

令和元年6月20日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07447

研究課題名(和文) 基部植物ヒメツリガネゴケの生物時計解析 時計機能の多様化原理の理解に向けて

研究課題名(英文) Study of the biological clock in the basal plant *Physcomitrella patens* -Toward understanding diversification principles of the clock functions.

研究代表者

青木 摂之 (Aoki, Setsuyuki)

名古屋大学・情報学研究科・准教授

研究者番号：30283469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：現在も原始的な特徴を示すコケ植物のモデル種ヒメツリガネゴケを用い、逆遺伝学を駆使しつつ生物時計の分子機構を研究した。その結果、重要な時計関連因子の候補として、コケや小葉類などの古い系統群に固有のキナーゼタンパク質であるPHK1とPHK2が見出された。またこれらのタンパク質は、酸素条件に依存し、茎葉体の形成を正にも負にも制御する興味深い発生制御因子であることを明らかにした。さらにPHK1とPHK2からリン酸転移を受ける下流因子としてHPT2タンパク質を同定し、これらの因子からなる新規のシグナル伝達機構の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：植物の生物時計は、光合成産物の蓄積や生殖のタイミングを制御する重要機構であるが、その進化や多様性に関する研究は進んでいない。この研究では、原始的な系統に属するコケ植物を用い、時計機構に関連深いシグナル伝達因子のPHK1とPHK2が、酸素条件に依存して植物の発生を制御する因子でもあることを明らかにした点で学術的な意義が大きい。社会的意義：この2つのタンパク質の機能研究を進めることで、将来的には潜水耐性の付与や効果的な生殖制御につながる可能性があり、農業や園芸などの応用分野における波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of a biological clock (circadian clock) was studied by using the moss *Physcomitrella patens*, a basal plant model species, to which reverse genetics is efficiently applicable. As a main result, a novel type of eukaryotic histidine kinases, PHK1 and PHK2, which are unique to ancient lineages such as bryophytes and lycophytes, were identified. It was revealed that they regulate development of gametophore tissues positively or negatively depending on ambient oxygen conditions. Moreover, HPT2 was identified as a factor functioning downstream of PHK1 and PHK2, indicating the presence of a two-component system that might function in the circadian clock mechanisms in basal land plants.

研究分野：光合成生物のモデル種を用い、生物時計の仕組みについて分子生理的な研究を行なっている。

キーワード：生物時計 ヒスチジンキナーゼ 二成分制御系 ヒメツリガネゴケ 逆遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物の生物時計：生物時計は、約1日周期の自律発振により多様な生物リズムを制御し、昼夜の環境変化への適応のために機能する仕組みである。真核生物では、時計の部品蛋白質をコードする「時計遺伝子」群の制御ネットワークの動態が発振を生み出すとされている。植物では、モデル被子植物のシロイヌナズナで解析が進み、CCA1/LHYやTOC1といった植物固有の時計遺伝子からなる時計遺伝子ネットワークモデルが提唱されているが、ネットワークのどこが発振機構なのか、どこが環境の入力や生理反応の出力を担う機構なのか、といった本質的問題は未解明であった。また、シロイヌナズナ以外の植物群の時計機構は多くが未解明で、植物時計の進化と多様性は謎のままであった。そこで、被子植物とは系統的に隔たった植物種で研究を進め、その成果をシロイヌナズナや、緑藻といった光合成生物の生物時計の知見と比較・対照することで、生物時計機構の機能上の区分けに関する重要情報が得られるのではないかと期待された。

(2) ヒメツリガネゴケを用いた時計研究：研究代表者の青木は、基部植物である蘚類のモデル種ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を用い、進化的観点から時計機構を解析し、次の成果を得ていた (図1)：1) シロイヌナズナの時計の主要機構「三棘み(さんすくみ)回路」の全要素遺伝子 (CCA1/LHY、LUX1/PCL1、ELF3、ELF4、PRRs) のホモログがコケゲノムに存在し、それらの間の主な制御関係と、少なくとも一部の要素遺伝子の機能がシロイヌナズナとコケの間で共通する。2) 青色光入力で連携して働くGI、ZTL、TOC1などを始めとして、かなりの数のシロイヌナズナ時計遺伝子のホモログがコケゲノムには存在しない。3) 主要な時計蛋白質であるPRR (Pseudo-Response Regulator) のコケホモログは、被子植物のPRRと異なり、真正のレスポンスレギュレータ (RR) として、二成分制御系特有のリン酸転移による信号伝達を行うらしい。このように異種間の比較により、コケと被子植物が共有する進化的な「コア回路」と、コケ固有の「サブ経路」が徐々に浮き彫りとなってきた。またリン酸リレーからなるコケ固有のサブ経路が、時計への環境入力を解明し、さらに、生物時計機能の多様化を、陸上植物の多様化と関係付けつつ理解する手がかりとして重要であると考えられた。こうした背景で、植物時計機構とその進化・多様化・起源を解明するため、ヒメツリガネゴケを用いて研究することには大きな優位性があると考えられた。

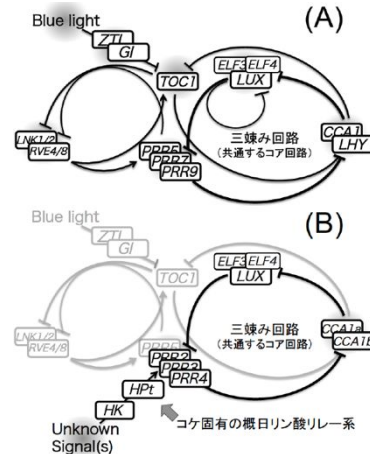


図1. (A)シロイヌナズナと(B)ヒメツリガネゴケの時計機構。主要な制御関係のみ記す。両方で、CCA1/LHY、LUX1/ELF3/ELF4、PRRs が順に抑制する「三棘み回路」が共通するらしい(太線で示す)。Bの灰色はコケにおいて欠けている部分。コケの時計はさらにHKとHPTからなるリン酸リレー系(左下)を持つ。

2. 研究の目的

ヒメツリガネゴケを用いて次の3つの課題を遂行し、植物の生物時計の分子機構の解明を目指す：

- 1) CCA1/LHYやPRRなどのコケゲノムに見つかる時計遺伝子ホモログの時計発振における機能を解明する。
- 2) コケのPRRにリン酸を転移する「概日リン酸リレー系」の要素遺伝子を同定し、それらの生理機能を解明する。
- 3) これらの解析結果を踏まえて、コケの時計機構解明に向けた数理解析に着手する。

こうしてコケの時計機構の解明を目指し、さらに他植物種や緑藻、シアノバクテリアなどの多様な光合成生物の時計機構との対比により、植物時計の進化と多様化の原理に迫る。

3. 研究の方法

ヒメツリガネゴケを用い、次の方法により研究を進める：1) CCA1/LHYやPRRなどの時計遺伝子ホモログに関し、相同組換えに基づく逆遺伝学解析を進め、周期の制御やリセット機能、さらには出力の制御など、それら遺伝子の「時計機能」を探る。2) コケ時計において働くヒスチジンキナーゼを推定し、その(生物時計に関係しない側面も含めて)生理機能を逆遺伝学的に解析する。また酵母2ハイブリッドシステムにより、リン酸含有転移因子(HPT)、RRといったパートナー因子を同定し、時計機構で働くコケ固有の二成分制御系を明らかにする。3) パーティクルガンによるエフェクター導入とルシフェラーゼレポーターアッセイを組み合わせた共導入アッセイ法を確立し、遺伝子のリズム発現の解析に活用する。4) シロイヌナズナの時計機構についての理論研究を活用するなどし、コケの時計遺伝子の動態データを組み込んだ連立微分方程式にもとづく計算機シミュレーションを行い、分子モデルの構築・妥当性検証に役立てる。

4. 研究成果

(1)逆遺伝学による概日ヒスチジンキナーゼ候補遺伝子PHK1とPHK2の生理機能の解析 シロイヌナズナの時計タンパク質 Pseudo-Response Regulators (AtPRRs) のコケホモログ PpPRRs は、被リン酸化配列のDDKモチーフを有し、また in vitro でリン酸転移の基質となるので、高等

植物の PRRs とは違い、二成分制御系の真性 RR であると考えられた。そこで PpPRRs にリン酸転移するヒスチジンキナーゼ (HK) の候補として、植物の系統上でコケ型 PRR 配列群と分布が重なる 2 つの HK に注目した。これらのタンパク質は、多様な生物種の時計タンパク質に見出されるドメインである PAS ドメインを持つ点でも興味深く、このことから PAS-Histidine Kinase 1 と 2 (PHK1 と 2) と名付けて解析を行なった。まず、これらタンパク質をコードする *PHK1*、*PHK2* 遺伝子の経時発現を定量 PCR 法で調べたところ、両遺伝子ともに、暗期で発現が低くなる日内発現変動を示すことがわかった。次に、両遺伝子について相同組換えによる遺伝子破壊を施し、*PHK1*、*PHK2* それぞれの一重変異株と両者をともに欠いた二重変異株を作出した。これらの変異株では、野生型株と比べ、1) 茎葉体の発生が明暗サイクル条件特異的に早期化し、また、2) AP2 タイプの茎葉体発生制御因子 *AINTEGUMENTA*, *PLETHORA* and *BABY BOOM* (*APB*) 遺伝子群の転写活性が上昇することを明らかにした。さらに 1) の原因として、破壊株で赤色光によるカウロネマ側枝始原細胞 (SIBC) の分岐誘導が促進することを発見した。つまり、*PHK1* と *PHK2* は、野生型株では (おそらくファイトクロムを介した) 光による SIBC の分岐誘導を抑えることにより茎葉体発生のタイミングを遅らせており、この制御には *APB* 遺伝子群が仲介因子として関与している可能性が考えられた (一方で、茎葉体形成の制御過程をさらに特定するため、茎葉体原基の bud の形成率を野生型株と *PHK1/PHK2* 二重破壊株との間で比べたが、有意な差は見られなかった)。また、*CCA1* ホモログほかいくつかの生物時計関連遺伝子の転写活性を比較したところ、野生型株に比べて破壊株では *CCA1* ホモログの一つ *CCA1b* の転写が顕著に上昇する結果を予備的に得た。このことから、*PHK1* と *PHK2* は生物時計の制御に関わる可能性が示された。なお、サイトカニンを始めとして各種植物ホルモンに対する感受性を野生型株と変異株の間で比べたが、調べた条件では違いは見つからなかった。さらに、下記(3)の解析から *PHK1* と *PHK2* が酸素センシングに関わる可能性が考えられたため、冠水条件と低酸素条件 (酸素濃度約 8%) の両条件において、野生型株と破壊株との間で茎葉体形成数を比較した。その結果、どちらの条件においても、好気条件とは逆に、破壊体の茎葉体形成数が減ることを見出した。このため、*PHK1* と *PHK2* が実際に酸素センシングに関与し、恐らくそれによって周囲の水の有無を確認している可能性が高いと考えられた。さらに、GFP との融合タンパク質の原系細胞内での一過的発現により、*PHK2* は核に局在すると推定された (rATPase-RFP 融合タンパク質由来の蛍光パターンとの比較にもとづく)。

(2)*PHK1* と *PHK2* と相互作用する二成分制御因子の同定 ハイブリッド型の二成分制御系では、HK はまず Histidine-containing Phosphotransfer 因子 (HPt) にリン酸転移し、シグナルを伝達する。ゲノムデータベースの検索と詳細な系統解析により、ヒメツリガネゴケが 3 つの HPt を持つことを明らかにし、HPt1、HPt2、HPt3 と命名した (これらのうち HPt3 はリン酸転移に必要なヒスチジン残基を欠いていた)。酵母 2 ハイブリッドシステムを用い、これらのうち HPt2 が *PHK1*、*PHK2* 双方と相互作用することを明らかにした。HPt2 と時計タンパク質 Pseudo-Response Regulator 2 (PRR2) との相互作用を酵母 2 ハイブリッドシステムでさらに調べた結果、相互作用は認められなかったが、コケの他の 2 つの HPt、HPt1 と HPt3 も PRR2 と相互作用を示さなかったため、この結果はさらに検証が必要であると考えられた。

(3) 系統解析による *PHK1* と *PHK2* の機能推定 最尤法に基づく系統解析により、*PHK1* と *PHK2* は小葉植物やゼニゴケの、シャジクモの PAS-HK タンパク質群と系統的に関連深いことが分かった。また *PHK1* と *PHK2* の PAS ドメインは、ファイトクロムや HD-ZIP III など、高等植物の各種 PAS タンパク質の PAS ドメインとはクラスターせず、むしろバクテリアの PAS 含有タンパク質 (PAS-HK の組み合わせを持つものが多い) の PAS に近いことが分かった。これらの結果と、緑藻類に *PHK1*、*PHK2* のホモログが見つからないことから、*PHK1* と *PHK2* は細菌からシャジクモへの水平伝播で植物の系統に獲得された可能性があることが示唆された。また *PHK1* と *PHK2* の PAS は、特にバクテリアの酸素センサー FixL の PAS の近傍に位置づけられるため、*PHK1* と *PHK2* が酸素センシングに関わる可能性が考えられた。

(4) ヒメツリガネゴケにおける効果的な概日遺伝子発現アッセイ系の確立 まず、パーティクルガンを用いたコケ原系コロニーへのレポーターコンストラクトの撃ち込みによる、遺伝子発現リズムの一過的測定の条件検討を行った。その結果、従来の測定結果よりも斉一性・再現性に勝る条件を確立した。また、時計遺伝子プロモーターとルシフェラーゼレポーター遺伝子の連結配列を微調整したレポーターコンストラクトを用いて安定な形質転換体を作成することにより、従来よりも発光レベルとリズムの振幅の高いコケのリズムレポーター株の作出を試みた。*CCA1b*、*PRR2* といった主要な時計遺伝子のプロモーターを用いてコンストラクトの作製・導入を行い、形質転換株を作出し、継時的な発光変動測定を行なったが、発光レベル、リズムの振幅はともに従来のレポーター株よりも低く、目的は達成できなかった。

(5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望について PAS ドメインを持つヒスチジンキナーゼ *PHK1* と *PHK2* は、茎葉体形成に対し好気-嫌気条件で逆の制御を及ぼす興味深い因子であることが分かった。さらに細胞内局在の検証や相互作用相手の同定により、生理機能を裏打ちする特徴を明らかにできた。これらのタンパク質は、環境の酸素濃度を検知す

ることで冠水/非冠水状態を確認し、その結果に応じて茎葉体形成を制御する因子であると考えられる。茎葉体形成は生殖器官の形成につながる重要な発生過程であり、またコケ植物では精子が茎葉体の表面を泳いで受精に至る。これらの点から、PHK1とPHK2は、水環境の変化に応じて生殖に至る発生過程を促す「世代交代」タイマーである可能性が考えられた。植物の進化によって、世代交代様式の変遷は大きな要因であったので、本研究の成果は植物の進化と多様化の原理解明のうえで有意義な知見となると考えられる。一方で、PHK1とPHK2両遺伝子が高振幅の日周変動発現を示す点や、遺伝子破壊株で時計遺伝子 *CCA1a* の転写が促進される点などから、PHK1とPHK2が概日時計機構と密接な関係にあることも示唆された。これらの成果は、植物の時計機構の解明に資するうえ、今まで不明確であった植物時計の進化・多様化の一端を明らかにした点で重要である。また、今後この成果を踏み台として、近年ますます蓄積しつつある多様な植物種のゲノム/トランスクリプトーム情報を活用し、各植物種の時計機構や他の代謝・生理調節機構との関係を探ることにより、植物の時計の進化と多様性、そして起源にさらに迫ることが可能であると考えられ、基礎生物学上の意義・重要性が大きい。さらに、PHK1とPHK2の生理機能の解明は、将来的には湛水耐性の付与や生殖制御による高機能作物種の作出にもつながる可能性があり、応用のうえでも波及効果の高い研究に発展することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Ryo M, Yamashino T, Yamakawa H, Fujita Y, Aoki S. PAS-histidine kinases PHK1 and PHK2 exert oxygen-dependent dual and opposite effects on gametophore formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 503(4):2861-2865. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.056. (査読あり)

Ryo M, Yamashino T, Nomoto Y, Goto Y, Ichinose M, Sato K, Sugita M, Aoki S. Light-regulated PAS-containing histidine kinases delay gametophore formation in the moss *Physcomitrella patens*. *J Exp Bot*. 2018 69(20):4839-4851. doi: 10.1093/jxb/ery257. (査読あり)

〔学会発表〕(計12件)

中井 隼太「ヒメツリガネゴケのPASヒスチジンキナーゼの研究」名古屋生物リズム研究会、2019年

中井 隼太「ヒメツリガネゴケにおけるPASヒスチジンキナーゼを含む二成分制御系の同定」第60回日本植物生理学会年会、2019年

青木 撰之「ヒメツリガネゴケのPASヒスチジンキナーゼの機能解析」日本遺伝学会第90回大会、2018年

佐藤 健介「コケ植物のPASヒスチジンキナーゼの機能解析」日本農芸化学会第183回支部例会、2018年

龍 昌志「ヒメツリガネゴケの茎葉体形成を制御するHKの解析」第二回名古屋リズム研究会、2018年

青木 撰之「研究課題の紹介」第二回名古屋リズム研究会、2018年

龍 昌志「ヒメツリガネゴケの茎葉体形成を抑制する二成分制御系の研究」日本農芸化学会中部支部第180回例会、2017年

龍 昌志「ヒメツリガネゴケの茎葉体形成を抑制する二成分制御系の解析」日本遺伝学会第89回大会、2017年

龍 昌志「ヒメツリガネゴケのPAS含有HKと概日時計」第58回日本植物生理学会年会、2017年

Ryo Masashi "Circadian Clock in the Moss *Physcomitrella Patens*" *Circadian Clock of Cyanobacteria during 1991-2017*, 2017年

¹¹ 龍 昌志「ヒメツリガネゴケの疑似レスポンスレギュレータータンパク質と相互作用する因子の探索」第23回日本時間生物学会、2016年

¹²Masashi Ryo "Study of factors that potentially interact with the Pseudo-Response Regulator proteins in the moss *Physcomitrella patens*" International Symposium on Biological Rhythms, 2016 年

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/view/aoki-lab/home>

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：中井 皐太

ローマ字氏名：Kohta Nakai

研究協力者氏名：佐藤 健介

ローマ字氏名：Kensuke Sato

研究協力者氏名：龍 昌志

ローマ字氏名：Masashi Ryo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。