

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14732

研究課題名(和文)植物における概日時計の環境応答性および標的遺伝子の組織特異性の解析

研究課題名(英文) Analysis of environmental responsiveness and target genes of tissue-specific circadian clocks in plants

研究代表者

井上 佳祐 (Inoue, Keisuke)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：20805931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では組織特異的な生物時計の性質と標的遺伝子について解析した。葉肉細胞から維管束細胞の分化を誘導する系を用いて未分化の幹細胞集団を調整し、幹細胞における時計遺伝子の標的遺伝子を解析した。その結果、幹細胞において、時計遺伝子は細胞周期や細胞分化に関わる遺伝子を標的とすることを明らかにした。以上より、生物時計が幹細胞に置いて細胞分裂や細胞分化の制御因子を統合的に制御することで、細胞の運命を決定する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物時計が組織ごとに異なる性質を示すことは古くから知られているが、組織ごとの詳細な性質や標的遺伝子については未明であった。本研究では、幹細胞の生物時計が細胞周期や細胞分化を制御する遺伝子を直接的に制御することを明らかにした。生物時計による細胞分化の制御機構の存在は動物においても示唆されているため、生物時計による細胞分化の制御は種を超えた普遍性をもつと考えられ、本研究の知見は研究分野に新たな概念をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the characteristics of the tissue-specific circadian clock and its target genes. We analyzed the target genes of circadian clock genes in the stem cells obtained by using a differentiation induction system, which induces vascular cells from mesophyll cells through stem cells. We found that clock genes directly regulate the genes involved in the cell cycle and cell differentiation in stem cells. These results suggest that the circadian clock may determine the cell fate through the cooperative regulation of cell division and cell differentiation in stem cells.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：概日時計 組織特異性 細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物は外部環境における明暗や温度の約 24 時間の周期に対応する自律的な生物時計をもち、生理応答を適切なタイミングで制御することで外部環境への適応力を高めている。動物では、全身のほぼ全ての細胞が時計遺伝子を発現しているにもかかわらず、生物時計が組織ごとに異なる生理応答を制御することが知られている (例 脳の時計による睡眠や行動リズムの制御、肝臓の時計による代謝リズムの制御など)。植物においても生物時計は組織特異的に機能し、表皮の時計が温度刺激に応答して胚軸伸長を制御することや、維管束の時計が日長の変化に応答して光周性花成を制御することが報告されている[1]。

生物時計が組織特異的に生理応答を制御するメカニズムに関しては、ショウジョウバエを用いた研究から、時計遺伝子のシス配列に隣接する他の転写因子のシス配列が、時計遺伝子の DNA 結合領域を組織ごとに決定することで組織特異性を生み出すことが明らかとなっている[2]。動植物の時計遺伝子に相同性はないものの、(1) 動植物の生物時計は複数の転写因子によるフィードバックループという共通の分子機構によって構成されていること、(2) 植物においても日周期的な発現変動を示す遺伝子群が組織間で異なっていること[3]、(3) 植物でも隣接する複数のシス配列がプロモーターの応答性を決定する例が報告されていること[4]などから、上記のショウジョウバエの知見と同様に、植物の時計遺伝子も組織特異的に異なる標的遺伝子を制御することが強く予想された。

[1] Shimizu et al. (2015) *Nat. Plants* 1: 15163. [2] Meireles-Filho et al. (2014) *Curr. Biol.* 24: 1-10.

[3] Endo et al. (2014) *Nature* 515: 419-22. [4] Puente et al. (1996) *EMBO J.* 15: 3732-43.

2. 研究の目的

生物は光や温度の日内変動といった周期的な環境変化を予測し、対応するための仕組みとして概日時計を持っている。動物では組織特異的な概日時計が異なる標的遺伝子を制御し、それぞれの組織で特異的な機能をもつことが知られている一方で、植物の概日時計の詳細な組織特異性についてはほとんど明らかになっていない。しかし、これまでの知見から、植物においても組織特異的な概日時計が異なる生理応答を制御することから、それぞれ異なる標的遺伝子を制御する可能性が強く示唆された。そこで本研究では、植物の組織特異的な概日時計の標的遺伝子を同定し、その役割を明らかにする。生物時計が全身で同じ時間を刻むのではなく、組織特異的に異なるリズムを示し、異なる性質・役割をもつ生物学的な意義は未だ不明である。生物時計のメカニズムは動植物で共通しているため、植物の生物時計がもつ組織特異性を解析し、動物との比較解析を行うことで、生物種を超えて保存された生物時計の組織特異性の意義を理解できると考えられる。

3. 研究の方法

組織特異的な概日時計の中で、特に幹細胞における概日時計の機能を明らかにすることを目的に、主要な時計遺伝子の 1 つである LUX に GFP を結合した融合タンパク質を発現する形質転換体を用いて ChIP-seq 解析を試みる。均質な幹細胞を大量に調整するため、葉肉細胞から幹細胞への脱分化を経て維管束細胞に再分化させる分化誘導系を用いる。12 時間の明期と 12 時間の暗期の 24 時間サイクルで培養した植物体に対して、ZT0 に分化誘導処理を行い、その後は恒常白色光条件下で培養して脱分化および維管束細胞分化を誘導する。分化誘導系によって得られる幹細胞集団を材料に ChIP-seq を行い、LUX-GFP が結合する標的遺伝子群の同定を行う。

4. 研究成果

まず、サンプリングのタイムポイントを決定するため、分化誘導 24 時間前から誘導後 72 時間の計 4 日間を 8 時間ごとにサンプリングを行い、ウエスタンブロットによって LUX-GFP の蓄積量の挙動を解析した。その結果、分化誘導前は LUX-GFP の蓄積量に明確な日内変動が見られるのに対し、分化誘導直後から 48 時間の間では蓄積量に日内変動が見られず、常に高レベルに蓄積していた (図 1)。一方で、誘導後 48 時間以降は蓄積量の日内変動がわずかに回復していた。次に、日内変動が見られなかった分化誘導直後から 48 時間について 4 時間おきにサンプリングを行い、LUX-GFP の日内変動の有無をより詳細に解析した。その結果、4 時間ごとの時間解像度においても LUX-GFP の日内変動は確認されなかった。これらの結果と、分化誘導過程における葉肉細胞、幹細胞、維管束幹細胞、維管束細胞のマーカ遺伝子の発現パターンから、細胞の脱分化と共に LUX-GFP の日内変動が消失し、再分化とともに LUX-GFP の日内変動が回復すると考えられ、細胞の分化状態と概日時計のリズム形成が密接に関係していることが示唆された。細胞の分化状態と概日時計のリズム形成の関連は動物においても観察されるため、概日時計による細胞分化制御の種を超えた普遍性の存在が示唆された。

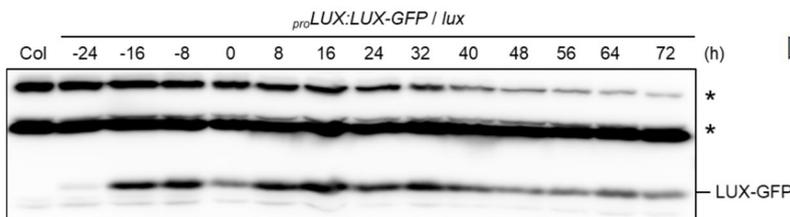


図 1 分化誘導過程における LUX-GFP の蓄積量変化

上記の結果から、分化誘導後 24 時間のタイムポイントにおいて、幹細胞マーカーの発現がピークに達すること、本来の日内変動とは異なり LUX-GFP が高蓄積することが明らかとなったため、誘導後 24 時間のサンプルを用いて ChIP-seq 解析を行った。得られたリードをシロイヌナズナのゲノムにマッピングし、MACS2 によって免疫沈降サンプルで濃縮される領域を探索したところ、*GI* や *PRR9* といった既知の LUX 標的遺伝子のプロモーター領域の濃縮が確認されたことから、今回の ChIP-seq が問題なく成功していることが確認された(図 2)。得られた結果を、植物体全体を用いて LUX-GFP の ChIP-seq を行った過去の知見と比較したところ、植物体全体を用いた場合では光合成関係の遺伝子群が標的遺伝子として多数検出されているのに対し、幹細胞を用いた今回の結果では細胞周期や細胞分化、エピジェネティック制御に関する遺伝子群が標的遺伝子として検出された(図 2)。これらの結果から、幹細胞の概日時計は細胞分裂や細胞分化に関する遺伝子を統合的に制御することで、細胞運命決定の舵取りを担うことが示唆された。

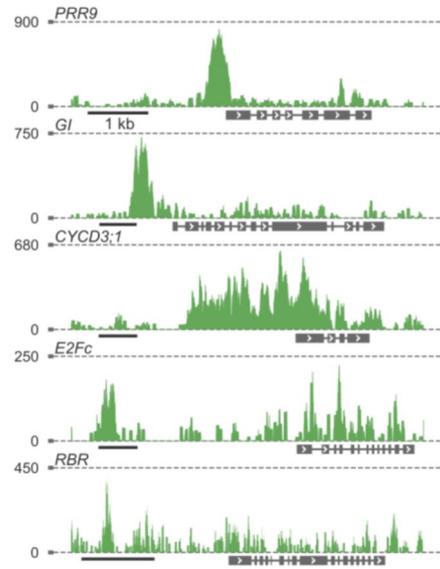


図 2 IGV による ChIP-seq の可視化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kotaro Torii, Keisuke Inoue, Keita Bekki, Kazuya Haraguchi, Minoru Kubo, Yuki Kondo, Takamasa Suzuki, Hanako Shimizu, Kyohei Uemoto, Masato Saito, Hiroo Fukuda, Takashi Araki, Motomu Endo	4. 巻 -
2. 論文標題 Origination of the circadian clock system in stem cells regulates cell differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1101/710590	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鳥井孝太郎・井上佳祐・別城啓太・荒木 崇・遠藤 求
2. 発表標題 Cell-type specific clock system regulates plant cell fate
3. 学会等名 日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鳥井孝太郎・井上佳祐・別城啓太・遠藤 求
2. 発表標題 細胞タイプ特異的な概日時計が細胞の運命を決定する
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鳥井 孝太郎 (Torii Kotaro)		
研究協力者	遠藤 求 (Endo Motomu)		