

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目

日長、温度に応答した植物の形態制御を支える  
概日時計出力経路の分子生物学的解析

氏名

野本 友司

## 論文内容の要旨

概日時計は植物を含む全ての真核生物に保存され、生存に必要とされる多様な生理現象に時間的特性を付与している。この内生リズムは地球の自転によって生じた昼夜の環境変化における適切なタイミングに生物が最大限のパフォーマンスを発揮する上で重要な役割を果たしていると考えられている。とりわけ、自由に移動することができない独立栄養性の植物にとって、外界の時間情報や季節変化を感知して細胞、組織レベルの生理応答に結びつける情報伝達経路は個体や種の生存において極めて重要な意味を持っていると推察される。

2000年に全ゲノムが解読されて以降、モデル植物シロイヌナズナにおける概日時計の分子機構に関わる研究は目覚ましい進展を遂げており、これまでに自律振動性の根幹をなす中心振動体を構成する多くの時計関連遺伝子が同定された。これらの遺伝子の多くは転写因子をコードしており、相互に転写を制御し合う複雑なフィードバックループを形成することで約24時間周期の概日リズムを形成していると考えられている。これと並行して2004年には概日時計の出力系、すなわち概日時計が制御する時間や季節に特異的な生理応答の代表例である光周性花生制御を転写因子 CONSTANS (CO)の発現位相と明暗周期における明期の位相との重なりによって説明する外的符号モデルが提唱された。栄養成長期における植物の形態もまた日長によって変化することが知られているが、近年、所属研究室の先行研究から光周性の形態制御の分子機構が花生における外的符号機構と非常に対称的な構造を持っていることがわかってきた。この中で概日時計による日周性の転写リズムを持ち、光によって活性制御を受ける転写因子として PYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4, 5 (PIF4, 5)、下流因子としてホメオボックス型転写因子 ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 2 (ATHB2)が同定されたが、光周性の形態形成における多様な表現型を説

明するには *ATHB2* という単一の転写因子では不十分であり、この点において単一のマスター因子 *FT* によって制御される花生経路とは非対称に複数の因子が関わることを示唆されている。光とともに概日時計と関わりの深い外的シグナルとして知られる温度についてもこれまで多くの研究報告があり、花生及び形態形成制御の双方に影響を与えることが示されているが、これらの情報伝達系におけるシグナル受容分子が見つかっていないことをはじめ、その分子機構については十分に理解されていないというのが現状である。このような時計の出力経路に関わる研究は生物種間で広く保存された概日時計というシステムが自然界における生物の生存にどのように寄与しているかを定義するという点で非常に重要な意義を持っている。

以上のような背景をもとに、本論文では概日時計の出力経路としての光及び温度に応答した形態形成制御の分子機構を解明することを目的とし、これまでに行った研究結果を示す。

第2章においては *PIF4, 5* の下流で植物の形態形成制御に直接的に関わると考えられる複数の遺伝子候補の同定を試みた。第3章においては植物の形態制御においてこれまで示唆されてきた光シグナルと温度シグナルの統合機構に関して研究を進め、異なる2つのシグナルの作用が *PIF4* の転写リズムの位相変化と外的符号機構によって統合的に出力されることを明らかにした。これを受け第4章においては *PIF4* の転写リズム形成における概日時計関連遺伝子の関わりについて検討を行った。

### 植物ホルモン関連遺伝子に着目した *PIF4, 5* 新規下流因子の同定

近年、シロイヌナズナの光形態形成を制御する *PIF4, 5* の下流因子として同定された *ATHB2* はホメオボックス型転写因子に属し、過剰発現株では長胚軸の表現型を示すことから主に胚軸伸長に関わる因子であることが示唆された。しかしながら *athb2* 欠損変異株が顕著な表現型を示さないこと、*PIF4, 5* による日長応答性の形態形成制御は胚軸だけでなく本葉における葉柄の伸長や葉身の形態など多岐にわたることから、一連の応答を単一の転写因子 *ATHB2* だけで説明することは難しい。これに関連して、多くの先行研究により光形態形成制御における植物ホルモンの協調的作用の重要性が認識されていることから *PIF4, 5* による植物ホルモンシグナル経路への直接的な制御があるのではないかと推測した。この仮説を検討するための具体的な方策として、これまで多くの研究者から公開されているトランスクリプトームデータの中から主に *Phytochrome* の活性に関わる遠赤色光照射条件、*PIF* ファミリー遺伝子欠損変異株における発現データを用いて *ATHB2* の発現特性と一致する新規候補遺伝子の抽出を行った。抽出された各候補遺伝子について遠赤色照射による発現誘導性、明暗周期下での時間特異的な発現特性を qPCR ベースで再解析し、*pif4 pif5, phyB* 及び概日時計によるリズムが完全に欠失した *prp9 prr7 prr5* の各欠損株における発現パターンの解析を行い、代表的な植物ホルモンであるオーキシン、ブラシノステロイド、ジベレリ

ン、サイトカイニン、エチレンの各情報伝達経路に関わる遺伝子群が PIF4, 5 の下流因子として制御されることを明らかにした。

### 温度による胚軸伸長制御メカニズムの解析

これまでの研究報告から光形態形成におけるキー因子 PIF4, 5 のうち特に PIF4 は光とともに植物の形態形成に影響を与える外的シグナルである温度に対する応答においても重要な役割を果たすことが示唆されている。このうち胚軸伸長に関して、22°C の条件下では PIF4 の転写が明期に限定される長日条件においても 28°C の条件では長胚軸の表現型が観察されるという報告から、光と温度という 2 つのシグナルが PIF4 によって統合的に出力されて伸長応答を制御するメカニズムの存在が強く示唆された。これを検証するため、温度変化による PIF4 の経時的な mRNA 及びタンパク質の蓄積量の変化を精査するとともに、前章で明らかにした複数の下流遺伝子の mRNA 発現変化と照らし合わせることで温度シグナルがいつ、どのような様式で PIF4 の働きを変化させるかという点に着目して実験を進めた。その結果、温度シグナルは PIF4 の転写リズムの位相を前進または後退させることで外的な明暗周期における暗期との重なりを変化させ、光周性の形態形成と共通した下流因子を利用して種々の形態形成を制御していることを明らかにした。更にこの PIF4 転写リズムの位相変化は 16°C から 28°C という広い温度範囲において段階的なものであり、このような非ストレス範囲における低温に対する応答と高温に対する応答を共通の外的符号機構によって説明できることを示した。

### PIF4 転写リズム形成における概日時計関連遺伝子の機能解析

概日時計の備える 3 種の基本的性質のひとつ、外的周期への同調機構は特定の時間帯域における光や温度変化に対して特定の概日時計関連遺伝子の発現位相を前進または後退させることで連鎖的に概日時計全体の周期を外部環境に合わせる働きを持っていることが知られている。このような時計の同調機構と温度による PIF4 の転写リズム形成の変化に類似性が認められ、また PIF4 の転写が概日時計による転写リズムを持っているという点から、温度による PIF4 転写リズムの変化は概日時計を介した温度感知と活性調節によって行われていることが示唆された。これを検証するため、PIF4 の高温による発現誘導の時間特異性を調べた結果、夜間特異的な発現誘導性が見られることがわかった。また、同じ実験系により種々の概日時計関連遺伝子欠損変異株を用いて発現誘導性を調べることで特に *elf3*, *elf4* 変異株で PIF4 の高温に対する誘導性が顕著に低下していることを明らかにした。ELF3, ELF4 及び LUX/PCL1 は Evening Complex と呼ばれる複合体を形成することで転写抑制因子として働くことが報告されており、またこれらのタンパク質が共通に PIF4 プロモータに局在していたことから温度シグナルは Evening Complex の活性調節を介して PIF4 の転写リズムを変化させていると結論づけた。