

論文の内容の要旨

The unique function of the Arabidopsis circadian clock gene *PRR5* in the regulation of shade avoidance response (概日時計遺伝子 *PRR5* の新規機能の解明)

高瀬 将映

1. 本研究の背景

バクテリアから種子植物、哺乳動物にいたるまで、生物は外部からの刺激に依存しない約 24 時間周期の生理学的な発振機構をもつ。これを概日時計(Circadian Clock)という。これによって、生物は生理反応や行動を調節し、環境に適応している。概日時計は、動物では摂食および睡眠、求愛などの行動を制御していることが知られている(Ishida et al., 2010)。また植物では、花芽形成および気功の開閉、葉茎の伸長、光合成色素の合成などを制御していることが知られている。(Nakamichi et al, 2011)。

概日時計の機構は動物と植物で類似しており、リズムを生み出す中心振動体と、その位相および周期、振幅を調節する多数の補助因子からなる。中心振動体は、複数の遺伝子が互いにその発現を促進または抑制することでリズムを発生させる生理的振動子であり、動物では Clock/Bmal, Per/Cry(TIM) が、植物では LHY/CCA1, TOC1, PCL1 が知られている。また、補助因子としては、動物では ROR, REVERB などが、植物では LUX, GI, ELF3 などがあ (Davidson et al, 2012, Nakamichi et al, 2011)。現在、概日時計を構成する様々な遺伝子について解析が進められているが、それらの相互作用の複雑さと影響の広範さが障害となっている。

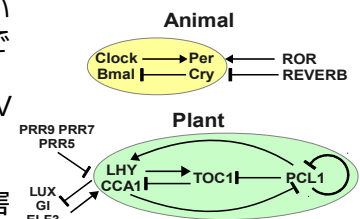


Fig. 1 Schematic dialog of Circadian clock.

本研究では、シロイヌナズナの時計補助因子群の一つである転写制御因子 PRR9, PRR7 および PRR5 に着目した。変異体を用いた解析から、これらの遺伝子は概日時計の位相および周期を調節していると考えられている。これら全てが欠損すると概日リズムが消滅するが、いずれか一つが正常ならば、位相や周期に異常はあるがリズム自体は保たれる(Iida et al., 2007, Nakamichi et al., 2010)。このことから、PRR9 および PRR7, PRR5 は類似した機能を持ち、重複的に働いていると考えられてきた。しかし本研究によって、PRR5 が、PRR9 および PRR7 とは異なる独特の機能を持ち、植物の光形態形成を直接的に制御していることが明らかになった。

2. *prp9/7/5* 三重変異体は暗期に避陰応答を示す

植物によって遮られた光は、赤色光成分(600-700 nm)が吸収され、近赤外光(700-750 nm)が相対的に強くなる。植物はそれを赤色光・近赤外光受容体フィトクロム(主に PhyA, B)の平衡状態の変化として感知し、葉身の展開を抑制し、茎や葉柄の伸長を促進させる。これを避陰応答という。*prp9/7/5* 三重変異体においては、恒明条件下では野生型より矮化し、明暗条件下では葉身の展開が抑制され、葉柄の伸長が促進されるという、避陰応答に類似した表現型が観察された(Fig. 2)。

明暗条件における *prp9/7/5* の避陰応答に類似した表現型について、避陰応答のマーカー遺伝子である

HFR1 の発現を測定すると、暗期において著しく発現が上昇していた。さらに、避陰応答の正の制御因子で、概日時計によって暗期での発現が抑制される PIF4 および PIF5 の発現が、*prp9/7/5* では周期性を失い、かつ野生型の 10–20 倍に上昇していた(Fig. 3)。

以上から、リズム消失型の変異体である *prp9/7/5* では、暗期で PIF4 および PIF5 が著しく発現していることが、明暗条件において避陰応答に類似した表現型を示す原因であると推測される。

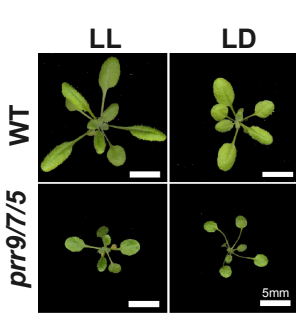


Fig. 2 *prp9/7/5* triple mutant grown under continuous lighting (LL) or 16 h / 8 h light / dark cycle (LD) for 20 d.a.s.

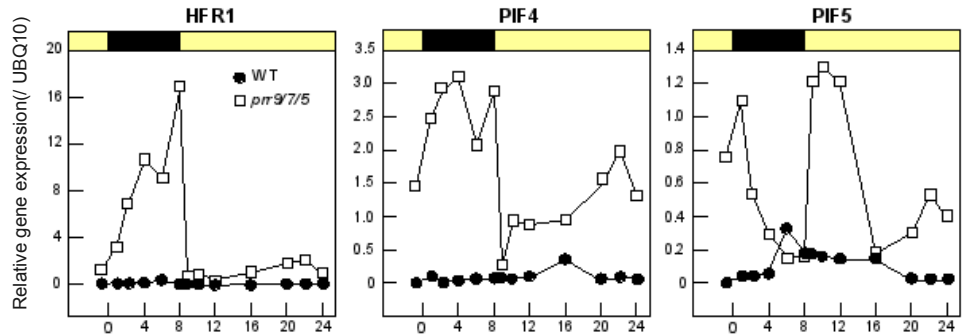


Fig. 3 Time course of HFR1, PIF4 and PIF5 expression in *prp9/7/5*. Plants were grown under LD condition (16 h / 8 h) for 20 d.a.s.

3. PRR5 は避陰応答の強度の調節に關与する

明期の終わりに近赤外光(ピーク波長:735 nm)を照射し、フィトクロムの平衡状態を変化させて避陰応答を誘導すると(以後、E.O.D-FR 処理)、*prp9/7/5* および *prp7/5* において、避陰応答のマーカー遺伝子 HFR1 の発現が対照区より著しく上昇した。さらに、PRR9、PRR7 および PRR5 の変異体および過剰発現体に E.O.D-FR 処理を施すと、*prp5* でのみ HFR1 が野生型の 2 倍以上発現し、PRR5 過剰発現体でのみ E.O.D-FR 処理による HFR1 の発現誘導が著しく抑制された(Fig.4)。

prp5 は恒明条件下および明暗条件下において、目立った表現型を示さない(lida et al., 2005)。また、恒常的に避陰応答を示す *phyB* 変異体および PIF5 過剰発現体に E.O.D-FR 処理を施しても、避陰応答のマーカー遺伝子の発現は野生型と同程度であることが報告されている(Lorrain et al., 2008)。以上を総合して考えると、PRR5 は避陰応答の誘導ではなく、誘導後の応答強度を負に制御するという、PRR9 および PRR7 には存在しない独特の機能を持つことが示された。

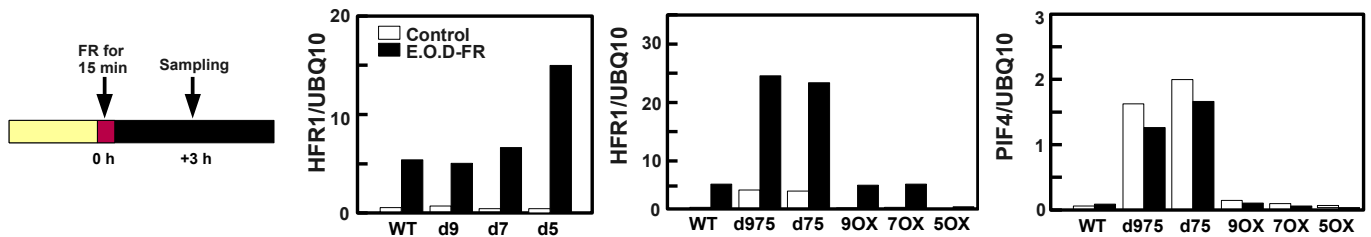


Fig. 4 Effects of End of day-FR treatment on HFR1 and PIF4 expression in PRR9, PRR7 and PRR5 mutants and overexpressors.

4. 避陰応答シグナル経路において、PRR5 は PIF5 の下流を制御している

避陰応答シグナル経路における PRR5 の位置を調べるために、PRR5 および PIF5 の過剰発現体(以後、PIF5oxPRR5ox)を作成した。PIF5oxPRR5ox では PRR5ox と同様に、胚軸の伸長が著しく抑制され(Fig. 5)、避陰応答のマーカー遺伝子 HFR1 の発現も抑制された(データ未表示)。

赤色光下における *phyAphyB* 二重変異体の胚軸伸長が PRR5 によって抑制されることから、PRR5 が PhyA および PhyB シグナルの下流を制御していると推測されていたが(Matsushita et al., 2007)、本実験により、PIF5 の下流を制御していることが明らかになった。



Fig. 5 Hypocotyl elongation of PIF5oxPRR5ox. Seedlings were grown under 20 μ E PPFD for 7 d.a.g.

5. PRR5 は葉身特異的な避陰応答に關与している

避陰応答では、葉身の展開が抑制され、葉柄の伸長が促進される。PRR5 による避陰応答強度の制御が形態形成に及ぼす影響を調べるために、*prp9*、*prp7* および *prp5* を白色光に近赤外光を付与した光条件下(赤色光と近赤外光との光量子密度比 R:FR < 0.2)で栽培し、それぞれの葉の形態を調べた。結果、近赤外光照射による葉柄の伸長促進は、*prp9* および *prp7* においては野生型と同程度であったが、*prp5* では野生型の~1.7 倍と著

しかった。また、*prp9* および *prp7* においては、近赤外光照射により葉身の展開が抑制されたが、*prp5* では抑制されなかった(Fig.6)。以上の結果から、PRR5が葉身特異的な避陰応答の抑制に関与していることが示された。

6. 結論

以上の結果から、PRR5はPRR9およびPRR7とともに概日時計の補助因子として重複的に機能するだけでなく、PIF5の下流において避陰応答の強度を負に制御し、葉身特異的な避陰応答を抑制するという独特の機能を持つことが示された。PRR5の独特の性質としては、時計遺伝子TOC1およびZTLとのタンパク質間相互作用が報告されている(Kiba et al., 2007, Wang et al., 2010)。しかし、TOC1およびZTLとの相互作用部位であるPRRドメインは避陰応答の抑制に必要なことが報告されている(Matsushita et al., 2007)。また、Chip assayによる解析からも、PRR5の特異的なターゲットは発見されていない(Nakamichi et al., 2012)。PRR5独特の作用機構の解明については、今後の課題である。また、PRR5による葉身特異的な避陰応答の抑制については、葉身と葉柄との避陰応答の差異を解明するきっかけになると期待される。

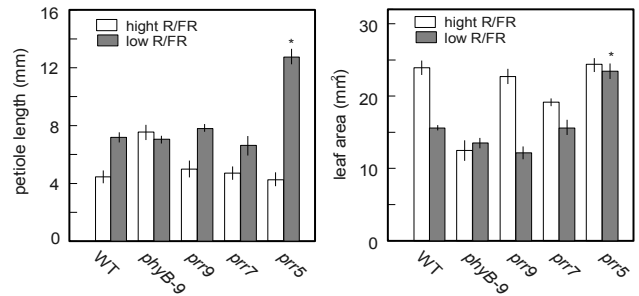


Fig. 6 Petiole elongation and leaf expansion of *prp9,7* and *5* mutants grown under high R/FR (> 2) or low R/FR (< 0.2). Bars indicate S.E. (n=6).