

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650097

研究課題名(和文)植物の組織によって異なる概日時計の環境応答性の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of plant tissue-specific responses of circadian clocks to environmental stimuli

研究代表者

遠藤 求(Endo, Motomu)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：80551499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物の概日時計の機能を組織レベルで解析した結果、(1)植物の概日時計の機能には動物と同様、組織特異性があること、(2)日長刺激は維管束の概日時計によって処理され花成制御に関わること、(3)維管束の概日時計は葉肉よりも上位に位置づけられること、(4)温度刺激は表皮の概日時計によって処理され、細胞伸長制御にかかわることを明らかにした。これらの結果から、植物の概日時計システムは動物とは異なり、組織ごとに外部環境刺激を処理していることを示した。

研究成果の概要(英文)：The circadian clock increases organisms' fitness by regulating physiological responses. In Arabidopsis, tissue-specific circadian clock functions have emerged, and the importance of the vasculature clock for photoperiodic flowering has been demonstrated. We then studied the involvement of tissue-specific circadian clock regulation of flowering and cell elongation under different photoperiods and temperatures. We found that the circadian clock in vascular phloem companion cells is essential for photoperiodic flowering regulation; by contrast, the epidermis has a crucial impact on ambient temperature-dependent cell elongation. Thus, there are clear assignments of roles among circadian clocks in each tissue. Our results reveal that, unlike the more centralized circadian clock in mammals, the plant circadian clock is decentralized, where each tissue specifically processes individual environmental cues and regulates individual physiological responses.

研究分野：植物生理学 時間生物学

キーワード：シロイヌナズナ 植物 概日時計 温度 組織特異性

### 1. 研究開始当初の背景

長日植物の光周性花成は「概日時計による遺伝子発現」が充分あるときに「光」が存在することで引き起こされる。しかし、*TOC1* など一部の時計遺伝子は日長依存的に発現ピークの位相が変化するため、単純なモデルでは説明できない。こうした現象を説明するために、現在の概日時計モデルは非常に複雑なものとなっている。

シロイヌナズナでは、日長刺激は葉の維管束で受容されており、花成制御因子の発現も葉の維管束に限定されている。このことから、日長刺激と概日時計のシグナルの統合は葉の維管束で行われており、動物と同様に植物でも組織ごとに概日時計の機能が異なっている可能性が考えられた。

そこで申請者は組織ごとに概日時計モデルを考えることで、より直感的に理解しやすく正確なモデルを構築できるのではないかと考えた。申請者がすでに開発している組織単離法を用いて、葉全体と単離した維管束で時計遺伝子 (*TOC1*) の発現リズムを測定したところ、葉全体では日長変化に応じて *TOC1* の発現ピークの位相変化が見られたが、維管束では、日長の変化に応じた発現ピークの位相変化は見られなかった。このことから、植物の概日時計は組織によって異なる制御を受けていることが初めて示唆された。

### 2. 研究の目的

生物は明暗周期や日長変化といった周期的な環境変化を予測し、対応するための仕組みとして概日時計を持っている。動物では「主要時計」や「末梢時計」といった組織特異的な概日時計が知られている一方で、植物では、概日時計は細胞自律的であると漠然と考えられており、組織特異的な役割についてはほとんど考えてこられなかった。しかし、申請者を含むこれまでの研究から、植物においても組織特異的な概日時計機能の存在が示唆された。そこで本研究では、植物の概日時計の組織特異性を生み出している分子基盤およびその生物学的意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 分ける：表皮およびその他組織を効率良く単離するための手法を開発する。表皮の単離は、維管束の単離ですでに実績のある超音波処理と酵素処理の併用に加えて、剥離法にも挑戦する。

(2) 見つける：マイクロアレイ解析から、組織特異的な時計因子や日長に応じて位相を変化させる遺伝子群の探索を行うことで、組織特異的な制御が生まれる分子基盤を明らかにする。

(3) つくる：組織による遺伝子発現パターンの違いや、機能の組織特異性を考慮にいたった新しい概日時計モデルの提案を行い、分

子/細胞レベルの知見を統合して組織レベルの知見とする。

### 4. 研究成果

各組織の体内時計がどのように環境刺激を処理しているか明らかにするため、組織ごとに体内時計機能を阻害した系統を創り出した。体内時計はほぼ全ての細胞・組織で見られるため、変異体の解析や単純な過剰発現体の解析では、観察された表現型がどの組織の体内時計の機能に由来しているのかを推定するのは困難であった。今回、組織特異的な発現を持つプロモーターを用いて組織特異的に時計遺伝子を過剰に発現させることで、特定の組織における体内時計の機能を阻害した形質転換植物を多数作出した。これにより、観察される表現型と組織の機能の関係がはっきりとし、初めて定量的に各組織の体内時計の機能を解析することが可能になった。

この系統を用いて、花を誘導する日長条件および花を誘導しない日長条件での、花芽形成速度を測定したところ、維管束の特に篩部伴細胞で時計機能を阻害した系統のみが日長依存的な遅咲きを示すことが明らかとなった。次に、他の生理応答でもこうした維管束・篩部伴細胞の時計が同様に重要であるかを調べるために、代表的な体内時計制御の生理応答である胚軸伸長制御について調べた。維管束・篩部伴細胞の時計は全く表現型が見られない一方で、表皮の時計機能を阻害した系統では顕著な胚軸伸長が観察された。また、表皮の時計は胚軸以外にも仕様や葉柄の伸展・伸長に関わっていたことから、表皮の時計は細胞伸長制御全般を司っていることが示され、花芽形成の場合と異なり、表皮の時計は常温刺激を処理し、細胞伸長制御に関わっていることが明らかとなった。これらの成果は *Nature* および *Nature Plants* 誌に発表した。

### 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9件)

1. Shimizu H, Torii K, Araki T, Endo M<sup>†</sup>. (2016) "Importance of epidermal clocks for regulation of hypocotyl elongation through *PIF4* and *IAA29*." *Plant Signaling & Behavior* *accepted*.

<sup>†</sup> Corresponding author 【査読あり】

2. Higo A, Niwa M, Yamato KT, Yamada L, Sawada H, Sakamoto T, Kurata T, Shirakawa M, Endo M, Shigenobu S, Yamaguchi K, Ishizaki K, Nishihama R, Kohchi T, Araki T. (2016) "Transcriptional framework of male gametogenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L." *Plant and Cell*

*Physiology* 57, 325-338. 【査読あり】

3. Kawamoto N, Endo M, Araki T. (2015) "Expression of a kinase-dead form of CPK33 involved in florigen complex formation causes delayed flowering." *Plant Signaling & Behavior* 10, e1086856. 【査読あり】

4. Shimizu H, Katayama K, Koto T, Torii K, Araki T, Endo M<sup>†</sup>. (2015) "Decentralized circadian clocks process thermal and photoperiodic cues in specific tissues." *Nature Plants* 1, Article number: 15163. <sup>†</sup> Corresponding author 【査読あり】

5. Shimizu H, Araki T, Endo M<sup>†</sup>. (2015) "Photoperiod sensitivity of the Arabidopsis circadian clock is tissue-specific." *Plant Signaling & Behavior* 10, e1010933. <sup>†</sup> Corresponding author 【査読あり】

6. Kawamoto N, Sasabe M, Endo M, Machida Y, Araki T. (2015) "Calcium-dependent protein kinases responsible for the phosphorylation of a bZIP transcription factor FD crucial for the florigen complex formation." *Scientific Reports* 5, 8341. 【査読あり】

7. Endo M<sup>†</sup>, Shimizu H, Nohales MA, Araki T, Kay SA. (2014) "Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling." *Nature* 515, 419-422. <sup>†</sup> Corresponding author 【査読あり】

8. Endo M (2016) "Tissue-specific circadian clocks in plants." *Curr Opin Plant Biol.* 29, 44-49. 【査読あり】

9. Endo M, Araki T, Nagatanai A. (2015) "Tissue-specific regulation of flowering by photoreceptors." *Cell Mol Life Sci.* 73, 829-839. doi: 10.1007/s00018-015-2095-8 【査読あり】

〔学会発表〕(計 21 件)

日本時間生物学会 第 22 回大会 (2015 年 11 月 21 日 - 22 日, 東京大学)

Decentralized circadian clocks process thermal and photoperiodic cues in specific tissues

組織特異的に概日時計機能を阻害した系統における表現型解析

清水 華子, 片山 可奈, 古藤 知子, 鳥井 孝太郎, 荒木 崇, 遠藤 求

日本植物学会 第 79 回大会 (2015 年 9 月 6 日 - 8 日, 新潟コンベンションセンター)

植物における環境応答の組織特異性  
遠藤 求

植物に脳はあるか  
遠藤 求

*NaKR1* による花成制御機構の解析  
根岸 克弥, 遠藤 求, 荒木 崇

日本植物生理学会 第 56 回大会 (2015 年 3 月 16 日 - 18 日, 東京農業大学)

シロイヌナズナ FT タンパク質の輸送機構の解析

堀川 工望, 佐々木 陽平, 遠藤 求, 荒木 崇

花成制御における *NaKR1* の役割の解析  
根岸 克弥, 遠藤 求, 荒木 崇

カルシウム依存性タンパク質キナーゼ CPK33 は FD をリン酸化しフロリゲン複合体形成を制御する

川本 望, 笹部 美知子, 遠藤 求, 町田 泰則, 荒木 崇

日本時間生物学会 第 21 回大会 (2014 年 11 月 7 日 - 9 日, 九州大学)

Tissue-specific functions of circadian clock in *Arabidopsis*

遠藤 求

第 38 回内藤コンファレンス (2014 年 10 月 7 日 - 10 日, シャトレゼ ガトーキングダム サッポロ)

*Arabidopsis* has a central dominant clock in the vasculature

Motomu Endo, Hanako Shimizu, Maria A Nohales, Takashi Araki, Steve A Kay

日本植物学会 第 78 回大会 (2014 年 9 月 12 日 - 14 日, 明治大学)

シロイヌナズナの維管束における概日時計の機能解析

遠藤 求, 清水 華子, Steve A. Kay, 荒木 崇

組織特異的に概日時計機能を阻害した系統における表現型解析

清水 華子, 片山 可奈, 古藤 知子, 荒木 崇, 遠藤 求

FD-FT 複合体形成を制御するタンパク質キナーゼの探索と同定

川本 望, 笹部 美知子, 遠藤 求, 町田 泰則, 荒木 崇

日本植物生理学会 第 55 回大会 (2014 年 3 月 18 日 - 20 日, 富山大学)

ゼニゴケ MpLFY ノックアウト株の表現型解析

丹羽 優喜, 酒井 友希, 肥後 あすか, 遠藤 求, 山口 礼子, 石崎 公庸, 大和 勝幸, 西浜 竜一, 河内 孝之, 荒木 崇

維管束の概日時計は主要時計としての性質を持つ

遠藤 求, 清水 華子, Brenda Chow, Steve Kay, 荒木 崇

FD-FT 複合体形成を制御するタンパク質キナーゼの探索と同定

川本 望, 笹部 美知子, 遠藤 求, 町田 泰則, 荒木 崇

日本時間生物学会 第 20 回大会 (2013 年 11 月 9 日 - 10 日, 近畿大学)

植物における生物時計の組織得意的な役割

遠藤 求, 清水 華子, Brenda Y. Chow, Steve A. Kay, 荒木 崇

日本植物学会 第 77 回大会 (2013 年 9 月 13 日 - 15 日, 北海道大学)

FD-FT 複合体形成を制御するタンパク質キナーゼの探索

川本 望, 笹部 美知子, 遠藤 求, 町田 泰則, 荒木 崇

維管束の概日時計は主要時計としての性質を持つ

遠藤 求, 荒木 崇

シロイヌナズナ 14-3-3 タンパク質の FT, TFL1, FD との相互作用による花成制御機構の解析

肥後あすか, 川本 望, 遠藤 求, 荒木 崇

シロイヌナズナ FT/TSF との相互作用を介した BRC1 による側芽相転換の調節

丹羽 優喜, 遠藤 求, 荒木 崇

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 求 (京都大学・大学院生命科学研究所)

ENDO MOTOMU

研究者番号 : 80551499

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :