

光環境に適応した植物の成長制御機構の解析

Analysis of regulatory mechanisms of plant growth in response to light environments.

酒井達也 独立行政法人理化学研究所植物科学研究センター チームリーダー
Tatsuya Sakai: RIKEN Plant Science Center, Team Leader

和文要旨

人工増加、大気のコ₂濃度上昇による地球の温暖化は、人類の未来の食生活と住環境を危険にさらしている。今後も持続的に安定な生活を営んでいくために、食と環境の基礎になる植物について、その能力を理解し最大限利用することが重要である。植物が環境に適応した最大限の成長を導くためには、環境情報の受容機構から遺伝子発現制御、内在性因子である植物ホルモンの調節、さらにそれらの作用制御という一連のシグナル伝達経路の働きが重要であり、そのメカニズムの理解こそが植物の生産性及び環境適応性を向上させる技術を生む。本研究は生命のエネルギーを支える光と植物の成長制御の関係について焦点をあてて研究を行う。具体的には光を情報として認識する光受容体及びその下流で働くシグナル伝達因子がどのように植物の成長及び緑化を含む細胞分化を制御するかについて明らかにする。本研究を通して、植物の生産性向上に資する遺伝子機能の発見を目指す。

Abstract

A rapid expansion of population and the global warming by an increase of CO₂ concentration in the air risk foods and life of future generations. To keep a stable, secure, and safety life, it is important to understand and use abilities of plants, which have fundamental roles on foods and environments. Plants perceive various environmental stimuli, regulate various signaling pathways including gene expressions and phytohormone's actions, and adapt themselves to the environment to gain the maximum growth. The understanding of those regulatory mechanisms generates techniques to improve productivities and abilities to adapt to the environment of plants. Our research focuses on the regulatory mechanisms of plant growth in response to light environments. We reveal how signaling pathways downstream of photoreceptors control plant growth and development. Based on this study, we are discovering new gene's function to improve the productivities of plants.

研究目的

植物は葉緑体で光を吸収し光エネルギーから化学エネルギーへ変換する光合成を行うが、光合成を適切に行うためには複

数の光受容体が光の質と量を環境情報として認識し、光合成に適した生体制御を行う必要がある。植物には主な光受容体

ファミリーが3つ存在しており、赤色光・近赤外光を受容するファイトクロム (phy)、青色光を受容するクリプトクロム (cry) 及びフォトトロピン (phot) が光の質を見分け、それぞれの光受容体ファミリーの分子種の違いによって光の強さを見分け、それぞれの光受容体が特徴的な機能を持って働いている。光受容体下流で働くシグナル伝達因子はモデル植物シロイヌナズナの突然変異体を用いた解析から多数同定されているが、シグナル伝達経路の全体像やシグナル伝達経路による植物ホルモン制御の実体などについてはまだほとんど明らかになっていない。

本研究は、phy、cry、phot による植物ホルモンオーキシンを介した成長制御機構の実体を明らかにすることを目的に実験を行った。具体的には、1) phy、cry による植物ホルモン・オーキシンを介した芽生え胚軸の伸長抑制及びランダム屈曲誘導の分子機構、2) オーキシン輸送阻害剤を用いた光屈性におけるオーキシン輸送体の機能、3) phot による偏差成長制御因子 NPH3 の脱リン酸化制御の機能、4) phy、cry、phot による偏差成長制御因子 RPT2 の発現制御、の4点を明らかにすることを目標として実験を行った。

研究経過

実験1) phy、cry によるオーキシンを介した芽生え胚軸成長制御機構の解析

フィトクロム赤色光/遠赤色光受容体の活性化によって芽生え地上部のオーキシン量が減少することは既に明らかにしている。本研究ではクリプトクロム青色光受容体の活性化がオーキシン量の調節に関わるか解析を行った。また赤色光照射による胚軸のランダム屈曲誘導が、オーキシン不均衡と一致するかどうか、オーキシンレポーター遺伝子の発現を観察することによって検討した。

実験2) オーキシン輸送阻害剤を用いたオーキシン輸送体の機能解析

オーキシン輸送阻害剤 NPA は胚軸内のオーキシン極性輸送を阻害し、かつ胚軸の偏差成長を抑制する。*atpgp19* 変異体

に対する NPA の効果を調べた。

実験3) phot による偏差成長制御因子 NPH3 の脱リン酸化制御の機能解析

Phot1 による NPH3 の脱リン酸化が植物の屈性にどのような機能を持つのか明らかにするために、まず NPH3 のリン酸化サイトをコンピューター予測し、20 のアミノ酸残基についてアミノ酸置換した NPH3 突然変異遺伝子を作成した。これを *nph3* 突然変異体に遺伝子導入し、その表現型を観察し、NPH3 リン酸化の役割を解析した。

実験4) phy、cry、phot による偏差成長制御因子 RPT2 の発現制御解析

RPT2 は光によって転写誘導される。*phyA phyB cry1 cry2* 四重変異体における RPT2 の遺伝子発現を観察した。RPT2 は光によって phot1 依存的に転写後発現制御を受ける。RPT2 の転写後発現制御が phot1 によるタンパク質安定化なのか、翻訳誘導なのか明らかにすることを目的に、RPT2 cDNA についてドメイン解析を行った。RPT2 3'-UTR をレポーター遺伝子につなぎ、恒常的発現プロモーターで発現誘導を植物体内で行った。また RPT2 のタンパク質コード領域のみを恒常的発現プロモーターに融合し、植物体内で発現させた。

研究成果

クリプトクロム活性化によって芽生え地上部のオーキシン量が減少することを明らかにした。またオーキシン不均衡を示すオーキシンレポーター遺伝子発現パターンと胚軸屈曲の間には相関関係があることを数値化することによって明らかにした。

NPA の効果を調べた結果、NPA による胚軸伸長阻害及びフックの立ち上がり誘導について *atpgp19* 変異体は野生型の表現型と同様の応答を示すが、偏差成長については NPA の阻害効果が著しく抑制されることを明らかにした。

アミノ酸置換変異体解析の結果、NPH3 のリン酸化残基の少なくとも3カ所のリン酸化アミノ酸位置を明らかにした。そ

これらのアミノ酸位置は一カ所に集中して存在したため、リン酸化ドメインとしてこれを欠失した *NPH3* 遺伝子を作成して *nph3* 突然変異体に遺伝子導入し、その表現型の観察を行い、*NPH3* のリン酸化ドメインを欠失しても光屈性には影響を与えないことを明らかにした。

RPT2 の光誘導発現は *phy* 及び *cry* に依存しており、*phyA phyB cry1 cry2* 四重変異体では光転写誘導がほとんど失われていることが明らかになった。*RPT2* の発現がほとんど失われたこの四重変異体で光屈性を観察した結果、*rpt2* 突然変異体の光屈性とよく似た光強度依存性胚軸光屈性を示した。一方、*phot1* による転写後発現誘導については、*RPT2* 3'-UTR を融合したレポーター遺伝子が光誘導性発現を示した。一方で、タンパク質コード領域のみでも *RPT2* は光誘導性を示した。

今後の課題と発展

本研究によって、フィトクロム、クリプトクロムそれぞれがオーキシン量の調節及びオーキシン輸送の両面でオーキシンの調節を行っていることが明らかになった。オーキシン合成・代謝及び輸送の2つの制御を遺伝的に分離すべく、恒常的発現プロモーターにオーキシン合成酵素 *YUCCA* 遺伝子を融合したコンストラクトを作成し、野生型シロイヌナズナ及び *atpgp19* 突然変異体に遺伝子導入している。オーキシン合成・代謝制御がオーキシン輸送体発現制御に関与するか、独立した制御によってフィトクロム、クリプトクロムによる胚軸成長制御が行われているのか、今後明らかにする。

本研究によって、*PGP19* が *PIN3* と相互作用をするか、もしくは *NPA* 非感受性偏差成長誘導機構が存在することが示唆された。*PIN3* 非依存的に偏差成長を誘導するオーキシン輸送体を同定することが重要と考えられるので、現在胚軸偏差成長における *AtPGP19* 及び *PIN1*、*PIN3*、*PIN7* の多重変異体を作成し、各オーキシン輸送体の機能分担様式を解明しようとしている。偏差成長におけるオーキシン

輸送体の機能分担様式の詳細が理解できたのち、各光受容体によるこれらのオーキシン輸送体発現制御及び機能活性制御の実体を解明する。

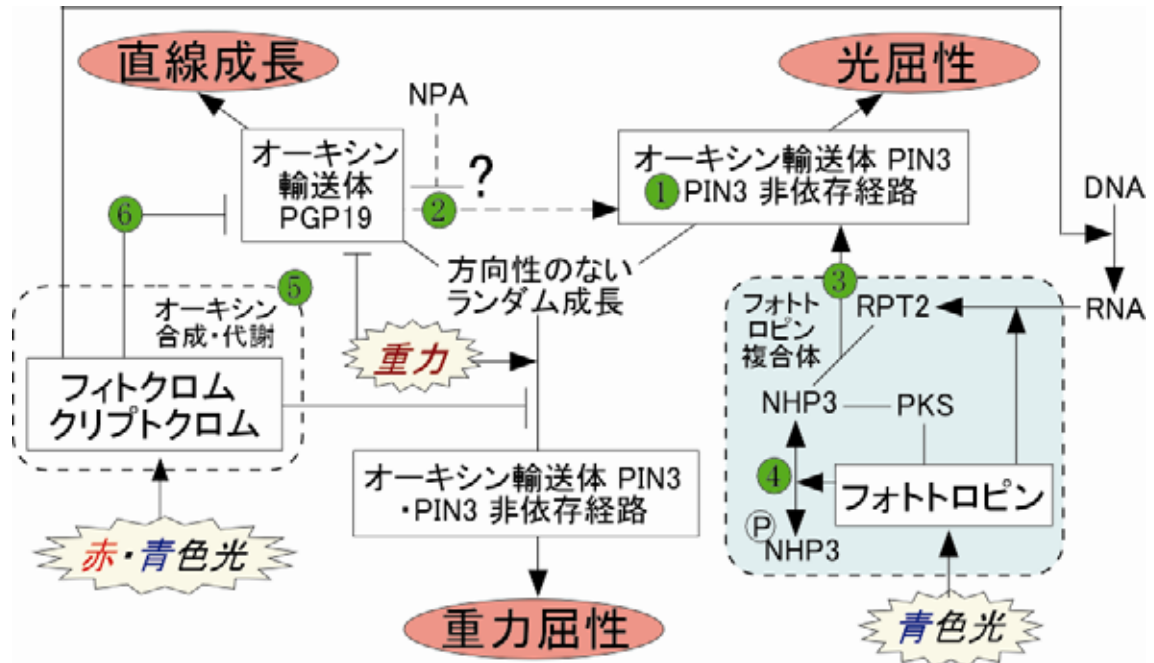
NPH3 のリン酸化残基が決定したので、今後リン酸化、脱リン酸化を行う酵素の同定を進める。特に脱リン酸化酵素の同定及びその変異体の解析によって、脱リン酸化が光屈性にどのような機能を持っているのか、また *phot1* がどのように *NPH3* の脱リン酸化を誘導するのか明らかにできるものと考えられる。また今後 *NPH3* の更なるドメイン解析を行い、光屈性及びそれを誘導するオーキシン輸送体制御における *NPH3* の生化学的機能を解明する。

phy、*cry* による *RPT2* 転写誘導と光屈性の修飾作用に平行関係が認められた。現在、*RPT2* を恒常的に発現させる遺伝子コンストラクトを作成し、四重変異体に遺伝子導入して、*phy*、*cry* の光屈性修飾機構における *RPT2* 光転写誘導の機能を解析している最中である。本研究によって *phy*、*cry* による光屈性修飾作用の実体を解明する。また本研究によって *phot1* による *RPT2* 3'-UTR を介した翻訳誘導の機構の存在が示唆される一方で、cDNA 配列内のシス配列による翻訳誘導もしくはタンパク質の安定化制御の可能性も否定できないことを示唆した。*phot1* による *RPT2* 3'-UTR を介した翻訳制御の分子機構を解明すべく、シストランス因子の解析を行っている。これによって、これまで報告されていない *phot1* の転写後発現制御機構の実体を解明し、他の遺伝子の発現制御にも関与しないか明らかにする。

今回の有意義な研究に多大な援助を頂きました日産科学振興財団に感謝いたします。

発表論文リスト

Blakeslee, J. J., Bandyopadhyay, A., Lee, O. R., Mravec, J., Titapiwatanakun, B., Sauer, M., Makam, S. N., Cheng, Y., Bouchard, R., Adamec, J., Geisler, M., Nagashima, A., Sakai, T., Martinoia, E., Frim, J., Peer, W. A. and Murthy, A. S.



図。本研究成果の概要。フォトロピン、フィトクロム、クリプトクロムによる芽生え胚軸の成長制御におけるそれぞれの機能を矢印で示している。今後、緑で示した番号の制御機構について研究を進め、光によるオーキシシンを介した胚軸成長制御の全体像を解明する（本研究成果は未発表のため、データの公開はここでは省略し、研究成果及び今後の計画についての概要のみ図で示す）。