

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770036

研究課題名（和文） 植物における中枢時計の探索

研究課題名（英文） Searching for main clock in plants

研究代表者

遠藤 求 (ENDO MOTOMU)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：80551499

研究成果の概要（和文）：

本研究は植物における生物時計の組織特異的な機能を明らかにするための第一歩として、組織特異的に時計機能を阻害した系統の作出および時計遺伝子のプロモーター活性を組織特異的に測定するための系の開発を目指した。茎頂・表皮・葉肉・維管束・根および自身のプロモーターや CaMV35S プロモーターを使い組織/器官特異的に時計機能を阻害した 24 系統の作出に成功した。また、スプリットルシフェラーゼを応用することで、組織特異的な発光リズムの振動が測定された。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate tissue-specific functions of biological clocks in plants, we transformed and expressed TOC1-GFP or CCA1-GFP under several different tissue/organ-specific promoters, and suppressed biological clock functions tissue-specific manners. Some of transgenic lines showed late flowering phenotype and long hypocotyl length. Furthermore, by using split luciferase, we established reporter constructs that can detect clock promoters activity with tissue specific manners.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学，植物分子・生理科学

キーワード：生物時計 組織特異性 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

多くの生物は最適な季節に成長や生殖を行うために、日長を測る仕組みを獲得してきた。こうした反応は光周性とよばれ、光周性を説明するモデルとして外的符号モデル (external coincidence model) が有力とされている。例えば長日植物であるシロイヌナズ

ナでは、時計遺伝子の発現ピークは日長に依存せず一定であり、長日条件では遺伝子発現と光刺激が重なることで下流にシグナルを伝え、逆に、短日条件では遺伝子発現と光刺激は重ならないためシグナルを伝えない、とされている (図1左)。

しかし実際は、*TOC1* や *PRR3* などの一部の

時計遺伝子は日長依存的に発現ピークが遷移するため、単純な外的符号モデルは成り立たない(図1右)。こうした現象を盛り込むために、システムバイオロジーの研究者らは、従来のモデルに比べてはるかに複雑なモデルを提唱するに至っていた。

申請者はこれまでに、シロイヌナズナの日長刺激の受容体は葉の維管束で機能して花成を制御していることを明らかにしてきた。また、生物時計の支配下にある光周性花成の実行遺伝子(*CO*や*FT*)の発現は葉の維管束に限定されている。こうしたことは、外的符号モデルにおいて、日長刺激と生物時計の両シグナルの統合が葉の維管束で行われており、組織ごとに生物時計の機能が異なっている可能性を示唆するものである。そこで申請者は、生物時計機能の組織特異性を考慮に入れることでより直感的に理解しやすく正確な生物時計モデルを構築できるのではないかと考えた。

これまで植物の生物時計は細胞自律的であると漠然と考えられてきており、組織特異的な生物時計の機能についてはほとんど考えてこられなかった。しかし、

- ① 花成などの実現には、個々の細胞が持つ概日リズムを個体レベルで統合する必要があること、
 - ② ヒト・マウス・ハエなどでは、脳にある強大な生物時計の中核(主要時計)と末梢臓器にある弱い時計(末梢時計)という形で生物時計機能の組織特異性が知られていること、
 - ③ 植物も動物と同様、器官間で概日リズムシグナルをやりとりしている可能性があること、
 - ④ 少なくとも植物の地上部と根では生物時計の挙動が異なっていること、
 - ⑤ ある分子の発現パターンとその分子の機能が必要な器官/組織は必ずしも一致せず、申請者が明らかにした例も含めて、こうした例は決して珍しいものではないこと、
- などから、植物においても生物時計機能に器官/組織特異性が存在することが強く予想される。

動物の主要時計は外科的な手術により中枢を切除・移植するといった実験によって発見された。しかし、植物は脳に対応する明確な中枢を持たず、特定の組織を外科的な方法で取り除くことが困難である。また、周囲の影響から切り離された培養細胞系などでは組織/細胞間の相互作用は失われ、生命現象を生体内のコンテキストで解析することは困難である。こうした問題を解決するためには、生体内の分子動態を高い時空間分解能で測定することが必要であり、このことによって植物における生物時計の組織特異性の解析は大幅に進むと考えられた。

2. 研究の目的

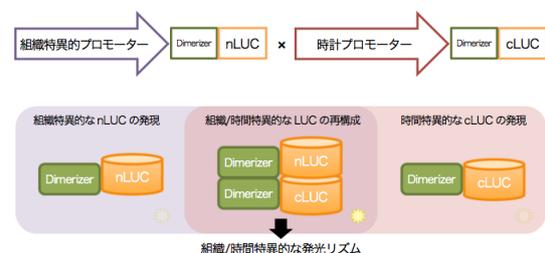
細胞/分子レベルで明らかになりつつある知見をもとに上位の器官/組織レベルで生体を理解するためには、それぞれの組織の機能特異性(不均一性)を明らかにしたうえでモデルを構築する必要がある。しかし、生体内の特定の組織における分子動態を高い時空間分解能で測定することは難しく、平均化された細胞群や生体から切り離された培養細胞系を用いての解析が主流となっている。本研究では、植物の生物時計をモデル系とし、高い時空間分解能で生体内組織/細胞の分子動態を定量する方法を開発することで、植物における生物時計の組織特異的な役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

申請者の予備的解析を含め、組織特異的な生物時計機能の存在は示唆されているものの、そうした組織特異的な生物時計が生体内でどのような役割を担っているのかについては全く不明である。

本研究では、シロイヌナズナの生物時計の構成因子を過剰発現させるとフィードバックループの働きによって生物時計のリズムが完全に失われることを利用し、組織特異的なプロモーターを用いて時計遺伝子を過剰発現させることで組織特異的に生物時計の機能を阻害したシステムを作出する。こうして作出した形質転換植物を、さまざまな環境下で栽培し表現型解析を行うことで、各組織における生物時計の役割を明らかにする。

さらに、植物組織の直接的単離・定量的PCRとは異なる原理で、生体内における時計遺伝子の挙動を組織特異的に測定するための方法として、N末端およびC末端に分割したLUC(スプリットルシフェラーゼ)に対して二量体化因子(Dimerizer)を融合させたものをそれぞれ組織特異的なプロモーターおよび時計プロモーターで発現させることで、両者の発現が重なる時間・空間でのみ二量体化因子の働きによってLUCが再構成され組織/時間特異的な発光リズムの検出を目指す。



4. 研究成果

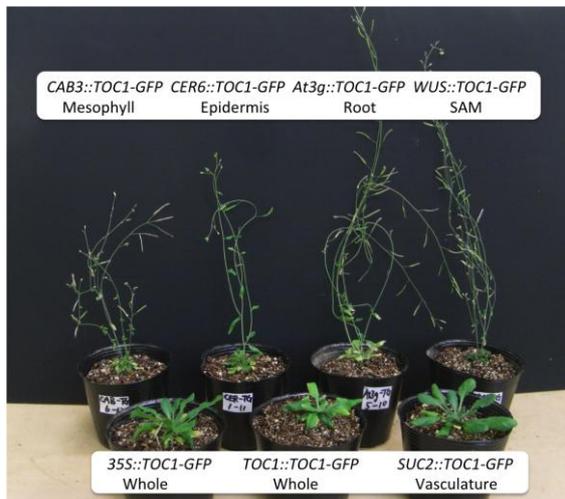
植物な主要な器官/組織である茎頂・葉肉・維管束・表皮・根の各部位で TOC1-GFP と CCA-GFP を発現させるために茎頂のプロモーターとして UFO, WUS、葉肉のプロモーター

として CAB3, Lhcb2.1, CA1、維管束のプロモーターとして Sultr1:3, Serat2:1, SUC2、表皮のプロモーターとして AtML1, CER6、根のプロモーターとして At3g25820/25830 をそれぞれ用いた。プロモーターの長さは 3kb 程度とし組織特異的な発現を示すには十分な長さである。これらのプロモーターに加え、過剰発現のための 35S とコントロールのための TOC1, CCA1 のプロモーターを加えた計 13 種類のプロモーターについて TOC1-GFP と CCA1-GFP を組織特異的に発現させた系統 (全 24 種) を作出した。

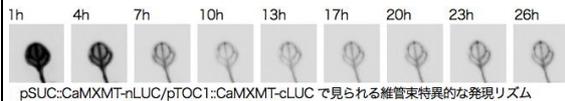
作出した系統は T2 世代において複数個体の平均として遺伝子の発現量を qPCR で定量し、阻害効果が高いと期待できる高発現株を各系統についての 3 つずつ得、それらのホモ化を目指した。最近になって全ての系統のホモ化が完了した。

全ての系統についての解析は済んでいないものの、TOC1 を組織特異的に発現させることで時計機能を阻害したシリーズでは、35S::TOC1-GFP や TOC1::TOC1-GFP, SUC2::TOC1-GFP といった維管束の篩部伴細胞を含む組織で時計機能を阻害した系統において、強く花成遅延の影響が見られることが明らかとなった。このことから、花成の促進に関しては維管束篩部における生物時計機能が重要であることが示唆された。これは既に報告されている花成ホルモンである FT の発現部位が維管束篩部伴細胞であることと一致するものであり、花成制御における維管束の生物時計の重要性が改めて示された。

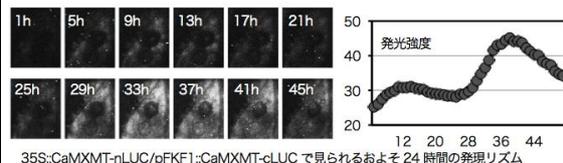
さらに、得られた系統の中には葉の大きさや胚軸伸長などに野生型と異なる表現型を示すものが見られており、これらについても順次解析を進めている。こうした結果から、植物にも生物時計の組織特異的な機能分担が存在していることが示され、今後の細胞や組織レベルでの解析の重要性が示唆された。



また、こうした植物における生物時計の組織特異的な役割を理解するために、時計遺伝子のプロモーター活性を組織特異的に測定するための系の開発を進め、シロイヌナズナの維管束特異的に時計遺伝子 TOC1 の発現リズムを測定するための形質転換植物 pSUC2::CaMXMT-nLUC/pTOC1::CaMXMT-cLUC (CaMXMT はコーヒーのカフェイン合成経路に関わる酵素をコードするホモ二量体化因子) をすでに作出しており、維管束特異的に LUC による発光リズムが測定されることを見出している。



また、同様の結果はタバコの一過的発現系においても測定されており、二量体化因子を介して LUC が再構成されることや発光強度が約 24 時間のリズムを持っていることが確認された。



これらの結果から、植物における生物時計の組織特異的な機能分担が確かに存在することが示された。また、それを解析するための新しい手法としてスプリットルシフェラーゼを用いた方法が有効であることが示唆された。今後は、ここで見られたリズムが定量的 PCR の結果と一致するかどうかを様々な条件で確認し、測定系の評価を進めると共に、組織特異的なプロモーターや時計プロモーターのカタログ化を進め、さまざまな組織でさまざまな時計遺伝子の挙動を測定できるようにしていく。さらに、この方法でネックとなっているプロモーター強度に依存した形を改めるために植物ではあまり応用例の無いリコンビナーゼを利用した形質転換植物の作出も行う。測定系が完成した後は、こういった条件や組織で組織特異的な制御メカニズムが測定できるかを明らかにするとともに、マイクロアレイを行なっていく予定である。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①構成的アプローチを用いた植物における
生物時計の組織特異性の役割の解明

第 53 回日本植物生理学会 2012/3/17

京都産業大学

②生物時計の組織特異的な機能分担の解析
に向けて

日本植物学会第 75 回大会 2011/9/17

東京大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 求 (ENDO MOTOMU)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：80551499