

Title	寄生植物ヤセウツボのフィトクロム応答およびフィトクロムAホモログの機能に関する研究
Author(s)	高木, 一輝
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57514
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	高木 一輝
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 23349 号
学位授与年月日	平成21年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物学専攻
学位論文名	寄生植物ヤセウツボのフィトクロム応答およびフィトクロムAホモログの機能に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 福崎英一郎 (副査) 教授 大竹 久夫 教授 藤山 和仁 教授 杉本 幸裕 (神戸大学大学院 農学研究科) 教授 福井 希一 教授 原島 俊 教授 仁平 卓也 教授 清水 浩

論文内容の要旨

植物は光受容体によって外部の光環境を認識し、生態調節に利用することで環境に対応する。この光受容体の1つとしてフィトクロム (phytochrome; phy) が知られている。フィトクロムは赤色/遠赤色光の光受容体で、暗所にて細胞質に蓄積され、赤色光照射により核へと移行する。活性型フィトクロムは遠赤色光により可逆的に不活性型へと変換される。また、フィトクロムAは微弱な白色光下で不可逆的に活性型に変化し、下流の光応答性遺伝子の発現を制御している。このように植物中ではフィトクロムをはじめとする光受容体を起点とする複雑な光情報伝達系が構築されている。

本研究では、全寄生植物であるヤセウツボに着目した。寄生植物は光合成を行わず宿主に寄生することで生育に必要な養分を獲得している。そのため、光合成植物と比較して光情報伝達系の必要性が低下していると考えられる。既にヤセウツボより *PHYA* 遺伝子(*OmPHYA*) が単離されており、そのアミノ酸配列とシロイヌナズナの *phyA* のアミノ酸配列の相同性は 71% である。また、15 種の光合成植物の *phyA* と比較した結果、26 個所でアミノ酸の置換が認められた。また、これらのアミノ酸の置換は、GAF, PHY, PAS 等のシグナル伝達に重要であると考えられているドメイン中にも多く確認できた。

そこで、本研究では、ヤセウツボにおけるフィトクロム特徴的な光応答反応解析、*OmphyA* の分子生物学的性質の解析、ならびに、*OmphyA* 機能評価系としてのシロイヌナズナ *OmPHYA* 形質転換体の解析を通して、植物の光情報伝達系について新たな知見を得る為の遺伝子資源としての *OmphyA* の有用性の検証を目的とした。

第1章ではヤセウツボのフィトクロムに特徴的な光応答解析を行った。これまでに、植物の *phyA* に特徴的な光応答として、発芽、地上部の伸長、ならびに、アントシアニンの蓄積が確認されている。そこで、これらの光応答をヤセウツボについて確認した。その結果、白色および赤色光によって発芽が抑制され、暗所および遠赤色光下での発芽率はほぼ同等であった。また、赤色光による発芽抑制が遠赤色光で打ち消されることから、ヤセウツボも光可逆的な *phy* 応答を示すことが確認できた。地上部の伸長時には、白色光および遠赤色光が阻害効果をもつことを確認した。しかし、赤色光は阻害効果を示さなかった。以上の光応答のパターンは、光合成植物とは全く異なるヤセウツボ独自のものであった。アントシアニンについては白色光および遠赤色光下で蓄積量の増加

が認められ、暗所および赤色光での蓄積量が同等であったことから、ヤセウツボにおけるアントシアニンの生合成は *OmphyA* が制御していることが示唆された。

第2章では *OmphyA* の分子生物学的解析を行った。*OmphyA* の細胞内局在、遺伝子発現量ならびにタンパク質発現量の光応答性について解析を行った。ヤセウツボより調製したプロトプラストに *OmphyA::mGFP* を発現させたところ、暗所では細胞質全体に、明所では核に局在が認められた。また、*OmPHYA* の発現量は暗所において最も高く、光照射によりその発現が抑制された。*OmphyA* のタンパク質発現量は暗所において長日条件の 4~5 倍であることを確認した。これらの結果より、*OmphyA* はこれまでに報告のあった光合成植物の *phyA* と同様の分子生物学的性質を有していることが明らかとなった。

第3章では *OmphyA* のシロイヌナズナ *phyA* 相補性の評価を行った。シロイヌナズナを用いて *OmphyA* の機能を解析することが可能かどうかを評価するために、*phyA* 欠損変異株 (*phyA-211*) に *OmPHYA* 遺伝子を導入した形質転換体を作出した。この形質転換体の遠赤色光下での胚軸長を測定した結果、表現型の回復は見られなかった。さらに、マイクロアレイおよびメタボローム解析を行った。マイクロアレイ解析の結果、*OmPHYA* を導入した形質転換体は、変異株に近い遺伝子発現プロファイルを示したが、一部野生株と同様の光応答を示す遺伝子が存在することが判明した。また、メタボロームの主成分分析を行った結果、野生株および変異株とは異なるクラスターを形成しており、一次代謝プロファイルを表現型とした場合には、変異株とは形質が異なることが判明した。そこで、シロイヌナズナ *PHYA* の N 末端側および C 末端側を *OmPHYA* に置き換えたキメラ形質転換体を作出し、再度遠赤色光下にて胚軸長を測定した結果、*OmPHYA* C 末端のキメラ *PHYA* 形質転換体が中程度の表現型の回復を示した。本研究により、シロイヌナズナが *OmphyA* の機能評価系として利用可能であり、*OmphyA* が *AtphyA* の機能を部分的に相補できること、また、シロイヌナズナの遠赤色光下での胚軸伸長制御には *OmphyA* の N 末端で置換されていたアミノ酸が重要な役割を担っていることが示唆された。

本研究を通して、光合成能を失った寄生植物が光合成植物とは異なる光応答を示すことが明らかになった。しかし、*OmphyA* の分子生物学的性質は光合成植物由来の *phyA* と同様であることから、*OmphyA* はヤセウツボ中で依然、光受容体として機能していることが示唆された。シロイヌナズナの形質転換体を用いたマイクロアレイ解析ならびにメタボローム解析により、*OmphyA* が *AtphyA* の機能を部分的に相補可能であることが示され。さらに、キメラ *phyA* を発現させた形質転換体を用いた解析の結果、シロイヌナズナの遠赤色光下での胚軸伸長の制御には *OmphyA* では置換されていた N 末端側のアミノ酸が重要であると示唆された。本研究により、進化的に光合成能を失ったヤセウツボ由来の光受容体が植物の光受容体の機能の解明のための有力な遺伝子源であることが提示できた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、第1章「緒論」、第2章「ヤセウツボの *phyA* に特徴的な光応答の解析」、第3章「ヤセウツボ *phyA* の分子生物学的解析」、第4章「*OmphyA* のシロイヌナズナ *phyA* 相補性の評価」および第5章「総括」より構成されている。

第1章では、植物の光受容体であるフィトクロム分子の性質および機能、生理応答に関する背景が詳しく記されており、これまでモデル植物を中心として研究がなされてきたフィトクロム研究において、全寄生非光合成植物ヤセウツボのフィトクロムを解析する意義および目的が丁寧に解説されている。第2章では、ヤセウツボにおける *phyA* に特徴的な光応答である、発芽、地上部の伸長、ならびに、アントシアニンの蓄積を確認しており、これまで光合成植物において報告されている *phyA* 光応答とヤセウツボの *phyA* 光応答が異なるという新たな知見を見出している。第3章では、*OmphyA* の細胞内局在、遺伝子発現量ならびにタンパク質発現量の光応答性について解析を行っており、*OmphyA* はこれまでに報告のあった光合成植物の *phyA* と同様の性質を有していることを記している。第4章では、*phyA* の機能解析に資する遺伝子資源としての *OmphyA* の有用性を、形質転換体を用いて示している。中でも、シロイヌナズナ *PHYA* の N 末端側および C 末端側を *OmPHYA* に置き換えたキメラ形質転換体を用いた表現型解析では、*OmphyA* が *AtphyA* の機能を部分的に相補できることを証明しており、*OmphyA* が *phyA* の機能を評価する遺伝子源として有用であることを示している。第5章では、全寄生非光合成植物ヤセウツボのフィトクロムの機能

解析およびフィトクロム研究におけるヤセウツボ *phyA* の遺伝資源としての有用性について本研究で得られた成果を中心に記されている。

以上のように、本論文は光合成能を失った寄生植物ヤセウツボ由来 *OmphyA* が光受容体として機能していることを示し、さらに光合成能を失ったヤセウツボ由来の光受容体が植物の光受容体の機能解明の為の有力な遺伝子源であることを示している。本研究の戦略や得られた知見は今後植物生理学や、植物バイオテクノロジー等に貢献すると期待できる。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。