

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650098

研究課題名(和文)植物体微小領域への簡便で長期的操作可能な光照射法の開発と応用

研究課題名(英文)Development and application of a micro-area illumination method for plants

研究代表者

小山 時隆(Oyama, Tokitaka)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30324396

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文):ウキクサ植物を材料に、個体内に光ファイバの先端を固定することで、微小領域に長期間光を照射する手法を開発した。この手法を用いて、植物体全体に光照射する場合と異なり、光を受けた組織や細胞から受けていない組織や細胞への光情報の伝達様式を観測できることが期待される。個々の細胞がもつ概日時計へ与える光信号の影響を直接的に評価するための単一細胞レベルの概日リズムの測定技術の開発にも成功した。

研究成果の概要(英文):We developed a technique that enables a micro-area illumination in a duckweed plant by fixing a tip of an optical fiber inside the plant body. This method should be used for the analysis about cell-to-cell light signal transmission: from light-perceived cells to cells without receiving light. To analyze the cell-to-cell light signal transmission in the circadian clock system, we developed a bioluminescence monitoring system at a single-cell level. This will be used in combination with the micro-area illumination method.

研究分野：生物学

キーワード：光応答 ルシフェラーゼ 概日時計 生物発光 ウキクサ

1. 研究開始当初の背景

地表の自然環境は様々な時間スケールで刻々と変化するが、昼夜に伴う光環境サイクルは陸上植物にとって最も基本的で重要な環境変動といえる。太陽光を利用した光合成反応とそれに関連する様々な応答反応は1日の周期性を持っている。それら1日の周期性を植物側でコントロールするメカニズムとして植物は概日時計を持っている。概日時計は植物に限らず動物なども有している。その時計は自律的に1日周期を刻むことができるのに加えて、その時刻を日周的外部環境に同調させることができる。概日時計は生物種によらず細胞自律的なシステムであり、多細胞生物においても個々の細胞が自律的にうごく概日時計を有している。一方で、哺乳類のほとんどの細胞は光を感知する能力がないため、昼夜の光刺激を直接感知して時計の時刻を調整することができず、眼が受容した外部環境光情報を間接的に受け取ることになる。それとは異なり、植物においては植物体を構成する個々の植物細胞がそれぞれ光受容能をもち、個別に光応答することが可能である。植物の概日時計が光のオンオフの信号に応答して時刻をリセットするメカニズムは、分子レベルである程度理解されてきた。植物の概日時計の構成要素は様々な転写調節因子とそれらをコードする遺伝子群であり、それらによる制御ネットワークによって自律的な遺伝子発現概日振動が生じる。外部光環境変動からの光信号は、光受容体を介してこれらの遺伝子発現を変化させることで発現概日振動そのものを一過的に変化させ、その位相(時刻)を変化させると考えられてきた。この同調メカニズムは細胞自律的に起こりうるが、たとえば根器官の細胞のように直接光を受容することが困難な細胞においても、地上部の昼夜サイクルに同調できることが知られていた。この例からもわかるように、植物は他の細胞からの間接的に外部光環境信号を受け取り、時計の時刻合わせをすることができることも示唆されていたが、そのような時刻合わせに見られる細胞間の光信号伝達様式を直接的に観測した例はなかった。また、植物の一部(領域、器官等)に照射された光信号が別の領域の組織/細胞へと伝達される様式の詳細な記述はほとんどなされていなかった。とくに、近接細胞間の信号伝達機構は不明なことがほとんどであった。このような近接細胞間の信号のやり取りを解析する上で、植物体の微小領域のみに刺激を与えて、その刺激を直接受けていない細胞の挙動の変化を観測する汎用的な技術が求められていた。また、正常な植物体を材料に、光の日内変動など長期間にわたる光環境変動を微小領域に与え続ける技術は非常に困難であるが、それが実現できれば概日時計研究にとっては大きなブレイクスルーになると考えられていた。

申請者はウキクサという植物を用いて、単

一細胞レベルで概日時計の挙動を観測する測定系の開発を行っていたが、その精度や汎用性に関しては途上にあった。この技術の応用が可能になれば、細胞レベルの詳細な概日リズムの挙動が解析できるため、間接的な同調信号伝達様式など弱い刺激への確率的な応答反応を観測できると期待されていた。この細胞レベルでの概日リズム測定は、パーティクルボンバードメント法によってウキクサ表面近傍の細胞にまばらに概日発現発光レポーターを導入し、その細胞発光概日リズムを測定する技術であるが、同時に様々なエフェクター遺伝子を共導入することで、周囲の細胞と異なる性質をもつ細胞を植物体内に実現できることもわかってきた。それらの技術を応用することで、細胞間の信号伝達を人工的に生成・検出する技術も可能と考えられ、将来的に細胞間光信号伝達系解析のモデル系になることが期待されていた。

2. 研究の目的

本研究課題は、植物体における微小領域(細胞群・組織)がその周辺組織や細胞、さらに個体全体に与える影響を評価するための、長期間かつ局所的に光照射する実験系の確立を目的とした。微小領域の長期的な処理は操作対象の観測も含めて多くの困難が伴う。本課題では、材料としてウキクサを用い、概日時計システムと人工的なcAMP生成・検出系を操作対象とすることで、簡便かつ画期的な実験系を作り、その有用性の検証を目指した。これまで実証が困難であった細胞間情報伝達系などの研究において、オンタイムモニタリングや光による遺伝的操作など、多細胞生物の本質的な理解につながる実験系の提供を目指した。

3. 研究の方法

本研究課題は、植物体の微小領域への光照射を長期間行える実験系の確立を目指して、以下の3つの手法を用いて取り組んだ。

(1) 光ファイバによる局所的な光照射法の開発と局所的な光照射の影響評価のための生物発光レポーター系をつかった細胞発光の長期的モニタリング法の確立を目指した。材料としてはウキクサを用い、その主要部分である葉状体(フロンド)の表皮およびその内側の葉肉細胞を遺伝子導入/発光測定のターゲットとした。細胞概日リズム測定にはシロイヌナズナの時計遺伝子 *CCA1* のプロモーターでドライブされるホタルルシフェラーゼ遺伝子を用いた。パーティクルガンによる簡便で高効率な遺伝子導入を構築し、単一細胞に由来する生物発光の検出は高感度 EM-CCD カメラ装置によって行った。

(2) 光活性化アデニレートシクラーゼとcAMP依存型ルシフェラーゼを用いた人工的cAMP生成/検出系による細胞間の光情報伝

達観測系の開発を目指した。この系を局所性と長期性を兼ね備える光照射実験系と組み合わせることで、その実用性を実証することを目指した。

4. 研究成果

(1) ウキクサ植物を材料に単一細胞レベルで導入発光遺伝子の日周発現リズムの測定に成功した。完全な生物個体上の発現変動を細胞レベルで長期間観測し続ける技術はそれまでになく、画期的な技術開発となった。パーティクルボンバードメント法による遺伝子導入では、ウキクサの葉状体の表皮と表皮直下の葉肉細胞にレポーター遺伝子が導入され、ウキクサの上面に100個以下の導入細胞を生じさせることで、個々の導入細胞の発光を分離・定量することが可能となった。(発表論文3)

(2) 上記の生物発光測定系においては、ウキクサが培養液面上で半固定されている。この測定状態を基本形とし、その状態のウキクサに微小なニードルを植物体下面からさし、その先端を植物体内にとどめることで、その先端位置を固定することができた。ニードル内には光源につながる光ファイバを挿入することで、局所的な光を安定的に実現することができた。用いたウキクサ(イボウキクサ)の葉状体(フロンド)の直径は4~5 mmであるが、この照射装置を用いると、表面に照射される光量に1000倍以上の差をつけることが可能であった。つまり、点光源の直上で受ける光量と比較して周辺部は1/1000以下の光量を受けることになる。照射光量を調節することで、概日リズムを同調させるのに十分な光量を受ける領域と、必要以下の光量しか受けない領域とを同一フロンド内に作ることが可能となった。この光量分布が長期間にわたって安定に維持できることも明らかとなった。この技術と細胞レベルの生物発光概日リズム測定を組み合わせることで、局所的にかつ長期間光照射し、その植物個体全体の発光レポーター活性をモニターすることができるようになった。

(3) ウキクサの仲間は属ごとに大きさの違いや維管束の発達度合いなど多様な形態を示す。これらは概日時計に関する細胞間光情報伝達の多様性(あるいは制約の違い)を引き起こしている可能性が考えられ、本研究課題においても様々な種類のウキクサを材料にすることが検討された。まず、ウキクサの4属の代表的な種について、これまでモデル材料として用いてきた *Lemna gibba* と *Lemna aequinoctialis* 同様に生物発光リズム測定が可能かどうか確かめた結果、遺伝子導入効率(発光効率)に若干の差があるが、基本的にどれも同じ方法で概日リズムを測定できることを明らかにした。ただし、同じ発光概日レポーター遺伝子を導入しても、種ごとに

発光概日リズムの性質が異なるなど、時計システムそのものの多様性を示唆する結果を得ることができた。(発表論文1)

(3) 細胞間光信号伝達様式を解析するモデルとして、光応答性の活性を持つアデニルシクラーゼとその生成物である cAMP に依存した発光活性を持つルシフェラーゼを用いた人工的な信号伝達系の構築を目指した。cAMP 依存的な生物発光活性はパーティクルボンバードメント法によって導入したウキクサの細胞で機能し、外部から投与した cAMP に応答して生物発光活性を示した。しかし、パーティクルボンバードメント法でウキクサの細胞に導入したアデニルシクラーゼは、共導入した cAMP 依存的なルシフェラーゼを活性化できるほどの cAMP 合成活性を持たないことが明らかになった。

エフェクター遺伝子を生物発光レポーター遺伝子と共導入することで、レポーター活性の性質を変えることが可能であり、たとえば植物の光周性花成反応の鍵となるアラビドプシス *CO* 遺伝子やそのウキクサホモログを過剰発現させるエフェクターを概日発光レポーターと共導入すると、生物発光概日リズムをほぼなくすことができることを明らかにした。(発表論文2)

ウキクサを材料として、その微小領域への長期間の光照射法を本研究課題で確立した。この技術を用いて概日時計システムに関する細胞間/組織間の光情報伝達様式の解明に向けた研究が促進されるほか、植物の様々な光応答性反応に関する細胞間での情報のやり取りを直接的に観測するための重要な手法の1つになると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Characterization of circadian rhythms of various duckweeds. *Plant Biol (Stuttg)* 17 (Suppl 1): 66-74 (2015)
Muranaka, T., Okada, M., Yomo, J., Kubota, S., Oyama, T. (査読有) DOI: 10.1111/phb.12202

Overexpression of a *CO* homologue disrupts the rhythmic expression of clock gene *LgLHYH1* in *Lemna gibba*. *Plant Biotech.* 31: 319-328 (2014)
Ito-Miwa, K, Serikawa, M., Kondo, T., Oyama, T. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.14.1111a

A Single-Cell Bioluminescence Imaging System for Monitoring Cellular Gene

Expression in a Plant Body. *Plant Cell Physiol.* 54: 2085-2093 (2013)
Muranaka, T., Kubota, S., Oyama, T.
(査読有) DOI: 10.1093/pcp/pct131

[学会発表](計 26 件)

伊藤照悟, 内海陽子, 小山時隆 単子葉植物のコウキクサにおける CaMV35S ならびに *ZmUBQ* プロモーターの転写活性の *LUCIFERASE* レポーターを用いた 時空間解析 第 57 回日本植物生理学会年会 2016年03月18日~2016年03月20日 岩手大学(岩手市)

村中智明, 小山時隆 1細胞リズム測定から捉える植物の概日時計システム 第22回日本時間生物学学会学術大会 2015年11月21日~2015年11月22日 東京大学(東京都)

伊藤照悟, 上野賢也, 内海陽子, 小山時隆 ウキクサ植物の発光レポーター安定形質転換体を用いた概日リズム解析 第22回日本時間生物学学会学術大会 2015年11月21日~2015年11月22日 東京大学(東京都)

四方純, 村中智明, 小山時隆 局所光照射装置を用いた植物概日時計システムにおける細胞間相互作用の解析 第22回日本時間生物学学会学術大会 2015年11月21日~2015年11月22日 東京大学(東京都)

Oyama, T. Using duckweeds for basic research in plant physiology: Exploring plant biological clock systems. The Third International Conference on Duckweed Research and Applications 2015年07月03日~2015年07月06日 京都大学(京都市)

Yomo, J., Muranaka, T., Okada, T. Ito, T., Oyama, T. Developing a manipulation system of partial illumination to the microarea of duckweed plants for the detection of intercellular signaling on cellular circadian clocks. The Third International Conference on Duckweed Research and Applications 2015年07月03日~2015年07月06日 京都大学(京都市)

Ito, T., Utsumi, Y., Oyama, T. Improvement of fast and efficient. Agrobacterium mediated stable transformation methods for Lemna specie The Third International Conference on Duckweed Research and Applications 2015年07月03日~2015年07月06日 京都大学(京都市)

Oyama, T. Analysis of cellular circadian rhythms in the plant body for the detection of their physiological interaction. Awaji-Symposium on RNA &

CLOCK 2015年3月25-26日 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県)

Ito, S., Oyama T. Transient and Agro-mediated stable transformation method for circadian clock analysis in *Lemna* species. Awaji-Symposium on RNA & CLOCK 2015年3月25-26日 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県)

Okada, M., Oyama T. Analysis of roles of *ELF3* in the plant cellular circadian clock. Awaji-Symposium on RNA & CLOCK 2015年3月25-26日 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県)

伊藤照悟, 内海陽子, 小山時隆 ウキクサ類におけるカルス誘導とアグロバクテリウム共培養による安定形質転換体作製の試み 第56回日本植物生理学会年会 2015年3月16-18日 東京農業大学(東京都)

村中智明, 小山時隆 ウキクサ個体内における細胞概日時計の相互作用様式の解析 第56回日本植物生理学会年会 2015年3月16-18日 東京農業大学(東京都)

岡田全朗, 小山時隆 植物細胞概日時計の明暗サイクル同調における *ELF3* の機能 第56回日本植物生理学会年会 2015年3月16-18日 東京農業大学(東京都)

小山時隆 植物個体で単一細胞レベルの概日リズムを測定する技術とその応用 第22回日本時間生物学学会学術大会 2014年11月8-9日 九州大学(福岡市)

岡田全朗, 村中智明, 小山時隆 光シグナルによる細胞概日時計リセットにおける *ELF3* の機能解析 第22回日本時間生物学学会学術大会 2014年11月8-9日 九州大学(福岡市)

四方 純, 村中智明, 岡田全朗, 小山時隆 局所的明暗条件に対する植物細胞概日時計の同期過程の時空間的解析 第22回日本時間生物学学会学術大会 2014年11月8-9日 九州大学(福岡市)

村中智明, 小山時隆 ウキクサ植物が示す概日リズムの種間および種内多様性 第22回日本時間生物学学会学術大会 2014年11月8-9日 九州大学(福岡市)

村中智明, 岡田全朗, 小山時隆 一細胞発光測定で明らかにするウキクサにおける細胞概日振動子集団の振る舞い 第23回日本バイオイメージング学会学術集会 2014年9月5日 大阪大学(吹田市)

岡田全朗, 村中智明, 小山時隆 細胞概日リズム可視化による植物細胞時計の時刻合わせ機構の解析 第23回日本バイオイメージング学会学術集会 2014年9月5日 大阪大学(吹田市)

Oyama T. Behavior of cellular circadian rhythms in plants. Molecular clock 2014: Epigenetic Landscape in Biological Rhythms 2014年3月29日 京都大学(京都市)

- 21 村中智明、岡田全朗、小山時隆 ウキクサ植物にみられる概日リズム多様性 第55回日本植物生理学会年会 2014年3月18日 富山大学(富山市)
- 22 村中智明、小山時隆 ウキクサ植物における細胞概日振動子の挙動解析 第20回日本時間生物学会学術大会 2013年11月9-10日 近畿大学(東大阪市)
- 23 岡田全朗、小山時隆 ウキクサ植物の細胞概日リズムにおける ELF3 の機能解析 第20回日本時間生物学会学術大会 2013年11月9-10日 近畿大学(東大阪市)
- 24 Oyama T. Use of duckweeds for physiological and genetic researches in the laboratory. The Second International Conference on Duckweed Research and Applications 2013年8月22日 ラトガース大学(米国NJ州)
- 25 Okada M., Muranaka T., Yoshihara T., Oyama T. Characterization of cellular circadian rhythms in *Lemna gibba* by using an in vivo bioluminescence monitoring system. The Second International Conference on Duckweed Research and Applications 2013年8月22日 ラトガース大学(米国NJ州)
- 26 Muranaka T., Oyama T. Characterization of cellular circadian clocks in duckweeds. The 2013 International Symposium on Plant Photobiology 3.2013年6月3日 エジンバラ大学(英国)

〔その他〕

ホームページ等

<http://cosmos.bot.kyoto-u.ac.jp/clock/index.html>

6. 研究組織

(1) 小山 時隆 (OYAMA TOKITAKA)

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：30324396