植物の光受容体フォトトロピンファミリーの機能解析

Function analysis of plant photoreceptor, phototropin family

（日本植物学会推薦）

代表研究者　筑波大学　加川貴俊　University of Tsukuba　Takatoshi KAGAWAa

協同研究者　筑波大学　木村光宏　University of Tsukuba　Mitsuhiro KIMURA

In seed plants, chloroplast relocation movement is mediated by a phototropin which is constructed with two LOV domains with FMN and one kinase domain. In Arabidopsis, accumulation movement is mediated by phot1 and phot2, and avoidance movement is mediated by phot2. In lower plants such as green algae and fern, the chloroplast movement should be controlled by chimeric photoreceptor of red-light absorbing photoreceptor phytochrome and the phototropin as well as the phototropin. In this study, we demonstrated about photoreceptors for the chloroplast movement. As results of analysis of phot2-transgenic plants on the chloroplast avoidance in Arabidopsis, the velocity should be dependent upon amount of phot2 but leaf expansion is rescued by phot2 accumulation which is lower than threshold level of immunoblotting. In photoreceptors of lower plants, we analyzed photometrically photoreceptive domains which were expressed modified *E. coli*. As the results, both phytochrome and LOV domains of phy3 works as photoreceptive domain. However, phytochrome domain of green algae neochrome works as photoperception but the LOV domain could not absorb blue light because of absent of chromophore, FMN.

研究目的

動き回ることができない植物は、外界の環境を上手に関知し、様々な方法で対応している。細胞内では、葉緑体の光環境に依存した定位運動がおきている。弱い光環境では細胞表面に位置して光合成を活発に行い（集合反応・弱光反応）、強い光環境のもとでは葉緑体の光障害をさけるために逃げている（逃避反応・強光反応）。光受容から葉緑体運動までの分子メカニズムの解明の過程で、私たちは逃避反応の光受容体がフォトトロピン2(phot2)であること(Kagawa ら 2001)、集合反応の光受容体はフォトトロピン1(phot1)と2であることを明らかにした(Sakai ら 2001)。このフォトトロピンが、葉緑体運動のみならず光屈性や気孔開口の光受容体であることも明らかにした。また葉緑体光定位運動は強光傷害回避メカニズムとして植物生存に重要な役割をしていることも明らかにした(Kasahara ら 2002)。しかし、分子メカニズムが解明されたとは全く言えない。

基本的に葉緑体光定位運動は、3つの素過程、①光の受容・②シグナル伝達・③葉緑体運動、の連携による光生理反応である。そこで本研究では、それぞれの素過程を詳細に多角的に解析し、光受容から葉緑体運動へのフォトトロピンシグナル伝達系の解明をめざす。

研究経過

1　フォトトロピンの過剰発現体における青色光反応

シロイヌナズナにおけるフォトトロピン2のヘテロ型(PHOT2/*phot2-1*)個体の葉緑体の逃避速度は、野生型(PHOT2/PHOT2)に比べて遅い。イムノブロット解析では、phot2 タンパク質量は野生型の方が多い。そこで、さまざまな蓄積量の phot2 形質転換植物を作出し、葉緑体光逃避運動解析を行った。またこの形質転換植物をもちいてフォトトロピン依存の青色光反応を調べた。

PHOT2-GFP(P2G)を *phot1phot2* 欠損植物体に導入した形質転換植物を作出し、その植物体の P2G 発現量は、野生型の phot2 発現量に比べて0ー20 倍程度であった。運動速度の解析の結果、P2G 発現量と逃避の運動速度は正の相関が認められた(Fig. 1)。つまり、phot2 の蓄積が運動速度を調整していることを示唆している。また、花茎の光屈性は3倍程度までは正の相関が確認でき、それ以上では相関が認められない。一方、葉の伸展は、イムノブロット解析で発現が確認できない形質転換植物でさえも野生株と同様程度葉が伸展することがわかった。これらの結果から、野生株と同様の反応を引き起こすために必要なフォトトロピン2量は、青色光反応に依存して異なることが明らかになった。

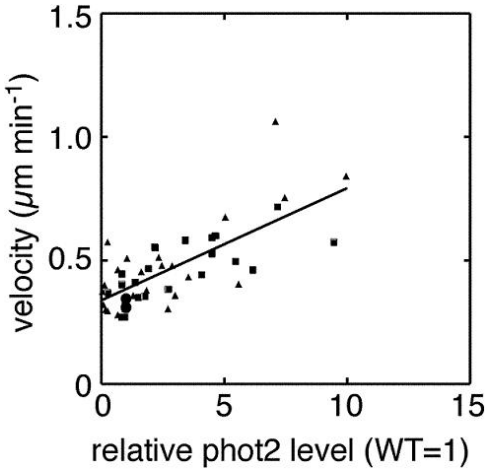

Fig. 1. Velocity of chloroplast avoidance movement in phot2-transgenic plants

2　ヒザオリネオクロームとホウライシダフィトクロム3の光受容特性

種子植物の葉緑体光定位運動は、フォトトロピンにより制御されている。しかし、下等植物の中で緑色植物のヒザオリやシダ植物のホウライシダでは、葉緑体光定位運動は N 端に赤色光受容体であるフィトクロムの光吸収ドメインが融合したフォトトロピンが光受容体だと思われている。しかしながら、その光特性はわかっていない。本研究では大腸菌内で光受容部位を発現させ光受容特性を調べた。

通常フィトクロムの発色団ファイトクロモビリンは大腸菌内で作られることはない。そこで、植物の2つの合

成酵素とともに、光受容部を発現させることで光吸収能のあるタンパク質を合成することができた。

まず、ホウライシダのフィトクロム3の光受容部位（フィトクロム光吸収部位＋LOV ドメイン）はファイトクロモビリンの場合は 669nm にピークを持つ部分フィトクロムが作れたが、ファイトシアニンでは 656nm だった。葉緑体光定位運動の作用スペクトルは、680nm 付近にピークをもつことから、発色団としてファイトクロモビリンを利用していることを示唆された。また、青色光照射により典型的なフラビンのシスアダクトが確認でき、フィトクロム部分とLOVドメイン共に機能していることが示唆された (Fig. 2)。しかしながら、LOVドメインからフィトクロム部分へのエネルギーの転移は確認できなかった。

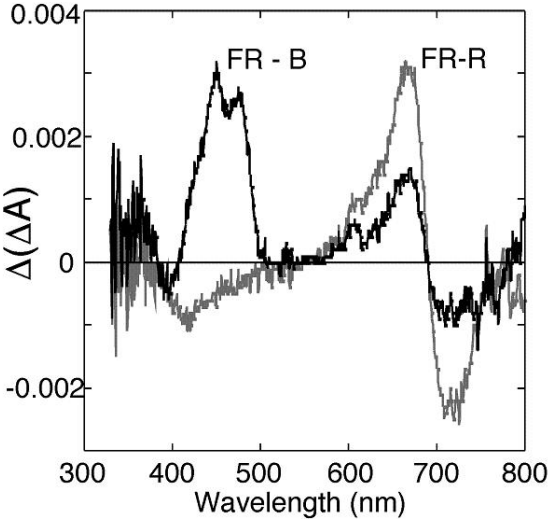

Fig. 2. Difference spectra of fern phy3 photoperceptive domain

一方、ほぼ同じタンパク質構造をもつ緑藻植物のヒザオリのネオクロームは、シダフィトクロム3と同様に赤色光吸収能をもち、ファイトクロモビリンを発色団としてもつ場合に作用スペクトルと非常に近い吸収を示すことがわかった(Fig. 3)。しかしながら、LOVドメインに発色団であるFMNの結合は確認できなかったが、多量体形成の場である可能性が示唆された。

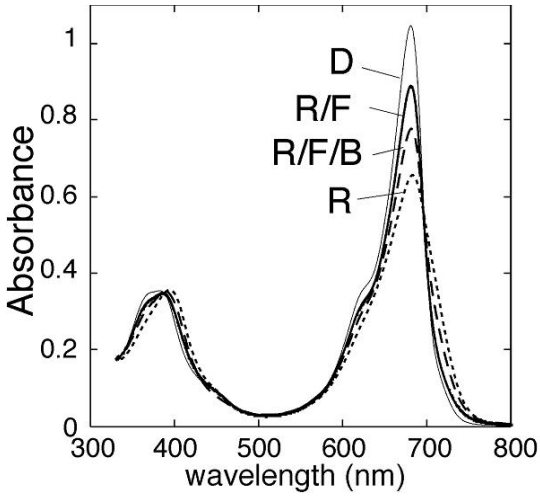

Fig. 3. Absorbing spectra of recombinant neochrome 2 after several light irradiation

考察

本研究では、シロイヌナズナのフォトトロピン2，シダのフィトクロム3，ヒザオリのネオクロームを解析した。

シロイヌナズナのフォトトロピン2の発現量が青色光応答に重要な役割を持っていることがあきらかになった。しかし、フォトトロピンは細胞・組織のどこに位置しているのか、いかにしてシグナルを伝達するのか。まだまだ、この光受容体の機能は未解明な部分が多く、研究課題である。

下等植物の葉緑体光定位運動の解析は、これまでは生理学的解析しか出来なかった。光受容体の特定と大腸菌により再構成が成功したことから、in vitro での詳細な解析が可能となった。今後、生理学的アプローチとからめた解析により詳細な研究が可能となった。シロイヌナズナの解析とともに下等植物の葉緑体光定位運動の解析を進めることで、どのような過程を経て葉緑体光定位運動は機構を変化していったのかもわかるであろう。

研究発表

口頭発表

1. 加川貴俊；「大腸菌によるシダフィトクロムの再構築系の開発」、日本植物学会（富山、2005）
2. 澤木真理子，加川貴俊;「プロトプラストを用いた葉緑体光定位運動解析法の開発」（富山、2005）
3. Kagawa, T.；「Reconstruction of phy3 in E. coli.」、 植物の光受容体フォトトロピン （岡崎、2005）
4. 門田明雄，山田　岳，佐藤良勝，及川和聡，中井正人，小倉康裕，笠原賢洋，加川貴俊，末次憲之，和田正三;シロイヌナズナ葉緑体光定位運動におけるアクチンフィラメントの役割.日本植物生理学会（つくば、2006）
5. 及川和聡，小倉康裕，中井正人，高橋文雄，笠原賢洋，加川貴俊，和田正三;「CHUP1 は葉緑体上で機能する」日本植物生理学会（つくば、2006）
6. 末次憲之，加川貴俊，和田正三;「シロイヌナズナにおいてフォトトロピン依存の葉緑体光定位運動を制御する Auxilin 様 J-ドメインタンパク JAC1 の解析」日本植物生理学会（つくば、2006）
7. 加川貴俊 ；「葉緑体光定位運動を制御するフォトトロピンファミリー」特定領域研究「LOV 光受容体による植物の運動制御機構」、 第1回若手ワークショップ （京都、2007）
8. 木村光宏、加川貴俊「フォトトロピン2発現量に依存した青色光応答の調整」日本植物生理学会（愛媛、2007）
9. 加川貴俊「葉緑体のダイナミクス」日本植物生理学会（愛媛、2007）

誌上発表

1. Kimura, M. and Kagawa, T.; "Photoreceptor and signal pathway in phototropism." Current Opinion in Plant Biology. (2006) 9: 503-508.

2. Kagawa, T. and Suetsugu, N.; "Photometrical analysis with photosensory domains of photoreceptors in green algae." FEBS Letters (2007) 581: 368-374.