

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570007

研究課題名(和文)分子ネットワーク比較に基づく植物生物時計機構の理解

研究課題名(英文) Understanding of the mechanism of the plant biological clock based on comparison between molecular networks.

研究代表者

青木 摂之 (Aoki, Setsuyuki)

名古屋大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：30283469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：生物時計は約24時間周期の内因性振動体であり、昼夜の周期的環境変化に対する重要な適応機構である。この本研究では、モデル高等植物シロイヌナズナとは系統的に大きく隔たるモデル基部植物ヒメツリガネゴケを用いて、生物時計の機構研究を行い、シロイヌナズナの時計機構モデルとの比較を行った。その結果、CCA1遺伝子群とPRR遺伝子群からなる高等植物時計との共通機構と、PRRタンパク質のリン酸化に繋がる基部植物の固有機構とが浮き彫りとなった。これらの成果により、植物の生物時計の分子機構とその進化についての理解を大きく進める事が出来た。

研究成果の概要(英文)：The biological clock is an endogenous oscillation mechanism with a period of about one day, and it is an important adaptive mechanism to survive under day-night environmental cycles. In this study, we studied the molecular mechanisms of the clock of a model basal plant *Physcomitrella patens*, which diverged from higher plants including the model dicot *Arabidopsis thaliana* at least 450 million years ago. By the comparison of the clock machineries between *P. patens* and *A. thaliana*, we unraveled the mechanisms shared in both plants, mainly consisting of member genes of CCA1 and PRR families and their interactions, and also a mechanism specific to the moss plant, which includes phosphorylation of PRR proteins. By these findings, understanding of the molecular mechanisms of the plant clocks and their evolutionary changes has been greatly facilitated.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：生物時計 生物リズム 進化 ヒメツリガネゴケ 遺伝子破壊 リン酸リレー

1. 研究開始当初の背景

生物時計は約 24 時間周期の内因性自律振動機構であり、昼夜の周期的環境変化に対する重要な適応機構である。真核生物の生物時計の仕組みは、時計の部品タンパク質をコードする一群の「時計遺伝子」の制御ネットワークに基礎を置くとされる。植物では、モデル高等植物のシロイヌナズナを用いた解析により、*CCA1*・*LHY* 遺伝子対や *PRR* 遺伝子群など、多くの時計遺伝子がみつき、それら遺伝子間の制御ネットワークに基礎を置く機構モデルの拡充と複雑化により研究が進められて来た(文献1)。しかし、研究の進展により機構モデルのネットワーク構造が複雑になるにつれ、逆説的に時計発振の真の仕組みはかえって捉え難くなっていた。

2. 研究の目的

シロイヌナズナと進化的に非常に隔たる(しかし「隔たり過ぎない」)植物種で時計機構を解析し、その結果をシロイヌナズナの時計機構の知見と比較することにより、植物の時計の共通機構(「コア」機構と呼ぶ)と系統グループに個別の機構(「サブ」機構)をはっきりさせ、時計発振の真の仕組みを明らかにする。またそれと同時に植物の時計機構の進化の筋道を解明する。

3. 研究の方法

シロイヌナズナを含む維管束植物とは 4 億 5 千万年以上前に分岐したコケ植物(蘚類)の一種であり、相同組換えに基づく遺伝子破壊が容易に適用可能であるなど、実験上の利点を多く持つヒメツリガネコケを用いて、生物時計の分子機構を解析する。その結果をシロイヌナズナの時計の機構モデルと比較対照し、両者に共通であるコア機構と、コケ植物に固有のサブ機構とを浮き彫りにする。このアプローチにより、植物に共通する時計の中核的な仕組みと、進化に伴うその変遷の有り様を解明する。

4. 研究成果

(1)コケの時計遺伝子ホモログのカタログ化  
研究開始の段階で *CCA1/LHY* 遺伝子のホモログである *CCA1a/CCA1b*、*PRR* 遺伝子群のホモログである *PRR1/PRR2/PRR3/PRR4* を既に分離・解析していた(文献2、3)。コケの各種データベースを活用し、これら以外の、コケゲノムに存在する既知時計遺伝子のホモログ配列を羅列したうえで、多くのホモログについて完全長 cDNA 配列を取得・決定した。主要時計遺伝子については、コケは動物・菌類・シアノバクテリア等の植物以外の時計遺伝子のホモログを一切持たない事、多くの場合、2-4 程度のスプライズバリエーションを持つ事等がわかった。

(2)時計遺伝子(ホモログ)のゲノム上流調

節配列の解析  
すでに時計機能を明らかにしている *CCA1a/CCA1b*、4 つの *PRR* 遺伝子群、そして他の時計遺伝子ホモログについて、ゲノム上流配列の解析を行った。多くの遺伝子については oligo capping 法により cDNA の完全な 5' 末端配列を明らかにし、転写開始点の推定を行ったうえで解析した。その結果、*PRR* 遺伝子群の上流領域に *LUX* 結合部位が、また *LUX* 遺伝子群の上流に *CCA1* 結合部位がみつかるなど、シロイヌナズナで示唆されている *PRRs*→*CCA1/LHY*→*EC* (Evening complex)→の三すくみ回路仮説を指示する知見が得られた。

(3)*CCA1a/CCA1b* 二重欠損変異株を用いた解析  
既に得られていた *CCA1a/CCA1b* 二重欠損変異株(文献1)を用いて、*PRR* 遺伝子群の発現を解析した。その結果、*CCA1a/CCA1b* による制御について、4 つの *PRR* 遺伝子間で違いがある事がわかった。系統解析の結果や光応答解析の結果(文献2)と合わせて、*PRR3* と *PRR4* は *CCA1a/CCA1b* を介して光により誘導されるが、一方で *PRR1* と *PRR2* は時計による自律的な制御が主で、光による誘導は殆ど見られないことが示された。

(4)生物リズムのトランジェントアッセイによる解析法の確立  
研究開始当初すでにルシフェラーゼレポーター遺伝子をゲノムに挿入した「安定な」レポーター株を用いた発光リズムの測定が可能であった。これに加えて、2 つの方法に基づくトランジェントアッセイ系を開発した。

ポリエチレングリコール(PEG)法による方法  
PEG 存在下でプロトプラスト細胞にレポーター DNA を移入する事により、プロトプラストから *PRR1* や *CCA1b* などの時計遺伝子の発現リズムを一過的な発光リズムとして観察する実験系を確立した。また安定なレポーター

株の細胞をプロトプラスト化したうえで、同様に PEG 法により発光リズムを観察する事にも成功した。ただし、これらのリズムの発光のレ

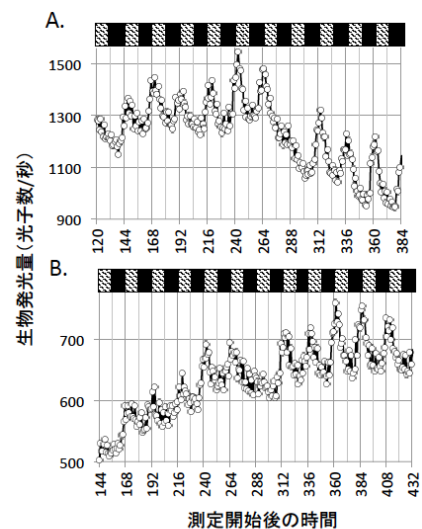


図1. パーティクルボンバードメントによるトランジェントアッセイの結果 A、*CCA1b*レポーター株の発光リズム; B、*PRR1*レポーター株の発光リズム。

ベルは非常に高かったが、連続条件下でのリズムの振幅が非常に弱く、また長くて3-4日程しか続かず、継続性も非常に低かった。

パーティクルボンバードメント (PB) 法による方法 PEG 法には上記の欠点がみられたので、プロトプラスト化しないで DNA 導入できる PB 法に基づく方法の確立を試みた。その結果、プロトネマ組織にレポーター DNA を PB で導入する事により、発光リズムを観察する事が出来た。発光レベルは PEG 法の場合よりも低かったが、連続暗条件下と明暗サイクル条件下で十分な振幅の発光リズムを観察する事が出来た。このリズムは非常に持続性が良く、場合によっては測定開始後6日以降に、さらに10日間に渡りはっきりした振動を示した(図1)。一方で連続明条件下では、安定な形質転換体を用いた場合と同様に、自律的な振動が見られないことがわかった。さらに様々な培養条件で測定を行う事により、この実験系で観察される発光リズムの生理的な特性を明らかにした。さらにこの実験系で、レポーター DNA と、強力な E7Qn プロモーターの下流に他の時計遺伝子 cDNA を繋いだエフェクターとを同時にプロトネマ組織に導入し、発光パターンを調べる共導入実験を試みた。その結果、予備的ではあるが、安定な形質転換体を用いた解析と同様な結果が得られた。

(5)新たな安定なレポーター株を用いた解析 既に確立していた *Lhcb2* レポーター株と *CCA1b* レポーター株に加えて、他の時計遺伝子のプロモーターと *luc* 遺伝子を連結し、ゲノムに移入する事により安定なレポーター株の作出を試みた。その結果、特に *PRR4* のプロモーターを用いたレポーター株において、高振幅な発光リズムが観察された。このレポーター株を用いて、*CCA1a/CCA1b* ほかの時計遺伝子の遺伝子破壊を試み、候補株を得た。それらの解析は現在継続中である。

(6)*PpX-HK1a* と *PpX-HK1b* (仮称) の解析 コケの PRR タンパク質のうち、*PRR2/3/4* は典型的なレスポンスレギュレーターが持つ「D-D-K モチフ」を保持する。このモチフはリン酸リレーによるリン酸化の標的配列であり、また実際に、*in vitro* アッセイにより、コケ *PRR2* がリン酸リレー系によりリン酸化されることが分かっていた(文献3)。*PpX-HK1a/PpX-HK1b* はヒスチジンキナーゼをコードし、その植物系統樹上のホモログの分布が、DDK 型 PRR 配列を持つ植物種の系統樹上の分布と完全に一致するため、コケなどが持つ原始的な PRR へのリン酸リレーに関わるヒスチジンキナーゼと考えられた。この二つの遺伝子の完全長 cDNA を分離し、その発現解析を行い、また遺伝子破壊株の作出を試みた(解析継続中)

(7)ヒメツリガネゴケの時計機構の推定

以上の解析結果により、ヒメツリガネゴケの生物時計の分子機構と、植物の進化に伴う時計機構の変遷の概要を推定した。当初想像したように、ヒメツリガネゴケは、シロイヌナズナと同様に *PRRs*→*CCA1/LHY*→*EC*→から成る三すくみ回路を共通機構として保持するが、*TOC1* や *ZTL*、*GI* といった青色光シグナルに関わる時計遺伝子を持たない。その一方で、シロイヌナズナと対照的に、*PRR* (の大部分) はリン酸リレーによるリン酸化を受ける。この「概日リン酸リレー系」で働く事が推定されるヒスチジンキナーゼは光受容ドメインを持っている。従って、コケの時計機構に置いては、シロイヌナズナで *ZTL* 他因子が受け持っている青色光による振動制御機構を、概日リン酸リレー系が代替している可能性がある。

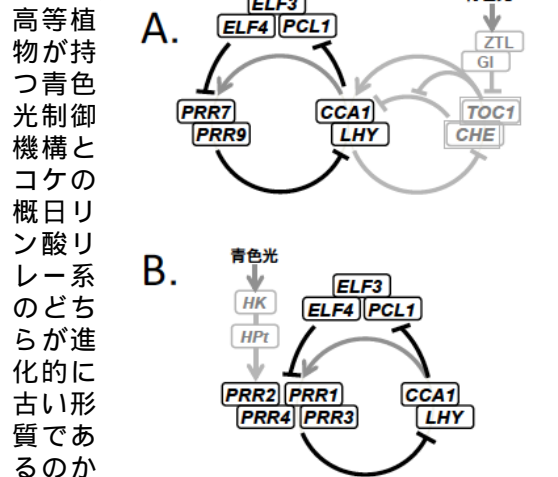


図2. 植物の生物時計モデル

A、シロイヌナズナの生物時計の仕組みのモデル。黒い部分は時計の振動を生み出すコア回路。灰色の部分は光の情報のコア回路に伝えるサブ回路; B、ヒメツリガネゴケのモデル。四角は遺伝子を、矢印は遺伝子の活動を促す働きを、T字は遺伝子の活動を抑える働きを示す。

*TOC1* を持つとされる)が、一部の原始的植物のゲノムには両システムの遺伝子が併存している場合があり(イヌカタヒバ等)、両システムは異なる制御を分担しており、進化に伴う環境の変化により、一方のシステムが不要となっていた、というシナリオが考えられる。これらの可能性については今後解析を継続する事によって、何らかの答えを出したいと考えている。なおこれらの総括の内容は、英文総説として出来るだけ早く発表する予定である。

文献:

1) Complexity in the wiring and regulation of plant circadian networks. Nagel DH, Kay SA. Current Biology (2012) 22(16):R648-657.

2) Functional characterization of

CCA1/LHY homolog genes, *PpCCA1a* and *PpCCA1b*, in the moss *Physcomitrella patens*. Ryo Okada, Sayo Kondo, Satbhai SB, Yamaguchi N, Tsukuda M and Aoki S. Plant Journal (2009) 60(3):551-563.

3) Pseudo-Response Regulator (PRR) homologues of the moss *Physcomitrella patens*: Insights into the evolution of the PRR Family in land plants. Satbhai SB, Yamashino T, Okada R, Nomoto Y, Mizuno T, Tezuka Y, Itoh T, Tomita M, Otsuki S and Aoki S. DNA Research (2011) 18(1):39-52.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 1 件)

Cyclic bis(3'-5')diadenylic acid (c-di-AMP) analogs promote the activities of photosynthesis and respiration of *Chlamydomonas reinhardtii*"Takafumi Tezuka\*, Hiroshi Shirouzu, Keigo Ishida, Noritaka Suzuki, Takuya Matsuo, Kin-ichi Oyama, Setsuyuki Aoki and Masaki Tsukamoto. American Journal of Plant Sciences. (2014) 5:24-28. (DOI: 10.1246/cl.2012.1723)

##### [学会発表](計 2 件)

龍昌志、一瀬瑞穂、杉田護、青木撰之「パーティクルガンを用いたランジェントアッセイによるヒメツリガネゴケの生物時計遺伝子の発現解析」第56回日本植物生理学会年会、2015年3月16日、世田谷区、東京農業大学世田谷キャンパス

龍昌志、出口大和、手塚裕紀、青木撰之「ヒメツリガネゴケの生物時計遺伝子の発現解析」第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18日、富山市、富山大学五福キャンパス

##### [図書](計 1 件)

Transformation and measurement of bioluminescence rhythms in the moss *Physcomitrella patens*" Setsuyuki Aoki, Ryo Okada and Santosh B. Satbhai. In Plant Circadian Networks (Methods in Molecular Biology, Vol. 1158), pp. 325-336, Edited by Dorothee Staiger. (2014) Humana Press, New York.

##### [その他]

ホームページ等

<http://inforhythmlab.jimdo.com>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

青木 撰之 (AOKI, Setsuyuki)

名古屋大学・大学院情報科学研究科・准教授

研究者番号：30283469

##### (3) 連携研究者

寺田智樹 (TERADA, Tomoki)

名古屋大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：20420367

山篠貴史 (YAMASHINO, Takashi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：00314005

北山陽子 (KITAYAMA, Yoko)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：20444367