

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870267

研究課題名(和文)新奇時計関連因子の生化学的な解析

研究課題名(英文)Biochemical analysis of novel clock associated genes

## 研究代表者

中道 範人(Nakamichi, Norihito)

名古屋大学・理学研究科(WPI)・准教授

研究者番号：90513440

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)：概日リズムは多くの生物の多様な活動に見られる約24時間周期のリズムである。植物の概日リズムを生み出す仕組み(概日時計)の分子的な実体解明を目指すため、機能的ゲノム解析を行った。その結果、午後に発現ピークをもつシロイヌナズナの時計遺伝子群の上流に時計タンパク質CCA1が結合することが分かった。さらにCCA1の直接的な標的遺伝子群を明らかとし、その中に環境ストレス応答の鍵となる遺伝子群を多数発見した。これらの遺伝子群の発現は朝に抑制され、夕方に誘導される。言い換えるとCCA1により、これらの遺伝子の発現時刻は夕刻に限られている。本研究により時計機構による遺伝子発現の時刻制御が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Circadian rhythms is an endogenous oscillation with a period about 24 hr. In order to understand molecular mechanism underlying circadian clock in plants, we performed functional genomic approaches. This project found that Arabidopsis CCA1, a morning-expressed clock-associated transcriptional factor, directly regulates a set of clock-associated genes expressed in the evening. Furthermore, CCA1 directly regulates key genes involved in environmental stress responses. These genes are expressed in the evening. This study illustrates that direct binding by CCA1 in the morning defines strong repression in a genomic scale.

研究分野：植物生理分子生物学

キーワード：植物 概日時計 概日リズム 転写因子 転写ネットワーク

## 1. 研究開始当初の背景

概日時計は、様々な概日リズムの根源となる内的な計時システムである。植物においては、気孔の開閉、葉緑体の定位運動、胚軸の伸長、花弁の開閉、葉の上下運動、アントシアニンの合成など、多様な生命現象の発現する時刻を規定している。また日長に応答した花成誘導のための内的な時刻情報の基盤となっている。その結果、繁殖にもっとも適切な季節に一齐に生殖生長をする。このような多様な生命現象の時刻をコントロールするために、時計はゲノムワイドな遺伝子発現を制御している。シロイヌナズナでは、少なくともゲノム上の 30% の遺伝子の発現が時計による制御を受けている。その多くは転写制御を受けていると考えられてきたが、スプライシングなどの転写後調節も関わってくることも報告されている。

植物の概日時計に関わる転写制御フィードバックが提唱されていたが、時計に関連する因子が隠されている可能性もあった。機能的ゲノミクス法(例えば鍵転写因子のターゲットの網羅的解析; クロマチン免疫沈降後の高速 DNA シークエンシング「ChIPseq」法など)は、これらの因子を探索する方法として適している。さらに ChIPseq 法は時計による多様な生理現象の制御の分子基盤を明らかにできる方法である。このような方法を利用して、時計の分子機構および、時計によるその他の生理現象の制御の分子基盤を理解しようとする流れが加速していた。

私はこれまでに植物独自の概日時計の分子機構の解明と、時計を利用した植物の生存戦略を明らかとするため、概日時計に関連する *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRR)* 遺伝子群に着目し、その機能解析を行ってきた。時計に関わる *PRR* 遺伝子群として *PRR9*, *PRR7*, *PRR5*, *PRR3*, *PRR1/TIMING OF CAB EXPRESSION 1(TOC1)* が知られていたが、これら *PRR* 遺伝子群の遺伝的な相互作用を解析し、*PRR9*, *PRR7*, そして *PRR5* は冗長的な働きを持ち、かつ時計機能に必須であることを報告した (Nakamichi et al., *PCP* 46: 686-698, 2005)。

*PRR* タンパク質は、働きが既知であるドメインを持っておらず、長い間その生化学的な機能が不明であった。私は、*PRR5* タンパク質の機能を薬剤で誘導するという方法を導入し、*PRR5* は直接的に *CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 (CCA1)* と *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* 遺伝子群を抑制するという可能性を見いだした。さらに一過的遺伝子発現系を用いて、*PRR5* は *CCA1* と *LHY* の転写を抑制することを見いだした。また *PRR5* に転写抑制活性に必要な新奇なドメインを実験的に見いだした。このドメインはあらゆる植物種の *PRR* タンパク質に存在するため、*PRR* タンパク質の転写抑制活性の普遍性が示唆された。また *PRR9*, *PRR7*, *PRR5* は生体内で *CCA1* と *LHY* の上

流に順繰りに相互作用することが分かり、これが *CCA1/LHY* の昼から夜半にかけての抑制に重要であることを見いだした (Nakamichi et al., *Plant Cell* 22: 594-605, 2010)。

*PRR* タンパク質が転写抑制因子であることを受け、その標的遺伝子群をゲノムワイドに同定することを目指した。そのために、植物体内で発現する *PRR5* を免疫沈降で回収し、同時に回収される DNA 配列を高速 DNA シークエンサーで解読した (ChIPseq)。この解析により、*PRR5* はゲノム上の少なくとも 500 ヶ所の領域に相互作用することが分かった。さらに 500 ヶ所の領域の近傍に位置する 60 の遺伝子の発現に対して *PRR5* は抑制的な制御をすることを見いだした。これらを *PRR5* の標的遺伝子群と名付けた。*PRR5* の標的遺伝子の発現は、昼から夜半にかけて抑制されていた。このパターンは典型的な *PRR5* の標的遺伝子である *CCA1* と *LHY* のそれと似ていた。このことから *PRR5* は標的遺伝子の主要な転写抑制因子として働くことが示唆された。これら *PRR5* の標的遺伝子群には、花成時期の制御、胚軸の伸長、そして低温ストレス応答の鍵となる遺伝子 (*CYCLING DOF FACTORS*, *PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS*, *DEHYDROLATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING 1s*) が含まれており、これらの遺伝子には *PRR5* だけでなく *PRR7* や *PRR9* も物理的に作用していた。この解析から時計転写因子 *PRRs* による多様な生理現象の制御の分子基盤が明らかとなった (Nakamichi et al., *PNAS* 109: 17123-17128, 2012)。

## 2. 研究の目的

時計関連転写因子である *PRR5* の直接的なターゲット遺伝子の中には生化学的な機能が未知であるが、互いに相同性が高い遺伝子 *X1* と *X2* があった。私は予備的な実験により、この *X1* と *X2* 遺伝子の二重変異体の概日リズムは長周期になり、一方で *X1* の過剰発現体は短周期になったことを見いだしていた。つまり *X1* と *X2* 遺伝子は時計機能に関連している。本研究では *X1* と *X2* タンパク質の生化学機能を解明することで、時計機構の分子基盤の実体に迫ることを目的とした。しかし研究着手後に、この因子群について他の研究グループより *X1* と *X2* が時計に関わるという報告があった。*X1* と *X2* はそれぞれ *NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED 1 (LNK1)* と *LNK2* と命名され、さらにこれらは *PRR5* 遺伝子の発現誘導に関わることも報告された。しかし *LNK* による *PRR5* の転写誘導は夕刻に限られており、朝には何らかの抑制に関わる因子や状態が *LNK* の機能を阻害していると考えられた。本研究ではこの抑制機能に関わる因子を同定し、*LNK* との関わりを考察し、そ

のことでより時計の分子基盤の理解を深めることとした。

### 3. 研究の方法

*PRR5* 遺伝子の 5' 上流の転写リズムを解析し、次にこの領域に結合する可能性のある因子を *in silico* で探索する。次に ChIPseq 法で、生体内でのその候補因子と *PRR5* 遺伝子 5' 上流の結合を定量化する。この ChIPseq 解析に用いる高速 DNA シークエンサーは、異なる 2 つの機種 (Illumina GAII と IonPGM) を用いる。GAII はショートリードシークエンサーとして標準的な機能を持ち、一方で IonPGM はそれに比べて出力数は少ないがより長いリードを読むことができる。次に *PRR5* の調節因子候補の変異体で *PRR5* の発現を解析する。また *PRR5* 遺伝子制御における、候補因子と *LNK* の遺伝子群関係性を解析する。

さらに候補因子の ChIPseq のデータを解析し、候補因子の直接的ターゲットをあぶりだすことで、時計による多様な生理現象の制御の分子基盤の理解をさらに深める。

### 4. 研究成果

*PRR5* 遺伝子の 5' 上流の転写活性を解析し、翻訳開始コドンから約 1,400bp ほどの 5' 上流が午後にピークをもつ概日リズムを産み出すために必要なことが分かった。この領域内には Evening Element (EE) や CCA1-BINDING SITE (CBS) という時計関連因子 CCA1/LHY が結合する可能性のある配列が見つかったが、その他には時計に関連するシス配列は見つからなかった。*PRR5* 上流領域への CCA1 の物理的作用を ChIPseq 解析により検討したところ、CCA1 タンパク質がこの領域内に 3 カ所結合することが明らかとなった。特に IonPGM を用いた解析は、非常に高い解像度で CCA1 の *PRR5* 上流への作用を示した。CCA1 タンパク質の *PRR5* 遺伝子座における相互作用の時刻を確かめる目的で、経時的な ChIP-qPCR 解析を行ったところ、CCA1 は明方から午前中にかけて *PRR5* 遺伝子座に結合していた。*PRR5* の発現は午後にピークを迎えるため、上記の結果から、2 つの可能性が考えられた。すなわち CCA1 は *PRR5* の発現を朝に抑えている、あるいは CCA1 は午後に向けて *PRR5* の発現状態を上昇させる引き金になっている、可能性である。それを検証するために *cca1 lhy* 二重変異体における *PRR5* の発現を解析したところ、この二重変異体では *PRR5* の発現レベルが野生型と比較して高まっていた。また葉肉細胞プロトプラストにおいて CCA1 あるいは LHY を一過的に過剰発現させると、*PRR5* の転写活性が極端に抑制された。この抑制効果は、*lnk1 lnk2* 二重変異体由来のプロトプラストでも観察された。さらに CCA1 と *LNK1* の共過剰発現でも *PRR5* の転写抑制が確認された。したがって *PRR5* の転写制御に

関して CCA1 と LHY は *LNK1* に対して優性的に働くことが示唆された。

次に *PRR5* 遺伝子座の CCA1 結合領域がリズム発現に重要なレポーター解析により、確認した。*PRR5* の 5' 上流には、EE がいくつかあるが、CCA1 が生体内で結合しうる EE を含む領域は午後ピークの概日リズムを付与したのに対して、CCA1 が結合しない EE を含む領域はリズムミクな転写活性を示さなかった。生体内での CCA1 の結合こそが *PRR5* の午後ピークの転写活性リズムに重要であることが示された。

次に ChIPseq データを解析し、CCA1 の直接的なターゲット遺伝子群を同定した。興味深いことに、試験管内における CCA1 結合サイトである CCA1-binding site (CBS) には CCA1 は生体内でそれほど結合しておらず、EE に良く結合することが分かった。また CCA1 の標的遺伝子群は朝に発現が抑制され、夕方に活性化される遺伝子群が濃縮していた。またこれら遺伝子群には時計関連遺伝子群および環境ストレス応答に関わる鍵遺伝子が多数存在していた。CCA1 は時計関連遺伝子である *PRR9* と *PRR7* の発現に対して正に振舞うことが示唆されていたが、この点を薬剤誘導性の CCA1 発現体およびプロトプラストの一過的発現系を利用して検討した。薬剤で CCA1 を誘導すると、即座に *PRR9* と *PRR7* の発現が抑制された。この薬剤の効果は正午および真夜中に検討したが、いずれの時点でも CCA1 は *PRR9* と *PRR7* を抑制していた。また葉肉プロトプラストにおいて CCA1 を一過的に発現させると *PRR9* と *PRR7* の転写プロモーター活性が抑制された。以上の解析により、CCA1 は従来示唆されていたように *PRR9* と *PRR7* の活性化因子ではなく、むしろ抑制因子であることが分かった。この成果は、時計転写ネットワークの新たな改訂を迫るものであった。

CCA1 の標的遺伝子群には、環境ストレス応答に関わる鍵遺伝子が濃縮されていた。これらは、乾燥ストレス、熱ストレス、植物ホルモンのアブシジン酸、ブラシノステロイド、ワックスの合成に関わるものであった。時計は CCA1 の働きにより、これら生理現象を特定の時刻に発現させることを可能にしているのかもしれない。

CCA1 の標的遺伝子群の中には、*PRR5* にも直接的に制御される遺伝子群が含まれていた。そこで CCA1 と *PRR5* の遺伝子発現に関する関係を調べるために、CCA1-*PRR5* 共標的遺伝子群の発現を解析した。CCA1 標的遺伝子群の発現は夕刻に、*PRR5* 標的遺伝子の発現は明方に見られたが、CCA1-*PRR5* の共標的遺伝子群の発現は、昼ごろに見られた。したがって CCA1 と *PRR5* のゲノム DNA への物理的作用は、その発現時刻にとって重要であることが分かった。

本研究は機能的ゲノミクス法を用いて、午後から夕刻に発現する遺伝子群の転写時刻

調節に CCA1 が優性的に働くことを示唆し、さらに CCA1 の標的をあぶりだすことにより、時計に直接制御される生理現象を発見した。時計および CCA1 はあらゆる維管束植物に保存されているため、本研究の知見は多様な植物の転写概日時刻決定の理解につながると期待される (Kamioka et al., *Plant Cell* 28: 696-711, 2016)。

#### 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 5 件)

1. Kamioka M, Takao S, Suzuki T, Taki K, Higashiyama T, Kinoshita T, Nakamichi N. Direct Repression of Evening Genes by CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 in the Arabidopsis Circadian Clock. *Plant Cell*. 2016 Mar;28(3):696-711. <査読有り>

2. Nakamichi N, Takao S, Kudo T, Kiba T, Wang Y, Kinoshita T, Sakakibara H. Improvement of Arabidopsis biomass and cold-, drought-, and salinity-stress tolerance by modified circadian clock-associated PSEUDO-RESPONSE REGULATORS. *Plant Cell Physiol*. 2016 in press. <査読有り>

3. Nakamichi N. Adaptation to the local environment by modifications of the photoperiod response in crops. *Plant Cell Physiol*. 2015 Apr;56(4):594-604. <査読有り>

4. Kimura Y, Aoki S, Ando E, Kitatsuji A, Watanabe A, Ohnishi M, Takahashi K, Inoue S, Nakamichi N, Tamada Y, Kinoshita T. A flowering integrator, SOC1, affects stomatal opening in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*. 2015 Apr;56(4):640-649. <査読有り>

5. Kobayashi K, Suzuki T, Iwata E, Nakamichi N, Suzuki T, Chen P, Ohtani M, Ishida T, Hosoya H, Müller S, Leviczky T, Pettkó-Szandtner A, Darula Z, Iwamoto A, Nomoto M, Tada Y, Higashiyama T, Demura T, Doonan JH, Hauser MT, Sugimoto K, Umeda M, Magyar Z, Bögre L, Ito M. Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *EMBO J*. 2015 Aug 4;34(15):1992-2007. <査読有り>

[学会発表](計 8 件)

1. 中道範人. 植物の概日時計機能に関わるタンパク質 PRR の研究. 第 22 回時間生物学会学術大会. 2015 年 11 月. (招待講演).

2. Nakamichi N. Synthetic Molecules Changing Plant Circadian Clock. The 64<sup>th</sup> NIBB Conference Evolution of Seasonal Timers. 2016

年 4 月予定. (招待講演).

3. Nakamichi N. Synthetic molecules controlling plant circadian rhythms, 2nd International Symposium of Transformative Bio-molecules, 名古屋, 2014年5月(招待講演).

4. Nakamichi N. Systematic analysis of plant circadian clock. 38<sup>th</sup> Naito Conference, 札幌, 2014 年 10 月

5. Nakamichi N. Genetic architecture of Arabidopsis circadian clock system, The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 横浜, 2014年11月(招待講演).

6. 中道範人, 上原貴大, 山口潤一郎, 高尾早織, 瀧京美, 笠原博幸, 伊丹健一郎, 木下俊則. シロイヌナズナの概日リズム周期を調整する新規低分子化合物群. 第56回日本植物生理学会年会, 東京, 2015年3月

7. 水谷佳幸, 上原貴大, 山口潤一郎, 高尾早織, 瀧京美, 佐藤綾人, 桑田啓子, 伊丹健一郎, 木下俊則, 中道範人. 概日リズムを長期化する低分子化合物のターゲットとして同定されたキナーゼの解析. 第 57 回日本植物生理学会年会, 盛岡, 2016 年 3 月

8. 瀧京美, 上原貴大, 山口潤一郎, 高尾早織, 笠原博幸, 伊丹健一郎, 木下俊則, 中道範人. 概日リズムの周期長を変える化合物の作用機序の理解に向けた遺伝学的解析. 第 57 回日本植物生理学会年会, 盛岡, 2016 年 3 月

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 概日リズム調整剤

発明者: 中道範人, 山口潤一郎, 伊丹健一郎, 上原貴大, 大松亨介, 古川由季乃, 木下俊則, 大井貴史, 佐藤綾人

権利者: 名古屋大学

種類: 特願

番号: 2014-164097

出願年月日: 2014 年 8 月 14 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 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

<http://plantphys.bio.nagoya-u.ac.jp/>

プレスリリース

<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/en/research/2016/03/Nakamichi-Clock.php>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中道範人 (NAKAMICHI, Norihito)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命  
分子研究所・特任准教授

研究者番号：90513440

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：