

氏 名	まつ した とも なお 松 下 智 直
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2716 号
学位授与の日付	平 成 15 年 11 月 25 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	phytochrome B分子のN末端/C末端領域間の機能分担の解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 長 谷 あ き ら 教 授 岡 田 清 孝 教 授 西 村 い く こ

論 文 内 容 の 要 旨

植物の主要な光情報受容体である phytochrome は単量体分子量約12万の色素蛋白質で、種子発芽から花成に至るまで植物の様々な発生・成長の過程を制御している。赤色光を吸収すると、phytochrome は細胞質から核内に移行し、PIF3などの転写因子と相互作用することにより、核内で様々な遺伝子の発現を制御することが知られている。このとき phytochrome は光に応じて核内で顆粒状構造体を形成するため、これまでこの構造体が核内での phytochrome シグナル伝達の間を反映するのではないかと考えられていた。

phytochrome 分子は、光受容に働く N 末端領域とキナーゼ活性を持つ C 末端の領域の二つの領域から成り、後者を介して常に二量体化していることが知られているが、その生理学的意義についてはこれまで全くの不明であった。また、C 末端領域にはキナーゼドメインや PAS ドメインなどシグナル伝達に関与すると思われるモチーフが存在するために、これまで長い間、C 末端領域がシグナルを下流の因子に伝達していると考えられてきた。

本研究では、遺伝子導入シロイヌナズナを用いて、phytochrome の最も主要な分子種である phytochrome B (phyB) の光依存的核局在機構および核局在と生理機能の関係を調べた。まず、phyB を N 末端領域と C 末端領域の二つに分け、緑色蛍光蛋白質 (GFP)、 β グルクロニダーゼ (GUS)、核移行シグナル (NLS)、核外移行シグナル (NES) などとの融合蛋白質遺伝子を各種構築し、シロイヌナズナの phyB 欠損株に導入してその細胞内局在や生理活性を解析した。

その結果、C 末端領域は光条件に関わらず核移行活性を持つが、一方、N 末端領域は核移行活性を持たず、不活性型である Pr 型においては C 末端領域の活性を押さえることで核内への移行を妨げており、光によって N 末端領域が活性化されると C 末端領域に対する抑制が解除され分子は核内に移行することが明らかになった。

さらに、phyB の N 末端領域を GUS によって二量体化し、NLS の働きで核内に蓄積させると (このコンストラクトを以下 NG-GUS-NLS と呼ぶ)、phyB としての完全な生理機能を果たし、全長 phyB 分子よりも100倍以上高い光感受性を示すことを見出した。このことは、前述した従来の考えに反して、phyB が N 末端領域からシグナルを伝達すること、そして phyB の C 末端領域には N 末端領域の核内でのシグナル伝達を阻害する活性があることを意味する。また、NG-GUS-NLS から GUS を取り除くと二量体化能は完全に失われるが、一方生理活性は低下するものの完全には失われないことがわかった。このことは、phyB が効率よくシグナルを伝達するためには二量体化が必要であるが、単量体でもシグナルは伝達できることを示す。さらに、NG-GUS-NLS は明所においても顆粒状構造体を全く形成しないため、この構造体は phyB のシグナル伝達に必要なことが示された。

phytochrome 分子の C 末端領域内に存在するあるミスセンス異変は、光受容能や二量体化能に影響を与えることなくシグナル伝達能を低下させることが知られている。この変異を phyB に導入したところ、変異を導入した phyB は核移行活性を失うこと、ここで核移行活性を外來の NLS を融合させることで補うと、変異型分子は核内に移行しシグナルを十分に伝えること、この場合には顆粒状構造体は形成されないこと、などがわかった。従って、この C 末端領域内の変異は phyB の

核移行活性を低下させるが、シグナル伝達には直接は関与しないことが示され、phyBがN末端領域からシグナルを伝達するという前述のモデルがさらに確かめられた。また、顆粒状構造体がphyBのシグナル伝達に必要なことも再び確かめられた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、遺伝子操作により様々な改変を施したフィトクロムBの細胞内分布と生理活性を詳細に調べることにより、フィトクロムB分子の主要ドメインの機能を明らかにしたものである。フィトクロムは植物の主要な光受容タンパク質で、発芽、芽生えの形態形成、避陰反応、花芽形成など、植物の様々な発分化過程を制御している。フィトクロムは水溶性の色素タンパク質で、光によって活性化された後、細胞質から核へ移行することが知られている。その研究の歴史は長い、未だにそのシグナル伝達機構には謎が残される。

申請者はまず、フィトクロムの核移行に注目し、フィトクロムB (phyB) を大きくN-末端側領域とC-末端側領域の2つにわけ、それぞれに蛍光性のタグであるGFPを融合した形でシロイヌナズナのphyB欠損株に遺伝子導入した。得られた植物で当該分子の細胞内分布を調べたところ、C-末端側領域のみで核移行するのに対して、N-末端側領域には核移行活性が無いことが明らかとなった。ここで、N-末端側領域は色素分子を結合しフィトクロムに特有の吸収スペクトル変化を示す光受容ドメインであることが知られている。従って、フィトクロムで観察される光依存的な核移行は、C-末端側領域の核移行活性と、それを制御するN-末端側領域の協調的な働きによることがわかった。

申請者は、上記の研究において、N-末端側領域単独で発現させても、わずかながらフィトクロムの生理活性を示すことを見いだした。さらに、その活性は、N-末端側領域に核移行シグナルと大腸菌由来のGUSタンパク質を結合させると非常に高まることが分かった。そこで、これらの分子の存在状態を非変性電気泳動で調べたところ、GUSを融合させることによりN-末端側領域が2量体化することが分かった。ここで、通常的全長フィトクロムは2量体として存在するが、N-末端側領域単独では単量体となる。このことから、N-末端側領域を2量体化させて核に局在させれば、C-末端側領域の存在無しに光受容体として十分働くことが示唆された。加えて、C-末端側領域がシグナルを伝達するという従来の仮説は成り立たないことが明らかとなった。これは当該分野に大きなインパクトを与える重要な成果である。

次に申請者は、2量体化させて核に局在させたN-末端側領域を発現する植物の光応答を詳しく調べた。その結果、N-末端側領域は、胚軸伸長の阻害以外にも子葉の発達やクロロフィルの蓄積などを制御する能力を持つことが示された。また、フィトクロム分子種が示す特異性として異なる波長に対する応答の違いが挙げられるが、この点でphyBのN-末端側領域はphyBとして機能するが、phyAの機能は示さないことが分かった。さらに、異なる光強度に対する応答を調べたところ、N-末端側領域を発現する植物は通常の植物より100倍、光に対する感度が高いことが分かった。このことは、C-末端側領域が存在することで、全長フィトクロムではN-末端側領域の働きが抑制されていることを示している。これは、今まで全く知られていなかったC-末端側領域の機能である。

以上の研究に加え、申請者は、これまでに知られているphyBのC末端領域内に存在するミスセンス変異に関する研究も行い、通常言われているのとは異なり、この変異によってphyBは核移行活性を失うが、核内のシグナル伝達活性は保持していることを示した。

以上について審査した結果、本論文は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。