

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月29日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657033

研究課題名（和文） 概日リズム消失植物培養細胞を土台にした概日時計再構成系構築

研究課題名（英文） Reconstruction of circadian clocks in plant clock-less culture cells

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：ウキクサで樹立した概日リズムを消失した培養細胞株を、（脱）分化過程や分裂細胞で生じる時計システムの擾乱のモデルと見なし、外来遺伝子導入による遺伝子操作でリズムの復活を目指した。リズムの復活にはいたらなかったが、細胞分裂能を有する点で共通な通常植物個体の分裂組織の細胞のリズム特性と分化過程における概日リズム動態の一端をあきらかにした。

研究成果の概要（英文）：We established a strain of duckweed culture cells that lacked the circadian rhythmicity. Culture cells are a model for the cells with a number of perturbations of circadian oscillation that could be generated through the processes of differentiation/de-differentiation and cell proliferation. We tried reconstruction of the clock system in the clock-less culture cells by gene modification.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答、概日時計、培養細胞

## 1. 研究開始当初の背景

高等植物の概日時計分子機構について、シロイヌナズナを材料とした分子遺伝学的手法によって、時計関連遺伝子やそれらの相互作用様式などの理解が進んでいた。申請者は概日リズムの測定法としてパーティクルガンを用いた生物発光レポーターの一過的発現

系を利用し、植物対象を選ばず簡便で時間のかからない実験方法を開発・確立していた。さらに、この系を応用して、過剰発現やRNAiのためのエフェクターコンストラクトをレポーターと共導入することで、導入細胞内の遺伝子発現状態を操作する系も確立していた。一方で、申請者はウキクサのカルスおよ

びそれに由来する培養細胞を作製した。上記の発光レポーター系を利用した測定では、連続明条件下で生物発光リズムが観測されないことを明らかにしていた。つまり、培養細胞も植物体も遺伝的背景は基本的に同一と考えられるが、培養細胞では概日リズム生成ができなくなったと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は概日リズムを失った培養細胞を対象に、人為的に時計関連遺伝子の発現様式を変化させることにより、生物リズムを再構成することを目標とした。植物の概日時計は時計関連遺伝子ネットワークによって自律的な発振を行っていると考えられており、概日リズムが見られなくなった培養細胞等ではこれらのネットワークが正常に機能していないと考えられた。このネットワーク異常は時計突然変異体のような遺伝的に不可逆的なシステム異常ではなく、例えばカルスを植物体に再生させると可逆的にシステムが復活すると期待される。培養細胞の状態のまま細胞の時計を復活させることが出来るのではないかと考えたことが研究動機となった。

## 3. 研究の方法

概日リズムを示さないウキクサの培養細胞を用いて概日リズムの再構成、および、そのための理論的背景構築を以下の手順で目指した。(1) 時計関連遺伝子の発現解析による(潜在的)概日振動状態の観測、(2) 個々の細胞の概日リズム観測による細胞間のリズム動態の相違の検証、(3) 主要時計遺伝子の人為的発現操作による(潜在的)概日振動状態への影響評価と、概日時計の再構成。さらに、(4) 植物で細胞増殖・分化が連続的に起こる根の伸長時の概日リズム動態解

析を行った。

(1) 培養細胞における時計関連遺伝子の発現解析。ウキクサ培養細胞を用いて、時計関連遺伝子の重要な LHY 遺伝子の発現様式を発光レポーター系で調査した。パーティクルボンバードメンド法による遺伝子導入法を主に用いた。

(2) 細胞間のリズム動態相違の検証。超高感度 EM-CCD カメラによる培養細胞塊にある、単一細胞発光の長期間連続測定系の開発とともに、ウキクサ培養細胞の個々の細胞概日リズム測定を試みた。

(3) 時計関連遺伝子の人為的操作による概日振動状態への影響評価と概日時計再構成。時計遺伝子の RNAi コンストラクトと発光レポーターコンストラクトと共導入する系を利用した。

(4) 根の伸長時の概日リズム動態解析。シロイヌナズナの CCA1 プロモーター下流でルシフェラーゼ遺伝子を発現させたシロイヌナズナ形質転換体の芽生えの根の生物発光を連続的に画像モニターすることで、根端分裂組織周辺と伸長した根での発光リズム空間パターンの解析を行った。この研究は大阪府立大の福田弘和助教が取得したデータを元に、共同で進めた。

## 4. 研究成果

ウキクサの培養細胞を用いて概日リズムの再構成を目指したが、研究期間中に再構成を実現させるに至らなかった。一方で、大阪府立大の福田博士らと行った培養細胞同様に未分化で増殖能をもつ分裂組織の細胞および、その分化過程で生じる概日リズムの頑健性・脆弱性に関する研究は一定の成果を得た。これらの成果について、『研究の方法』の順に従い、以下にまとめた。

(1) 培養細胞における時計関連遺伝子の発現解析。

通常個体において朝方に発現する遺伝子の中でも、明暗環境下でリズムを示すものと、リズムをもたないものが見つかった。連続明という特殊な条件下だけでなく、明暗周期に対する細胞の発現応答も培養細胞において異常になっていることを示唆した。

(2) 細胞間リズム動態相違の検証。

通常個体における単一細胞概日リズムの観測の開発を行うと同時に、培養細胞におけるリズムの動態観測を試みた結果、単一細胞レベルでもリズム異常を示すことが示唆された。

(3) 時計関連遺伝子の人為的操作による概日振動状態への影響評価と概日時計再構成。

いくつかの時計関連遺伝子について人為的操作を試みたが、時計の再構成には至っていない。

(4) 根の伸長時の概日リズム動態解析。

シロイヌナズナの根端分裂組織および分裂組織から生じる分化した根の概日リズムを時空間的に解析した結果、分裂組織においても概日リズムは維持されているものの、細胞が増殖能を失い伸長する段階で、概日時計が一度リセット（あるいは休止）され、伸長が終わり分化する段階で再び概日時計が同じ位相で動き始めることが明らかになった。この結果は、培養細胞に限らず概日リズムが維持されない状態が通常の植物個体でも存在し、それは植物（細胞）の分化過程に大きく依存していることを明確に示した最初の例になった。これまで、一定条件においては、どの細胞においても概日時計が働いていると考えられていたが、少なくともある種の分化過程で生じる擾乱に対してはリズムを維持できないことを明らかにしたことで、時計

システムの安定性を評価する上で分化過程の時計システム状態の変動が重要な指標となることを示した。これらの結果は、細胞時計の状態変動と細胞間の相互作用の影響についての数理モデルの構築につながった。

当初の目的である概日リズムのない培養細胞株における概日時計の再構成という目標は未だ途上にあるが、現在、単一細胞レベルで概日リズムの復帰を観測する系を立ち上げつつあり、今後の研究発展につなげていけると考えられる。また、通常個体においても、概日時計の停止と再生が行われていることを示したことにより、培養細胞においても概日時計の再構成が可能でないことを示唆することができた点は大きな研究の進展であった。

## 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1件)

Fukuda H, Ukai K, Oyama T

Self-arrangement of cellular circadian rhythms through phase-resetting in plant roots

Phys. Rev. E (査読あり) vol. 86, 41817 (2012)

DOI: 0.1103/PhysRevE.86.041917

[学会発表] (計3件)

(1) 小山時隆、高等植物の概日リズム特性  
第19回日本時間生物学会学術大会  
北海道大学学術交流会館（北海道）  
2012年9月15日

(2) 小山時隆、Characterization of cellular circadian oscillators in plants  
第53回日本植物生理学会年会

京都産業大学（京都市）

2012年3月18日

(3) 小山時隆、Gene introduction methods for the analysis of biological rhythms in duckweeds

The 1st International Conference of Duckweed Research & Applications

Wangjiang Hotel (中国成都市)

2011年10月8日

[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

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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：