

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770042

研究課題名(和文)概日時計の周期安定性を内包する分子の解析

研究課題名(英文)Analysis for proteins related to temperature-compensation of plant clock

研究代表者

中道 範人(Nakamichi, Norihito)

名古屋大学・WPI(理)・准教授

研究者番号：90513440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：植物(シロイヌナズナ)の概日時計の周期長は幅広い温度条件で、ほぼ24時間と一定である(時計の周期の温度補償性)。ある遺伝子の変異体では、低温条件では24時間周期の概日リズムを示すが、高温条件では周期長が非常に長くなる。この変異の原因遺伝子は、転写因子をコードしていた。そこでこの転写因子の細胞内でのターゲットDNAへの結合をChIP-qPCR法で解析した。この転写因子は低温条件よりも高温条件下でターゲットDNAへの結合が強くなっていた。このことはこの転写因子のDNA結合活性には、温度補償性がないことが分かった。さらに転写因子のターゲット遺伝子を含めた包括的な解析により、温度補償性の理解へ迫る。

研究成果の概要(英文)：Period length of circadian rhythm is about 24 hours under physiological temperature conditions. This property is called as Temperature compensation of circadian period. To understand this phenomenon in plant (*Arabidopsis thaliana*), we took genetic approach, and found genes related to temperature compensation. Mutants lacking genes showed 24 hour length period in low temperature, but very long period in high temperature. The genes encode transcription factors. We performed the ChIP-qPCR analysis to examine whether temperature changes alter the association between the transcription factors and target DNA. As a result, temperature changes altered association pattern of the transcription factors and target DNA, indicating that the transcription factors is temperature-sensitive. Further examination including target DNA of the transcription factors is needed to understand temperature compensation mechanism.

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：植物 蛋白質 概日時計 環境応答

1. 研究開始当初の背景

植物の概日時計は、多様な生理現象の周期的な発現を生み出す仕組みで、結果として個体の生存に有益な働きをもつ。概日時計は正確な時を刻む必要性があり、幅の広い条件下で約 24 時間の周期を保つ(概日周期の温度補償性)。この性質は、極めて驚異である。なぜなら細胞内の高次な生体反応や生化学反応は、ある程度の温度範囲において温度が上昇すると反応速度が増大すると理論的には考えられているからだ。つまり、温度が高くなれば周期長は短くなるとされる。しかし、実際には上述したように概日周期は常に一定である。近年の研究より、植物の概日時計を形成する遺伝子群が明らかとなってきた。明け方に発現ピークを迎える *CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 (CCA1)* と *LATE ELONGATE HYPOCOTYL (LHY)* 遺伝子、昼にピークを迎える *PSEUDO RESPONSE REGULATOR (PRR)* 遺伝子群、夕方から夜にピークを迎える *TIMING OF EXPRESSION 1 (TOC1)*, *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)*, *ELF4*, *LUXARRHYTHMO (LUX)*/*PHYTOCLOCK1 (PCL1)* 遺伝子の相互の転写抑制ループが、時計中心として考えられる。このことはこれら遺伝子の産物である転写因子が分子レベルでの温度補償性を生み出す可能性を示唆している。しかし実際に温度補償性についての分子レベルでの知見は、ほとんどない。

2. 研究の目的

申請者を含めた研究者らが現在までにまとめてきた概日時計の分子モデルを基礎として、シロイヌナズナの時計転写ループの中で温度補償性に関わる転写因子を見いだす。温度補償性を担う転写因子は、一つであるかもしれないし、複数存在するかもしれない。上記の実験は、申請者が作成してきた時計遺伝子の破壊株の網羅的なセットを適宜に利用する。次に温度補償性に関わる転写因子の性質(DNA 結合性と転写制御反応等)を植物体内で調べる。また転写因子に結合する蛋白質を取得することで、転写因子の調節機構を見いだす。これらの解析により、温度補償性を担う転写因子を決定し、またその転写因子がどのように温度補償性を発揮させているか、を明らかにする。

3. 研究の方法

ハイスループットなモニタリング機器で解析することで、時計転写ループの中で温度補償性に関わる転写因子を見いだす。次に温度補償性を担う時計転写因子の性質(DNA 結合性)を、クロマチン免疫沈降(Chromatin immunoprecipitation [ChIP])解析する。転写因子とターゲット DNA の結合に温度補償性がみられたのならば、この転写因子に結合しうる蛋白質を同定するこ

とで、転写因子の調節機構を調べる。上記の解析により、植物体内での概日時計の温度補償性の分子レベルの結論が期待される。

4. 研究成果

ハイスループットなモニタリング機器を用いて、シロイヌナズナの時計変異体の中に、温度補償性が異常になるもの 1 株を見いだした。特にこの変異体は、低温で周期が短く、高温で周期が長くなるという、興味深い形質を示した。

次にこの変異体の原因遺伝子のコードする転写因子に着目し、この転写因子とターゲット DNA の結合を ChIP 法により、様々な温度で解析した。その結果、この転写因子とターゲット DNA の結合は温度が高くなると結合が強くなっていた。したがって、この転写因子の性質には温度補償性は備わっていないと解釈した。しかし、この転写因子の変異体では温度補償性がなくなる。この結果を解釈すると、この転写因子そのものが温度補償性に関わるのではなく、この転写因子に制御されている因子に温度補償性に関わる性質があることが示唆された。今後は、その候補となる因子の同定および、その因子の生化学的な解析を進め、温度補償性の仕組みを理解していく。

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 8 件)

Norihito Nakamichi, Takatoshi Kiba, Mari Kamioka, Takamasa Suzuki, Takafumi Yamashino, Tetsuya Higashiyama, Hitoshi Sakakibara, Takeshi Mizuno. Transcriptional repressor PRR5 directly regulates clock-output pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol. 109(42):17123-17128, 2012.

Yuji Nomoto, Saori Kubozono, Takafumi Yamashino, Norihito Nakamichi, Takeshi Mizuno. Circadian clock- and PIF4-controlled plant growth: a coincidence mechanism directly integrates a hormone signaling network into the photoperiodic control of plant architectures in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol., vol. 53, 1950-1964, 2012.

Yuji Nomono, Saori Kunozone, Mari Miyachi, Takafumi Yamashino, Norihito Nakamichi, Takeshi Mizuno. A circadian clock- and PIF4-mediated double coincidence mechanism is implicated in the thermosensitive photoperiodic control of

plant architectures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, vol. 53, 1965-1973, 2012.

Hanayo Ueoka-Nakanishi, Takafumi Yamashino, Kai Ishida, Mari Kamioka, Norihito Nakamichi, Takeshi Mizuno. Molecular mechanisms of **circadian** rhythm in *Lotus japonicus* and **Arabidopsis thaliana** are sufficiently compatible to regulate heterologous core clock genes robustly. *Biosci Biotechnol Biochem.* vol. 76:2332-2334, 2012.

Takafumi Yamashino, Yuji Nomono, Severine Lorrain, Miki Miyachi, Shogo Ito, Norihito Nakamichi, Christian Fankhauser, Takeshi Mizuno. Verification at the protein level of the PIF4-mediated external coincidence model for the temperature-adaptive photoperiodic control of plant growth in **Arabidopsis thaliana**. *Plant Signal Behav.* Vol. 8:e23390. 2013.

Takafumi Yamashino, Saori Yamawaki, Emi Hagui, Hanayo Ueoka-Nakanishi, Norihito Nakamichi, Shogo Ito, Takeshi Mizuno. Clock-controlled and FLOWERING LOCUS T (FT)-dependent photoperiodic pathway in *Lotus japonicus* I: verification of the flowering-associated function of an FT homolog. *Biosci Biotechnol Biochem.*;77:747-753. 2013.

Takafumi Yamashino, Saori Yamawaki, Emi Hagui, Kai Ishida, Hanayo Ueoka-Nakanishi, Norihito Nakamichi, Takeshi Mizuno. Clock-controlled and FLOWERING LOCUS T (FT)-dependent photoperiodic pathway in *Lotus japonicus* II: characterization of a microRNA implicated in the control of flowering time. *Biosci Biotechnol Biochem.* vol. 77(6):1179-85. 2013.

Takeshi Mizuno, Aya Takeuchi, Yuji Nomono, Norihito Nakamichi, Takafumi Yamashino. The LNK1 night light-inducible and clock-regulated gene is induced also in response to warm-night through the circadian clock nighttime repressor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* Vol. 9. pii: e28505.2014.

〔学会発表〕(計 5件)

Norihito Nakamichi, Takatoshi Kiba, Mari Kamioka, Takamasa Suzuki, Takafumi Yamashino, Tetsuya Higashiyama, Hitoshi Sakakibara, Takeshi Mizuno. Transcriptional repressor

PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5 directly regulates clock output pathways. 23rd International Conference on Arabidopsis Research. Vienna, Austria, July 2012.

中道範人、木羽隆俊、神岡真理、鈴木孝征、山篠貴史、東山哲也、榊原均、水野猛. ChIP-seq 法による植物時計の出力系の遺伝子ネットワーク構造の解析. 第 19 回日本時間生物学学会学術大会. 2012 年 9 月

Norihito Nakamichi, Takatoshi Kiba, Mari Kamioka, Takamasa Suzuki, Takafumi Yamashino, Tetsuya Higashiyama, Hitoshi Sakakibara. Circadian time information transmits to out-put pathways through PRR. 第 54 回日本植物生理学会年会, 岡山, 2013 年 3 月

Mari Kamioka, Nobutaka Mitsuda, Chitose Yamamizo, Akemi Ohmiya, Takafumi Yamashino, Masaru Ohme-Takagi, Takeshi Mizuno, Norihito Nakamichi. Identification of a transcription factor potentially regulates clock-regulated PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5. 第 54 回日本植物生理学会年会, 岡山, 2013 年 3 月

中道範人. 概日リズムに関わる転写制御ネットワークの発見. 第 55 回日本植物生理学会年会, 富山, 2014 年 3 月

〔図書〕(計 0件)

〔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.bio.nagoya-u.ac.jp/~plant4/index.html>

<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中道範人 ()

研究者番号：90513440

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：