

論文内容の要旨

論文題目 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

氏名 笠井（馬場） 晶子

序論

生存に適した環境への移動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、エネルギー源でもある重要な環境因子で、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。植物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、紫外光受容体としてUVR8、青色光受容体としてはフォトトロピン、クリプトクロム、赤色光受容体としてフィトクロムが単離、同定されている。

フィトクロムはButlerらにより1959年に単離同定された植物界に広く存在する水溶性色素タンパク質で、赤色光受容により下流の生理応答を誘導する一方で遠赤色光受容によりこれを阻害する、赤・遠赤色光可逆性と呼ばれる特性（Borthwick *et al.* 1952）を持つ。また、1990年代以降の膨大な遺伝学的・分子生物学的な研究の結果、フィトクロムには、暗所で生育した植物体で大量に蓄積するが光に不安定な phyA タイプと、明暗を問わず前者の数十分の一しか蓄積されないが光に安定な phyB タイプの2種類が存在すること、phyA は超低光量あるいは遠赤色光の受容体で、phyB は典型的な赤・遠赤色光可逆性を示す赤色光受容体であること、それぞれには植物種に応じた遺伝子ファミリーが存在することなどが次々と明らかになった。

全ゲノムシーケンシング時代の到来により、植物においてもシロイヌナズナ(2000年)、イネ(2004年)と全ゲノム情報が公開され、代表的なモデル双子葉植物であるシロイヌナズナには *PHYA* から *E* まで5つのフィトクロム遺伝子が存在する一方で、単子葉植物のイネでは、フィトクロム遺伝子は3つ (*PHYA*, *B*, *C*) だけであることが明らかになった。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）の作製とフィトクロムの分子種ごとの生理機能解析を加速し、その結果、イネのフィトクロムが、発芽後の光形態形成や日長に応答した出穂期（開花期）制御などにおいて、生理機能を分担していることが明らかとなった（Takano *et al.* 2001, 2005, 2009）。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。*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形を示す。また、主な遠赤色光受容体は phyA で、暗所における蓄積や光受容により分解する光不安定性などについては、他植物同様の特性を持つ。*PHYA* 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。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、下流遺伝子の発現制御において赤・遠赤色光可逆性を示すという、他植物には例を見ないユニークな特性を持つことも同時に発見された。

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) タンパク質構造の相違もしくは類似性 と 2) 遺伝子発現パターンの相違もしくは類似性 とに単純化して答えを出すことを試みた。解析手段として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と、これらの生理機能評価から研究を着手した。

結果と考察

1. 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

イネゲノムのデータベース (KOME および RAP-DB) より得た塩基配列情報を元にイネのゲノム DNA を鋳型として *PHYA*, *B*, *C* 遺伝子の発現制御領域(プロモーター)を PCR クローニングした。これらの下流にそれぞれ *PHYA*, *B*, *C* の cDNA 配列を配し (順に APAC, BPBC, CPCC と呼称を付けた)、フィトクロム 2 重変異イネに導入した (図 1)。

プロモーター機能の評価は a) 幼苗 と b) 成熟イネの 2 つの生育ステージで行い、a) については、発芽後の光形態形成を連続赤色光あるいは遠赤色光照射による幼葉鞘の伸長抑制で評価 (図 2)、b) については短日条件あるいは長日条件での出穂 (開花) の早晚性で評価した。結果は、クローニングしたプロモーターの全てが内生のフィトクロム遺伝子の発現に対して十分な機能を持つことを示しており、これらプロモーター配列を以降の実験に用いることの妥当性を保証するものであった。

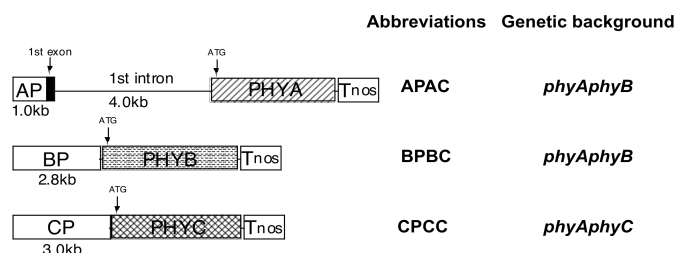
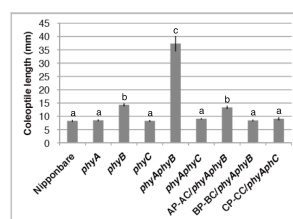


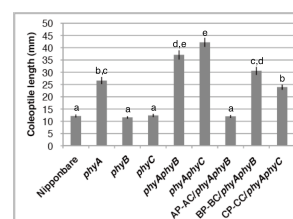
図1) 解析に用いた形質転換イネの導入遺伝子とフィトクロム変異体

A) 連続赤色光_播種後9日



結果
*phyAB*背景にAPAC: *phyB*
*phyAB*背景にBPBC: *phyA*
*phyAC*背景 (≈*phyA*) にCPCC: *phyA*

B) 連続遠赤色光_播種後9日



結果
*phyAB*背景にAPAC: *phyB*
*phyAB*背景にBPBC(*phyC*が回復): *phyA*
*phyAC*背景にCPCC: *phyA*

図2) オウンプロモーターは幼葉鞘の伸長抑制において十分な機能を持つ

2. イネ・フィトクロムの存在様式と光受容機能との相関

農業生物資源研究所・生体分子研究ユニットとの共同研究により、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発見された。*phyB* アミノ酸配列に *phyA* 型の変異を与えることにより、N 末側受光領域のフレキシビリティに影響して受光特性が *phyA* 型に変わることが期待され

たので、変異型 *PHYB* 遺伝子を *PHYB* プロモーターにつないで *phyAphyB2* 重変異イネに導入、形質転換イネを作製した。

幼苗を用いて前章同様に、連続赤色光あるいは遠赤色光照射による幼葉鞘の伸長抑制で生理機能を評価したところ、赤色光下においてのみ変異型 *phyB* が *phyA* 様の機能を持つ可能性が示唆された。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、導入した *phyB* タンパク質の発現量と相関関係が見られた。そこで、前章（１）で作製した野生型 *PHYB* 遺伝子導入イネの未解析系統の中から、*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）を選出して同様の評価を行った。その結果、アミノ酸配列の変異ではなく *phyB* タンパク質の発現量の低下により、連続赤色光下において *phyB* が *phyA* 様の機能を持つことが判明した。

上述の結果から、*phyA* と *phyB* の発現特性と生理機能の間に相関があることが示唆されたので、*PHYA* プロモーターに *PHYB* 遺伝子（APBC）もしくは *PHYB* プロモーターに *PHYA* 遺伝子（BPAC）をつないだプロモータースワップコンストラクトを作製、フィトクロム変異イネに導入した。

幼葉鞘の伸長抑制について前章同様の生理機能の評価をした結果、APBC が連続赤色光および遠赤色光照射下の両方で *phyB* として機能する（*phyA* としては機能しない）一方で、BPAC については両光条件下とも *phyA* としての機能を失っていること、および、*phyB* 様の機能を獲得することもないことが判明した。このことは、イネ・フィトクロムの機能発現にとってその発現特性が必須であることを再び示すものと考えられた。

3. 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

2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1でクローニングした *PHYA*, *B*, *C* の3遺伝子のプロモーターについて β -グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子との融合遺伝子を作製して、GUS活性による呈色反応を利用して組織化学的方法でフィトクロム遺伝子の発現組織を解析した。

その結果、*PHYB* と *C* プロモーターについては、発現パターンは共通しているが組織特異性および発現量が共に低いこと、これに反して *PHYA* プロモーターは、明所で生育したイネの地上部では維管束特異的に発現していること、その一方で、根と暗所芽生えでは全体的で強い発現パターンを示すことが分かった。

これらの結果は、シロイヌナズナなどの双子葉植物から得られていた知見（*PHYA*、*PHYB* ともに組織特異性の低い全体的な発現）とは大きく異なっており、分子種ごとの機能分化を議論するうえで興味深いものであった。また、イネ・*PHYA* の特徴的な発現パターンがイネ・*phyA* のユニークな機能（赤色光受容体としての機能）に関与している可能性が考えられたので、*PHYA* プロモーターの発現制御について、さらに解析を進めることにした。

暗所芽生えで全体的に発現する *PHYA* が、明所で生育した場合は維管束特異的な発現を示す、という上の結果より、光が維管束以外での *PHYA* の発現を抑制することが推測された。この仮説を検証するために、*PHYA* プロモーター-GUS（APGUS）を導

入した野生型イネの芽生えを白、赤、青、遠赤色光の4つの光条件下と暗所で生育してAPGUSの発現パターンを比較した。その結果、青、遠赤色光区の発現パターンは暗所と同様で、これらの波長の光は *PHYA* の発現抑制に対して無効であること、白色と赤色光区では葉肉細胞や表皮での発現が抑えられて維管束特異的な発現パターンとなることから、*PHYA* の発現抑制には赤色光およびその受容体（フィトクロム）が関与していることが示唆された。

3つのフィトクロムのどの分子種が *PHYA* の発現抑制に関与しているかを特定するために、フィトクロム変異イネにAPGUSを導入して、同様の光処理実験を行った。その結果（図5）は、幼苗期において *phyB* 依存的な光シグナルが維管束以外での *PHYA* の発現を抑制していることを示しており、図6に示す機構が想定された。

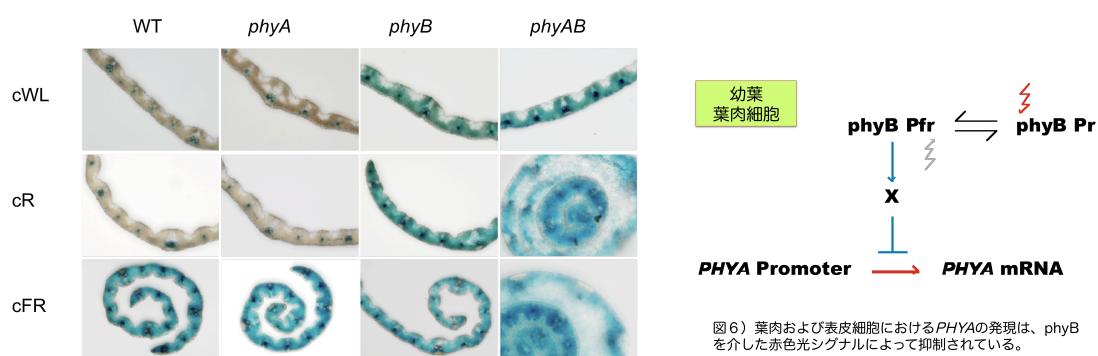


図5) 葉肉および表皮細胞におけるAPGUSの発現は、*phyB*を介した赤色光シグナルによって抑制されて維管束特異的になる。

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プロモーター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。1章と3章の結果は、*phyA*の機能発現には *PHYA* プロモーターからの発現が必須であることを示している。4章で示された維管束特異的な *PHYA* プロモーターの発現は、5章で示したように、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、赤色光下の *phyB* 変異体では、暗所同様に大量の *phyA* が発現しているが、同時に、光受容により大量に分解されていると考えられる。近年になって、*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 2004）。この説に、*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連続赤色光下でも *PHYA* 遺伝子発現が抑制されず、*phyA*”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。そうであるならば、2章で示された低発現量の *phyB* が模倣する *phyA* とは上記の *phyA*” と考えられ、タンパク質構造よりも存在様式の方が重要であるという2章の結果を説明することができる。