

遺伝子破壊を用いた植物の光情報伝達経路の解析

Analysis of photo-signaling pathway in plants using gene disruption

研究代表者 岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 助手 清末 知宏

Research Associate, Division of Biological Regulation, National Institute for Basic Biology, Tomohiro KIYOSUE

In plants, light is not only an energy source but also a very important signal that modulates development and differentiation. Light signals are perceived by plants via several photoreceptors, such as phytochromes and cryptochromes. In order to understand the blue light signaling pathway of lower plants and higher plants, NPH1 homologues were isolated from the moss, *Physcomitrella patens* and the fern, *Adiantum capillus-veneris*, and they were characterized. A new putative blue receptor that named LKP1 was isolated from *Arabidopsis*.

1. 研究目的

植物は外界の光を光合成のエネルギーとして用いるのではなく、環境の変化を認識するための環境情報としても利用している。この外界の光の中でも特に赤色光・青色光は、植物細胞のフィトクロムやクリプトクロムといった光受容体によってそれぞれ受容され、植物に様々な反応を引き起こすことが知られている。この植物による光応答については多くの研究がなされており、これまでに、光受容体の存在だけでなく、植物の光に応答した種々の生理的変化や、幾つかの遺伝子の発現変動が明らかとなっている。これらの植物における光情報の伝達経路に関しては、最近まで余り解明されていなかった。これは、1) 多くの光依存の生理現象が複雑であること、2) これまでの光応答の研究が生理・生化学的研究が主体であったこと、3) 実験材料として古くから用いられている植物の多くが分子生物学・分子遺伝学的解析には適さないこと等が原因で

あった。しかし、シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的解析をブレイクスルーとしてここ2、3年で急速に研究が加速し、この分野における多くの知見が得られてきている。

本研究ではこの植物における光情報伝達経路を明らかにするために、シロイヌナズナを用いた解析だけに留まらず、相同組み換えによる遺伝子破壊が可能なコケ植物 (*Physcomitrella patens*)、及び、細胞生物学の良い材料であるシダ植物を用いても研究を行った。

2. 研究経過

LOV ドメインを有する青色光受容体の解析

植物の光情報伝達経路を解析する上でまず青色光受容体に着目し研究を行った。それは、植物は主として赤色光と青色光を光シグナルとして使っており、赤色光による現象はフィトクロムを受容体として説明され得るが、青色光による現象はクリプトクロムだけでは説明がつかず、

新しい受容体が想定されているからである。近年、Briggs らのグループによってシロイヌナズナの屈光性に関与する青色光受容体 phototropin (NPH1)が明らかにされた。しかし、屈光性以外の NPH1 の働きに関しては明らかではない。これは、複雑に分化した多細胞生物である高等植物を用いて解析が行われていることが原因の1つである。そこで、NPH1 の機能解析を目的として糸状単細胞で培養できるコケ、シダを使った解析を進めている。

2. 1. ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) NPH1 の解析

NPH1 の機能発現に重要である LOV ドメインと kinase ドメインで保存された領域を探し出し、その領域に対する PCR プライマーを設計し、RT-PCR を行い、コケ NPH1cDNA 断片を得た。RT-PCR による解析から、白色光下で培養した細胞が暗所、赤色光、青色光下の細胞より多くの NPH1 mRNA を蓄積していることが明かとなった。そこで、白色光下培養細胞の mRNA から cDNA ライブラリーを作製後、先の cDNA 断片をプローブに用いてスクリーニングし4種類の cDNA (PpNPH1A~D)を得た。そして、各々 5' RACE 法により全長を得、塩基配列を決定した。PpNPH1 は 4039、4188、4263、4404bp で各々 1070、1133、1095、1171 アミノ酸をコードしており、シロイヌナズナ NPH1 とアミノ酸レベルで 56~60% のホモロジーを有していた。特に、蛋白質リン酸化酵素部分と2つの LOV ドメインは高いホモロジーを有し、良く保存されていた。

遺伝子破壊を行う目的で、PpNPH1 cDNA に対するゲノムクローンを

Long genomic PCR により増幅し、塩基配列の決定を行った。PpNPH1 遺伝子のコード領域は 7~8kbp で 18~20 のエクソンから成っていた。

2. 2. ホウライシダ (*Adiantum capillus-veneris*) NPH1 の解析

ホウライシダは青色光による生理現象が数多く報告・解析されている。原糸体(糸状細胞)を用いることができるので細胞生物学の良い実験材料であり、青色光に対する反応性にも富んでいる。最近、当研究グループで開発された gene silencing 系を用いることで任意の遺伝子を不活化することができる実験系でもある。コケの場合と同じ方法でシダ NPH1 cDNA (AcNPH1)断片を得た。RT-PCR の結果、暗所で生育させた若い胞子体シダが胞子、前葉体、原糸体に比べ、NPH1 遺伝子を最も強く発現していた。5'-RACE、3'-RACE 法により完全長 AcNPH1 cDNA を得た。AcNPH1 は 3492bp で 1092 アミノ酸から成る 122Kda の産物をコードしており、高等植物 NPH1 とアミノ酸レベルで 46~49% のホモロジーを有していた。AcNPH1 の LOV ドメインを大腸菌内で発現させて調べた結果、フラビンモノヌクレオチド (FMN) と結合することが明かとなった。この結果は AcNPH1 が青色光受容体として働き得ることを示唆するものである

(<http://www.tarweed.com/pgr/PGR00-039.html>)。

2. 3. シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) LKP1 の解析

シロイヌナズナはモデル植物として世界中で研究され、分子生物学、分子遺伝学、ゲノム科学的なリソー

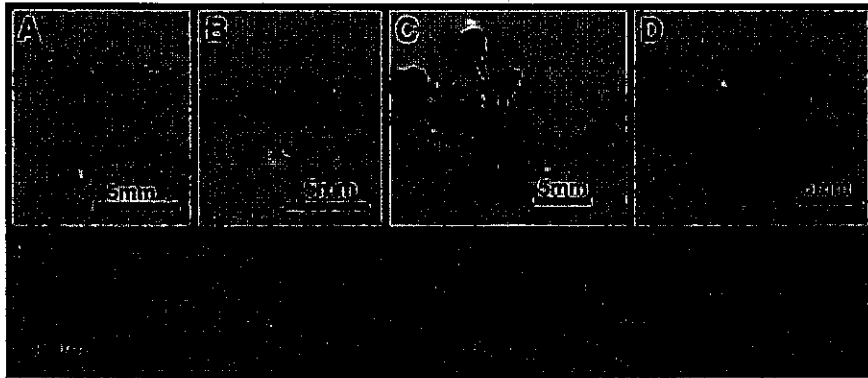
スの整理等が急速になされ、植物生物学のすぐれた主要な研究材料である。青色光による現象はクリプトクロムや NPH1 だけでは説明がつかず新しい受容体が想定されていることから、LOV ドメインに着目し、コンピューターを用いたゲノム解析の結果、新規青色光受容体候補遺伝子を見つけだし、LKP1 遺伝子と名付けた。

LKP1 遺伝子は 610 アミノ酸からなる 65.9KDa の蛋白質 (LKP1) をコードしており、LOV ドメインを1つ有している。LKP1 遺伝子は葉で強く発現しており、その他の器官 (根、茎、花、さや) でも発現は認められたが、乾燥種子での発現は低かった。また、LKP1 プロモーター GUS コンストラクトを有する形質転換植物体では、子葉、本葉で強い GUS 染色が観察された。

35S プロモーターを用いて LKP1 遺伝子 (cDNA) を過剰発現させた形質転換植物では3つの表現型 (胚軸と葉柄の伸長、葉運動、開花遅延) が見られた。即ち、形質転換体では非形質転換体の3倍の胚軸長、葉柄長を示したが、それらの表層細胞数は同じであった。形質転換植物では非形質転換植物に見られない明確な子葉運動が認められた。形質転換植物では長日条件下でも短日条件下で育てた植物と同時期に抽台・開花し、春化处理による抽台・開花促進は認められなかった。



LKP1プロモーターによるGUS発現



形質転換体 (A,C,E) と非形質転換体 (B,D,F) の胚軸、葉柄、細胞の長さの比較

過剰発現体における LKP1 の細胞内存在様式を調べる為に 35S::GFP-LKP1 遺伝子をシロイヌナズナに導入したところ、この植物でも上記3つの表現型が認められた。このことは、導入した GFP-LKP1 融合蛋白質が LKP1 と同じ活性を有していることを示唆している。この形質転換植物の細胞では GFP シグナルが細胞質と核に認められた。

3. 研究成果

遺伝子破壊が可能なコケ、遺伝子不活化が可能なシダから NPH1 ホモログの cDNA、遺伝子を単離し、それらのキャラクタライゼーションを行った。また、モデル植物で遺伝子破壊システムのスクリーニングが可能なシロイヌナズナから新規青色光受容体候補遺伝子として LKP1 遺伝子を単離し、そのキャラクタライゼーションを行った。

4. 今後の課題と発展

本研究で得られた情報をもとにヒメツリガネゴケの遺伝子破壊、ホウライシダでの遺伝子不活化を行い、下等植物での NPH1 遺伝子の機能解析を行う。2-hybrid 等の分子生物学的手法や分子遺伝学的手法を用いて LKP1 から始まる光情報伝達経路の解析を行う。

5. 発表論文リスト

- Isolation and Characterization of a Fern Phototropin (Accession No. AB037188), a Putative Blue-Light Photoreceptor for Phototropism. Kazunari Nozue, John M. Christie, Tomohiro Kiyosue, Winslow R. Briggs, and Masamitsu Wada (2000) (PGR00-039) *Plant Physiol.* 122: 1457
- LKP1 (LOV kelch protein 1): a putative photoreceptor involved in the regulation of flowering time in *Arabidopsis*. Tomohiro Kiyosue and Masamitsu Wada (投稿中)