

京都大学	博士 (理学)	氏名	村中智明
論文題目	植物の概日時計が多細胞系として示す挙動の研究		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>概日時計は生物の内部に振動を生み出し、昼夜サイクルへの適応を可能としている。この振動は時計遺伝子が転写・翻訳フィードバックループを形成することで生成される。植物個体内の細胞は、その多くで時計遺伝子を発現しており、細胞概日時計として機能すると考えられる。しかしながら個体内での細胞時計の挙動に関する知見は乏しく、安定性や相互作用様式など基本的な性質すらわかっていないのが現状であった。本研究では、パーティクルガン法によるウキクサ植物への発光レポーター導入技術を基盤として、個体内の細胞の概日リズムを個別に測定する技術を開発した。さらにそれをもとに、イボウキクサにおいて個体内の個々の細胞が示す概日リズムを解析し、植物の概日時計システムを細胞レベルから理解することを目指した。</p> <p>まず、個体内における個々の細胞の遺伝子発現変動を測定する技術の開発を行った。遺伝子発現変動の測定には、ルシフェラーゼを用いた発光レポーターが用いられてきたが、形質転換体では個々の細胞の発光が分離できず、単一細胞由来の発光の測定は不可能であった。そこで、パーティクルガン法による遺伝子導入では個体表面近くの細胞に遺伝子がまばらに導入される点に注目し、発光レポーターをパーティクルガンでイボウキクサに導入し、高感度カメラでイメージングすることで、個々の細胞由来の発光を分離して測定することに成功した。</p> <p>次に、朝方に発現する<i>AtCCA1:LUC</i>をレポーターとし、イボウキクサ個体内の細胞が示す概日リズムを解析した。定常条件では個々の細胞の概日リズムは脱同期を示し、個体全体での時間情報の共有が維持されないことが明らかとなった。脱同期が生じる要因として、細胞時計の周期不均一性と周期不安定性が推定された。脱同期状態において近傍細胞で位相差が減少したことから、細胞間相互作用による同期現象が示唆されたが、その強度は個体全体を統合できるほどは大きくないと考えられた。また、脱同期状態の個体が明暗条件へ同調する過程の解析から、個体内の細胞時計は細胞自律的に環境刺激に応答することが示唆された。さらに、明暗条件においては細胞時計の位相は連続的な空間パターンを示し、その挙動が個体上の位置に強く影響を受けることが明らかとなった。以上の解析から、個々の細胞時計は、定常条件においては固有の周期で振動し外部刺激に細胞自律的に応答する独立した概日時計として振る舞うが、明暗条件においては連結した時計として機能し得ることが示唆された。</p> <p>また、イボウキクサ以外のウキクサ植物を実験材料とすることを目指し、4属5種のウキクサ植物において生物発光の測定を同一条件で行うことができる培養培地を開発した。さらに、パーティクルガンによる遺伝子導入の簡便さに注目し、ウキクサ植物にみられる個体レベルの概日リズムの多様性について解析を行った。その結果、ウキクサ植物の概日時計において、昼夜サイクル下で時間情報を保持する機構は保存されているが、その分子機構はある程度多様化していることが示唆された。</p> <p>以上のように本研究では、1細胞発光測定系を新規に構築することで、これまで知見の乏しかった植物個体内における細胞概日時計の基本的性質を明らかにすることに成功した。また、本研究で発見した明暗条件下における位相空間パターンは、今後の細胞時計間の相互作用機構の解析に大きく貢献すると考えられる。さらに、維管束組織の発達度や個体サイズに大きな多様性があるウキクサ植物を用いることで、個体の構造が細胞時計集団の挙動に与える影響の理解が進むことが期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

村中智明氏が研究対象とした概日時計は、植物において光周性応答やショ糖代謝など様々な生理現象に関与することが明らかとなっている。多細胞生物において、個々の細胞が概日時計として機能することは古くから指摘されていたが、個々の細胞が示す概日リズムの直接的な観測は技術的に困難であった。近年になって、発光レポーターの開発と光学的測定技術の進歩により、個々の細胞における時計遺伝子の振動が観測可能となったが、その対象は主に動物の培養組織や培養細胞に限られていた。植物では発光レポーター形質転換体において個々の細胞の発光が分離できないことが細胞概日リズムの測定ができない要因であった。そこで村中氏はパーティクガン法によるまばらな遺伝子導入に着目し、1細胞発光測定系を新たに構築することで、植物の概日時計を多細胞系として理解する上で基盤となる研究を遂行した。

第1章では1細胞測定系の開発過程が報告されている。材料として、小型かつ平坦な形態をもつウキクサ植物を選択したことで、個体全体の高解像度かつ長期間の測定に成功している。また、レポーターが導入される細胞の種類や、細胞発光特性の導入DNA量依存性について解析を行い、本測定系を使用した解析の基盤となる知見まとめている。本測定系は、今までの主流であった個体レベルでの遺伝子発現解析では見ることのできなかつた細胞レベルでの遺伝子発現挙動を解析するための強力な手法になると考えられる。

第2章ではイボウキクサを材料として、植物における細胞時計の性質を初めて明らかとしている。とくに、周期不均一性と周期不安定性を定量的に解析し、哺乳類であるマウス線維芽細胞の細胞時計の性質と似通っていることを明らかとした。植物と哺乳類では、時計遺伝子の起源が全く異なる。また、哺乳類では神経系が概日時計の中核として機能するのに対して、植物には神経系はなく、概日時計は分散システムとして働くと考えられる。このような大きな差異にも関わらず、植物と哺乳類で細胞時計の挙動に見られる基本的な性質が似通っていることには大きな興味もたれる。また、村中氏は明暗条件において細胞時計の位相は連続的な空間パターンを示すことを発見した。このことは先行研究で指摘されてきた植物における細胞時計の独立性の高さは、定常条件にのみ当てはまることであり、明暗条件においては個々の細胞時計は協調して機能し得ることを示唆している。この空間パターンは再現よく観察できるため、これまで不明であった細胞間相互作用の分子機構に迫る上で重要な現象であると考えられる。

第3章では4属5種のウキクサ植物について個体レベルの概日リズムの解析を行っている。その結果、概日リズムの多様性を簡便に解析することに成功し、ウキクサ植物が概日時計の分子機構の多様性解析の材料として優れていることを示した。ウキクサ植物は維管束組織の発達度や個体サイズに大きな多様性がみられる。そのため、ウキクサ植物全般を材料として細胞レベルでのリズム解析を行うことで、維管束組織や個体サイズなど、植物体の構造が個々の細胞時計の挙動にどのような影響を与えるかを検討することができると考えられる。よって、今後の研究展開にも大いに期待が持てる。

以上のように、本論文で述べられた研究の質は高く、今後の植物の概日時計研究の展望を大きく開くものである。本論文の一部は国際誌*Plant Cell Physiology*及び*Plant Biology*に掲載された。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、平成27年8月18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