

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292191

研究課題名(和文) 概日時計機構を利用した植物のストレス応答戦略

研究課題名(英文) Plant stress responses regulated by the circadian clock

研究代表者

華岡 光正 (HANAOKA, Mitsumasa)

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号：30508122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光合成などの葉緑体機能を守るために植物が備えた、概日時計に依存した「待ちかまえ」ストレス応答の分子機構を明らかにすることを目的とした。明暗サイクル下の夜明け前後における遺伝子発現を詳細に調べた結果、概日時計に制御を受ける遺伝子群は複数のタイミングで誘導されることが示された。表現系解析の結果も含め、植物は概日時計を用いることで夜明け後の光ストレスを予防・緩和している可能性が示唆された。また、概日時計制御に関わる核と葉緑体間の双方向シグナル伝達や、光合成微生物における同様のシステムの存在についても検討を進め、一定の知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to understand molecular mechanisms of plant stress responses regulated by the circadian clock. We performed gene expression as well as phenotypic analyses around dawn in *Arabidopsis thaliana*, and found that the circadian clock is possible to repress light-dependent stressful condition after dawn. Furthermore, bidirectional signaling between the nucleus and chloroplasts for circadian regulation, and similar stress response mechanisms in photosynthetic microorganisms, have been also characterized.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：概日時計 ストレス応答 遺伝子発現制御 葉緑体

1. 研究開始当初の背景

移動することのできない植物は、変動する環境変化に速やかに応答するための独自の生存戦略を持っている。このような植物特有の環境適応機構の中でも、強光・低温・乾燥・高塩濃度など、様々な環境ストレスに対する応答メカニズムが次々と明らかにされ、主要制御因子の過剰発現によるストレス抵抗性植物の開発など、応用研究も積極的に展開されている。これらストレス応答は、基本的に全て「ストレスとなる状況が起こった場合における植物の応答」であり、ストレスの回避、あるいはダメージの軽減を目的とした適応機構と捉えられてきた。

葉緑体は、原始シアノバクテリアの細胞内共生によって誕生したと考えられており、独自のゲノム DNA とその転写翻訳システムを有していることから、核コード遺伝子群との協調的な発現調節が正常な葉緑体の機能を支える上で重要である。研究代表者らはこれまでに、シロイヌナズナの葉緑体 RNA ポリメラーゼの転写調節因子である核コードシグマ因子のうち、SIG5 の発現が強光や低温など様々な環境ストレスによって顕著に誘導されることを見いだした。さらに、最近の研究により、SIG5 は連続明条件下で約 24 時間周期の発現パターンを示し、夜明け前に発現のピークを持つことから、ストレスのみならず概日時計にも応答するシグマ因子であることを明らかにしてきた。

概日時計(サーカディアンリズム)は、様々な生命活動を 1 日 24 時間周期に適応させるための内在的なシステムであり、動物・植物・微生物を問わず広く保存されている。植物の概日時計は、多くのコンポーネントから構成されており非常に複雑な分子ネットワークを形成していることが示されている。動物と比較してその生理的な意義についてはあまり明らかにされていなかったが、最近になって、概日時計が正常に 24 時間を刻むことが葉緑体での光合成能力や炭酸固定活性の最適化に必要であるとの報告から、概日時計の存在が植物の光合成や代謝、さらに物質生産能力に大きな影響を与えるものとして注目が集まっている。

先述の通り、ストレス応答にも深く関わるシグマ因子 SIG5 の発現は、夜明け前から発現が開始する。SIG5 は光化学系 II 複合体の反応中心タンパク質をコードする *psbA*, *psbD* の発現に関わることから、夜明け時に起こるストレスを前もって「待ちかまえる」ための応答であるとも捉えることができる。言い換えると、SIG5 の発現が夜明け前に誘導されることは、暗所から急に光が当たった際の光合成装置の損傷を修復し、かつ、最大の光合成活性が得られるように植物が発達させた究極のストレス応答戦略とも考えられたが、その詳細については不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、この概日時計に依存した、葉緑体機能を守るために植物が備えた「待ちかまえ」ストレス応答の分子機構、特に概日時計による葉緑体機能の調節機構を明らかにすることを目的とした。また、正常な葉緑体機能の発現においては、核と葉緑体間の双方向のシグナル伝達が重要とされている。そのため、細胞内の時間情報の維持やストレスシグナルの共有に関わるオルガネラ間情報伝達のメカニズムを明らかにすることで、昼夜の光ストレスを「待ちかまえて」光合成機能を守る植物特有のストレス応答の実体解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 概日時計に依存した葉緑体遺伝子発現調節の実体をより明らかにするため、シグマ因子 SIG1・SIG5 による葉緑体遺伝子の転写制御について検討を行った。

(2) SIG5 と同様に概日時計に影響を受けるストレス応答遺伝子を探索し、夜明け前後における発現パターンを詳細に調べ、「待ちかまえ」ストレス応答の可能性を検討した。

(3) 葉緑体の状態がプラスチドシグナルを介して核の概日時計システムにどのような影響を与えるかについて検討を行った。

(4) 高等植物に加え、光合成微生物においてもストレス応答と概日時計制御に深い関係性があるかについて検討を行った。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの 6 種のシグマ因子のうち、SIG1 と SIG5 が特異的に概日時計に依存した周期的な発現パターンを示し、その発現ピークは夜明け前後となることが示されている。そのため、ChIP 解析により同定した SIG1・SIG5 のターゲット候補遺伝子について、概日時計に依存した発現パターンの変動を調べたところ、従来より知られている *psbD* BLRP の発現は顕著な振動パターンを示したものの、その他の遺伝子については高振幅の発現パターンは観察されなかった。また、SIG1・SIG5 の欠損株においても発現挙動の変化は見られなかったことから、複数のシグマ因子が相乗的にこれら遺伝子の転写制御に関わっている可能性が示唆された。一方で、SIG5 と *psbD* BLRP については共に明確な転写振動を示し、明暗サイクル下における 1 時間ごとのサンプリングによる詳細な発現のタイムコースを調べた結果、SIG5 の発現は *psbD* BLRP の発現に先んじており、かつ夜明け前からの発現誘導を確認することができた。

(2) *SIG5*と同様に概日時計に制御され、朝に発現ピークを示す光ストレス関連の遺伝子をマイクロアレイデータから探索し、候補に挙げた遺伝子の発現を調べた。その結果、*CAT2*等の光ストレスに対する防御に関わる遺伝子の発現が夜明け前から上昇し、*PSBS*等の光化学系を保護する因子は夜明け直後に発現が上昇していることが示された。これらの遺伝子の発現上昇は、*CAB3*を代表とする光合成関連遺伝子よりも早いタイミングで発現が上昇していたため、光化学系のタンパク質を合成することよりも光化学系を守るための応答の方が先に行われることが分かった。また、夜明け前から上昇する遺伝子は概日時計に制御され、夜明け後に発現が上昇する遺伝子は光によって発現が制御されると考えられた。さらに、夜明け前後における概日時計変異体の光ストレス感受性を調べたところ、概日時計変異体の生育は野生株と比べて遅れることが分かった。これらの結果から、植物は概日時計を用いて夜明け前から光ストレス防御に関わる遺伝子を上昇させ、夜明け後の光ストレスを「予防」し、速やかな光応答によって夜明け後に光化学系を保護する遺伝子を上昇させることで光ストレスを『緩和』していることが予想された。この『予防』と『緩和』二つの防御機構によって植物は日中に被る光ストレスから身を守っている可能性が示唆された。

(3) プラスチドシグナルとは、葉緑体の状態を核に伝えることで核コードの葉緑体関連遺伝子の発現を制御する役割を持つ。この情報伝達経路については、特にレドックス応答やストレス応答との関連から研究が進められてきたが、概日時計に依存した遺伝子発現リズムに果たす影響は調べられていなかった。カロテノイド合成の阻害剤であるノルフルラゾンを追加して葉緑体機能にダメージを与えた際の概日時計関連遺伝子の発現を調べた結果、時計の中心振動体を構成する *CCA1* の発現振動には大きな影響を与えなかったのに対して、下流のターゲット遺伝子の一つである *CAB3* の周期的な発現パターンは大きく乱れることが分かった。このことから、概日時計に依存した下流遺伝子発現制御において、葉緑体の状態も調節因子の一つとして関与する可能性が示唆された。

(4) 上述のような仕組みが光合成微生物にも備わっているかを検討するため、単細胞紅藻シズンを用いて一連の解析を行った。まず、シズンにおける概日時計による遺伝子発現リズムについて調べた結果、全遺伝子の約5%に相当する286の概日時計依存遺伝子が同定され、この中には葉緑体やミトコンドリア機能に関わる遺伝子が多く含まれることが示された。続いて、シロイヌナズナの概日時計の中心振動体と相同性の高い *CCA1* の欠損株と過剰発現株を用いて発現

解析を行った結果、オルガネラ機能に関わる *GAPA* などの遺伝子発現パターンがコントロール株と比べて長周期化するなど、野生株と比較して大きく変化することが分かった。また、*CCA1* 欠損株は野生株より増殖速度が遅く、光合成活性やフィコシアニン量も低いことが示された。さらに、シロイヌナズナと同様に、概日時計変異株の生育は夜明け時における光ストレスに対して弱まる傾向が観察された。したがって、*CCA1* が関わる概日時計が遺伝子発現を介してオルガネラ機能を制御していることが示唆された。一方、葉緑体の状態が核の概日時計に与える影響について検討するため、光合成の阻害剤である DCMU を添加した際の核コードの概日時計依存遺伝子の発現を調べたところ、*CCA1* 発現リズムの位相が DCMU 処理により前進したことから、光合成を始めとした葉緑体機能が概日リズムの位相調節に関わっている可能性が示唆された。

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10件)

Takatomo Fujisawa, Rei Narikawa, Shin-ichi Maeda, Satoru Watanabe, Yu Kanesaki, Koichi Kobayashi, Jiro Nomata, Mitsumasa Hanaoka, Mai Watanabe, Shigeki Ehira, Eiji Suzuki, Koichiro Awai and Yasukazu Nakamura (2017) *CyanoBase: A large-scale update on its 20th anniversary*. *Nucleic Acids Research*, 査読有, 45 (D1), D551-D554.
DOI: 10.1093/nar/gkw1131.

Yuki Kobayashi, Hiroyuki Ando, Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka (2016) *Abscisic acid participates in the control of cell-cycle initiation through heme homeostasis in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae**. *Plant and Cell Physiology*, 査読有, 57(5), 953-960.
DOI: 10.1093/pcp/pcw054.

Gaku Fujii, Sousuke Imamura, Atsuko Era, Shin-ya Miyagishima, Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka (2015) *The nuclear-encoded sigma factor SIG4 directly activates transcription of chloroplast *psbA* and *ycf17* genes in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae**. *FEMS Microbiology Letters*, 査読有, 362 (10), pii: fnv063.
DOI: 10.1093/femsle/fnv063

華岡光正 (2015) 「共生によるレトログレ

ードシグナリングの成立と進化」生物科学、Vol. 66, No. 4, pp. 208-212.
http://www.ruralnet.or.jp/seibutsu/066_04.htm

Antony N. Dodd, Jelena Kusakina, Anthony Hall, Peter D. Gould and Mitsumasa Hanaoka (2014) The circadian regulation of photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 査読有, 119, 181-190.
DOI: 10.1007/s11120-013-9811-8.

Rajesh Tewari, Mamoru Satoh, Sayaka Kado, Kohei Mishina, Misato Anma, Kazuhiko Enami, Mitsumasa Hanaoka and Masami Watanabe (2014) Overproduction of stromal ferredoxin:NADPH oxidoreductase in H2O2-accumulating *Brassica napus* leaf protoplasts. *Plant Molecular Biology*, 査読有, 86 (6), 627-639.
DOI: 10.1007/s11103-014-0252-3.

華岡光正 (2014) 「植物が葉緑体に「時」の情報を伝えるメカニズム」*バイオサイエンスとインダストリー*、査読無、Vol. 72, No. 2, pp. 125-126.
https://www.jba.or.jp/link_file/backnumber/2014_72.pdf

他

〔学会発表〕(計49件)

Natsuko Kagawa, Masahumi Henzan, Hiroya Iguchi and Mitsumasa Hanaoka
Effects of cutting and drying leaves of culinary herbs on contents of bioactive phytochemicals in *Perilla frutescens*.
255th ACS National Meeting and Exposition
March 20, 2018, New Orleans, LA, USA.

平安山昌史、井口広也、加川夏子、華岡光正 「ストレスに応答した青シソ二次代謝関連遺伝子の発現制御」日本農芸化学会2018年度大会、名古屋、2018年3月17日

片野貴章、雪竹健太郎、高橋広夫、恵良厚子、宮城島進也、今村壮輔、田中寛、華岡光正 「単細胞紅藻 *C. merolae* における概日時計とオルガネラ機能の相互作用」第16回微生物研究会、横浜、2017年11月18日

片野貴章、雪竹健太郎、高橋広夫、恵良厚子、宮城島進也、今村壮輔、田中寛、華岡光正 「単細胞紅藻 *C. merolae* における核とオルガネラ間の概日時計情報伝達の解析」日本植物学会第81回大会、野田、2017年9月8日

井口広也、平安山昌史、加川夏子、華岡光正 「青シソの二次代謝関連遺伝子発現の

トレス応答」日本植物学会第81回大会、野田、2017年9月8日

林健太郎、癸生川奈央子、石井健雄、村山遙香、華岡光正 「概日時計に依存して発現するSIG5の葉緑体光ストレス応答における役割」第58回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017年3月18日

片野貴章、雪竹健太郎、恵良厚子、宮城島進也、今村壮輔、田中寛、華岡光正 「単細胞紅藻 *C. merolae* の概日時計によるオルガネラへの情報伝達の解析」第15回微生物研究会、藤沢、2016年11月5日

船城桐子、猪狩温、癸生川奈央子、安間美里、石井健雄、華岡光正 「様々な環境下におけるプラスチドシグナルに依存した核遺伝子の転写制御」日本植物学会第80回大会、沖縄、2016年9月16日

片野貴章、雪竹健太郎、恵良厚子、宮城島進也、藤井岳、今村壮輔、田中寛、華岡光正 「単細胞紅藻シソンの概日時計応答に関する細胞内シグナル伝達の解析」第57回日本植物生理学会年会、盛岡、2016年3月18日

華岡光正 「光と概日時計に応答した葉緑体の機能調節」千葉大学戦略的重点研究強化プログラム「ファイトケミカル植物分子科学」第1回公開シンポジウム、千葉、2016年3月16日

徳山城永、小堀奈美、木村明日香、高井直樹、岩崎秀雄、近藤孝男、田中寛、華岡光正 「概日時計応答に関わる2つの転写因子 RpaA・RpaB による協調的な転写制御」かずさDNA研究所研究会「ラン藻の分子生物学2015」かずさ、2015年11月16日

徳山城永、小堀奈美、高井直樹、岩崎秀雄、近藤孝男、田中寛、華岡光正 「*S. elongatus* PCC 7942 の概日時計応答に関わるレスポンスレギュレーター RpaA/B の解析」第14回微生物研究会、川崎、2015年10月31日

片野貴章、雪竹健太郎、恵良厚子、宮城島進也、華岡光正 「*C. merolae* における概日時計機構の解析」第14回微生物研究会、川崎、2015年10月31日

徳山城永、小堀奈美、木村明日香、高井直樹、岩崎秀雄、近藤孝男、田中寛、華岡光正 「転写因子 RpaA・RpaB の協調によるシアノバクテリアの概日時計出力系の制御」第6回光合成学会・シンポジウム、岡山、2015年5月22日

Mitsumasa Hanaoka
Light sensing in chloroplasts.

Tokyo Tech-HHU Dusseldorf Joint Symposium
on Photosynthesis as a New Chemical
Resource
March 5, 2015, Tokyo, Japan.

Gaku Fujii, Sousuke Imamura, Keisuke
Tarohara, Keisuke Yoshida, Toru Hisabori,
Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka
Redox status regulates chloroplast
transcription in the red algae
Cyanidioschyzon merolae.
Tokyo Tech-HHU Dusseldorf Joint Symposium
on Photosynthesis as a New Chemical
Resource
March 5, 2015, Tokyo, Japan.

Mitsumasa Hanaoka
Plastid sigma factors and
nucleus-chloroplast communication.
Gordon Research Conference “Chloroplast
Biotechnology: Reengineering
Photosynthetic Organelles”,
January 19, 2015, Ventura, CA, USA.

徳山城永、木村明日香、華岡光正「*S. elongatus* PCC 7942 の概日時計出力系で機能する転写制御因子の解析」第13回微生物研究会、東京、2014年7月26日

他

〔図書〕(計1件)

Yuki Kobayashi, Yu Kanesaki, Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka (2018)
Control of cell nuclear DNA replication by chloroplast and mitochondrion. In
Cyanidioschyzon merolae: A New Model Eukaryote for Cell and Organelle Biology,
T. Kuroiwa et al. (eds.), Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapore.

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.h.chiba-u.jp/lab/tenure/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

華岡 光正 (HANAOKA, Mitsumasa)
千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授
研究者番号：30508122