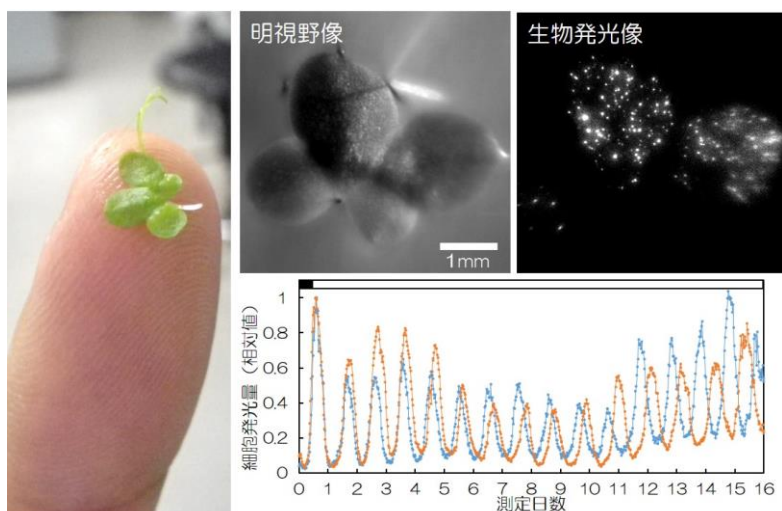


# 1つの体に無数の時計。アバウトでも整然と。

## –ウキクサ植物を用いて植物の概日時計の挙動を細胞レベルで解明–

### 概要

- ・植物個体内の細胞が生み出す概日リズムを個別かつ長期間測定することに世界で初めて成功。
- ・細胞単位の概日時計は時間精度も均質性も低いアバウトな性質を持つことを定量的に実証。
- ・昼夜のある条件ではアバウトな性質が一掃され、細胞時計は個体内で整然と時を刻むことを発見。



生物は時間を測る体内時計（概日時計）という約24時間周期のリズム（概日リズム）発振機構を備えており、地球の自転に伴う昼夜サイクルに適応しています。概日時計を構成する遺伝子は個々の細胞で機能するため、個々の細胞が時計として働きます。しかしながら、植物内における細胞の遺伝子発現を個別に測定することは非常に困難であり、細胞レベルでの概日時計の性質はよく分かっていませんでした。

本研究ではウキクサ植物を材料として、個々の細胞における遺伝子発現リズムを可視化する技術を開発し、細胞レベルから概日時計の挙動を解明することに成功しました。その結果、連続明のような昼夜のない条件では、個々の細胞のリズム周期は不安定であり、細胞間でリズムは徐々にずれていくことが明らかとなりました。一方、昼夜のある環境下では植物細胞の概日時計は秩序正しく時刻の空間パターンを形成することを発見しました。この空間パターンは、昼夜のない条件でみられたアバウトな時計の性質を一掃することで形成されると推察されます。このことから、植物の概日時計は昼夜のある環境下で初めてその実力を発揮すると考えられました。

昼夜の有無によって植物の時計の状態が大きく異なることを明らかとなりましたが、今後、このような劇的な変化を可能とする仕組みを解明することを目指します。

### 1. 背景

我々ヒトが体内に約24時間周期の生物時計（概日時計）を有していることは近年広く知られるようになってきましたが、植物も同じく概日時計を持っています。概日時計は生物の内部に約24時間周期のリズム（概日リズム）を生成する機構であり、この概日リズムを地球の自転に伴う昼夜サイクルへと同調させることで適応的な行動を可能とします。概日時計は、植物において、光合成・成長・花成・代謝・病害防御など様々な生理現象を制御しており、その重要性が注目されています。

概日時計の基盤となる概日リズムは、複数の時計遺伝子（概日時計に必要な遺伝子）が転写・翻訳フィードバックを形成し、協調的に働くことで生成されます。これらの時計遺伝子は各細胞で働くため、個々の細胞は独立に概日リズムを生成する『細胞時計』として機能します。これまで、植物の個体や組織の概日リズムをもとに研究されてきましたが、植物個体内における細胞時計の挙動に関する知見は乏しく、細胞レベルでの概日リズムの安定性や細胞間でのバラつき・相互作用様式など基本的な性質すらわかっていませんでした。これは、植物内における個々の細胞の遺伝子発現を個別に測定することが非常に困難であったためです。

そこで本研究では、ウキクサ植物というユニークな材料・パーティクルボンバードメント法による特殊な遺伝子導入・超高感度カメラでの生物発光イメージングを組み合わせることで個々の細胞における遺伝子発現リズムを可視化することに成功し、細胞レベルから植物の概日時計の挙動を解明しました。

## 2. 研究手法・成果

これまでの概日時計の研究では、ホタルルシフェラーゼを利用した生物発光レポーターによる概日リズム測定が行われてきました。生物発光レポーターを全細胞に導入すると、すべての細胞が発光するため、個々の細胞の発光シグナルは分離できません。そこでパーティクルボンバードメント法によるまばらな遺伝子導入を利用し、1細胞由来の発光シグナルを分離できる手法を開発しました（図1）。

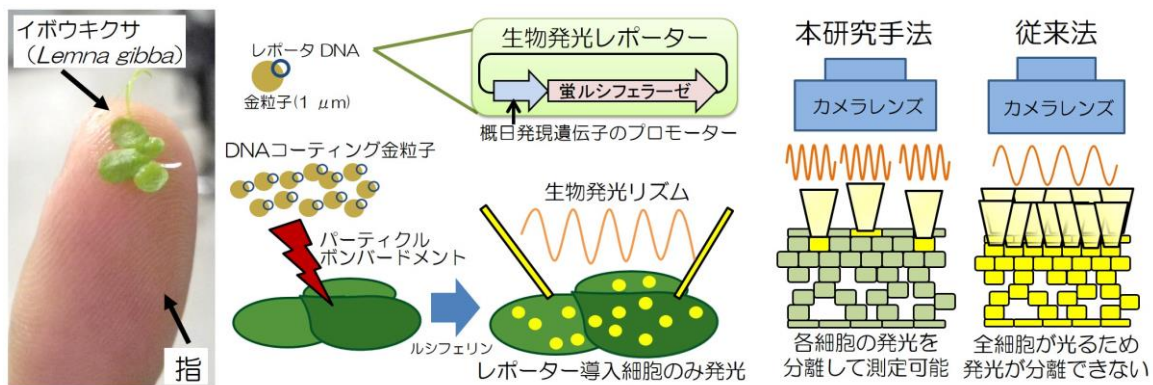


図1. パーティクルボンバードメント法によるウキクサ植物への生物発光レポーターの導入

生物発光レポーターDNA を金粒子にコーティングしてウキクサ植物へヘリウムガス銃で打ち込む。レポーターDNA がうまく導入された細胞のみが発光する。発光遺伝子は時計遺伝子のプロモーター下流に結合しており、細胞内の時間情報に従って決まった時間に発現し、細胞を発光させる。そのため、生物発光量を経時測定することで、細胞内の時間情報を可視化することができる。

さらに、発光レポーターを導入したウキクサ植物を超高感度カメラで長期間撮影することで、個々の細胞の概日リズムの測定に成功しました（図2）。ウキクサ植物は小型で扁平な形態をしており、水面に浮いて生育することから上下運動をしないため、高解像度での長期間測定に最適な材料です。連続明条件での測定の結果、同一個体内においても細胞のリズムは徐々にずれてしまい、細胞間で時間情報が共有されないことが明らかとなりました（図2右）。

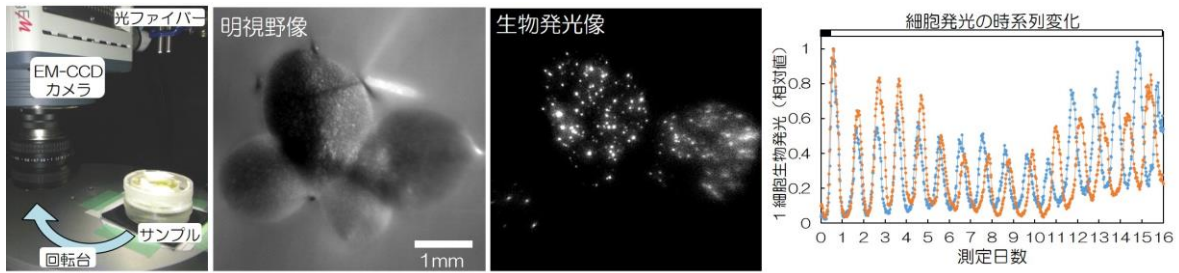


図2. 1細胞概日リズムの測定

超高感度カメラによる生物発光測定。生物発光像の白いスポットが1細胞由来の発光。右に、同一個体中の2細胞の生物発光を16日にわたって記録した結果を示した。

この細胞間でのリズムの『ずれ』は、細胞のリズムの周期が日差(最大)±5時間程度とかなりアバウトなため生じていました。数理モデルを用いた解析を行い、このアバウトさが細胞間で概日リズムの周期が異なること、細胞時計自体の精度が低いことの両方に起因することを示しました。興味深いことに、哺乳類の末梢細胞もほぼ同様にアバウトな時計を持っていることが報告されている一方で、シアノバクテリアは非常に精度の高い時計を持っていることが知られています。植物と哺乳類は真核生物であり、転写・翻訳フィードバックを基盤とする概日時計を採用していますが、原核生物であるシアノバクテリアはATPで駆動される時計タンパクを基盤とした概日時計を採用しています。植物と哺乳類では細胞の構造が大きく異なるうえ、時計遺伝子の種類も異なります。それにもかかわらず時計のアバウトさが似ていることを発見した本研究は、転写・翻訳フィードバックを基盤とする真核生物の概日時計の基本的性質を解き明かす糸口になると期待しています。

このようにアバウトな細胞時計ですが、昼夜サイクルの下では精度よく働くことを本研究で明らかにしました。連続明条件で生育し、細胞間で概日リズムがずれている植物に明暗サイクルを与えたところ、個々の細胞の概日リズムはわずか2日で明暗サイクルへと同調しました(図3)。

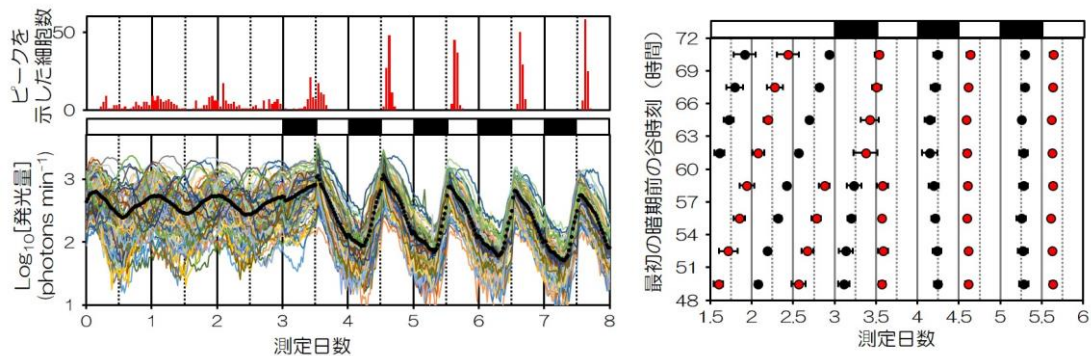


図3. 細胞概日リズムの明暗サイクルへの同調

左には細胞発光リズムが明暗条件に同調していく様子を示した。右には明暗処理前の時刻(位相)でグループ分けした細胞リズムのピーク(赤)と谷(黒)の平均時刻のプロット。

また同調過程において、個々の細胞は概日リズムが示す時刻に応じて異なる挙動を見せたため、明暗サイクルへの同調は細胞自律的な機能だと考えられました。さらに、昼夜のある環境下では植物細胞の概日時計は秩序正しく時刻の空間パターンを形成することを発見しました。ウキクサ個体の中心部と辺縁部にかけて連続的に2時間ほどの時差を生じる空間パターンは、明暗条件への同調前に見られた概日

リズム周期の無秩序なバラつきとは関係なく形成されたため、昼夜環境下では細胞時計のアバウトさは一掃され、個体内で精度のよい細胞時計が生成された推察されました（図4）。つまり、植物の概日時計は昼夜のある環境下で初めてその実力を発揮し、精度のよい時間測定が可能になると考えられます。

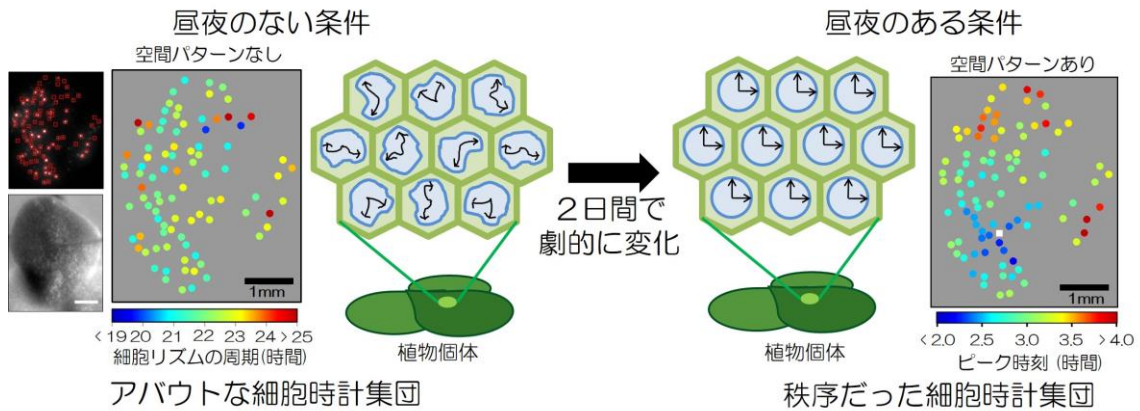


図4. 昼夜条件下でみられる空間パターン

連続明条件から明暗条件に移行した際の変化を、実験データと模式図で示した。左のカラーマップは各細胞の連続明条件における概日リズムの周期を示しており、右のカラーマップは明暗条件下でのピーク時刻（夜明けからの時間）を示している。植物体上のプロット点は細胞の位置に対応している。連続明条件における細胞リズムの周期には空間的な秩序は見られなかったが、明暗条件へと移行後2日後からはピーク時刻に明瞭な空間パターンが出現する。

### 3. 波及効果

多細胞体内における個別の細胞の概日リズムの挙動と個体の挙動を同時に観測することは生物時計の研究分野における大きな挑戦でした。本研究結果はそれを実現する手法を提供しており、時間の関わる様々な生理学的現象について、細胞時計という生物時計の最小単位と個体や器官といった構造単位とを結びつけて理解する新たな方法論が今後発展していくと期待されます。また、植物の細胞時計の精度や不均一性を数値化できたことで、1日の中での植物の挙動を解析する上で必要な実験精度の目標値を具体的に設定できるようになります。これらは定量性が重視される昨今の生命科学において、大きな進展につながります。また、本研究では細胞ごとの時計遺伝子発現の挙動を発光レポーターで観測しましたが、この技術は時計関連遺伝子に限らず多くの遺伝子にも応用可能ですので、様々な植物の生命現象に関して、個体内の1細胞レベルの遺伝子発現を解析する手法が広がっていくと期待されます。また、基礎研究分野に限らず、時計の精度や個体内での時間の空間配置の問題は、将来的に植物工場など人工的な昼夜環境調整が可能な施設における生産性の向上への取り組みなどにつながっていく可能性があります。

### 4. 今後の予定

本研究によって、昼夜環境変動の有無により植物の生物時計の状態が劇的に変化することが明らかとなりました。今後はこのような変化を可能とする分子機構の解明を目指します。また、明暗条件下の空間パターンには、ウキクサ植物体の中心部と辺縁部で2時間ほどの時差が生じていましたが、個体内時差

の形成機構とその生理学的な役割を明らかとしていきたいと考えています。それらを通して、細胞時計の挙動から個体の挙動までを統一的に理解する理論を構築していきます。また、これまでの『昼夜条件』は研究室の中で電気のスイッチをオン/オフするだけの不自然な環境変動でしたが、より複合的な環境要因と複雑な変動を行う野外環境での生物時計の挙動や役割を細胞時計の観点から明らかにしていきます。

## 5. 研究支援者やプロジェクト等

本研究は日本学術振興会（科研費）、日本科学技術振興機構(さきがけ（PRESTO）,先端的低炭素化技術開発(ALCA))の支援を受けました。

### <論文タイトルと著者>

タイトル：Heterogeneity of cellular circadian clocks in intact plants and its correction under light-dark cycles

著者：村中智明、小山 時隆

掲載誌：*Science Advances*