

研究報告書

「バイオマス生産性の向上を指向した概日時計のシステム生物学」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 中道 範人

1. 研究のねらい

高等植物において普遍的にみられる環境応答システムの一環である「概日時計」を解析することで、環境に応答したバイオマス生産性の制御の理解とその人工制御を目標とする。研究目標は、おおまかに2つに区分される。(1)植物の概日時間を規定する転写ネットワークを明らかにするために、モデル植物のシロイヌナズナの概日時計をシステム生物学の最新手法によって解析する。さらにこの転写ネットワークによるバイオマス生産性の制御の包括的な理解をめざす。(2)概日時間を規定する転写ネットワークをシロイヌナズナにおいて人工制御(デザイン)して、バイオマス生産性の向上を図る。さらに、この知見を他の植物種例えばイネに展開し、従来の育種や遺伝学で得られてきたバイオマス生産性に比肩しうる、さらにはそれを凌駕する植物を創りだすことを目標とする。

2. 研究成果

(1) 概要

シロイヌナズナの概日時計機構に関する転写抑制因子である PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5(PPR5)の分子機能解析を進め、PPR5 タンパク質内に、DNA 領域との相互作用に必要なタンパク質ドメインを明らかにした。さらに PPR5 が相互作用するゲノム DNA 領域を明らかにするために、クロマチン免疫沈降-高速 DNA シークエンシング(ChIPseq)を行い、PPR5 に直接制御される約 60 個の遺伝子を見いだした。この中には、光周性花成、組織の伸長、そして低温ストレス応答の鍵として働く転写因子をコードしている遺伝子(CDF family, PIF family, DREB1 family)が見いだされた。また PPR5、PPR7、PPR9 によるこれら遺伝子の抑制は、日周的パターンの形成に必須であることが分かった。以上の解析により、時計機構から時計出力への時間情報の伝達の仕組みの一部が具体的に明らかになった(Nakamichi et al., PNAS, 2012)。

三重変異体 *ppr9 ppr7 ppr5* は実験室内ではリズムの異常、開花遅延、組織伸長、乾燥ストレス耐性、そしてバイオマス生産性の向上などを示すが、これらの形質は上記の ChIPseq の解析から明らかになった分子ネットワーク構造からも十分にサポートされる。PPR は維管束植物に高度に保存されているため、PPR を機能欠損されることで上記のような有用形質を他の植物においても付与できる可能性が指摘された。しかし、シロイヌナズナの PRR9、PPR7、PPR5 は重複した機能を持ち、多くの植物においても PRR 遺伝子はゲノム中に複数存在する。したがってあらゆる植物種で有用形質を出すためには、複数の PRR 遺伝子群を一挙に機能喪失させることが必要だと予想された。そこで優性機能喪失型の PRR の作製を試みた。ウイルス由来の強制的な転写活性化ドメイン VP16 を PRR5 にタンデムに融合させることで、転写活性化型 PRR を作製することが出来た。この PRR5-VP を恒常活性プロモーターである 35S の支

配下で発現させ、バイオマス生産性の向上させることができた。一方、*PRR5* をイネにおいて過剰発現させると、バイオマス生産性が向上した。植物種によってバイオマス生産性を向上させる PRR の利用法が明らかとなった。

(2) 詳細

研究テーマ A「時計支配下の遺伝子ネットワークの解析」

シロイヌナズナの概日時計機構に関する転写抑制因子である PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5(*PRR5*)の分子機能解析を進めた。ドメイン内に変異をもつ *PRR5* を一過的に発現させた実験および、変異型 *PRR5* を用いたクロマチン免疫沈降実験により、DNA 領域との相互作用に必要なドメイン CCT(for CONSTANS, CONSTANS-LIKE1, TIMING OF CAB EXPRESSION1)を *PRR5* タンパク質内に発見した。

この知見を背景にして、*PRR5* が直接的に制御する遺伝子の取得を試みた。クロマチン免疫沈降-高速 DNA シークエンシング(ChIPseq)を行い、生体内において *PRR5* は約 500 のゲノム DNA 領域と相互作用することを見いだした (A 遺伝子群)。この中には、*PRR5* の直接的ターゲット遺伝子が含まれることが期待された。しかし ChIPseq は、技術的に擬陽性となる DNA 配列を含む可能性がある。そこで別の方法によって、*PRR5* の直接的ターゲット遺伝子を同定することを試みた。*PRR5* にウイルス由来の強力な転写活性ドメイン VP16 をタンデムに融合させると、既知の *PRR5* ターゲットの *CCA1* 遺伝子に対して転写活性化因子として機能する (*PRR5-VP*)。*PRR5-VP* 過剰発現株において、発現量が上昇する遺伝子群を取得した (B 遺伝子群)。その中には、*PRR5* の直接的ターゲットと間接的ターゲット遺伝子が含まれることが期待された。A 遺伝子群と B 遺伝子群に共通して含まれる遺伝子 64 個を「*PRR5* の直接ターゲット」とした。

これらの遺伝子の多くは、*PRR5* だけでなく *PRR7* と *PRR9* にもターゲットされていることが、ChIPqPCR 解析により分かった。ターゲット遺伝子の発現抑制の時間帯は昼から夜半であり、この時間帯は 3 つの PRR が機能する時間と同じであった。従って PRR はターゲット遺伝子の発現の時間を決定する主要因子として振舞うことが考えられる。さらに PRR のターゲット遺伝子には、花成の時期の決定、組織の伸長、そして低温ストレスへの応答の鍵となる転写因子タンパク質をコードしているものがあり、概日時計からこれら生理現象への制御経路が具体的に明らかとなった。特定の時間に機能する PRR の転写ネットワーク構造により、植物は上記の生理現象を一日のうちで適切な時間に発現させることを可能にしているのであろう。実際に、*PRR* 遺伝子群を遺伝子操作 (変異体、過剰発現体、また機能改変型 PRR の発現体) し、*PRR* の転写ネットワーク構造を改変すると、花成の時期の決定、胚軸組織の伸長、低温ストレスへの応答能力、そして一次代謝物の蓄積をコントロールできる。このように PRR タンパク質群による転写ネットワーク構造を統合的に理解することで、概日時計を利用した植物の生存戦略の一端が明らかとなった。(図 1, Nakamichi et al., PNAS, 2012)。

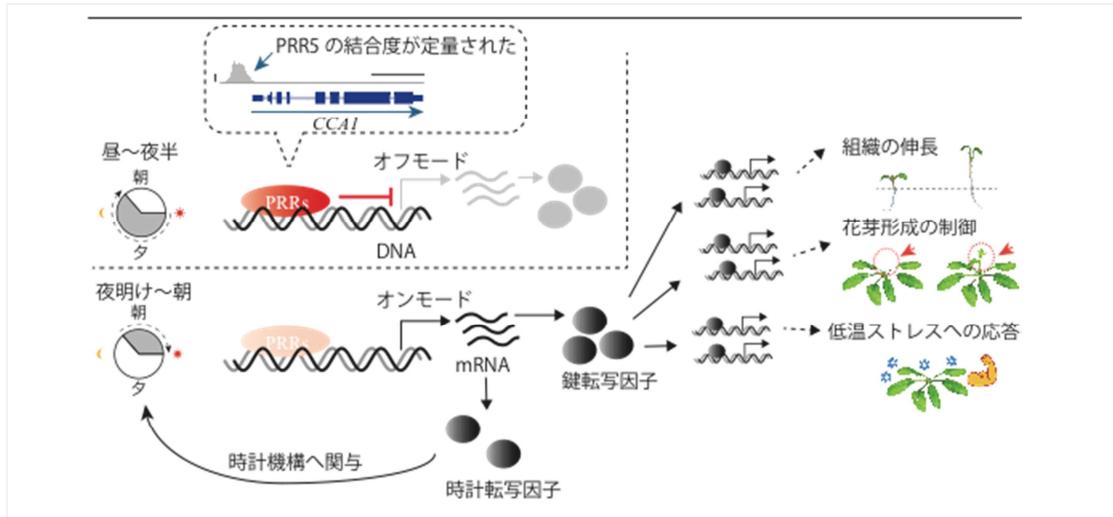


図 1. PRR による概日時計出力系の制御

昼から夜半にかけて PRR9、PRR7、PRR5 タンパク質は連続的に発現し、直接的なターゲット遺伝子の発現を抑制する(オフモード、図上)。またターゲット遺伝子座への PRR5 の結合も定量化された。夜明けから朝は PRR タンパク質が存在しないため、PRR の直接的ターゲット遺伝子の発現は解除され、誘導をうける(オンモード、図下)。直接的ターゲット遺伝子の中には、組織の伸長、花成時期の制御、低温ストレス応答の鍵となる転写因子が濃縮されている。PRR によるゲノムワイドな転写調節機構により、植物は特定の生命現象を特定の時刻に発現することが可能となる(生命現象の時間的な分業)。

研究テーマ B「バイオマス生産性の向上を目的とした人工時計遺伝子の作出」

シロイヌナズナの三重変異体 *prr9 prr7 prr5* は実験室内ではリズムの異常、開花遅延、組織伸長、乾燥ストレス耐性、そしてバイオマス生産性の向上などを示すが、これらの形質は上記の ChIPseq の解析から明らかになった分子ネットワーク構造からも十分にサポートされる。PRR 遺伝子群は維管束植物に高度に保存されているため、PRR を機能欠損されることで、上記のような有用形質を他の植物においても付与できる可能性が指摘された。

しかし、シロイヌナズナの PRR9、PRR7、PRR5 は重複した機能を持ち、多くの植物においても PRR 遺伝子はゲノム中に複数存在する。したがってあらゆる植物種で有用形質を出すためには、複数の PRR 遺伝子群を一挙に機能喪失させが必要だと予想された。そこで優性機能喪失型の PRR の作製を試みた。研究テーマ A で述べた通り、ウイルス由来の強制的な転写活性化ドメイン VP16 を PRR5 にタンデムに融合させることで、転写活性化型 PRR を作製することが出来た。この PRR5-VP を恒常活性プロモーターである 35S の支配下で発現させると、バイオマス生産性の向上させることができた。概日時計は、光合成活性の日周制御に関わることが指摘されていたため、PRR5-VP 株の光合成活性を測定したところ、PRR5-VP は野生型とほぼ同等の光合成活性を示した。生育曲線および開花時期の解析から、PRR5-VP のバイオマス生産性向上は、発芽から開花時までの日数が延びることに起因することが示唆された。移管植物において、PRR5 が含まれる PRR ファミリーは、PRR7/3 サブファミリー、PRR5/9 サブファミリー、そして TOC1 サブファミリーに分けられる。PRR5/9 以外のサブファミ

リー遺伝子を利用して開花時期の遅延ができるか確認するために、*PRR7/3*と*TOC1*サブファミリーの代表として、シロイヌナズナの*PRR7*および*TOC1*にVPを融合させてシロイヌナズナにおいて過剰発現させた。*PRR7-VP*過剰発現株は花成時期遅延を導いたが、*TOC1-VP*はわずかな遅延を示した。このように*PRR5/9*サブファミリー以外のPRRとVPの融合タンパク質を発現させることで、長日植物に属すシロイヌナズナの開花時期を遅延させることができた。なお、オオムギやサトウダイコンといった長日植物でもPRR遺伝子の機能喪失によって開花時期の遅延およびバイオマス生産性の向上が報告されている (Tunér et al., *Science*, 2005, Pin et al., *Curr. Biol.*, 2012)。

一方、短日植物種のイネやソルガムでは、PRR遺伝子の機能喪失によって逆に開花時期が早まることが知られている (Murphy et al., *PNAS*, 2011, Koo et al., *Mol. Plant*, 2013)。本研究において、*PRR5-VP*をイネにおいて発現させると形質展開当代において矮小化した形質を示した。つまりイネに*PRR5-VP*を導入するとバイオマス生産性の向上は見込めないことが示された。次にシロイヌナズナの*PRR5*とFLAGタグ融合タンパク質をイネに発現させた。この*PRR5-FLAG*発現イネは、対照イネと比べて、「葉と稈」と「根」の乾燥重要および「稔実率」が向上していた。この研究は、短日植物種においてPRRの機能を増強させてバイオマス生産性を向上させた始めての例となった (Nakamichi et al., *in revision*)。



図 2. PRRによるバイオマス生産性の制御

シロイヌナズナに*PRR5-VP*を導入すると、花成時期の遅延およびバイオマス生産性の向上が観察された。一方イネに*PRR5*を導入すると、バイオマス生産性の向上が観察された。長日植物ではPRRの機能を低下させることで、短日植物ではPRRの機能を増強することで、バイオマス生産性の向上が期待される。

3. 今後の展開

時計に関連する転写因子の解析を進めることで、特定の時刻に発現を誘導する遺伝子発現制御システムが明らかになると期待される。この知見を利用すれば、任意の時刻で任意の遺伝子を発現させる技術が達成できる。また時計の制御下にある遺伝子の解析を進め、あらたな時計制御下の現象を見いだす。

また本研究で作製されたPRR-VPコンストラクトおよびPRRを、多様な植物種に形質転換によって導入し、開花時期の変化およびバイオマス生産性の向上が達成されるか、解析を進める。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

当初掲げた概日時計に関わる転写因子の制御する転写ネットワークの解析は、まだ途上であるが、この研究期間内に、昼から夜半にかけて発現する PRR9, PRR7, PRR5 が、転写抑制因子として機能すること、およびこれらのターゲット遺伝子群を明らかにし、PRR による転写制御システムを提案した(Nakamichi et al., PNAS 2012)。この研究の中で、植物の転写調節因子の ChIPseq 解析の技術を確かなものにした。本研究は、主にさきがけ研究でサポートされた研究実施体制および研究費によって遂行されたが、理化学研究所環境資源科学研究センターの榎原均博士、木羽隆俊博士と名古屋大学 ITbM の東山哲也博士、鈴木孝征博士から技術的サポートをうけた共同研究である。本研究は、時計システム全体の転写制御ネットワークの理解へむけた先駆的な研究になったと考えている。またさきがけ研究予算でハイスループット概日リズム検出系を立ち上げ、概日時計のさらなる理解へ向けて研究を進めている。

時計関連遺伝子と光周性花成関連遺伝子の変異が、穀物の栽培地域拡大と関連していることを体系化した。この知見をふまえて、シロイヌナズナの時計関連遺伝子 PRR5 とその優性抑圧型 PRR5-VP を、イネおよびシロイヌナズナに導入することで開花時期の変更およびバイオマス生産性の向上を達成した (in revision)。当初掲げた目標の、育種で取られたバイオマス生産性向上株を凌駕するまでには到達していない。本研究で利用された PRR の発現量をより高めたり、発現する細胞を適宜に選択したりすることで、よりバイオマス生産性の向上が期待される。この研究は主にさきがけ研究でサポートされた研究実施体制および研究費によって遂行されたが、イネの解析は理化学研究所環境資源科学研究センターの榎原均博士との共同研究である。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

概日時計関連遺伝子の機能を解析し、その活用によって植物の生長を制御し、バイオマスの増産につなげる基盤技術を開発することを目的に研究が進められた。その結果、時計関連遺伝子の導入によって花成時期を遅延させ、バイオマスの増産を図ることに成功するなど、優れた成果を生み出している。また概日時計は、ストレス耐性にも影響があることなどを示し、さらに、概日時計と相互作用する化合物をスクリーニングによって発見するなど、想定されていなかった成果も生み出している。こうした多くの成果は、基礎研究としてもまた、技術開発研究としても極めて高く評価され、本年度終了課題の中でも極めて優れた研究の一つであると判断する。

今後は、本研究課題で得られた成果をいっそう発展させ、概日時計の支配下にある多くの生理現象の解明に努めるなど、基礎研究を進め、その中で、バイオマス増産への基盤技術の開発に努めて欲しい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Nakamichi N., Kiba T., Kamioka M., Suzuki T., Yamashino T., Higashiyama T., Sakakibara H., Mizuno T. Transcriptional Repressor PRR5 Directly Regulates Clock–Output Pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. 109: 17123–17128.
2. Nomoto Y., Kubozono S., Miyachi M., Yamashino T., Nakamichi N., Mizuno T. A circadian clock– and PIF4–mediated double coincidence mechanism is implicated in the thermosensitive photoperiodic control of plant architectures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2012. 53:1965–1973
3. Nomoto Y., Kubozono S., Yamashino T., Nakamichi N., Mizuno T. Circadian clock– and PIF4–controlled plant growth: a coincidence mechanism directly integrates a hormone signaling network into the photoperiodic control of plant architectures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2012. 53:1950–1964.
4. Nakamichi N. Adaptation to the local environment by modification of the photoperiod response in crops. *Plant Cell Physiol.* 2014. *In press*, PMID: 25432974.
5. Kimura Y., Aoki S., Ando E., Kitatsuji A., Watanabe A., Ohnishi M., Takahashi K., Inoue SI., Nakamichi N., Tamada Y., Kinoshita T. A flowering integrator, SOC1, affects stomatal opening in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 2015. *In press*, PMID: 25588388.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

「植物の概日リズム現象」第 14 回オルガネラワークショップ、京都、2012 年 3 月 15 日
(招待講演)

「Repressors for the morning time in *Arabidopsis* circadian clock」第 53 回日本植物生理学会年会、京都、2012 年 3 月 17 日 (招待講演)

「Transcriptional repressor PSEUDO–RESPONSE REGULATOR 5 directly regulates clock output pathways」23ed International Conference on *Arabidopsis* Research、Vienna Austria、2012 年 7 月 3–7 日 (ポスター)

「ChIP-seq 法による植物時計の出力系の遺伝子ネットワーク構造の解析」第 19 回日本時間生物学会年会、札幌、2012 年 9 月 16 日 (指名口頭)

「概日時間情報はPRRタンパク質を介して出力系現象に伝達する」第 54 回日本植物生理学会年会、岡山、2013 年 3 月 22 日 (口頭)

「概日リズムに関わる転写制御ネットワークの発見」第 55 回日本植物生理学会年会、富山、2014 年 3 月 19 日 (招待講演)

「Synthetic molecules controlling plant circadian rhythms」 2nd International ITbM Symposium、Nagoya、2014 年 5 月 12 日 (招待講演)

「Systematic approaches to understand *Arabidopsis* circadian clock」第 38 回内藤コンフ

アレンス生命システムの物質的基盤、札幌、2014年10月9日（指名口頭、およびポスター）

「Genetic architecture of *Arabidopsis* circadian clock system」第37回日本分子生物学
会年会、横浜、2014年11月26日（招待講演）

受賞

1st ITbM Research Award 2013年11月

第21回（2014年）植物生理学会奨励賞 2014年3月19日

第38回内藤コンファレンスポスター発表賞 2014年10月10日

プレスリリース

「植物の時間情報を制御」科学新聞 2012年10月19日

「植物眠らせるタンパク質特定」中日新聞 2012年10月3日

「遺伝子60種 概日リズムに関与」日刊工業新聞 2012年10月2日

WPI プログラム Institute of Transformative Bio-molecules Nagoya University (ITbM) に特任准教授として採用された(2013年5月1日)。研究所内で共同研究を開始し、新たなリズム調整化合物群を発見した。この成果は、ITbM Research Award および ITbM symposium の招待講演につながった。生物と化学という異なる分野の融合的な研究を進めて、植物科学界へ研究ツールの提供及び、新たな研究分野の創出につなげたい。

また研究所内において、動物細胞の概日時計に関する研究も共同して進めている。植物と動物を比較することで植物の概日時計システム(主に転写制御ネットワーク)の特異性および植物と動物の概日時計システムの普遍性を探求していきたい。

バイオマスイノベーション若手の会を立ち上げ、2回の研究会を催した。植物科学発の応用研究へむけて若手研究者のネットワーク作りを進めている。またこの枠組みで、植物科学学術分野と産業界との連携も図っている。