

「葉から始まる植物概日時計の長距離相互作用」

研究期間:2020年10月～2024年3月

研究者:高橋 望

1. 研究のねらい

地球の自転による24時間周期の環境変化に対し、多くの生物が体内に概日時計を持つことでタイミングを予測し、生理機能を適応させている。哺乳類においては、個々の細胞が概日時計を持ち、その中でも脳深部の視交叉上核に存在する中枢時計が、液性因子や神経を通じて体各所の末梢時計を支配する、という階層性が認められている。一方、植物については長年のあいだ、個々の細胞に備わる概日時計が自律的に機能していると考えられていた。そのため、多くの植物概日時計研究では植物体全体が用いられ、細胞もしくは組織、器官レベルでの特異性や階層性は不明であった。しかし近年に入り、葉において維管束の概日時計が日長依存的に花成を制御し、表皮の概日時計が温度依存的に細胞伸長を制御することが報告され、植物の概日時計でも生理応答や機能の分担が行われていることが分かった。さらに植物体の地上部と根で時間情報が伝達されていることや、葉の維管束の概日時計が葉肉の概日時計を制御していることも報告され、時計どうしのコミュニケーションの存在についても明らかになり始めてきた。

本研究では、植物の各組織・器官にある細胞の時計どうしがどのように相互作用するのか、また、時間情報をどのように共有・統合して個体全体としての生理機能最適化に役立てているのかについてさらに総合的に理解するため、光合成や蒸散などの重要な活動を担う場である葉の概日時計に着目する。葉の時計機能については、前述の通り細胞組織での特異性や細胞間の階層性は明らかになっているが、はたして茎頂や根といった他の器官の細胞にある時計と時間情報のやりとりをし、植物全体の概日時計の制御に関わっているかは分かっていない。これは、葉と他器官での概日時計の相互作用を直接的に確認する手法が確立されていないことが理由に挙げられる。また、葉から維管束を通じてシグナリングされていると考えられる時間情報の伝達物質についても、糖類や、RNA、タンパク質など様々な候補が挙げられているが、それらの物質が葉から長距離を移動して時間依存的に概日時計に作用することを実証した報告はまだ無い。そこで、葉の細胞にある概日時計とコミュニケーションを行う器官および細胞組織の特定と、時間情報伝達に関わる時計遺伝子の特定を目指す、また、時間情報の伝達に使われる物質の同定、さらにその物質が概日時計に作用する仕組みの解明を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

葉を中心とした概日時計の長距離コミュニケーションを解明すべく、葉の接ぎ木を用いた概日リズム測定技術をモデル植物シロイヌナズナで確立し、解析を行った。その結果、正常な概日時計を持つ野生株の葉が概日リズム喪失株本体のリズムを回復させること、そして野生株の本体が概日リズム喪失株の葉のリズムを回復させることがわかり、葉と植物本体の概日時計のあいだで双方向にコミュニケーションが行われていることが明らかになった。これは、植物が持つ概日時計ネットワークは、哺乳類が持つ中央集権型の構造とは異なり、器官どうしの時計が相互に影響を与え合う非中央集権型である可能性を支持するものであった。さらに、振幅や周期といった葉の時計が持つ概日リズムのパラメーターが維管束組織を介して植物本体に伝達することも明らかになり、葉からのコミュニケーションの性質についても理解を深められた。

時間情報伝達物質については、さきがけ研究期間中に具体的な候補物質を同定するまでは至らなかったが、接ぎ木実験の結果から、24時間以内に消費されるものであること、主に朝型の時計遺伝子の発現に対して作用するものであること、そして少なくともアブラナ科植物の中では種を超えて情報伝達可能なものであることが明らかになった。現在も引き続き、同定に向けた解析を進めている。

(2) 詳細

研究テーマ 1. 「接ぎ木を用いた葉を中心とする時間情報コミュニケーションの検出・解析」

本研究にて確立した葉の接ぎ木実験の概要は、図 1. に示すとおりである。

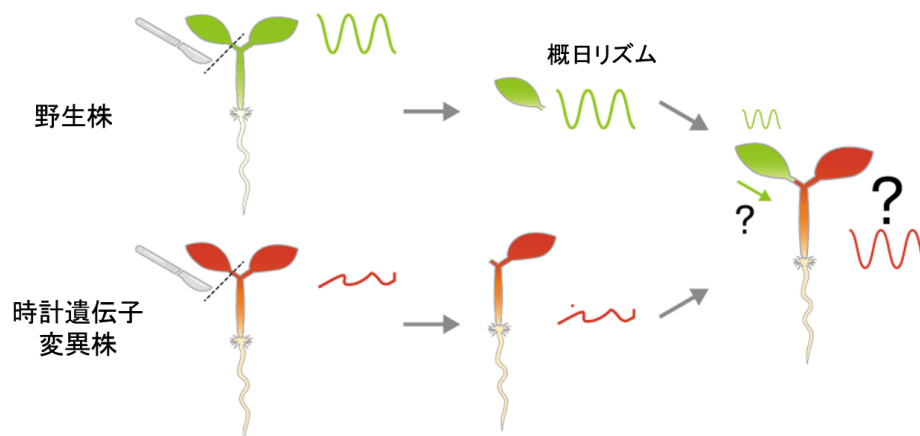


図1. 葉の接ぎ木法を用いた実験の例：シロイヌナズナの時計遺伝子変異株に野生株の葉を接ぎ木し、葉から時間情報が植物体に伝達され、概日リズムに影響が出るかを調べる。

正常な概日リズムを示す野生株の子葉を、概日リズムが失われた時計遺伝子変異株の植物体に接いだ接ぎ木体を作成し、恒明条件下で発光測定を行ったところ、植物体本体のCCA1::LUC 活性に約 24 時間周期の概日リズムがみられた（図 2A）。また、接ぎ木の組み

合わせを反転させ、時計遺伝子変異株の子葉を野生株植物体に接いだケースにおいても、子葉の CCA1::LUC 活性が概日リズムを示した(図 2B)。このことから、シロイヌナズナの葉と本体の概日時計のあいだで双方向にコミュニケーションが行われていることが明らかになった。これにより、植物が持つ概日時計ネットワークは、脳の SCN を中枢とする中央集権型の哺乳類の概日ネットワークとは異なり、器官どうしの時計が相互に影響を与え合う非中央集権型である可能性が示された。

次に、葉のリズムの性質が時計遺伝子変異株のリズムに与える影響について調べた。葉の時計のリズムおよびその出力として送られる時間情報伝達物質が、変異株の内的リズムを駆動させるためのきっかけとしてのみ機能している場合は、変異株の回復リズムは葉のリズムの持つ周期や振幅などに関わらず、約 24 時間周期を示すと予想された。一方で、葉の持つリズムが変異株のリズムに対し強い同調力を持つのであれば、変異株のリズム回復様は、葉の時計の周期や振幅の影響を受けると予想された。そこで上記の変異株に、異なるリズム表現型が報告されている別の変異株の子葉を接ぎ木し、発光測定を行った。その結果、植物体のリズム回復様はおおむね葉の持つリズムの表現型を反映することがわかった。さらに、葉の中で時間情報が送り出されているのはどの組織なのかを調べた。葉は主に表皮・葉肉・維管束の 3 つの組織によって構成されていることから、それぞれの組織で時計機能を阻害した植物体の葉を用いて時計遺伝子変異株に接ぎ木を行った。時間情報の伝達に関係の薄い組織の時計が止まっても、重要な組織の時計が動いていれば変異株のリズムを回復させる能力は維持される一方で、時間情報の伝達に重要な組織の時計が止まった場合は、リズムは回復されることが予想された。接ぎ木体のリズム回復を観察したところ、表皮の時計が阻害された植物体の葉や、葉肉の時計が阻害された植物体の葉を用いた接ぎ木体ではリズムの回復がみられたのに対し、維管束の時計が阻害された植物体の葉を接いだ植物体ではリズムの回復はみられなかった。これらの結果から、葉の概日時計から送出される時間情報は、葉の時計が持つ概日リズムのパラメーターを含み、維管束組織を介して本体に届けられていることがわかった。

研究テーマ 2.「時間情報伝達物質の同定」

葉から本体に向けての時間情報は、維管束組織の篩管を通して伝達していることが予想された。そこで、EDTA 法やチューブ法などを用い、シロイヌナズナの葉から篩管液をタイムコースで採取し、オミクス解析を行うことを試みたが、さきがけ研究期間中に解析に十分なサンプルを得ることができず、具体的な候補物質をリストアップすることはできなかった。しかしな

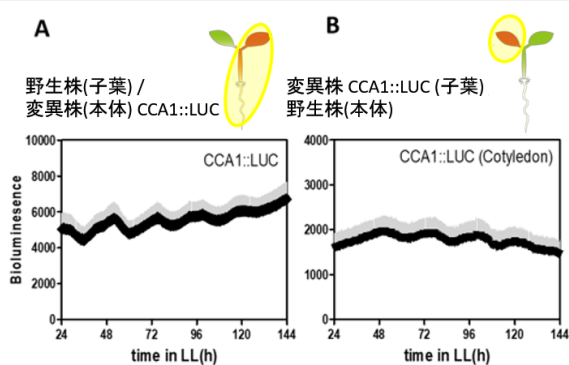


図 2. 葉の接ぎ木体の概日発光レポーター CCA1::LUC 活性。黄色円で囲まれた部位を測定した。

がら、伝達物質の性質については理解が進んだ。例えば、接ぎ木体から接ぎ葉を切除しリズムへの影響を観察した実験では、切除からおおむね 1 日で回復リズムが失われ、時間情報伝達物質は 24 時間以内に消費されるものであることがわかった。また、野生株の葉を接ぎ木した変異株茎頂の RNA-seq を行った結果、主に朝型の時計遺伝子のリズムが回復していることも明らかになった。さらに、異種間接ぎ木実験により、シロイヌナズナ以外のアブラナ科植物の葉でもシロイヌナズナ時計遺伝子変異株のリズムを回復させられることも示され、種を超えて情報伝達可能なものであることがわかり、同定に向けた手掛かりを得ることができた。

3. 今後の展開

本研究により、葉という植物にとって重要な器官の概日時計が外部と時間情報のやり取りを行っていることが明らかになった。また、その性質についてもある程度の知見を得られ、多細胞生物がもつ概日時計どうしの長距離相互作用についての理解を進められた。しかし、コミュニケーションに用いられた時間情報伝達物質についてはまだ同定がなされておらず、その物質が具体的にどのように離れた場所の概日時計に対して作用しているのかも明らかではない。現在、時間情報伝達物質の同定を行うための実験系を漸く確立しつつあり、その系にて候補物質を絞り込むべく、作業を進めている。得られた候補物質については、生合成・分解もしくは輸送に関わる遺伝子の変異体を用い、葉の接ぎ木実験を行って概日リズムへの影響を観察することを予定している。また、時間情報伝達物質の変異体と時計遺伝子変異体との接ぎ木の組み合わせや、候補物質や阻害剤の外部投与などにより、どの物質がどの時計遺伝子を介して概日時計の長距離コミュニケーションを行っているかを解明したいと考えている。葉も含めた植物各部の時計による長距離のコミュニケーション情報が、どのように個体レベルで統合され生理機能最適化に寄与しているのかについての知見を得ることも、今後 5-10 年以内に実現できることを目標としている。

4. 自己評価

本さがけ研究において、葉の接ぎ木を用いた概日リズム測定技術を開発し、葉を中心とした長距離時間情報コミュニケーションの存在を発見できたことで、一定の成果をもたらせたと考えている。特に、葉の接ぎ木技術については、対象を他の生理機能に関わる遺伝子の変異株や形質転換体と置き換えることが可能である。したがって、植物時計以外の研究においても、シロイヌナズナが誇る膨大な遺伝学的リソースを活用し組み合わせることで、葉と他器官のあいだでの多様な相互作用を、細胞や組織、器官のレベルで時系列的に解析できる利便性の高いツールとして活用されることが期待される。

一方で、時間情報伝達物質の同定については、サンプルを採取する段階で大きく躓いてしまい、期間内に候補物質を絞り込むための解析にまで至ることができなかったことを大いに反省している。解析の基盤となる手法については、複数の論文にて報告されており、時系列データの取得もさほど困難ではないと判断したが、より厳密な検討が必要であったと言わざるを得ない。現在、時系列解析が可能な実験系を確立しつつあり、全力で進め、近い将来の発表を目指している。

接ぎ木を用いた概日リズム解析法について、国際学会 33rd International Conference on Arabidopsis Research において招待発表を行い、国内外の様々な研究者から評価を得られたことは貴重な経験であり、研究者としての飛躍につながったと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. Hikari Ikeda, Taiga Uchikawa, Yohei Kondo, **Nozomu Takahashi**, Takuma Shishikui, Masaaki K Watahiki, Akane Kubota and Motomu Endo. “Circadian Clock Controls Root Hair Elongation through Long-Distance Communication” *Plant and Cell Physiology*, 2023 pcad076

植物の根には表皮細胞の一部が突出して形成される根毛と呼ばれる器官があり、栄養や水分の吸収効率向上に寄与している。本研究では、根毛の伸長に概日リズムが存在することを発見した。さらにそのリズムが時計遺伝子の変異体ではかく乱されることが、接ぎ木実験により地上部の概日時計が長距離の情報伝達を介して根毛伸長リズムを調節していることなども示し、植物の根において概日時計が細胞伸長制御に関わっている例を初めて報告した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

- ・ **高橋望** 第 28 回日本時間生物学会学術大会 2021 年 11 月
“A mobile ELF4 delivers circadian temperature information from shoots to roots”
- ・ **高橋望** 第 29 回日本時間生物学会学術大会 2022 年 12 月
“葉を中心とした植物概日時計の長距離相互作用”
- ・ **N.Takahashi** 33rd International Conference on Arabidopsis Research (ICAR2023) 2023 年 6 月
招待発表 “Characterization of the long-distance circadian communication through micro-grafting techniques”
- ・ **高橋望** 第 30 回 日本時間生物学会学術大会 2023 年 9 月
“葉を中心とした植物概日時計の長距離時間情報伝達”

受賞

- ・ **高橋望** 第 28 回日本時間生物学会学術大会 2021 年 11 月 優秀ポスター賞

その他メディア

- ・ **高橋望** 遠藤求. *健康・科学情報誌ヘルシスト* 46 巻 4 号 2022 年 7 月
“変化する自然環境を生き抜く「概日時計」の巧みな仕組み”
- ・ 遠藤求 久保田茜 **高橋望**. *JT 季刊 生命誌* 111 号 2022 年 12 月
“植物が刻む体内時計”