

令和元年9月4日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26292051

研究課題名(和文) 植物時計のリセット機構の解明とこれを基盤とした成長制御への応用展開

研究課題名(英文) Molecular mechanism underlying synchronization of circadian clock in higher plants to external environmental stimuli

研究代表者

山篠 貴史 (Yamashino, Takafumi)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：00314005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：生物時計のリセット機能は、概日リズムの位相を昼夜の時間変化に同調させるために必須の役割を果たしている。植物時計遺伝子のプロモーター活性は約24時間周期の概日リズムを示すが、その振動は内的機構に依存して自由継続するとともに、外的シグナルにตอบสนองしてリセットされる。本研究では、概日リズムをリセットする温度入力の本質である時間特異性、リセットの方向性(暗期後半の入力は位相前進、暗期前半の入力は位相後退)に着目し、時計系への入力刺激に対する位相応答に必須の役割を果たす時計遺伝子を同定するとともに、植物時計のリセット制御を支える情報伝達の分子機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

概日リズムの位相制御は一日周期で規則的に変動する外部環境を予測し、種々の生理機能について一日における特定の時間に最高のパフォーマンスを発揮できるように生体の内生リズムを調節する上で非常に重要であると考えられる。本研究では暗期の入力信号に感受性を示す植物時計の本質を分子レベルで解析し、暗期の入力信号に感受性を示す転写抑制因子の機能を明らかにすることができた。この知見は概日時計が深く関与している植物の光周期成花や形態形成を含む成長様式全般を人工制御するための知識基盤となりうるだろう。

研究成果の概要(英文)：Circadian clocks are intrinsic and entrainable mechanisms that generate biological rhythms with approximately 24-hours period. Resetting of circadian clocks play an essential role in order to synchronize phases of the biological rhythm with changes in diurnal day and night cycles. Light and changes in ambient temperature are two fundamental resetting cues. Focused on time-of-day-specific temperature effect on clock gene responses, it was found that PRR9, PRR7 & LNK1 are up-regulated in response to changes in temperatures specifically at late night phase. On the contrary, TOC1 is up-regulated response to changes in temperatures specifically at early night phase. These results suggest that the temperature-response is gated by circadian clock. Chromatin immunoprecipitation assays showed that PRR9, PRR7, LNK1 and LUX are direct targets of the nighttime repressor, suggesting that temperature signals feed into the clock transcriptional circuitry through the EC nighttime repressor.

研究分野：分子生物学

キーワード：概日時計 光情報伝達 温度入力 転写制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

概日時計によって生成される約 24 時間周期の内生リズムは植物を含む多様な真核生物に普遍的に備わっていることが知られており、地球の自転によって生じる昼夜の環境変化に適切に応答するために重要な役割を担っていると推定されている。生物は概日時計に依存して、一日周期で規則的に変動する外部環境を予測し、種々の生理機能について一日における特定の時間に最高のパフォーマンスを発揮できるように内生リズムを調節していると考えられている。とりわけ光合成に依存した独立栄養性の成長様式をもつ植物にとって、明暗周期における時間情報を細胞や組織、個体レベルの応答に結びつけるためのシグナル伝達経路は個体の生存や種の維持にとって極めて重要な役割を果たしていると考えられている。

研究代表者らは緑色植物において新奇なリン酸リレー系関連タンパク質 (N 末端側にレシーバー様の配列を、C 末端側に CCT ドメインをもつ) が存在することを見だし、これらを疑似レスポンスレギュレーター (Pseudo Response Regulators, PRR1, PRR3, PRR5, PRR7, PRR9) と名付けて報告するとともに、それらの発現が、PRR9→PRR7→PRR5→PRR3→PRR1 の順に概日リズムを刻むことを明らかにした。上記因子の一つである PRR1 は、長年にわたりシロイヌナズナの時計候補因子として注目されていた TOC1 と同一であることが判明した。そこで、PRR ファミリーの生理的機能を逆遺伝学的に解析したところ、*prp9 prp7 prp5 toc1 (prp1)* 四重変異体は定常条件における自由継続リズムが消失しているだけでなく、光や温度サイクル下においても概日リズムを生成することができないことが明らかになった (Yamashino et al. *Plant Cell Physiol.* 49, 1839-1850, 2008)。24 時間周期の環境サイクル下で arrhythmic になる変異体は、未だ *prp* 多重変異以外に報告されていない。このことは、PRR ファミリーが植物時計の中心振動体として機能することを強く示唆している。現在までに同定された時計関連因子の機能に基づいて、因子間の発現制御機構が明らかになってきているが、生物時計の本質的な理解に必須である時計のリセット機構 (明暗サイクルに対する同調性) を説明する分子機構の解明には至っていない。生物時計の特性は中心振動体の機能によって支えられていると考えられるので、植物時計における中心振動体候補である PRR の機能に着目すれば時計機構の本質的理解に迫ることが可能だと思われる。まず、研究代表者は植物時計の温度入力において、他の生物と同様の位相応答特性をもつリセット機能が備わっていることを確認した。さらに、PRR9/PRR7, TOC1 が特異的にこの機能に必須であることを見出した。これらの知見を手がかりに、概日リズムの温度リセット機構を解明するための研究を実施した。

2. 研究の目的

生物時計のリセット機能は、概日リズムの位相を昼夜の時間変化に同調させるために必須の役割を果たしている。研究代表者らは、植物に特異的な一次構造上の特徴を有する疑似レスポンスレギュレーターファミリーが概日時計の中心振動体として機能していることを発見した。時計遺伝子のプロモーター活性は約 24 時間周期の概日リズムを示すが、その振動は内的機構に依存して自由継続するとともに、外的シグナルに依存してリセットされる。本研究では、これまでのシロイヌナズナを対象とした時計遺伝子の同定、発現制御機構、機能解析を手がかりに、生物時計の特性に迫る研究へと発展させ、植物の概日リズムをリセットする機構を解明することを目的とする。これを基盤に概日リズムの位相応答特性を人工制御し、成長制御に活かす方法論を開発する。

3. 研究の方法

本研究では、概日時計の特性を支える未知の分子機構に関する手がかりを得るために、概日リズムのリセットシグナルとして知られている温度入力における 2 つの性質、①時間特異性、②リセットの方向性 (暗期後半の入力は位相前進、暗期前半の入力は位相後退) に着目する。時計遺伝子の温度入力に対する初期応答性を解析し、上記の性質と整合性を示す時計遺伝子を同定する。同定した時計遺伝子の発現制御機構を遺伝学的手法で解析し、制御に関与する *trans* 因子と *cis* 配列を同定する。*cis* 配列の機能、*trans* 因子の温度感受性機構を、分子生物学的、細胞生物学的、生化学的手法で解析することにより、概日リズムの温度リセット機構を解明する。これを基盤に、概日リズムの位相応答特性を人工制御し、植物成長制御に応用するための方法論を開発する。

4. 研究成果

1. 植物時計の温度入力に対する応答特性の解析

一般に、暗期前半と暗期後半の温度上昇 (入力シグナル) は、それぞれ、概日リズムを前進、後退させるリセットシグナルとして機能することが知られている。しかしながら、植物の温度リセットに関しては関与する遺伝子も含めて不明な点が多い。本研究では、モデル高等植物のシロイヌナズナを対象に植物時計をリセットすることのできる温度シグナルの性質を解析した。その結果、少なくとも 16°C から 28°C の温度帯で 4°C の温度差を感知して位相応答が可能であ

ること、温度上昇と温度低下は逆方向の位相応答性を示すことを明らかにした。次に、時計遺伝子の温度応答性と概日リズムのリセット機能との関係を明らかにするために 22°C から 28°C へのシフトによる温度パルス刺激に対して感受性を示す時計遺伝子の同定を試みた。その結果、暗期後半の温度上昇に応答して *PRR9*, *PRR7* の発現開始位相が前進すること、暗期後半の温度刺激に応答して *TOC1* の発現終了位相が後退することを明らかにした。この結果は、*PRR9* および *PRR7* は概日リズムのリセットにおける位相前進を、その逆に *TOC1* は位相後退を司る制御因子として機能していることを示唆している。すなわち、これらの温度シグナルは中心振動体へ *PRR9*, *PRR7*, *TOC1* の発現位相の変化を引き起こす応答として伝達されることがわかった。温度とならぶ概日時計の入力シグナルである光パルスに対しても、温度パルスと同様に時計遺伝子が応答することを見いだした。さらに、温度と光を同時に作用させた場合には単独の場合と比較して相乗的に効果を発揮することを明らかにした。

2. 温度リセットシグナルによる概日時計の位相応答制御機構の解析

前述した植物時計のリセット機能を支える分子機構を明らかにするために、入力シグナルに対する *PRR9*, *PRR7*, *TOC1* の位相応答において、温度非感受性を示す時計遺伝子変異を逆遺伝学的解析によって同定することを試みた。その結果、LUX/PCL1-ELF3-ELF4 複合体をコードする遺伝子 *elf4*, *elf4*, *lux* 変異を同定した。これらのいずれの変異体においても *PRR9*, *PRR7*, *LNK1* の発現が暗期後半に脱抑制されており、この時間の温度入力に対する応答が消失していることが判明した。そこで、ELF3promoter:ELF3-YFP, LUXpromoter:LUX:-GFP コンストラクトを染色体に保持する形質転換体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) 実験により、LUX/PCL1-ELF3-ELF4 複合体の核内におけるプロモーター結合活性を解析したところ、標的である *PRR9*, *PRR7*, *LNK1* 遺伝子上流に存在する特徴的な *cis* 配列に直接結合することを明らかにした。さらに、この結合は温度感受性であり、高温で阻害されることを見いだした。このことから、LUX/PCL1-ELF3-ELF4 複合体が温度リセットによる位相応答遺伝子のプロモーター上流を認識する *trans* 因子であることが明らかになった。

3. 植物時計のリセット機能の理解を基盤とした生長制御への応用展開

概日時計のリセット機構は昼夜の変化に時計を同調させるためだけでなく、光・温度に応答した植物の発生および成長可塑性を制御している。このことは、概日時計の中心振動体の入力刺激に対する位相応答が出力系遺伝子の時間特異的発現に深くリンクしていることを示唆している。前年度までの研究の結果、概日時計をリセットする暗期の光・温度パルスシグナル (リセットシグナル) は Evening Complex (EC) とよばれる LUX-ELF3-ELF4 複合体の活性を調節する情報伝達経路上で統合され、EC の転写抑制因子としての活性を阻害することが明らかになった。そこで、EC に依存して暗期入力に応答性を示す出力系関連遺伝子を網羅的に同定するためにトランスクリプトーム解析を実施した。具体的には、シロイヌナズナの micro array を用いて暗期後半の温度パルスの有無による phase advance response (位相前進応答) を野生型と *elf3* 変異体背景でゲノムワイドに比較解析した。その結果、EC 支配下の遺伝子を網羅的に同定することに成功し、平成 27 年度に詳細に解析した *PRR9*, *PRR7*, *LNK1* に加えて *GI*, *LUX*, *PIF4*, *DOG1*, *ASN1* も EC に依存してリセットシグナルに応答性を示すことが明らかになった。これらの遺伝子プロモーター近傍には前年度の解析で同定した *PRR7*, *PRR9* 遺伝子上流に存在する LUX binding site が存在し、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 実験により *in vivo* で EC が直接結合していることを明らかにした。以上の結果から、EC は振動体タンパク質だけでなく特定の出力系関連遺伝子の発現を直接制御することによりリセットシグナルによる時計機構の位相応答と連動して出力経路の活性化が同期する機構が存在することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

(1) Mizuno T, Nomoto Y, Oka H, Kitayama M, Takeuchi A, Tsubouchi M, Yamashino T. Ambient temperature signal feeds into the circadian clock transcriptional circuitry through the EC night-time repressor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 55: 958-76(2014). doi: 10.1093/pcp/pcu030. (査読有り)

(2) Mizuno T, Takeuchi A, Nomoto Y, Nakamichi N, Yamashino T. The *LNK1* night light-inducible and clock-regulated gene is induced also in response to warm-night through the circadian clock nighttime repressor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* 9: e28505 (2014). (査読有り)

(3) Mizuno T, Kitayama M, Oka H, Tsubouchi M, Takayama C, Nomoto Y, Yamashino T. The EC night-time repressor plays a crucial role in modulating circadian clock transcriptional circuitry by conservatively double-checking both warm-night and night-time-light signals in a synergistic manner in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 55: 2139-51. doi: 10.1093/pcp/pcu144 (2014). (査読有り)

(4) Mizuno T, Kitayama M, Takayama C, Yamashino T. Insight into a Physiological Role for the EC Night-Time Repressor in the Arabidopsis Circadian Clock. *Plant Cell Physiol.* 56: 1738–47. doi: 10.1093/pcp/pcv094 (2015). (査読有り)

(5) Mizuno T, Oka H, Yoshimura F, Ishida K, Yamashino T. Insight into the mechanism of end-of-day far-red light (EODFR)-induced shade avoidance responses in Arabidopsis thaliana. *Biosci Biotechnol Biochem.* 79: 1987–94. doi: 10.1080/09168451.2015.1065171 (2015). (査読有り)

(6) Mizuno T, Yamashino T. The plant circadian clock looks like a traditional Japanese clock rather than a modern Western clock. *Plant Signal Behav.* 10: e1087630. doi: 10.1080/15592324 (2015). (査読有り)

(7) Ryo M, Matsuo T, Yamashino T, Ichinose M, Sugita M, Aoki S. Diversity of plant circadian clocks: Insights from studies of Chlamydomonas reinhardtii and Physcomitrella patens. *Plant Signal Behav.* 11: e1116661. doi: 10.1080/15592324.2015.1116661 (2016). (査読有り)

(8) Sørensen JL, Benfield AH, Wollenberg RD, Westphal K, Wimmer R, Nielsen MR, Nielsen KF, Carere J, Covarelli L, Beccari G, Powell J, Yamashino T, Kogler H, Sondergaard TE, Gardiner DM. The cereal pathogen Fusarium pseudograminearum produces a new class of active cytokinins during infection. *Mol Plant Pathol.* 19: 1140–1154. doi: 10.1111/mpp.12593 (2018). (査読有り)

(9) 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.* 69: 4839–4851. doi: 10.1093/jxb/ery257 (2018). (査読有り)

(10) 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.* 503:2861–2865. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.056 (2018). (査読有り)

[学会発表] (計 24 件)

(1) 山篠貴史 Molecular basis on resetting of circadian clock system in higher plants. 第 38 回内藤コンファレンス「生物システムの物質的基盤」2014 年 10 月 (札幌)

(2) 北山 美樹, 高山 知恵子, 坪内 真由佳, 岡 晴香, 野本 友司, 山篠 貴史, 水野 猛 The EC nighttime repressor plays a crucial role in modulating circadian clock transcriptional circuitry by conservatively double-checking both warm-night and nighttime-light cues in Arabidopsis thaliana. 第 56 回日本植物生理学会年会 2015 年 03 月 17 日 (東京)

(3) 坪内 真由佳, 北山 美樹, 岡 晴香, 野本 友司, 山篠 貴史, 水野 猛 Identification and characterization of a set of novel circadian clock-associated genes through a new approach in Arabidopsis thaliana. 第 56 回日本植物生理学会年会 2015 年 03 月 17 日 (東京)

(4) 岡 晴香, 吉村 英美, 坪内 真由佳, 北山 美樹, 野本 友司, 山篠 貴史, 水野 猛 Molecular mechanisms underlying the clock-controlled and PIF4-mediated diurnal and photoperiodic seedling growth including the elongation of hypocotyls in Arabidopsis thaliana. 第 56 回日本植物生理学会年会 2015 年 03 月 17 日 (東京)

(5) Miyu Imamura, Nobutaka Mitsuda, Masaru Ohme-Takagi and Takafumi Yamashino Role of cytokinin signaling in proliferation of vascular cambium in A. thaliana. International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium 2015 年 8 月 (名古屋)

(6) Takafumi Yamashino Involvement of circadian clock in the control of growth and development in A. thaliana. International symposium on Agricultural Biotechnology 2015 年 11 月 (Dong-A University)

(7) 今村美友, 島田由里菜, 光田展隆, 高木優, 竹林裕美子, 榊原均, 山篠貴史 Role of cytokinin signaling in proliferation of vascular cambium in A. thaliana. 第 57 回日本

植物生理学会年会 2016 年 3 月 (盛岡)

(8) 高田祐輔、嶺野雄登、笹田詩織、山篠貴史 The important role of the expression period of PRR7 in the phase setting of circadian rhythms of *A. thaliana*. 第 58 回日本植物生理学会 2017 年 3 月 (鹿児島大学)

(9) 今村美友、島田由里菜、光田展隆、高木優、山篠貴史 シロイヌナズナにおけるサイトカニンシグナリングによる二次成長制御機構の解析 日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年 3 月 (京都)

(10) 高田祐輔、嶺野雄登、今村美友、山篠貴史 シロイヌナズナにおける概日時計中心振動体を構成する疑似レスポンスレギュレーター-PRR7 のレシーバー様ドメインの機能解析 第 81 回日本生化学会中部支部例会 2017 年 5 月 (名古屋)

(11) 高田祐輔、嶺野雄登、加藤翔子、今村美友、野本友司、山篠貴史 高等植物シロイヌナズナにおける概日時計因子 PRR7 のレシーバー様ドメインの機能解析 日本農芸化学会中部支部第 180 回例会 2017 年 10 月 (名古屋)

(12) 今村美友、島田由里菜、古川博規、山篠貴史 サイトカニン情報伝達によるシロイヌナズナ軸性器官における細胞分裂活性の制御機構 日本農芸化学会中部支部第 180 回例会 2017 年 10 月 (名古屋)

(13) 高田祐輔、古川博規、今村美友、野本友司、山篠貴史 植物時計の中心振動体機能を支える PRR family のレシーバー様ドメインの機能解明 第 59 回日本植物生理学会年会 2018 年 3 月 (札幌)

(14) Miyu Imamura, Yurina Shimada, Masaki Ito, Nobutaka Mitsuda, Yuki Kondo, Masaru Ohme-Takagi, Takafumi Yamashino Regulatory Mechanism of Radial Growth at Root Axis via Cytokinin Signaling in *Arabidopsis thaliana*. 第 59 回日本植物生理学会年会 2018 年 3 月 (札幌)

(15) 高田祐輔、古川博規、嶺野雄登、今村美友、山篠貴史 植物時計の振動特性を支えるエピジェネティック制御機構の解析 日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年 3 月 (名古屋)

(16) 島田由里菜、今村美友、古川博規、山篠貴史 高等植物の二次成長を支える側方分裂組織の活性維持機構の解明 日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年 3 月 (名古屋)

(17) 今村美友、島田由里菜、古川博規、馬場真里、山篠貴史 シロイヌナズナ軸性器官でのサイトカニンによる細胞分裂活性の制御に関する転写因子の分子機能 日本農芸化学会中部支部第 183 回例会 2018 年 9 月 (名古屋)

(18) 佐藤健介、山篠貴史、龍昌志、山川壽伯、藤田祐一、青木撰之 コケ植物の PAS ヒスチジンキナーゼの機能解析 日本農芸化学会中部支部第 183 回例会 2018 年 9 月 (名古屋)

(19) 高田祐輔、古川博規、今村美友、嶺野雄登、野本友司、山篠貴史 植物時計の中心振動体 PRR に保存されたレシーバー様ドメインの機能解析 日本農芸化学会中部支部第 183 回例会 2018 年 9 月 (名古屋)

(20) 高田祐輔、小林将英、古川博規、山篠貴史 植物時計を構成する中心振動体 PRR family のレシーバー様ドメインの機能解明 第 60 回日本植物生理学会年会 2019 年 3 月 (名古屋)

(21) 今村美友、島田由里菜、伊藤正樹、光田展隆、近藤侑貴、高木優、山篠貴史 サイトカニン情報伝達による肥厚成長に関する LBD/ASL ファミリー転写因子の機能解析 第 60 回日本植物生理学会年会 2019 年 3 月 (名古屋)

(22) 中井皐太、佐藤健介、龍昌志、山篠貴史、野本友司、後藤雄規、一瀬瑞穂、杉田護、青木撰之 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 3 月 (名古屋)

(23) 小林将英、高田祐輔、山篠貴史 植物時計の中心振動体 PRR7 に保存されたレシーバー様ドメインの構造と機能 第 3 回名古屋リズム研究会 2019 年 3 月 (名古屋)

(24) 島田由里菜、今村美友、権部晃一、山篠貴史 高等植物シロイヌナズナの二次肥厚を活性

化するサイト カイニン情報伝達経路の解明 2019年度日本農芸化学会大会 2019年3月(東京)

〔図書〕(計1件)

(1) 水野猛、山篠貴史 植物の概日時計と和時計「植物に内在する時計のしくみ」化学と生物 55: 174-181 (2017)

〔産業財産権〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：青木撰之，光田展隆，高木 優，水野 猛，野本友司，岡 晴香，北山美樹，高田祐輔，加藤翔子，今村美友，古川 博規，小林将英

ローマ字氏名：AOKI Setsuyuki, MITSUDA Nobutaka, TAKAGI Masaru, MIZUNO Takeshi, NOMOTO Yuji, OKA Haruka, KITAYAMA Miki, TAKATA Yusuke, KATO Shoko, IMAMURA Miyu, FURUKAWA Yoshiki, KOBAYASHI Masahide

※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。