

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 野本友司

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

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学准教授	山 篠 貴 史
委員	名古屋大学教授	小 俣 達 男
委員	名古屋大学教授	藤 田 祐 一
委員	名古屋大学准教授	伊 藤 正 樹

## 論文審査の結果の要旨

概日時計によって生成される約 24 時間周期の内生リズムは植物を含む多様な真核生物に普遍的に備わっていることが知られており、地球の自転によって生じる昼夜の環境変化に適切に応答するために重要な役割を担っていると推定されている。生物は概日時計に依存して、一日周期で規則的に変動する外部環境を予測し、種々の生理機能について一日における特定の時間に最高のパフォーマンスを発揮できるように内生リズムを調節していると考えられている。とりわけ独立栄養生物でありながら自由に移動することができない植物にとって、明暗周期における時間情報や 1 年を通して変化する光周期（日長）に関する情報を細胞や組織、個体レベルの応答に結びつけるためのシグナル伝達経路は個体の生存や種の維持にとって極めて重要な役割を果たしていると考えられている。

植物概日時計の研究は 2000 年にシロイヌナズナの全ゲノムが解読されて以降目覚ましい進展を遂げており、多くの時計関連遺伝子が同定されている。これらの遺伝子の多くは転写因子をコードしており、相互に複雑なフィードバックループを形成することにより、約 24 時間周期で自律的に振動する概日リズムを作り出していることが明らかになってきた。これと並行して概日時計の出力経路の理解も進展し、長日植物シロイヌナズナにおける日長に依存した花成調節（光周性花成制御）を説明することのできる分子機構が明らかにされた。この成果は、1960 年代に生物時計の父と称される時間生物学者 Pittendrigh によって提唱された外的符合モデルの実証に値するものであり、当時、光条件依存的かつ時間特異的に活性化すると仮定された因子（CONSTANS(CO)と名付けられた）の存在とはたらきが明確になった。具体的な CO の性質と機能としては、以下の 2 点である。① CO は zinc finger 様の DNA 結合ドメインを有する転写制御因子をコードしており、その発現は概日時計の支配下におかれ、転写レベルで巧妙に調節されている。すなわち、短日条件では暗期にピークをもつ内生リズムを生成するが、長日条件では夕刻にピークがセットされる。② CO は光依存的に活性化し、フロリゲンをコードする *FT* の遺伝子発現を転写レベルで正に制御する。したがって、CO は、短日条件では一日を通して活性化できないが、長日条件では夕刻に活性化し、*FT* mRNA を誘導する。この原理を基盤に、日長条件特異的な光周性花成経路の活性化を説明することのできる分子機構が提唱された。

上述した概日時計に依存した日長感知の機構は光周期特異的な花成誘導だけでなく植物の種々の生理応答に co-opt されていると考えてよいだろう。例えば、栄養成長期における植物の形態もまた日長に応答して変化する（例えば、シロイヌナズナにおいては胚軸および本葉の葉柄が短日条件特異的に伸長する）。この応答には赤色光受容体 phyB および PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF) ファミリーに属する転写因子に依存した光情報伝達系が関わっていることが知られている。*phyB* 変異体では日長にかかわらず長胚軸・長葉柄の形質を示すが、その逆に、*pif* 多重変異

体においては日長条件にかかわらず伸長成長が活性化されない。PIF ファミリーは phyB と相互作用するドメインと bHLH 型の DNA 結合ドメインを有する転写因子群であり、これらは共通に赤色光依存的に構造変化した phyB (P<sub>fr</sub> 型 phyB) によって活性が負に制御されることが示唆されている。申請者の所属研究グループの解析により、PIF ファミリーに属する PIF4, PIF5 をコードする遺伝子の転写は概日時計の支配下で調節されており、日周レベルで変動していることが見いだされた。このような背景のもと、野本友司は日長に応答したモデル植物シロイヌナズナの形態制御を支える概日時計出力系路の分子機構を解析した。提出された学位論文は以下に記す3つの研究内容で構成されていた。

### PIF4, PIF5 標的遺伝子の同定および PIF4, PIF5 の日長特異的な活性化機構の理解

*PIF4, PIF5* の転写量は (*CO* が暗期にピークをもつこととは対照的に) 明期にピークをもつ明瞭な概日リズムを示すが、それらの遺伝子産物は明期に活性化している赤色光受容体 phyB との相互作用を介して不活性化されてしまうことにより、PIF4, PIF5 の機能は一日を通じて常に抑制されているのではないかと推定された。この仮説を検証するため、野本は PIF4, PIF5 の活性の指標となる PIF4, PIF5 の標的遺伝子の同定を試みた。所属研究室ではホメオボックス転写因子をコードする *ATHB2* が同定されていたが、野本はこれまでに公開されたトランスクリプトームデータの中から主に phyB 情報伝達に関わる遠赤色光照射条件で誘導される遺伝子を抽出し、その誘導が PIF4, PIF5 に依存したものであるかどうかを qPCR ベースで解析することにより、PIF4, PIF5 によって正に調節される遺伝子群を網羅的に同定した。その結果、細胞壁合成や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の発現が *ATHB2* とともに PIF4, PIF5 により正に制御されていることが明らかになった。同定した遺伝子のいくつかに関しては、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 実験により PIF4, PIF5 の直接の標的であることを示すとともに、*in vivo* での標的遺伝子上流における PIF の結合部位を明確に位置づけた。興味深いことに、本研究で同定した PIF4, PIF5 のあらゆる標的遺伝子は長日条件においてどの時間帯においても発現が誘導されず基底レベルを維持していたが、短日条件においては朝方時刻に発現誘導を示すことを見いだした。この時間特異的な発現誘導は *pif4 pif5* 二重変異体においては完全に消失した。これらのことは、PIF タンパク質は長日条件では活性化しないが、短日条件では朝方に活性化していることを示している。そこで、昼にピークをもつ *PIF4* mRNA の発現リズムを詳細に解析したところ、長日条件下では発現する時間帯が明期に限定されているが、短日条件下では夜明けを待たずして暗期後半に誘導され始めることが明らかになった。*PIF4* mRNA の発現が構成的となる時計遺伝子 *prp9 prp7 prp5* 三重変異体 (arrhythmic 変

異体)においては、本来長日条件下では基底レベルを維持している標的遺伝子の発現が暗期に脱抑制されていた。以上の解析結果により、日長応答性の伸長成長を支える情報伝達経路の活性化は、光周性花成の誘導機構と同様に、外的符合モデルに従って説明できることが実証された。ここで、花成を誘導する情報伝達経路は長日条件の明期後半に活性化するが、野本が提唱する伸長成長を誘導する情報伝達経路は短日条件の暗期後半に時間特異的に活性化する点で対照的である点が興味深い。

### 温度による胚軸伸長制御メカニズムの解析

生育環境における温度上昇は花成および形態形成制御の双方に影響を与えることが報告されている。シロイヌナズナの至適温度は 22°C であるが、28°C になると本来短日条件下で抑制されているはずの花成や、長日条件で抑制されている伸長成長が促進されてしまう。日長と温度情報がどのように統合され概日時計の出力経路が調節されているかについての研究は、自然界における生物の生理応答における概日時計の役割を理解するうえで重要な課題といえる。このような背景のもと、野本は光および温度に応答したモデル植物シロイヌナズナの形態制御を支える概日時計出力系路の分子機構を解析した。前章に記した研究から明暗サイクル下における光形態形成を調節する最も主要な役割を担っている因子は *PIF4* であることが判明している。しかし、胚軸・葉柄の伸長成長に関して、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観察結果から、温度は *PIF4* 非依存的に伸長成長を誘導する可能性が推定された。ところが、*pir4* 変異体においては高温条件で観察された伸長成長の誘導が顕著に抑制されていることが観察された。このことから、光と温度という 2 つのシグナルが *PIF4* に統合されて伸長応答を制御する情報伝達経路の存在が強く示唆された。これを検証するため、野本は温度変化による *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 *PIF4* 標的遺伝子 (*PIF4* レギュロン) 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* の機能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、温度変化は日長変化とは独立に *PIF4* の転写開始時刻を前進または後退させることで外的な明暗周期との符合関係を変化させる作用をもっていることが判明した。興味深いことに、*PIF4* mRNA 転写開始時刻の変化は 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、高温側に変化することにより明期開始 (ZT=0) を起点とした *PIF4* mRNA の発現開始時刻が前進し、低温側に変化することにより ZT=0 を起点とした *PIF4* mRNA の発現開始時刻が後退することが判明した。さらに、あらゆる温度・日長条件において *PIF4* 標的遺伝子は暗期に上昇した *PIF4* mRNA に符合して誘導されることが観察された。以上の解析から、野本は温度に応答した伸長成長の誘導機構も前章で

提唱した外的符号モデルに従って説明できることを明らかにした。

### ***PIF4* 転写リズム形成に関与する概日時計関連遺伝子の機能解析**

前章の解析から *PIF4* mRNA の発現開始時刻が生育温度に感受性を示すことが明らかになった。*PIF4* の転写開始時刻は明け方にセットされていることから、*PIF4* 遺伝子発現調節において温度感受性を示す時刻は明け方であることが推定された。このことを明確にするために、明暗サイクル下で生育している植物において様々な時刻に温度パルス刺激を与え 3h 後の *PIF4* 遺伝子発現の変化を観察した。興味深いことに、明暗サイクル下で発現が上昇する昼に温度刺激を与えても相加的あるいは相乗的発現上昇は観察されなかった。逆に、明暗サイクル下で発現が抑制されている暗期後半に入力した温度パルスは顕著に *PIF4* mRNA を誘導した。温度応答に時間特異性（ゲート効果）が観察されたことにより、*PIF4* mRNA の夜間の抑制は概日時計を介した制御であることが強く示唆された。そこで、如何なる時計因子がこの制御を担っているかを明らかにするために逆遺伝学的手法で解析したところ、植物時計の中心振動体として機能する LUX-ELF3-ELF4 複合体のはたらきがゲート効果の原因であることが明らかになった。LUX-ELF3-ELF4 複合体は発現開始が夕刻にセットされていることから Evening Complex (EC) とよばれており、転写抑制因子として機能することが知られていた。野本は、いずれの *elf3*, *elf4*, *lux* 変異体においても、夜間に抑制されていた *PIF4* の転写が脱抑制されており、もはや温度に非感受性となっていることを示すとともに、ChIP 実験により EC が *PIF4* 遺伝子上流に結合することを示し、EC が *PIF4* を標的とする転写抑制因子であることを明らかにした。光とともに温度は夜間に入力されると概日時計の位相をリセットする環境シグナルとして機能することが知られている。しかしながら、温度の受容機構については不明な点が多いことに加え、温度変化を感知して概日リズムを調節する分子機構についての理解は乏しい。この状況において、EC が夜間の温度入力にかかわるといふ知見を得たことは概日時計の同調機構を理解する上で意義深い。

上記の通り、野本友司はモデル植物シロイヌナズナの概日時計の出力経路に着眼した独自の視点で、温度と日長を統合して伸長成長を誘導する新規の分子機構を解明した。当博士学位審査会は、本論文の研究が環境に応答した可塑的な植物形態形成機構の一端を明らかにすることで農芸化学および植物生理学分野の発展に寄与する学術的価値を有するものであると認めるとともに、概日時計の同調性を解明するための糸口となる知見を提供することにより時間生物学分野の発展にも貢献するものであると評価し、合格と判定した。