

《農芸化学奨励賞》



高等植物における二成分制御系関連分子の体系的解析

名古屋大学大学院生命農学研究科生物機構・機能科学専攻 助教 山 篠 貴 史

はじめに

バクテリア細胞の恒常性を支える二成分制御系と総称される環境応答システムは、浸透圧, pH, 無機イオン, 栄養, 酸素状態などのさまざまな因子に対して特異的な制御系が存在し、広範な環境応答をカバーしていることから、バクテリアにおけるシグナル検知・情報伝達・応答的遺伝子発現を包含する最も主要な環境適応システムであるといえる。本システムは、環境に应答して活性化されるセンサーヒスチジンキナーゼと遺伝子発現を制御するレスポンスレギュレーターとの2因子間のリン酸リレーを基盤とするタンパク質の逐次的リン酸化を介した細胞内情報伝達における一様式のことであり、リン酸リレーに与るタンパク質のアミノ酸残基がヒスチジンとアスパラギン酸であることから「His-Asp リン酸リレー系」とも称されている。また、本システムは当初バクテリアに固有のものと思われていたが、近年急速に蓄積してきたゲノム情報に基づいた比較ゲノム解析により、His-Asp リン酸リレー系関連制御分子はバクテリア、古細菌、酵母・カビなどの真菌、植物一般に広く認められ、原核生物だけでなく動物を除く真核生物にも普遍的に保存されていることが判明した。このことから、バクテリア型二成分情報伝達系は、真核生物を中心とした「Ser/Thr キナーゼ・フォスファターゼ系」と双璧をなす生物に普遍的なタンパク質の逐次的リン酸化を介した情報伝達システムであり、各生物種において多様な生物機能を制御する情報処理システムに組み込まれていることが示唆された。とりわけ多細胞生物においては、環境に適応するための情報処理システムは、器官発生・組織分化を伴う固体統御に必須の役割を果たしていると考えられる。本研究は His-Asp リン酸リレーを基盤とする二成分情報伝達系による環境応答機構をモデル高等植物シロイヌナズナにおいて体系化することを目的として行った。

1. 高等植物の His-Asp リン酸リレー系の解析

モデル高等植物シロイヌナズナのゲノム情報を精査することにより、シロイヌナズナには11種類のヒスチジンキナーゼ(HK)ホモログ、5種類のリン酸転移メディエーター(HPt), 23種類のレスポンスレギュレーター(RR)が存在することが明らかとなった。これらは、それぞれ AHK, AHP, ARR と名づけられ分類された。ヒスチジンキナーゼホモログを解析するにあたり、まず、大腸菌の多段階型 His-Asp リン酸リレー系である RcsC (HK)→YojN (HPt)→RcsB (RR) 系に注目し、この情報伝達系の活性化を *cps promoter-lacZ* レポーター遺伝子の発現でモニターすることのできる大腸菌株を確立した(図1左)。このリン酸リレーアッセイシステムを用いて、RcsC HK 機能をシロイヌナズナの HK ホモログで相補させる実験を行うことにより、シロイヌナズナの HK ホモログの解析を行った。その結果、シロイヌナズナのヒスチジンキナーゼ AHK2/AHK3/AHK4 (CRE1) がここ40年来探し求められていた植物の成長と分化を制御するサイトカイニンホルモンの受容体であることが示唆された(図1右)。さらに、ラジオアイソトープラベルされたサイトカイニンを用いて AHK4/CRE1 がサイトカイニンと直接結合することが示された。

サイトカイニン(CK)は、細胞分裂、分化、シュートの形成など、植物の成長・分化のさまざまな場面ににかかわる重要な植物ホルモンである。CK 情報伝達における初発の応答は、AHK (CK 受容体) → AHP → Type-B ARR (転写因子) からなるリン酸リレー系により制御されていると考えられる。シロイヌナズナには Type-B ARR が11種存在することが知られているが、これらの機能重複や機能分担に関しては不明点が多い。そこで、T-DNA 挿入変異による Type-B ARR の多重欠損変異体を作製し、CK 情報伝達における Type-B ARR の機能に関する遺伝学的な解析を行った。その結果、*arr1-4 arr10-5 arr12-1*

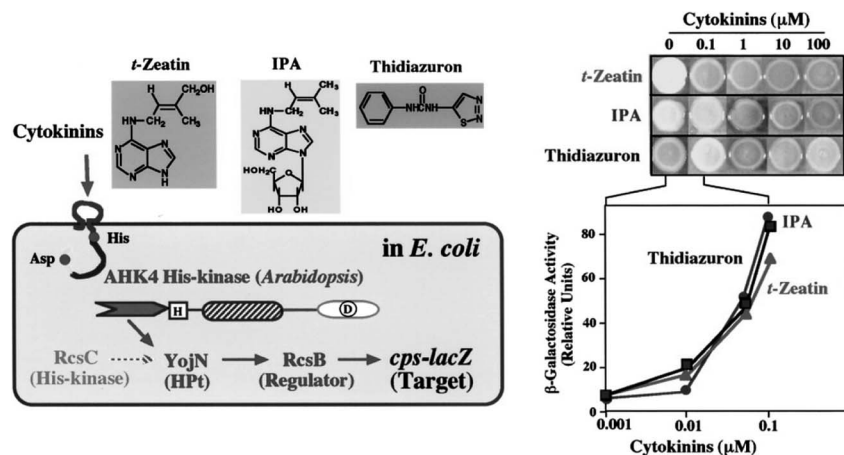


図1 大腸菌の多段階 His-Asp リン酸リレー情報伝達系を利用したシロイヌナズナセンサー HK による大腸菌細胞のサイトカイニン応答

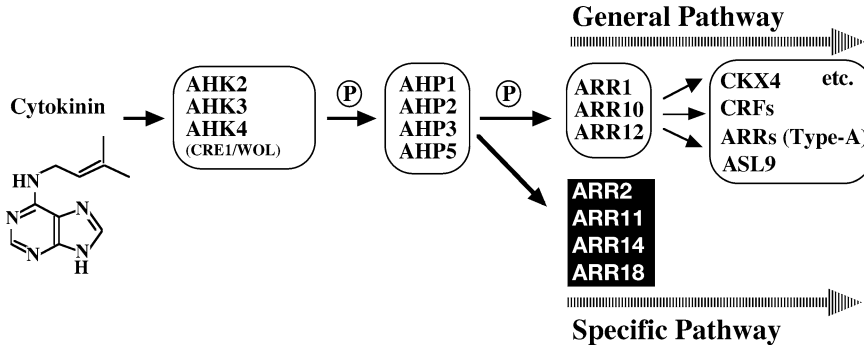


図2 シロイヌナズナにおけるサイトカイニン情報伝達の初発分子機構

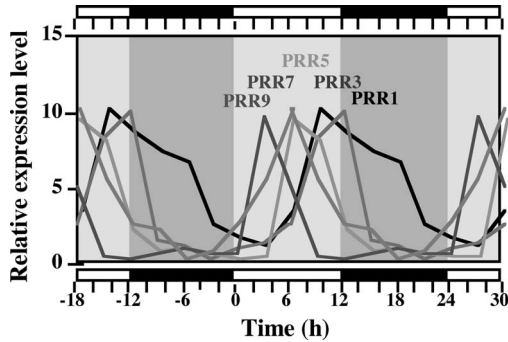


図3 疑似レスポンスレギュレーターファミリーの発現リズム

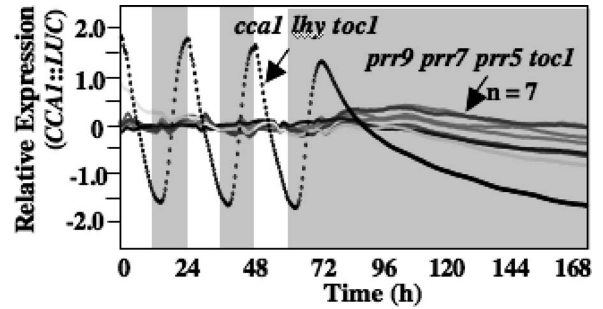


図4 *prp9 prp7 prp5 toc1* 四重変異体における概日リズムの消失

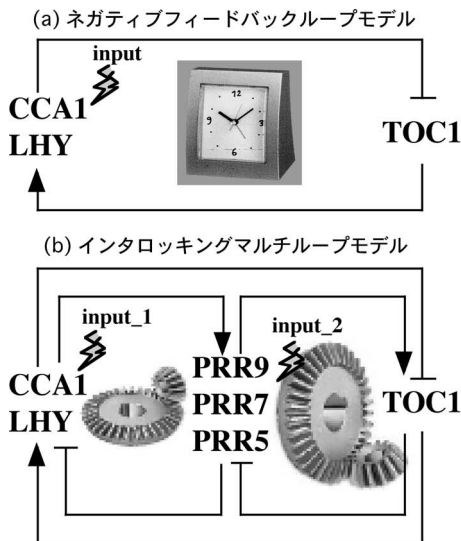
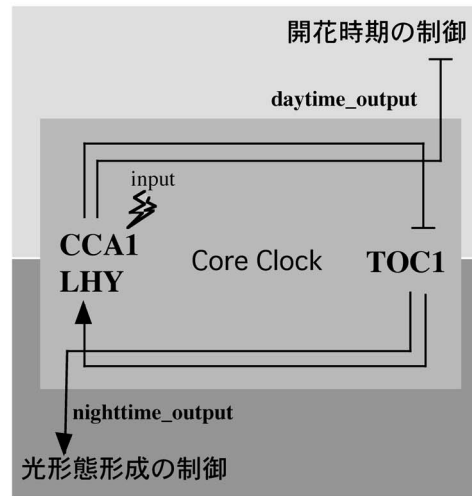


図5 概日時計機構の振動（左図）と発信（右図）に関する分子機構モデル



三重欠損変異体は根の伸長阻害、カルスからのシュート分化、CK 応答性遺伝子発現などにおいて CK 非感受性を示した。また、種子の肥大、主根形成不全と不定根の形成、根の維管束分化の異常、茎頂・根端分裂組織領域の減少が観察された。これらの表現型は CK 受容体 (AHK) 三重欠損変異体 (*ahk2/3/4*) に極めて類似していた。以上の結果より、7 種類の Type-B ARR の中で、ARR1, ARR10, ARR12 が CK 初期情報伝達経路において必須の役割を担っており、AHK2/3/4 (HK)→AHP (HPt)→ARR1/10/12 (RR) へのリン酸リレーを基本骨格とするヒスチジンとアスパラギン酸残基間の逐次的リン酸基転移のシステムがサイトカイニンに応答した核内の遺伝子発現調節における初発の分子機構であることが明らかになった (図2)。

## 2. 植物固有の疑似レスポンスレギュレーター (PRR) ファミリーの解析

シロイヌナズナの His-Asp リン酸リレー系を体系化する過程で、バクテリアには見いだされない固有の制御分子ファミリーが、植物には存在することが明らかとなった。これらのタンパク質の一次構造上の特徴として N 末端側にレシーバドメイン様の配列を C 末端側に特徴的な配列 (CCT モチーフ) をもっていることから、疑似レスポンスレギュレーター (PRR) と名づけられた。シロイヌナズナには PRR ファミリーをコードする遺伝子が五つ (*PRR1, PRR3, PRR5, PRR7, PRR9*) 見いだされた。PRR 遺伝子群の発現を解析したところ、各遺伝子がそれぞれ *PRR9, PRR7, PRR5, PRR3, PRR1* の順序で夜明けから

夕方にかけて概日リズムを刻んで発現していることが観察された(図3)。

PRR 遺伝子の一つ *PRR1* は長年にわたりシロイヌナズナの時候補遺伝子として注目されていた *TOC1* と同一であることが判明した。そこで、本研究では *prp9 prp7 prp5 toc1/prp1* 四重変異体を含む多様な組合せの *prp* 多重変異体を作製して解析した。その結果、*prp9 prp7 prp5 toc1/prp1* 四重変異体においては、明暗条件下においても概日リズムが消失していることが示された(図4)。このことから、高等植物に見出された擬似レスポンスレギュレーター分子群が、植物の高次機能を統御することで古くから知られている概日リズム機構を支える中心振動体(時計)として機能していることが明らかとなった。*PRR* 遺伝子の種々の多重変異体のリズムを詳細に解析することにより、すでに提唱されていたシロイヌナズナの中心振動体の発現制御機構を分子レベルで説明したネガティブフィードバックループモデルを改良し、(CCA1/LHY)、(PRR9/PRR7/PRR5)、(PRR1)の3要素がインターロックする形で閉じた系を形成するマルチループモデルを提唱した(図5左)。また、概日時計が統御する植物特有の光形態形成や開花時期の制御に関しても、概日時計の基本機構に依存した出力経路のモデルを提案した(図5右)。

#### おわりに

植物の特徴は胚発生以後に、環境(栄養環境、物理的環境、生体防御環境など)に応答しながら新たな器官を発生・分化させることにより、個体としての体制構築がなされることである。この環境適応分化型の個体統御機構が、地に根ざし動かずに生きていく植物独自の生存戦略を可能にしていると考えられている。その点で、植物ホルモンは胚発生と後胚発生における分化・生長あるいは環境応答を調節する情報分子として、重要な役割を果たしていることが知られている。一方、外環境と密接な関係をもって生長分化を統御していく上で、特に、日周期

(1日における光[温度]環境の明暗[寒暖]サイクル)と光周期(1年における日長変化のサイクル)の情報を処理する概日時計システムは、植物成長と密接に関連した生体機能の一つであるといえる。本研究により、バクテリアの環境応答系から進化した二成分制御系関連分子によって、植物の生長と分化を規定するサイトカイニンホルモンの情報伝達機構や日周期と光周期の情報を処理する概日時計システムが構築されており、これらを基盤として植物の環境に適応した可塑的な個体統御が支えられていることが明らかとなってきた。

本研究「高等植物における二成分制御系関連分子の体系的解析」は名古屋大学大学院生命農学研究科生物機構・機能科学専攻分子細胞機構学講座において行われたものです。本研究に参画する機会を与えていただき、同研究室においてご指導、ご助言を賜りました水野 猛先生に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究は同研究室で植物科学研究を立ち上げ、日々推進してこられた多くの皆様の多大なる努力の賜であり、山田寿美博士、鈴木友美博士、松鹿昭則博士、今村 綾博士、木羽隆敏博士、中道範人博士、村上正也博士、萩原大祐博士、伊藤照悟博士をはじめご協力いただきましたすべての共同研究者の皆様には厚く御礼申し上げます。植物科学の研究を行うにあたって、種々のサポートを賜りました榊原 均先生、森 仁志先生、石黒澄衛先生、佐藤 豊先生に心より感謝の意を表します。本研究を行うにあたっての実験施設の共同利用・研究材料の提供などすべての方のお名前を挙げることはできませんが、ここに深く感謝申し上げます。本研究は以上の皆様のご指導、ご協力、ご支援なくしてはなしえませんでした。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中部支部長、前島正義先生の細やかなお心遣いならびに学会の諸先生のご支援に厚く御礼申し上げます。