b)、(c) の高倍率画像 ; 矢印は維管束を矢じ
 りは nodal vascular anastomosis を示す ; Bars= 2.0 mm (a-f) 、0.2 mm (g-i) C) 穎花 ;
 (d) は *PHYA:GUS* の葯の横断面 ; (e) は *PHYA:GUS* の花粉 ; (f) は *PHYA:GUS* の穎
 花 (a) の横断面 ; スケールバーは 0.2mm (a-c) 、0.2 mm (d-h) を順に示す

A) Dark-grown Seedling

B) Light-grown Seedling

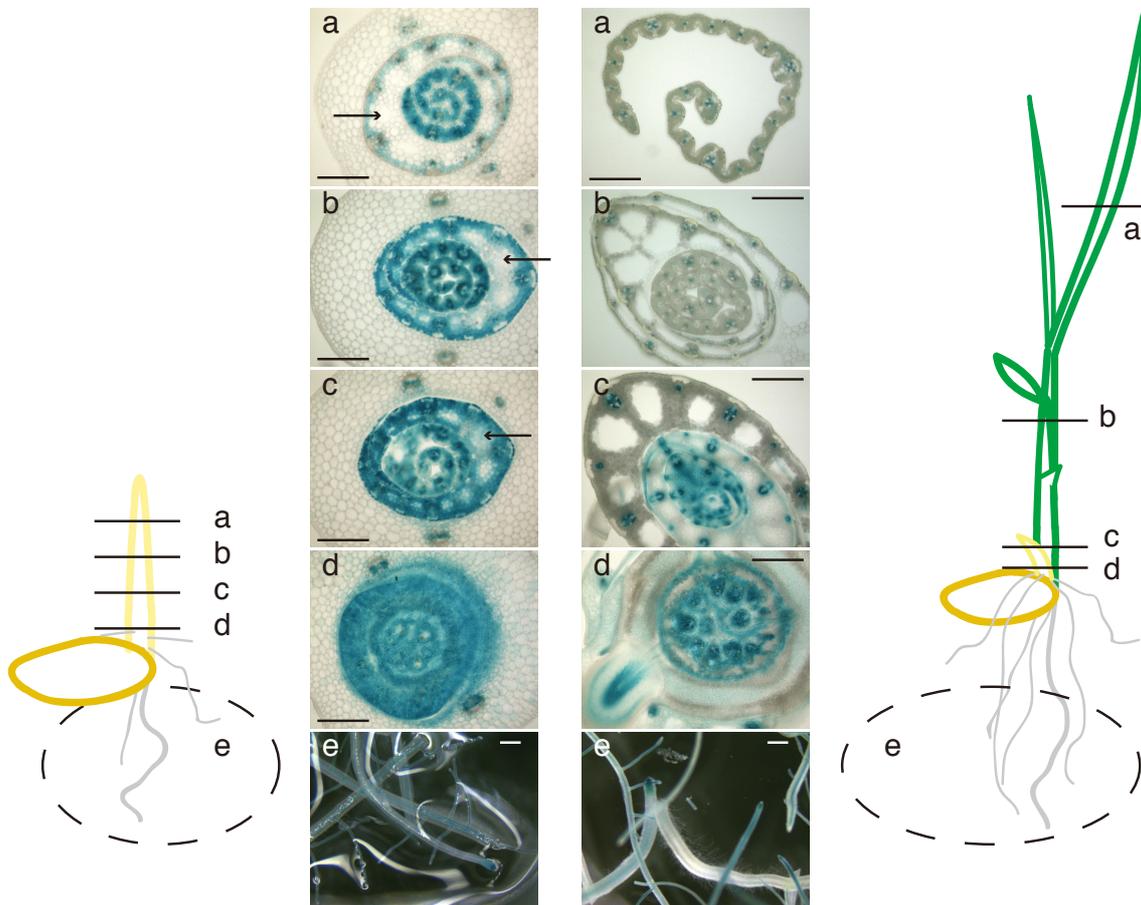
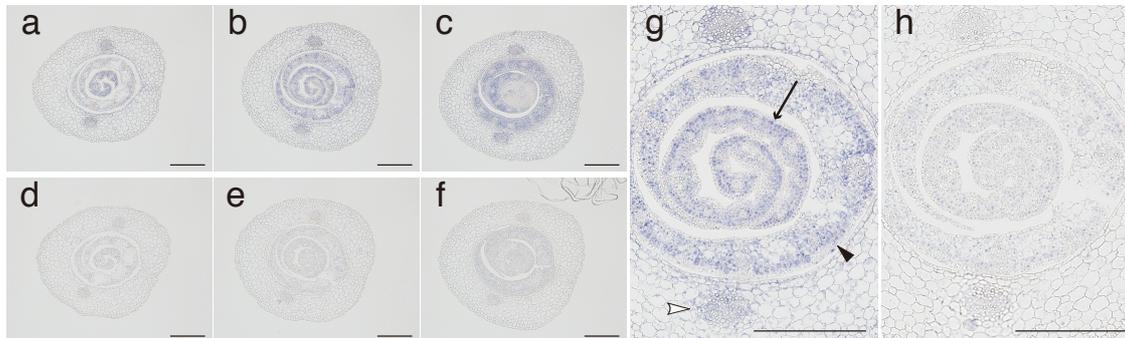


図 3-4. 暗所あるいは明所芽生えにおける *PHYA:GUS* の組織特異性の解析
 (A) 播種後 3 日目の暗所芽生えの連続横断切片；地上部先端から (b) 基部まで（顕微鏡） (e) 根（実体顕微鏡）；右のイラストに写真の横断面の位置に示した；矢印は発達途中の破生間隙
 (B) 播種後 9 日目の明所芽生えの連続横断切片；地上部先端から (b) 基部まで（顕微鏡） (e) 根（実体顕微鏡）；左のイラストに写真の横断面の位置に示した；矢印は発達途中の破生間隙
 各形質転換系統で典型的な染色パターンをデータとして取得した。スケールバーは 0.2mm を示す

A) etiolated seedling



B) flower

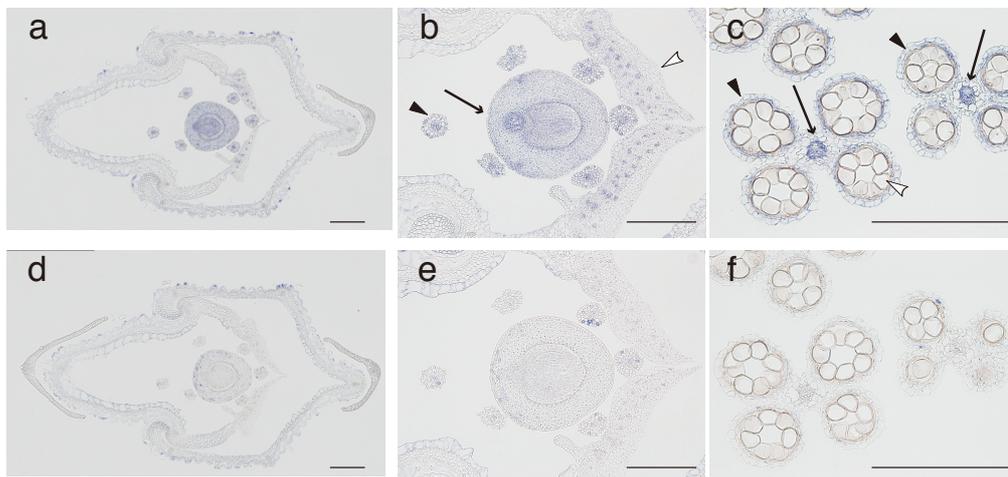


図 3-5. *in situ* hybridization による内在性 *PHYA* mRNA の組織特異性の解析
 (A) 暗所芽生え (播種後 3 日目) ; (a, b, c, g) アンチセンスプローブによる *PHYA* mRNA シグナルの検出 ; (d, e, f, h) センスプローブによるバックグラウンドの検出 : 横断切片の植物体における位置は (a/d), (b/e), (c/f) の順に図 3-4 の (a), (b), (c) に該当する ; (g, h) は (b, e) の高倍率画像 ; 矢じり (白)、(黒)、矢印は、順に、幼葉鞘、葉鞘 (未抽出)、葉身 (未抽出) の維管束を示す (B) 出穂前の若い穎花 ; (a, b, c,) アンチセンスプローブによる *PHYA* mRNA シグナルの検出 ; (d, e, f,) センスプローブによるバックグラウンドの検出 ; (b, e) は (a, d) の高倍率画像 ; b の矢じり (白)、(黒)、矢印は、順に、鱗被、花糸、子房を示す ; c の矢じり (白)、(黒)、矢印は、順に、花粉、葯壁、花糸を示す
 スケールバーは 0.2mm を示す

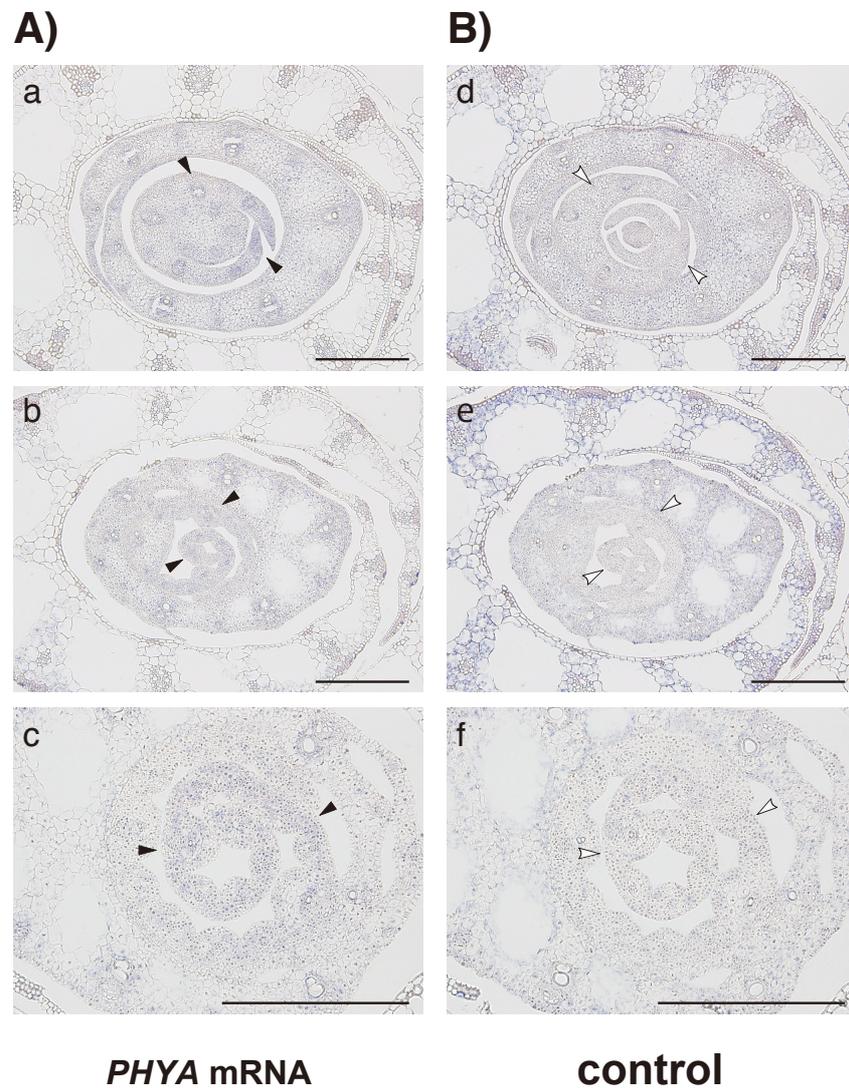


図 3-6. 未抽出の葉および葉鞘における *PHYA* mRNA の *in situ* hybridization 解析
 播種後9日目の明所芽生えの *in situ* hybridization 解析；*PHYA* アンチセンスプローブ
 (A-a, b, c)；*PHYA* センスプローブ (B-d, e, f)；
 (A) 未抽出の葉および葉鞘において検出される維管束特異的な *PHYA* mRNA シグナル
 を矢じり（黒）で示した。(B) 未抽出の葉および葉鞘における弱いバックグラウンドシ
 グナルを矢じり（白）で示した。一方、外側に露出した組織では強いバックグラウンド
 シグナルが検出される。；スケールバーは 0.2mm を示す

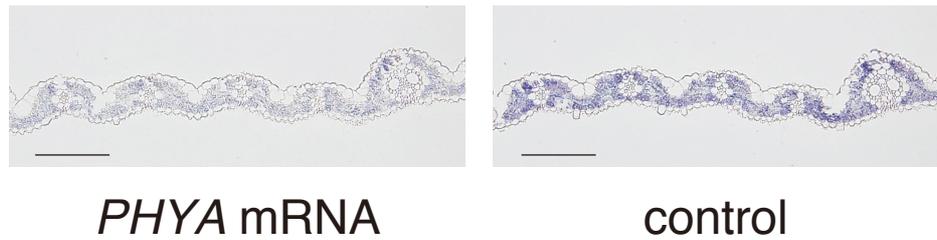


図 3-7. 光環境下で生育したイネ展開葉における *PHYA* mRNA の *in situ* hybridization 解析
PHYA アンチセンスプローブによるシグナル（左）は葉身全体で観察されるが、センスプローブによるバックグラウンド（右）がこれより強いため、*PHYA* mRNA のシグナルを同定できない；スケールバーは 0.2mm を示す

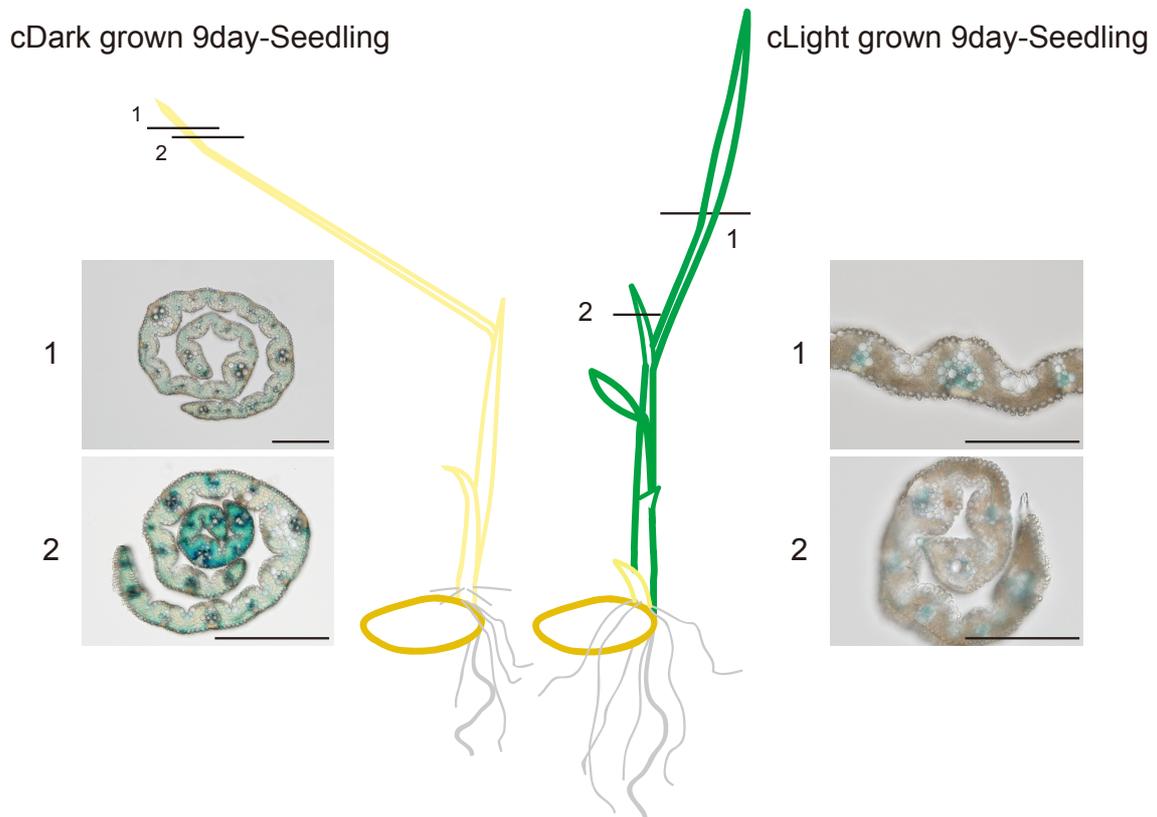


図 3-8. 播種後 9 日目の暗所あるいは明所芽生え葉身における *PHYA:GUS* の組織特異性
 (左) 播種後 9 日目の暗所芽生えの第 3 葉 (1) およびその内側にある第 4 葉 (2) の GUS 染色像；(右) 播種後 9 日目の明所芽生えの第 3 葉 (1) および第 4 葉 (2) の GUS 染色像；スケールバーは 0.2mm を示す

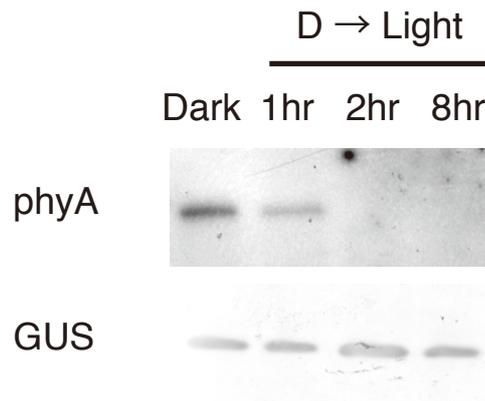
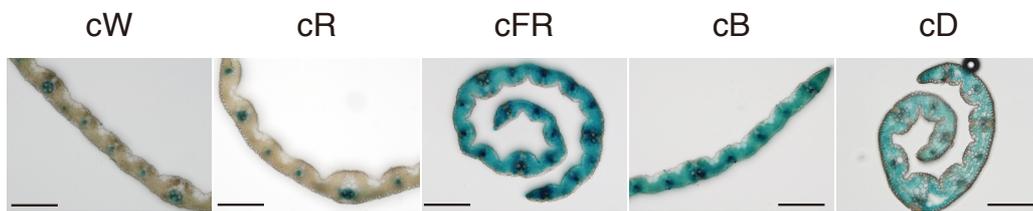


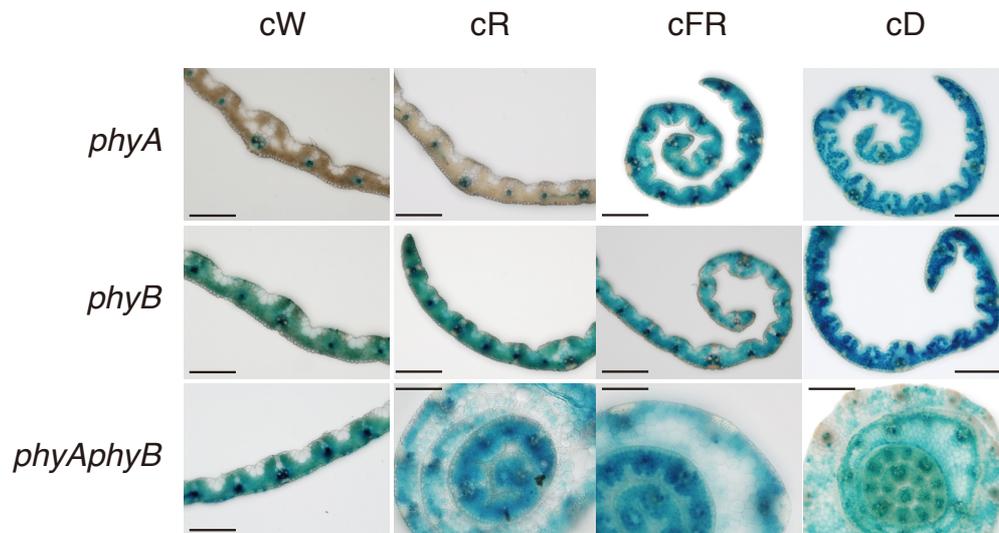
図 3-9. *PHYA:GUS* 形質転換イネから抽出した phyA および GUS タンパク質のウェスタンブロット解析

phyA の N 末端領域の付加が GUS タンパク質の安定性に影響しているか否かを 4 日間暗所で生育した幼苗を白色光照射下に移動する実験より検討した。解析に用いたタンパク質は暗所 4 日目 (Dark)、白色高照射 1 時間 (1hr)、2 時間 (2hr)、8 時間 (8hr) の 4 点で抽出した。内在性の phyA タンパク質は黄化した幼苗において大量に蓄積しているが、光照射によって速やかに分解され、2 時間でほぼ完全に消失する。一方、本研究で用いた phyA の N 末端領域を付加した GUS 融合タンパク質は、光に対して安定であることが分かる。

A) seedling leaf (wild type)



B) seedling leaf (phytochrome mutant)



C) mature leaf (natural light conditions)

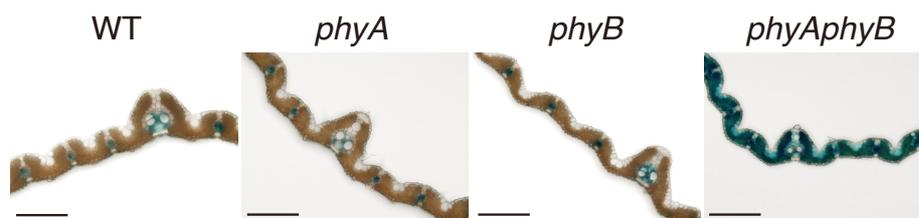
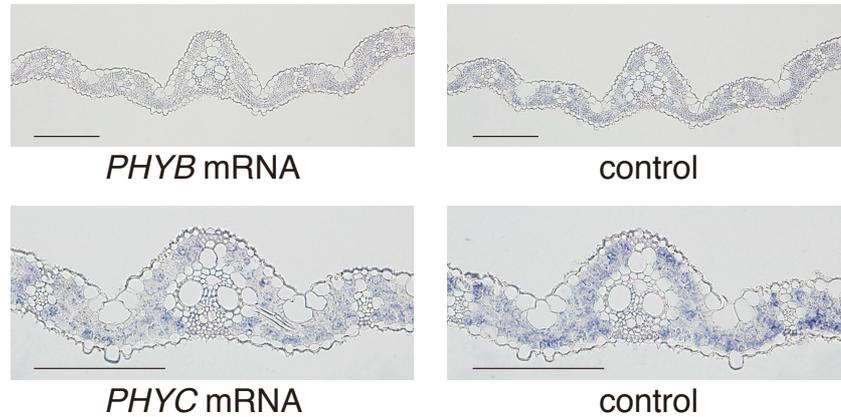


図 3-10. イネ葉身における *PHYA:GUS* 遺伝子発現パターンを制御する光シグナルおよびその受容体の同定

(A) 野生型背景の *PHYA:GUS* 形質転換イネの幼葉を用いた単色光照射実験；cW: 連続白色光照射条件，cR: 連続赤色光照射条件，cFR: 連続遠赤色光照射条件，cB: 連続青色光照射条件，cD: 連続暗条件 (B) フィトクロム変異背景の *PHYA:GUS* 形質転換イネの幼葉を用いた単色光照射実験 (C) *PHYA:GUS* 形質転換イネの成葉におけるフィトクロム変異背景による *PHYA:GUS* 遺伝子発現パターンの変化；スケールバーは 0.2mm を示す

A) fully expanded leaf



B) pre-emergent leaf

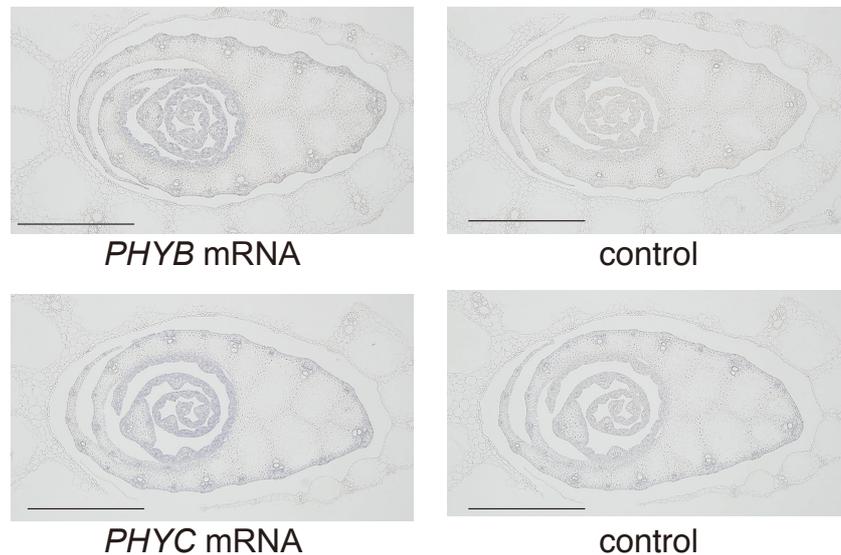


図 3-11. 成葉および未抽出の葉における *PHYB* mRNA と *PHYC* mRNA の *in situ* hybridization 解析
PHYB と *PHYC* プローブを用いた *in situ hybridization* 解析；アンチセンスプローブにてそれぞれの mRNA シグナルを検出、センスプローブでバックグラウンドを検出した；解析に供した植物の発育ステージは図 3-7 と同じ時期である；スケールバーは 0.2mm
(A) 最上位展開葉を用いての *in situ hybridization* 解析；アンチセンスプローブ（左）で葉肉細胞にシグナルが検出されるが、センスプローブ（右）のバックグラウンドシグナルの方が強いため、*PHYB* と *PHYC* の mRNA シグナルを同定できない (B) 未抽出の葉身ではバックグラウンドシグナル(左)は弱く、*PHYB* と *PHYC* の mRNA シグナル(右)が葉身全体に分布していることが検出できる。

[seedling leaf]

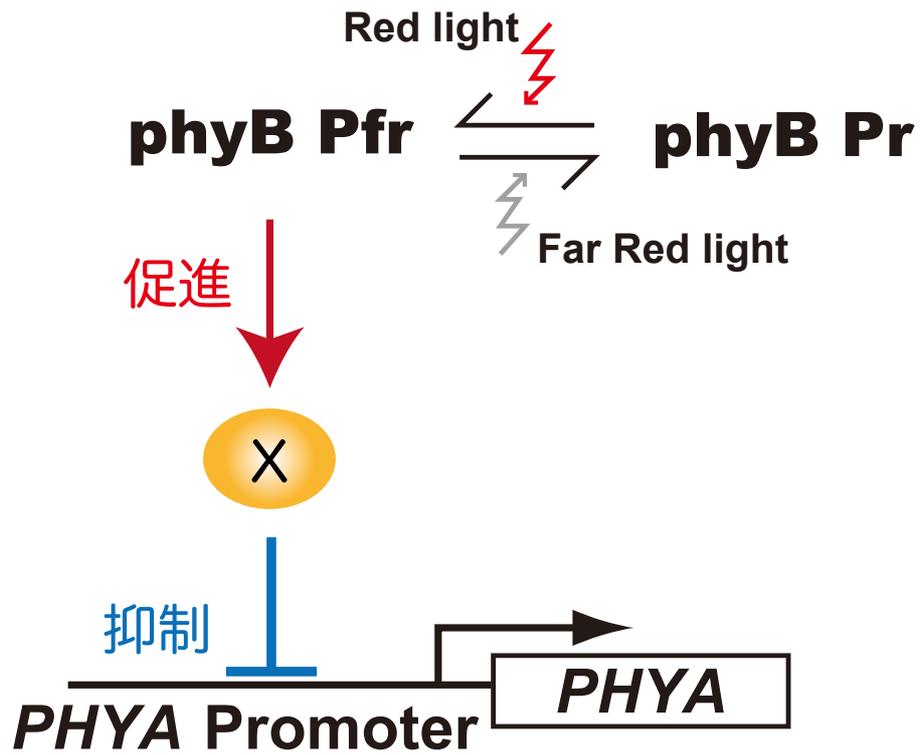


図 3-12. 幼葉の葉肉細胞で赤色光が phyB を介して *PHYA* 遺伝子の発現を抑制する機構

結論

本研究により、イネ・*phyA* の赤色光受容というユニークな特性に内生の発現制御領域からの光応答性の発現が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。緒論で設定した問い「*phyB* と *phyA* の光受容機能の相違と類似は 1) 質：タンパク質構造 と 2) 量：発現量や局在性 のどちらに起因しているのだろうか？」に対して、イネにおける *phyB* と *phyA* の光受容機能の類似（赤色光受容）は、1) 質：タンパク質構造ではなくて、2) 量：発現量や局在性 に起因しているという答えを得ることができた。

第1章のフィトクロム発現制御領域：cDNA の結果と第2章のプロモータースワップ解析の結果は、*phyA* の機能発現には *PHYA* 発現制御領域からの発現が必要であることを示している。第3章で示された *PHYA* 発現制御領域の維管束特異的な発現は、赤色光を受容した *phyB* によって維管束以外での発現が大きく抑制されることを反映したもので、これを考慮すると、cR(赤色光照射下の) *phyB* 変異体では、暗所 (cD) 同様に大量の *phyA* が発現していることになる。ただし、cR においては、大量に発現した *phyA* は、同時に、光受容により大量に分解されていると考えられ (Clough と Vierstra, 1997 ; Hennig ら, 1999)、これのみではイネにおける *phyA* の赤色光受容機構を説明することはできない。

1990年代に、*phyA* には翻訳後に何らかの修飾を受けることによって光に安定なタイプとなった *phyA* (以降 *phyA*"と表記) がわずかな割合で混在しているという説が提唱された (Sineshchekov, 1994 ; Sineshchekov, 1998 ; Sineshchekov, 2004)。近年になって、シロイヌナズナの *phyA* も $160 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ 以上の強い光が連続照射される条件では赤色光を受容できることが報告され (Franklin ら, 2007)、*phyA* 以外のフィト

クロムが欠損したシロイヌナズナの *phyBphyCphyDpyhE* 4 重変異体が自然光下では健全に生育することなどから(Strasser ら、2010)、従来から提唱されていた緑化植物における *phyA* の機能 (Franklin ら、2003 ; Johnson ら、1994 ; Lin ら、2000 ; Yanovsky ら、1995) が立証された。Franklin (2007) らによると、強光下での *phyA* による赤色光受容は細胞核内で起きる photoprotection により、Pfr 型 *phyA* が分解から守られることにより成立すると考えており、*phyA*”と同じものを見ている可能性がある。*phyA*”については双子葉植物でも単子葉植物でも認められる普遍的な *phyA* の性質であると言われており

(Sineshchekov、1994 ; Sineshchekov、1998)、イネにおいて赤色光を受容している *phyA* も *phyA*”あるいは photoprotection された *phyA* であると考えられる。そうならば、第 2 章で示された低発現量の *phyB* が模倣する *phyA* も上述の光に対して安定化した *phyA*”あるいは photoprotected *phyA* と考えられる。つまり、光に対して安定なフィトクロムが適当量存在することが cR における *phyA* の機能の実態であり、タンパク質構造よりも発現量や局在性の方が重要であるという第 2 章の結果を説明することができる。

上記の *phyA*”あるいは photoprotection という考え方に、イネの *phyA* による赤色光受容が *phyB* 変異背景でのみ観察されることを加味すると、*phyB* が存在しないために cR にも関わらず大量に *PHYA* 遺伝子が発現した結果として *phyA*”の存在量が増えてその機能が顕在化した、というのがイネにおける *phyA* の赤色光受容機構と考えられる(図 4)。連続赤色光照射下の *phyB* 変異イネにおける *phyA*”タンパク質の植物体内での分布は、*PHYB* 遺伝子の組織特異性に類似した全体的なパターンになり、かつ、低発現であることが予測される。

第 3 章で明らかになったイネ・*PHYA* 発現制御領域の発現特性 (Pfr 型 *phyB* による発現抑制) と、第 2 章で明らかになったイネ・*phyA* の赤色光受容は *phyB* によって模倣

できるという事実に生物学的な意義はあるのだろうか？現時点では仮説に過ぎないが、イネ・*PHYA* 発現制御領域の発現特性は、*phyB* の機能が失われたときの補償に *phyA* を利用するために、イネなどの単子葉植物で発達したものではないか、と私は考えている。イネ同様に、単子葉植物ではフィトクロムの分子種構成は基本的に *phyA*, *phyB*, *phyC* の3種類と単純なものになっている。これに対して、ナデシコ目を除く双子葉植物では *phyB* の類縁分子種が複数有り、シロイヌナズナには *phyB* 類縁の *phyD* と *phyE* を加えた5分子種のフィトクロムがある (Mathews, 2006)。自然光下で生活する緑化植物にとって最も重要なフィトクロムは *phyB* である。双子葉植物はこれを補うために *phyB* 類縁分子種を増やし、単子葉植物は *PHYA* 発現制御領域を発達させた。その戦略の違いがイネ・*phyA* の特性として本研究の結果に現れているのではないだろうか。単子葉、双子葉ともに研究対象植物種を拡げることにより、近い将来に、この仮説を検証することができるであろう。

図表

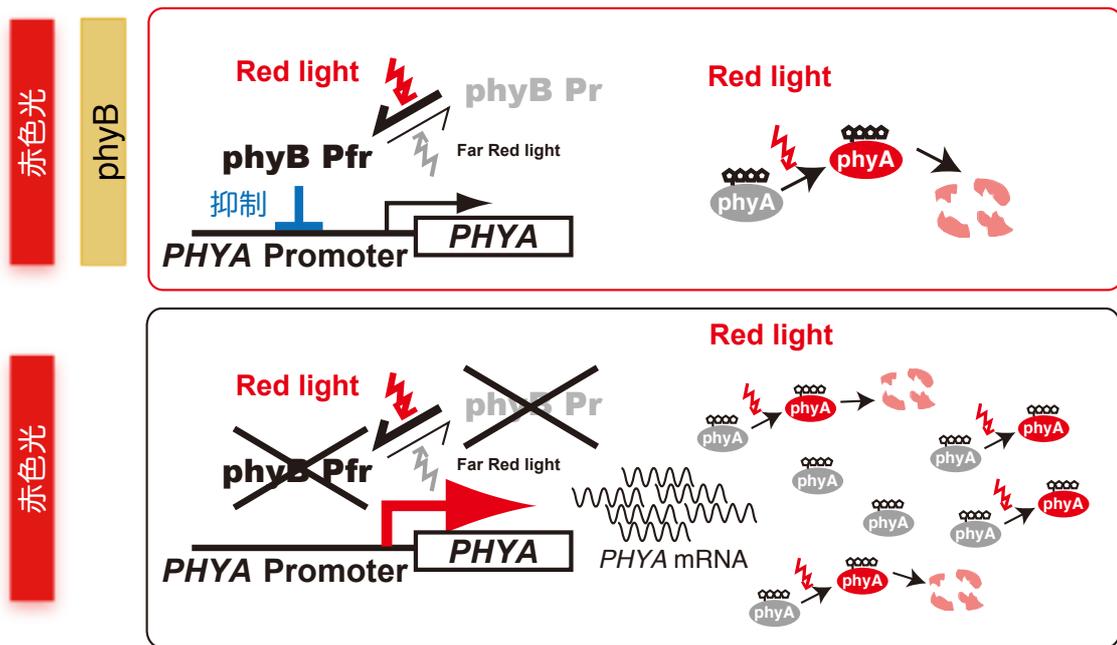


図 4. イネにおける phyA の赤色光受容メカニズム

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導、ご鞭撻を頂きました独立行政法人農業生物資源研究所の高野誠博士には心より感謝申し上げます。また、同研究所（旧）光環境応答ユニット光応答サブグループの研究員の皆様には、グループセミナーおよび日常のディスカッションを通じ実験の指導および数々のご助言を頂きましたこと感謝申し上げます。同サブグループの研究支援者の皆様、特に、井口裕見子様には、実験器具および実験材料の管理などの支援に感謝申し上げます。

同農業生物資源研究所研究支援グループの原奈穂様には *in situ hybridization* の実験支援をして頂きました。同グループ田切明美様には同実験に数々のご助言を頂きました。同研究所植物生産生理機能研究ユニットの市川裕章博士にはプラスミド構築に用いた pMCS5 および植物の形質転換用ベクター pSMAH を分与して頂き、実験全般にわたるご助言と数々の激励を頂きました。さらに、同研究所生体分子研究ユニットの山崎俊正博士と大阪大学蛋白質研究所の児島長次郎准教授には変異型 *phyB* の情報とアミノ酸変異導入の鋳型となるプラスミドを分与して頂きました。この場を借りて感謝の意を申し上げます。

最後になりましたが、連携大学院在学中およびこの度の学位申請にあたり多大なるご尽力とご支援を頂きました同農業生物資源研究所の山本敏央博士に深く感謝いたします。

参考文献

- Abe H., Yamamoto K., Nagatani A. & Furuya M. (1985) Characterization of green tissue-specific phytochrome isolated immunologically from pea seedlings. *Plant Cell Physiol*, **26**, 1387-1399.
- Adam E., Kozma-Bognar L., Kolar C., Schafer E. & Nagy F. (1996) The Tissue-Specific Expression of a Tobacco Phytochrome B Gene. *Plant Physiol*, **110**, 1081-1088.
- Adam E., Szell M., Szekeres M., Sheaffer E. & Nagy F. (1994) The developmental and tissue-specific expression of tobacco phytochrome-A genes. *Plant Journal*, **6** 283-293.
- Ahmad M. & Cashmore A.R. (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, **366**, 162-166.
- Bae G. & Choi G. (2008) Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu Rev Plant Biol*, **59**, 281-311.
- Basu D., Dehesh K., Schneider-Poetsch H.J., Harrington S.E., McCouch S.R. & Quail P.H. (2000) Rice PHYC gene: structure, expression, map position and evolution. *Plant Molecular Biology*, **44**, 27-42.
- Borthwick H.A., Hendricks S.B., Parker M.W., Toole E.H. & Toole V.K. (1952) A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **38**, 662-666.
- Bruce W.B., Deng X.W. & Quail P.H. (1991) A negatively acting DNA sequence element mediates phytochrome-directed repression of phyA gene transcription. *EMBO J*, **10**, 3015-3024.
- Bruce W.B. & Quail P.H. (1990) cis-acting elements involved in photoregulation of an oat phytochrome promoter in rice. *Plant Cell*, **2**, 1081-1089.

- Butler W.L., Norris K.H., Siegelman H.W. & Hendricks S.B. (1959) DETECTION, ASSAY, AND PRELIMINARY PURIFICATION OF THE PIGMENT CONTROLLING PHOTORESPONSIVE DEVELOPMENT OF PLANTS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **45**, 1703-1708.
- Cherry J.R., Hondred D., Walker J.M. & Vierstra R.D. (1992) Phytochrome requires the 6-kDa N-terminal domain for full biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5039-5043.
- Christensen A.H. & Quail P.H. (1989) Structure and expression of a maize phytochrome-encoding gene. *Gene*, **85**, 381-390.
- Clack T., Mathews S. & Sharrock R.A. (1994) The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol*, **25**, 413-427.
- Clack T., Shokry A., Moffet M., Liu P., Faul M. & Sharrock R. (2009) Obligate Heterodimerization of Arabidopsis Phytochromes C and E and Interaction with the PIF3 Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor. *Plant Cell*.
- Clough R.C. & Vierstra R.D. (1997) Phytochrome degradation. *Plant Cell Environ.* **20**, 713-721.
- Debrieux D., Trevisan M. & Fankhauser C. (2013) Conditional involvement of constitutive photomorphogenic1 in the degradation of phytochrome A. *Plant Physiol*, **161**, 2136-2145.
- Dehesh K., Bruce W.B. & Quail P.H. (1990) A trans-acting factor that binds to a GT-motif in a phytochrome gene promoter. *Science*, **250**, 1397-1399.
- Dehesh K., Tepperman J., Christensen A.H. & Quail P.H. (1991) phyB is evolutionarily conserved and constitutively expressed in rice seedling shoots. *Mol Gen Genet*, **225**, 305-313.

- Dehesh K., Franci C., Parks B.M., Seely K.A., Short T.W., Tepperman J.M. & Quail P.H. (1993) *Arabidopsis* HY8 locus encode phytochrome A. *Plant Cell*, **5**, 1081-1088.
- Dieterle M., Bauer D., Büche C., Krenz M., Schäfer E. & Kretsch T. (2005) A new type of mutation in phytochrome A causes enhanced light sensitivity and alters the degradation and subcellular partitioning of the photoreceptor. *Plant J*, **41**, 146-161.
- Endo M., Nakamura S., Araki T., Mochizuki N. & Nagatani A. (2005) Phytochrome B in the mesophyll delays flowering by suppressing FLOWERING LOCUS T expression in *Arabidopsis* vascular bundles. *Plant Cell*, **17**, 1941-1952.
- Franklin K., Allen T. & Whitelam G. (2007) Phytochrome A is an irradiance-dependent red light sensor. *Plant J*, **50**, 108-117.
- Franklin K., Praekelt U., Stoddart W., Billingham O., Halliday K. & Whitelam G. (2003) Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **131**, 1340-1346.
- Franklin K. & Whitelam G. (2007) Red: far-red ratio perception and shade avoidance. In *Light and Plant Development*, ed. G. Whitelam, K. Halliday, pp. 211-234. Oxford: Blackwell
- Fruya M. (1989) Molecular properties and biogenesis of phytochrome I and II. *Adv. Biophys*, **25**, 133-167.
- Fry R.C., Habashi J., Okamoto H. & Deng X.W. (2002) Characterization of a strong dominant phytochrome A mutation unique to phytochrome A signal propagation. *Plant Physiol*, **130**, 457-465.
- Goosey L., Palecanda L. & Sharrock R.A. (1997) Differential patterns of expression of the *Arabidopsis* PHYB, PHYD, and PHYE phytochrome genes. *Plant Physiol*, **115**, 959-969.
- Hennig L., Büche C., Eichenberg K. & Schäfer E. (1999) Dynamic properties of endogenous phytochrome A in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol*, **121**, 571-577.

- Hennig L., Stoddart W.M., Dieterle M., Whitelam G.C. & Schäfer E. (2002) Phytochrome E controls light-induced germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **128**, 194-200.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T. & Kumashiro T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, **6**, 271-282.
- Hirschfeld M., Tepperman J.M., Clack T., Quail P.H. & Sharrock R.A. (1998) Coordination of phytochrome levels in phyB mutants of *Arabidopsis* as revealed by apoprotein-specific monoclonal antibodies. *Genetics*, **149**, 523-535.
- Huala E., Oeller P.W., Liscum E., Han I.S., Larsen E. & Briggs W.R. (1997) *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science*, **278**, 2120-2123.
- Iwamoto M., Higo K. & Takano M. (2009) Circadian clock- and phytochrome-regulated Dof-like gene, *Rdd1*, is associated with grain size in rice. *Plant Cell Environ*, **32**, 592-603.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. & Bevan M.W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, **6**, 3901-3907.
- Johnson E., Bradley M., Harberd N.P. & Whitelam G.C. (1994) Photoresponses of Light-Grown phyA Mutants of *Arabidopsis* (Phytochrome A Is Required for the Perception of Daylength Extensions). *Plant Physiol*, **105**, 141-149.
- Jordan E., Hatfield P., Hondred D., Talon M., Zeevaart J. & Vierstra R. (1995) Phytochrome A overexpression in transgenic tobacco. Correlation of dwarf phenotype with high concentrations of phytochrome in vascular tissue and attenuated gibberellin levels. *Plant Physiol*, **107**, 797-805.
- Kay S.A., Keith B., Shinozaki K. & Chua N.H. (1989a) The sequence of the rice phytochrome gene. *Nucleic Acids Res*, **17**, 2865-2866.

- Kay S.A., Keith B., Shinozaki K., Chye M.L. & Chua N.H. (1989b) The rice phytochrome gene: structure, autoregulated expression, and binding of GT-1 to a conserved site in the 5' upstream region. *Plant Cell*, **1**, 351-360.
- Kim J.I., Shen Y., Han Y.J., Park J.E., Kirchenbauer D., Soh M.S., Nagy F., Schäfer E. & Song P.S. (2004) Phytochrome phosphorylation modulates light signaling by influencing the protein-protein interaction. *Plant Cell*, **16**, 2629-2640.
- Komeda Y., Yamashita H., Sato N., Tsukaya H. & Naito S. (1991) Regulated Expression of a Gene-Fusion Product Derived from the Gene for Phytochrome I from *Pisum sativum* and the *uidA* Gene from *E. coli* in Transgenic *Petunia hybrida* *Plant Cell Physiol*, **32** 737-743.
- Kosugi S., Ohashi Y., Nakajima K. & Arai Y. (1990) An improved assay for B-glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous B-glucuronidase activity. *Plant Sci.*, **70**, 133-140.
- Lapko V.N., Jiang X.Y., Smith D.L. & Song P.S. (1997) Posttranslational modification of oat phytochrome A: phosphorylation of a specific serine in a multiple serine cluster. *Biochemistry*, **36**, 10595-10599.
- Lapko V.N., Jiang X.Y., Smith D.L. & Song P.S. (1999) Mass spectrometric characterization of oat phytochrome A: isoforms and posttranslational modifications. *Protein Sci*, **8**, 1032-1044.
- Lapko V.N., Wells T.A. & Song P.S. (1996) Protein kinase A-catalyzed phosphorylation and its effect on conformation in phytochrome A. *Biochemistry*, **35**, 6585-6594.
- Li J., Li G., Wang H. & Wang Deng X. (2012) Phytochrome signaling mechanisms. *Arabidopsis Book*, **9**, e0148.
- Lin C. (2000) Photoreceptors and regulation of flowering time. *Plant Physiol.* **123**, 39-50

- Lissemore J.L., Colbert J.T. & Quail P.H. (1987) Cloning of cDNA for phytochrome from etiolated cucurbita and coordinate photoregulation of the abundance of 2 distinct phytochrome transcripts. *Plant Molecular Biology*, **8**, 485-496.
- Lissemore J.L. & Quail P.H. (1988) Rapid transcriptional regulation by phytochrome of the genes for phytochrome and chlorophyll a/b-binding protein in *Avena sativa*. *Mol Cell Biol*, **8**, 4840-4850.
- Martínez-García J.F. & Quail P.H. (1999) The HMG-I/Y protein PF1 stimulates binding of the transcriptional activator GT-2 to the PHYA gene promoter. *Plant J*, **18**, 173-183.
- Mathews S. (2006) Phytochrome-mediated development in land plants: red light sensing evolves to meet the challenges of changing light environments. *Mol Ecol*, **15**, 3483-3503.
- Mathews S. & Sharrock R.A. (1997) Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ.*, **20** 666-671.
- McMichael R.W. & Lagarias J.C. (1990) Phosphopeptide mapping of *Avena* phytochrome phosphorylated by protein kinases in vitro. *Biochemistry*, **29**, 3872-3878.
- Monte E., Alonso J.M., Ecker J.R., Zhang Y. & Li X. (2003) Isolation and characterization of phyC mutants in *Arabidopsis* reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. *Plant Cell* **15**, 1962-1980.
- Montgomery B. & Lagarias J. (2002) Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci*, **7**, 357-366.
- Nagatani A. (2004) Light-regulated nuclear localization of phytochromes. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 708-711.

- Nagatani A., Reed J. & Chory J. (1993) Isolation and initial characterization of Arabidopsis mutants that are deficient in Phytochrome A. *Plant Physiol*, **102**, 269-277.
- Nieto-Sotelo J. & Quail P.H. (1994) Cloning and characterization of cDNAs encoding oat PF1: a protein that binds to the PE1 region in the oat phytochrome A3 gene promoter. *Biochem Soc Symp*, **60**, 265-275.
- Osugi A., Itoh H., Ikeda-Kawakatsu K., Takano M. & Izawa T. (2011) Molecular dissection of the roles of phytochrome in photoperiodic flowering in rice. *Plant Physiol*, **157**, 1128-1137.
- Parks B.M. & Quail P.H. (1993) hy8, a new class of Arabidopsis long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell*, **5**, 39-48.
- Quail P., Boylan M., Parks B., Short T., Xu Y. & Wagner D. (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science*, **268**, 675-680.
- Quail P.H. (2002) Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 85-93.
- Quail P.H., Briggs W.R., Chory J., Hangarter R.P., Harberd N.P., Kendrick R.E., Koornneef M., Parks B., Sharrock R.A., Schafer E., Thompson W.F. & Whitelam G.C. (1994) SPOTLIGHT ON PHYTOCHROME NOMENCLATURE. *Plant Cell*, **6**, 468-471.
- Quail P.H., Gatz C., Hershey H.P., Jones A.M., Lissemore J.L., Parks B.M., Sharrock R.A., Barker R.F., Idler K., Murray M.G., Koornneef M. & Kendrick R.E. (1987) *Molecular biology of phytochrome*. Academic Press Inc., Orlando, Florida.
- Quint M., Ito H., Zhang W. & Gray W. (2005) Characterization of a novel temperature-sensitive allele of the CUL1/AXR6 subunit of SCF ubiquitin-ligases. *Plant J*, **43**, 371-383.

- Reed J.W., Nagatani A., Elich T.D., Fagan M. & Chory J. (1994) Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in Arabidopsis Development. *Plant Physiol*, **104**, 1139-1149.
- Reed J.W., Nagpal P., Poole D.S., Furuya M. & Chory J. (1993) Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *PlantCell*, **5**, 147-157.
- Rizzini L., Favory J., Cloix C., Faggionato D., O'Hara A., Kaiserli E., Baumeister R., Schäfer E., Nagy F., Jenkins G. & Ulm R. (2011) Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science*, **332**, 103-106.
- Rockwell N.C., Su Y.S. & Lagarias J.C. (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, **57**, 837-858.
- Sato N. (1988) Nucleotide sequence and expression of the phytochrome gene in *Pisum sativum*: Differential regulation by light of multiple transcripts. *Plant Mol Biol* **11** 697-710
- Seeley K., Byrne D. & Colbert J. (1992) Red Light-Independent Instability of Oat Phytochrome mRNA in Vivo. *Plant Cell*, **4**, 29-38.
- Seo H., Watanabe E., Tokutomi S., Nagatani A. & Chua N. (2004) Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes Dev*, **18**, 617-622.
- Shanklin J., Jabben M. & Vierstra R.D. (1989) Partial purification and peptide mapping of ubiquitin-phytochrome conjugates from oat. *Biochemistry*, **28**, 6028-6034.
- Sharrock R.A. & Clack T. (2004) Heterodimerization of type II phytochromes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11500-11505.
- Sharrock R.A. & Quail P.H. (1989) Novel phytochrome sequences in Arabidopsis thaliana: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev*, **3**, 1745-1757.

- Shinomura T., Nagatani A., Hanzawa H., Kuota M., Watanabe M. & Furuya M. (1996) Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8129-8133.
- Sineshchekov V. (2004) Phytochrome A: functional diversity and polymorphism. *Photochem Photobiol Sci*, **3**, 596-607.
- Sineshchekov V. (1994) Two spectroscopically and photochemically distinguishable phytochromes in etiolated seedlings of monocots and dicots. *Photochem Photobiol*, **59**, 77-86.
- Sineshchekov V.A. (1998) The system of phytochromes: photobiophysics and photobiochemistry in vivo. *Membr Cell Biol*, **12**, 691-720.
- Somers D.E. & Quail P.H. (1995) Temporal and spatial expression patterns of PHYA and PHYB genes in *Arabidopsis*. *Plant J*, **7**, 413-427.
- Strasser B., Sanchez-Lamas M., Yanovsky M.J., Casal J.J. & Cerdan P.D. (2010) *Arabidopsis thaliana* life without phytochromes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 4776-4781.
- Stockhaus J., Nagatani A., Halfter U., Kay S., Furuya M. & Chua N. (1992) Serine-to-alanine substitutions at the amino-terminal region of phytochrome A result in an increase in biological activity. *Genes Dev*, **6**, 2364-2372.
- Su Y. & Lagarias J. (2007) Light-independent phytochrome signaling mediated by dominant GAF domain tyrosine mutants of *Arabidopsis* phytochromes in transgenic plants. *Plant Cell*, **19**, 2124-2139.
- Sun Q., Yoda K. & Suzuki H. (2005) Internal axial light conduction in the stems and roots of herbaceous plants. *J Exp Bot*, **56**, 191-203.
- Sun Q., Yoda K., Suzuki M. & Suzuki H. (2003) Vascular tissue in the stem and roots of woody plants can conduct light. *J Exp Bot*, **54**, 1627-1635.

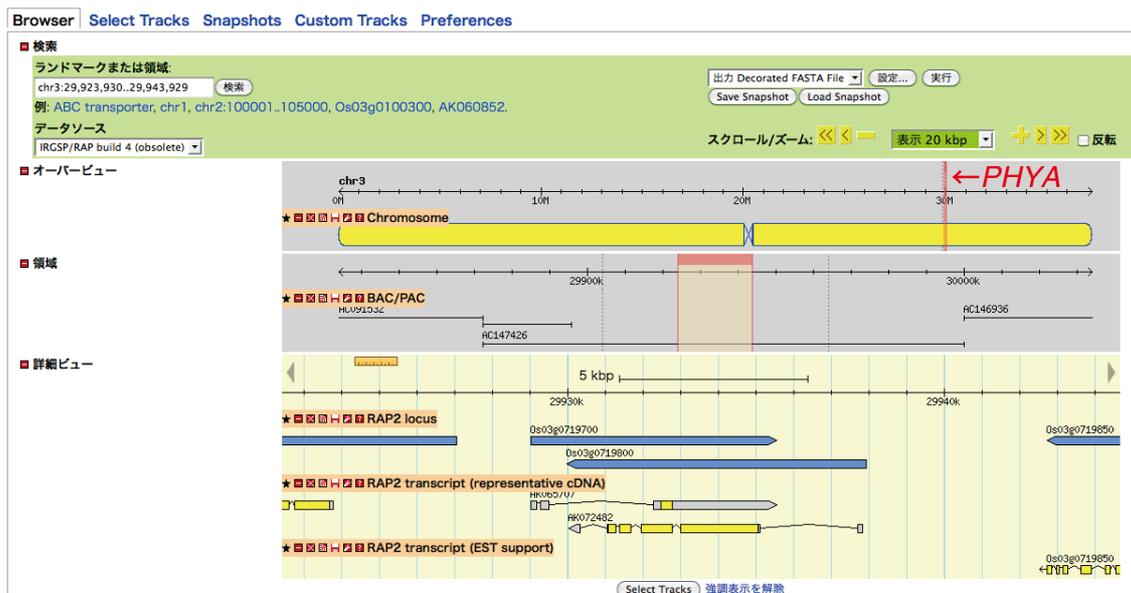
- Tahir M., Kanegae H. & Takano M. (1998) Phytochrome C (*PHYC*) gene in rice: Isolation and characterization of a complete coding sequence. *Plant Physiol.*, **118**
- Takano M., Inagaki N., Xie X., Kiyota S., Baba-Kasai A., Tanabata T. & Shinomura T. (2009) Phytochromes are the sole photoreceptors for perceiving red/far-red light in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 14705-14710.
- Takano M., Inagaki N., Xie X., Yuzurihara N., Hihara F., Ishizuka T., Yano M., Nishimura M., Miyao A., Hirochika H. & Shinomura T. (2005) Distinct and cooperative functions of phytochromes A, B, and C in the control of deetiolation and flowering in rice. *Plant Cell*, **17**, 3311-3325.
- Takano M., Kanegae H., Shinomura T., Miyao A., Hirochika H. & Furuya M. (2001) Isolation and characterization of rice phytochrome A mutants. *Plant Cell*, **13**, 521-534.
- Tepperman J.M., Hwang Y.S. & Quail P.H. (2006) phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of *Arabidopsis* seedling de-etiolation. *Plant J.*, **48**, 728-742.
- Toki S. (1997) Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Molecular Biology Reporter*, **15** 16-21.
- Tokuhisa S.A., Daniels S.M. & Quail P.H. (1985) Phytochrome in green tissue: spectral and immunochemical evidence for two distinct molecular species of phytochrome in light grown *Avena sativa* L. *Planta*, **164** 321-332.
- Tomizawa K.-I., Komeda Y., Sato N., Nagatani A., Iino T. & Furuya M. (1986) Isolation of cDNA for pea phytochrome using an expression vector. *Plant Cell Physiol.*, **27** 1101-1108.

- Trupkin S., Debrieux D., Hiltbrunner A., Fankhauser C. & Casal J. (2007) The serine-rich N-terminal region of Arabidopsis phytochrome A is required for protein stability. *Plant Mol Biol*, **63**, 669-678.
- van Tuinen A., Kerckhoffs L.H., Nagatani A., Kendrick R.E. & Koornneef M. (1995) Far-red light-insensitive, phytochrome A-deficient mutants of tomato. *Mol Gen Genet*, **246**, 133-141.
- Wang H. & Deng X.W. (2003) Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci*, **8**, 172-178.
- Weinmann P., Gossen M., Hillen W., Bujard H. & Gatz C. (1994) A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. *Plant J*, **5**, 559-569.
- Weller J.L., Batge S.L., Smith J.J., Kerckhoffs L.H., Sineshchekov V.A., Murfet I.C. & Reid J.B. (2004) A dominant mutation in the pea PHYA gene confers enhanced responses to light and impairs the light-dependent degradation of phytochrome A. *Plant Physiol*, **135**, 2186-2195.
- Whitelam G.C., Johnson E., Peng J., Carol P., Anderson M.L., Cowl J.S. & Harberd N.P. (1993) Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell*, **5**, 757-768.
- Xie X., Kagawa T. & Takano M. (2014) The phytochrome B/phytochrome C heterodimer is necessary for phytochrome C-mediated responses in rice seedlings. *PLoS One*, **9**, e97264.
- Xie X., Shinomura T., Inagaki N., Kiyota S. & Takano M. (2006) Phytochrome-mediated inhibition of coleoptile growth in rice: age-dependency and action spectra. *Photochem Photobiol*, **83**, 131-138.
- Xu Y., Parks B.M., Short T.W. & Quail P.H. (1995) Missense mutations define a restricted segment in the C-terminal domain of phytochrome A critical to its regulatory activity. *Plant Cell*, **7**, 1433-1443.

Yanovsky M.J., Casal J.J. & Whitelam G.C. (1995) Phytochrome A, phytochrome B and HY4 are involved in hypocotyl growth responses to natural radiation in *Arabidopsis*: weak deetiolation of *phyA* mutant under dense canopies. *Plant Cell Environ.* **18**, 788-794.

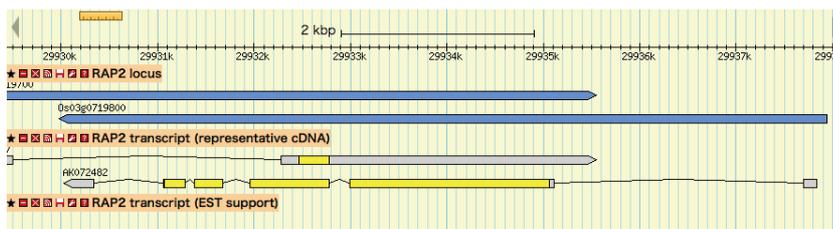
付録

■ IRGSP/RAP build 4 (obsolete): 20 kbp の範囲を chr3 から表示、塩基番号 29,923,930 から 29,943,929



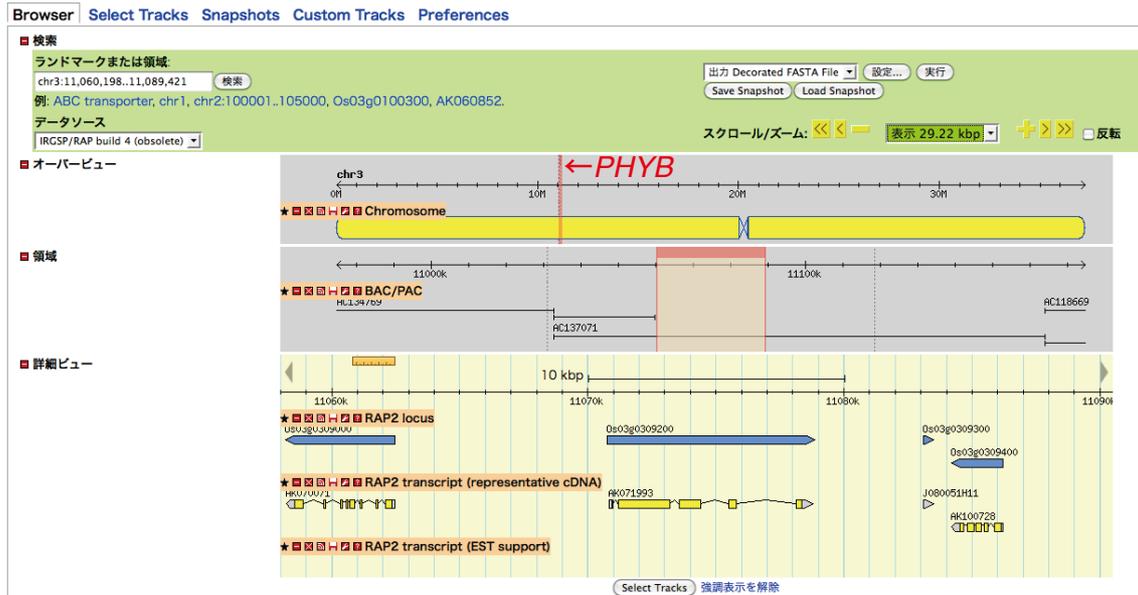
Copyright © 2005-2009 NIAS, DDBJ, JBC and AIST. All rights reserved.

拡大
↓



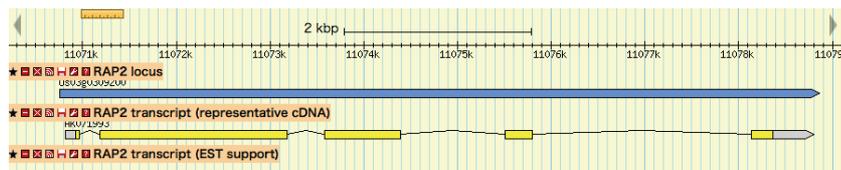
付録 1. イネ *PHYA* 遺伝子周辺のゲノム情報

■ IRGSP/RAP build 4 (obsolete): 29.22 kbp の範囲を chr3 から表示、塩基番号 11,060,198 から 11,089,421



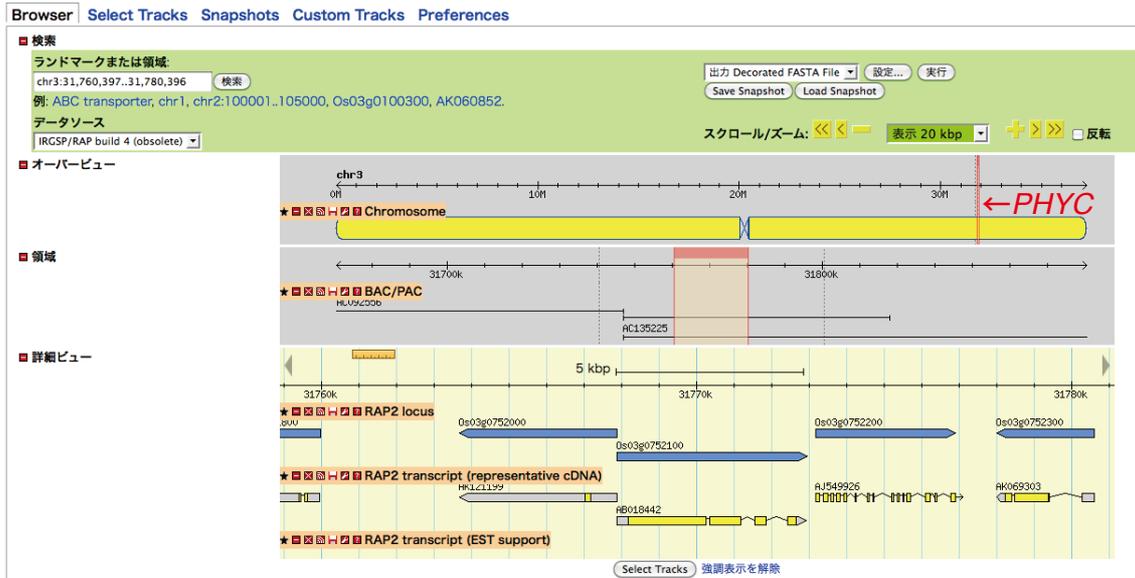
Copyright © 2005-2009 NIAS, DBJ, JBIC and AIST. All rights reserved.

拡大
↓



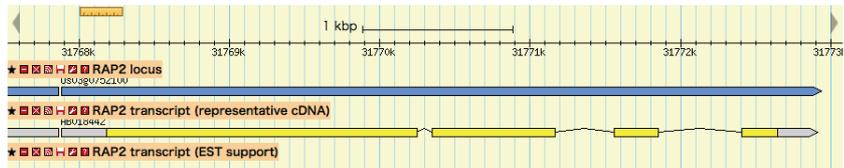
付録 2. イネ *PHYB* 遺伝子周辺のゲノム情報

■ IRGSP/RAP build 4 (obsolete): 20 kbp の範囲を chr3 から表示、塩基番号 31,760,397 から 31,780,396



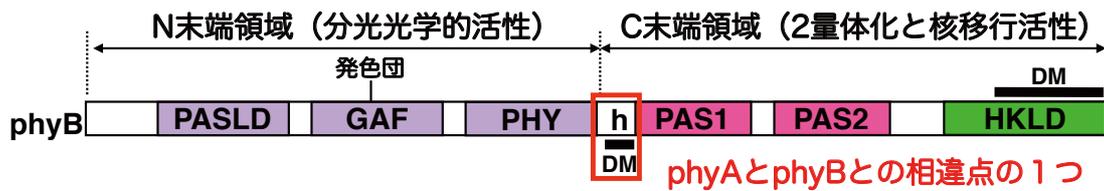
Copyright © 2005-2009 NIAS, DDBJ, JBiC and AIST. All rights reserved.

拡大

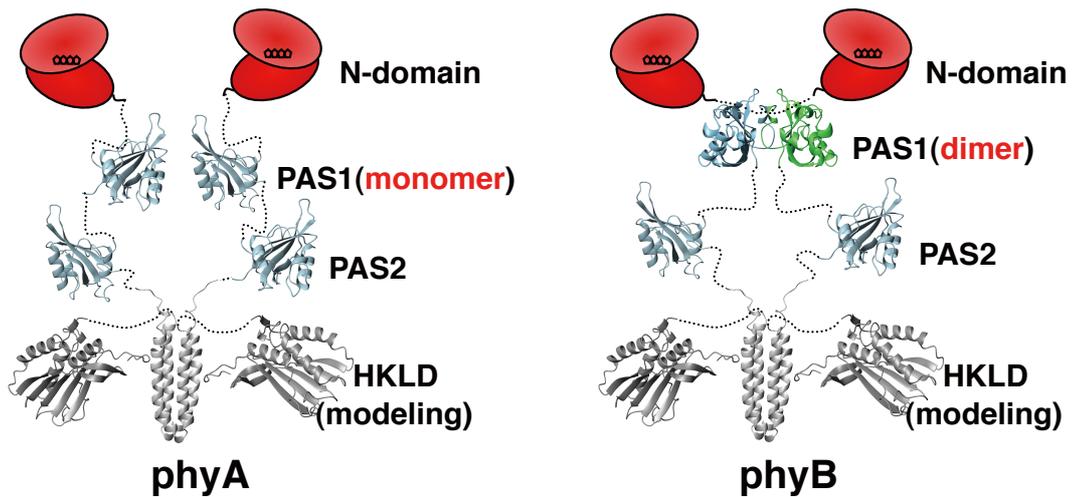


付録3. イネ *PHYC* 遺伝子周辺のゲノム情報

A) イネ phyB のドメイン構造



B) イネ phyA と phyA : C 末端領域における高次構造の比較



Kobayashi *et al.*, 学会発表データ

付録 4. イネ phyA と phyB の C 末端領域における相違点と期待される構造変化