

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：32615

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440141

研究課題名(和文)光周期補償性メカニズムの解明

研究課題名(英文)Studies on molecular mechanism underlying photoperiodic compensation

研究代表者

溝口 剛 (MIZOGUCHI, Tsuyoshi)

国際基督教大学・教養学部・教授

研究者番号：70281623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの野生型(WT)は明期長が異なる光周期下で生育させても、クロロフィル含量はほぼ一定であった。我々はこの機構を光周期補償性と定義した。一方、概日時計遺伝子の二重変異体 lhy;cca1 では明期の長さに依存してクロロフィル含量が増加した。これに伴って、アンテナタンパク質である、Light Harvesting Complex (LHC) のタンパク質量が増加していることが分かった。さらに、lhy;cca1 では葉緑体内膜構造のうち、グラナの重層数が著しく増加していることを透過型電子顕微鏡観察により明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Circadian clock ensures consistency in antenna size under different photoperiod conditions. We named this novel clock function "photoperiodic compensation." Double loss of function of LHY and CCA1 (lhy;cca1) resulted in changes in the total chlorophyll (Chl) level and Chl a/b ratio depending on the photoperiod. Under continuous light conditions (LL), the total Chl level increased significantly and the Chl a/b ratio decreased in lhy;cca1 compared with those in the wild type (WT). Increased stacked grana thylakoid membranes in chloroplasts were also observed in lhy;cca1 under LL. LIGHT HARVESTING COMPLEX II, which is an antenna protein involved in photosynthesis, accumulated to high levels in lhy;cca1 under LL compared with the WT.

研究分野：植物分子遺伝学、植物生理学

キーワード：光合成 葉緑体 概日時計 LHY CCA1 シロイヌナズナ 光周性

1. 研究開始当初の背景

植物にとって、光は最も重要な情報の一つである。それを効率的に利用するために、約 24 時間周期の内生リズムを作り出す機構(概日時計)が重要な働きをしている。シロイヌナズナにおける概日時計の主要な構成因子である *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* と *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* の二重欠損変異体 (*lhy;cca1*) では、恒明条件下で概日リズム制御機能が著しく低下し、花成遅延や胚軸・葉柄の短縮及び、顕著な濃緑色葉の形質が表れる。我々はこれまでの研究により、花成や器官伸長異常の分子メカニズムを明らかにしてきた。しかし、これらの知見からのみでは、恒明条件下の *lhy;cca1* で見られる濃緑色葉形質について十分に説明できない。葉の緑色は、クロロフィルという光合成色素由来であり、クロロフィルはアンテナタンパク質に結合して葉緑体内で光エネルギーを集める働きをしている。アンテナタンパク質は光ダメージによる分解と生産を繰り返しているが、概日時計による制御機構は殆ど着目されていない。

2. 研究の目的

近年、細胞内の内膜構造は、電子顕微鏡観察で見られるような静的なものではなく、成長段階、外界の環境変化等に応じて形態・大きさ等が刻々と変化する動的なものであることが明らかにされつつある。このような生体膜ダイナミクスは、多様な生命現象の機能発現において根幹をなすと考えられていることから、生命現象を正確に捉え解釈する上で、生体膜ダイナミクスをライブイメージとして捉えることは非常に重要であるといえる。そこで、本研究では、1) 葉緑体内膜構造ダイナミクスのライブイメージング技術を確立すること、2) この新技術を利用してシロイヌナズナにおける光合成色素であるクロロフィル量及び a/b 比の光周期補償性メカニズムを解明することを研究目的とした。

3. 研究の方法

次の 4 課題を実施することとした。

(課題 1) 葉緑体が巨大化する変異体背景で *lhy;cca1* 変異による光周期依存的なグラナスタッキング数の変化を透過型電子顕微鏡により観察する。

(課題 2) *lhy;cca1* 変異による光周期依存的なグラナスタッキング数の変化を抑圧または増強する変異を同定する。

(課題 3) 葉緑体内膜構造ダイナミクスのライブイメージング技術を確立する。

(課題 4) 課題 3 で確立する技術を用いて、課題 1、2 の変異体及びその比較対象植物の

葉緑体内膜構造ダイナミクスのライブイメージを取得して比較解析する。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの野生型(WT)は明期長が異なる光周期下で生育させても、クロロフィル含量はほぼ一定であった。我々はこの機構を光周期補償性と定義した。一方、興味深いことに *lhy;cca1* では明期の長さ依存してクロロフィル含量が増加した。これに伴って、アンテナタンパク質である、Light Harvesting Complex (LHC) のタンパク質量が増加していることが分かった。さらに、*lhy;cca1* では葉緑体内膜構造のうち、グラナの重層数が著しく増加していることを透過型電子顕微鏡観察により明らかにした(図 1~4)。

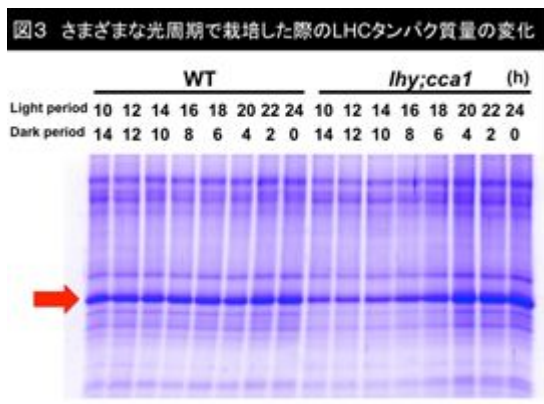
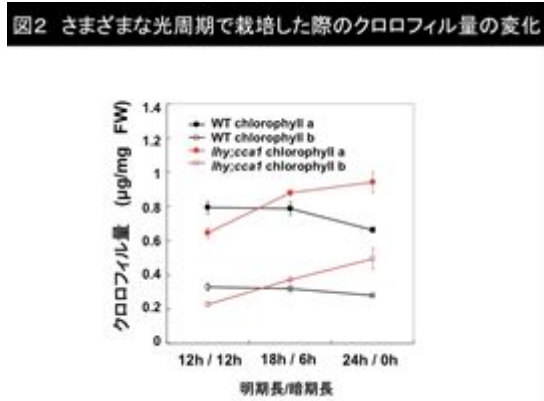
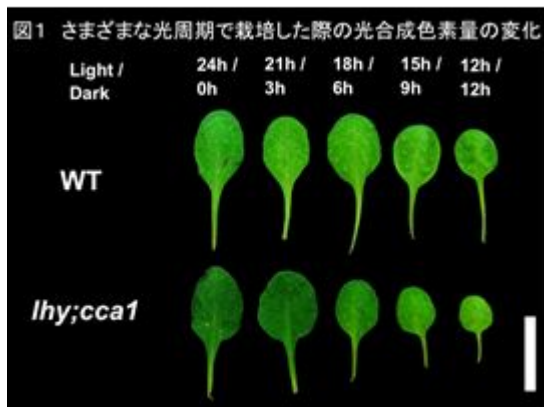
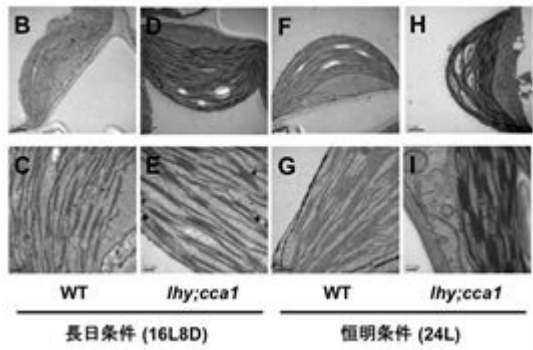


図4 葉緑体内グラナスタッキング数の変化



(2) *lhy;cca1* 変異による光周期依存的なグラナスタッキング数の変化を抑圧または増強する変異を同定するために、*lhy;cca1* 変異体に EMS 処理を行い、約 25 系統ごとに、M2 種子プールを作成した。これらを恒明条件下で培養土上に播種して、植物体の葉の色が、*lhy;cca1* 変異体の葉の濃緑色に比べて、淡いもしくは濃い変異体候補を多数選抜した。自家受粉により、各系統の次世代種子を収穫した。恒明条件 / 長日条件 (16 時間明期 / 8 時間暗期) / 短日条件 (8 時間明期 / 16 時間暗期) の 3 種類の光周期条件下で、これらの種子を播種して、葉の緑色、花成時期、胚軸長、葉柄長を観察・測定した。恒明条件下において、野生型に比べて、*lhy;cca1* 変異体の葉の緑色は濃く、花成時期は遅延して、杯軸長及び葉柄長が短縮することが分かっている。単離した候補系統の中で、10 系統については、*lhy;cca1* 変異体に比べて、葉の緑色は淡く、花成時期は野生型程度にはやくなり、杯軸長及び葉柄長も野生型程度まで回復した。以上の結果は、これら 10 系統は抑圧変異体の良い候補であり、本研究の良好な研究材料となることを示している。

(3) シロイヌナズナの概日リズム制御因子の二重変異体である *lhy;cca1* 変異による光周期依存的なグラナスタッキング数の変化を抑圧または増強する変異を同定することを目的として、既知の変異体と *lhy;cca1* 変異体を交配し、三重変異体を作成し、研究を行った。抑圧変異体の 1 つとして、*early flowering 3 (elf3)* 変異体を、増強変異体の 1 つとして、*gigantea (gi)* 変異体を既に単離し、解析中であった。*elf3* 及び *gi* 変異体を用いて、さまざまな環境下におけるクロロフィル a/b 蓄積パターンを解析するとともに、*elf3;gi* 二重変異体についても同様の解析を行った。また、クロロフィル量の制御において主要な働きをもつことが知られている 3 つの転写制御因子 *PIF3*、*PIF4*、*PIF5* の遺伝子発現量を、上記の変異体において、RT-PCR 法により比較解析した。

(4) 抑圧変異体の 1 つ *lhy;cca1;elf3*、増強変異体の 1 つ *lhy;cca1;gi*、これらの変異

を組み合わせさせた *elf3;gi* とともに、新規変異体について、クロロフィル量ならびにクロロフィル a/b 比を測定した。明暗周期下で栽培後に、暗所に移行後のクロロフィル量の減少が *gi* により抑圧されることを見出した。また、新規抑圧変異体については既知の抑圧変異である *elf3*、*svp*、*phyB* とのアレリズム試験を行った。

(5) 生物は外界環境の変化 (光、温度、湿度などの周期的または非周期的な日内・季節変化など) によらず、生命現象を一定に保つ戦略 (ホメオスタシス) と、積極的に利用して子孫繁栄に繋げる戦略 (光周期依存型花成制御など) を共存させている。基本的には生化学反応は温度依存的である。概日時計の周期は、多くの生物の生育温度範囲においてほぼ一定であり、一般的な生化学反応の温度依存性に対して、温度補償性と呼ばれている。近年、ある種の時計遺伝子の変異により、この温度補償性が失われることが発見され、温度補償性の分子機構解明が重要な研究課題となっている。本研究は、我々の研究グループの発見を契機として「光周期によらず一定に保つ機能に対する概日時計の役割」を研究対象とした点で、「光周期に依存した変化に対する概日時計の役割」に関する従来の研究とは全く異なる。光周期補償性の分子機構解明は、光周期依存型の他の応答性の理解、他の外界環境刺激に対する応答性の補償性との共通点・相違点の理解に大きく貢献しうるものとして、独創性の高い研究であり、今後の継続実施が必要である。

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 13 件)

1 Yamamoto K, Takahashi K, Hara M, Miyata K, Hayama R, Mizoguchi T*. (2016) Density effects on late flowering mutants of *Arabidopsis thaliana* under continuous light. *Plant Biotech* **33**, 323-331.

2 Takahashi K, Hara M, Miyata K, Hayama R, Mizoguchi T*. (2016) Density effects on semi-dwarf and early flowering mutants of *Arabidopsis thaliana* under continuous light. *Plant Biotech* **33**, 333-339.

3 Suzuki S, Miyata K, Hara M, Niinuma K, Tsukaya H, Takase M, Hayama R, Mizoguchi T*. (2016) A loss-of-function mutation in the *DWARF4/PETANKO5* gene enhances the late-flowering and semi-dwarf phenotypes of the *Arabidopsis* clock mutant *lhy-12;cca1-101* under continuous light without affecting *FLC* expression. *Plant Biotech* **33**, 315-321.

4 **Mizoguchi T***, Funabashi M. (2016) Environmental responses of plants: Biological interactions in the homogenous population or community (mixed populations). *Plant Biotech* **33**, 211-212.

5 Tsukamoto A, Hirai T, Chin DP, Mii M, **Mizoguchi T***, Mizuta D, Yoshida H, Olsen J, Ezura H, Fukuda N. (2016) The FT-like gene PehFT in petunia responds to photoperiod and light quality but is not the main gene promoting light quality-associated flowering. *Plant Biotech* **33**, 297-307.

6 **溝口剛***(2015)はじめに: Garner と Allard が 100 年前に抱いた疑問、特集: 植物の概日時計と光周性花成応答、植物の生長調節 49: 25-26

7 **溝口剛***(2015)長日植物シロイヌナズナの概日時計遺伝子変異が及ぼす光周性花成応答への影響、特集: 植物の概日時計と光周性花成応答、植物の生長調節 49: 27-33

8 Aihara K, Naramoto S, Hara M, **Mizoguchi T***. (2014) Increase in vascular pattern complexity caused by mutations in *LHY* and *CCA1* in *Arabidopsis thaliana* under continuous light. *Plant Biotechnology* **31**, 43-47.

9 Hara M, Kamada H, **Mizoguchi T***. (2014) *CO-EXPRESSED WITH CLOCK GENES LHY AND CCA1 1 (CEC1)* is regulated by *LHY* and *CCA1* and plays a key role in phase setting of *GI* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology* **31**, 35-41.

10 Mizuno Y, Okamoto S, Hara M, **Mizoguchi T***. (2014). EMS mutagenesis and characterization of *Brassica rapa* mutants. *Plant Biotechnology* **31**, 185-190.

11 Takase M, **Mizoguchi T***, Kozuka T, Tsukaya H. (2013). The unique function of the *Arabidopsis* circadian clock gene *PRR5* in the regulation of shade avoidance response. *Plant Signal Behav* **8**, e23534.

12 Mori K, Lemaire-Chamley M, Asamizu E, **Mizoguchi T***, Ezura H, Rothan C. (2013). Comparative analysis of common genes involved in early fruit development in tomato and grape. *Plant Biotechnology* **30**, 295-300.

13 Sugiyama H, Natsui Y, Hara M, Miyata K, Nefissi R, **Mizoguchi T***. (2013) Late flowering phenotype under ultra-short photoperiod (USP) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology* **31**, 29-34.

[学会発表](計 13件)

1 Coyne K, Hayama R, Mullen DM, **Mizoguchi T***, Circadian rhythm gating of transcription factors implicated in salinity stress in *Solanum lycopersicum*, JSOL 2016, The 13th Japan Solanaceae Consortium (Nov 25, 2016; Mitaka, Japan).

2 Takahashi K, Yamamoto K, Hara M, Miyata K, Hayama R, Ito E, Choi SW, **Mizoguchi T***, Density effects on late and early flowering mutants of *Arabidopsis thaliana* under continuous light, JSOL 2016, The 13th Japan Solanaceae Consortium (Nov 25, 2016; Mitaka, Japan).

3 Miyata K, Kobayashi M, Murayama Y, Hayama R, Ito E, Choi SW, **Mizoguchi T***, Gibberellic acid and PTA7 may control flowering time via a common genetic pathway in *Arabidopsis thaliana*, JSOL 2016, The 13th Japan Solanaceae Consortium (Nov 25, 2016; Mitaka, Japan).

4 Murayama Y, Kuroki K, Sakamoto S, Fujiwara S, Hara M, Natsui Y, Takahashi K, Miyata K, Hayama R, Ito E, Choi SW, **Mizoguchi T***, Natural variation in the photoperiodic response of *elf3;gi* between *Landsberg erecta* and Columbia ecotypes in *Arabidopsis thaliana*, JSOL 2016, The 13th Japan Solanaceae Consortium (Nov 25, 2016; Mitaka, Japan).

5 Nakai H, Hara M, Takahashi K, Ariga H, Murayama Y, Hayama R, Ito E, Choi SW, **Mizoguchi T***, Effect of night break on flowering time and *FT* expression in *elf3;gi*, an SDP-type mutant of *Arabidopsis thaliana*, JSOL 2016, The 13th Japan Solanaceae Consortium (Nov 25, 2016; Mitaka, Japan).

6 Hara M, Natsui Y, Murayama Y, Kuroki K, Takahashi K, Miyata K, Chiba Y, Hayama R, Ito E, Choi SW, **Mizoguchi T***, Inversion of photoperiodic response by double loss-of-function mutations in *EARLY FLOWERING 3* and *GIGANTEA* in *Arabidopsis thaliana*, JSOL 2016, The 13th Japan Solanaceae Consortium (Nov 25, 2016; Mitaka, Japan).

7 Kato K, Oikawa J, Ishigami Y, Shimoyama S, Shiba T, Tatsuzawa F, Yoshida R, Hiwasa-Tanase K, Wang N, Ariizumi T, **Mizoguchi T***, Ezura H, Involvement of *SELF PRUNING 5G* in the floral and sympodial regulation in a day-neutral plant tomato, JSOL 2016, The 13th Japan Solanaceae Consortium (Nov 25, 2016; Mitaka, Japan).

梶本悟史 (NARAMOTO, Satochi)
東北大学・生命科学研究科・特任助教
研究者番号：30612022

8 Arimoto S, Choi SW, Ebine K, **Mizoguchi T***, Nakano A, Ueda T, Ito E, Analysis of subcellular localization of Pleckstrin-homology domain-containing protein, PH15, JSOL 2016, The 13th Japan Solanaceae Consortium (Nov 25, 2016; Mitaka, Japan).

9 Hayama R, Hoshikawa K, **Mizoguchi T***, Diverse floral responses to day length among tomato species and difference within the regulatory mechanisms, JSOL 2016, The 13th Japan Solanaceae Consortium (Nov 25, 2016; Mitaka, Japan).

10 Hara M, Natsui Y, **Kuroki K**, Takahashi K, Miyata K, **Mizoguchi T***, Inversion of photoperiodic response by clock mutations in *Arabidopsis thaliana*, TJASSST 2015, TUNISIA-JAPAN Symposium on Science, Society and Technology (Feb 23-25, 2016; Tsukuba, Japan).

11 Takahashi K, Yamamoto K, Hara M, Suzuki K, Miyata K, **Mizoguchi T***, Density effects on flowering time of *Arabidopsis thaliana*, TJASSST 2015, Tunisia-Japan Symposium on Science, Society and Technology (Feb 23-25, 2016; Tsukuba, Japan).

12 Nefissi R, Natsui Y, Miyata K, Ghorbel A, **Mizoguchi T***, Identification of *sel7* as a novel inversion mutation within *PAB3* gene, TJASSST 2013, Tunisia-Japan Symposium on Science, Society and Technology (Nov 15-17, 2013; Hammamet, Tunisia).

13 **Mizoguchi T***, Miyata K, Photoperiodic compensation: A mechanism underlying regulation of chlorophyll amount by circadian clock in *Arabidopsis thaliana*, The 24th International Conference on Arabidopsis Research, ICAR 2013 (June 2013; Sydney, Australia).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 剛 (MIZOGUCHI, Tsuyoshi)

国際基督教大学・教養学部・教授

研究者番号：70281623

(2) 研究分担者