

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手スタートアップ

研究期間：2008～2009

課題番号：20870040

研究課題名（和文） 植物における時計関連タンパク質の生化学的解析

研究課題名（英文） Biochemical study of clock-associated proteins in plants

研究代表者

中道 範人 (NAKAMICHI NORIHITO)

独立行政法人理化学研究所・生産制御研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：90513440

研究成果の概要（和文）：

私は、生化学的機能が未知であったシロイヌナズナの生物時計関連タンパク質 PSEUDO-RESPONSE REGULATOR9 (PRR9), PRR7, PRR5 の解析を行い、これらは *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* と *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* 遺伝子への転写抑制因子として機能する事を発見した。

研究成果の概要（英文）：

I found that PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 9 (PRR9), PRR7, and PRR5 act as transcriptional repressors of *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* and *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：シロイヌナズナ、生物時計、転写因子、ChIP

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナの PSEUDO-RESPONSE REGULATOR9 (PRR9), PRR7, PRR5 は生物時計で機能することが、分かっていた。例えばこれらの変異体は、生物時計の生み出すリズム(概日リズム)の周期長と振幅に異常を示す。またこのような生物時計の機能欠落によって二次的に、様々な生理現象の異常も示す。これらの生理現象は、産業上有用な形質も多

く含む。さらに PRR 遺伝子群は、コケ植物から種子植物まで保存されていることも分かっていた。

しかしながら、PRR タンパク質そのもの生化学的な機能は分かっておらず、従って植物型の生物時計の分子機構も不明なままであった。

2. 研究の目的

モデル植物におけるシロイヌナズナの PRR9, 7, 5 の生化学的な機能の同定と、その機能の発現する時間帯を決定することを目指した。

3. 研究の方法

PRR9, 7, 5 タンパク質をそれぞれ植物体内(シロイヌナズナ)で発現させ、生化学的な性質をレポーターアッセイによって、同定した。また PRR タンパク質を植物体内で発現させ、その挙動(この場合は特定の DNA 配列との結合)をクロマチン免疫沈降(Chromatin Immunoprecipitation :ChIP)-定量 PCR 法によって、決定した。

4. 研究成果

生化学的機能が未知であったシロイヌナズナの生物時計関連タンパク質 PSEUDO-RESPONSE REGULATOR9 (PRR9), PRR7, PRR5 の解析を行い、これらは *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* と *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* 遺伝子への転写抑制因子として機能する事を見いだした。グルコシルコリドで機能誘導される PRR5-GR は、その他のタンパク質の翻訳が存在しない条件においても *CCA1* と *LHY* の発現を抑制した。一方、シロイヌナズナの一過的遺伝子発現系によって、PRR9, PRR7, PRR5 の *CCA1* と *LHY* のプロモーター活性に対する抑制効果を発見した。さらにその抑制機能を担う新規なモチーフが PRR9, PRR7, PRR5 に存在することも分かった。このモチーフは様々な植物に存在しているため、PRR9, PRR7, PRR5 の転写抑制能は植物に普遍的な機能であると考えられる(図 1)。

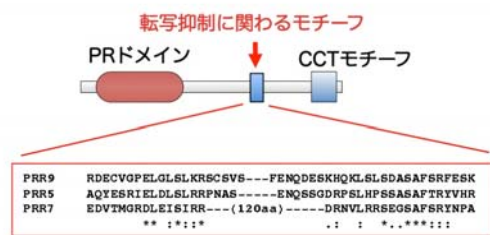


図 1. PRR9, PRR7, PRR5 タンパク質に保存されている転写抑制モチーフの発見

またクロマチン免疫沈降法によって、PRR9, PRR7, PRR5 タンパク質が植物体内で *CCA1* と *LHY* のプロモーター上に存在していることが分かった。これら PRR が *CCA1* と *LHY* プロモーターに存在している時間帯と、*CCA1* と *LHY* の転写抑制が見られる時間帯は一致(午前から夜半)していた。

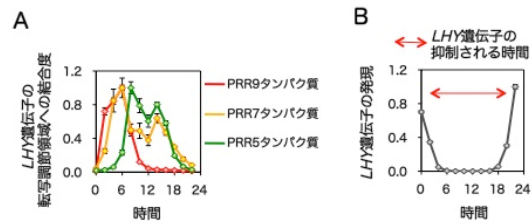


図 2. 植物体内における PRR9, PRR7, PRR5 の *LHY* プロモーター-DNA 領域への結合(A)と、ターゲットである *LHY* 遺伝子の発現パターン(B)。PRR の結合している時間帯では、*LHY* 遺伝子の発現が抑制されている。*CCA1* 遺伝子にたいしても同等の効果が認められる(データは割愛)。

PRR の *CCA1* と *LHY* プロモーターに存在している時間帯を、それぞれ人為的にコントロールして、PRR の発現時間帯の意義を調べた。*prp9 prp7* 変異体では、PRR5 タンパク質のみが、夕方に発現している。この変異体では、*CCA1* と *LHY* の「昼間」の抑制が解除されていた。つまり昼間に発現する PRR9 と PRR7 は、*CCA1* と *LHY* の昼間における抑制に必要なことが分かった。一方、*prp7 prp5* 変異体では、夜間の *CCA1* と *LHY* の発現抑制が解除されていたため、PRR7 と PRR5 は夜間に機能していることが示唆された。つまり PRR9, PRR7, PRR5 の時間的な分業が明らかになった。

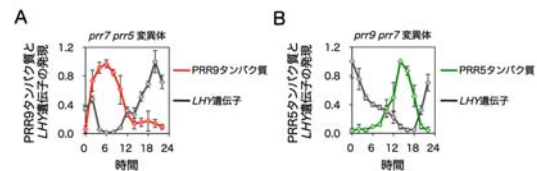


図 3. *prp7 prp5* 変異体(A)と *prp9 prp7* (B)での *LHY* 遺伝子の発現パターン。*prp7 prp5* では、夜間の *LHY* の抑制が解除され、*prp9 prp7* では昼間の *LHY* の抑制が緩やかになる。

これら一連の解析により、PRR は *CCA1* と *LHY* の転写抑制を担う主要な因子であることが示唆された。以上の結果は、国際誌(査読付) *The Plant Cell* vol. 22: 594-605 で発表した。

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 6 件)

- ① Norihito Nakamichi, Takatoshi Kiba, Rossana Henriques, Takeshi Mizuno,

- Nam-Hai Chua, Hitoshi Sakakibara. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the Arabidopsis circadian clock. *The Plant Cell* 査読有 vol.22: 594-605, 2010,
- ② Norihito Nakamichi, Miyako Kusano, Atsushi Fukushima, Masanori Kita, Shogo Ito, Takafumi Yamashino, Kazuki Saito, Hitoshi Sakakibara, and Takeshi Mizuno. Transcript profiling of an Arabidopsis PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant Cell Physiol* 査読有 vol.50(3): 447-462, 2009
- ③ Atsushi Fukushima, Miyako Kusano, Norihito Nakamichi, Makoto Kobayashi, Naomi Hayashi, Hitoshi Sakakibara, Takeshi Mizuno, and Kazuki Saito. Impact of clock-associated Arabidopsis pseudo-response regulators in metabolic coordination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 査読有 vol.106(17): 7251-7256, 2009
- ④ Norihito Nakamichi, Atsushi Fukushima, Miyako Kusano, Hitoshi Sakakibara, Takeshi Mizuno, and Kazuki Saito. Linkage between circadian clock and tricarboxylic acid cycle in Arabidopsis. *Plant Signal Behav.* 査読有 vol.4(7):660-662, 2009
- ⑤ Shogo Ito, Yosuke Niwa, Norihito Nakamichi, Hideaki Kawamura, Takafumi Yamashino, and Takeshi Mizuno, Insight into missing genetic links between two evening-expressed pseudo-response regulator genes TOC1 and PRR5 in the circadian clock-controlled circuitry in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 査読有 vol.49(2): 201-213, 2008
- ⑥ Takafumi Yamashino, Shogo Ito, Yosuke Niwa, Atsushi Kunihiro, Norihito Nakamichi, and Takeshi Mizuno. Involvement of Arabidopsis clock-associated pseudo-response regulators in diurnal oscillations of gene expression in the presence of environmental time cues. *Plant Cell Physiol.* 査読有 vol.49(12): 1839-1850, 2008
- [学会発表] (計 5 件)
- ① 中道範人、草野都、福島敦史、伊藤照悟、山篠貴史、斉藤和季、水野猛、榊原均、「植物時計変異体のDNAアレイ解析」第15回時間生物学会学術大会、2008年11月8日、岡山
- ② 中道範人、草野都、福島敦史、伊藤照悟、山篠貴史、斉藤和季、水野猛、榊原均、「シロイヌナズナ時計変異体のアレイ解析」第50回日本植物生理学会年会、2009年3月18日、名古屋
- ③ Norihito Nakamichi, Takatoshi Kiba, Rossana Henriques, Takeshi Mizuno, Nam-Hai Chua, Hitoshi Sakakibara. 「PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 9, 7 and 5 are Repressors of CCA1 and LHY Transcription in Arabidopsis Circadian Clock」 Plant Biology 2009, July 23/2009, Honolulu
- 中道範人、木羽隆敏、水野猛、榊原均 「PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 9, 7 and 5 are Transcriptional Repressors of CCA1 and LHY in Arabidopsis Circadian Clock」第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日、横浜
- 中道範人、木羽隆敏、Rossana Henriques、水野猛、Nam-Hai Chua、榊原均、「シロイヌナズナの疑似レスポンスレギュレーターは生物時計で機能する転写抑制因子である」第51回日本植物生理学会年会、2010年3月20日、熊本
- [産業財産権]
○出願状況 (計 2 件)

□名称：バイオマスが増大し、かつ環境ストレスが向上した形質転換植物およびその作出方法

発明者：中道範人、榊原均

権利者：理化学研究所

種類：

番号：特願2009-244595

出願年月日：平成 21 年 10 月 23 日

国内外の別：国内

□名称：バイオマスが増大し、かつ環境ストレスが向上した形質転換植物およびその作出方法

発明者：中道範人、榊原均

権利者：理化学研究所

種類：

番号：61/291300

出願年月日：平成 21 年 12 月 30 日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ

<http://labs.psc.riken.jp/brt/>

プレスリリース

http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2010/100318_2/detail.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

中道 範人 (NAKAMICHI NORIHITO)

独立行政法人理化学研究所・生産制御研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：90513440