

Phytochrome controlled signaling cascades in higher plants

高等植物中的光敏素訊息傳導

演 講 人：黃健祐

指導老師：王淑珍 助理教授

時 間：2003/5/8 AM 11:10

地 點：農藝館 112 室

摘要：

植物可以藉由高度特化的光接收器來感應到環境中的光線條件的變化。而 Phytochromes 在植物中扮演了感應紅光與紅外線的雙重角色。這些光接收器在植物從發芽到下一代種子成熟的生長過程中扮演了非常重要的角色，而且他們也參與生物體內生物時鐘的作用。藉由生化、細胞學與基因研究也漸漸瞭解了 phytochromes 傳遞光訊息的分子機制，此過程包括活化 phytochromes，phytochromes 在細胞質與細胞核間之傳遞。在核內 phytochromes 與一些轉錄因子交互作用，進而調控眾多的基因表現，導致一連串的生理與發育反應。本篇報告主要著重目前已知的一些因子與 phytochromes 訊息傳導的過程。

前言：

感應自然環境的變化對生物體而言是最重要的事。對無法遷移的植物來說，除了養分的供給以外，光線很明顯地是最重要的環境因子之一，因為它提供了能量來源，也調控了植物生活史中許多的生長發育與適應的過程。

由於地球會自轉，自然環境中光與暗具有週期性的輪流交替。為了精細的協調他們對周遭光(或溫度)條件改變的適應力，如同其他生物體一樣，植物發展出了內生的生物時鐘，用以調控大量的生物反應。生物時鐘會受到所處環境因子的同步化與設定，其中最重要的因子是光線。

植物可以感應光的質、量與持續的時間，藉以調整他們的生長與發育，以獲得最理想的能量利用。植物藉由四類的光感應器來監測周遭環境中光線的變化：接收紅光與紅外線的 phytochromes，目前還沒被發現的 UVB 接收器，以及接收藍光和 UVA 的 cryptochromes 與 phototropins。在這些光接收器中，目前對於 phytochrome 的訊息傳導機制是較為清楚的。這篇報告是整理最新的發現，以助於瞭解 phytochromes 在光訊息傳導上的功能。

Phytochromes 的功能

在阿拉伯芥中，phytochromes 家族有五個成員，分別命名為 phytochrome A (PHYA)到 phytochrome E (PHYE)。Phytochromes 以兩條 125-kDa 的 polypeptide 組成二元體。每一條 polypeptide 由兩個構造上的大 domain 組成，在 N 端與一個 tetrapyrrole 發色基以共價鍵結合，而賦予 phytochromes 感應光線的能力。在 C 端的部分則具有形成二元體以及把訊息傳遞到下游的構造。Phytochromes 具有吸收紅光而不具活性的 P_r 與吸收紅外線具有生物活性的 P_{fr} 兩種構型。會受到光線誘發而使光接收器的 P_r 與 P_{fr} 構型發生轉變，進而活化不同的訊息傳導路徑，導致相關基因表現的改變，而使植物之生長、發育及生化代謝反應發生改變。由 phytochromes 缺失的突變體及過量表現的轉基因植物分析研究證實了 phytochromes 在整個植物發育過程的功能。

Phytochromes 之作用功能模式可分為三類：(1) 對非常微弱的光量產生反應(VLFR, very low fluence responses)。 (2) 對微弱光量產生反應(LFR, low fluence responses) , (3) 對於強光光照的反應 (HIR, high irradiance responses)。 PHYA 是 phytochrome 中研究較清楚的, 已知它具有 VLFR 與 FR-HIR 兩種功能。PHYA 之作用可控制種子萌芽過程, 當種子受到微弱的光照處理後就可以促進萌芽。PHYB 所影響的植物生理代謝和發育反應非常眾多。而 PHYD 與 PHYE 參與節間伸長之作用機制及開花時期的控制。而 PHYE 也影響種子萌發過程。

Phytochromes 在黑暗環境下合成, 其為 P_r 形式。而 P_{fr} 形式的 PHYA 非常不穩定。相較之下, 其他的 phytochromes 較為穩定, 但對於其運作機制仍為完全明瞭。從研究中發現, 在 phytochromes 的反應與其他光接收器間具有交互作用, 並導致在不同光照處理下, 生理反應會有放大的效果。

Phytochromes 在細胞中的位置

研究的結果發現, PHYA 和 PHYB 的訊息傳導中包括活化 GTP-binding protein, 藉由調整細胞中的次級傳訊者 cGMP 或鈣離子濃度來活化一些受光調控的基因轉錄。而 Harter 等人也發現在高等植物中 phytochromes 具有將細胞質中蛋白質磷酸化的能力。從研究中發現磷酸化的骨牌效應可能是 phytochromes 傳遞訊息初期的重要步驟。

早期的生化與免疫化學研究發現, PHYA 的 P_r 與 P_{fr} 形式主要都是位在於細胞質中, 大多數的實驗顯示也 phytochromes 位在於細胞質中。但是, Sakamoto 和 Nagatani 利用 PHYB C 端的片段與 GUS 報導基因融合的轉殖植物。他們觀察到了在細胞核中也有 GUS 融合蛋白的染色, 他們也發現在受到紅光照射處理後, 核內 PHYB 數量會增加。之後, Yamaguchi 等人和 Kircher 等人將 PHYB 缺失的阿拉伯芥突變體轉殖入全長的 PHYB 與 GFP 報導基因的融合蛋白。在這些植物中, PHYB-GFP 在受光線照射後會有移入細胞核的現象。Kiecher 等人也發現 PHYA-GFP 的融合蛋白質在光照下也會出現在核內, 而黑暗中 PHYA 只會出現在細胞質中。由這些發現可以提出一個假設: 在黑暗中 PHYA 無法從細胞質轉移到細胞核內, 或是 P_r 形式的光接收器是無法被運輸到細胞核中。後來的研究發現, 光誘導了 PHYA 分子構型的改變, 造成蛋白質上的核訊號顯露出來, 以致於 PHYA 可以被轉運到核內。從分佈位置的研究上, 也發現 PHYA-GFP 和 PHYB-GFP 轉運到核內的條件有所不同。PHYB-GFP 要轉送到核內需要受到持續的紅光照射, 顯示 PHYB 是對於低光量反應(LFR)。相較之下, PHYA 進入核內會受到持續性的紅外線或是短暫的紅光、紅外線或藍光照射刺激的誘導, 顯示了 PHYA 的轉移是屬於 VLFR 與對紅外線的 HIR 的反應模式。這些研究結果證實了 PHYA-GFP 與 PHYB-GFP 轉運到核內需要不同波長的光波處理。在一些其他的 PHYA 與 PHYB 相關的光線反應研究中, 也發現 PHYA P_{fr} 形式的核傳送明顯比 PHYB 快很多。這些實驗中也觀察到另一個重要的現象, 在 PHYA 或

PHYB 轉運進入細胞核內後，會形成特別的斑點。而在不具生理活性的突變種中，PHYA-GFP 與 PHYB-GFP 在光照下也會出現轉運到核內的現象，但是不會形成斑點。這顯示出在光接收器斑點的形成與光接收器的生物活性具有高度的相關。目前，已知 PHYC、PHYD 與 PHYE 再受到光照處理之後被轉運到核內而且形成斑點。此外，在自然的光照條件下(日夜循環)所有 PHY-GFP 融合蛋白在運送入核內之反應會呈現出一日的韻律性。

Phytochrome 的訊息傳導

目前已分離出一些與 phytochrome 產生交互作用的蛋白質(phytochrome-interacting proteins)。第一個被確認的 phytochrome interacting factor 3 (PIF3)，是一個位於核內的 bHLH (basic helix-loop-helix)的轉錄因子，PIF3 蛋白質與 PHYB 及 PHYA 具有明顯的交互作用。此外，研究也發現 PIF3 蛋白會與多種受光調控基因的啟動子序列上之 G-box 結合，例如 *LHY* (late elongated hypocotyl)與 *CCA1* (circadian clock associated 1)基因。PHYB 在以 P_{fr} 的形式與 PIF3 結合後可以結合在 G-box 上。

另一個在的最新 bHLH 轉錄因子，PIF4 (phytochrome interacting factor 4) 也被 Huq 與 Quail (2002)所發表。PIF4 對 PHYB 訊息傳遞是負向調控的作用，其直接地在核內與具活性的 PHYB P_{fr} 形式作用。PIF4 和 PIF3 構造上很相似，也可以結合在光可誘導的啟動子序列上的 G-box，然而 PIF4 無法同時與 PHYB 和 G-box 結合。這顯示當在核內形成 PHYB-PIF4 的異質二元體後，可能會抑制受 PIF4 影響的轉錄調控，或是 PIF4 和 PHYB 結合使其失去活性。

另外 PKS1 (phytochrome kinase substrate 1)與 PIF3 相似，PKS1 也可以跟 PHYA 及 PHYB 兩者作用。PKS1 位於細胞質中，而且可以被 P_{fr} 形式的 phytochrome 磷酸化，phytochromes 具有 serine/threonine kinase 的功能，而且 phytochrome 的磷酸化/自體磷酸化是受到光線所調控的。另一個與 phytochromes 有交互作用的分子，NDPK2 (nucleoside diphosphate kinase 2)，其可以結合在 PHYA 與 PHYB 的 C 端區域，這也支持了磷酸化是提供了 phytochromes 訊息傳導一個可能的路徑。當有 P_{fr} 形式的 phytochromes 存在時，NDPK2 的 kinase 活性會增加，而 NDPK2 分佈在細胞質與核內，而且在細胞內個兩部分都可以磷酸化特定蛋白質。

使用 oligonucleotide microarray 來分析野生型與 phyA 缺失的阿拉伯芥突變體的整體基因表現，Tepperman 等人發現有 10%左右的基因受到 PHYA 紅外線反應的調控。大量的基因是藉由 PHYA 來迅速地誘導或抑制表現。在 Ma 等人 (2001)以 sequence tag-based microarray 分析中也獲得相似的結果。在此實驗中，除了紅外線外，紅光所誘發基因的表現也被證實。這些光照處理後觀察到的基因表現改變，也支持了對於 phytochrome 功能的推論

Phytochromes 與生物時鐘

光接收器在生物時鐘的設定也扮演決定性的角色。由 phytochromes 經由訊息傳導路徑將訊號輸入時鐘，進而重新設定時鐘系統，此路徑中與調控對光反應基因的表現共用了相似的元素。銜接光生物學和時間生物學的重點就是生物時鐘，這也調控了某些受光誘導的基因表現。

生物時鐘最簡單的模式可大略分為三個最主要的部分：環境訊息輸入路徑(input)、中心節律器(central oscillator)和訊息由生物時鐘輸出(output)之過程。在生物時鐘系統的另一頭，光接收器所吸收的光線訊號，藉由輸入的路徑進入中心節律器，將植物體自身的狀態可以和環境中的週期變化達到同步化。中心節律器會產生大約 24 小時週期的韻律，是基於一個由數種時鐘基因和蛋白形成負向回饋迴圈(negative feedback loop)，其後藉由輸出的路徑來調控基因的表現。

在阿拉伯芥中，PHYA、B、D、E、CRY1 與 CRY2 這些光接收器都被證實有在生物時鐘的重新設定上有功能。PHYA、CRY1 和 CRY2 是屬於輸入藍光到中心節律器的，PHYA 是唯一一個偵測到紅外線的，而 PHYB、D 和 E 的功能都是屬於紅光訊號輸入時鐘的訊息傳導。研究發現，phytochromes 和 cryptochromes 本身的基因表現也都受到生物時鐘所控制。

LHY (late elongation hypocotyl)與 CCA1 (circadian clock association 1)是兩個轉錄因子。過量表現或基因的突變體研究結果顯示，有大量的概日輸出無法表現出正常的韻律。Timing of CAB 1 (TOC1/APRR1)在植物的概日系統中極為重要。LHY/CCA1 與 TOC1 一起作用形成一個回饋的迴圈，進而發揮了中心節律器的機制。LHY 和 CCA1 的基因表現也呈現出概日韻律。LHY 和 CCA1 的基因表現也是受到光線誘導的，PHYB 與 PIF3 參與了這個反應之訊息傳導過程。在受到光線照射後，PHYB 轉移到細胞核內，並與 PIF3 產生交互作用，然後這個複合體會結合在 LHY 及 CCA1 啟動子上的 G-box。這個交互作用快速地引發 LHY 和 CCA1 的基因表現。TOC1 則被發現會與 PIF3-like protein 1 (PIL1)相互作用。這個交互作用可能就是 TOC1 調控其他基因表現(如 LHY 和 CCA1)的機制，雖然目前沒有直接證據顯示 TOC1 是轉錄調節因子。如同 PIF3 是核內組成 phytochrome 訊息的成分，可能在核內會形成一個含有 PHY/PIF3/TOC1 多蛋白複合體，這可能是光訊息影響生物時鐘操作的重點之一。

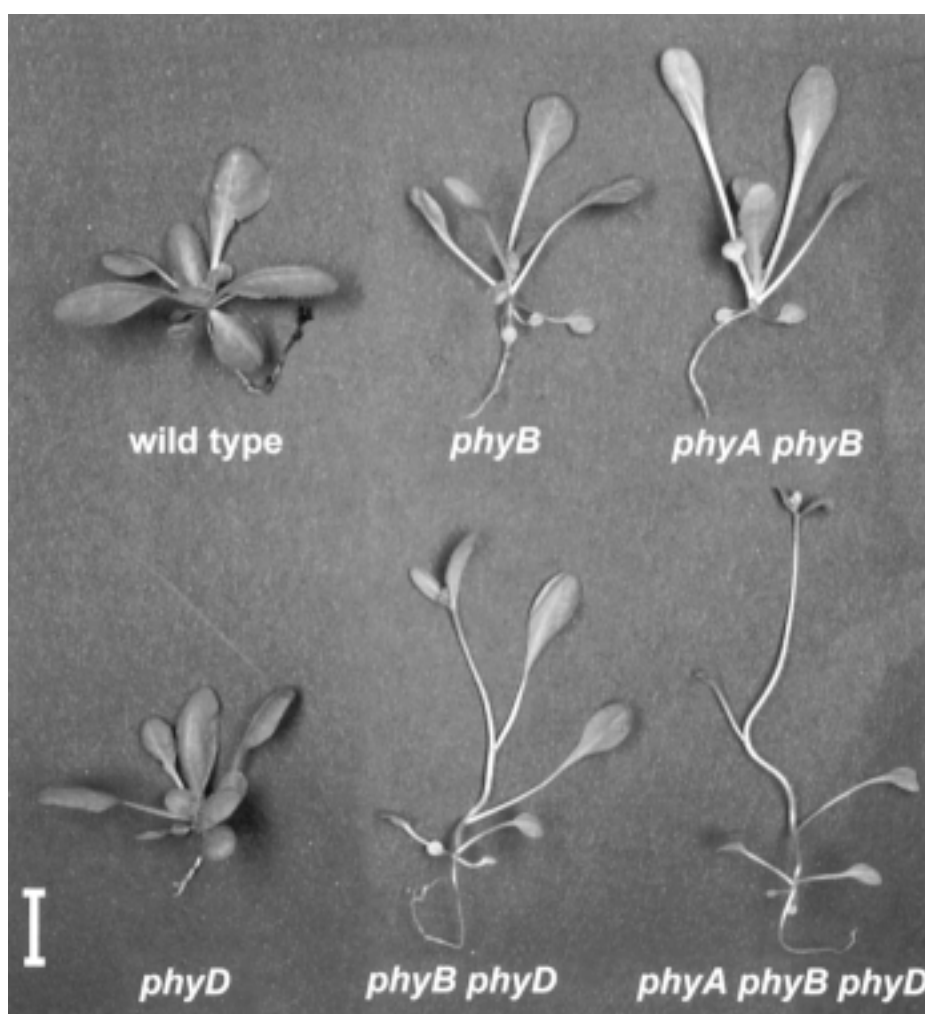
另一個組成時鐘的成分，ELF3 (early flowering 3)被發現在光的輸入路徑上具有功能。ELF3 分佈在細胞核內，並且也有概日韻律的現象。從 *elf3* 突變體與過量表現植株之研究，指出了 ELF3 在 PHYB 影響的光型態發生的訊息傳導初期發揮作用。從 yeast two-hybrid 系統發現，ELF3 與 PHYB 可以產生交互作用，雖然目前對 PHYB/ELF3 的複合體所具有功能與表現的機制仍然未明。可能的解釋之一是這個複合體會調控核內的基因表現，或這些核內蛋白質間的交互作用導致 ELF3 蛋白質本身的修飾作用，使得 ELF3 可以在與其他蛋白質交互作用來控制轉錄。

之前所述的植物概日系統的組成包括了光訊息的傳送到核心節律器。圖十一是一個簡圖，展示了植物概日系統中各項因子在光輸入路徑上扮演的角色。

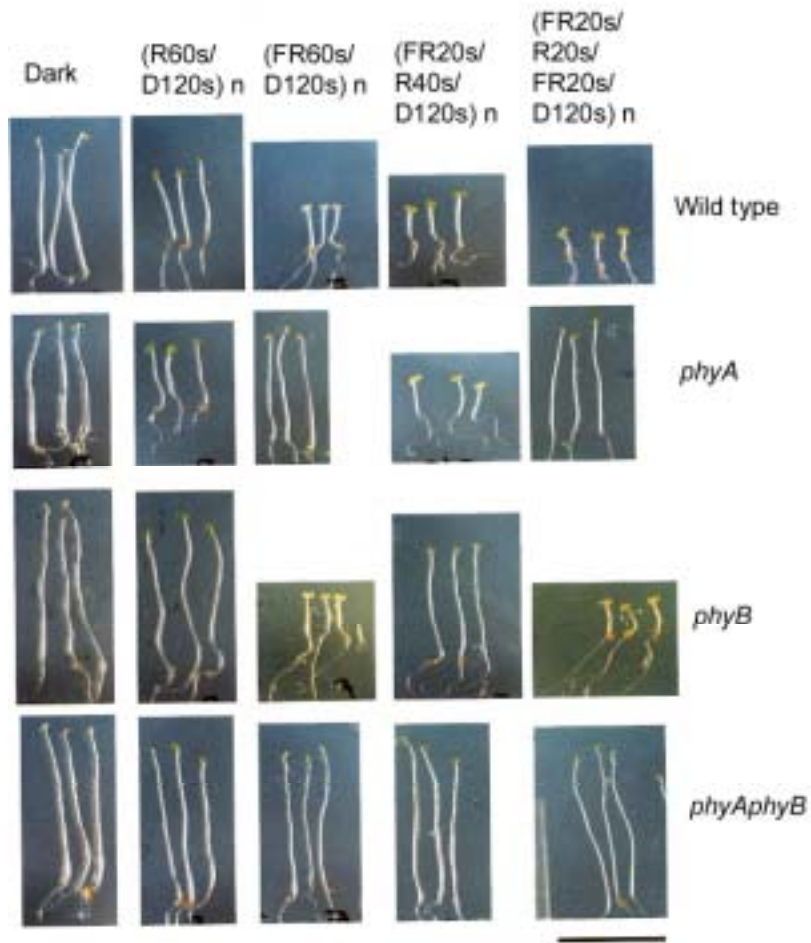
總結

植物監控環境中光照的改變是藉由三種光接收器家族：吸收藍光與 UVA 的 phototropins 與 cryptochromes，以及吸收紅光與紅外線的 phytochromes。Phytochromes 參與生物時鐘的設定並且調控了植物的光型態發生。Phytochromes 是藉由多種的訊息傳導路徑控制其相關基因之轉錄，依靠蛋白質的磷酸化，活化 GTP-binding protein 造成細胞中次級傳訊者 Ca^{2+} 或 cGMP 在細胞質中的濃度改變來進行訊息傳導，其亦可在核內直接地與轉錄因子發生相互作用。不同的 phytochromes 在控制光型態發生與植物適應環境中光線改變的功能上，有些路徑是各自獨立，而有些是有相互重疊的。

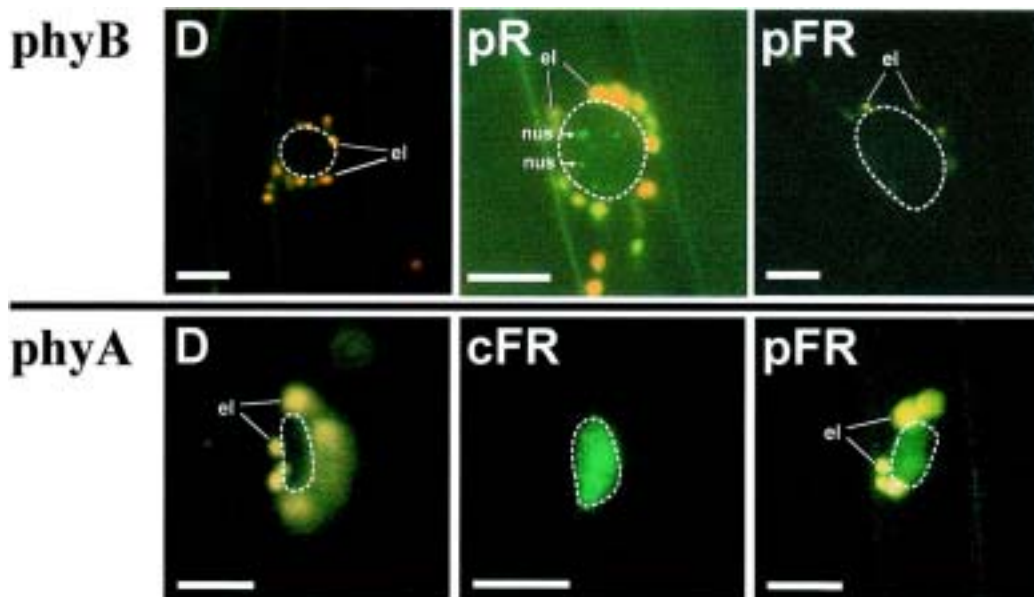
附圖：



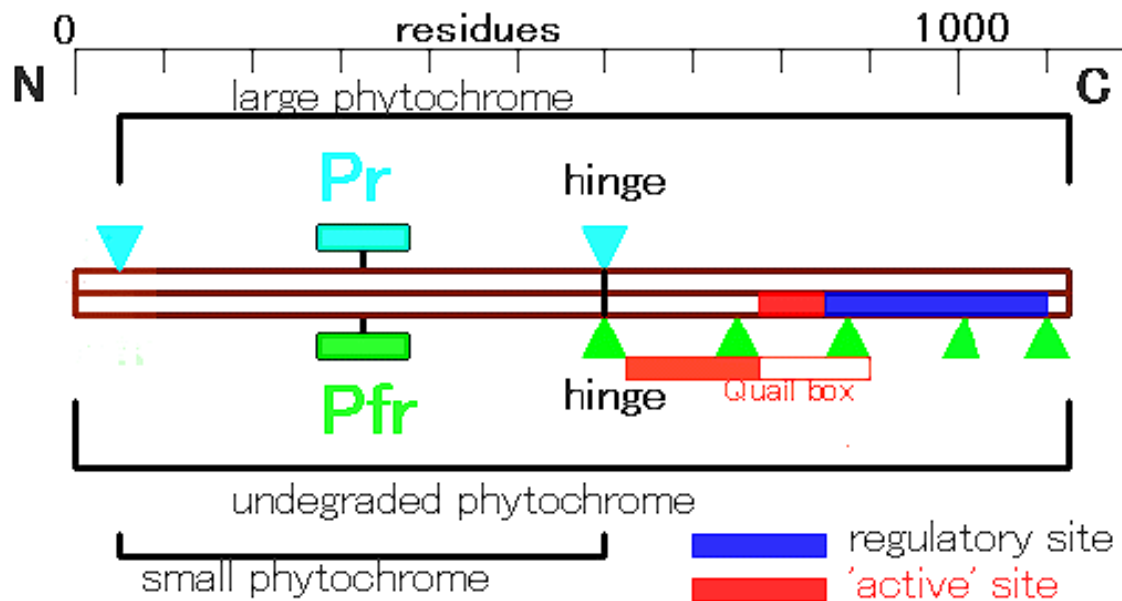
圖一：阿拉伯芥的 phytochrome 突變體與多重突變體的外表型，白色線段表示長度 1 cm。(Devlin et al., 1999)



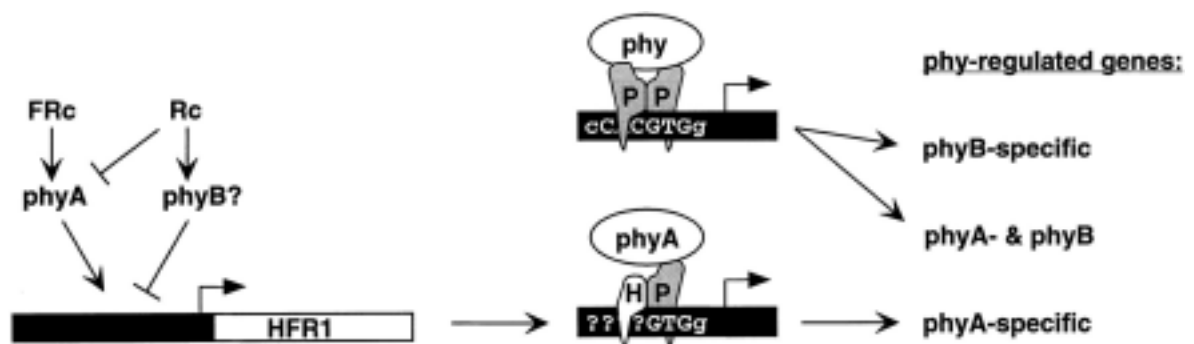
圖二：阿拉伯芥 *phyA* 與 *phyB* 的突變體，接受不同的紅光及紅外線的光照處理後，下胚軸伸長的變化，黑線表示長度 10 mm，Dark 或 D 表示黑暗處理，R 為紅光，FR 為紅外線。(和田正三 et al., 2001)



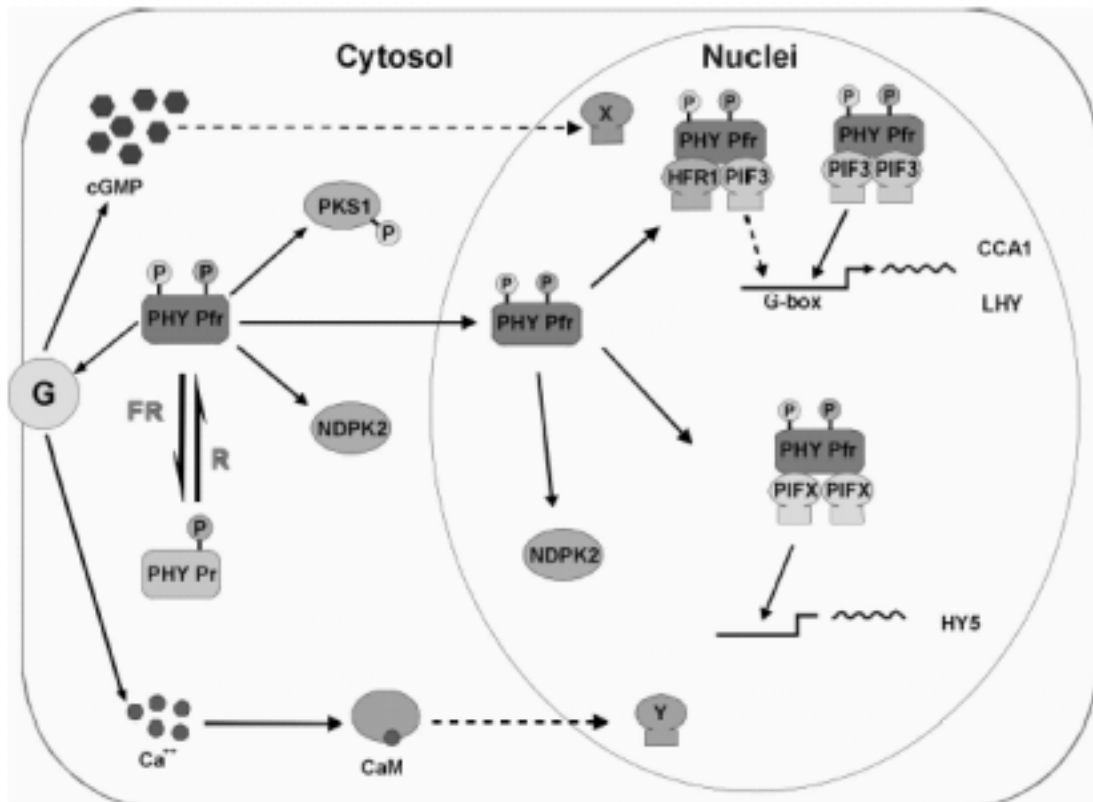
圖三：PHYA 與 PHYB 在細胞內的分佈。利用 PHYA-GFP 和 PHYB-GFP 的融合蛋白來觀察。虛線表示細胞核的位置，pR = pulse red light pFR = pulse far-red light cFR = continuous far-red light pFR = pulse far-red light。(Nagy and Schaefer, 2002)



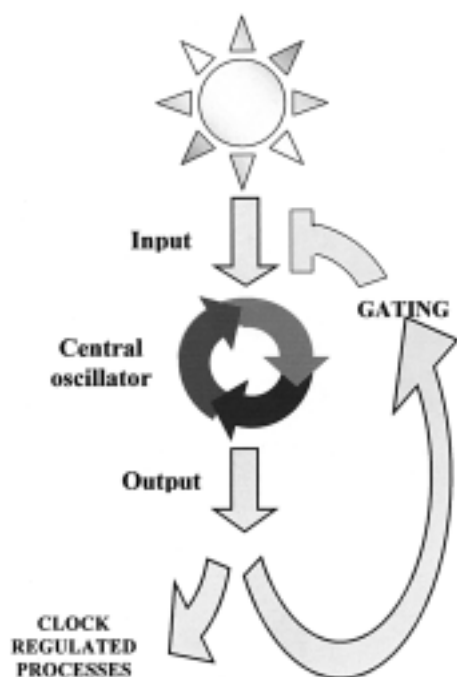
圖四：Phytochrome 的構造，由兩個大的 domain 組成，中間由一個 hinge 區域連接，N 端的區域與一個 tetrapyrrol 的發色基以共價鍵結合，是屬於感應光線的區域。C 端淺色的 active site 是一個 PAS 相關的區域，而深色的 regulatory site 是屬於 histidine-kinase-related domain。(http://plant.sci.yokohama-cu.ca.jp, 2003)



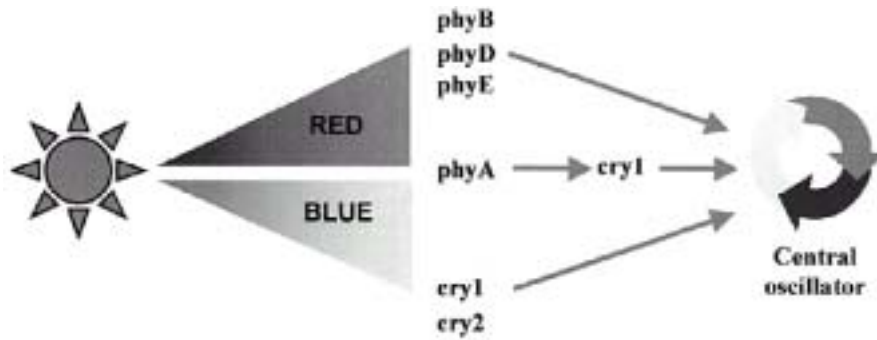
圖五：轉錄因子 PIF3 與 HFR1 在 phytochrome 訊息中的功能。(Fairchild et al., 2000)



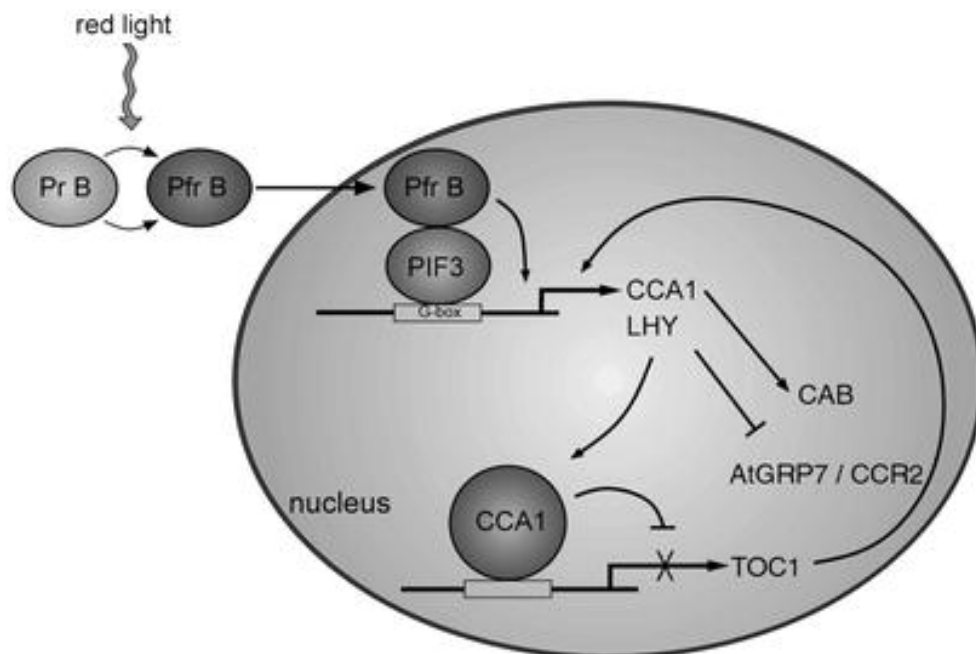
圖六： phytochrome 訊息傳導的路徑。光線的吸收讓 phytochrome 的構型從 P_r 轉變成具生理活性的 P_{fr} 形式。光線誘使構型改變藉由光接收器的自體磷酸化，以及磷酸化其他蛋白質，如 PKS1，可誘導細胞內的訊息傳導串連。(P：磷酸根，G：GTP-binding protein，箭頭表示推定的訊息傳導路徑)。(Kevei and Nagy, 2003)



圖七：植物生物時鐘的簡圖。主要由三大部分構成：輸入(input) 核心節律器(central oscillator)與輸出(output)，(Devlin, 2002)



圖八：植物與生物時鐘相關的光接收器，與其偵測範圍。(Fankhauser and Staiger, 2002)



圖九：阿拉伯芥生物時鐘的中心節律器運作機制與重設方式：由 TOC1 與 LHY/CCA1 三種 clock protein 交互作用的負向調控迴圈產生概日韻律調控基因的表現，並由 phytochrome B 接收紅光後，進入核中，與 PIF3 結合後，改變 LHY 與 CCA1 基因表現來重設生物時鐘。(Fankhauser and Staiger, 2002)

參考文獻：

- Devlin PF. (2002) **Signs of the time: environmental input to the circadian clock.** J Exp Bot. 53(374): 1535-50.
- 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(3): 909-15.
- Fairchild CD, Schumaker MA, Quail PH (2000). **HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction.** Genes Dev.14 (18): 2377-91.
- Fankhauser C, Staiger D. (2002) **Photoreceptors in Arabidopsis thaliana: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock.** Planta. 216(1): 1-16.
- Hicks KA, Millar AJ, Carre IA, Somers DE, Straume M, Meeks-Wagner DR, Kay SA (1996) **Conditional circadian dysfunction of the Arabidopsis early-flowering3 mutant.** Science 274:790-792
- Kevei E, Nagy F. (2003) **Phytochrome controlled signaling cascades in higher plants.** Physiol Plant. 117(3): 305-313.
- Nagy F, Schaefer E. (2000) **Nuclear and cytosolic events of light-induced, phytochrome-regulated signaling in higher plants.** EMBO J 19: 157-163.
- Nagy F, Schaefer E (2002) **Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants.** Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 53: 329-355