

遺伝学的手法およびmass spectrometry技術を用いたシロイヌナズナ生物時計制御機構に関わる新規因子の同定・解析

Genetic and mass spectrometric approaches to identification of novel Components of the. *Arabidopsis* circadian system

藤原 すみれ

Sumire Fujiwara

派遣期間 2006年2月14日～2008年9月22日
February 14, 2006 – September 22, 2008

研究機関 Department of Plant Cellular and Molecular Biology,
Ohio State University, 038 Rightmire Hall, 1060 Carmack Road,
Columbus, OH43210, USA

研究指導者 Prof. David E Somers

The circadian clock is essential for coordinating the proper phasing of many important cellular processes. One core group of circadian clock components in *Arabidopsis* is comprised of five PRR (Pseudo-Response Regulator) proteins whose biochemical function in the clock remains unclear. We found that PRR1 (TOC1) and PRR5 are the only likely proteolytic substrates of the E3 ubiquitin ligase SCF^{ZTL} within this PRR family. We demonstrate a functional significance for the phosphorylated forms of PRR5, PRR1, and PRR3. Each PRR protein is differentially phosphorylated over the circadian cycle. PRR1 and PRR3 interact *in vivo* and phosphorylation of both is necessary for their optimal binding *in vitro*. PRR1/PRR3 phosphorylation-dependent interaction may protect PRR1 from the F-box protein ZEITLUPE (ZTL)-mediated degradation, resulting in an enhanced amplitude of PRR1 cycling (Fujiwara et al 2008 JBC).

ZTL mRNA is constitutively expressed, but ZTL protein levels show diurnal oscillation. We found that GIGANTEA (GI) is essential to establish and sustain oscillations of ZTL by a direct protein–protein interaction. GI, a large plant-specific protein with a previously undefined molecular role, stabilizes ZTL *in vivo*. ZTL facilitates its own stability through a blue-light-enhanced GI interaction (Kim and Fujiwara et al 2007 Nature).

<研究成果>

概日リズムの適切な制御には、転写レベルでのリズム制御のみならず、タンパク質分解を始めとした転写後修飾が非常に重要な役割を担っている。しかし、タンパク質レベルでの概日リズムの制御機構については、植物ではほとんど解明されていなかった。

留学先である Somers 研究室らの先行研究により、ZEITLUPE(ZTL)が、光による概日リズムの周期の制御において中心的役割を担うことが示唆されていた。ZTLは新規なタイプの F-box タンパク質をコードしている。F-box タンパク質はユビキチンリガーゼ複合体の構成要員としてターゲットタンパク質をプロテアソーム経路を介した分解に導く。また、ZTL の持つ LOV ドメインは、青色光受容領域として機能する可能性が示唆されていた。興味深いことに、ZTLは他の時計関連因子と異なり転写レベルでの概日振動を示さないが、タンパク質レベルでは夕方にピークを示す概日振動を示すことが示されていた。そこで我々は、まずこの ZTL の概日振動を生み出すメカニズムの解明、および ZTL が光入力経路と概日時計本体を結ぶ機構の解明を目指して研究をおこなった。

その結果、GIGANTEA (GI)が ZTL のタンパク質の安定化制御に関わることを発見した。gi 変異体が多様な表現型を示すことから、約 50 年前に単離されて以来、極めて多くの研究が行われてきた。しかし、植物に特異的な機能未知の巨大なタンパク質をコードするため、その生化学的機能は未解明であった。申請者らは、GI が ZTL と直接相互作用し、安定化することを発見した。ZTL と GI は、ZTL N 末端の LOV ドメインを介して *in vivo* で相互作用した。この相互作用は、青色光下（および白色光下）で大幅に強くなり、LOV ドメインに変異を持つ場合は大幅に弱まった。さらに、LOV ドメイン内のアミノ酸 C82（他の青色光受容体の研究により、フラビン結合を介した光化学反応に必須であることが報告されている）に変異を持つ場合、ZTL と GI の相互作用における光依存性が完全に失われた。GI の発現は RNA、タンパク質レベル共に ZTL タンパク質と類似の日周変動を示したことから、GI の発現振動により ZTL のタンパク質の日周変動が供与される可能性が示唆された。この研究によって、概日時計におけるタンパク質の制御が極めて重要であることを改めて示した。また、ZTL が *in vivo* で青色光受容体として機能することを初めて報告した。その上、青色光受容体依存タンパク質間相互作用による自身の安定化制御という、新規の LOV ドメインの機能を発見した。さらに、長年生化学的機能が不明であった GI がタンパク質の安定化因子であることを見出した。これは、植物時計関連タンパク質の制御に安定化機構が積極的に関わることを示す初めての報告となった。この研究成果は Nature に報告し、Cell と Science で取り上げられた。

また、上記の GI, ZTL に加え、シロイヌナズナの PSEUDO RESPONSE REGULATOR (PRR)ファミリータンパク質は、その遺伝子の機能欠損や過剰発現が概日時計に影響を与えることから、概日時計の制御に関わると考えられている。しかし、その生化学的機能が不明であることや、時計関連因子はフィードバックループを形成しておりその遺伝学的解析結果の解釈が難しいことなどから、PRR ファミリータンパク質を始めとした時計関連因子同士の関係はほとんど未解明である。本研究において、我々は、PRR ファミリーメンバー5つのうち、PRR1 と PRR5 のみが F-box タンパク質 ZTL と直接相互作用し、ZTL を含む E3 ユビキチンリガーゼ複合体による分解のターゲットとしてプロテアソーム経路により分解されることを示した。また、PRR ファミリータンパク質がリン酸化修飾を受け、その修飾レベルが概日振動を示すことを見出した。リン酸化レベルの高い TOC1 と PRR5 は、ZTL とより強く相互作用した。また、TOC1 と PRR3 は *in vivo* で相互作用し、この相互作用には両タンパク質のリン酸化が必須であることが示された。ZTL と PRR3 は共に TOC1 の N 末端側と相互作用することから、ZTL と PRR3 が競合的に TOC1 と相互作用する可能性が示唆された。実際に、一過的に PRR3 を過剰発現させた植物体内では TOC1

と ZTL の相互作用が大幅に弱まったことから、PRR3 と相互作用した TOC1 は ZTL と相互作用できず、これにより ZTL による分解を免れて安定化する可能性が示唆された。このように、TOC1、PRR3、PRR5 のリズム的なリン酸化とそれによる時計関連因子同士の相互作用の変化によりタンパク質の安定性が制御され、これが概日時計機構において重要である可能性を見出した。この研究成果は、科学誌 JBC に報告した。

また、上記の成果に加え、時計の制御に関わる新規のタンパク質安定化機構を発見した (論文投稿準備中)。

<参考文献>

- ・ Kim and Fujiwara et al (2007) *Nature* 449: 356-360
- ・ Fujiwara et al (2008) *J Biol Chem* 283: 23073-23083

- ・ Somers et al (2007) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 72: 193-200.
- ・ Fujiwara (2008) *Plant Biotech.* 25: 123-130 (review)
- ・ Somers and Fujiwara (2009) *Trends Plant Sci.* 14: 206-213 (review)
- ・ 藤原すみれ (2009) 植物概日時計の光同調機構. 海老原史樹文・井澤毅(編) 光周性の分子