

論文内容の要旨

申請者氏名 蘆田佳子

植物の赤色光／遠赤色光受容体であるフィトクロムは、植物が光環境に適応した形態形成を行うために重要なタンパク質である。フィトクロムは、発色団としてフィトクロモビルン (PΦB) を有しているが、その生合成経路は明らかではなかった。そこで、PΦB 生合成に異常をきたすシロイヌナズナの *hy2* 変異体を用い、遺伝学的な手法により、*HY2* 遺伝子の単離・同定を行った。次に、*HY2* タンパク質の生化学的解析により、*HY2* が還元型フェレドキシン依存の 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 PΦB 生合成反応の実体が全て明らかになった。さらに、*HY2* の単離がきっかけとなり、光合成生物におけるピリン還元酵素遺伝子ファミリーの存在が明らかになり、藍藻の重要な集光性色素であるフィコビルンの生合成酵素遺伝子 (PcyA、PebA、PebB) が同定できた。

これらの成果をもとに、大腸菌において PΦB を結合した光受容能を有するフィトクロムの発現系の構築を行った。大腸菌で PΦB を合成するヘムオキシゲナーゼと PΦB シンターゼ、およびフィトクロムタンパク質の N 末端領域を共発現させたところ、発色団をもち、光受容能を有するフィトクロムが合成された。また、同発現系で合成した全長 *phyB* を用いた暗反転速度の解析により、フィトクロム発色団の D 環の側鎖が Pfr 型の *phyB* の安定性に寄与していることを明らかにした。

さらに、フィトクロム光シグナル発信の分子機構の解明を目指して、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 ライブラリーから酵母 Two-hybrid 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。組換えフィトクロムを用いて、*in vitro* における相互作用の光質特異性を調べたところ、*VOZ1*、*VOZ2* とともに 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、*VOZ* 欠損変異体、および *VOZ* とフィトクロムの多重欠損変異体を用いて表現型解析を行った。その結果、*VOZ* がフィトクロムの下流で機能し、光周期依存的に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 *CONSTANS* (*CO*)、*Flowering locus T* (*FT*) と *VOZ* の関係を調べたところ、*VOZ* は *CO* の転写には寄与しないが、*FT* の転写を調節することが明らかとなった。

シロイヌナズナ *HY2* 遺伝子の単離によるフィトクロム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、植物における光受容体からの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。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 蘆田佳子

本論文では、フィトクロム発色団生合成経路の解明から、組換えフィトクロム発現系の構築、および、フィトクロムの新規相互作用因子の単離を通して、フィトクロムの光シグナル伝達機構を分子的に解明することを目的としている。

シロイヌナズナのHY2遺伝子の単離同定と機能解析により、本研究で初めて植物におけるピリン還元酵素が単離された。これに伴い、藍藻のピリン還元酵素も明らかにされ、植物や藍藻に一群のピリン還元酵素が存在することが明らかにされた。本成果により、フィトクロム発色団生合成に特異的な経路が全て明らかになったことで、大腸菌などの異種生物内での光受容能を有するフィトクロム合成が可能になった。また、藍藻のピリン還元酵素遺伝子を利用して、植物内での発色団の修飾が可能になり、光応答におけるフィトクロム発色団の構造の重要性を解析できるようになった。これらはフィトクロム研究分野における大きな貢献である。

光受容能を有する組換えフィトクロム発現系の構築では、これまで精製や抽出が困難であったフィトクロモピリン (PΦB) を容易に利用できるようになった点で大きな意義がある。これにより、分子レベルからも発色団の構造の重要性を研究することが可能となり、本研究では、発色団の違いによって、phyB の暗反転速度が異なることを示している。また、本発現系により合成したフィトクロムタンパク質が、全て発色団を有していることを明らかにした意義は大きく、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できる。

フィトクロムの信号伝達機構は、この10年間のフィトクロム相互作用因子の精力的な解析から一定の成果が得られているが、phyA および phyB の光シグナル伝達機構の全貌の解明には至っていない。また、光周期依存的な花成促進経路において、光受容体による光受容から CO-FT に至る経路は、植物で広く保存された経路であるが、その制御の詳細はまだ明らかになっていない。よって、相互作用因子として申請者が同定した VOZ が光周期依存的な花成促進経路で機能することは大きな発見である。VOZ は、未だ明らかでない花成に関与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、非常に興味深い。

以上のように、本論文は植物のフィトクロム発色団生合成経路を明らかにし、この成果を用い、大腸菌内における植物フィトクロム合成系を確立した。さらにフィトクロム合成系を応用することで、植物の新規フィトクロム相互作用因子 VOZ を単離し、VOZ が関わる植物の花成調節機構のモデルを提唱した。この研究結果は、フィトクロム研究を大きく進展させるツールを提供したと共に、植物生理現象で重要なイベントである花成の新たな分子メカニズムを発見したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。