

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	あいはら ゆうすけ 相 原 悠 介
学 位 (専 攻 分 野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 年 月 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 学 専 攻
(学 位 論 文 題 目) 植物の青色光受容体フォトトロピンの構造・機能解析	
論 文 調 査 委 員	(主 査) 長 谷 あ き ら 教 授 西 村 い く こ 教 授 鹿 内 利 治 教 授

理 学 研 究 科

京都大学	博士（理学）	氏名	相原 悠介
論文題目	植物の青色光受容体フォトトロピンの構造・機能解析		
（論文内容の要旨） 固着生活を営む植物は、周囲の光環境を感知し応答するために、いくつかの光受容体を発達させてきた。フォトトロピンは植物界に広く保存される青色光受容体であり、光屈性・葉緑体定位運動・気孔開口・葉の光形態形成などといった多様な生理応答を制御することが知られる。フォトトロピンの分子構造は2つの大きな機能領域、すなわち N 末端側の光感受領域と、C 末端側のセリン／スレオニンキナーゼ領域よりなる。N 末端側領域には2つの発色団結合領域、LOV1 と LOV2 が含まれ、このうち主に LOV2 領域が光情報伝達を担う。N 末端側領域が暗所において C 末端側のキナーゼ活性を抑制し、青色光照射によりその抑制が解除されることで光情報が伝達されると考えられている。 フォトトロピンの生理機能に関しては様々な知見が得られてきたにもかかわらず、フォトトロピンの光受容から生理応答までに至る分子内および細胞内情報伝達機構については不明の点が多く残されている。そこで私はフォトトロピン分子の構造と機能との関わりを明らかにすべく、まずフォトトロピン分子そのものについて、N および C 末端領域の構造と、フォトトロピン分子種の機能特異性との関係を調べるとともに（第一章）、N 末端領域内で分子内情報伝達に関わる新奇領域の探索を行った（第二章）。また、フォトトロピンの細胞内シグナル伝達における直接のターゲットの候補として、リン脂質輸送体フリッパーゼのフォトトロピン応答への関与について調べた（第三章）。各章の概要は以下の通りである。 第一章: シロイヌナズナは PHOT1 と PHOT2 の2つのフォトトロピン分子種を持つ。PHOT1 が PHOT2 よりも高い光感受性を有する一方で、PHOT2 は葉緑体逃避反応や葉緑体暗所定位といった特有の応答を誘導する。そこで、PHOT1 と PHOT2 の N および C 末端領域を交換して GFP を付加したキメラフォトトロピンを構築し形質転換植物で発現させた。その結果、フォトトロピンの光感受性は N 末端領域ほぼ単独によって決定されること、PHOT1 の N / C 末端領域が組み合わせることで逃避運動誘導活性が抑制されること、PHOT2 による葉緑体暗所定位には、PHOT2 の N 末端領域が必要であること、などがわかった。 第二章: フォトトロピンの LOV 領域の局所的な光構造変化がどのようにキナーゼ領域の活性を制御するのか、その詳細は不明である。そこで、出芽酵母がフォトトロピンと高い配列相同性を示すセリン／スレオニンキナーゼを持つことに着目し、これらの欠損をフォトトロピンにより相補する実験系を確立して、光によるキナーゼ活性制御に異常が生じる分子内変異の大規模スクリーニングを行った。なお、各種フォトトロピンを比較した結果、この研究には単細胞緑藻クラミドモナスのフォトトロピン (CrPHOT) を用いた。以上の結果、暗所においてもキナーゼ活性が上昇してしまう変異型 CrPHOT が多数取得された。中でも、LOV2 の N 末端側近傍に、まったく新規の変異が集中することを見出し、それらの変異が予想された活性変化を CrPHOT にもたらすことを生化学的に確認した。 第三章: フォトトロピンがリン酸化するターゲットについての知見はほとんど得られていない。一方で、出芽酵母でフォトトロピンと高い配列相同性を示すセリン／スレオニンキナーゼがリン脂質輸送体であるフリッパーゼをリン酸化により活性化することが知られている。そこで、植物のフリッパーゼが青色光応答に関わる			

(続紙 2)

かどうかを検討した。植物のフリッパーゼホモログ、ALA ファミリーの欠損変異体の幾つかを調べたところ、ala3 変異体において青色光による気孔開口が阻害されるという新規表現型が見出された。しかしながら、気孔開口に先立つフォトトロピンによる細胞膜 H⁺-ATPase の活性化については、ala3 変異体は正常であり、フォトトロピンがフリッパーゼを介して細胞膜 H⁺-ATPase の活性を制御している可能性は低いことがわかった。また、タバコ BY-2 細胞を用いて、フリッパーゼ活性を測定する系を確立し、青色光による活性制御の有無を調べたが、明暗で顕著な差は認められなかった。

(論文審査の結果の要旨)

本論文で申請者は、植物の青色光受容体であるフォトトロピン分子の構造と機能の関係について詳しく解析した。植物にとって光環境の変化を敏感に感知し、それに適切に応答することは死活問題である。これを可能としているのが、一連の植物に特有の光受容体であり、なかでもフォトトロピンは、青色光に応答して、光屈性、葉緑体定位、気孔開口などを制御する主要な光受容体である。フォトトロピン分子が発見されたのは比較的最近であるが、直接光を感知するドメイン (LOV ドメインと呼ばれる) の構造については、多くの知見が蓄積しつつある。一方、フォトトロピン分子が LOV ドメインで感知した光刺激を、どのような分子内機構で下流の因子に伝えるのかについては不明な点が多い。

申請者は本論文で、フォトトロピン分子の構造とシグナルの受容・発信といった機能の関係について、分子生物学的、細胞生物学的、生化学的手法を用いて詳しく調べた。本論文は主に 3 つの章よりなる。最初の章では、植物がもつ 2 種類のフォトトロピン phot1 と phot2 の機能的な差異に注目し、両者の相の子 (キメラ) 分子を植物体で発現させ、その光応答を詳しく調べることにより、フォトトロピン分子の光感受性が N-末端側にある光受容領域によって決められていることなどを明らかにした。この結果は、phot1 と phot2 の役割分担の仕組みを分子レベルで明らかにした優れた研究である。また第 2 章では、変異が導入されたフォトトロピン分子の生理活性を、微生物を利用して簡便に評価する系を開発した。さらに、この実験系を用いて、ランダムに変異を導入したフォトトロピン分子のプールから、光刺激によらず恒常的に活性化される変異型フォトトロピンを多数同定し、それらの分子が試験管内でも光刺激なしに活性化されることを生化学的に確かめた。この研究により、これまであまり注目されていなかった LOV2 ドメインに隣接した α ヘリックス構造が、分子内シグナル伝達に重要な役割を果たしていることが示された。これはフォトトロピン分子の作用機構を理解する上で、重要な一步である。最後に、フォトトロピンの微生物内での振舞いから、「フォトトロピンがフリッパーゼと呼ばれるリン脂質輸送体の活性を制御する」という仮説を立て、この証明を目指した。この件については、フリッパーゼ活性が変化するとフォトトロピンの応答に影響が出ることは確認できたものの、フォトトロピンがフリッパーゼを直接制御する証拠は得られなかった。この件については、さらなる研究が必要と結論された。

以上、本論文は多くの新奇な知見を含み、また研究の進め方や記述の仕方においても問題はない。これをもって、本論文を博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成 24 年 2 月 1 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。

要旨公開可能日： 年 月 日以降