

研究報告書

「植物の概日振動子の観測と相互作用の検出」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：小山 時隆

1. 研究のねらい

多細胞生物においては、分子・細胞内小器官・細胞・組織・器官・個体など、それぞれの階層で自律的に働くシステムがある一方で、それらのシステムが階層を横断して有機的につながることで、個体(生命体)を実現している。逆に、システム間の相互作用様式を明らかにすることが、生命システムの理解の大きな柱になると考えられる。概日振動システムはほぼ全ての生物種が持つ基本的な生体システムである。どの生物種でも個々の細胞が細胞自律的な概日振動子を持っていると考えられており、振動子間の相互作用が個体等の高次の階層における多様な概日リズム現象に深く関与していると考えられる。概日振動システムの細胞内・近接細胞間・個体内のそれぞれのレベルで見られる相互作用様式とその基盤構造を明らかにすることを将来の大きな目標とし、本研究では高等植物の個々の振動子を細胞単位で解析する手法の確立を第一に、その技術を基にした振動子間相互作用の検出を試みた。具体的には、同一個体内で複数の細胞の概日リズムを個別かつ同時に測定する系を開発し、その系を活用することで、細胞概日振動子の特性・細胞振動子間の同期・外部環境への細胞振動子の応答の解明を目指した。これらの研究成果を元に、現在非常な勢いで明らかになりつつある個別の概日振動現象およびその分子機構について、それらの階層性を明確化し、概日振動システムを有機的に捉える手法の開発へと展開する。

2. 研究成果

研究課題の第一の目標であった、植物の概日リズムを細胞レベルで捉える系の開発に成功した。以下に具体的な成果を述べる。

(1) 生物発光細胞を発光スポット(輝点)として細胞毎に観測する手法の開発

植物材料としてウキクサを用い、その極小・平板な植物体の表面の細胞にランダムに生物発光レポーター系を導入することで、遺伝子導入細胞を互いに干渉しない発光スポットとして検出することに成功した(図1、図2)。超高感度EM-CCDカメラにマクロレンズを取り付けた微弱発光検出装置の下に、光ファイバで導かれた植物育成用光照射装置をおいたセットを暗箱中に構築した。ウキクサへの遺伝子導入はレポーターコンストラクトを付着させた金粒子をパーティクルボンバードメント法により行い、個体表面の細胞へ導入した。発光基質であるルシフェリンを植物培地に導入することで、明確な発光スポットを検出した。さらに、一つのスポットが一つの細胞に対応していることを顕微鏡下での観測で明らかにした。また、発光量の定量性の良さを活かして、ボンバードメント法による導入遺伝子の発現量の分布も明らかにすることができた。これらの解析をとおして、遺伝子導入法と測定条件の最適化を行った。

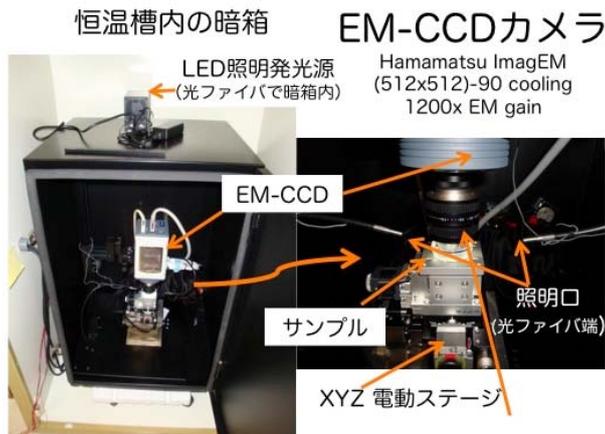


図1, 細胞生物発光イメージング装置

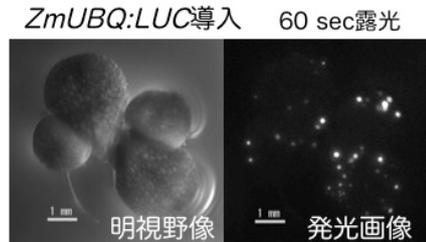


図2, 細胞生物発光イメージ

(2) 発光スポットの時系列データ取得法の確立

ウキクサは一般的な植物と異なり、垂直方向の運動や成長を行わない。この特性を活かして、撮影レンズのフォーカス位置を変えることなく、同一個体を長期間測定することを可能にした。また植物の水平方向の移動は個体をピンで固定することにより抑制したが、完全に動きを封じ込めることは困難であった。そのため、時系列データとして取得した連続的なイメージ(群)の位置補正および発光スポットの発光量定量を ImageJ ソフトを用いて効率的に行う自動化スキームを構築した。

(3) 細胞概日振動子の観測

生物発光レポーターとして朝に発現する時計遺伝子 *CCA1/LHY* のプロモーター下で発現するホタルルシフェラーゼを用いた。発光スポットの光量が極大になる時点を朝と見なせる発光概日リズムを観測することができる。個体レベルでは、連続明条件・連続暗条件ともに概日リズムが減衰する傾向を示す(図3)。この発光レポーターをパーティクルボンバードメント法で遺伝子導入し、細胞毎の概日リズムを測定した。その結果、連続明条件では個々の細胞概日リズムは持続するが、周期が安定せず、全体として脱同期状態に陥ることが分かった。また、連続暗条件では細胞概日リズムが減衰することが分かった。このように、個体レベルの概日リズムは必ずしも細胞レベルの概日振動子の性質を表現しないことを明らかにした。

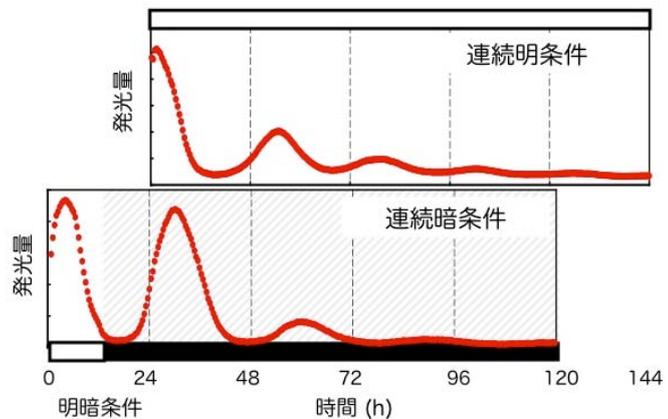


図3, ウキクサ個体の概日発光リズム (CCA1プロモーター::ルシフェラーゼ)

(4) 細胞概日振動子の外部環境変動による同期特性

概日時計は外部の昼夜環境変動に同期することで、時刻をリセットしている。細胞外日振動子の光パルスに対する応答を調べた結果、個体の概日時計時刻を完全にリセットできる程度の強い光刺激(パルス)を与えると、細胞概日振動子はリセットされた。ただし、光刺激を与えられた位相が同じでも、リセット後の振動子毎の位相変動量は大きな幅を持っていることが分かった。細胞概日振動子の性質は周期だけでなく光に対する位相応答性も細胞毎のバラツキが顕著であることを示した。

上記した成果は、植物全体の概日時計システムの基盤となる細胞概日振動子の基本的な性質を実証した点で大きな意義があった。

3, 今後の展開

細胞振動子の観測が可能になり、個体レベルの概日リズムを細胞振動子レベルの挙動の集合体として再検討することが可能となった。今後は、個体内の細胞振動子が脱同期状態にある時や、組織・領域など局所的な同期・脱同期状態にある時などの植物個体の挙動を捉えることで、個体レベルの概日リズム(特性)のもつ生理学的役割に関して新たな発見につなげていきたい。また、同期や脱同期状態が観測可能になったことから、今後はそれらの状態を引き起こすメカニズムについて、遺伝子・分子・細胞構造レベルからアプローチしたい。

4, 自己評価

細胞振動子の観測という第一の目標は達成できた。研究期間中に測定系の開発と基礎的データを取り終えることができた点は評価できる一方で、個体内での細胞振動子間の同期・脱同期状態の定量的な分析やそれらを引き起こすメカニズムの問題が今後の課題として残った。

5, 研究総括の見解

このさきがけ期間中に、ウキクサの極小・平板な植物体の表面の細胞にランダムに生物発光レポーター系を導入することで、遺伝子導入細胞を互いに干渉しない単一細胞レベルの測定に成功したことは、細胞概日研究を加速させている。すでに、新しい現象を次々に見出しており、今後の成果、進展が楽しみである。

6, 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

投稿準備中

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

T. Oyama, Genetic Manipulation of Lemna in the study of circadian rhythm Meeting at Cold Spring Harbor, NY, USA "Aquatic Plants" Oct 18-21 2009

T. Oyama Gene introduction methods for the analysis of biological rhythms in duckweeds The 1st International Conference of Duckweed Research & Applications 2011 年 10 月 8 日～10 日 中国成都市

ウキクサの例にみる植物の光周性反応 伊藤(三輪)久美子、小山時隆 『光周性の分子生物学』 海老原史樹文、井澤毅編集 (シュプリンガー・ジャパン)1-14 2009 年

Photoperiodic control of flowering: *Lemna* plants. In "Photoperiodism: The biological calendar". Edited by Nelson RJ, Denlinger DL, Somers DE. Oxford University Press, New York, pp74-87 (2010) Ito-Miwa K, Oyama T

受賞

小山 時隆 平成 20 年度文部科学大臣表彰、若手科学者賞 「光合成生物の概日時計分子機構の研究」