

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370018

研究課題名（和文）

植物の二成分情報伝達系による高次機能統御の包括的理解

研究課題名（英文）

Study on Two-Component Systems in Plants

研究代表者

水野 猛 (MIZUNO TAKESHI)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：10174038

研究成果の概要（和文）：情報伝達基本機構である二成分情報伝達系（以下 TCS と略）は微生物に最も普遍的な環境シグナル検知・応答機構である。しかし、永い進化を経て植物においても環境シグナル検知・応答機構として重要な生理機能の制御に関わっていることが知られている。特に、サイトカイニンやエチレンなどの植物ホルモンに応答した情報伝達系や概日時計機構に必須の役割を担っている。本研究計画ではモデル植物シロイヌナズナだけでなく、モデルマメ科植物ミヤコグサや最初の陸上植物の子孫であるヒメツリガネゴケを対象として TCS による植物の高次機能統御における役割とその分子機構を包括的に理解することを目的とした。その結果、サイトカイニンの応答機構や概日時計機構に関して多くの新しい知見を得ることができた。これらの成果は30報近く学術論文として公表した。

研究成果の概要（英文）：The so-called Two-Component Systems (TCS) provide us with the paradigm of signal transduction system in prokaryotes, including numerous bacterial species. TCS play important and general roles in signal perception and adaptive response to a variety of environmental stimuli. However, it should be emphasized that, during evolution, plants also have evolved sophisticated TCS, which now play important physiological roles in plant developments, including not only the phytohormone cytokinin and ethylene perception and signal transduction but also the plant circadian clock systems. In order to gain more fundamental insights into the physiological roles of TCS in plants, in this study we employed not only the model plant *Arabidopsis thaliana*, but also the model legume *Lotus japonicus* and the primitive land moss *Physcomitrella patens*. As the results, we gained a number of new insights into the plant TCS, particularly, with regard to the mechanisms underlying cytokinin signal transduction and circadian clock. These results have already been published in a series of reports, as many as 30.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答、情報検知、情報伝達、二成分制御系、植物ホルモン、概日時計、進化

1. 研究開始当初の背景

バクテリア型二成分情報伝達系は進化的に保存され、かつ普遍的な環境応答・情報伝達基本機構である（以下、Two-Component Signal Transduction Systems:TCS 系と略）。TCS 系は全ての原核生物（バクテリア・古細菌）の環境応答機構に活用されているのみならず、酵母・カビなどの真核微生物にも広く認められる。言い換えれば、TCS 系は微生物に見られる最も普遍的で多様化した環境シグナル検知・細胞内情報伝達機構である。TCS 系は今から 20 年以上前に大腸菌の環境応答機構として発見された。我々は、大腸菌浸透圧応答 TCS 系の分子機構を明らかにし、TCS 系の発見とその基本機構の確立に貢献した。その後ゲノム時代が到来し、枯草菌やシアノバクテリアなどのバクテリアゲノム配列が決定され、TCS 系がバクテリアの主要な情報伝達機構であることが明らかになり、TCS 系はより普遍化的に体系化された（総説・Mizuno (1998) J Biochem. 123:555）。我々は、光合成細菌のゲノムワイド TCS 系研究を展開することでこの流れに貢献した(Mizuno & Tabata (1996) DNA Res. 3:407)。時を同じくして酵母などの真核微生物の情報伝達機構にも TCS 系が用いられていることが明らかになり、その普遍性と多様性は一層確かなものとなった。我々も、分裂酵母を対象にした TCS 系研究を展開してこの流れに貢献した(Nakamichi & Mizuno, (2002) BBB 66:2663)。さらに、TCS 系は高等植物の情報伝達機構にも進化的により洗練された系として保存されている。我々は、高等植物 TCS 系に関するブレークスルーにも先導的な役割を果たした（総説・Mizuno, (2004) Curr. Opin. Plant Biol. 7:499）。こうした TCS 系に関する学術的背景を換言すれば「His・Asp リン酸リレー TCS 系は生物に最も普遍的で多様化した細胞内情報伝達基本機構である」といえる。

従って、TCS 系の包括的理解は、環境応答機構や遺伝子発現制御機構といった分子微生物学の基本命題としての重要性のみならず、TCS 系に着目した応用生物学的な幅の広さから考えても、学術基盤研究としての重要性は明らかである。我々は一貫して、「大腸菌の浸透圧応答→光合成細菌のリン酸欠乏応答→根粒菌の根粒形成→分裂酵母のストレス応答→糸状菌の孢子分化制御→高等植物のホルモン応における TCS 系の役割」とその分子機構の研究を発展・拡大してきた（総説・Mizuno (2005) BBB 69:2263）。申請者らの総合的 TCS 系研究は、現在では高等植物の光情報伝達・植物生物時計機構の研究にまで広がりつつある（総説・Mizuno & Nakamichi (2005) Plant Cell Physiol. 46:677）。この

ように普遍性の高い TCS 系に関する学術的背景を基盤に本研究課題を立案・考究した。

2. 研究の目的

我々は最近、モデル双子葉植物シロイヌナズナの全ゲノム配列を活用して高等植物に見られる TCS 系の全体像を把握するための基礎知識を初めてまとめた（総説・Mizuno, (2004) Curr. Opin. Plant Biol. 7:499）。これを基盤として TCS 系に関わる高次機能統御機構を明らかにしつつある。その過程で、植物の概日時計を構成する主要な因子として TCS 関連遺伝子が関与していることを明らかにしてきた（総説・Mizuno & Nakamichi (2005) Plant Cell Physiol. 46:677）。本研究課題では、今までの我々の植物 TCS 系研究を更に発展させることを目的とした。

具体的には

- (月) 概日時計の分子基盤を更に考究する。
- (火) 概日時計と赤色光受容体により日長変動に対応して植物の生長を制御するシグナル伝達経路を明らかにする。
- (水) 概日時計による光と温度シグナルの統合的感知機構の存在を実証する。
- (木) 概日時計による温度シグナル感知機構の分子基盤を明らかにする。
- (金) 光と温度シグナルの相互作用のダイナミズム介した栄養成長及び生殖成長の制御に焦点をあて概日時計の生理機能を明らかにする。

以上を、研究目的として設定した

3. 研究の方法

- (月) 対象としてモデル植物シロイヌナズナ、ミヤコグサ、ヒメツリガネゴケを用いることで、上記の目的を「普遍性・多様性・進化」を視点に据えて考究した。
- (火) ゲノム情報を駆使した。
- (水) 分子生物学・分子遺伝学的手法を駆使した。

4. 研究成果

成果 (1) : シロイヌナズナの光周性成長制御を司る概日時計支配下のコインシデンス因子である :

植物の概日時計は様々な生理現象の日周性・光周性制御に関わっている。この点で、シロイヌナズナの長日性の光周性花成制御や短日性の光周性胚軸伸長制御に関して、概日時計の役割と出力経路の分子機構の詳細が理解されつつある。前者の出力経路には CO

と FT が、後者には PIF4/5 が関わっており、光周性制御の機構としては外的符合 (external coincidence) モデルが提唱されている。前者のコインシデンス因子である FT はフロリゲンとしてよく知られている。しかし、胚伸長制御に関わるコインシデンス因子 (X) は未だ同定されていない。この仮想因子 X は PIF4/5 の支配下に短日条件かつ夜の後半特異的に発現するはずである。今回は、公開されているシロイヌナズナ遺伝子発現データベースを頼りにコインシデンス因子 X の同定を試みた。その結果、コインシデンス因子の候補の一つとして転写因子 HOME0 BOX2 (ATHB2) を同定した。それらを総合して、概日時計と光受容体 phyB が協調して PIF4/5-ATHB2 出力系を制御することで短日特異的な胚軸伸長が起こる機構を説明するための外的符合モデルを提唱した。

成果 (2) : ヒメツリガネゴケにおける進化的に保存された光応答転写因子群の解析 :

ヒメツリガネゴケは陸上植物の進化を考える上で格好の研究材料である。我々は、シロイヌナズナを対象とした研究の延長として、ヒメツリガネゴケの「二成分制御系」や「概日時計」に関して興味ある知見を得た。さらに、シロイヌナズナの光形態形成において重要な転写因子群に関して、ヒメツリガネゴケにおける進化的保存性に焦点を当てて解析した。シロイヌナズナにおいて光受容体 (フィトクロムやクリプトクロム) の直下で働く光形態形成関連因子としては HY5 (bZIP 型)、BBX (B-box-CCT 型)、PIF (bHLH 型) の各ファミリーに属する転写因子がよく解析されている。これらの因子はヒメツリガネゴケでも保存されているであろうか? これらの疑問に対して、(i) HY5、BBX、PIF ファミリーに属する転写因子は全てヒメツリガネゴケに存在することを示し、(ii) それらの遺伝子を取得してシロイヌナズナにおいて過剰発現させることにより機能的保存性を確認した。また、(iii) ヒメツリガネゴケに二つ存在する HY5 ホモログ遺伝子の二重欠損変異体を作成してコケの生育に及ぼす影響を解析した。HY5 ホモログ (PpHY5a と PpHY5b) の欠損体ではコロニー周辺でのカウロネマ細胞の先端伸長が著しく阻害されることを含めて、植物における光形態形成関連の転写因子群の進化に関して考察した。

成果 (3) : ミヤコグサにおける二成分制御系と根粒形成機構 :

植物 TCS の代表例はサイトカイニン (CK) 応答であり、CK 受容体は His キナーゼであることが知られている。これらの知見は主にシロイヌナズナで得られたものであるが、最近になり TCS 研究の対象としてマメ科植物が注

目されている。なぜならば、シロイヌナズナには見られないマメ科植物の特徴である根粒形成に CK 受容体 His キナーゼ (LHK1) が重要な役割を担っていることが分かったからである。我々は植物における TCS の普遍性と多様性を理解する一環としてミヤコグサを対象として TCS 関連遺伝子のゲノムワイド解析を行い、TCS 因子群がモデルマメ科植物にもよく保存されていることを明らかにした。例えば、(i) ミヤコグサの CK 受容体型 His キナーゼはシロイヌナズナ同様三種類 (LHK1/2/3) 存在すること、(ii) A 型 LjRRa のみならず LHK1 や B 型 LjRRb2 と名づけた転写因子が根で CK による特異的転写誘導をうけることを見いだした。これらを背景に、ミヤコグサ TCS 因子群の根粒形成における役割を、形質転換による毛状根形成を利用した逆遺伝学的手法を用いて解析することで現在知られてる根粒形成遺伝子発現ネットワークの中に位置づけて考察した。

成果 (4) : ミヤコグサにおける避陰反応と腋芽分制御 :

避陰反応は植物の光応答系において最も特徴的な現象の一つであり、近接する植物の陰に入った植物は著しく背丈が徒長する。こうした避陰反応は遠赤色光が重要な光シグナルとなりフィトクロム (主に phyB) を介した光情報伝達系により制御されていることが明らかになっている。我々はミヤコグサの光シグナル伝達系の解析をする過程でミヤコグサに特に顕著な避陰反応を見いだした。避陰反応には背丈の徒長に加え、早咲き、腋芽からの分岐の抑制などがある。シロイヌナズナでは腋芽からの分岐抑制現象はあまり顕著ではなくほとんど解析されていない。我々はミヤコグサを遠赤色光に富んだ光条件下で生育させ避陰反応を誘導すると腋芽からの分岐が極端に阻害され、白色光条件下で生育させた植物体と全く異なる形態を示すことを見いだした。このことはミヤコグサが「光シグナルによる避陰反応の誘導」と「ストリゴラクトンによる分岐制御」とのリンクを解析する上で格好の材料であることを示している。以上のような背景をもとに、(i) ミヤコグサにおける避陰反応としての腋芽分岐制御の詳細な現象を解析した。

成果 (5) : ゲノム情報を通じたミヤコグサの花成制御機構に関する検証 :

マメ科植物の花成制御機構の理解は穀物生産管理にとって重要であり、主にエンドウやダイズ対象とした長い研究の歴史がある。しかし、遺伝子レベルの研究はイネやシロイヌナズナに比べて立ち後れている。そこで今回は、ゲノム情報が豊かなモデルマメ科植物であるミヤコグサを対象に遺伝子レベルの

解析を行った。用いたミヤコグサ MG20 は長日条件下で花成が促進される。そこで同じ長日植物であるシロイヌナズナの知見を元に、光周性花成制御機構に関与する「概日時計→CO→FT 経路」、「microRNA172→FT 経路」及び「遠赤色光→phyB→FT 経路」に焦点をあててゲノムワイドな解析をした。加えてシロイヌナズナ形質転換実験やミヤコグサ phyB 変異株を用いた実験結果を根拠に次の点を報告する。①花成促進機能を有する FT オルソログを同定した。しかし、②CO オルソログは見当たらない。代わって、③FT 促進機能を有する miR172 を同定できた。④phyB が FT を介した花成抑制機構に関与しており、ミヤコグサ phyB 変異株では短日でも顕著に花成が促進される。⑤シロイヌナズナにおいて花成制御に関わることが知られている重要な遺伝子の幾つかが現在の ver. 2.5 のゲノム情報に見当たらない。⑥今回得られたこれらの新しい知見をエンドウやダイズにおける最近の知見と関連づけて考察した。

成果 (6) : ミヤコグサにおける概日時計機構の多面的解析 :

植物の概日時計機構は普遍的であり、単細胞緑藻類にもそのプリミティブな実体が保存されている。概日時計は花成制御をはじめ様々な生理・生態機能の制御に関わっており、基礎生物学だけでなく植物生産の観点からもその普遍性と多様性の理解が重要である。しかし、マメ科植物の概日時計に関しては解析が遅れている。そこで、ゲノム情報が豊富なモデル植物ミヤコグサを対象として概日時計機構を解析することは興味深い。本研究ではミヤコグサの概日時計機構に関して次のことを明らかにした。①シロイヌナズナの時計関連遺伝子群のオルソログをミヤコグサデータベース利用してゲノムワイドに解析したところ、「多くの時計遺伝子がよく保存されていた。②主要な時計遺伝子候補に関し概日リズムの波形特性を解析した。その結果、」期待される波形特性を示す遺伝子が多かったが、時計機構を考える上で重要な違いも認められた。③毛状根形質転換系を利用してシロイヌナズナ時計遺伝子 (朝方遺伝子 CCA1 と夕方遺伝子 PRR5) をミヤコグサに導入してリズムを測定した。これらの遺伝子が期待されるリズム波形を示したことから、ミヤコグサの概日リズム生成に関わる諸因子はその働きも含めて保存性が高いことが示された。

成果 (7) : 日長と気温変化 (季節) に応答した胚軸や葉身の伸長制御機構 :

シロイヌナズナの胚軸伸長は日長条件により制御されており、短日条件では顕著な伸長促進が観察される。その分子機構には赤色

光受容体 phyB と概日時計に制御されている bHLH 型転写因子 PIF4 (胚軸伸長促進因子) が重要な働きをしている。PIF4 タンパク質は光条件下では phyB により分解される。一方、PIF4 遺伝子は長日条件下では日中でのみ転写されるが、短日条件下では夜の終わりにも転写がみられる。この転写制御には日長変化を感知した概日時計が関与している。結果として、短日条件下 (夜の終わり) にのみ PIF4 タンパク質が働くことで胚軸や葉身の伸長が促進される。このように外的日長条件と内在性 PIF4 概日リズムが符合することで短日特異的な胚軸伸長起ると考えられる。これが最近我々の提唱した外的符合モデル (External Coincidence Model) である。しかし、長日条件下でも高温 (28°C) では常温 (22°C) と比較して PIF4 に依存した顕著な胚軸伸長が見られることが最近相次いで報告された。この現象は我々の符合モデルでは即座には説明できない。今回は、この現象も我々の符合モデルを少し拡張するだけで説明できることを報告する。すなわち、日長と温度という二つの外的条件と PIF4 リズムが符合することで季節 (日長と気温変化) に応答した胚軸や葉身の伸長制御がなされているという新規なモデルを提案した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 27 件)

1: Ueoka-Nakanishi, H., *Yamashino, T., Mizuno, T., (6/6) Molecular mechanism of circadian rhythm in *Lotus japonicus* is compatible enough with that of *Arabidopsis thaliana* to robustly regulate heterologous core clock genes. Biosci. Biotechnol. Biochem. In press (2012). (査読有)

2: *Nakamichi, N., Kiba, T., Mizuno, T., (7/7) Transcriptional repressor PRR5 directly regulates clock-output pathways. P.N.S.A. 109: 17123-17128 (2012). (査読有)

3: Nomoto, Y., Kubozono, S., *Yamashino, T., Mizuno, T., (5/5) Circadian clock and PIF4-controlled plant growth: A coincidence mechanism directly integrates a hormones-signaling network into the photoperiodic control of plant architectures in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. PMID: 23037003 (2012). (査読有)

4: Nomoto, Y., *Yamashino, T., Mizuno, T., (6/6) A circadian clock and PIF4-mediated

double coincidence mechanism is implicated in the thermo-sensitive photoperiodic control of plant architectures in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. PMID: 23037003 (2012). (査読有)

5: Satbhai, S.B., Mizuno, T., *Aoki, S. (5/9) Pseudo-response regulator (PRR) homologues of the moss *Physcomitrella patens*. DNA Res. 18: 39-52 (2011). (査読有)

6: Satbhai, S.B., Mizuno, T., *Aoki, S. (3/4) Heterologous expression and functional characterization of a *Physcomitrella* pseudo response regulator Homolog in *Arabidopsis* **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 75: 786-789 (2011). (査読有)

7: *Hagiwara, D. Mizuno, T. (2/3) Characterization of the conserved phosphorylation site in the *Aspergillus nidulans* response regulator SrrA. Curr. Genet. 57: 103-114 (2011). (査読有)

8: Yamawaki, S., *Yamashini, T., Mizuno, T. (3/3) Functional characterization of HY5 homolog genes in *Physcomitrella patens*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 75: 1533-1538 (2011). (査読有)

9: Kunihiro, A., *Yamashina, T., Mizuno, T. (6/6) PIF4 and 5 activate the homeobox ATHB2 gene in the coincident mechanism underlying photoperiodic control of plant growth of *A. thaliana*. Plant Cell Physiol. 52:13151329 (2011). (査読有)

10: Yamawaki, S., *Yamashino, T., Mizuno, T. (5/5) Light-Responsive double B-box transcription factors are conserved in *Physcomitrella patens*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 75: 2037-2041 (2011). (査読有)

11: Nakanishi, H., *Yamashino, T., Mizuno, T. (7/7) Characterization of shade avoidance responses in *Lotus japonicas*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 75:2148-2154 (2011). (査読有)

12: *Nakamichi, N., Kiba, T., Mizuno, T. (4/6). PRR 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the *Arabidopsis* circadian clock. Plant Cell 22: 596-605(2010). (査読有)

13: Mizuno, T. *Yamashino, T. (1/2) Biochemical characterization of plant hormone cytokinin receptor histidine kinases using microorganisms. Methods Enzymol. 471: 101-109 (2010). (査読有)

14: Ono, N., *Yamashino, T., Mizuno, T. (7/7) Genomewide characterization of the light-responsive and clock-controlled output pathways in *Lotus japonicus*. Plant Cell Physiol. 51: 1800-1814 (2010). (査読有)

15: *Pokhiko, H., Hodge, S. Mizuno, T. (6/7) Data assimilation constrain connections and components in a complex, eukaryotic circadian clock model. **Mol. Syst. Biol.** 6: 416 (2010). (査読有)

16: Kunihiro, A., *Yamashino, T., Mizuno, T. (3/3) PIF4 is implicated in the regulation of hypocotyl elongation in response to blue light in *A. thaliana*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74: 2538-2541 (2010). (査読有)

17: Ishida K., *Yamashino, T., Mizuno, T. (4/4) Classification of the genes involved in the two-component system of the moss *Physcomitrella patens*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74: 2542-2545 (2010). (査読有)

18: Ito, S., *Yamashino, T., Mizuno, T. (6/6) A genetic study of the *Arabidopsis* circadian clock with reference to the *TOC1* gene. Plant Cell Physiol. 50: 290-303 (2009). (査読有)

19: *Nakamichi, N., Kusano, M., Mizuno, T. (9/9) 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. 50: 447-462 (2009). (査読有)

20: Niwa, Y., *Yamashino, T., Mizuno, T. (3/3) Circadian clock regulates photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in *A. thaliana*. Plant Cell Physiol. 50: 838-854 (2009). (査読有)

21: *Fukushima, A., Mizuno, T. (7/8) Impact of clock-associated *Arabidopsis* pseudo-response regulators in metabolic coordination. Proc. Natl. Acad. Sci. 106:

7251-7256 (2009). (査読有)

22: *Hagiwara, D., Mizuno, T. (2/3) C characterization of NikA histidine kinase and two response regulators with special reference to osmotic adaptation and asexual development in *Aspergillus nidulans*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73: 1566-1571-2696 (2009). (査読有)

23: *Nakamichi, N., Mizuno, T. (5/6) Linkage between circadian clock and tricarboxylic acid cycle in Arabidopsis. Plant Signal Behav. 4: 660-662 (2009). (査読有)

24: *Hagiwara, D., Mizuno, T. (5/6) Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HOGA MAPK signaling pathway in response to fluodioxonil and osmotic stress. Fungal Gen. Biol. 46: 868-878 (2009). (査読有)

25: Ishida, K., *Yamashino, T., Mizuno, T. (4/4) A genome-wide compilation of the two-component systems in *Lotus japonicus*. DNA Res. 16: 237-247 (2009). (査読有)

26: *Khanna, R., Mizuno, T. (8/9) The *Arabidopsis* B-box zinc finger family. Plant Cell 21: 3416-3420 (2009). (査読有)

27: Higuchi, M., Kakimoto, T., Mizuno, T. (3/3) Cytokinin sensing systems using microorganisms. Methods Mol. Biol. 495: 101-109 (2009). (査読有)

[学会発表] (計15件)
紙面の都合上、詳細は省略した。

[図書] (計10件)

1. 水野 猛 (分担): 植物ゲノム科学辞典 (朝倉書店) (2009).
2. 水野 猛 (分担): 生物学事典 (東京化学同人) (2010).
3. 水野 猛 (分担): 生物学事典 (第5版) (岩波書店) (2013).
4. 山篠貴史 水野 猛: 植物の成長を制御するサイトカイニン情報伝達機構 「化学と生物」 47: 312-322 (2009).
5. 水野 猛 山篠貴史: A Stressful Episode in Plant Biology 「化学と生物」 47: 312-322 (2009).
6. 水野 猛 山篠貴史: 植物の概日時計分子機構「光周性の分子生物学」(シュブ

リンガージャパン) (2009).

7. 山篠貴史 水野 猛: 植物の時計「植物のシグナル伝達」(共立出版) (2010).
8. 水野 猛: 二成分制御系研究を振り返って(前編: 組換え DNA 時代) 「化学と生物」 49: 426-430 (2011).
9. 水野 猛: 二成分制御系研究を振り返って(後編: ゲノム時代) 「化学と生物」 49: 485-489 (2011).
10. 水野 猛 (分担): 図説分子病態学 (5版) (中外医学社) (2013).

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~microbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 猛 (MIZUNO TAKESHI)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号: 10174038

