

# 研究報告書

## 「1 細胞解析から明らかにする植物細胞の運命決定に関わる概日時計の役割」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 12 月～平成 30 年 3 月

研究者: 遠藤 求

### 1. 研究のねらい

概日時計は地球の自転による約 24 時間の明暗周期や季節変化に対応するためのメカニズムであり、多くの遺伝子の発現制御に関わっている。こうした概日時計は、ほぼ全ての細胞に見られることが知られている。植物細胞には分化全能性が見られることや、動物細胞ほどは明確な機能分化が見られないことから、これまで植物における概日時計の機能は細胞自律的であると漠然と考えられてきた。そのため、概日時計研究を始め多くの研究分野では個体・器官レベルでの解析が主流であり、組織・細胞レベルの解析はほとんど行われてこなかった。最近、申請者らは植物にも動物と同様に概日時計の組織特異的な機能分担が見られることを発見した。こうしたことから、植物の概日時計をより詳細に 1 細胞レベルで解析することで、これまで平均化により隠されていた新たな概日時計の役割を明らかにできるのではないかと考えた。しかし、植物細胞の持つ分化全能性や細胞壁といった特徴は、細胞単離の複雑化・単離操作による発現プロファイルの変化といった問題を引き起こすため、動物細胞で主流となっている細胞単離を伴う 1 細胞解析系をそのまま適用することは困難であった。こうした理由から、植物における 1 細胞解析の報告例は少なく、時系列解析を伴う報告はこれまで全く無かった。

本研究では、分化全能性をベースとした分化誘導系・大きい細胞サイズ・細胞の膨圧など植物細胞が持つ特徴を最大限に利用することで、従来とは全く異なるアプローチによって植物での 1 細胞解析系の確立を目指す。具体的には、脱分化により解析対象である維管束幹細胞の数および大きさを増やし、マイクロマニピュレータを用いて細胞質を取得することで、1 細胞レベルでのトランスクリプトーム解析を 30 分程度の高い時間分解能で行う。さらに、特定の細胞における遺伝子発現の可視化などの補完的な方法と組み合わせることで、統合的な 1 細胞解析系を確立する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

分化誘導系を用いることで、細胞運命決定と概日時計の関わりについて明らかにした。これまで植物では適切な解析手法が存在せず、概日時計が細胞運命決定に関わっているかどうかは不明であった。本研究では植物の葉から維管束幹細胞を経て維管束細胞へと分化誘導する系と 1 細胞トランスクリプトーム系を併せて用いることで、植物の幹細胞において概日リズム形成が細胞運命決定に先立って起こっていることを初めて明らかにした。

#### (2) 詳細

本研究では、細胞運命決定における概日時計の役割を明らかにするために、二種類のアプローチを採用した。

## 1. バルク解析による概日時計と細胞運命決定の関係

分化誘導系を利用することで植物の葉から維管束細胞への分化誘導を行い、その過程における概日時計の役割を解析した。時計変異体では、野生型と異なり、異所的な道管細胞の分化見られなかったことから、概日時計が細胞運命決定に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。次に、時計変異体においてこうした葉肉細胞から維管束細胞への脱分化および分化のどのステップが阻害されているかを明らかにするため、それぞれのマーカー遺伝子の発現を解析した。その結果、維管束幹細胞マーカーの発現レベルが時計変異体では野生型の60%程度に減少していることが明らかとなり、葉肉→維管束幹細胞に概日時計による制御が入っていることが明らかとなった。このことを、より詳しく調べるために、様々な遺伝子発現を調べたところカルスマーカーとしても知られているLBD16の発現が、維管束幹細胞の発現に先立って一過的に上昇していること、また、時計遺伝子の変異体においてはLBD16no発現が高いレベルで維持されていることを明らかにした。こうしたことから、葉肉細胞は一旦、カルス様細胞へと脱分化し、そこから維管束幹細胞へと分化転換している可能性が明らかとなり、時計変異体においてはこのカルス様細胞から維管束幹細胞への転換に異常があるためにカルスマーカーであるLBD16の発現が高いレベルで維持されていることを明らかとした。

さらに、LBD16の発現と同じタイミングもしくは少し早いタイミングにおいて転写因子BES1の発現が一過的に上昇していることを明らかにした。こうしたことから、BES1と概日時計が同一シグナル伝達経路で働いている可能性が考えられた。この可能性を検証するために、分化誘導後の概日リズムを野生型とbes1変異体で比較した所、bes1変異体では分化誘導後の時計遺伝子LHYの概日リズム形成が全く見られないことが明らかとなった。このことは、BES1からLHYへのシグナル伝達がカルス様細胞(未分化細胞)における概日リズム形成に重要であることを示している。このことは、LHYプロモーター上に存在する推定BES1結合配列をスクランブル化すると概日リズム形成が再び見られるようになったことから、LHYからBES1へのシグナル伝達経路の重要性がさらに支持された。こうした結果から、概日リズム形成の初期過程にはBES1からのシグナル伝達が重要であることが示唆された。では、概日時計は何を標的とすることで細胞運命決定を制御しているのだろうか？そのことを明らかにするために、非分化誘導系における時計変異の影響を解析した。時計変異体では維管束の形成パターンが異常になっているだけでなく、気孔の数や根におけるEdUの取り込みも以上になっていることが明らかとなった。さらに、葉やカルスにおける細胞サイズの増大も見られたことから、概日時計は幹細胞の細胞分裂のタイミングを制御することで細胞運命決定を制御している可能性が示唆された。このことを明らかにするために、再び分化誘導系で細胞分裂に関わる遺伝子の発現を調べたところ、時計変異体ではその発現が低下もしくは著しく遅延していることが明らかになった。以上の結果から、BES1シグナル伝達経路を介して形成された概日リズムは幹細胞における細胞分裂周期制御を介して細胞運命決定に関わっている可能性が明らかとなった。しかし、今回用いた分化誘導系では細胞の分化転換のタイミングは必ずしも同調しておらず、また、道管と篩管の両方が分化誘導されることから、解析の時空間分解能は低く、概日リズム形成が細胞運命決定を行っているのか、細胞運命決定の結果として概日リズムが形成されたのかという問題の解決には至っていない。

## 2. 1細胞解析による概日時計と細胞運命決定の関係

このことを明らかにするために、私は1細胞解析により解析の制度を究極的に向上させることを考えた。植物では、これまでに1細胞解析はわずか3例しか報告されておらず、それらは全てプロトプラスト化を介したものであった。プロトプラスト化によって遺伝子発現プロファイルは大きく変化することが既に知られていることから、これらの方法は必ずしも適切ではない。そこで、本研究ではガラスキャピラリーを用いて細胞内容物を直接回収する方法を採用した。この方法によって、生体内のコンテキストで遺伝子発現を解析することが可能になる。1細胞あたり約10秒程度で逆転写反応に持ち込めるため、RNAの分解はほとんど考慮しないで済む。

次に、得られた1細胞トランスクリプトーム解析から特定の細胞系列をえることを考えた。Wishboneと呼ばれるアルゴリズムが2016年に公開されており、ここではこれを利用することで道管になる細胞系列(木部系列)と篩管になる細胞系列(篩部系列)の分離を試みた。Wishboneは遺伝子発現プロファイルの類似度から細胞を二次元上に配置することで、二股の細胞系譜を予測するものである。実際、各細胞特異的のマーカの発現からは木部系列と篩部系列を綺麗に分離することが可能であったことから、今回の解析では篩部系列の細胞を捨て、木部系列のみを解析対象とした。さらに、こうした得られた細胞系列は時間分解能が非常に悪く、複数のマーカ遺伝子の発現が入り乱れている状態であった。そこで、Seuratと呼ばれるアルゴリズムを利用して遺伝子発現の順を学習させることで、最適な細胞の位置を推定することによって時間分解能の向上を試みた。その結果、各マーカの発現を比較的綺麗に分離することができ、これらの操作によって時空間分解能を向上させることが可能となった。さらに、時間分解能を向上させるために、実際の時間間隔が既知であるバルクデータとの対応付を行い、これによってスナップショットとしてしか得られない1細胞トランスクリプトームデータから実時刻を再構成することに初めて成功した。

こうして得られた実時刻のデータを見てみると、細胞分裂周期に関わるOBP1やE2Faよりも早いタイミングで概日時計遺伝子の発現の再構成が起きていることが明らかとなった。具体的にはこれまで発現していないELF4の発現が見られ、これまで発現しているLHYやPRR5といった発現が失われていた。こうした概日時計を構成する時計遺伝子発現の大胆な再構成が幹細胞で起こることによって、その後の細胞運命決定関連の遺伝子発現が動き出すことが初めて明らかとなり、概日リズム形成が細胞運命決定に先立つことの証拠を1細胞解析を通じて得ることに初めて成功した。

## 3. 今後の展開

本研究から、植物の細胞運命決定にこれまであまり着目されてこなかった概日時計が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、こうした概日時計による細胞運命決定の仕組みは動物でも本質的に類似していることが示されつつ有ることから、遺伝子配列の類似性を超えた機能の類似性といったものが、生命のシグナル伝達機構を形作る重要な要素である可能性が示唆される。今後は、私たちの主張をより強くするためにいくつかの追加実験を行うことと併せて、動物のシグナル伝達経路との比較を通じて、何が本質であるのかを明らかにすることに取り組んでいきたい。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本研究は1細胞トランスクリプトームを行うことに時間を取られすぎてしまい、系の評価やその後の展開にまで十分な時間を割けなかったことが最大の反省点である。これらの点については、現在、最速で進めており、さきがけ期間中には間に合わなかったものの近い将来まとまった形で示すことができると考えている。

一方で、本研究のもう一つの目的である、細胞運命決定と概日時計の関係については1細胞解析を用いることで初めて明らかになった部分があり、大きな進展があったと考えられる。こうした、遺伝子発現の微妙な前後関係は従来のバルク解析でも1細胞解析でも出来なかった分野であり、こうした手法の有効性が認められれば時間生物学だけでなく、1細胞トランスクリプトーム解析における一般的な解析手法として普及すると期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバック、1期生成果評価会での総括・AD間の議論を踏まえ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

植物の葉から維管束幹細胞を経て維管束細胞への分化を誘導する系において、1細胞トランスクリプトーム解析を行う新規手法を開発するとともに、Wishbone と Seurat の適用によって木部系譜の時間変化を再構成することに初めて成功し、幹細胞における概日リズム形成が細胞運命決定に先立って行っていることを明瞭に実証することに成功しました。これによって、概日時計の分化運命決定への関与を明らかにしました。植物幹細胞分化という現象を理解する上で興味深い基盤情報が得られたといえます。植物学研究に最新の分子生物学ツールを積極的に導入した研究のデザイン、成果をとりまとめとともに巧みで、しっかりした publication につなげているところも評価できます。

今後は、植物細胞と分化の全能性の違いの本質を明らかにするような研究を展開してゆくことを期待します。今後の課題として掲げる擬時間ベースから実時間ベースの解析への進展は尖っていて面白い目標であると思います。

平成 27 年度の日本植物学会 奨励賞、平成 27 年度には文部科学大臣賞若手科学者賞、ドイツ・イノベーション・アワード「ゴットフリート・ワグネル賞、日本時間生物学会 奨励賞、日本植物生理学会 奨励賞など多数の表彰を受け、高く評価されています。今後、植物、時間生物学の分野をリードする研究者としての益々の活躍を期待します。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Uemoto R, Araki T, Endo M<sup>†</sup>. (2017) Isolation of Arabidopsis palisade and spongy mesophyll cells. Methods Mol Biol. Accepted.

\*2. Endo M<sup>†</sup>, Shimizu H, Araki T. (2016) Rapid and simple leaf tissue isolation in *Arabidopsis thaliana*. Nature Protocols. 11, 1388–1395.

3. Shimizu H, Torii K, Araki T, Endo M<sup>†</sup>. (2016) Importance of epidermal clocks for regulation of hypocotyl elongation through *PIF4* and *IAA29*. Plant Signaling & Behavior 11, e1143999.

4. Higo A, Niwa M, Yamato KT, Yamada L, Sawada H, Sakamoto T, Kurata T, Shirakawa M, Endo M, Shigenobu S, Yamaguchi K, Ishizaki K, Nishihama R, Kohchi T, Araki T<sup>†</sup>. (2016) Transcriptional framework of male gametogenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. Plant and Cell Physiology 57, 325–338.

5. Kawamoto N, Endo M, Araki T<sup>†</sup>. (2015) Expression of a kinase-dead form of CPK33 involved in florigen complex formation causes delayed flowering. Plant Signaling & Behavior 10, e1086856.

## (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

## (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)

- (1) 第58回日本植物生理学会奨励賞 “植物の概日時計システムのネットワーク構造”  
平成29年3月
- (2) 第11回わかしゃち奨励賞優秀賞 “温暖化などの気候変動に強い植物を非遺伝子組換えで作る”  
平成29年2月
- (3) 第23回日本時間生物学会 奨励賞 “植物における概日時計の組織特異的な役割”  
平成28年11月
- (4) ドイツ・イノベーション・アワード、ゴットフリート・ワグネル賞(Life Sciences & Healthcare部門) “Tissue-specific environmental responses in plants”  
平成28年7月
- (5) 文部科学大臣表彰若手科学者賞 “環境刺激に対する植物の組織特異的な応答機構の研究”  
平成28年4月
- (6) 第3回 京都大学 学際研究着想コンテスト優秀賞 “時間の流れと幸福感 – 生命にとって時間って何だろう? 日本とラオスの比較研究から –”  
平成27年10月
- (7) 第79回 日本植物学会奨励賞 “植物における環境応答の組織特異性”  
平成27年9月