

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	中村駿志
論文題目	シロイヌナズナ単離細胞の概日リズム特性の研究		

(論文内容の要旨)

地球の自転による周期的な環境変化である昼夜サイクルに適応するために、多くの生物が概日時計を有している。概日時計は約24時間の周期のリズム (概日リズム) を生成し、環境変動をあらかじめ予測することによって生体内の状態を最適化している。シロイヌナズナ植物においては、約20個の時計遺伝子の転写—翻訳フィードバックループによって概日リズムが生み出されている。植物全体の細胞で時計遺伝子が発現することから、植物の概日時計は細胞時計の集合体として捉えることができるが、全ての細胞が均質な概日時計を有しているわけではない。先行研究から植物は組織特異的な細胞概日時計の集合体であり、茎頂から根などの他の器官への時間情報伝達が示唆された他、細胞時計は周りの細胞からの影響を受けていると考えられている。つまり、植物は器官や組織によって異なる不均一な細胞時計間を統合することによって、植物個体として外部環境の変動や細胞ごとの時計のばらつきに適応している。しかし、組織からの影響を受けない細胞時計の特徴や役割は依然として不明のままであった。本研究では、細胞自身が持つ固有の概日時計の特徴を明らかにすることによって、植物が細胞時計を統合し、個体として環境に適応する仕組みを理解することを目指した。プロトプラストとして細胞を物理的に単離し、個々の細胞概日リズムを様々な条件で調べることで、細胞が本来持つ概日時計の特徴を明らかにした。

第1章では、シロイヌナズナの葉から単離した細胞の発光概日リズムを長期的に測定できる条件を確立した。従来の方法では葉由来単離細胞集団の概日リズムは急激に減衰し、3日程度しか発光概日リズムを検出することができなかった。培地条件や細胞密度を検討することで単離細胞集団の概日リズムを11日以上測定することに成功し、様々な概日リズム解析を可能にする実験系を確立した。

第2章では、単一細胞レベルでの単離細胞の発光概日リズム測定系を確立し、細胞時計の特徴を明らかにした。概日リズムの三大性質である「自由継続性」、「温度補償性」、「同調性」を単離細胞が有することを明らかにし、植物の細胞一つ一つの概日時計が細胞自律的に機能することを実証した。また、葉由来単離細胞に加えて根由来単離細胞の概日リズムを調べることによって器官特異的な細胞時計の存在を示した。

第3章では、単離細胞の細胞間ではたらく作用によって単離細胞の概日リズムの安定性や明暗に対する細胞間での正確性を向上させていることを示した。葉由来単離細胞を高細胞密度下でみられるその作用は時刻情報とは直接関係のない細胞の分泌物質によって引き起こされていることを明らかにした。

単離細胞の発光概日リズムを単一細胞レベルで解析することによって、組織からの影響を受けない植物細胞時計の特徴を明確に示した。単離細胞という人工的な条件ではあるが、植物の概日時計研究を発展させるための基本的な知見を見出したことに加え、葉と根の細胞時計が植物の地上部や地下部といった植物内での不均一な環境に適合した性質を持つとのコンセプトを提唱した。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

中村駿志氏が研究対象とした概日時計は、地球上の生物が昼夜サイクルに適応するために獲得したシステムである。植物は概日時計システムを有しており、光周性花成・気孔の開閉・代謝など植物にとって重要な生理現象に関与している。植物の概日時計は細胞単位で複数の時計遺伝子の転写・翻訳ネットワークによって駆動されており、個々の細胞が概日リズムを示す。一方で、シロイヌナズナで観察されるような葉の上下運動など個体としての概日リズムを示すことから、その概日時計システムは植物個体として統制の取れた細胞時計の集合体であると考えられる。個々の細胞において組織特異的な概日リズムが観察されている一方、細胞自体が周りの細胞や組織から時間情報などの影響を受けるため、細胞が本来持つ概日時計の特徴を明確に示すことはできていなかった。中村氏は細胞時計を統合し、個体として環境に適応する仕組みを理解するために、細胞時計が有する固有の特徴を評価する研究に取り組んだ。

中村氏は細胞時計の特徴を明らかにするために、酵素処理によって植物体から物理的に単離された細胞であるプロトプラストを利用することを考えた。初めに中村氏はシロイヌナズナの葉からプロトプラストとして単離した細胞集団の発光概日リズムを長期測定するための実験系を構築した。

次に、個々の細胞の発光概日リズムを測定するために、中村氏は単一細胞の発光測定系を立ち上げ、シロイヌナズナの葉と根から単離した個々の細胞の概日リズムを調べた。その結果、単離された細胞一つ一つが概日リズムの三大性質である「自由継続性」、「温度補償性」、「同調性」を満たすことを明らかにした。これは植物細胞時計の独立性の高さを裏付けるものであった。加えて、葉と根由来の単離細胞において温度補償性の堅牢度の違いなどを見出し、器官特異的な概日時計の存在を細胞レベルで明確に示した。また、高細胞密度によってシロイヌナズナの葉由来細胞の概日リズムの安定性と明暗に対する正確性が向上することを示し、植物個体内で見られる概日リズムの頑健性と細胞間での位相合わせの基盤となる現象を提示した。

本研究は、様々な条件における細胞時計が有する固有の特徴を丁寧に調べることによって、これまで見過ごされていた細胞時計の独立性の高さを実証した研究として高く評価された。本研究の内容は、*Plant Biotechnology*誌と*Plant and Cell Physiology*誌に掲載された。中村氏が実施した研究は植物が有する概日時計システムの本質に迫るものであった。この研究は概日時計研究の発展に寄与するもので、学位論文として十分価値あるものと評価される。よって本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年2月2日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降