【解説】

植物の生物時計

時計関連遺伝子と計時機構研究の新展開

中道範人, 水野 猛

菜の花は春、菊は秋と、植物はそれぞれに決まった季節に花を咲かせる（花暦）。また、葉の就眠運動や花弁の開閉など一日の時刻をほぼ正確に反映した動きも示す（花時計）。このような季節や時刻を検知する仕組みは植物に遺伝的に備わった機構であり、古くから多くの研究者が魅了されてきた。最近になって、モデル高等植物シロイヌナズナの生物時計に関する理解が飛躍的に進み、多くの時計関連遺伝子が同定され、これらの遺伝子の相互作用により構築されるネットワークとしての時計機構を分子レベルで理解できるようになってきた。本稿ではこれら最新の知見を解説しながら、新奇な時計関連遺伝子 PRR ファミリーの働きも含めて、明暗周期にตอบสนองして様々な高次現象を巧妙に制御するシロイヌナズナ概日時計に関する分子モデルについて考えてみる。

生物時計が刻む概日リズムとは

あらゆる生物は地球の自転に伴う昼夜という周期的な環境変化のもとで生きている。多くの生物はこのような日周性の環境変化（明暗や寒暖）に適応した生体制御機構を備えている。たとえば、高等動物は昼夜に同調した睡眠覚醒サイクルを示し（夜に人は眠り、ネズミは駆け

回る）、ある種の昆虫は早朝に一斉に羽化する。リンネの花時計を思い浮かべるまでもなく、多くの植物はそれぞれ決まった時刻に花弁を開く。このような規則的な生物現象は約（概ね）24 時間の周期を示すことから「概日リズム」と呼ばれている。つまり、生物は 24 時間を計測できる仕組みを備えていると考えられ、そのような機構は概念的に「生物時計」といわれる。

一見不思議な生物時計も、周期的に変動する近未来を予知することで様々な生体機能を適切に制御できるメリットを考えると、多くの生物が進化の過程で時計機構（概日リズム）を獲得した理由が直感的に理解できる。事実、動物や植物のみでなく、カビやある種のバクテリアでさえ巧妙な時計機構を備えていることが明らかになっている。とりわけ、光に依存して生活する植物にとって概日リズムは重要な生物学的意味をもつ。ここでは、モデル植物シロイヌナズナを用いた分子生物学的研究から明らかになってきた高等植物の概日リズムを生み出す時計分子機構に関して解説する。

植物の概日リズムの重要性

太陽エネルギーに依存して光合成を行なう植物にとって、その活性を明暗サイクルに同調させて制御すること

Plant Circadian Clock : Clock Related Genes and Clock Mechanism.

Norihito NAKAMICHI, Takeshi MIZUNO, 名古屋大学大学院生命農学研究科

図1 ■ シロイヌナズナにおける概日リズムが制御する生理現象
 円の外部は容易に観察ができる日周リズムを、円の内部は日周変動をする遺伝子の主な例を示した。

が重要であることは言うまでもない。実際に、多くの生理現象が明暗周期に同調して制御されている^(1,2) (図1)。たとえば、光合成関連遺伝子の多くが時計に支配されて明け方から昼にかけて活発に転写されるが、こうした遺伝子発現レベルでの概日リズムは効率的な光合成能の準備と維持に一役買っている⁽³⁾。また、シロイヌナズナを注意深く観察すると、胚軸は夕方から夜にかけてより速やかに伸張り、葉は上下運動（昼間は水平になる）を、気孔は開閉運動（昼間に開く）を繰り返す。さらに詳細に調べると、胚軸の伸張速度、葉や気孔の運動を実験的に計測すると概日リズムを刻んでいる。これらの現象の生物学的意義は明確ではないが、昼はエネルギー生産に専念して夜に生長するシロイヌナズナにとって、昼間には葉を水平にして効率的に光エネルギーを吸収し、気孔を開き光合成関連のガス交換や蒸散を盛んにするなどのメリットが考えられる。

以上のような日周性を示す高次機能の制御だけでなく、時計機構を介した季節（日長）の検知も植物にとっては重要である。花芽形成（開花）のタイミングは多くの植物において巧妙に制御されていることがよく知られている（光周性花成制御）⁽⁴⁾。たとえばシロイヌナズナでは日が長くなると、イネでは日が短くなると花成が促進される。こうして、同一種の植物がある季節にタイミングを合わせて一斉に開花受粉することで個体間の交配が促進される。交配によって遺伝的多様性がもたらされる生物学的意味を考えると、植物における概日リズムを介した光周性花成制御の重要性が理解できる（後述）。

概日リズムを生み出す生物時計

このように生物学的に重要な働きをしている時計が生み出す概日リズムを把握する上で、重要な特性が3つあ

用語解説

自由継続リズム： 連続明や連続暗のような日周期性のない環境下での生物の概日的な活動リズムのこと。ほぼ24時間の周期を示すが、多くの生物は完全な24時間のリズムではない。

同調： 概日リズムの時間軸（位相）が、光や温度などの日周期変化の位相にそろうこと。たとえば、強烈な光入力によって植物のリズム位相は、朝に引き込まれる。

温度補償性： 広い温度の範囲内で反応速度がほぼ一定であること。一般的な生化学反応は温度が10℃上昇すると反応速度は2~4倍になるが、概日リズムはせいぜい1.2倍ほどにしかない。

位相応答曲線： 自由継続しているリズムに任意の位相で光などのリセット情報を与えた場合、そ

の位相がどのくらい変化するかをプロットする実験。多くの生物で夜後半の光入力は位相を前進させ（早く朝になるようにする）、日中の光入力は位相を後退させる（再度朝から繰り返そうとする）。

就眠運動： 葉が開閉や上下の運動をすること。多くの植物種でみられ、概日周期性を示す。葉の付け根にある葉枕といわれる組織の細胞圧の変化が、葉を動かす原因となる。

光周性花成： 植物が日長を感知し、それに応答して花芽形成をする現象。日が長くなると花が咲く植物を長日植物、日が短くなると花が咲くものを短日植物という。また、日長に左右されずに花を咲かせる植物を中日植物という。

図2 ■ シロイヌナズナ培養細胞系 T87 の概日リズム (文献10より引用)

CCA1::LUCを導入した T87 細胞のルシフェラーゼ発光を自動計測し、細胞集団のリズムを簡便にモニターした。細胞の生育条件は下記のとおり。(A) 上図: T87 を 10 日ほど連続明条件で生育させたのち、連続暗条件に移した。また対照実験としては、連続明条件のままの T87 の発光を測定した。下図: T87 を 10 日ほど連続暗条件で生育させたのち、連続明条件に移した。“リズムの自由継続”と“リズムのリセット”が観察された。(B) 任意温度、連続明条件での T87 の発光を測定した。広範な温度のもとで周期がそれほど変わらない“リズムの温度補償性”が観察された。

る^(5, 6) (図2)。

①概日リズムは明暗周期や温度周期など時間情報のない条件下でも約 24 時間周期で自律的に継続する (リズムの自由継続)。

②しかし、光や温度シグナルに応答してリズムの位相が変化する (リズムの同調)。

③一般的な生化学反応と異なり、幅広い温度条件でほぼ 24 時間の周期性が大きく変動することなく維持される (リズム周期の温度補償性)。

一般に、このような特性をもつ概日リズムを生み出す生物時計 (計時システム) を理解するために

入力系→中心振動体→出力系

というフレームワークが便宜的に設定されている。このフレームワークは、自由継続リズムを生み出す中心振動体の上流に時計の同調とリセットに関わる入力系を想定し、時計の下流で様々な生理現象に日周性リズムを付与する出力系ネットワークの存在を想定している^(7, 8) (図3)。しかし、これらは生物時計をわかりやすく理解するための便宜的な区分けであり、研究が進むにつれて、最近はその境界が曖昧になってきているのも事実である (後述)。

図3 ■ シロイヌナズナの生物時計の分子モデル

朝方遺伝子の CCA1/LHY は、次の位相の遺伝子 PRR9/PRR7/PRR5 などの転写を促す。ある程度の時間経過ののち、蓄積した PRR9/PRR7/PRR5 は、CCA1/LHY の発現を抑える。このことで CCA1/LHY による夕方位相の PRR1 (TOC1)、ELF4、LUX (PCL1) の抑制が解除される。そして、徐々に発現し、蓄積してくる PRR1 (TOC1) などは朝方遺伝子の CCA1/LHY の転写を促す。このように位相段階的な転写レベルのフィードバックが自律的に振動することで、概日リズムが発生すると考えられる。このリズムは多くの出力系を随えており、様々な生理現象の概日周期性をもたらす。また、このフィードバックは光変化や温度変化によって昼夜に同調することができる。

植物における概日リズムの測定法

概日リズム発見はマメ科植物の葉の示す就眠運動の観察に基づいているが、この現象はきわめて印象的であり、すでに紀元前に報告されている⁽²⁾。花卉の開閉運動も葉の就眠運動と並んで観察が容易であったため、古くから概日リズムの指標とされてきた。1900年代初めによりやく植物時計の研究が近代科学の対象となり、就眠運動を自動測定する装置が考案されて様々な実験がなされた。その後の多くの実験証拠から、先に述べた概日リズムに関する3つの特性が明らかにされた⁽²⁾。現在では、このような個体レベルの概日リズムの測定に加えて、概日リズムを示す植物遺伝子のプロモーターにホタルのルシフェラーゼ遺伝子を融合させたレポーターをもつ組換え植物を利用して、詳細なリズムを発光変化としてリアルタイムで解析することが可能であり、時計研究の強力な武器になっている^(6, 9)。

植物の時計はどこにあるか？

本稿では詳しく述べないが、動物における時計本体は視交叉上核と呼ばれる脳の一組織に局在しており、これがその他末梢組織の概日リズムを制御している。同じ多細胞生物であるが神経や脳をもたない植物において時計はどこに存在しているのだろうか？よく聞かれる質問である。筆者らは、明け方に発現のピークがみられる時計遺伝子 *CCA1* のプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を融合した形質転換植物を作製して概日リズムの測定に用いている。この植物体を用いて葉、茎、根など組織ごとに切りとったのち発光リズム（時計遺伝子の発現リズム）を測定してみると、組織にかかわらず同様なリズムが観察される。さらに、同じレポーター遺伝子をシロイヌナズナの培養細胞に導入することで概日リズムを解析することにも成功した⁽¹⁰⁾（図2）。この組換え細胞における発光リズムは植物個体における *CCA1* mRNA の発現パターンとよく一致しており、そのリズムの特性は「自由継続、明暗シグナルによるリセット、温度補償性」の必須条件をすべて満たした。このことは、単離細胞でも時計が機能していることを示している。少し専門的になるが、自由継続しているリズムの位相が光などによってどの程度変化するかを時間毎にプロットする実験（位相応答曲線解析）⁽¹¹⁾ からこの結論は支持された。これらのことから、植物においては全身の細胞で自律性の高い時計が作動しており、どこか一定の組織（部位）に主要な時計が局在しているわけではないと考えられる。

シロイヌナズナにおける時計関連因子

分子遺伝学の容易なシロイヌナズナを用いた時計研究は、2000年に全染色体塩基配列が決定されたこともあり、大きく進展した。ここでは、まずシロイヌナズナにおいて同定された時計関連遺伝子について、その特徴なども含めて列挙する（表1）。以下、表1を参照しながら、各時計関連遺伝子に関する遺伝的解析結果や特徴に関して概観する。

1. シロイヌナズナにおける最初の時計因子候補 *TOC1*

光合成関連遺伝子 *CAB2* (*CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN2*) は昼に発現ピークを迎える遺伝子であり、その発現は時計に支配されている（以下、*CAB2* 遺伝子のようにその発現が時計に支配されて概日リズムを刻む遺伝子群を *ccg* : circadian-controlled gene と総称する）。1992年、典型的な *ccg* 遺伝子である *CAB2* プロモーターとルシフェラーゼの融合遺伝子を導入したシロイヌナズナを用いて概日リズムを簡便に解析するシステムが米国の Kay らによって開発された⁽⁹⁾。これは、その後の時計研究に画期的な威力を発揮することになった。この系を用いて最初に分離された時計変異体の有力候補が *toc1* である。*TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESSION1*) 遺伝子に変異が起ると、*CAB2* 遺伝子など多くの *ccg* 遺伝子の自由継続概日リズムの周期が著しく短くなる⁽¹²⁾。こうして、シロイヌナズナの時計因子の最初の候補遺伝子が報告された。しかし、その *TOC1* 産物が同定されるまでにはさらに数年の努力を要し、その間あまり多くの知見は得られなかった（後述）。

2. Myb 型転写因子 *CCA1* と *LHY*

一方、Tobin らは、同じ *CAB2* 遺伝子のプロモーター域に結合する因子を探索することで *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1*) タンパク質を取得した⁽¹³⁾。*CCA1* 遺伝子自身も明け方に発現ピークをもつ *ccg* 遺伝子である。*CCA1* はその構造から、DNA 結合性の Myb 型転写因子と考えられ、試験管内の実験ではあるが、*CAB2* 遺伝子以外のいくつかの *ccg* 遺伝子の上流領域に結合することも知られている（先に述べた *TOC1* 遺伝子を含む）^(14~16)。興味深いことに、*CCA1* 遺伝子の機能欠損植物体では、調べた限りすべての *ccg* 遺伝子の自由継続概日リズムの周期が著しく短くなる⁽¹⁷⁾。また、*CCA1* 遺伝子を過剰発現する形質転換植物体では、*ccg* 遺伝子群の自由継続リズムが失われる⁽¹⁸⁾。一方、ほぼ同時期に *CCA1* ときわめて相溶性が高い遺伝子がまった

表 1 ■ 時計関連遺伝子とその特徴

遺伝子名	略名	AGI コード	mRNA 発現 ピーク (時間)	生化学的機能, 分子性質	文献
<i>CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1</i>	<i>CCA1</i>	At2g46830	0	single-Myb 型転写因子	13, 14, 17, 18, 20, 21
<i>β-subunit of the protein kinase CK2</i>	<i>CKB3</i>	At3g60250	報告なし	CK2 β サブユニット	46, 47
<i>EARLY FLOWERING 3</i>	<i>ELF3</i>	At2g25930	20	核内移行	39
<i>EARLY FLOWERING 4</i>	<i>ELF4</i>	At2g40080	12	不明	37
<i>GIGANTEA</i>	<i>GI</i>	At1g22770	8	核内移行	38
<i>LATE ELONGATED HYPOCOTYL</i>	<i>LHY</i>	At1g01060	0	single-Myb 型転写因子	19~21
<i>LOV KELCH PROTEIN 2</i>	<i>LKP2</i>	At2g18915	報告なし	E3 UBQ リガーゼ SCF 複合体 F-box 構成因子	43
<i>LUX ARRHYTHMO</i>	<i>LUX</i>	At3g46640	12	single-Myb(GARP) 型転写因子	16, 40
<i>PHYTOCLOCK 1</i>	<i>PCL1</i> (= <i>LUX</i>)				
<i>PSEUDO RESPONSE REGULATOR 1</i>	<i>PRR1</i>	At5g61380	12	核内移行	12, 14, 27, 28
<i>PSEUDO RESPONSE REGULATOR 3</i>	<i>PRR3</i>	At5g60100	10	核内移行	27, 28
<i>PSEUDO RESPONSE REGULATOR 5</i>	<i>PRR5</i>	At5g24470	7	核内移行	27~29, 32~34, 36
<i>PSEUDO RESPONSE REGULATOR 7</i>	<i>PRR7</i>	At5g02810	5	核内移行	15, 27, 29, 31, 33~ 36
<i>PSEUDO RESPONSE REGULATOR 9</i>	<i>PRR9</i>	At2g46790	1	核内移行	15, 27, 28, 30, 32, 33, 35, 36
<i>TIMING OF CAB EXPRESSION 1</i>	<i>TOC1</i> (= <i>PRR1</i>)				
<i>ZEITLUPE</i>	<i>ZTL</i>	At5g57360	周期性なし, タンパク質 ピークは 10	E3 UBQ リガーゼ SCF 複合体 F-box 構成因子	41, 42
<i>PHYTOCHROME A</i>	<i>PHYA</i>	At1g09570	10	遠赤色光, 赤色光受容体	49, 51
<i>PHYTOCHROME B</i>	<i>PHYB</i>	At2g18790	6	赤色光受容体	49, 51
<i>CRYPTOCHROME 1</i>	<i>CRY1</i>	At4g08920	6	青色光受容体	49, 51
<i>CRYPTOCHROME 2</i>	<i>CRY2</i>	At1g04400	10	青色光受容体	49, 51
<i>SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED</i>	<i>SRR1</i>	At5g59560	16	核内移行	44

く別のアプローチから時計関連遺伝子として同定された⁽¹⁹⁾. *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*) と名づけられたその遺伝子の特徴は、野生株と比べて著しく胚軸の長い遅咲きという点である。*LHY* と *CCA1* は、遺伝子発現の様式だけでなく、欠損変異体や過剰発現変異体の表現型も互によく似ている。さらに重要な事実は、*cca1 lhy* 二重欠損変異体では調べた限りすべての ccg 遺伝子において自由継続リズムがほぼ消失した点である。これらの結果から、現在では *CCA1* と *LHY* はその機能が一部重複して働く中心振動体構成因子の有力候補と考えられている^(20, 21).

3. 疑似 RR 群 (PRR)

His-Asp リン酸リレー系は二成分制御系とも呼ばれ、Ser/Thr/Tyr リン酸化カスケードと並んで生物に普遍的な情報伝達機構であることはよく知られている。一般的には、シグナルセンサーである His キナーゼ (HK) がレスポンスレギュレーター (RR) にリン酸基を転移することで調節因子 RR の機能を制御する⁽²²⁾. 高等植物にお

いても His-Asp リン酸リレー系関連因子がエチレン応答などの情報伝達機能を担っていることが明らかになっている。筆者らは、シロイヌナズナにおける His-Asp リン酸リレー系関連遺伝子群の網羅的機能解析を行なうことで植物ホルモン・サイトカニン受容体 HK を発見し、サイトカニン応答初発情報伝達経路が His-Asp リン酸リレー系で構成されていることを明らかにしてきた。その詳細に関しては他の総説に譲るとして^(23~26), これらの研究の過程で、筆者らは偶然にも疑似 RR と名づけた時計関連遺伝子ファミリーを見いだした⁽²⁷⁾.

これら疑似 RR は一般的 RR に類似しているが、リン酸基を受容するアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基に置き換わっていてリン酸リレー能を失っていることから、PRR (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR) と名づけられた。PRR ファミリータンパク質は構造が互によく似た PRR1, PRR3, PRR5, PRR7, PRR9 のメンバーからなる。これら PRR タンパク質は、共通の構造的特徴として N 末端に疑似レシーバーを、C 末端に CCT モチーフをもつ (残念ながら分子機能は未だ不明

である)。PRR 遺伝子群の発現様式を解析したところ、興味深いことに $PRR9 \rightarrow PRR7 \rightarrow PRR5 \rightarrow PRR3 \rightarrow PRR1$ の順に約 2 時間間隔で発現ピークをもつ波状的な概日リズムを示した⁽²⁷⁾。これらの結果はきわめて印象的であり、それまで時計研究に無縁であった筆者らを魅了するのに十分であった。こうして筆者らは、PRR ファミリーが時計関連因子であることを期待して研究をスタートしたが、それと時を同じくしてさらに驚くべき報告がなされた。ようやく *toc1* の原因遺伝子が同定されたが、なんと初代時計因子候補 TOC1 は PRR1 と同一であった⁽¹²⁾。

筆者らはこの事実さらに意を強くし、時計研究に焦点を当てながら PRR 遺伝子ファミリーに関する広範な遺伝学的解析を進めた（各遺伝子の欠損変異体の解析や過剰発現体の解析など）。紙面の都合上その詳細は割愛するが、いずれの解析結果も PRR1 (TOC1) だけでなく他の PRR 因子も時計機能に深く関わっていることを示唆するに十分であった^(15, 28~35)。その端的な例として、*prp9/prp7/prp5* 三重欠損変異体では時計機能が崩壊しているかのような表現型を示した⁽³⁶⁾。調べた限りすべての ccg 遺伝子の自由継続リズムが消失し、光シグナルだけでなく温度シグナルへの応答にも変調をきたし、きわめて遅咲きであり、その胚軸は著しく徒長する。概日リズムの表現型の重篤性は *cca1/lhy* 二重欠損変異体と同等であり、今まで知られている時計関連変異体の中でも際だっている。したがって、PRR1 (TOC1) だけでなく PRR9/PRR7/PRR5/PRR3 すべてが CCA1/LHY と並んで中心振動体の近傍で働く主要時計関連因子と考えられる。

4. その他時計関連因子群

CCA1/LHY や PRR ファミリー因子以外にも、概日リズムの維持に関わるとされる時計関連遺伝子が報告されている。中でも、ELF4 (EARLY FLOWERING 4)⁽³⁷⁾ と GI (GIGANTEA)⁽³⁸⁾ は、それらの遺伝子が欠損したときの表現型が顕著であり、自由継続リズムの振幅の低下や無周期化が観察される。したがって、これらの因子も中心振動体の近傍で働く時計関連因子と考えられている。*elf4* 変異体と同様に光周性花成制御の変異体として分離された *elf3* (EARLY FLOWERING3) では、*elf4* や *gi* 変異体と異なり恒明条件下でのみ自由継続リズムが消失する（連続暗所では正常）⁽³⁹⁾。この変異株に関する位相応答曲線を解析した結果をもとに、時間帯依存性の光入力系遮断因子としての働きが提唱されている。しかし、これらの因子 (EFL3, ELF4, GI) はいずれ

も機能不明の植物固有のタンパク質であり、それぞれが分子レベルでどのように時計機能に関わっているのかを想像することは現時点では困難である。

最近になり、新たな転写因子型の時計関連因子が同定された。LUX (LUX ARRHYTHMO)⁽¹⁶⁾ と PCL1 (PHYTOCLOCK1)⁽⁴⁰⁾ と呼ばれ、2つの研究グループから独立に報告された同一因子である。LUX (PCL1) をコードする遺伝子は PRR1 (TOC1) と同じ夕方にピークをもつ ccg 遺伝子である。*lux (pcl1)* 変異体では恒明条件下の自由継続リズムが顕著に変調をきたす。LUX は GARP (ある種の Myb) 型の転写因子と考えられ、PRR1 (TOC1) と同様に *CCA1/LHY* 遺伝子に対する正の調節因子としての役割が提唱されている⁽⁴⁰⁾。

ZTL (ZEITLUPE) は比較的分子機能が明確に推定できる時計関連因子である⁽⁴¹⁾。*ztl* は恒明条件下で *CAB2* 遺伝子の自由継続リズムの周期を長くする変異として取得された。ZTL は F ボックスおよび KELCH リピートをもつ特徴的なタンパク質であり、ユビキチン/26S プロテアソーム系で働く E3 リガーゼであることが考えられる。事実、ZTL は SCF 複合体を形成して E3 リガーゼとして働くことで PRR1 (TOC1) の分解を促進することが示されている⁽⁴²⁾。また、シロイヌナズナには LKP2 という機能的な ZTL ホモログが存在する⁽⁴³⁾。

以上の他に、SRR1⁽⁴⁴⁾ や TIC⁽⁴⁵⁾ 遺伝子といった機能未知の遺伝子に加えて、カゼインキナーゼ調節因子 (CKB3)^(46, 47) やポリ (ADP-リボース) グリコヒドrolラーゼ (TEJ)⁽⁴⁸⁾ といった酵素遺伝子の変異が時計関連の表現型を示すことが報告されている。これらに加えて、光入力系に関与する赤色光受容体 (PHYA/PHYB) や青色光受容体 (CRY1/CRY2) も時計関連因子として考慮する必要があることは言うまでもない⁽⁴⁹⁾。しかし、ここではこれらの因子に関する詳細は割愛する（一部後述）。

シロイヌナズナの生物時計の分子機構モデル

以上、シロイヌナズナにおいて同定されている時計関連因子を列挙したが、これらの因子の働きを組み合わせた時計分子モデルを構築するまでには至っていない。しかし、シロイヌナズナの時計研究者がプラットフォームとして共有している第一世代モデルが提唱されている。これは、CCA1/LHY と PRR1 (TOC1) 間で形成される負/正の CCA1-TOC1 転写フィードバックループを基盤に据えたモデルであり、考察に値する (図 4-A)⁽¹⁴⁾。

図4 ■ シロイヌナズナの中心振動体の分子モデル

(A) 明け方につくられる CCA1/LHY は *TOC1* の遺伝子発現を抑制する。一方、夕方から夜にかけてつくられる *TOC1* は *CCA1/LHY* の転写の誘導に関わる。(B) 朝から昼にかけて、CCA1/LHY は *PRR9/7/5* の転写を誘導し、*TOC1* の転写を抑制する。次第に蓄積した *PRR9/7/5* は *CCA1/LHY* の転写を抑制し、*TOC1* の転写を誘導する。最後につくられる *TOC1* は *PRR9/7/5* を抑制しつつ、*CCA1/LHY* の転写の誘導に関わる。

1. 転写翻訳を介した CCA1-TOC1 フィードバックループモデル

簡単に言えば、CCA1 (朝方因子) が TOC1 (夕方因子) の負の転写因子として働き、TOC1 が CCA1 に対する正の転写因子として働くというモデルである。CCA1-TOC1 間で閉じたフィードバックループを形成することで基本的な転写の振動 (リズム) を生み出すことができることは直感的に理解できる。このモデルは完全に証明されたものではないが、いくつかの状況証拠により支えられている。たとえば、転写因子 CCA1 が TOC1 のプロモーターの AAAATATCT 配列に直接結合することが試験管内実験により示されている⁽¹⁴⁾。また、*cca1/lhy* 二重欠損変異体では TOC1 遺伝子の脱抑制が観察されている^(20, 21)。こうして CCA1→TOC1 の負のループの存在が考えられた。一方、TOC1 が DNA 結合性の転写因子として働く証拠はなく、TOC1→CCA1 の正のループにおける TOC1 の役割は間接的であると思われる。この点で、最近になり CCA1 が転写因子と思われる LUX のプロモーターにも結合することが示唆されたが⁽¹⁶⁾、LUX が TOC1 と同様に夕方因子であることを考えると、このモデルにおいて LUX も TOC1 と並列的に機能しているかもしれない。いずれにしろ、CCA1-TOC1 間で形成されるフィードバックループがシロイヌナズナにおける転写振動モデルとして広く受け入れられている。これは、他の生物の時計分子モデルのイメージと概念的には一致している (しかし、CCA1 や TOC1 が高等植物に固有の時計因子である事実を強調する必要がある)。

CCA1-TOC1 フィードバックループが時計本体であるとしても、これだけでは不十分である。概日リズムにおける 24 時間周期性の維持、外部周期への同調、温度補

償性の働きをすべて CCA1/LHY と TOC1 に帰着させることは難しい。実際に、このループでは説明できない実験結果やモデリング結果が報告されている⁽⁵⁰⁾。つまり、別の因子が存在し、CCA1-TOC1 ループと関連して機能していることが想像できる。これらの因子として現在考えられているのが ELF4, GI, LUX などであるが、これらの因子の分子機能を考察するに足る十分なデータはまだ得られていない。また、これらの因子はすべて夕方因子であるが、それらとは違った位相で発現する、つまり朝方から夕方にかけて連続的に働く *PRR9/PRR7/PRR5* が一層興味深い時計因子として浮かび上がってくる。

2. CCA1-PRR9/7/5-TOC1 マルチループモデル

筆者らは最近、CCA1-TOC1 ループモデルを発展させた CCA1-PRR9/7/5-TOC1 マルチループモデルを提案している⁽³⁶⁾。これは、主に *prp9/prp7/prp5* の各二重欠損変異体や三重欠損変異体の表現型に関して、CCA1 や TOC1 を中心とする *ccg* 遺伝子群の発現リズムに及ぼす影響を解析した結果に基づいている。*prp9/prp7* の二重欠損変異体は長周期リズム (30 時間)、*prp7/prp5* の二重欠損変異体は短周期 (19 時間)、そして *prp9/prp7/prp5* 三重欠損変異体は無周期になる。このことから、PRR9, PRR7, PRR5 は時計本体の近傍で互いに密接に関連しながら巧妙な周期制御因子として働いていることが読み取れる。さらに、*prp9/prp7/prp5* 三重欠損変異体では恒明条件下での CCA1 遺伝子の発現が脱抑制され、かつ TOC1 遺伝子の発現が抑制される。この *prp9/prp7/prp5* での時計関連因子の発現様式から、筆者らは CCA1-PRR9/7/5-TOC1 マルチループモデルを提唱した (図 4-B)。これは、当初の CCA1-TOC1 シングルループモデルと相容れるものであり、シロイヌナズナ時計分子モデルの改良モデルとして今後の研究の基盤になると考えている。ELF4, GI, LUX や ZTL といった時計関連因子の働きだけでなく、入力系や各種出力系との接点 (インターフェース) に関しても、この改良版モデルを基盤にすることで分子レベルでの理解が深まるものと期待している。

3. 環境シグナルによる時計の同調 (入力系)

すでに光受容体 (フィトクロムやクリプトクロム) に加え、ELF3 など入力系で働く想定される因子に関しては簡単に述べたので繰り返さない。ただフィトクロム、クリプトクロム、ELF3 遺伝子の発現自身もリズムを刻むことから、時計本体からの入力系へのフィード

バックも考える必要がある（入力系と中心振動体の境界の曖昧化）^(39, 51)。また、この他にも赤色光情報伝達因子の SRR1 (SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED) などが報告されており、光入力からのリズム同調に関わっていると推定されている⁽⁴⁴⁾。しかし、これらの入力系因子が先に述べた時計因子とどのように相互作用しているかを含め、その分子機構は不明である。ましてや、温度シグナルの入力系に関してはほとんど知見が得られていない。ただ、*prr9/prr7/prr5* 変異体においては温度サイクルに対する応答も顕著に変調している事実を考えると、温度シグナルにより制御される中心振動体も CCA1-PRR9/7/5-TOC1 マルチループモデルで駆動される振動体と重なり合っていることは間違いないと思われる^(34, 35)。

4. 時計により制御される植物の高次機能（出力系：光周性花成制御を例にして）

植物の開花・結実の時期（花成時期）を制御する分子機構を理解することは基礎および応用植物学の重要命題であり、様々な植物種において膨大な研究がなされている。こうして解析された複雑な花成制御機能のうちで、特に日長の変化を感知して花成を誘導する機構は特徴的であり、これを光周性花成制御と呼ぶ。この制御は日長を測定するための時計機構と密接に関連していることは明らかである。実際に、先に述べた時計関連遺伝子（入力系遺伝子も含む）のどれかに変異が起ころうと光周性花成制御が異常になる。シロイヌナズナにおける光周性花成制御は最も代表的な出力系として詳細な研究がなされている。紙面の都合もありここでは簡単に述べるにとどめるので、詳細は最近の総説を参照していただきたい。簡単に述べれば、時計の下流の光周性花成制御として「時計→GI→CO→FT→花成誘導」経路が確立されている^(38, 52~54)。GI は先に述べた時計関連因子であるが、時計機構と日長を照らし合わせる分子が CO (CONSTANS) である。長日条件下で CO は活性化されて、花成促進因子の FT (FLOWERING LOCUS T) の転写を促進することで花芽形成を促す（図5）。

以上述べたように、光周性花成制御経路は最もよく解析された出力系の代表例である。この他の出力系に関してはほとんど解析が進んでいない。ただ、概日リズムとカップルした光形態形成制御機構（胚軸の伸長など）に関して、フィトクロムや TOC1 と直接相互作用する bHLH 型転写因子群 (PIF3, PIL1~PIL8) が関与した出力系に関する興味深い知見が蓄積しつつある^(55, 56)。さらに、最新のマイクロアレイを用いた概日リズム遺伝子に

図5 ■ シロイヌナズナの光周性花成

時計によって転写制御される CO 遺伝子は、光によって安定化するタンパク質をコードする。長日条件において日中に発現した CO は安定であり、FT の転写を促すことができ、その結果、花成が誘導される。一方短日条件では、CO の発現は暗期であり、その産物は不安定であり、FT を転写誘導することはできないため、開花しない。

関する網羅的な解析から、発現が認められる約 13,000 のシロイヌナズナ遺伝子の 25% 近くが時計の支配下にあると推定されている⁽⁵⁷⁾。したがって、時計中心振動体の下流には多岐にわたった出力系ネットワークがあると考えられ、その全貌を明らかにすることは今後に残された大きな課題である。この点で、先に述べた時計関連変異体を用いたトランスクリプトームやメタボロミクスなどのシステム解析が有効と考えられ、筆者らもすでに予備的な解析を開始している。

植物時計の農芸化学的視点から見た普遍性

最近の植物ゲノム研究の進展により、今まで述べてきたシロイヌナズナ時計関連遺伝子群や光周性花成制御に関わる遺伝子群のオーソログが各種の植物に普遍的に存在することは明らかになってきた。たとえば、*PRR1* (*TOC1*) 遺伝子群や *CCA1/LHY* は、主要穀物のイネ⁽⁵⁸⁾とオオムギ⁽⁵⁹⁾、ブナ科クリ属の樹木⁽⁶⁰⁾でも報告されており、それぞれ、その発現は概日リズムを示す。また、先に述べたシロイヌナズナの光周性花成制御経路「GI→CO→FT」が短日植物であるイネにおいても基本的には保存されていることが明らかになってきた⁽⁶¹⁾。さらに最近の研究から、ヨーロッパや北部アメリカにおけるオオムギの春播き優良栽培品種では *PRR7* ホモログの *ppd-H1* に主要な変異があり、光周性反応が低下し、収量が増えるといった農業的に有用な形質を付与していること

が示されている⁽⁵⁹⁾。これらのことは、シロイヌナズナの概日リズムと時計分子機構研究の成果が広く有用植物に普遍化できることを示唆している。すなわち、シロイヌナズナでの概日リズム研究の成果は、穀物、野菜、樹木の有用形質の制御を通じた植物バイオサイエンス研究に直接還元できると考えられる。

まとめと展望

以上述べてきたことから、古くは1800年代の後半にダーウィンを大いに悩ませた植物時計の実体に関して、現在我々は多くの分子レベルでの知見をもっていることが理解していただけたと思う。しかし、こうしてシロイヌナズナにおける多くの時計関連因子が同定されたことで植物時計研究も新しい段階（ターニングポイント）に入ろうとしている。すなわち、同定された各因子を時計の部品（ピース）に見立てたジグソーパズルのように考えて還元論的に植物時計を理解する段階である。だが、そのような方法論では複雑な生命現象を理解するには限界があると思われる。こうしたジレンマ、あるいは先行きに対する科学的不安が一因になっていると思われるが、システムバイオロジーという論法に活路を見いだそうとする潮流が生きている⁽⁶²⁾。中心振動体などといったハードウェアの実体を還元論的に追求するよりも、生物時計をダイナミックなシステムとして把握するほうがより回答に近づくことができるという主張には魅力がある。確かに生物時計研究はシステムバイオロジーによく似合う。しかし、このシステムバイオロジーの魅力は現時点ではまだ観念的なものであり、我々が30年以上も前に同じような考えに魅了されたことを思い起こす必要がある。フォン・ベルタランフィーの説くシステム論的生命有機体説やノーバート・ウィナーの生物学的サイバネティクス論が、日本の生物学分野で広く議論されたのは1970代のことである。いささか胡散臭い生氣論と背中合わせのこの旧システムバイオロジー論も、組換えDNA技術の到来に伴い、生物学者がやたら日々の実験に追われるようになって何時しか忘れ去られた。昨今のシステムバイオロジーはその亡霊の再来であろうか？しかし、我々生物学者がこの20年間思弁的議論に現を抜かすことなくきわめて勤勉に塩基配列の決定に励んだおかげで、1970年代とは圧倒的に異なる量の生物学的情報を手に入れている。この大量な情報（個々の遺伝子の配列や機能など）から、それらの関連性を見だし、生命現象という複雑系の説明へと昇華することがシステムバイオロジーの本質ならば、確かに今こそシステムバイオ

ロジーの時代を迎えようとしている（ベルタランフィーは少し早く生まれすぎた）。いずれにしろ、繰り返しになるが、生物時計研究にはシステムバイオロジーがよく似合う。その意味で、今後の植物時計研究の進展は大いに楽しみであり、筆者らもその発展に貢献していきたいと考えている。

本研究は文部科学省や農林水産省からの各種の科学研究補助金の支援を得て遂行したものである。また21世紀COE拠点形成プログラム「新世紀の食を担う植物バイオサイエンス」を推進するためのものであることを付記することで関係各位に感謝申し上げる。最後に、紙面の関係から多くの原著論文を引用できなかったことを関連研究者に深くお詫び申し上げます。

文献

- 1) S. Barak, E. M. Tobin, C. Andronis, S. Sugano & R. M. Green: *Trends Plant Sci.*, **5**, 517 (2000).
- 2) E. Bunning: "The Physiological Clock", The Heidelberg Science Library, Springer-Verlag, New York, 1967.
- 3) S. L. Harmer, J. B. Hogenesch, M. Straume, H. S. Chang, B. Han, T. Zhu, X. Wang, J. A. Kreps & S. A. Kay: *Science*, **290**, 2110 (2000).
- 4) W. W. Garner & H. A. Allard: *J. Agr. Res.*, **18**, 553 (1920).
- 5) 田澤 仁: '生物時計はいかにして生まれたか', 時間生物学, **9**, 34 (2003).
- 6) T. Kondo, C. A. Strayer, R. D. Kulkarni, W. Taylor, M. Ishiura, S. S. Golden & C. H. Johnson: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5672 (1993).
- 7) S. L. Harmer, S. Panda & S. A. Kay: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **17**, 215 (2001).
- 8) 小山時隆, 片山光徳, 近藤孝男: "植物の光センシング", 秀潤社, 2001, p. 134.
- 9) A. J. Millar, S. R. Short, N. H. Chua & S. A. Kay: *Plant Cell*, **4**, 1075 (1992).
- 10) N. Nakamichi, S. Ito, T. Oyama, T. Yamashino, T. Kondo & T. Mizuno: *Plant Cell Physiol.*, **45**, 57 (2004).
- 11) C. H. Johnson: *Chronobiol. Int.*, **16**, 711 (1999).
- 12) C. Strayer, T. Oyama, T. F. Schultz, R. Raman, D. E. Somers, P. Mas, S. Panda, J. A. Kreps & S. A. Kay: *Science*, **289**, 768 (2000).
- 13) L. Sun, R. A. Doxsee, E. Harel & E. M. Tobin: *Plant Cell*, **5**, 109 (1993).
- 14) D. Alabadi, T. Oyama, M. J. Yanovsky, F. G. Harmon, P. Mas & S. A. Kay: *Science*, **293**, 880 (2001).
- 15) E. M. Farre, S. L. Harmer, F. G. Harmon, M. J. Yanovsky & S. A. Kay: *Curr. Biol.*, **15**, 47 (2005).
- 16) S. P. Hazen, T. F. Schultz, J. L. Prunedo-Paz, J. O. Borevitz, J. R. Ecker & S. A. Kay: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 10387 (2005).
- 17) R. M. Green & E. M. Tobin: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4176 (1999).
- 18) Z.-Y. Wang & E. M. Tobin: *Cell*, **93**, 1207 (1998).
- 19) R. Schaffer, N. Ramsay, A. Samach, S. Corden, J. Putterill, I. A. Carre & G. Coupland: *Cell*, **93**, 1219 (1998).
- 20) T. Mizoguchi, K. Wheatley, Y. Hanzawa, L. Wright, M. Mizoguchi, H. R. Song, I. A. Carre & G. Coupland: *Dev. Cell*, **5**, 629 (2002).
- 21) D. Alabadi, M. J. Yanovsky, P. Mas, S. L. Harmer & S. A. Kay: *Curr. Biol.*, **12**, 757 (2002).
- 22) T. Mizuno: *J. Biochem. (Tokyo)*, **123**, 555 (1998).

- 23) T. Kakimoto : *Annu. Rev. Plant Biol.*, **54**, 605 (2003).
- 24) C. Chang & E. M. Meyerowitz : *Res. Microbiol.*, **145**, 481 (1994).
- 25) 鈴木友美, 水野 猛 : 化学と生物, **40**, 139 (2002).
- 26) 木羽隆敏, 水野 猛 : 蛋白質 核酸 酵素, **48**, 2029 (2003).
- 27) A. Matsushika, S. Makino, M. Kojima & T. Mizuno : *Plant Cell Physiol.*, **41**, 1002 (2000).
- 28) M. Murakami, T. Yamashino & T. Mizuno : *Plant Cell Physiol.*, **45**, 645 (2004).
- 29) Y. Yamamoto, E. Sato, T. Shimizu, N. Nakamichi, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, A. Nagatani, T. Yamashino & T. Mizuno : *Plant Cell Physiol.*, **44**, 1119 (2003).
- 30) S. Ito, A. Matsushika, H. Yamada, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, T. Yamashino & T. Mizuno : *Plant Cell Physiol.*, **44**, 1237 (2003).
- 31) K. A. Kaczorowski & P. H. Quail : *Plant Cell*, **11**, 2654 (2003).
- 32) M. E. Eriksson, S. Hanano, M. M. Southern, A. Hall & A. J. Millar : *Planta*, **218**, 159 (2003).
- 33) T. P. Michael, P. A. Salome, H. J. Yu, T. R. Spencer, E. L. Sharp, M. A. McPeck, J. M. Alonso, J. R. Ecker & C. R. McClung : *Science*, **302**, 1049 (2003).
- 34) N. Nakamichi, M. Kita, S. Ito, E. Sato, T. Yamashino & T. Mizuno : *Plant Cell Physiol.*, **46**, 609 (2005).
- 35) P. A. Salome & C. R. McClung : *Plant Cell*, **17**, 791 (2005).
- 36) N. Nakamichi, M. Kita, S. Ito, T. Yamashino & T. Mizuno : *Plant Cell Physiol.*, **46**, 686 (2005).
- 37) M. R. Doyle, S. J. Davis, R. M. Bastow, H. G. McWatters, L. Kozma-Bognar, F. Nagy, A. J. Millar & R. M. Amasino : *Nature*, **419**, 74 (2002).
- 38) T. Mizoguchi, L. Wright, S. Fujiwara, F. Cremer, K. Lee, H. Onouchi, A. Mouradov, S. Fowler, H. Kamada, J. Putterill & G. Coupland : *Plant Cell*, **17**, 2255 (2005).
- 39) M. F. Covington, S. Panda, X. L. Liu, C. A. Strayer, D. R. Wagner & S. A. Kay : *Plant Cell*, **13**, 1305 (2001).
- 40) K. Onai & M. Ishiura : *Genes Cells*, **10**, 963 (2005).
- 41) D. E. Somers, T. F. Schultz, M. Milnamow & S. A. Kay : *Cell*, **101**, 319 (2000).
- 42) P. Mas, W. Y. Kim, D. E. Somers & S. A. Kay : *Nature*, **426**, 567 (2003).
- 43) T. F. Schultz, T. Kiyosue, M. Yanovsky, M. Wada & S. A. Kay : *Plant Cell*, **13**, 2659 (2001).
- 44) D. Staiger, L. Allenbach, N. Salathia, V. Fiechter, S. J. Davis, A. J. Millar, J. Chory & C. Fankhauser : *Genes Dev.*, **17**, 256 (2003).
- 45) A. Hall, R. M. Bastow, S. J. Davis, S. Hanano, H. G. McWatters, V. Hibberd, M. R. Doyle, S. Sung, K. J. Halliday, R. M. Amasino & A. J. Millar : *Plant Cell*, **15**, 2719 (2003).
- 46) S. Sugano, C. Andronis, M. S. Ong, R. M. Green & E. M. Tobin : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12362 (1999).
- 47) S. Sugano, C. Andronis, R. M. Green, Z. Y. Wang & E. M. Tobin : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11020 (1998).
- 48) S. Panda, G. G. Poirier & S. A. Kay : *Dev Cell*, **3**, 51 (2002).
- 49) D. E. Somers, P. F. Devlin & S. A. Kay : *Science*, **282**, 1488 (1998).
- 50) J. C. Locke, A. J. Millar & M. S. Turner : *J. Theor. Biol.*, **234**, 383 (2005).
- 51) R. Toth, E. Kevei, A. Hall, A. J. Millar, F. Nagy & L. Kozma-Bognar : *Plant Physiol.*, **127**, 1607 (2001).
- 52) F. Valverde, A. Mouradov, W. Soppe, D. Ravenscroft, A. Samach & G. Coupland : *Science*, **303**, 1003 (2004).
- 53) A. Samach, H. Onouchi, S. E. Gold, G. S. Ditta, Z. Schwarz-Sommer, M. F. Yanofsky & G. Coupland : *Science*, **288**, 1613 (2000).
- 54) T. Araki : *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**, 63 (2001).
- 55) M. G. Salter, K. A. Franklin & G. C. Whitelam : *Nature*, **426**, 680 (2003).
- 56) T. Yamashino, A. Matsushika, T. Fujimori, S. Sato, T. Kato, S. Tabata & T. Mizuno : *Plant Cell Physiol.*, **44**, 619 (2003).
- 57) O. E. Blasing, Y. Gibon, M. Gunther, M. Hohne, R. Morcuende, D. Osuna, O. Thimm, B. Usadel, W. R. Scheible & M. Stitt : *Plant Cell*, **17**, 3257 (2005).
- 58) M. Murakami, M. Ashikari, K. Miura, T. Yamashino & T. Mizuno : *Plant Cell Physiol.*, **44**, 1229 (2003).
- 59) A. Turner, J. Beales, S. Faure, R. P. Dunford & D. A. Laurie : *Science*, **310**, 1031 (2005).
- 60) A. Ramos, E. Perez-Solis, C. Ibanez, R. Casado, C. Colada, L. Gomez, C. Aragoncillo & I. Allona : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7037 (2005).
- 61) R. Hayama, S. Yokoi, S. Tamaki, M. Yano & K. Shimamoto : *Nature*, **422**, 719 (2003).
- 62) H. Kitano : *Science*, **295**, 1662 (2002).

求人情報

弘前大学農学生命科学部応用生命工学科教員公募

募集人員：助教授 1 名

専門分野：食品科学（食品の化学分析および製造を含む食品科学に精通していて、食品の化学的安全性に関して研究業績があり、今後が期待できる、30 歳代の方が望ましい）

提出書類：履歴書、教育研究業績目録、研究論文あるいは学術著書などの別刷またはコピー（20 編以内）、教育業績書など（一部提出書類には所定の用紙がありますので公募要項でよくご確認の上、下記にご請求下さい）

応募締切：2006 年 6 月 16 日/着任時期：2006 年 10 月 1 日

書類送付先・問合せ先：〒036-8561 弘前市文京町 3 弘前大学農学生命科学部総務グループ（総務担当）

Tel. 0172-39-3747, E-mail : jm3746@cc.hirosaki-u.ac.jp

※詳細は弘前大学ホームページ→採用情報を参照

(<http://www.hirosaki-u.ac.jp/saiyo/index.html>)

求人情報のお申込み

メールアドレス jsbba-kaikoku@jsssp.co.jp あてにテキストファイル（文字数：26 文字×20 行以内）で作成した原稿を添付してお送り下さい。大学、官公庁、独立行政法人の掲載は無料、企業は掲載料 52,500 円（税込）です。締切は毎月 20 日で、掲載は翌々月発行号になります。お問合せは、上記メールアドレスまたは学会出版センター編集部（Tel. 03-3815-0426）まで。