

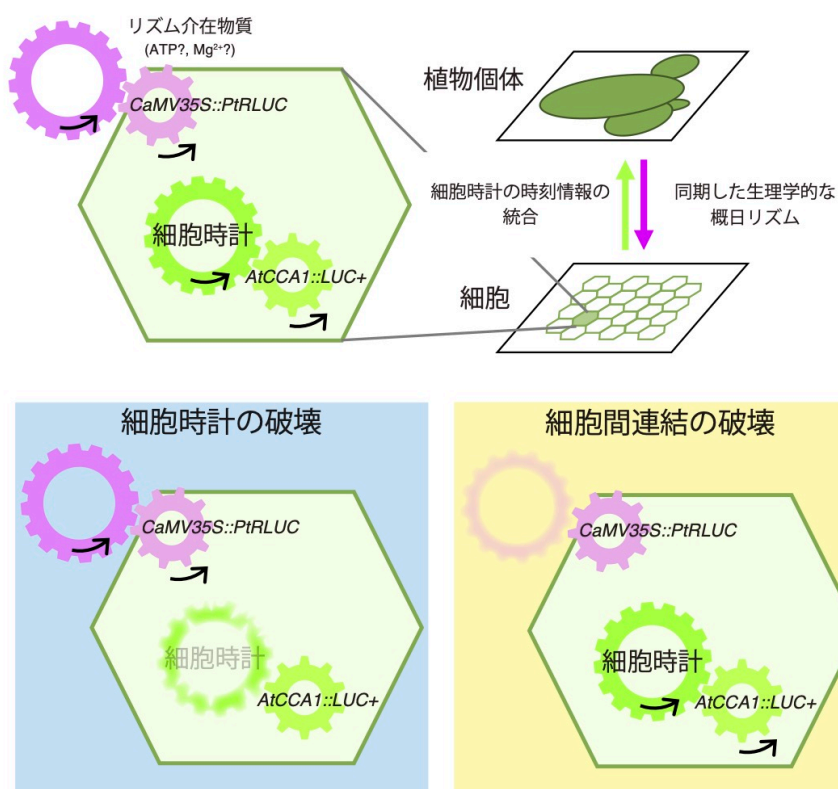
# 細胞非自律的な植物の概日リズムの発見

## —細胞の持つ概日時計に従わない概日リズム—

### 概要

概日時計は、花の開花を受粉に適した時間にするなど、植物のさまざまな生理学的プロセスの時間的調節に関与しています。概日時計は一つひとつの細胞の中にあり、個々の細胞が持つ時計の挙動は不安定です。ですが、植物のような多細胞生物は、個体レベルでは1日のリズムを調和的に生み出しています。なぜ、個体レベルで調和的なリズムを形成できるのでしょうか。この仕組みについては不明な点が多くあります。

京都大学大学院理学研究科の小山時隆准教授の研究グループは、人為的な生物発光技術を使って、単一細胞由来の2つの異なる概日リズムを調べました。その結果、一つひとつの細胞の中にも、単一細胞レベルで自律的な概日リズムと、その自律的なリズムとは異なる概日リズムがあることを世界で初めて明確に示すことができました。細胞内に自律的なリズムとは異なるリズムがあることは、植物の個体レベルで調和的な時間制御を可能にする要因の一つと考えられます。この調和的な概日リズムを形成するメカニズムを今後解き明かすことで、植物の1日の時間の使い方についてその全体像を明らかにできると期待されます。



植物個体の細胞が形成する2種類の概日リズム

## 1. 背景

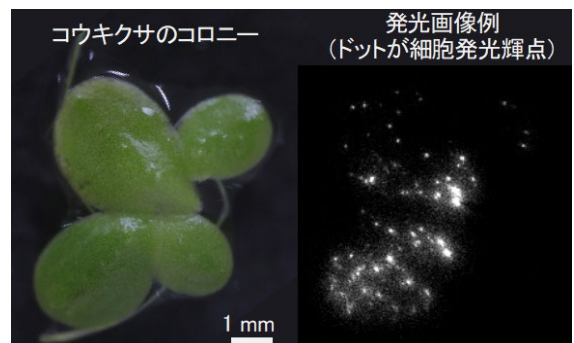
生き物は概ね1日で回る概日時計<sup>1</sup>をもつことで、昼夜の周期的な環境変動に適応しています。植物など多細胞生物では個々の細胞が概日時計をもっています。概日時計は複数種の時計遺伝子によって構成されており、これらの時計遺伝子が自分自身を含むお互いの遺伝子の発現<sup>2</sup>を制御する回路（フィードバックループ回路）を形成することで、自律的な振動を生じます。さらに、植物の多くの遺伝子が、この時計遺伝子の直接的、あるいは間接的なコントロールを受けることで、遺伝子発現に概日リズム性が生じます。これらの遺伝子機能の周期的な変動をもとに、様々な生理学的活性に概日リズムが形成されると考えられています。一方で、個々の細胞がもつ概日時計は『品質』が不均一・低精度であることが知られています。このような不安定な細胞の概日時計で構成される植物の概日時計システムが、個体レベルで調和的に働く仕組みについては不明な点が多くあります。

京都大学大学院理学研究科の小山時隆准教授の研究グループでは、生物発光レポーター系<sup>3</sup>を用いて単一細胞レベルで概日リズムを観測する技術をこれまでに開発してきました。その技術を応用した研究の中で、時計遺伝子をベースにした生物発光レポーター(*AtCCA1::LUC+*)で発光概日リズムが生じるだけでなく、恒常的に発現するレポーター(*CaMV35S::PtRLUC*)でも発光概日リズムが観測されることを発見していました。前者の発光リズムは細胞の概日時計の不安定な挙動を反映する一方で、後者の発光リズムはお互いが高い同調性を示すなど、両者で性質が異なっていることがわかっていましたが、恒常的に発現するレポーターで概日リズムが生じる仕組みやその意義などについては不明でした。

## 2. 研究手法・成果

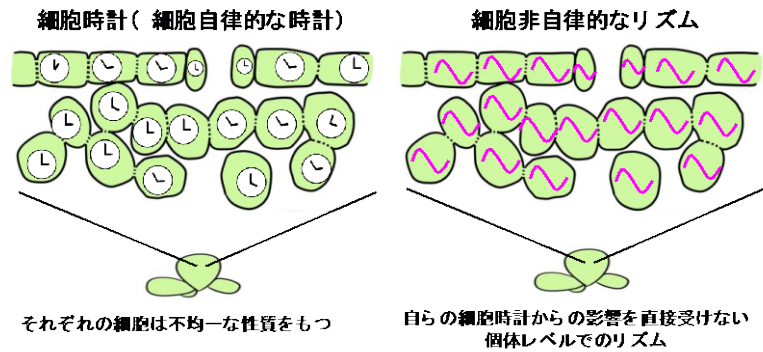
コウキクサ(*Lemna minor*)を材料に、発光色の異なる2つの発光レポーター [*AtCCA1::LUC+* (黄緑色) と *CaMV35S::PtRLUC* (赤色)] を同一細胞にパーティクルガン法<sup>4</sup>で一過的に導入し、その発光像を高感度カメラで一週間程度連続撮影しました。この観測手法で細胞の発光輝点を捉えることができます。撮影時には緑色光透過型フィルタと赤色透過型フィルタを用いて2つの発光レポーター由来の光を分離・測定し、単一細胞レベルで2つの異なる発光レポーター由来の概日リズムを同時に検出しました(2波長発光レポーター系)。また、この2種の発光レポーターに加えて、エフェクター遺伝子を共導入することで、単一細胞レベルで概日時計の性質を変化させたときの、2つの発光リズムの性質の変化を解析しました。さらに、高浸透圧培地で原形質分離(細胞壁から細胞膜を分離して、細胞間の連結がなくなることを引き起こしたときの、2つの発光リズムの変化を解析しました。

同一細胞由来の2つの発光リズムを比較解析することで、*CaMV35S::PtRLUC*に由来する発光リズムが以下の性質を保つことがわかりました。(1) 個体内で高い同期状態を維持する、(2) 細胞の概日時計の性質変化の影響を受けない、(3) リズムの形成が細胞間の連結に依存する。概日時計の挙動を反映する *AtCCA1::LUC+*の発光リズムは上記と対照的な性質を示すことから、*CaMV35S::PtRLUC*に由来する発光リズムはその細胞がもつ概日時計の影響を直接受けない、独立したリズムであることを示しました。つまり *AtCCA1::LUC+*は細胞自律的<sup>5</sup>な時計を反映した発光リズムを生じさせる一方で、*CaMV35S::PtRLUC*は細胞非自律的な発光リズムを生じさせました。これらの実験結果から植物個体の概日時計システムが細胞自律的な概日リズムと細胞非自律的な概日



手法成果の図(1番目): ウキクサの外観と細胞発光の様子

リズムから構成されていることを実証し、それぞれのリズムがもつ特性を明らかにすることに成功しました。細胞非自律的な概日リズムをもつことは、不均一・不安定な細胞の概日時計で構成される植物個体で調和的な時間制御を可能にする要因の一つであると考えられます。このような時間調整システムをもつ植物個体（細胞集団）は、お互いに時刻が少々ずれた時計をもつ人々の集団でもお互いに調和した行動が可能になる人間社会にも例えられます。



手法成果の図（2番目）：植物体の各細胞の概日時計と細胞非自律的なリズムの模式図

### 3. 波及効果、今後の予定

本研究で明らかにした細胞非自律的な概日リズムは、細胞レベルより高次の個体レベルあるいは組織レベルで生じた概日リズムを反映したものと想定されます。一方で、それら高次の階層で生じる概日リズム形成においては、個々の細胞がもつ概日時計が重要と考えられます。細胞非自律的な概日リズムを生じさせるメカニズムを今後解明することで、複雑な階層性を示す植物の概日時計システムの全貌を明らかにできると期待されます。

### 4. 研究プロジェクトについて

日本学術振興会科学研究費助成事業(科研費番号 JP21J23250, JP19J23441, JP16H06864, JP20K06342, JP17KT0022, JP19H03245)。科学技術振興機構先端的低炭素化技術開発 (JPMJAL1108) および地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (JPMJSA2004)。

#### <用語解説>

- <sup>1</sup>**概日時計**：生き物がもつ概ね 24 時間の周期を示す自律的な振動システム。恒常条件で振動し続けるが、1 日の環境変動に応じて時計の時刻を調整し、外部環境と時計の針（位相）が同調する。多細胞生物では、時計遺伝子と呼ばれる複数の遺伝子を構成要素とするフィードバックループで自律的な振動を引き起こす。
- <sup>2</sup>**遺伝子の発現**：DNA にコードされている遺伝子が実際に機能をもつこと。また、その第一段階である、遺伝子領域の DNA を鋳型に RNA が合成（転写）されること。  
ウキクサ植物：淡水生の単子葉植物でサトイモに近縁な植物群。扁平小型で 2 次元的な成長をすることから、実験環境下でカメラ等を用いた長期的な観測がやりやすい。
- <sup>3</sup>**生物発光レポーター系**：ルシフェラーゼと呼ばれる発光酵素を利用することで、遺伝子発現活性を発光活性として生きている状態で観測する系。
- <sup>4</sup>**パーティクルガン法**：細胞径より十分小さな金粒子(1 マイクロメートル程度)に導入遺伝子を含む DNA を付着させ、金粒子を高速で細胞にぶつけ、貫通させることで、金粒子と一緒に細胞内に DNA を導入する手法。
- <sup>5</sup>**細胞自律的**：ある細胞現象が生じるのに、その細胞があれば十分であることを言う。逆に『細胞非自律的』とは、その細胞だけでは不十分で、周囲の細胞などが必要であることを言う。

### <研究者のコメント>

植物がもつ『時間』に関する今回の成果は基礎的な研究から生まれましたが、研究材料であるウキクサ植物は産業応用面でも注目されて、近年様々な研究に使われています。基礎研究であっても応用研究であっても、『時間』抜きには生き物を語ることはできません。『生き物の時間の秘密』を感じながら、これからも面白い研究を進めていきたいと思っています。(小山時隆)

### <論文タイトルと著者>

タイトル：A non-cell-autonomous circadian rhythm of bioluminescence reporter activities in individual duckweed cells. (個々のウキクサ細胞内での生物発光レポーター活性に見られる細胞非自律的なリズム)

著者：Emiri Watanabe<sup>1,2</sup>, Tomoaki Muranaka<sup>1,3</sup>, Shunji Nakamura<sup>1,4</sup>, Minako Isoda<sup>1,5</sup>, Yu Horikawa<sup>1</sup>, Tsuyoshi Aiso<sup>1</sup>, Shogo Ito<sup>1</sup>, Tokitaka Oyama<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大学大学院理学研究科生物科学専攻、<sup>2</sup>東京大学大学院新領域創成科学研究科複雑理工学専攻、<sup>3</sup>名古屋大学大学院生命農学研究科、<sup>4</sup>東京大学大学院理学系研究科、<sup>5</sup>県立広島大学大学院総合学術研究科生命システム科学専攻 (<sup>2,3,4,5</sup>は現所属)

掲載誌：*Plant Physiology* DOI：<https://doi.org/10.1093/plphys/kiad218>