

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19229

研究課題名(和文)花成ホルモン誘導化合物の解析

研究課題名(英文)Analysis of small molecule that induces flowering

研究代表者

中道 範人(Nakamichi, Norihito)

名古屋大学・理学研究科(WPI)・特任准教授

研究者番号：90513440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は大規模ケミカルスクリーニングより、花成ホルモン遺伝子FTの発現を誘導する人工化合物を得ていた。本研究では、化合物処理後の遺伝子発現プロファイリングなどによって化合物の作用経路の解明を目指した。その結果、本化合物は、ジベレリン経路や春化経路に関連する遺伝子の発現には影響を与えず、光周性遺伝子に影響を与えることが明らかとなった。また光周性の中でも、時計遺伝子の発現に大きな影響を与えていた。そこでその時計遺伝子を制御するタンパク質を中心に解析したところ、化合物はこのタンパク質の安定性を変化させることで花成時期を調節することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花成は植物の生活環において劇的な変化の1つであり、これにより植物は専ら光合成を目的とした個体の生長(栄養生長)から、次世代を残すための生殖生長へと生長相を転換させる。生殖生長への移行が環境変化にตอบสนองすることは、着生した場で一生を送るという生活をする植物に特徴的で洗練された環境応答といえる。本研究では生殖生長への移行(花成時期)を大きく変化させる人工化合物の主要な作用機序を解明できた。基礎科学として、光周性を制御する時計の分子機構に新たなメカニズムが潜んでいることを見出した。また応用的にも、この化合物の利用や化合物の作用点を理解した変異導入は新たな手法となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We obtained a small molecule that induces the expression of the florigen gene FT from a large-scale chemical screening. In this study, we aimed to elucidate the mode of action of the molecule by gene expression profiling. As a result, it was clarified that the molecule does not affect the expression of genes related to the gibberellin pathway and the vernalization pathway, but affects the photoperiodic pathway genes. Especially, the expression of clock genes that control the photoperiod pathway were affected by the molecule. Furthermore, was found that the molecule regulates the flowering time by changing the stability of the clock proteins that regulate the clock genes.

研究分野：植物科学

キーワード：化合物 花成 時計 作用機序

1. 研究開始当初の背景

花成は植物の生活環の中において劇的な変化であり、これにより植物はもっぱら光合成を軸とした個体の生長(栄養生長)から次世代を残すための生殖生長へと生長相を転換させる。生殖生長への移行が環境変化に応答することは、着生した場で一生を送るという生活をする植物に特徴的で洗練された環境適応といえる。

私はこれまでに長日モデル植物のシロイヌナズナの概日時計が花成ホルモン *FT* の発現を介して花成時期を制御していることを、時計変異体の形質の解析、花成ホルモン *FT* の遺伝子発現解析、また時計転写因子の網羅的標的同定によって明らかにしてきた(Nakamichi et al., PNAS 2012, Kamioka et al., Plant Cell 2016)。シロイヌナズナにおける時計から *FT* 発現制御へ至る経路が明らかとなりつつあるが、*FT* を制御する経路は他の植物種では異なることも報告されており、分子機構の多様性の理解は端緒に付いたばかりである (Itoh and Izawa, Mol Plant 2013)。またシロイヌナズナを含めてほとんどの植物種ではゲノムの重複した痕跡がまだ残っており、重複機能を持つ遺伝子群が多い (Arabidopsis Genome Consortium, Nature 2000)。したがって遺伝学が中心となって解明してきたシロイヌナズナの生命現象の分子機構の解明には遺伝子重複が問題となり、取得できなかった鍵遺伝子が隠されている可能性も高い。

ケミカルバイオロジーは分子機構の多様性の問題と遺伝子重複の問題を一挙に解決できる可能性を秘めている。しかし植物科学では低分子ホルモンの一部の研究を除いて、必ずしもその研究手法は成功を収めていない黎明期の研究方法である。申請者は、この研究方法の技術開発を行っており、ハイスループット概日時計イメージング実験系を整備し、それを使って時計を攪乱する低分子化合物のスクリーニングに成功している。またそのうちの1つの化合物の標的タンパク質を、化合物ビーズに結合するタンパク質を生化学的にスクリーニングすることにより明らかにしている(アフィニティープロテオミクス解析)。これらの解析技術は、植物ケミカルバイオロジーを進めるうえで強力な研究ツールとなる。

2. 研究の目的

私はシロイヌナズナの花成遺伝子 *FT* の発現を誘導する未報告の低分子化合物の発見をした。このような働きをもつ化合物は今のところ報告されておらず、この作用機序を解明することは、植物の遺伝子重複の問題を乗り越えて花成分子基盤の深い理解とその制御につながる。さらにこのような効果が強い化合物は、植物種を超えて作用する可能性が高い。したがって本研究のもう1つの意義は、多様性を見据えた植物生理学、分子生物学、農業現場に新たな研究ツールや生長調整剤を提供することである。

3. 研究の方法

化合物と既知の花成ホルモン誘導シグナルとの関係ははっきりしていない。そこでまず既知の花成ホルモン誘導シグナル(光周性、ジベレリン、春化)と化合物との関係を解析する。そのために化合物処理後のトランスクリプトーム解析を実施し、化合物によって変化する遺伝子を見出す。変化した遺伝子群が既知の花成ホルモン誘導シグナルに現れれば、化合物の作用経路の推定が可能である。さらに花成ホルモン誘導シグナル経路の変異体における化合物感受性を解析することで、化合物の作用経路を決定する。また化合物ビーズを用いたアフィニティープロテオミクスによって、化合物の直接的な標的タンパク質を同定する。さらに化合物の作用経路の検証を、分子生物学・生化学的な方法で進める。

4. 研究成果

(1) 花成ホルモン誘導シグナルと本化合物との関係の解析

既知の花成ホルモン誘導シグナル(光周性、ジベレリン、春化)と化合物との関係を調べるために、長日条件下(16時間明/8時間暗)で生育させたシロイヌナズナに化合物を処理し、花成ホルモン(*FT*)遺伝子の発現を逆転写定量PCRで解析した。短日条件下で見られた化合物による *FT* 遺伝子の発現誘導は、長日条件では観察されなかった。長日条件ではすでに *FT* 遺伝子の発現レベルが高く、化合物ではこれ以上の誘導はできないと解釈された。これは化合物の作用が、長日・短日(光周性反応)に依存していることを暗示していた。そこで光周性反応が低下し、日長に依存せず常に遅咲きになる変異体に化合物を処理し、*FT* 遺伝子の発現を観察したところ、*FT* 遺伝子発現の誘導性が低下していた。以上の解析により、この化合物による *FT* 遺伝子の発現誘導は光周性反応を介するものであることが示唆された。この仮説をさらに検証するために、光周性経路に関わる遺伝子のいくつかの変異体に、この化合物を処理し、光周性経路が活性化するかを判別した。光周性花成が亢進した株は野生型と比較して *FT* 遺伝子の発現が上昇しているが、化合物処理によってさらに *FT* 遺伝子の発現量が上昇した。また光周性花成経路が減弱している株では、この化合物による *FT* 遺伝子の発現上昇は認められなかった。花成経路亢進変異体の原因遺伝子は、この化合物の作用機序の経路で働くのではなく、花成経路減弱変異体の原因遺伝子がこの化合物の作用機序で重要な役割をもつことが明確になった。以上より、化合物の

作用において光周性経路が重要であることが強く示唆された。

(2) 化合物の標的生体分子の探索

研究協力者が作成した化合物ビーズを用いた化合物の標的探索(アフィニティープロテオミクス)を行った。本研究室で確立した化合物標的探索のプロトコール(Uehara et al., PNAS 2019, Saito et al., Plant Direct 2019), あるいはその改良した方法論でアプローチしていたものの化合物の標的とみなせるタンパク質の決定には至っていない。これは標的タンパク質と化合物の結合係数が未知であり, 我々の取り組んだ生化学実験でもちいた溶液や反応条件が適切でなかった可能性がある。あるいはこの化合物の標的はタンパク質以外の生体分子である可能性もある。化合物を結合させるビーズの種類やビーズの作成方法も検討の余地がある。またビーズを用いない別の分子プローブの利用を予定している。

(3) 化合物処理後のトランスクリプトーム解析

化合物の標的を探るために, 化合物の処理後の遺伝子発現変化は重要な情報となる。そこで, 比較的短時間(3時間)の化合物処理によって, 発現変化する遺伝子群を明らかにすることで, 化合物の作用機序を推測することを目指した。3時間の処理では, 調べた限りの花成経路遺伝子の発現変化が認められなかった。処理濃度を限界まで濃くしたが, その条件でも遺伝子発現の変化を捉えることができなかった。

化合物を1日処理すると花成ホルモン(*FT*)遺伝子の発現が上昇するため, 化合物処理1日目, 2日目で遺伝子の発現を解析した。植物を短日条件あるいは長日条件で生育させ, 化合物を処理し, 1日目, 2日目のRNAサンプルを3時間おきに回収した。このRNAをショートリードシーケンサーによるRNAseq解析に供与した。期待通り*FT*遺伝子は, 短日条件で化合物によって誘導された。化合物処理によって発現に影響をうける遺伝子群を抽出すると, これらの遺伝子群は日長依存的に誘導される遺伝子群であることが判明した。したがって, 本化合物は花成以外の日長依存的生理反応を網羅的に明らかにする働きがあることが示唆された。この成果は, 研究開始時には考えていなかったものであり, 本研究の成果から派生したものである。日長依存的な生理反応の全貌は, モデル植物のシロイヌナズナでもほとんど分かっていない。化合物の新たな生物活性「日長依存的な生理反応全般の攪乱」は, これまで報告されたことがなく, 基礎科学としても応用技術としても非常にユニークなツールを得たと確信している。

(4) さらなる化合物の探索

本化合物は光周性を攪乱することで, 花成時期を短縮化していることが明らかとなった。また花成時期制御以外の, 既知・未知の光周性反応全般を攪乱できることも明らかとなった。この化合物の基礎・応用での有用性はとてもユニークであるため, 同様の生物活性をもつ化合物の探索を行った。その結果, 別の構造を持つが花成誘導や*FT*の発現誘導を行うことのできる化合物を得ることに成功した。この成果は, 本研究を始めたタイミングでは予期していなかったものである。

(5) 化合物処理後のタンパク質の解析

(1)と(3)の長日・短日条件で育てた植物に対する化合物の*FT*遺伝子の誘導性の有無や, 光周性変異体での化合物感受性の変化などから, 化合物は光周性経路に作用することが明らかとなった。しかし(2)の取り組み, 化合物ビーズを用いた標的生体分子の同定は不首尾に終わっている。化合物は何らかの生体分子に結合し, その生物活性を出しているはずであり, その生体分子とは様々な機能をもつタンパク質のいずれかである可能性が高い。そこで, 化合物の作用機序の解明にむけて, 化合物処理によって量的・質的に変化するタンパク質の探索を行った。

まず(1)の解析により, 化合物の感受性が落ちた光周性変異体の原因遺伝子がコードするタンパク質が化合物処理によって変化するかを解析した。そのタンパク質を恒常的に発現する形質転換体を作成し, ウエスタンブロットによって目的タンパク質が検出できることを確認した。この形質転換体を化合物処理し, 1日後に植物を凍結し, その総タンパク質画分を回収した。この画分に含まれる目的タンパク質をウエスタンブロットで解析した。その結果, 化合物処理によって, このタンパク質の量が劇的に低下することが見出された。したがって, 化合物の作用経路の重要なステップとして, このタンパク質の量的制御があることが強く示唆された(投稿論文準備中)。

以上, 本化合物の作用を探ることで, あるタンパク質の量的制御が光周性経路で重要なステップであること, またこのステップは化合物によって調節できることを明確に示すことに成功した。なおこのタンパク質は維管束植物で高度に保存されているため, 化合物は潜在的にあらゆる農作物に効果を持つと考えられる。本研究においてまとめた時計や光周性反応の制御ネットワークの普遍性や多様性(Toda et al., Sci. Rep. 2019, Nakamichi et al., BBB 2020, Nakamichi Gene, 2020)と, このタンパク質の量的制御の新たな知見を比較しつつ, 新たな花成制御技術としての普及を狙いたい。

参考文献

Nakamichi et al., PNAS 109:17132-17128, (2012)

Kamioka et al., *Plant Cell* 28:696-711, (2016)
Itoh and Izawa, *Mol Plant* 6:635-649, (2013)
Arabidopsis Genome Consortium, *Nature* (2000)
Uehara et al., *PNAS* 116:11528-11536, (2019)
Saito et al., *Plant Direct* 3:e00172, (2019)
Toda et al., *Sci. Rep.* 9: 1-14, (2019)
Nakamichi et al., *BBB* 64:2493-2496, (2020)
Nakamichi, *Gene* 11: #1284, (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Uehara TN., Mizutani Y, Kuwata K, Hirota T, Sato A, Mizoi J, Takao S, Matsuo H, Suzuki T, Ito S, Saito AN., Nishiwaki-Ohkawa T, Yamaguchi-Shinozaki K, Yoshimura T, Kay SA., Itami K, Kinoshita T, Yamaguchi J, Nakamichi N.	4. 巻 116
2. 論文標題 Casein kinase 1 family regulates PRR5 and TOC1 in the Arabidopsis circadian clock	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 11528 ~ 11536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1903357116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Saito Ami N., Matsuo Hiromi, Kuwata Keiko, Ono Azusa, Kinoshita Toshinori, Yamaguchi Junichiro, Nakamichi Norihito	4. 巻 3
2. 論文標題 Structure-function study of a novel inhibitor of the casein kinase 1 family in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 e00172 ~ e00172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pld3.172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ono Azusa, Sato Ayato, Fujimoto Kazuhiro J, Matsuo Hiromi, Yanai Takeshi, Kinoshita Toshinori, Nakamichi Norihito	4. 巻 60
2. 論文標題 3,4-Dibromo-7-Azaindole Modulates Arabidopsis Circadian Clock by Inhibiting Casein Kinase 1 Activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2360 ~ 2368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Aoki Saya, Toh Shigeo, Nakamichi Norihito, Hayashi Yuki, Wang Yin, Suzuki Takamasa, Tsuji Hiroyuki, Kinoshita Toshinori	4. 巻 9
2. 論文標題 Regulation of stomatal opening and histone modification by photoperiod in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46440-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamichi Norihito, Kudo Toru, Makita Nobue, Kiba Takatoshi, Kinoshita Toshinori, Sakakibara Hitoshi	4. 巻 84
2. 論文標題 Flowering time control in rice by introducing Arabidopsis clock-associated PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 970 ~ 979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1719822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toda Yosuke, Kudo Toru, Kinoshita Toshinori, Nakamichi Norihito	4. 巻 9
2. 論文標題 Evolutionary Insight into the Clock-Associated PRR5 Transcriptional Network of Flowering Plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39720-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamichi Norihito	4. 巻 11
2. 論文標題 The Transcriptional Network in the Arabidopsis Circadian Clock System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11111284	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masuda Kosaku, Tokuda Isao T., Nakamichi Norihito, Fukuda Hirokazu	4. 巻 12
2. 論文標題 The singularity response reveals entrainment properties of the plant circadian clock	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21167-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 中道範人	4. 巻 58
2. 論文標題 有用品種から紐解く植物の概日時計メカニズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 646-648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Norihito Nakamichi
2. 発表標題 Small molecules targeting Casein Kinase 1 family modulate Arabidopsis circadian clock
3. 学会等名 Frontiers in plant environmental response research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中道範人
2. 発表標題 Origin of molecules underlying plant circadian clock
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norhito Nakamichi
2. 発表標題 Molecular mechanism underpinning the plant circadian clock
3. 学会等名 The Universities of Edinburgh and Nagoya Joint PhD Degree Program meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norihito Nakamichi
2. 発表標題 A small molecule reveals novel post-translational regulation of plant circadian clock
3. 学会等名 第25回時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中道範人
2. 発表標題 植物の時間を操る技術
3. 学会等名 平成30年度アグリビジネス創出フェアin東海（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野梓、松尾宏美、佐藤綾人、木下俊則、中道範人
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける新規時計長周期化合物
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中道範人
2. 発表標題 夢の花成制御技術の開発
3. 学会等名 Bio-tech アカデミア（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中道範人
2. 発表標題 植物の時間を調節するトランスフォーマティブ生命分子
3. 学会等名 生物リズム若手研究者の集い(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中道範人
2. 発表標題 A small molecule modulating circadian clocks both in plant and animal
3. 学会等名 第24回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中道範人
2. 発表標題 Molecular study of circadian clock with small molecules
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2017(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中道範人
2. 発表標題 農芸化学的な植物体内時計の解析
3. 学会等名 農芸化学Frontiersシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中道範人
2. 発表標題 体内時間を変えるトランスフォーマティブ生命分子
3. 学会等名 第59 回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中道範人, 松尾宏美, 大野梓, 前田明里, 佐藤綾人, 伊丹健一郎, 木下俊則, 山口潤一郎
2. 発表標題 時計攪乱化合物の作用機序
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田明里, 松尾宏美, 木下俊則, 中道範人
2. 発表標題 シロイヌナズナの概日時計の温度補償性が減衰した変異体について
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 花成時期調節剤、農薬組成物及び植物の花成時期の調節方法	発明者 中道範人ら	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017-151824	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------