

研究報告書

「構成的アプローチによる植物の生物時計の組織特異的な役割の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 26 年 12 月

研究者: 遠藤 求

1. 研究のねらい

20 世紀後半、生体の生理現象は分子レベルにまで解体され、後には膨大な分子生物学的な知見が蓄積された。これからの生物学は、得られた知見を統合・再生していくことが重要となる。細胞/分子レベルで明らかになりつつある知見をもとに上位の器官/組織レベルで生体を理解するためには、それぞれの組織の機能特異性(不均一性)を明らかにしたうえでモデルを構築する必要がある。

これまで植物の概日時計は細胞自律的であると漠然と考えられてきており、組織特異的な生物時計の機能についてはほとんど考えてこられなかった。しかし、

① 花成などの実現には、個々の細胞が持つ概日リズムを個体レベルで統合する必要があること、

② ヒト・マウス・ハエなどでは、脳にある強大な生物時計の中核(主要時計)と末梢臓器にある弱い時計(末梢時計)という形で生物時計機能の組織特異性が知られていること、

③ 少なくとも植物の地上部と根では概日時計の挙動が異なっていること、

④ ある分子の発現パターンとその分子の機能が必要な器官/組織は必ずしも一致せず、こうした例は決して珍しいものではないこと、

などから、植物においても生物時計機能に器官/組織特異性が存在することが強く予想される。

動物の主要時計は、外科的な手術により中枢を切除・移植するといった実験によって発見された。しかし、植物は脳に対応する明確な中枢を持たず、特定の組織を外科的な方法で取り除くことが困難である。また、周囲の影響から切り離された培養細胞系などでは、組織/細胞間の相互作用は失われ、生命現象を生体内のコンテキストで解析することは困難である。しかし、生体内の特定の組織における分子動態を高い時空間分解能で測定することは難しく、平均化された細胞群や生体から切り離された培養細胞系を用いての解析が主流となっている。本研究では、高い時空間分解能で植物の組織/細胞内での分子動態を定量する方法を開発することで、植物における概日時計の組織特異的な役割を明らかにすることを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、植物組織の遺伝子発現をモニタリングする新規解析手法を開発し、時計遺伝子の発現を組織レベルで定量的に測定することに成功しました。

動物では、脳に存在する体内時計とその他の臓器に存在する体内時計の機能が異なることが知られていました。植物でも、動物のような体内時計の機能分担が組織レベルで存在

する可能性は指摘されていましたが、組織単離に時間がかかるため、時々刻々と発現量が変化する体内時計に関わる時計遺伝子の発現を、定量的・経時的に測定することは困難でした。

本研究では、各組織での時計遺伝子の発現を迅速に測定するために、組織単離時間を従来法の1/3以下に短縮しました。また、時計遺伝子の発現を非侵襲で測定できる「TSLA法」を世界で初めて開発し、維管束に存在する時計遺伝子の性質が他の組織と大きく異なり、隣接する葉肉組織の時計遺伝子の発現に影響を与えていることを明らかにしました。さらに、維管束の時計機能を阻害するだけで、植物の花の咲くタイミングを遅らせることに成功しました。

(2) 詳細

研究テーマ A「大規模な遺伝子発現解析による組織特異的な発現制御メカニズムの解明」

本研究では、まず、これまで組織レベルでの体内時計の解析を難しいものにしてきた組織単離法の改良に取り組みました。これまでは目的組織でだけGFPを発現させた植物からプロトプラストを作成し、それをフローサイトメーターで単離していたため、組織の単離に約1時間30分～4時間30分ほどかかっていました。そのため、操作中に時計遺伝子の発現量が変化してしまい、体内時計を定量的に測定することは困難でした。今回、超音波処理と酵素処理を組み合わせることで、シロイヌナズナからの組織単離にかかる時間を30分以内に短縮することに成功しました。これにより、単離操作中の遺伝子発現量の変化をほとんど気にする必要がなくなり、初めて定量的に各組織の体内時計を解析することが可能になりました。

この方法を用いて、シロイヌナズナの葉全体、葉肉組織と維管束組織の、時計遺伝子の発現を定量的に測定したところ、発現量や発現リズム、標的遺伝子などが、葉全体と葉肉の発現様式はよく似ているのに対し、維管束はそのどちらとも大きく異なっていることがわかりました。こうしたことから、植物でも動物と同様に体内時計システムは組織ごとに異なっていることが考えられました。

さらに、こうした維管束の体内時計はフロリゲンと呼ばれる花成ホルモンの産生を通じて、個体全体の生理応答を制御していることも示され、植物の体内時計において維管束が非常に重要であることが示されました。

研究テーマ B「さまざまな組織で生物時計機能を阻害した形質転換植物の解析」

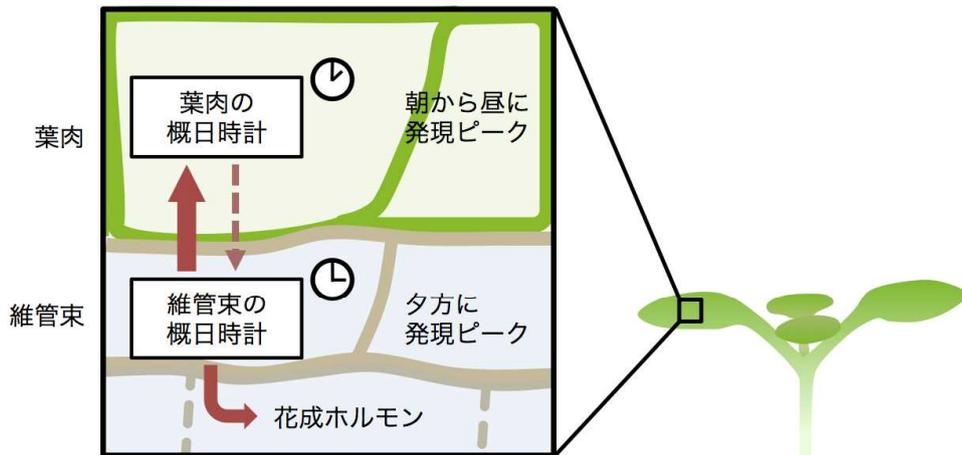
さらに、維管束で時計の働きを阻害すると葉肉の体内時計の働きも阻害される一方で、葉肉の時計の働きを阻害しても維管束の時計の働きには影響がないこともわかりました。こうした時計制御の非対称性は動物でも見られており、植物の体内時計システムは動物と同様に階層構造を持っていることも明らかになりました。

研究テーマ C「Tissue-specific luciferase assay (TSLA) 法の開発」

このことを別のアプローチから確認するために、組織レベルでの遺伝子発現を非侵襲で測定するための新しい方法としてTissue-specific luciferase assay (TSLA) 法を世界で初めて開発しました。従来法では、全ての組織で発光リズムが見られるため、特定の組織における発光量を定量することは困難でしたが、この方法では、ルシフェラーゼという酵素の遺伝子を2

つに分け、組織特異的プロモーターおよび時計プロモーターによって発現させ、2つの発現が重なる時間・空間のみでルシフェラーゼを再構成させることで、特定の組織における時計遺伝子の発現を発光リズムとしてとらえることができます。TSLA法を用いた解析から、同じ時計遺伝子でも維管束と葉全体では異なる遺伝子発現リズムが見られることから、葉肉と維管束の時計システムが異なっていることが支持されました。

研究成果のまとめ



今回、維管束の概日時計は葉肉の概日時計を強く制御している一方で、葉肉の概日時計は維管束の概日時計をそれほど強くは制御できないことが示された。これは植物の概日時計の機能に組織を単位とする階層性があることを示唆している。さらに、維管束の概日時計は花成ホルモンの産生を通じて個体レベルの生理応答も制御していることも明らかになった。

3. 今後の展開

概日時計は多くの遺伝子発現の制御に関わっていますので、花成や細胞伸長など体内時計によって制御されている生理応答の解析も、組織レベルで行っていく必要があることがわかりました。本研究で開発した手法を用いることで、こうした組織レベルでの解析が大きく進むことが期待されます。

また、維管束の時計機能を阻害するだけで植物の花の咲くタイミングを遅らせることができたことから、体内時計は植物の生長調節法開発の新たなターゲットになる可能性が期待されます。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究成果という点では自分の予想以上の成果を残せたと思っている。将来の研究シーズンも多く得ることができ、こうした点については満足している。しかし、植物や概日時計関連の研究

者が少なかったこと、研究手法に関しても共通点が少なかったことから、領域内での共同研究の推進という点では課題が残った。ただ、この点に関しても、将来的には利用したい技術の存在をすることができ、人的ネットワークも生まれていることから、今後の資産になっていくと考えている。

社会・経済への波及効果に関しては未知数だが、植物研究において新たな物の見方を提案できたと考えており、今後、細胞／組織レベルでの解析が活発化していくと感じており、これまで見過ごされていた新たな発見が私の研究分野以外についても見つかると考えている。

(2) 研究総括評価

これまで植物の概日時計は細胞自律的であると漠然と考えられてきており、組織特異的な生物時計の機能については、知られていませんでした。今回の研究で、植物組織の遺伝子発現をモニタリングする新規解析手法を開発し、時計遺伝子の発現を組織レベルで定量的に測定することに成功されて、実りある成果を次々に挙げられたことを、高く評価します。

維管束の体内時計は、フロリゲンと呼ばれる花成ホルモンの産生を通じて、個体全体の生理応答を制御していることを示され、植物の体内時計において維管束が非常に重要であることを、提唱されました。また、維管束の体内時計機能を阻害すると遅咲き表現型を示すことを実証され、今後の育種の応用分野への展開も期待したいと思います。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Endo M, Shimizu H, Nohales AM, Araki T, Kay SA. Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature*. (2014), 515, 419-422.

(2) 特許出願

特になし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

第 20 回 日本時間生物学会、ベストポスター賞受賞

第 38 回 内藤コンファレンス、ベストポスター賞受賞

プレスリリースなど

[紹介記事] Leaf veins share the time of day

Martí, M. C. & Webb, A. A. 2014 *Nature News & Views* 515 巻, 7527 号, 352-353

「シロイヌナズナは組織特異的な時計を持つ」
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/9444>

「植物で組織ごとに違う体内時計を発見」
http://scienceportal.jst.go.jp/news/newsflash_review/newsflash/2014/10/20141030_02.html

