

報告番号	※甲	第	号
------	----	---	---

主論文の要旨

論文題目 ヒメツリガネゴケにおける PAS ヒスチジンキナーゼの
生理機能の解析

氏名 龍 昌志

論文内容の要旨

生物の歴史において、植物の陸上化は最も大きなイベントの一つである。今からおよそ 4.8 億年前、植物の祖先は接合藻類の祖先から分岐し、形態形成や代謝の仕組みを変化させながら生育域を拡大していき、水源から離れた環境でも生育できるようになった。現在では、植物は地球上の様々な地域で繁栄しており、その環境に合わせて多様な体制や環境耐性の仕組みを備えている。植物の上陸およびその後の多様化における生存戦略は、環境シグナルの受容・応答に基づく適応の過程の変遷を解明していくことで理解できると考えられる。

二成分制御系(Two-Component Systems; TCSs)は、原核生物と一部の真核生物に広く保存されたシグナル受容・伝達機構である。一般的な TCS は、ヒスチジンキナーゼ(HK)とレスポンスレギュレーター(RR)から構成される。HK は N 末端側にセンサードメイン、C 末端側にキナーゼドメインをもつ。RR は N 末端側にレシーバードメイン、C 末端側に DNA 結合ドメインなどの出力ドメインをもつ。HK のセンサードメインが特定の環境シグナルを受容すると、キナーゼドメインが自己リン酸化し、このリン酸基が RR のレシーバードメインに転移することで、環境シグナルへの応答に繋がる遺伝子発現などが制御される。TCS は植物のサイトカイニンとエチレンに対する応答の分子機構として知られているが、植物の TCS は主に高等植物シロイヌナズナを用いて調べられてきたため、その起源や進化の過程は未解明である。

ヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)は、被子植物の祖先とは 4.5 億年以上前に分岐した基部陸上植物の蘚類に属し、原始的な性質をいまでも多く残す。またヒメツリガネゴケはモデル植物に適した性質を持つため、進化的な観点から生理学や発生学のモデル植物として研究されてきた。ヒメツリガネゴケは植物の中で最も多数の TCS 因子をもち、また被子植物や緑藻にない独自の因子を多くもつことが報告されている。しかし、その詳細な仕組みなどはほとんど研究されていない。本研究では、ヒメツリガネゴケがもつ 2 つの PAS(Per-ARNT-Sim)ドメイン含有 HK を PAS-Histidine Kinase 1(PHK1)と PHK2 と名付け、その機能解析を行った。はじめに、PHK1/PHK2 の基本的な特徴付けとして、cDNA のクローニング、アミノ酸配列を用いた系統解析、遺伝子発現の解析を行った。

PHK1/PHK2 をコードする cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した結果、

PHK1/PHK2 は N 末端側から順に 2 つの PAS ドメイン、ヒスチジinkinaseドメイン (HisKA)、ヒスチジinkinase様 ATPase ドメイン(HATPase_C)、レシーバードメイン (REC)を持つことがわかった。どちらのタンパク質においても、TCS 因子として機能するために不可欠なアミノ酸残基、すなわち自己リン酸化の基質となる HisKA のヒスチジン残基と、リン酸転移に関わる REC のアスパラギン酸-アスパラギン酸-ロイシン残基 (DDK) モチーフが保存されていた。

次に、植物関連の各種データベースを用いた探索により、*PHK1/PHK2* のホモログは車軸藻、コケ植物、小葉類に存在することがわかった。これらのホモログのアミノ酸配列を用いて系統樹を作成し、分岐の形状を検討した結果、車軸藻には *PHK1/PHK2* と系統的に近いホモログが 1 つと、系統的に隔たるクラスターを形成する複数のホモログが存在することがわかった。さらに、PHK の PAS ドメインについても系統解析を行った。PAS ドメインは全ての生物界に見られるドメインであり、植物では青色光受容や概日時計の制御などの様々な機能を担う。これら植物における機能既知の PAS ドメインも含めて、多様な生物種の各種 PAS タンパク質と PHK の PAS ドメインのアミノ酸配列を用いて系統樹を作成したところ、PHK1/PHK2 の PAS は、機能既知のいずれの PAS ともクラスター化しなかった。したがって、PHK1/PHK2 の PAS ドメインは植物では新規の機能を持つものであることが推測された。

続いて、逆転写 PCR 法により *PHK1/PHK2* の転写産物の有無を調べた。その結果、*PHK1/PHK2* は原系体と茎葉体のどちらの組織でも発現していることがわかった。さらに詳細な発現プロファイルを調べるため、原系体組織を異なる明暗条件下で培養し、明期と暗期の発現量を定量 PCR により比較した。その結果、*PHK1/PHK2* の発現は、明期の長さとは無関係に光に抑制されることが示唆された。

PHK1/PHK2 の生理機能を調べるために *PHK1* と *PHK2* の遺伝子破壊株を作出した。遺伝子破壊株と野生株(WT)を短日条件(8時間明期/16時間暗期:SD)または長日条件(16時間明期/8時間暗期:LD)で 2~4 週間生育させ、茎葉体形成を比較した。SD においては、2 週間後では全ての株でわずかな茎葉体しか発生しなかったが、4 週間後には全ての *PHK* 破壊株が WT より多くの茎葉体を発生させた。一方で、LD においては、2 週間の時点で全ての *PHK* 破壊株が WT より多くの茎葉体を形成したが、4 週間後では株間の差はなかった。この生育期間内における原系体の成長速度は、どちらの明暗条件においても WT と *PHK* 破壊株の間に差はなかった。これらの結果から、PHK1/PHK2 は茎葉体の発生を遅らせるが、最終的に形成される茎葉体の総数には影響しないことが示された。また、SD と LD のどちらでも *PHK* 破壊株は多くの茎葉体を形成しており、PHK1/PHK2 は光周性の制御に関与しないと考えられた。さらに、茎葉体の形態を比較するため、4 週間後の茎葉体の葉の枚数と茎の長さを調べた結果、*PHK* 破壊株は WT より茎葉体が大きくなる傾向があることがわかった。しかし、単位長の茎に付く葉の枚数は全ての株の間で差がなかった。これらの結果から、PHK1/PHK2 は茎葉体の形態形成には関与せず、茎葉体の発生するタイミングを遅延させると考えられた。次に、PHK1/PHK2 による制御過程をより詳しく明らかにするために、カウロネマ側枝始原細胞の形成を株間で比較した。その結果、*PHK* 破壊株では、カウロネマ側枝始原細胞の発生が促進されていることがわかった。さらに、*PHK* 破壊株は赤色光下において WT より多くのカウロネマ側枝始原細胞を発生させたことから、PHK1/PHK2 は赤色光のシグナリングを抑制することで、茎葉体の発生を制御することが示された。

続いて、茎葉体頂端細胞の発生を誘導する *APB* 遺伝子群の発現を調べた結果、

*PHK1/PHK2*破壊株では *APB2* と *APB3*の発現が WT よりわずかに高いことがわかった。この結果から、*PHK1* と *PHK2* の両方あるいはどちらかが、*APB2* と *APB3*の発現を弱く抑制することがわかった。したがって、*APB2* と *APB3*は *PHK1/PHK2* がリン酸を転移する RR の標的遺伝子であり、これらの転写調節活性を通じて、茎葉体の発生が制御されている可能性が示唆された。

PHK 遺伝子は車軸藻、コケ植物、小葉類に保存されている。これらの植物は有性生殖に体外の水を必要とすることが知られている。また、コケ植物や小葉類は体のサイズが小さく、大雨などによる冠水の影響を受けやすい。すなわち、*PHK*を持つ植物は、いずれにおいても、その生活環の一定期間において生育場所の水環境が大きく変動する可能性がある。したがって、*PHK* は冠水条件と非冠水条件が転換する環境において何らかの役割を持つと考えられた。そこで、*PHK*破壊株を冠水条件下で生育させ、WT との間で生育と発生を比較した。その結果、連続明条件において、各 *PHK*単独破壊株の茎葉体の数は WT と差がなかったが、*PHK1/PHK2*二重破壊株の茎葉体の数は WT より少なかった。SD においては、全ての *PHK*破壊株の茎葉体の数が WT より顕著に少なくなった。この結果から、好気条件と対照的に、冠水条件において *PHK1/PHK2* は茎葉体形成を促進することがわかった。次に、冠水条件における制御モードの決定に酸素濃度が関与するかどうかを調べた。人工的な低酸素条件下で *PHK*破壊株を生育させ、WT との間で生育と発生を比較した。その結果、冠水条件と同様に、また好気条件とは対照的に、*PHK1/PHK2*二重破壊株は低酸素条件においては茎葉体形成を促進することがわかった。したがって、*PHK1/PHK2* は茎葉体形成の促進または抑制という、逆方向の制御機能のどちらかを環境の酸素濃度に応じて示すことを明らかにした。

本研究において著者は、(1)*PHK* が車軸藻、コケ植物、小葉類に保存されていること；(2)*PHK* の PAS ドメインは植物では新規のグループであること；(3)好気条件では、*PHK1/PHK2* は赤色光のシグナリングを介してカウロネマ側枝始原細胞の発生を抑制し、茎葉体の発生のタイミングを遅らせること；(4)冠水条件では、*PHK1/PHK2* はおそらく低酸素濃度を検知することによって茎葉体形成を促進させることを明らかにした。*PHK* は、水環境に応じて植物の発生を制御することで、植物の陸上化とその後の進化・多様化に貢献したと推測され、基礎生物学的な観点で興味深い因子である。また本研究の成果は、将来的に作物への水害耐性の付与などの農業上の応用にも貢献できると期待できる。