

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780092

研究課題名(和文)

植物時計システムによる個体統御機構の解析

研究課題名(英文)

Study on Circadian Clock-Dependent Control of Growth and Development in Plants

研究代表者：

山篠 貴史 (YAMASHINO TAKAFUMI)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：00314005

研究成果の概要(和文)：一日周期の生物リズムの生成や光周期(日長)に対する応答は概日時計機構によって支えられていることが知られている。植物は動物とは異なる振動体タンパク質から構成される概日時計機構を保持していることが明らかとなってきた。本研究ではモデル植物シロイヌナズナに存在する植物に特異的なレスポンスレギュレーター様タンパク質(疑似レスポンスレギュレーター-PRR)ファミリーが概日時計の中心振動体として機能し、植物の生長と分化を支えていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The plant circadian clock generates rhythms with a period close to 24 h, and it controls a wide range of physiological and developmental oscillations in habitats under natural light/dark cycles. In this study, we clarified that the Pseudo Response Regulator (PRR) family represent elements necessary for the circadian clock to entrain properly to local time in response to light/dark and hot/cold cycles in natural habitats and is involved in the control of photoperiodic response of plant growth as well as flowering.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：概日時計、環境応答、光情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、植物における His-Asp リン酸リレー情報伝達系の全体像を把握するために、全ゲノムが解読されたシロイヌナズナのゲノム情報をもとにして、ヒスチジンキナーゼ、Hpt 因子、レスポンスレギュレーター(RR)をコードしている遺伝子を網羅的に検索した。その結果、バクテリアや真菌類には見受けられない新規のドメイン構造をもっている RR ファミリーの存在に気付いた。RR はヒスチジンキナーゼまたは Hpt 因子の一

次配列中に特徴的に保存されているヒスチジン残基に結合したリン酸基を受容することのできるレシーバードメインを有している。通常、レシーバードメイン内に保存されたアスパラギン酸残基がヒスチジンキナーゼからのリン酸基転移に与ることが His-Asp リン酸リレー系の基本様式として知られているが、上記のファミリーに属するレシーバードメインにはリン酸リレーに必須の役割を果たすアスパラギン酸残基が存在せず、グルタミン酸残基に置換されていた。そこで、

研究代表者らはこのドメインをもつ制御分子のファミリーを **PRR** と名付けて、通常の **RR** と区別することにした。N 末端側に存在する **PRR** ドメインに加えて、このファミリーのメンバーは共通して C 末端側に約 50 アミノ酸残基からなる保存性の高いドメインを有している。興味深いことに、この保存配列は光周性花成を制御する主要因子である **CO** の一次配列中にも保存されていることが知られており、**CCT** ドメインと名付けられている。これらの特徴をもった **PRR** 制御分子はシロイヌナズナの中に 5 種 (**PRR9**, **PRR7**, **PRR5**, **PRR3**, **PRR1**) 存在している。その mRNA 発現量はいずれもリズムを刻んでおり、**PRR9**→**PRR7**→**PRR5**→**PRR3**→**PRR1** の順序で明期の開始から終わりにかけてピークを示しながら発現していることが判明した。さらに、**PRR1** は当時植物時計の転写翻訳フィードバックループ機構を支える **TOC1** と同一であることが明らかとなり、**PRR** ファミリーは概日時計として機能していることが推定された。

## 2. 研究の目的

外環境と密接な関係をもって生長分化を統御していく上で、特に、日周期（1 日における光 [温度] 環境の明暗 [寒暖] サイクル）と光周期（1 年における日長変化のサイクル）の情報を処理する概日時計システムは、植物にとって最も基本的な生体機能の 1 つであることが知られている。これまでの解析により、植物は、動物、カビ、シアノバクテリアのいずれとも異なる植物固有の時計関連因子群から構成される概日時計機構を保持していることが明らかになってきた。このような背景を踏まえ、本研究では植物の概日時計システムと、それを基盤とする植物個体統御（光形態形成や光周性花成の制御機構）の分子機構に関する知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) **PRR** 多重変異体の作製・解析

シロイヌナズナの **PRR1/TOC1** を含む 5 種類の疑似レスポンスレギュレーター (**PRR**) ファミリーは申請者らにより独自に取得・解析された時計関連因子である。現在、各因子は高等植物における概日時計中心振動体としての機能を有していると考えられるようになってきた。また、時計関連分子の多くは核局在性タンパク質であり、それらの分子ダイナミズムが、概日時計システムの振動・発信機構の本質であると考えられている。そこで、**PRR** 因子群を含む時計因子複合体の動態を明らかにするために、*prp9*, *prp7*, *prp5*, *prp1* に

関して、単一、二重、三重、四重変異体を作製し、時間に関する種々の量的形質の比較解析を行う。

### (2) 個体統御を支える時計機能の解析

概日時計からの出力シグナルは、個体の体構築に関わる様々な生理応答に重要な役割を果たすことが知られている。しかし、時計振動体によって生成されるリズムが如何に伝達され、細胞・組織・器官レベルでの応答系を制御しているかに関しては不明な点が多い。そこで、時計系からのシグナルを伝達・仲介する制御分子を検索するために、**PRR** とともに働く因子を同定して解析する。我々は、**bHLH** 型の転写因子 **PIF4**, **PIF5** が概日リズムをもって発現していること、**phyB** に依存した光情報伝達経路を介して細胞の伸張制御に関わっていることを見いだした。これを手掛かりに、**PIF4**, **PIF5** が時計系の出力経路とどのようにリンクしているかを明らかにする。

(3) 概日時計機構の進化と多様性に関する研究：植物固有の概日時計関連因子である疑似レスポンスレギュレーター (**PRR**) は緑藻、コケ、シダから高等植物に至るまで広く保存されている。高等植物には **PRR** ファミリーに属するタンパク質が分子系統的に **PRR1/TOC1** 型、**PRR7/PRR3** 型、**PRR9/PRR5** 型の 3 つのクレードに分類できることが知られている。ところが、シダに近いイヌカタヒバには **PRR9/PRR5** 型の因子が見いだされていない。また、ヒメツリガネゴケには **PRR7/PRR3** 型の因子しか存在しない。さらに、興味深いことに、コケ、シダの **PRR** ファミリー因子にはセンサーキナーゼからのリン酸基転移を受けられることのできるレシーバードメインを保持しているものが存在する。そこで、時計機構の必須要素を明らかにするために、また、**PRR** タンパク質の機能を理解する手掛かりを得るために、高等植物とそれよりも前に系統分岐したと考えられる植物の **PRR** ファミリー因子の比較機能解析を行う。

(4) 概日時計による植物個体統御の多様性に関する研究：マメ科植物ミヤコグサにおいてもモデル植物シロイヌナズナ同様、概日時計により光形態形成や花成が制御されると推定されるが、ミヤコグサにはシロイヌナズナでは観察できない以下に挙げる形態的・生理的特徴を持つ。例えば、栄養成長器官に分化する腋芽の伸張制御が観察されることや、多年性としての性質をもつことなどである。そこで、概日時計が支配する個体統御と密接に関連がある光形態形成または花成制御をミヤコグサの **PIF** ファミリー遺伝子や **FT** 遺伝子に注目し、その発現や機能を解

析する。

#### 4. 研究成果

(1) *PRR*多重変異体の作製・解析：シロイヌナズナの*PRR1/TOC1*を含む5種類の疑似レスポンスレギュレーター (*PRR*) ファミリーは申請者らにより独自に同定された時計関連因子である。今回、*prp9*, *prp7*, *prp5*, *prp1* に関して、単一、二重、三重、四重変異体を作製し、時間に関する種々の量的形質の比較解析を行った。その結果、*PRR9*, *PRR7*, *PRR5*は *CCA1*の負の制御因子として機能していること、*prp9*, *prp7*, *prp5*, *prp1*四重変異体では、概日リズムが消失することが明らかとなった。四重変異体における概日リズムの消失は環境サイクル (明暗サイクル・温度サイクル) 下においても消失していた。即ち、我々は始めて概日リズムをもたない植物変異体を分離することに成功した。また、これらの結果から *PRR9* *PRR7* *PRR5*は概日リズムの生成に必須の時計因子として機能していることが明らかとなった。

(2) 個体統御を支える時計機能の解析：植物の細胞伸張にはフィトクロムに依存した光情報伝達系がかかわっていることが知られている。フィトクロムと相互作用するbHLH型転写因子 *PIF4*, *PIF5*の発現は明期にピークをもつ概日リズムを示すことを明らかにした。さらに、長日条件では胚軸の細胞伸張は強く抑制されているが、短日条件ではその抑制が解除されており、そのときの胚軸伸張は *PIF4*, *PIF5*に大きく依存していることを見いだした。種々の日長条件で各種概日時計変異体を用いて *PIF4*, *PIF5*の概日リズムを解析したところ、暗期に *PIF4*, *PIF5*が発現することが、胚軸伸張に必要であることが明らかになった。*PIF5*タンパク質は青色光下では安定だが、赤色光下では速やかに分解されることを他の研究グループの報告を踏まえて確認した。以上の結果から、概日時計は *PIF4*, *PIF5*の概日リズムを制御することで胚軸伸張制御に関わることが示唆された。

(3) 概日時計の分子機構に関する研究：植物固有の概日時計関連因子である疑似レスポンスレギュレーター (*PRR*) は緑藻、コケ、シダから高等植物に至るまで広く保存されている。コケ、シダの *PRR*ファミリー因子にはセンサーキナーゼからのリン酸基転移を受けることのできるレシーバードメインを保持しているものが存在する。本研究では、

コケの *PRR*ホモログタンパク質と大腸菌のヒスチジンキナーゼ *ArcB*を過剰発現した内膜画分を精製し、*in vitro*で *ArcB*から *PRR*へのリン酸転移反応がおきることを示した。ヒメツリガネゴケに存在する4種の *PRR*ホモログの mRNA発現は連続暗条件においても自由継続リズムをもつことを明らかにした。ヒメツリガネゴケの *PRR*をシロイヌナズナに導入し概日リズムや光形態形成、花成に関する表現型解析を行い、ヒメツリガネゴケにおいて高等植物の *PRR*の機能が保存されていることを示唆する結果を得た。

(4) 概日時計による植物個体統御に関する研究：マメ科植物ミヤコグサにおいてもモデル植物シロイヌナズナ同様、概日時計により光形態形成や花成が制御されていると推定されるが、シロイヌナズナとは異なり栄養成長器官に分化する腋芽の伸張制御が観察されることや、多年性としての性質をもつ。本研究ではミヤコグサのゲノムデータベースを検索し、FTのオーソログを推定した。これをコードする遺伝子をシロイヌナズナに導入した植物体は花成が促進されることを示した。また、ミヤコグサゲノムの解析から、シロイヌナズナにおいて長日条件特異的に FT 遺伝子が発現するための制御因子として知られている CO タンパク質のオーソログがミヤコグサには存在しない可能性があることを見いだした。シロイヌナズナの日長にตอบสนองした光形態形成に重要な役割を果たすことが知られている *PIF4/PIF5*のオーソログをミヤコグサゲノムから見だし、この遺伝子発現が概日時計の支配下にあり明瞭なリズムをもつことを示した。

#### 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9件)

① Satbhai SB, Yamashino T, Okada R, Nomoto Y, Mizuno T, Tezuka Y, Itoh T, Tomita M, Otsuki S, Aoki S. Pseudo-Response Regulator (*PRR*) Homologues of the Moss *Physcomitrella patens*: Insights into the Evolution of the *PRR* Family in Land Plants. *DNA Res.* 査読有 18: 39-52 (2011)

② Ishida K, Yamashino T, Nakanishi H, Mizuno T. Classification of the genes involved in the two-component system of the moss *Physcomitrella patens*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 査読有 74: 2542-2545 (2010)

- ③ Kunihiro A, Yamashino T, Mizuno T. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS PIF4 and PIF5 are implicated in the regulation of hypocotyl elongation in response to blue light in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 査読有 74: 2538-2541 (2010)
- ④ Mizuno T, Yamashino T. Biochemical characterization of plant hormone cytokinin-receptor histidine kinases using microorganisms. *Methods Enzymol*. 査読無 471: 335-356 (2010)
- ⑤ Ono N, Ishida K, Yamashino T, Nakanishi H, Sato S, Tabata S, Mizuno T. Genomewide characterization of the light-responsive and clock-controlled output pathways in *Lotus japonicus* with special emphasis of its uniqueness. *Plant Cell Physiol*. 査読有 51: 1800-1814 (2010)
- ⑥ 水野 猛、山篠貴史、A stressful episode in plant biology: Are you a real ABA receptor?-Give me a break、*化学と生物*、査読無、47: 446-449 (2009)
- ⑦ 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*、査読無、47: 312-322 (2009)
- ⑧ Ishida K, Niwa Y, Yamashino T, Mizuno T A genome-wide compilation of the two-component systems in *Lotus japonicus*. *DNA Res*. 査読有 16: 237-247 (2009)
- ⑨ Niwa Y, Yamashino T, Mizuno T. The circadian clock regulates the photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 査読有 50: 838-854 (2009)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 山脇 沙織、山篠 貴史、水野 猛、ヒネ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、第 52 回日本植物生理学会年会 (仙台) 2011 年 3 月
- ② 山篠 貴史、国広 篤史、中西 華代、水野 猛、bHLH 型転写因子 PIF4/PIF5 は短日条件特異的に ATHB2 遺伝子の転写を誘導しシロイヌナズナの光周期依存的胚軸伸張制御を支えている、第 52 回日本植物生理学会年会 (仙台) 2011 年 3 月
- ③ 中西 華代、堀 菜七子、山篠 貴史、水野 猛、ミヤコグサにおける避陰反応と腋芽分制御、第 52 回日本植物生理学会年会 (仙台) 2011 年 3 月
- ④ 石田 快、山篠 貴史、水野 猛、ミヤコグサにおける二成分制御系と根粒形成機構、第 52 回日本植物生理学会年会 (仙台) 2011 年 3 月
- ⑤ 石田 快、小野 奈津子、山篠 貴史、水

- 野 猛、Informatics of plant two-component systems (TCS): (II) Diversification of TCS in the legume *Lotus japonicus*、第 33 回日本分子生物学会年会 (神戸) 2010 年 12 月
- ⑥ 山脇 沙織、石田 快、山篠 貴史、水野 猛、A genome-wide informatics of plant two-component systems (TCS): (I) Evolution of TCS in the primitive land plant *Physcomitrella patens*、第 33 回日本分子生物学会年会 (神戸) 2010 年 12 月
- ⑦ Satbhai, Santosh B., Yamashino, Takafumi, Okada, Ryo, Mizuno, Takeshi, Mitsuru, Tomita, Aoki, Setsuyuki. Circadian Regulated Response Regulators (CRRs) of Moss *Physcomitrella patens* and Evolution of Pseudo Response Regulators (PRRs) among Green Plants. *ASPB Plant Biology (Montreal)* 2010 年 8 月
- ⑧ 山篠貴史、山脇沙織、Santosh Satbhai、青木撰之、水野 猛、ヒメツリガネゴケ二成分情報伝達系遺伝子群のゲノムワイド俯瞰と解析、第 51 回 日本植物生理学会大会 (熊本)、2010 年 3 月
- ⑨ 国広篤史、山篠貴史、水野 猛、シロイヌナズナにおける PIF4/5 依存性光形態形成の分子機構: Web 検索を用いた新しいアプローチの試み、第 51 回 日本植物生理学会大会 (熊本)、2010 年 3 月
- ⑩ 石田 快、小野奈津子、山篠貴史、水野 猛、ミヤコグサ二成分情報伝達系のゲノムワイド俯瞰と解析、第 51 回 日本植物生理学会大会 (熊本)、2010 年 3 月
- ⑪ 小野奈津子、石田 快、山篠貴史、水野 猛、ミヤコグサの光形態形成及び花成制御遺伝子群のゲノムワイド俯瞰と解析、第 51 回日本植物生理学会大会 (熊本)、2010 年 3 月
- ⑫ 国広篤史、丹羽悠介、山篠貴史、水野 猛、Web-Query Aided in silico identification of ATHB2 as a Downstream Regulator of the Circadian Clock-Associated and Phytochrome-Interacting Factor PIF4-Mediated Signaling Pathway in *Arabidopsis thaliana*、第 32 回 日本分子生物学会 (横浜) 2009 年 12 月
- ⑬ 石田 快、丹羽悠介、小野奈津子、山篠貴史、水野 猛、Genome-Wide Compilation and Characterization of the Two-Component Signaling System-Associated Genes in the Model Legume *Lotus japonicus*、第 32 回 日本分子生物学会 (横浜) 2009 年 12 月
- ⑭ 山篠貴史、高等植物における二成分制御系関連分子の体系的解析、日本農芸化学会中部支部第 155 回例会 (静岡)、2009 年 7 月
- ⑮ 山篠貴史・水野 猛、モデル高等植物シロイヌナズナの概日時計機構の解析、第 82 回日本生化学会 (神戸)、2009 年 9 月

[図書] (計 2 件)

- ① 山篠貴史、水野猛、植物の時計、植物のシグナル伝達 分子と応答 共立出版 69-76 (2010)
- ② 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、シュプリンガー・ジャパン 15-26 (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○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]  
ホームページ等  
<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~microbio/entrance.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山篠 貴史 (YAMASHINO TAKAFUMI)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号：00314005

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし