

低分子化合物で植物時計の仕組みを発見！

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (ITbM) の 中道 範人 特任准教授、大学院理学研究科の 上原 貴大 博士課程修了生、水谷 佳幸 修士課程修了生、早稲田大学の 山口 潤一郎 教授らの研究グループは、低分子化合物を使って植物時計に関わる新たなタンパク質とその働きを発見しました。

地球の自転に伴う昼夜変化に適応するために、多くの生物は遺伝的に組込まれた概日時計を獲得してきました。例えば「アレクサンドロス大王の東征時に記された葉の就眠運動」や「リンネの提唱した花時計」などは植物の時刻依存的な振る舞いを記載したものです。しかし、植物の概日時計のメカニズムの解明および産業的な利用の指針の確立は不十分です。その要因の1つとして、現存する多くの陸上植物は、染色体倍加のイベントを経ることで、体内に多くの推定重複遺伝子が存在しており、これが時計の基礎的な理解を妨げていると考えられています。

今回、研究グループは推定重複遺伝子の存在をふまえた上で時計の仕組みを理解するために「化学・生物学の融合研究」を行いました。まず、未同定の時計機構の重要なステップを標的とする可能性をもつ低分子化合物をランダムスクリーニングによって見出しました。次に、分子プローブを用いたプロテオミクス解析によって化合物の標的タンパク質の探索を試み、シロイヌナズナのタンパク質リン酸化酵素であるカゼインキナーゼI (CK1) ファミリーを得ました。CK1をコードする遺伝子はシロイヌナズナには少なくとも13遺伝子座あり、これら遺伝子群の発現を一举に低下させると化合物処理と同様の時計攪乱が認められました。さらに、CK1が作用する時計関連タンパク質も同定しました。

このように、本研究では活性のある低分子化合物の探索および分子プローブの活用により、これまで遺伝的重複性が要因となって隠されてきた時計のメカニズムを発見しました。これまで概日時計は、「バクテリア」、「動物」、「植物」などの生物界で独立して誕生したシナリオが支持されてきましたが、本研究の結果は従来の学説に一石を投じました。また、多くの穀物において、開花期の調節のために選抜された品種には、時計およびその制御下の遺伝子変異が頻出しています。したがって、今回の低分子化合物の発見により、将来的な地球環境変動に対する適応策の一環である花成時期調節を目指した低分子化合物の開発へ向けた取り組みが加速すると期待されます。

この研究成果は、令和元年5月14日付（日本時間4時）米国科学雑誌 *Proceeding of the National Academy of Sciences* オンライン版に掲載されました。

この研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業基盤B『環境の時刻変動への適応を可能にする植物の時計転写ネットワークの包括的な解析』などの支援のもとで行われたものです。

【ポイント（箇条書き）】

- 植物の1日の長さ（概日時計の周期長）を延長する低分子化合物を発見しました。
- 分子プローブの設計とプロテオミクス解析により、周期延長化合物の標的タンパク質として遺伝的重複性が推測されるカゼインキナーゼ1（CK1）ファミリーを見出しました。また、周期延長化合物およびCK1の主要な作用経路を決定しました。
- 植物の時計を標的とした分子は、花成時期の人為調節などの調整剤としての開発につながることを提案します。
- 動植物に共通した時計関連タンパク質CK1の発見は、時計分子モデルの進化的シナリオに再考を促します。

【研究背景と内容】

概日時計は地球上の多くの生物に認められる約24時間の周期を創り出す遺伝的に組込まれたシステムです。植物は概日時計の働きにより、1日のうちで最適な時刻に適切な生理反応を行います。オジギソウの日周期的な就眠運動や、多くの植物の開花する時間などは良く知られた「時計に依存した」生理応答です。その他にも、突然の日光は光合成装置からの酸化ストレスの発生の原因となるため、植物はやがてやってくる朝に向けて酸化ストレスへの対応を夜のうちから準備し始めます。またやってくる夜の低温に向けて、午後のうちから低温への応答を始めます。このように、概日時計の働きによって植物は外環境の時刻変化へ予期的に応答することができます（図1）。また、多くの植物は特定の季節に花を咲かせますが、その現象の背景にある日長測定^{注1}のための体内時間情報の基礎として概日時計は働いています。特定の季節に花芽を形成するための日長測定を、概日時計が生み出す体内時刻を基礎として使っています（図1）。時計機構の変異による花成時期の変化の事例が多く、植物種で報告されてきました。



図1. 植物の概日時計の働き

植物は、概日時計の働きにより、近い将来(数時間後)にやってくる昼夜に依存した環境変化に対して予期的に応答する。夜明け前にすでに日の出後の対応を始め、日が暮れる前に夜の対応を始めている。
また概日時計の時刻と光情報を参照して、日長を計る。この仕組みは 特定の季節に花が咲くことに寄与する。

概日時計は複数の時計関連タンパク質の相互の転写制御によって成り立つとされますが、その理解はまだ不完全でした。その理由の1つとして、多くの植物は染色体倍加^{注2}の結果生じた遺伝的冗長性^{注2}の高い遺伝子群を持ち、このような冗長性遺伝子群を踏まえて時計システム

を理解する方法が限られていたからです。

研究グループは、仮に、機能重複あるいは生存必須機能を持つタンパク質群に働きかける薬剤(化合物)があれば、上記の問題点を解決できると考えました。まず、トランスフォーマティブ生命分子研究所で整備された化合物ライブラリーからシロイヌナズナの概日時計周期を延長する化合物のスクリーニングを実施し、PHA767491 という化合物を得ました(図2)。PHA767491 は動物の CDK7 (cyclin dependent kinase 7) の阻害剤として知られていましたが、植物における標的は不明でした。植物での PHA767491 の標的を探るため、PHA767491 の活性をある程度保持したままアガロースビーズ^{注3}に共有結合できる分子プローブ^{注3}を開発して、これを PHA ビーズ(図3)と命名しました。PHA ビーズに結合するシロイヌナズナ由来のタンパク質を質量分析したところ、CK1 タンパク質^{注4}を見出しました。CK1 タンパク質はシロイヌナズナには少なくとも13遺伝子座にコードされていました。この13のCK1遺伝子群の発現を一括的に低下させると概日リズム周期が延長したため、PHA767491 はCK1を阻害することで時計周期長を調節することが示唆されました(図3)。

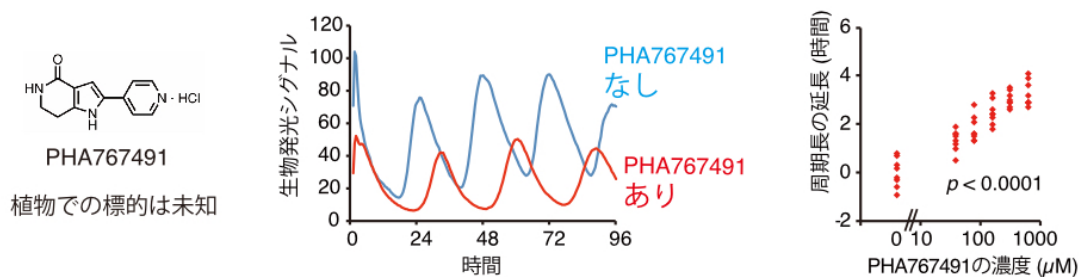


図2. PHA767491は植物の概日時計周期の延長効果を示す

スクリーニングによって、PHA767491は植物の概日時計周期を延長する化合物として見出された。約24時間の概日時計周期(青色トレース)を約3~4時間ほど延長させる効果を持つ。

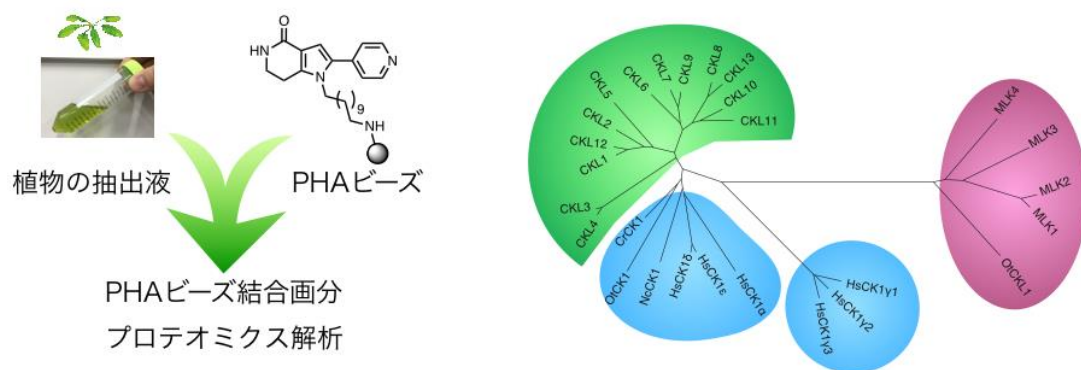


図3. PHA767491の植物での標的候補はCK1ファミリー

PHA767491をビーズに共有結合させ、そのビーズに特異的に結合する植物タンパク質をプロテオミクス解析で同定した。動物やカビなどに保存されているCK1(水色)に類似した植物タンパク質が取得された(CKL, 緑)。このCKLファミリーの次に類似する植物のMLKファミリーはビーズに結合しない(赤色)。

また、研究グループは、PHA767491の作用機序を探る別のアプローチとしてPHA767491を短時間処理した直後の遺伝子発現の変化に着目しました。PHA767491の効果として、明け方と朝の遺伝子群の発現が低下することが示されたため、この遺伝子群を直接的に制御することが知

られていた PRR タンパク質群^{注5}と CK1 の関係が疑われました。実際に研究グループは CK1 が試験管内で PRR5 と TOC1 をリン酸化すること、このリン酸化は PHA767491 で阻害されることを見出しました。また、シロイヌナズナに PHA767491 を投与すると PRR5 と TOC1 の分解が緩やかになりました。以上のことから、CK1 は PRR5 と TOC1 の分解の契機となるリン酸化修飾を担っていると示唆されました (図 4)。

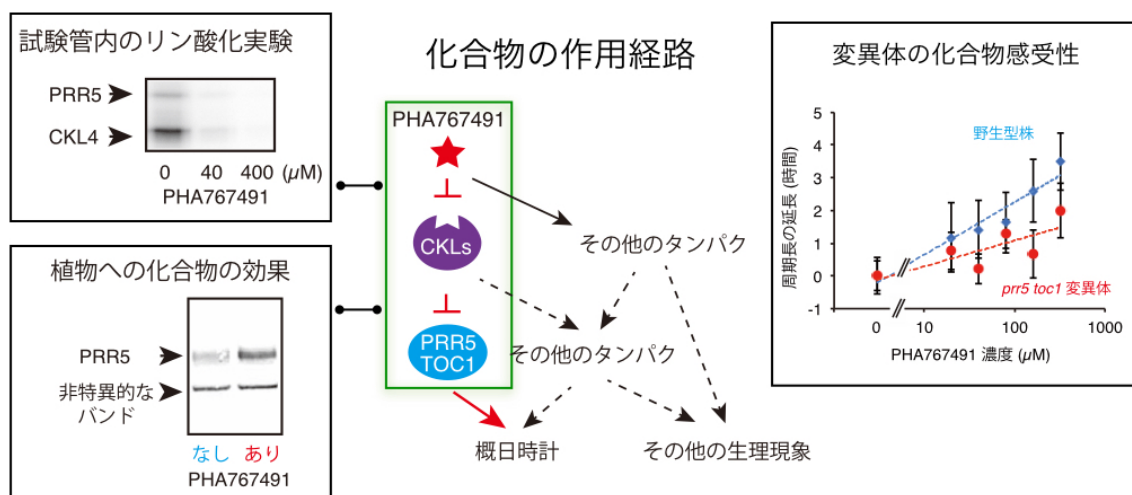


図4. PHA767491とCKLタンパクの植物概日時計への作用

試験管内でCKL4タンパク質はPRR5タンパク質をリン酸化し、PHA767491はそのリン酸化を阻害する (左上). 植物にPHA767491を処理すると、PRR5タンパク質の量が増える (左下). 左上と左下の実験はTOC1タンパク質についてもPRR5と同様の結果が得られている。

PHA767491による周期延長効果は*prr5 toc1*で減弱する (右上). ただし*prr5 toc1*のPHA767491感受性は完全に消失しないため、PRR5とTOC1に依存しないPHA767491の作用経路も存在すると示唆される。

【成果の意義】

本研究は、植物に活性のある低分子化合物の標的を分子プローブの利用により発見した初のケースになりました。また、多くの穀物で、時計およびその下流を標的とした品種が開花期の調節のために選抜されてきていることを踏まえると、今回の低分子化合物の発見により、将来的な地球環境変動に対する適応策の一環である花成時期調節を目指した低分子化合物の開発へ向けた取り組みを加速すると期待されます。従来知見では、それぞれの生物界(バクテリア、カビ、動物、植物)で進化的に起源の異なるタンパク質が時計を作り出してきた、いわゆる「収斂的な進化シナリオ」^{注6}が支持されてきましたが、CK1はカビと動物の時計の調節に関わることが知られていたため、今回の植物時計におけるCK1の時計への関わりの発見は、これまでの時計分子の進化シナリオに再考を促します。

今回の研究は、本学トランスフォーマティブ生命分子研究所の 桑田 啓子 特任助教、廣田 毅 特任准教授、佐藤 綾人 特任准教授、大川 (西脇) 妙子 准教授、吉村 崇 教授、Steve Kay 教授、伊丹 健一郎 教授、木下 俊則 教授、東京大学の溝井 順哉 准教授と篠崎 (山口) 和子 教授、中部大学の 鈴木 孝征 准 教授、京都大学の 伊藤 照悟 助教らと共同で行われました。

【用語説明】

ここでは専門的な用語やタンパク質名などについて簡単に説明しました。詳しい情報については下記に掲載した論文や説明サイトをご覧ください。

注1) 日長測定: 概日時計の時刻情報と環境の光条件を参照して、日の長さを測るしくみ。多くの植物は好ましい季節に一斉開花する必要性があり、その季節の手がかりとして日の長さを測っている。1920年に米国のガーナーとアラードによるマメ科植物の日長に依存した花芽形成の報告が、初の科学的記述である。日長測定の原理究明が多くの生物の概日時計の発見につながった「マメから生まれた生物時計学会出版センター、田澤 仁 著、2009年」。日長が花芽形成に影響するため、原産地と異なる日長や気候をもつ地域での作物の開花および栽培化には、日長測定にあえて異常をもたせることが必要である。イネの日長測定と日本列島での栽培化の経緯については、「時間生物学 vol. 25、no 1、イネが光周性花芽形成の「モデル」って本当ですか？井澤 毅 著、2019年」に詳しく述べられている。他の穀物の日長測定と栽培地域の拡大の関連性については、「*Plant Cell Physiol.*、vol. 56、no 4、Adaptation to the local environment by modification of the photoperiod response in crop、N. Nakamichi 著、2015年」に報告されている。

注2) 染色体倍加、遺伝的重複性: 染色体が倍加した体細胞が生殖細胞へと分化したり、不完全な減数分裂によって倍数化した生殖細胞が発生したりすると、それにより次世代の個体全体の染色体が倍加する。被子植物においては、倍数体化した形跡はあらゆる分類のもので見られる。菜種や小麦の誕生には、異種植物間の倍数体化が関わっている「植物生理学・発生学、講談社、2017年」。シロイヌナズナでもゲノム配列の決定によって、過去に倍数体化した痕跡が認められた。倍数体化は元となった2つのゲノムから相同遺伝子を持ち込むことにもなるため、必然的に遺伝子の重複が生まれる。

注3) アガロースビーズ、分子プローブ: 化合物の作用の詳細を解明するために化合物の一部を改変すること。今回は化合物 PHA767491 の結合するタンパク質を見出すために、PHA767491 の複数の構造類似体を作成して、その生物活性の評価を実施し、改変しても活性を保持する部位を見出して、そこを起点として PHA767491 とアガロースビーズを共有結合させた (PHA ビーズ)。PHA767491 そのものは濃縮することができないが、作成した PHA ビーズは遠心分離機で回収することができるため、それを用いて PHA767491 に結合するタンパク質の探索が可能となる。

注4) CK1 タンパク質: 進化的に保存されたタンパク質リン酸化酵素。カビや動物では概日時計に関わることが知られている (実験医学 vol 24、no 4、時計タンパク質の多段階リン酸化、廣田 毅、深田 吉孝 著、2006、実験医学 vol 29、no 9、概日時計のケミカルバイオロジー、廣田 毅、Steve A Kay 著、2011)。動物の CK1 は時計タンパク質の PER をリン酸化するが、陸上植物では時計に関わることは不明であった。本研究では植物の CK1 ファミリーが時計に関わること、また CK1 が植物時計関連タンパク質の PRR をリン酸化することを見出した。

注5) PRR タンパク質群: 植物に特有な時計関連タンパク質 PSEUDO-RESPONSE REGULATOR。バクテリアの情報伝達因子から分子進化したと考えられ、本学のグループと Scripps 研究所のグループが、ほぼ同時に発見した (https://en.wikipedia.org/wiki/Pseudo-response_regulator)。PRR の存在は動物やカビ、バクテリアなどには認められていないため、概日時計の仕組みは植物・動物・バクテリアで独立して誕生したと示唆されている。いくつかの穀物における花成時期の変わる品種の原因は、PRR 遺伝子の変異である「*Plant Cell Physiol.*、vol. 56、no. 4、Adaptation to the local

environment by modification of the photoperiod response in crop、N. Nakamichi 著、2015 年」。

注6)収斂的な進化:起源の異なるものが進化の結果、同等の働きを持つものになること。例えば昆虫の羽と、鳥の翼は、起源としては異なる器官であるが、似たような形となり、飛ぶ能力を支える器官となった。概日時計はバクテリア、動物、植物などで認められているが、時計としての働きを担う分子機構は、進化的に起源の異なるタンパク質で担われていることが通説であった。本研究では、動物の時計に関わる CK1 が、植物の時計でも働くことを報告した。

【論文情報】

雑誌名：*Proceeding of the National Academy of Sciences*

論文タイトル：Casein kinase 1 family regulates PRR5 and TOC1 in the Arabidopsis circadian clock
(シロイヌナズナの概日時計においてCasein kinase 1はPRR5とTOC1を制御する)

著者：Takahiro N Uehara、Yoshiyuki Mizutani、Keiko Kuwata、Tsuyoshi Hirota、Ayato Sato、Junya Mizoi、Saori Takao、Hiromi Matsuo、Takamasa Suzuki、Shogo Ito、Ami N Saito、Taeko Nishiwaki-Ohkawa、Kazuka Yamaguchi-Shinozaki、Takashi Yoshimura、Steve Kay、Kenichiro Itami、Toshinori Kinoshita、Junichiro Yamaguchi、Norihito Nakamichi
(上原 貴大*、水谷 佳幸*、桑田 啓子*、廣田 毅*、佐藤 綾人*、溝井 順哉、高尾 早織、松尾 宏美*、鈴木 孝征、伊藤 照悟、斎藤 杏実、大川(西脇) 妙子*、篠崎 (山口) 和子、吉村 崇*、Steve Kay*、伊丹 健一郎*、木下 俊則*、山口 潤一郎、中道 範人*) *名古屋大学所属

DOI: [10.1073/pnas.1903357116](https://doi.org/10.1073/pnas.1903357116)

【WPI-ITbM について】(<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp>)

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所(ITbM)は、2012 年に文部科学省の世界トップレベル研究拠点プログラム(WPI)の 1 つとして採択されました。名古屋大学の強みであった合成化学、動植物科学、理論科学を融合させ、新たな学問領域である植物ケミカルバイオロジー研究、化学時間生物学(ケミカルクロノバイオロジー)研究、化学駆動型ライブイメージング研究の 3 つのフラッグシップ研究を進めています。ITbM では、精緻にデザインされた機能をもつ分子(化合物)を用いて、これまで明らかにされていなかった生命機能の解明を目指すと共に、化学者と生物学者が隣り合わせで研究し、融合研究を行うミックス・ラボという体制をとっています。「ミックス」をキーワードに、化学と生物学の融合領域に新たな研究分野を創出し、トランスフォーマティブ分子の発見と開発を通じて、社会が直面する環境問題、食料問題、医療技術の発展といった様々な課題に取り組んでいます。