

フィトクロム発色団生合成遺伝子同定に基づく
植物光信号伝達機構の解析

蘆田（向川） 佳子

2006

目次

緒論.....	4
第一章 シロイヌナズナのフィトクロム発色団生合成に関わる <i>HY2</i> 遺伝子の単離とその機能解.....	10
第二章 大腸菌における光受容能をもつフィトクロム発現系の構築と その評価.....	41
第三章 フィトクロム相互作用因子の単離とその機能解析.....	64
結論.....	102
謝辞.....	104
参考文献.....	105
論文目録.....	112

フィトクロムに関する表記

<植物>

PHYA ; フィトクロム A 遺伝子

phyA ; フィトクロム A 変異体

PHYA ; フィトクロム A アポタンパク質 (発色団を結合していない)

phyA ; フィトクロム A ホロフィトクロム (発色団を結合している)

PHYB ; フィトクロム B 遺伝子

phyB ; フィトクロム B 変異体

PHYB ; フィトクロム B アポタンパク質 (発色団を結合していない)

phyB ; フィトクロム B ホロフィトクロム (発色団を結合している)

<藍藻>

cph1 ; 遺伝子

Cph1 ; タンパク質 (発色団の有無による使い分けはない)

本研究で用いた表記

PHYA (N617) ; *PHYA* の N 末端領域 617 アミノ酸からなるタンパク質

phyA (N617) ; *PHYA* (N617) に発色団が結合した光受容能をもつタンパク質

PHYB (N651) ; *PHYB* の N 末端領域 651 アミノ酸からなるタンパク質

phyB (N651) ; *PHYB* (N651) に発色団が結合した光受容能をもつタンパク質

アポ Cph1 (N514) ; Cph1 の N 末端領域 514 アミノ酸からなる光受容能のないタンパク質

PΦB-*phyA* ; 発色団として PΦB を結合した *phyA*

PΦB-*phyB* ; 発色団として PΦB を結合した *phyB*

PΦB-*phyA* (N617) ; 発色団として PΦB を結合した *phyA* (N617)

PΦB-*phyB* (N651) ; 発色団として PΦB を結合した *phyB* (N651)

PCB-*phyA* ; 発色団とし PCB を結合した *phyA*

PCB-*phyB* ; 発色団とし PCB を結合した *phyB*

PCB-Cph1 ; 発色団とし PCB を結合した Cph1

PCB-*phyA* (N617) ; 発色団として PCB を結合した *phyA* (N617)

PCB-*phyB* (N651) ; 発色団として PCB を結合した *phyB* (N651)

PCB-Cph1 (N514) ; アポ Cph1 (N514) に発色団として PCB が結合したタンパク質

緒論

植物は、固着生活を営むため、外部環境に適応できなければ生存できない。そのため、環境を察知する能力を発達させてきた。外部環境には、光、温度、湿度、風等が挙げられる。光は、エネルギーとして光合成に用いられると同時に、シグナルとして形態形成に用いられる。よって、植物は、敏感に光シグナルを感知しながら、光合成に有効な光を求めつつ、環境に適した形づくりをしている。

シグナルとして光情報を認識し、形態を環境に適応させる応答は光形態形成と呼ばれる。種子発芽、脱黄化、子葉の展開に代表される分化、胚軸伸長の抑制に代表される細胞伸長制御、葉緑体の細胞内移動に代表される光定位運動、生殖生長から栄養生長への移行である花成などが含まれ、植物の生涯を通し、光シグナルは重要な情報となる。

光シグナルの中には、光質、強度、照射時間、方向の情報があり、植物は非常に鋭敏な認識能力を備えている。これは、植物が複数の光受容体を有することで成り立っており、赤色光 (R)/遠赤色光 (FR) 特異的なフィトクロム、青色光特異的なクリプトクロム、フォトトロピン、FKF1、実体として未知な部分が多い紫外線受容体がある。クリプトクロムは、胚軸伸長抑制、子葉展開や概日リズムの制御、花成に、フォトトロピンは光屈性、気孔開口、葉緑体光定位運動に、FKF1 は概日リズムの調節を介して花成に深く関わっており、青色光受容体は同じ波長域でも受容体別に、これらの役割を一部分担している。これに対し、フィトクロムは、R/FR を受容する唯一の光受容体であり、発芽から胚軸伸長抑制、脱黄化、子葉の展開・開閉、花成、結実まで幅広く制御しており、植物の運命を左右する鍵分子の一つといえる。

フィトクロムは、光を受容するためにフィトクロモビルン (PΦB) と呼ばれるテトラピロール化合物を発色団として有しており、これがフィトクロムアポタンパク質1分子に1つ、チオエーテル結合している。発色団が光を吸収すると、C15位の二重結合部位に関してZ型からE型、またはE型からZ型の光異性化反応が起こる (Fig. 1)。この発色団の異性化によりアポタンパク質の構造変化が引き起こされ、光シグナルが発信される。フィトクロムのシグナル伝達における大きな特徴は、R (660~670 nm 付近) を吸収する Pr 型 (The red light-absorbing form of phytochrome) と FR (730 nm 付近) を吸収する Pfr 型 (The

far-red light-absorbing form of phytochrome) の二つの構造をとり、両者が光可逆的に構造変化することである。かつては、Pfr 型が活性型、Pr 型が不活性型とされ、光シグナルのスイッチを ON/OFF 制御していると考えられていたが、近年では、ON/OFF 以外にも複数のシグナル発信様式があることが知られている。

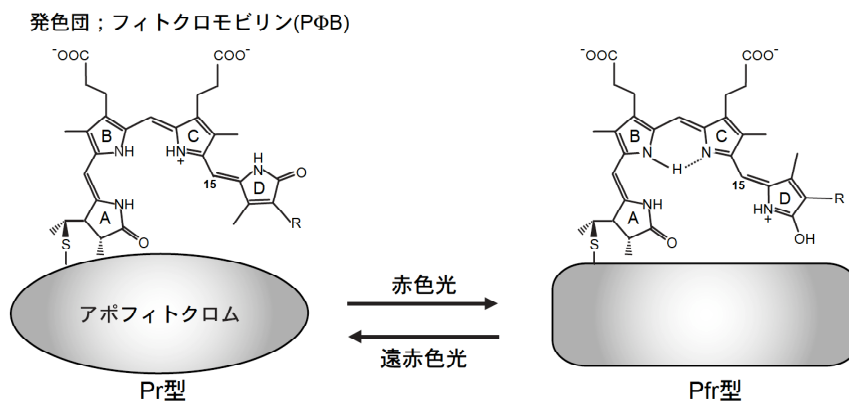


Fig.1 フィトクロムの構造変化の模式図

発色団の光異性化反応によりアポフィトクロムの構造変化が引き起こされ、光シグナルが伝達される。光可逆的な構造変化はフィトクロムの典型的な応答である。Rockwell らの図を参考に改変した (Rockwell et al., 2006)。

フィトクロム遺伝子は、ゲノム中で遺伝子ファミリーを形成しており、シロイヌナズナではフィトクロムとして phyA~phyE の分子種が存在する。進化系統樹では、PHYB と PHYD が最も近く、PHYB/D/E が同じグループに属し、PHYA、PHYC は異なる。一方、生化学的な性質からは、光に不安定なタイプ I と光に安定なタイプ II に分けられる。光によってすばやく分解される phyA はタイプ I に属し、光により分解されない phyB~phyE はタイプ II に属する。よって、暗所では phyA が最も多く、黄化組織のフィトクロムのほとんどを占めており、明所では phyB が最も多く存在する。

フィトクロムは、単量体の分子質量が約 120 kDa であり、二量体の形で存在する可溶性タンパク質である。一次構造上、大きく N 末端側半分と C 末端側半分の領域に分けることができる (Fig. 2)。N 末端領域は PΦB を結合するシステイン残基を含み、光を受容する領域だと考えられてきた。C 末端領域は核局在シグナル配列と二量体化ドメインを含み、さらに、シグナル伝達に関わるとされる PAS 類似ドメインやキナーゼ類似配列がある。かつては、C 末端領域が光

シグナルを伝えると考えられ、PAS ドメインに変異を導入する実験等の結果からも、その仮説が支持されてきた (Quail et al., 1995)。しかし、近年、核内で phyB の N 末端領域からシグナルが伝達され、C 末端領域は核局在、および二量体化に必要であることが明らかにされた。さらに、C 末端領域が N 末端領域のシグナル伝達を抑制していることも示唆された (Matsushita et al., 2003)。

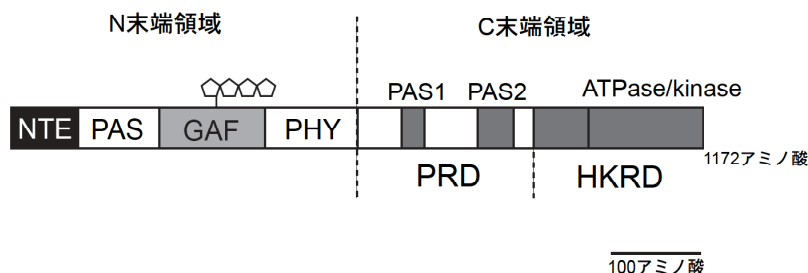


Fig. 2 フィトクロム B の一次構造の模式図 (Rockwell et al., 2006 改変)

NTE (N-terminal extension); 植物のフィトクロムに特有な領域であり、暗反転に関わる。
 PAS ドメイン; PAS (Per-Arnt-Sim) は、ショウジョウバエの体内時計タンパク質 PER、神経形態形成因子 SIM、および脊椎動物の芳香族炭化水素受容体である ARNT で見つけられた配列である。この配列を介してタンパク質間相互作用し、遺伝子の転写やシグナル伝達に関わるとされる。
 GAFドメイン; BLD (bilin lyase domain) とも表され、P Φ Bを結合するシステイン残基を含む。フィトクロムでの保存性が最も高い。GAF (cGMP binding and stimulated phosphodiesterases, *Anabaena* adenylyl cyclases, and *Escherichia coli* FhIA) は、小分子のリガンドを結合する配列であり、シグナル伝達に関わると考えられる。
 PHYドメイン; Pfr型の安定性に関わっており、フィトクロムに特異的な配列である。また、GAFドメインと低い相同性がある。
 PRD (The PAS-related domain); 2つのPASドメインを含む領域であり、フィトクロムの核局在にも重要であると考えられている。
 HKRD (Histidine-kinase-related domain); ヒスチジンキナーゼドメインと類似しているが、リン酸基を受容するヒスチジン残基が保存されていない。ATP結合配列を含む。

シロイヌナズナの分子遺伝学的な解析から、フィトクロム分子種で機能的に重複している部分と、分担している部分があることが明らかにされてきた。しかし、phyA、phyB 突然変異体では顕著な表現型が現れるのに対し、他のフィトクロムを欠損する突然変異体は顕著な表現型を示さないため、phyA、phyB が主要な役割を果たしていると考えられ、これらを中心に研究が進められてきた。phyA は、発芽、胚軸伸長抑制、FR による緑化抑制や花成の促進に機能している。また、phyB も、発芽、胚軸伸長抑制、R による子葉の展開や緑化、および花成の抑制に関わっている。

フィトクロムの光応答様式は、光量と光質によって区別されている。~100 pmol·m⁻² の非常に弱い光によって誘導される光応答を The very low fluence

responses (VLFR)、 $\sim 1,000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ のものを The low fluence responses (LFR)、 $\sim 100,000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ のものを High irradiance responses (HIR) と呼ぶ。VLFR は phyA が発芽を誘導する応答で、R と FR のみではなく、広範囲の波長が有効であり、光可逆性はない。一方、phyB が発芽を制御する応答は、LFR であり、R で発芽を促進、FR で抑制するフィトクロムの典型的な光可逆応答である。HIR には、胚軸伸長抑制応答が挙げられ、FR によって phyA が、R よって Pfr 型の phyB が引き起こす不可逆的な応答である。この他にも、End-of-day (EOD) FR 反応、避陰反応、光周性反応が知られている。EOD FR 反応は、消灯前のパルス照射によって引き起こされる応答であり、光可逆的である。茎や葉柄の伸長抑制、花成の促進に関与している。避陰反応は、R/FR の割合を感知し、茎の長さや葉の角度を調節する応答で、林床や近隣の植物との距離を感知していると考えられている。これらも phyB が関わる応答である。また、光周性反応は、明暗周期の暗期の長さを感じて花成を調節する反応である。

近年では、シロイヌナズナの多重変異体を用いた解析から、他のフィトクロム分子種の役割も明らかになってきている。phyCは、phyAと重複して長日条件下での花成抑制に関わっている。また、R下での胚軸伸長抑制や子葉の展開に関わるが、*phyB/phyC*でも表現型がシビアにならないため、phyBとphyCは似た機能を有しながらも、完全には機能的に重複していないと考えられている。さらに、phyCは、青色光下での胚軸伸長抑制を促進する効果があることも報告されている (Franklin et al., 2003a, Monte et al., 2003)。phyDは、R下での胚軸伸長抑制や花成促進に関わっており、phyBとの二重変異体で表現型がシビアになることから、phyBと重複して機能していると考えられている。シロイヌナズナの野生型の一つである Wassilewskija (Ws) は、phyDが欠損していることが明らかになっており、自然環境下での生育に必須でないことが示唆されている (Aukerman et al., 1997, Devlin et al., 1999)。phyEは、単独で欠損しても表現型は観察されないが、*phyB/phyE*の解析から避陰反応に関わることや*phyB/phyD/phyE*の解析からEOD反応に関わっていることが示唆されている。その他、発芽や子葉の展開への関与も示唆されている (Devlin et al., 1998, Hennig et al., 2002, Franklin et al., 2003b)。

フィトクロムは様々な生理応答を引き起こすが、その光シグナル伝達の分子機構も解明が進んでいる。フィトクロムは、光に依存して細胞内局在が変わるタンパク質であり、局在の変化がシグナル発信の調節に重要であると考えられ

る。phyA は、暗所では細胞質に局在し、FR を受容すると核に移行する。R を受容すると、核に移行はするが、光に対して不安定なためすみやかに分解される。一方、phyB も暗所では細胞質に局在するが、R の受容によって核に移行し、FR の場合は細胞質に局在する。フィトクロムの相互作用因子は多数単離されているが、フィトクロムが光質によって、細胞質と核を移動するため、ある光条件の時に同じ局在である因子と相互作用し、シグナルを発信している。

植物以外の生物にもフィトクロムは存在する。全ゲノム配列が解析された藍藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 から、アポタンパク質として Cph1 が見つかった (Kaneko et al., 1996)。Cph1 は、植物のフィトクロムとは発色団が異なり、フィコシアノビルリン (PCB) を利用している。PCB は、PΦB と D 環の側鎖がビニル基ではなくエチル基であることのみが異なっている。この Cph1 は、R/FR により可逆的な活性をもつヒスチジンキナーゼとして機能している (Yeh et al., 1997)。また、*Synechocystis* sp. PCC6803 からは、走光性に関わるフィトクロム様タンパク質、PixJ も見つかった。PixJ は、発色団として PCB を有しながらも、青色光と緑色光により光可逆的な応答をする珍しいフィトクロム様タンパク質である (Yoshihara et al., 2006)。また *Fremyella diplosiphon* のフィトクロム様タンパク質である RcaE は、リン酸転移反応によって、補色適応を制御することが知られている (Kehoe and Grossman, 1997)。その他、藍藻の *Synechococcus elongates* (Schmitz et al., 2000)、紅色細菌の *Rhodospirillum centenum* (Jiang et al., 1999) にもフィトクロム様タンパク質は存在する。

光合成生物だけでなく、非光合成生物でもフィトクロム様タンパク質が見つかった。放射線耐性細菌 *Deinococcus radiodurans* や緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* から見つかった BphP は、PCB や PΦB の生合成の中間体であるピリベルジン (BV) を発色団として利用しており、光可逆的なヒスチジンキナーゼ活性を有する (Bhoo et al., 2001)。植物や藍藻のフィトクロムは、N 末端領域に保存されたシステイン残基に PΦB、または PCB がチオエーテル結合している。しかし、非光合成細菌のフィトクロム様タンパク質には、システイン残基が保存されておらず、BV がヒスチジン残基にシッフ塩基を介して結合している。その他、土壌細菌の *Agrobacterium tumefaciens* でも、BV を結合するフィトクロム様タンパク質である Agp1、Agp2 が報告されている (Lamparter et al., 2002)。このように、機能は不明なものが多いが、フィトクロム様タンパク質は多くの生物に存在しており、光シグナルの重要性が窺える。

以上のように、フィトクロムは様々な生物が、光を環境のシグナルとして利用するために、非常に重要なタンパク質である。上述したように、植物において、フィトクロムに関わるいくつかの生理応答が明らかにされている。しかしながら、これらの生理応答が、フィトクロムがどのような光シグナルを受容し、どのような分子機構でシグナルを発信した結果引き起こされるのかは、ほとんど解明されていない。実際に、フィトクロムが光受容を行うために必須な発色団の生合成経路も明らかでなかった。植物における発色団生合成経路の解明は、未解明である生合成経路が明らかとなるだけでなく、発色団生合成酵素をコードする遺伝子が利用できるようになる。これによって、他の生物や植物体内での発色団生合成を調節できるようになれば、光受容能を有するフィトクロムを用いて、シグナル発信の分子機構を解析することができると期待された。

そこで、本論文では、まず光受容に欠かせない発色団の生合成経路を明らかにすることを目的として第一章での研究を開始した。この研究により、植物における発色団生合成経路が明らかとなったので、この成果を生かし、第二章において、大腸菌における **PΦB** 生合成系の構築を行った。また、大腸菌 **PΦB** 生合成系にフィトクロムを共発現させ、光受容能をもつフィトクロムを大腸菌内で発現させることに成功した。この成果は、*in vitro* において、フィトクロムと相互作用因子の結合の光質依存性を調べる実験など、光シグナル発信の機構を解明する上での強力なツールを獲得したことを意味した。そこで、このツールを利用して、フィトクロム光シグナル発信の分子機構を明らかにすることを目的とし、第三章で研究を行った。まず、光シグナル発信の鍵となる新規相互作用因子 **VOZ** の単離を行った。次に、単離した **VOZ** とフィトクロムの結合能について、第二章で合成した光受容能を有するリコンビナントフィトクロムを用いて解析し、相互作用の光質特異性を明らかにした。さらに、**VOZ** が光周期に依存した花成促進経路で機能する新規の因子であることを明らかにした。

以上のように、第一章から三章の研究を通して、「フィトクロム発色団生合成遺伝子同定に基づく植物光信号伝達機構の解析」を行った結果について、以下に報告する。

第一章 シロイヌナズナのフィトクロム発色団生合成に関わる

HY2 遺伝子の単離とその機能解明

序論

植物のフィトクロムタンパク質は数種類存在するが、**PΦB** を発色団として共通に用いている。**PΦB** は光を受容する非常に重要な補欠分子であり、その生合成経路の解明に向けて、生化学的な手法により研究が行われてきた。発色団の生合成は葉緑体で行われ、5-アミノレブリン酸 (**ALA**) が初発物質となる (Lagarias and Rapoport, 1980)。**ALA** からは幾つかの中間生成物を経て、クロロフィル生合成と共通の経路で、プロトポルフィリン **IX** が合成される。これに、**Mg²⁺**が配位するとクロロフィル生合成へ向かい、**Fe²⁺**が配位するとヘムが合成される。ヘム以降が発色団生合成に特有の生合成経路となり、ヘムがヘムオキシゲナーゼ (**HO**) によりビリベルジン (**BV**) **IXα**に変換される。続いて、**BV IXα** がフィトクロモビルンシンターゼ (**PΦB** シンターゼ) により **3Z-PΦB** に変換される。その後、**3Z-PΦB** は **3E-PΦB** へと異性化する。**3E-PΦB** は細胞質でアポフィトクロムの自己触媒反応によって結合し、ホロフィトクロムとなる。この一連の経路は、反応生成物から明らかにされてきたが、植物体内での酵素量が微量で抽出や精製が困難であるため、長い間、酵素の同定には至らなかった。しかし、1999年、村本らにより、光可逆性をもつフィトクロムを生合成できないシロイヌナズナ *hy1* 変異体を用いた分子遺伝学的な解析から、*HY1* 遺伝子が単離、同定され、ヘムオキシゲナーゼをコードしていることが明らかにされた (Muramoto et al., 1999)。

hy (*long hypocotyl*) 変異体は、1980年、Koornneefらによって、白色光下で胚軸伸長が抑制されないシロイヌナズナの突然変異体として単離された。*hy* 変異体には、5つの独立したアレルがあり、*hy1* はヘムオキシゲナーゼ欠損、*hy3* はフィトクロムタンパク質の **PHYB** 欠損、*hy4* は青色光受容体タンパク質の **CRY1** 欠損、*hy5* は光シグナル伝達経路の下流で機能する **bZIP transcription factor** 欠損であることが明らかにされていた。一方、*hy2* 変異体は、明所下での胚軸伸長に加え、*hy1* 変異体同様に、葉の色が薄い、頂芽優性が強い、早咲きなどの表現型を示す (Chory et al., 1989)。*hy2* 変異体は **R**、**FR** 下でも胚軸が伸長するため、その受容体であるフィトクロムに異常をきたしていると考えられた。その

後の解析により、フィトクロム構造遺伝子には異常がなく、フィトクロム A 抗体を用いた実験から、フィトクロムアポタンパク質は野生型と同様に蓄積することが明らかにされた (Parks et al., 1989)。さらに、**PΦB** の前駆体である **BV** を生育培地に添加しても、*hy1* 変異体では表現型が野生型に復帰したのに対し、*hy2* 変異体では復帰しないことが示された。これらのことから *hy2* 変異体はフィトクロム発色団生合成経路中の **BV IXα** から **3Z-PΦB** を合成する酵素、**PΦB** シンターゼに関与する変異であると考えられた (Parks and Quail, 1991)。

HY1 の単離、同定が行われたことから、発色団生合成経路の解明には *hy2* 変異体を用いた遺伝学的なアプローチが有効であると考えられた。*HY2* が明らかになれば、ヘムオキシゲナーゼと合わせ、ヘム以降の発色団生合成に特異的な経路が全て明らかになり、**PΦB** を合成することが可能になる。**PΦB** も植物体内での合成量が少ないために抽出が困難であったが、**PΦB** を生合成する酵素をコードする遺伝子が利用できれば、異種生物内でのホロフィトクロム発現系の構築が可能になり、分子レベルでのフィトクロムの研究に有効であることが期待された。また、**PΦB** に類似したピリン化合物は、藍藻の集光性色素として利用されているが、ピリン還元酵素は一つも明らかにされていない。よって、*HY2* がピリン還元酵素をコードすることが明らかになれば、他のピリン生合成の研究に役立つことも期待された。

この章では、*HY2* 遺伝子が **PΦB** シンターゼをコードすると予想し、まず CAPS マーカーを用いたマッピング法を用いて *HY2* 遺伝子の単離、同定を行った。さらに、*HY2* タンパク質の機能解析を行い、*HY2* 遺伝子が **PΦB** シンターゼをコードしていることを明らかにした。

材料と方法

植物体

Columbia (Col)

Landsberg *erecta* (Ler)

Wassilewskija (WS)

hy2-1 (Maarten Koornneef により単離された CS68 ; Ler 由来)

hy2-101 (Jason Reed により単離された EMS89S73S-E ; Col 由来)

hy2-102 (Jason Reed により単離された EMS195 ; Col 由来)

hy2-103 (Allison Wilson により単離された IAA^R-7 ; Col 由来)

hy2-104 (Allison Wilson により単離された IAA^R-12 ; Col 由来)

hy2-105 (Jason Reed により単離された g10-9 ; Col 由来)

hy2-106 (Aron Silverstone により単離された FN16-3 ; Ler 由来)

hy2-107 (Nam-Hai Chua により T-DNA 挿入株から分離された ; Ws 由来)

種子を発芽促進液 (10 mM KNO₃、10 mM リン酸バッファー, pH 5.5) 中で吸水させ、4°C、暗所で 2~5 日間、春化処理を行った。用土、またはロックウール (Nitto Boseki Co., Tokyo, Japan) に播種し、22°C、長日条件の人工気象器で生育させた。

CAPS マッピング

Ler バックグラウンドの *hy2-1* に異なるエコタイプである Col を交配し、F1 個体を得た。更に自殖により F2 個体を得て、*hy2* の表現型を示す個体を選抜した。1 回目は約 400 個体から、2 回目は約 2000 個体から簡易 DNA 抽出法 (Edwards et al., 1991) によりゲノム DNA を抽出し、PCR の鋳型として用いた。変異表現型の識別の容易な *hy2* は遺伝学的マーカーとしても利用されており、シロイヌナズナ第 3 染色体上腕部に位置することが明らかになっていた。そこで、第 3 染色体上の公開されていた CAPS マーカー C6、MnSOD に加え、新たに 6 つの CAPS マーカーを作製し、マッピングを行った。CAPS マーカーは Table 1-1 に示す。

Table 1-1 マッピングに用いた CAPS マーカー

Marker *1	Primers*2	Product size*3	Enzyme*4	Polymorphism(bp)*5
C6	5'-GCCTACCATCAATAAACCC-3' 5'-ATGAAAGACATCACAGATCC-3'	800bp	<i>Dde</i> I	Col 450, 350 Ler 650, 150
#80	F 5'-ACAGCGAGATTCAAAGGTCCATTAACCGGA-3' R 5'-GGGCTTACAGTGATATCTGCAAGACTTCTA-3'	about1100bp	<i>Hap</i> II	1000, 100 1100
cMLP3E1	F 5'-TAATGCTTGCGACAAACAGG-3' R 5'-GTTTCATCTCAGGGCCAAAAA-3'	1552bp	<i>Afa</i> I	1.2%agarose gel,polymorphisim between Col and Ler
cMXK7	F 5'-GCTTTTCAGAAATCAGACCTCAA-3' R 5'-CTGGTGTGGTTGATCGAATCT-3'	about850bp	<i>Dde</i> I	850 650, 200
cMZB10	F 5'-CTGCCAAGCTTCATTTGGTT-3' R 5'-GCAGGAGCTGCAGACAATCT-3'	797bp	<i>Bse</i> NI (<i>Bsr</i> I)	535, 262 797
cMZB10.18	F 5'-CAATGCAGGTTTAACTTCAGCA-3' R 5'-CCATGGGAAAGTCTGCAAAAT-3'	463bp	<i>Dde</i> I	86, 32, 233, 112 86, 265, 112
cF3L24	F 5'-TCAAGCCCTTTTCCAACATC-3' R 5'-TTCCCATCTGAACTCAACC-3'	601bp	<i>Hinf</i> I	54, 29, 93, 232, 193 54, 29, 93, 425
cF8A24	F 5'-AATGATGCATGGTGTGGTG-3' R 5'-GCTCGAGGAAAAGTCATCCA-3'	800bp	<i>Mbo</i> I	451, 127, 222 417, 34, 127, 222
MnSOD	F 5'-TTACGCTTCTGATCTTCTTACG-3' R 5'-CTCCCAAACATCTATACCCACCAG-3'	about1230bp	<i>Tai</i> I	700, 300, 230 1000, 230

*1 はマーカー名、*2 はプライマー配列、*3 は PCR により増幅された DNA 断片のサイズ、*4 は Polymorphism を示す制限酵素、*5 は制限酵素後の DNA 断片のサイズを示す。C6、MnSOD は公開されていたマーカーであり、その他は本研究において作製されたマーカーである。

HY2 座の塩基配列解析

WT と *hy2* 変異体のゲノム DNA を鋳型とし、MZB10.18 を含む 1,983 bp を Ex Taq DNA polymerase (TaKaRa, Shiga, Japan) を用い、PCR で増幅した。プライマー配列は以下の通りである。

F : 5'-CGTTTGTCTCACTGAAACTG-3'

R : 5'-CAATCATCTTGAAATGCAGA-3'

得られた PCR 産物を ExonucleaseI (1 U)、Shrimp Alkaline Phosphatase (0.2 U) (GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Piscataway, NJ, USA) を加えて、37°C で 30 分、その後 81°C で 30 分の反応を行い、シーケンス反応の鋳型として用いた。

HY2 cDNA の単離

当研究室で作製された Col の芽生え由来の cDNA ライブラリー約 300,000 クローンから plaque hybridization 法によりスクリーニングを行った。上記のプライマーを用いて MZB10.18 領域を Ex Taq DNA polymerase により PCR で増幅し、

プローブとした。ライブラリーのクローンは、 λ ZAPII ベクターに cDNA が挿入されていたので、*in vivo excision* により cDNA をもつプラスミドを単離した。*in vivo excision* の方法は、ZAP-cDNA GigapackIII Gold Cloning Kit (Stratagene inc., La Jolla, CA, USA) の説明書に従った。M13 プライマーを用いて、単離された cDNA の塩基配列を決定した。

相補性テスト

Col のゲノム DNA を鋳型として MZB10.18 領域と、その上流 901 bp、下流 434 bp を含む 3,004 bp を KOD DNA polymerase (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて、PCR で増幅した。プライマー配列は以下の通りである。

F : 5'-TCCCCCGGGTCTCAGCCATTGGAGATTGTT-3' (下線部 *Sma* I site)

R : 5'-TCCCCCGGGCAGACGAACCTCTTGGGTGT-3' (下線部 *Sma* I site)

得られた DNA 断片を pBS-SK⁺ の *Sma* I site に挿入し、塩基配列の確認を行った。プライマー部分の 1 塩基欠落により上流側の *Sma* I site が欠損したため、MZB10.18-pBS プラスミドから目的の領域を *Hind* III、*Sma* I で切り出し、バイナリーベクター-pBIN19 の同サイトに挿入した。このプラスミドを大腸菌 DH5 α に導入後、*A. tumefaciens* C58C1Rif^r (pGV2260)、HB101 (pRK2013) を用いた接合法により *A. tumefaciens* に導入した。減圧湿潤法 (島本, 岡田, 2001) により植物体 *hy2-1* へ形質転換を行った。

hy2 アリルのノザンプロット解析

WT と各 *hy2* 変異体の播種後 1 週間の芽生えから ISOGEN (NIPPON GENE CO., LTD., Tokyo, Japan) により RNA を抽出した。全 RNA 10 μ g を 1.2 % アガロース-ホルムアルデヒド変性ゲルで電気泳動した後、ナイロンメンブレン (Hybond-N, GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) に転写した。電気泳動およびハイブリダイゼーションは標準的な方法に従った。プローブは *HY2* cDNA プラスミドから *Eco* RI、*Xho* I site で切り出した DNA 断片を用いた。

GFP 融合タンパク質を用いた細胞内局在解析

HY2 cDNA を鋳型に葉緑体移行シグナル様配列 (TP) をコードすると推測された塩基配列を含む 186 bp (N 末端側の 62 アミノ酸をコードする領域に相当) を以下のプライマーを用いて KOD DNA polymerase により増幅した。

F : 5'-CATGCCATGGCTTTATCAATGGAGTTTGG-3' (下線部 *Nco* I site)

R : 5'-CATGCCATGGTTTCTTCTAAAGCAGACTCTG-3' (下線部 *Nco* I site)

得られた PCR 産物を pTH2XA (Takemura M., unpublished work) の *Nco* I site に挿入した。pTH2XA は 35SΩ-sGFP-S65T (Chiu et al., 1996) の融合部位にグリシンが 5 残基挿入されたものである。この *HY2* TP-pTH2XA プラスミドをタマネギの表皮とタバコ (*Nicotiana tabacum*) の葉に導入した。導入は、プラスミド精製カラム (QIAprep Spin Midiprep Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) で精製したプラスミド 1 μg/金粒子φ 1.0 μm (タマネギ)、プラスミド 1.5 μg/金粒子φ 1.6 μm (タバコ) を使用し、ヘリウム圧 1100 PSI、真空度 28 inches Hg でパーティクルガン (PDS-1000/He, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) により遺伝子導入を行った。22°Cで一晩、暗所に静置した後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて蛍光観察した。

以下は J. C. Lagarias (U. C. Davis) のグループとの共同研究により行ったものである。

大腸菌組換え *HY2* タンパク質発現ベクターの構築

予想された葉緑体移行シグナル配列、45 残基を除く *HY2* (mature *HY2* ; m*HY2*) のコーディング領域を *HY2* cDNA を鋳型として増幅した。プライマー配列は以下の通りである。

F : 5'-GAAGATCTGTCTCTGCTGTGTCGTATAAGG-3' (下線部 *Bgl* II site)

R : 5'-TCCCCCGGGTTAGCCGATAAATTGTCCTGTAAATC-3' (下線部 *Sma* I site)

得られた PCR 産物を pGEX-6P-1 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) の *Bam* HI/*Sma* I site に挿入した。コンストラクトは制限酵素処理と挿入部位の塩基配列の決定により確認した。

大腸菌における組換え *HY2* タンパク質の発現と精製

発現ベクター m*HY2*-pGEX を形質転換した大腸菌 DH5α株を 100 μg/ml のアンピシリンを含む LB 培地 500 ml で O.D.₅₇₈ が 0.6 に達するまで 37°C で培養した。0.6 に達した培養液に終濃度が 1 mM となるように Isopropyl-β-D(-)-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、37°C で 3 時間培養を行い、組換え m*HY2* の発現誘導を行った。この培養液 3 L から菌体をペレットとして回収した。ペ

レットに Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、100 mM NaCl、0.05 % Triton-X100、2 µg/ml leupeptin、2 mM PMSF、3 µg/ml pepstatinA、1 mM DTT) を 20 ml 加え、菌体を破砕した。この菌体破砕液を遠心し、上清を回収した。上清を PBS で平衡化したグルタチオン-アガロース (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) カラム (1cm×3cm) に供した。次にカラム容量の 5 倍の PBS で洗浄することにより非吸着タンパク質を溶出した。GST-mHY2 は 50 mM Tris-HCl (pH8.0)、10 mM 還元型グルタチオンにより溶出した。GST-mHY2 画分を Digestion buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.0)、100 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM DTT) で透析した。透析後、100 µg の GST-mHY2 に対し 2 ユニットの PreScission Protease (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) を加え、4°C で 5 時間静置して GST を切断した。切断処理後、上記と同様にグルタチオン-アガロースカラムに供してフロースルー画分を回収し、精製 mHY2 とした。

タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度は Bradford 法 (Bradford, 1976)、および mHY2 の 280 nm におけるモル吸光係数から導かれる、280 nm の吸光度 $1.0 = 0.64 \text{ mg/ml}$ の値を用いて算出した (Gill and von Hippel, 1989)。

mHY2 反応生成物を用いた光可逆的なフィトクロム生成の検出

BV と mHY2 の反応生成物がアポタンパク質と結合して、光可逆的なフィトクロムが生成するかどうかを調べた。このアッセイはこれまでに報告されている方法 (Terry and Lagarias, 1991) に従った。mHY2 反応は、精製 mHY2 を反応系 1 ml、50 mM TES-KOH (pH 7.3)、6.5 mM glucose-6-phosphate、0.82 mM NADP⁺、1.1 units glucose-6-phosphate dehydrogenase、4.6 µM ferredoxin、0.025 units/ml ferredoxin : NADP⁺ oxidoreductase (FNR)、10 µM BSA に加え、最終濃度が 5-10 µM となるように BV を添加することで開始した。反応は緑色安全光および暗所下、28°C で行った。以上のように調製した mHY2 反応生成物と大腸菌で発現させた *Synechocystis* sp. PCC6803 の Cph1 タンパク質を 20-30 分間、緑色安全光下、室温で反応させた。生成したフィトクロムの差スペクトルによる検出はこれまでに報告されている方法 (Terry and Lagarias, 1991) に従い測定した。

HPLC による mHY2 反応生成物の同定

BV と mHY2 の反応生成物を HPLC システムにより分離した。上記の「光可逆的なフィトクロム生成の検出」の方法で調整した反応液を C18 Sep-Pak Light (Waters Associates, Milford, MA, USA) に供した。C18 Sep-Pak Light は使用前に順に 3 ml の acetonitrile、3 ml の dH₂O、3 ml の 50 mM 4-methylmorpholine/glacial acetic acid (pH 7.7) で洗浄したものをを用いた。反応液をアプライ後、3 ml の 50 mM 4-methylmorpholine/glacial acetic acid (pH 7.7) で洗浄し、次に 3 ml の 0.1 % (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) で洗浄した。2 ml の 100 % acetonitrile で反応生成物を溶出して真空乾燥し、ペレットを DMSO に溶解した。この溶液を acetone : 20 mM formic acid (50 : 50, v/v) 200 μ l と混合して HPLC のサンプルとした。HPLC は Phenomenex Ultracarb 5 μ m ODS (20) (4.6 mm \times 250 mm) カラムとガードカラム (4.6 mm \times 30 mm) を用い、acetone : 20 mM formic acid (50 : 50, v/v) で溶出し、380 nm の吸収をモニターした。流速は 0.8 ml/min で行った。

結果

遺伝学的なマッピング

HY2 座を同定するために、遺伝学的なマッピングを行った。*hy2* は表現型の識別が容易なため、これまでシロイヌナズナの染色体上のマーカーとして利用されており (Nam et al., 1989)、*HY2* 座が第 3 染色体の上腕部に位置することが明らかになっていた。そこで、*hy2* 変異体 391 個体からゲノム DNA を抽出し、第 3 染色体上の公開されている CAPS マーカー C6、MnSOD を用いて解析を行った。次に、この 2 つのマーカー間に新たな CAPS マーカーを作成してマッピングを行ったところ、C6 からセントロメア側へ、MnSOD からテロメア側へ向かって、組換え率が低下したため *HY2* 座が C6 と MnSOD 間に位置することが明らかになった。さらに、この領域でマッピングを続けた結果、cMLP3E-1 マーカーから cF3L24 マーカー間の約 360 kb の範囲まで *HY2* 座を限定することができた。そこで、組換え率をもとに、これらのマーカーと *HY2* 座までの遺伝的距離を計算した。1 cM を 200 kb と仮定して遺伝的距離を物理的距離に換算すると、*HY2* 座は上流側の cMLP3E-1 マーカーからは約 26 kb、下流側の cF3L24 マーカーからは約 76 kb であった。cMLP3E-1 と cF3L24 間の距離は約 360 kb であるため、計算された *HY2* 座は約 250 kb 離れていた。よって、この 360 kb の範囲は組換え率が低いと考えられ、391 個体の F2 集団では、それ以上 *HY2* 座を限定することは出来なかった。そこで、新たに F2 集団の *hy2* 変異体、2,464 個体からゲノム DNA を採取し、PCR で増幅できたゲノム DNA サンプルのみを用いて、マッピングを行った。これにより、*HY2* 座を cMZB10 マーカーから cF3L24 マーカーの間、約 66 kb の範囲に限定することができた (Fig. 1-1)。

データベースを用いた *HY2* 座の予測

シロイヌナズナのゲノムプロジェクトから順次公開されていた遺伝子情報を利用し、*HY2* 座の予測、検討を行った。66 kb の領域内には 11 の未知遺伝子を含む 22 の遺伝子が存在し、この中から、*HY2* が PΦB シンターゼであるとの想定のもと、以下の三つの条件に適合する遺伝子を探索した。まず、生化学的な知見より PΦB がプラスチドで合成されることから、葉緑体移行シグナル様配列を有するタンパク質をコードする遺伝子とした。次に、藍藻が PΦB と構造が類似したピリン化合物を生合成することから、藍藻のゲノムプロジェクト

から推定される ORF と相同性を持つタンパク質をコードする遺伝子とした。さらに、ピリン化合物を還元する酵素が、これまでに単離されていないことから、機能未知遺伝子とした。検索の結果、三つの条件を満たす遺伝子は MZB10.18/F3L24.1 の一つだけであったため、これを *HY2* 遺伝子の候補とした。

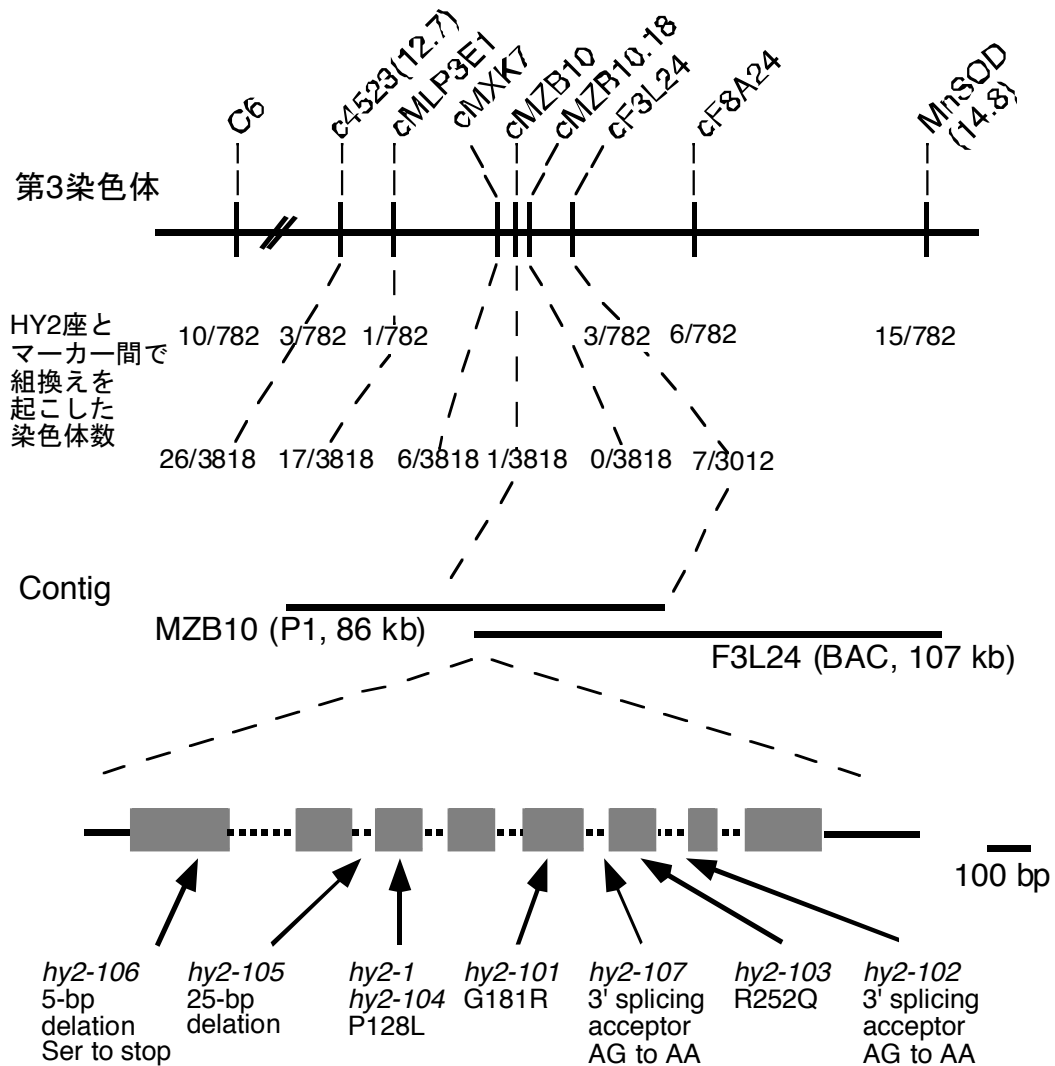


Fig. 1-1 遺伝学的なマッピングによる *HY2* 遺伝子のクローニング

上段は第 3 染色体の *HY2* 座を含む領域のマップと CAPS マーカーを示す。「c」で始まるものは本研究で作成したマーカーである。組換えを起こした染色体数には、2 度のマッピングの結果を分けて表す。中央の MZB10、F3L24 は BAC クローンである。下段は *HY2* 遺伝子の構成であり、灰色のボックスはエクソン、破線はイントロン、実線は非翻訳領域を示す。矢印で示す部位は *hy2* アリルの変異箇所を示す。

```

gaattccccacgtcaacgtgactgtgcattccacgtggcggatgtgggacctatagttgg 60
accatgactcggacggatgtgaaattcattgtcgttgccaattgctgttctcactga 120
aactgtgaaaatctctctttatagataaAGAATCTGCTTTTTTCAGTTTTTCAGTA 180
TGAAGAAGAATTGAAGAGAGTGTCCGAGGAAGGAGACCTTGGTTTCAGTTTGTGAGTCT 240
TGTGTGAATGGCTTTATCAATGGAGTTTGGGTTTTCAATGGGTCATGCTTCAAGGCACC 300
M A L S M E F G F S I G S C F K A P
AAACCCACCTGTTCTAATCTCTGCAAGCCCTAATAAGATCAATTCACGTTGAGAAGGAG 360
N P P V L L I S A S P N K I N F T L R R R
AAAGAAAAGATTCTTACTTAGAGTCTCTGCTGTGTCGTATAAGGAATTCGCAGAGTCTGC 420
hy2-106 *****
K K R F L L R V S A V S Y K E F A E S A
TTTAGAAGAAACCAGGAAAAGGATCGTTCTTGAACCTTACATCTCCAGgtatatgcaat 480
L E E T R K R I V L E P S H L Q
tacatttcgtagttagtggaggattatatttctcattgtttcttctgtgtaattttg 540
ggtaaatgattgagttgtcattaggaaccaaaacaataactttactgttatagactgc 600
ttatataagtaaaagttcagattttgttttctaatacagaaactgtttcagGAAAAGTA 660
E K Y
TAGTAGCATGACAGGACTAGATGGTAAGACCGAACTTCAAATGCTTGTCTTTTAAATCTTC 720
S S M T G L D G K T E L Q M L A F K S S
AAAGATTAGACTCTTGGAGATATGGCAATAGAGAATGAGACAATGCAGgtttaacttca 780
K I R L L R S M A I E N E T M Q
gcagtacaaaactgattgcttttagtcccatttcttactttcaattgattgattgtttgta 840
hy2-105 *****
tcttcgcttagGTCTTTGACTTTGCGGGTTTCATGGAGCCTGAGTATGATACTCCCATAT 900
hy2-1,hy2-104 T
V F D F A G F M E P E Y D T P I F
TCTGTGCTAACTTTTTACATCTACCAACGTTAACATAGTTGTATTgtaagttatcttct 960
C A N F F T S T N V N I V V L
agttatgctggagttatcaggctctgtattgtccaaactgatgttcaatattttactgtat 1020
gttcttcttagGGACCTTAATCCTTTGCATCAGTTGACTGACCAGACGGATTACCAAGA 1080
D L N P L H Q L T D Q T D Y Q D
CAAGTATTATAACAAGATAATGTCCATATATCACAATATGCTGAGgtgaccacaagaat 1140
K Y Y N K I M S I Y H K Y A E
acaccaaattactcaattgcaagtaaacctaagtctgagggtgaaatgactgatcttgag 1200
atattattgacACTTTCCCATGGGGAGGAAATGACTGGTGAATCCATAAAGTTTTTC 1260
hy2-101 A
T F P W G G K L T G E S I K F F
TCGCCTTTGGTGATGTGGACTAGGTTTTTCGTCTAGCAAAGAAAACATAAGGCTTTGTTC 1320
S P L V M W T R F S S S K E K H K A L F
TCTGCGTTTCTAGAGTACTATCAGgtatatactcagcggccaaaagctaaggttttattg 1380
S A F L E Y Y Q
gaaactttgactgagaatctatcatcttcttctacagGCATGGCTTGAGATGACAATCC 1440
hy2-107 a
A W L E M T I Q
AAGTGAGGGAGGAGATGGAACCATCTCATGTGAGAGCCAATTGTGAAGCACAAACACAAGT 1500
V R E E M E P S H V R A N C E A Q H K Y
ACCTGACATGGCGAGCACAAAAGgtgatttcttcttcttcttctgtaattgcatgtttga 1560
hy2-103 A
L T W R A Q K
acagacactgtatctgtattgttacaatggatattgatttgggtgtttgcagGATCCTGGA 1620
hy2-102 a
D P G
CATGGTCTTCTTAAAAGATTAGTAGGTGAAGCAAAGGCAAAGgtataaaagatttgatcc 1680
H G L L K R L V G E A K A K
cattagtgccccattattaattagcttgtgaagatgttgaaaatgatttgaacaaaatc 1740
agGAGCTGCTAAGGGATTTCTGTTCAATGGGGTGGATGAGTTAGGCACAAAACATTCA 1800
E L L R D F L F N G V D E L G T K T F I
TTGATTACTTTCCAGAGTACCAACAGAAAGATGGAAGTGAAGCGATAAACGAAGTATCA 1860
D Y F P E Y Q T E D G T V S D K R S I I
TTGGGAAGTCATATGAAACTCGTCCATGGGATTTAACAGGACAATTTATCGGCTAACAAAT 1920
G K S Y E T R P W D L T G Q F I G
GATATATGTGAACAAGTCAGATTTTCAGAGTCAATCAACAAGAGGACGTGAAGTAAAGGGA 1980
AGTAGGAATAAGAAAGAGCAGCATGAGGAGTCTCTCAGGTCTATCTGCATTTCAAGATGA 2040
TTGTTTGAAGTTACCATGCATTTGTAGTTTTACAAGTGTAGTCTCTCAGCCCTTCATCAAAAT 2100
GAGAATCCTCGAGTATGATATGATTTTAAATGAAAATGTATTCGTCTCTacctaatacaaca 2160

```

Fig. 1-2 HY2 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列

大文字の塩基配列はエキソン、小文字の塩基配列はイントロンと非翻訳領域を示す。二重線部は終止コドンである。塩基配列の下には、各 *hy2* 変異体における変異部位を示し、*は欠損を示す。

hy2 変異体における MZB10.18 領域の塩基置換、欠損の検索

MZB10.18 が *HY2* 遺伝子ならば、*hy2* 変異体のこの遺伝子座に変異があると予測された。そこで、当研究室にある各 *hy2* 変異体の MZB10.18 領域の塩基配列を調べた。その結果、8 つのアリル全てにおいて、野生型に対する塩基置換や欠損が見つかった。*hy2-105* では 25 bp、*hy2-106* では 5 bp の塩基欠損、*hy2-1*、*hy2-101*、*hy2-102*、*hy2-103*、*hy2-104*、*hy2-107* では 1 塩基置換が起こっていた。解析を行った全ての *hy2* 変異体で野生型との塩基配列の違いが確認されたため、MZB10.18 が *HY2* 遺伝子である可能性が強く示唆された (Fig. 1-2)。

hy2 変異体における MZB10.18 遺伝子の発現解析

一般に変異遺伝子は転写産物の蓄積量が低下することが多い。そこで、MZB10.18 が *HY2* 遺伝子であることの傍証を得るために、*hy2* 変異体における MZB10.18 の発現量をノザンブロット解析により調べた。その結果、*hy2-1*、*hy2-106*、*hy2-107* で明らかな発現量の低下が見られた (Fig. 1-3)。よって、MZB10.18 が *HY2* 遺伝子であることが更に強く示唆された。

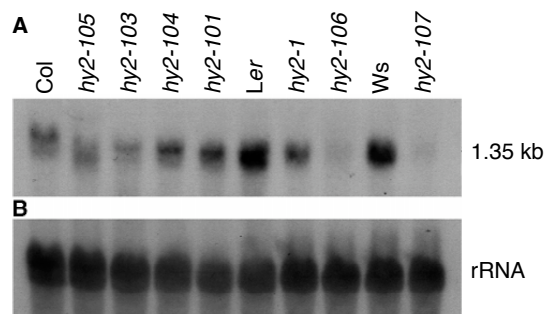


Fig. 1-3 *hy2* 変異体のノザンブロット解析

A. *HY2* 遺伝子と推測された MZB10.18 の発現量

B. rDNA をプローブとした loading control
播種後 1 週間の芽生えから抽出した Total RNA
を 10 μ g ずつ用いた。

HY2 座の遺伝学的な確認

さらに、遺伝学的に MZB10.18 が *HY2* 遺伝子であることに矛盾がないかを調べるために、MZB10.18 領域内に CAPS マーカーを作成し、マッピングを行った。その結果、MZB10.18 では組換えを起こした染色体数が 0 になった (Fig. 1-1)。

相補性テスト

hy2 変異体の表現型が MZB10.18 遺伝子の単一の変異に起因することを確認するため、相補性テストを行った。*hy2-1* 変異体に MZB10.18 とその推定プロ

モーターやターミネーターを含む約 3 kb のゲノム DNA 断片を導入した。その結果、*hy2* 変異体に特徴的な表現型である白色下での胚軸の伸長、早咲き、薄緑の表現型が回復した。よって、MZB10.18 単一遺伝子が *hy2* 変異体の原因遺伝子であることが確認された (Fig. 1-4)。

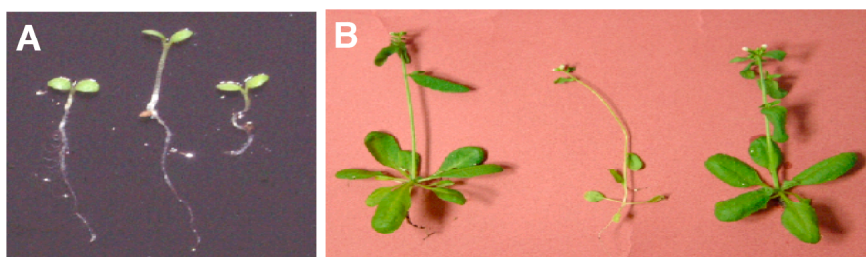


Fig. 1-4 相補性テスト

A. 発芽後 1 週間の芽生えの写真

左から野生型、*hy2* 変異体、*hy2* 相補株 (T3 世代) である。*hy2* 相補株において、胚軸伸長が抑制されたことを示す。

B. 発芽後 2 週間の植物体の写真

左から野生型、*hy2* 変異体、*hy2* 相補株 (T2 世代) である。*hy2* 相補株は薄緑、早咲きの表現型が回復したことを示す。

以上、遺伝学的なマッピング、*hy2* 変異体における MZB10.18 領域の塩基配列解析と発現解析、および相補性テストの結果から、MZB10.18 /F3L24.1 が *HY2* 遺伝子であることが明らかになった。

HY2 cDNA の単離

HY2 遺伝子の一次構造を決めるため、MZB10.18 領域をプローブとして、cDNA ライブラリーからスクリーニングを行い、全長の *HY2* cDNA を単離した。ゲノム DNA と cDNA 配列の比較から、*HY2* 遺伝子は、開始コドンから終始コドンまで 1,669 bp で 8 つのエキソンから構成されていることが明らかとなった (Fig. 1-1)。また、cDNA の全長は 1,307 bp、コーディング領域は 984 bp であった (Fig. 1-2)。

hy2 変異体での変異は次の通りであった (Fig. 1-1)。*hy2-1*、*hy2-104* は同じ位置の同一塩基置換による変異であり、第 3 エキソン Pro-128 が Lys へ置換されていた。両者はエコタイプによる多型が検出されたため、種子の混入ではなく、独立に同一の塩基置換を持った突然変異体が得られたと考えられる。*hy2-101*

は第 5 エキソンの Gly-181 が Arg に、*hy2-103* は第 6 エキソンの Arg-252 が Gln に置換されていた。*hy2-106* は第 1 エキソンの Ser-5 が終止コドンに変換されており、null な変異体であると考えられた。*hy2* のノザンブロット解析で mRNA の蓄積が見られなかったことも、この変異により開始コドンのすぐ後に終止コドンをもつことと一致していた。*hy2-102* は第 7 イントロン、*hy2-107* は第 5 イントロンの 3'側のスプライシングサイトに塩基置換があり、*hy2-105* は第 2 イントロンに塩基欠損があった。これら 3 つのアリルにおけるイントロン内の変異はスプライシングに異常をきたしていると考えられた。*hy2-107* も発現レベルは非常に低く、第 5 イントロンのスプライシング阻害は *HY2* の発現に大きく影響すると考えられた。*hy2-105* はスプライシングサイトの変異ではないが、大きな塩基欠失によりイントロンサイズが小さくなりすぎてスプライシングが生じない変異ではないかと推測された。

HY2 タンパク質、および相同性を示すタンパク質の検索

HY2 タンパク質は 329 アミノ酸残基からなっており、分子量が約 38.1 kDa の親水性タンパク質として翻訳されると予測された。*HY2* タンパク質の相同性検索の結果、藍藻で比較的相同性の高いタンパク質が見つかり、最も相同性が高い藍藻のタンパク質に対しては約 23 %が同一のアミノ酸残基であった。

植物ではクロロフィル分解系で機能する Red Chl catabolite reductase (RCCR) との相同性が最も高く、約 11 %のアミノ酸残基が同一であった。シロイヌナズナゲノムにも、RCCR より *HY2* と相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子は存在せず、*HY2* 遺伝子は、シロイヌナズナのゲノムにおいて、1 コピーの遺伝子で、遺伝子ファミリーを形成しないと推測された。

次に、*HY2* タンパク質の葉緑体移行シグナルの有無を調べた。P sort、および Chloro P での検索結果から、*HY2* は 45 残基の葉緑体移行シグナル様配列を有すると推測され、セリンに富む点からも葉緑体移行シグナル配列の特徴と一致していた (Fig. 1-5)。葉緑体移行様シグナル配列 45 残基を除いた成熟 *HY2* タンパク質の分子量は、約 33.0 kDa であると予測された。また、*HY2* と藍藻の *HY2* 類似タンパク質とのマルチプルアラインメントの結果、この領域が *HY2* に特有であることが示され、*HY2* が葉緑体移行シグナル配列を有することが示唆された。また、*HY2* C 末端側の第 8 エキソンに相当する約 45 残基も *HY2* に特有であり、この領域が植物でどのように関与しているのか非常に興味深い。

細胞内局在解析

HY2 タンパク質は葉緑体に輸送されると予想されたが、その細胞内局在を実験的に検証する必要がある。そこで、予測葉緑体移行シグナル様配列 (TP) に葉緑体へのタンパク質輸送能があることを実証するために、HY2 タンパク質の開始メチオニン残基から 62 アミノ酸残基と GFP との融合タンパク質を用い、細胞内局在解析を行った。タマネギの表皮細胞で一過的に発現させた結果、GFP のみのコントロールが細胞質、核に局在するのに対し、HY2 TP-GFP は細胞質に点在していた (Fig. 1-6)。この点在は細胞質に存在するオルガネラであることが予想され、プラスチドでの局在を示していると考えられた。次に、HY2 TP-GFP の葉緑体局在を明らかにするため、タバコの葉表皮で一過的に発現させた。その結果、孔辺細胞の片側で GFP の蛍光が観察された。この蛍光は、GFP 蛍光をもつ細胞の葉緑体のクロロフィルによる自家蛍光と完全に一致した。よって、HY2 は 62 アミノ酸残基以内に機能的な葉緑体移行シグナルを有することが実験的に明らかとなった。全長の HY2 タンパク質が葉緑体に移行することは確認されていないが、この局在解析と HY2 の推測される機能から全長の HY2 タンパク質も葉緑体に局在すると考えられる。

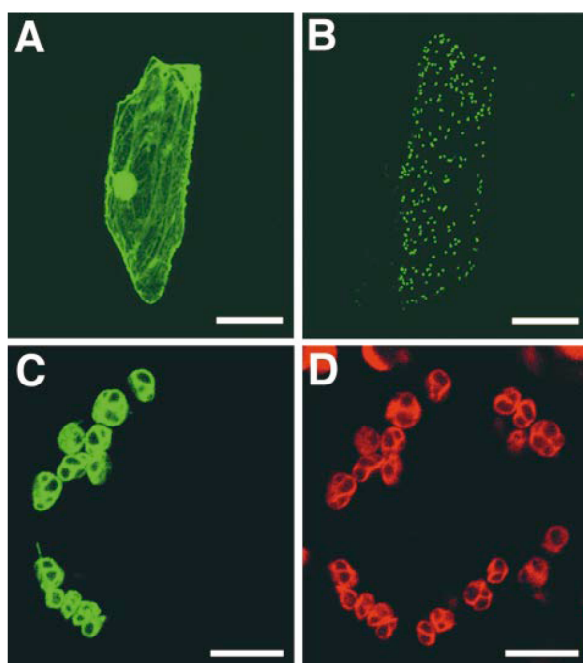


Fig. 1-6 HY2 TP-GFP 融合タンパク質による細胞内局在解析

- A. タマネギにおける GFP の蛍光
 - B. タマネギにおける HY2 TP-GFP の蛍光
 - C. タバコの孔辺細胞における HY2 TP-GFP の蛍光
 - D. C と同じ細胞の葉緑体の自家蛍光
- A.B.のスケールバーは 100 μm 、C.D.のスケールバーは 10 μm を表す。

組換え HY2 の精製

HY2 の機能解析を行うために、大腸菌における組換え HY2 タンパク質の発現と精製を行った。mHY2 と GST の融合タンパク質を大腸菌 DH5 α で発現させ、2 度のアフィニティークロマトグラフィーによって mHY2 を精製した。グルタチオンアガロースを用いたリクロマトグラフィー精製後に、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により mHY2 の予想分子量である約 30 kDa の位置に単一バンドとして検出され、mHY2 の精製が確認された (Fig. 1-7)。

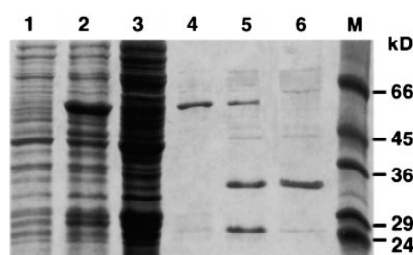


Fig. 1-7 組換え HY2 タンパク質 (mHY2) の精製

mHY2 の精製過程を SDS-PAGE 法により確認した結果を示す。各レーンは 1. IPTG 誘導前の全タンパク質抽出液、2. 誘導後の全タンパク質抽出液、3. 可溶性画分、4. グルタチオンアガロース精製後、5. GST 切断後、6. グルタチオンアガロースによるリクロマトグラフィー精製後である。

差スペクトル測定による組換え Cph1 を用いた mHY2 反応生成物の解析

HY2 が P Φ B シンターゼであることが推測されていたため、まず、mHY2 と BV の反応産物が藍藻のアポフィトクロム (Cph1) と結合し、分光学的に検出可能なフィトクロムを形成するかを検討した。還元型フェレドキシン存在下で BV と mHY2 発現大腸菌の粗抽出液をインキュベーションした後、組換え Cph1 を加え、生成物の差スペクトルを測定した。その結果、676 nm と 724 nm の吸収極大に由来するスペクトルが得られた (Fig. 1-8)。精製した mHY2 を用いて、同様の実験を行っても同じ結果が得られた。よって、BV と mHY2 の反応産物と組換え Cph1 から光可逆性を示す機能的なフィトクロムが生成されたことが明らかとなり、mHY2 と BV の反応生成物が発色団として機能することが示唆された。

紅藻である *Cyanidium caldarium* の細胞抽出液を用いた研究から、ビリン還元酵素が還元型フェレドキシン依存性であることが示唆されていた (Beale and Cornejo, 1991)。しかし、これまでに、ビリン還元酵素が単離されていなかった

ため、証明はされていなかった。上記の実験において、アッセイ系に還元型フェレドキシンを添加し、mHY2 のビリル還元酵素活性を測定した結果、還元型フェレドキシン添加に依存して活性が検出できた。よって、本結果から BV の還元酵素と示唆された HY2 が、HY1 同様にフェレドキシン依存性であることが明らかになった。

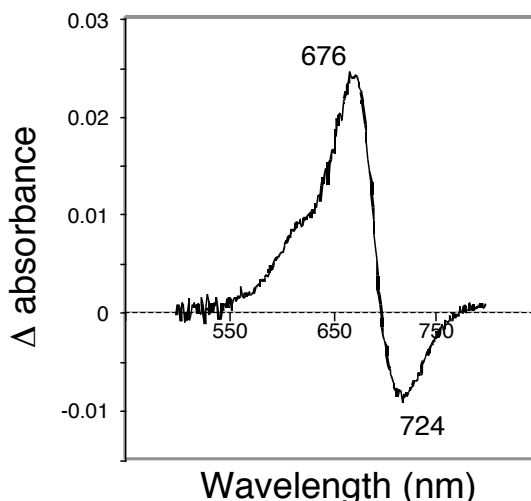


Fig. 1-8 BV と mHY2 の反応生成物を結合した組換え Cph1 の差スペクトル

大腸菌で発現させた mHY2 を BV と反応させた。この mHY2 反応液に組換え Cph1 を加えた結合産物の差スペクトルを測定した結果を示す。グラフ内に吸収極大と極小の波長を示した。

HPLC を用いた BV と mHY2 の反応生成物の同定

次に、mHY2 が PΦB シンターゼであるかを明らかにするために、mHY2 と BV の反応生成物の同定を行った。精製した mHY2 を暗所下で BV と反応させ、反応生成物を HPLC により検出した。結果を Fig. 1-9 に示す。mHY2 と BV の反応後は BV のピークが消失し、3Z-PΦB のピークと新たな別のピークが現れた。この新たなピークは 3E-PΦB であると考えられた。よって、mHY2 は BV から 3Z-PΦB への変換を触媒しており、PΦB シンターゼ活性を有することが明らかとなった。

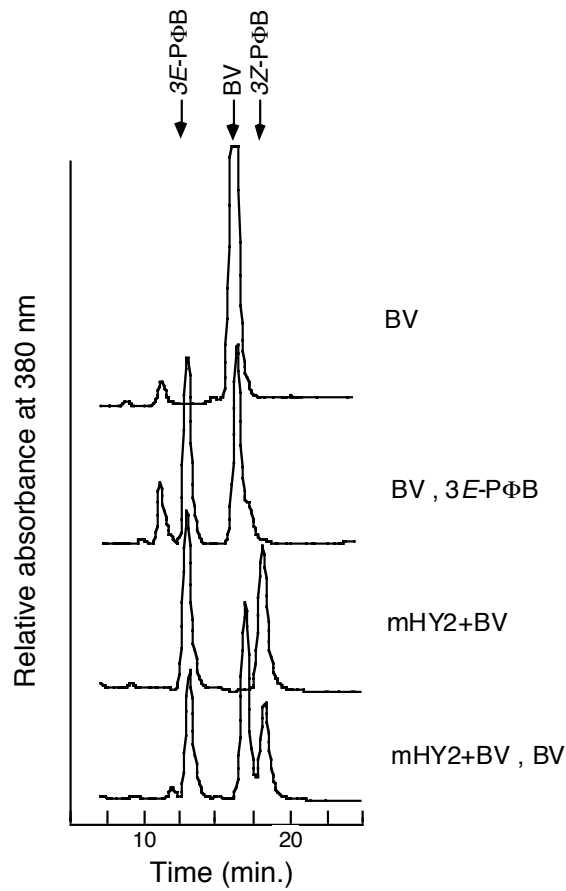


Fig. 1-9 HPLC を用いた BV と mHY2 の反応生成物の同定

BV と mHY2 の反応生成物を HPLC により分離した結果を示す。上段は BV のピークを示す。2 段目は BV と 3E-PφB を混合物したサンプルで 3E-PφB のピークを示す。3 段目は mHY2 と BV の反応生成物のピークを検出したものであり、4 段目は mHY2 と BV の反応生成物に、さらに BV を添加した時のサンプルのピークを表す。

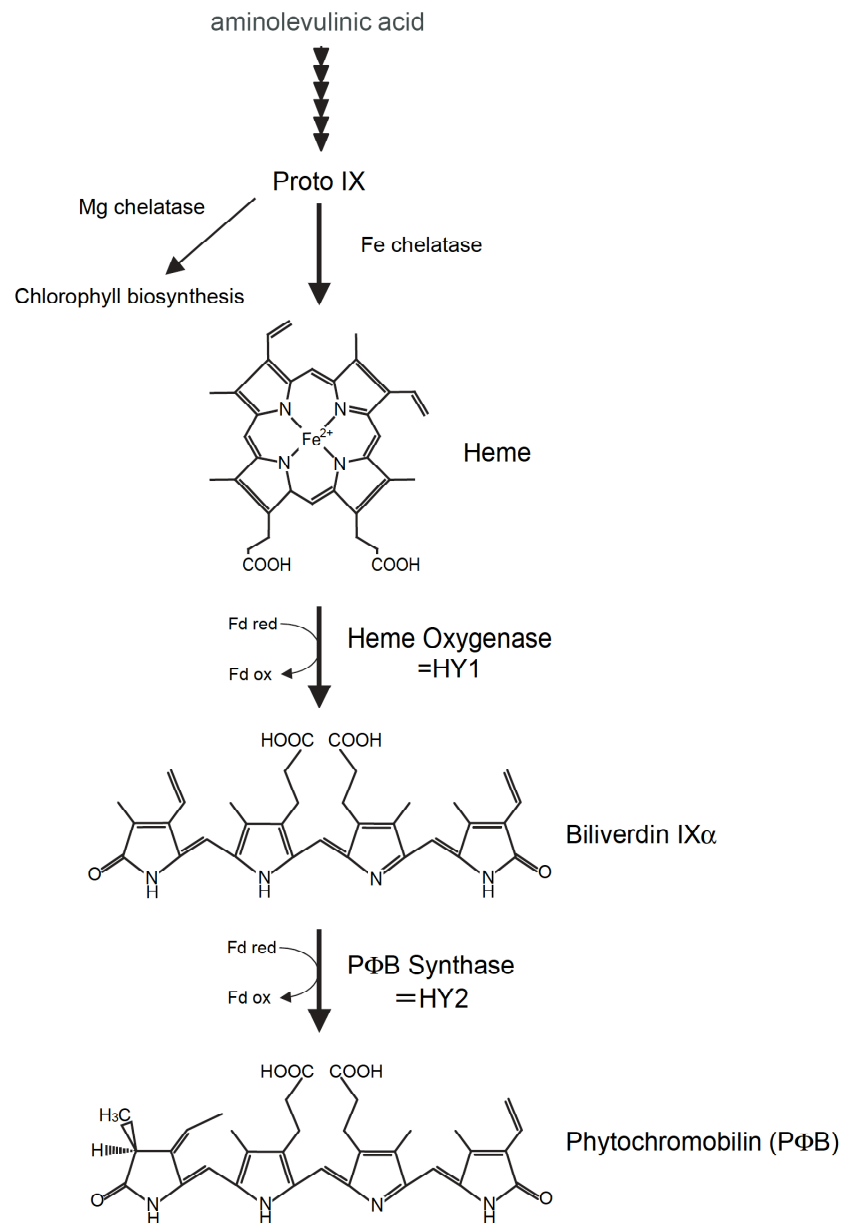


Fig. 1-10 発色団生合成経路

本研究から、HY2 が PΦB シンターゼであること、およびこの反応が還元型フェレドキシンに依存していることが明らかになった。このことにより、発色団生合成経路が明らかになった。

以上、本研究から、mHY2 がフェレドキシンに依存して、BV を 3E-PΦB に変換する PΦB シンターゼであることが明らかになった。また、3Z-PΦB から 3E-PΦB への異性化に、HY2 以外の酵素が不要であることが示唆された。BV を基質として mHY2 のみで PΦB が合成されたことから、HY2 が発色団生合成経路の最終段階の酵素であることが明らかになった (Fig. 1-10)。

考察

HY2 の PΦB シンターゼ活性

本研究では、HY2 遺伝子を単離し、遺伝子を利用した組換え HY2 タンパク質の PΦB シンターゼ活性を測定した。Cph1 と BV を基質とした HY2 の反応生成物の結合物による差スペクトル測定、および HPLC による反応生成物の解析から HY2 が BV を 3Z-PΦB に変換することが明らかとなった。差スペクトルの測定結果において、光可逆的なフィトクロムが形成されたこと、および HPLC の結果から、3Z-PΦB だけでなく 3E-PΦB の生成も確認されたことから、HY2 以外の酵素を必要とせずに 3Z-PΦB から 3E-PΦB への反応が進んだことを示唆している。これまで、3Z-PΦB から 3E-PΦB への反応には PΦB イソメラーゼが関与すると考えられていたが (Terry et al., 1995)、本研究により、異なる酵素としての PΦB イソメラーゼが不要であることが示唆された。今回の結果からだけでは、3Z-PΦB から 3E-PΦB への反応が、HY2 によって触媒されているのか、自然に起る反応かは明らかではないが、今後の研究に興味を持たれる。hy 変異体をはじめ、トマト (*yg-1*, *au*)、エンドウ (*pcd1*, *pcd2*)、タバコ (*pew1*, *pew2*) でもヘムオキシゲナーゼ、PΦB シンターゼと考えられる変異体が単離されているにも関わらず、PΦB イソメラーゼ変異体が未だ単離されていないことも、PΦB イソメラーゼが存在しないことを指示すると考えられる。

HY2 と発色団生合成

シロイヌナズナでは、全ゲノム配列が明らかにされているが、HY2 と類似するタンパク質はなく、相同性が約 11 %の Red Chl catabolite reductase (RCCR) が最も類似していた。RCCR はクロロフィル分解系において、Red Chl catabolite を Fluorescent Chl catabolite へ変換する酵素である。HY2 同様に、還元型のフェレドキシンに依存して、還元反応を行う。触媒する反応は類似しているが、PΦB シンターゼ活性を有していないことが、*in vitro* で明らかにされている (Wuthrich et al., 2000)。また、2004 年には、トウモロコシの Elm1 (Sawers et al., 2004) が、2005 年には、トマトの AUREA (Muramoto et al., 2005) が PΦB シンターゼであることが明らかになった。相同性検索では、*Physcomitrella patens*、*Adiantum capillus-veneris*、*Oryza sativa* にも PΦB シンターゼが見ついている (Fig. 1-11)。これらも全て遺伝子は 1 コピーであり、HY2 は遺伝子ファミリーを形成しない

と考えられた。

*hy2-106*は、ノザンブロット解析で転写産物が確認されず、葉緑体移行シグナル配列の後、すぐにストップコドンが現れる変異体であるため、**null**な変異だと考えられる。よって、発色団が全く合成されず、フィトクロムも機能しないと推測されるが、この*hy2*変異体は、成長が著しく阻害されるものの致死ではない。また、トウモロコシの*elm1*変異体は、塩基置換によりスプライシングに異常をきたしていたため、第3エクソン以降でC末端側を欠くタンパク質を合成し、**PΦB**シンターゼ活性の有無を解析した。しかし、全長のリコンビナントタンパク質以外では活性が検出されなかった (Sawers et al., 2004)。さらに、DNAの再編成により機能的な**PΦB**シンターゼを欠くと推測されるトマトの*au*⁶変異体も致死ではない。これらは、フィトクロムが機能しなくても、植物は生存できることを示しており、フィトクロムは生存そのものには必須ではないと考えられる。近年、青色光受容体が胚軸伸長の抑制や概日リズムの調節、花成の促進など、光生理応答の制御を行うことが明らかになっている。よって、フィトクロムの機能が欠損しても他の光受容体が、その機能を部分的に補っていると推測された。

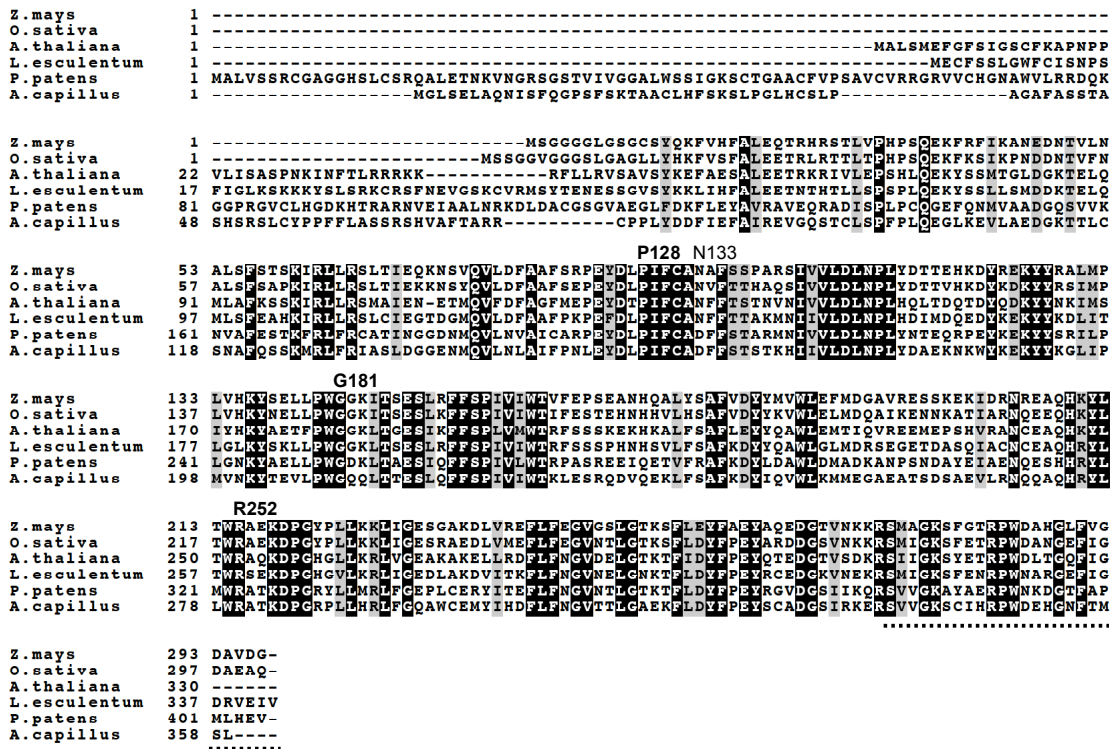


Fig.1-11 HY2 ファミリーのアラインメント

CLUSTAL W と BOXSHADE でアラインメントを作製した。全ての HY2 で同一のアミノ酸を黒、類似アミノ酸を灰色で示した。P128 は、シロイヌナズナの *hy2-1*、*hy2-104* 変異体、G181 は *hy2-101* 変異体、R252 は *hy2-103* 変異体におけるアミノ酸置換部位である。N133 は、トマトの *au^w*、*au^s* 変異体におけるアミノ酸の置換部位である。破線は、*au* 変異体でフレームシフトの起こっている部位を示す。各アミノ酸残基は HY2 のアミノ酸残基番号で示す。

フェレドキシン依存性

フェレドキシンは、光化学系 I に由来する電子伝達体であり、フェレドキシン依存 NADP⁺還元酵素やグルタミン合成酵素などの多くの酸化還元反応系や代謝系で利用されている。本研究から、植物や藍藻のヘムオキシゲナーゼに加え、ビリジン還元酵素も還元型フェレドキシン (Fd red) に依存して機能していることが示唆された。特異的抗体をもちいたウエスタンブロット解析により HY1、HY2 は葉緑体のストロマに局在することが示唆されている (鶴居、2001)。また、単離チラコイド膜とフェレドキシンを用いた HY1 のヘムオキシゲナーゼ活性測定の結果から、HY1 のヘムオキシゲナーゼ活性が葉緑体中で光依存的に上昇し、主に光化学系 I からの電子をフェレドキシンを介して受け取ることが示唆されている (鶴居、2001)。HY2 が HY1 と同様に Fd red に依存して活性を示すことから、HY2 もストロマ内の膜付近に局在し、光化学系 I からの電子をフェレド

キシンを介して電子を受け取ると推測された。

光合成における電子伝達反応のエネルギー源は光であるため、光照射下での Fd red、NADPH 濃度は高くなるため、Fd red を還元力に用いる HY1、HY2 は明期に活性が高いと考えられる。HY1、HY2 の発現解析からは、これらの mRNA の発現が明期で上昇することが示唆されており (data not shown)、先の仮説と一致する。また、PHYB の発現が明期で上昇することも報告されており、日中にホロフィトクロムの生合成が盛んになることが推測される。よって、HY1、HY2 は明期に機能するために、日中に多く存在する Fd red を利用しているのかもしれない。しかしながら、PHYA が黄化芽生えや暗所で蓄積することは、上記の明期に HY1 と HY2 が機能する仮説と矛盾している。黄化芽生えでも PΦB が合成され PHYA が蓄積されることから、HY1 と HY2 はプラスチドに存在する非光合成型フェレドキシンも触媒反応に用いることができると考えられる (Suzuki et al., 1991)。

藍藻におけるビリジン化合物の生合成

BV 以外の植物のビリジン化合物は PΦB であるが、藍藻や緑藻、紅藻には、フィコビリジンと呼ばれる数種類のビリジン化合物が存在する。藻類ではフィコシアノビリジン (PCB)、フィコエリスロビリジン (PEB)、フィコビリビオリン (PXB)、フィコウロビリジン (PUB) の 4 種類があり、これらも全て BV から派生する (Fig. 1-12)。フィコビリジンは集光性色素であり、フィコビリジンタンパク質に結合している。フィコビリジンタンパク質は会合してフィコビリソームと呼ばれる構造をとり、光化学系 II に結合して、化学反応中心へ高い効率でエネルギーを伝達している (Grossman et al., 1993)。また、PCB は、集光性色素としてだけでなく、藍藻のフィトクロムである Cph1 の発色団としても利用されている。

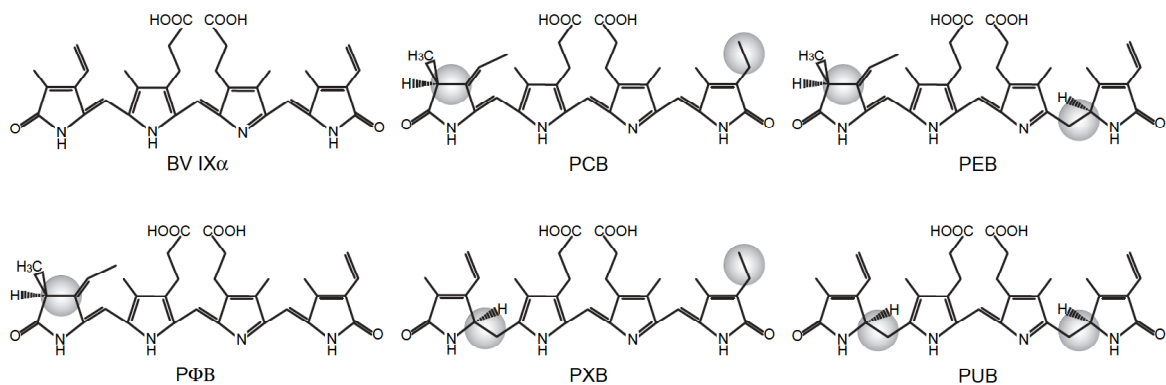


Fig. 1-12 ビリン化合物

灰色の円は、BV と異なる部位を示す。

これまでに藍藻のビリン化合物生合成経路では、ヘムをBVに変換するヘムオキシゲナーゼが*Synechocystis* sp. PCC6803で単離されている (Cornejo et al., 1998)。また、他の藍藻でもヘムオキシゲナーゼと高い相同性を示す遺伝子が見つかったが、BV以降の反応を触媒する酵素は明らかになっていなかった。本研究では、シロイヌナズナにおけるビリン還元酵素であるHY2と相同性を示す藍藻のタンパク質が見つかり、これらが藍藻のビリン還元酵素である可能性が期待された。そこで、共同研究者であるFrankenberg N.、Lagarias JC.らとともに、藍藻のこれらの酵素についても解析を行った。その結果、PCB、PEB生成に関わるポリベルジンリダクターゼを同定した。HY2に相同性のある遺伝子を検索した結果、7種類の藍藻 (*Synechocystis* sp. PCC6803, *Prochlorococcus marinus* sp. MED4, *Synechococcus* sp. WH8102, *Anabaena* sp. PCC7120, *Nostoc punctiforme*, *Synechococcus* sp. WH8020, *Prochlorococcus marinus* sp. SS120) から、15種類の遺伝子が見つかった。これらの遺伝子は3種類の酵素をコードしていた。BVを3Z-PCBに変換する酵素はPcyA (3Z-phycoyanobilin:ferredoxin oxidoreductase) と名付けられ、HY2と同様にBVのA環から2電子を還元する反応に加え、D環の側鎖からも2電子を還元する反応を触媒する。次に、PebA (15,16-dihydrobiliverdin:ferredoxin oxidoreductase) と名付けられた酵素は、BVの第15、16位間の二重結合を還元する反応を触媒して、BVを15,16-dihydrobiliverdin (DHBV)へと変換する。この反応は、HY2と基質は同じであるが、還元部位は全く異なる。PebB (3Z-phycoerythrobilin:ferredoxin oxidoreductase) と名付けられ

た酵素は、DHBVのA環から2電子を還元する反応を触媒し、3Z-PEBへと変換する。この酵素は、HY2と基質は異なるが、反応部位は全く同じである (Fig. 1-13)。また、これらのピリン還元酵素は全てHY2と同様にフェレドキシン依存性であった。以上、HY2の同定により、PcyA、PebA、PebBが同定され、光合成生物に一群のピリン還元酵素ファミリーが存在することが明らかになった (Frankenberg et al., 2001)。

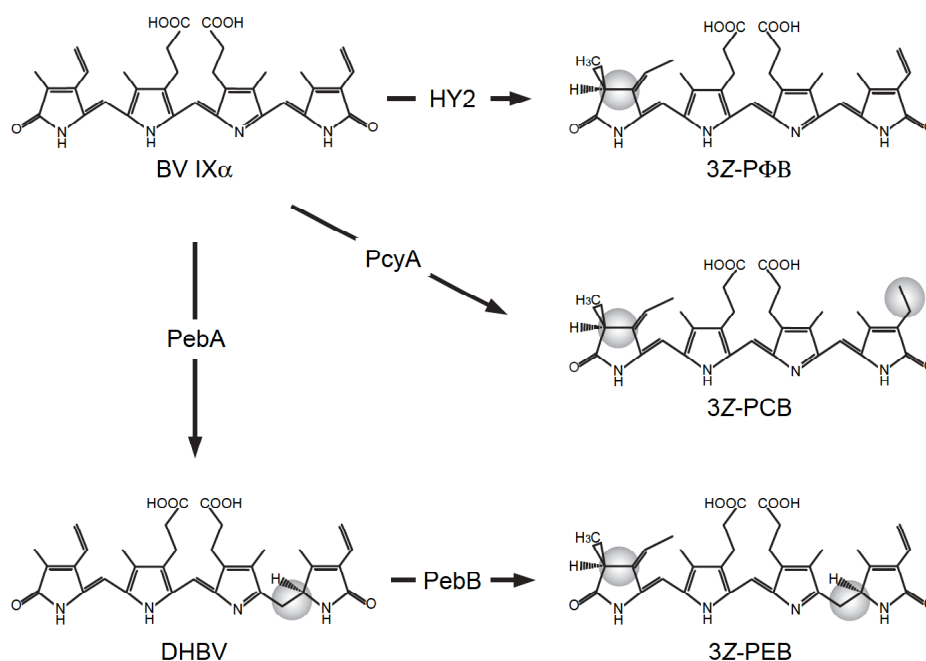


Fig. 1-13 明らかになったピリン還元酵素
灰色の円は、BV と異なる部位を示す。

現在では、データベース検索の結果、さらに多くの藻類で HY2 と相同性のあるタンパク質が見つかった。全て、あるいはほぼ全てのゲノム解読が終了している *Anabaena*、*Crocospaera*、*Gloeobacter*、*Nostoc*、*Prochlorococcus*、*Synechococcus*、*Synechocystis*、*Thermosynechococcus*、*Trichodesmium* の 27 種類の藍藻で相同性検索を行った。その結果、PcyA のみを有する種と PcyA、PebA、PebB を有する種が存在した。検索した全ての藍藻において、これらの酵素はそ

れぞれ1コピーしか存在しなかった。また、HY2 と最も相同性の高いタンパク質は、*Nostoc punctiforme* の PebB であり、アミノ酸配列の相同性は約 23 %であった。複数の生物種の HY2、PcyA、PebA、PebB で系統樹を作製しても、HY2 と PebB の clade が最も近く、HY2 と PcyA の clade が最も遠かった (Fig. 1-14)。よって、基質との結合特異性よりも、全く同じ反応を触媒するかどうかピリン還元酵素のアミノ酸配列を特徴づけていると考えられた。

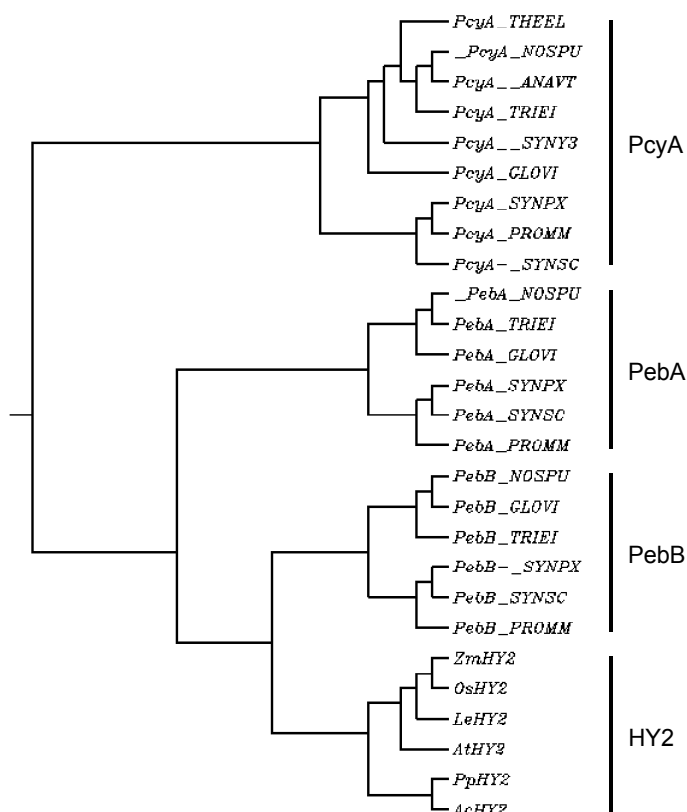


Fig.1-14 ビリン還元酵素ファミリーの系統樹

CLUSTAL W と N-j Tree で系統樹を作製した。生物名は下記の通りである。ANAVT ; *Anabaena variabilis* ATCC 29413、GLOVI ; *Gloeobacter violaceus*、NOSPU ; *Nostoc punctiforme* PCC73102、PROMM ; *Prochlorococcus marinus* MIT 9313、SYNPX ; *Synechococcus* sp. WH8102、SYNSC ; *Synechococcus* sp. CC9605、SYNY3 ; *Synechocystis* sp. PCC 6803、THEEL ; *Thermosynechococcus elongatus* BP-1、TRIEI ; *Trichodesmium erythraeum* IMS101、Ac ; *Adiantum capillus-veneris* (*A. capillus*)、At ; *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*)、Le ; *Lycopersicon esculentum* (*L. esculentum*)、Os ; *Oryza sativa* (*O. sativa*)、Pp ; *Physcomitrella patens* (*P. patens*)、Zm ; *Zea mays* (*Z. mays*)

PUB は BV の第 4、5 位間と第 15、16 位間の二重結合が還元された化合物であり、PXB は BV の第 4、5 位間の二重結合と第 18¹、18² 位間の二重結合が還元された化合物である。HY2 と PebB がアミノ酸配列の相同性を示すことを考慮すると、PUB 合成酵素は PebA と、PXB 合成酵素は PcyA と相同性を示すと考えられたが、PebA や PcyA と相同性の高い新たな酵素は見つからなかった。BV を基質とし、組換え PcyA、あるいは組換え PebA/PebB によって合成された化合物に PUB や PXB は含まれていなかった (Frankenberg et al., 2001)。このことから、PcyA や PebA/PebB が多機能酵素として PUB、PXB を合成する可能性や PCB、PEB が非酵素的に PUB、PXB へ変換する可能性は低いと考えられる。PUB、PXB を有し、ゲノム解読がほぼ終わっている藻類でも新たな酵素が見つからなかったことから、HY2、PcyA、PebA、PebB とは相同性のない酵素が PUB、PXB の合成を触媒していると推測された。これらは、PCB や PEB を基質として、第 4、5 位間を還元する新たな酵素かもしれない。

アミノ酸配列の比較

HY2、PcyA、PebA、PebB、RCCR のアミノ酸配列のアラインメントを行い、一次構造での機能予測を行った。hy2 変異体で起こっていたアミノ酸置換は、hy2-1、hy2-104 では Pro-128 が Leu、hy2-101 では Gly-181 が Arg、hy2-103 では Arg-252 が Gln であった (Fig. 1-11)。これらは、全ての PΦB シンターゼに保存されているアミノ酸であった。さらに、Pro-128 は、フェレドキシン依存性の RCCR、および全てのピリン還元酵素で保存されているアミノ酸であるため、このアミノ酸は還元型フェレドキシンに対する親和性に関わると推測された。次に、Gly-181 は HY2、PcyA、PebB に共通して保存されており、Arg-252 は HY2、PebB に共通して保存されていた。これらのアミノ酸は、A 環の還元に関わるかもしれない。また、トマトの aurea 変異体の変異部位は、au^w、au^{ls} では同じ部位で Asn-133 が Tyr-133 (トマトのアミノ酸番号では Asn-140) に置換されていた (Fig.1-11)。この部位は、シロイヌナズナ、イネ、トマト、トウモロコシでは保存されているが、ヒメツリガネコケ、ホウライシダでは保存されておらず、au^w、au^{ls} 変異体の表現型も野生型に近い。Asn-133 の前には、5 アミノ酸が連続して保存されているため、この周辺のタンパク質立体構造に影響を与える変異であるのかもしれない。また、AU は 342 アミノ酸残基からなるが、au 変異体は、欠失によって、C 末端側の 26 残基がフレームシフトを起こしている変異体

である。PΦB シンターゼは他のビリン還元酵素に比べ、C 末端側が長く、保存されているアミノ酸も多い。au でフレームシフトを起こしている領域内には全ての PΦB シンターゼに保存されたアミノ酸が 8 残基含まれている。このことから、PΦB シンターゼの C 末端側のアミノ酸配列は、PΦB シンターゼ活性に重要な部位であると考えられた。

また、アラインメントの結果、全てのビリン還元酵素に保存されたアミノ酸は Arg-100、Pro-128、Asp-146、Pro-149、Phe-192、Ser-193、Tyr-248、Asp-256、Leu-279、Phe-280 (各アミノ酸残基は HY2 のアミノ酸残基番号で示している) であった。近年、Hagiwara らにより PcyA と BV 複合体の立体構造が報告され、その結果から、PcyA と BV の結合に関与するアミノ酸残基が明らかとなっている (Hagiwara et al., 2006)。その残基のうち Phe-192、Tyr-248、Phe-280 が PΦB シンターゼ、PcyA、PebA、PebB に保存されているアミノ酸であり、特に Phe-192 は BV の A 環と、Tyr-248 と Phe-280 は D 環との結合に関与している。このことから、これらの残基は、PΦB シンターゼをはじめとするビリン還元酵素においても、テトラピロール化合物の A 環と D 環との結合に関与していると考えられる。実際、PcyA と BV の複合体では、BV の A 環と D 環が PcyA 内部に埋まっており、B 環と C 環のプロピオン酸が溶媒にさらされていることから、酵素-基質複合体を形成するために、A 環、および D 環と酵素の結合がビリン還元酵素の触媒反応に重要であると考えられる。PcyA の触媒反応において、BV は、まず D 環の側鎖が還元され、続いて A 環が還元されることが明らかにされている (Frankenberg and Lagarias, 2003)。この PcyA の還元反応では、その反応中に D 環側鎖と A 環への 4 個のプロトン付加が必要である。PcyA に結合している BV の A 環と D 環周辺には、Glu-105、His-116、Asp-133、Tyr-248、Gln-252 が位置しており、Glu-105 と Asp-133 は、D 環側鎖還元の活性残基と考えられ、Asp-133 が 1 個目の、Glu-105 が 2 個目のプロトン供給残基であると推測されている (Hagiwara et al., 2006)。一方、A 環の還元には His-116、Tyr-248、Gln-252 が関わると考えられている (Hagiwara et al., 2006)。A 環の還元反応では、D 環側鎖還元後に、部分的に A 環の構造が変化し、再度 Asp-133 が A 環への 1 個目のプロトン供給残基になると予測されている (Hagiwara et al., 2006)。Asp-133 は D 環側鎖と A 環への 2 回のプロトン供与を行うと考えられるが、D 環側鎖の還元反応で脱プロトン化されているため、His-116、あるいは B 環、C 環のアミド基が Asp-133 へプロトンを供給していると考えられている (Hagiwara et al.,

2006)。また、Tyr-248 は、A 環還元における 2 個目のプロトン供与体である可能性が考えられている (Hagiwara et al., 2006)。しかしながら、これら 5 残基のうち、PΦB シンターゼでは Tyr-248 のみ保存されており、他の残基は異なるアミノ酸残基に置換されている。特に、PcyA による BV の還元反応において、Asp-133 は BV の D と A 環還元の両方に非常に重要な役割を果たすと予想されるが、この残基は PebA、PebB では保存されているのに対し、HY2 では Asn に置換されている。しかし、興味深いことに、Asp-133 は、トマトの *au* 変異体で塩基置換を起こしていた Asn-133 に相当する。Asn-133 は、前述のとおり、PΦB シンターゼの中でも高等植物にのみ保存されており、ヒメツリガネゴケとホウライシダでは、PcyA、PebA、PebB と同様に Asp である。*au* 変異体が Asn-133 の変異に起因していたことは、PΦB シンターゼにおいて Asn-133 が触媒反応に関与していることを示唆しているが、Asn はプロトン供与体となることができないため、間接的に触媒反応に関与しているのではないかと予想される。よって、高等植物では他のアミノ酸残基がプロトン供与体として Asp-133 の役割を果たしているのではないかと考えられた。また、PcyA の Gln-252 は、シロイヌナズナの *hy2* 変異体でアミノ酸置換を起こしていた Arg-252 に相当する。よって、Arg-252 が、A 環の還元に関与しているとの予測が裏付けられたと考えられる。しかし、*hy2* 変異体におけるアミノ酸置換が Arg-252 から Gln-252 であることから、同じ A 環の還元反応を行う酵素であっても、PΦB シンターゼ活性を有するためには Gln ではなく、Arg であることが重要であると考えられた。

HY2、PebA、PebB では、PcyA の還元反応に関与すると予想されるアミノ酸残基のほとんどが保存されていなかったが、HY2、PebA、PebB で Arg-103、Asp-126、Leu-145、Ala-214、Pro-257、Gly-267 が共通に保存されていた。これらは 4 電子還元反応を触媒する PcyA には保存されておらず、2 電子還元反応を触媒する HY2、PebA、PebB の反応に関与するアミノ酸残基かもしれない。

本章では、*HY2* 遺伝子を単離し、*HY2* が PΦB シンターゼであることを明らかにした。これにより、ヘム以降の発色団生合成経路が明らかになったこと、および藻類に存在するビリジン還元酵素の一群が明らかにされた意義は大きい。本成果の報告後、PcyA の酵素学的解析や PcyA/BV 複合体の構造解析が進み、ビリジン還元酵素に関する知見が深まっている。また、遺伝子が単離されたことで、第二章で報告する組換えフィトクロムの合成が可能となった。植物体内へ

の遺伝子導入も行えるようになったため、植物体内で PΦB を PCB に置換した発色団改変植物体が生産、解析されている。このように、ビリジン還元酵素遺伝子群を単離し、機能を解明した本研究は、新たなアプローチから、植物の光シグナル伝達機構を明らかにする緒となった。

第二章 大腸菌における光受容能をもつフィトクロム発現系の構築とその評価

序論

組換えタンパク質による発現系は、大量に精製タンパク質を調製することが容易であり、タンパク質の機能や性質、構造等の解明に有効である。しかし、異種生物でタンパク質を発現させることには障害も多く、特に真核生物のタンパク質を原核生物で合成することは難しい場合が多い。フィトクロムも、組換えタンパク質を合成する試みは多く行われてきた。組換えタンパク質を合成する宿主として、大腸菌は培養や精製が最も容易であり、タンパク質を大量に発現させることができる利点がある。しかし、エンドウの **PHYA** の場合は、全長の約 20 %にあたる C 末端側が欠失したタンパク質は可溶化したものの、全長のタンパク質は不溶化し、大腸菌で機能的なタンパク質として発現させることができなかった (Tomizawa et al., 1991)。そこで、フィトクロムタンパク質の合成には、出芽酵母の発現系が用いられてきた。酵母では、可溶性タンパク質として全長のアポフィトクロムを発現させることができ、このアポタンパク質は発色団と結合して光可逆性を示した (Wahleithner et al., 1991, Deforce et al., 1991)。しかし、酵母の生重量 1 g あたり、約 11 μg の可溶性タンパク質しか得られなかった (Wahleithner et al., 1991)。よって、酵母の発現系を用いて、大量のフィトクロムを得ることは困難であり、なかなか分子レベルでの研究へ発展させることはできなかった。

これまでのフィトクロム研究に発色団として利用されてきたピリン化合物は、植物が本来用いている **P Φ B** ではなく、藍藻から抽出した **PCB** であった。**P Φ B** は、抽出や合成が困難であったが、藍藻由来の **PCB** は容易かつ大量に調製することができるためである。**P Φ B** は、植物体内での蓄積量が少ないために、植物から抽出することができない。そこで、キュウリから単離したエチオプラストの調製液を用いて、**BV** から合成して利用された。しかし、これは精製された **P Φ B** ではなく、反応液のまま用いられていた (Terry and Lagarias, 1991)。また、紅藻であるチノリモからも抽出されたが、逆相 HPLC を用いて **P Φ B** を分離しなければならず、多量に調製するためには労力がかかった (Li and Lagarias, 1992)。一方、藍藻は、光化学系の集光生色素として **PCB** を大量に有しており、その抽出、精製は比較的容易である。また、乾燥状態の藍藻も市販されているため材料の入

手が容易である利点もあった。

PCB は、PΦB の D 環の側鎖がビニル基であるのに対し、エチル基である点のみが異なっており、PΦB と同様にフィトクロムタンパク質にチオエーテル結合することができる。PCB を結合したフィトクロムは、PΦB を結合したフィトクロムに比べ、赤色光の吸収極大が 10 nm、遠赤色光の吸収極大が 15 nm 短波長側にずれるものの、R/FR を受容し、光可逆的なフィトクロムの構造変化を引き起こすことができる。このことから、PCB は PΦB の代替物として利用されてきたが、PCB を有するフィトクロムの性質や機能が植物本来のフィトクロムと全く同じであるかは定かではなく、植物のフィトクロムを研究する上で、PΦB を用いることが重要であると考えられた。

第一章において、HY2 遺伝子が PΦB シンターゼをコードしていることを示し、HY1 と HY2 の遺伝子がコードする二つの酵素によってヘムから PΦB が合成されることが明らかになった。フィトクロムには、PΦB を結合する自己触媒活性が存在する。よって、発色団をもつフィトクロムを生合成するために必要な全ての遺伝子が解明されたことになる。大腸菌は生体内でヘムを合成利用しているため、ヘムオキシゲナーゼと PΦB シンターゼを発現させることで、大腸菌内で PΦB を合成できることが期待された。また、大腸菌内でフィトクロムタンパク質の構造遺伝子と PΦB を生合成する酵素の遺伝子を共発現させれば、不溶化しやすいアポタンパク質も PΦB と結合することで本来の構造を保持し、可溶性タンパク質として発現する可能性も期待された。

大腸菌でのフィトクロム合成は、発色団として植物本来の PΦB を付加できるだけでなく、PHYA~PHYE の分子種を選択的に、かつ大量に生合成できる利点がある。これにより、一種類のフィトクロム分子種と特異的に相互作用するタンパク質のスクリーニングなど、ツールとして有効であると考えられる。また、構造解析が可能となり、光受容によって引き起こされる構造変化とシグナル発信のメカニズムの解明など今後の光シグナル伝達経路の解明に役立つと考えられた。

そこで、第二章では、第一章で単離した PΦB シンターゼをコードする HY2 遺伝子と、ヘムオキシゲナーゼをコードする遺伝子を共発現させることで、大腸菌における PΦB 生合成系の構築を行った。さらに、大腸菌の PΦB 生合成系にシロイヌナズナのフィトクロム遺伝子を共発現させ、光受容能をもつフィトクロムの発現系構築を目指した。得られた組換えフィトクロムの生化学的な性

質を解析したところ、光受容能を有するフィトクロムを合成できたことが明らかになった。

方法

ビリジン化合物生合成酵素の発現コンストラクトの作製

pKT210、pKT211、pKT218、pKT270、pKT271、pKT272 は河内博士 (現、京都大学大学院) により作製された。以下にこれらベクターの作成法について記述する。

pKT210 (BV IX α 合成用)

ヘムオキシゲナーゼをコードする *hoI* 遺伝子 (*sll1184*) を *Synechocystis* sp. PCC6803 のゲノム DNA を鋳型として PCR により増幅した。PCR 反応には KOD DNA polymerase を用いた。なお、特筆しない限り、以下の PCR 反応も同様に KOD DNA polymerase を用いた。PCR 産物を pQE-30 (Qiagen GmbH) の *Eco* RI-*Sal* I site に挿入し、pKT210 とした。プライマーの配列は以下の通りである。

F : 5'-GGAGGAATTCCTTAAGAAGGAGATATACATATGAGTGTCAACTTAGCT
-3' (下線部は *Eco* RI site)

R : 5'-GCGCTCGAGGATAAGTTGTCACGCTAGGTA-3' (下線部は *Xho* I site)

pKT211 (PCB 合成用)

PCB:ferredoxin oxidoreductase をコードする *pcyA* 遺伝子 (*slr0116*) を *Synechocystis* sp. PCC6803 のゲノム DNA を鋳型として PCR により増幅した。*Hol* と *pcyA* がタンデムにつながるように、得られた PCR 産物を pKT210 の *Xho* I site に挿入し、pKT211 とした。プライマーの配列は以下の通りである。

F : 5'-GCGCTCGAGTATTCCCATTTGCTTTGCCCTA-3' (下線部は *Xho* I site)

R : 5'-CGGCTCGAGGCTAAACAACCTACGATTAGT-3' (下線部は *Xho* I site)

pKT218 (P Φ B 合成用)

P Φ B シンターゼをコードする *HY2* 遺伝子は、*HY2* cDNA を鋳型とし、葉緑体移行シグナル配列をコードする遺伝子配列除いた遺伝子断片 (*mHY2*) を PCR により増幅した。得られた PCR 産物を、*Xho* I と *Sal* I で切断した後、pQE-30 の *Xho* I site に挿入した。このプラスミドの *Eco* RI-*Xho* I site に上述の *hoI* 遺伝子の PCR 産物を *mHY2* とタンデムになるように挿入し、pKT218 とした。プラ

イマーの配列は以下の通りである。

F : 5'-GGAGCTCGAGAAGAAGGAGATATACATATGAGAGTCTCTGCTGTGTC
GTAT-3' (下線部は *Xho* I site)

R : 5'- GGAGGTCGACCTGAGAGACTCCTCATGCTG -3' (下線部は *Sal* I site)

pKT270

pKT210 を鋳型に T5 プロモーターと *hol* 遺伝子領域を PCR により増幅した。得られた PCR 産物を pACYC184 の *Xba* I-*Sal* I site に挿入し、pKT270 とした。プライマーの配列は以下の通りである。

F : 5'-GTCTGCTAGCAAATCATAAAAAATTTATTTGC-3' (下線部は *Nhe* I site、
以下 T5 Pro *Nhe* プライマー)

R : 5'-GCGGTCGACGATAAGTTGTCACGCTAGGTA-3' (下線部は *Sal* I site)

pKT271

pKT211 を鋳型に T5 プロモーター-*hol-pcyA* 領域を PCR により増幅した。得られた PCR 産物を pACYC184 の *Xba* I-*Sal* I site に挿入し、pKT271 とした。プライマー配列は以下の通りである。

F : T5 Pro *Nhe* プライマー

R : 5'-CGGGTCGACGCTAAACAACCTACGATTAGT-3' (下線部は *Sal* I site)

pKT272

pKT218 を鋳型に T5 プロモーター-*hol-mHY2* 領域を PCR により増幅した。得られた PCR 産物を pACYC184 の *Xba* I-*Sal* I site に挿入し、pKT272 とした。プライマー配列は以下の通りである。

F : T5 Pro *Nhe* プライマー

R : 5'-GGAGGTCGACCTGAGAGACTCCTCATGCTG-3' (下線部は *Sal* I site)

シロイヌナズナフィトクロム遺伝子の単離

シロイヌナズナの cDNA ライブラリー (Col の花芽、茎頂、葉由来) を鋳型にし、Pfu DNA polymerase (Stratagene, inc.) を用いて、*AtPHYA* と *AtPHYB* を PCR により増幅した。用いたプライマーの配列は下記の通りである。下線部は *Nde* I site を示す。

PHYA 5'F : 5'-GGAATTCCCATATGTCAGGCTCTAGGCCG-3'

PHYA 3'R : 5'-GGAATTCCCATAIGCTTGTGTTGCTGCAGCGAG-3'

PHYB 5'F : 5'-GGAATTCCCATATGGTTTCCGGAGTCGG-3'

PHYB 3'R : 5'-GGAATTCCCATATGATATGGCATCATCAGCATCAT-3'

得られた PCR 産物を pBC-SK⁺の *Eco* RV site に挿入した。シーケンスによりこれらの塩基配列に変異がないことを確認し、本研究全てに用いるフィトクロム cDNA とした。

フィトクロム発現コンストラクトの作製

pKT214 (Cph1 発現用)

Synechocystis sp. PCC6803 のゲノム DNA を鋳型にし、PCR により *cph1* を増幅した。得られた PCR 産物を pQE-30 の *Bam* HI-*Sma* I site に挿入し、pKT214 とした。プライマー配列は以下の通りである。

F : 5'-CGCGGATCCATGGCCACCACCGTACA-3' (下線部は *Bam* HI site)

R : 5'-TCCCCGGGTTAGTTGCCAATGGGGAT-3' (下線部は *Sma* I site)

pKT306 (PHYA (N617) 発現用)

PHYA cDNA を鋳型に *PHYA* N 末端領域の 1-1851 bp (617 アミノ酸をコード) を PCR により増幅した。この PCR 産物を pTXB1 (New England Biolabs, Inc. USA) の *Nde* I-*Xho* I site に挿入した。用いたプライマー配列は以下の通りである。

F : *PHYA* 5'F

R : 5'-CCGCTCGAGAGCTTCTAGTTCTTGTATACC-3' (下線部は *Xho* I site)

pKT307 (PHYB (N651) 発現用)

フィトクロムの cDNA を鋳型に *PHYBN* 末端領域の 1-1953 bp (651 アミノ酸をコード) を PCR により増幅した。この断片を pTXB1 の *Nde* I-*Eco* RI site に挿入した。用いたプライマー配列は以下の通りである。

F : *PHYB* 5'F

R : 5'-CCGGAATTCTGCACCTAACTCATCAATCCC-3' (下線部は *Eco* RI site)

pKT313 (全長 *PHYB* 発現用)

上記の *PHYB* cDNA-pBC プラスミドを *Nde* I で制限酵素処理し、得られた

PHYB 断片を切り出して、pTXB1 の *Nde* I site に挿入し、pKT313 とした。

PΦB、PCB 生合成大腸菌の培養と差スペクトル測定サンプルの調整

pKT211、pKT218、pKT214 を大腸菌 M15 に導入し、50 μg/ml のアンピシリンと 50 μg/ml のカナマイシンを含む LB 培地で培養した。OD₆₀₀ が 0.6 に達したところで、終濃度 1 mM の IPTG で発現を誘導し、25 °C、130-180 rpm で一晚培養を続け、集菌した。それぞれの菌体を Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) に懸濁し、氷上で超音波破碎を行った。4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。PΦB、PCB 生合成用菌体の粗抽出液とアポタンパク質発現用菌体の粗抽出液を等量混合し、室温、暗所で 30 分間静置して、差スペクトル測定に用いた。

HPLC を用いたビリニン化合物の解析

培養、集菌した pKT211、pKT218 形質転換大腸菌を Lysis Buffer に懸濁した。等量の acetone を加え、攪拌後、遠心し、上清を回収した。これを、0.1 % TFA で 10 倍に希釈し、C18 Sep-Pak light cartridge (Waters Corp.) に供した。また、菌体分離後の培地溶液も同様にカラムに供した。C18 Sep-Pak Light は使用前に順に 3 ml の acetonitrile、3 ml の dH₂O、3 ml の 0.1 % TFA で洗浄した。アプライ後は、3 ml の 0.1 % TFA、3 ml の acetonitrile : 0.1 % TFA (20 : 80, v/v) で洗浄した。2 ml の acetonitrile : 0.1 % TFA (60 : 40, v/v) で反応生成物を溶出し、真空乾燥後、ペレットを dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。この溶液 5 μl を acetone : 20 mM formic acid (50 : 50, v/v) 200 μl と混合して HPLC のサンプルとした。このサンプルを Wakosil- II 5C18HG カラムに供し、ビリニン化合物を acetone : 20 mM formic acid (50 : 50, v/v)、流速 0.8 ml/min で溶出した。ビリニン化合物は 380 nm の吸収をモニターすることにより検出した。ビリニン化合物のマーカには、市販の BV IX、rHY2 を用い BV IX から *in vitro* で合成した PΦB、*Spirulina* より調製した PCB、rPcyA を用い BV IX から *in vitro* で合成した PCB を用いた。

PΦB、PCB 生合成系とフィトクロムの共発現大腸菌の培養

pKT271/pKT306、pKT271/pKT307、pKT271/pKT313、pKT272/pKT306、pKT272/pKT307、pKT272/pKT313 を大腸菌 ER2566 に形質転換した。2 % glucose、50 μg/ml アンピシリン、30 μg/ml クロラムフェニコールを含む LB 培地 250 ml

500 ml で、 $OD_{600}=0.5$ に達するまで 37°C で振盪培養した。 $OD_{600}=0.5$ に達した時に、終濃度 1 mM となるように IPTG を添加して発現を誘導し、 18°C で一晩培養した。

アフィニティー精製

遠心分離により回収した菌体を 5~15 ml の Lysis buffer (50 mM リン酸バッファー (pH7.0), 100 mM NaCl, 0.1 % TritonX-100, 1 mM 2-mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail) に懸濁し、氷上にて超音波破碎を行った。15,000 rpm、10 分間の遠心分離を行った上清を bed volume 0.5~1 ml の Chitin Beads を詰めたカラムに供し、bed volume の 20 倍以上の column buffer (50 mM リン酸バッファー (pH7.0), 100 mM NaCl, 0.1 % TritonX-100, 1 mM 2-mercaptoethanol, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF) で洗浄した。bed volume の 3 倍以上の cleavage buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.8), 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 50 mM DTT) によって、カラム内のバッファーを置換した後、 4°C 、暗所で 2 晩静置した後に溶出した。

ゲルろ過クロマトグラフィー精製を行ったサンプルは、次の容量でアフィニティー精製を行った。1.5 L の培地で培養した菌体を、50 ml の Lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.8), 500 mM NaCl, protease inhibitor cocktail) で破碎した。bed volume は 3 ml にし、75 ml の column buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.8), 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) で洗浄した。溶出は同様の方法で行った。

差スペクトルの測定

タンパク質溶液にファイバー型の光源 (Intralux 6000-1; Volpi AG, Schlieren, Switzerland) と赤色光バンドパスフィルター、遠赤色光カットフィルター (BP-W1 660, R-72; Kenko, Tokyo, Japan) を用いて、単色光を 10 分間照射した。光照射直後に、フォトダイオードアレイ分光器 (HP 8453 UV-Visible system, HEWLETT PACKARD, Germany、あるいは S-3100 Series, SCINCO Co., Ltd. Korea) を用いて、吸光スペクトルを測定した。FR 照射後の吸光スペクトルの値から R 照射後の吸光スペクトルの値を引いて、差スペクトルの値を算出した。光照射と測定は緑色光下で行った。

Zinc Blot 解析

SDS-PAGE 法でタンパク質を展開した SDS-ポリアクリルアミドゲルを 100

mM Zinc acetate、150 mM Tris-HCl (pH7.0) の溶液中で 30 分間振盪した。バイオイメージアナライザー (FM-BIO-2; Hitachi Software Engineering, Yokohama, Japan)、あるいは UV illuminator で検出した。Zinc Blot 解析後のゲルを CBB 染色した。

ゲルろ過クロマトグラフィー精製と specific absorbance ratio (SAR) 値の測定

アフィニティー精製を行ったタンパク質溶液 1 ml をゲルろ過バッファー (50 mM リン酸バッファー (pH7.0), 100 mM NaCl) で平衡化を行った HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 pg カラムに供し、ÅKTA purifier システムにより、0.5 ml/min の流速で溶出した。280 nm と 660 nm (for PΦB) あるいは 650 nm (for PCB) の吸光度をモニターしながら、1 ml ずつ分画し、R の吸光度が最も高かった画分を分取した。FR-LED あるいは R-LED (SANYO Electric Co., Ltd., Osaka, Japan) を 10 分間照射し、フォトダイオードアレイ分光器 (HP 8453 UV-Visible system, HEWLETT PACKARD) により吸収スペクトルの測定を行った。280 nm の吸光度と 660 nm (for PΦB) あるいは 650 nm (for PCB) の吸光度から総フィトクロムタンパク質に占める光受容能をもつフィトクロムの割合 (SAR) 値を算出した。

PCB の添加実験では、アフィニティー精製を行ったタンパク質溶液に、20 mM の PCB を終濃度が 20 μM となるように添加し、20°C、暗所で 30 分間反応した。この反応液 1 ml を同様の方法で処理した。なお、PCB は *Spirulina* より調製したものをを用いた。

ウエスタンブロット解析

シロイヌナズナの PHYB に対するモノクローナル抗体は京都大学大学院・長谷教授より供与頂き、200 倍希釈で用いた。抗 mouse IgG 抗体 (A9044, Sigma-Aldrich, USA) は 10,000 倍希釈で用いた。抗体反応の検出は、ECL Plus Kit (Amersham Biosciences CO.) と LAS-1000 (Fuji Photo Film Co., Ltd.) を用いた。

全長フィトクロム B の暗反転速度の測定

粗抽出液に終濃度が 25 % (wt/vol) となるように硫酸アンモニウム粉末を加え、4 °C、暗所で 1 時間静置した。遠心分離後のペレットを Lysis buffer に懸濁した。この粗精製タンパク質溶液に、ファイバー型の光源と赤色光バンドパスフィルターを用いて、R を 10 分間照射した。その後、22°C、暗所に静置した。暗所静

置後の時間を 0 分とし、15, 30, 60, 120 分後にフォトダイオードアレイ分光器 (HP 8453 UV-Visible system, HEWLETT PACKARD) で吸収スペクトルを測定した。660 nm と 730 nm (for PΦB)、あるいは 650 nm と 715 nm (for PCB) の吸光度から Pfr 型の割合を算出した。算出方法を以下に記す。

$$\text{Relative Pfr amount (\%)} = \frac{\Delta A_{\text{FR}} - \Delta A (t=n)}{\Delta A_{\text{FR}} - \Delta A (t=0)} \times 100$$

$\Delta A = \text{Pr 型の吸光度} - \text{Pfr 型の吸光度}$ として、 $\Delta A_{\text{FR}} = \text{FR 照射直後の } \Delta A$ 、 $\Delta A (t=0) = \text{R 照射直後の } \Delta A$ 、 $\Delta A (t=n) = \text{暗所静置 } n \text{ 分後の } \Delta A$ である。

結果

大腸菌における PΦB、PCB 生合成系の構築

大腸菌内で発色団を有するフィトクロムを合成するためには、まず、大腸菌内でピリン化合物を合成する必要がある。ヘムは大腸菌が合成することができるため、ヘムオキシゲナーゼ (HO ; シロイヌナズナでは HY1、藍藻では Ho1) と PCB:ferredoxin oxidoreductase (PcyA) を大腸菌で発現させることにより、PCB が合成されることが報告されていた (Landgraf et al., 2001)。よって、ヘムオキシゲナーゼと PΦB シンターゼ (HY2) を発現させることにより、大腸菌内で PΦB を合成できることが期待された。そこで、HO と PcyA、あるいは HO と HY2 を大腸菌で共発現させ、PCB あるいは PΦB が合成されているかを調べた。PCB 合成用の pKT211、あるいは PΦB 合成用の pKT218 を有する大腸菌の粗抽出液と藍藻のアポフィトクロムである Cph1 発現用の pKT214 を有する大腸菌の粗抽出液を混合した。混合液の差スペクトル測定を行うことにより、Pr 型と Pfr 型のフィトクロムを検出し、大腸菌内での PCB、PΦB 合成の有無を解析した。その結果、次のピークを有する差スペクトルが検出された。pKT218 保有菌を用いた場合、max;668 nm、min;714 nm (Fig. 2-1, A 左)、pKT211 保有菌を用いた場合、max;660 nm、min;705 nm (Fig. 2-1, A 右)であった。この値は、これまでの報告とほぼ一致しており (Lamparter et al., 1997)、pKT211 の導入により PCB が、pKT218 の導入により PΦB が大腸菌内で合成されていることが示唆された。

次に、大腸菌内で合成された化合物を同定するために、HPLC によって化合物の同定を行った。pKT218 を有する大腸菌は緑色を呈しており、HPLC による解析の結果、菌体の抽出物から BV IX と 3Z-PΦB が検出された (Fig. 2-1, B 左)。一方、pKT211 を有する大腸菌は緑色を呈さず、菌体の抽出物からは組換え Ho1 によって合成されたと考えられる BV IX のみが検出され、培地から 3E-PCB が検出された (Fig. 2-1, B 右)。よって、それぞれの大腸菌内で目的通りに PΦB、あるいは PCB が生合成されていることが明らかとなった。また、PΦB は大腸菌内に蓄積しやすいが、PCB は大腸菌内には蓄積しにくく培地中に放出される性質があることが示唆された。

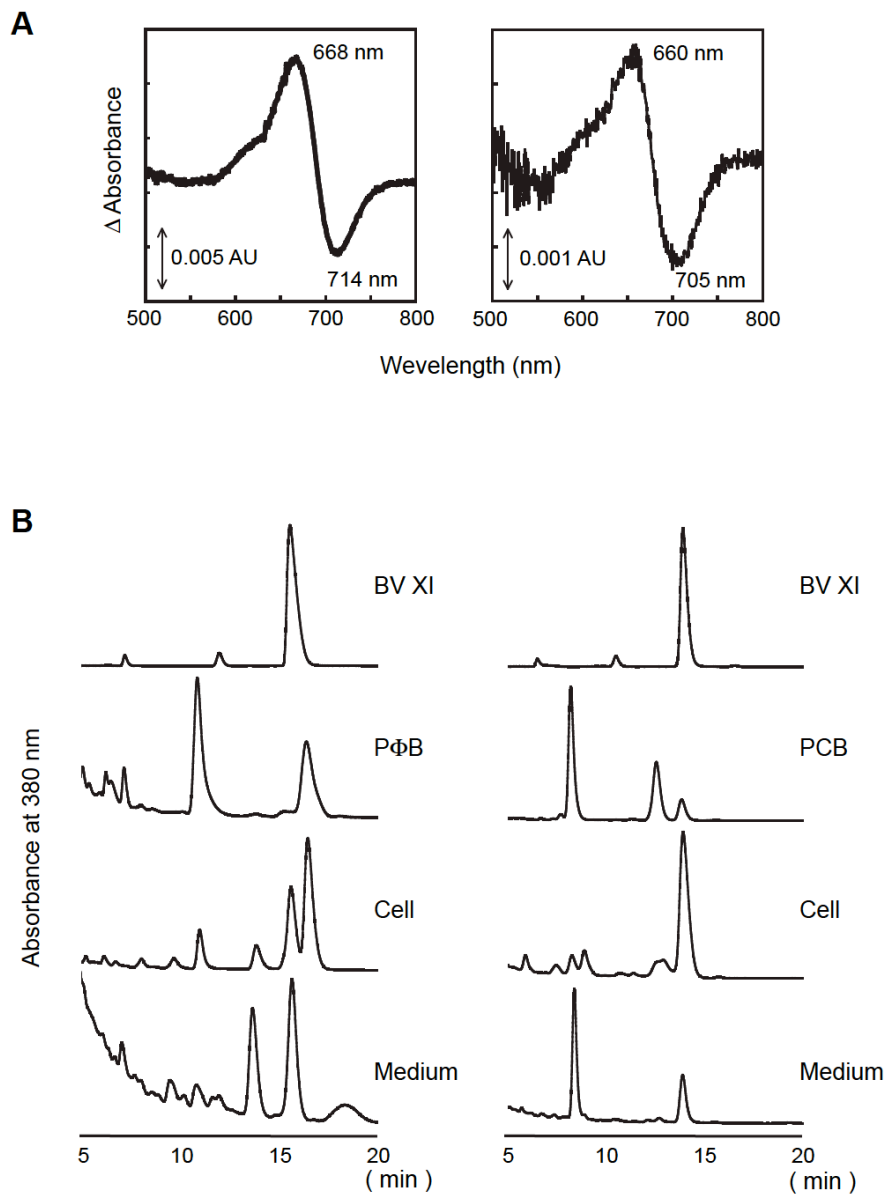


Fig. 2-1 大腸菌で生合成された PΦB、PCB の確認

A. PΦB、あるいは PCB の生合成酵素をコードする遺伝子を導入した大腸菌の粗抽出液と組換え Cph1 の粗抽出液を混合して測定した差スペクトル
 グラフ内の数値は吸収極大と極小の波長を示す。左;pKT218 (PΦB 合成用)、右;pKT211 (PCB 合成用)

B. PΦB、あるいは PCB の生合成酵素をコードする遺伝子を導入した大腸菌から精製したピリン化合物の HPLC による解析

BV IX は市販品を用いた。PΦB は組換え HY2、PCB は組換え PcyA を使い、*in vitro* で BV IX を基質として合成した。Cell は菌体の抽出液から精製した化合物であり、Medium は大腸菌培養後の培地から精製した化合物を示す。左;pKT218 (PΦB 合成用)、右;pKT211 (PCB 合成用)

フィトクロム発現系の構築

大腸菌で PΦB、PCB を合成することができたので、光受容能をもつフィトクロムを大腸菌内で合成するために、植物のフィトクロムとの共発現系を構築した。phyB の N 末端領域が光シグナルの発信には重要であることが報告されている (Matsushita et al., 2003)。そこで、まず、フィトクロムタンパク質が可溶化しやすいことを期待し、PHYA、および PHYB の N 末端領域のみを用いて、フィトクロム発現系を構築した。また、フィトクロムタンパク質発現用のコンストラクトは、pMB1 ori を持つため、プラスミドの不和合性を考慮して、PΦB、PCB 生合成用のコンストラクトは p15A ori を持つコンストラクトへ改良した。pKT306 (PHYA (N617) 発現用)、あるいは pKT307 (PHYB (N651) 発現用) と pKT271 (PCB 合成用)、あるいは pKT272 (PΦB 合成用) の組み合わせで検討を行った。その結果、全ての菌体が緑色を呈し (Fig. 2-2, A)、Zinc Blot 解析によって、4 種類全ての菌体内で、発色団を有するフィトクロムが合成されていることが確認された (Fig. 2-2, B)。さらに、差スペクトルを測定したところ、それぞれ次のような吸収極大、極小を示した (Fig. 2-2, C, Table 2-1)。PΦB-phyA (N617) ; max 662 nm, min 728 nm、PCB-phyA (N617) ; max 652 nm, min 717 nm、PΦB-phyB (N651) ; max 662 nm, min 724 nm、PCB-phyB (N651) ; max 650 nm, min 715 nm。よって、本発現系によって目的の組換えフィトクロムが合成されたことが明らかになった。また、1 L 培養した大腸菌から精製した場合の精製量の平均値は、PΦB-phyA (N617) ; 1.8 mg、PCB-phyA (N617) ; 1.8 mg、PΦB-phyB (N651) ; 3.3 mg、PCB-phyB (N651) ; 2.6 mg と算出された (Table 2-1)。しかしながら、Intein-CBD Tag をカラム内で切断した後に、Tag が切断されたフィトクロムを溶出することで精製を行っているが、切断効率が低く、カラム内に未切断のフィトクロムが多く残っていた。よって、大腸菌内での発現量は上記の精製量よりも多いと考えられた。また、His Tag を用いた発現系も構築したが、可溶性として発現するアポタンパク質は非常に微量であった (Data not shown)。よって、intein-CBD Tag がタンパク質の可溶化に有効であることが示唆された。

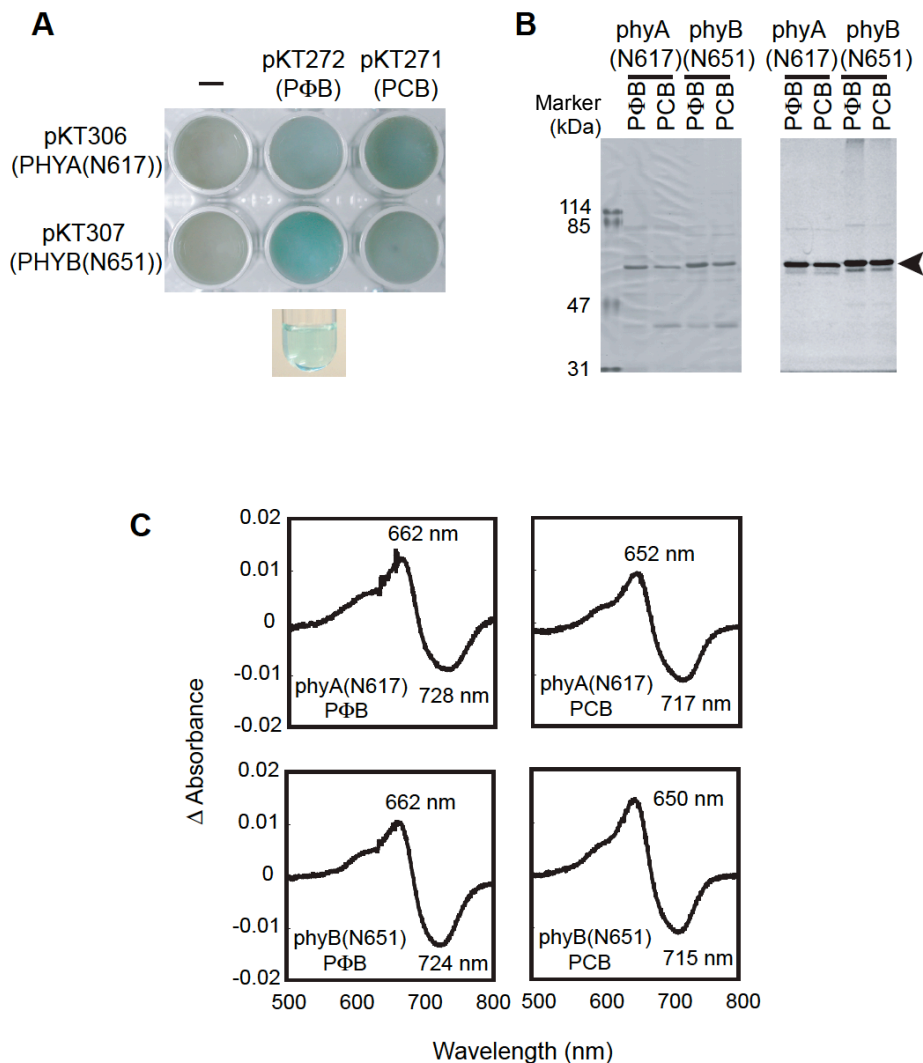


Fig. 2-2 大腸菌で生合成された組換えフィトクロムの確認

- A. 発現を誘導した大腸菌の色(上段)と pKT307/pKT272 形質転換大腸菌からアフィニティー精製したフィトクロムタンパク質溶液の色(下段)
 上段はマイクロウェルプレートに回収した菌体である。フィトクロムタンパク質溶液の濃度は約 0.5 mg/ml である。
- B. アフィニティー精製したフィトクロムタンパク質の CBB 染色(左)と Zinc-Blot 解析(右)
 2 μg/lane のタンパク質を 10 % SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離した。
- C. アフィニティー精製したフィトクロムタンパク質の差スペクトル

組換えフィトクロム発現系の評価

これまでに共発現系で PCB とアポ Cph1 (N514) を合成すると組換えフィトクロムの発現量がアポタンパク質のみの場合に比べ、10 倍に上昇するとの報告があり (Gambetta and Lagarias, 2001)、発色団を有するフィトクロムは大腸菌内でアポフィトクロムよりも可溶化しやすいことが期待された。そこで、本発現

系における PHYB (N651) と phyB (N651) の発現量を比較した。共発現系を用いることで phyB (N651) の総発現量は増加したものの、増加した分は不溶性画分に存在し、可溶性タンパク質は増加しなかった (Fig. 2-3, A)。

大腸菌内で光受容能をもつフィトクロムを合成できても、組換えフィトクロムの発色団保有率によって、発現系の有効性は左右される。これまでに、植物から精製したフィトクロムを用いた研究から、ホロフィトクロムはタンパク質の吸収を示す 280 nm の吸光度と Pr 型のフィトクロムの吸収極大波長である 660 nm 付近の吸光度の比 (specific absorbance ratio; SAR) がほぼ 1 になることが明らかになっており (Nakazawa et al., 1990)、SAR はホロフィトクロムの純度の目安とされている。そこで、発色団を有するフィトクロムの割合を明らかにするために、ゲルろ過クロマトグラフィーで精製した組換えフィトクロムを用いて SAR の測定を行った。その結果、PΦB-phyB (N651) の SAR は 0.96、PCB-phyB (N651) は 1.05 であった (Fig. 2-3, B, Table 2-1)。よって、本発現系で合成した phyB (N651) は、ほぼ 100 % 発色団を有するフィトクロムであることが明らかとなった。また、精製 phyB (N651) にさらに PCB が結合するかも調べた。その結果、PCB を添加しても、SAR は、PΦB-phyB (N651) では 0.98、PCB-phyB (N651) では 1.03 であり、さらなる PCB の付加は認められなかった (Fig. 2-3, C, Table 2-1)。このことから本発現系で合成した phyB (N651) が発色団を有するフィトクロムであることが裏付けられた。

Table 2-1 大腸菌から精製したフィトクロムの吸収波長と精製量、SAR 値の比較

Sample	adduct	$\lambda\Delta A_{\max}$ (nm)	$\lambda\Delta A_{\min}$ (nm)	yield* (mg)	SAR**	
					-PCB	+PCB
phyA (N617)	PΦB	662	728	1.8	ND	ND
phyA (N617)	PCB	652	717	1.8	ND	ND
phyB (N651)	PΦB	662	724	3.3	0.96	0.98
phyB (N651)	PCB	650	715	2.6	1.05	1.03

精製量は、1 L の培地で培養した菌体からアフィニティー精製した場合に回収されるタンパク質量の計算値を示す。実験は 200~1,000 ml の培地で培養した大腸菌を用い、3 回以上の実験結果の平均値から計算した。

SAR は、タンパク質の吸収を示す 280 nm の吸光度と Pr 型のフィトクロムの 650~660 nm の吸光度の比を示す。+PCB は、アフィニティー精製した光受容能をもつフィトクロムに PCB を添加して反応させた後にゲルろ過クロマトグラフィー精製したタンパク質の SAR 測定値を示す。ND は未測定

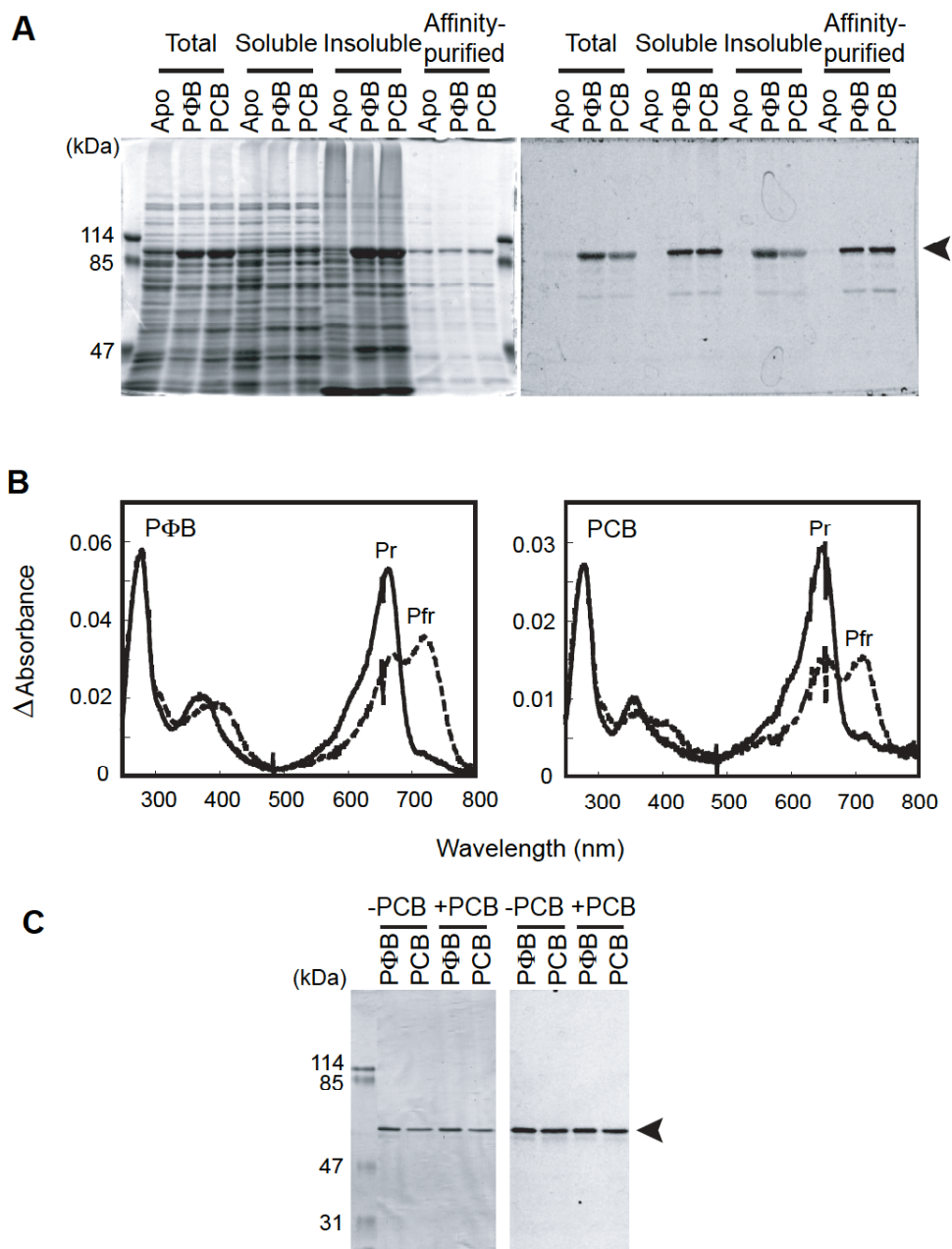


Fig. 2-3 大腸菌で生合成された phyB (N651) の評価

A. phyB (N651) の分離画分の CBB 染色(左)と Zinc-Blot 解析(右)

可溶性画分は約 10 μg/lane で泳動した。精製画分は、Tag の切断と溶出を行わず、Chitin Beads ごと泳動した。泳動には 7.5 % SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた。

B. ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した phyB (N651) の吸収スペクトル

左は PΦB-phyB (N651)、右は PCB-phyB (N651)、実線は FR 照射後、点線は R 照射後の吸収スペクトルを示す。

C. ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した phyB (N651) の CBB 染色(左)と Zinc-Blot 解析(右)

10 % SDS-ポリアクリルアミドゲルで 1 μg/lane のタンパク質を分離した。+PCB はアフィニティ精製後のタンパク質溶液に PCB を添加して反応させた後、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製したタンパク質である。

全長 phyB 発現系の構築

フィトクロムの N 末端領域を用いた実験から Intein-CBD Tag がフィトクロムの可溶化に有効であることが明らかになったため、次に全長フィトクロムの発現系を検討した。まず、全長 PHYB が大腸菌内で発現していることを確認するために PHYB 抗体によるウエスタンブロット解析を行った。その結果、可溶性画分にも全長 PHYB が検出できた。また、全長を用いた場合には、phyB (N651) の結果とは異なり、アポタンパク質のみ発現させた場合よりも、PΦB、PCB 合成酵素を共発現させた方が可溶性タンパク質の量は増加した (Fig. 2-4, A)。次に、Zinc-Blot 解析を行い、共発現系で合成した phyB に PΦB、あるいは PCB が結合していることを確認した (Fig. 2-4, B)。全長 phyB は発現量が低く、粗抽出液を用いた Zinc-Blot 解析では検出できなかったため、chitin beads を用いてタンパク質を精製したが、全長よりも短いタンパク質が混在していた。得られた phyB に結合しているピリン化合物が PΦB であるか PCB であるかを確認するため、粗抽出液を用いて差スペクトルの測定を行った。その結果、PΦB 合成用の酵素と共発現させた phyB の吸収極大は 662 nm と 724 nm であり、PΦB を発色団として有することが確認された。同様に PCB 合成用の酵素と共発現させた場合は、647 nm と 714 nm であり PCB が結合していることが確認された (Fig. 2-4, C)。

phyB は暗所において、Pfr 型から Pr 型へと自然に構造変化する。この反応は、暗反転と呼ばれ、生体内でシグナル伝達量を調節する機構の一つである (Kami et al., in preparation)。phyB (N651) を用いた実験により、暗所静置 2 時間後に Pfr 型の量が PΦB-phyB (N651) では 20 %にまで減少するのに対し、PCB-phyB (N651) では 80 %までの減少に留まり、発色団の違いで暗反転速度が異なることが明らかになっている (小林, 2005)。そこで、暗反転速度を指標にし、phyB (N651) と全長 phyB の分子の性質を比較した。全長 phyB を用いた測定結果では、Pfr 型の量が PΦB-phyB では 20 %に、PCB-phyB では 70 %にまで減少した (Fig. 2-4, D)。この結果は、phyB (N651) とほぼ一致しており、暗反転速度に関しては、phyB (N651) と全長 phyB で分光学的性質の違いがないことが明らかになった。

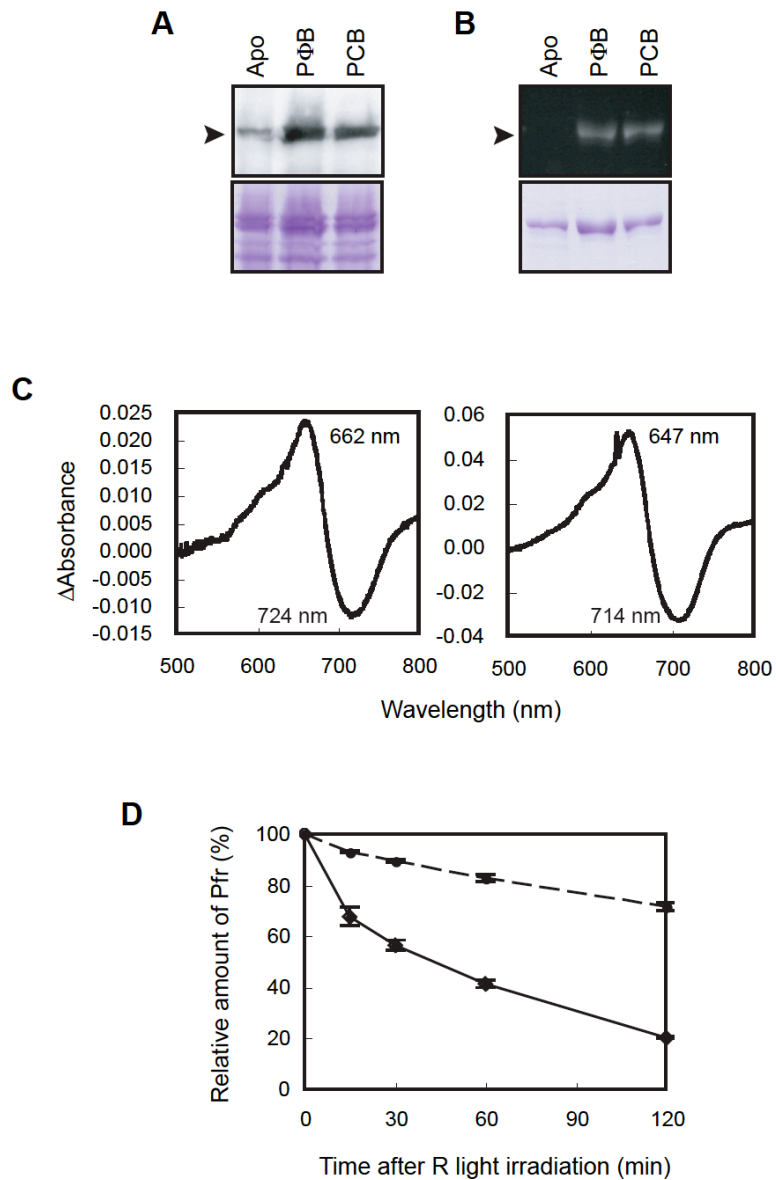


Fig. 2-4 大腸菌で合成した全長 phyB の評価

A. 大腸菌の粗抽出液を用いた phyB 抗体によるウエスタンブロット解析(上段)と CBB 染色(下段)

可溶性画分の粗抽出タンパク質を 8 μg/lane、7.5 % SDS-ポリアクリルアミドゲルにより泳動した。

B. アフィニティー精製した全長 phyB の Zinc-blot 解析(上段)と CBB 染色(下段)

Tag を切断せず、Chitin Beads ごと 7.5 % SDS-ポリアクリルアミドゲルに泳動した。Zinc Blot 解析のシグナルの検出には UV illuminator を用いた。

C. 硫酸アンモニウム沈殿により粗精製した全長 phyB の差スペクトル
左;PΦB、右;PCB

D. 硫酸アンモニウム沈殿により粗精製した全長 phyB の暗反転速度
実線;PΦB、点線;PCB、n≧3

考察

光受容能をもつフィトクロム発現系の構築

これまでに、フィトクロムアポタンパク質の発現系には酵母が用いられてきた (Wahleithner et al, 1991., Deforce et al, 1991)。しかし、発現量は少なく、培養やタンパク質の抽出には労力がかかった。また、発色団の付与には、藍藻から抽出した PCB が用いられてきた。よって、植物本来の発色団でないことに加え、PCB を用いたホロフィトクロムの合成は時間のかかる作業であった。本発現系の構築は、大腸菌を培養し発現誘導を行うだけで PΦB を合成できる点と簡単に光受容能をもつフィトクロムを合成できる点で非常に優れていると考えられた。PCB-Cph1 を合成する発現系はすでに報告されていたものの、PΦB を合成できたことで、初めて PCB と PΦB の性質の比較することが可能になった。PΦB と PCB は D 環の側鎖がビニル基であるか、エチル基であるかしか異なる化合物であるため、PCB は PΦB の代替物として用いられてきた。しかしながら、本研究から発色団の違いにより、Pfr 型の phyB の安定性が異なることが明らかになった。今後、両者の性質の違いを詳しく調べることによって光シグナル発信の分子機構を探ることができるかもしれない。また、アポフィトクロムの分子種別に光受容能をもつフィトクロムを合成できるため、物理化学的な解析を行うことで、フィトクロム分子の性質の違いを明らかにすることにも有効であると期待される。

本研究では、フィトクロム発現系において His Tag の検討も行ったが、可溶性画分における発現量は微量であった。また、N 末端領域だけでなく、全長も可溶性画分に発現させることができたことから、intein-CBD Tag がフィトクロムの可溶化に役立っていると考えられた。この Tag は DTT で切断できるとされているが、切断の効率は低かった。よって、今後、他の Tag を検討することで精製後の回収率が高くなることが期待される。

全長 phyB は、phyB (N651) に比べ、発現量は非常に低く、量的な観点からは酵母の発現系と大差がないと考えられた。また、アフィニティー精製のみでは共雑タンパク質が多く混合していた。よって、純度の高い全長 phyB を得るためには、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの精製を組み合わせることが必要であると考えられる。フィトクロムは、未だ立体構造が明らかになっていない。量の問題はあるものの、PΦB を結合した全長フィトクロムが合成できたこ

とにより、立体構造解析等への道も開けたと期待される。

大腸菌内での発色団生合成酵素の活性

大腸菌で Ho1 と mHY2 を共発現させることにより、大腸菌内のヘムから PΦB が合成された。第一章で明らかになったように、HY2、PcyA は HO 同様に、光化学反応によって獲得した電子を受容した還元型のフェレドキシンに依存して機能する酵素である。よって、大腸菌で発現させた HO や HY2、PcyA は、大腸菌内で植物型フェレドキシンの代わりに何かの電子伝達タンパク質を利用し、それぞれの反応を触媒できたと考えられる。大腸菌は植物と同じ [2Fe-2S] 型のフェレドキシンを有していることが明らかになっているが、大腸菌フェレドキシンはアミノ酸配列や立体構造から、植物型フェレドキシンとは異なるアドレノドキシン/プチダレドキシンファミリーに属することが報告されている (Kakuta et al., 2001)。近年、Frankenberg と Lagarias により、*Anabaena* の PcyA の酵素学的解析が行われ、フェレドキシン依存性に関して報告されている。それによると、PcyA はプチダレドキシン、および [4Fe-4S] 型フェレドキシンを触媒反応に用いることができないが、フラビントタンパク質であるフラボドキシンは利用することができる (Frankenberg and Lagarias, 2003)。これらの結果と大腸菌がフラボドキシンを有していることから、彼らは、PcyA は、大腸菌内でフラボドキシンの還元力を利用していると推測している。HO や HY2 ではこのような解析は行われていないが、フェレドキシン依存性に対し、PcyA と同じ性質を有するならば、同様にフラボドキシンを利用している可能性が推測された。

大腸菌におけるフィコエリスロブリン (PEB) の合成は低速回転の培養が適していることが金本により示されていた。そこで、PCB や PΦB でも低速回転での菌体の培養法を検討したが、PEB とは異なり、一般的な培養速度で合成できた。また、温度に関して、37°Cでは HY2 タンパク質が不溶化しやすいため、低温での培養を試したが、16°Cよりも 25°C以上の方が PΦB 生合成大腸菌の色が濃くなった。HY1 は、酵素学的な解析から、16°Cに比べ、37°Cでは相対活性が3倍程度高い (Muramoto et al., 2002)。HY2 や PcyA の最適温度は明らかになっていないが、低温での培養は可溶性画分における発現タンパク質量が増加しても、酵素活性が低くなるため、PCB、PΦB の合成には 25°C〜37°Cが適していると考えられた。HO や HY2 を発現させた大腸菌の粗抽出タンパク質を SDS-

PAGE 法で展開しても、バンドで確認できるほどは発現しておらず、大腸菌における **PΦB** の生合成は、基質の供給量ではなく、酵素の発現量や活性の低さが制限となっていると推測された。

発現系の評価

フィトクロムの N 末端領域だけを発現させた場合でも、**Cph1** の発現系に比べると発現量は少なかった。アポ **Cph1** (N514) と **Ho**、**PcyA** を共発現系させると、**PCB-Cph1** (N514) の回収効率が約 10 倍に上昇することが報告されている (Gambetta and Lagarias, 2001)。しかし、**phyB** (N651) では不溶性画分でのみ増加が見られ、Zinc blot 解析から、不溶性画分は、**phyB** (N651) に比べ、**PHYB** (N651) の割合が高いことが示唆された。これは、アポフィトクロムが不溶化することによって、リアーゼ活性を失い、**PΦB**、あるいは **PCB** を結合できないためであると推測された。**PCB** を過剰に添加した *in vitro* の反応では、数秒のうちにホロフィトクロムが形成されることが **Cph1** で明らかになっている (Lamparter et al., 1997)。よって、不溶化したアポタンパク質が多く存在することは、**PCB**、**PΦB** の不足を意味しており、そのために可溶化したフィトクロム量が上がらなかった可能性も考えられる。前述の通り、**PCB**、**PΦB** の合成には 25°C 以上の培養条件が望ましいが、共発現系ではフィトクロムを可溶化するために 18°C で培養しており、**Ho1** や **HY2** の活性が低かったことが一因であると推測された。また、**PCB-Cph1** (N514) の発現系では、先に **Ho1**、**PcyA** の発現を IPTG で誘導して、**PCB** が合成された後に、**arabinose** でアポ **Cph1** の発現を誘導しており、この発現誘導の時間差が **PCB-Cph1** (N514) 発現量の上昇に有効であったのかもしれない。アポタンパク質の性質の問題であるかもしれないが、本発現系でもプロモーターを検討する価値はあると考えられた。

PCB、**PΦB** の合成量が光受容能をもつフィトクロム合成の律速になっていると考えられたが、合成した精製フィトクロムは、ほぼ 100 % 発色団を有するフィトクロムであることが明らかになった。これは、アポタンパク質は不溶化し、**PCB**、**PΦB** とすみやかに結合したフィトクロムタンパク質だけが可溶化できるためだと考えられた。本研究では、暗反転速度の測定や相互作用因子と結合実験 (第三章) に用いたが、発色団の保有率が 100 % に近かったことにより、分子レベルでの様々な解析に有効であると期待できる。

暗反転

phyB は、R を受容すると活性型である Pfr 型となるが、これを暗所に移すと不活性型である Pr 型に戻ることが知られている。この応答は暗反転と呼ばれるが、生理的な意義は明らかになっていなかった。

これまでに植物体内で PΦB を PCB に置換した発色団改変植物体 (PCYA1) が作出され、その生理応答解析が行われてきた (Kami et al., 2004)。その後の研究から、長日条件下で生育させた PCYA1 植物体の芽生えは、野生型よりも胚軸が短くなることが明らかにされた。しかしながら、胚軸が短くなる表現型は、明期の終わりに FR を照射することにより抑制され、PCYA1 の胚軸長は野生型と長さに差がなくなることが明らかにされた。これらの結果から、野生型では暗期で phyB は不活性型になっているのに対し、PCYA1 では暗期の間も phyB が活性型のままで胚軸伸長抑制のシグナルが伝達されていること、また明期の終わりに FR を照射すると、phyB が不活性型になり、胚軸伸長抑制のシグナル伝達が停止することが考えられた (Kami et al., in preparation)。そこで、PCB-phyB が暗期で活性型である Pfr 型を保つという仮説を分子レベルで検証するために、本発現系で合成した組換えフィトクロムを用いて、暗反転速度の測定を行った。その結果、PCB-phyB は PΦB-phyB よりも暗反転速度が遅いことが明らかとなり、この仮説を指示する結果が得られた。よって、phyB に特徴的な暗反転は、環境の変化に対応するための重要なシグナル調節機構であることが示唆された。

暗反転に関しては、これまでの研究から、いくつかの知見がある。2004 年には Oka らにより、PCB を結合した全長 AtphyB の Pfr 型は、暗反転によって 2 時間で 80 %まで減少することが報告されており (Oka et al., 2004)、本研究の結果とほぼ一致した。また、暗反転により PΦB-phyB (N651) は 2 時間で 20 %、PCB-phyB (N651) は 80 %まで Pfr 型が減少し (小林、2005)、全長 phyB の結果とほぼ一致した。今回、全長の PCB-phyB では 70 %と Oka らの報告や phyB (N651) の 80 %に比べてやや低いですが、これはサンプルや測定による誤差範囲であると考えられる。また、Cph1 は 12 時間で、PΦB では 65 %、PCB では 30 %まで暗反転することが報告されており (Yeh et al., 1997)、AtphyB と同様の傾向が見られる。一方、再構成したポテトの全長 phyB では、*in vitro* における暗反転は、PΦB でも PCB でも差がなく、2 時間で 80 %までの減少にとどまることが報告されており (Ruddat et al., 1997)、AtphyB とは異なっている。本研究から、発色団の D 環側鎖の二重結合の有無は、フィトクロムタンパク質の性質を変えるには十

分な違いであることが示唆されたが、シロイヌナズナの場合とは異なり、ポテトの phyB の場合のように、フィトクロムのアミノ酸配列によっては、D 環側鎖の影響を受けないタンパク質構造になると推測された。アブラナ科に属するシロイヌナズナは phyB を 1 種しか持たないが、ナス科に属するポテトやトマトは phyB1 と phyB2 の分子種を有する。よって、シロイヌナズナでは、暗反転は光環境の変化にすばやく適応するための重要な分子機構であると考えられるが、ポテトやトマトには分子種で役割を変えるような異なった調節機構が存在するのかもしれない。

本章では、大腸菌において光受容能を有する組換えフィトクロムの発現系を構築した。本研究の PΦB、PCB 生合成酵素の発現系は、PixJ などの藍藻のフィトクロム様タンパク質の再構築にも用いられており、今後も利用されることが期待できる。一方で、全長のフィトクロムの発現量が少ないことは、今後の改善すべき課題である。フィトクロムのシグナル伝達が N 末端領域から行われていても、二量体化も重要であるため、植物本来の全長のホロフィトクロムを効率よく合成する系が必要であると考えられる。タグの検討やプロモーターの検討に加え、近年では、シャペロンを共発現させる様々なプラスミドも利用可能なため、そのようなシステムも検討すべきであると考えられる。

第三章 フィトクロム相互作用因子の単離とその機能解析

序論

近年、フィトクロムの光シグナル伝達経路の解明に向けて、様々な研究が行われてきた。フィトクロムの下流で機能する因子はもちろん、フィトクロムと直接相互作用する因子の単離が盛んに行われてきた。1998年に、青色光受容体のCRY1とphyAの相互作用 (Ahmad et al., 1998)、スクリーニングによる相互作用因子PIF3の単離 (Ni et al., 1998) が報告され、現在までに、シロイヌナズナの研究から少なくとも14の因子がフィトクロムと相互作用することが報告されている: NDPK2 (Choi et al., 1999)、PKS1 (Fankhauser et al., 1999)、Aux/IAA (Colon-Carmona et al., 2000)、cry2 (Mas et al., 2000)、AOD1/ZTL/LKP1 (Jarillo et al., 2001)、ARR4 (Sweere et al., 2001)、ELF3 (Liu et al., 2001)、PIF4 (Huq et al., 2002)、PIF1 (Huq et al., 2004)、PIF5, PIF6 (Khanna et al., 2004)、PAPP5 (Ryu et al., 2005)。しかし、単離された因子は多種多様である。上記の相互作用タンパク質には、phyAのみ、phyBのみ、phyA、phyBの両方に結合する因子があり、相互作用する部位の細胞内局在からみると、核のみ、細胞質のみ、核と細胞質の両方がある。さらに機能の点からみると、PIFに代表される転写因子、PKS1のようなフィトクロムのタンパク質キナーゼ活性に対する基質タンパク質、PAPP5のようなフィトクロムを脱リン酸化する因子がある。更に、cry1、cry2は青色光受容体、ARR4は構造的にはレスポンスレギュレーターでフィトクロムの安定化に関わる因子であるとされている。このことは、いかにフィトクロムの光シグナル伝達経路が複雑であることを示しており、フィトクロムが発見されてから半世紀が経過した現在でも、フィトクロムを介する光生理応答制御機構の統一的な理解にはほど遠い状況にある。

このように、多様な相互作用因子が単離同定されてきたが、近年では、相互作用研究の前提ともいえるフィトクロム機能ドメインの定説が覆されている。一つは、シロイヌナズナphyBの研究から、単にPΦBを結合する光受容部位として考えられていたフィトクロムのN末端領域から細胞内シグナルが発信されていることが明らかになったことである (Matsushita et al., 2003)。これまでは、フィトクロムのC末端領域がシグナルを伝達していると考えられていたため、多くの相互作用因子はC末端領域との結合能によって判断されてきた。よって、

シグナル伝達に重要と推測される N 末端領域に結合する因子が見逃されてきたと考えられる。もう一つは、PIF3 の知見である。PIF3 は、PHYB の C 末端領域を用いた酵母 Two hybrid (Y2H) スクリーニングによって単離された basic helix-loop-helix (bHLH) を有する転写因子である。様々な研究からフィトクロムの C 末端領域にある PAS ドメインを介して、核内で Pfr 型の phyB に結合すると考えられた。PIF3 は、光質依存的に下流の遺伝子の転写を活性化し、光シグナルを正に制御するというモデルが提唱された。しかし、その後、PIF3 がフィトクロムの N 末端領域にも結合すること (Zhu et al., 2000)、PIF3 が phyB の抑制因子であること (Kim et al., 2003)、PIF3 の分解がシグナル伝達を調節していること (Bauer et al., 2004) などが次々と報告され、提唱されたモデルが間違えていることが明らかになってきた。PIF はファミリーを形成し、複数の因子が相互作用することから、主要な相互作用因子だと考えられてきたが、現在では他に重要な因子が存在すると考えられるようになった。

これらの理由から、フィトクロムの光シグナル伝達経路の解明には、新規相互作用因子の単離が重要であると考えられたが、その取り組みには、さらに改善点があると考えられた。これまでに、フィトクロムからの情報発信によって引き起こされる生理応答の解析も進められ、特に、種子発芽、胚軸伸長抑制、緑化(脱黄化)は、光条件等まで詳細に解析されている。生長初期の応答は、表現型が顕著で解析しやすいことから、単離した相互作用因子の評価によく利用されてきた。フィトクロムは、植物の生涯を通して機能しているため、生長後期の応答に関わる因子も存在するはずであるが、上述の相互作用因子で生長後期の応答への関与が明らかなものはほとんどない。よって、初期の生長に注目したこれまでの探索方法では、見つからない相互作用因子が存在すると考えられた。

以上の理由から、本研究では、フィトクロムの光シグナル発信の分子機構の解明に向けて、新規相互作用因子の単離とその機能解析を行うことを目的とした。フィトクロム全長を用いてスクリーニングを行うこと、抽台直後の植物から作製したライブラリーを用いることを改善点として、Y2H 法によってスクリーニングを行った。これにより、新規相互作用因子の候補として VOZ1 および VOZ2 を単離した。さらに、VOZ 遺伝子の生理的な役割を解析した結果、VOZ は光周期依存的なシグナル伝達経路で花成を促進することが明らかになり、花成促進因子としても新規の因子であった。

方法

Y2H スクリーニング

河内博士により pGBKT7 ベクター (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) のクローニング部位内の *Nde* I site を破壊し、GAL Binding domain (GBD) の開始コドンに対応する部分に *Nde* I site を挿入したベクターが作製された。以下、このベクターを pGBKT7 (M) と表す。

第二章で作製した PHY-pBC プラスミドから *Nde* I site によりフィトクロム断片を切り出し、pGBKT7 (M) の *Nde* I site に挿入した。これを、フィトクロムの C 末端領域に GBD が付加される Bait のコンストラクトとした。

Bait のプラスミドを酵母の形質転換キット (Frozen-EZ Yeast Transformation II, ZYMO RESEARCH, Orange, CA, USA) を用いて酵母 AH109 に導入し、さらに Prey となる cDNA ライブラリープラスミドを同様の方法で導入した。cDNA ライブラリープラスミドは、Col の抽台直後の地上部由来の cDNA を pADGAL4 ベクターに挿入したものを竹村博士 (現、石川県立大学) より分与して頂いた。この形質転換酵母を選択培地上で、30°C で 1 週間程度培養した。選択培地は、Bait が PHYA の場合は、SD (トリプトファン (Trp)、ロイシン (Leu)、ヒスチジン (His) 除去) 培地を用い、PHYB の場合は、SD (-Trp, Leu, His) + 1 mM 3-amino 1,2,4-triazol (3-AT) 培地を用いた。

単離されたコロニーから酵母のプラスミド抽出キット (Zymoprep yeast plasmid Miniprep Kit, Zymo Research) を用いてプラスミドを抽出し、大腸菌 DH5 α に導入した。50 μ g/ml アンピシリンを含む LB 寒天培地で生育したコロニーを単離、培養し、プラスミド抽出キット (QIAGEN Mini Prep Kit) を用いてプラスミドを抽出した。シーケンス解析によって塩基配列を決定し、遺伝子を同定した。シーケンス反応に用いたプライマー配列は、pGADF : 5'-TACCACTACAATGGATG-3' である。

候補遺伝子の単離

TCP 遺伝子は、Col 由来の mRNA から逆転写酵素 Rever Tra Ace- α (TOYOBO) と Oligo (dT) 20 プライマー (TOYOBO) を用いて RT-PCR を行い、逆転写産物を鋳型として KOD DNA polymerase により PCR でコーディング領域を増幅した。プライマーに付加した制限酵素サイトを用いて、pGADT7 (Clontech Laboratories,

Inc.) に挿入し、塩基配列の確認を行った。プライマー配列は下記の通りである。

TCP3 (At1g53230)

F : 5'-GGAATTCCATATGGCACCAGATAACGAC-3' (下線部は *Nde* I site)

R : 5'-CCATCGATTTAATGGCGAGAATCGG-3' (下線部は *Cla* I site)

TCP7 (At5g23280)

F : 5'-GGAATTCATGTCTATTAACAACAACAAC-3' (下線部は *Eco* RI site)

R : 5'-CCGCTCGAGTTAACGTGGATCTTCCTCTC-3' (下線部は *Xho* I site)

TCP8 (At1g58100)

F : 5'-GGAATTCATGGATCTCTCCGACATC-3' (下線部は *Eco* RI site)

R : 5'-CCGCTCGAGTCACTCAGAGCTATTTGAGTTC-3' (下線部は *Xho* I site)

TCP10 (At2g31070)

F : 5'-GGAATTCATGGGACTTAAAGGATATAGCG-3' (下線部は *Eco* RI site)

R : 5'-CCGCTCGAGTTAGAGGTGTGAGTTTGGAG-3' (下線部は *Xho* I site)

TCP13 (At3g02150)

F : 5'-GGAATTCATGAATATCGTCTCTTGAAAG-3' (下線部は *Eco* RI site)

R : 5'-CCGCTCGAGCTACATTTGCCTCGGATC-3' (下線部は *Xho* I site)

TCP14 (At3g47620)

F : 5'-GGAATTCATGCAAAAGCCAACATC-3' (下線部は *Eco* RI site)

R : 5'-CCGCTCGAGCTAATCTTGCTGATCCTCCTC-3' (下線部は *Xho* I site)

TCP15 (At1g69690)

F : 5'-GGAATTCATGGATCCGGATCCG-3' (下線部は *Eco* RI site)

R : 5'-CCGCTCGAGCTAGGAATGATGACTGGTGC-3' (下線部は *Xho* I site)

TCP20 (At3g27010)

F : 5'-TCCCCCGGGAATGGATCCCAAGAACCTAAA-3' (下線部は *Xma* I site)

R : 5'-TCCGAGCTCTTAACGACCTGAGCCTTG-3' (下線部は *Sac* I site)

TCP21 (At5g08330)

F : 5'-GGAATTCCATATGGCCGACAACGAC-3' (下線部は *Nde* I site)

R : 5'-CCATCGATTCAACGTGGTTCGTGG-3' (下線部は *Cla* I site)

TCP22 (At1g72010)

F : 5'-TCCCCCGGGAATGAATCAGAATTCCTCTGTTG-3' (下線部は *Xma* I site)

R : 5'-TCCGAGCTCTCACTTTTTGTCATCACCAC-3' (下線部は *Sac*I site)

VOZ 遺伝子は、Y2H スクリーニングで単離された遺伝子に全長が含まれていたため、これを鋳型とし、KOD DNA polymerase を用いて PCR によりコーディング領域を増幅した。プライマーに付加した制限酵素サイトを用いて、pGADT7 に挿入し、塩基配列の確認を行った。用いたプライマー配列は下記の通りである。

VOZI (At1g28520)

F : 5'-GGAATTCCATATGACGGGGAAGCG-3' (下線部は *Nde* I site)

R : 5'-CCATCGATTCAGGGGATATAATAGTCGC-3' (下線部は *Cla* I site)

VOZ2 (At2g42400)

F : 5'-GGAATTCATGTCAAACCACCCGA-3' (下線部は *Eco* RI site)

R : 5'-CCGCTCGAGTCACTCCTTACGACCTTTG-3' (下線部は *Xho* I site)

ヒスチジン要求性による相互作用の確認

Bait に PHYs-pGBKT7 (M)、Prey には候補遺伝子を挿入した pGADT7 を用いた。Bait と Prey のプラスミドを酵母 AH109 に形質転換し、Y2H 法で選択培地における酵母の生育を調べた。選択培地は、SD (-Trp, Leu, His) と SD (-Trp, Leu, His) + 1 mM 3-AT を用いた。

β -Galactosidase 活性の測定

PHYs-pGBKT7 (M) と候補遺伝子を挿入した pGADT7 を酵母 Y187 に形質転換した。 β -Galactosidase 活性の検出方法は、Clontech 社の「Yeast Protocols Handbook」の「Liquid Culture Assay Using ONPG as Substrate」に従った。

RT-PCR による mRNA の発現解析

回収した組織から RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) により、mRNA を調製した。Rever Tra Ace- α と Oligo (dT) 20 プライマーを用いて、First strand cDNA を合成した。逆転写産物を鋳型として、PCR Master Mix (Promega, Madison, USA) を用い、PCR を行った。

VOZ2 タンパク質のウエスタンブロット解析

液体窒素で凍らせた植物をペッスルで破砕し、抽出バッファー (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 % ethylene glycol (v/v), 2 mM DTT, Protease inhibitor cocktail) 内で

溶解した。遠心分離により得た上清を 10 % SDS-ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE 法により展開した。各レーンには、40 μ g の粗抽出タンパク質を泳動した。タンパク質濃度の定量は Bradford 法で行った。

一次抗体は 5,000 倍希釈で用い、二次抗体には抗 Rabbit IgG 抗体 (PI-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を 5,000 倍希釈で用いた。検出試薬には ECL-plus を用い、LAS-1000、あるいは X 線フィルムにより検出を行った。VOZ2 抗体は、佐藤雅彦博士 (京都府立大学) より分与頂いた。

組換え GST-VOZ 融合タンパク質発現系の構築

スクリーニングで単離された VOZ クローンを鋳型として、VOZ のコーディング領域を KOD DNA polymerase を用いて PCR により増幅した。プライマー配列は下記の通りである。

VOZ1

F : 5'-GGAATTCATGACGGGGAAGCG-3' (下線部は *Eco* RI site)

R : 5'-ACGCGTCGACTCAGGGGATATAATAGTCGC-3' (下線部は *Sal* I site)

VOZ2

F : 5'-GGAATTCATGTCAAACCACCCGA-3' (下線部は *Eco* RI site)

R : 5'-CCGCTCGAGTCACTCCTTACGACCTTTG-3' (下線部は *Xho* I site)

得られた PCR 産物を pGEX-6P-1 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) に挿入し、塩基配列の確認を行った。VOZ1 は *Eco* RI-*Sal* I site、VOZ2 は *Eco* RI-*Xho* I site を使用した。

VOZ の発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換し、50 μ g/ml のアンピシリン含む LB 培地 200ml で培養した。OD₆₀₀ が 0.6 に達したら、終濃度 1mM となるように IPTG を添加し、16°C で 5 時間培養して発現を誘導した。回収した菌体を Lysis buffer (50 mM リン酸バッファー (pH 7.0), 100 mM NaCl, 0.1 % TritonX-100, 1 mM 2-mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail) に懸濁して、氷上で超音波破碎した。遠心分離後の上清を Bed volume 1ml の glutathione sepharose 4B (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) を詰めたカラムに供した。その後、1M NaCl を含む PBS、および PBS で十分に洗浄し、*in vitro* 結合アッセイに用いた。

in vitro 結合アッセイ

1. *in vitro* 転写・翻訳法によるアポフィトクロムの合成と *in vitro* 結合アッセイ

鋳型のプラスミドは次のように作製した。全長アポフィトクロム合成用は、*PHY*-pBC プラスミドから切り出した cDNA 断片を pGBKT7 ベクターの *Nde* I サイトに挿入した。N 末端領域の合成用は、*PHY* cDNA を鋳型とし、KOD DNA polymerase を用いて PCR により増幅した PCR 産物を pGBKT7 の *Nde* I サイトに挿入した。増幅した領域は、第二章同様に *PHYA* N 末端領域の 1-1851 bp (617 アミノ酸残基に相当) と *PHYB* N 末端領域の 1-1953bp (651 アミノ酸残基に相当) である。用いたプライマー配列は下記の通りである。

PHYA

F : *PHYA* 5'F (第二章 方法)

R : 5'-ACTCATATGAGCTTCTAGTTCTTGTATACCATC-3' (下線部は *Nde* I site)

PHYB

F : *PHYB* 5'F (第二章 方法)

R : 5'-TCTCATATGTGCACCTAACTCATCAATC-3' (下線部は *Nde* I site)

これらのプラスミドを鋳型とし、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン存在下で、TNT T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System Kit (Promega, Madison, USA) を用い、*in vitro* 転写・翻訳反応によりアポタンパク質を合成した。

合成したフィトクロムタンパク質 10 μl と GST-VOZ 融合タンパク質を結合した glutathione sepharose 4B 20 μl を混合し、室温で 2 時間振盪しながら反応させた。その後、ミニスピニングカラム (Pierce Biotechnology, inc., Rockford, IL, USA) と小型卓上遠心機を用い、500 μl の PBS で 9 回洗浄した。カラムに 2 \times サンプルバッファーを 20 μl 添加し、75°C で 5 分間加熱した後、遠心分離により溶出した。溶出したサンプルを 10 % SDS-ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE 法により展開して、ゲルを乾燥し、BAS で RI のシグナルを検出した。

2. 組換えフィトクロムを用いた *in vitro* 結合アッセイ

第二章の方法でアフィニティー精製した P Φ B-phyA (N617)、P Φ B-phyB (N651) 35 μg に R、あるいは FR を 5 分間照射した後、GST-VOZ タンパク質を結合した glutathione sepharose 4B 20 μl と混合した。混合後、phyA (N617) を加えたサンプルは暗所で、phyB (N651) を加えたサンプルは光を照射しながら、20°C で 2 時間、振盪しながら反応した。結合の光可逆性を調べる実験では、振盪培養

1 時間後に混合前と異なる光を照射した。phyA (N617) を加えたサンプルは、光を 5 分間照射した後に暗所で、phyB (N651) を加えたサンプルは、光を照射しながらさらに 1 時間の反応を行った。反応の後、ミニスピニングカラムと小型卓上遠心機を用い、500 μ l の PBS で 5 回洗浄した。洗浄後のカラムに 2×サンプルバッファーを 20 μ l 添加し、95°C で 5 分間加熱した後、遠心分離により溶出した。光照射以外の操作は全て暗所で行った。溶出したサンプルを 10 % SDS-ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE 法により展開し、Zinc blot 解析によりフイトクロムを検出した。Zinc blot 解析の方法は第二章に記した。

変異体

本研究では、Col バックグラウンドである以下の変異体を使用した。

- *voz1-1* (GABI_418B02 ; BC₃)
- *voz1-2* (WISCDSLOX489-492O10 ; BC なし)
- *voz2-1* (SALK_021718 ; BC₃)
- *voz2-2* (SALK_115813 ; BC なし)
- *phyA-211*
- *phyB-9*

交配により、以下の多重変異体を作成した。

- *voz1/voz2-1* (*voz1-1* × *voz2-1* ; BC₃)
- *voz1/voz2-2* (*voz1-2* × *voz2-2* ; BC なし)
- *phyA/voz1* (*phyA-211* × *voz1-1*)
- *phyA/voz2* (*phyA-211* × *voz2-1*)
- *phyA/voz1/voz2* (*phyA-211* × *voz1-1* × *voz2-1*)
- *phyB/voz1* (*phyB-9* × *voz1-1*)
- *phyB/voz2* (*phyB-9* × *voz2-1*)
- *phyB/voz1/voz2* (*phyB-9* × *voz1-1* × *voz2-1*)

植物栽培の条件

春化処理後、バーミキュライト、またはロックウールに播種し、22°C の人工気象器で栽培した。長日条件は 16 h L/8 h D、短日条件は 8 h L/16 h D とした。

過剰発現体の作出

過剰発現用のコンストラクトを Col に形質転換した T1 世代の種子プールを佐藤雅彦博士により分与して頂いた。ハイグロマイシン耐性を指標に T1 世代を選抜し、自家受精によりホモ個体を単離した。

胚軸伸長抑制応答

1/10×MS, 0.8 % 寒天培地に滅菌した種子を播種して、FR 蛍光灯を 10 分間照射し、内在性の phyB を不活性化した。2 日間の春化处理の後、白色光を 4 時間照射し、暗所に 40 時間置いて発芽させた。発芽直後に、R-LED、または FR-LED を 5 日間照射しながら栽培し、胚軸の長さを測定した。春化处理後は 22 °C で栽培した。

緑化抑制応答

上記同様に発芽させた後、FR 蛍光灯を 3 日間照射して緑化を抑制した。その後、白色光下で 3 日間生育させ、写真撮影した。

花成時期の測定

長日条件は 16 h L/ 8 h D、短日条件は 8 h L/ 16 h D の明暗周期下、22°C、100 ~150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ の人工気象器で栽培した。抽台までの栽培日数とロゼット葉の枚数を測定し、花成時期の指標とした。

相補性検定

Gateway cloning technology (Invitrogen, Carlsbad, USA) を用いてコンストラクトの作成を行った。Col のゲノムを鋳型とし、VOZ1 の開始コドン上流 3,379 bp から終止コドン直前まで、VOZ2 の開始コドン上流 1,870 bp から終止コドン直前までを PCR により増幅した。用いたプライマーを下記に示す。

VOZ1 F : 5'-AAAAAGCAGGCTTGTGGTAAAAGGCGATCAA-3'

R : 5'-AGAAAGCTGGGTAGGGGATATAATAGTCGCTTAG-3'

VOZ2 F : 5'-AAAAAGCAGGCTATTTTCCAACAGATGATGATC-3'

R : 5'-AGAAAGCTGGGTACTCCTTACGACCTTTGGTTG-3'

さらに、この PCR 産物を鋳型とし、attB1 adapter プライマー (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3') と attB2 adapter プライマー

(5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3') を用いて増幅した。PCR には KOD DNA polymerase を用いた。得られた DNA 断片を BP 反応によって pDONR-221 に挿入し、塩基配列を確認して、エントリークローンとした。エントリークローンから LR 反応によってバイナリーベクター pGWB1 に VOZ のゲノム断片を挿入した。pGWB1 は中川博士 (島根大学) より分与頂いた。PCR の反応条件や BP 反応、LR 反応は Invitrogen 社のプロトコールに従った。A. tumefaciens C58C1Rif^R を用い、減圧浸潤法によって、voz 二重変異体へ導入した。ハイグロマイシン耐性により T1 世代の選抜を行った。

クロロフィル含量の測定

0.126 cm² のリーフパンチで葉をサンプリングし、液体窒素で凍結し、破砕した。1 ml のメタノールを加え、クロロフィルを抽出し、分光光度計で 652 nm、665.2 nm の吸光度を測定した。750 nm の吸光度をバックグラウンドとして差し引き、クロロフィル含量を算出した。計算式は Porra らの方法 (Porra et al., 1989) に従った。

アントシアニン含量の測定

クロロフィル含量測定と同様に葉を破砕し、1 %の塩酸を含む 150 µl のメタノール中で色素を抽出し、100 µl の dH₂O を加え、攪拌した。これに 250 µl のクロロホルムを加え、攪拌し、遠心した。上清を用いて、530 nm と 657 nm の吸光度を分光光度計で測定した。(A530-A657)×1,000 でアントシアニンの量を比較した。Neff and Chory らの方法 (Neff and Chory, 1998) を一部改変し、アントシアニン量の測定を行った。

CONATANS、Flowering locus T の発現解析

播種後、長日条件 (16h L /8 h D) 下で15日間栽培した植物体の地上部を4時間おきに24時間分回収した。回収した組織からRNeasy Plant Mini Kitを用いて、mRNAを調整した。Rever Tra Ace-αとOligo (dT) 20プライマーを用いて、First strand cDNAを合成した。Total RNA 50 ngに相当する逆転写産物を鋳型として、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) の反応系に従い、10 µlの反応系で試料を調製し、ABI 7700 (Applied biosystems, CA, USA) でReal-Time PCRを行った。プライマー配列は次の通りである。

CO F : 5'-GCTCCCACACCATCAAACCTT-3'

CO R : 5'-GTCGTGCCCTGTTGTTCTCT-3'

FT F : 5'-TATGATACGAGTAACGAACGG-3'

FT R : 5'-AACACTCTCATTTTCCTCCC-3'

結果

相互作用因子スクリーニング系の構築

新規フィトクロム相互作用因子を単離するため、Y2H法により、baitに全長のアポフィトクロムを用いて、スクリーニングを行った。一般的に、Y2H法では、GAL Binding Domain (GBD) をBaitとするタンパク質のN末端領域に付加するが、フィトクロムはN末端領域を改変したときには機能的ではないというこれまでの知見を考慮し、C末端領域にGBDを付加した。PHYAをBaitとしたスクリーニングにより、cDNAライブラリーの 1.4×10^6 クローンから130クローンを単離した。このうち、99クローンを塩基配列決定により同定し、機能未知遺伝子7種類を含む64種類の遺伝子を候補として得た。PHYBをBaitとした場合は、cDNAライブラリーの 1.8×10^6 クローンから200クローンを単離して、163クローンを同定し、機能未知遺伝子24種類を含む125種類の候補遺伝子を得た。同定した遺伝子の中に、相互作用因子として報告されているものは含まれていなかったが、PHYAによるスクリーニングで、PHYAが単離された。フィトクロムは二量体を形成することから、本Y2Hスクリーニングは成功していると判断した。PHYA、PHYBのどちらをBaitとした場合でも、単離された遺伝子は類似しており、TCPファミリーに属する数種類の遺伝子とVOZ (Vascular plant One Zinc finger) 遺伝子が複数含まれていた。これらは、全長を含め、比較的長い配列が単離され、ともに転写因子であると推測されていた。よって、光シグナル伝達の制御因子であることが期待されたため、さらに解析を進めた。スクリーニングによって単離された遺伝子をTable 3-1に示す。

Table 3-1 Y2Hスクリーニングによって単離された遺伝子

A

Locus Number	Clone Number	Annotation
Transcription		
At2g42400	10	VOZ2
At1g53230	1	TCP3
At5g23280	1	TCP7
At1g58100	4	TCP8
At2g31070	2	TCP10
At3g47620	5	TCP14
At1g69690	1	TCP15
At5g08330	14	TCP21
At1g72010	1	TCP22
At1g27730	2	salt-tolerance zinc finger protein
At1g75240	1	zinc finger homeobox family protein / ZF-HD homeobox family protein
At1g75560	1	DNA-binding protein
At2g02070	1	C2H2-type zinc finger protein -related
At4g38900	1	bZIP protein
Signal transduction/response		
At1g09570	1	phytochrome A (PHYA)
At2g25440	1	leucine rich repeat protein family
At4g31820	1	phototropic response protein family
Protein transport/sorting		
At1g09070	1	C2 domain-containing protein
At3g59920	2	Rab GDP dissociation inhibitor
Protein synthesis/degradation		
At1g02305	1	cathepsin B-like cysteine protease, putative
At1g74970	1	ribosomal protein S9 -related
At1g75950	1	E3 ubiquitin ligase SCF complex subunit, SKP1/ASK1(At1)
At2g45180	1	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein family
At3g09440	1	heat shock protein hsc70-3 (hsc70.3)
At3g16640	2	translationally controlled tumor protein -related
At4g15000	1	60S ribosomal protein L27 (RPL27C)
At5g06600	1	ubiquitin-specific protease 12 (UBP12)
At5g09900	1	26S proteasome regulatory subunit (RPN5), putative
At5g20890	1	chaperonin, putative
Energy		
At1g12840	1	vacuolar ATP synthase subunit C -related
At1g15820	1	chlorophyll a/b-binding protein Lhcb6
At1g29920	1	photosystem II type I chlorophyll a /b binding protein, putative
At1g30380	1	photosystem I subunit X precursor
At1g79040	1	photosystem II polypeptide -related
At2g30570	1	photosystem II reaction center 6.1KD protein
At3g54890	1	light-harvesting chlorophyll a/b binding protein
At3g61470	2	light-harvesting chlorophyll a/b binding protein
At5g66570	1	photosystem II oxygen-evolving complex 33 (OEC33)
Metabolism		
At1g09420	1	glucose-6-phosphate dehydrogenase -related
At1g67090	1	ribulose-bisphosphate carboxylase small unit -related
At2g27490	1	dephospho-CoA kinase family
At2g36530	2	enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolyase)
At3g15850	1	fatty acid desaturase family protein
At5g14780	1	formate dehydrogenase (FDH)
At5g26000	1	glycosyl hydrolase family 1, myrosinase precursor
At5g38410	1	RuBisCO small subunit 3b
Cytoskeleton		
At5g05170	1	cellulose synthase, catalytic subunit (Ath-B)
Injury/pathogen response		
At3g56800	1	calmodulin
Scavenging reactive oxygen species		
At1g20620	1	catalase 3
At4g35090	1	catalase 2
Unknown		
At1g01320	1	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein
At1g18260	1	suppressor of lin-12-like protein-related / sel-1 protein-related
At5g10860	1	CBS domain containing protein
At5g50900	1	C2 domain-containing protein/armadillo/beta-catenin repeat family protein
At1g01360, At1g21065, At1g22930, At2g46820, At3g15380, At3g15840, At3g24100		
At5g11500, At5g13610, At5g47580		

B

Locus Number	Clone Number	Annotation	Locus Number	Clone Number	Annotation
Transcription			Metabolism		
At1g28520	5	VOZ1	At1g01090	1	pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit
At2g42400	4	VOZ2	At1g02730	1	cellulose synthase family
At1g58100	1	TCP8	At1g05200	1	glutamate receptor family (GLR3.4)
At2g31070	8	TCP10	At1g20620	1	catalase 3
At3g47620	12	TCP14	At1g23820	1	spermidine synthase -related
At3g27010	1	TCP20	At1g27450	1	adenine phosphoribosyltransferase 1, APRT
At1g08680	1	ARF GAP-like zinc finger-containing protein (ZiGA4)	At1g67090	3	ribose-bisphosphate carboxylase small 1A
At1g09750	1	chloroplast nucleoid DNA-binding protein-related	At1g68530	1	very-long-chain fatty acid condensing enzyme (CUT1)
At2g26580	1	plant-specific transcription factor YABBY family protein	At1g80360	1	aminotransferase family
At3g02150	1	TCP family transcription factor TFPD	At2g29110	1	glutamate receptor family (GLR2.8)(GLUR9)
At3g24050	1	GATA transcription factor 1 (AtGATA-1)	At2g30870	1	glutathione transferase, putative
At4g17230	1	scarecrow-like transcription factor 13 (SCL13)	At3g01550	2	triose/phosphate translocator, putative
At4g22820	1	zinc finger -related protein	At3g02230	1	reversibly glycosylated polypeptide-1
At4g25320	1	DNA-binding protein-related	At3g09840	1	transitional endoplasmic reticulum ATPase -related
At5g04340	1	c2h2 zinc finger transcription factor -related	At3g19010	1	flavonol synthase family
At5g66320	1	GATA zinc finger protein	At3g29360	1	UDP-glucose dehydrogenase -related
Protein transport/sorting			At3g45300	1	isovaleryl-CoA-dehydrogenase precursor (IVD)
At1g07140	2	Ran-binding protein (atranbp1a)	At3g50270	1	hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase-related
At5g16620	1	proline-rich protein family	At4g01850	1	S-adenosylmethionine synthase 2
Protein synthesis/degradation			At4g02520	2	glutathione transferase, putative
At1g07940	1	elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	At4g02860	1	phenazine biosynthesis PhzC/PhzF family protein
At1g09690	1	60S ribosomal protein L21 (RPL21C)	At4g38970	1	fructose-bisphosphate aldolase, putative
At1g58983	1	40S ribosomal protein, putative	At5g24210	1	lipase (class 3) family
At1g72370	1	40S ribosomal protein SA (RPSaA)	At5g24530	1	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family
At2g21390	1	coatamer alpha subunit	At5g38410	1	RuBisCO small subunit 3b
At2g43190	1	ribonuclease P family protein	At5g38430	1	RuBisCO small subunit 1b
At3g05590	1	60S ribosomal protein L18 (RPL18B)	At5g42650	1	allene oxide synthase / cytochrome P450 74A
At3g11940	1	40S ribosomal protein S5 (RPS5B)	At5g47890	1	NADH dehydrogenase 10.5K chain-related protein
At3g27430	1	20S proteasome beta subunit B (PBB1)	At5g51970	1	L-iditol 2-dehydrogenase (sorbitol dehydrogenase), putative
At3g63490	1	ribosomal protein L1p family	At5g54770	1	thiazole biosynthetic enzyme precursor (ARA6)
At4g36800	1	RUB1-conjugating enzyme RCE1, putative	Scavenging reactive oxygen species		
At4g39200	1	40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	At3g49120	1	peroxidase, putative
At5g02500	1	heat shock protein hsc70-1 (hsp70-1) (hsc70.1)	Transporter		
At5g52640	1	heat shock protein 81-1 (HSP81-1)/heat shock protein	At4g13510	1	ammonium transport protein (AMT1)
At5g60390	1	elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	Homeostasis		
Protein kinase			At5g02380	1	metallothionein 2b
At3g01090	1	Snf1-related protein kinase KIN10 (AKIN10)	Cytoskeleton		
At4g18710	1	shaggy-related protein kinase etha (EC 2.7.1.-)	At1g78830	1	curculin-like (mannose-binding) lectin family
At4g31170	1	protein kinase family	At4g29350	1	profilin 2
At4g35310	1	calcium-dependent protein kinase, putative (CDPK)	chromatin structure		
Signal transduction/response			At3g18035	1	histone H1/H5 family protein
At5g61530	1	auxin-regulated protein	Unknown		
Injury/pathogen response			At1g07620	1	GTP-binding protein -related
At2g14080	1	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	At1g15670	1	Kelch repeat containing F-box protein family
At2g41100	1	calmodulin-related protein 3, touch-induced (TCH3)	At1g16480	1	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein
At3g52400	1	syntaxin of plants SYP122	At1g72610	2	germin-like protein (AtGER1)
At5g66900	1	disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative	At2g03730	1	ACT domain-containing protein
Energy			At3g11700	1	beta-Ig-H3 domain-containing protein / fasciclin domain-containing protein
At1g06680	1	photosystem II oxygen-evolving complex 23 (OEC23)	At3g54300	1	synaptobrevin -related protein
At1g30380	1	photosystem I subunit X precursor	At3g58820	1	F-box protein family
At1g29930	1	light-harvesting chlorophyll a/b binding protein	At4g32060	1	calcium-binding EF-hand family protein
At1g79040	1	photosystem II polypeptide -related	At5g19120	1	conglutin gamma - like protein
At2g30570	2	photosystem II reaction center 6.1KD protein	At5g19140	1	aluminium-induced protein - like
At3g47470	1	light-harvesting chlorophyll a/b binding protein	At5g47790	3	forkhead-associated domain-containing protein
At4g04640	1	ATP synthase gamma chain 1, chloroplast (ATPC1)	At1g13470	2	expressed protein
At4g27520	1	plastocyanin-like domain-containing protein	At1g34350	2	expressed protein
At5g01530	2	light-harvesting chlorophyll a/b binding protein	At1g05860, At1g08380, At1g08640, At1g14880, At1g29970, At1g35210, At1g52200		
At5g66570	2	photosystem II oxygen-evolving complex 33 (OEC33)	At1g66970, At2g14560, At2g25510, At2g27950, At2g39740, At3g06150, At3g12760		
			At3g13030, At3g15420, At3g15450, At3g62550, At4g08555, At4g17250, At4g22890		
			At5g01350, At5g13210, At5g52780		

AはPHYAによって単離された遺伝子、BはPHYBによって単離された遺伝子を示す。clone numberは単離された遺伝子の数を表す。Unknownに分類した遺伝子でclone numberの記載していないものは全て1クローンである。

酵母内での相互作用の確認

単離した因子とフィトクロムが酵母内で相互作用するかの再現性を確かめるために、10種類のTCP遺伝子とVOZ1、VOZ2遺伝子の全長を用い、再度、Y2H法を用いて選択培地における酵母の生育を調べた。また、フィトクロムに依存しない擬陽性クローンを除去するために、インサートをもたないBaitクローンをを用いた実験を行った。その結果、5種類のTCP (TCP3, 7, 14, 15, 21) はフィトクロムを欠いた場合でも酵母が生育し、残り5種類のTCP (TCP8, 10, 13, 20, 22) はPHYBと共発現させた場合にのみ生育した (Fig. 3-1, A)。また、VOZはPHYA、PHYBと共発現させた場合のみ生育した (Fig. 3-2, A)。

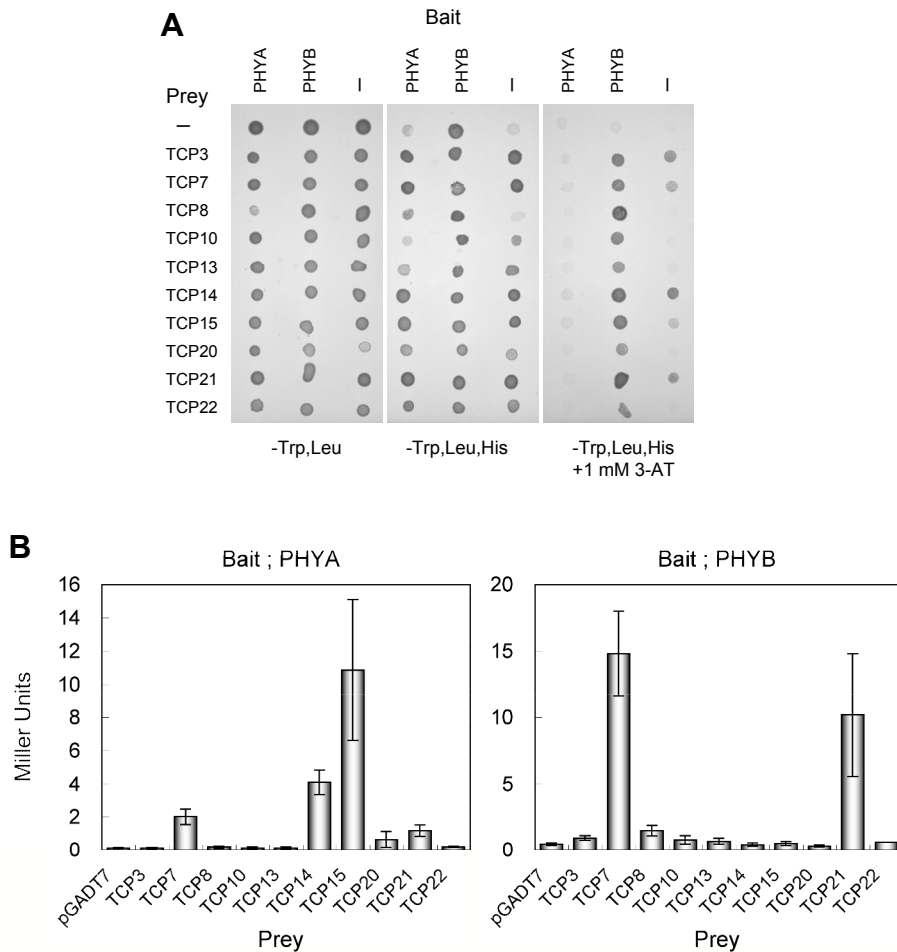


Fig. 3-1 酵母におけるフィトクロムと TCP の相互作用解析

- A. ヒスチジン (His) 要求性を指標にした選択培地における酵母の生育の確認
 左は非選択培地、中央は His 欠損培地、右は His 欠損培地に 1 mM 3-AT を添加した培地を用いた。Bait は PHY、Prey は TCP である。
- B. 酵母におけるβ-Galactosidase 活性の検出
 左は PHYA と TCP、右は PHYB と TCP の Y2H におけるβ-Galactosidase 活性を示す。独立した 3 回以上の測定結果の平均値を示す。

次に相互作用の強さを評価するために、酵母 Y187 を用いて、 β -Galactosidase 活性の検出を行ったところ、PHYA と TCP7、14、15、21、PHYB と TCP7、21 で活性が検出された。TCP14、TCP15 は PHYA との組み合わせでのみ活性が検出されたことから、TCP 単独の活性ではないと考えられたが、 β -Galactosidase 活性の検出の結果と選択培地における生育の結果が一致しなかったことから、TCP はその後の解析から除外した (Fig. 3-1, B)。一方、VOZ は、VOZ1 と PHYA の組み合わせでわずかに活性が検出され、選択培地での酵母の生育状況とも類似した結果であったため、VOZ の解析を進めることにした (Fig. 3-2, B)。 β -Galactosidase 活性の測定は酵母内でのタンパク質の発現量にも依存するため、活性が検出されなかった VOZ2 も VOZ1 とともに候補とした。全体的に活性が低い理由には、タンパク質の発現量が少ない可能性や pGBKT7 ベクターを改変していることが考えられた。

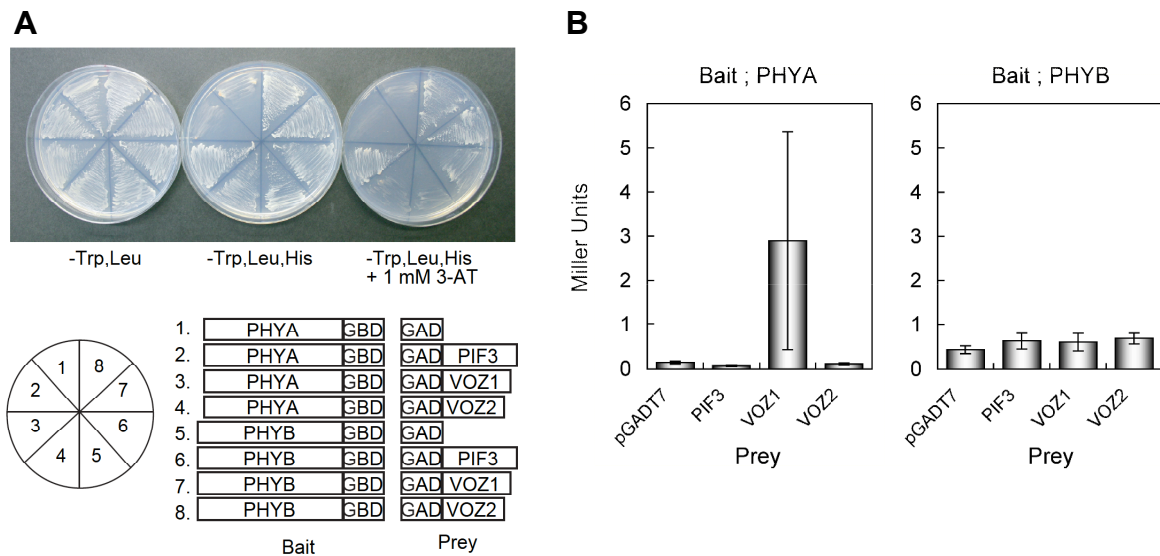


Fig. 3-2 酵母におけるフィトクロムと VOZ の相互作用解析

A. His 要求性を指標にした選択培地における酵母の生育の確認

左は非選択培地、中央は His 欠損培地、右は His 欠損培地に 1 mM 3-AT を添加した培地を用いた。下段は Bait と Prey の組み合わせの模式図を示す。

B. 酵母における β -Galactosidase 活性の検出

左は PHYA と VOZ、右は PHYB と VOZ の Y2H における β -Galactosidase 活性を示す。独立した 3 回以上の測定結果の平均値を示す。

VOZ の特徴

VOZは、シロイヌナズナのデータベースであるThe *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) やThe Institute for Genomic Research (TIGR) ではexpressed proteinとして登録されている遺伝子であるため、データベースを元に情報を収集した。シロイヌナズナには今回単離されたVOZ1、VOZ2の2遺伝子以外に相同遺伝子はなかった。VOZ1は486アミノ酸残基、VOZ2は450アミノ酸残基からなるタンパク質をコードし、アミノ酸配列において互いに約53%の相同性を示した。アミノ酸配列の相同性検索の結果、*P. patens* (ヒメツリガネゴケ)、*O. sativa* (イネ)、*Z. mays* (トウモロコシ) で全長と考えられるタンパク質が存在した。これらの遺伝子のアラインメントを作成した結果、N末端領域には*P. patens*を除く高等植物で保存された領域が存在し、C末端領域には全ての植物に高度に保存された領域が存在した (Fig. 3-3)。さらに塩基配列を元に検索し、相同性の高い遺伝子をアミノ酸配列に変換して比較すると、C末端領域と高い相同性を示す部分長配列が多く見つかった。*Medicago truncatula* (ウマゴヤシ)、*Trifolium pratense* (ムラサキツメクサ)、*Lotus japonicus* (ミヤコグサ)、*Euphorbia esula* (ハギクソウ)、*Ipomoea nil* (アサガオ)、*Curcuma longa* (ウコン)、*Capsicum annuum* (トウガラシ)、*Triticum aestivum* (コムギ)、*Hordeum vulgare* (オオムギ)、*Lactuca serriola* (レタス)、*Glycine max* (ダイズ)、*L. esculentum* (トマト)、*Solanum chacoens* (ナス)、*Solanum tuberosum* (ポテト)、*Vitis vinifera* (ブドウ)、*Fragaria vesca* (イチゴ)、*Saccharum officinarum* (サトウキビ)、*Gossypium hirsutum* (コットン)、*N. tabacum* (タバコ)、*Brassica rapa (oleracea,napus)* (アブラナ)、*Helianthus annuus* (ヒマワリ)、*Coffea canephora* (コーヒー)、*Carica papaya* (パパイヤ)、*Cycas rumphii* (ソテツ)、*Picea glauca* (トウヒ)、*Pinus taeda* (テーダマツ)、*Citrus clementina* (シトラス)等、ヒメツリガネゴケから樹木まで、短日植物、中性植物、長日植物に関わらず、ほぼ全ての植物に広く保存されていた。一方、植物以外に相同タンパク質は見つからなかったため、VOZは植物に特有の遺伝子であり、植物特異的で重要な役割を果たしていると考えられた。また、ヒメツリガネゴケはゲノム中に1コピーの遺伝子だが、イネでは2コピーが存在し、その他の植物でも2コピー存在すると考えられる配列が見られた。

2004年、Mitsudaらにより、Vacuolar H⁺-pyrophosphatase (V-PPase) をコードするAVP1のプロモーター領域に結合するタンパク質として単離され、VOZと命名された。VOZに関する報告は、この1報のみであり、*in vitro*の研究から、C-X4-

C-X13-C-X3-Hの新奇Zinc finger motifを有し、転写活性化能があること、このモチーフに亜鉛が配位すること、GCGT (N×7) ACGC のDNA配列に結合することが報告されている (Mitsuda et al., 2004)。しかしながら、これらの研究は、植物におけるVOZの機能を調べたものではなく、VOZの生理的な役割は未だ明らかになっていないといえる。

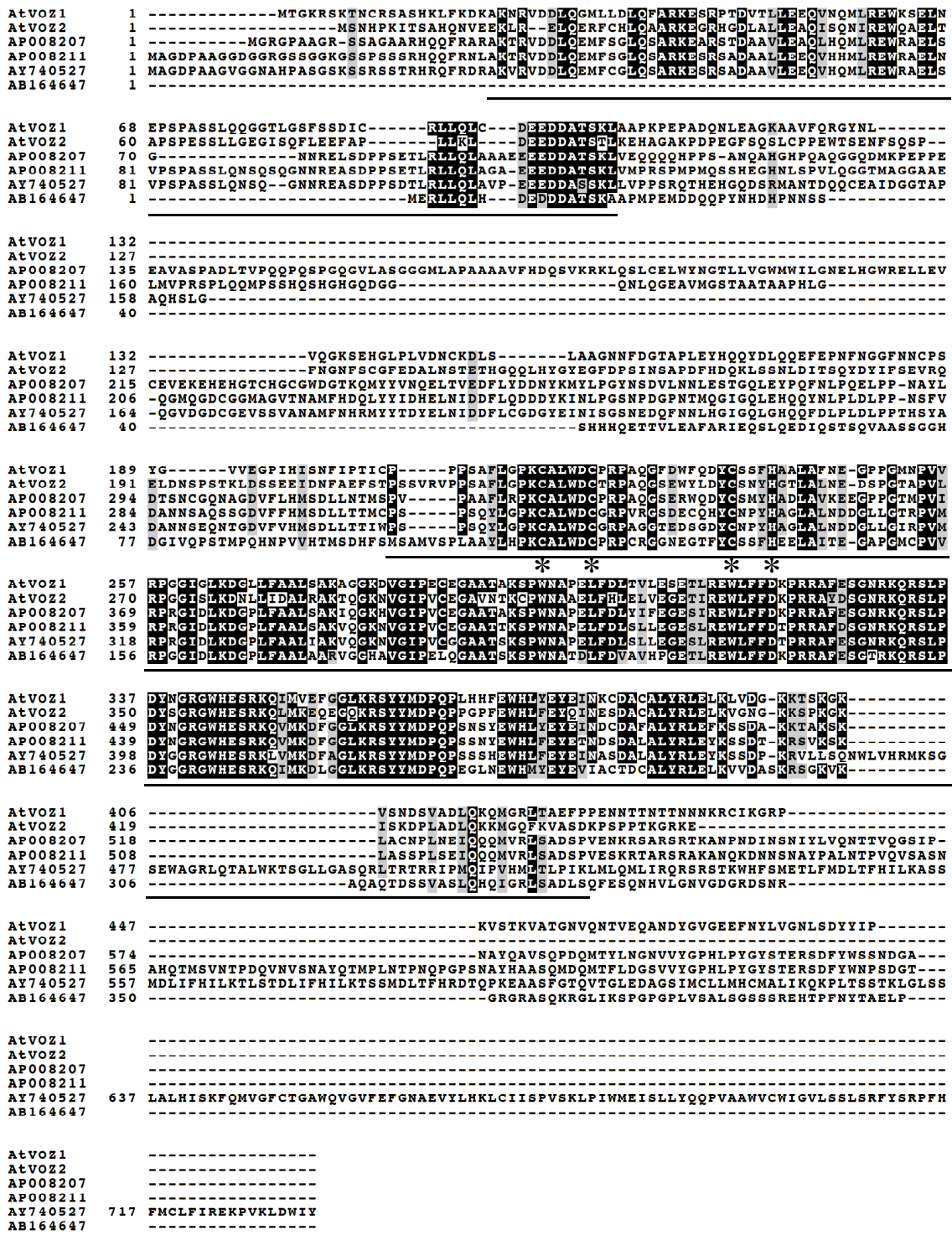


Fig. 3-3 VOZと相同性を示すタンパク質のアミノ酸配列のアラインメント

CLUSTAL WとBOXSHADEで作製した。AP008207、AP008211は*O.sativa*、AY740527は*Z.mays*、AB164647は*P.patens*のタンパク質である。*はZinc finger motifであり、N末端領域の下線部はDomain A、C末端領域の下線部はDomain BとMitsudaらによって名付けられたアミノ酸配列の保存性が高い領域である。黒のボックスは同一アミノ酸、灰色のボックスは類似アミノ酸を示す。

VOZの発現解析

フィトクロムとVOZが相互作用するためには、時間的、空間的な発現部位が一致しなければならない。そこで、VOZ遺伝子の発現時期と場所を調べるためにRT-PCR解析を行ったところ、VOZは生長時期に関わらず、ほぼ全ての組織で発現していることが明らかになった。この結果は、Mitsudaらの報告と基本的に一致している。さらに、彼らは、VOZプロモーター領域 (*AtVOZ1* はATGの上流3,773 bp、*AtVOZ2* はATGの上流1,868 bp) とGUSレポーター遺伝子を用いた組織染色による解析からVOZ1は維管束で、VOZ2は根、おしべで特に強く発現していることが報告されている。さらに、光により発現が誘導されるか、発現量が光周期に依存して変動するかを調べたところ、光に依存せずに、基本的には恒常的に一定レベルで発現していることが明らかになった (Fig. 3-4)。

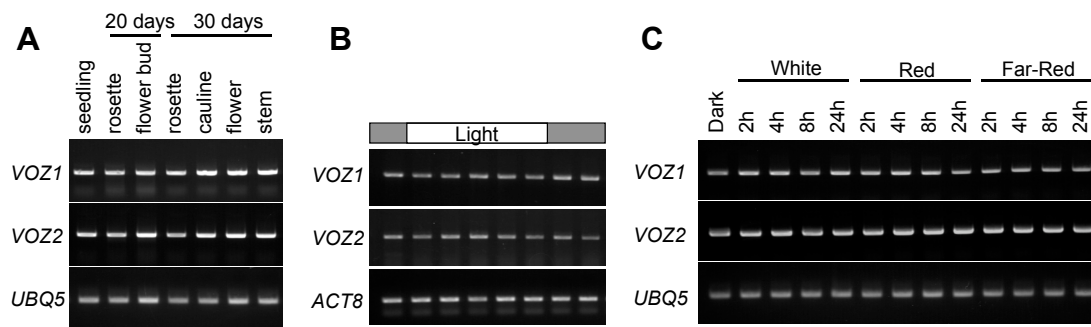


Fig. 3-4 RT-PCRによるVOZの発現解析

A. 生長時期・組織別の発現量

長日条件下で栽培した植物体の生長時期別、組織別の発現量を示す。

B. 長日条件下における光周期依存的な発現の変化

長日条件下で約2週間栽培した植物体における3時間ごとの発現量を示す。

C. 発現の光誘導

暗所で1週間栽培した黄化芽生えに2~24時間光を照射した場合の各時間での発現量を示す。

次に、VOZタンパク質の蓄積量を調べた。VOZ1抗体は、全長の組換えタンパク質を抗原として抗体を作製しても、力価が低かったため、VOZ2タンパク質に対してのみ解析を行った。組織別の発現量を調べたところ、ほぼ全ての組織で発現が確認されたが、遺伝子の発現量とは異なり、花・花芽にタンパク質は多く蓄積していた。次に、光周期依存的な発現量の変化を調べたところ、mRNAの蓄積と同様に、一定のレベルでVOZ2タンパク質が蓄積していることが確認された (Fig. 3-5)。また、単色光を照射してもVOZ2タンパク質量に変化はなか

った (data not shown)。よって、mRNAの発現している場所とタンパク質が存在する場所が一致することが確認された。フィトクロムはVOZ 1およびVOZ2が発現している組織において、常に発現していることが、これまでに報告されている (Somers and Quail, 1995)。以上の結果、VOZ遺伝子とフィトクロム遺伝子の発現時期と場所が一致することが示唆された。

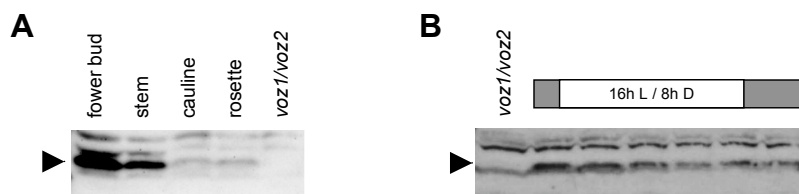


Fig. 3-5 ウェスタンブロット解析によるVOZ2タンパク質の発現解析

A. 組織別の発現量

全日長で栽培した播種後30日の植物体における組織別の発現量を示す。

B. 長日条件下における光周期依存的な発現の変化

長日条件下で約2週間栽培した植物体における4時間ごとの発現量を示す。

A.Bともに40 µg/laneの粗抽出タンパク質を使用した。

in vitro における相互作用の検証

フィトクロムと VOZ の相互作用を検証するために、*in vitro* においてフィトクロムと VOZ の結合アッセイを行った。*In vitro* 転写・翻訳法で全長のアポフィトクロムを³⁵S]メチオニン存在下で合成し、GST-VOZ 融合タンパク質との結合を調べた。その結果、VOZ1、VOZ2 とともに全長の PHYA および PHYB との結合が検出された (Fig. 3-6, A)。同様に VOZ1 と PHYA、PHYB の N 末端領域が結合することも明らかとなった (Fig. 3-6, B)。

次に、相互作用の光特異性を調べるために、第二章で構築した発現系により合成した光受容能をもつ組換えフィトクロムと GST-VOZ 融合タンパク質を用いて、結合アッセイを行った。組換えフィトクロムに、R-LED、あるいはFR-LEDを照射した後、GST-VOZ 融合タンパク質と混合した。phyA (N617) を用いた場合は、混合後は暗所でインキュベーションを行い、phyB (N651) を用いた場合は、phyB の暗反転を抑制するために光を照射しながらインキュベーションを行った。その結果、VOZ1、VOZ2 とともに Pr 型の phyA (N617) に対する結合の親和性が高いことが示唆されたが、一旦結合したタンパク質に対して、結合の光可逆性はみられなかった。また、phyB (N651) に関しては、Pr 型、Pfr 型どちら

の phyB (N651) にも VOZ1、VOZ2 の結合は検出されず、先の結果と異なった (Fig. 3-6, C)。

以上のことから、*in vitro* で VOZ1、VOZ2 タンパク質は、フィトクロム A、B と相互作用し、フィトクロム A に対するタンパク質間相互作用の親和性が高いことが示唆された。また、Pfr 型よりも Pr 型の phyA (N617) に対する親和性が高いことも示唆された。

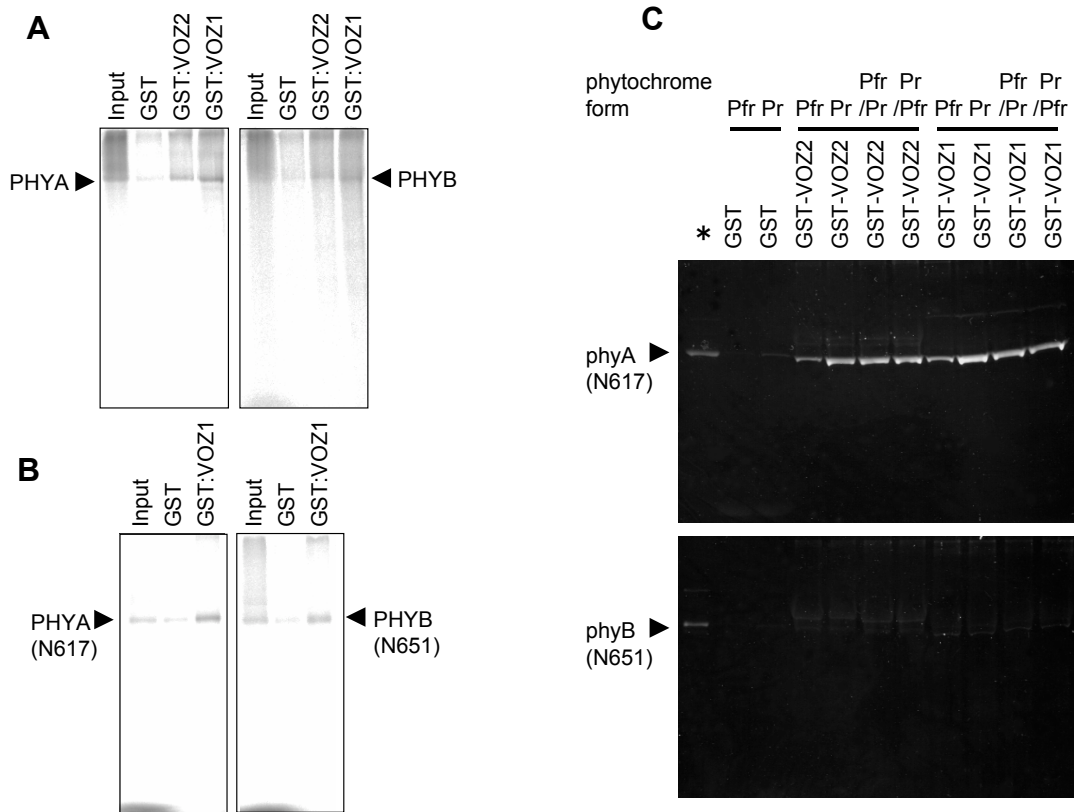


Fig. 3-6 GST pull-down 法を用いた *in vitro* における相互作用解析

A. *in vitro* 転写・翻訳法で合成した全長アポタンパク質と GST-VOZ 融合タンパク質の結合
矢印は³⁵S存在下で合成した全長のアポタンパク質を示す。左は PHYA、右は PHYB と混合した結果を示す。Input には、合成タンパク質 2 μl 用いた。

B. *in vitro* 転写・翻訳法で合成したアポタンパク質の N 末端領域と GST-VOZ1 融合タンパク質の結合

矢印は³⁵S存在下で合成したアポタンパク質の N 末端領域を示す。左は PHYA (N617)、右は PHYB (N651) と混合した結果を示す。Input には、合成タンパク質 2 μl 用いた。

C. 発色団を有するフィトクロム N 末端領域の組換えタンパク質と GST-VOZ 融合タンパク質の結合

上段は phyA (N617)、下段は phyB (651) と混合した結果を示す。R を照射した Pfr 型、あるいは FR を照射した Pr 型のフィトクロムを GST-VOZ 融合タンパク質と混合した。Pfr/Pr は、Pfr 型を混合して 1 時間後に FR を照射し、さらに 1 時間インキュベーションした。同様に、Pr/Pfr は、Pr 型を混合して 1 時間後に R を照射し、さらに 1 時間インキュベーションした。* は、合成タンパク質を 3 μg 泳動した。フィトクロムは Zinc blot 法で検出した。

A, B, C ともに 10% の SDS-ポリアクリルアミドゲルを用い、SDS-PAGE 法で展開した。

voz 変異体の表現型解析

1. 芽生えの応答

VOZ の生体内における機能を解析するために、*voz1*、*voz2*、*voz1/voz2*、*VOZ2 ox* を用いて表現型の観察を行った。*VOZ1 ox* は、三種類のコンストラクトで過剰発現体の作出を試みたが、いずれも遺伝子は導入されるものの、mRNA は過剰に蓄積しなかったため、解析できなかった。*VOZ2 ox* は、タンパク質が過剰発現していることも確認された。各変異体における T-DNA の挿入部位と *VOZ* 遺伝子の発現量を Fig. 3-7 に示す。*In vitro* 結合アッセイにおいて、*VOZ* と *phyA* の結合が示唆されたことから、代表的な *phyA* の応答について調べた。*phyA* は、芽生えにおいて、FR 下での胚軸伸長抑制、緑化抑制応答を制御しているが、これらの応答には異常はなかった (Fig. 3-8)。*phyB* の応答である R 下での胚軸伸長抑制や脱黄化にも異常はなかった。よって、*VOZ* は芽生えの光生理応答に関与していないと結論した。

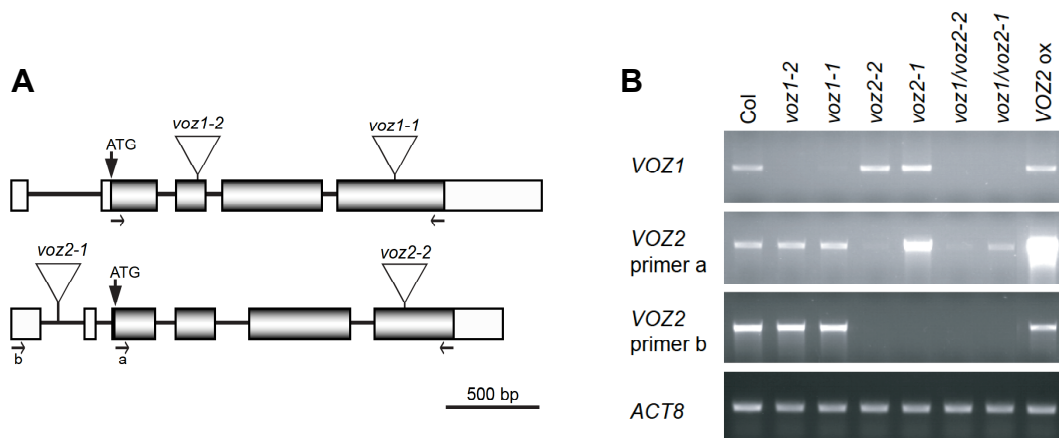


Fig. 3-7 *voz* 変異体における T-DNA 挿入部位と *VOZ* の発現量の確認

A. *voz* 変異体における T-DNA 挿入部位を示した模式図

上段は *VOZ1* 遺伝子、下段は *VOZ2* 遺伝子の一次構造を示す。実線部はイントロン、ボックスはエクソンを示し、白色部は非翻訳領域、灰色部は翻訳領域を示す。白色の三角は T-DNA 挿入部位である。また、B の RT-PCR に用いたプライマーの位置を矢印で示した。

B. RT-PCR 法を用いた *voz* 変異体における *VOZ* 遺伝子の発現量解析

最上段は *VOZ1* 遺伝子のコーディング領域、二段目は *VOZ2* 遺伝子のコーディング領域、三段目は *VOZ2* 遺伝子の 5'側の非翻訳領域とコーディング領域、最下段はコントロールであり、*ACT8* 遺伝子の発現量である。

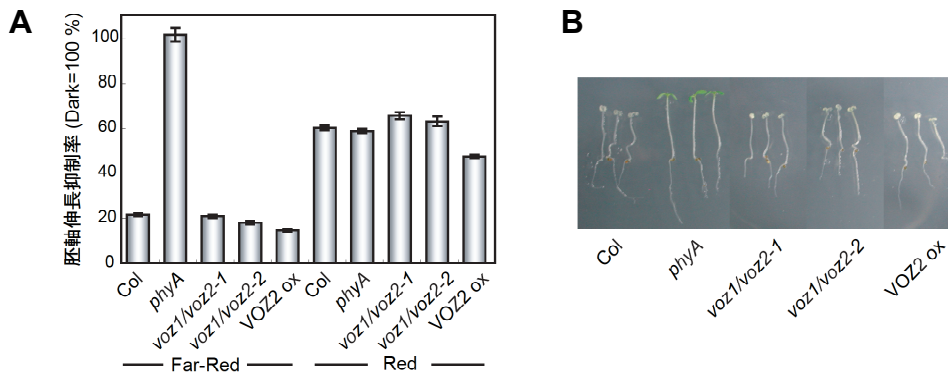


Fig. 3-8 voz 変異体の芽生えにおける表現型解析

A. 胚軸伸長抑制応答

発芽直後に R-LED、または FR-LED を 5 日間連続照射した芽生えの胚軸の長さを測定した。暗所芽生えの胚軸の長さを 100 %として光照射による胚軸伸長抑制率を示した。n \geq 18

B. 遠赤色光照射による緑化抑制応答

発芽後に FR の蛍光灯を 3 日間照射して緑化を抑制した。その後、白色光下で 3 日間生育させた芽生えの写真を示す。

2. 花成の調節

生長後期において、phyA は長日条件下の花成を促進し、phyB は抑制していることが知られている。そこで、長日条件下と短日条件下で花成時期を調べたところ、voz1/voz2 二重変異体が長日条件下でのみ遅咲きを示した。voz1、voz2、VOZ2 ox は全く野生型と変わらなかった。このことから、VOZ は長日条件下において花成を促進しており、VOZ1、VOZ2 は重複して機能していることが示唆された (Fig. 3-9)。相補性テストの結果、voz1/voz2 二重変異体にプロモーター領域を含む VOZ1、あるいは VOZ2 のゲノム断片を導入すると遅咲きの表現型が回復することも確認された (Fig. 3-10)。よって、VOZ1、VOZ2 が重複して長日条件下での花成を促進していることが明らかになった。VOZ が長日条件下でのみ機能することから、フィトクロムと同じ花成シグナル伝達経路で機能していることが示唆された。

voz1/voz2-2 は、短日条件下における花成までの日数が野生型より長かったが、ロゼット葉の枚数に差がないことから、これは生育自体が遅いことを示していると考えられた。T-DNA の挿入部位から、voz1/voz2-2 は、voz1/voz2-1 に比べてシビアな表現型を示すと考えられるが、生育段階をあわせるために、以降の表現型解析には voz1/voz2-1 を用いた。

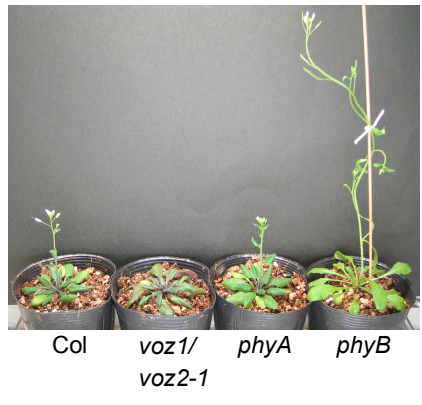
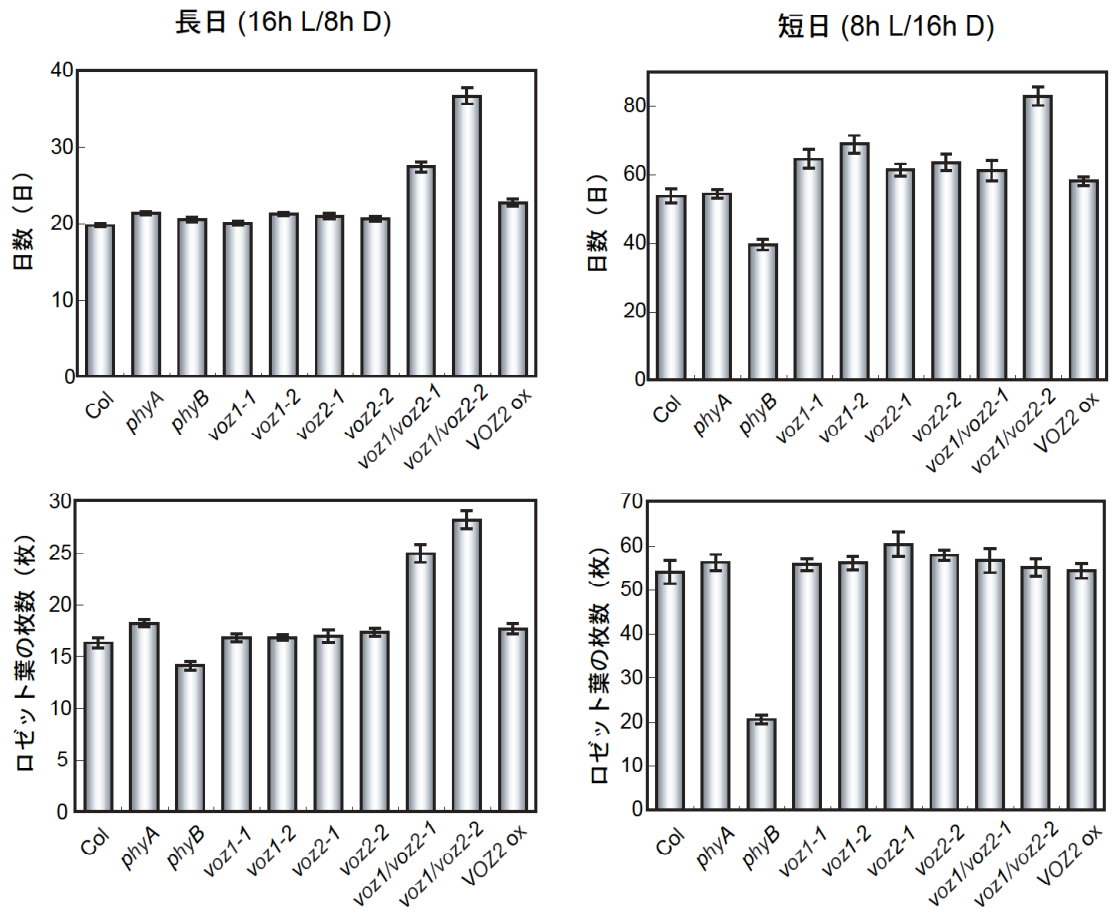


Fig. 3-9 voz 変異体の花成時期の測定

グラフの左側は長日条件 (16 h L/8 h D) における花成時期、右側は短日条件 (8 h L/16 h D) における花成時期を示す。上段は抽台までの日数、下段は抽台時のロゼット葉の枚数を示す。n ≥ 9
 下の写真は長日条件下で測定した植物体を示す。左から Col、voz1/voz2-1、phyA、phyB である。

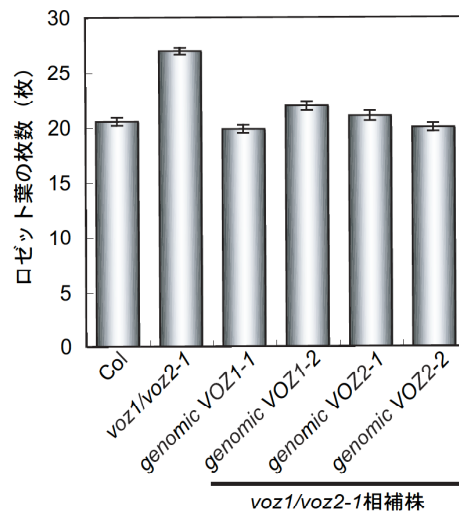


Fig. 3-10 花成時期を指標にした *voz1/voz2* 二重変異体の相補性テスト

長日条件下で栽培した植物体の抽台時におけるロゼット葉の枚数をグラフに示す。*voz1/voz2-1* 相補株は、*voz1/voz2-1* にプロモーター領域を含む *VOZ1* あるいは *VOZ2* のゲノム断片を導入した植物体であり、それぞれ独立した2ラインを用いた。n \geq 34

3. クロロフィル含量

これまでの研究から、*phyA* と *phyB* は緑化を制御することが知られている。*voz1/voz2* は、通常の光条件下で栽培すると生長後期に葉の緑色が濃くなる傾向が観察されたため、ロゼット葉のクロロフィル含量を定量した。シロイヌナズナの一般的な栽培条件である 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ で栽培すると、花成前の生長前期では、野生型と *voz1/voz2* に差はみられなかったのに対し、生長後期では、*voz1/voz2* のクロロフィル含量は野生型よりも高かった。一方、40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ の低光量で栽培すると生長後期でもクロロフィル含量に差はなかった (Fig. 3-11)。*phyB* 変異体は、生長時期や光量に関わらず、クロロフィル含量が低かった。シロイヌナズナを短日条件下で栽培すると、長日条件よりも遅咲きになり、緑色も濃くなる。よって、*voz1/voz2* の緑色の濃さは、遅咲きに関連した表現型であると考えられた。

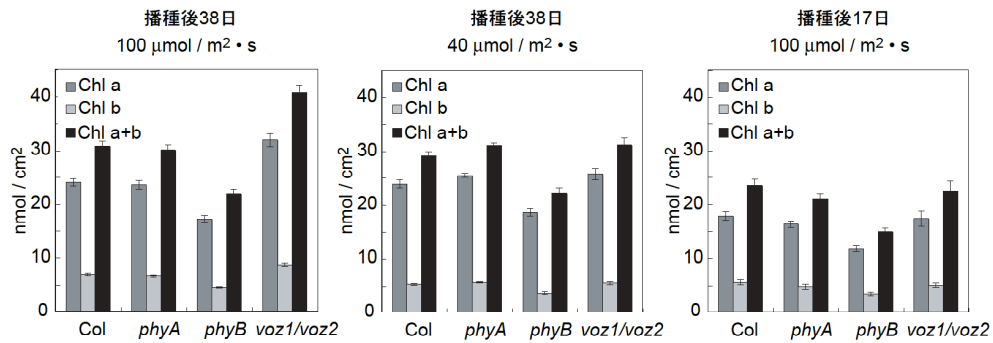


Fig. 3-11 *voz1/voz2* 二重変異体におけるクロロフィル含量

左は播種後 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ で 38 日間、中央は 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ で 38 日間、右は 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ で 17 日間、長日条件で栽培した時のクロロフィル含量を示す。葉面積 1cm^2 あたりのクロロフィル含量をグラフに示した。n \geq 12

4. アントシアニン含量

葉の緑色だけでなく、*voz1/voz2* はアントシアニンが蓄積する傾向も見られたため、定量を行った。その結果、生長前期では *voz1/voz2* のアントシアニン蓄積量が野生型と同程度であるのに対し、生長後期では顕著に蓄積することが明らかになった。よって、野生型よりも光障害を受けやすいことが示唆された。アントシアニンの蓄積は、光に制御されているため、VOZ が光シグナル伝達経路で機能していることが示唆された。

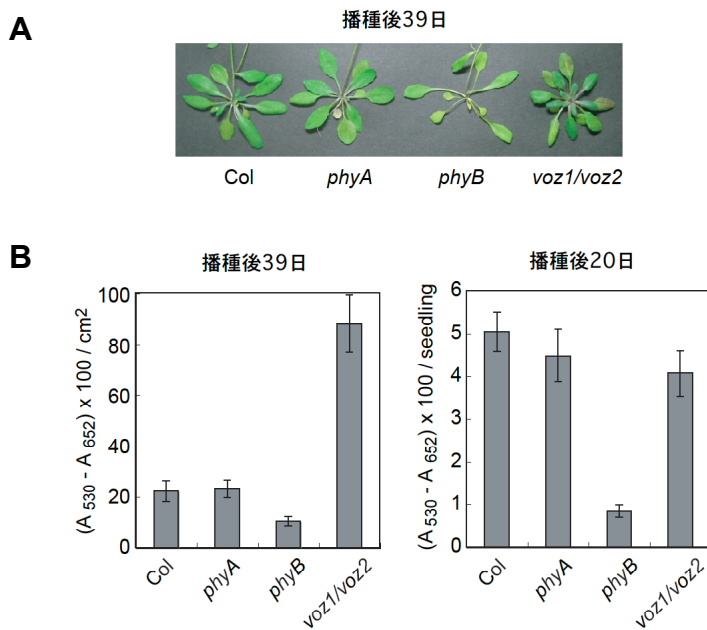


Fig. 3-12 *voz1/voz2* 二重変異体におけるアントシアニン含量

A. 播種後 39 日間、長日条件下で栽培した植物体のロゼット葉の写真

B. アントシアニン含量の定量
左は播種後 39 日間、長日条件下で栽培した植物体のロゼット葉 1cm^2 あたりの量を示す。右は播種後 20 日間栽培した植物体 1 個体あたりの量を示す。n \geq 10

5. 葉が立つ表現型

voz1/voz2 は、白色光下で葉が立つ表現型が観察された。フィトクロムは、R/FR の比により日陰を感知して、葉の重なりを避けるように葉を立てる日陰回避応答を調節していることが知られている (Franklin and Whitelam, 2005)。そこで、*voz1/voz2* が R/FR 比を認識できるか調べるために、白色光に R、あるいは FR を追加して栽培し、表現型を観察した。野生型は、FR が多い場合は葉を立て、R が多い場合は葉を寝かせるように角度が変化した。*voz1/voz2* 二重変異体も、常に野生型よりも葉は立っているものの、野生型同様に葉の角度が変化した。よって、*voz1/voz2* 二重変異体は、R/FR の比を認識できていると判断した。また、この表現型は全日長、長日条件、短日条件でも観察されたため、日長とは無関係であることが示唆され、VOZ が関与すると予想される花成経路とは別の経路で VOZ が機能することが示唆された。また、同じ光強度でも、長日条件より短日条件の方が表現型は顕著であり、同じ日長の場合は光量の低い方が顕著な表現型であったため、光量の総量を感じている可能性が考えられた。

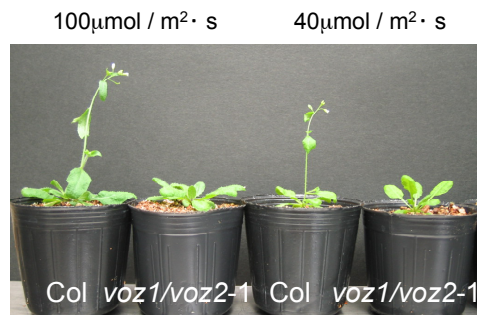


Fig. 3-13 *voz1/voz2* 二重変異体の葉が立つ表現型

長日条件下で栽培した植物体を示す。左側 2 個体は $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 、右側 2 個体は $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ の光量で栽培した植物体である。

花成促進経路における VOZ の位置づけ

1. フィトクロムと VOZ の関係

VOZ は、フィトクロムの相互作用因子の候補として単離されたが、*in vivo* における相互作用は明らかになっていない。そこで、花成促進経路における *phyA*、*phyB* と VOZ の関係を遺伝学的に調べるため、各フィトクロムと *VOZ1*、*VOZ2* の多重変異体を作成して、長日条件下での花成時期を調べた。その結果、*phyA/voz1/voz2*、*phyB/voz1/voz2* の三重変異体は、*voz1/voz2* と同様に遅咲きであり、VOZ が *phyA*、*phyB* の下流で機能していることが明らかになった (Fig. 3-14)。

phyA/voz1、*phyA/voz2* 二重変異体の花成時期は、*phyA* と差がなく、*phyB/voz1*、*phyB/voz2* 二重変異体の花成時期も、*phyB* と差がなかった。このことから、白色光下において、*VOZ* は一方の遺伝子のみで十分に機能を果たせることが示唆された。また、*phyB/voz1/voz2* の葉の形態は、*phyB* と変化がなく、*VOZ* が花成促進経路で特異的に機能していることが示唆された。

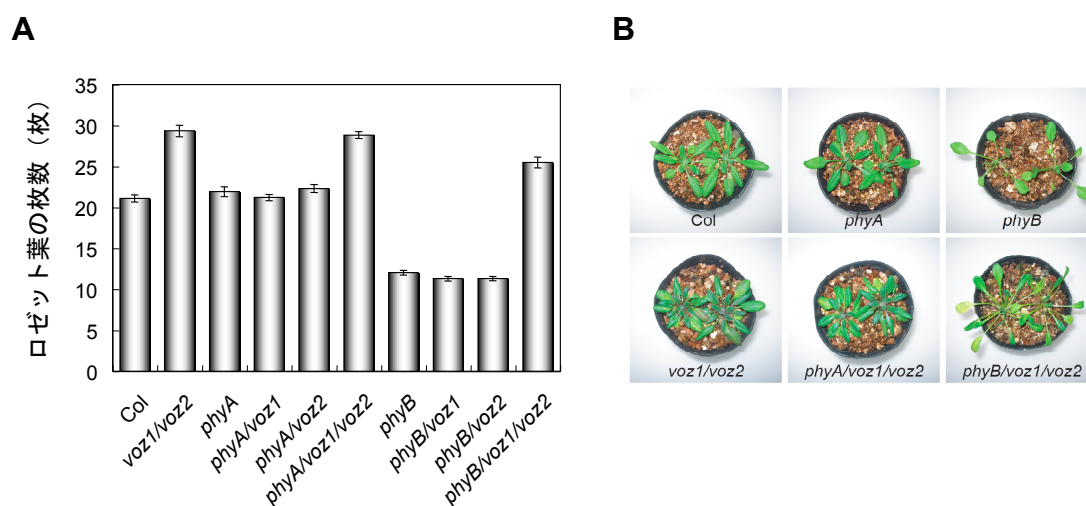


Fig. 3-14 フィトクロムと VOZ の多重変異体の長日条件下における花成時期

- A. 長日条件下で栽培した植物体の抽台時におけるロゼット葉の枚数をグラフに示す $n \geq 39$
 B. 各変異体の抽台時の表現型を示す

2. *CONSTANS* (*CO*) と *Flowering locus T* (*FT*) の発現解析

フィトクロムを初発とする花成のシグナル伝達経路において、*CO* と *FT* が主要な役割を果たしていることが知られている (Imaizumi and Kay, 2006)。*CO* は、フィトクロムからの光シグナルによって、遺伝子の発現量だけでなく、タンパク質の分解も調節されており、*CO* タンパク質の蓄積量に依存して、*FT* 遺伝子の発現量が変化し、花成が制御されている (Valverde et al., 2004)。*VOZ* がフィトクロムの下流に位置することから、*VOZ* が *CO*、*FT* の上流で機能することが推測された。そこで、*VOZ* と *CO*、*FT* との関わりを明らかにするために、*voz1/voz2* 二重変異体における光周期依存的な *CO*、*FT* の発現量の変動パターンを調べた。その結果、*CO* 遺伝子の変動パターンは野生型と同様であり、*VOZ* が *CO* 遺伝子の発現調節には関わっていないことが示唆された。一方、*FT* 遺伝子は、*voz1/voz2* において、暗期前の発現上昇が起こらず、これが遅咲きの直接的な原因であることが明らかになった。よって、*VOZ* は *CO* の転写制御には関与しないが、*VOZ* が *FT* の上流で機能することが明らかになった (Fig. 3-15)。

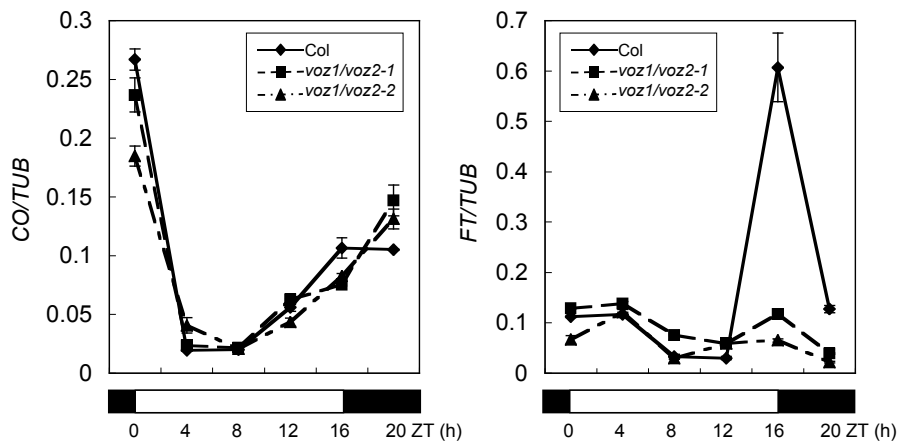


Fig. 3-15 voz1/voz2 二重変異体における CO、FT の発現解析

Real-Time PCR 法により測定した長日条件下における一日の発現量の変化を示す。縦軸は、*TUBULIN* (*TUB*)の発現量に対する *CO* (左)、*FT* (右)の発現量である。実線に◆は Col、破線に■は *voz1/voz2-1*、破線に▲は *voz1/voz2-2* を示す。グラフ下のバーは、明暗周期を表し、黒が暗期、白が明期である。n=3

考察

フィトクロム相互作用タンパク質のスクリーニング系の構築と結果

本研究では、フィトクロムと光依存的に相互作用するタンパク質を単離するため、光異性化能を有する全長ホロフィトクロムを用いたスクリーニング系の構築を目指した。そのためにはスクリーニングを行う宿主細胞内で全長のフィトクロムを発現させること、**PΦB** を合成させることの 2 つの課題があった。これまでの報告から、全長のアポフィトクロムを酵母で発現させることは可能であるが、大腸菌では困難であることが知られていた。第二章において、*PHYB* 遺伝子と大腸菌内で **PΦB** 合成遺伝子との共発現により、発色団を有した全長 *phyB* を発現させることに成功したため、大腸菌の Two-hybrid 系の利用を検討した。しかし、大腸菌 Two-hybrid 系は、スクリーニングのバックグラウンドが高く結果の信頼性に欠けていた。また、Two-hybrid 系では **GBD** または **GAD** との融合タンパク質としてフィトクロムを発現させる必要があるが、二章における結果から、大腸菌でのフィトクロムの発現は、融合させる **Tag** などの種類に大きく影響されることが明らかであった。これらの 2 つの理由から、大腸菌を Two-hybrid スクリーニングを行う宿主として用いることは断念した。そこで、酵母を宿主に用いてスクリーニングを行うために、酵母で **PΦB** の合成系構築を試みたが、酵母での **PΦB** 合成は成功しなかった。**PΦB** を生合成する酵素が機能するには、本来、還元型フェレドキシンから供給される電子が必要となる (Muramoto et al., 1999, Kohchi et al., 2001) が、酵母の細胞質には利用できる還元力が存在しなかったと推測された。酵母において **PΦB** を合成できなかったことから、**Y2H** 法を用い、アポタンパク質のみでスクリーニングを行った。これまでにフィトクロム相互作用因子が 14 種類以上単離されているにも関わらず、全長のフィトクロムを用いて **Y2H** によるスクリーニングを行った例は、近年の 1 例しか報告されていない (Ryu et al., 2005)。よって、アポタンパク質のみを用いたスクリーニングでも、相互作用にフィトクロムの二量体化が必要である因子や、結合にフィトクロムの N 末端領域が必要な因子を単離できると期待された。さらに、単離されている因子は芽生えでの応答に関わるものが多かったが、フィトクロムは生長の時期に関わらず、光形態形成に重要な光受容体であるため、スクリーニング対象とする cDNA プールを獲得する植物の生長時期を検討することで新規因子の単離が期待できた。

今回のスクリーニングでは、当初は単離された因子の中に、フィトクロムとの関連が報告されている因子は含まれていなかったが、その後、TCP domain を有する *sorghum Teosinte Branched1* (SbTB1) (Kebrom et al., 2006) やシロイヌナズナの scarecrow-like transcription factor 13 (SCL13) (Torres-Galea et al., 2006) は、フィトクロムの光シグナル伝達経路で機能することが報告された。よって、今回単離された因子の中に、いまだ機能解析されていない相互作用因子が含まれることが期待された。

TCP ファミリー

TCP ファミリーのタンパク質は、TCP ドメインと呼ばれる非典型的な bHLH をもつ植物特有の転写因子である。フィトクロム相互作用因子としてよく知られている PIF3 や PIF4 は典型的な bHLH 転写因子であることから、同じ bHLH を有する TCP ファミリーの転写因子も相互作用因子である可能性が期待された。シロイヌナズナでは、塩基配列から 24 遺伝子が TCP ファミリーとして同定され、これらの生体内における機能の詳細は明らかにされていないが、細胞分裂に関わっていると考えられている。今回は、Y2H の選択培地における酵母の生育状況と β -galactosidase 活性測定の結果が一致しなかったため、TCP を候補として除外したが、当研究室で同じライブラリーに対し、異なる Bait でスクリーニングした場合には、TCP は 1 つも単離されなかった。また、 β -galactosidase 活性を測定すると、TCP14、15 は PHYA と、TCP7、21 は PHYB との親和性が検出され、さらに、これら 4 つの TCP は *in vitro* 結合アッセイでも phyA との結合が示唆されている。今後、TCP がフィトクロムの相互作用因子であるかどうか、詳しい研究が必要である。

VOZ とフィトクロムの相互作用

In vitro における結合アッセイの結果、VOZ とフィトクロムが結合することが示唆された。*in vitro* 転写・翻訳法で合成したアポフィトクロムを用いた場合では、PHYA、PHYB とともに VOZ との結合が検出されたが、大腸菌で発現させた光受容能をもつ N 末端領域の組換えフィトクロムを用いた場合では、phyB (N651) と VOZ との結合は検出されなかった。このことから、VOZ は phyB よりも phyA との結合の親和性が高いと考えられた。*in vitro* 転写・翻訳法で合成したアポフィトクロムと組換えフィトクロムを用いた場合での結果の違いは、合

成されたタンパク質の性質やインキュベーション時のバッファの違いが原因かもしれない。また、*in vitro* 転写・翻訳法で合成したアポフィトクロムを用いた結合アッセイは、ラジオアイソトープによる検出で、大腸菌で発現させた組換えフィトクロムを用いた場合は Zinc Blot 法による検出であるため、検出感度が異なることも原因かもしれない。PIF3、PIF4 は、phyB に対する親和性が phyA に対する親和性よりも 10 倍以上高いことが報告されており (Duek et al., 2005)、VOZ も phyA と phyB で親和性が異なると推測された。

フィトクロムと VOZ の相互作用は、*in vitro* では検出されたものの、植物体内での相互作用は明らかになっていない。*In vitro* での相互作用の結果から、*in vivo* においても相互作用すると考えるのは非常に危険である。このため、VOZ が相互作用因子であるかどうかを明らかにするためには、*in vivo* の相互作用を検出する実験が必要不可欠だと考える。後述するが、実際に、Mitsuda らの *in vitro* において決定された VOZ の DNA 結合配列は、*in vivo* において VOZ が結合する DNA 配列とは異なることが示唆されている。*In vivo* における直接的な相互作用を示す実験としては、免疫共沈降法や bimolecular fluorescence complementation 法、Fluorescence resonance energy transfer 法等が考えられる。また、フィトクロムは、光質によって細胞内局在が変わるタンパク質であるため、VOZ とフィトクロムの細胞内局在を解析し、比較することでも相互作用の可能性を検証できると考えられる。

VOZ の細胞内局在解析の試み

Mitsuda らによって転写因子として単離された VOZ は、核に局在すると推測されるが、VOZ の配列上には、明らかな核局在シグナル配列はみられない。フィトクロムやフィトクロム相互作用因子である PIF3 等は、光質特異的に細胞質と核を移動することが知られており、フィトクロムと VOZ の関係を明らかにする上で、細胞内局在は重要な情報になる。そこで、蛍光タンパク質を用いた局在解析を試みた。CaMV 35S プロモーター制御下の VOZ:YFP 融合遺伝子を Bombardment 法でタバコ葉に導入したところ、核と細胞質で蛍光が観察された。細胞質での蛍光は全体に広がる場合と斑点状の場合がみられた。VOZ:YFP 融合タンパク質が機能的であるかを調べるために、*voz1/voz2* 二重変異体でこのタンパク質を発現させたところ、T1 世代では遅咲きの表現型が相補されたが、T2 世代では 1 つのメリステムから葉や茎が無秩序に発達する形態の異常が生じ

た。野生型に導入した場合には、この形態の異常は見られなかった。よって、VOZ:YFP 融合タンパク質が本来の機能を有していないか、このタンパク質を過剰発現させたことで異常なシグナルが生じた可能性が考えられた。これらの結果から、本研究により VOZ の局在を明らかにすることができなかったため、今後、蛍光タンパク質を VOZ の N 末端領域に付加するなど、コンストラクトの改善を行い、解析を行う必要がある。

VOZ の標的遺伝子

Mitsuda らの報告によって、*in vitro* の実験から VOZ の結合する DNA 配列が決定されている。VOZ の標的遺伝子が明らかになれば、VOZ の機能を知る上で重要な手がかりとなる。そこで、この DNA 配列と VOZ の結合が *in vivo* を反映しているかを確認するために、VOZ が結合するプロモーターを有する AVPI 遺伝子の発現を *voz1/voz2* 二重変異体で調べた。しかし、野生型と *voz1/voz2* で AVPI の mRNA 量に差はなかった。*in vitro* で同定された標的配列を有する遺伝子の中には、花成に関わるとされる PRECOZ 遺伝子が含まれる。VOZ が花成を促進することが明らかになったため、*voz1/voz2* 二重変異体におけるこの遺伝子の発現も調べたが、AVPI 同様に、野生株と *voz1/voz2* 二重変異体の間で mRNA 量に差はなかった。よって、*in vitro* で決定された VOZ の DNA 結合配列は、*in vivo* を反映していない可能性が高く、VOZ の標的を明らかにするためには、クロマチン免疫沈降法のような *in vivo* レベルでの実験が必要だと考えられた。

花成シグナル伝達経路における VOZ の上流

フィトクロムの光応答には、1 回のパルス照射や連続した光照射が有効な応答と光の明暗周期が必要な応答がある。明暗周期が必要な応答の代表は花成である。花成のシグナル伝達経路には、光周期依存促進経路、自律的促進経路、春化依存促進経路、ジベレリン依存促進経路が存在する。この中で、フィトクロムは、青色光受容体のクリプトクロムとともに光周期依存促進経路のシグナルを発信している。*phyA/voz1/voz2*、*phyB/voz1/voz2* の三重変異体が *voz1/voz2* 二重変異体同様に長日条件下で遅咲きであったことから、VOZ が *phyA*、*phyB* の下流で花成を促進していることが示唆された。*phyA* は花成の促進、*phyB* は花成の抑制に関わっており、VOZ は *phyA* と同じ花成促進に、*phyB* の花成抑制とは反対の方向に花成を調節していることになる。*phyA* と VOZ が相互作用する

ならば、*phyA* 変異体と *voz1/voz2* 変異体の花成時期は一致すると考えられる。しかし、*voz1/voz2* が白色光下で顕著な遅咲きを示すのに対し、*phyA* は野生型とほぼ変わらない。*phyA* は、FR を多く含む弱光で遅咲きになることが報告されており (Johnson et al., 1994)、今後そのような光条件で *voz1/voz2* の花成時期を調べる必要がある。一方、*phyB* 変異体は白色光下で早咲きとなり、*voz1/voz2* 変異体の遅咲きとは全く逆の表現型を示すことから、*phyB* と VOZ が相互作用するならば、VOZ は *phyB* の花成抑制機能を抑える働きをしていると推測される。

相互作用と花成促進の機能を別々に考える必要もある。概日時計を介して花成を抑制する ELF3 は、*in vitro* で *phyB* と相互作用することが報告されている。*ELF3* 欠損変異体は、R 下で胚軸伸長が抑制されないため、芽生えの胚軸伸長抑制ではフィトクロムとの相互作用を介して機能していると考えられた。しかし、花成に関しては、*phyB/ELF3 ox* が、*ELF3 ox* と同様に遅咲きになることから、*phyB* とは独立して機能していると考えられた (Liu et al., 2001)。また、*spa1* 変異体は、胚軸伸長抑制応答から *phyA* のシグナルを抑制する変異体として単離された (Hoecker et al., 1998)。しかし、花成に関しては、*phyA* と SPA1 は独立の経路で機能しており、SPA1 は CO との相互作用を介して、短日条件下での花成を抑制していることが明らかになっている (Laubinger et al., 2006)。これらの報告が示すように、本研究結果からのみでは、フィトクロムと VOZ の相互作用が花成と関与しているのかを断定することはできず、さらなる解析が必要であると考えられる。

また、光周期依存的な花成促進経路のシグナル発信には、フィトクロムだけでなく、青色光受容体であるクリプトクロムの関与が知られている (Lin C, 2000)。特に、*cry2* 変異体は白色光の長日条件下で遅咲きになることが報告されている (Mockler et al., 1999)。さらに、*phyA* と *cry1* (Ahmad et al., 1998)、*phyB* と *cry2* (Mas et al., 2000) の相互作用も報告されていることから、*voz1/voz2* 二重変異体の遅咲きは、R、FR だけでなく、青色光の影響が複合された結果であるかもしれない。よって、今後、様々な変異体を作製し、光質に対する応答を調べることで、VOZ とフィトクロムの関係を明らかにすることができると期待される。

花成シグナル伝達経路における VOZ の下流

voz1/voz2 二重変異体において、光周期依存的な *FT* mRNA の発現量の上昇が見られなかったことから、*VOZ* は *FT* の上流で機能する事が明らかになった。一方、*voz1/voz2* 二重変異体における *CO* mRNA の光周期依存的な発現量の変動パターンは野生型と変化がなかったため、*VOZ* は *CO* の転写調節には関わっていないことが示唆された。そこで、*VOZ* と *CO* の関係を探るために、*voz1/voz2* 二重変異体で *CO* を過剰発現させたところ、T1 世代の植物体は早咲きであった (data not shown)。このことから、*VOZ* は *CO* よりも上流に位置するか、あるいは *CO* とは別の経路で機能することが示唆された。*VOZ* が *CO* を介して *FT* を調節していると仮定すると、フィトクロムが *CO* タンパク質の分解を制御している (Valverde et al., 2004) ことから、*VOZ* も *CO* タンパク質の分解に関わっている可能性が考えられる。しかし、*CO* タンパク質は、非常に低発現であり、タンパク質量を調べることは容易ではない。よって、この仮説を検証するためには、高い力価を有する *CO* 抗体を作製し、核タンパク質のみを用いたウエスタンブロット解析を試みる必要がある。また、蛍光シグナルを指標にするために GFP-*CO* 融合タンパク質を導入した形質転換体を作製中である。一方、近年、光シグナルから *CO* を介さずに *FT* を調節する経路の存在も示唆されている (Cerdan and Chory, 2003)。よって、*VOZ* が *CO* とは独立した経路で *FT* を調節する可能性もあるため、今後、様々な角度から両者の関係を調べなければならない。*CO* は、光条件によって、核への蓄積量が増加するタンパク質であるため (Valverde et al., 2004)、*VOZ* の細胞内局在や挙動を明らかにすることから、両タンパク質の時間的、空間的な関係を探ることができると考えられる。

イネやアサガオのような短日植物は、明暗周期下において、連続した暗期の長さを感じており、暗期中に光を照射すると花成が阻害されることが知られている。近年、短日植物の花成調節機構について、興味深い報告がされた。2005年、イネを用いた研究から、光中断における花成の抑制は、*phyB* が *FT* のホモログである *Hd3a* の発現を抑制することが原因であることが Ishikawa らによって明らかにされた (Ishikawa et al., 2005)。さらに、*CO* から *FT* への発現制御経路は、短日植物でも長日植物同様に保存されているにも関わらず、光中断を与えても、与えなくても *CO* のホモログである *Hd1* の発現量の変動パターンは変わらないことも報告されている。よって、光中断実験における *Hd1* と *Hd3a* の発現量の変化と、これに起因する花成の抑制は、*voz1/voz2* 二重変異体における

現象と酷似している。よって、VOZ は短日植物の光中断における花成抑制に関与している可能性が考えられた。今後、光中断実験によっても、フィトクロムから VOZ を介する花成のシグナル伝達機構を明らかにすることができるかもしれない。

本章では、フィトクロム相互作用因子の単離とその機能解析を目的とした。フィトクロムと VOZ の関係、および VOZ と CO の関わりは明確になっていないが、CO、FT を介するシグナル伝達経路は、シロイヌナズナやイネだけでなく、塊茎植物のポテト (Rodriguez-Falcon et al., 2006) や樹木のポプラ (Bohlenius et al., 2006) の光周性制御にも存在する極めて主要な経路である。VOZ の相同性検索の結果、様々な植物から相同性を示すタンパク質が見いだされたことは、VOZ がこの経路で重要な機能を果たしていることを裏付けているのかもしれない。VOZ は、voz1/voz2 二重欠損変異体でなければ表現型が現れないため、変異体のスクリーニングで単離することは困難な遺伝子である。よって、光周期依存的な花成促進経路で機能している新規の花成促進因子の発見は、本研究の大きな成果であったと考えられた。

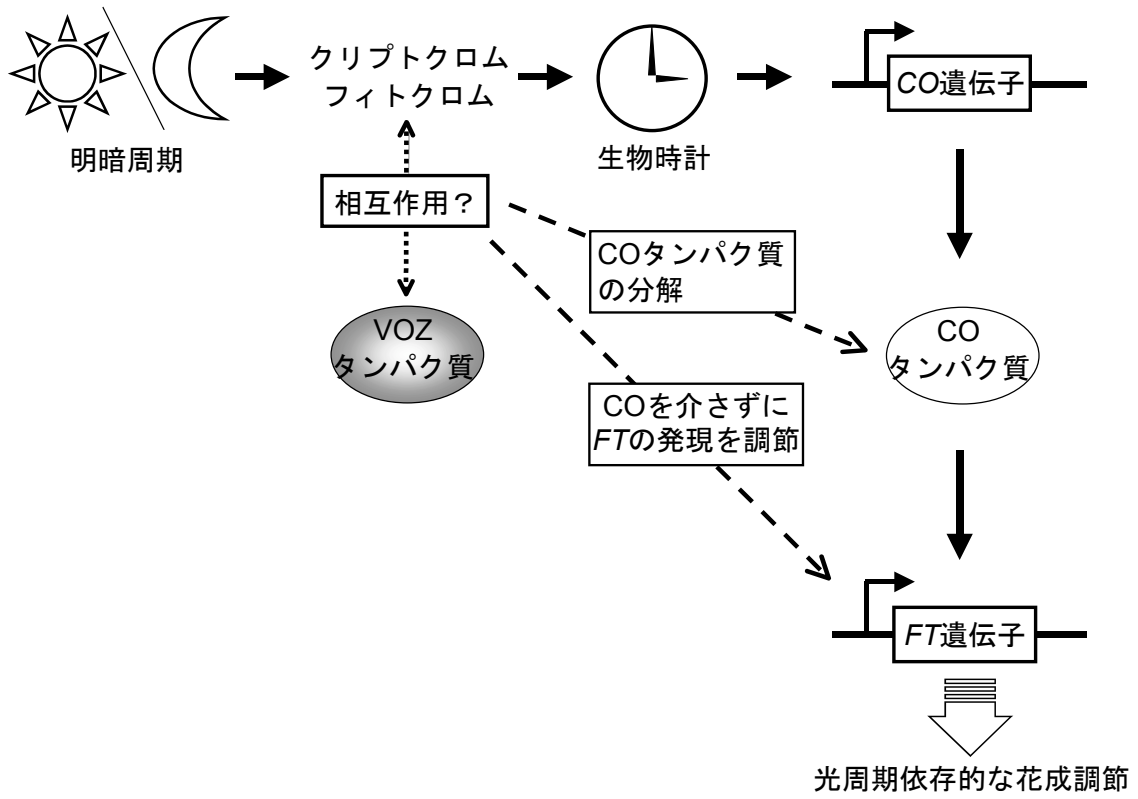


Fig. 3-17 光周期依存的な花成促進経路における VOZ の位置づけ

VOZ と光受容体の関係は明らかではないが、光周期依存的促進経路において、CO タンパク質の分解調節、あるいは CO を介さない新たな経路で FT の発現を誘導し、花成を促進していると考えられる。

結論

本研究では、第一に遺伝学的な手法により *HY2* 遺伝子の単離を行った。発色団生合成経路に異常をきたす *hy2* 変異体を用い、遺伝学的なマッピングによって、*HY2* 座を限定した。シロイヌナズナのデータベースを利用して、*HY2* 座を予測したところ、*HY2* 候補遺伝子として MZB10.18 が見つかった。その後、*hy2* 変異体における MZB10.18 遺伝子の塩基配列解析と発現解析の結果、および MZB10.18 による相補性テストの結果から、MZB10.18 を *HY2* 遺伝子と同定した。次に、全長 *HY2* cDNA を cDNA ライブラリーからのスクリーニングによって単離した。局在解析からは *HY2* タンパク質が葉緑体移行シグナル配列を有することが明らかとなり、PΦB が葉緑体で生合成されるというこれまでの知見と一致した。また、組換え *HY2* タンパク質を精製し、PΦB シンターゼ活性の測定を行ったところ、*HY2* が還元型フェレドキシン依存の PΦB シンターゼ活性を有することが明らかとなった。以上により、PΦB シンターゼをコードする *HY2* 遺伝子を単離、同定し、*HY2* がフィトクロム発色団生合成経路の最終段階の反応を触媒することが明らかになった。植物におけるビリン還元酵素の単離は、本研究が初めてであり、この *HY2* の単離がきっかけとなって、藍藻で機能するビリン還元酵素も明らかとなった。

HY2 が単離されたことにより、ヘム以降の PΦB 生合成に特異的な経路が明らかとなり、PΦB を人工的に合成することが可能となった。そこで、PΦB を結合した光受容能を有するフィトクロムを容易に得るために、大腸菌におけるフィトクロム発現系の構築を行った。大腸菌で PΦB の生合成酵素である HO と *HY2*、あるいは PcyA とアポタンパク質の N 末端領域を共発現させることで、目的の発色団を有するフィトクロムを合成し、精製することができた。この組換えフィトクロムのほとんどが、発色団を有するフィトクロムであった。また、全長の phyB も合成することができ、暗反転速度の解析を行った。以上、光受容能をもつフィトクロムの発現系が構築でき、合成したフィトクロムは、物理化学的な解析をはじめとする様々な解析に有効なツールとなることが期待された。

さらに、フィトクロム光シグナル発信のメカニズムを明らかにすることを目指して、フィトクロムの新規相互作用因子の探索を行った。全長のアポタンパク質を用い、抽台直後のロゼット葉由来の cDNA ライブラリーから Y2H 法に

よってスクリーニングを行った結果、候補因子として *VOZ1* および *VOZ2* が得られた。そこで、*in vitro* における相互作用の光質特異性を上述の組換えフィトクロムを用いて調べたところ、*VOZ1*、*VOZ2* とともに **FR** 照射によって生成される Pr 型の *phyA* と結合の親和性が高いことが示唆された。次に、*VOZ* 遺伝子の生理的な役割を調べるために、*voz1/voz2* 二重変異体の表現型解析を行ったところ、長日条件下においてのみ遅咲きであった。よって、*VOZ* は光周期依存的なシグナル伝達経路で花成を促進していることが明らかになった。さらに、この経路で機能する *CO* と *FT* の長日条件下における発現量の変動パターンを調べた。その結果、*voz1/voz2* 二重変異体において *FT* の光周期依存的な発現量の上昇が起こらず、これが *voz1/voz2* 二重変異体の花成遅延の原因であることが明らかになった。以上、*phyA* と *VOZ* の相互作用に関しては、さらなる解析が必要であるが、これまでに明らかにされている *phyA* の相互作用因子は少ないため、今後の解析に期待が持たれる。また、光周期依存的な花成促進経路もフィトクロム→*CO*→*FT* の間は不明であるため、*VOZ* は、未だ明らかでない花成に関するフィトクロムからの光シグナル伝達経路を解明していくターゲットとして最適であると期待された。

本研究では、*HY2* 遺伝子の単離による発色団生合成経路の解明、光受容能をもつ組換えフィトクロム発現系の構築を行い、フィトクロム相互作用因子の単離による光シグナル伝達経路の解明を目指した。発色団生合成経路の解明や組換えフィトクロム発現系の構築は、研究のツールを広げることで光シグナル伝達経路の解明に有効であった。また、*VOZ* の単離は、直接的な光シグナル伝達経路の解明に繋がると考えられる。今後、これらの成果により、光シグナル伝達経路の解明が進むことが期待される。

謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科、分化・形態形成学講座の横田明穂教授のもとで行われました。ご指導、ご鞭撻のほど誠にありがとうございました。直接ご指導下さりました京都大学大学院生命科学研究科の河内孝之教授（前、分化・形態形成学講座助教授）には、大変お世話になりました。ありがとうございました。石川県立大学の竹村美保助教授（前、分化・形態形成学講座助手）には、研究のアドバイスだけでなく、ライブラリーやコンストラクトの実験材料を分与頂きました。ありがとうございました。

京都大学大学院理学研究科の長谷あきら教授には、フィトクロム抗体を分与頂き、島根大学の中川博士には、Gateway 用のバイナリーベクターを頂きました。ありがとうございました。本研究第一章における共同研究研究者の Lagarias J.C.教授、Frankenberg N.博士、第三章における共同研究者の京都府立大学の佐藤雅彦助教授にこの場を借りて深く感謝申し上げます。また、第一章において丁寧にご指導下さりました増田宗久さん、第二章の共同研究者である小林聡和さん、第三章の共同研究者である京都大学谷朋子さん、硯亮太さんに感謝します。分化・形態形成学講座の皆様、および京都大学大学院遺伝子特性学講座の皆様には大変お世話になりました。ありがとうございました。

本研究は日本学術振興会特別研究員としてのサポートを頂きました。支援して頂いたことに感謝致します。

参考文献

- An H, Roussot C, Suarez-Lopez P, Corbesier L, Vincent C, Pineiro M, Hepworth S, Mouradov A, Justin S, Turnbull C, Coupland G. (2004) CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development*, 131, 3615-26.
- Ahmad M, Jarillo JA, Smirnova O, Cashmore AR. (1998) The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A *in vitro*. *Mol Cell.*, 7, 939-48.
- Aukerman MJ, Hirschfeld M, Wester L, Weaver M, Clack T, Amasino RM, Sharrock RA. (1997) A deletion in the PHYD gene of the *Arabidopsis* Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *Plant Cell*, 9, 1317-26.
- Bauer D, Viczian A, Kircher S, Nobis T, Nitschke R, Kunkel T, Panigrahi KC, Adam E, Fejes E, Schafer E, Nagy F. (2004) Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16, 1433-45.
- Beale, S. I., Cornejo, J. (1991) Biosynthesis of phycobilins. Ferredoxin-mediated reduction of biliverdin catalyzed by extracts of *Cyanidium caldarium*. *J Biol Chem.*, 266, 22328-32
- Bhoo SH, Davis SJ, Walker J, Karniol B, Vierstra RD. (2001) Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature*, 414, 776-9.
- Bohlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, Brunner AM, Jansson S, Strauss SH, Nilsson O. (2006) CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science*, 312, 1040-3.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Cerdan PD, Chory J. (2003) Regulation of flowering time by light quality. *Nature*, 423, 881-5.
- Choi G, Yi H, Lee J, Kwon YK, Soh MS, Shin B, Luka Z, Hahn TR, Song PS. (1999) phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature*, 401, 610-3.
- Chory, J., Peto, C.A., Ashbaugh, M., Saganich, R., Pratt, L., and Ausubel, F. (1989) Different roles for phytochrome in etiolated and green plants deduced from characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Plant Cell*, 1, 867-880.
- Colon-Carmona A, Chen DL, Yeh KC, Abel S. (2000) Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome *in vitro*. *Plant Physiol.*, 124, 1728-38.
- Cornejo J, Robert DW, Beale SI. (1998) Phytobilin biosynthesis: cloning and expression of a gene encoding soluble ferredoxin-dependent heme oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J.*, 15, 99-107.
- Deforce L, Tomizawa K, Ito N, Farrens D, Song PS, Furuya M. (1991) In vitro assembly of apophytochrome and apophytochrome deletion mutants expressed in yeast with phycocyanobilin. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 88, 10392-6.
- Devlin PF, Patel SR, Whitelam GC. (1998) phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 1479-87.

- Devlin PF, Robson PR, Patel SR, Goosey L, Sharrock RA, Whitelam GC. (1999) phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiol.*, 119, 909-15.
- Duek PD, Fankhauser C. (2005) bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. *Trends Plant Sci.*, 10, 51-4. Review.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19, 1349.
- Emborg TJ, Walker JM, Noh B, Vierstra RD. (2006) Multiple heme oxygenase family members contribute to the biosynthesis of the phytochrome chromophore in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 140, 856-68.
- Frankenberg N, Lagarias JC. (2003) Phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase of *Anabaena* sp. PCC 7120. Biochemical and spectroscopic. *J Biol Chem.* 278, 9219-26.
- Frankenberg N, Mukougawa K, Kohchi T, Lagarias JC. (2001) Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *Plant Cell*, 13, 965-78.
- Fankhauser C, Yeh KC, Lagarias JC, Zhang H, Elich TD, Chory J. (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science*, 284, 1539-41.
- Franklin KA, Davis SJ, Stoddart WM, Vierstra RD, Whitelam GC. (2003a) Mutant analyses define multiple roles for phytochrome C in *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Plant Cell*, 15, 1981-9.
- Franklin KA, Praekelt U, Stoddart WM, Billingham OE, Halliday KJ, Whitelam GC. (2003b) phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 131, 1340-6.
- Franklin KA, Whitelam GC. (2005) Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Ann Bot (Lond)*, 96, 169-75.
- Gambetta GA, Lagarias JC. (2001) Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10566-71.
- Gill, S. C. and von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG, Collier JL. (1993) The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev.*, 57, 725-49
- Hagiwara Y, Sugishima M, Takahashi Y, Fukuyama K. (2006) Crystal structure of phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase in complex with biliverdin IX alpha, a key enzyme in the biosynthesis of phycocyanobilin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 27-32.
- Hennig L, Stoddart WM, Dieterle M, Whitelam GC, Schafer E. (2002) phytochrome E controls light-induced germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 128, 194-200.
- Hoecker U, Xu Y, Quail PH. (1998) SPA1: a new genetic locus involved in phytochrome A-specific signal transduction. *Plant Cell*, 10, 19-33.

- Huq E, Al-Sady B, Hudson M, Kim C, Apel K, Quail PH. (2004) phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science*, 305, 1937-41.
- Huq E, Quail PH. (2002) PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.*, 21, 2441-50.
- Imaizumi T, Kay SA. (2006) Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends Plant Sci.*, 11, 550-8.
- Ishikawa R, Tamaki S, Yokoi S, Inagaki N, Shinomura T, Takano M, Shimamoto K. (2005) Suppression of the floral activator Hd3a is the principal cause of the night break effect in rice. *Plant Cell*, 17, 3326-36.
- Jarillo JA, Capel J, Tang RH, Yang HQ, Alonso JM, Ecker JR, Cashmore AR. (2001) An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature*, 410, 487-90.
- Jiang Z, Swem LR, Rushing BG, Devanathan S, Tollin G, Bauer CE. (1999) Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science*, 285, 406-9.
- Johnson E, Bradley M, Harberd NP, Whitelam GC. (1994) Photoresponses of Light-Grown phyA Mutants of *Arabidopsis* (Phytochrome A Is Required for the Perception of Daylength Extensions). *Plant Physiol.*, 105, 141-149.
- Kakuta Y, Horio T, Takahashi Y, Fukuyama K. (2001) Crystal structure of *Escherichia coli* Fdx, an adrenodoxin-type ferredoxin involved in the assembly of iron-sulfur clusters. *Biochemistry*, 40, 11007-12.
- Kami C, Mukougawa K, Muramoto T, Yokota A, Shinomura T, Lagarias JC, Kohchi T. (2004) Complementation of phytochrome chromophore-deficient *Arabidopsis* by expression of phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101,1099-104.
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.*, 3, 109-36.
- Kebrom TH, Burson BL, Finlayson SA. (2006) phytochrome B represses Teosinte Branched1 expression and induces *sorghum* axillary bud outgrowth in response to light signals. *Plant Physiol.*, 140, 1109-17.
- Kehoe DM, Grossman AR. (1997) New classes of mutants in complementary chromatic adaptation provide evidence for a novel four-step phosphorelay system. *J Bacteriol.*, 179, 3914-21.
- Khanna R, Huq E, Kikis EA, Al-Sady B, Lanzatella C, Quail PH. (2004) A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Cell*, 16, 3033-44.
- Kim J, Yi H, Choi G, Shin B, Song PS, Choi G. (2003) Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochromemediated light signal transduction. *Plant Cell*, 15, 2399-407.
- Kohchi T, Mukougawa K, Frankenberg N, Masuda M, Yokota A, Lagarias JC. (2001) The *Arabidopsis* HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell*. 13, 425-36.
- Koornneef M, Rolf E, Spruit CJP. (1980) Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana*. *L. Heynh. Z. Pflanzenphysiol.*, 100, 147-160.

- Kraepiel Y, Julien M, Cordonnier-Pratt M.-M. Pratt LH. (1994) Identification of two loci involved in phytochrome expression in *Nicotiana plumbaginifolia* and lethality of the corresponding double mutant. *Mol. Gen. Genet.*, 242, 559-565.
- Lagarias DM, Crepeau MW, Maines MD, Lagarias JC. (1997) Regulation of photomorphogenesis by expression of mammalian biliverdin reductase in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, 9, 675-688.
- Lagarias JC and Rapoport H. (1980) Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the PR form of the phytochrome chromophore. *J.An.Chem.Soc.*, 102, 4821-4828.
- Lamparter T, Michael N, Mittmann F, Esteban B. (2002) phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99, 11628-33.
- Lamparter T, Mittmann F, Gartner W, Borner T, Hartmann E, Hughes J. (1997) Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94, 11792-7.
- Landgraf FT, Forreiter C, Hurtado Pico A, Lamparter T, Hughes J. (2001) Recombinant holophytochrome in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 508, 459-62.
- Laubinger S, Marchal V, Gentilhomme J, Wenkel S, Adrian J, Jang S, Kulajta C, Braun H, Coupland G, Hoecker U. (2006) *Arabidopsis* SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development*, 133, 3213-22.
- Liu XL, Covington MF, Fankhauser C, Chory J, Wagner DR. (2001) *ELF3* encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an *Arabidopsis* PHYB signal transduction pathway. *Plant Cell*, 13, 1293-304.
- Li L, Lagarias JC. (1992) Phytochrome assembly. Defining chromophore structural requirements for covalent attachment and photoreversibility. *J Biol Chem.*, 267, 19204-10.
- Lin C. (2000) Photoreceptors and regulation of flowering time. *Plant Physiol.*, 123, 39-50.
- Mas P, Devlin PF, Panda S, Kay SA. (2000) Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature*, 408, 207-11.
- Matsushita T, Mochizuki N, Nagatani A. (2003) Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature*, 424, 571-4.
- Mitsuda N, Hisabori T, Takeyasu K, Sato MH. (2004) VOZ; isolation and characterization of novel vascular plant transcription factors with a one-zinc finger from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 45, 845-54.
- Mockler TC, Guo H, Yang H, Duong H, Lin C. (1999) Antagonistic actions of *Arabidopsis* cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development*, 126, 2073-82.
- Monte E, Alonso JM, Ecker JR, Zhang Y, Li X, Young J, Austin-Phillips S, Quail PH. (2003) Isolation and characterization of phyC mutants in *Arabidopsis* reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. *Plant Cell*, 15, 1962-80.
- Montgomery BL, Yeh KC, Crepeau MW, Lagarias JC. (1999) Modification of distinct aspects of photomorphogenesis via target expression of mammalian biliverdin reductase in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol.*, 121, 629-639.

- Muramoto T, Kami C, Kataoka H, Iwata N, Linley PJ, Mukougawa K, Yokota A, Kohchi T. (2005) The tomato photomorphogenic mutant, *aurea*, is deficient in phytochromobilin synthase for phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant Cell Physiol.*, 46, 661-5.
- Muramoto T, Kohchi T, Yokota A, Hwang I, Goodman HM.(1999) The *Arabidopsis* photomorphogenic mutant *hyl* is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase. *Plant Cell.* 11, 335-48.
- Muramoto T, Tsurui N, Terry MJ, Yokota A, Kohchi T. (2002) Expression and biochemical properties of a ferredoxin-dependent heme oxygenase required for phytochrome chromophore synthesis. *Plant Physiol.*, 130, 1958-66.
- Nakazawa M, Kakihana J, Hisabori T, Manabe K. (1990) Purification and spectral characterization of a 121-kilodalton phytochrome from etiolated pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 31, 789-6.
- Neff MM, Chory J. (1998) Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.*, 118, 27-35.
- Ni M, Tepperman JM, Quail PH. (1998) PIF3, a phytochromeinteracting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell*, 95, 657-67.
- Frankenberg N, Mukougawa K, Kohchi T, Lagarias JC. (2001) Functional Genomic Analysis of the HY2 Family of Ferredoxin-Dependent Bilin Reductases from Oxygenic Photosynthetic Organisms. *Plant Cell*, 13, 965-978
- Oka Y, Matsushita T, Mochizuki N, Suzuki T, Tokutomi S, Nagatani A. (2004) Functional analysis of a 450-amino acid N-terminal fragment of phytochrome B in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16, 2104- 16.
- Parks BM, Shanklin J, Koornneef M, Kendrick RE, Quail PH. (1989) Immunochemically detectable phytochrome is present at normal levels but is photochemically non-functional in the *hyl* and *hy2* long hypocotyl mutants of *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, 12, 425-437.
- Parks BM and Quail PH. (1991) phytochromedeficient *hyl* and *hy2* long hypocotyl mutants of *Arabidopsis* are defective in phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant Cell*, 3, 1177-1186.
- Phee BK, Shin DH, Cho JH, Kim SH, Kim JI, Lee YH, Jeon JS, Bhoo SH, Hahn TR. (2006) Identification of phytochromeinteracting protein candidates in *Arabidopsis thaliana* by co-immunoprecipitation coupled with MALDI-TOF MS. *Proteomics*, 6, 3671-80.
- Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y, Wagner D. (1995) phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science*, 268, 675-80.
- Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC. (2006) phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol.*, 57, 837-58.
- Rodriguez-Falcon M, Bou J, Prat S. (2006) SEASONAL CONTROL OF TUBERIZATION IN POTATO: Conserved Elements with the Flowering Response. *Annu Rev Plant Biol.*, 57, 151-80.
- Ruddat A, Schmidt P, Gatz C, Braslavsky SE, Gartner W, Schaffner K.(1997) Recombinant type A and B phytochromes from potato. Transient absorption spectroscopy. *Biochemistry*. 36, 103-11.

- Ryu JS, Kim JI, Kunkel T, Kim BC, Cho DS, Hong SH, Kim SH, Fernandez AP, Kim Y, Alonso JM, Ecker JR, Nagy F, Lim PO, Song PS, Schafer E, Nam HG. (2005) phytochromespecific type 5 phosphatase controls light signal flux by enhancing phytochrome stability and affinity for a signal transducer. *Cell*, 120, 395-406.
- Sawers RJ, Linley PJ, Gutierrez-Marcos JF, Delli-Bovi T, Farmer PR, Kohchi T, Terry MJ, Brutnell TP. (2004) The *Elm1* (*ZmHy2*) gene of maize encodes a phytochromobilin synthase. *Plant Physiol.*, 136, 2771-81.
- Schmitz O, Katayama M, Williams SB, Kondo T, Golden SS. (2000) CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science*, 289, 765-8.
- Somers DE, Quail PH. (1995) Temporal and spatial expression patterns of PHYA and PHYB genes in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 7, 413-27.
- Suzuki S, Izumihara K, Hase T. (1991) Plastid Import and Iron-Sulfur Cluster Assembly of Photosynthetic and Nonphotosynthetic Ferredoxin Isoproteins in Maize. *Plant Physiol.*, 97, 375-380.
- Sweere U, Eichenberg K, Lohrmann J, Mira-Rodado V, Baurle I, Kudla J, Nagy F, Schafer E, Harter K. (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science*, 294, 1108-11.
- Takada S, Goto K. (2003) Terminal flower2, an *Arabidopsis* homolog of heterochromatin protein1, counteracts the activation of flowering locus T by constans in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *Plant Cell*, 15, 2856-65.
- Terry MJ, Lagarias JC. (1991) Holophytochrome assembly. Coupled assay for phytochromobilin synthase in organello. *J Biol Chem.*, 266, 22215-21.
- Terry, MJ., McDowell, MT., and Lagarias, J.C. (1995). (3Z)- and (3E)- phytochromobilin are intermediates in the biosynthesis of the phytochrome chromophore. *J. Biol. Chem.* 270, 11111-11118.
- Terry MJ, Kendrick RE. (1999) Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient *aurea* and *yellow-green-2* mutants of tomato. *Plant Physiol.*, 119, 143-52.
- Tomizawa K, Ito N, Komeda Y, Uyeda TQP, Takio K, and Furuya M (1991) Characterization and Intracellular Distribution of Pea Phytochrome I Polypeptides Expressed in *E. coli*. *Plant Cell Physiol.*, 32, 95-102.
- Torres-Galea P, Huang LF, Chua NH, Bolle C. (2006) The GRAS protein SCL13 is a positive regulator of phytochromedependent red light signaling, but can also modulate phytochrome A responses. *Mol Genet Genomics.*, 276,13-30.
- Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G. (2004) Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science*, 303, 1003-6.
- Van Tuinen A, Hanhart CJ, Kerckhoffs LHJ, Nagatani A, Boylan MT, Quail PH, Kendrick RE, Koornneef M. (1996) Analysis of phytochromedeficient *yellow-green-2* and *aurea* mutants of tomato. *Plant J.*, 9, 173-182.
- Wahleithner JA, Li LM, Lagarias JC. (1991) Expression and assembly of spectrally active recombinant holophytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 88, 10387-91.

Wuthrich KL, Bovet L, Hunziker PE, Donnison IS, Hortensteiner S. (2000) Molecular cloning, functional expression and characterisation of RCC reductase involved in chlorophyll catabolism. *Plant J.*, 21, 189-98

Yeh KC, Wu SH, Murphy JT, Lagarias JC. (1997) A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science*, 277, 1505-8.

Yoshihara S, Shimada T, Matsuoka D, Zikihara K, Kohchi T, Tokutomi S. (2006) Reconstitution of blue-green reversible photoconversion of a cyanobacterial photoreceptor, PixJ1, in phycocyanobilin-producing *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 45, 3775-84.

Zhu Y, Tepperman JM, Fairchild CD, Quail PH. (2000) phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97, 13419-24.

島本 功, 岡田清孝 (編). 新版 モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ編 (2001) 秀潤社,

鶴居 義之 (2001) シロイヌナズナのフィトクロム発色団生合成酵素の発現と in vivo 反応機構に関する研究 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文

小林 聡和 (2005) シロイヌナズナのホロフィトクロムの大腸菌発現系の確立と相互作用因子の探索 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文

論文目録

The *Arabidopsis* *HY2* gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase.

Kohchi T, Mukougawa K, Frankenberg N, Masuda M, Yokota A, Lagarias JC.

2001年2月, Plant Cell 13, 425-436

Metabolic engineering to produce phytochromes with phytochromobilin, phycocyanobilin, or phycoerythrobilin chromophore in *Escherichia coli*.

Mukougawa K, Kanamoto H, Kobayashi T, Yokota A, Kohchi T.

2006年2月, FEBS Lett. 580, 1333-1338

Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms.

Frankenberg N, Mukougawa K, Kohchi T, Lagarias JC.

2001年4月, Plant Cell 13, 965-978

Complementation of phytochrome chromophore-deficient *Arabidopsis* by expression of phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase.

Kami C, Mukougawa K, Muramoto T, Yokota A, Shinomura T, Lagarias JC, Kohchi T.

2004年1月, Proc Natl Acad Sci U S A. 101, 1099-1104

The tomato photomorphogenetic mutant, *aurea*, is deficient in phytochromobilin synthase for phytochrome chromophore biosynthesis.

Muramoto T, Kami C, Kataoka H, Iwata N, Linley PJ, Mukougawa K, Yokota A, Kohchi T.

2005年4月, Plant Cell Physiol. 46, 661-665