

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18554

研究課題名(和文) 局所光照射装置を用いた細胞時計の光同調シグナルと細胞同期シグナルの伝達機構の解析

研究課題名(英文) Analyses of the circadian clock entrainment and cell-cell phase synchronization mechanisms using a device of local LED light irradiation to the micro-area in higher plants

研究代表者

伊藤 照悟 (Ito, Shogo)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：60632586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物の概日時計機構は細胞自律的である一方で、個々の細胞の時計位相は周りの細胞から影響を受けていることが予想されている。我々は1細胞レベルでの概日発光リズム解析技術を開発してきた。本研究ではさらに植物体の微小領域に局所光を照射する装置を開発し、発光リズム解析装置と組み合わせることで、概日時計の光同調シグナルと細胞同期シグナルの伝達機構解析を可能にした。この間にコウキクサにおける安定形質転換植物体の作成にも成功し、細胞間レベルの位相同期メカニズムだけでなく、組織間や、個体間(親フロントと娘フロント間)の概日時計位相の解析を行うことに成功した。

研究成果の概要(英文)：The circadian clock system is basically cell-autonomous in plants. On the other hand, circadian clock phase of individual cells are presumably influenced by other cells. In order to understand the mechanisms of intercellular clock phase communication among cellular circadian clocks in plants, we have utilized a single-cell bioluminescence monitoring system in higher plants. In this project we newly developed a manipulation system of illumination on a microarea in duckweed plants for long-term experiments of circadian rhythms. We combined this device with the bioluminescence reporter imaging technology. During this project we also established a stable transformation methods in a duckweed *lemna minor* and *lemna turionifera*. This technique also enable us to analyse circadian phase synchronization mechanisms between tissues and/or individual organs.

研究分野：光合成生物の時間生物学、基礎生物学、植物分子・生理科学

キーワード：概日時計 ウキクサ 光受容体 局所光 形質転換 ゲノム編集

## 1. 研究開始当初の背景

概日時計機構は生物が周期的に繰り返し変化する外環境を予想し、実際の環境変化が起こる前に対応するために獲得してきた高次生命機能である。多細胞生物の植物は、個々の細胞が自律的な時計機構を保持していると考えられており、それぞれが独立して光などの外環境を感知し、自身の細胞時計の位相(時刻)を外界の時刻に同調させ、有利に生育、繁殖することを可能にしている。

植物細胞は動物細胞のように神経ネットワークや循環器系のような明瞭な細胞間の情報伝達経路は有していない。しかしながら、細胞は組織ごとに高度に機能分化しており、維管束系や原形質連絡を利用して相互作用し、個体として調和して様々な環境に应答している。この应答のためには、たとえ受容できる外界の光刺激などが細胞・組織ごとに完全に均一ではなくても、細胞自律的な個々の細胞時計機構が、何らかの相互作用を行い、細胞同士の時計位相が同期して、個体としての同期した概日リズムを保つ必要があると考えられる。ただし、植物の光受容体は地下部を含めてほぼすべての細胞で発現・機能していると考えられており、基本的には各々の細胞が個別に光情報を受容することで細胞自律的な概日時計機構の時刻合わせを行っていることが予想されていた。

これまでの高等植物の遺伝子発現リズムの解析は、主に植物体集団、あるいは個体(細胞集団)を対象とし、レポーター遺伝子の発光を個体または細胞集団の平均値として解析してきた。しかしながら多細胞生物である植物において、葉・茎・根などの組織が異なれば、外界からの刺激(光など)の強度は異なる。また、同じ葉でも、日陰の葉と、直接太陽光を受ける葉とでは、刺激(光量、波長スペクトル)が異なるため、遺伝子の発現もその環境刺激の違いによって違いが生じると考えられる。そこで単一細胞ごとの詳細解析が必要とされてきた。

所属する研究室では、ウキクサを実験材料に用いて、金粒子を用いた遺伝子導入法(ボンバードメント法)によりフロンド(葉状体)に一過的にかつランダムに生物発光レポーターを導入し、遺伝子導入細胞からの発光を検出するシステムが開発されていた(*Plant Cell Physiol.*, 54, 2085-2093, 2013)。

イボウキクサにおいて、フロンドにまばらに一過的導入された概日リズムを発振する発光レポーターの解析から、明暗条件下では各細胞の発光レポーターの振動位相の同期率が高い状態で維持されているのに対して、連続明条件下では、各細胞のリズム周期の不均一性と振動の不安定性によって細胞集団の同期率が徐々に下がり、個々の細胞の時刻(位相)情報がばらばらになっていくことが示された。また、位相の差と細胞間の距離の相関を解析すると、0.5mm 以内では位相差が

小さくなっていることも示され、近傍細胞間において、何らかの時計位相の同期メカニズムが存在していることが予想されていた。

## 2. 研究の目的

「同一個体内で各細胞からの発光を個別にかつ同時に長時間測定する技術」に加えて、本研究では「植物体の同一微小領域に単色光を照射する技術」を構築することで「個体・集団全体の時計機構の解析」から一歩進み「単一細胞レベルでの遺伝子発現解析、光刺激による局所細胞の時計位相リセット機構の解析、リセット情報・位相情報の細胞間伝達機構(同期メカニズム)の解析」をめざした。予備実験で、構築したシステムは、ウキクサだけでなく切断したシロイヌナズナの子葉・本葉を用いても、時計遺伝子のプロモーターの活性を細胞毎の生物発光レポーターで連続的に測定する事が可能であることがわかっていたので、解析にはウキクサ植物と、シロイヌナズナの時計因子、光シグナル伝達因子の変異体リソースも活用することとし、「各細胞が、光刺激を受容し時計位相(時刻)をリセットするシグナル伝達機構」と、「細胞間を光シグナル(リセットシグナル)が相互作用によって近傍・遠隔細胞へ伝播する様子をリアルタイムの生物発光で捉え、情報の細胞間伝達様式を解明する」ことを最終目標とした。

## 3. 研究の方法

解析にはウキクサ(*Spirodela polyrhiza*)、イボウキクサ(*Lemna gibba*)のフロンド(葉状体)とシロイヌナズナの子葉・本葉を用いる。こととしたが、研究期間中に、コウキクサ(*Lemna minor*)の安定形質転換植物体の作出に成功したことから、主な研究材料をコウキクサにシフトしていった。

高感度 EM-CCD カメラの単一細胞生物発光測定システムに加えて、植物体の微小領域に光を照射する装置はすでにプロトタイプが作成済みであり改良を加えた。具体的には暗室外に設置した LED 光源からの光を 100 $\mu$ m 径の光ファイバで誘導し、最終的に極細インシュリン注射針(内径 180 $\mu$ m)の先から照射できるように設計した。針は植物体の裏(背軸面)から細胞表面付近まで刺し、固定する役割を兼ねさせた。植物の上面から 1~2 層目の細胞で、直径~300 $\mu$ m 以下の照射円を照射の目標とした。光源には干渉フィルタを取り付け様々な波長(色)の光源とし、光受容体に着目した解析ができるようにした。実際の照射光の強さ、照射範囲や細胞によって乱反射した光などは植物体上方にある CCD カメラによって実測し記録できるようにした。ウキクサは葉状体の背軸層に比較的厚い細胞とウキブクロ空間があるので針での固定は容易である。

更に概日リズムを測定するための発光レポーターにはホタルルシフェラーゼ (LUC+黄緑 発光最大波長 556nm) に加え、発光波長の異なるルシフェラーゼ遺伝子を利用することで、2 種類の遺伝子の転写活性、タンパク質の蓄積変動を生物発光として同時にモニターすることをめざした。発光昆虫の鉄道虫(PhRLUC 赤 630nm)、ヒカリコメツキ虫(ELUC 緑 538nm)、イリオモテボタル(RoLUC 緑 550nm)由来の発光波長の異なるルシフェラーゼを候補とした。

これまでの植物分野での発光レポーターは主に遺伝子の転写活性を生物発光として経時的に測定しているものが多く、タンパク質の動態(安定性、半減期など)の解析にはあまり使われてきていない。本研究では、ルシフェラーゼと様々な遺伝子を融合タンパク質として発現させ、タンパク質の蓄積レベルを生物発光をレポーターにして単一細胞レベルで検出を試みた。特に、時計リセットに関わる、赤色・青色光受容体タンパク質、並びにその下流の転写因子タンパク質が光受容によって細胞内での局在場所(細胞質↔核)の変化や安定性(分解活性)がどのように変化するかをレポーターで解析することを計画した。

#### 4. 研究成果

初年度(27 年度)はイボウキクサ (*Lemna gibba*) とコウキクサ (*Lemna minor*) のフロンドを用いて解析を進めた。申請時にはウキクサ (*Spirodela polyrhiza*) を用いる予定だったが、申請者らがコウキクサの形質転換法を確立し、コウキクサにおいても共同研究者らによってゲノム情報が利用可能になったため主な研究材料を変更した。作成予定だった局所光照射装置は、直径 300 $\mu$ m 以下の照射円を光照射の目標としていたが、予想よりも植物体内で光の拡散が大きく、より広い範囲で光量のグラデーション照射が起こった。しかしながら装置の設計自身は終了し解析が進められた。白色光を用いた解析によって、概日時計機構を維持する光量、リセットする光量の解析を行い、これまで安全光として用いられてきた緑色の微弱光源においても連続暗条件下で見られるような概日振動の急激な低振幅化を抑える効果が観察され、結果的に緑色安全光が概日時計解析には安全でないことも見出された。これらの結果から、フィトクロム A の情報伝達系が機能していることが考えられた。赤色・遠赤色・青色光の LED を用いた解析から、時計の周期が光源の波長(色)によって変化し、頑健性も大きく変化することも見出された。

28 年度は主にコウキクサ (*Lemna minor*) のフロンドを用いて解析を進めた。概日発光レポーターを一過的に導入した細胞と並行して、概日発光レポーターを保持する形質転換植物体を複数ライン作出して解析を行った。こ

れまでに、成熟したウキクサのフロンド(サイズが変化しない)や、シロイヌナズナの本葉における一過的に導入したレポーター遺伝子由来の 1 細胞生物発光のタイムラプス画像からリズムを定量解析するための画像処理ツールはある程度構築済みであったが、安定形質転換植物体では新たに発光する細胞が出現してくるため、発光画像の解析方法の改良が必要となった。新規フロンド成長と発光リズムを同時解析する事が可能となりウキクサ個体の各フロンド間(親子間・兄弟間)の時計位相の関係を、別々にリズム解析することが可能となった。

概日発光リズムの解析に並行して、コウキクサの公開ゲノム情報を利用し、コウキクサにおける時計遺伝子ホモログのクローニングはほぼ完了した。また、野生株内での経時的な遺伝子発現解析も終えた。しかし、過剰発現体の作成では、コサプレッションが頻繁に起き、適切な過剰発現個体が得られない遺伝子もあったため解析が遅れた。光受容体の欠損変異株作成には CRISPR/Cas9 を用いて作出を試みたが、変異導入が予定通りに起きず、スクリーニングを継続した。

最終年度(29 年度)は、作成に成功したコウキクサ (*Lemna minor*) の概日発光レポーターを保持する形質転換植物体を用いて解析を行った。タイムラプス発光撮影で得られた、生物発光の経時変化画像を解析するための画像処理ツールは、28 年度までは ImageJ のマクロをベースにしたものであったが、今年度は Python ベースで実装することにより、より汎用性の高い解析を可能とした。また、画像取得の装置の改良により、植物の概日時計に影響のない緑色安全光の光量(強さ)、照射時間等を最適化した。これを用いることで、植物体の増殖や、ウキクサ輪郭抽出を行うための画像取得を暗所下においても可能にし、コウキクサの発光を個体別(フロンド別)に分けて定量できるようになった。その結果、親フロンドの時計位相に対して新規に成長してきた、娘フロンド、孫フロンドの時刻位相のズレ(主に位相の遅れ)を検出することができた。親フロンドへの局所光照射による娘フロンドへの影響を見ることで、今後同調シグナルの解析へ展開できると考える。

コウキクサにおける時計遺伝子ホモログの過剰発現体の作成では、当初はシロイヌナズナの形質転換バイナリーベクターの流用をしたため、35S プロモーターを用いた過剰発現植物を作成していたが、単子葉植物で活性が高いとされているトウモロコシ由来の *ZmUBQ1* プロモーターを用いたコンストラクトも同時に使用することでより発現量の高い形質転換体を選抜した。また、コウキクサに於ける強力な遺伝子発現プロモーターの探索も行った。ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 を用いた変異導入では新たに Cas9 D10A ニッカーゼを用いることで特異性を高めた欠損変異体植物の作成を進め、LUC

レポーターの発光を指標にした解析から発光しなくなった(変異が導入されたと考えられる)細胞集団を得ることができた。今後はこれらの手法を利用することで、コウキクサにおける、機能欠損の変異体を作成することで、概日時計位相の外界との同調・細胞間での同期メカニズムの解析を更に加速できると考えられる。

#### 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)

①Akane Kubota, Shogo Ito (joint first authorship), Jae Sung Shim, Richard S. Johnson, Yong Hun Song, Ghislain Breton, Greg Goralogia, Michael Kwon, Dianne Laboy Cintrón, Tomotsugu Koyama, Masaru Ohme-Takagi, Jose L. Pruneda-Paz, Steve A. Kay, Michael J. MacCoss, Takato Imaizumi, “TCP4-dependent induction of *CONSTANS* transcription requires *GIGANTEA* in photoperiodic flowering in *Arabidopsis*” *PLOS Genetics*, Vol. 13, No. 6, e1006856, 2017, doi: 10.1371/journal.pgen.1006856, 査読有り

②Masaaki Okada, Tomoaki Muranaka, Shogo Ito, Tokitaka Oyama, “Synchrony of plant cellular circadian clocks with heterogeneous properties under light/dark cycles”, *Scientific Reports*, Vol. 7, No. 317, 2017, doi:10.1038/s41598-017-00454-8 査読有り

③Hannah A. Kinmonth-Schultz, Xinran Tong, Jae Lee, Young Hun Song, Shogo Ito, Soo-Hyung Kim, Takato Imaizumi, “Cool night-time temperatures induce the expression of *CONSTANS* and *FLOWERING LOCUS T* to regulate flowering in *Arabidopsis*”, *New Phytologist*, Vol. 211, No. 1, 208-224, 2016, doi: 10.1111/nph.13883, 査読有り

[学会発表](計 13件)

① 中村 駿志, 伊藤照悟, 小山時隆, *AtCCA1::LUC* シロイヌナズナ葉の単離細胞を用いた単一細胞概日リズム解析, 第59回植物生理学会年会, 2018年3月28-30日, 札幌コンベンションセンター, (北海道, 札幌市)

②伊藤照悟, 小山時隆, 光周期依存的なキタゲニコウキクサ(*Lemna turionifera*)の休眠越冬芽(Turion)形成, 第59回植物生理学会年会, 2018年3月28-30日, 札幌コンベンシ

ョンセンター, (北海道, 札幌市)

③Shogo Ito, Is turion formation in the aquatic duckweed, *Lemna turionifera* under the control of photoperiod and phytochrome signaling pathways?, International Symposium on Plant Photobiology 2018, 2018年1月15-18日 くにびきメッセ, (島根県, 松江市)

④上野 賢也, 中澤 詩風, 伊藤照悟, 小山時隆, 自由継続周期の異なる近縁植物(*Wolffiella* 属)を用いた明暗周期に対する概日リズムの同調性の比較, 第24回日本時間生物学会学術大会, 2017年10月28-29日, 京都大学, (京都府, 京都市)

⑤中村 駿志, 伊藤照悟, 小山時隆, 植物の単離プロトプラストを用いた細胞発光概日リズム測定系, 第24回日本時間生物学会学術大会, 2017年10月28-29日, 京都大学, (京都府, 京都市)

⑥伊藤照悟, 小山時隆, キタゲニコウキクサ(*Lemna turionifera*)における光周期依存的な休眠越冬芽形成, 第24回日本時間生物学会学術大会, 2017年10月28-29日, 京都大学, (京都府, 京都市)

⑦伊藤照悟, 磯田 珠奈子, 四方 純, 小山時隆, ウキクサ植物(*Lemna minor*)における時計関連遺伝子群の単離と機能解析, 第58回日本植物生理学会年会, 2017年3月16-18日, 鹿児島大学, (鹿児島県, 鹿児島市)

⑧Shogo Ito, Analysis of circadian rhythms and photoperiodisms in duckweeds, Circadian Clock of Cyanobacteria during 1991-2017, 2017年3月12日, 名古屋大学, (愛知県, 名古屋市)

⑨伊藤照悟, 小山時隆, 太陽光利用型温室でのウキクサ植物における時計遺伝子発現変動の長期間計測, 第23回日本時間生物学会学術大会, 2016年11月12-13日, 名古屋大学, (愛知県, 名古屋市)

⑩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3月18-20日, 岩手大学, (岩手県, 盛岡市)

⑪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回日本時間生物学会学術大会, 2015年11月21-22日, 東京大学, (東京都, 東京)

⑫Shogo Ito, Yoko Utsumi and Tokitaka Oyama, Improvement of fast and efficient Agrobacterium mediated stable transformation methods for Lemna species, Third International Conference on Duckweed Research and Applications, 2015年7月3日-6日, 京都大学(京都府, 京都市)

⑬Jun Yomo, Tomoaki Muranaka, masaaki Okada, Shogo Ito, Tokitaka Oyama, 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7月3日-6日, 京都大学(京都府, 京都市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔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)研究代表者

伊藤 照悟 (Ito, Shogo)  
京都大学・理学研究科・助教  
研究者番号: 60632586

### (2)研究協力者

小山時隆准教授 (Oyama, Tokitaka)  
京都大学・理学研究科・准教授  
研究者番号: 30324396