

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

名古屋大学大学院生命農学研究科

生物機構・機能科学専攻

分子細胞機構学講座

ゲノム情報機能学研究分野

野本 友司

2019年3月

目次

1章. 序論	2
2章. 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	
緒言	11
結果	13
考察	17
図表	20
3章. 温度による胚軸伸長制御メカニズムの解析	
緒言	42
結果	43
考察	47
図表	48
4章. <i>PIF4</i> 転写リズム形成における概日時計関連因子の機能解析	
緒言	59
結果	61
考察	64
図表	65
5章. 総合考察	73
研究材料及び実験方法	79
参考文献	86
謝辞	101
発表論文	102

1 章. 序論

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 (Doherty and Kay 2010)。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。

概日時計の分子実体

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、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 Myb 型転写因子 (*CCA1*, *LHY*)、pseudo 型レスポンスレギュレーター (*TOC1*, *PRR5*, 7, 9)、GARP 型転写因子 (*LUX/PCL1*) とその相互作用因子 (*ELF3*, 4) など、種々の転写因子をコードしており (Hamilton and Kay 2008, McClung 2008, Harmer 2009, McClung 2011, Nakamichi 2011) 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 (Pokhilko et al. 2010, Pokhilko et al. 2012)。

光周性花成制御の分子機構

概日時計におけるリズム形成の分子機構に対する理解の進展と並行して概日時計と種々の生理現象を結びつける出力経路への理解も進み、2004 年にはシロイヌナズナの日長依存的な花成調節 (光周性花成制御) を説明する分子機構が明らかにされた。この成果は 1960 年台に Pittendrigh によって提唱された、外的符合 (External Coincidence) モデル (概日時計によって発現が制御される因子と、光などの外的シグナルが一致した時に誘導シグナルが発せられるというモデル (Sawa et al. 2007)) の実証例に値するものであり、当時予見された光依存的かつ

時間特異的に活性化すると仮定された因子(CONSTANS(CO)と命名された)の存在とその働きが明確となった。

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*mRNA の転写は概日時計によって制御され、日周性のリズムを持つ発現パターンを示す。短日条件における *CO*mRNA の発現は暗期のはじめから誘導され、暗期後半には再度抑制されるため、明期においてはほとんど検出されない。一方で、長日条件においては *CO*mRNA の発現は明期の後半から誘導される。② *CO* は zinc finger 様の DNA 結合ドメインを持つ転写因子をコードしており、*CO* タンパク質は光情報伝達経路の下流に位置し、光依存的に活性化することでフロリゲンをコードする *FT* 遺伝子の転写を正に制御する。従って *CO* は短日条件では一日を通して活性化できないが、長日条件では明期の後半に特異的に活性化し、*FT*mRNA の転写を誘導する。この原理を基盤として日長条件特異的な光周性花生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(Salome and McClung 2004, Imaizumi and Kay 2006)。

光周性形態制御の分子機構

上述したような概日時計に依存した日長感知機構は花成誘導だけでなく種々の生理応答にも共通に利用されていると考えられる。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事が知られているが、近年、光周性の形態形成制御の分子機構が花成制御における分子機構と極めて対称的な構造を持っていることが所属研究室の先行研究から明らかとなってきた。

栄養成長期のシロイヌナズナでは日長に応答した胚軸や本葉における葉柄の伸長、葉身の形状変化が観察される。これらの伸長応答は多くの概日時計関連遺伝子の欠損変異株で見られ、花成制御と並んで概日時計と関わりの深い現象として着目されてきた。このような伸長応答の分子機構もまた、外的符合モデルによって説明できることが示され、花成制御における *CO* と同様に光依存的かつ時間特異的に活性化する性質をもつ因子として PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF)ファミリーに属する bHLH 型転写因子 PIF4, PIF5 が同定されている(Breton and Kay 2007, Nozue et al. 2007, Niwa et al. 2009)。

シロイヌナズナの PIF ファミリー因子は 1998 年に PIF3 が phyB の相互作用因子として初めて同定され、配列の相同性から多くの因子から成る遺伝子ファミリーを形成していることが明らかとなった。生化学的な解析により phyA および phyB の双方と相互作用する PIF1, 3 と phyB のみと相互作用する PIF4, 5, 6 とに大別され、このうち PIF1, 3 は主に発芽や暗形態形成から明形態形成への転換において重要な役割を果たしており、PIF4, 5 は主に赤色光条件に依存した胚軸伸長や子葉の形態制御に関与していることが示唆されている。また、これらの因子は共通して光によって活性化された phyA 及び phyB との相互作用によって分解制御を受けることが示されている (Haq and Quail 2002, Khanna et al. 2004)。PIF ファミリー因子の中で PIF4, 5 を特徴付けるもうひとつの性質として、遺伝子発現が概日時計によって制御される日周性のリズムを持つ事が明らかとなっている (Fig.1)。時計によって制御される PIF4, 5 の転写は長日条件においては明期に限定されているが、短日条件においては暗期の終わりから観察される (Niwa et al. 2009)。これらの点から PIF4, 5 は外的符合モデルにおける光依存性かつ時間特異的に活性化される因子としての特性を満たし、長日条件に特異的な花成制御における CO とは対照に短日条件に特異的な伸長応答を制御するキー因子であることが示唆される。また、光周性の形態制御が外的符合モデルによって説明されることは *PHYB* や時計関連遺伝子 *PRR9 PRR7 PRR5* の欠損変異株において伸張応答の短日条件特異性が失われていることから支持される (Fig.2)。

このような外的符合による生理応答機構の解明は、これまで盛んに研究されてきた概日時計の分子機構と実際の生理現象を明確に結びつける研究例として重要な意義を持っており、今後の概日時計研究においてはこのような生理現象を説明する分子機構の解明が中心的な関心事となることが予想される。

日長に応答した形態形成制御に関わる種々の因子が同定されたことで、この系が光周性の花成制御と非常に対称的な分子メカニズムによって制御されていることがわかってきたが、これまで花成制御における *FT* に相当するような下流因子についてはほとんど明らかになっていなかった。これに関して最近、homeobox 型転写因子をコードする *ATHB2/HAT4* 遺伝子が PIF4 の下流因子としてこのような制御に関わることが報告された (Kunihiro et al. 2011, Fig3)。

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、光周性の形態形成制御における表現型が非常に多岐に渡ることから、*FT* という一つの遺伝子によって制御される花成とは異なり、複数の因子が *PIF4* の下流因子として伸長応答を制御していることが示唆された(Fig.4)。そこで本論文第2章においては、このような伸長応答に関わる *PIF4* 下流因子の多様性を解明することを目的として研究を行った。具体的にはこれまで多くの研究者から公表されている種々のトランスクリプトームデータの再解析を行うことで *PIF4* 下流の新規候補遺伝子の抽出を行い、変異体を用いた mRNA 発現解析によって候補遺伝子の絞り込みを進めた。伸長応答を始めとする植物の形態変化は一般に種々の植物ホルモンによって制御される事が示唆されている (Vandenbussche et al. 2005, Nozue and Maloof 2006, Alabadi and Blázquez 2009) 事から、本研究においては特に植物ホルモンに関連する遺伝子及び細胞伸長に関わる遺伝子に着目して候補の選定を行った。

植物の形態形成において光と並び重要な環境要因として認識される温度に対する応答についてもこれまでに多くの研究報告がなされてきたが、興味深いことにいくつかの研究において温度応答性の形態制御においても *PIF4* 遺伝子が重要な役割を果たすことが示唆されている (Koini et al. 2009, Franklin et al. 2011)。Phytochrome に代表される各種の光受容体タンパク質が発見されたことに始まり、前述した光周性花成や伸長応答など、植物の光応答制御の分子機構に関する研究は目覚ましい進展を遂げてきたが、対して温度の感知機構、とりわけ非ストレス範囲における温度応答の分子機構についての詳細はほとんどわかっていない。自然界において日長と気温の変化はともに季節をはかる重要なシグナルであり、この2つのシグナルは季節ごとに密接に関連しながら変動していることから植物はこれらのシグナルを統合的に処理して形態を制御するメカニズムを持っていることが示唆されてきた。この問題に関して、日長応答の外的符合機構の中心因子であるとともに温度応答においても重要な寄与を果たす *PIF4* はこれらのシグナルを統合するキー因子である事が強く示唆された。そこで本論文第3章において日長応答の外的符合機構に対する外部気温の影響を解析し、*PIF4* を中心とした日長、温度の統合的感知機構を理解することを目的として研究を進めた。具体的な実験方法として、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調べるとともに、第2章で明らかにした複数

の *PIF4* 下流遺伝子の mRNA 発現変化と照らし合わせることで温度変化のシグナルがいつ、どのような様式で *PIF4* のはたらきを変化させるか、という点に着目して実験を進めた。

本論文第4章においては、第3章で得られた「温度シグナルは *PIF4* の転写リズムの位相を変化させることで光シグナルと統合されて形態形成を制御する」という結果をもとに、*PIF4* 転写リズム形成に関わる概日時計因子の機能解析を行い、これまで進めてきた *PIF4* を中心とした外的符合機構の全体像、すなわち温度シグナルの入力から光シグナルとの統合、下流因子の発現制御までの分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を進めた。

第5章においてはこれまでに得られた結果をもとに、自然界において植物がさらされる実際の環境変化との対比、高等植物における同メカニズムの普遍性について考察をおこなった。また、実験を進めるなかで他のグループから発表された新たな知見をもとに現在考えられる *PIF4* を中心とした形態形成制御の分子メカニズムの全体像を考察した。

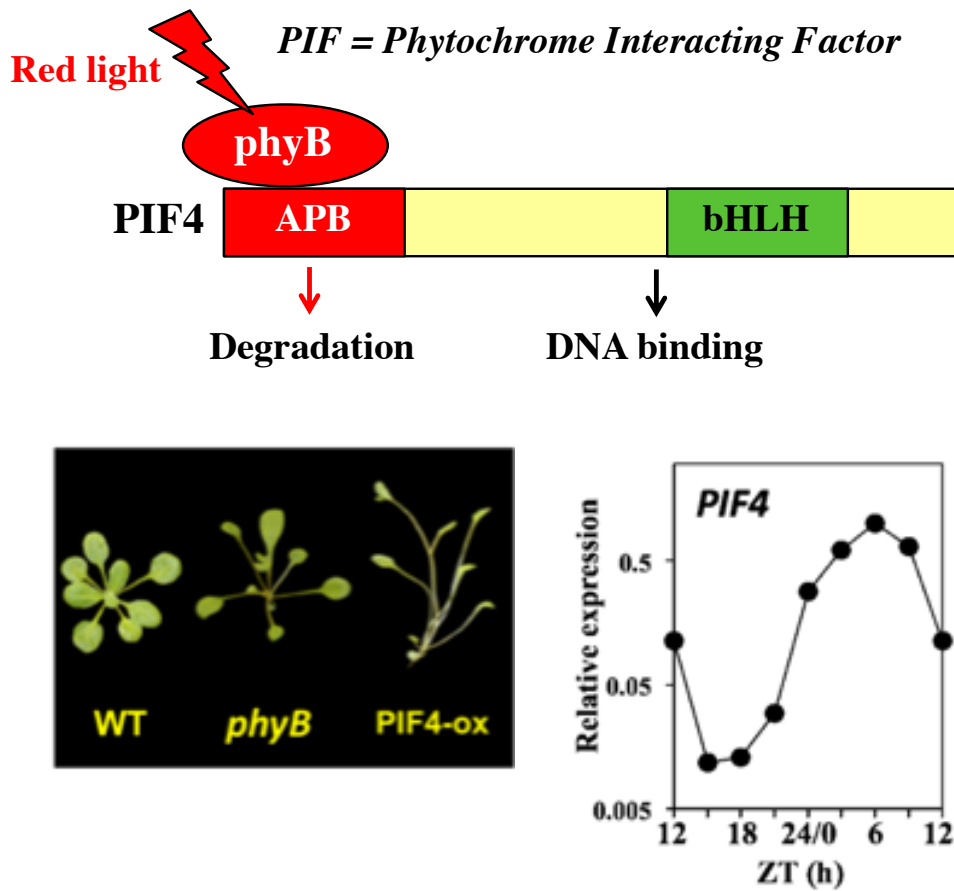


Fig.1 明暗サイクル下で植物の形態を制御する *PIF4*

PIFファミリー遺伝子群に含まれる *PIF4* は phyB と相互作用する APB ドメイン及び DNA 結合に関わる bHLH ドメインをもつ転写因子をコードしている。*PIF4* 過剰発現株は *phyB* 欠損変異株とよく似た長胚軸、長葉柄の表現型を示し(図中左下)、早咲きという点でも共通している。明暗サイクル条件下における *PIF4* の mRNA 発現は概日時計によって制御される日周性のリズムを持つことが知られている(図中右下)。

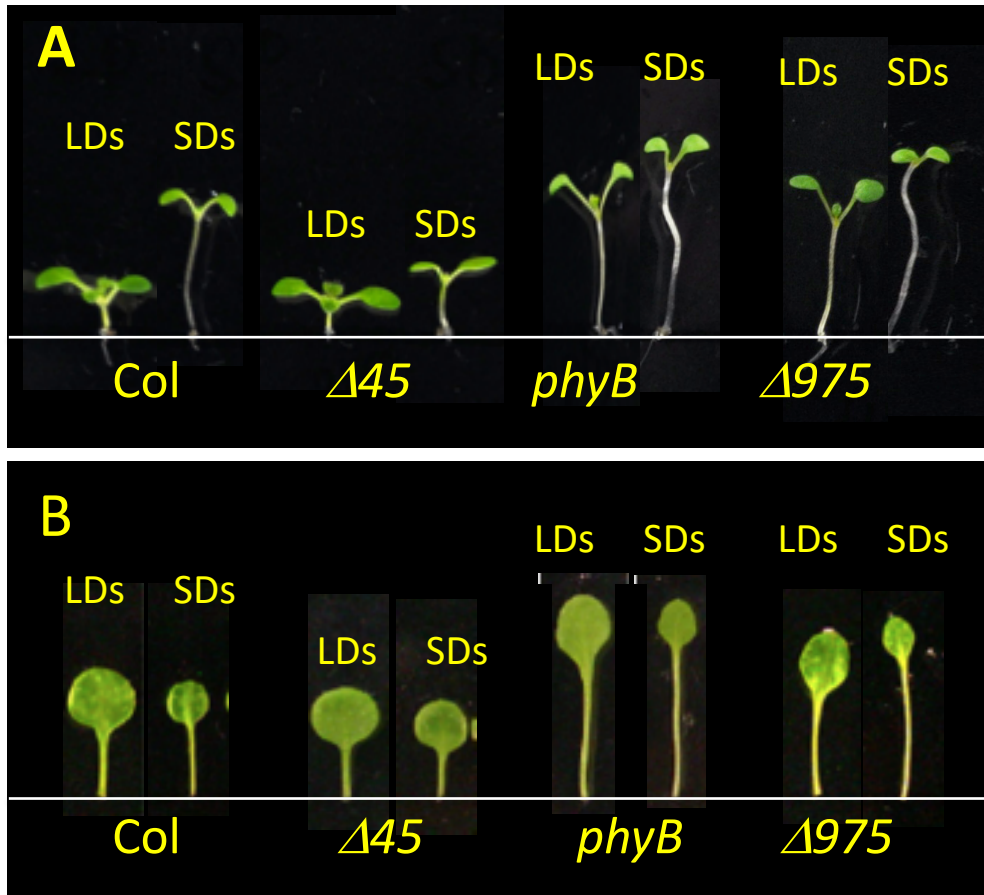


Fig.2 日長変化に対する胚軸、葉柄の伸長応答

野生株(Col-0)及び *pif4 pif5*株(図中では $\Delta 45$ と表記), *phyB*株, *prp9 prp7 prp5*株(図中では $\Delta 975$ と表記)を 22°C白色光 LD(16 時間点灯、8 時間消灯)またはSD(8 時間点灯、16 時間消灯)条件で 8 日間生育し胚軸の長さを比較した(A)。

野生株(Col-0)及び *pif4 pif5*株(図中では $\Delta 45$ と表記)、*phyB*株, *prp9 prp7 prp5*株(図中では $\Delta 975$ と表記)を 22°C白色光 LD(16 時間点灯、8 時間消灯)またはSD(8 時間点灯、16 時間消灯)条件で 21 日間生育した植物の本葉第一葉における葉柄の長さ、葉身の形態を比較した(B)。

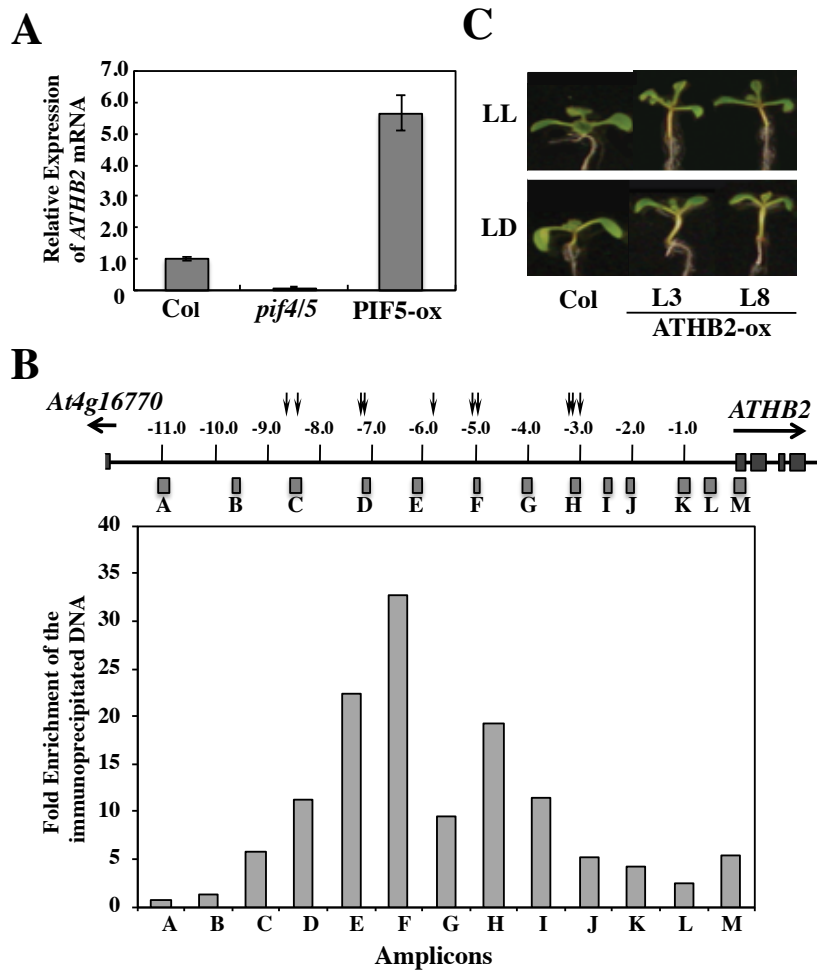


Fig.3 Homeo-box 型転写因子 *ATHB2* の転写は PIF4, PIF5 に直接制御され、胚軸伸長制御に関わる (Kunihiro et al. 2011)

(A) *pif4 pif5* 二重変異株及び PIF5-HA 過剰発現株を白色光 SD(8時間点灯、16時間消灯)条件下で1週間生育し、ZT0における *ATHB2* の mRNA 発現量を比較した結果、*ATHB2* の転写は *PIF4*, *PIF5* に依存的であることが示された。(B) *ATHB2* 翻訳開始点から上流に A-M までのプライマーセットを設計し、PIF5-HA 過剰発現株を用いて ChIP-qPCR 解析を行った。In vivo で PIF5-HA タンパク質の *ATHB2* 上流域への局在が確認された。これらの実験により *ATHB2* は光周性の伸長生長制御における PIF4, 5 の下流因子として直接制御されていることが示唆された。(C) 野生型、*ATHB2* 過剰発現株を白色光 LD(16時間点灯、8時間消灯)および LL(連続光)条件下で1週間生育し、胚軸長を測定し比較した。*ATHB2* 過剰発現株は LL 及び LD のいずれの条件においても野生型と比べて長胚軸の表現型を示す。

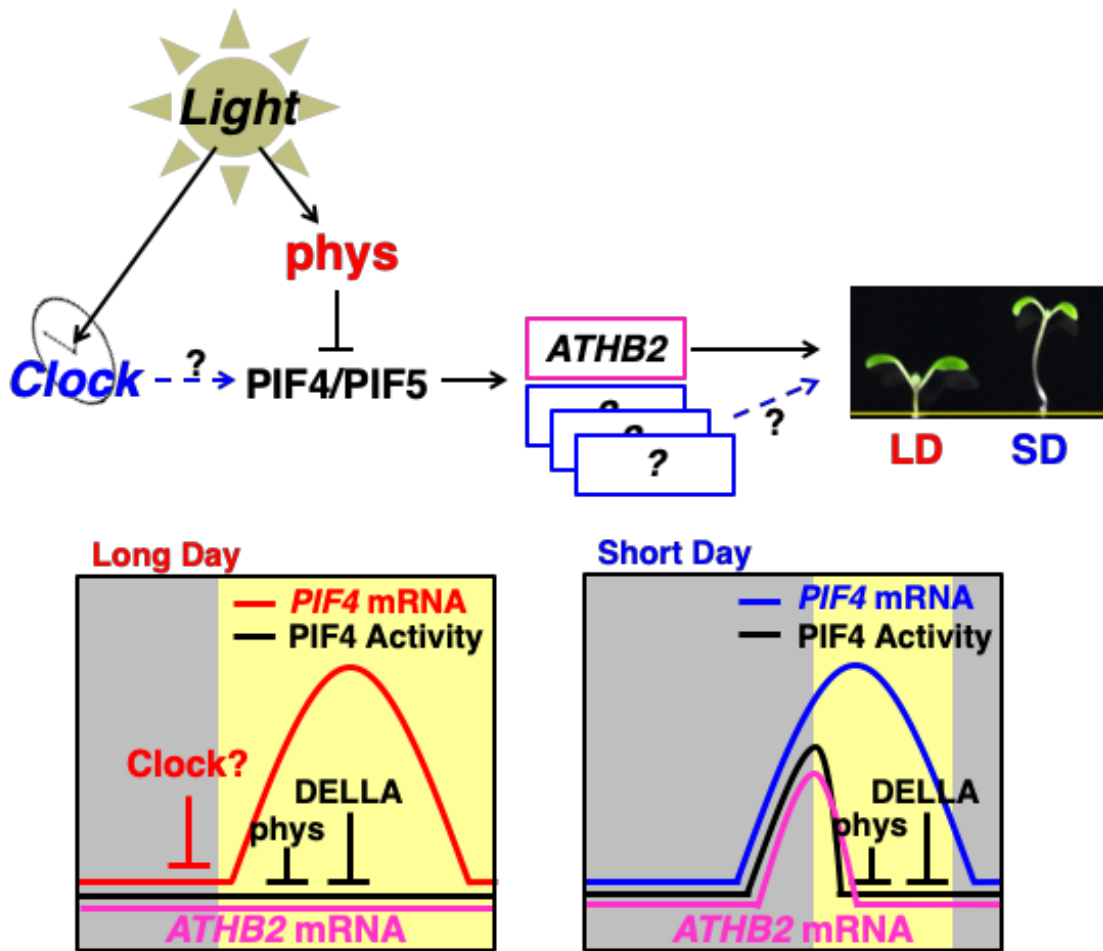


Fig.4 日周性成長制御における外的符合機構

概日時計によって制御される日周性の発現リズムと夜間にも安定に蓄積する性質を併せ持つ転写因子 PIF4 は光周性の胚軸伸長応答を制御する外的符合機構において中心的な役割を果たしている。時計、光(phyB)PIF4 及び下流因子 *ATHB2* からなる外的符合機構を模式的に示す(図下)。それぞれ長日及び短日条件における *PIF4* の mRNA 量(赤、青線)、発現した PIF4 タンパク質全体の転写因子としての活性の強さ(黒線)、下流因子 *ATHB2* の mRNA 量(ピンク線)の一日の推移を示しており、黄色背景は光が点灯している時間帯を示す。

2章. 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

緒言

近年、シロイヌナズナの日長応答を制御する PIF4, 5 の下流因子として所属研究室の先行研究から同定された ATHB2/HAT4 はホメオボックス型転写因子に属し、主に胚軸伸長制御に関わる因子であることが示唆された(Kunihiro et al 2011)。しかしながら *athb2* 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渡る点から、これらの生理応答を単一の転写因子 ATHB2 だけで説明することは難しい。従って光周性の形態形成制御においては単一のマスター因子 FT によって制御される光周性花経路とは異なり、多数の因子が同時に関わっていることが示唆された。

そこで次の研究展開として、PIF4, 5 を中心とした外的符合機構の下流因子の多様性を示すため、ATHB2 と同様に制御される新規下流遺伝子の探索を行うこととした。研究を始めるに当たり、植物ホルモンのシグナル伝達経路が概日時計による光形態形成制御に関わることを示した2つの先行研究に着目した。

- ① Chory らのグループはマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析から、光誘導性のホルモン関連遺伝子の発現が概日時計によって特定の時間帯にゲーティングされることで、種々のホルモンシグナル経路の相互作用を保障し、季節や日照変化に対する応答を強める仕組みを持っていることを示した(Mockler et al . 2007, Michael et al. 2008a, Michael et al. 2008b)。
- ② Maloof らのグループは概日時計、光応答、生長制御に関わる遺伝子の時間特異的発現特性に着目したトランスクリプトーム解析から、PIF4, 5 が植物ホルモンオーキシンのシグナル経路における調節因子として働くことで周期的な胚軸伸長制御に寄与していることを示した(Nozue et al. 2011)。

これらの研究結果から光周性の形態形成において植物ホルモンのシグナル経路の調節が重要な意味を持っており、Maloof らが示したオーキシン経路への関与のみならず、PIF4, 5 が種々の植物ホルモン応答を特定の時間(暗期の後半)に一斉に制御することが植物の形態を多面的に変化する分子基盤となっている事が推測された。

このような背景のもと、本章においては前述した2例を含め、これまでに多くの研究者から公開されたトランスクリプトームデータを利用することで、**光周性の形態形成におけるホルモンシグナル経路の関わりを明確にすることを目標として研究を進めた。**オーキシン、ブラシノステロイド、ジベレリン、エチレン、サイトカイニンといった代表的な植物ホルモンに関わる遺伝子群に着目して個々のトランスクリプトームデータを詳細に解析する事で、光周性の形態形成制御に関わる *PIF4, 5* の新規下流因子の同定を試みるとともに、このような日周性の伸長応答における各ホルモンの役割について考察を行った。

結果

PIF4, 5 下流因子 *ATHB2* の mRNA 発現特性

PIF4, 5 下流新規遺伝子の同定を試みるに当たり、国広らによって日長応答における PIF4, 5 下流因子として同定された *ATHB2* の mRNA 発現特性の解析を行った。*ATHB2* は SD 条件特異的に、また明け方特異的な発現ピークを持ち (Fig.5 C, D)、同条件下における *PIF4* の mRNA 発現量と比較すると *PIF4* の発現が暗期に見られる時間帯と *ATHB2* の発現ピークは一致している (Fig.5 A-D)。また、SD 条件において *pif4 pif5* 欠損株における *ATHB2* の発現を野生株と比較すると、*pif4 pif5* 株においてはこのような SD 条件特異的な発現ピークは消失していた (Fig.5 F)。次に、LD 条件において *phyB* 欠損株、*prp9 prp7 prp5* 欠損株及び *elf3* 欠損株の *ATHB2* 発現量をそれぞれ野生株と比較すると、時計の機能または光特異的な分解制御を欠くこれらの変異株においては、野生株では一日を通して抑制される *ATHB2* の発現が夜間に脱抑制されていることがわかった (Fig.5 E, Fig.6 A, B)。各欠損株における *ATHB2* の発現パターンは同条件下における胚軸伸長の表現型 (Fig.2) とよく合致しており、時計、phyB、PIF4, 5 によって制御される外的符合機構 (Niwa et al. 2009, Kunihiro et al. 2011) の下流因子の予測された典型的発現様式を示した。

公開マイクロアレイデータベースを用いた PIF4, 5 下流候補遺伝子の抽出

光周性の形態形成制御に関わる植物ホルモン関連遺伝子を抽出するにあたり、この現象と同様に phyB-PIF モジュールによって制御される避陰応答に関する研究結果に着目した。植物が日陰から逃れるために起こす急激な伸長反応として古くから研究されてきた避陰応答において、植物は光に含まれる赤色光と遠赤色光の比率を感知していると考えられており (Ruberti et al. 2011, Casal 2012) この応答機構においても phyB とともに PIF4 及び *ATHB2* が関与することが報告されている (Steindler et al. 1999, Lorrain et al. 2008)。実験的にも *ATHB2* の mRNA 発現は遠赤色光の照射によって PIF4, 5 に依存的に短時間での誘導が確認できた (Fig.7 B) 事から、日長応答に関わる PIF4 下流遺伝子もまた遠赤色光による mRNA 発現誘導を受けると仮定した。この仮定に基づき、公開されているトランスクリプトームデータの中から、多数の報告がある各種の遠赤色光照射条件 (Sessa et al. 2005, Carabelli et al. 2007, Kozuka et al. 2010, Lin et al. 2012) 及び PIF ファミリー因子の欠損変異株を用いたトランスクリプトームデータ (Leivar et al. 2009, Leivar et al. 2012, Hornitschek et al. 2012) を参照した。各データベースから高い応答性を示す遺伝子リストを取得し、対照とした *ATHB2* がすべてのリストに含まれることを確認した上で、植物ホルモンのシグナル伝

達に関わる遺伝子を抽出した結果、オーキシンに関わる遺伝子群から *GH3.5*, *IAA19*, *IAA29* の 3 遺伝子、ブラシノステロイドに関わる遺伝子群から *BR6ox2*, *BAS1*, *BIM1* の 3 遺伝子、ジベレリンに関わる *GAI*、エチレンに関わる *ACS8*、サイトカイニンに関わる *CKX5* が得られた (**Table.1**)。得られた候補遺伝子は各植物ホルモンの生合成、分解及びシグナル伝達などそれぞれのホルモンシグナル経路における様々な機能に関わるものであった。この結果をもとに、以降の実験において個々の遺伝子発現パターンの詳細な解析を行い、日長応答における PIF4, 5 下流因子としての性質を満たすものであるか検討を進めた。

候補遺伝子の遠赤色光誘導性発現

以降の実験における PIF4, 5 下流因子の発現特性におけるポジティブコントロールとして *ATHB2* を、ネガティブコントロールとして候補因子に含まれず、また PIF4 非依存的に避陰応答に関与する事が報告されているオーキシン生合成遺伝子 *TAA1* (Tao et al. 2008) を用いた。候補遺伝子の遠赤色光誘導性を確認する為、q-PCR 法を用いて野生株及び *pif4 pif5* 欠損株を用い LL 条件で 8 日間生育した植物における遠赤色光照射後 6 時間までの各候補遺伝子の mRNA 発現量の変化を観察した。結果として野生株においてすべての候補遺伝子において遠赤色光照射後 1 時間での mRNA 発現量の増加が確認された。また、*BAS1* を除く候補因子における発現誘導は PIF4, 5 に依存的であった (**Fig.7 D-L**)。

日長変化に対する候補遺伝子の発現特性

候補遺伝子の日長に対する発現特異性を調べるため、22°C 白色光 LD または SD 条件で 8 日間生育した植物を 3 時間毎にサンプリングし、q-PCR 法を用いて各候補遺伝子の mRNA 発現量解析を行った。結果として *BAS1* を除く候補遺伝子において *ATHB2* と同様に SD 条件の暗期後半に特異的なピークを持つ発現が確認された (**Fig8 D-L**)。次に、Fig.8 で観察された各候補遺伝子の SD 条件特異的な発現ピークが PIF4, 5 に依存することを確認するため *pif4 pif5* 株を用いて SD 条件における発現を比較すると、すべての候補遺伝子について *pif4 pif5* 株では発現ピークの著しい減少が観察された (**Fig.9 D-L**)。また、Fig.9 の結果を補足する実験として野生株 (Col-0)、*pif4 pif5* 株、PIF4 過剰発現株 (*4-ox*) を 22°C SD 条件で 8 日間生育し、点灯の直前 (ZT0) にサンプリングして各遺伝子の mRNA 発現量を比較した。結果として PIF4 の発現量と各候補遺伝子の発現量の間には明確な正の相関が確認された (**Fig.10 D-L**)。これまでの発現解析結果から、候補として挙げられたホルモン関連遺伝子のうち *BAS1* を除いたものを日周性の形態形成の形態形成制御における PIF4, 5 の下流因子としての性質を満たすものであると結論付けた。

光入力、時計の機能欠損株における表現型と新規下流因子の発現

1章において述べたように、外的符合モデルの根幹をなす光入力、時計の機能欠損は伸長応答におけるSD条件特異性の消失に結びつくことがわかっている。このような表現型に、新たに同定された下流因子が寄与することを明示するため、光周性の形態制御における光入力系の機能を担う *PHYB* の欠損変異株を用いて新規下流遺伝子のLD条件でのmRNA発現量をq-PCR法により野生型と比較した。*phyB*株における *PIF4* のmRNA発現量はLD条件であっても暗期の後半から増加しており、これに伴って *ATHB2* の発現にSD条件特異性が無くなっていた。また、*phyB*株では明期においても低いレベルながら *ATHB2* の発現が観察され、*PIF4* の転写がなくなる明期の後半まで継続した(Fig.11 A, B)。新たに下流因子として同定された各ホルモン関連遺伝子の発現は *ATHB2* と同様に *phyB*株においてLDにおいても暗期後半の発現ピークが見られ、明期においても弱い発現が観察される点で共通していた。このことは *phyB* が概日時計における光同調機構と明期における *PIF4, 5* 活性調節の両面に寄与することを示している。次に、明暗周期下においても概日リズムが欠失している *prp9prp7prp5* 欠損株を用いて新規下流遺伝子のLD条件でのmRNA発現量をq-PCR法により野生型と比較した。*prp9prp7prp5*株における *PIF4* のmRNA発現量は野生株に対して常に非常に高い値を示し、これを反映して多くのホルモン関連遺伝子において *ATHB2* と同様にLD条件の暗期全体で高い発現が観察された(Fig.12 A-L)。*phyB*株、*prp9prp7prp5*株における *PIF4, 5* 下流遺伝子の非特異的なmRNA発現はLD条件における長胚軸の表現型(Fig.2)とよく合致しており、またその発現誘導されるタイミングの違いが外的符合機構における *phyB*、時計の役割を反映するものであったことは、*ATHB2* だけでなくこれらの植物ホルモン関連遺伝子群が外的符合機構によってひとまとまりに発現することで栄養成長期における様々な形態形成の変化を制御していることを強く支持するものであった。

PIF4, 5 下流の非ホルモン関連候補遺伝子

これまでの実験結果より、光周性の形態制御において多くの植物ホルモン関連遺伝子の発現が外的符合機構によって制御されていることを示してきた。しかしながら同定された遺伝子群には伸長応答を正に制御すると考えられるもの、負に制御すると考えられるものの両方を含み、これらの植物ホルモン情報伝達系がどのように相互作用して植物の形態形成を制御しているかという点に関しては不明な点が多く残されており、今後の更なる研究の進展が待たれる。一方でトランスクリプトーム解析から得られた *PIF4, 5* 下流候補遺伝子の中にはホルモンシグナル経路とは直接関わらないものの、伸長応答に必要な細胞壁合成に

関わる複数の遺伝子が含まれていた。胚軸伸長は主に胚軸を構成する個々の細胞の鉛直方向への細胞伸長によって引き起こされる現象であり、この時新規に細胞壁を合成する細胞壁合成酵素や修飾酵素が重要な役割を果たしている事が知られている。これらの遺伝子もまた、PIF4, 5 に直接的に制御されている可能性を検討するため、細胞伸長に関わる遺伝子群に着目してデータベースを再度検証したところ、*XTH15*, *EXPA8*, *LNG2*, *LTP3* という4つの候補遺伝子を抽出することができた(**Table.1**)。qPCR法を用いて遠赤色光によるこれらの遺伝子の mRNA 発現誘導性を確認した結果、これらのうち *XTH15* のみが *PIF4*, *5* に依存的な発現誘導性を示した(**Fig.13 A-D**)。これを受け、対象を *XTH15* に絞って日長変化及び *phyB*, *prp9 prp7 prp5* 欠損変異株における発現解析を行ったところ、細胞壁修飾酵素をコードする *XTH15* 遺伝子もまた外的符合機構によって PIF4, 5 に直接制御されている事がわかった(**Fig.13 E-H**)。

日長変化に対する PIF4 タンパク質の蓄積量の変化

これまで mRNA 発現量を指標として検討を行ってきたが、*PIF4* の mRNA 発現と実際のタンパク質蓄積量の間どの程度の整合性があるかという点に関しては疑問が残る。そこで mRNA 発現解析の補足として、日長変化に対する PIF4 タンパク質の蓄積量の変化を確認するため、ウェスタンブロッティングの実験を行った。PIF4:PIF4-HA/*pif4* 株を 22°C 白色光 LD(16 時間点灯 8 時間消灯)または SD(8 時間点灯 16 時間消灯)条件下で 10 日間生育し 3 時間おきにサンプリングした。粗抽出液を SDS-PAGE によって分離し、PVDF メンブレンに転写後、ペルオキシダーゼ標識された Anti-HA モノクローナル抗体(3F10)を用いて PIF4-HA タンパク質の蓄積量の変化を検出した(**Fig.14**)。PIF4-HA タンパク質の蓄積量の変化は同じ条件で行った mRNA 発現解析の結果(**Fig.5A, B**)とよく合致しており、SD 条件においては ZT21 から ZT0 にかけて PIF4 タンパク質の強い蓄積が見られた。このタンパク質の蓄積量のピークは *PIF4* 下流遺伝子 *ATHB2* の発現ピークと合致しており、これまでの mRNA 発現解析の結果との整合性を確認することができた。また、明期での *ATHB2* の発現は強く抑制されているにもかかわらず、PIF4 タンパク質の蓄積が明期を通して観察されることから、日中に発現した PIF4 タンパク質は *phyB* による分解制御を受けると同時に、DELLA 等の相互作用によって活性レベルで強い抑制作用を受けている事が示唆された。

考察

植物は概日時計によって日の長さを測ることができる。概日時計の生理学的な役割として最もよく知られる現象は日長応答性の栄養成長から生殖成長への転換(光周性花成)である。シロイヌナズナの光周性花成制御において *CO* 遺伝子が重要な役割を果たしている (Putterill et al. 1995, Wenkel et al. 2006)。 *CO* の転写は概日時計によって制御された日周性のリズムを持ち、**長日条件下においては明期の終わりから暗期**にかけて発現するのに対し、**短日条件下においては暗期**に限定される (Yanovsky and Kay 2003, Sawa et al. 2007)。 *CO* タンパク質は明条件下で活性化し、暗条件下では E3 リガーゼ COP1 による分解制御を受ける性質を持つため長日条件の日中にのみ転写因子として *FT* 遺伝子の発現を誘導することができる (Jang et al. 2008)。葉で作られた *FT* タンパク質は茎頂へと移動し茎頂分裂組織の分化を誘導する (Corbesier and Coupland 2006)。このように概日時計によって形成される内生の転写リズムの位相と明暗周期における明期の位相との符合によって成立する *CO-FT* 経路は外的符合機構の典型例である (Imaizumi and Kay 2006, Fornara et al. 2010, Imaizumi 2010)。

近年、概日時計によって制御される光周性応答のひとつとして、植物の栄養成長期における光周性の形態形成制御もまた外的符合機構によって説明できることが報告された (Nozue et al. 2007, Niwa et al. 2009)。光周性の形態制御におけるキー因子は *PIF4, 5* 遺伝子 (Duek and Fankhauser 2005, Monte et al. 2007) であり、これらもまた概日時計によって制御される転写リズムを持っている (Yamashino et al. 2004)。 *CO* とは対照的に、 *PIF4, 5* の転写は**短日条件下においては暗期の終わりから明期**にかけて起こるのに対し、**長日条件下においては明期**に限定される (Niwa et al. 2009)。 *PIF4, 5* タンパク質は暗条件下で活性化し、明条件下では *phyB* によって光依存的な分解制御を受ける性質をもつ (Huq and Quail 2002, Khanna et al. 2004)。更に、残存した *PIF4, 5* タンパク質は *DELLA* タンパク質による相互作用によって不活性化される (de Lucas et al. 2008)。

このように *PIF4, 5* による光周性の形態制御と *CO* による花成制御は対称的な関係にあると言えるが、これまで *PIF4, 5* の下流因子に関する知見は限られていた。そこで本章では光周性応答における *PIF4, 5* の下流因子として多くの植物ホルモン関連遺伝子を同定し、概日時計によって制御される転写因子 *PIF4, 5* が植物ホルモンのネットワークを介して植物の形態を多面的に制御していることを明らかにした。同定された *PIF4, 5* 下流因子にはオーキシンだけでなく、ブラシノステロイド、ジベレリン、エチレン、サイトカイニンといった様々な植物ホルモンのシグナル伝達系を構成する遺伝子が含まれていたが、行ったいくつかの実験条件においては他とは異なる挙動を示すものがあつた (**Fig.8 H, 12 I**)。この

事から、植物は光周性形態制御において、外的符合機構による日長感知と、各シグナル経路における個別の制御とを組み合わせることで、より複雑な形態変化を可能としている事が伺える。

下流因子として同定されたホルモン関連遺伝子はいずれも大きなファミリーに属するものであった。一例として *GH3.5* は IAA アミド合成酵素をコードする GH3 遺伝子ファミリーに属しており、同ファミリーに属する *GH3.1*, *GH3.2* 等のホモログ遺伝子が同様の発現特性を示すか、という点は興味深い。マイクロアレイデータベース DIURNAL(http://diurnal.mocklerlab.org/diurnal_data_finders/new) を用いて検証を行ったところ、*GH3.5* はファミリーの他の遺伝子と比較して短日条件の暗期後半に特異的な発現ピークを示すが、*GH3.2*, *GH3.3* についても弱いながらも似たような特徴が見られた(Fig.16 A)。同様に *IAA29*(Fig.16 B)、*BR6ox2* 及び *BIM*(Fig.S17 A)、*GAI*(Fig.17 B)、*ACS8*(Fig.18 A)、*CKX5*(Fig.18B) のホモログ遺伝子について検討を行った結果、このような暗期後半にピークを持つ発現様式はそれぞれのファミリーの中でも非常に特徴的なものであることが分かった。この結果は植物ホルモンのシグナル伝達系においてこれらの遺伝子が光周性応答のためにファミリーの中でも特異的な機能を担っていることを示している。

同定された下流因子とシロイヌナズナの形態形成との関わりについて、これまでに報告された知見の一部を以下に示す。*GH3.5* 過剰発現株は短胚軸の表現型を示し(Park et al. 2007)、*iaa19* 欠損株では胚軸伸長においてオーキシン非感受性となる(Tatematsu et al. 2004)。*gai* 欠損株は短胚軸の表現型を示す(Lee et al. 2006)。また、*GAI* は DELLA タンパク質の一つであり、直接的な相互作用によって *PIF4* の機能を阻害する(de Lucas et al. 2008)。*BAS1* の過剰発現は *phyB* 欠損による長胚軸の表現型を抑制する(Neff et al, 1999)。これらの知見はオーキシン、ブラシノステロイド、ジベレリンが植物の生長を制御するホルモンとしてよく知られているという事実とも合致する(Mockaitis and Estelle 2008, Lau and Deng 2010, Gudesblat and Russinova 2011)。

本章における興味深い発見として、一般に伸長応答と結び付けられることの少ないエチレンやサイトカイニンのシグナル経路を構成する *ACS8*, *CKX5* もまた *PIF4, 5* の下流因子として同定された点が挙げられる。このことはこれらのホルモン関連遺伝子についてもシロイヌナズナにおける光応答性の形態制御に関わるといういくつかの報告とも一致している(Golan et al. 1996, Zhong et al. 2009)。総括として、同定されたホルモン関連遺伝子は何らかの形で胚軸伸長に関わっているものの、伸長生長を正に制御するものとフィードバック制御に関わると考えられる抑制的作用を示すものが同時に含まれていることがわかる。この事

からも形態制御におけるこれらの遺伝子の協調的な働きを一意的にとらえることは難しく、今後の更なる研究が必要であろう。

本章において同定された PIF4, 5 下流遺伝子群が直接の標的であるかという点に関しては検討の余地が残されている。これに関しては、国広らの行った研究により PIF5 タンパク質が *ATHB2* のプロモータ領域に結合することが報告されている。また Fankhauser らのグループによる ChIP-sequence 解析によって PIF5 タンパク質が *IAA29* 遺伝子を含む一連のオーキシン合成やシグナル伝達に関わる遺伝子群のプロモータ領域に結合することが示されている (Hornitschek et al. 2012)。ごく最近、新たに PIF4 を用いた ChIP-sequence 解析も行われており (Bai et al. 2012, Oh et al. 2012)、PIF4 の直接的な標的遺伝子が網羅的に明らかとなってきた。この解析結果を参照すると、*ATHB2*, *IAA19*, *IAA29*, *GH3.5*, *BR6ox2*, *BAS1*, *BIM1*, *GAI*, *ACS8*, *CKX5*, *XTH15* が含まれて (Oh et al. 2012; Supplementary table2) おり、本章において同定された下流因子は PIF4, 5 によって直接制御される因子であることが示されている。

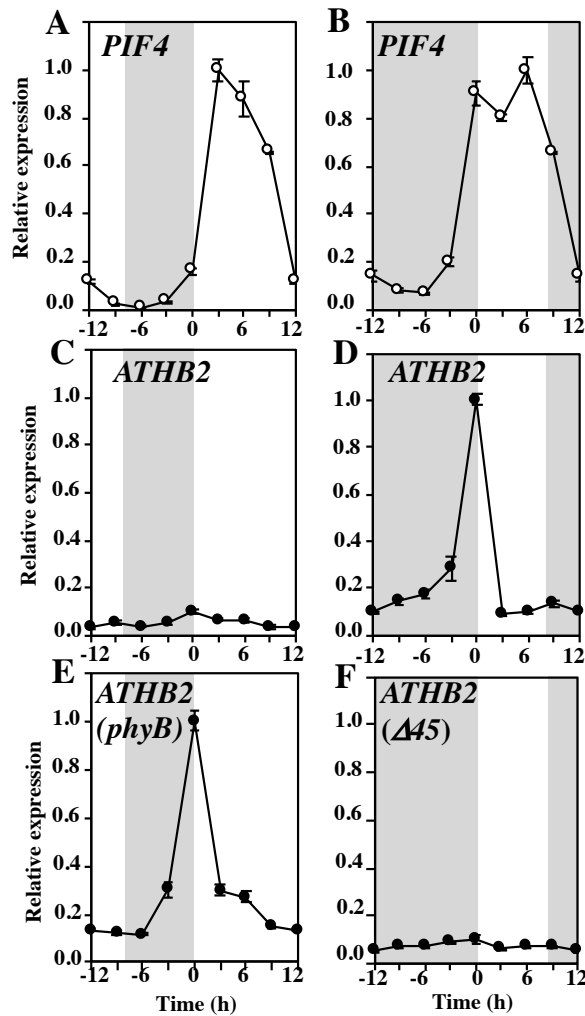


Fig.5 日長変化に対する *PIF4* 及び下流因子 *ATHB2* の発現特性

野生株(Col-0)及び *phyB*, *pif4 pif5* 株(図中では $\Delta 45$ と表記)を 22°C白色光 LD または SD 条件の下で 8 日間生育し、3 時間おきにサンプリングした。定量 RT-PCR 法を用いて *PIF4*, *ATHB2* の mRNA 発現量を調べた。A,C,E は LD 条件で生育した植物における各遺伝子発現量の測定値を示し B,D,F は SD 条件で生育した植物における測定値を示す。また、E,F はそれぞれ *phyB* 株, *pif4 pif5* 株における測定値を示す。3 連で行った定量の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量で補正したものを各点の値として示し、標準誤差(SD)をエラーバーで示す。生育条件において点灯していた時間帯を白、消灯していた時間帯をグレーの背景で示す。

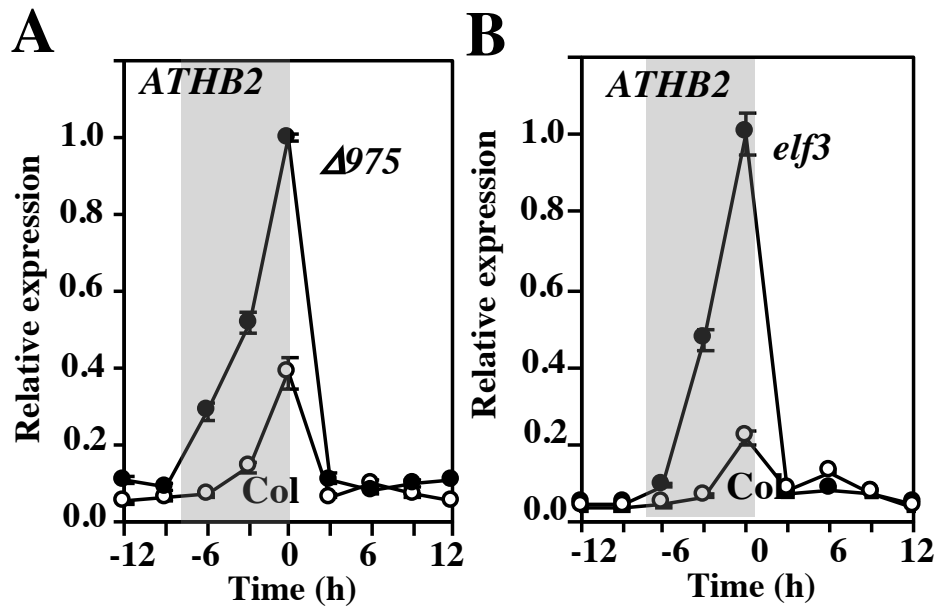


Fig.6 *ATHB2* の mRNA 発現に対する時計関連遺伝子の影響

野生株(Col-0)及び *prp9 prp7 prp5* 株 ($\Delta 975$), *elf3* 株を 22°C 白色光 LD 条件の下で 8 日間生育し、3 時間おきにサンプリングした。定量 RT-PCR 法を用いて *ATHB2* の mRNA 発現量を調べた。3 連で行った定量の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量で補正したものを各点の値として示し、標準誤差(SD)をエラーバーで示す。生育条件において点灯していた時間帯を白、消灯していた時間帯をグレーの背景で示す。

Table.1 抽出された全候補遺伝子リスト

<i>ATHB2</i>	(AT4G16780)	<i>ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 2</i>
<i>TAA1</i>	(AT1G70560)	<i>TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1</i>
<i>GH3.5</i>	(AT4G27260)	<i>Indole-3-acetic acid amido synthase family</i>
<i>IAA19</i>	(AT3G15540)	<i>INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 19</i>
<i>IAA29</i>	(AT4G32280)	<i>INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 29</i>
<i>BR6ox2</i>	(AT3G30180)	<i>BRASSINOSTEROID-6-OXIDASE 2</i>
<i>BAS1</i>	(AT2G26710)	<i>PHYB ACTIVATION TAGGED SUPPRESSOR 1</i>
<i>BIM1</i>	(AT5G08130)	<i>BES1-INTERACTING Myc-LIKE 1</i>
<i>GAI</i>	(AT1G14920)	<i>GIBBERELIC ACID INSENSITIVE</i>
<i>ACS8</i>	(AT4G37770)	<i>1-AMINO-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 8</i>
<i>CKX5</i>	(AT1G75450)	<i>CYTOKININ OXIDASE 5</i>
<i>XTH15</i>	(AT4G14130)	<i>XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE</i>
<i>EXPA8</i>	(AT2G40610)	<i>EXPANSIN A8</i>
<i>LNG2</i>	(AT3G02170)	<i>LONGIFOLIA2</i>
<i>LTP3</i>	(AT5G59320)	<i>LIPID TRANSFER PROTEIN 3</i>

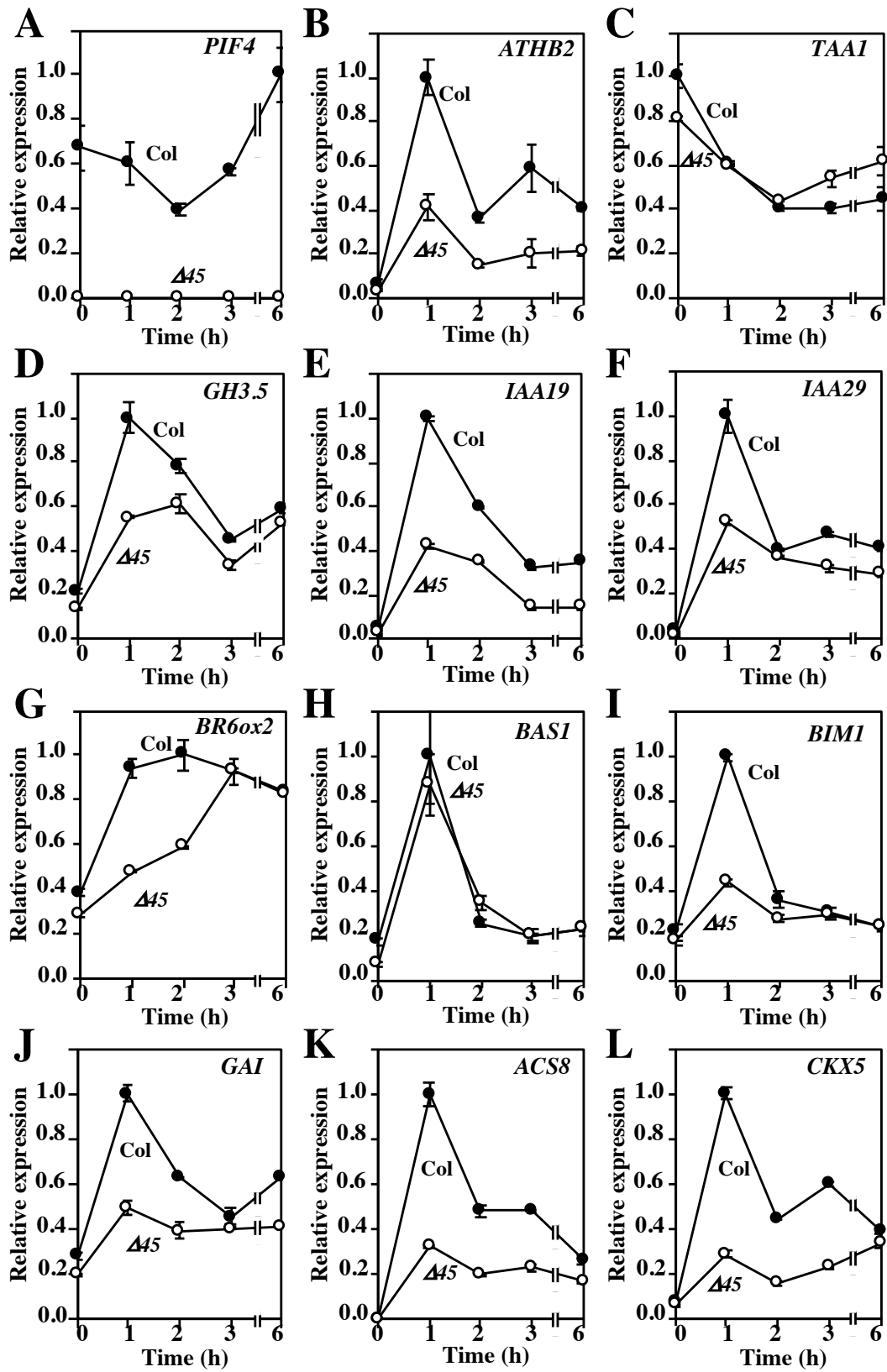


Fig.7 PIF4 下流候補遺伝子の遠赤色光誘導性

野生株(Col-0)及び *pif4 pif5* 株(図中では $\Delta 45$ と表記)を 22°C 白色光 LL(連続光)条件下で 8 日間生育した後、遠赤色光を照射して 1, 2, 3 及び 6 時間後の各点においてサンプリングを行った。定量 RT-PCR 法を用いて *ATHB2* 及び各候補遺伝子の mRNA 発現量を調べた。*PIF4*, *ATHB2*, *TAA1*, *GH3.5*, *IAA19*, *IAA29*, *BR6ox2*, *BAS1*, *BIM1*, *GAI*, *ACS8*, *CKX5* の各遺伝子について、野生株における測定値を黒、*pif4 pif5* 株の測定値を白の点で示す。3 連で行った定量の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量で補正したものを各点の値として示し、標準誤差(SD)をエラーバーで示す。

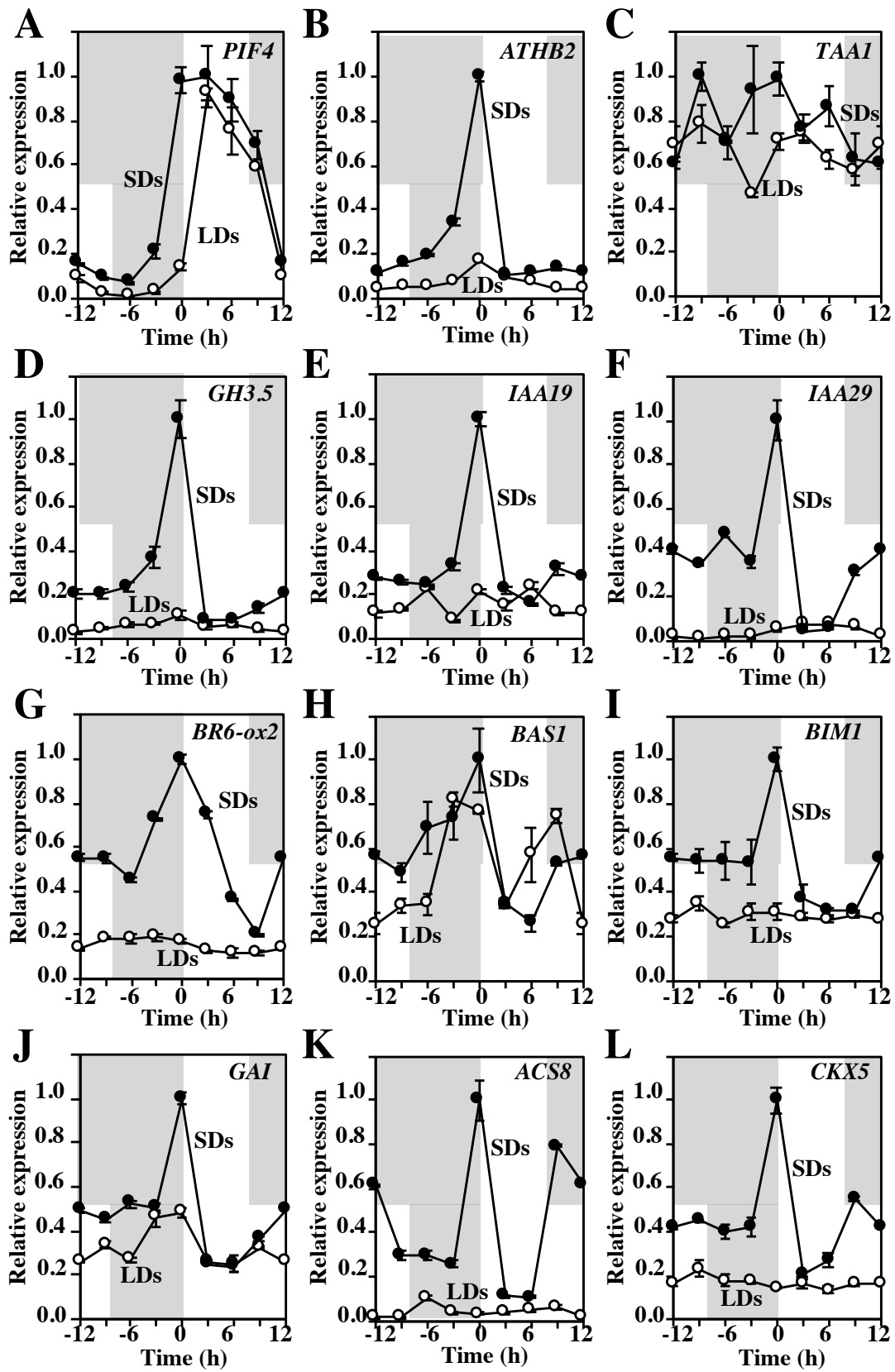


Fig.8 PIF4 下流候補遺伝子の日長変化に対する発現特性

野生株(Col-0)を 22°C白色光 LD または SD 条件下で 8 日間生育し、3 時間おきにサンプリングした。定量 RT-PCR 法を用いて *PIF4* 及び各候補遺伝子の mRNA 発現量を調べた。*PIF4*, *ATHB2*, *TAA1*, *GH3.5*, *IAA19*, *IAA29*, *BR6ox2*, *BAS1*, *BIM1*, *GAI*, *ACS8*, *CKX5* の各遺伝子について LD 条件での測定値を白、SD 条件での測定値を黒の点で示す。3 連で行った定量の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量で補正したものを各点の値として示し、標準誤差(SD)をエラーバーで示す。生育条件において点灯していた時間帯を白、消灯していた時間帯をグレーの背景で示す(各グラフについて背景の上半分が SD, 下半分が LD における光条件)。

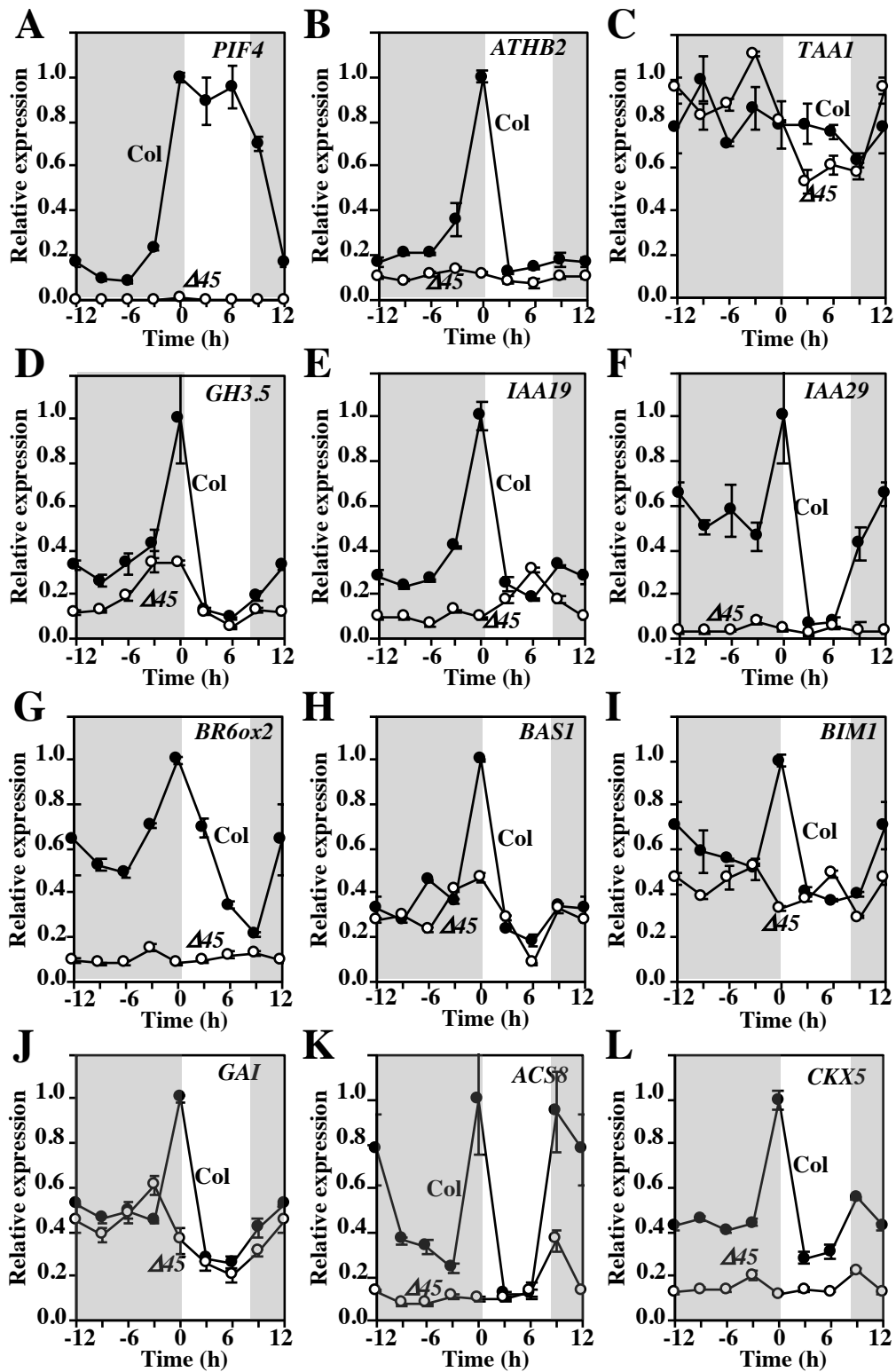


Fig.9 PIF4 下流候補遺伝子の発現に対する *PIF4, 5* 依存性①

野生株(Col-0)及び *pif4 pif5* 株 ($\Delta 45$)を 22°C 白色光 SD 条件下で 8 日間生育し、3 時間おきにサンプリングした。定量 RT-PCR 法を用いて *PIF4* 及び各候補遺伝子の mRNA 発現量を調べた。*PIF4, ATHB2, TAA1, GH3.5, IAA19, IAA29, BR6ox2, BAS1, BIM1, GAI, ACS8, CKX5* の各遺伝子について野生株の測定値を黒、*pif4 pif5* 株の測定値を白の点で示す。3 連で行った定量の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量で補正したものを各点の値として示し、標準誤差(SD)をエラーバーで示す。生育条件において点灯していた時間帯を白、消灯していた時間帯をグレーの背景で示す。

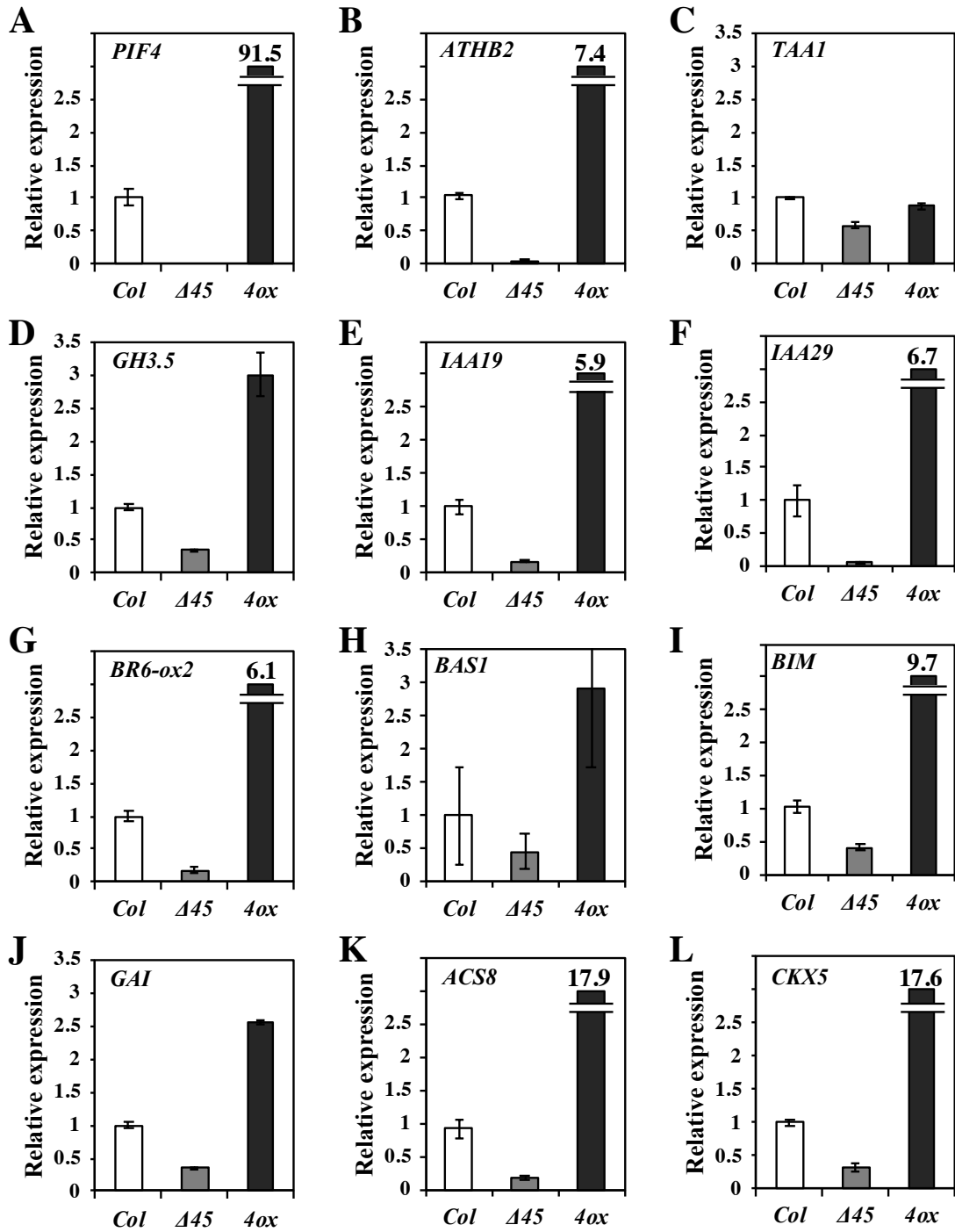


Fig.10 PIF4 下流候補遺伝子の発現に対する *PIF4, 5* 依存性②

野生株(Col-0), *pif4 pif5* 株 ($\Delta 45$), PIF4 過剰発現株 (*4ox*)を 22°C白色光 SD 条件下で 8 日間生育し ZT0 でサンプリングした。定量 RT-PCR 法を用いて *PIF4* 及び各候補遺伝子の mRNA 発現量を調べた。3 連で行った定量の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量で補正したものを各点の値として示し、標準誤差(SD)をエラーバーで示す。

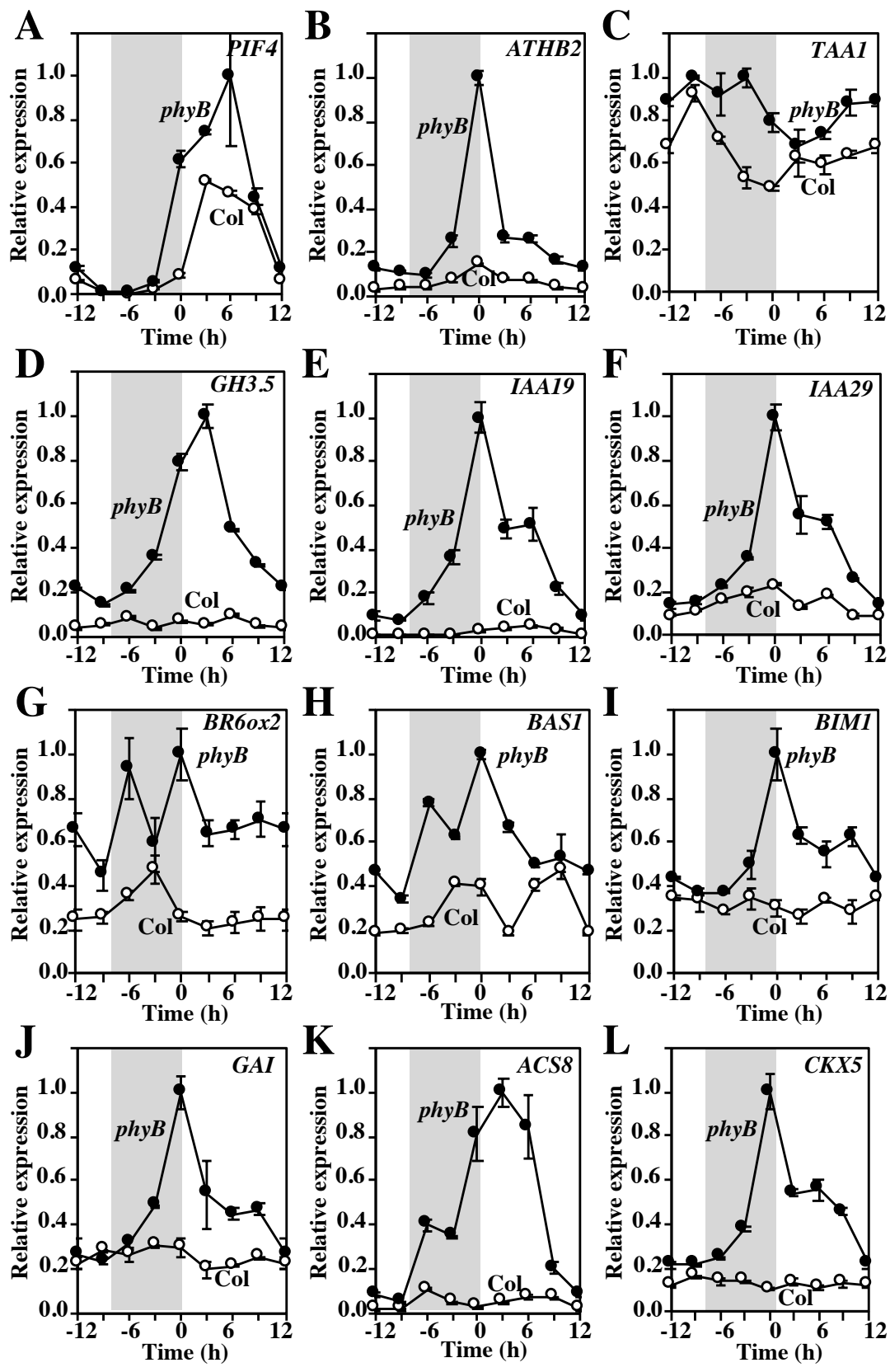


Fig.11 *phyB*欠損変異株における PIF4 下流候補遺伝子の発現特性

野生株(Col-0)及び *phyB*株を 22°C白色光 LD 条件下で 8 日間生育し、3 時間おきにサンプリングした。定量 RT-PCT 法を用いて *PIF4* 及び各候補遺伝子の mRNA 発現量を調べた。*PIF4*, *ATHB2*, *TAA1*, *GH3.5*, *IAA19*, *29*, *BR6ox2*, *BAS1*, *BIM1*, *GAI*, *ACS8*, *CKX5*の各遺伝子について野生株における測定値を白、*phyB*株における測定値を黒の点で示す。3 連で行った定量の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量で補正したものを各点の値として示し、標準誤差(SD)をエラーバーで示す。生育条件において点灯していた時間帯を白、消灯していた時間帯をグレーの背景で示す。

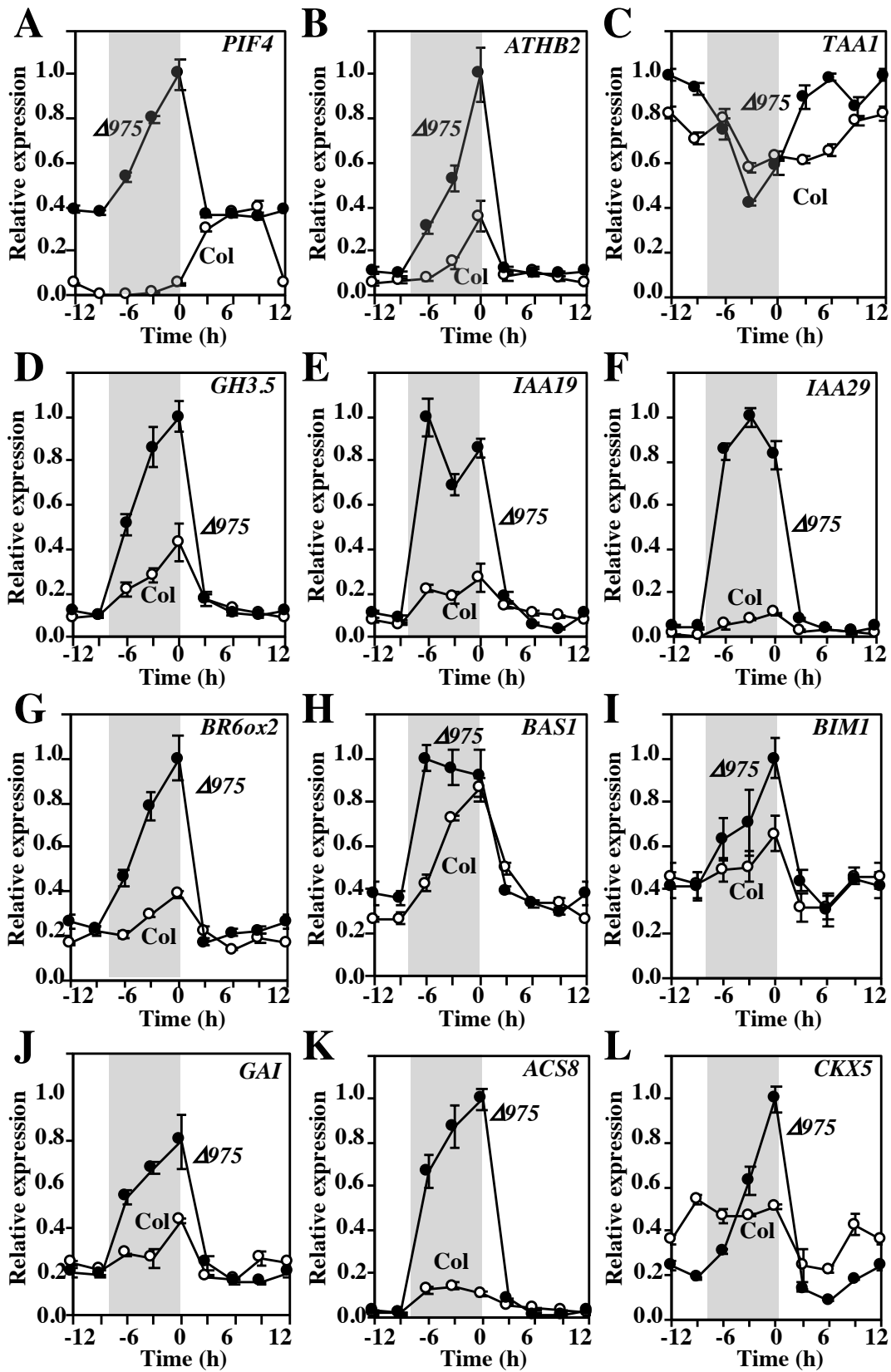


Fig.12 *prp9 prp7 prp5*欠損株における PIF4 下流候補遺伝子の発現特性

野生株(Col-0)及び *prp9 prp7 prp5*($\Delta 975$)株を 22°C白色光 LD 条件下で 8 日間生育し、3 時間おきにサンプリングした。定量 RT-PCT 法を用いて PIF4 及び各候補遺伝子の mRNA 発現量を調べた。*PIF4, ATHB2, TAA1, GH3.5, IAA19, 29, BR6ox2, BAS1, BIM1, GAI, ACS8, CKX5*の各遺伝子について野生株における測定値を白、 $\Delta 975$ 株における測定値を黒の点で示す。3 連で行った定量の平均値を APX3 遺伝子の発現量で補正したものを各点の値として示し、標準誤差(SD)をエラーバーで示す。生育条件において点灯していた時間帯を白、消灯していた時間帯をグレーの背景で示す。

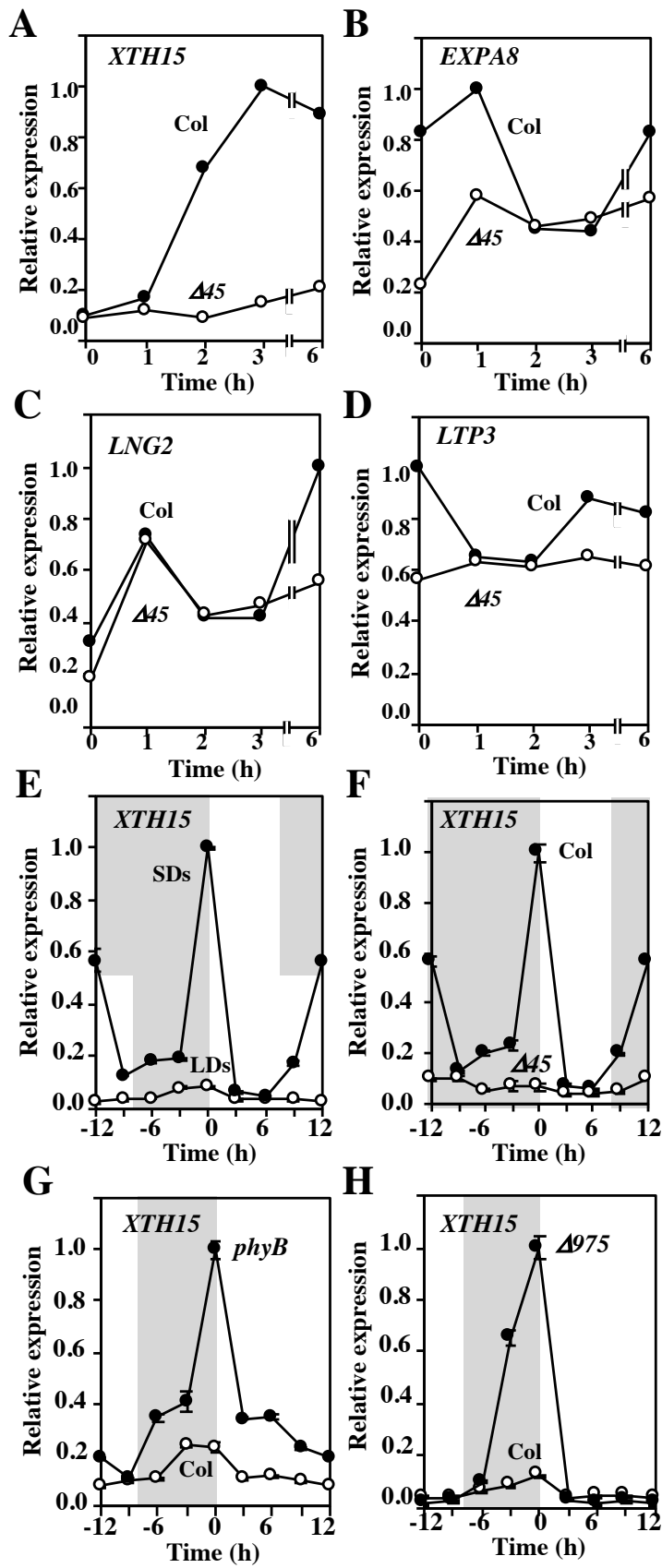


Fig.13 細胞壁合成に関わる PIF4 下流候補遺伝子の発現特性

(A-D) 野生株(Col-0)及び *pif4 pif5*株(図中では $\Delta 45$ と表記)を 22°C白色光 LL(連続光)条件下で8日間生育した後、遠赤色光を照射して1, 2, 3及び6時間後の各点においてサンプリングを行った。定量 RT-PCR 法を用いて候補遺伝子 *XTH15*, *EXPA8*, *LNG2*, *LTP3* の mRNA 発現量を調べた。

(E, F) 野生株(Col-0)を 22°C白色光 LD または SD 条件下で8日間生育し、3時間おきにサンプリングした。定量 RT-PCR 法を用いて *XTH15* の mRNA 発現量を調べた。

(G, H) 野生株及び *phyB*株, *prp9 prp7 prp5*株 ($\Delta 975$)を 22°C白色光 LD 条件下で8日間生育し、3時間おきにサンプリングを行った。定量 RT-PCR 法を用いて *XTH15* の mRNA 発現量を調べた。

3連で行った定量の平均値を APX3 遺伝子の発現量で補正したものを各点の値として示し、標準誤差(SD)をエラーバーで示す。生育条件において点灯していた時間帯を白、消灯していた時間帯をグレーの背景で示す。

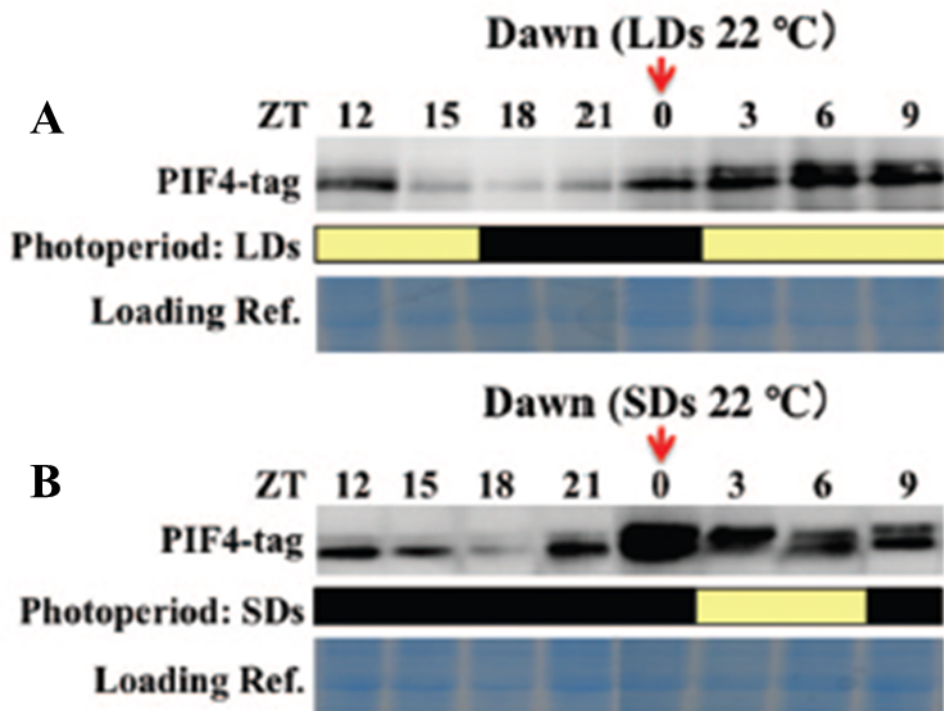


Fig.14 日長による PIF4 タンパク質蓄積量の変化

PIF4-HA/*pif4* 株を 22°C 白色光 LD(16 時間点灯 8 時間消灯)または SD(8 時間点灯 16 時間消灯)条件で 10 日間生育し、3 時間おきにサンプリングした。粗抽出液を SDS-PAGE によって分離し、CBB 染色によって全タンパクを検出した後 PVDF メンブレンに転写した。ペルオキシダーゼ標識された Anti-HA モノクローナル抗体(3F10)を用い PIF4-HA タンパク質の蓄積量の変化を観察した。生育条件において黄色いボックスで示した部分は光照射している時間帯、黒で示した部分は消灯している時間帯を示す。

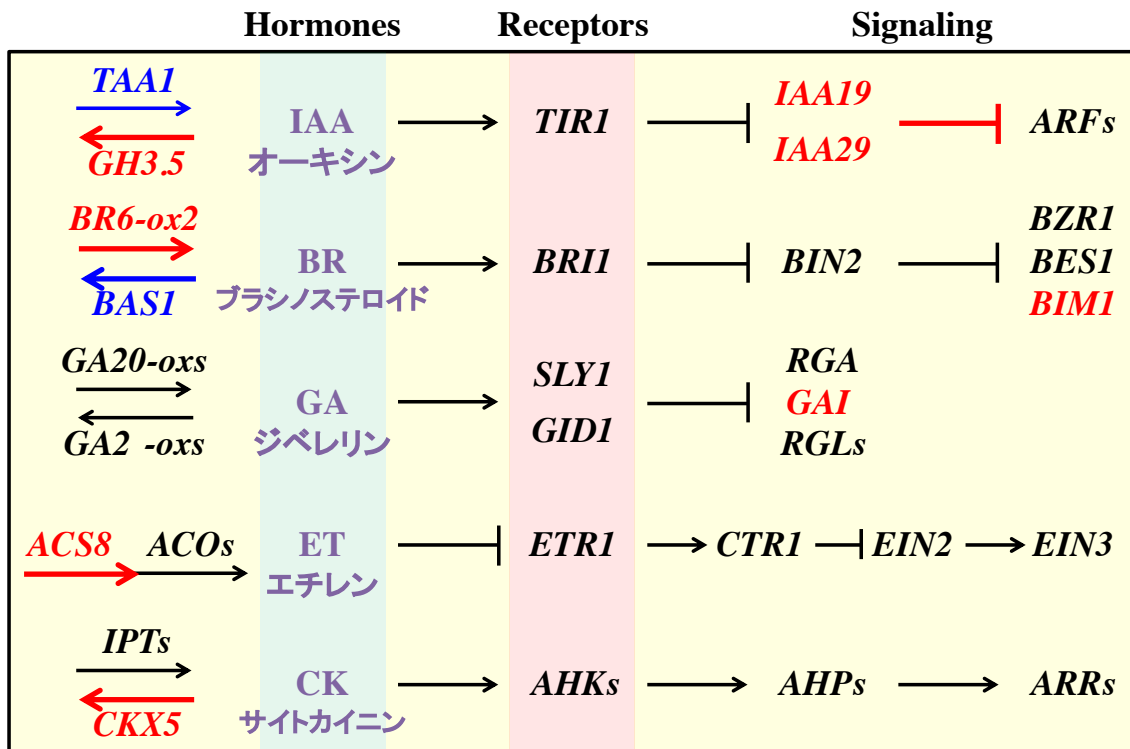


Fig.15 PIF4 による発現制御を受けるホルモン関連遺伝子

5つの植物ホルモンの生合成及び情報伝達に関わる遺伝子群のうち、日長応答における PIF4 下流因子として同定されたものを赤字で示す。シグナル分子としての IAA-CK の上流において左向きの矢印は分解系(または不活性化)、右向きの矢印は合成系(または活性化)の作用を示し、下流における矢印はその下流因子のはたらきを正に、Tバーは負に制御する作用を示す。

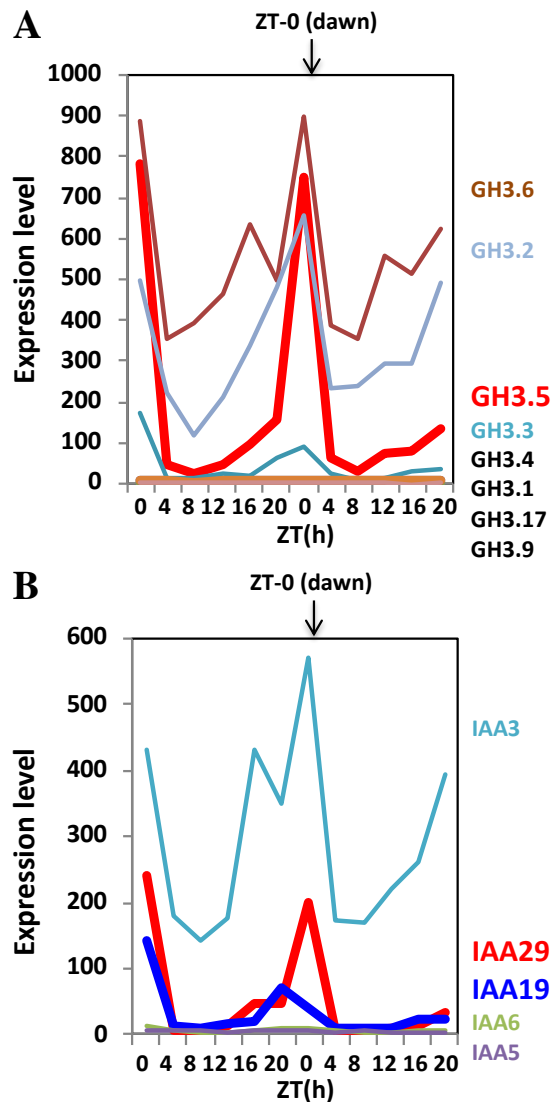


Fig.16 *GH3.5, IAA19, 29* ホモログ遺伝子群の発現特性

マイクロアレイデータベース DIURNAL を用いて短日条件における *GH3.5* 及びそのホモログ遺伝子 *GH3.1, 3.17, 3.2, 3.3, 3.4, 3.6, 3.9* の mRNA 発現量のデータ取得した(A)。

同様に *IAA19,29* 及びホモログ遺伝子 *IAA3, 6, 5* の mRNA 発現量データを取得した(B)。

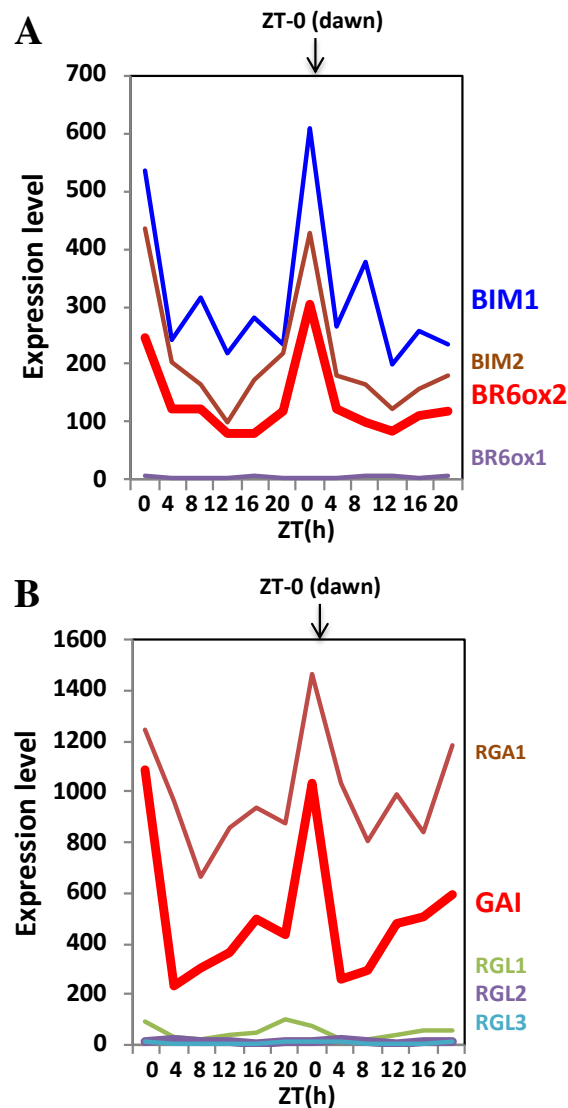


Fig.17 *BR6ox2*, *BIM1*, *GAI* ホモログ遺伝子群の発現特性

マイクロアレイデータベース DIURNAL を用いて短日条件における *BIM1* 及びそのホモログ遺伝子 *BIM2*, *BR4ox2* 及びそのホモログ遺伝子 *BR6ox1* の mRNA 発現量データを取得した(A)。

同様に *GAI* 及びホモログ遺伝子 *RGA1*, *RGL1*, 2, 3 の mRNA 発現量の変化を取得した(B)。

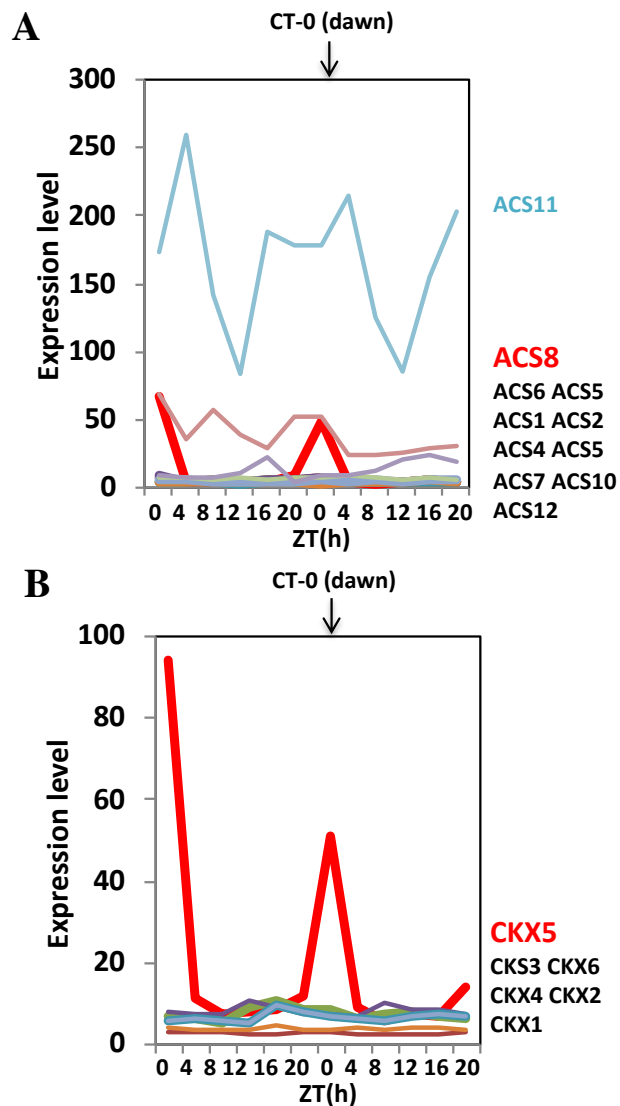


Fig.18 *ACS8*, *CKX5* ホモログ遺伝子群の発現特性

マイクロアレイデータベース DIURNAL を用いて短日条件における *ACS8* 及びそのホモログ遺伝子 *ACS1, 2, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12* の mRNA 発現量データを取得した(A)。

同様に *CKX5* 及びホモログ遺伝子 *CKX1, 2, 3, 4, 6* の mRNA 発現量の変化を取得した(B)。

3章. 温度による胚軸伸長制御メカニズムの解析

緒言

2章において光周性の形態形成制御機構に関して述べてきたが、植物が環境の変化をはかるシグナルとして、また概日時計のリズム形成において光と同等に重要な要素が温度である。温度による植物の形態制御に関しても近年になっていくつかの研究グループからの報告がなされている。一連の研究報告から PIF4, 5 の機能は光と温度を統合的に感知することで①暗形態形成から明形態形成への転換(Lorrain et al. 2009, Leivar and Quail 2011)、②避陰応答(Lorrain et al. 2009, Hornitschek et al. 2012)、③青色光強度に対する形態形成の変化(Keller et al. 2011)、④高温に応答した形態形成の変化(Koini et al. 2009, Franklin et al. 2011)、更には⑤短日条件における高温依存的な花成誘導(Kumar et al. 2012)等、非常に多岐に渡る環境変化への適応応答に関わっている事が示唆されている。

これらの報告から、2章において述べてきた PIF4, 5 を中心とする光周性の形態制御機構を振り返ると、④の研究報告において長日条件であっても生育温度の変化(22°Cから 28°C)によって胚軸伸長が誘導される(Fig.19 A, B)という結果は非常に興味深い。日長を変化させた時の *PIF4* 及び下流因子の発現パターンの解析結果より、長日条件における PIF4, 5 タンパク質は phyB や DELLA 等の作用によって強固に不活性化されていることが分かっている(Fig.4)。そこで本章においては、これまで述べてきた PIF4, 5 を中心とする外的符合機構に対して温度がどのように作用することで長日条件における胚軸伸長応答を可能にしているのかという問題を解決することで、時計と PIF4, 5 による外的符合機構の生理的な意義の再検討を行い、更には植物が光と温度という 2 つの異なる環境シグナルをどのように統合して形態制御を行っているかという疑問に対する回答を得られるのではないかと考えた。また本章においては高温だけでなく低温による胚軸伸長応答への影響を検討し、16°Cから 28°Cという非ストレス範囲での温度変化に対する植物の形態形成制御を *PIF4, 5* 及び下流因子の mRNA 発現解析によって明らかにすることを試みた。

結果

日長及び温度に応答した形態制御

過去に報告された表現型を確認するため野生株(Col-0)及び *pif4 pif5* 欠損株を用いて日長と温度をそれぞれ変化した時の胚軸伸張の表現型を調べた。白色光、SD22°Cのもとで7日間生育した植物体は、LD22°Cの条件で生育したものと比較して長胚軸の表現型を示した。また、SD条件における胚軸伸張は *pif4 pif5* 株において顕著に抑制された(Fig.19A, B)。興味深いことに、このような胚軸伸張の表現型は生育温度による影響を受けていた。白色光、LD28°Cの条件で生育した植物体はLD22°Cで生育したものと比較して長胚軸の表現型を示す。温度による胚軸伸張もまた *pif4 pif5* 株において顕著に抑制されていた。また、同条件で20日間生育した植物体を比較すると、日長の変化に対する応答と同様に、白色光、LD22°Cで生育したものに比べてLD28°Cで生育した植物では顕著な葉柄の伸張が観察された(Fig.19 C)。このような葉柄伸長の表現型もまた *pif4 pif5* 株によって顕著に抑制されていた。これらの結果は過去に報告された高温による胚軸、葉柄伸張の表現型とよく一致していた(Koini et al. 2009, Stavang et al. 2009)。また、高温条件における表現型はSD条件における表現型と類似していた。

高温条件における *PIF4* 及び下流因子の発現解析

PIF4 による外的符合機構における高温条件の影響について直接的な知見を得るため、q-PCR法を用いて白色光LD22°C及び28°C条件における *PIF4*, *PIF5* の mRNA 発現量を調べた。LD28°Cの条件ではLD22°Cより早いタイミングから(暗期の終わりから明期にかけて) *PIF4* の mRNA 発現が観察された。それに対し、*PIF5* においてはこのような発現位相の変化は観察されなかった(Fig.20 A, B)。LD28°Cにおける *PIF4* の発現が、2章で述べたSD22°C条件における *PIF4* の発現パターン(Fig.5 B)と同様に、暗期の終わりから観察されたことから、LD28°Cの条件においても暗期後半における *PIF4* タンパク質の活性化が起こっていると考えられる。また、高温条件に対して *PIF5* の mRNA 発現位相に変化が見られなかったことから温度に対する形態制御においては主に *PIF4* が重要な役割を果たしていると考えられる。そこで次に、高温条件における発現位相の変化によってLD条件においても実際に *PIF4* タンパク質の活性化が起こっていることを確認する為、q-PCR法により下流因子 *ATHB2* をマーカーとして同条件下における mRNA 発現解析を行い、日長に対する変化と比較した。LD28°C条件における *ATHB2* の発現はLD22°Cでは見られない暗期後半に特異的なピークを持っており、SD22°Cの条件下での発現パターンとよく一致していた(Fig.20 C,

D)。このような高温依存的な暗期後半の発現ピークは *pif4 pif5* 株で見られなくなった(Fig.20 E, F)ことから LD28°C条件において *PIF4*の発現位相の変化による暗期後半特異的な *PIF4* タンパク質の活性が起こっていると考えることができる。次に、温度と日長変化に対する応答の共通性に関して更に検討する為、2章において *PIF4* の下流因子として同定した一連のホルモン関連遺伝子の一部についても同様の発現解析を行った。その結果、*IAA29* を始めとした光周性の形態制御における *PIF4* 下流ホルモン関連遺伝子の多くが LD 条件においても温度変化に対して暗期後半特異的に発現誘導されることが明らかになった(Fig.21)。これらの結果から、温度変化に対する形態制御応答は日長変化による形態制御応答と共通の標的遺伝子発現の変化によって制御されていることが示唆された。

phyB 欠損株を用いた解析

2章において述べたように、*phyB* は光依存的に *PIF4* タンパク質を分解系へと誘導する作用によって明期における *PIF4* 活性調節因子として働いている(Breton and Kay 2007)。この働きは光周性の形態制御における光シグナルの入り口として捉えられ、時計による *PIF4*の転写制御と並んで外的符合機構の根幹を成している。そこで次に、*phyB* による *PIF4* 活性調節に対する温度変化の影響を検討するため、*phyB* 欠損株を用いて白色光、LD22°Cまたは 28°Cの条件で7日間生育した植物の胚軸長を比較した。その結果、*phyB* 欠損株では野生株と同様に温度による胚軸伸長の表現型が見られた(Fig.22)。また、このときの *PIF4* 及び下流因子 *ATHB2*, *IAA19*, *IAA29* の発現を調べた結果、*phyB* 株において LD22°Cの条件で暗期後半から見られる *PIF4* の発現位相が 28°Cの条件では更に前進していた(Fig.23 A)。*PIF4* 下流因子の夜間の発現量は顕著に増加していた(Fig.23 B-D)。これらの結果は温度が *phyB* の *PIF4* タンパク質の活性調節作用とは独立に *PIF4* の転写リズムの位相を変化させ、暗期に発現した *PIF4* タンパク質の活性化によって下流因子の発現をより強く誘導することを示唆しており、*phyB* 変異株における胚軸伸長の表現型をよく説明できる結果であったと考えられる。一連の mRNA 発現変化は *phyB* 株の胚軸伸長における表現型をよく説明している。またこれに関連して、過去に別のグループから *PIF4* タンパク質の明条件下における安定性や分解速度が 22°C、28°Cの条件間で変化しないこと(Stavang et al. 2009, Kumar et al. 2012)が報告されている。これらを総合的に考慮し、明期における *phyB* の *PIF4* タンパク質の活性調節ではなく、*PIF4* の転写リズムの位相変化が温度に対する形態変化の主要因となっていると考えられる。

より広い範囲における温度応答性の伸長制御

これまでの結果から、高温による形態制御応答は *PIF4* の転写リズムが変化にすることによって起こる、暗期後半特異的な *PIF4* タンパク質の活性化とそれに伴う一連の下流因子の発現誘導によって説明することができる。つまり概日時計と *PIF4* による外的符合機構は日長だけでなく温度条件が変化する場合においても植物の形態制御の基本的機構であると考えられる。そこで次に、この制御機構がどこまでの温度範囲において寄与しているかという点を検討するため、これまで検討していなかった低い温度帯を含め、16°Cから 28°Cまでの範囲における胚軸伸長応答を調べることにした。野生株(Col-0)及び *pif4* 欠損株を白色光、22°C LD または SD 条件で 3 日間生育し、日長を変えずにそれぞれ①LD22°C、②LD28°C、③SD22°C、④SD16°Cの 4 条件に分け、更に 4 日間生育して胚軸の長さを比較した(Fig.24)。1 章及び 2 章でも述べたように、22°Cにおいて SD 条件で生育した野生株は LD 条件で生育したものに比べ長胚軸の表現型を示す。また、LD 条件においても生育温度を 28°Cにすると SD 条件とよく似た長胚軸の表現型が見られる。一方で、16°Cという低い温度で生育した野生株では SD 条件でみられる長胚軸の表現型が抑制されていた。また、これらの胚軸伸長に関する表現型は *pif4* 株において顕著に抑制されていた。この結果から、時計と *PIF4* による外的符合機構は 16°Cから 28°Cの温度範囲において成立していることが示唆される。

16°Cから 28°Cまでの温度帯における *PIF4* および下流因子の発現解析

胚軸伸長の表現型から伺えるように、16°Cから 28°Cという広い範囲で外的符合機構が寄与していることを示すため、①LD28°C、②LD22°C、③SD22°C、④SD16°Cの 4 つの条件における *PIF4* 及び下流因子の mRNA 発現量を比較した。興味深いことに、SD22°Cの条件では暗期後半から見られる *PIF4* の mRNA 発現位相が SD16°Cの条件では後退し、SD 条件であるにもかかわらず明期に限定されていた(Fig.25 D)。また、SD22°C条件で見られた暗期後半特異的な下流因子 *IAA29* の発現は SD16°C条件では見られなかった(Fig.25 H)。これらの結果は胚軸伸長における SD16°Cの表現型もまた、*PIF4* の転写リズムの位相変化による外的符合機構によって説明できることを示唆している。日長、温度条件における *PIF4* の発現変化の全体像を俯瞰すると、外部気温のシグナルは 16°Cから 28°Cにかけて段階的に *PIF4* の発現位相を変化させており、明暗周期における暗期の位相との重複範囲を調節することによってこれらの温度条件に応答した伸長制御を行っていると考えられる(Fig.25 A-D)。

高温条件における *PIF4* タンパク質の蓄積量の変化

mRNA 発現解析を補足する実験として、高温条件における PIF4 タンパク質の蓄積量の変化を観察した。PIF4:PIF4-HA/*pif4* 株を白色光、LD22°Cの条件で3日間生育した後、LD22°C、LD28°Cの2条件に分けて更に5日間生育し、3時間おきにサンプリングを行った。粗抽出液を SDS-PAGE によって分離後、PVDFメンブレンに転写し Anti-HA モノクローナル抗体(3F10)を用い PIF4-HA タンパク質の蓄積量の変化を観察した(**Fig.26**)。その結果、LD22°Cの条件では PIF4-HA タンパク質の蓄積は明期に限定されていたのに対し、28°Cの条件では夜の後半から強い PIF4-HA タンパク質の蓄積が観察された。また、日中の PIF4 タンパク質の蓄積量については温度による顕著な変化が見られなかった。これらの結果は *PIF4* の mRNA 発現パターン(**Fig.20A**)とよく一致しており、温度による胚軸伸長制御が *PIF4* の発現位相の変化によって成立することを支持するものであった。

考察

これまでシロイヌナズナの高温条件における形態形成に関して、PIF4 がオーキシン、ブラシノステロイド、ジベレリンのシグナル経路を介して胚軸伸張を制御する (Stavang et al. 2009)、高温条件において PIF4 がオーキシン合成を直接制御する (Franklin et al. 2011) などの報告がなされていたが、その基盤となる分子機構の詳細については明らかとなっていなかった。これに対するひとつの回答として、本章では光と温度という 2 つの外的シグナルが外的符合機構によって統合的に感知されることを示した。

光周性の形態制御において日長の変化は概日時計を介した *PIF4* の転写リズム形成と光条件特異的な PIF4 タンパク質の活性調節によって感知される。LD 条件における *PIF4* の mRNA 発現は明期に入ってから誘導され、明期の終わりに下がる特徴的なリズムを持つ。この時 PIF4 タンパク質は光を受容して活性化した phyB による分解制御と、DELLA タンパク質との相互作用によって強力に抑制され、転写因子として機能することができない。しかし短日条件では *PIF4* の発現が暗期の終わりから誘導される。phyB は暗期では不活性型で存在しており、PIF4 タンパク質の分解活性を持たず、同時に暗期ではジベレリンの作用による DELLA の分解が促進される。従って暗期で作られた PIF4 タンパク質は安定に蓄積し、DELLA の複合体形成による抑制作用を免れることで転写因子として下流因子の転写を誘導する。高温のシグナルは日長とは独立に *PIF4* の発現を暗期後半に誘導する。またこの時、光依存的な PIF4 タンパク質の抑制作用には影響を与えない。結果として日長と温度のシグナルは PIF4 が転写因子として働くことができる時間範囲に対して相加的な影響を与える (Fig.27)。このようにして最終的な植物の形態変化は日長と温度による影響の和として現れる。実際には、PIF4 下流にはホルモンシグナル経路に関わる複数の因子があることがわかっており、これらの協調的な作用によって様々な伸張成長を制御していると考えられる。

植物は移動することができないため、環境条件の微妙な変化を感知することで自身の生長を厳密に制御することで刻々と変化する環境に適応していると考えられる。このような環境変化において、光と温度は植物の生育にとって最も重要なふたつの要素である。しかしながら、日長の変化は季節を通して少しずつ、また決まったパターンで起こるものであるのに対し、気温の変化は一日の中でも刻一刻と起こっているという点で異なった性質を持っている。この点において、シロイヌナズナにおける概日時計と PIF4 による外的符合機構はこれらの性質的にも異なった 2 つの環境シグナルを統合的に処理し、自身の形態を適切に制御する洗練されたシステムであるといえる (Fig.28)。

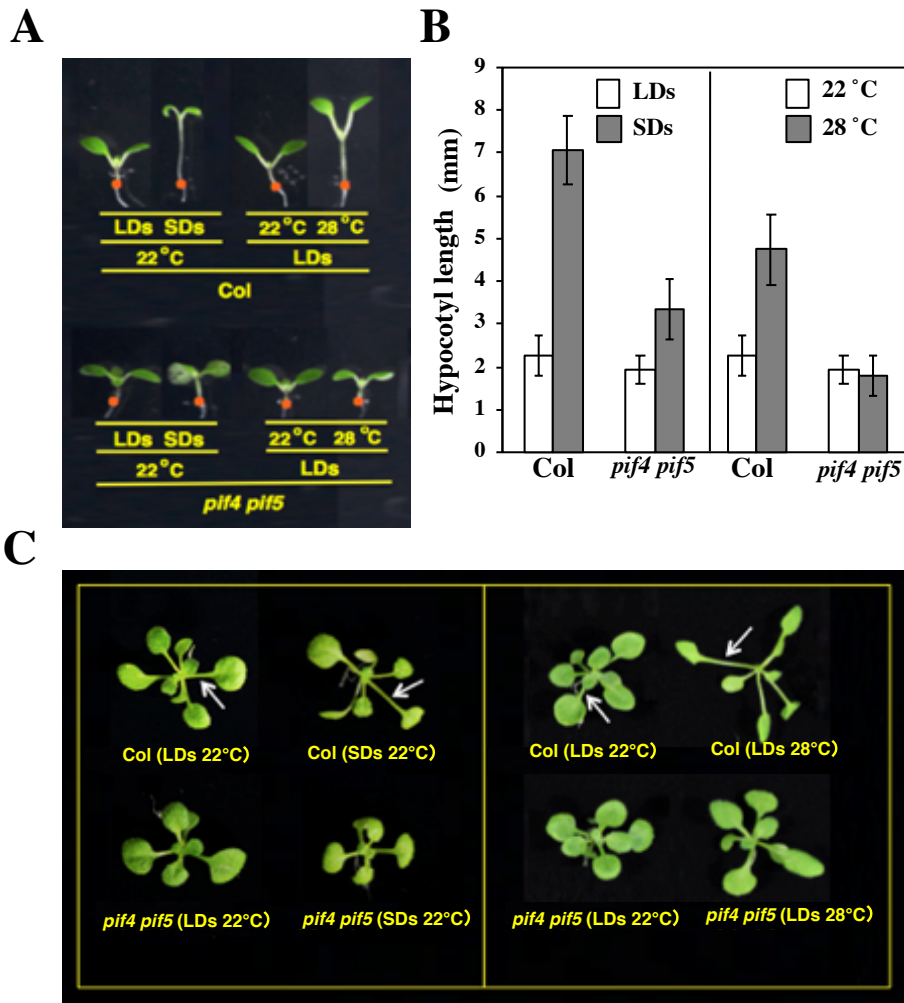


Fig.19 日長及び温度変化に対する胚軸伸長、形態形成応答

野生株(Col-0)及び *pif4 pif5* 株を 22°C 白色光 LD または SD 条件で 8 日間生育し胚軸長を比較した(A, B 左側)。同じ株を用いて 22°C 白色光 LD 条件で 3 日間生育した後、LD22°C、LD28°C の 2 条件に分けて更に 4 日間生育した植物の胚軸長を比較した(A, B 右側)。

胚軸の実験と同様の条件で 20 日間生育し形態を比較した(C)。

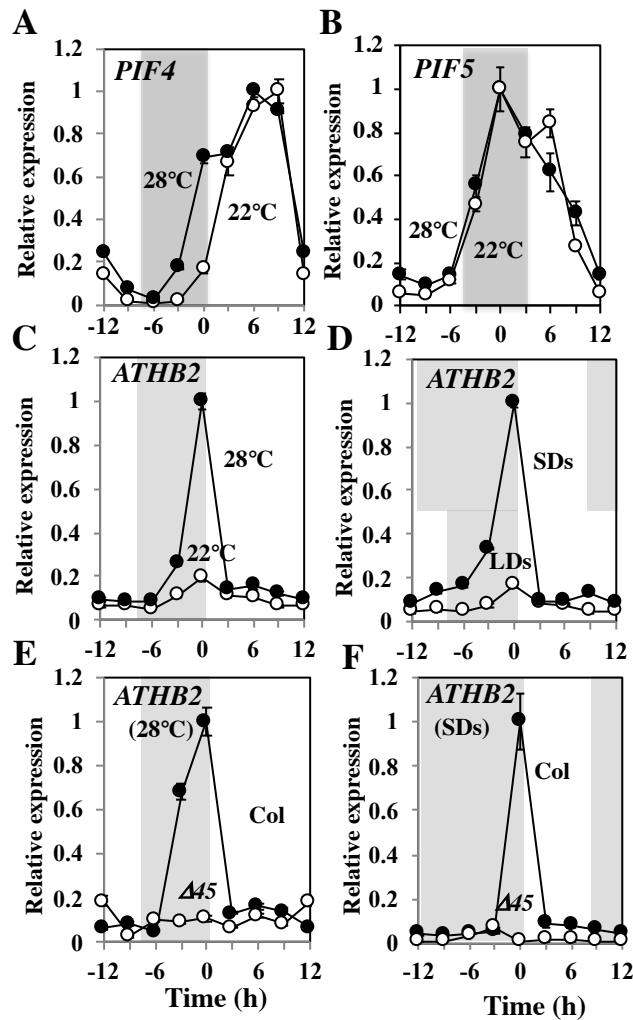


Fig.20 温度変化に対する *PIF4* 及び下流因子の発現特性

(A, B, C, E) 野生株(Col-0)及び *pif4 pif5* 株 ($\Delta 45$) を 22°C 白色光 LD 条件で 3 日間生育した後、LD22°C、LD28°C の 2 条件に分けて更に 4 日間生育し、3 時間おきにサンプリングした。定量 RT-PCR 法を用いて *PIF4*、*PIF5*、*ATHB2* の mRNA 発現量を調べた。

(D, F) 野生株(Col-0)及び *pif4, pif5* 株 ($\Delta 45$) を 22°C 白色光 LD または SD 条件で 7 日間生育し、3 時間おきにサンプリングした。定量 RT-PCR 法を用いて *ATHB2* の mRNA 発現量を調べた。

3 連で行った定量の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量で補正したものを各点の値として示し、標準誤差(SD)をエラーバーで示す。生育条件において点灯していた時間帯を白、消灯していた時間帯をグレーの背景で示す。

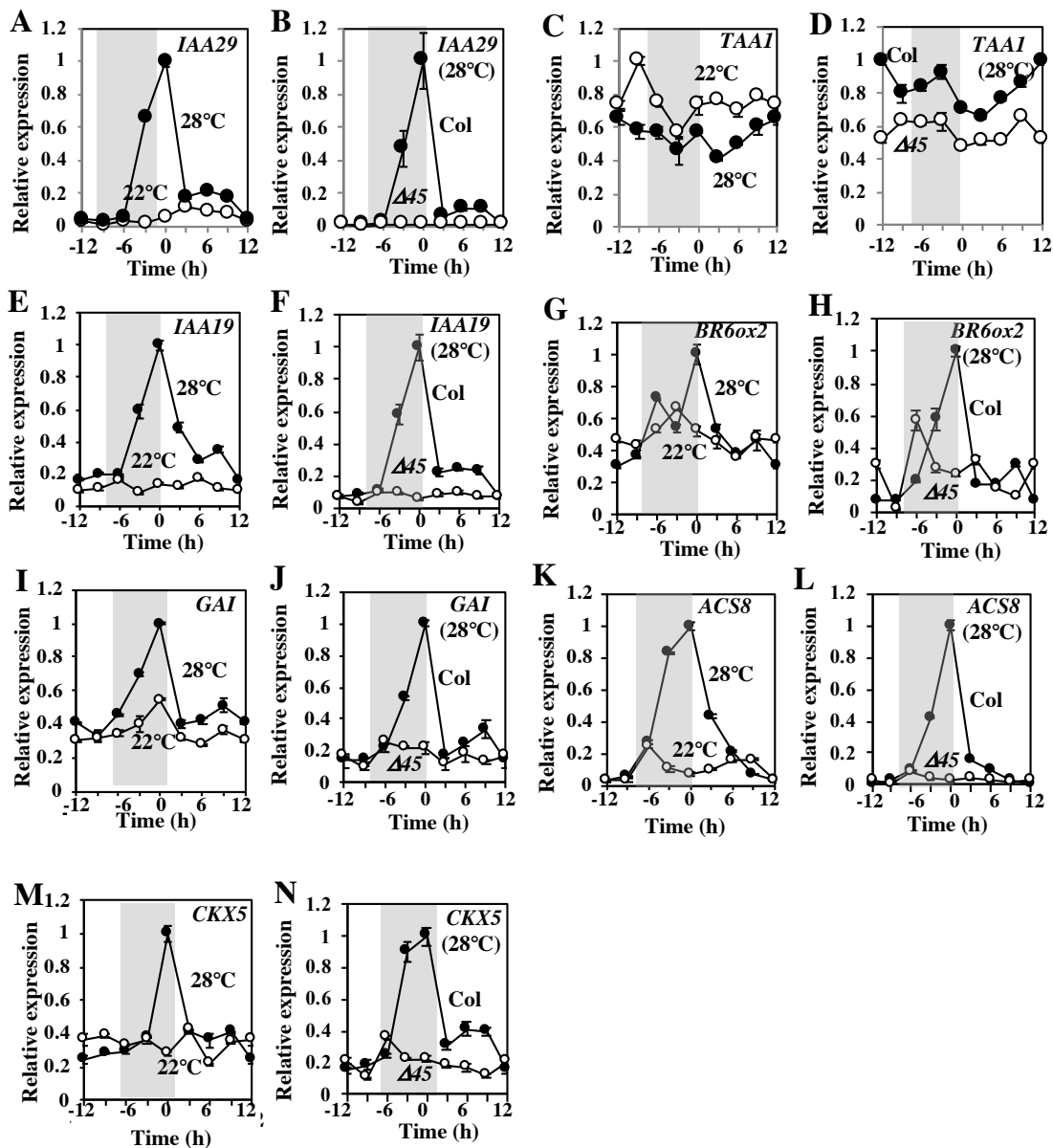


Fig.21 温度変化に対する植物ホルモン関連遺伝子の発現特性

野生株(Col-0)及び *pif4 pif5* 株($\Delta 45$)を 22°C 白色光 LD 条件で 3 日間生育した後、LD22°C、LD28°C の 2 条件に分けて更に 4 日間生育し 3 時間おきにサンプリングした。定量 RT-PCR 法を用いて *IAA19*, *29*, *TAA1*, *BR6ox2*, *GAI*, *ACS8*, *CKX5* の各遺伝子について mRNA 発現量を調べた。3 連で行った定量の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量で補正したものを各点の値として示し、標準誤差(SD)をエラーバーで示す。生育条件において点灯していた時間帯を白、消灯していた時間帯をグレーの背景で示す。

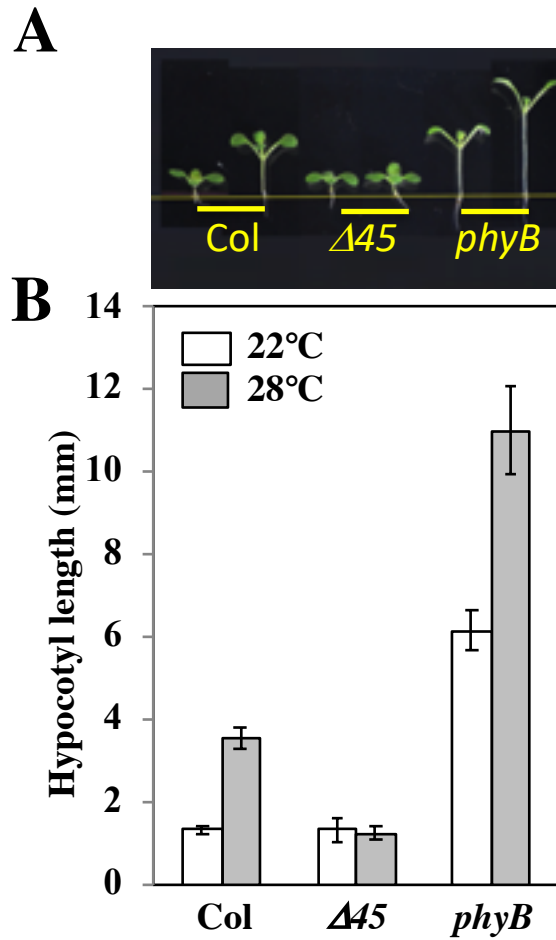


Fig.22 温度による胚軸伸長に対する *phyB* 欠損の影響

野生株(Col-0)及び *pif4 pif5* 株 ($\Delta 45$), *phyB* 株を 22°C 白色光 LD 条件で 3 日間生育した後、LD22°C、LD28°C の 2 条件に分けて更に 4 日間生育し胚軸長を比較した。(A)において各株の写真の左側が 22°C、右側が 28°C の条件で生育した植物を示す。

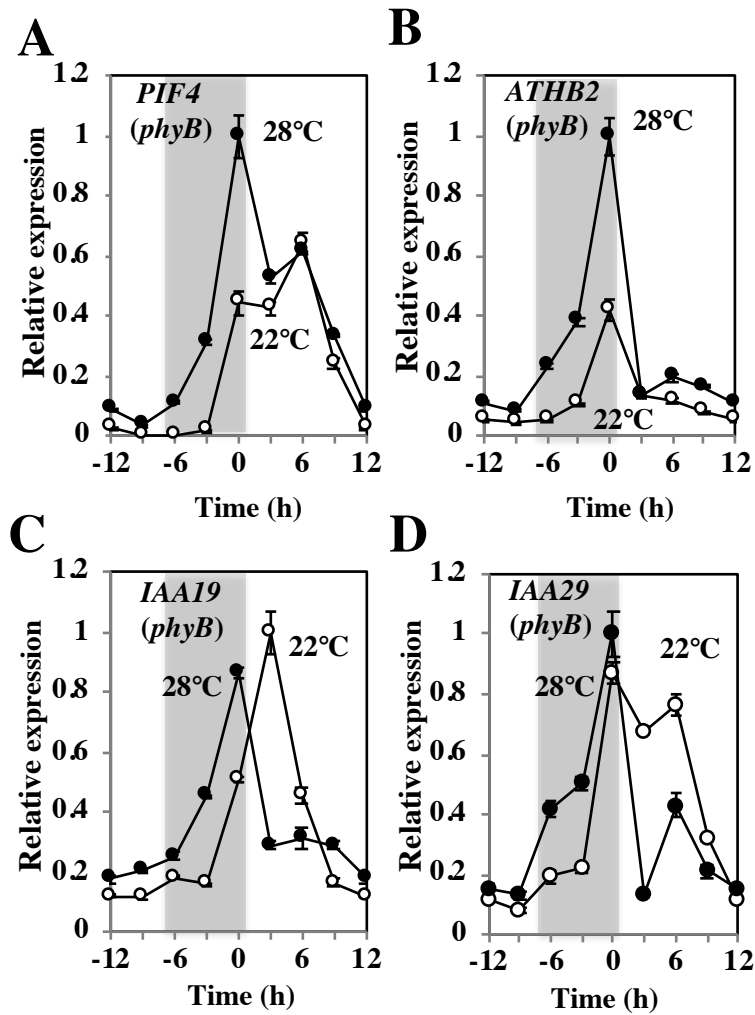


Fig.23 温度による *PIF4* 及び下流因子の発現変化に対する *phyB* 欠損の影響
phyB 株を 22°C 白色光 LD 条件で 3 日間生育した後、LD22°C、LD28°C の 2 条件に分けて更に 4 日間生育し、3 時間おきにサンプリングした。定量 RT-PCR 法を用いて *PIF4*, *ATHB2*, *IAA19*, *29* の各遺伝子について mRNA 発現量を調べた。3 連で行った定量の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量で補正したものを各点の値として示し、標準誤差(SD)をエラーバーで示す。生育条件において点灯していた時間帯を白、消灯していた時間帯をグレーの背景で示す。

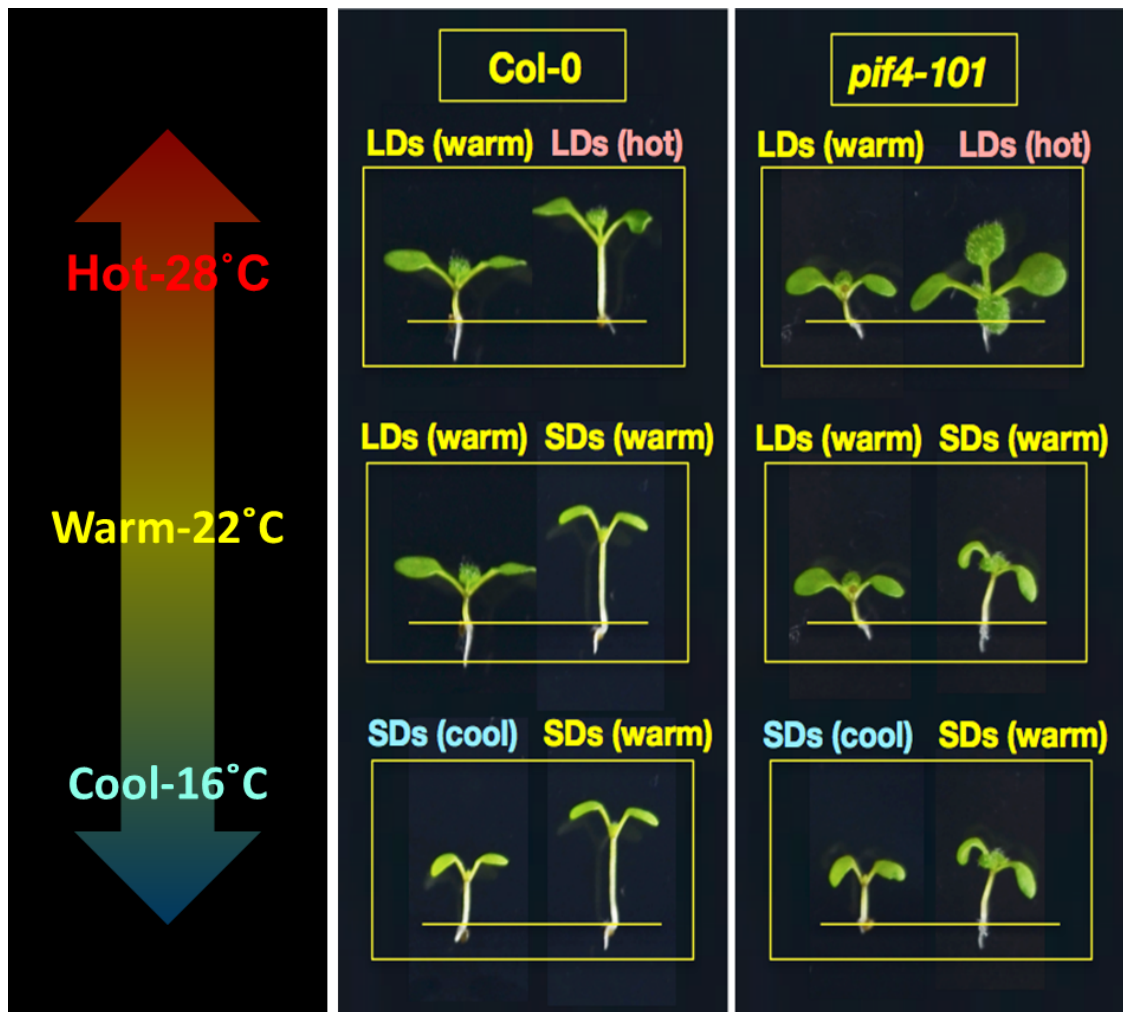


Fig.24 広い温度範囲における可逆的な胚軸伸長応答

野生株(Col-0)及び *pif4* 株を 22°C 白色光 LD または SD 条件で 3 日間生育し、LD 条件で生育したものは 22°C, LD または 28°C, LD の 2 条件に、SD 条件で生育したものは 22°C, SD または 16°C, SD の 2 条件にそれぞれ分けて更に 4 日間生育し胚軸長を比較した。

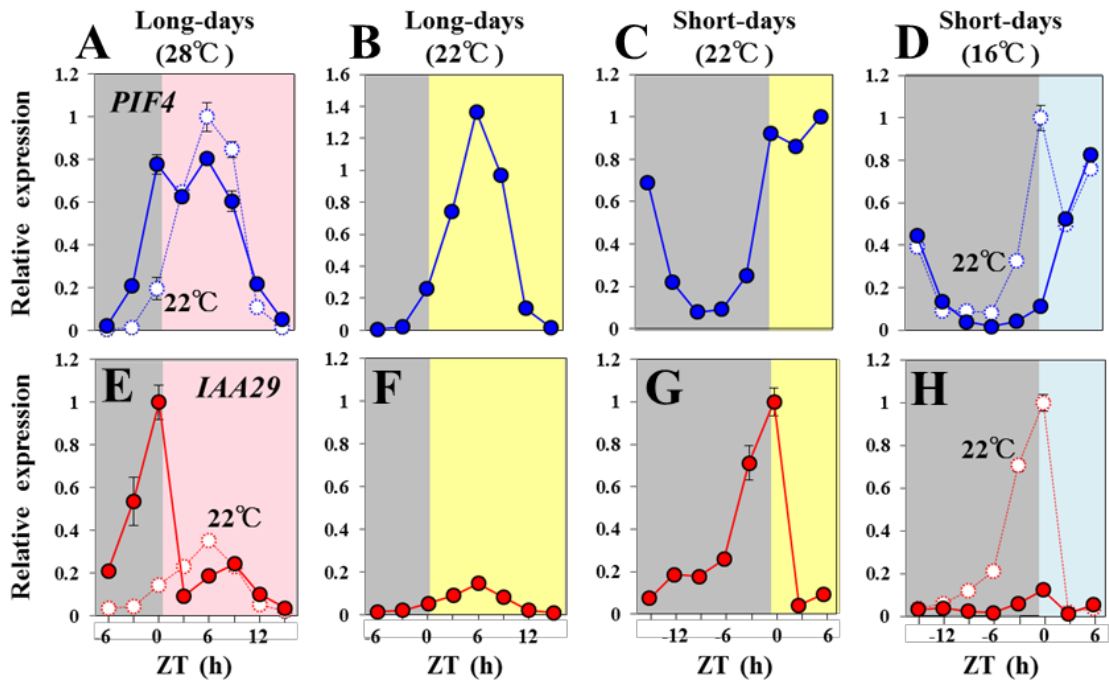


Fig.25 広い温度範囲における *PIF4* 及び下流因子 *IAA29* の発現特性

野生株(Col-0)を 22°C 白色光 LD または SD 条件で 3 日間生育し、LD 条件で生育したものは①22°C, LD または②28°C, LD の 2 条件に、SD 条件で生育したものは③22°C, SD または④16°C, SD の 2 条件にそれぞれ分けて更に 4 日間生育し 3 時間おきにサンプリングした。定量 RT-PCR 法により *PIF4* 及び下流因子 *IAA29* の mRNA 発現量を調べた。各条件における *PIF4* 発現量の測定値を青、*IAA29* 発現量の測定値を赤点で示し、28°C 及び 16°C における発現量と比較する為、各日長条件での 22°C における発現量を白点のグラフで付記した(A,D,E,H)。3 連で行った定量的平均値を *APX3* 遺伝子の発現量で補正したものを各点の値として示し、標準誤差(SD)をエラーバーで示す。生育条件において消灯していた時間帯をグレーの背景で示す。

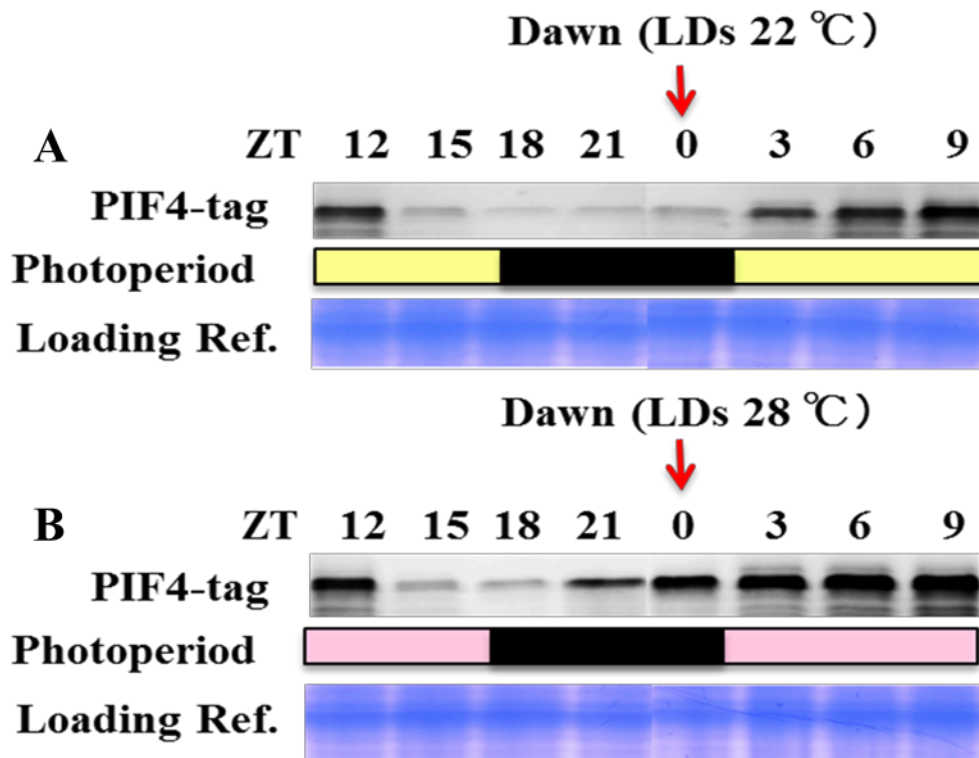


Fig. 26 温度による PIF4 タンパク質蓄積量の変化

PIF4-HA/*pif4* 株を白色光 LD(16 時間点灯 8 時間消灯)22°C条件で 3 日間生育した後、22°C及び 28°C条件に分けて更に 5 日間生育し、3 時間おきにサンプリングした。粗抽出液を SDS-PAGE によって分離し、CBB 染色によって全タンパクを検出した後 PVDF メンブレンに転写した。ペルオキシダーゼ標識された Anti-HA モノクローナル抗体(3F10)を用い PIF4-HA タンパク質の蓄積量の変化を観察した。生育条件において黄色またはピンクのボックスで示した部分は点灯している時間帯、黒で示した部分は消灯している時間帯を示す。

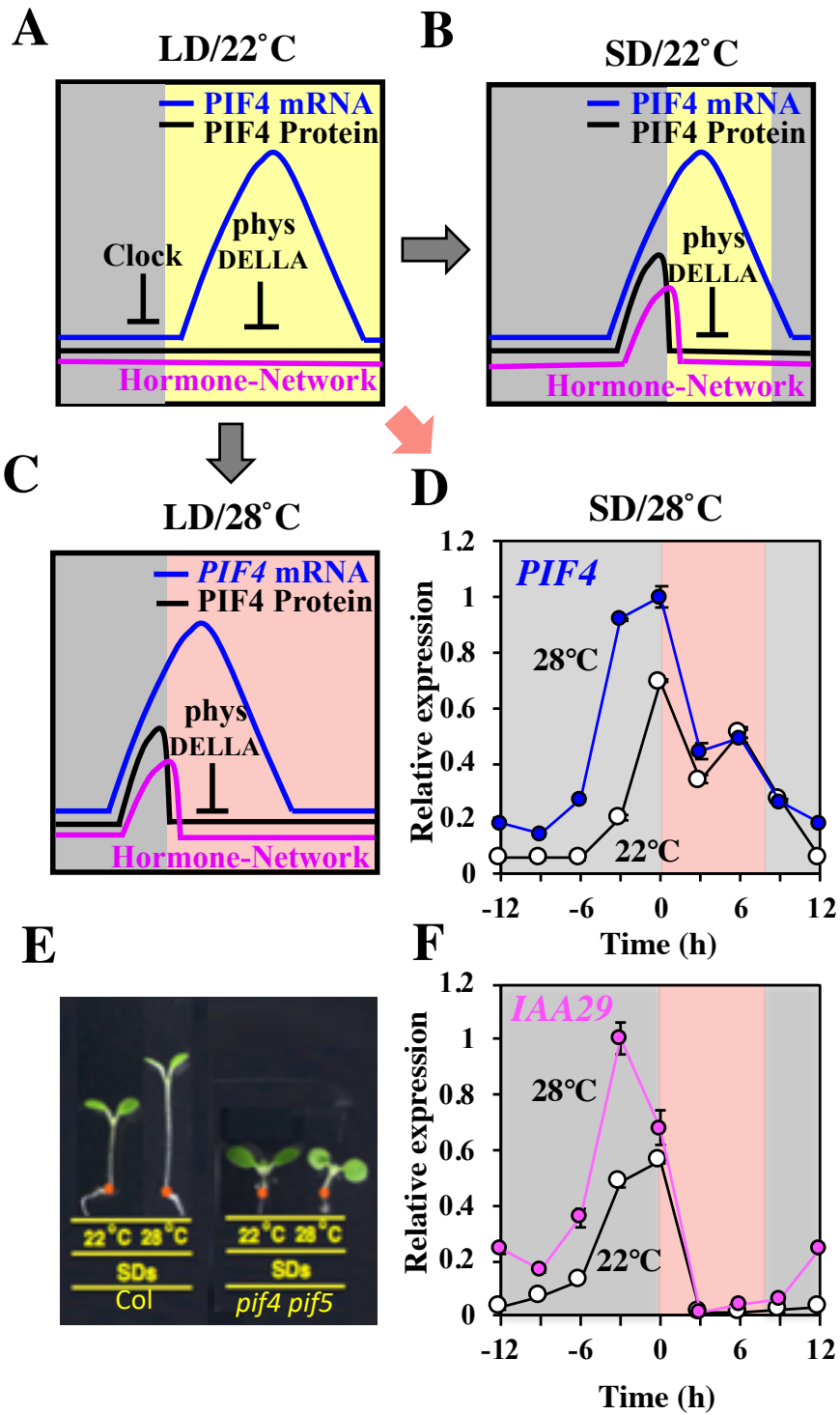


Fig.27 胚軸伸長応答における温度と日長の相加的な影響

(A, B) 短日条件においては暗期の長さによって *PIF4* の mRNA 発現が夜の後半に起こることで胚軸伸長を制御することを示すモデル。青線は *PIF4* の mRNA 発現量、黒線は *PIF4* タンパク質の活性、赤線は下流因子の mRNA 発現量をそれぞれ示す。生育条件における明期を黄、暗期をグレーの背景で示す。

(A, C) 高温条件においては *PIF4* の転写リズムの変化によって *PIF4* の mRNA 発現が夜の後半に起こることで胚軸伸長を制御することを示すモデル。青線は *PIF4* の mRNA 発現量、黒線は *PIF4* タンパク質の活性、赤線は下流因子の mRNA 発現量をそれぞれ示す。生育条件における明期を赤、暗期をグレーの背景で示す。

(D, F) 野生株(Col-0)を 22°C 白色光 SD 条件で 3 日間生育した後、SD22°C、SD28°C の 2 条件に分けて更に 4 日間生育し 3 時間おきにサンプリングした。定量 RT-PCR 法を用いて *PIF4* 及び *IAA29* 遺伝子について mRNA 発現量を調べた。3 連で行った定量の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量で補正したものを各点の値として示し、標準誤差(SD)をエラーバーで示す。生育条件において点灯していた時間帯を白、消灯していた時間帯をグレーの背景で示す。

(E) 野生株(Col-0)及び *pif4*, *pif5* 株を 22°C 白色光 SD 条件で 3 日間生育した後、SD22°C、SD28°C の 2 条件に分けて更に 4 日間生育し胚軸長を比較した。

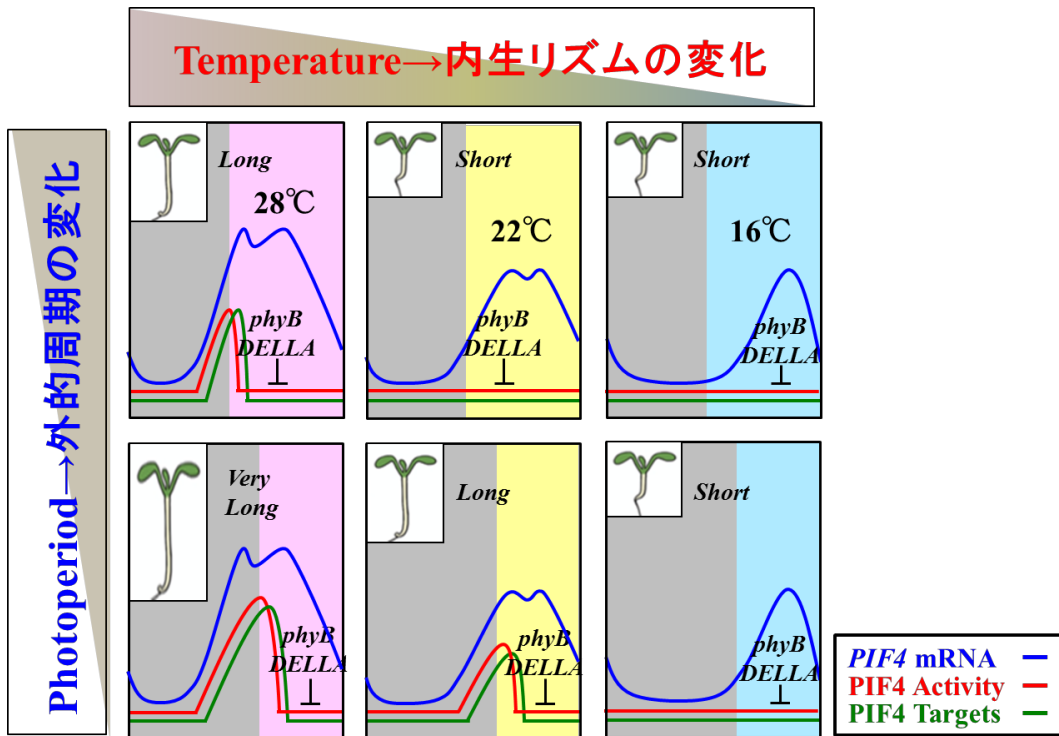


Fig.28 日長と温度を統合的に感知する外的符合モデル

温度(横方向)と日長(縦方向)が段階的に変化する時の *PIF4* の mRNA 発現量(青線)、*PIF4* の転写因子活性(赤線)、下流因子群の mRNA 発現量(緑線)を模式的に示す。図の上段は長日条件、下段は短日条件における変化を示す。

4 章. *PIF4* 転写リズム形成における概日時計関連因子の機能解析

緒言

温度応答性の伸長生長制御が *PIF4* の転写リズムの位相変化と、それに伴う *PIF4* の暗期後半における活性化によって起こる外的符合機構によって説明されること、*PIF4* の下流には複数の植物ホルモン関連遺伝子群や細胞伸張に関わる細胞壁修飾酵素等多数の遺伝子があり、これらの作用によって様々な応答を制御している事は 2、3 章で述べたとおりである。そこで本章においては、残された *PIF4* の上流における制御、つまり温度シグナルがどのように受容されて *PIF4* の転写リズムの位相を変化させるかという点について *PIF4* の転写制御に深く関与することが示唆されている概日時計の特性に着目して検討を進めた。

概日時計の基本的性質としては、①外的なシグナルがなくても自律振動が一定期間継続する(自由継続性)、②光(及び温度)などの外的シグナルに同調して位相をリセットする事ができる(外部同調性)、③一定の温度範囲において自律振動を一定周期に維持する事ができる(温度補償性)の3つが挙げられるが、このうち②の外部同調という特性は、特定の時計関連因子の発現やターンオーバーが種々のシグナル受容分子によって制御されることで転写フィードバックを介して時計全体の位相を変化させていると理解されている。概日時計の同調機構に関わるシグナル分子としてこれまでに、赤色光受容体 Phytochrome、青色光受容体 Cryptochrome 及び ZEITLUPE(ZTL)ファミリー因子が同定されている。このうち Phytochrome と Cryptochrome の欠損変異株は恒明条件下で長周期の表現型を示すことから概日時計における光入力経路に関わるとされる(Somers et al. 1998, Devlin and Kay 2000)のに対し、*ztl*の欠損変異は恒明および恒暗条件下で長周期の表現型を示すことから単純な光入力経路だけでなく、中心振動体における自律振動周期を維持する上でも重要な役割を持っている事が示唆されている(Somers et al. 2004)。また、このように複数のシグナル入力経路が存在することで概日時計はシグナルが入力された時間帯に応じて位相の前進、後退といった異なる応答によって外界の変化に柔軟に同調することができると考えられる。一方で温度シグナルの受容分子はこれまでに同定されておらず、温度による概日時計の同調における分子メカニズムはほとんどわかっていない。*PIF4*の発現位相の変化は概日時計におけるこの外部同調における時計関連遺伝子の発現位相の変化と極めて類似しており、概日時計における温度に対する同調制御が同時に出力経路の発現制御に利用されている事が推察される。

このような背景から、温度応答性の胚軸伸長における温度シグナルは概日時計における温度同調機構の一部を介して *PIF4* の転写リズムの位相変化を引き起

こしていると仮定し、*PIF4*の発現位相の変化に対する種々の概日時計関連因子の影響を調べることで温度応答性の伸長制御における温度の入力機構というだけでなく、これまで不明であった概日時計における温度シグナルがどのように入力されるか、という点についても知見が得られることを期待して研究を進めた。

結果

温度応答に対する概日時計のゲート効果

温度変化に対する *PIF4* の転写リズムの位相変化が概日時計を介して行われていることを示すため、温度による *PIF4* 発現制御の時間特異性を調べた。具体的な実験方法として、LD22°C条件で7日間生育した野生株を用いて、2つの異なる時間帯 ZT19(暗期に入ってから3時間後)、ZT3(明期に入ってから3時間後)に温度を28°Cに変化し、5時間後までの *PIF4* と下流因子 *ATHB2* の発現量の変化を観察した(Fig.29 B, C)。ZT19で生育温度を変化すると *PIF4* の mRNA 発現量は2時間以内に顕著に増加したが、ZT3で生育温度を変化した条件では *PIF4* 発現量の変化は見られなかった。*ATHB2* の発現量の変化はこれとよく一致しており、ZT19で温度を変化すると3時間以内に顕著な増加が見られたが、ZT3で温度を変化した条件ではこのような応答は観察されなかった。また、他の *PIF4* 下流遺伝子についても同様の実験を行った結果、*CKX5*を除くほとんどのホルモン関連遺伝子においてZT19での温度変化に対して *ATHB2* と同様に発現誘導されることがわかった(Fig.29 D-G)。これらの結果から、温度応答性の *PIF4* 転写リズムの変化は暗期後半に特異的な温度感受性の変化に起因していると考えられる。また、このような時間特異的な応答性の変化は一般にゲート効果と呼ばれており、概日時計によって制御される応答によく見られる現象である。このことから温度に対する *PIF4* 発現位相の変化には概日時計が深く関わっている事が示唆された。

概日時計関連遺伝子欠損変異による温度応答性の変化

PIF4 の mRNA 発現における夜間に特異的な応答性に関わる時計関連遺伝子を明らかにするため、一連の時計関連遺伝子欠損株を用いた発現解析を行った。野生株(Col-0)、*elf3*, *elf4*, *pcl1*, *cca1 lhy*, *prr9 prr7*, *toc1* 株をMD22°Cの条件で7日間生育した後、7日目のZT18において22°C、28°Cの2条件に分けてから0, 2, 4, 6時間後の各点でサンプリングを行った。定量 RT-PCR 法によって *PIF4* の mRNA を調べた。前節における結果と同様に、野生株においてはZT18で生育温度を28°Cに変化してから2時間後には *PIF4* mRNA 発現の顕著な誘導が観察される(Fig.30 A)。各欠損株における *PIF4* の発現量の変化を見ると、すべての株において温度に対する応答性が低下していた(Fig.30 B-G)。中でも最も顕著な影響が見られたのは *elf3*, *elf4* 株であり、これらの株では暗期における *PIF4* の発現は22°Cにおいても高く、温度に対する応答性はほとんど見られなかった(Fig.30 B, C)。

ELF3, ELF4 はともに概日時計の中心振動体として夜間に発現し、Evening Complex(EC)と呼ばれる複合体を形成することで転写抑制性因子として働くことが知られている(Helfer et al. 2011, Nusinow et al, 2011)。この事から、*PIF4*における温度応答性の発現誘導には EC の機能が深く関わっていると考えられる。時計関連因子 LUX/PCL1 もまた EC の構成因子として同定されているが、*pcl1* 欠損変異による影響は *ELF3, ELF4* に比べて小さかった(Fig.30 D)。この点については LUX/*PCL1* 遺伝子のホモログである *NOX* 遺伝子の作用によって *pcl1* 欠損による表現型が隠されてしまったのではないかと考えられる。

ELF3, LUX タンパク質の *PIF4* プロモータへの局在の確認

EC が夜間における *PIF4* の温度応答性発現誘導に関わるという仮説を支持する事実として、近年になって EC が *PIF4* のプロモータに結合して転写抑制に働くという報告がなされた(Nusinow et al. 2011)。そこで次に、クロマチン免疫沈降法を用いてこの結果の再現性を確認することとした。EC を構成するタンパク質のうち、DNA 結合に直接関与されていると考えられているのは GARP 型転写因子 LUX である。DNA 結合において LUX が認識する配列として LUX binding site(LBS)が報告されており(Helfer et al. 2011)、*PIF4* プロモータ上流にはこの LBS 及び 1bp 違いの LBS が複数確認できる(Fig.31 A)。これらの LBS 配列を挟むように設計されたプライマーを用いて ELF3, LUX タンパク質の *PIF4* プロモータへの局在量を調べた結果、*PIF4* の転写開始点の上流 586bp から 425bp の位置に設計されたプライマーにおいて顕著な LUX-GFP, ELF3-YFP タンパクの局在が観察された(Fig.31 B, C)。これらの結果から、EC が *PIF4* プロモータに直接結合する事が確認できた。

elf3 欠損変異株における温度応答性の胚軸伸長

温度応答性の胚軸伸長制御における EC の影響を検討する為、EC の構成因子のうち最も強い表現型を示す *elf3* 欠損株を用いて温度による胚軸伸長応答を観察した。*elf3* 株において LD22°C、28°Cの胚軸の長さを比較すると、LD22°Cの条件下でも顕著な長胚軸の表現型を示しており、野生株のような温度変化に対する胚軸伸長の顕著な応答性が見られなかった(Fig.32 A)。同様に *elf3* 株における温度変化に対する *PIF4, ATHB2, IAA29* の mRNA 発現量の変化を調べると、*elf3* 株においては LD22°Cにおける *PIF4* の発現位相が野生株に比べて顕著に前進しており、暗期を通して *PIF4* の発現が見られた(Fig.32 E)。温度変化に対する *PIF4* の発現位相の応答性は野生型と比べて低く、下流遺伝子 *ATHB2, IAA29* の発現はこれらの温度帯では大きく変化しなかった(Fig.32 F, G)。これらの結果から、温度応答性の胚軸伸長における *PIF4* の転写リズム形成において ELF3,

ELF4, LUX から構成される Evening Complex が重要な役割をしていると結論付けられた。

考察

温度による胚軸伸長応答は、転写因子 *PIF4* の発現位相の変化と明暗周期における暗期の位相の重なりによって説明されるが、*PIF4* の転写リズム形成における温度の受容、それに伴う *PIF4* の発現制御の分子メカニズムについてはほとんどわかっていなかった。本章において、概日時計に着目して網羅的な解析を行うことで、概日時計における中心振動体を構成する *ELF3*, *ELF4*, *LUX/PCL1* からなる Evening Complex がこのような温度応答性の *PIF4* 発現制御に直接的に関与していることを明らかにした。

Evening Complex は *PIF4* だけでなく、*PRR7* を始めとした複数の概日時計関連遺伝子の発現制御にも関わっている事が報告されており (Dixon et al. 2011)、概日時計の外部同調機構や温度補償性の維持においても重要な役割を果たしていると考えられる。これに関連して *PRR9*, *PRR7*, *GI* 遺伝子などに関しても EC 構成因子の欠損によって温度に対する応答性が失われることを確認している (Fig.33)。このような点から考えると、本章における結果は外的符合による形態制御に限らず、植物の非ストレス範囲における温度変化に対する生理的応答全般に対する分子メカニズムの理解へつながる重要な意味を持っていると言える。時計関連遺伝子の欠損株を用いた夜間の温度変化に対する応答性を調べる実験では、用いたすべての欠損株において野生株に比べて低い応答性を示した (Fig.30) が、これは時計関連遺伝子が転写フィードバックループを形成し、相互に密接な発現制御を行っている事に起因すると考えられる。時計関連遺伝子の欠損は、*PIF4* の転写を制御する EC 構成因子の発現位相に影響を与え、結果として夜間の温度応答性が低下したと類推できる。この点において概日時計の適切な機能を維持することは植物の温度応答性の形態制御において不可欠であり、EC を除けば直接的に関与していないと考えられるすべての時計関連遺伝子もまた、この制御における重要な構成要素の一つであると捉えることができる。

EC の機能が温度条件の変化によってどのように影響を受けるか、という点については不明な点が多く残されているが、本研究において確認できた事実として、*ELF3*, *ELF4* 自身の発現はこのような温度変化に対して非感受性であることが分かっている。*LUX* の発現は *PIF4* や *PRR7* と同様に、暗期後半に温度感受性であるが (Fig34 A)、これについては *LUX* 自身が EC の標的である (Helfer et al 2011) ことから、フィードバック制御に関わる応答であると考えられる。この事から EC は非転写制御によって温度を受容している事が強く示唆されており、生化学的なアプローチによって温度に対する応答を検討していく必要があると考えられる。

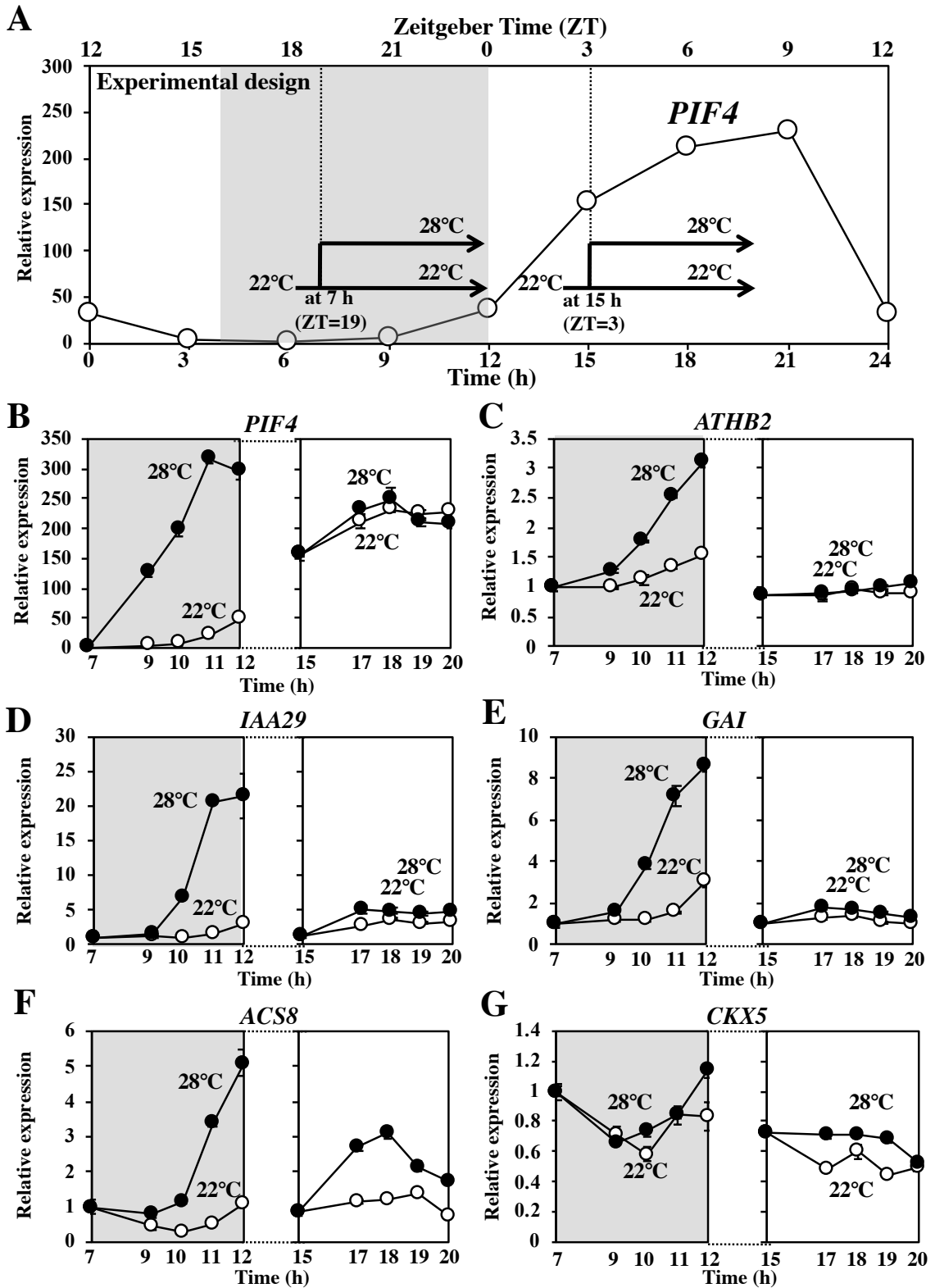


Fig.29 温度による *PIF4* 及び下流遺伝子の一過的発現誘導性

(A) 野生株を白色光の下 LD22°Cの条件で7日間生育し3時間おきにサンプリングした。定量 RT-PCR 法を用いて *PIF4* の mRNA 発現量を調べた。図中の矢印はそれぞれ(B-G)の実験における温度変化からサンプリングの時間範囲を示す。

(B-G) 野生株を白色光の下 LD22°Cの条件で7日間生育し、7日目の ZT19 または8日目の ZT3 においてそれぞれ 22°C, 28°Cの2条件に分けてから 0, 2, 3, 4, 5 時間後の各点でサンプリングを行った。定量 RT-PCR 法によって *PIF4*, *ATHB2*, *IAA29*, *GAI*, *ACS8*, *CKX5* の各遺伝子について mRNA 量を調べた。各グラフにおいて生育温度を 28°Cに変化した植物における発現量を黒、温度を変えずに生育した植物における発現量を白の点で示す。各点の値は3連の測定値の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量によって補正した値を示し、標準誤差をエラーバーとして示す。

生育条件において点灯していた時間帯を白、消灯していた時間帯をグレーの背景によって示す。

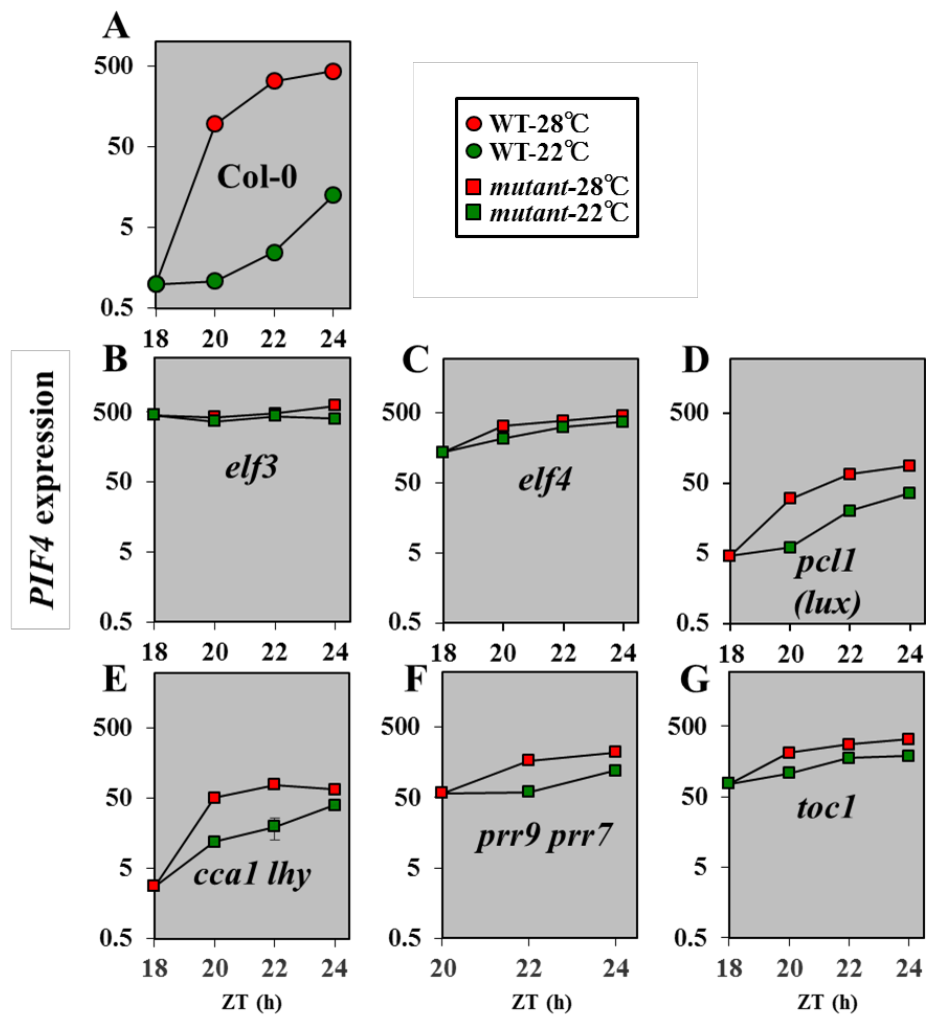


Fig. 30 時計関連遺伝子欠損株における夜間の温度変化に対する *PIF4* 発現応答性の変化

野生株(Col-0 及び *elf3*, *elf4*, *lux(pcl1)*, *cca1 lhy*, *prp9 prp7*, *toc1* 株を MD22°C の条件で 1 週間生育した後、7 日目の ZT18 において 22°C、28°C の 2 条件に分け、0, 2, 4, 6 時間後の各点でサンプリングした。定量 RT-PCR 法を用いて *PIF4* の mRNA 量を調べた。野生株における 22°C 条件での発現量を緑丸、28°C 条件での発現量を赤丸、各欠損変異株における 22°C 条件での発現量を緑の四角、28°C 条件での発現量を赤の四角でそれぞれ示す。各点の値は 3 連の測定値の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量によって補正した値を示し、標準誤差をエラーバーとして示す。グレー背景は生育条件において消灯していた時間帯を示す。

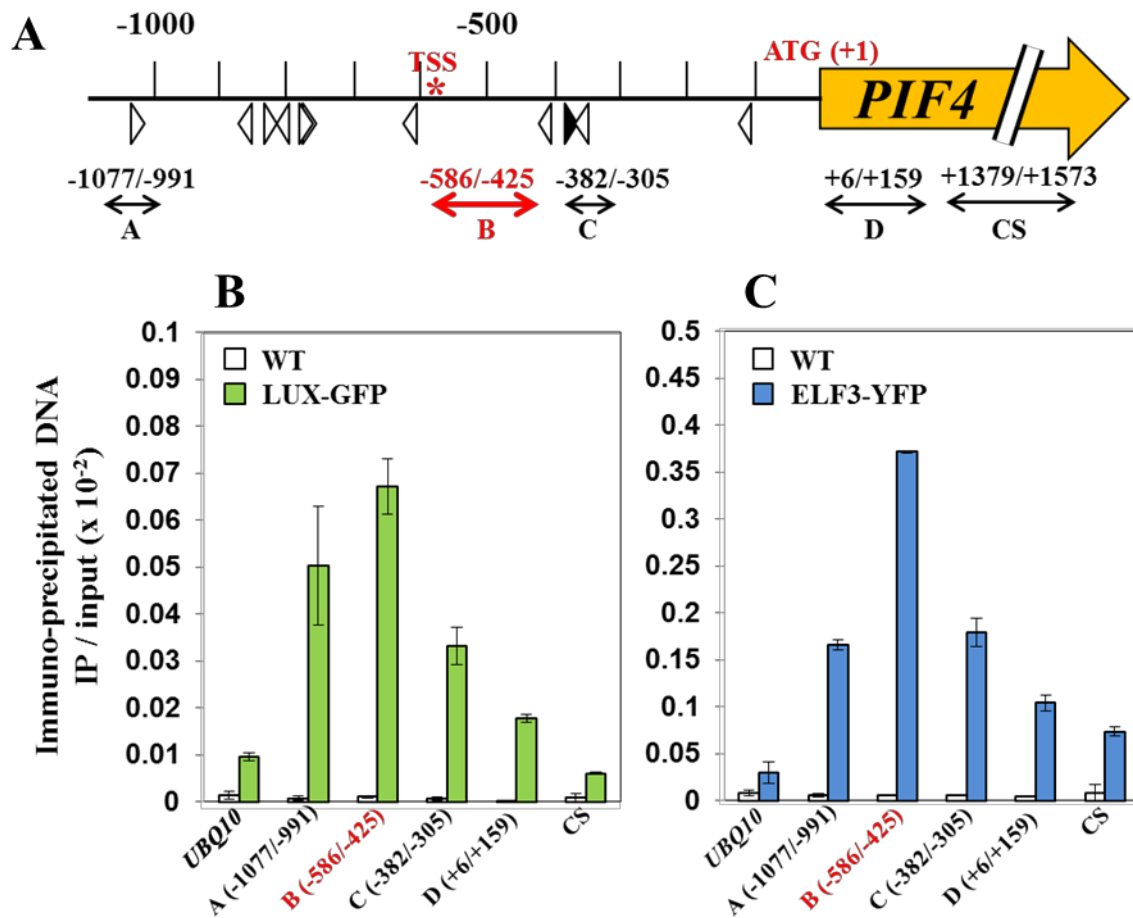


Fig.31 *PIF4* プロモータへの LUX 及び ELF3 タンパク質の局在量

(A) *PIF4* プロモータ領域における LBS 配列の位置を黒の三角、1bp 違いの不完全な LBS の位置を白の三角、検出に用いたプライマー A-D および CS(coding sequence) の設計位置を両矢印で示す。各数字は *PIF4* の翻訳開始点からの距離 (bp) を示す。

(B, C) 野生株及び LUX:LUX-GFP, ELF3:ELF3-YFP 株を MD22°C の条件で 2 週間生育し、ZT20 でサンプリングした。クロマチン免疫沈降法を用いて得られた DNA 断片に含まれる *PIF4* プロモータ上の配列を定量 PCR 法によって調べた。各グラフにおいて、野生株における測定値を白、LUX-GFP 株における測定値を緑、ELF3-YFP 株における測定値を青で示す。グラフの各値は免疫沈降後のサンプルにおける定量値 Input サンプルの定量値で割った値を示し、標準誤差をエラーバーで示す。

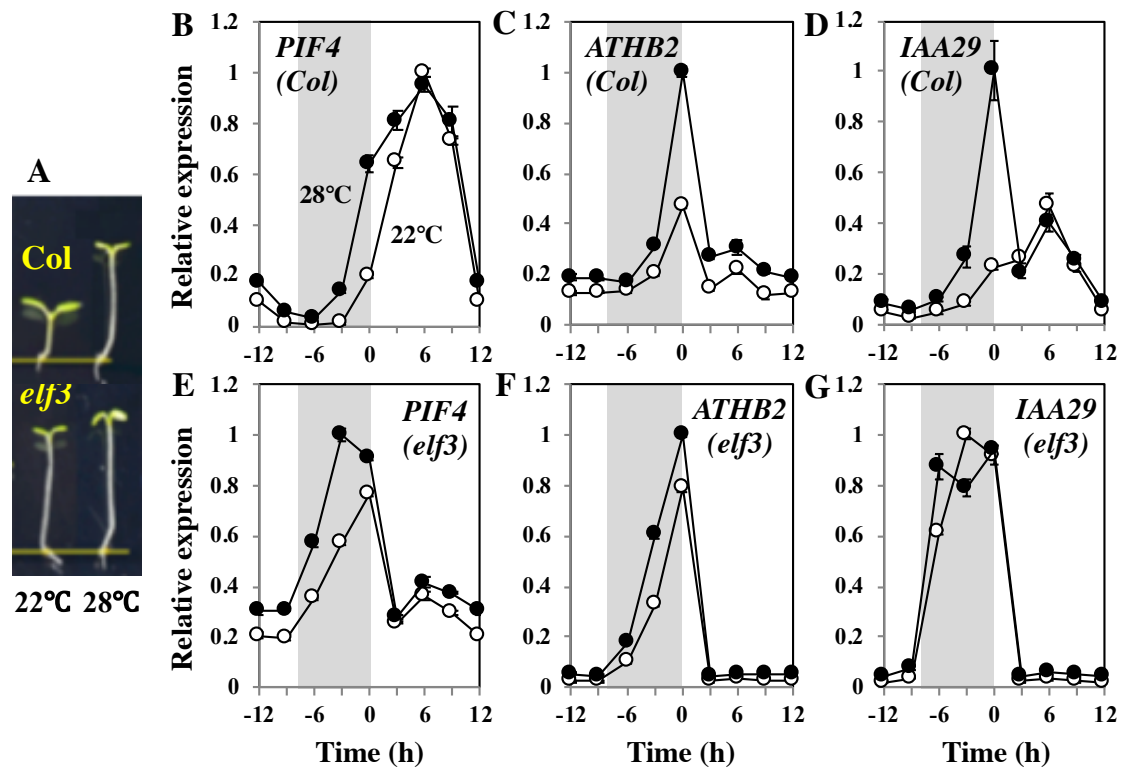


Fig.32 *elf3*株における温度応答性の胚軸伸長制御

(A) 野生株(Col-0)及び *elf3* 株を白色光の下、LD22°Cまたは LD28°Cの条件で7日間生育し胚軸長を比較した。

(B-G) 同様の条件で7日間生育した植物を3時間おきにサンプリングし、定量RT-PCR法によって *PIF4*及び *ATHB2*, *IAA29*遺伝子の mRNA 量を調べた。各グラフにおいて 22°C条件での測定値を白、28°C条件での測定値を黒の点で示す。各点の値は3連の測定値の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量によって補正した値を示し、標準誤差をエラーバーとして示す。生育条件において点灯していた時間帯を白、消灯していた時間帯をグレーの背景で示す。

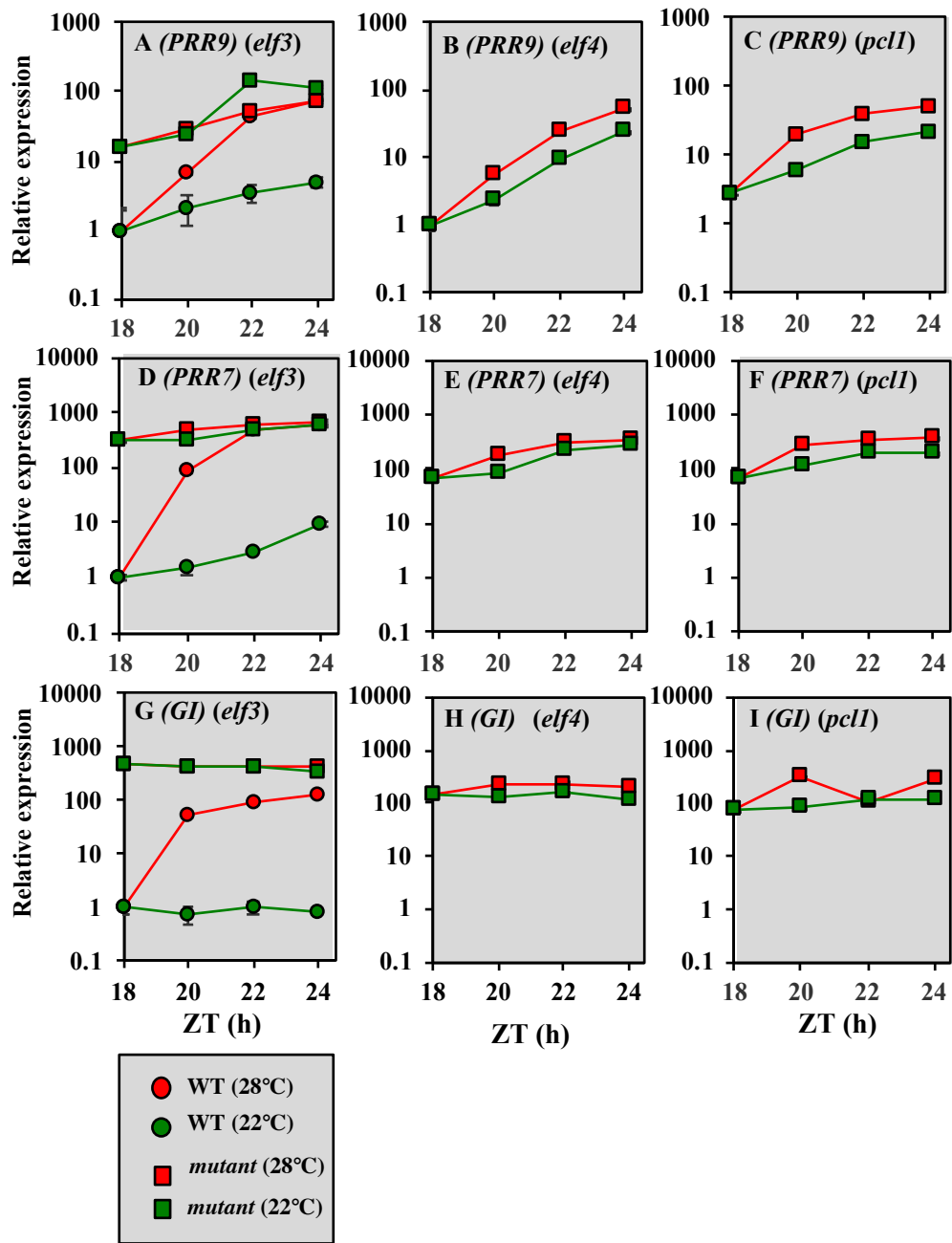


Fig.33 *elf3, 4, lux(pcl1)*欠損株における夜間の温度に対する時計関連遺伝子の発現応答性の変化

野生株(Col-0)及び *elf3, elf4, lux(pcl1)*株を MD22°Cの条件で 1 週間生育した後、7 日目の ZT18 において 22°C、28°Cの 2 条件に分け、0, 2, 4, 6 時間後の各点でサンプリングした。定量 RT-PCR 法を用いて概日時計関連遺伝子 *PRR9, PRR7, GI* の mRNA 量を調べた。野生株における 22°C条件での発現量を緑、28°C条件での発現量を赤の丸(A, D, G)、各欠損変異株における 22°C条件での発現量を緑、28°C条件での発現量を赤の四角でそれぞれ示す。各点の値は 3 連の測定値の平均値を *APX3* 遺伝子の発現量によって補正した値を示し、標準誤差をエラーバーとして示す。グレー背景は生育条件において消灯していた時間帯を示す。

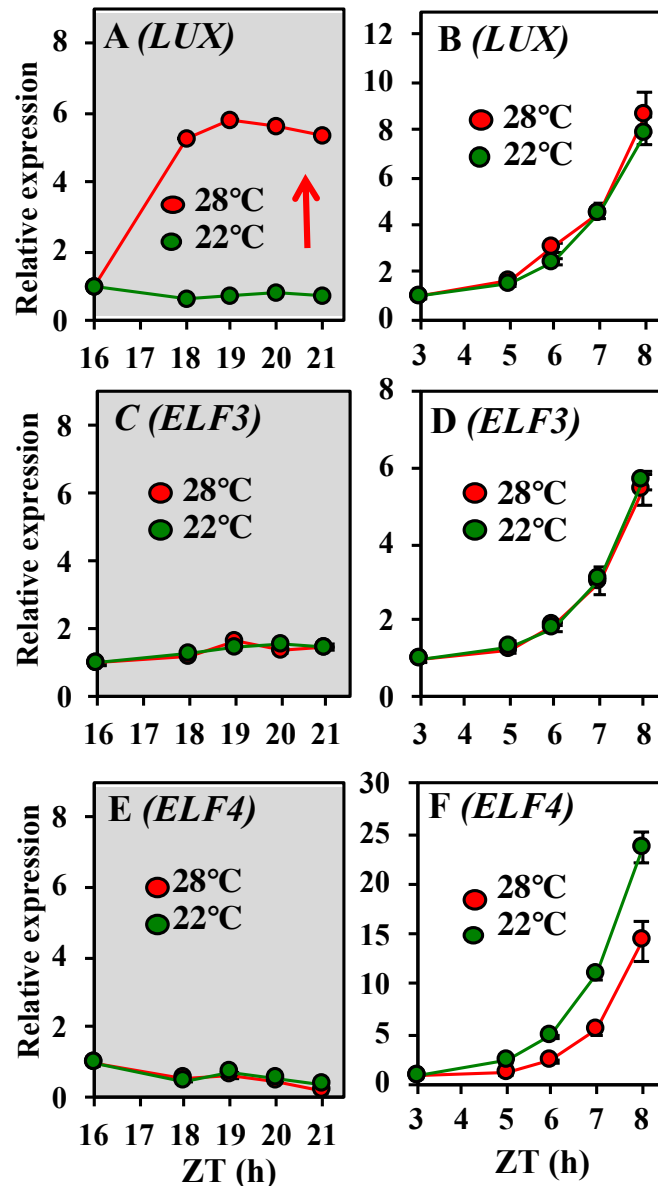


Fig.34 *ELF3, 4, LUX/PCL1* の温度変化に対する一過的な発現応答性

野生株(Col-0)をMD22°Cの条件で1週間生育した後、7日目のZT16またはZT3において22°C、28°Cの2条件に分け、0, 2, 3, 4, 5時間後の各点でサンプリングした。定量RT-PCR法を用いて*ELF3, 4, LUX*のmRNA量を調べた。22°C条件での発現量を緑、28°C条件での発現量を赤の点で示す。各点の値は3連の測定値の平均値を*APX3*遺伝子の発現量によって補正した値を示し、標準誤差をエラーバーとして示す。グレー背景は生育条件において消灯していた時間帯を示す。

5 章. 総合考察

光による植物の形態形成に関する研究の歴史は長く、暗形態形成から明形態形成への転換や避陰応答を始めとした様々な現象において多くの知見が蓄積している。日長に対する応答もまた、光による形態形成の一例であるが、この現象に対する理解は概日時計の分子メカニズム研究と共に近年になって急速に進展してきた。日長応答性の形態制御において中心的役割を果たす *PIF4, 5* 遺伝子が概日時計に制御される日周性の発現リズムを持つことが報告され(Yamashino et al. 2004)、これらの遺伝子の発現位相と明暗周期における暗期の位相との重なりによって伸長生長の表現型を説明する外的符合モデルが提唱された(Niwa et al. 2009)。また、バイオインフォマティクス技術の進展とともに、多くの研究者らによって蓄積されたトランスクリプトーム情報を利用することで、外的符合モデルにおける *PIF4, 5* の下流因子として *ATHB2* 遺伝子が同定された(Kunihiro et al. 2010)。これらの研究を進展させる形で本論文第 2 章においては、*PIF4, 5* の下流因子としてオーキシン、ジベレリン、ブラシノステロイド、エチレン、サイトカイニンという多くの植物ホルモンに関わる遺伝子群(*GH3.5, IAA19, IAA29, BR6ox2, BIM1, GAI, ACS8, CKX5*)を同定した。この結果は過去の研究において示唆されていた光周性の形態形成と植物ホルモン情報伝達の関わりを明確にし、この系における植物の多岐に渡る表現型を説明するひとつの解答となる点で意義深いものであった。しかしながら同定された複数の下流因子の個々の機能を一意的に捉える事は難しく、この点は本論文において残された大きな課題の一つであるといえる。これを解決する糸口として近年、植物ホルモン情報伝達経路におけるクロストークに関して多くの研究者らからの報告がなされている。これらの研究の進展により *PIF4* 下流遺伝子における相互関係が明確化され、近い将来 *PIF4* による光周性の形態制御における下流因子の総体としての機能を捉えることが可能になることが期待される。

生育温度は植物の様々な生理応答の制御要因として光と並んで着目される外的シグナルである。温度による植物の形態制御に関わる研究も古くから行われてきたが、その分子機構に関しては不明な点が多く残されている。近年になって高温応答性の形態制御に *PIF4* 遺伝子が関与していることが報告された(Koini et al. 2009, Franklin et al. 2011)。これを受け本論文第 3 章では、高温応答性の形態制御が *PIF4* 転写リズムの位相変化に起因する外的符合の変化によって説明できることを明らかにした。また、温度変化に対する *PIF4* 転写リズムの位相変化は 16°C から 28°C という広い温度帯にわたって段階的なものであり、シロイヌナズナが生育する広い温度範囲における形態制御を説明し得ることを示した。これらの研究結果はこれまで不明であった植物の形態制御における日長、温度

という 2 つの外的シグナルの関係を明確化(日長、温度は PIF4 を中心とした外的符合機構によって統合され、共通した下流因子を誘導することで植物の形態を多面的に制御する)したという点においても意義深いものであった。

このように洗練された制御機構が自然界においてどのように機能しているか、という点を考察するため、植物の生育環境の一例として名古屋市における平均気温及び日長の年間を通した変化を示す(Fig.35)。名古屋市における平均日照時間は年間を通して約 5 時間、平均気温は約 20°C の大きな変化が見られる。これらの変動には相関があるものの、位相のずれによって季節ごとの様々な環境条件が生まれることがわかる。植物はこのように様々に変化する環境に適応し、不安定な栄養成長期を生き抜くために日長と温度という 2 つの外的シグナルを統合的に処理する制御機構を獲得してきたと考えることができる。

本研究においてはシロイヌナズナを用いて実験を進めてきたが、近年になって他の植物種における形態制御機構の普遍性を示唆する興味深い報告がなされている。単子葉植物であるイネにおいてシロイヌナズナの PIF3 とよく似た配列をもつ PIL 転写因子群が同定されているが(Nakamura et al. 2006)、この中でシロイヌナズナの PIF4 のオルソログと考えられている *OsPIL1* 遺伝子の発現は日周性の発現リズムを持ち、またこの発現は温度感受性を示す。更に *OsPIL1* 遺伝子の過剰発現株では穂丈の伸長生長が促進される表現型を示す(Todaka et al. 2012, Fig.36)。これらの性質はシロイヌナズナにおける PIF4 の転写制御と非常に似通っており、これまで述べてきた日長、温度を統合的に制御する外的符合機構がイネにおいても共通に存在している事が期待される。応用の観点から考えると、イネで見られるような穂丈の伸長生長はバイオマスの増加に直結する表現型であり、今後ますます増えていくと考えられる非モデル植物の研究において、このような日長、温度応答性の形態制御機構の普遍性を検討していくことは重要なテーマとなり得るだろう。

本論文第 4 章では温度による形態形成制御における PIF4 転写リズム形成の分子機構を解明することを目的とし、時計関連遺伝子に着目して研究を進めることで ELF3, ELF4, LUX/PCL1 から構成される複合体 Evening Complex(EC) が直接的に関与していることを明らかにした。しかしながら EC に対して温度シグナルが作用する分子メカニズムの詳細についてはほとんどわかっておらず、本論文において残された最も重要な課題であると考えられる。この問題について、近年になって報告された新しい事実を交えて考察していきたい。本論文第 4 章において、*elf3*, *elf4* 株における温度感受性の顕著な低下と、PIF4 プロモータへの ELF3, LUX タンパク質への局在解析によって EC が PIF4 の温度に対する転写制御において直接的に影響を与える事を示したが、これを支持する事実として 22°C で見られる PIF4 プロモータへの ELF3 タンパク質の局在が高温条件

下で減少する事が報告されている(Box et al. 2015)。また、高温で転写誘導される B-BOX ファミリータンパク質 BBX18, BBX23 が E3 ユビキチンリガーゼ COP1 依存的に ELF3 タンパク質の蓄積量を減少させる事が示唆されている(Ding et al. 2018)。他方で非常に興味深い事実として赤色光受容体 Phytochrome が夜間の温度感受性分子であることが報告された。明暗サイクル条件下における Phytochrome は明期には Pfr 型として存在し、暗期で緩やかに Pr 型に変化する。この光非依存的な Pfr 型から Pr 型への変化速度(半減期)は温度が高くなるほど早くなる(Jung et al. 2016)。つまり Phytochrome は温度を直接感知することで夜間に PIF タンパク質が安定化できる時間範囲を限定しており、高温条件では夜の早い段階から PIF の抑制を解除することで伸長成長に関わっていると考えられる。このように現在では、温度応答性の伸長成長制御には夜間の *PIF4* の転写レベルだけでなく、活性調節との両面による協調的な作用が重要な役割を果たしていることがわかってきている(**Fig.37**)。しかしながら現在においても *PIF4* の転写制御に関わる EC の活性調節における温度感知メカニズムの詳細は解明されておらず、植物の環境適応という研究領域において今後最も注目される研究課題の一つとなることが予想される。また、本研究においては伸長応答制御に関わる *PIF4* を中心として温度応答制御を考察してきたが、*PIF4* の転写制御に関わる EC は概日時計の中心振動体として様々な標的の遺伝子発現制御に関わる事が知られている。従って同メカニズムの解明は植物の形態制御だけにとどまらず、植物における温度応答性の多くの生理現象を解決する糸口となることが期待される。

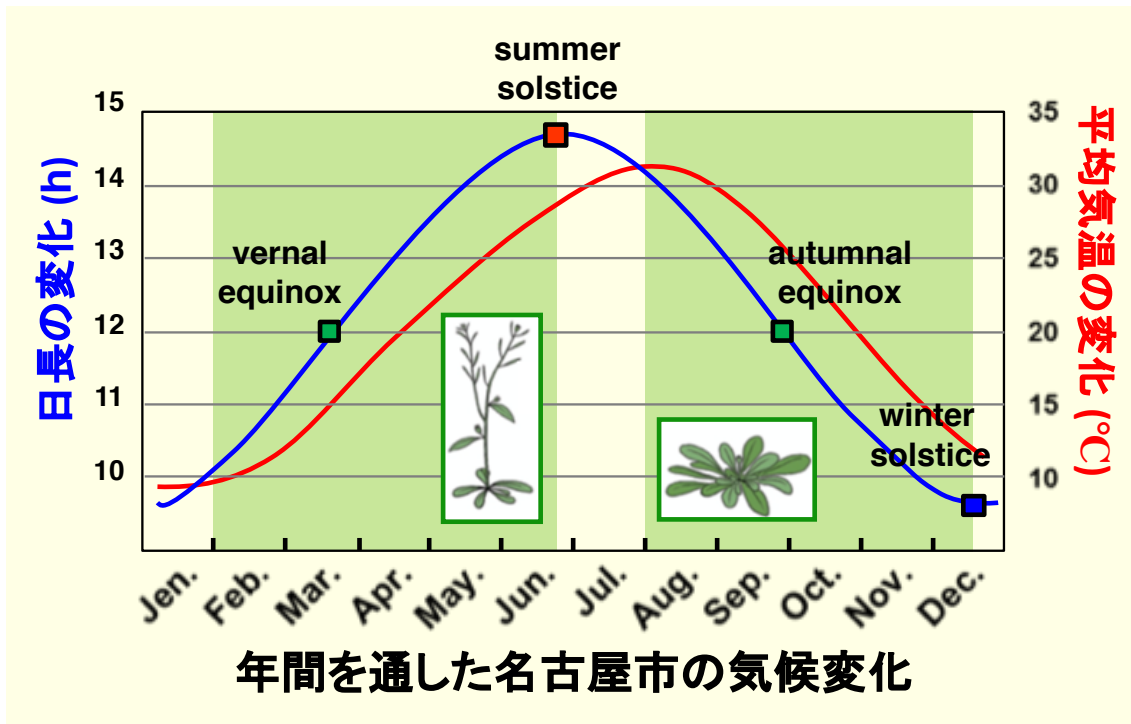


Fig.35 日長、気温の季節変化

名古屋市における年間を通した気候変化。日長の変化を青線、平均気温の変化を赤先のグラフで示す。日長変化のグラフにおいて春分、秋分を緑の四角、夏至を赤、冬至を青の四角で示す。また、一般的なシロイヌナズナの生育範囲を緑の背景で示す。

イネの穂丈を制御する *OsPIL1* 遺伝子

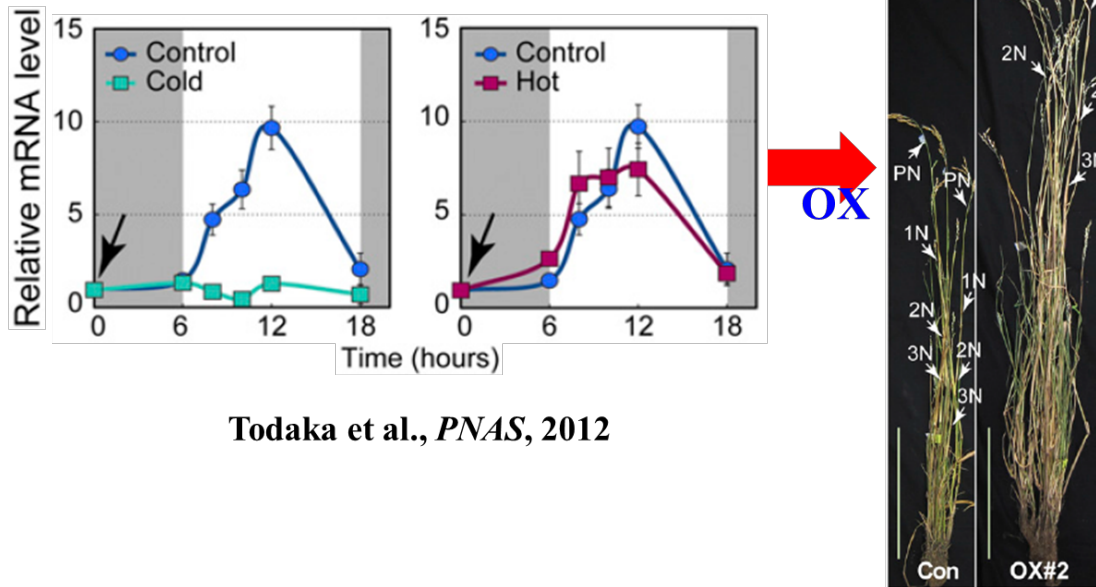


Fig.36 イネの生長制御に関わる *OsPIL1* 遺伝子

単子葉植物であるイネにおいても PIF とよく似た配列を持つ遺伝子群が同定されている。その一つである *OsPIL1* 遺伝子は明暗周期下で日周性の発現リズムをもち、また温度感受性の発現制御を受けている事が示唆されている (Todaka et al. 2012)。同遺伝子の過剰発現株では対照に比べて穂丈の伸長生長が促進されている。

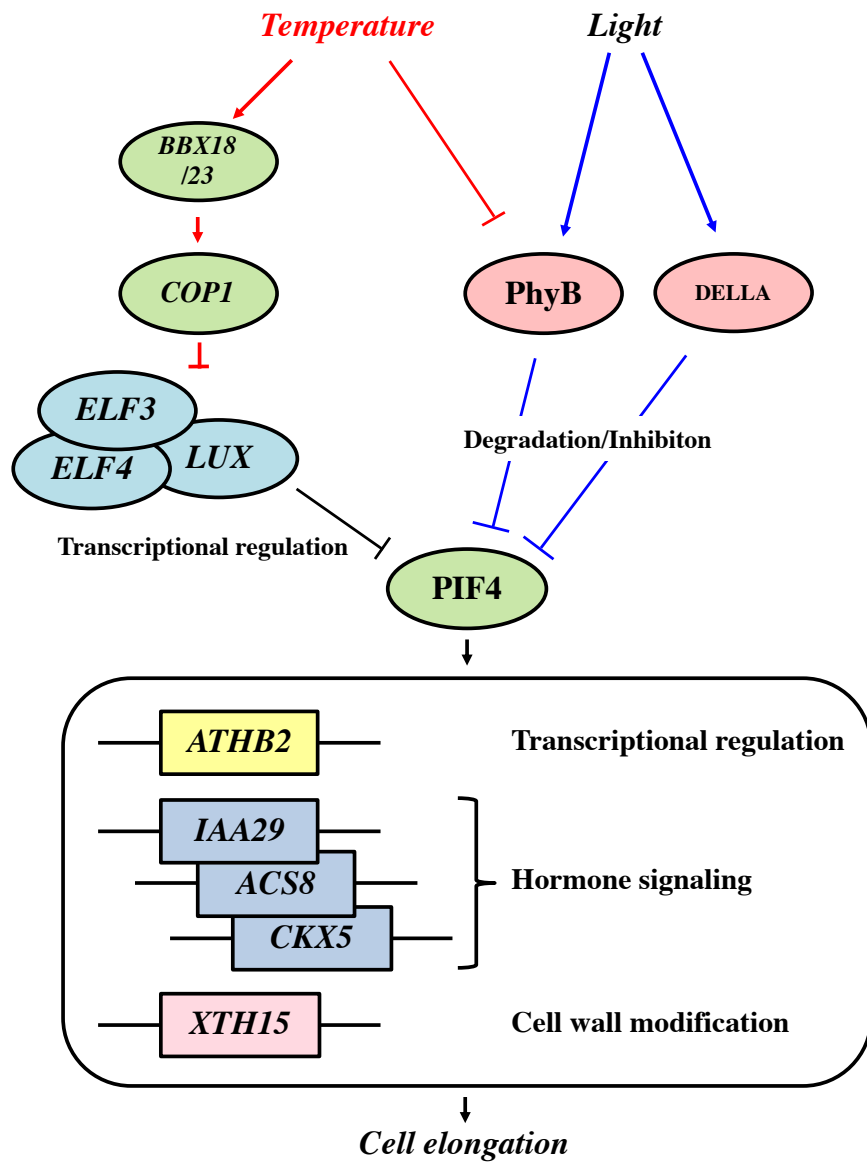


Fig.37 PIF4 を中心とした光、温度による伸長応答制御

現在明らかとなっている PIF4 を中心とした温度、光による伸長応答制御メカニズムの全体像を模式的に示す。本研究で明らかにした制御経路を黒線、その後の研究によって明らかとなってきた制御経路を赤線で示す。

研究材料及び実験方法

実験に用いたシロイヌナズナ種子

Arabidopsis thaliana

Accession	name	Reference
Columbia:	Wild(Col-0)	
	<i>pif4-101</i>	de Lucas et al. 2008
	<i>pif4-101 pif5-1</i>	de Lucas et al. 2008
	<i>pif4-101</i> PIF4 ^{pro} -PIF4-citrine-HA #2	This work
	35S ^{pro} -PIF4	Fujimori et al. 2004
	<i>phyB-9</i>	Reed et al. 1994
	<i>prr9-10 prr7-11 prr5-11</i>	Nakamichi et al. 2005b
	<i>elf3-8</i>	Hicks et al. 2001
	<i>elf4-2</i>	Hazen et al. 2005a
	<i>pcl1-1</i>	Onai et al. 2004
	<i>cca1-1 lhy-11</i>	Niwa et al. 2007
	<i>prr9-10 prr7-11</i>	Nakamichi et al. 2005a
	<i>toc1-2</i>	Ito et al. 2007
	<i>gi-2</i>	Araki and Komeda 1993
<i>lux-4</i> LUX ^{pro} -LUX-GFP	Helfer et al. 2011	
Wassilewskija:	Wild(WS)	
	<i>elf3-4</i> ELF3 ^{pro} -ELF3-YFP	Dixon et al 2011

通常 of 植物生育方法

通常 of シロイヌナズナ of 生育は種子 of 発芽から幼植物体まで Murashige and Skoog (MS) 培地を用いて行い、土(バーミキュライト/クレハ園芸用培土=3:2)に植え替えた。生育条件は 22°C、LD 条件、光量は 90~110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ とした

Murashige and Skoog 培地

MS salt	4.6 g
1000 x Vitamins	1 ml
2 g/100 ml myo-inositol	5 ml
Sucrose	10 g
dH ₂ O	1 L

1N KOH で pH6.3 に合わせ、120°C 20min オートクレーブしたものを用いた。支持体として gellan gum (final 0.3% w/v)を用いた。

FR 発現誘導実験

MS 培地上で 22°C 白色光恒明条件、8 日間生育した植物に遠赤色光 ($\lambda_{\text{max}} = 720 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) を照射し、1 時間おきにサンプリングを行った

RNA 抽出

サンプリング後すみやかに植物体全体を液体窒素で急速凍結し、マルチビーズ ショッカー(安井機械)によって破碎した。RNeasy plant mini kit (Qiagen) によって RNA の抽出を行った

qRT-PCR

抽出したトータル mRNA 1 μg を用いて、ReverTra Ace (TOYOBO) 、oligo (dT) primer によって逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

各遺伝子的に特異的な primer set、SYBR Premix Ex Taq II (TAKARA)を用いて Stepone Plus™ Real-Time PCR System (Life Technologies) により mRNA 発現量を測定し、PCR Miner (Zhao and Fernald 2005; <http://www.miner.ewindup.info>) によって解析した。APX3 遺伝子の発現量を内部コントロールとして各遺伝子の発現量を補正し、最終的な測定値とした。

トータル粗タンパク抽出

300mg サンプリング後すみやかに植物体全体を液体窒素で急速凍結し、マルチビーズショッカー(安井機械)によって破碎した。

各サンプルに 600 μ l Extraction buffer(100mM Tris-HCl pH=8, 50mM EDTA, 250mM NaCl, 0.7% SDS, 1mM DTT) を加えて 65°C, 10 分間インキュベートし 15,000rpm, 5min, RT で遠心した後上清を回収し、等量の 2xSample buffer(62.5mM Tris-HCl pH=8, 2% SDS, 10% Glycerol, 5% β -Met, BPB) を加えて泳動用サンプルとした。

SDS-PAGE

TGX Stain-Free Acryl Amid Gel(Bio-Rad)を用いて 10%ゲルを作成し、CC:20mA の条件で各サンプルを約 1 時間泳動した。

ゲルを取り出し UV クロスリンカー CL-1000(FUNAKOSHI)を用いて 120,000 μ J/cm² の UV を照射してクロスリンク反応を行い、イメージングアナライザー LAS3000(FUJIFILM)を用いて蛍光モード(EtBr), 10 秒露光の条件で全タンパクのパターンを検出した。

または Bio-safe Coomassie Stain(Bio-rad)で約 30 分染色後 D7000(Nikon)で全タンパクのパターンを検出した。

ウェスタンブロット

泳動したアクリルアミドゲルを 15V, 1hr の条件で PVDF メンブレンに転写した。メンブレンをハイブリバッグに移し TBS-T 0.5%スキムミルクを用いて 1 時間ブロッキング反応を行った後、1/2000 の Anti-HA-Peroxidase 抗体(Roche, 3F10 monoclonal)を加えて更に 1 時間反応させた。メンブレンを TBS-T で 5 分 \times 4 回 wash した後、SuperSignal West Femto 検出試薬(Thermo Fisher Scientific)を反応後、イメージングアナライザー LAS3000(FUJIFILM)を用いて速やかに PIF4-HA タンパクのパターンを検出した。

クロマチン免疫沈降(ChIP)

中日条件で約 10 日間生育した植物 1-2g をサンプリングし 25mL Cross-link buffer(2xTBS, 1% Formaldehyde, 0.01% Silwet)を加えて 30 分間減圧した。溶液を捨て脱イオン水で 1 回洗浄した後 25mL Stop buffer(2xTBS, 125mM Glycine)を加えて 10 分間静置しクロスリンク反応を停止した。溶液を捨て脱イオン水で 1 回洗浄しペーパータオルで水分を除いた後、液体窒素で速やかに凍結した。乳鉢を用いて凍結サンプルを破碎し 25mL Extraction buffer I(400mM Sucrose, 10mM Tris-HCl pH=8, 10mM MgCl₂, 50 μ M MG132, 1x Protease inhibitor cocktail(SIGMA))を加えて懸濁し 3 重にしたミラクロス(Calbiochem)でろ過した。ろ液を 4,000rpm, 20min, 4°Cで遠心し上清を除いた後 pellet を 1mL Extraction buffer II(250mM Sucrose, 10mM Tris-HCl pH=8, 10mM MgCl₂, 1%

Triton X-100, 50 μ M MG132, 1x Protease inhibitor cocktail)に再懸濁した。懸濁液を 14,000rpm, 10min, 4°Cで遠心し上清を除いた後 pellet を 300 μ L Extraction buffer III(1.7M Sucrose, 10mM Tris-HCl pH=8, 2mM MgCl₂, 0.15% Triton X-100, 50 μ M MG132, 1x Protease inhibitor cocktail)に再懸濁した。新しいチューブに予め分注した 300 μ L Extraction buffer III に得られた懸濁液を重層し 14,000rpm, 60min, 4°Cで遠心した後 pellet を 300 μ L Nuclear lysis buffer(50mM Tris-HCl pH=8, 10mM EDTA, 1% SDS, 50 μ M MG132, 1x Protease inhibitor cocktail)に再懸濁した。Bioruptor(コスモ・バイオ)を用いて懸濁液を 30sec ON/30sec OFF の条件で 10cycle ソニケーションしクロマチンを断片化した。15,000rpm, 5min, 4°Cで遠心し上清を新しいチューブに移して 2.7mL ChIP dilution buffer(16.7mM Tris-HCl pH=8, 1.2mM EDTA, 167mM NaCl, 1.1% Triton X-100)加えて希釈した(断片化クロマチン溶液)。

1mL クロマチン溶液に予め洗浄した 50 μ L Dinabeads protein G(Thermo Fisher Scientific)加え 4°Cで 1 時間反応させた。Beads を分離し上清に 1 μ L anti-GFP モノクローナル抗体(Clontech)を加えて 4°Cで 1 時間反応させた後、予め洗浄した 50 μ L Dinabeads protein G を加えて更に 4°Cで 1 時間反応させた。beads を分離し 1mL Low salt buffer(20mM Tris-HCl pH=8, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.2% SDS)で 2 回、1mL High salt buffer(20mM Tris-HCl pH=8, 2mM EDTA, 500mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.2% SDS)で 1 回、1mL LiCl buffer(10mM Tris-HCl pH=8, 1mM EDTA, 250mM LiCl, 1% NP-40, 1% Sodium Deoxycholate)で 1 回洗浄した後、250 μ L Elution buffer(50mM Tris-HCl pH=8, 10mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS)を加えて懸濁しヒートブロックを用いて 65°C, 15min インキュベートした。beads を分離し上清を新しいエッペンに移し 20 μ L 5M NaClを加えた後、ヒートブロックを用いて 65°Cで一晩インキュベーションすることで脱クロスリンクを行った(このとき断片化クロマチン溶液 250 μ L を同様に処理して input サンプルとし qPCR による定量解析に用いた)。ChIP サンプル及び input サンプルに 10 μ L 0.5M EDTA ,20 μ L 1M Tris-HCl pH6.5 ,1.05 μ L 20mg/mL proteinase K , 2 μ g RNase A をそれぞれ加え 45°C , 60min インキュベートした後、NucleoSpin(MACHEREY-NAGEL)を用いてサンプルの精製を行った。

精製した ChIP/input サンプル、ターゲットのプロモータ領域に設計された各プライマーセットを用いて q-PCR 解析を行い、免疫沈降法によって回収された各断片の回収率を比較した。

用いたプライマー

for qPCR

Primer name	sequence
APX3-F	CTCCGTTCTCTCATCGC
APX3-R	CAGAGATCGAGAGCGATC
PIF5-F	GCGGGAAATCAGACCGTGCAACAA
PIF5-R	CGCCGGAGATCCAAATCCCAACAT
PIF4-F	ATCATCTCCGACCGGTTTGC
PIF4-R	AGTGGCTCACCAACCTAGTG
ATHB2-F	GAGGTAGACTGCGAGTTCCTAC
ATHB2-R	GCATGTAGAACTGAGGAGAGAGC
TAA1-F	GCATTGACCTTTAGATAAGCAAGCG
TAA1-R	TGTTACCTTCATATTTACATAGG
GH3.5-F	AAGTCCATAGGCCCGC
GH3.5-R	CACGTTCCACATTCCATC
IAA19-F	GAGCATGGATGGTGTGCCTTAT
IAA19-R	TTCGCAGTTGTCACCATCTT
IAA29-F	ATCACCATCATTGCCGTAT
IAA29-R	ATTGCCACACCATCCATCTT
BR6ox2-F	GACCTGACGAACCGCTCAC
BR6ox2-R	GAAGGAAGCTTGAGACTTCCG
BAS1-F	TCCGGCACTCAAAGAGACC
BAS1-R	GAAGAAATGATAAGGAGGACCTCG
GAI-F	CAATCAGTTCGCTATCGATTTCG
GAI-R	CTTTCTGAACAGCTTCAGCGC
ACS8-F	GTGGTAGCGTAATGGAAGTCC
ACS8-R	TCTAGACCCGAGACGAGC
CKX5-F	GACAAGTGGGATCGGTTTCAG
CKX5-R	CCTGTGTCACCATGAAGCC
XTH15-F	CTTATGGCAGGAGGAGACTC
XTH15-R	CCAGGAATGCTTTATTGATCTTGAC
EXPA8-F	CCAAGGTGGTCAGTTCTGATC
EXPA8-R	CCTTGCTTTTTTGTAGGCACAATG
LTP3-F	CCACTGCGAAGAGCATTTCTG
LTP3-R	CTGGTAAACCATACTCTTAACGC

LNG2-F	CTTCACTCAGCAGCAGCAG
LNG2-R	GGACAACCTCGATCTCGCAG
CCA1sygF	GGTGGACTGAGGAAGAAC
CCA1sygR	GGAGAAAAATTTCTGAGCGTGAC
LHYsygF	CAATGCAACTACTGATTCGTGGAA
LHYsygR	GCTATACGACCCTCTTCGGAGAC
TOC1sygF	CTCTCCTTTCAGAGTGTTCTTATC
TOC1sygR	CACAGGGATTCTGCGAAG
PRR5sygF	ATTCCGAATGAAGCGAAAGGA
PRR5sygR	TCGTAACGAACCTTTTTCTCATAACAT
PRR7sygF	GAATGTGCTGAGGCGTTCAGA
PRR7sygR	GGCTGGATTATACCTTGAGAAAGC
PRR9sygF	GTTGAAGAGGAAAGATCGATGCTT
PRR9sygR	CTGCTCTGGTACCGAACCTTTT
ELF3-sygF	GCACAGACTGATTAAGGTTCAAAAAC
ELF3-sygR	CTTCACTGGATAGCTTTTAGCAG
ELF4sygF	CGATGTGGGAGAATCTTGAC
ELF4sygR	TGTCGTTGACTTGTTGAATCAGTG
LUXsygF	TAACGTGGAGGAGGAAGATCGA
LUXsygR	TCCATCACCGTTTGATGTCTTT
GI-sygF	ACTAGCAGTGGTCGACGGTTTATC
GI-sygR	GCTGGTAGACGACACTTCAATAGATT

for ChIP qPCR

Primer name	sequence
UBQ(-622/-422)F	AATAAACGGCGTCAAAGTGG
UBQ(-622/-422)R	ACGAGGACGACTAGGTACAG
LUX LBS-0(-596/-507)F	TCCAACGGTGGAAAGATCACATTGC
LUX LBS-0(-596/-507)R	GTTCGGCCAGCTGGAGAGTG
LUX CS(+442/+547)F	GTGTGGACACCGCAGCTAC
LUX CS(+442/+547)R	ATCCTTCAACGTTTCATCAGCTGC
GI a(-887/-706)F	GGCAAACATTTTTCTTGGTGATTGTAAC
GI a(-887/-706)R	CATCTCCACCCATACCATG
GI b(-674/-498)F	GCGCATAAAGGTGGTGG
GI b(-674/-498)R	GAGAGATCGACGAATATCGGAG

GI c(-455/-252)F	CCAACCAACAAACTCATAGGAAGAC
GI c(-455/-252)R	GTCAAATCAAACAACAAATCTAAGCTGAG
GI d(-210/-1)F	CAGGGTTTAGCTGTTTGATTTCAGC
GI d(-210/-1)R	CCAGGAACCGAAACTAAACCC
GI CS(+532/+742)F	GCTGTCTAGTATCATGCTTACTG
GI CS(+532/+742)R	CTAGTTGTAGCTTTGCTCAGAC
PRR7 a(-1732/-1586)F	CCTACCTGGAAAAGCTTAACGTCG
PRR7 a(-1732/-1586)R	CCTCCGTCCATTTGCCTCC
PRR7 b(-1557/-1415)F	CGAGCTCAGGAACATACAGC
PRR7 b(-1557/-1415)R	CGCAGATCTCTCACTCTCC
PRR7 c(-1138/-997)F	GGCGGGAAAATTTACCCTTTAGG
PRR7 c(-1138/-997)R	CCTTAACCACTCGGACATATCG
PRR7 d(-791/-647)F	CGTTTTCCTTACCCACCATTACACG
PRR7 d(-791/-647)R	CCACGTCAGAGCGGATATTTCC
PRR7 e(CS)(+20/+166)F	GGGAGGGTTCACGTTACC
PRR7 e(CS)(+20/+166)R	GCAGTCCACCTGAACTCC
PIF4 a(-1077/-991)F	GCCAAGGGTGCCCTTTCAATGC
PIF4 a(-1077/-991)R	CCGAGTTCAATGCTCTCAACGAGT
PIF4 b(-586/-425)F	TGCTCCTGTCACTTTCTGTCTGTACCC
PIF4 b(-586/-425)R	TCCAAGTTCCACGCCCAACACA
PIF4 c(-382/-305)F	TCTGATTCGTCCAGAAGCTTTCCT
PIF4 c(-382/-305)R	GCCACATCTTATAAAACCAAAAACCCG
PIF4 d(+6/+159)F	ACACCAAGGTTGGAGTTTGTGAGGA
PIF4 d(+6/+159)R	TGGCCTAGACATCAATACACACACACA
PIF4 CS(+1379/+1573)F	TCCCCGGAGTTCAACCTCAGCA
PIF4 CS(+1379/+1573)R	GAGTCGCGGCCTGCATGTGT

参考文献

- Alabadí, D. and Blázquez, M.A. (2009) Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. *Plant Mol. Biol.* 69: 409-417.
- Araki, T. and Komeda, Y. (1993) Analysis of the role of the late-flowering locus, GI, in the flowering of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 3: 231-239
- Bai, M.-Y., Shang, J.-X., Oh, E., Fan, M., Bai, Y., Zentella, R., Sun, T. and Wang, Z.-Y. (2012) Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nature Cell Biol.* DOI: 10.1038/ncb2546.
- Boikoglou, E., Ma, Z., von Korff, M., Davis, A.M., Nagy, F. and Davis, S.J. (2011) Environmental memory from a circadian oscillator: the *Arabidopsis thaliana* clock differentially integrates perception of photic vs. thermal entrainment. *Genetics* 189: 655-664.
- Box, M.S., Huang B.E., Domijan, M., Jaeger, K.E., Khattak, A.K., Yoo, S.J., Sedivy, E.L., Jones, D.M., Hearn, T.J., Webb, A.A., Grant, A., Locke, J.C., Wigge, P.A. (2015) ELF3 Controls Thermoresponsive Growth in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 25: 194-199.
- Breton, G. and Kay, S.A. (2007) Plant biology: time for growth. *Nature* 448: 265-266.
- Carabelli, M., Possenti, M., Sessa, G., Ciolfi, A., Sassi, M., Morelli, G. and Ruberti, I. (2007) Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genew Dev.* 21: 1863-1868.
- Carre, I. and Veflingstad, S.R. (2013) Emerging design principles in the *Arabidopsis* circadian clock. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24: 393-398.
- Casal, J.J. (2012) Shade avoidance. *Arabidopsis Book* 10: e0157.
- Chow, B.Y., Helfer, A., Nusinow, D.A. and Kay, S.A. (2012) ELF3 recruitment to the PRR9 promoter requires other Evening Complex members in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Signal Behav* 7: 170-173.

- Corbesier, L. and Coupland, G. (2006) The quest for florigen: a review of recent progress. *J Exp Bot* 57: 3395-3403.
- Covington, M.F. and Harmer, S.L. (2007) The circadian clock regulates auxin signaling and responses in Arabidopsis. *PLoS Biol* 5: e222.
- Covington, M.F., Maloof, J.N., Straume, M., Kay, S.A. and Harmer, S.L. (2008) Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol* 9: R130.
- Deal, R.B., Topp, C.N., McKinney, E.C. and Meagher, R.B. (2007) Repression of flowering in Arabidopsis requires activation of FLOWERING LOCUS C expression by the histone variant H2A.Z. *Plant Cell* 19: 74-83.
- Deal, R.B. and Henikoff, S. (2010) Gene regulation: A chromatin thermostat. *Nature* 463: 887-888.
- de Lucas, M., Daviere, J.M., Rodriguez-Falcon, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blazquez, M.A., Titarenko, E. and Prat, S. (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451: 480-484.
- de Montaigu, A., Tóth, R. and Coupland, G. (2010) Plant development goes like clockwork. *Trends Genet.* 26: 296-306.
- Derbyshire, P., Findlay, K., McCann, M.C. and Roberts, K. (2007a) Cell elongation in Arabidopsis hypocotyls involves dynamic changes in cell wall thickness. *J Exp Bot* 58: 2079-2089.
- Derbyshire, P., McCann, M.C. and Roberts, K. (2007b) Restricted cell elongation in Arabidopsis hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biol* 7: 31.
- Devlin PF, Kay SA. (2000) Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 12:2499-2510.
- Ding, L., Wang, S., Song, Z.T., Jiang, Y., Han, J.J., Lu, S.J., Li, L., Liu, J.X. (2018) Two B-Box Domain Proteins, BBX18 and BBX23, Interact with ELF3 and Regulate Thermomorphogenesis in Arabidopsis. *Cell Rep.* 25:1718-1728.

- Dixon, L.E., Knox, K., Kozma-Bognar, L., Southern, M.M., Pokhilko, A. and Millar, A.J. (2011) Temporal repression of core circadian genes is mediated through EARLY FLOWERING 3 in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 21: 120-125.
- Doherty, C.J. and Kay, S.A. (2010) Circadian control of global gene expression patterns. *Annu. Rev. Genet.* 44: 419-444.
- Doyle, M.R., Davis, S.J., Bastow, R.M., McWatters, H.G., Kozma-Bognar, L., Nagy, F., Millar, A.J. and Amasino, R.M. (2002) The ELF4 gene controls circadian rhythms and flowering time in Arabidopsis thaliana. *Nature* 419: 74-77.
- Duek, P.D. and Fankhauser, C. (2005) bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. *Trends Plant Sci* 10: 51-54.
- Edwards, K.D., Anderson, P.E., Hall, A., Salathia, N.S., Locke, J.C., Lynn, J.R., Straume, M., Smith, J.Q. and Millar, A.J. (2006) FLOWERING LOCUS C mediates natural variation in the high-temperature response of the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell* 18: 639-650.
- Edwards, K.D., Lynn, J.R., Gyula, P., Nagy, F. and Millar, A.J. (2005) Natural allelic variation in the temperature-compensation mechanisms of the Arabidopsis thaliana circadian clock. *Genetics* 170: 387-400.
- Eriksson, M.E., Hanano, S., Southern, M.M., Hall, A. and Millar, A.J. (2003) Response regulator homologues have complementary, light-dependent functions in the Arabidopsis circadian clock. *Planta* 218: 159-162.
- Farre, E.M., Harmer, S.L., Harmon, F.G., Yanovsky, M.J. and Kay, S.A. (2005) Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the Arabidopsis circadian clock. *Curr. Biol.* 15: 47-54.
- Farre, E.M. (2012) The regulation of plant growth by the circadian clock. *Plant Biol.* 14* 4-1-410.
- Fornara, F., de Montaigu, A. and Coupland, G. (2010) SnapShot: Control of flowering in Arabidopsis. *Cell* 141: 550, 550 e551-552.
- Franklin, K.A. (2010) Plant chromatin feels the heat. *Cell* 140: 26-28.
- Franklin, K.A., Lee, S.H., Patel, D., Kumar, S.V., Spartz, A.K., et al. (2011) Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 20231-20235.

- Fujimori, T., Yamashino, T., Kato, T. and Mizuno, T. (2004) Circadian-controlled basic/helix-loop-helix factor, PIL6, implicated in light-signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45: 1078-1086.
- Golan, A., Tepper, M., Soudry, E., Horwitz, B.A. and Gepstein, S. (1996) Cytokinin, acting through ethylene, restores gravitropism to *Arabidopsis* seedlings grown under red light. *Plant Physiol.* 112: 901-904.
- Gould, P.D., Locke, J.C., Larue, C., Southern, M.M., Davis, S.J., Hanano, S., Moyle, R., Milich, R., Putterill, J., Millar, A.J. and Hall, A. (2006) The molecular basis of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 18: 1177-1187.
- Gould, P.D., Ugarte, N., Domijan, M., Costa, M., Foreman, J., et al. (2013) Network balance via CRY signalling controls the *Arabidopsis* circadian clock over ambient temperatures. *Mol Syst Biol.* 9: 650.
- Gudesblat, G.E. and Russinova, E. (2011) Plants grow on brassinosteroids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 530-537.
- Hamilton, E.E. and Kay, S.A. (2008) SnapShot: circadian clock proteins. *Cell* 135: 368-368 e361.
- Harmer, S.L. (2009) The circadian system in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 60: 357-377.
- Hornitschek, P., Kohnen, M.V., Lorrain, S., Rougemont, J., Ljung, K., et al. (2012) Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *Plant J.* 71:699-711.
- Hazen, S.P., Borevitz, J.O., Harmon, F.G., Pruneda-Paz, J.L., Schultz, T.F., Yanovsky, M.J., Liljegren, S.J., Ecker, J.R. and Kay, S.A. (2005a) Rapid array mapping of circadian clock and developmental mutations in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138: 990-997.
- Hazen, S.P., Schultz, T.F., Pruneda-Paz, J.L., Borevitz, J.O., Ecker, J.R. and Kay, S.A. (2005b) LUX ARRHYTHMO encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 10387-10392.

- Helfer, A., Nusinow, D.A., Chow, B.Y., Gehrke, A.R., Bulyk, M.L., and Kay, S.A. (2011) LUX ARRHYTHMO encodes a nighttime repressor of circadian gene expression in the Arabidopsis core clock. *Curr. Biol.* 21: 126-133.
- Hicks, K.A., Albertson, T.A., and Wagner, D.R. (2001). EARLY FLOWERING 3 encodes a novel protein that regulates circadian clock function and flowering in Arabidopsis. *Plant Cell* 13: 1281–1292.
- Hotta, C.T., Gardner, M.J., Hubbard, K.E., Baek, S.J., Dalchau, N., Suhita, D., Dodd, A.N. and Webb, A.A. (2007) Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. *Plant, cell & environment* 30: 333-349.
- Huq, E. and Quail, P.H. (2002) PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis. *EMBO J.* 21: 2441-2450.
- Imaizumi, T. (2010) Arabidopsis circadian clock and photoperiodism: time to think about location. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 83-89.
- Imaizumi, T. and Kay, S.A. (2006) Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends Plant Sci* 11: 550-558.
- Ito, S., Nakamichi, N., Nakamura, Y., Niwa, Y., Kato, T., Murakami, M., Kita, M., Mizoguchi, T., Niinuma, K., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2007) Genetic linkages between circadian clock-associated components and phytochrome-dependent red light signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 48: 971-983.
- Jang, S., Marchal, V., Panigrahi, K.C., Wenkel, S., Soppe, W., Deng, X.W., Valverde, F. and Coupland, G. (2008) Arabidopsis COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO J.* 27: 1277-1288.
- Jung, J.H., Domijan, M., Klose, C., Biswas, S., Ezer, D., Gao, M., Khattak, A.K., Box, M.S., Charoensawan, V., Cortijo, S., Kumar, M., Grant, A., Locke, J.C., Schäfer, E., Jaeger, K.E., Wigge, P.A. (2016) Phytochromes function as thermosensors in Arabidopsis. *Science* 354:886-889.
- Keller, M.M., Jaillais, Y., Pedmale, U.V., Moreno, J.E., Chory, J. and Ballare, C.L.

- (2011) Cryptochrome 1 and phytochrome B control shade-avoidance responses in *Arabidopsis* via partially independent hormonal cascades. *Plant J.* 67: 195-207.
- Khanna, R., Huq, E., Kikis, E.A., Al-Sady, B., Lanzatella, C. and Quail, P.H. (2004) A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Cell* 16: 3033-3044.
- Kiba, T., Henriques, R., Sakakibara, H. and Chua, N.H. (2007) Targeted degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCF^{ZTL} complex regulates clock function and photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19: 2516-2530.
- Kikis, E.A., Khanna, R. and Quail, P.H. (2005) ELF4 is a phytochrome-regulated component of a negative-feedback loop involving the central oscillator components CCA1 and LHY. *Plant J.* 44: 300-313.
- Kim, W.Y., Fujiwara, S., Suh, S.S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., Putterill, J., Nam, H.G. and Somers, D.E. (2007) ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* 449:356-360.
- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitelam, G.C. and Franklin, K.A. (2009) High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Curr. Biol.* 19: 408-413.
- Kojima, S., Banno, H., Yoshioka, Y., Oka, A., Machida, C. and Machida, Y. (1999) A binary vector plasmid for gene expression in plant cells that is stably maintained in *Agrobacterium* cells. *DNA Res.* 6: 407-410.
- Kolmos, E., Nowak, M., Werner, M., Fischer, K., Schwarz, G., Mathews, S., Schoof, H., Nagy, F., Bujnicki, J.M. and Davis, S.J. (2009) Integrating ELF4 into the circadian system through combined structural and functional studies. *HFSP journal* 3: 350-366.
- Kozuka, T., Kobayashi, J., Horiguchi, G., Demura, T., Sakakibara, H., Tsukaya, H. and Nagatani, A. (2010) Involvement of auxin and brassinosteroid in the regulation of petiole elongation under the shade. *Plant Physiol.* 153: 1608-1618.

- Kumar, S.V., Lucyshyn, D., Jaeger, K.E., Alos, E., Alvey, E., Harberd, N.P. and Wigge, P.A. (2012) Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature* 484: 242-245.
- Kunihiro, A., Yamashino, T., Nakamichi, N., Niwa, Y., Nakanishi, H. and Mizuno, T. (2011) Phytochrome-interacting factor 4 and 5 (PIF4 and PIF5) activate the homeobox ATHB2 and auxin-inducible IAA29 genes in the coincidence mechanism underlying photoperiodic control of plant growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52: 1315-1329.
- Lau, O.S. and Deng, X.W. (2010) Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 571-577.
- Lee, S., Lee, S., Yang, K.Y., Kim, Y.M., Park, S.Y., Kim, S.Y. and Soh, M.S. (2006) Overexpression of PRE1 and its homologous genes activates Gibberellin-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 591-600.
- Leivar, P. and Quail, P.H. (2011) PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Sci* 16: 19-28.
- Leivar, P., Tepperman, J.M., Cohn, M.M., Monte, E., Al-Sady, B., Erickson, E. and Quail, P.H. (2012) Dynamic antagonism between phytochromes and PIF family basic helix-loop-helix factors induces selective reciprocal responses to light and shade in a rapidly responsive transcriptional network in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 24: 1398-1419.
- Leivar, P., Tepperman, J.M., Monte, E., Calderon, R.H., Liu, T.L. and Quail, P.H. (2009) Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 21: 3535-3553.
- Leivar P, Monte E, Cohn MM, Quail PH. (2012) Phytochrome signaling in green *Arabidopsis* seedlings: impact assessment of a mutually negative phyB-PIF feedback loop. *Mol Plant.* 5:734-49.
- Li, L., Ljung, Breton, K.G., Schmitz, R.J., Pruneda-Paz, J., Cowing-Zitron, C.,

- Cole, C.B.J., Ivans, L.J., Pedmale, U.V., Jung, H.-S., Ecker, J.R., Kay, S.A. and Chory, J. (2012) Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes Dev.* 26:785-790.
- Liu, T., Carlsson, J., Takeuchi, T., Newton, L. and Farré, E.M. (2013) Direct regulation of abiotic responses by the *Arabidopsis* circadian clock component PRR7. *Plant J.* doi: 10.1111/tpj.12276.
- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P.D., Whitelam, G.C. and Fankhauser, C. (2008) Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant J.* 53: 312-323.
- Lorrain, S., Trevisan, M., Pradervand, S. and Fankhauser, C. (2009) Phytochrome interacting factors 4 and 5 redundantly limit seedling de-etiolation in continuous far-red light. *Plant J.* 60: 449-461.
- Makino, S., Kiba, T., Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Ueguchi, C., Sugiyama, T. and Mizuno, T. (2000) Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 41: 791-803.
- Matsushika, A., Makino, S., Kojima, M. and Mizuno, T. (2000) Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol.* 41: 1002-1012.
- McClung, C.R. (2008) Comes a time. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 514-520.
- McClung, C.R. and Davis, S.J. (2010) Ambient thermometers in plants: from physiological outputs towards mechanisms of thermal sensing. *Curr. Biol.* 20: R1086-1092.
- McClung, C.R. (2011) The genetics of plant clocks. *Adv. Genet.* 74: 105-139.
- Michael, T.P., Breton, G., Hazen, S.P., Priest, H., Mockler, T.C., Kay, S.A. and Chory, J. (2008a) A morning-specific phytohormone gene expression program underlying rhythmic plant growth. *PLoS Biol* 6: e225.
- Michael, T.P., Mockler, T.C., Breton, G., McEntee, C., Byer, A., et al. (2008b) Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genet* 4: e14.

- Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H.R., Carre, I.A. and Coupland, G. (2002) LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in Arabidopsis. *Developmental Cell* 2: 629-641.
- Mizuno, T. and Nakamichi, N. (2005) Pseudo-Response Regulators (PRRs) or True Oscillator Components (TOCs). *Plant Cell Physiol.* 46: 677-685.
- Mockaitis, K. and Estelle, M. (2008) Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24: 55-80.
- Mockler, T.C., Michael, T.P., Priest, H.D., Shen, R., Sullivan, C.M., Givan, S.A., McEntee, C., Kay, S.A. and Chory, J. (2007) The DIURNAL project: DIURNAL and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72: 353-363.
- Monte, E., Al-Sady, B., Leivar, P. and Quail, P.H. (2007) Out of the dark: how the PIFs are unmasking a dual temporal mechanism of phytochrome signalling. *J Exp Bot* 58: 3125-3133.
- Nagel, D.H. and Kay, S.A. (2012) Complexity in the wiring and regulation of plant circadian networks. *Curr. Biol.* 22: R648-657.
- Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Sato, E., Yamashino, T. and Mizuno, T. (2005a) The Arabidopsis pseudo-response regulators, PRR5 and PRR7, coordinately play essential roles for circadian clock function. *Plant Cell Physiol.* 46: 609-619.
- Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T. and Mizuno, T. (2005b) PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the circadian clock of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 46: 686-698.
- Nakamichi, N. (2011) Molecular mechanisms underlying the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell Physiol.* 52: 1709-1718.
- Neff, M.M., Nguyen, S.M., Malancharuvil, E.J., Fujioka, S., Noguchi, T., Seto, H., Tsubuki, M., Honda, T., Takatsuto, S., Yoshida, S. and Chory, J. (1999) BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in

- Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 15316-15323.
- Nemhauser, J.L. (2008) Dawning of a new era: photomorphogenesis as an integrated molecular network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 4-8.
- Niwa, Y., Ito, S., Nakamichi, N., Mizoguchi, T., Niinuma, K., Yamashino, T. and Mizuno, T. (2007) Genetic linkages of the circadian clock-associated genes, TOC1, CCA1 and LHY, in the photoperiodic control of flowering time in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 48: 925-937.
- Niwa, Y., Yamashino, T. and Mizuno, T. (2009) The circadian clock regulates the photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 50: 838-854.
- Nozue, K., Covington, M.F., Duek, P.D., Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S.L. and Maloof, J.N. (2007) Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* 448: 358-361.
- Nozue, K., Harmer, S.L. and Maloof, J.N. (2011) Genomic analysis of circadian clock-, light-, and growth-correlated genes reveals PIF5 as a modulator of auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 156: 357-372.
- Nozue, K. and Maloof, J.N. (2006) Diurnal regulation of plant growth. *Plant, cell & environment* 29: 396-408.
- Nusinow, D.A., Helfer, A., Hamilton, E.E., King, J.J., Imaizumi, T., Schultz, T.F., Farre, E.M. and Kay, S.A. (2011) The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* 475: 398-402.
- Oh, E., Zhu, J.-Y. and Wang, Z.-Y. (2012) Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nature Cell Biol.* DOI: 10.1038/ncb2545
- Onai, K. and Ishiura, M. (2005) PHYTOCLOCK 1 encoding a novel GARP protein essential for the Arabidopsis circadian clock. *Genes Cells* 10: 963-972.
- Onai, K., Okamoto, K., Nishimoto, H., Morioka, C., Hirano, M., Kami-Ike, N. and Ishiura, M. (2004) Large-scale screening of Arabidopsis circadian

- clock mutants by a high-throughput real-time bioluminescence monitoring system. *Plant J.* 40: 1-11.
- Paltiel, J., Amin, R., Gover, A., Ori, N. and Samach, A. (2006) Novel roles for GIGANTEA revealed under environmental conditions that modify its expression in *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Planta* 224:1255-1268.
- Park, J.E., Seo, P.J., Lee, A.K., Jung, J.H., Kim, Y.S. and Park, C.M. (2007) An *Arabidopsis* GH3 gene, encoding an auxin-conjugating enzyme, mediates phytochrome B-regulated light signals in hypocotyl growth. *Plant Cell Physiol.* 48: 1236-1241.
- Park E, Park J, Kim J, Nagatani A, Lagarias JC, Choi G. (2012) Phytochrome B inhibits binding of phytochrome-interacting factors to their target promoters. *Plant J.* 72:537-46.
- Penfield, S. (2008) Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytol* 179: 615-628.
- Pokhilko, A., Fernandez, A.P., Edwards, K.D., Southern, M.M., Halliday, K.J. and Millar, A.J. (2012) The clock gene circuit in *Arabidopsis* includes a repressilator with additional feedback loops. *Mol Syst Biol* 8: 574.
- Pokhilko, A., Hodge, S.K., Stratford, K., Knox, K., Edwards, K.D., Thomson, A.W., Mizuno, T. and Millar, A.J. (2010) Data assimilation constrains new connections and components in a complex, eukaryotic circadian clock model. *Mol Syst Biol* 6: 416.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R. and Coupland, G. (1995) The CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80: 847-857.
- Quail, P.H. (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 180-188.
- Robertson, F.C., Skeffington, A.W., Gardner, M.J. and Webb, A.A. (2009) Interactions between circadian and hormonal signalling in plants. *Plant Mol. Biol.* 69: 419-427.

- Ruberti, I., Sessa, G., Ciolfi, A., Possenti, M., Carabelli, M. and Morelli, G. (2011) Plant adaptation to dynamically changing environment: The shade avoidance response. *Biotechnol Adv.* 30:1047-58.
- Salome, P.A. and McClung, C.R. (2004) The Arabidopsis thaliana clock. *J. Biol. Rhythms* 19: 425-435.
- Salome, P.A. and McClung, C.R. (2005a) PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell* 17: 791-803.
- Salome, P.A. and McClung, C.R. (2005b) What makes the Arabidopsis clock tick on time? *Plant Cell Envir.* 28: 21-38.
- Salome, P.A., Weigel, D. and McClung, C.R. (2010) The role of the Arabidopsis morning loop components CCA1, LHY, PRR7, and PRR9 in temperature compensation. *Plant Cell* 22: 3650-3661.
- Samach, A and Wigge, P.A. (2005) Ambient temperature perception in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 483-486.
- Sanchez, S.E. and Yanovsky, M.J. (2013) Time for a change. *Elife.* 2: e00791.
- Sawa, M., Nusinow, D.A., Kay, S.A. and Imaizumi, T. (2007) FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science* 318: 261-265.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I.A. and Coupland, G. (1998) The late elongated hypocotyl mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 93: 1219-1229.
- Schena, M., Lloyd, A.M. and Davis, R.W. (1993) The HAT4 gene of Arabidopsis encodes a developmental regulator. *Genes Dev.* 7: 367-379.
- Sessa, G., Carabelli, M., Sassi, M., Ciolfi, A., Possenti, M., Mitterpergher, F., Becker, J., Morelli, G. and Ruberti, I. (2005) A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in Arabidopsis. *Genes Dev.* 19: 2811-2815.

- Sidaway-Lee, K., Josse, E.-V., Alanna Brown, A., Gan, Y., Halliday, K.J., Graham, I.A. and Penfield, S. (2010) SPATULA links daytime temperature and plant growth rate. *Curr. Biol.* 20: 1493-1497.
- Somers DE, Devlin PF, Kay SA. (1998) Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock. *Science* 282:1488–1490.
- Somers DE, Kim WY, Geng R. (2004) The F-box protein ZEITLUPE confers dosage-dependent control on the circadian clock, photomorphogenesis, and flowering time. *Plant Cell* 16:769–782.
- Soy, J., Leivar, P., González-Schain, N., Sentandreu, M., Prat, S., Quail, P.H. and Monte, M. (2012) Phytochrome-imposed oscillations in PIF3 protein abundance regulate hypocotyl growth under diurnal light/dark conditions in Arabidopsis. *Plant J.* 71: 390-401.
- Stavang, J.A., Gallego-Bartolomé, J., Gómez, M.D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J.E., García-Martínez, J.L., Alabadí, D., Blázquez, M.A. (2009) Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *Plant J.* 60: 589-601.
- Steindler, C., Matteucci, A., Sessa, G., Weimar, T., Ohgishi, M., Aoyama, T., Morelli, G. and Ruberti, I. (1999) Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development* 126: 4235-4245.
- Stewart, J.L., Maloof, J.N. and Nemhauser, J.L. (2011) PIF genes mediate the effect of sucrose on seedling growth dynamics. *PLoS One* 6: e19894.
- Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Mas, P., Panda, S., Kreps, J.A. and Kay, S.A. (2000) Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* 289: 768-771.
- Sun TP. (2011) The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Curr Biol.* 21:R338-45.
- Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., et al. (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade

avoidance in plants. *Cell* 133: 164-176.

- Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M.K., Harper, R.M., Liscum, E. and Yamamoto, K.T. (2004) MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 379-393.
- Thines, B. and Harmon, F.G. (2010) Ambient temperature response establishes ELF3 as a required component of the core *Arabidopsis* circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 3257-3262.
- Vandenbussche, F., Verbelen, J.P. and Van Der Straeten, D. (2005) Of light and length: regulation of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Bioessays* 27: 275-284.
- Wang, Z.Y. and Tobin, E.M. (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93: 1207-1217.
- Wenkel, S., Turck, F., Singer, K., Gissot, L., Le Gourrierec, J., Samach, A. and Coupland, G. (2006) CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 2971-2984.
- Wigge, P.A. (2013) Ambient temperature signalling in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 661-666.
- Yamashino, T., Matsushika, A., Fujimori, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. and Mizuno, T. (2003) A Link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 44: 619-629.
- Yanovsky, M.J. and Kay, S.A. (2003) Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 265-275.
- Zhao, S., and Fernald, R.D. (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Comput. Biol.* 12: 1047-1064.

Zhong, S., Zhao, M., Shi, T., Shi, H., An, F., Zhao, Q. and Guo, H. (2009)
EIN3/EIL1 cooperate with PIF1 to prevent photo-oxidation and to promote
greening of Arabidopsis seedlings. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 21431-
21436.

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究の方向性から研究者としての姿勢、思考など様々な面で熱心にご指導を賜りました水野猛教授に心より感謝いたします。また、学部生として研究室に配属された頃より、研究を進める上で必要な技術的、知識的な面で終始懇切丁寧にご指導頂きました山篠貴文准教授に深く感謝いたします。

不慣れな生化学的解析にあたっては、中道範人博士、伊藤照悟博士に的確な助言を頂きました。心より感謝いたします。

共著者として共に研究を進めていただきました久保園さん、宮地さん、竹内さん、岡さん、北山さん、坪内さんのおかげで非常に多くの研究課題に取り組むことができました。感謝いたします。

研究を遂行するにあたって実験材料を提供いただきました Campus 大 Prat 博士、京都大小内博士、名古屋大石浦博士、東京大米田博士、Edinburgh 大 Millar 博士、Southern California 大 Kay 博士に深謝いたします。

2019年3月