

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24年 6月 5日現在

機関番号：13901
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21570005
 研究課題名（和文）
 二種のモデル基部植物を用いた植物概日システムの起源解明
 研究課題名（英文）
 Study of the Origins of the Plant Circadian Clocks by Using Two Basal Land Plants as Model Species.
 研究代表者
 青木 撰之（SETSUYUKI AOKI）
 名古屋大学・情報科学研究科・准教授
 研究者番号：30283469

研究成果の概要（和文）：

植物の生物時計は、光合成などの重要な生理過程のタイミングを制御している。植物の時計機構は、モデル種のシロイヌナズナにおいて精力的に調べられてきたが、ほかの多様な種での仕組みが未解明であったため、その多様性は全くの謎であった。我々は、シロイヌナズナとは進化的に大きく隔たるコケ植物を用いて時計機構を調べることにより、植物の時計は、植物の進化に伴い、基本的なコア機構を維持する一方で、それぞれの系統に独特なサブ機構を進化させてきたことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The biological clock in plants controls important processes such as photosynthesis on a daily basis. Although its mechanism has been extensively studied in the model dicot *Arabidopsis*, the diversity of the plant clocks has been a complete mystery because the clock mechanisms in other species have not been elucidated. We have shown, by studying the clocks in bryophytes, basal group of plants, that the plant clocks have evolved subsidiary mechanisms specific to each group while they share the basic core machinery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：進化遺伝・生物時計

1. 研究開始当初の背景

生物時計は約1日周期の自律的な振動機構であり、地球の自転に由来する24時間周期の環境サイクルに対する適応機構として進化した。広範な生物種において、実に多様な生理現象がこの生物時計に制御され、その結果、様々な生物リズムとして観察されることとなる。植物においても生物時計は、花卉や葉の運動から光合成、さらには遺伝子発現に

至るまで多くの重要な過程を制御する適応機構として働いている。生物時計の発振とその制御の仕組みについては、高等植物のモデルであるシロイヌナズナで研究が進展し、主に遺伝学的な手法により、時計の部品蛋白質をコードすると考えられる一群の「時計遺伝子」が分離された。そして、それら時計遺伝子の間で織りなされる制御のネットワークが生物時計の中心機構であり、ネットワーク

の動的な振る舞いとして1日の振動が生じる、という仮説が提唱されている。しかしながら、シロイヌナズナが属する被子植物以外の多様な植物種においては、遺伝子レベルでの研究がほとんど行われていなかったため、植物の時計の多様性、進化、そして起源についてはほぼ完全な謎であった。こうした状況で、シロイヌナズナとは系統的に大きく隔たる、いわゆる「基部植物」に属するヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*= 蘚類の一種) とゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*= 苔類の一種) が、分子遺伝学における有効な実験植物として精力的に開発・確立され、ゲノム/ポストゲノム時代の新たなモデル植物として注目されていた。

2. 研究の目的

本研究においては、1) 基部陸上植物に属し、2) 4億年以上前に分岐し互いに系統的に大きく隔たり、3) 遺伝子の機能解析に非常に適する二つの植物、ヒメツリガネゴケとゼニゴケを用い、おもに逆遺伝学とゲノム科学に基づく種々の手法を活用して、時計機構の枠組みを明らかにし、さらにその成果を互いに、また被子植物や緑藻の知見と体系的に比較し、植物の時計の多様性、進化、起源、さらには動物を始めとする他の大分類群の時計機構との関係に肉薄することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒメツリガネゴケを用いた解析

① ルシフェラーゼレポーター株の作出

シロイヌナズナにおける主要な時計遺伝子と考えられる *CCA1/LHY* ホモログと *TOC1/PRR* ホモログについて、それらのプロモーターとホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結し、レポーター株の作出を試みた。

② 遺伝子破壊による時計遺伝子の機能解析

①の結果得られた *PpCCA1b* レポーター株を宿主として用いて、相同組換えにより時計遺伝子ホモログの遺伝子破壊株を作出し、コケの時計遺伝子ホモログ群の網羅的な機能解析を試みた。

③ 生物時計の生理学的解析

ヒメツリガネゴケの多様な遺伝子について、明暗サイクル条件と連続暗条件でその発現が生物リズムを示す一方で、連続明条件においてはアリズミック (= 無周期) となる。これは、多くの場合3つのどの条件においても生物リズムがみられる被子植物とは対照的である。この現象について、光生理学的・時間生物学的な解析を行った。

④ 生物時計の生理的意義の調査

野生型のコケ株と *PpCCA1a* と *PpCCA1b* 両遺伝子を破壊した二重遺伝子破壊株との間で、原糸体コロニーの成長速度と *PpCCA1b* 遺伝子

の発現リズムをそれぞれ比較することにより、ヒメツリガネゴケにおける生物時計の生理的意義を調べた。

⑤ PRR ホモログのリン酸転移能の検証

被子植物の PRR 蛋白質は、重要な細胞内シグナル伝達であるリン酸転移応答においてリン酸を受容するレシーバードメインに似た配列を持つが、典型的なレスポンスレギュレーター (RR) とは異なり、リン酸を直接受け取るアスパラギン酸残基を持たず、また実際に試験管内でリン酸転移能を示さない。一方でコケの PRR ホモログはリン酸を受け取るアスパラギン酸残基を保持し、典型的な RR 型の配列を示す。このように特徴的な配列を持つコケの PRR ホモログについて、試験管内でのリン酸転移アッセイを行い、その結果に基づいてシロイヌナズナ PRR との機能分化の可能性を検証した。またリン酸転移能決失型 (被子植物型) とリン酸転移型 (コケ型) それぞれの PRR 配列の植物における系統的分布を調べた。

(2) ゼニゴケを用いた解析 (連携研究者の河内教授らによる)

① ゼニゴケの時計遺伝子ホモログ探索

連携研究者らにより明らかになったゼニゴケのドラフトゲノム配列について、時計遺伝子ホモログの網羅的な探索を行った。

② ゼニゴケの TOC1 オルソログ遺伝子の分離

ゼニゴケ PAC ライブラリのスクリーニングにより、TOC1 のオルソログ遺伝子 *MpTOC1* の分離を行い、その塩基配列を決定した。

4. 研究成果

本研究により次の成果が得られた。

(1) 植物時計遺伝子のネットワーク構造の進化的推移について

全ゲノム上の遺伝子構成でみた場合、ヒメツリガネゴケはシロイヌナズナの時計機構モデルの一部分のみを保持すると考えられる。すなわちヒメツリガネゴケは、現行のシロイヌナズナの時計遺伝子ネットワークモデルの中で、「朝」ループ (*CCA1/LHY* と *PRR7/PRR9* からなる; 非常に最近、これに *PCL1/ELF3/ELF4* が重要なノードとして加わることが明らかになってきている) の構成要素のホモログ遺伝子を持つ一方で、時計機能のうえでの重要因子と考えられていた「夕方」ループの *TOC1*、*ZTL*、*GI* のホモログ遺伝子を持たない。さらに *PpCCA1a/PpCCA1b* の遺伝子破壊などの逆遺伝学的手法による機能解析によって、コケは *CCA1/LHY-PRR7/PRR9* 間の制御ループをシロイヌナズナと同様に持つことが分かった。これらの結果から、植物の進化と多様化に伴い、生物時計は、恐らくは *CCA1/LHY*、*PCL1*、*ELF3*、*ELF4*、*PRR7/PRR9* のホモログからなるコアループを振動の中心機構として維持してきたと考えられた。一

方でゼニゴケは、ヒメツリガネゴケが持たない被子植物の時計遺伝子 *TOC1*、*ZTL*、*GI* のホモログ遺伝子を持つ。従って植物の時計の進化には、「原始的で単純な蘚苔類の時計→高等で複雑な被子植物の時計」という分かりやすい図式は当てはまらず、基部植物のレベルでも複雑な進化の道筋があり、恐らくは、進化的なコア回路とは別に、それぞれの分類群に固有なサブ回路が存在することが示唆された。

(2) ヒメツリガネゴケの生物時計の生理的特徴について

ヒメツリガネゴケのリズム発現遺伝子が連続明条件でアリズミックな発現を示すのは、出力系の異常によるいわゆる「マスキング効果」によるものではなく、時計の振動自体が停止しているか、あるいは入力系に異常があるか、どちらかが原因であると考えられた。すなわち、時計の運行/制御の観点からは、より重要な過程における問題であるといえる。また原糸体コロニーの成長を解析することにより、生物時計が長日条件において成長を抑制することが明らかとなった。これらの結果から、ヒメツリガネゴケの時計は、シロイヌナズナの場合と同様に日長特異的に成長を制御する重要な生理的役割を持つ一方で、連続明条件でその中心的な機能が働かなくなることによりアリズミックとなることがわかった。

(3) ヒメツリガネゴケの PRR ホモログ (PpPRR) の少なくとも一部は、高等植物 PRR と異なり、試験管内でリン酸転移反応を行うことが分かった。すなわち、コケの PRR はシュード (Pseudo=偽) レスポンスレギュレーターではなく、典型的なレスポンスレギュレーターとして働く。このことから、PpPRR はパートナーのヒスチジンキナーゼからのリン酸転移により、時計の制御に関わる何らかのシグナルを伝達すると考えられた。

これらの成果により、植物の生物時計は、「朝」ループからなる進化的コア回路を保持し、またこれと並行してそれぞれの系統群において独特なサブ機構を進化させてきたと考えられた。この考えは、ヒメツリガネゴケの時計が成長制御機能というシロイヌナズナの時計と共通する生理的役割を持つ一方で、連続明条件で停止する点で対照的な性質も持っている、という結果とも合致する。植物は、振動発生という重要な基本機構を維持する一方で、それぞれの種に特有な生活環境に応じて、時計の制御機能を変化させてきたのかもしれない。ヒメツリガネゴケの PRR ホモログは、被子植物の PRR とは異なりリン酸転移能を持つと考えられるが、リン酸転移によりどのようなシグナルを伝達するのかはまだわからない。しかし、植物界でのコケ型 PRR 配列の系統的分布は、特定の光受

容ドメインを持つヒスチジンキナーゼ配列の分布と完全に一致する (連携研究者の山篠博士による)。このことから、コケ PRR は光入力においてなんらかの働きを持つと推測できる。この点は、今後の研究の展開にとって重要な知見となると考えられる。

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 4 件)

- ① "Heterologous expression and functional characterization of a *Physcomitrella* Pseudo Response Regulator homolog, PpPRR2, in *Arabidopsis*" Santosh B. Satbhai, Takafumi Yamashino, Takeshi Mizuno and Setsuyuki Aoki. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (2011) 75(4):786-789. (査読あり)
- ② "Pseudo-Response Regulator (PRR) homologues of the moss *Physcomitrella patens*: Insights into the evolution of the PRR Family in land plants" Santosh B. Satbhai, Takafumi Yamashino, Ryo Okada, Yuji Nomoto, Takeshi Mizuno, Yuki Tezuka, Tomonori Itoh, Mitsuru Tomita, Susumu Otsuki and Setsuyuki Aoki. *DNA Research* (2011) 18(1):39-52. (査読あり)
- ③ "Photoperiod-dependent regulation of cell growth by *PpCCA1a* and *PpCCA1b* genes encoding single-myb clock proteins in the moss *Physcomitrella patens*" Ryo Okada, Santosh B. Satbhai and Setsuyuki Aoki. *Genes and Genetic Systems* (2009) 84(5):379-384. (査読あり)
- ④ "Functional characterization of *CCA1/LHY* homolog genes, *PpCCA1a* and *PpCCA1b*, in the moss *Physcomitrella patens*" Ryo Okada, Sayo Kondo, Santosh B. Satbhai, Nobutoshi Yamaguchi, Masashi Tsukuda and Setsuyuki Aoki. *Plant Journal* (2009) 60(3):551-563. (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Setsuyuki Aoki, Santosh B. Satbhai, Kazuhiro Ichikawa, Ryo Okada "The circadian clock of the basal land plant *Physcomitrella patens*" AOCF 2011 (5th Asia and Oceania Conference for Photobiology), July 30- August 1, 2011, Nara Prefectural New Public Hall, Nara

- ② サントーシュ・B・サトバハイ、山篠貴史、岡田龍、水野猛、伊藤裕紀、中川繭、青木撰之「ヒメツリガネゴケの概日時計関連遺伝子の解析」日本遺伝学会第82回大会、2010年9月20日～23日、札幌、北海道大学高等教育機能開発総合センター
- ③ Santosh B. Satbhai、山篠貴史、岡田龍、水野猛、富田充、青木撰之「ヒメツリガネゴケにおける *Pseudo-Response Regulator* ホモログ遺伝子群の解析」日本植物学会第74回大会、2010年9月9日～11日、春日井市、中部大学
- ④ Santosh B. Satbhai、Takafumi Yamashino、Ryo Okada, Takeshi Mizuno, Mitsuru Tomita, Setsuyuki Aoki "Circadian Regulated Response Regulators (CRRs) of Moss *Physcomitrella patens* and Evolution of Pseudo Response Regulators (PRRs) among Green Plants" (Selected talk and poster) Plant Biology 2010 (Joint Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists & the Canadian Society of Plant Physiologists), July 31-August 4, 2010, Montreal, Quebec, Canada
- ⑤ Santosh B. Satbhai、Takafumi Yamashino、Ryo Okada, Yuki Tezuka, Tomonori Ito, Takeshi Mizuno and Setsuyuki Aoki "Circadian Response Regulators (CRRs) of Moss *Physcomitrella patens* : Evolution of Pseudo Response Regulators (PRRs) in land plants" The 13th Annual MOSS International Conference, July 21-24, 2010, Lake Shikotsu Resort & Hokkaido University, Japan
- ⑥ Setsuyuki Aoki, Santosh B. Satbhai, Takafumi Yamashino, Ryo Okada, Takeshi Mizuno, Kazuhiro Ichikawa. "*PpCCA1a/PpCCA1b* and *PpCRR* genes as circadian clock-associated genes in the moss *Physcomitrella patens*" The 13th Annual MOSS International Conference, July 21-24, 2010, Lake Shikotsu Resort & Hokkaido University, Japan

⑦ 岡田龍、Santosh B. Satbhai、近藤沙代、山口暢俊、青木撰之「ヒメツリガネゴケの *CCA1/LHY* ホモログ遺伝子、*PpCCA1a* と *PpCCA1b* の解析」日本遺伝学会第81回大会、2009年9月16-18日、信州大学理学部、松本

⑧ Santosh B. Satbhai、岡田龍、手塚裕紀、笹野佑介、伊藤智則、青木撰之「ヒメツリガネゴケの PRR (Pseudo-Response Regulator) ホモログ遺伝子の解析」日本遺伝学会第81回大会、2009年9月16-18日、信州大学理学部、松本

[その他]
ホームページ等
<http://www.info.human.nagoya-u.ac.jp/~aoki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 撰之 (SETSUYUKI AOKI)
名古屋大学・大学院情報科学研究科・准教授
研究者番号：30283469

(3) 連携研究者

河内孝之 (TAKAYUKI KOCHI)
京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：40202056
小山時隆 (TOKITAKA OYAMA)
京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：30324396
山篠貴史 (TAKASHI YAMASHINO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号：00314005