

苔類ゼニゴケの青色光応答反応と  
青色光受容体フォトトロピン機能の解析

森井（小松）愛乃

# 目次

要旨	1
略語表	3
第1章 序論	4
第2章 材料と方法	10
第3章 結果	
3-1 苔類ゼニゴケ幼葉状体における葉緑体局在変化の解析	15
3-2 苔類ゼニゴケにおける青色光受容体フォトトロピン遺伝子の単離と構造解析	16
3-3 葉緑体光定位運動における青色光受容体フォトトロピンの機能解析	18
3-3-1 ジーンターゲット法によるフォトトロピンノックアウト株の作出	18
3-3-2 フォトトロピンノックアウト株における葉緑体光定位運動の解析	18
3-3-3 蛍光タンパク質を用いたフォトトロピンの細胞内局在解析	19
3-4 葉緑体光定位運動変異体の分離と原因遺伝子の探索	20
3-4-1 青色光依存的な原糸体光屈性を指標とした青色光応答変異体の選抜	20
3-4-2 青色光応答変異体における原因遺伝子の探索	21
3-5 フォトトロピンによる葉緑体光定位運動制御機構の進化学的解析	21
3-5-1 ホウライシダ変異体におけるゼニゴケフォトトロピンの機能解析	21
3-5-2 シロイヌナズナ変異体におけるゼニゴケフォトトロピンの機能解析	22
第4章 考察	
4-1 ゼニゴケ葉緑体光定位運動における青色光受容体フォトトロピンの寄与	23
4-2 フォトトロピンの制御する葉緑体光定位運動の分子機構	24
4-3 陸上植物進化に伴うフォトトロピン遺伝子の重複と機能分化	25
引用文献	28
図表	35
謝辞	62

## 要旨

植物は環境情報として光を受容することで、光環境の変化に応じて分化や成長を調節し、適切な応答反応を行う。植物では様々な光応答反応が観察されており、光屈性、葉緑体光定位運動、気孔開口などは主に青色光で誘導される光応答反応である。刻々と変化する光環境に応じて迅速にこれらの反応を示すことで、植物は光合成効率の促進を図っている。

葉緑体光定位運動は光環境に応じて葉緑体の細胞内局在を変化させ、葉緑体の光吸収効率を調整することにより光合成効率を最適化する、植物にとって重要な光応答反応である。葉緑体光定位運動によって、葉緑体は効率的に光を吸収するために弱い光が当たっている部位へと移動し (集合反応)、強い光からは光損傷を避けるために逃げる (逃避反応)。葉緑体光定位運動は多くの陸上植物で青色光によって誘導されており、青色光受容体フォトトロピンがその光受容体であること、その下流で複数のシグナル伝達因子が関与していることが明らかとなってきた。これまでに解析が行われてきた植物では、フォトトロピンも含めたいくつかの因子における遺伝子重複が報告されており、遺伝子機能の冗長性のため、葉緑体光定位運動に関わる分子制御機構はいまだ全容解明に至っていない。

本研究では、新たなモデル植物として陸上植物の進化上最も基部に位置する苔類の一種、ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* L.に着目した。ゼニゴケにおいて葉緑体光定位運動を詳細に解析し、集合反応と逃避反応が青色光によってのみ誘導されることを明らかにした。暗黒下における葉緑体局在 (暗黒定位) についても観察し、ゼニゴケ幼葉状体における暗黒定位のパターンを明らかにした。ゼニゴケにおける葉緑体光定位運動の光受容体候補であるフォトトロピン遺伝子の探索を行った結果、典型的なドメイン構造を保持したフォトトロピン遺伝子 (*MpPHOT*) を単離した。ゲノムデータベース検索およびゲノムサザンプロット解析から、ゼニゴケにはフォトトロピンが 1 分子種のみ存在していることを明らかにした。ゼニゴケで確立されている相同組換えによるジーンターゲットイングの手法によって、*MpPHOT* のノックアウト株を作出して葉緑体光定位運動の観察を行い、ゼニゴケでは 1 分子種のフォトトロピンが集合反応、逃避反応、暗黒定位のすべての葉緑体光定位運動を制御することが明らかとなった。したがって、ゼニゴケの葉緑体光定位運動は陸上植物に共通した反応を示すものの、複数のフォトトロピンによって複雑に制御されている従来のモデル植物の制御機構に比べて、ゼニゴケにおける制御機構は 1 分子種のフォトトロピンで制御される単純なものであることが示された。また、系

統解析の結果 *MpPHOT* が陸上植物の基部に位置したことから、*Mpphot* はフォトトロピンとしての祖先的な機能を保持していることが期待された。実際に、シダ植物であるホウライシダおよび被子植物であるシロイヌナズナのフォトトロピン変異体において *MpPHOT* を発現させたところ、それぞれの植物のフォトトロピン変異体における葉緑体光定位運動の欠損がレスキューされたことから、ゼニゴケフォトトロピンの葉緑体光定位運動における制御能は進化的に保存されていることが明らかとなった。

以上より、ゼニゴケは明確な葉緑体光定位運動をもち、青色光シグナル伝達機構を複雑に発展させた維管束植物と共通する葉緑体光定位運動の基本的な制御機構を保持していることが示唆された。本研究により、ゼニゴケは陸上植物に共通なフォトトロピンによる葉緑体光定位運動制御の基本的分子機構を解析するうえで優れたモデル植物となると期待される。

## 略語一覧

bp	base pairs
CBB	Coomassie brilliant blue
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
dCTP	deoxycytidine 5'-triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMS	ethyl methanesulfonate
EST	expressed sequence tag
FMN	flavin mononucleotide
GFP	green fluorescent protein
kb	kilo base pairs
kDa	kilo dalton
LED	light emitting diode
LOV	light, oxygen, or voltage
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
ORF	open reading frame
PAC	P1-derived artificial chromosome
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
T-DNA	transfer-deoxyribonucleic acid
UTR	untranslated region

### フォトトロピンの表記

<i>PHOT</i>	フォトトロピン遺伝子
PHOT	フォトトロピン アポタンパク質
phot	フォトトロピン ホロタンパク質

# 第1章 序論

## 植物の光応答反応

植物は固着生活を営むため、最適環境を求めて移動することはできない。そのため、絶え間なく変化する環境に応じて植物体を変化させることで、環境に適応し、生存している。環境変化に適切に応答するためには、環境の変化を情報として感知することが重要であり、植物は、光、土壌中の水分、栄養成分、温度、湿度、日長、重力、二酸化炭素濃度、接触刺激など様々な環境情報を認識して適切な応答反応を行っている。多様な環境情報の中で、光は光合成に必要なエネルギー源としての役割だけでなく、同時に植物の様々な生理的応答を調節するシグナルとしても機能している。植物は、光の波長、強度、方向性、日周変化、日長変化などを読み取り、環境変化に応じて発芽や成長相移行、運動応答などの生理的応答を調節している。

植物の多様な光応答反応は、遺伝子発現を制御することで形態形成調節を行う比較的長期的な応答と、遺伝子発現を介さない迅速な応答に大別できる。遺伝子発現制御を伴う光応答反応のみでは応答に時間がかかるため、自然環境での絶え間ない光変化に対応しにくい。しかし、遺伝子発現調節を介さず大きな形態変化を必要としない応答反応をもつことで、一時的な環境変化に対して迅速に適応することが可能となっている。迅速な光応答反応には、葉緑体光定位運動、光屈性や気孔の開閉などがあり、光条件に応じて最適に誘導されることで光合成の効率化に寄与している。

## 葉緑体光定位運動

葉緑体は光合成において重要な役割を担う細胞小器官であり、その細胞内局在の厳密な制御は、光合成に用いる光吸収効率の最適化につながり、植物全体の光合成の効率化において大きく貢献している。多くの植物種では、葉緑体の細胞内局在を光依存的に調節する機構が備えられており、光条件に応じた光合成効率の上昇と光損傷の回避をバランスよく行うことで植物体全体での光合成効率化を図っている。

葉緑体光定位運動に関する詳細な研究は19世紀から行われてきた (Böhm, 1856)。緑藻類、苔類、蘚類、シダ植物、種子植物といった様々な植物種で光条件によって異なる葉緑体分布パターンが観察され、葉緑体は一般的に光の強さや方向に対して応答することが明らかになっている (Senn, 1908)。弱光条件下では光の照射方向に対して垂直となる細胞面に沿って葉緑体は局在しており (集合反応; 図1)、光合成に利用する光を効率的にとらえることができる。反対に、強光条件下では、葉緑体は光の照射方向と平行な細胞面に沿って分布し (逃避反応; 図1)、全体の光吸収量を最小にして光による損傷を避ける。

このような葉緑体の局在変化は、多くの植物では主に青色光によって誘導されるが、ホウライシダを含む多くのシダ植物や蘚類ヒメツリガネゴケ、車軸藻類ヒザオリやメソタイ

ニウムなどの一部の植物種では、青色光だけでなく赤色光も葉緑体運動を誘導するのに有効である (Suetsugu and Wada, 2007b)。

さらに、葉緑体は暗黒下において一定の局在パターンを示すことが明らかとなっている (暗黒定位)。暗黒定位は植物種や組織によって異なっており、例えば、図 1 に示すように、シロイヌナズナの葉肉細胞では葉緑体は細胞の下部に局在し (Suetsugu et al., 2005a)、ホウライシダの前葉体細胞では葉緑体は近傍の細胞と接着している垂直細胞面に局在する (Kagawa and Wada, 1993; Tsuboi et al., 2007)。

### 青色光受容体フォトトロピン

シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的解析によって葉緑体光定位運動に関わる分子機構の解明が進められており (Suetsugu and Wada, 2012)、光によって活性化するキナーゼであるフォトトロピン (phot) が青色光受容体として同定されている (Jarillo et al., 2001; Kagawa et al., 2001; Sakai et al., 2001)。フォトトロピンは約 120 kDa のタンパク質であり、N 末端側の光受容領域と C 末端側のシグナル伝達領域の 2 つの機能的な領域から構成されている (Christie, 2007)。光受容領域には Per/ARNT/Sim (PAS) ドメインスーパーファミリーに属する 2 つの light, oxygen, or voltage (LOV) ドメイン (LOV1 と LOV2) が含まれる。それぞれの LOV ドメインは 1 分子のフラビンモノヌクレオチド (FMN) と結合しており、青色光のセンサーとして機能する (Christie et al., 1999)。特に LOV2 ドメインは、シグナル伝達領域における青色光依存的な活性化調節に重要な役割を果たす (Christie et al., 2002; Harper et al., 2003)。シグナル伝達領域にはセリン/スレオニンキナーゼドメインが存在し (Huala et al., 1997)、青色光照射によって活性化することでシグナル伝達を担っている。暗黒下では LOV2 ドメインによってキナーゼ活性が抑えられているが、青色光照射によって LOV2 ドメインのシステインと FMN の間に共有結合が生じて光活性化し、タンパク質全体の立体構造が変化すると、LOV2 ドメインの抑制がはずれてキナーゼが活性化される。特に LOV2 ドメインとセリン/スレオニンキナーゼドメインの間に存在する J $\alpha$ ヘリックス領域の立体構造変化が青色光依存的なキナーゼの活性化に重要であることが示されている (Harper et al., 2003; Takayama et al., 2011)。

シロイヌナズナには phot1 と phot2 の 2 分子種のフォトトロピンが存在しており、葉緑体光定位運動だけでなく、光屈性、気孔の開口、葉の平坦化といった、植物の光合成効率を最適化して成長を促進するような光応答反応を制御している (Christie, 2007)。phot1 と phot2 は、葉緑体の集合反応 (Sakai et al., 2001)、胚軸の光屈性 (Huala et al., 1997; Sakai et al., 2001)、気孔の開口 (Kinoshita et al., 2001)、葉の平坦化 (Sakai et al., 2001; Sakamoto and Briggs, 2002) を重複的に制御している (Suetsugu and Wada, 2013)。しかしながら、胚軸伸長抑制は phot1 が特異的に制御し (Folta and Spalding, 2001)、葉緑体の逃避反応 (Jarillo et al., 2001; Kagawa et al., 2001) と柵状組織の細胞発達の主な光受容体としては phot2 が機能を担う (Kozuka et al., 2011)。このように phot1 と phot2 には一定の機能分化も存在する。また、葉緑体の暗黒

定位に関しても *phot2* が関与していることが報告されている (Suetsugu et al., 2005a; Tsuboi et al., 2007)。

フォトリポピンが関与する青色光応答反応のなかで、葉緑体光定位運動は無核の細胞でも観察されることから (Wada, 1988)、遺伝子発現調節を介さない可能性が示されている。さらに、フォトリポピンは青色光によって誘導される遺伝子発現にはほとんど影響を与えないことから (Jiao et al., 2003; Ohgishi et al., 2004; Lehmann et al., 2011)、フォトリポピンの制御する光応答反応は、遺伝子発現調節を介さない機構により制御されていると考えられている。細胞内局在としては、細胞膜貫通ドメインをもたない *phot1* と *phot2* の細胞膜局在が報告されており (Sakamoto and Briggs, 2002; Kong et al., 2006)、一部は細胞膜だけでなく葉緑体外膜にも局在することから (Kong et al., 2013c)、細胞膜または葉緑体周辺での機能が示唆されている。また、青色光依存的な局在変化も観察されており、*phot1* は細胞質移行 (Sakamoto and Briggs, 2002; Knieb et al., 2004; Wan et al., 2008; Kaiserli et al., 2009)、*phot2* はゴルジ体への結合を示す (Kong et al., 2006)。多くの植物で葉緑体光定位運動はアクチン繊維に依存しているが (Suetsugu and Wada, 2012)、フォトリポピンが葉緑体上のアクチン繊維の重合部位や量を青色光依存的に制御することにより、葉緑体の運動と細胞膜への結合を制御していることが明らかとなっている (Kadota et al., 2009; Kong et al., 2013a)。

フォトリポピン遺伝子 (*PHOT*) は様々な植物で単離されており、種子植物、シダ植物、小葉類、蘚類では複数のフォトリポピン遺伝子が存在していることが示されている (Li et al., 2014)。前述のように、シロイヌナズナでは *phot1* と *phot2* の2分子種が存在している。シダ植物のハウライシダでは、葉緑体の集合反応と逃避反応は青色光と赤色光の両方で誘導されるが (Yatsunami et al., 1985)、その光受容体として2つのフォトリポピン (*Acphot1* と *Acphot2*) と1つのネオクロムが単離されており、フォトリポピンファミリーが3分子種存在することが明らかになっている (Nozue et al., 1998; Kagawa et al., 2004)。ネオクロムは赤色光受容体フィトクロムの発色団結合ドメインと全長のフォトリポピンから構成されたキメラ光受容体である。ネオクロムは葉緑体光定位運動を制御する赤色光受容体であることが示されたが (Kawai et al., 2003)、LOVドメインを介して青色光による葉緑体運動も制御できる可能性が示唆されている (Kanegae et al., 2006)。蘚類のヒメツリガネゴケでも葉緑体逃避反応や集合反応は赤色光と青色光で誘起される (Kadota et al., 2000)。ヒメツリガネゴケのゲノムにはネオクロム遺伝子は存在しないものの、7分子種のフォトリポピン遺伝子が存在する (Rensing et al., 2008)。このうちの4つ、*photA1*、*A2*、*B1*、*B2* については青色光依存的な葉緑体光定位運動において機能することが確認されている (Kasahara et al., 2004)。さらに赤色光依存的な葉緑体運動についても、フィトクロム (Mittmann et al., 2004; Uenaka and Kadota, 2007) とともにこれらのフォトリポピン (Kasahara et al., 2004) が機能していることが示されている。フォトリポピンとフィトクロムの直接的な相互作用が赤色光依存的な葉緑体光定位運動に関与していることが示唆されており (Jaedicke et al., 2012)、赤色光依存的な葉緑体運動のシグナル経路でもフォトリポピンが必須の因子であることが明らかとなっている



(Kasahara et al., 2004)。

単細胞の緑藻クラミドモナスには、フォトトロピンは1分子種のみ存在する (Huang et al., 2002; Kasahara et al., 2002)。クラミドモナスの *PHOT* 遺伝子をシロイヌナズナ *phot1 phot2* 変異体において発現させると、葉緑体光定位運動の欠損を相補することから (Onodera et al., 2005)、フォトトロピンが制御する葉緑体光定位運動のシグナル伝達機構における初期段階は緑色植物において広く保存されていることが示唆されている。クラミドモナスにおける単一のフォトトロピンの存在は、フォトトロピンの制御機構を解析するうえで理想的ではあるものの、クラミドモナスでは葉緑体光定位運動が観察されないため、葉緑体光定位運動のモデルとして有用でない。

### 基部陸上植物ゼニゴケ

陸上植物はコケ植物と維管束植物に大別され、維管束植物は小葉類、シダ植物、裸子植物、被子植物に分類される。本研究において用いたゼニゴケ *Marchantia polymorpha* L. は苔類に属しており、蘚類、苔類、ツノゴケ類から構成されるコケ植物の1種である。コケ植物は進化上最も早くに分岐した陸上植物群であり、なかでも苔類は陸上植物の進化上最も基部に位置しており (Bowman et al., 2007)、陸上植物で共通してみられる様々な生理学的応答を解析するうえで重要な植物種である。

ゼニゴケの生活環の大半を占める葉状体は配偶体である (図2)。ゼニゴケは雌雄異株であり、自然環境下では春と秋に葉状体先端に雄器床や雌器床を形成し、受精によって胞子を形成する有性生殖による繁殖を行う。無性生殖によって繁殖することも可能であり、1年を通して葉状体上に形成される杯状体内の無性芽は1細胞由来のクローンであり、地表に落ちると新たな葉状体へと成長する。葉状体の構造は扁平で、葉状体本体と仮根によって構成される単純な体制をもつ。種子植物で広く見られるような根・茎・葉といった器官は存在しない。葉状体の背側には光合成に必要なガス交換の場と考えられている気室が表面を覆うように多数存在している。仮根は葉状体腹側に形成され、仮根によって地面に固着した状態で地表を這うように成長するが、仮根は水分および栄養分の吸収能力を持たないため、葉状体全体で土壤中の水分や栄養分を吸収する。

このように、ゼニゴケは体制の単純さに加えて遺伝的に均一なクローンを容易に取得できるという実験材料としての利点を有する。また、生活環の大半を半数体で過ごすことから、遺伝子型と表現型が一致しており、変異の優性や劣性に関わらず表現型観察を行うことができるという遺伝学的解析における利点も備えている。

近年、ゼニゴケにおいて分子遺伝学的解析を行うための基盤整備が進められてきた。これまでに、パーティクルボンバードメントを用いた核ゲノム (Takenaka et al., 2000) および葉緑体ゲノム (Chiyoda et al., 2007; Chiyoda et al., 2008) への形質転換法、アグロバクテリウムによる高効率な核ゲノムへの形質転換法 (Ishizaki et al., 2008; Kubota et al., 2013; Tsuboyama and Kodama, 2014) が確立された。 $\gamma$ 線照射やEMS処理による変異誘起および突

然変異体の単離、T-DNA タギングを用いた形質転換による変異体の取得と原因遺伝子の同定 (Ishizaki et al., 2013b) などが行えるようになっており、順遺伝学的な解析が可能となっている。また、相同組換えを利用した遺伝子ターゲティング法 (Ishizaki et al., 2013a)、CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集法 (Sugano et al., 2014) などの逆遺伝学的手法も利用可能である。

さらに、異なる発生段階や光条件の植物体に由来する EST 情報 (Nagai et al., 1999; Nishiyama et al., 2000) が利用可能となっており、ゲノム全体に対する PAC ゲノムライブラリーの構築 (Okada et al., 2000) に加えて、ゲノム解読プロジェクトがアメリカの Joint Genome Institute の Community Sequencing Program (<http://jgi.doe.gov/why-sequence-a-liverwort/>) のもとで進行中である。

これまでの研究の結果、ゼニゴケゲノムには、植物の主な光受容体であるフィトクロム、クリプトクロム、フォトトロピンがそれぞれ 1 分子種ずつ存在していること、主要な概日時計構成因子を 1 分子種ずつ保持していることなどが明らかになっており、ゼニゴケは遺伝的冗長性が低く、陸上植物の進化に伴って複雑化したシグナル伝達機構の原型を単純な形で保持していることが期待されている。

### ゼニゴケにおける青色光応答反応

これまでに、本研究室において、さまざまなゼニゴケ光応答反応の解析が行われてきた。赤色光応答反応としては、発芽胞子および葉状体の細胞分裂制御や生殖生長相移行制御、葉状体の扁平生長促進が報告されている (石崎ら、2013)。青色光によって誘導される光応答反応としては、葉状体や原糸体の光屈性 (Phototropism)、原糸体の偏光屈性 (Polarotropism)、葉緑体光定位運動 (Chloroplast photorelocation movement)、背腹性決定 (Dorsoventral patterning) が確認されている (図 3)。ゼニゴケの無性芽や胞子に対して一方向から青色弱光を連続照射すると、葉状体や原糸体の先端は光源方向に向かって成長し、青色光に対する正の光屈性を示す。原糸体は、成長途中においても光照射方向の変化を認識して成長方向を変化させる。また、原糸体は、青色の偏光についてその振動方向を認識し、振動方向に対して垂直な方向へ成長軸を定めて成長する偏光屈性を示す。葉状体発生過程においても青色光は重要な役割を担っており、扁平な円盤状で表裏の違いをもたない無性芽は、葉状体へと成長する過程で気室に富んだ背側組織を青色光依存的に形成するという背腹性決定を行っている。

これらのゼニゴケ青色光応答反応のうち、光合成効率化に寄与している葉緑体光定位運動については古くから報告されている (Senn, 1908)。葉状体背側表面に形成される気室内部に存在するフィラメント状の同化糸では、入射光の角度に応じて葉緑体の局在位置が変化する様子が観察されていた (図 4)。また、青色光が葉緑体局在変化を引き起こすのに有効な光波長であることも示唆されていた。しかしながら、ゼニゴケを含めた苔類の葉緑体光定位運動に関する詳細な観察は不足している。そこで、本研究ではゼニゴケにおいて葉緑体

光定位運動を詳細に観察すると同時に、分子遺伝学的解析によって葉緑体光定位運動における光受容体がフォトトロピンであることを明らかにした。

## 第 2 章 材料と方法

### 実験材料と培養条件

本研究では、ゼニゴケの野生型雄株として Takaragaike-1 (Tak-1)、野生型雌株として Takaragaike-2 (Tak-2) または BC3-38 を用いた (Ishizaki et al., 2008)。BC3-38 は Tak-1 と Tak-2 を掛け合わせて取得した F1 の雌株に対して、Tak-1 との戻し交配を 3 回繰り返して取得した雌株である。BC3-38 について、Tak-1 と Tak-2 のゲノム DNA に存在する多型を検出するマーカー 27 個を用いて解析を行った結果、多型マーカーの 27 箇所の遺伝子部位に関して Tak-1 遺伝背景であることが確認された。植物体はそれぞれ 1/2 Gamborg's B5 寒天培地 [(Gamborg et al., 1968), pH 5.5, 1% (w/v) 寒天] を用いて、連続白色光 (約  $20 \text{ Wm}^{-2}$ )、 $22^\circ\text{C}$  条件で培養した。観察および表現型解析には野生株として Tak-1 を用いた。

### 葉緑体光定位運動の観察

1/2 Gamborg's B5 寒天培地、 $22^\circ\text{C}$ 、連続白色光条件で無性芽から 3 日間培養したものを幼葉状体として各光処理を行った。葉緑体の局在は 1 層または数層の細胞からなる幼葉状体の周縁部で観察した。

青色光照射には青色 LED (MIL-B18, SANYO Electric, Osaka, Japan)、赤色光照射には赤色 LED (MIL-R18, SANYO Electric) を用い、減光フィルター (Smoke 20, Sumitomo 3M, Tokyo, Japan) で光強度を調節した。暗黒定位は、培養 3 日目の幼葉状体を暗黒条件でさらに 3 日間培養した後、観察を行った。

マイクロビーム照射は、直径 25 mm、厚さ 5 mm のキュベット (スチールリング、丸型カバーガラス、シリコンのスペーサーで構成される) に幼葉状体を移して行った (Wada et al., 1983)。幼葉状体を移したキュベットを顕微鏡のステージにセットし、マイクロビーム照射装置 (Yatsunashi and Wada, 1990; Tsuboi et al., 2006; Wada, 2007) でさまざまな光強度の赤色光または青色光を連続照射し、赤外光で葉緑体の局在変化を経時的に観察した。マイクロビームの照射領域は  $50 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  または直径  $25 \mu\text{m}$  とした。幼葉状体のキュベット封入、キュベットの設置、観察など、作業はすべて緑色弱光下で行った。マイクロビーム照射に伴う葉緑体運動過程は 1 分ごとに写真を撮影して記録した。撮影写真を ImageJ (version 1.45s; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて解析した。赤色光および青色光のマイクロビームは、それぞれ、 $1 \text{ Wm}^{-2}$  あたり約 5.5 または  $3.8 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  に相当する。

暗黒定位の定量化における葉緑体占有面積および細胞表面積の計測は過去のシロイヌナズナにおける計測を参考にした (Suetsugu et al., 2005a)。

### 原系体光屈性の観察と原系体光屈性変異体のスクリーニング

突然変異を誘起した孢子群を作出するために、Tak-1 と BC3-38 を交配して得られた孢子

群に対して $\gamma$ 線 (200 Gy) の照射を行った。原糸体を観察するために、滅菌した胞子を 1% (w/v) スクロース含有 1/2 Gamborg's B5 寒天培地に播いた。一方向から青色弱光 (およそ  $1.5 \text{ Wm}^{-2}$ ) が連続照射される環境で 14 日間培養し、原糸体へと成長させたのち、その形態を観察した。 $\gamma$  線照射胞子のうち、光源方向に向かって直線状に成長する野生型胞子とは異なる成長を示した個体を単離し、原糸体光屈性変異体とした。白色光下で葉状体へと成長させたのち無性芽を取得し、葉緑体光定位運動を観察した。

### ゲノム DNA の抽出

全ゲノム DNA は、連続白色光下で無性芽から 2 週間培養し、さらに 2 日間暗処理した Tak-1 または各形質転換体の葉状体 (約 5.0 g) を用いて、CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) 法 (Ishizaki et al., 2013a) によって抽出した。抽出後のゲノム DNA はサザンブロット解析に用いた。

### ゼニゴケフォトリロピンの単離

ゼニゴケフォトリロピン cDNA 配列の一部は、これまでに用いられていた縮重プライマー (Kagawa et al., 2004) を用いて単離した。この cDNA 部分配列を基に設計したプライマーを用いて、本研究室に存在するゼニゴケ PAC ゲノムライブラリー (Okada et al., 2000) を検索し、PCR によってゼニゴケフォトリロピンを含む PAC クローンを複数単離した。単離した PAC クローンの中の 1 つ、pMM23-591 A3 のシーケンス解析の結果、ゼニゴケフォトリロピンのゲノム配列を決定した。

### サザンブロット解析

CTAB 法で抽出した約 4  $\mu\text{g}$  の全ゲノム DNA を制限酵素によって切断した後、0.6% (w/v) アガロースゲル電気泳動で分離した。泳動後のゲルは、ナイロンメンブレン (Biodyne A, PALL, Port Washington, NY, USA) にブロッティングした。メンブレンは、Church hybridization buffer (Church and Gilbert, 1984) で  $50^\circ\text{C}$ 、1 時間プレハイブリダイゼーションした後、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP で標識したプローブを用いて、 $50^\circ\text{C}$  でハイブリダイゼーションした。プローブは Random Primer Labeling Kit Ver.2 (Takara Bio, Shiga, Japan) で標識し、フォトリロピンの分子種の確認には LOV2 プローブ (1050 bp) を、ジーンターゲット解析には 3 種類のプローブ (P1、P2 および P3; それぞれ 1182, 902, 1000 bp) を用いた。メンブレンの洗浄、解析は過去の手法に従った (Chiyoda et al., 2008)。

### フォトリロピンの系統解析

フォトリロピンアミノ酸配列のマルチプルアライメントの作成には Geneious version 6.1.8 (Biomatters; <http://www.geneious.com/>) に搭載されている MUSCLE プログラム (Edgar, 2004) を用いた。次に Gblocks ([http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks\\_server.html](http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html)) によって

相同性の低い領域を取り除き、J $\alpha$ ヘリックスと C 末端領域のセリン/スレオニンキナーゼドメインを含む相同性の高い領域を使って、Geneious の MrBayes 2.0.9 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001)、Markov-chain Monte-Carlo simulations を用いて系統樹を作成した。解析には Rate Matrix=blosum; Rate Variation=gamma; Gamma Categories=4; Chain Length=1000000; Subsampling Freq=200; Heated Chains=4; Burn-in Length=250000; Heated Chain Temp=0.2 のパラメーターを用い、アウトグループにはプラシノ藻オストレオコッカスのフォトリポピン配列を用いた。系統解析に用いたフォトリポピンとそのアクセッション番号を以下に示す。

- ✓ シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana*; At\_PHOT1 (AAC01753)、At\_PHOT2 (AAC27293)
- ✓ イネ *Oryza sativa*; Os\_PHOT1a (BAA84780)、Os\_PHOT1b (BAA84779)
- ✓ アンボレラ *Amborella trichopoda*; Atr\_PHOT1 (XP\_006828236)、Atr\_PHOT2 (XP\_006849852)
- ✓ ホウライシダ *Adiantum capillus-veneris*; Ac\_PHOT1 (BAA95669)、Ac\_PHOT2 (BAD16730)
- ✓ イヌカタヒバ *Selaginella moellendorffii*; Sm\_PHOT1-1 (EFJ32904)、Sm\_PHOT1-2 (EFJ15768)、Sm\_PHOT2-1 (EFJ27458)、Sm\_PHOT2-2 (EFJ07343)
- ✓ ヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens*; Pp\_PHOTA1 (EDQ60892)、Pp\_PHOTA2 (EDQ60548)、Pp\_PHOTA3 (EDQ69871)、Pp\_PHOTA4 (EDQ71981)、Pp\_PHOTB1 (EDQ68737)、Pp\_PHOTB2 (EDQ49461)、Pp\_PHOTB3 (EDQ79801)
- ✓ ヒザオリ *Mougeotia scalaris*; Ms\_PHOTA (AB206968)、Ms\_PHOTB (AB206969)
- ✓ クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii*; Cr\_PHOT (CAC94941)
- ✓ オストレオコッカス *Ostreococcus tauri*; Ot\_PHOT (CAL58288)

### ターゲティングによるフォトリポピンノックアウト株の作出

ゼニゴケフォトリポピンのノックアウト株を作出するために、pJHY-TMp1 ベクターを用いた (Ishizaki et al., 2013a)。フォトリポピン遺伝子の 5'側および 3'側の相同組換え領域 (3492 bp および 3482 bp) を KOD FX Neo (Toyobo, Osaka, Japan) によるゲノミック PCR で増幅し、pJHY-TMp1 の *PacI* サイトと *AscI* サイトにそれぞれ In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) を用いて挿入した。PCR のプライマーとして、5'側領域には PHOT-5IF-L / PHOT-5IF-R (表 1)、3'側領域には PHOT-3IF-L / PHOT-3IF-R (表 1) を用いた。作出したターゲティングコンストラクトをアグロバクテリウムによって Tak-1 と Tak-2 の交配で得た野生型胞子に導入し (Ishizaki et al., 2008; Ishizaki et al., 2013a)、候補となる形質転換体を 10  $\mu$ g/ml ハイグロマイシンで薬剤選抜した。薬剤耐性株 (T1 世代) から相同組換えによってノックアウトされた株をゲノミック PCR で選抜した (Ishizaki et al., 2013a)。選抜には GT-L2 / GT-R3、GT\_L0 / P1R、および HIF / GT\_R5 の 3 種類のプライマーセット (表 1) を用い、野生株と異なるサイズの増幅断片が得られる個体を探索した。選抜後、T1 世代から 1

細胞由来で形成される無性芽 (G1 世代) を取得し (Ishizaki et al., 2012)、取得した 2 株をゼニゴケフォトリロピンノックアウト株 (*Mpphot*<sup>KO</sup>) として、G1 世代で形成される無性芽 (G2 世代) を各実験に用いた。

### *Mpphot*<sup>KO</sup> の相補株の作出

*Mpphot*<sup>KO</sup> 株において *MpPHOT* を発現させた相補株を作出するために、クロロスルフロンの耐性を植物に付与する mutated *ACETOLACTATE SYNTHASE* 遺伝子 (*mALS*) をもつバイナリーベクター (pMpGWB302; 石崎ら、未発表) を用いた。フォトリロピンのコード領域の上流約 5 kb をプロモーター領域とし、プロモーター領域とコード領域からなるゲノム配列を PCR によって取得し、エントリークローン (pAI019) を作成した。*MpPHOT* のゲノム断片を含む pAI019 を作出するために、プロモーター領域とコーディング領域を PCR によって増幅させた。プロモーター領域の増幅には PRO\_L / PRO\_R (表 1)、コーディング領域の増幅には Infusion\_fw / Infusion\_rv をプライマーとしてそれぞれ用いた (表 1)。プロモーター領域を pENTR/D-TOPO (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) にクローニングしたのちに、*Hind*III による制限酵素処理および In-Fusion HD Cloning Kit によってコーディング領域をプロモーター領域の下流に挿入し、*MpPHOT* の開始コドンの上流 5 kb と 3'UTR までの全長約 13 kb を含む pAI019 を作成した。LR Clonase II (Life Technologies) によって *MpPHOT* カセットを pMpGWB302 に挿入したコンストラクトを、葉状体切断片による形質転換法 (Kubota et al., 2013) によって *Mpphot*<sup>KO</sup> 株に導入し、0.5 μM クロロスルフロンの (DuPont, Wilmington, DE, USA) による薬剤選抜によって、*Mpphot*<sup>KO</sup> 相補株 (*gMpPHOT/Mpphot*<sup>KO</sup>) を作出した。

### フォトリロピン抗体を用いた免疫ブロット法

ゼニゴケの免疫ブロッティングには、培養 7 日目の葉状体を 3 日間暗処理し、各光処理を行った後でサンプリングして用いた。葉状体 (100-200 mg 程度) を液体窒素で凍結し、乳鉢で破碎してタンパク質抽出を行った。*Mpphot* の発現解析には等量の抽出バッファー [1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM sodium fluoride, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)] を加え、4°C、16,000g で 20 分間遠心した上清を用いた。8% (w/v) SDS-PAGE ゲルでタンパク質画分をサイズ分画し、polyvinylidene difluoride メンブレン (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) に転写を行った。本研究室で作出されたウサギ抗 *Mpphot* 抗体を 5000 倍希釈して一次抗体反応に用い、二次抗体反応には 10000 倍希釈したウサギ IgG 抗体 [Anti-rabbit IgG HRP-conjugated secondary antibody (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)] を用いた。ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) によって ImageQuant LAS-4010 digital imaging system (GE Healthcare) で化学発光の検出を行った。

## 細胞内局在解析

蛍光タンパク質によって標識された *Mpphot* (*gMpPHOT-Citrine*) を発現する形質転換体を作成するために、PRO\_L / PRO\_R および Infusion\_fw / Infusion\_Cend\_rv (表 1) を用いて *MpPHOT* のプロモーター領域および開始コドンから最後のセンスコドンまでのコーディング領域をもつコンストラクトを上記の相補株作成の過程と同様に作出し、C 末端に Citrine を付与するバイナリーベクター pMpGWB307 (Ishizaki et al., 2013b) に挿入した。完成したバイナリープラスミドを *Mpphot*<sup>KO</sup> 株の葉状体へ形質転換した。Citrine の蛍光シグナルは培養 3 日目の幼葉状体において共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000; Olympus, Tokyo, Japan) で、波長 515 nm の励起光を照射し、525 - 565 nm の蛍光を観察した。

## *MpPHOT* を導入したホウライシダ *phot2* 変異体における葉緑体光定位運動の解析

ホウライシダにおいて *MpPHOT* を一過的に発現させた株を取得するために、MpPHOT-L / MpPHOT-R (表 1) のプライマーを用いて *MpPHOT* cDNA 配列を取得して、pGWB2 ベクター (Nakagawa et al., 2007) に Gateway system (Life Technologies) を用いてクローニングして *35S:MpPHOT* を作出した。ホウライシダ *phot2* 変異体に *35S:MpPHOT* ベクターと *35S:GFP* ベクターを同時にパーティクルボンバードメントによって導入し (Kagawa et al., 2004)、GFP 蛍光を指標にして *MpPHOT* が導入された細胞を探索した。青色光 (100 Wm<sup>-2</sup>) のマイクロビーム照射による葉緑体局在変化について 1 分間隔で写真を撮影し、*MpPHOT* 導入細胞と非導入細胞で比較を行った。

## *MpPHOT* を導入したシロイヌナズナ *phot1 phot2* 変異体における葉緑体光定位運動の解析

*MpPHOT* cDNA 配列を pGWB2 ベクター (Nakagawa et al., 2007) に Gateway system (Life Technologies) を用いてクローニングし、アグロバクテリウムを介してシロイヌナズナ *phot1 phot2* 二重変異体 (*phot1-5 phot2-1*) に導入した。形質転換体における葉緑体運動を葉の光透過率変化 (Wada and Kong, 2011) により調べた。赤色光 (650 nm) の透過率を 2 分間隔で自動的にマイクロプレートリーダー (VersaMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) で計測し、青色光照射に伴う透過率変化を解析した。

## Accession Numbers

*MpPHOT* のゲノム配列および cDNA 配列は DDBJ/GenBank/EMBL データベースへ登録を行った。登録したアクセッション番号を以下に示す。

- ✓ AB938187 (*MpPHOT* gene)
- ✓ AB938188 (*MpPHOT* cDNA)



## 第3章 結果

### 3-1 苔類ゼニゴケ幼葉状体における葉緑体局在変化の解析

これまでに報告されているゼニゴケの光による葉緑体局在変化は、気室内の同化糸で観察されていた (Senn, 1908)。しかしながら、同化糸は気室を構成する屋根の細胞に覆われているため (Kny, 1890)、葉状体切断片の作成なしに表層から観察することは困難であった。また、気室の形成に伴う葉状体構造の多層化によって、葉状体表皮細胞での葉緑体観察も困難であったことから、本研究では比較的細胞層の少ない気室形成前の幼葉状体 (無性芽から成長する葉状体の成長初期のもの、本研究では培養3日目のものを用いた) を観察に用いることとした。

初めに、野生株の幼葉状体を用いてさまざまな光条件のもとで葉緑体の分布パターンを観察した。連続白色光下で3日間培養した幼葉状体では、白色光下で葉緑体は細胞の上面を覆うように局在しており (図 5A)、葉緑体集合反応における典型的な局在パターンを示していた。青色強光 ( $50 \text{ Wm}^{-2}$ ) を2時間照射すると、葉緑体は細胞の水平面から垂直面へと局在を変化させ (図 5B)、他の植物で観察される典型的な逃避反応を示した。対照的に、赤色強光 ( $50 \text{ Wm}^{-2}$ ) を2時間照射した場合では、葉緑体は細胞の水平面に留まっており (図 5C)、赤色光に依存する葉緑体の局在変化は観察されなかった。

また、白色光下で培養した幼葉状体に対して3日間の暗処理を施すと、青色強光を照射した場合と同様に、葉緑体は細胞の水平面から垂直面へと局在を変化させていた (図 5D)。しかしながら、葉状体周縁部の細胞では逃避反応時とは異なる葉緑体局在パターンが観察された。青色強光下での逃避反応の場合、周縁部の細胞でも内側の細胞でも葉緑体は細胞のすべての垂直面に局在しており、周縁部の細胞の最外に位置する垂直細胞面にも葉緑体が局在していた (図 5B)。暗処理の場合、内側の細胞では青色強光照射時と同様にすべての垂直面に葉緑体が局在していたが、ホウライシダの前葉体細胞における葉緑体局在変化に類似して (Kagawa and Wada, 1993; Kagawa and Wada, 1995; Tsuboi et al., 2007)、周縁部の細胞では一番外側の垂直面には葉緑体は局在しておらず、他の細胞と隣接する垂直面にのみ局在していた (図 5D)。暗処理に依存した特徴的な葉緑体局在パターンが観察されたことから、この局在パターンをゼニゴケの暗黒定位とした。

次に、ゼニゴケにおける葉緑体光定位運動を細胞レベルで詳細に解析するために、シロイヌナズナ (Kagawa and Wada, 2000) やホウライシダ (Kagawa and Wada, 1999) においてなされたようにマイクロビーム照射を用いて光量および光質の変化に伴う葉緑体光定位運動を詳細に顕微鏡観察した (図 6)。青色弱光 ( $10 \text{ Wm}^{-2}$ ) では、光照射領域外にあった葉緑体は光照射領域内へと移動し、光照射領域内にあった葉緑体はそのまま光照射領域内に留まっており (図 6A、E)、照射光に対する集合反応が観察された。青色強光 ( $50 \text{ Wm}^{-2}$ ) では、

光照射領域外の葉緑体は光照射領域内に移動することができず光照射領域外に留まるが、光照射領域内の葉緑体は光照射領域外へと移動し (図 6B、F)、照射光に対する逃避反応が観察された。

光量および光質を変えて同様の観察を行ったところ (表 2)、青色光の場合、 $0.01 \text{ Wm}^{-2}$  から  $25 \text{ Wm}^{-2}$  の範囲では、葉緑体の集合反応が観察された。 $37.5 \text{ Wm}^{-2}$  では、葉緑体によって集合反応または弱い逃避反応が観察された。 $50 \text{ Wm}^{-2}$  以上の光量では明確な逃避反応が観察されたことから、逃避反応と集合反応の境界が  $37.5 \text{ Wm}^{-2}$  付近であることが示唆された。

赤色光のマイクロビーム照射では実験に用いた全ての光量条件で、葉緑体の光定位運動は観察されなかった (図 6C、D、G、H)。蘚類のヒメツリガネゴケの場合、白色光下で培養した原糸体と異なり、連続赤色光下で培養した原糸体は赤色光によって誘導される葉緑体局在変化を示す (Kadota et al., 2000)。しかしながら、ゼニゴケの場合、連続赤色光下で培養した幼葉状体でも赤色光依存的な集合反応や逃避反応を観察することはできなかったことから、ゼニゴケの葉緑体運動は赤色光で誘導されないことが示唆された。

以上の結果から、ゼニゴケ葉緑体光定位運動は赤色光ではなく青色光によって誘導されることが示された。

### 3-2 苔類ゼニゴケにおける青色光受容体フォトトロピン遺伝子の単離と構造解析

3-1 では、ゼニゴケの青色光依存的な葉緑体光定位運動が観察された。シロイヌナズナやホウライシダ、ヒメツリガネゴケで葉緑体光定位運動の青色光受容体としてフォトトロピンが同定されていることから、ゼニゴケ葉緑体光定位運動の光受容体候補としてフォトトロピンに着目し、フォトトロピン遺伝子の単離と同定を試みた。

まず、フォトトロピン LOV2 ドメインとキナーゼドメインの保存領域に対応する縮重プライマーを用いた RT-PCR により、ゼニゴケフォトトロピン遺伝子 (*MpPHOT*) の断片を増幅させたところ、単一の cDNA 断片が取得された。その cDNA 配列を基に、本研究室で確立された PAC ゲノムライブラリーからフォトトロピン遺伝子を含む PAC クローン (pMM23-591 A3) を単離し、その配列解読によってフォトトロピン遺伝子全長とその周辺約 50 kb の配列を決定した。決定した *MpPHOT* のゲノム配列および cDNA 配列は DDBJ/GenBank/EMBL データベースへ登録を行った [アクセッション番号; AB938187 (*MpPHOT* gene) および AB938188 (*MpPHOT* cDNA)]。

野生株のゲノム DNA を用いたサザンブロット解析において (図 7)、フォトトロピンのシグナルは、上記で決定したゲノム配列から予測される位置にのみ検出されたことから、ゼニゴケのフォトトロピン遺伝子は 1 分子種であることが示された。さらに、現行のゲノムデータベースおよびさまざまな組織由来のトランスクリプトームの情報の解析からも、ゼニゴケには単離したフォトトロピン 1 分子種のみが存在していることが支持された。

単離した *MpPHOT* は 24 エキソンと 23 インترونから構成されていた。*MpPHOT* の ORF におけるイントロンの挿入位置は、基本的にシロイヌナズナの *PHOT1* または *PHOT2* の位置と共通しており、アミノ酸配列における相同性が低い 1 か所のみ比較ができなかった (図 8)。*MpPHOT* の ORF は 1,115 アミノ酸をコードすることが推定され、2 つの LOV ドメイン (LOV1 と LOV2) と 1 つのセリン/スレオニンキナーゼドメインから構成されていた (図 9)。LOV ドメインのアミノ酸配列は、これまでに明らかになっている他の植物種のフォトトロピンと高い相同性を示しており、発色団 FMN との結合および光活性化に必要なアミノ酸残基 (Crosson and Moffat, 2001) も保存されていた (図 10)。したがって、ゼニゴケフォトトロピンの LOV ドメインは光反応する可能性が示唆された。*Mpphot* の LOV1 ドメインの上流の N 末端領域は、シダ植物や蘚類のフォトトロピン同様 (Kagawa et al., 2004; Kasahara et al., 2004)、種子植物のフォトトロピンの N 末端領域より長くなっていた (図 9)。N 末端領域の植物種間における保存性は低いものの、シロイヌナズナの *phot1* および *phot2* でリン酸化が報告されているいくつかのセリン残基 (Inoue et al., 2008; Inoue et al., 2011) に対応するセリン残基が *Mpphot* の N 末端領域においても保存されていた (図 10; 黒色のアスタリスク)。また、セリン/スレオニンキナーゼドメインも他の植物種のフォトトロピンと高い相同性を示したが (図 10)、特に、シロイヌナズナ *phot1* および *phot2* の機能において重要な自己リン酸化部位であるキナーゼドメインのアクチベーションループ内にある 2 つのセリン残基 (Inoue et al., 2008; Inoue et al., 2011) は *Mpphot* においても完全に保存されていた (図 10; 赤色の三角)。

植物種間で保存性の高いセリン/スレオニンキナーゼドメイン周辺の領域 (*Mpphot* の 699 – 1087 aa に相当する; 図 11) を用いた系統解析の結果、*MpPHOT* はコケ植物のフォトトロピンのクレードに属していた (図 12)。コケ植物のクレードは、被子植物やシダ植物、小葉類のクレードとは異なるクレードを形成しており、被子植物における *phot1* および *phot2* の分岐以前に分岐していた。また、*MpPHOT* はコケ植物の中でも、蘚類ヒメツリガネゴケにおける *photA* と *photB* の分岐の基部に位置しており、蘚類や維管束植物のように、複数分子種化している陸上植物のフォトトロピンの基部に位置していた。最近報告されたフォトトロピン遺伝子の大規模な系統解析においてもゼニゴケを含む苔類 7 種のフォトトロピンは被子植物の *phot1* および *phot2* とは異なるクレードを形成することが示されており、蘚類や維管束植物の基部に位置することが示唆されている (Li et al., 2014)。また、Li et al. (2014) の解析において、用いられたゼニゴケを含む苔類すべてでフォトトロピンが 1 分子種のみ単離されていることから、ゼニゴケのフォトトロピンが 1 分子種のみであるという本研究の結果が支持される。

以上のことから、陸上植物の進化上最も基部に位置する苔類に属するゼニゴケは、他の陸上植物種では進化に伴って複数分子種化しているフォトトロピンの基部に位置する祖先的なフォトトロピンを 1 分子種のみ有していることが示唆された。

### 3-3 葉緑体光定位運動における青色光受容体フォトトロピンの機能解析

本節では *Mpphot* の葉緑体光定位運動における機能解析を目的とした逆遺伝学的解析を行った。はじめに *MpPHOT* のノックアウト株の作出を行った (3-3-1)。次に作出したノックアウト株およびその相補株を用いて葉緑体光定位運動を詳細に解析した (3-3-2)。また、*Mpphot* の細胞内局在について観察を行った (3-3-3)。

#### 3-3-1. ジーンターゲティング法によるフォトトロピンノックアウト株の作出

*Mpphot* の葉緑体光定位運動における役割を明らかにするために、ジーンターゲティング法 (Ishizaki et al., 2013a) を用いてフォトトロピンのノックアウト株を作出した。相同組換えによって、発色団 FMN とのフラビン C(4a)-システイン結合に寄与するシステイン残基を含む LOV1 ドメインの一部をコードする 276 bp をハイグロマイシン耐性カセットに置換して (図 13A)、ノックアウト株 (*Mpphot*<sup>KO</sup>) を 2 株作出した。ゲノミック PCR による *Mpphot*<sup>KO</sup> 株選抜では、ハイグロマイシン耐性カセットの挿入によって、野生株とは異なるサイズの増幅断片が *Mpphot*<sup>KO</sup> 株で検出された (図 13B)。取得した *Mpphot*<sup>KO</sup> 株についてサザンブロット解析を行った結果、1 コピーのターゲティングコンストラクトがフォトトロピン遺伝子内に相同組換えによって挿入されていることが確認された (図 13C)。また、*Mpphot* 抗体を用いたウエスタンブロッティングによるフォトトロピタンパク質の発現解析の結果、野生株で検出されたフォトトロピン (123.3 kDa) のシグナルは *Mpphot*<sup>KO</sup> 株では検出されず、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株ではフォトトロピタンパク質が蓄積していないことが確認された (図 14)。

さらに、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株が示す表現型がフォトトロピン遺伝子の破壊によって起こっていることを明らかにするために、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株において *MpPHOT* プロモーター制御下で *MpPHOT* を発現する相補株 (*gMpPHOT/Mpphot*<sup>KO</sup>) を作出した。ウエスタンブロッティングの結果、*gMpPHOT/Mpphot*<sup>KO</sup> 株では、フォトトロピンが野生株と同程度蓄積していた (図 14)。

#### 3-3-2. フォトトロピンノックアウト株における葉緑体光定位運動の解析

作出したフォトトロピンノックアウト株およびその相補株において葉緑体局在変化を観察し、野生株の葉緑体光定位運動と比較することで、葉緑体光定位運動におけるフォトトロピンの役割を明らかにすることを試みた。連続白色光下では、野生株の葉緑体は細胞の上面を覆うように全体に集まっているのに対して (図 5A)、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株の葉緑体は、細胞の上面にまばらに局在していた (図 15A)。したがって、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株は葉緑体集合反応に欠損をもつ可能性が示唆された。また、野生株で葉緑体の逃避反応が観察される光量の青色光 (50 Wm<sup>-2</sup>) を 2 時間照射した条件下では、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株は照射前と同様の葉緑体局在を示していた (図 15A)。これらの結果から、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株は集合反応に加えて葉緑体逃避反応にも異常をもつことが示された。

さらに、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株では暗処理後に野生株と異なる葉緑体局在が観察された。3 日間の暗

処理の後、野生株の辺縁部の細胞では葉状体の最外の垂直細胞面に葉緑体の局在は見られなかったが (図 5D)、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株では隣接する細胞のない垂直面にそって局在する葉緑体が複数存在していた (図 15A)。また、暗処理後の細胞の表面上に局在する葉緑体が野生株に比べて *Mpphot*<sup>KO</sup> 株で多くなっていた。そこで、細胞上面全体の面積に対して葉緑体が占める面積を計測して比率を求めたところ (図 16)、野生株と異なり、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株における葉緑体占有比率は暗処理の前後でほとんど変化が見られなかった。よって、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株では暗処理に伴う葉緑体の局在変化が生じていないことが示され、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株の葉緑体暗黒定位に欠損があることが明らかとなった。*Mpphot*<sup>KO</sup> 株では集合反応、逃避反応、暗黒定位の欠損が見られたが、これらの欠損は *gMpPHOT/Mpphot*<sup>KO</sup> 株においてすべて回復していた (図 15B および 16)。

*Mpphot* の機能についてより詳細な解析を行うために、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株および *gMpPHOT/Mpphot*<sup>KO</sup> 株においてマイクロビーム照射を用いた観察を行った。青色弱光 (10 Wm<sup>-2</sup>) の場合、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株の葉緑体は光照射領域に向かう移動を示さず、集合反応は観察されなかった (図 17A、E)。青色強光 (50 Wm<sup>-2</sup>) では、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株の逃避反応は観察されず、光照射領域内に局在する葉緑体は領域内に留まっていた (図 17B、F)。強光および弱光の両条件において、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株の葉緑体は細胞の水平面と垂直面にまばらに局在していて、光に応じた局在変化を示さなかったことから、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株において集合反応および逃避反応が欠損していることが改めて確認された。また、*gMpPHOT/Mpphot*<sup>KO</sup> 株では青色弱光による集合反応も青色強光による逃避反応もそれぞれ回復していた (図 17C、D、G、H)。

以上の結果から、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株における葉緑体光定位運動の欠損は *MpPHOT* の欠失に起因するものであり、*Mpphot* はゼニゴケにおける葉緑体光定位運動の光受容体として機能していることが示された。

### 3-3-3. 蛍光タンパク質を用いたフォトリポソムの細胞内局在解析

*Mpphot* の発現パターンと細胞内局在を明らかにするために、*Mpphot* の C 末端に蛍光タンパク質である Citrine を融合させた *Mpphot*-Citrine の遺伝子を *MpPHOT* プロモーター制御下で発現するコンストラクトを作成し、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株に対して形質転換を行った。取得した *Mpphot*-Citrine 株 (*gMpPHOT-Citrine/Mpphot*<sup>KO</sup>) では、野生株と同様の葉緑体光定位運動が観察され (図 18)、Citrine 標識した *Mpphot* がフォトリポソムとして機能的であることが示された。

培養 3 日目の幼葉状体において蛍光顕微鏡による観察を行った (図 19A)。*Mpphot*-Citrine による蛍光シグナルは、葉緑体光定位運動が観察された葉状体辺縁部の細胞だけでなく、小さな細胞が多く存在しているメリステム領域や仮根が形成されている基部の領域でも観察された。したがって *Mpphot* は幼葉状体全体に存在していることが示された。

また、高倍率下では細胞膜付近で特に強いシグナルが観察され (図 19B)、*Mpphot*-Citrine の細胞膜局在が示唆された。

### 3-4 葉緑体光定位運動変異体の分離と原因遺伝子の探索

本節では、ゼニゴケ葉緑体光定位運動の変異株の取得とその原因遺伝子の同定を目的として、葉緑体光定位運動と既知のゼニゴケ青色光応答反応である原糸体光屈性を指標とした変異体の探索を行った (3-4-1)。また、取得した葉緑体光定位運動変異株において、原因遺伝子の候補であるフォトトロピンにおける変異解析を行った (3-4-2)。

#### 3-4-1. 青色光依存的な原糸体光屈性を指標とした青色光応答変異体の選抜

前節までの逆遺伝学的手法による葉緑体光定位運動の光受容体解析と並行して、葉緑体光定位運動変異体の単離と解析による葉緑体光定位運動の順遺伝学的解析を行った。植物の青色光応答反応は、葉緑体光定位運動以外にも様々なものが観察されている。代表的なモデル植物であるシロイヌナズナでは、葉緑体光定位運動に異常のある変異体で、気孔開口や芽生えの光屈性などに異常があることが報告されている (Kinoshita et al., 2001; Sakai et al., 2001)。フォトトロピンの変異体における表現型異常の共通性から、葉緑体光定位運動と光屈性におけるシグナル伝達機構は共通する部分があると考えられており、両方の現象に欠損を示す変異体は、光受容体あるいは光受容体に近いところで機能している比較的上流のシグナル伝達因子の変異体である可能性が高い。

ゼニゴケにおける光屈性の観察では、これまでに青色光および赤色光を用いて光質依存的な原糸体の成長方向の解析が行われ、原糸体が青色光光源に向かって先端成長する正の光屈性を示すことが示唆されている。この原糸体の光屈性を指標にした一次スクリーニングを行い、得られた原糸体光屈性変異体の中に葉緑体光定位運動にも変異のある個体が存在すると期待し、 $\gamma$ 線照射によって突然変異を誘起した孢子群から青色光応答変異体を選抜することとした。

1方向からの青色光照射条件で成長させた野生型孢子では、光源方向に向かった直線状の原糸体しか観察されなかった (図 20A)。約 11,000 個体の  $\gamma$  線照射孢子由来の原糸体を観察したところ、ほとんどの個体は先端が光源方向に向かった直線状の形態になり、野生型孢子と同様に正の光屈性を示すのに対して、少数の個体では屈曲や高頻度の分岐によって直線状にはならず、先端が光源方向に向かわない形態を示していた (図 20B-E)。野生型孢子と異なる形態を示した原糸体を原糸体光屈性変異体として単離し、前述の葉緑体光定位運動について、白色光下における集合反応の観察を行った (図 20G-J)。複数の原糸体光屈性変異体における集合反応を観察し、白色光下で野生株のような明確な葉緑体集合反応を示さない株、#41 を取得した。この 1 個体を、*chloroplast abnormal positioning 1 (cap1)* と名付け、青色光照射および暗処理に伴う葉緑体光定位運動の観察を行った。

観察の結果、*cap1* では、白色光での集合反応、青色強光条件での逃避反応、暗処理後の暗黒定位、すべてにおいて野生株と異なる葉緑体局在が観察された (図 21A)。以上より、*cap1* を、原糸体光屈性と葉緑体光定位運動という複数の青色光応答において変異が見られ

る青色光応答変異体として、葉緑体光定位運動に関する解析に用いることとした。

### 3-4-2. 青色光応答変異体における原因遺伝子の探索

単離した青色光応答変異体 *cap1* では、原糸体の光屈性だけでなく葉緑体光定位運動に異常が見られたことから、*MpPHOT* を原因遺伝子の第一候補として解析を行った。

*cap1* 株から単離した *MpPHOT* のゲノム DNA 全長についてシーケンス解析を行い、野生株の配列と比較したところ、21 番目のイントロンから 22 番目のエキソンにかけての 95 bp が欠失していることが明らかとなった (図 22A)。*cap1* 株の RNA を抽出して合成した cDNA で *MpPHOT* のシーケンス解析を行ったところ、セリン/スレオニンキナーゼドメイン内の 2 アミノ酸の代わりに 4 アミノ酸が挿入されたタンパク質をコードする配列となっていた (図 22B)。ゲノム配列でみられた欠失変異の結果、スプライシングパターンの変化が生じたと推測された。

これまでに本研究室において、大腸菌発現系で精製した *cap1* 型の全長フォトリポシンタンパク質を用いた自己リン酸化活性の解析が行われており、*cap1* 変異により自己リン酸化活性が喪失することが示唆されている (寺井三佳氏、私信)。したがって、*cap1* 株で観察された葉緑体光定位運動の欠損は、*MpPHOT* のゲノム配列における部分欠損によって *Mpphot* のキナーゼ活性が失われた結果生じた可能性が示された。

*Mpphot*<sup>KO</sup> 株と同様に、*MpPHOT* を内在性プロモーター制御下で発現させる相補株 (*gMpPHOT/cap1*) を作出して表現型の解析を行ったところ、集合反応、逃避反応、暗黒定位の欠損がすべて回復していた (図 21B)。以上より、*cap1* 株における葉緑体光定位運動および原糸体光屈性に関する欠損は、フォトリポシンのアミノ酸変異に起因することが示唆された。

## 3-5 フォトリポシンによる葉緑体光定位運動制御機構の進化学的解析

本節では、ゼニゴケのフォトリポシン遺伝子を進化的に離れた植物種に導入することで、葉緑体光定位運動における *Mpphot* の役割が陸上植物全般に共通するものであり、他の植物種においても葉緑体光定位運動を制御する青色光受容体として機能できるかを検証した。

### 3-5-1. ホウライシダ変異体におけるゼニゴケフォトリポシンの機能解析

ホウライシダでは葉緑体の逃避反応が欠損した *phot2* 変異体が取得されている (Kagawa et al., 2004)。この *phot2* 変異体の前葉体に対して *PHOT* を *cauliflower mosaic virus 35S (35S)* プロモーター制御下で一過的に発現させることにより、*PHOT* の逃避反応における機能をマイクrobeームで解析する系が確立されている (Kagawa et al., 2004)。

これと同様の方法により、*Mpphot* の機能解析を行った。葉緑体逃避反応について青色強

光 ( $100 \text{ Wm}^{-2}$ ) を用いて観察した結果、隣接する *MpPHOT* 非導入細胞では葉緑体が光照射領域に集まるのに対し、*MpPHOT* 導入細胞では葉緑体は光照射領域外へと逃避反応を示し、*phot2* 変異を抑圧した (図 23)。したがって、*Mpphot* はホウライシダにおいて青色光受容体として機能し、葉緑体逃避反応のシグナル伝達系を活性化できることが示唆された。

### 3-5-2. シロイヌナズナ変異体におけるゼニゴケフォトリポピンの機能解析

次に被子植物シロイヌナズナを用いた機能解析を行った。被子植物シロイヌナズナでは、2分子種存在するフォトリポピンの二重変異体、*phot1 phot2* 変異体が取得されており、葉緑体の集合反応も逃避反応も示さないことが明らかになっている (Sakai et al., 2001)。そのため *phot1 phot2* 変異体を用いることで、*Mpphot* が逃避反応に加えて集合反応においても制御機能を保持しているかを明らかにすることができると期待された。

シロイヌナズナの *phot1 phot2* 変異体において *MpPHOT* を *35S* プロモーター制御下で発現する植物体を作成した。形質転換体 (*MpPHOT/phot1 phot2*) の葉緑体光定位運動を解析するために、葉の光透過性変化の観察およびマイクロビーム照射による葉緑体運動の観察を行った。

シロイヌナズナの野生株の葉の光透過性は、葉緑体光定位運動に依存して青色弱光と青色強光に反応して変化することが知られている (Wada and Kong, 2011)。青色弱光下では葉緑体は集合反応を示し、細胞の水平面に局在して光を吸収するため葉の光透過率が減少する。これに対して、青色強光下では葉緑体は逃避反応によって細胞の垂直面へと移動するため光の透過率が增大する。*phot1 phot2* 変異体では葉緑体光定位運動が欠損しているため、葉の光の透過率は光強度を変えても変化しない (図 24A、B)。*MpPHOT/phot1 phot2* 株では、青色弱光下および青色強光下の両方で部分的ではあるものの明らかな透過性の変化が観察され、葉緑体光定位運動の部分的な回復が示唆された (図 24A、B)。さらにシロイヌナズナの葉緑体光定位運動における *Mpphot* の機能を検証するために、葉肉細胞におけるマイクロビーム照射を行った (図 24C)。青色弱光 ( $1 \text{ Wm}^{-2}$ ) を照射した場合には、光照射領域外の葉緑体は光照射領域に向かって移動を行った。青色強光 ( $100 \text{ Wm}^{-2}$ ) を照射した場合には葉緑体は光照射領域外へと移動した (図 24C)。マイクロビーム照射によって、*MpPHOT/phot1 phot2* 株における葉緑体の集合反応と逃避反応の回復が示された。以上より、*Mpphot* は、シロイヌナズナにおいて集合反応と逃避反応の両方で青色光受容体として機能し得ることが示された。



## 第4章 考察

### 4-1 ゼニゴケ葉緑体光定位運動における青色光受容体フォトトロピンの寄与

葉緑体光定位運動は、古くから緑藻類、コケ植物、シダ植物や種子植物といったさまざまな植物種において観察が行われている (Senn, 1908; Suetsugu and Wada, 2012)。しかしながら、コケ植物のうち苔類における葉緑体光定位運動の知見は、これまでほとんど明らかにされていなかった。ゼニゴケの葉緑体光定位運動が青色光によって誘導されるという知見は存在したが (Nakazato et al., 1999)、その生理学的性質は詳細に解析されておらず、また光受容体の実体も明らかにされていなかった。本研究によって、ゼニゴケの葉緑体光定位運動について青色光依存的であることが明らかとなり、フォトトロピンノックアウト株や青色光応答変異体の解析から青色光受容体フォトトロピンの関与が示された。

過去の知見と同様に、ゼニゴケでは青色光依存的な葉緑体光定位運動が観察された。青色光は  $0.01-25 \text{ Wm}^{-2}$  の範囲では集合反応を誘導し、 $50 \text{ Wm}^{-2}$  以上では反対に逃避反応を誘導した (表 2 および図 6)。集合反応が誘導される青色弱光に対するゼニゴケの感受性は、他の植物同様であるものの、集合反応から逃避反応への移行に必要な光強度は維管束植物に比べてはるかに高いものであった。青色光  $10 \text{ Wm}^{-2}$  以上では、ホウライシダやシロイヌナズナの葉緑体は逃避反応を示すのに対して (Kagawa and Wada, 1999; Kagawa and Wada, 2000)、ゼニゴケの葉緑体は集合反応を示した (図 6)。同じコケ植物に属するヒメツリガネゴケの場合、青色光約  $30 \text{ Wm}^{-2}$  でも集合反応が起こり、逃避反応の誘導にはさらなる強光 ( $100 \text{ Wm}^{-2}$  以上) が必要である (Kadota et al., 2000; Sato et al., 2001)。このように、ゼニゴケで明らかになった逃避反応の誘導に必要な光強度が維管束植物に比べて高いという特徴は、コケ植物に共通しているものと考えられる。この青色光依存的な葉緑体光定位運動が、本研究において作出した *Mpphot<sup>KO</sup>* 株で観察されなくなったことから、これまでに葉緑体光定位運動の光受容体が明らかになっている植物種同様、ゼニゴケの集合反応および逃避反応の光受容体もフォトトロピンであることが示された。

一部の植物では、葉緑体光定位運動は赤色光でも誘導されることが知られている。コケ植物の蘚類ヒメツリガネゴケでは、赤色光下で培養した原糸体で赤色光依存的な葉緑体光定位運動が観察されており (Kadota et al., 2000)、フィトクロムとフォトトロピンの両者によって制御されていることが示唆されている (Kasahara et al., 2004; Mittmann et al., 2004; Uenaka and Kadota, 2007; Jaedicke et al., 2012)。この赤色光に依存した葉緑体光定位運動は、ヒメツリガネゴケと同じ蘚類に属するヒョウタンゴケ (Zurzycki, 1967) やヤノウエノアカゴケ (Kagawa et al., 1997) などでは観察されていない。ゼニゴケはフィトクロムもフォトトロピンも有しているが、本研究では白色光培養条件だけでなく赤色光培養の植物体でも赤色光依存的な葉緑体光定位運動は観察されなかった。以上より、コケ植物の大半は赤色光

に応じた葉緑体光定位運動を示さないものと推測される。

集合反応と逃避反応に加えて、ゼニゴケでは暗黒条件における特徴的な葉緑体局在パターンが観察された (図 5D)。暗黒下の特徴的な葉緑体局在パターンは、植物種によって異なっており (Senn, 1908)、ホウライシダおよびシロイヌナズナの *phot2* 変異体において暗黒定位に異常が生じることが報告されている (Suetsugu et al., 2005a; Tsuboi et al., 2007)。本研究において、ゼニゴケの野生株では葉緑体が葉状体辺縁部の細胞において隣接細胞の間の垂直細胞面のみにも局在する暗黒定位のパターンが観察され、*Mpphot*<sup>KO</sup> 株では葉緑体の暗黒下における局在は不規則となっており、特定の細胞面への局在は観察されなかった。このことから、ゼニゴケには暗黒定位が存在し、その制御には *Mpphot* が関与することが明らかとなった。また、ゼニゴケフォトトロピンは 1 分子種であるにも関わらず、集合反応、逃避反応、暗黒定位の 3 種類の葉緑体光定位運動すべてに関与することが明らかとなった (図 15 および 21)。

#### 4-2 フォトトロピンの制御する葉緑体光定位運動の分子機構

では、どのようにして、集合反応、逃避反応、暗黒定位という 3 種類の葉緑体光定位運動を 1 分子種のゼニゴケフォトトロピンは制御しているのか？シダ植物や被子植物においてフォトトロピンのキナーゼ活性は葉緑体光定位運動に必須であり (Kagawa et al., 2004; Kong et al., 2007; Sullivan et al., 2008; Suetsugu et al., 2013)、特にキナーゼドメイン内のアクチベーションループにおける自己リン酸化がフォトトロピンの生理反応誘導に重要であることが明らかとなっている (Inoue et al., 2008; Inoue et al., 2011; Suetsugu et al., 2013)。また、葉緑体の暗黒定位においても *phot2* の自己リン酸化が関与していることがホウライシダやシロイヌナズナで示されている (Suetsugu et al., 2005a; Tsuboi et al., 2007)。図 10 に示すように、キナーゼドメインは陸上植物種間で高度に保存されており、重要な自己リン酸化部位としてシロイヌナズナで同定されたアクチベーションループの 2 つのセリン残基についてもゼニゴケで保存されている。青色光応答変異株 *cap1* を用いた順遺伝学的解析からは、セリン/スレオニンキナーゼドメイン内のアミノ酸配列の変化によって集合反応、逃避反応、暗黒定位といった葉緑体光定位運動が欠損することが示唆された。*cap1* 株でアミノ酸の挿入と置換が生じていたのはセリン/スレオニンキナーゼドメインのみで、LOV ドメインには変異が見られなかったことから、*cap1* 変異をもつフォトトロピンタンパク質の青色光受容には異常がないと推測される。シグナル伝達を担うキナーゼドメインでの変異によって光応答反応の異常が生じたことから、*Mpphot* のフォトトロピンとしての機能においてキナーゼドメインは重要な役割を担っていることが示された。よって、シロイヌナズナの知見と同様に、ゼニゴケの葉緑体光定位運動において *Mpphot* のキナーゼ活性と自己リン酸化は重要な機能を担っているものと考えられる。また、今回アミノ酸変異が見られた領域はキナーゼドメイン内のアクチベーションループの下流に位置する。変異部位に関して、他の植物種

における先行研究で機能に関わる報告はないものの、*cap1* 型フォトトロピンタンパク質が自己リン酸化活性を喪失したことから、キナーゼ活性やシグナル伝達において重要な部位であることが示唆される。さらに、シロイヌナズナの *phot1* と *phot2* のキナーゼドメインは細胞膜局在と光依存的な局在変化にも寄与している (Kong et al., 2006; Kaiserli et al., 2009; Kong et al., 2013b)。本研究でも *Mpphot* の細胞膜局在が示され、細胞膜付近で機能していることが示唆された。ゼニゴケも含めて多くの植物種のフォトトロピンは膜貫通領域をもたないが、上記のように細胞膜付近に局在していることからフォトトロピンは細胞膜に局在する別の因子あるいは細胞膜の脂質成分との相互作用によって細胞膜に局在しており、その細胞膜局在機構は陸上植物全般で共通していることが考えられる。以上のことから、*Mpphot* は細胞膜付近に局在し、青色光による自己リン酸化によって自身のキナーゼ活性を調整することで青色光シグナル伝達を行うという、他植物で明らかになっているフォトトロピンの基本的性質をすべて保持していることが考えられる。しかしながら、葉緑体光定位運動におけるフォトトロピンのリン酸化基質やその下流の青色光シグナルを伝達する機構についてはいまだ全容が明らかになっていない。

シロイヌナズナにおける解析の結果、葉緑体周辺に存在するタンパク質が活性化することでアクチン繊維の重合が促進されて葉緑体が移動するという葉緑体運動のモデルが提唱されており (Wada, 2013)、移動に関わるアクチン繊維の制御因子として、CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING 1 (CHUP1) や KINESIN-LIKE PROTEIN FOR ACTIN-BASED CHLOROPLAST MOVEMENT (KAC) などが知られている (Oikawa et al., 2003; Suetsugu et al., 2010; Suetsugu et al., 2012)。ゼニゴケにおいてもシロイヌナズナと共通する因子がいくつか存在することが明らかになりつつあり (図 25)、CHUP1 や KAC などのホモログが本研究室で単離されている。ノックアウト株の作出によってそれらの機能解析が進みつつあり、今後の発展が期待される。

以上より、葉緑体光定位運動制御機構について、光受容、信号伝達、葉緑体運動という 3 つの大きな過程に分けると (図 25)、光受容に関してはフォトトロピンが機能し、葉緑体の移動ではアクチン繊維の重合が関与しているところは陸上植物で共通しているものと推測される。また、光受容から葉緑体運動に至る信号伝達に関しては、ほとんど明らかとなっていないものの、集合反応に関わる弱光シグナルと逃避反応に関わる強光シグナルの経路があると推測され、ゼニゴケでは 1 分子種のフォトトロピンの下流で分岐する比較的単純な機構であると期待される。

#### 4-3 陸上植物進化に伴うフォトトロピン遺伝子の重複と機能分化

本研究における系統解析の結果、*MpPHOT* は維管束植物とは異なるクレードに属しており、種子植物における *phot1* と *phot2* の分岐以前に分岐していた。複数の苔類のフォトトロピンを用いた最近の大規模な解析の結果においても苔類のフォトトロピンは独自のクレード

ドを形成しており (Li et al., 2014)、蘚類や維管束植物におけるフォトトロピンの基部で分岐していた。他の植物群のフォトトロピンは複数分子種存在するのに対して、苔類のクレードではそれぞれの植物種に 1 分子種のみが単離されており、本研究におけるゼニゴケのフォトトロピンが 1 分子種であるという解析結果と一致する。また、1 分子種のフォトトロピンが暗黒定位、集合反応、逃避反応といったすべての葉緑体光定位運動を制御していることがゼニゴケで明らかとなった。*Mpphot* のハウライシダやシロイヌナズナへの導入実験の結果から、*Mpphot* のもつ葉緑体光定位運動における制御機能はゼニゴケ特有ではなく、維管束植物においても共通することが示唆された。シロイヌナズナにおける *Mpphot* の導入では、葉の光透過率を用いた解析で集合反応および逃避反応の回復は部分的にしか示されていないものの、マイクロビーム照射による観察では明確な集合反応と逃避反応が観察された。葉の光透過率における *Mpphot* の機能が部分的であった原因として、本研究では *Mpphot* の発現は 35S プロモーターに制御されていたため、*Mpphot* 導入株ではサイレンシングによる *Mpphot* の発現の減少が考えられる。したがって、*Mpphot* はシロイヌナズナの集合反応および逃避反応に関する青色光受容体としての機能を保持していると考えられる。さらに、緑藻クラミドモナスに存在する 1 分子種のフォトトロピンがシロイヌナズナにおいて集合反応と逃避反応の両方の制御能を保持することから (Onodera et al., 2005)、集合反応と逃避反応を制御できるというフォトトロピンの光受容機構は植物の陸上化以前に獲得されており、ゼニゴケのフォトトロピンはその祖先的な機能を保持していると考えられる。

苔類以外の多くの陸上植物にはフォトトロピンが複数分子種存在している。これまでの解析から、複数のフォトトロピンは葉緑体光定位運動に関してある程度の機能重複をもつものの、機能的に分化していることが明らかとなっている。例えば、シロイヌナズナでは、集合反応には *phot1* と *phot2* の両方が重複的に関わっているが、*phot1* は *phot2* に比べて弱光条件下での集合反応に大きく寄与しており (Sakai et al., 2001)、逃避反応および暗黒定位においては *phot2* が主な機能を担っている (Suetsugu and Wada, 2007a; Luesse et al., 2010)。シロイヌナズナと同じように、ハウライシダの逃避反応と暗黒定位も *phot2* で制御されている (Kagawa et al., 2004; Tsuboi et al., 2007)。コケ植物においては、蘚類のヒメツリガネゴケには 7 分子種のフォトトロピン遺伝子が存在している (Rensing et al., 2008)。*PHOTA* (4 分子種) と *PHOTB* (3 分子種) の 2 グループに分けられるが、*photA* は逃避反応で *photB* よりも大きな役割を担っている (Kasahara et al., 2004)。進化上祖先的な位置にある苔類ではフォトトロピンは 1 分子種しか存在せず機能分化が起きていなかったことから、陸上植物は進化の過程でフォトトロピンの遺伝子数を増やして機能を分化させることで、変動する自然光条件下での葉緑体運動の制御機構を高度化させていったと考えられる。

機能分化したフォトトロピンは、集合反応を主に制御する *phot1* タイプと集合反応と逃避反応の両方に関与する *phot2* タイプに大別できる。主に *phot2* タイプのフォトトロピンが機能を担っている葉緑体逃避反応は、太陽光下の植物生存において重要な役割を担っている (Kasahara et al., 2002)。陸上植物進化の初期段階では光を遮るものがなく、祖先的陸上植物

は直接日光にさらされていたので、集合反応よりも逃避反応のほうが植物の生存において大きく貢献していたと考えられる。しかしながら、木本植物の爆発的な進化と多様化によって深い森林が形成されると、林床の植物は深い樹冠から漏れた弱い光を光合成に用いる環境となった。樹冠の下部のような日陰で生存する植物にとって、より弱い光で活性化する phot1 タイプのフォトトロピンを獲得することは、弱光条件に適応するうえで有効な戦略である。また、弱光条件への適応戦略として、青色光だけでなく赤色光も利用できるよう、赤色光受容体フィトクロムの光受容機構とフォトトロピン信号伝達を統合する戦略も生み出された。青色光に加えて赤色光も葉緑体光定位運動に利用する機構として、ホウライシダやヒザオリではフィトクロムの発色団結合領域とフォトトロピンのキメラである光受容体ネオクロムが存在しており (Li et al., 2014)、葉緑体運動が赤色光で制御されている (Nozue et al., 1998; Kawai et al., 2003; Schneider et al., 2004; Suetsugu et al., 2005b; Li et al., 2014)。ヒメツリガネゴケでは、フィトクロムとフォトトロピンの直接的相互作用により赤色光が葉緑体光定位運動を制御する系が示唆されている (Kasahara et al., 2004; Jaedicke et al., 2012)。このように、フォトトロピンの複数分子種化に伴う機能分化といった葉緑体光定位運動に関する光受容機構の進化は、変動する光環境下での陸上植物の爆発的な進化を促進するために貢献していたかもしれない。しかしながら、蘚類や維管束植物では、フォトトロピンの複数分子種化に伴ってシグナル伝達機構が非常に複雑となっており、いまだその全容は解明されていない。

このように多くの陸上植物では生存環境の光条件変化に伴って青色光シグナル伝達機構が複雑化していったと考えられるが、複雑化する以前の祖先的な制御機構を保持しているゼニゴケの葉緑体光定位運動の制御機構は単純であると期待される。以上の点から、ゼニゴケにおいてフォトトロピン信号伝達系の解析を行うことは、陸上植物におけるフォトトロピンが関与する青色光応答を理解するうえで非常に有効であると考えられる。ホウライシダおよびシロイヌナズナを用いた機能解析の結果から、ゼニゴケのフォトトロピンのもつ青色光シグナル伝達機構は維管束植物においても機能し得ることが明らかとなった。これまでのクラミドモナスのフォトトロピンがシロイヌナズナで青色光受容体として機能するという知見とともに、植物の青色光応答における光受容機構に共通性が保持されていることが示唆されており、植物の青色光応答の制御機構には進化に伴う複雑化はあるものの、基本的な機構は保持されていると考えられる。よって、複雑で精密な制御機構をもつ維管束植物に比べて単純なシグナル伝達機構をもつという解析上の利点を備えた苔類で生理現象を解析することで、いまだ把握されていない青色光シグナル伝達機構の全容に関する基本的な知見が得られるものと期待される。陸上植物に共通して観察される葉緑体光定位運動とその基本的な制御機構を保持しているゼニゴケは、今後、大きな発展の見込めるモデル植物である。現在、リン酸化プロテオーム解析を利用したフォトトロピン下流因子の解析や葉緑体光定位運動以外の青色光応答の解析などが進行中である。ゼニゴケを用いた網羅的な青色光応答の解析が進みつつあり、今後有意義な知見をもたらすものと期待される。

## 引用文献

- Bowman JL, Floyd SK, Sakakibara K** (2007) Green genes-comparative genomics of the green branch of life. *Cell* **129**: 229-234
- Böhm J** (1856) Beiträge zur näheren Kenntnis des Chlorophylls. *S B Akad Wiss Wien Math-nat Kl.* **22**: 479-498
- Chiyoda S, Ishizaki K, Kataoka H, Yamato KT, Kohchi T** (2008) Direct transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. by particle bombardment using immature thalli developing from spores. *Plant Cell Rep* **27**: 1467-1473
- Chiyoda S, Linley PJ, Yamato KT, Fukuzawa H, Yokota A, Kohchi T** (2007) Simple and efficient plastid transformation system for the liverwort *Marchantia polymorpha* L. suspension-culture cells. *Transgenic Res* **16**: 41-49
- Christie JM** (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 21-45
- Christie JM, Salomon M, Nozue K, Wada M, Briggs WR** (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8779-8783
- Christie JM, Swartz TE, Bogomolni RA, Briggs WR** (2002) Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J* **32**: 205-219
- Church GM, Gilbert W** (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1991-1995
- Crosson S, Moffat K** (2001) Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2995-3000
- Edgar RC** (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792-1797
- Folta KM, Spalding EP** (2001) Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *Plant J* **26**: 471-478
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**: 151-158
- Harper SM, Neil LC, Gardner KH** (2003) Structural basis of a phototropin light switch. *Science* **301**: 1541-1544
- Huala E, Oeller PW, Liscum E, Han IS, Larsen E, Briggs WR** (1997) *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**: 2120-2123
- Huang K, Merkle T, Beck CF** (2002) Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* gene that encodes a putative blue-light photoreceptor of the phototropin family. *Physiol Plant* **115**: 613-622
- Huelsenbeck JP, Ronquist F** (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees.

Bioinformatics **17**: 754-755

- Inoue S, Kinoshita T, Matsumoto M, Nakayama KI, Doi M, Shimazaki K** (2008) Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5626-5631
- Inoue S, Matsushita T, Tomokiyo Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Kinoshita T, Shimazaki K** (2011) Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in Arabidopsis. *Plant Physiol* **156**: 117-128
- Ishizaki K, Chiyoda S, Yamato KT, Kohchi T** (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. *Plant Cell Physiol* **49**: 1084-1091
- Ishizaki K, Johzuka-Hisatomi Y, Ishida S, Iida S, Kohchi T** (2013a) Homologous recombination-mediated gene targeting in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Sci Rep* **3**: 1532
- Ishizaki K, Mizutani M, Shimamura M, Masuda A, Nishihama R, Kohchi T** (2013b) Essential role of the E3 ubiquitin ligase NOPPERABO1 in schizogenous intercellular space formation in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell* **25**: 4075-4084
- Ishizaki K, Nonomura M, Kato H, Yamato KT, Kohchi T** (2012) Visualization of auxin-mediated transcriptional activation using a common auxin-responsive reporter system in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J Plant Res* **125**: 643-651
- Jaedicke K, Lichtenthaler AL, Meyberg R, Zeidler M, Hughes J** (2012) A phytochrome-phototropin light signaling complex at the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 12231-12236
- Jarillo JA, Gabrys H, Capel J, Alonso JM, Ecker JR, Cashmore AR** (2001) Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* **410**: 952-954
- Jiao Y, Yang H, Ma L, Sun N, Yu H, Liu T, Gao Y, Gu H, Chen Z, Wada M, Gerstein M, Zhao H, Qu LJ, Deng XW** (2003) A genome-wide analysis of blue-light regulation of Arabidopsis transcription factor gene expression during seedling development. *Plant Physiol* **133**: 1480-1493
- Kadota A, Sato Y, Wada M** (2000) Intracellular chloroplast photorelocation in the moss *Physcomitrella patens* is mediated by phytochrome as well as by a blue-light receptor. *Planta* **210**: 932-937
- Kadota A, Yamada N, Suetsugu N, Hirose M, Saito C, Shoda K, Ichikawa S, Kagawa T, Nakano A, Wada M** (2009) Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 13106-13111
- Kagawa T, Kasahara M, Abe T, Yoshida S, Wada M** (2004) Function analysis of phototropin2 using fern mutants deficient in blue light-induced chloroplast avoidance movement. *Plant Cell Physiol* **45**: 416-426
- Kagawa T, Lamparter T, Hartman E, Wada M** (1997) Phytochrome-mediated branch formation in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus*. *Journal of Plant Research* **110**: 363-370

- Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada M** (2001) *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* **291**: 2138-2141
- Kagawa T, Wada M** (1993) Light-dependent nuclear positioning in prothallial cells of *Adiantum capillus-veneris*. *Protoplasma* **177**: 82-85
- Kagawa T, Wada M** (1995) Polarized light induces nuclear migration in prothallial cells of *Adiantum capillus-veneris* L. *Planta* **196**: 775-780
- Kagawa T, Wada M** (1999) Chloroplast-avoidance response induced by high-fluence blue light in prothallial cells of the fern *Adiantum capillus-veneris* as analyzed by microbeam irradiation. *Plant Physiol* **119**: 917-924
- Kagawa T, Wada M** (2000) Blue light-induced chloroplast relocation in *Arabidopsis thaliana* as analyzed by microbeam irradiation. *Plant Cell Physiol* **41**: 84-93
- Kaiserli E, Sullivan S, Jones MA, Feeney KA, Christie JM** (2009) Domain swapping to assess the mechanistic basis of *Arabidopsis* phototropin 1 receptor kinase activation and endocytosis by blue light. *Plant Cell* **21**: 3226-3244
- Kanegae T, Hayashida E, Kuramoto C, Wada M** (2006) A single chromoprotein with triple chromophores acts as both a phytochrome and a phototropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 17997-18001
- Kasahara M, Kagawa T, Sato Y, Kiyosue T, Wada M** (2004) Phototropins mediate blue and red light-induced chloroplast movements in *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol* **135**: 1388-1397
- Kasahara M, Swartz TE, Olney MA, Onodera A, Mochizuki N, Fukuzawa H, Asamizu E, Tabata S, Kanegae H, Takano M, Christie JM, Nagatani A, Briggs WR** (2002) Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from *Arabidopsis*, rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **129**: 762-773
- Kawai H, Kanegae T, Christensen S, Kiyosue T, Sato Y, Imaizumi T, Kadota A, Wada M** (2003) Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor. *Nature* **421**: 287-290
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K** (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**: 656-660
- Knieb E, Salomon M, Rüdiger W** (2004) Tissue-specific and subcellular localization of phototropin determined by immuno-blotting. *Planta* **218**: 843-851
- Kny L** (1890) Bau und Entwicklung von *Marchantia Polymorpha* L. In *Botanische Wandtafeln mit Erläuterndem*. Verlag von Wiegandt, Hempel & Parey, Berlin, pp 364-401
- Kong SG, Arai Y, Suetsugu N, Yanagida T, Wada M** (2013a) Rapid severing and motility of chloroplast-actin filaments are required for the chloroplast avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 572-590



- Kong SG, Kagawa T, Wada M, Nagatani A** (2013b) A C-terminal membrane association domain of phototropin 2 is necessary for chloroplast movement. *Plant Cell Physiol* **54**: 57-68
- Kong SG, Kinoshita T, Shimazaki K, Mochizuki N, Suzuki T, Nagatani A** (2007) The C-terminal kinase fragment of Arabidopsis phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses. *Plant J* **51**: 862-873
- Kong SG, Suetsugu N, Kikuchi S, Nakai M, Nagatani A, Wada M** (2013c) Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity. *Plant Cell Physiol* **54**: 80-92
- Kong SG, Suzuki T, Tamura K, Mochizuki N, Hara-Nishimura I, Nagatani A** (2006) Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *Plant J* **45**: 994-1005
- Kozuka T, Kong SG, Doi M, Shimazaki K, Nagatani A** (2011) Tissue-autonomous promotion of palisade cell development by phototropin 2 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 3684-3695
- Kubota A, Ishizaki K, Hosaka M, Kohchi T** (2013) Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Biosci Biotechnol Biochem* **77**: 167-172
- Lehmann P, Nöthen J, von Braun SS, Bohnsack MT, Mirus O, Schleiff E** (2011) Transitions of gene expression induced by short-term blue light. *Plant Biol (Stuttg)* **13**: 349-361
- Li FW, Villarreal JC, Kelly S, Rothfels CJ, Melkonian M, Frangedakis E, Ruhsam M, Sigel EM, Der JP, Pittermann J, Burge DO, Pokorny L, Larsson A, Chen T, Weststrand S, Thomas P, Carpenter E, Zhang Y, Tian Z, Chen L, Yan Z, Zhu Y, Sun X, Wang J, Stevenson DW, Crandall-Stotler BJ, Shaw AJ, Deyholos MK, Soltis DE, Graham SW, Windham MD, Langdale JA, Wong GK, Mathews S, Pryer KM** (2014) Horizontal transfer of an adaptive chimeric photoreceptor from bryophytes to ferns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 6672-6677
- Luesse DR, DeBlasio SL, Hangarter RP** (2010) Integration of Phot1, Phot2, and PhyB signalling in light-induced chloroplast movements. *J Exp Bot* **61**: 4387-4397
- Mittmann F, Brücker G, Zeidler M, Repp A, Abts T, Hartmann E, Hughes J** (2004) Targeted knockout in *Physcomitrella* reveals direct actions of phytochrome in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13939-13944
- Nagai J, Yamato KT, Sakaida M, Yoda H, Fukuzawa H, Ohyama K** (1999) Expressed sequence tags from immature female sexual organ of a liverwort, *Marchantia polymorpha*. *DNA Res* **6**: 1-11
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T** (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* **104**: 34-41
- Nakazato T, Kadota A, Wada M** (1999) Photoinduction of spore germination in *Marchantia polymorpha* L. is mediated by photosynthesis. *Plant and Cell Physiology* **40**: 1014-1020
- Nishiyama R, Yamato KT, Miura K, Sakaida M, Okada S, Kono K, Takahama M, Sone T,**

- Takenaka M, Fukuzawa H, Ohyama K** (2000) Comparison of expressed sequence tags from male and female sexual organs of *Marchantia polymorpha*. *DNA Res* **7**: 165-174
- Nozue K, Kanegae T, Imaizumi T, Fukuda S, Okamoto H, Yeh KC, Lagarias JC, Wada M** (1998) A phytochrome from the fern *Adiantum* with features of the putative photoreceptor NPH1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15826-15830
- Ohgishi M, Saji K, Okada K, Sakai T** (2004) Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1, and phot2, by using combinatorial multiple mutants in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2223-2228
- Oikawa K, Kasahara M, Kiyosue T, Kagawa T, Suetsugu N, Takahashi F, Kanegae T, Niwa Y, Kadota A, Wada M** (2003) Chloroplast unusual positioning1 is essential for proper chloroplast positioning. *Plant Cell* **15**: 2805-2815
- Okada S, Fujisawa M, Sone T, Nakayama S, Nishiyama R, Takenaka M, Yamaoka S, Sakaida M, Kono K, Takahama M, Yamato KT, Fukuzawa H, Brennicke A, Ohyama K** (2000) Construction of male and female PAC genomic libraries suitable for identification of Y-chromosome-specific clones from the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant J* **24**: 421-428
- Onodera A, Kong SG, Doi M, Shimazaki K, Christie J, Mochizuki N, Nagatani A** (2005) Phototropin from *Chlamydomonas reinhardtii* is functional in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **46**: 367-374
- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, Kamisugi Y, Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin-I T, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aoki S, Ashton N, Barbazuk WB, Barker E, Bennetzen JL, Blankenship R, Cho SH, Dutcher SK, Estelle M, Fawcett JA, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks KA, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson DR, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A, Schween G, Shiu SH, Stueber K, Theodoulou FL, Tu H, Van de Peer Y, Verrier PJ, Waters E, Wood A, Yang L, Cove D, Cuming AC, Hasebe M, Lucas S, Mishler BD, Reski R, Grigoriev IV, Quatrano RS, Boore JL** (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**: 64-69
- Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz TE, Christie JM, Briggs WR, Wada M, Okada K** (2001) *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6969-6974
- Sakamoto K, Briggs WR** (2002) Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* **14**: 1723-1735
- Sato Y, Wada M, Kadota A** (2001) Choice of tracks, microtubules and/or actin filaments for chloroplast photo-movement is differentially controlled by phytochrome and a blue light receptor. *J Cell Sci*

114: 269-279

- Schneider H, Schuettpelz E, Pryer KM, Cranfill R, Magallón S, Lupia R** (2004) Ferns diversified in the shadow of angiosperms. *Nature* **428**: 553-557
- Senn G** (1908) Die Gestalts- und Lageveränderung der Pflanzen-Chromatophoren. W. Engelmann, Leipzig
- Suetsugu N, Kagawa T, Wada M** (2005a) An auxilin-like J-domain protein, JAC1, regulates phototropin-mediated chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 151-162
- Suetsugu N, Kong SG, Kasahara M, Wada M** (2013) Both LOV1 and LOV2 domains of phototropin2 function as the photosensory domain for hypocotyl phototropic responses in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am J Bot* **100**: 60-69
- Suetsugu N, Mittmann F, Wagner G, Hughes J, Wada M** (2005b) A chimeric photoreceptor gene, *NEOCHROME*, has arisen twice during plant evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13705-13709
- Suetsugu N, Sato Y, Tsuboi H, Kasahara M, Imaizumi T, Kagawa T, Hiwatashi Y, Hasebe M, Wada M** (2012) The KAC family of kinesin-like proteins is essential for the association of chloroplasts with the plasma membrane in land plants. *Plant Cell Physiol* **53**: 1854-1865
- Suetsugu N, Wada M** (2007a) Chloroplast photorelocation movement mediated by phototropin family proteins in green plants. *Biol Chem* **388**: 927-935
- Suetsugu N, Wada M** (2007b) Phytochrome-dependent photomovement responses mediated by phototropin family proteins in cryptogam plants. *Photochem Photobiol* **83**: 87-93
- Suetsugu N, Wada M** (2012) Chloroplast photorelocation movement: a sophisticated strategy for chloroplasts to perform efficient photosynthesis. InTech Publishers, Rijeka
- Suetsugu N, Wada M** (2013) Evolution of three LOV blue light receptor families in green plants and photosynthetic stramenopiles: phototropin, ZTL/FKF1/LKP2 and aureochrome. *Plant Cell Physiol* **54**: 8-23
- Suetsugu N, Yamada N, Kagawa T, Yonekura H, Uyeda TQ, Kadota A, Wada M** (2010) Two kinesin-like proteins mediate actin-based chloroplast movement in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 8860-8865
- Sugano SS, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Shimada T, Hara-Nishimura I, Kohchi T** (2014) CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol* **55**: 475-481
- Sullivan S, Thomson CE, Lamont DJ, Jones MA, Christie JM** (2008) In vivo phosphorylation site mapping and functional characterization of *Arabidopsis* phototropin 1. *Mol Plant* **1**: 178-194
- Takayama Y, Nakasako M, Okajima K, Iwata A, Kashojiya S, Matsui Y, Tokutomi S** (2011) Light-induced movement of the LOV2 domain in an Asp720Asn mutant LOV2-kinase fragment of *Arabidopsis* phototropin 2. *Biochemistry* **50**: 1174-1183

- Takenaka M, Yamaoka S, Hanajiri T, Shimizu-Ueda Y, Yamato KT, Fukuzawa H, Ohyama K** (2000) Direct transformation and plant regeneration of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Transgenic Res* **9**: 179-185
- Tsuboi H, Suetsugu N, Kawai-Toyooka H, Wada M** (2007) Phototropins and neochrome1 mediate nuclear movement in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Plant Cell Physiol* **48**: 892-896
- Tsuboi H, Suetsugu N, Wada M** (2006) Negative phototropic response of rhizoid cells in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *J Plant Res* **119**: 505-512
- Tsuboyama S, Kodama Y** (2014) AgarTrap: a simplified *Agrobacterium*-mediated transformation method for sporelings of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol* **55**: 229-236
- Uenaka H, Kadota A** (2007) Functional analyses of the *Physcomitrella patens* phytochromes in regulating chloroplast avoidance movement. *Plant J* **51**: 1050-1061
- Wada M** (1988) Chloroplast Photoorientation in Eucleated Fern Protonemata. *Plant and Cell Physiology* **29**: 1227-1232
- Wada M** (2007) The fern as a model system to study photomorphogenesis. *J Plant Res* **120**: 3-16
- Wada M** (2013) Chloroplast movement. *Plant Science* **210**: 177-182
- Wada M, Kadota A, Furuya M** (1983) Intracellular localization and dichroic orientation of phytochrome in plasma membrane and/or ectoplasm of a centrifuged protonema of fern *Adiantum capillus-veneris* L. *Plant Cell Physiol* **24**: 1441-1447
- Wada M, Kong SG** (2011) Analysis of chloroplast movement and relocation in Arabidopsis. *Methods Mol Biol* **774**: 87-102
- Wan YL, Eisinger W, Ehrhardt D, Kubitscheck U, Baluska F, Briggs W** (2008) The subcellular localization and blue-light-induced movement of phototropin 1-GFP in etiolated seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **1**: 103-117
- Yatsuhashi H, Kadota A, Wada M** (1985) Blue- and red-light action in photoorientation of chloroplasts in *Adiantum* protonemata. *Planta* **165**: 43-50
- Yatsuhashi H, Wada M** (1990) High-fluence rate responses in the light-oriented chloroplast movement in *Adiantum* protonemata. *Plant Science* **68**: 87-94
- Zurzycki J** (1967) Properties and localization of the photoreceptor active in displacements of chloroplasts in *Funaria hygrometrica*. I. Action spectrum. *Acta Soc Bot Pol* **36**: 133-142
- 石崎公庸, 井上佳祐, 河内孝之 (2013) 基部陸上植物の光応答戦略ーフィトクロムを介した光形態形成の分子機構ー. *BSJ Review* **4**: 37-44.
- 河内孝之, 石崎公庸 (2012) 古くて新しいモデル植物としてのタイ類ゼニゴケの特徴. *BSJ Review* **3**: 58-70.

## 図表

表1. プライマーリスト

プライマー名	配列
PHOT-5IF-L	5'-CTAAGGTAGCGATTAAGTGGTGGCAAACGAGGTAG-3'
PHOT-5IF-R	5'-CCGGGCAAGCTTTTACTGGAAAAGAAGCGAGAGCAT-3'
PHOT-3IF-L	5'-AACACTAGTGGCGCGTCATCATCTACGTCGCTTCG-3'
PHOT-3IF-R	5'-TTATCCCTAGGCGCGGATGCTCTGCGAGACATTA-3'
GT-L2	5'-ATGGGGAGTGCTGATGAAGA-3'
GT-R3	5'-TCCCTGGAGAAATCGACTGT-3'
GT_L0	5'-GAATCTGGCAAGGAGTTCCA-3'
P1R	5'-GAAGGCTTCTGATTGAAGTTTCCTTTTCTG-3'
HIF	5'-GTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTTT-3'
GT_R5	5'-GGCCTAGGAAAGACAACACG -3'
PRO_L	5'-CACCATCCAGCACCATGAGAAGTA-3'
PRO_R	5'-AAGCTTGGCTCGTCCTGATTT-3'
Infusion_fw	5'-TCAGGACGAGCCAAGATGATGCCCTCCACGGATTC-3'
Infusion_rv	5'-CGCGCCCACCCTTCTGAATTTGACATCCTCCTAAG-3'
Infusion_Cend_rv	5'-CGCGCCCACCCTTATATTCATCAAATGAGGCGG-3'
MpPHOT-L	5'-CACCATGATGCCCTCCAC-3'
MpPHOT-R	5'-TTAATATTCATCAAATGAGGCGG-3'

表2. 青色光または赤色光照射による葉緑体光定位運動

Light intensity (Wm <sup>-2</sup> )	Blue	Red
0.001	no movement	N. D.
0.01	Ac	N. D.
0.1	Ac	N. D.
1.0	Ac	no movement
10	Ac	no movement
25	Ac	N. D.
37.5	Ac or weak Av	N. D.
50	Av	no movement
75	Av	no movement

さまざまな光量の青色光または赤色光をマイクロビーム照射し、葉緑体の局在変化を解析した。Ac, 集合反応; Av, 逃避反応; N. D., 未解析

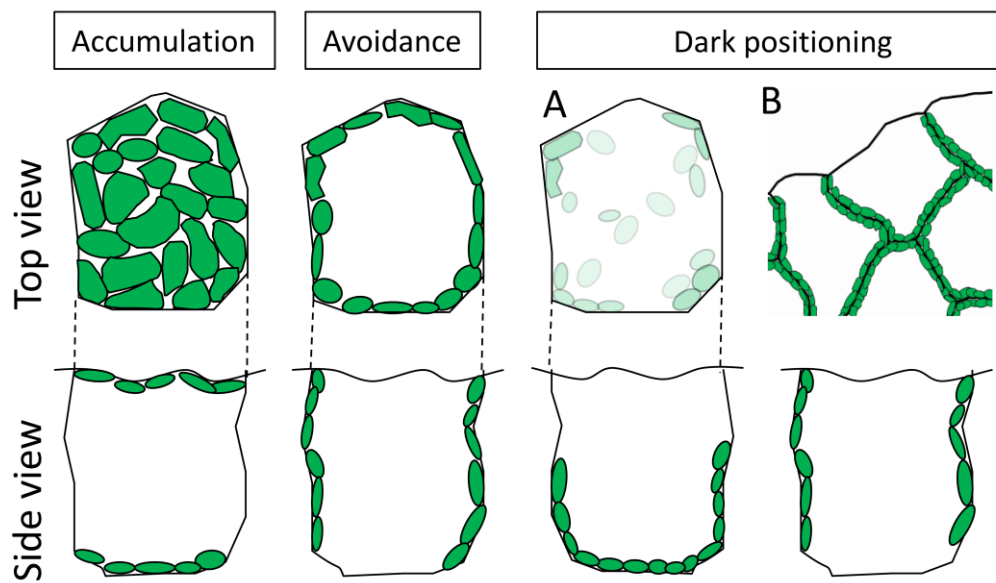


図1. 植物細胞における葉緑体光定位運動の模式図

弱光条件では、葉緑体(緑色)は細胞の水平面全体に広がって局在する(集合反応; Accumulation)。強光条件では葉緑体は細胞の垂直面に局在する(逃避反応; Avoidance)。暗黒条件では、葉緑体は一定の局在パターンを示す(暗黒定位; Dark positioning)。暗処理後、シロイヌナズナの葉肉細胞(A)では葉緑体は細胞底面に位置し、ホウライシダ(B)では細胞と細胞が接する垂直面にのみ葉緑体が局在する。

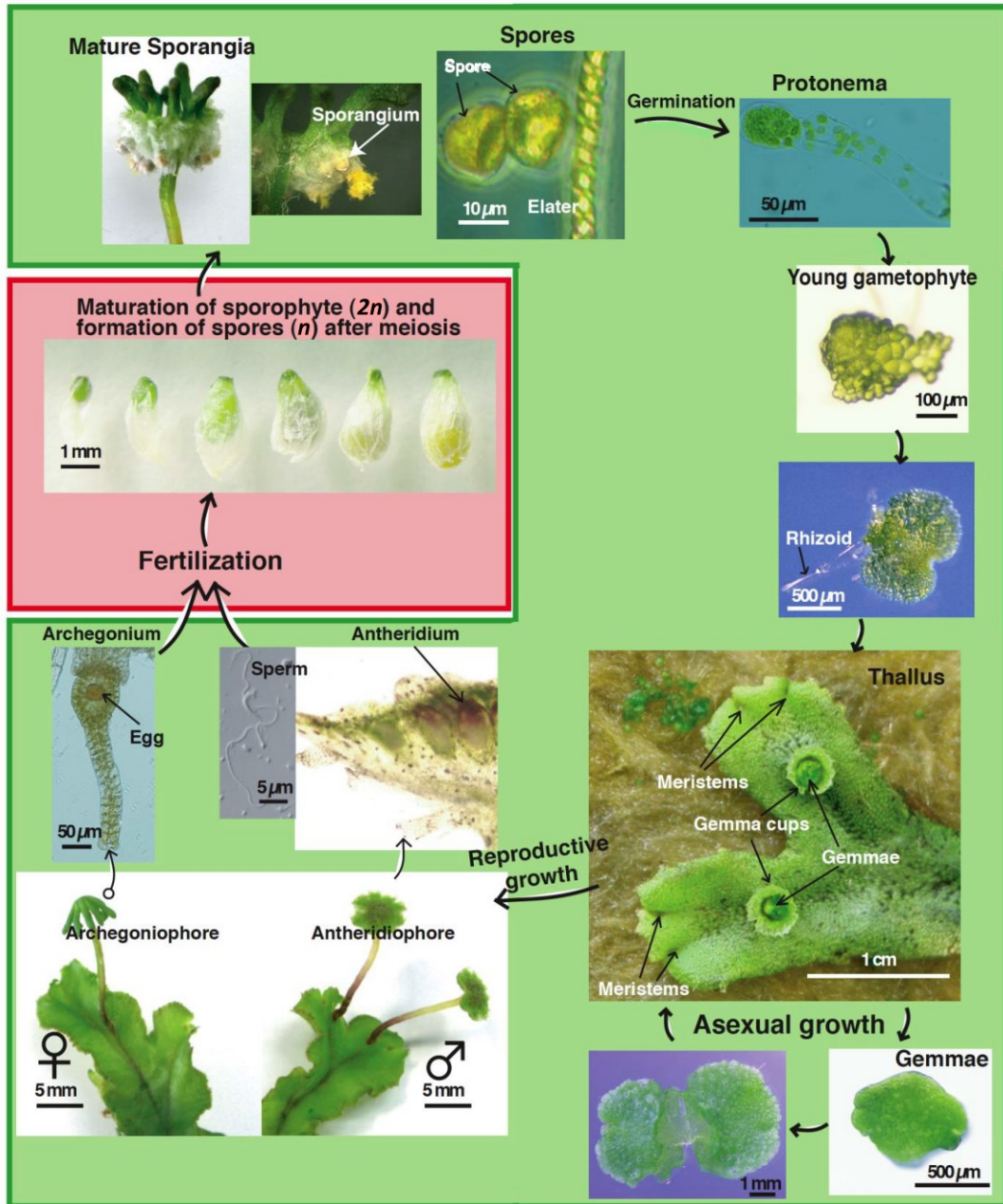


図2. 苔類ゼニゴケの生活環

無性芽による無性生殖の生活環と、精子と卵を介した有性生殖の生活環の両方を有する。生活環の大半を、配偶体世代が占める ( $n$ ; 緑色背景)。受精後、胞子を形成する過程のみ2倍体となる ( $2n$ ; 赤色背景)。石崎公庸博士作成の図(河内・石崎、2012)を基に一部改変。



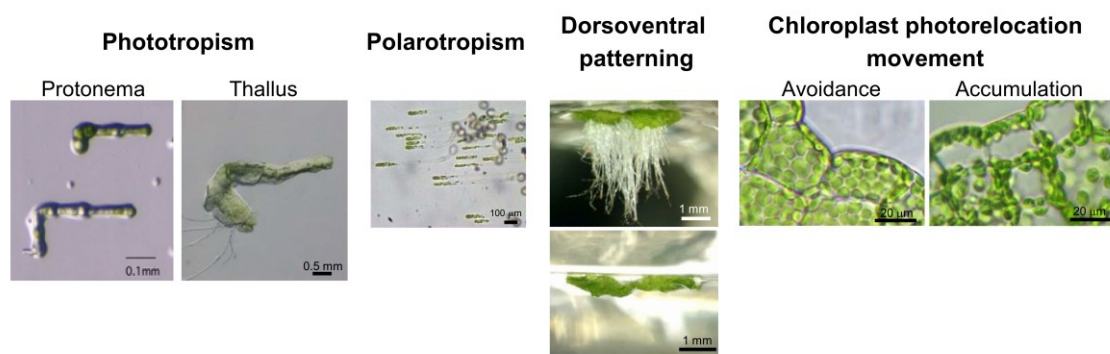


図3. ゼニゴケにおける青色光応答反応

ゼニゴケにおけるこれまでの解析の結果明らかになった青色応答反応を示す。原糸体 (Protonema) は青色弱光方向に伸長成長し、光源方向の変更に伴って伸長方向を変化させ、葉状体 (Thallus) の先端は青色光光源に向かって成長する (Phototropism)。原糸体は青色偏光の振動方向に対して垂直な方向に伸長する (Polarotropism)。葉状体の背腹性決定 (Dorsoventral patterning) は青色光光源方向によって変化する。Dorsoventral patterningにおける葉状体写真は芦原悠紀子氏撮影。葉緑体は青色強度によって集合反応 (Accumulation) や逃避反応 (Avoidance) を示す。

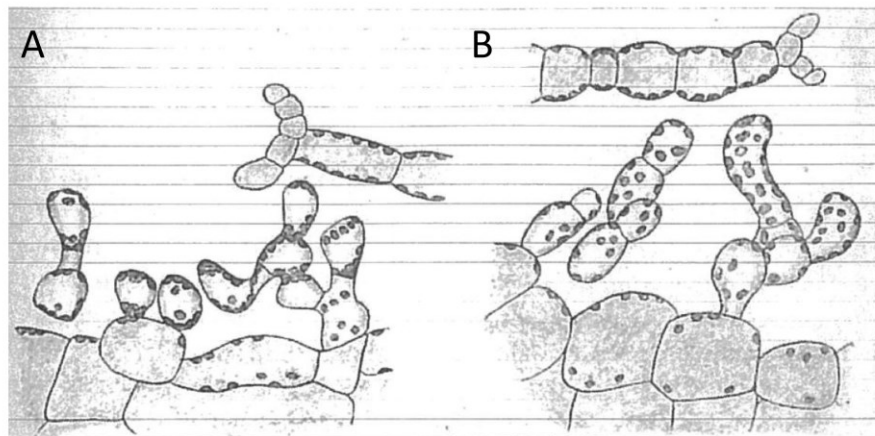


図4. ゼニゴケ同化系における葉緑体局在変化 (Senn, 1908より転載)

(A) ゼニゴケ葉状体に対して垂直な光を照射した条件での葉緑体局在。(B) 入射光 $60^\circ$ の収斂光照射条件または屋外における自然状態での葉緑体局在。

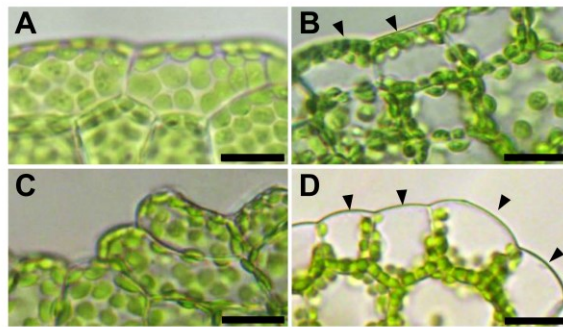


図5. 野生型幼葉状体における葉緑体局在分布

白色光下で3日間培養した幼葉状体を異なる光条件においた時の葉緑体局在観察結果を示す。(A) 光条件変更前。(B) 青色光 ( $50 \text{ Wm}^{-2}$ 、120分間) 照射後。(C) 赤色光 ( $50 \text{ Wm}^{-2}$ 、120分間) 照射後。(D) 3日間の暗処理後。黒色の三角は幼葉状体の辺縁部細胞の最外面を示す (B、D)。スケールバーは  $20 \mu\text{m}$ 。

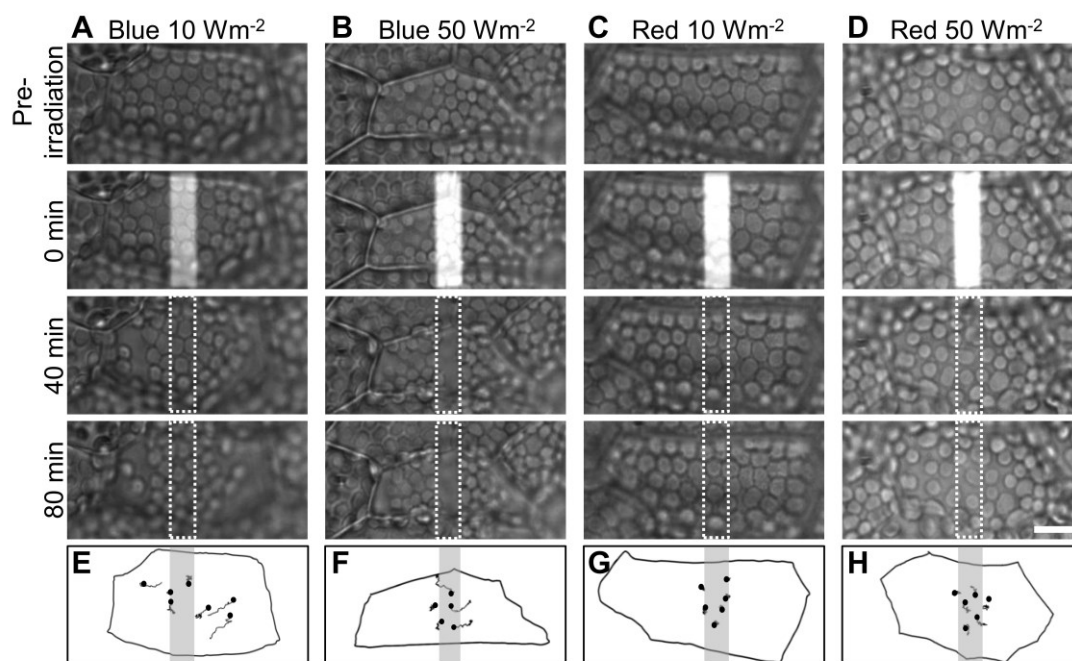


図6. 野生型幼葉状体におけるマイクロビーム照射に伴う葉緑体の局在変化

(AからD) 各光条件における葉緑体局在変化の経時的観察。写真内の破線で囲った範囲の幼葉状体の細胞に青色光 [ $10 \text{ Wm}^{-2}$  (A) /  $50 \text{ Wm}^{-2}$  (B)] または赤色光 [ $10 \text{ Wm}^{-2}$  (C) /  $50 \text{ Wm}^{-2}$  (D)] のマイクロビームを80分間照射した。(EからH) 各条件における葉緑体の挙動。照射前の各葉緑体の位置を黒丸で、1分ごとに写真撮影して追跡した葉緑体の軌跡を黒の実線で示す。同様の実験を3回以上行い、同様の結果が再現することを確認している。スケールバーは  $20 \mu\text{m}$ 。

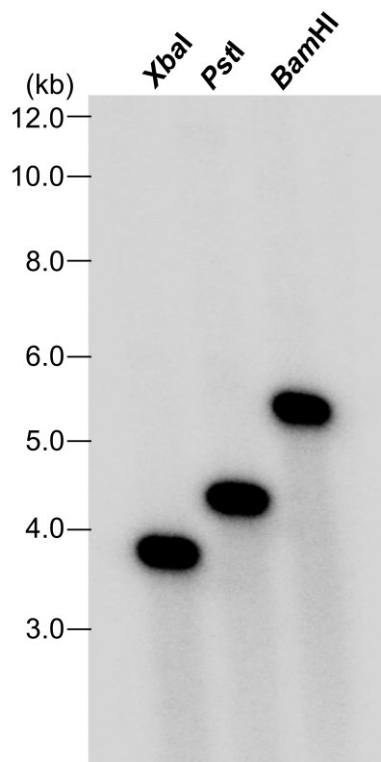


図7. *MpPHOT* 遺伝子のサザンブロット解析

野生株から抽出したゲノムDNAを *Xba*I、*Pst*I、*Bam*HIの3種類の制限酵素で切断した。各レーンには制限酵素処理したDNA 4  $\mu$ gを泳動した。LOV2ドメインに相当するゲノム配列(アミノ酸602-715 aaをコードする領域)をプローブとして検出に用いた。

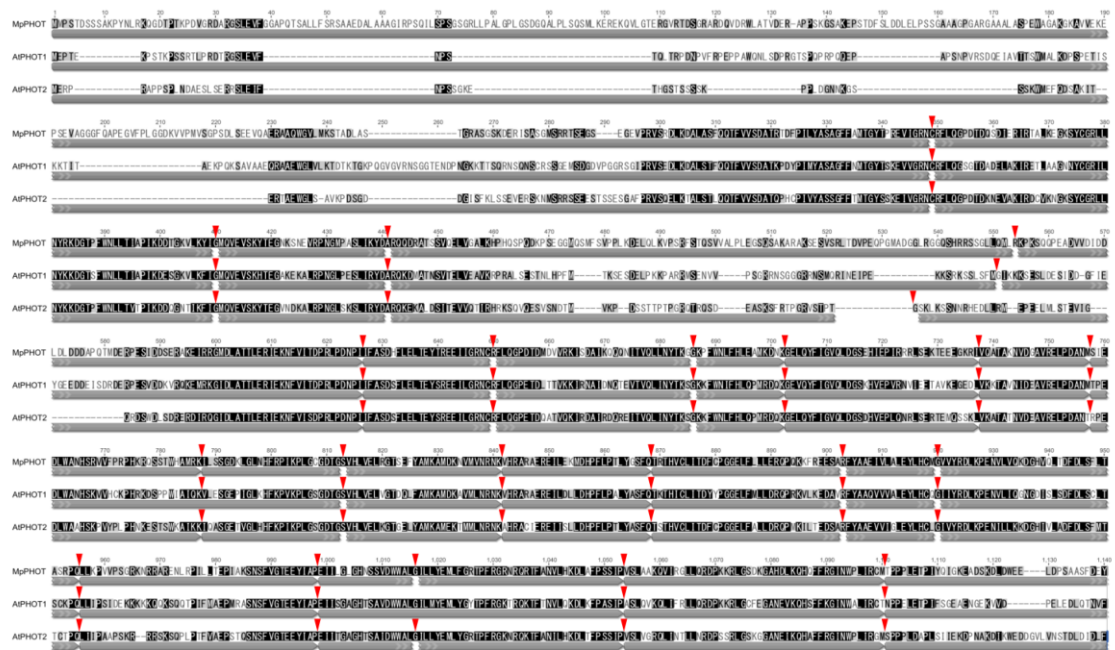


図8. ゼニゴケとシロイヌナズナのフォトロピン遺伝子におけるイントロン挿入位置の比較

ゼニゴケフォトロピン (*MpPHOT*) とシロイヌナズナフォトロピン (*AtPHOT1* と *AtPHOT2*) がコードするアミノ酸配列のアライメントとエクソン (灰色バー) の位置関係を示す。イントロン挿入位置を赤色の三角で示す。マルチプルアライメントはGenciousソフトウェア内のMUSCLEプログラムを用いて作成した。各アミノ酸残基の相同性は、100%を黒背景、60-100%を灰色背景で示す。

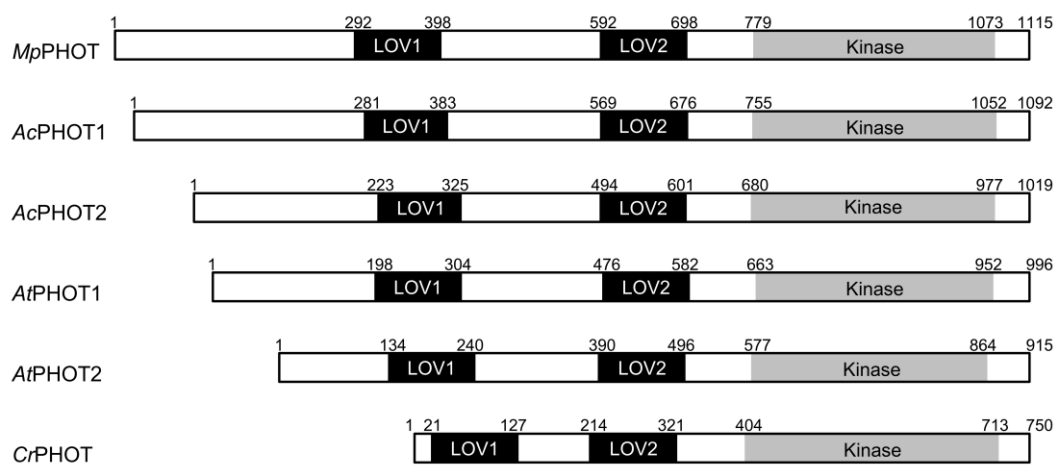


図9. フォトリポピンタンパク質のドメイン構造

ゼニゴケフォトリポピン (*Mp*PHOT)、ホウライシダフォトリポピン (*Ac*PHOT1と*Ac*PHOT2)、シロイヌナズナフォトリポピン (*At*PHOT1と*At*PHOT2)、クラミドモナスフォトリポピン (*Cr*PHOT)におけるタンパク質ドメイン構造の比較。黒および灰色の長方形は、それぞれ、LOVドメイン (LOV1とLOV2) とセリン/スレオニンキナーゼドメインを示す。模式図上部の番号はそれぞれのドメインの最初と最後のアミノ酸残基を示す。

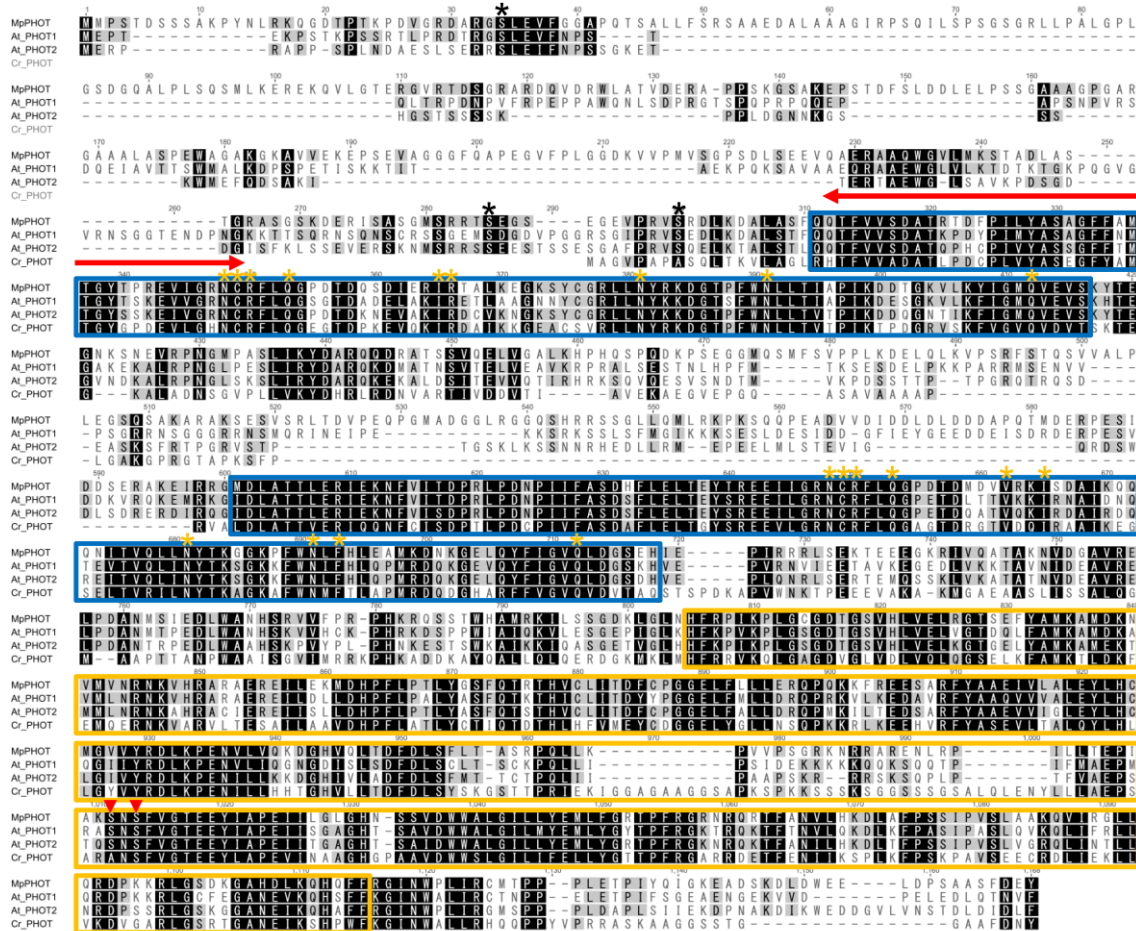


図10. フォトリポピンのアミノ酸配列アライメント

Mp; ゼニゴケ、At; シロイヌナズナ、Cr; クラミドモナス。LOVドメイン(LOV1とLOV2)は青色の四角で、セリン/スレオニンキナーゼドメインは黄色の四角でそれぞれ示す。シロイヌナズナのフォトリポピンで報告されているフォトリポピンの生理活性に必須な自己リン酸化部位であるセリン残基(Inoue et al., 2008; Inoue et al., 2011)は赤色の三角で示す。シロイヌナズナフォトリポピンのN末端領域において自己リン酸化の可能性が示唆されているアミノ酸残基(Inoue et al., 2008; Inoue et al., 2011)のうちゼニゴケフォトリポピンにも保存されているものは黒色のアスタリスクで示す。LOVドメインにおける発色団FMNとの相互作用部位(Crosson and Moffat, 2001)は黄色のアスタリスクで示す。Mpphot<sup>KO</sup>株においてhptカセットと相同組換えされる領域は赤色の矢印で示す。マルチプルアライメントはGenciousソフトウェア内のMUSCLEプログラムを用いて作成した。各アミノ酸残基の相同性は、100%を黒背景、60-100%を灰色背景で示す。



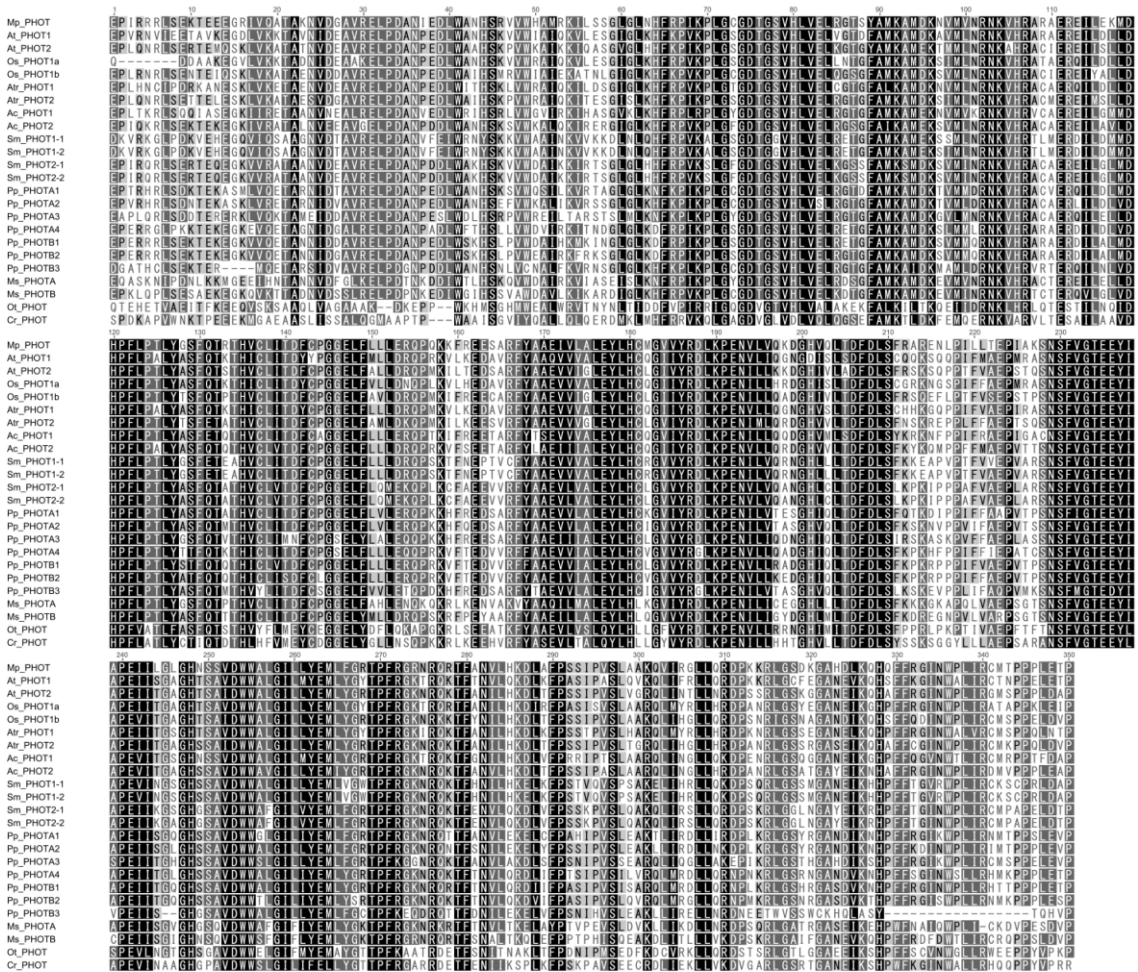


図11. 系統解析に用いた複数種の植物のフォトトロピンアミノ酸部分配列のアライメント

各タンパク質全長配列を用いて、Geneiousソフトウェア内のMUSCLEプログラムでマルチプルアライメント作成した。ギャップ領域はGblocks

([http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks\\_server.html](http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html)) を用いて除去し、Jαヘリックス

(LOV2ドメインの下流に位置する) からSer/Thrキナーゼドメインにかけての保存性の高い領域を抽出した。各アミノ酸残基の相同性は、100%を黒背景、60%以上を灰色背景で示す。

フォトトロピンの配列解析には、アンボレラ (Atr\_PHOT1, Atr\_PHOT2)、シロイヌナズナ

(At\_PHOT1, At\_PHOT2)、イネ (Os\_PHOT1a, Os\_PHOT1b)、ホウライシダ (Ac\_PHOT1,

Ac\_PHOT2)、イヌカタヒバ (Sm\_PHOT1-1, Sm\_PHOT1-2, Sm\_PHOT2-1, Sm\_PHOT2-2)、ヒメ

ツリガネゴケ (Pp\_PHOTA1, Pp\_PHOTA2, Pp\_PHOTA3, Pp\_PHOTA4, Pp\_PHOTB1,

Pp\_PHOTB2, Pp\_PHOTB3)、ヒザオリ (Ms\_PHOTA, Ms\_PHOTB)、オストレオコッカス

(Ot\_PHOT)、クラミドモナス (Cr\_PHOT) を用いた。アクセッション番号は12ページに示す。

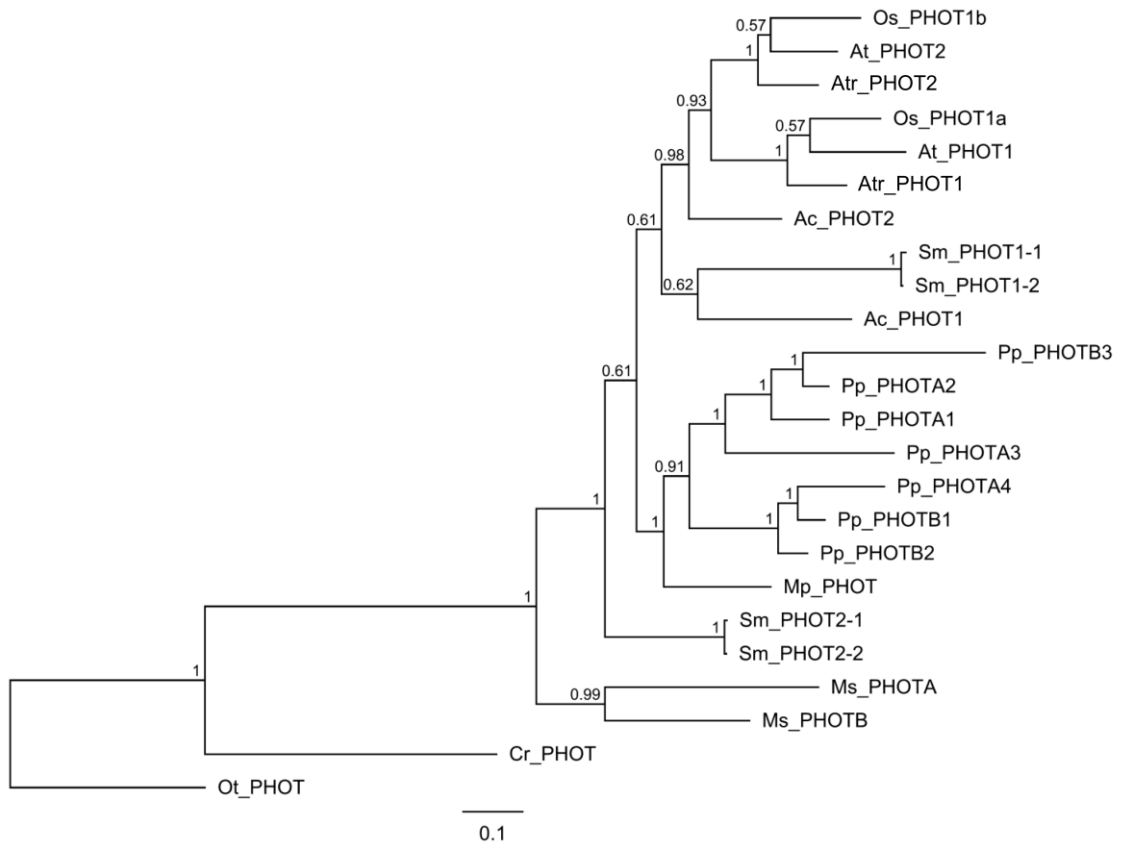


図12. フォトリロピンの系統解析

図11のフォトリロピンアミノ酸部分配列のアライメントを用いて、Bayes法により系統樹を作成した。外群にはオストレオコッカスのphotを用いた。系統樹内の数字は事後確率を示す。アクセッション番号は12ページに示す。

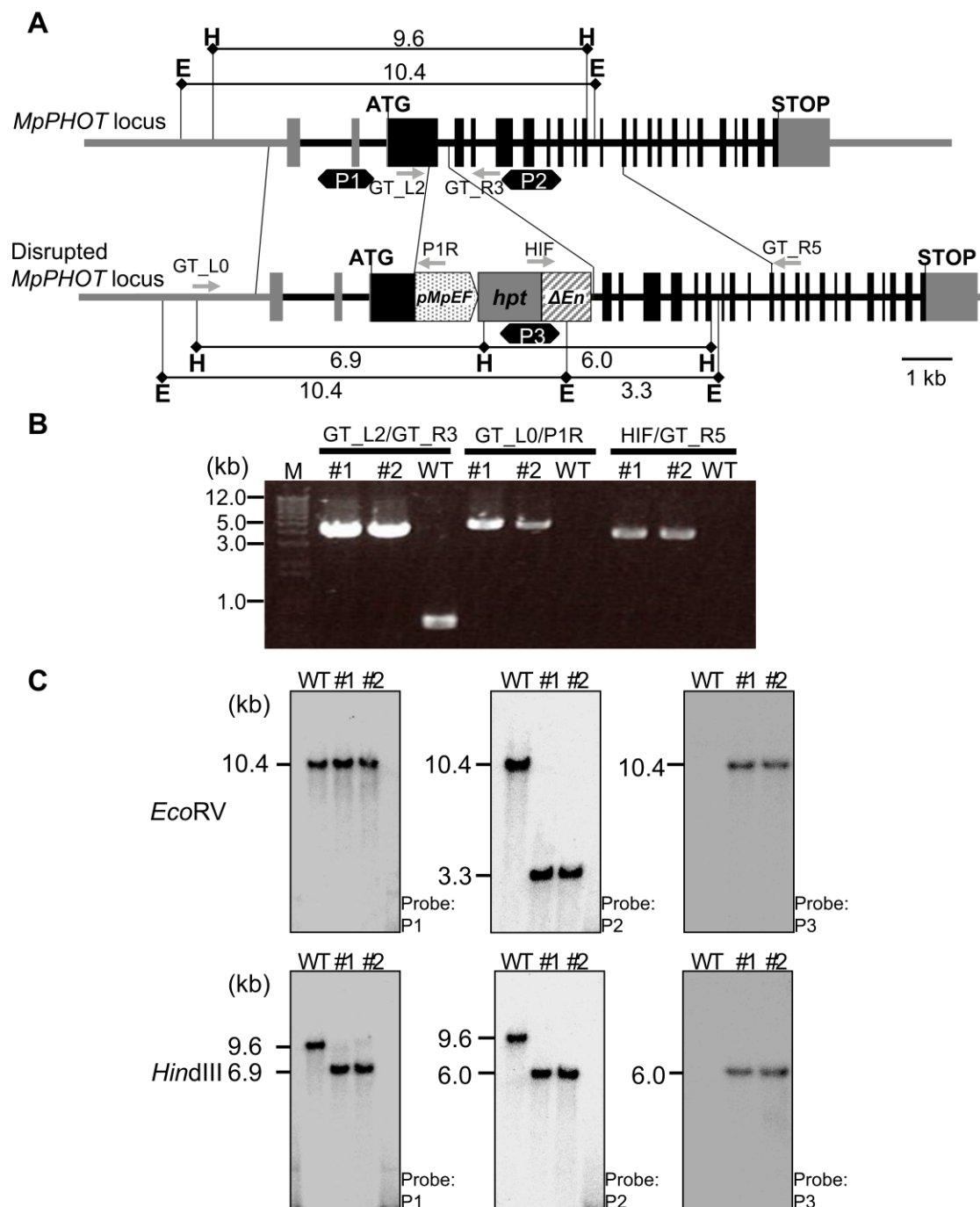


図13. *MpPHOT*ノックアウト株の作出

(A) *MpPHOT*のジーンターゲットにおける相同組換えの模式図。黒色の四角はエクソン、黒色のバーはイントロンを示す。灰色の四角は5'UTRおよび3'UTRを示す。(B) *Mpphot*<sup>KO</sup>株のゲノミックPCRによる遺伝子型判定の結果。PCRに用いたプライマーの位置は(A)に図示する。(C) 野生株、*Mpphot*<sup>KO</sup>株における*MpPHOT*遺伝子座に関するサザンブロット解析の結果。野生株および*Mpphot*<sup>KO</sup>株のゲノムDNAは*EcoRV*および*HindIII*による制限酵素処理を行った。検出に用いたプローブ(P1、P2、およびP3)の位置、ゲノム配列上の各制限酵素サイトおよび予想切断片サイズは(A)に図示する。

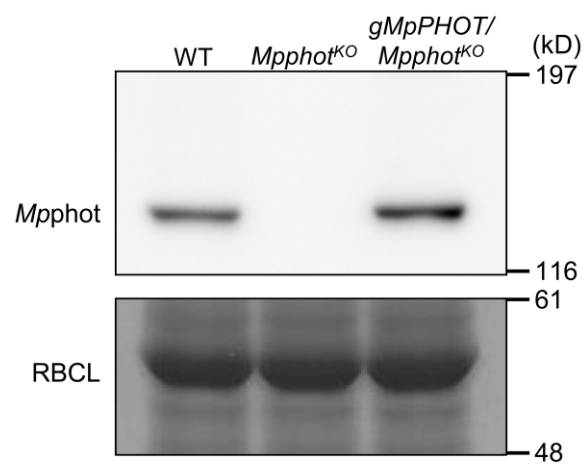


図14. 野生株、*Mpphot*<sup>KO</sup>株および*gMpPHOT/Mpphot*<sup>KO</sup>株における*Mpphot*タンパク質蓄積量の解析

連続白色光下で7日間培養した葉状体から抽出したゼニゴケ全タンパク質 (20 μg / レーン) を用い、*Mpphot*抗体を用いて検出した。下段はローディングコントロールのRubisco large subunit (RBCL) のCBB染色結果である。寺井三佳氏原図。

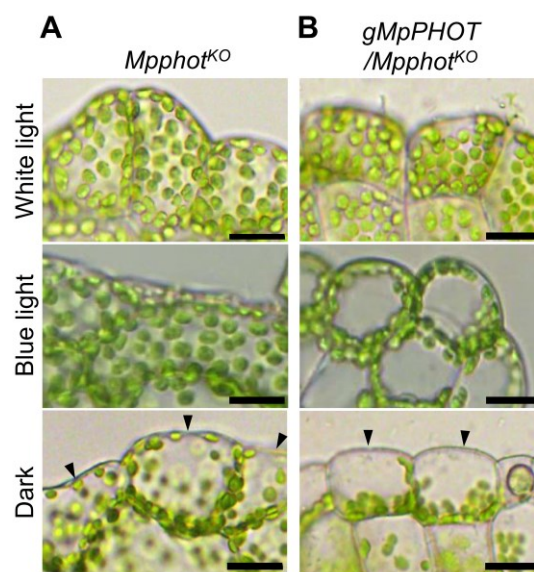


図15. *Mpphot*<sup>KO</sup>株および*gMpPHOT/Mpphot*<sup>KO</sup>株における葉緑体局在変化

連続白色光下で3日間培養した*Mpphot*<sup>KO</sup>株(A)と*gMpPHOT/Mpphot*<sup>KO</sup>株(B)の幼葉状態を異なる光条件下においた時の葉緑体局在を観察した。光条件変更前(上段)、青色強光条件(50 Wm<sup>-2</sup>、120分間;中段)、暗黒条件(3日間;下段)の結果を示す。黒色の三角は幼葉状態の辺縁部細胞の最外面を示す。スケールバーは20 μm。

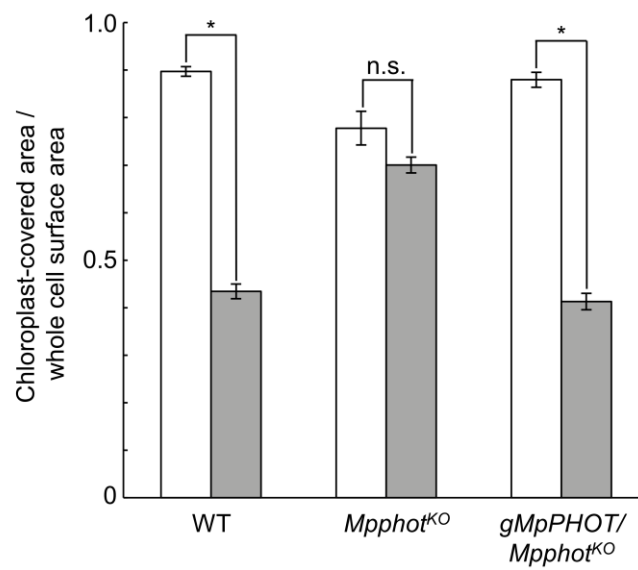


図16. 野生株、*Mpphot*<sup>KO</sup>株および*gMpPHOT/Mpphot*<sup>KO</sup>株における暗黒定位の定量的解析  
 連続白色光下で3日間培養した幼葉状態の暗処理前(白色)と3日間暗処理後(灰色)の葉緑体  
 占有面積の細胞表面積に対する割合を調べることにより、暗黒定位を定量化した。エラー  
 バーは標準誤差を示す(n=3)。Student's *t*-tests ( $P < 0.05$ )によって有意差が見られたものをア  
 スタリスクで、有意差が見られなかったものをn.s.で示す。

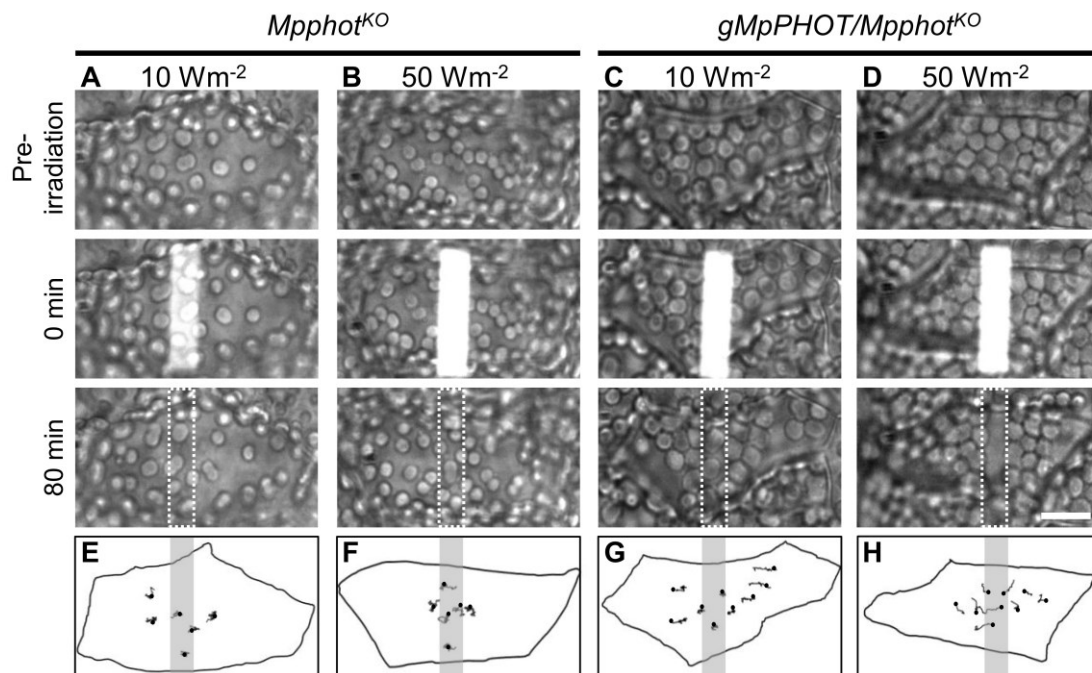


図17. *Mpphot*<sup>KO</sup>株および*gMpPHOT/Mpphot*<sup>KO</sup>株幼葉状体における青色光マイクロビーム照射に伴う葉緑体の局在変化

(AからD) マイクロビーム照射時の葉緑体局在変化の経時的観察。*Mpphot*<sup>KO</sup>株幼葉状体 (AとB) および*gMpPHOT/Mpphot*<sup>KO</sup>株幼葉状体の破線で囲った範囲の細胞に、青色弱光 [10 Wm<sup>-2</sup> (AとC)] と青色強光 [50 Wm<sup>-2</sup> (BとD)] を80分間照射した。(EからH) 各条件における葉緑体の挙動。照射前の各葉緑体の位置を黒丸で、1分ごとに写真撮影して追跡した葉緑体の軌跡を黒の実線で示す。同様の実験を3回以上行い、同様の結果が再現することを確認している。スケールバーは20 μm。

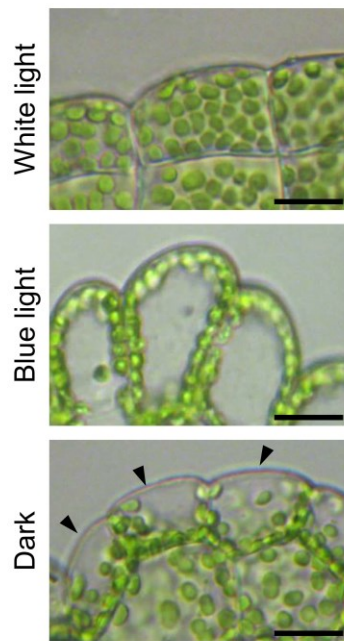


図18. *gMpPHOT-Citrine/Mpphot<sup>KO</sup>*株における葉緑体局在変化

連続白色光下で3日間培養した幼葉状体を異なる光条件下においた時の葉緑体局在を観察した。光条件変更前(上段)、青色強光条件(50 Wm<sup>-2</sup>、120分間;中段)、暗黒条件(3日間;下段)の結果を示す。黒色の三角は幼葉状体の辺縁部細胞の最外面を示す。スケールバーは20 μm。



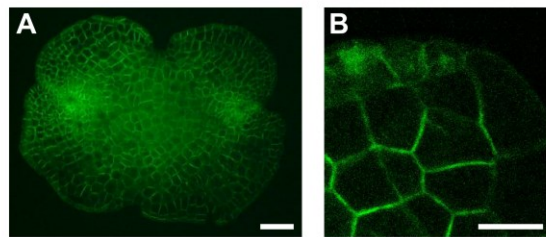


図19. ゼニコケにおける*Mpphot*の細胞内局在解析

連続白色光下で3日間培養した幼葉状体を用い、*gMpPHOT-Citrine/Mpphot<sup>KO</sup>*株において、Citrine蛍光の局在を観察した。スケールバーは、50  $\mu\text{m}$  (A) および10  $\mu\text{m}$  (B) を示す。

Mutants deficient in protonema phototropism

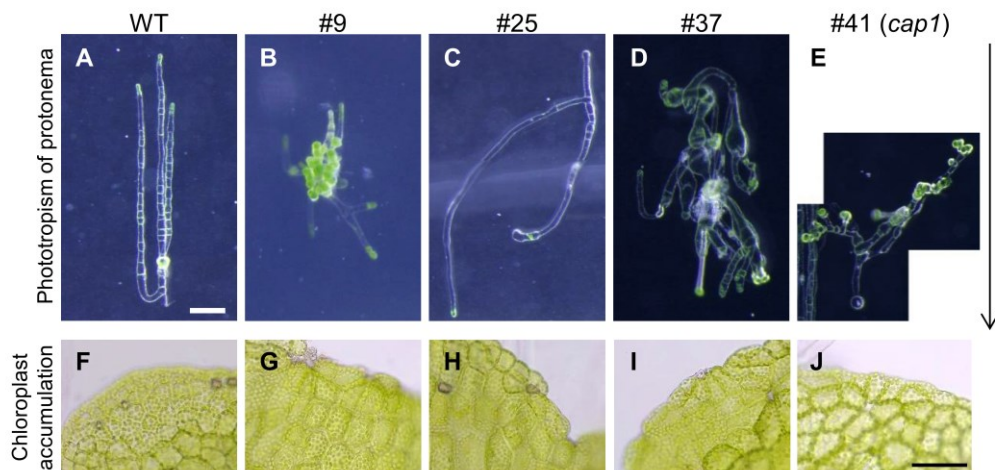


図20. 野生株および原糸体光屈性変異体における原糸体光屈性と葉緑体集合反応の観察 (AからE) 連続青色弱光条件 (約 $1.5 \text{ Wm}^{-2}$ ) で14日間培養した原糸体の形態。右端の矢印は青色光の照射方向を示す。(FからJ) 連続白色光下で3日間培養した幼葉状態における葉緑体の局在観察。スケールバーは $100 \mu\text{m}$ 。

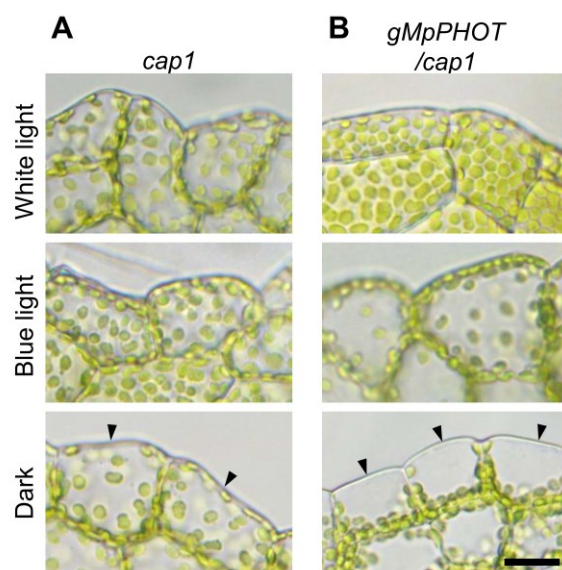


図21. *cap1*株および*gMpPHOT/cap1*株における葉緑体局在分布

連続白色光下で3日間培養した*cap1*株 (A) と*gMpPHOT/cap1*株 (B) の幼葉状体を異なる光条件下においた時の葉緑体局在を観察した。光条件変更前 (上段)、青色強光条件 ( $50 \text{ Wm}^{-2}$ 、120分間; 中段)、暗黒条件 (3日間; 下段) の結果を示す。黒色の三角は幼葉状体の辺縁部細胞の最外面を示す。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ 。

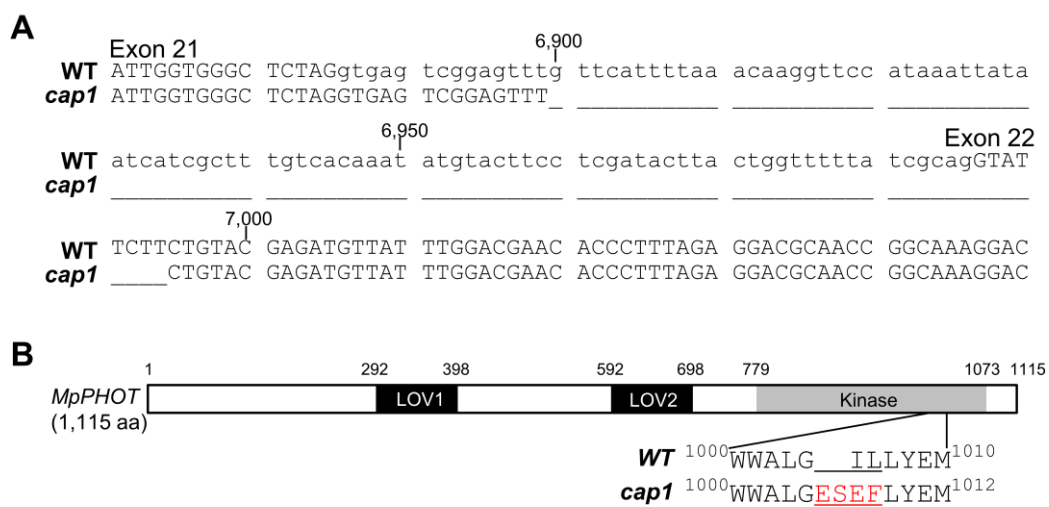


図22. 青色光応答変異体*cap1*における*MpPHOT*の変異解析

(A) 野生株および*cap1*株における*MpPHOT*ゲノム配列比較。野生株における21番目エキソンの途中から22番目のエキソンにかけての配列を示す。配列上部の数字は開始コドンからの塩基番号を示す。*cap1*株における欠失塩基はアンダーバーで示す。エキソン部分は大文字で、イントロン部分は小文字で示す。(B) 野生株および*cap1*株における*Mpphot*アミノ酸配列比較。*cap1*変異部分周辺のコードされるアミノ酸配列を示す。配列上部の数値はアミノ酸番号を示す。赤字は*cap1*株において野生株と異なるアミノ酸を示す。

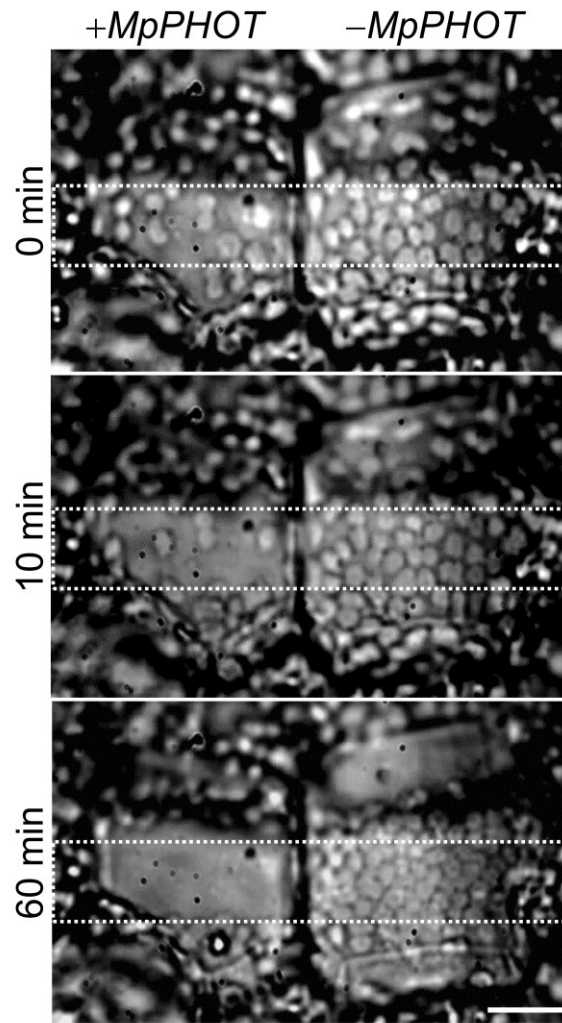


図23. ホウライシダ *phot2* 変異体における *MpPHOT* 発現の効果

ホウライシダ *phot2* 変異体の前葉体において、*MpPHOT* がパーティクルボンバードメントによって一過的に発現している細胞 (左側) と隣接する *MpPHOT* 非導入細胞 (右側) にマイクロビーム照射 (青色光  $100 \text{ Wm}^{-2}$ ) を行い、葉緑体の挙動を観察した。破線で囲んだ領域はマイクロビームを照射した領域を示す。スケールバーは  $20 \mu\text{m}$ 。

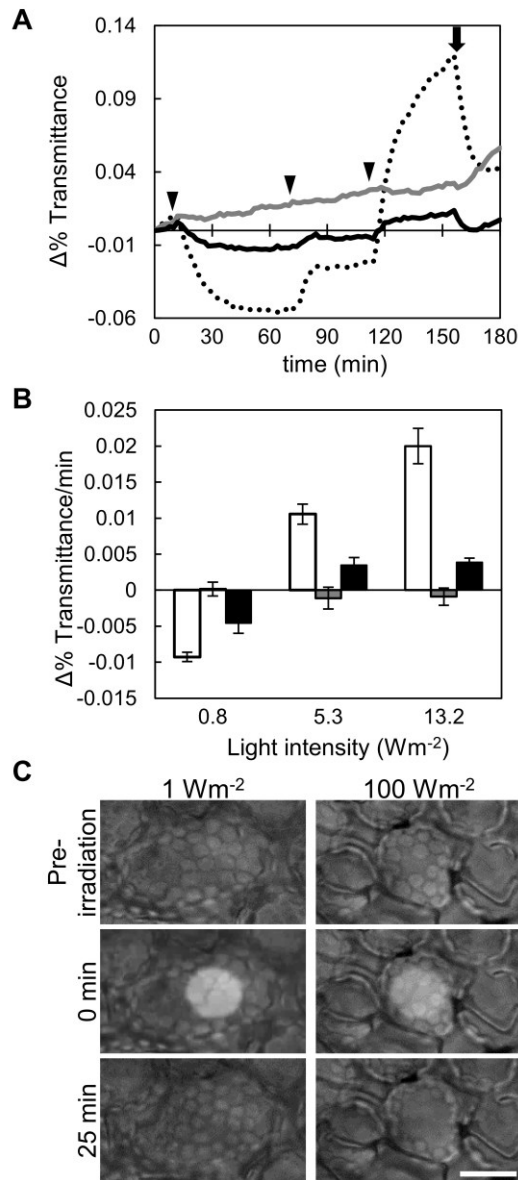


図24. シロイヌナズナ *phot1 phot2* 変異体における *MpPHOT* 発現の効果

(A) 葉緑体光定位運動に伴う葉の光透過性の経時的变化。グラフは3回の独立した実験の代表的な結果を示す。暗処理開始の時点をもとに0分とし、10分以降は0.8 Wm<sup>-2</sup>、70分以降は5.3 Wm<sup>-2</sup>、110分以降は13.2 Wm<sup>-2</sup>の青色光照射を行った。グラフ内の三角は照射光変更の時点を示す。矢印は青色光照射を終了した150分の時点を示す。点線、灰色の線、黒色の線はそれぞれ、野生株、*phot1 phot2*変異体、*MpPHOT/phot1 phot2*株の結果を示す。(B) 青色光照射後2~6分間における葉の透過性変化速度。白色、灰色、黒色のバーはそれぞれ、野生株、*phot1 phot2*変異体、*MpPHOT/phot1 phot2*株の結果を示す。独立した実験を3回行い、エラーバーは標準偏差を示す。(C) *MpPHOT/phot1 phot2*株におけるマイクロビーム照射に伴う葉緑体光定位運動の観察。光照射領域は白色の円形で示す。集合反応には青色弱光 (1 Wm<sup>-2</sup>; 左側)、逃避反応には青色強光 (100 Wm<sup>-2</sup>; 右側) を用いて観察した。スケールバーは25 μm。

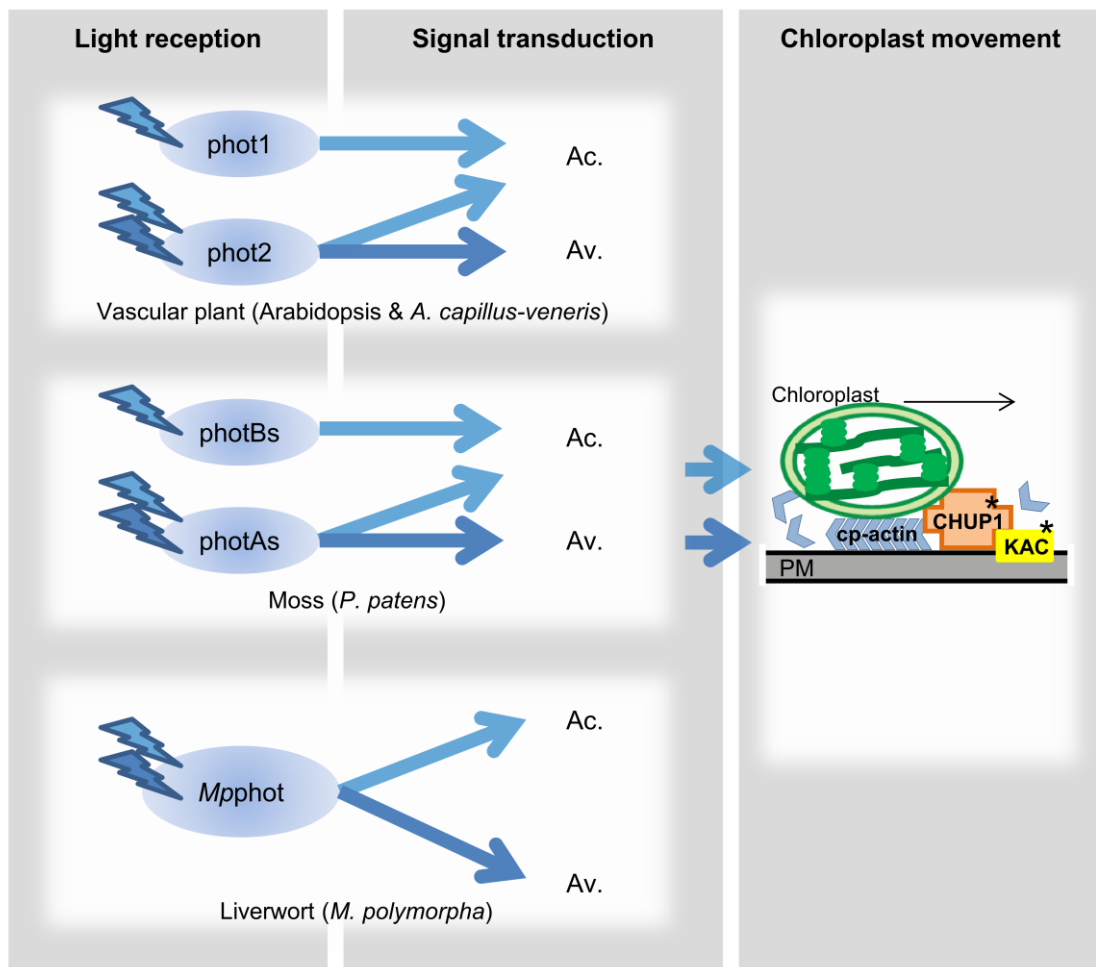


図25. 葉緑体光定位運動に関わる光シグナル伝達機構の模式図

葉緑体光定位運動における光受容、信号伝達、葉緑体運動の機構について示す。光受容において、維管束植物ではphot1とphot2が、蘚類ではphotAsとphotBsが、ゼニゴケではMpphotが機能している。集合反応 (Ac.) および逃避反応 (Av.) に信号伝達機構の詳細は明らかになっていないものの、葉緑体運動に関しては、アクチン繊維の関わる機構がシロイヌナズナで明らかとなっている (Wada, 2013を一部改変)。薄い青色の矢印は集合反応に関する弱光シグナルを、濃い青色の矢印は逃避反応に関する強光シグナルの流れを示す。アクチン繊維の重合に関わる既知の因子のうち、ゼニゴケでそれぞれ1分子種ずつ単離されているKAC (黄色) およびCHUP1 (橙色) を図中に示す。青色の矢じりはアクチン分子を、PMは細胞膜を示す。黒色の矢印は、葉緑体の移動方向を示す。

## 謝辞

本研究は、京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻細胞全能性発現学講座遺伝子特性学分野において行われたものです。本研究に従事する機会を与えてくださった指導教員の河内孝之教授（京都大学生命科学研究科）に心から感謝いたします。河内教授には、長年にわたってたくさんのご指導とご鞭撻を賜りました。心からお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたって、和田正三教授（九州大学理学研究院）、末次憲之博士（現京都大学生命科学研究科、前九州大学理学研究院）、孔三根博士（九州大学理学研究院）、坪井秀憲博士（現九州大学歯学研究院、前九州大学理学研究院）には共同研究として多くの助言やサポートを頂くと同時に、実験設備を使わせて頂いたことで、葉緑体局在観察における重要なデータを取得することができました。論文執筆にあたっては、特に末次憲之博士から多くのご指導とご支援、的確なご助言を賜りました。心から感謝いたします。

また、大和勝幸准教授（近畿大学生物物理工学部）、石崎公庸准教授（神戸大学理学研究科）、西浜竜一講師（京都大学生命科学研究科）、山岡尚平助教（京都大学生命科学研究科）には、論文執筆に際しての多大なご支援とともに、日々の研究過程においても多くのご助言を頂きました。長谷あきら教授（京都大学理学研究科）には、シロイヌナズナの *phot1* *phot2* 変異体の種子を分与していただきました。佐藤文彦教授（京都大学生命科学研究科）、神戸大朋准教授（京都大学生命科学研究科）には、副指導教員として、多くのご指導とご助言を頂きました。深く感謝いたします。

ゼニゴケフォトリピンの研究を行うにあたっては、芦原悠紀子さん、寺井三佳さんの協力によって多方面から研究を進めることができ、フォトリピンの関与するゼニゴケ青色光応答についてさまざまな知見を得ることができました。フォトリピンの光シグナル伝達機構の解明という同じ目標に向かって、日々議論する機会を得られて本当に幸いでした。ありがとうございました。また、石田咲子教務補佐員、松田頼子教務補佐員には、日々の研究において様々なサポートを頂きましたこと、お礼申し上げます。

修士課程から博士後期課程にわたってお世話になった遺伝子特性学分野の皆様には、様々な面から多くのご協力を頂きました。ゼニゴケに関する様々な観点からの知見とともに、研究室内のセミナーやミーティングを通して多くの議論の場を提供していただきました。現メンバーとともに、これまで関わってくださった数多くの皆様に感謝いたします。

最後に、日々研究に取りくむ活力を与えてくれた友人たちと、これまでの研究生生活を経済面、生活面、精神面と多岐にわたって支えてくれた家族に心より感謝いたします。



本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Aino Komatsu, Mika Terai, Kimitsune Ishizaki, Noriyuki Suetsugu, Hidenori Tsuboi, Ryuichi Nishihama, Katsuyuki T. Yamato, Masamitsu Wada, and Takayuki Kohchi

Phototropin Encoded by a Single-Copy Gene Mediates Chloroplast Photorelocation Movements in the Liverwort *Marchantia polymorpha*

Plant Physiology (2014) 166: 411-427, doi:10.1104/pp.114.245100

2014 年 10 月

森井（小松）愛乃