

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02136

研究課題名（和文）環境の時刻変動への適応を可能にする植物の時計転写ネットワークの包括的な解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of plant clock transcription network

研究代表者

中道 範人（Nakamichi, Norihito）

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：90513440

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：近年の研究より、植物の概日時計を形成する遺伝子群およびそれらが形成する時計転写ネットワークの分子基盤は明らかになりつつあるが、全貌の理解には至っていない。本研究では、我々がこれまでに世界にさきがけて整備してきた転写因子を扱うオミックス生物学の手法を用いて、時計転写ネットワーク構造の全貌を解明することを目的とした。本研究では国際的にもユニークな、ケミカルスクリーニングおよびヒット化合物の作用機序の解明を実施し、時計のメカニズムに潜んでいたタンパク質群を発見した。さらに時計メカニズムにおける これらタンパク質群による翻訳後修飾の重要性を明確に示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化合物を利用した研究を中心に取り組んだ成果として、植物時計の安定性のしくみの中で働くタンパク質・遺伝子を新たに見出すことができた。またこれら因子は、タンパク質リン酸化を担うものであり、時計メカニズムの中に翻訳後修飾が重要であることを示すことができた。また、化合物スクリーニングを起点として植物時計のメカニズムを理解する方法が、遺伝的重複性や変異の致死性を乗り越えて関連遺伝子を見出せる有効なものであることが立証できた。穀物では時計遺伝子の変異が、花成時期の変更を介して栽培地域の拡大に寄与してきたことが知られている。さらなる調節に向けた研究ルーツとして化合物を提供できた。

研究成果の概要（英文）：Recent studies have revealed the molecular mechanism underlying the plant circadian clock. However, posttranslational modifications are also crucial for clock functions in fungi and animals, but the posttranslational modifications that affect the plant clock are less understood. In this study, we aimed to elucidate the whole structure of the clock transcription network using comprehensible approaches including genetics, chemical biology, and omics sciences. We conducted chemical screenings and elucidated the mode-of-action of the hit molecules, and discovered a group of proteins that were cryptic in the clock mechanism. The importance of post-translational modifications by these proteins in the clock mechanism was clearly demonstrated.

研究分野：農芸化学

キーワード：植物 概日時計 概日リズム オミクス ケミカルバイオロジー 化合物

## 1. 研究開始当初の背景

日周変化に応答するために多くの生命活動の発現するタイミングは、遺伝的に備わった体内時計(概日時計)によって決められる。概日時計により作られる時間情報は極めて正確であるが、発芽した場から移動できない植物の時計の環境応答能は特筆すべきものである。近年の研究より、植物の概日時計を形成する遺伝子群が明らかとなってきた。明け方に発現ピークを迎える *CCA1*(*CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1*)と *LHY*(*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*)遺伝子、昼にピークを迎える *PRR*(*PSEUDO-RESPONSE REGULATOR*)遺伝子群、夕方から夜にピークを迎える *TOC1*(*TIMING OF CAB EXPRESSION 1*, 別名 *PRR1*), *ELF3*(*EARLY FLOWERING 3*), *ELF4*, *LUX*(*LUX ARRHYTHMO*, 別名 *PHYTOCLOCK1 [PCL1]*)遺伝子、さらに近年発見された *LWD*(*LIGHT REGULATED WD1*)遺伝子群、*LNK*(*NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED GENE 1*)遺伝子群と *RVE8* などの相互の転写制御ループが時計コアサーキットとして考えられる(Nohales and Kay, *Nature Str. Mol. Biol.*, 2016)。一連のオミックス解析により、コアサーキット内の転写因子の標的遺伝子群がゲノムワイドに部分的に明らかになってきている。このようにコアサーキットを含めた時計転写ネットワークの分子基盤は明らかになりつつあるが、全貌の理解には至っていない。また変化する環境への時計転写ネットワークの振舞い(変動する環境下でのネットワークの周期の安定性を保つ仕組みや、変動する環境下でのネットワークの寄与など)の理解は、遺伝子発現制御、植物生理、そして構成生物学の観点の未解決の重要課題として残されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに世界にさきがけて整備してきた転写因子を扱うオミックス生物学の手法を用いて、時計転写ネットワーク構造の全貌を明らかにする。また時計タンパク質のノイズに対する量的・質的变化を解析し、雑多な環境シグナルが存在する中でも安定的な時間情報を生み出す仕組みを理解する。さらに独自に見いだしている時計の安定性を低下させる化合物の作用機序の研究を行うことで、周期安定性に関するこれまでの知見とは質的に異なる理解を得る。変動する環境下での植物時計ネットワークの包括的な解明を目指す研究は、世界でも我々のみが利用できる研究手法・材料を用いた統合的な解析によってしか遂行できない。この解明は、生物がいかにして変動する外部環境に惑わされることなく正確に生命システムを作動できるか、しかしながら一方でそのシステムを利用して変動環境に柔軟に適應するかといった問いに対して、環境適應への貢献度が高くかつ安定的なシステムと示唆されている植物の時計転写ネットワークのシステム構造と性質の理解から迫るものである。また重複性の高い因子を内包する複雑系生命システムの分子基盤の解明へ向けた汎用性の高い解析技術論も提供する。

## 3. 研究の方法

ハイスループットなリズム検出系をセットアップし、それを利用することで時計の安定性を低下させる化合物を取得する。得られた化合物の作用機序を、分子プローブや遺伝子発現プロファイリング法などを手がかりとして解明する。作用機序から明らかとなってくる既知あるいは未知の時計タンパク質や遺伝子の解析にも取り組むことで、時計の安定性のしくみについてさらなる理解を得る。

## 4. 研究成果

(1)多検体のシロイヌナズナの概日リズムを一斉自動解析する実験系の特性を調べたところ、概日リズムの周期長は個体間の誤差が極めて小さく安定的であるが、振幅は不安定であることが分かった。周期の安定性と振幅の不安定性は、他の生物種や他のリズム検出を用いた研究でも観察されているため、この実験系は従来のリズム研究と生理学的に合致する結果が取れると判定した。この自動測定系を利用し、まず生物活性物質ライブラリー(LOPAC [Library of Pharmacologically Active Compounds] LO5100-1ea, Sigma 社)からリズムに影響する化合物をスクリーニングした。PHA767491 が長周期化合物として見出された。PHA767491 の標的タンパク質を探るため、構造活性相関研究を行い、活性を保持した分子プローブの作成に成功した。この分子プローブをアガロースゲルに共有結合させたものを作成し、これを結合する植物タンパク質をプロテオミクスで同定した。複数の CK1(Casein Kinase 1)類似タンパク質が見出された。シロイヌナズナには 12 の CK1 類似タンパク質(Casein Kinase 1 Like [CKL])があり、これらが機能重複する可能性が考えられた。調べた限りの CKL タンパク質は、いずれもそのリン酸化活性が PHA767491 によって阻害された。プロトプラストを用いて同時に 12 の CKL 遺伝子の発現をノックダウンさせ、そのリズムを計測した。CKL の発現抑制は、対照実験と比べて有意に長周期となることが判明した。次に CKL の基質タンパク質を探索した。CKL 阻害剤の PHA767491 をナズナに処理すると明方時計遺伝子 *CCA1* と *LHY*、朝方時計遺伝子の *PRR9* と *PRR7* の発現が抑制されることが判明したため、CKL はこれら遺伝子の発現を制御しているタンパク質(*PRR5* と *TOC1*)をリン酸化する可能性が考えられた。この仮説はリコンビナントタンパク質を用いた試験管リン酸化実験で実証された。ナズナに PHA767491 を処理すると、*PRR5* と *TOC1* タンパク質の量が

増加した。PRR5, TOC1 タンパク質の量的制御は周期長に重要な役割を果たすが、その量的制御にリン酸化が必要であり、そのリン酸化を担う酵素群を同定した成果となった (Uehara and Mizutani *et al.*, *PNAS* 2019).

(2)従来、植物体(シロイヌナズナ)でも機能する CK1 阻害剤は複数報告されてきたが、その活性はそれほど強くない。仮に強い CK1 阻害剤が誕生すれば、重複性の問題などによって明らかになっていない植物 CK1 が関わる生理現象が解き明かされる契機となろう。従来の CK1 阻害剤は試験管内リン酸化反応では、数  $\mu\text{M}$  の阻害活性があったが、リズム長を指標とした生体内活性を検定すると阻害活性は数十倍の濃度が必要であった。さらなる PHA767491 の構造活性相関研究を進めたところ、生体への投与濃度が劇的に下がる(活性が上がる)化合物 AMI-331 が見出された。アフィニティープロテオミクスの実施によって、AMI-331 は PHA767491 と比べて CK1(CKL) への選択性が向上していた。以上、植物科学での利用が見込まれる高活性・高選択性 CK1 阻害剤が開発できた (Saito *et al.*, *Plant Direct* 2019).

(3)植物ホルモンや植物由来の低分子化合物の物性を模倣した ITbM (Institute of Transformative Bio-Molecules)化合物ライブラリー(20,000 化合物)を利用して、時計周期を変える化合物のスクリーニングを実施した。3,4-dibromo-7-azaindole(B-AZ)が長周期化合物として取得された。B-AZ の標的タンパク質同定のための構造活性相関研究を行なったが、いずれの構造類似体も活性を持たなかったことから、活性のある(標的に結合する能力のある)B-AZ をビーズに結合することは困難だと判明した。これは B-AZ の構造が単純すぎることに起因すると考えられた。B-AZ 処理後のナズナの遺伝子発現解析から、B-AZ も PHA767491 と同じく *CCA1*, *LHY*, *PRR9*, *PRR7* の発現上昇が見られた。したがって B-AZ も PRR5 と TOC1 の安定化に寄与すること、また CK1 阻害剤として働く可能性があったため、その可能性を検討したところ、仮説が支持された。さらに分子動力学解析によって、動物の CK1 と B-AZ が安定的に結合することが示唆された (Ono *et al.*, *Plant Cell Physiol.* 2019).

(4) キナーゼ阻害ライブラリー(BML-2832-0500, Enzo Life Sciences) から長周期化合物 BML-259 を見出した。分子プローブとプロテオミクスを組み合わせた方法によって、BML-259 の標的タンパク質をスクリーニングし、2 つの CDKC を得た。CDKC の完全な欠失植物は致死であったが、CDKC をノックダウンした形質転換体は長周期となった。植物体から活性のある CDKC2 タンパク質複合体を精製し、そのキナーゼ活性を検出することに成功したが、このキナーゼ活性は BML-259 によって阻害された。動物の CDKC ホモログである CDK9 と BML-259 の結合モデルを分子動力学によって得た。CDKC はタンパクをコードする遺伝子全般の転写をする RNA ポリメラーゼ II (Pol II)のリン酸化をすることが示唆されていたが、実際にこれを試験管内で実証した。また Pol II の生体内でのリン酸化状態は BML-259 によって低下することを見出した。既知の阻害剤によって Pol II の活性を阻害すると時計の長周期化が見られた。転写活性は時計の周期長の安定性に不可欠であることが示唆された (Uehara, Nonoyama, and Taki *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 2022).

(5) 時計転写ネットワーク・時計変異と農業的重要形質の花成の関連などの知見をとりまとめ、総説論文として公表した (Nakamichi, *Gene*, 2020, Maeda and Nakamichi, *Plant Physiology* 2022). またシロイヌナズナの時計遺伝子の別の植物種での働きについて報告した (Toda *et al.*, *Sci Rep.* 2019, Nakamichi *et al.*, *BBB* 2020).

(6) 総括. 化合物を利用した研究を中心に取り組んだ成果として、時計の安定性のしくみの中に CK1(CKL)や CDKC などのキナーゼが深く関わるのが分かった。CK1 (CKL)は、シロイヌナズナには 12 の遺伝子座があるため、順遺伝学では時計関連遺伝子として同定できなかったと考えられる。CK1 によるリン酸化が PRR5 と TOC1 の安定性に寄与する発見は、時計の安定性に潜んでいたメカニズムを明らかにしたものである。また CDKC のノックアウトは致死であるため、遺伝学のみではその発見が出来なかったと推察される。以上、化合物スクリーニングを初手として植物時計のメカニズムを理解する方法が、遺伝的重複性や変異の致死性を乗り越えて関連遺伝子を見出せる有効なものであることが立証できた。

また化合物は、ATP などの生体低分子がタンパク質に結合する部位に作用することが想定できるが、これまで報告した化合物は ATP 結合に対して競合することが分かった。キナーゼなどの ATP 依存的な働きをするタンパク質(CK1 や CDKC)が低分子の標的だったことは必然であったと考えられる。したがって化合物を利用した研究は、キナーゼなどのタンパク質翻訳後修飾のメカニズムをさらに理解するためにも有効であろう。植物時計のメカニズムにおいて、翻訳後修飾はあまり理解が進んでいない。今後は化合物を適切に利用した研究を推進することで、時計の翻訳後修飾・タンパク質レベルでの理解が深まると確信しているが、この流れにたいする準備も本研究費で十分に整えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 9件）

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 (13page)
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 (7pages)
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 -
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 <i>Arabidopsis thaliana</i>	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 <i>Arabidopsis</i> 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 <i>Arabidopsis thaliana</i>	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 該当する

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 <i>Arabidopsis</i> 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 39720
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 Uehara Takahiro N, Nonoyama Takashi, Taki Kyomi, Kuwata Keiko, Sato Ayato, Fujimoto Kazuhiro J, Hirota Tsuyoshi, Matsuo Hiromi, Maeda Akari E, Ono Azusa, Takahara Tomoaki T, Tsutsui Hiroki, Suzuki Takamasa, Yanai Takeshi, Kay Steve A, Itami Kenichiro, Kinoshita Toshinori, Yamaguchi Junichiro, Nakamichi Norihito	4. 巻 63
2. 論文標題 Phosphorylation of RNA Polymerase II by CDKC;2 Maintains the Arabidopsis Circadian Clock Period	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 450 ~ 462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac011	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 Maeda Akari E, Nakamichi Norihito	4. 巻 in press
2. 論文標題 Plant clock modifications for adapting flowering time to local environments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiac107	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Norihito Nakamichi
2. 発表標題 Small-molecule modulators of the plant clock
3. 学会等名 5th Asia Forum on Chronobiology (招待講演) (国際学会)
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における周期の温度補償性に関わるタンパク質の量的制御
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田明里、松尾宏美、藤本和宏、木下俊則、山口潤一郎、中道範人
2. 発表標題 時計長周期化合物と標的タンパクの結合モデル
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022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 植物概日時計の温度補償性に関わるタンパク質の量的制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022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

1. 発表者名 Norihiro 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 Norihiro 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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------