

氏名	コン 孔	サム 三	グエン 根
学位(専攻分野)	博士(理学)		
学位記番号	理博第3054号		
学位授与の日付	平成18年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻		
学位論文題目	Studies of cellular and subcellular localization of <i>Arabidopsis</i> phototropin 2 and its structure/function analysis (シロイヌナズナフォトトロピン2の組織及び細胞内局在とその構造・機能解析)		
論文調査委員	(主査) 教授 長谷あきら 教授 西村いくこ 助教授 荒木 崇		

論文内容の要旨

青色光は植物の成長と発生の過程に様々な影響を及ぼすことが知られている。この応答には少なくとも4種の青色光受容体、すなわちクリプトクロム1 (cry1)、クリプトクロム2 (cry2)、フォトトロピン1 (phot1)、フォトトロピン2 (phot2)、が知られている。Phot1とphot2は、細胞膜に結合したタンパク質キナーゼで、シロイヌナズナにおいては、光屈性、葉緑体定位、気孔開口、葉の平坦化などに関わることが知られている。フォトトロピンは2つの機能ドメインよりなり、その一方であるN-末端側ドメインにはLOV1、LOV2という発色団結合サイトが存在する。フォトトロピンの発色団はフラビンモノヌクレオチドである。一方、C-末端側ドメインはセリン/トレオニン・キナーゼとして働く。シロイヌナズナにおいて、フォトトロピンの生理学的機能が詳細に調べられてきた。しかしながら、そのシグナル伝達の分子機構については、まだほとんど分かっていない。この過程を明らかにするため私は、遺伝子導入植物と一過的発現系を用いて、pho2分子の細胞内分布パターンを調べるとともに、phot2をドメインに分けて、それぞれの機能を調べた。

第1章において私は、phot2の発現パターンと細胞内分布を明らかにするため、PHOT2遺伝子のプロモーターの制御下でphot2と緑色蛍光タンパク質(GFP)の融合タンパク質(P2G)を発現する遺伝子導入植物を作出した。この植物では、P2Gタンパク質が、内在性のphot2と同程度の量発現されており、機能的にも内在性phot2と同様に振る舞うことが示された。さらに、pho1と異なりphot2は光に対して安定であることが示された。また、芽生え全体の中で、phot2の発現は子葉や胚軸の上部で高く、胚軸下部では低く、根では発現が確認されなかった。このパターンは、既に知られているphot2の生理応答のパターンと良く一致していた。これらの観察結果から、phot1とphot2の生理機能の差の少なくとも一部は発現パターンの差で説明されることが分かった。

第2章においては、35Sプロモーターの制御下でP2Gを発現させ(35-P2G系統)、その細胞内分布を観察した。まず、35S-P2G系統においても、正常な光応答が見られることを確認した。次に、暗所での分布を観察し、P2Gが主に細胞膜に分布するとともにその一部は細胞質に見られることを示した。さらに、この細胞に青色光を照射したところ、数分以内に細胞内にP2Gの顆粒状分布が観察されるようになることを見いだした。この顆粒状の分布はゴルジ体のマーカーであるKAM14C:mRFPの分布と良く一致しており、光刺激を受けたP2Gの一部が、ゴルジ体と結合することが示唆された。さらに、P2Gにキナーゼ活性を失わせるような変異を導入したもので同様の解析を行い、ゴルジ体との結合にキナーゼ活性が必要であることを示した。小胞輸送の阻害剤であるBFAがP2Gの細胞内分布に及ぼす影響を調べた。その結果、暗所においてBFA存在下でP2Gの一部は核の周辺に分布することが分かった。さらに、この状態で光を照射したところ、核の周囲のP2Gはさらにその周囲に集合したゴルジ体に結合した。従って、P2Gのゴルジ体結合はBFAに影響されないことが分かった。これらの結果は、phot2のシグナル伝達にゴルジ体との結合が関与する可能性を示唆しており興味もたれる。

第3章においては、phot2の構造/機能解析を行った。phot2をN-末端側ドメイン(P2NG)とC-末端側ドメイン

(P2CG)に分け、GFPを融合した上で、植物に遺伝子導入した。得られた植物で当該タンパク質の細胞内分布を調べた結果、phot2に特徴的な細胞膜分布とゴルジ体結合がP2CGで見られたのに対して、P2NGは細胞質ゾルに分布していた。さらに、これらのphot2断片の生理活性を調べたところ、P2CGを発現する植物では、光刺激なしに光応答が起こっていることを示唆する結果を得た。一方、キナーゼ活性を失わせる変異を導入したP2CGでは、このような活性は失われ、むしろ、内在性のphot2の作用を妨害するような活性が見られた。さらに、C-末端側ドメイン内での構造/機能解析を進めるために、C-末端側の42アミノ酸残基を欠くphot2を発現する遺伝子導入植物を作成した。この植物を観察したところ、この変異型phot2は、ゴルジ体への結合能と葉緑体の光逃避運動を引き起こす活性が低下していた。一方、他の光応答はほぼ正常であった。従って、前者ではゴルジ体が重要な役割を果たしているのかもしれない。

以上まとめると、phot2のキナーゼドメインによって引き起こされるゴルジ体との結合は、phot2のシグナル伝達機構に必須の反応かもしれない。

論文審査の結果の要旨

申請者は、植物の青色光受容体のなかでも、比較的最近発見されたフォトトロピン2 (phot2) について、その細胞内分布とシグナル伝達機構の解析を行った。フォトトロピンは、分子量10万前後の色素タンパク質で、モデル植物であるシロイヌナズナでは phot1 と phot2 の二つが存在する。フォトトロピンによって制御される主な生理応答は、光屈性、葉緑体定位運動、気孔開口であり、phot1 と phot2 はともにこれら全てに関わるが、概ね、phot1 はより弱い光に対する応答を担い、phot2 の応答にはより強い光が必要である。

まず申請者、phot2-GFP 融合タンパク質の cDNA を構築し、PHOT2 遺伝子のプロモーター領域の下流につないで、野生株及び phot1, phot2 二重変異体に導入した。この植物では、phot2 の機能欠損による表現型が完全に相補され、導入した遺伝子が野生株の遺伝子と同様の活性をもつことが分かった。この植物で芽生えにおける phot2-GFP の発現部位を調べたところ、子葉と胚軸上部で高く、根では発現が認められなかった。また、PHOT1 プロモーターで phot1-GFP を発現させた植物を他の研究者より入手して比較したところ、phot1 の方が発現量が高く、根を含む全身で発現していた。このような発現パターンの違いは、phot1 と phot2 の応答の差をよく説明していた。これにより、phot2 の今後の解析の基礎となる重要な知見が得られたと言える。

次に申請者は、phot2 の細胞内分布を明らかにするため、phot2-GFP の蛍光顕微鏡観察を行った。この実験では、観察がより容易にできるよう、活性の高い 35S プロモーターで phot2-GFP を発現させる植物を作成した。加えて、重要な結果については、PHOT2 遺伝子プロモーターを用いた植物でも確認した。まず、暗所芽生えにおいて phot2-GFP の細胞内局在を観察したところ、蛍光は主に細胞膜領域に存在し、細胞質にも弱い蛍光が認められた。さらに興味深いことに、この細胞に青色光を照射すると、蛍光で観察される粒状の構造体が5分以内に出現した。次に、この構造体の正体を明らかにするために、いくつかのマーカータンパク質との共局在を一過的発現系を用いて調べ、最終的には遺伝子導入植物で、phot2-GFP がつくる粒状の構造体がゴルジ体のマーカーとよく一致することを示した。これは、フォトトロピンがゴルジ体に結合することを初めて示した報告であり、高く評価される。

最後に申請者は、phot2 の部位ごとの役割を調べるために、phot2 分子を大きく、N-末端側の光受容ドメインと C-末端側のキナーゼドメインに分け、それぞれを GFP と融合した形で遺伝子導入植物で発現させた。これらのタンパク質について細胞内分布を調べたところ、キナーゼドメインが膜とゴルジ体に結合したのに対して、N-末端側ドメインは細胞質ゾルに分布した。さらに興味深いことに、キナーゼドメインは光シグナルの入力なしに生理作用を引き起こした。これにより、phot2 の膜結合にはキナーゼドメインが重要な役割を果たしており、シグナルはそこから発信されることが示唆された。この知見は、今後、フォトトロピンのシグナル伝達を解明する上で、重要な知見である。

以上により、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。