

令和 5 年 6 月 20 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：18H02137

研究課題名(和文)植物時計のrobustな振動特性を支えるクロマチン構造制御機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism on PRR (Pseudo Response Regulators)-mediated epigenetic regulation underlying robust circadian clock oscillation in higher plants

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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：生物時計のゲート効果は環境シグナルの入力を特定の時間帯に制限することにより、環境変動にrobustな時計遺伝子の発現振動を支えている。遺伝子発現の調節領域におけるDNAのメチル化やヒストンのアセチル化はクロマチン構造変化をもたらす、転写活性のポテンシャルを規定することが知られている。本研究ではシロイヌナズナの中心振動体のネガティブフィードバックループ回路を形成するPRR familyとその標的遺伝子CCA1/LHYに着目し、PRR familyが中心振動体のクロマチン構造制御に如何なる役割を果たしているかを明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

概日リズムを生成する植物時計の中心振動体タンパク質は外環境に同調しながら24時間周期で発現レベルが変動することが知られている。この振動の振幅は100倍以上の振れ幅をもち自由継続する性質も兼ね備えている。本研究では中心振動体のrobustな振動特性を支える背景にはエピゲノム制御を介した日周レベルのクロマチンダイナミクスが存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The gate effect of the biological clock supports oscillations of clock genes that are robust to environmental fluctuations by restricting the input of environmental signals to specific time periods. DNA methylation and histone acetylation in the regulatory regions of gene expression are known to cause conformational changes in chromatin that define the potential for transcriptional activity. In this study, we focus on the PRR family and its target gene CCA1/LHY, which form a negative feedback loop circuit in the central oscillator of Arabidopsis thaliana, to clarify how the PRR family plays a role in the regulation of chromatin structure in the central oscillator.

研究分野：植物生理学

キーワード：植物の概日時計 転写調節 エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

緑色植物系統の概日時計は転写制御因子としての構造的特徴をもつ複数のタンパク質が中心振動体として転写翻訳フィードバックループを形成して一過的に発現変動することによって機能していることが知られている。中心振動体タンパク質の一つである擬似レスポンスレギュレーター (PRR) family は N 末端に二成分制御系のレスポンスレギュレーター様のレシーバー様のドメインと C 末端に核移行と標的 DNA への部位特異的結合に関与する CCT ドメインを有する植物に特異的なタンパク質群として研究代表者らによって発見された。PRR family は緑藻からコケ・シダ植物、高等植物に至るまで緑色植物系統に普遍的に保存されており、モデル高等植物として知られるシロイヌナズナにおいては PRR1(TOC1), PRR3, PRR5, PRR7, PRR9 のパラログが存在している。研究代表者らはこれらの発現が明期開始から暗期にかけて、PRR9->PRR7->PRR5->PRR3->PRR1(TOC1)の順番に転写レベルで発現誘導されることを見いだした。さらに、PRR family の多重変異体(*prp9/7/5/toc1*)においては、概日リズムが生成されないこと、植物体の生理的な時間が暗期後半で停止していることを明らかにしている。その結果、*prp9/7/5/toc1* 変異体は概日リズムをもたないだけでなく、日長にかかわらず遅咲きで、本来暗所で誘導される胚軸や葉柄の伸張成長が絶えず活性化している表現型を示す。*prp* 多重変異体を用いたゲノムワイドなトランスクリプトーム解析の結果、PRR family の主要な標的遺伝子は中心振動体のループ構造の一翼を担うタンパク質をコードする遺伝子 (*CCA1/LHY*) であることが明らかになった。すなわち、*prp9/7/5/toc1* 変異体においては、本来明期直前に誘導される *CCA1/LHY* の mRNA の発現が構成的になってしまうことがわかった。時計遺伝子の発現は時間特異的に誘導され約 100 培の振れ幅で振動するが、その位相は厳密に調節されている。この制御は植物時計の robustness を支える重要な性質であるが、その分子基盤に関しては知見が乏しかった。

## 2. 研究の目的

生物時計のゲート効果は環境シグナルの入力を特定の時間帯に制限することにより、環境変動に robust な時計遺伝子の発現振動を支えている。遺伝子発現の調節領域における DNA のメチル化やヒストンのアセチル化はクロマチン構造変化をもたらす、転写活性のポテンシャルを規定することが知られている。事実、時計遺伝子のプロモーター近傍のヒストン修飾状態がリズムカルに変化することはロックフェラー大学の Nam-Hai Chua 博士ら、バルセロナ自治大学の Paloma Mas 博士ら、ソウル国立大学の Yoo-Sun Noh 博士らのグループによって報告されている。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、外的シグナルに応答して調節される。本研究ではシロイヌナズナの中心振動体のネガティブフィードバックループ回路を形成する PRR family とその標的遺伝子 *CCA1/LHY* に着目し、PRR family が中心振動体のクロマチン構造制御に如何なる役割を果たしているかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

*CCA1/LHY* の転写は暗期後半に誘導され、PRRs が発現する明期に抑制される。*CCA1/LHY* のプロモーター近傍のエピゲノム情報を特徴付けるために、ヒストン H3 のアセチル化、メチル化を K4, K9, K14, K18, K23, K27, K36, K56 を対象にそれぞれの特異抗体を用いたクロマチン免疫沈降実験 (ChIP assay) により広範に解析することとした。ヒストン修飾の生理的意義を理解するために、同定したヒストン修飾の時間的推移を明らかにするとともに、MNase-seq 解析および bisulfite sequencing 解析を併用し、open クロマチン構造および DNA メチル化修飾の日内変動を明らかにすることとした。ヒストン修飾における PRR の役割を明らかにするために *prp* 変異体を用いるとともに、概日リズムに依存した経時的なクロマチン構造変化を特徴づけるために *prp* 以外の短周期 or 長周期変異体の利用も検討した。PRR7 は標的遺伝子の転写を抑制する repressor 活性を有している。ヒストン修飾を介した抑制制御を視野に入れ、その分子機構に関する知見を得るために酵母 two-hybrid system を利用して PRR7 と相互作用するタンパク質を同定することとした。*CCA1/LHY* に備わる光誘導性 (光入力性) を利用して、本プロモーター活性が光パルスに耐性か感受性か、すなわちエピゲノム制御が入力シグナルに対して dominant に機能するかどうかを明らかにし、PRR によるヒストン修飾機構がゲート効果に果たす役割について理解することとした。PRR7 の発現を構成的にすることや逆位相プロモーター支配下で制御することにより、PRR7 の発現に対応してクロマチンダイナミズムに如何なる変化が生じるか、それ

にともないゲート効果が観察される時間帯がどのように変動するかを明らかにする。以上の解析から、PRR の機能によって担われるヒストン脱アセチル化を介した silent クロマチンへの構造変化がゲート効果 (時間特異的環境入力耐性) を説明する基盤機構である可能性について検証する。

#### 4. 研究成果

モデル高等植物シロイヌナズナの概日時計中心振動体は明け方に発現のピークをもつ CCA1/LHY、昼に発現のピークをもつ PRR9/PRR7/PRR5、夕暮れに発現のピークをもつ Evening Complex (EC) の 3 つのクラスの転写抑制因子から構成されており、互いに負のフィードバック回路を形成して振動している。CCA1/LHY 遺伝子の転写は暗期後半に誘導され、PRRs が発現する明期に抑制される。PRR7 の C 末端に HA タグを融合するコンストラクトを PRR7 プロモーター支配下で発現する形質転換体 (PRR7:PRR7-HA) を作製し HA 特異抗体を用いた ChIP 実験により、PRR7 は *in vivo* で CCA1/LHY の転写開始点からその上流約 300bp までの領域を認識し時間特異的に結合することを明らかにした。次に、CCA1/LHY 遺伝子プロモーター近傍のヒストン H3 のアセチル化、メチル化 に関して K4, K9, K14, K18, K23, K27, K36, K56 を対象にそれぞれの特異抗体を用いて ChIP 実験により解析した。その結果、転写誘導期に相当する暗期後半にはヒストン H3K9 のアセチル化レベルが高いが、転写が抑制されている 明期には脱アセチル化されており、制御領域のクロマチン構造が日周レベルで変動していることが示唆された。一日を通じて CCA1/LHY の転写が脱抑制されている *prp9 prp7 prp5* 三重変異体においてはヒストン H3K9 のアセチル化が構成的に高いレベルを維持していた。中心振動体に備わるゲート効果を CCA1 プロモーターの光誘導特性を利用して解析を試みたが、PRR7 の発現位相とゲート効果が維持されている時間帯は完全には一致しない (PRR7 の発現低下後もしばらく継続している) ことがわかった。このことは、PRR7 による脱アセチル化反応 (サイレントクロマチンの形成) は速やかに進行するが、その後のアセチル化反応は緩慢である可能性を示唆しているかもしれない。PRR family の分子内に保存されているレシーバー様のドメイン (RLD) の役割を理解するために RLD を欠損した PRR7 の機能解析を行ったところ、*prp9 prp7 prp5* 三重変異体に導入した intact PRR7 を発現する PRR7:PRR7-HA は、標的プロモーター近傍の周期的な脱アセチル化修飾が回復したが、RLD を欠損した PRR7-HA を導入した形質転換体 (PRR7:PRR7deltaRLD-HA) においては機能相補が観察されなかった。一方で、RLD の欠損は標的プロモーターへの結合性にまったく影響しないことがわかった。このことから、PRR7 は RLD 依存的な protein-protein 相互作用を介してターゲット遺伝子のヒストン修飾を制御していることが考えられた。RLD は二成分制御系のレシーバードメイン (RD) から分子進化したと考えられるので、RD と RLD の本質的違いを説明する構造的特徴を理解するために、一次配列の相同性、二次構造予測プログラム (CRNPRED) および三次構造予測プログラム (DeepSF) の利用した立体構造の観点から両者を比較解析した。その結果、RLD は結晶構造が解けているバクテリアの RD と同じ構造 (リン酸化部位を中央に配した、5 回の  $\beta$ -loop- $\alpha$  単位の繰り返し構造) を持っている可能性が高いことが推定された。次に、RLD が RD 同様に二量体形成活性を有しているかどうかを明らかにするために酵母細胞を用いた two-hybrid 法を利用した解析を行ったところ、PRR7 は RLD に依存して二量体を形成していることが明らかになった。興味深いことに、RLD の強い二量体形成活性は RD に保存されたリン酸化部位である Asp 残基に対応する Glu 残基を Ala に置換することにより顕著に低下した。RD と RLD の一次配列比較において、RD のリン酸化部位が位置する  $\beta 3$ - $\alpha 3$  の前後の loop に位置するアミノ酸配列が RD と RLD との間で変化に富んでいることを見いだした。この loop 部位に変異を導入した RLD を作製したところ、分子間の相互作用の強さは顕著に低下した。以上の結果から、RLD は RD と本質的に相同な二次構造を保持していると推定され、RD においてリン酸化に依存した構造変化の要となるリン酸化部位前後のループのアミノ酸配列が二量体形成活性に強く影響を与えていることが示唆された。微生物、植物の環境応答を支える His-Asp リン酸リレー情報伝達系を構成する RR は、N 末端に存在する RD がリン酸化修飾を受けることで C 末端に存在するエフェクタードメイン (ED) の活性が調節される制御因子として機能している。植物時計因子の一つである PRR もまた、N 末端にレシーバー様のドメインを保持する転写制御因子である。そこで、RD と RLD との構造比較から RLD に特徴的なアミノ酸に部位特異的変異を同定し、改変型 PRR7 の機能を *prp9 prp7 prp5* 変異体植物に導入することにより、RLD の構造と機能に関する知見を得た。その結果、二量体形成活性を失った RLD は *prp* 変異を相補することができないこと、RLD に導入したアミノ酸置換変異は概日時計の振動特性に多様な影響を与えることが明らかになった。PRR7 と相互作用する因子を探索したところ、他のグループによって既に報告されている TPL が PRR7 と相互作用することを再確認した。PRR7 と TPL との相互作用は RLD に依存しないことが報告されているが、BiFC 解析から PRR7RLD と TPL との相互作用が検出できたことから RLD は TPL との相互作用を増強または安定化する役割を担っているかもしれない。TPL はタンパク質間相互作用を介してヒストンデアセチラーゼをリクルートすることが知られているので、PRR7 は標的のヒストンを脱アセチル化することによりサイレントクロマチンを誘導すると考えられた。本研究により概日時計の robust な振動特性を支える背景には、エピゲノムを介した日周性のクロマチンダイナミズムが存在することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kikuchi H, Yamashino T, Anami S, Suzuki R, Sugita M, Aoki S	4. 巻 616
2. 論文標題 Diurnal control of intracellular distributions of PAS-Histidine kinase 1 and its interactions with partner proteins in the moss <i>Physcomitrium patens</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.05.070	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 Nomoto Y, Takatsuka H, Yamada K, Suzuki T, Suzuki T, Huang Y, Latrasse D, An J, Gombos M, Breuer C, Ishida T, Maeo K, Imamura M, Yamashino T, Sugimoto K, Magyar Z, Bogre L, Raynaud C, Benhamed M, Ito M.	4. 巻 13
2. 論文標題 A hierarchical transcriptional network activates specific CDK inhibitors that regulate G2 to control cell size and number in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 1660
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-29316-2	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 該当する
1. 著者名 Anami S, Yamashino T, Suzuki R, Nakai K, Sato K, Wu B, Ryo M, Sugita M, Aoki S.	4. 巻 26
2. 論文標題 Red light-regulated interaction of Per-Arnt-Sim histidine kinases with partner histidine-containing phosphotransfer proteins in <i>Physcomitrium patens</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 698-713
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12878	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 Sorensen 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.	4. 巻 19
2. 論文標題 The cereal pathogen <i>Fusarium pseudograminearum</i> produces a new class of active cytokinins during infection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Plant Pathol.	6. 最初と最後の頁 1140-1154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mpp.12593	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 Ryo M, Yamashino T, Nomoto Y, Goto Y, Ichinose M, Sato K, Sugita M, Aoki S.	4. 巻 69
2. 論文標題 Light-regulated PAS-containing histidine kinases delay gametophore formation in the moss <i>Physcomitrella patens</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Exp Bot.	6. 最初と最後の頁 4839-4851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/ery257	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 Ryo M, Yamashino T, Yamakawa H, Fujita Y, Aoki S.	4. 巻 503
2. 論文標題 PAS-histidine kinases PHK1 and PHK2 exert oxygen-dependent dual and opposite effects on gametophore formation in the moss <i>Physcomitrella patens</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 2861-2865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.08.056	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 Yamaura S, Yamauchi Y, Makihara M, Yamashino T, Ishikawa A.	4. 巻 84
2. 論文標題 CCA1 and LHY contribute to nonhost resistance to <i>Pyricularia oryzae</i> (syn. <i>Magnaporthe oryzae</i> ) in <i>Arabidopsis thaliana</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem.	6. 最初と最後の頁 76-84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1660612	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 寺前智瑛, 市古幹洋, 山篠貴史
2. 発表標題 シロイヌナズナの概日時計中心振動体PRR7 のレシーバー様ドメインの機能解析
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 櫻井芳幸, 島田由里菜, 上坂一馬, 山篠貴史
2. 発表標題 サイトカニン誘導性の bHLH 転写因子ファミリーによる高等植物シロイヌナズナの二次成長への関与についての研究
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 今村美友, 光田展隆, 坂本真吾, 近 藤侑貴, 上坂一馬, 高木優, 山篠 貴史
2. 発表標題 サイトカニン情報伝達を介した二次成長誘導機構
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 鈴木遼, 山篠貴史, 阿南秀, 龍昌志, 中井皐太, 吳博文, 菊地陽貴, 杉田護, 青木撰之
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケの PAS-Histidine Kinases の機能解析
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 小林将英, 高田祐輔, 寺前智瑛, 山篠貴史
2. 発表標題 植物時計の中心振動体PRR familyのレーシーバー様ドメインの構造と機能
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 権部晃一, 今村美友, 宮島俊介, 中 島敬二, 山篠貴史
2. 発表標題 高等植物シロイヌナズナの根端分裂組織における放射パターン形成に関する制御機構の解析
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 今村 美友、島田 由里菜、古川 博規、馬場 真里、山篠 貴史
2. 発表標題 シロイヌナズナ軸性器官でのサイトカイ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
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第183回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤健介, 山篠貴史, 龍昌志, 山川壽伯, 藤田祐一, 青木撰之
2. 発表標題 コケ植物のPASヒスチジンキナーゼの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第183回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田祐輔, 古川博規, 今村美友, 嶺野雄登, 野本友司, 山篠貴史
2. 発表標題 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農芸化学会中部支部第183回例会
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第183回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田祐輔, 小林将英, 古川 博規, 山篠貴史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 サイトカニン情報伝達による肥厚成長に関与する LBD/ ASL ファミリー転写因子の機能解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中井昇太, 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, 青木拱之
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林将英, 高田祐輔, 山篠貴史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第3回名古屋リズム研究会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 島田由里菜, 今村美友, 権部晃一, 山篠貴史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会大会
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			
オーストラリア	CSIRO			
フランス	Universit&#233; Paris-Saclay			
ハンガリー	Biological Research Centre			
英国	Royal Holloway University of London			
デンマーク	Aalborg University	Technical University of Denmark		
イタリア	University of Perugia			
ドイツ	Karlsruhe Institute of Technology			