

目次

要旨	2
略語表	4
緒言	7
1-1 序論	9
1-2 結果	13
1-3 考察	22
1-4 材料と方法	26
2-1 序論	30
2-2 結果	34
2-3 考察	44
2-4 材料と方法	47
結言	50
文献	51
謝辞	58

要旨

生物はミクロな遺伝子発現からマクロな生理現象まで様々なリズムを内包している。これらの生物リズムは内外の環境変動に適応するために厳密に調節されており、頑健なリズム制御は生物の恒常的な活動にとっては欠かすことができない重要なメカニズムとなっている。その一方で、リズムの変調をうまくシステムに組み込み、生物の発生を制御するリズム現象も知られているものの、その例は少ない。こうしたリズムの変調による制御メカニズムがこれまでほとんど明らかにされなかった理由として、従来の解析手法では時空間解像度が低く細胞ごとに不揃いなリズムの時系列解析が困難である点が挙げられる。近年になって、1細胞 RNA sequencing (RNA-seq) が普及し、1細胞の遺伝子発現データをその他多くのデータとつなぎ合わせることで、詳細な時系列解析を行うことが可能になってきた。そこで、本研究では植物ではまだ報告例が少ない1細胞 RNA-seq を用いることで、植物細胞の分化過程における新たなリズムの変調を計測し、それがどのように細胞分化に関わるのか明らかにすることを目的とした。

第一章では、細胞分化の指標である特殊な細胞周期エンドサイクルと植物ホルモンオーキシンの関係に着目した。これまで、エンドサイクルの進行にはオーキシンレベルが低いことが必須であるとされていたが、実際にエンドサイクルが進行する細胞ではオーキシンレベルは高い、という矛盾があった。そこで、既に公開されている1細胞 RNA-seq データを再解析することで、エンドサイクルと有糸分裂サイクルの時系列を再構築し、それぞれにおけるオーキシンレベルを推定した。その結果、オーキシンレベルはエンドサイクル内でのみ変動し、オーキシンの必要なフェーズでのみ細胞内のオーキシンレベルを増大させ、不要なフェーズでは低減させる仕組みの存在が明らかになった。さらに、この細胞自律的なオーキシンレベルの変動こそがエンドサイクルの進行の要であることも示した。

第二章では生物リズムで最も有名な概日リズムの変調とそれによる細胞分化制御を解析した。これまで1細胞 RNA-seq データの時系列解析は時間情報を加味しておらず、概日リズムのような時間経過による変動リズムを捉えることは難しかった。そこで、擬似的な時間軸に実時間の情報を付与するアルゴリズムを新たに開発し、分化誘導系を用いることで幹細胞の分化過程における概日リズムの変動を観察した。その結果、脱分化により生じた幹細胞では概日リズムの振動が停止し、分化が進行するにつれ概日リズムが現れることが明らかとなった。

さらに、分化後の時計遺伝子の発現プロファイルは脱分化前の細胞のものとは大きく異なっていたことから、幹細胞において概日時計システムが再構成されていることを示した。この概日リズムの変調が実際に細胞分化・分裂関連遺伝子の発現を制御していたことから、概日時計の変調により細胞運命が制御されていることが明らかになった。

略語表

遺伝子名

1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID SYNTHASE 6	(ACS6)
AINTEGUMENTA	(ANT)
ALCOHOL DEHYDROGENASE 1	(ADH1)
ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT	(APL)
ANAPHASE-PROMOTING COMPLEX/CYCLOSOME	(APC/C)
Arabidopsis response regulator1	(ARR1)
ARABIDOPSIS THALIANA HOMOLOG OF E2F C	(E2FC)
ATAUX1	(AUX1)
BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1	(BES1)
cell cycle switch 52	(CCS52)
CELLULOSE SYNTHASE LIKE D5	(CSLD5)
CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1	(CCA1)
CYCLE SWITCH PROTEIN 52 A 1	(CCS52A1)
COLD-REGULATED 15A	(COR15A)
CYCLIN A2;3	(CYCA2;3)
CYCLIN D2;1	(CYCD2;1)
CYCLIN D3;1	(CYCD3;1)
CYCLIN B1;1	(CYCB1;1)
CYCLIN B1;2	(CYCB1;2)
CYCLIN-DEPENDENT KINASE A;1	(CDKA;1)
CYCLIN-DEPENDENT KINASE B1;2	(CDKB1;2)
CYCLIN-DEPENDENT KINASE B2;1	(CDKB2;1)
Cytokinin response factor1	(CRF1)
EARLY FLOWERING 3	(ELF3)
EARLY FLOWERING 4	(ELF4)
HINKEL	(HIK)
IAA-amino synthase group II genes	(GH3.17)
IRREGULAR XYLEM 3	(IRX3)
IRREGULAR XYLEM 8	(IRX8)
KIP-RELATED PROTEIN1	(KRP1)

LATE ELONGATED HYPOCOTYLE	(LHY)
LOST MERISTEMS 2	(LOM2)
LUX ARRHYTHMO	(LUX)
OBF BINDING PROTEIN 1	(OBP1)
PIN-FORMED 1	(PIN1)
PIN-FORMED 2	(PIN2)
PIN-FORMED 3	(PIN3)
PIN2 PROMOTER BINDING PROTEIN 1	(PPP1)
PINOID	(PID)
PLETHORA	(PLT)
PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN 2	(PCNA2)
PSEUDO RESPONSE REGULATOR 5	(PRR5)
PSEUDO RESPONSE REGULATOR 7	(PRR7)
PSEUDO RESPONSE REGULATOR 9	(PRR9)
RESPONSIVE TO DESICCATION 29A	(RD29A)
ROOT GROWTH FACTOR 6	(RGF6)
SIAMESE	(SIM)
SIAMESE-RELATED 1	(SMR1)
SIEVE ELEMENT OCCLUSION-RELATED 1	(SEOR1)
TDIF RECEPTOR	(TDR)
TIMING OF CAB EXPRESSION 1	(TOC1)
VASCULAR RELATED NAC-DOMAIN PROTEIN 7	(VND7)
YUCCA9	(YUC9)

解析アルゴリズム / 実験手法

Density-based spatial clustering of applications with noise	(DBSCAN)
DESeq	(DESeq)
PeakMatch	(PeakMatch)
Seurat	(Seurat)
t-distributed Stochastic Neighbor Embedding	(t-SNE)
Vascular Cell Induction Culture System Using Arabidopsis Leaves	(VISUAL)
Wishbone	(Wishbone)

Wishbone-Seurat-PeakMatch (WISP)

化合物

2,4-dichlorophenoxyacetic acid	(2,4-D)
4-[(5-Bromo-2-pyridinyl)amino]-4-oxo-butanoic acid	(Bikinin)
4',6-diamidino-2-phenylindole	(DAPI)
5-ethynil-2'-deoxyuridine	(EdU)
indole-3-acetic acid	(IAA)
6-Furfurylaminopurine	(kinetin)
3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenylphenanthridinium diiodide	(PI)
1-N-Naphthylphthalamic acid	(NPA)

緒言

生物には秒から年単位の幅広い周期性をもつ様々なリズム現象があり、ミクロな遺伝子発現からマクロな生理現象にまで影響を与えている。身近なリズム現象の例として心拍数や睡眠覚醒リズム、月経、冬眠などがあり、一章で取り扱う細胞周期もまた周期性を持ったリズム現象の例である。細胞は細胞種ごとに周期長は異なるものの約0.5–4日の周期で分裂を繰り返している(Weber et al. 2014)。生物はこれらのリズムを自律的に維持しており、リズムが変調すると不整脈や睡眠障害などが引き起こされ、一般的には生物にとって悪影響を及ぼす。このことは、生物リズムは内外の環境変動に適応するために厳密に調整されていることを示しており、生物の恒常的な活動にとって堅固なリズム制御は欠かすことができない重要なメカニズムとなっている。

その一方で、リズムの変調をうまくシステムに組み込み、生物の発生を制御するリズム現象も知られている。その一例として、神経幹細胞における転写リズムの変調が知られている(Imayoshi et al. 2013)。神経幹細胞は自己複製を行うだけでなく、三種の神経細胞へ分化する多分化能を持っており、これらの細胞への分化はそれぞれ異なる遺伝子によって制御されている。神経幹細胞ではこれらの遺伝子は数時間周期の発現リズムを維持しており、この遺伝子群が発現リズムを維持している状態では神経幹細胞は自己複製を行なうが、発現リズムが変調すると種々の神経細胞への分化が誘導される。このように、神経幹細胞は自律的な遺伝子発現リズムとその変調をうまく利用することで、未分化性と分化多能性を柔軟に切り替えている。

しかし、このような生物リズムの変調が細胞運命を制御する例は現在までほとんど明らかにされていない。その原因として解析系の時空間解像度の低さが挙げられる。細胞分裂や分化の進行は細胞間で非同調的であるため、細胞の運命決定と連動する生物リズムの変調もまた細胞間で非同調的に進行する。そのため、細胞集団を対象とする従来の解析では平均化によって細胞ごとのリズムが打ち消しあい、リズムの変調を調べるができなかった。さらに、生物リズムもまた細胞間で同調的とは限らない。そのため、生物リズムの変調と細胞運命の関係を調べるためには、1細胞レベルで時系列解析が可能な実験系が必須であると考えられた。そこで、本研究では1細胞レベルで網羅的な遺伝子発現解析が可能な1細胞RNA-seqを用いて時系列解析を行い、細胞の運命が変化する際にどのように生物リズムが変調するのか、そしてその変調が細胞の運命を制御するのか明らかにした。

第1章

**エンドサイクル周期特異的な
オーキシンレベルの変動制御により
エンドサイクルの進行が維持される**

1-1. 序論

最も普遍的な生物リズムの一つとして細胞周期が挙げられる。原始の生物で進行していた細胞周期は現存するすべての生物においても進行し、連綿と続いている。その細胞周期の重要性から、多くの生物種でサイクリン依存性キナーゼ (CDKs) をはじめとした主要な因子は保存されており (Lloyd et al. 2006)、G₁、S、G₂、M の 4 つのフェーズの移行を制御している。有糸分裂では S 期に DNA が複製され、M 期に倍加した染色体は有糸分裂により二つの娘細胞に等分配される (Fig. 1) (Vandepoele et al. 2002, Bloom et al. 2007)。一方で、エンドサイクルと呼ばれる特殊な細胞周期も存在しており、M 期が省略されるために染色体が分配されず、DNA 複製とギャップ期間のサイクルだけが進行することにより、核相が倍加する。エンドサイクルは主に昆虫と植物で見られ、有糸分裂と共通した細胞周期因子によって制御されている (Edger et al. 2001)。モデル植物シロイヌナズナでは、ほとんどの組織で核相が倍加した細胞が見られ、細胞サイズを増大させることで個体の成長を制御に関わることが知られている (Breuer et al., 2010)。

植物において、有糸分裂は比較的未分化な細胞で起こる一方で、エンドサイクルは細胞の終末分化と同期している (Sugimoto-Shirasu et al. 2003)。このことから、エンドサイクルの進行は細胞の運命を決定する重要なステップであると考えられ、有糸分裂からエンドサイクルへの切り替えを制御する因子として植物ホルモンであるオーキシンがよく研究されてきた。

オーキシンは成長促進作用を持ち、光・水分・重力などの外的環境に対し初期的な応答を行なっている。オーキシン発見のきっかけとなったのは光による植物の屈曲性に関する研究であり、この研究からオーキシンは外部環境に応じて移動し、器官内で濃度勾配を形成することが示された。オーキシンの成長促進機能がこの濃度勾配に応じて発揮され、細胞の分裂と伸長が制御されることで、植物は環境刺激に対する屈性を示している。このオーキシンの濃度依存的な成長制御のモデルが拡張され、現在では有糸分裂からエンドサイクルへの切り替えはオーキシンの濃度によって説明されている。

オーキシンの濃度 (オーキシンレベル) の低下はユビキチンリガーゼ複合体である後期促進複合体 APC/C 活性化サブユニット *CCS52* の発現上昇を誘導し、G₂-M 期の移行を促進する B タイプ CYCs の分解を介してタンパク質レベルで CDKs 活性を抑える (Wu et al., 2016)。さらに、オーキシンレベルの低下は有糸分裂に重要な *CYCLIN A2;3 (CYCA2;3)* と *CYCB1;1* の発現も低下させる

(Ishida et al. 2010)。これにくわえて、*CDKs*の発現もオーキシンレベルによって制御されており、これらの制御によって転写レベルでも *CDK* 活性を調節している (Sanz et al. 2011, Tank et al. 2014)。また、これらの逆の制御として、サイトカイニン存在下においてオーキシンレベルが増大することで、 G_2 -M 期特異的な *CDKs* とサイクリン (*CYC*s) の発現が誘導され、 G_2 -M 期の移行を促すことでもエンドサイクルの進行が抑制される (Richard et al. 2002, Del Pozo et al. 2005, Ioio et al. 2008, Ishida et al. 2010)。このように、エンドサイクルの進行には、オーキシンレベルによる *CDKs* 活性の低下 (*CDKs* の活性化サブユニットである *CYC*s の遺伝子発現抑制とタンパク質分解の促進) が重要であり、オーキシンを含む環境因子から細胞周期制御の中心的役割を果たす *CDK-CYC* 複合体までをつなぐ制御メカニズムが明らかになっていた。

その一方で生体内におけるオーキシン濃度とエンドサイクルの相関に関する研究は立ち遅れている。根では、根端メリステム近傍に有糸分裂サイクルにある細胞と終末分化を迎えたエンドサイクルにある細胞が存在し、根端側からそれぞれメリステム領域、エンドサイクルへの移行領域、伸長領域と呼ばれている。有糸分裂サイクルが進行するメリステム領域ではオーキシンレベルが近傍の領域に比べ高く、メリステム領域から遠ざかるにつれてオーキシンレベルが低下しており、未分化な根端細胞から上部の分化細胞にかけてオーキシンの濃度勾配が存在する、とされてきた (Fig. 2) (Barrada et al. 2015)。メリステム領域、移行領域では有糸分裂サイクルが進行し、伸長領域でエンドサイクルに切り替わることはこうしたオーキシンの濃度勾配によって説明されており、メリステム領域から遠ざかるにつれて低下するオーキシンレベルが伸長領域におけるエンドサイクルの進行を促しているためだと考えられている。このように、根端はエンドサイクル研究の良いモデル系であり、オーキシンの濃度勾配モデルを前提にエンドサイクルとオーキシンの関係が調べられてきた。しかし、2017年に Di Mambro らは、メリステム領域にのみこのオーキシンの濃度勾配が存在し、エンドサイクルが進行する伸長領域ではオーキシンレベルがメリステム領域並みに上昇していることを明らかにした (Fig. 2)。この結果は、「根端の伸長領域でのオーキシンレベルの低下によりエンドサイクルが活発に進行する」とするこれまでのオーキシンの濃度勾配モデルの矛盾を示していた。このように、詳細に見るとオーキシンとエンドサイクルの進行の関係は、これまでのオーキシン濃度勾配モデルが示すような単純なものではなく、新しい理解の枠組みが必要とされていた。しかし、細胞内のオーキシンレベルがどのように制御され

ているのか、さらに、高オーキシンレベルの環境下でもエンドサイクルが進行する仕組みについて扱った研究は存在せず、その詳細は不明のままであった。

それでもなお、これまでの多くの研究からオーキシンレベルの低下がエンドサイクルを進行させていることは明らかであるため、高オーキシンレベル下でエンドサイクルが進行する細胞は自律的かつ一時的に細胞内のオーキシンレベルを低減させる可能性が考えられた。エンドサイクルの進行にはオーキシンによる G₂-M 期特異的 CDKs と CYCs の発現抑制が必須であり、S 期以降でのオーキシンレベルの抑制が示される一方で、エンドサイクルの G-S 期の移行にはオーキシンによる D タイプ CYCs の発現誘導が重要であることも示されている (Himanen et al. 2002, Perrot-Rechenmann et al. 2010, Magyar et al. 2005, Verkest et al. 2005, Sozzani et al. 2006)。こうした観察から、エンドサイクルの G-S 期の移行にはオーキシンレベルの上昇が、エンドサイクルの S-G 期の移行にはオーキシンレベルの抑制が必須であることが示唆され、エンドサイクル内で細胞周期依存的にオーキシンレベルが変動する可能性が考えられた (Fig.3)。この仮説を裏付けるように、伸長領域に位置しエンドサイクルが進行する細胞においてオーキシンの排出を阻害すると、細胞内のオーキシンレベルが増大し、有糸分裂特異的な *CYCB1* の発現が誘導されることが示されている (Benková et al. 2003)。こうした結果は、伸長領域の分化細胞ではオーキシンの排出により積極的にオーキシンレベルを低減させており、このオーキシンレベルの低減が有糸分裂特異的な CYCs の発現抑制を介してエンドサイクルの進行を支えることを強く示唆するものであった。

しかし、濃度勾配モデルのようにオーキシンは細胞に位置情報を与える外部環境として捉えられており、細胞内部で細胞自律的にオーキシン濃度が変動する可能性は考えられてこなかった。さらに、細胞周期は細胞間で非同調的であり、生体内のほとんどの細胞はすでに細胞周期が停止している。そのため、これまでの植物の細胞周期研究がもっぱら利用してきた遺伝学的あるいは生化学的手法による細胞集団を対象とした従来のバルク解析では様々なフェーズにある細胞や分化細胞由来のデータが平均化されるため、細胞周期の時系列を捉えることができなかった。こうした問題意識から、時空間解像度を確保する目的で単一細胞種の培養系と細胞周期の同調系を組み合わせ、細胞周期の各フェーズを対象にしたトランスクリプトーム解析から、細胞周期内で発現が変動する遺伝子を網羅的に調べる研究も行われてきた (Menges et al. 2005)。しかし、同調効果が一時的であるため、全ての細胞周期フェーズから質の高いデータを得ることはできていない。このように、細胞周期の進行度は細胞ごとに様々であるた

め、細胞周期の時系列に沿った解析から細胞内オーキシンレベルを推定することはこれまで困難であった。

ここ数年のあいだに、植物においても 1 細胞 RNA-sequencing (scRNA-seq) が盛んになり、多数の細胞の遺伝子発現データが利用可能になった。さらに、scRNA-seq データから高い解像度で「擬時刻 (pseudo time)」と呼ばれる時系列データを再構築する手法が多数報告されている。擬時刻は、遺伝子発現プロファイルの類似性・連続性をもとに細胞を一つあるいは複数の系譜上に配置することにより、時間と共に変遷する遺伝子発現プロファイルの時系列を作成する手法である。そこで本研究では、この擬時刻を用いることで、既存の scRNA-seq データから細胞周期の詳細かつ網羅的な時系列を再構築し、これにより、エンドサイクルにおけるオーキシンレベルの変動制御機構とその意義を明らかにすることを目的として研究を行った。具体的には、すでに報告されている scRNA-seq データから再構築したエンドサイクルと有糸分裂サイクルの時系列を比較し、オーキシンへの応答レベルを細胞周期のフェーズごとに解析した。さらに、オーキシンの不活化、合成、取り込み、排出に関わる遺伝子の発現パターンを解析することで、オーキシン応答レベルとの関係を調べた。これらの解析を通じて、エンドサイクルにある細胞は細胞周期に合わせて自律的に細胞内のオーキシン濃度を変化させ、高オーキシンレベルの環境下でエンドサイクルの進行を促している、オーキシンの濃度リズムモデルを示した。

1-2. 結果

細胞周期の性質による scRNA-seq データの分類

細胞には個性があり完全に同じ細胞は存在しない。そのため、たとえ同時刻にサンプリングを行っていても、scRNA-seq を用いた時系列解析においては各細胞が示す細胞の状態は微妙に異なる。こうしたことから、より多くの細胞が含まれるデータセットを用いることで、より正確かつ詳細な解析が可能になると考えられた。2019年4月に報告されたRyuらの論文 (Ryu et al. 2019) は現在 (2019年末) までに報告された根端由来の scRNA-seq データの中で最も多くの細胞を解析しており、その他にいくつか報告されているデータセットと比較しても細胞周期の時系列解析にもっとも適したデータセットであると考えられた。また、メリステム領域や伸長領域の細胞などエンドサイクルが進行している細胞を含む多様な根端の細胞が含まれることが報告されており、エンドサイクルの細胞周期を解析するために都合がよかった。そこで、本研究ではRyuらの野生型由来の scRNA-seq データを利用することでエンドサイクルにおける遺伝子発現変化の時系列を解析した。

エンドサイクルに固有のオーキシン制御を見出すためには、有糸分裂サイクルの時系列データとエンドサイクルの時系列データとの比較が有効であると考えた。そこで、有糸分裂サイクルとエンドサイクルにある細胞集団をそれぞれ特定するため、高次元データの可視化アルゴリズム t-distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) によって次元圧縮を行い、2次元平面上に7,522の細胞をプロットした。つぎに、それぞれの細胞ごとに“Cell cycle”および“DNA endoreduplication”の Gene Ontology (GO) term enrichment score [$-\log_{10}(\text{p-value})$]を算出し、プロットした細胞上にその値をカラーコードとして投影した (Fig. 4A)。その結果、t-SNE 平面の上部と下部中央に高い“Cell cycle”の GO term enrichment score を示す細胞集団が存在することを確認し、これらの細胞では細胞周期が進行していることを見出した。細胞周期が進行する細胞中で、エンドサイクルが進行している細胞を特定するため、“DNA endoreduplication”の GO term に着目し、高い GO term enrichment score を示す細胞が t-SNE 平面の上部に局在していることを確認した。このことから、t-SNE 平面上部にエンドサイクルの細胞が、t-SNE 平面下部中央に有糸分裂サイクルの細胞がそれぞれ局在していることを明らかにした。

この GO term 解析の結果をより確証づけるため、エンドサイクルマーカー遺伝子として確立されている *SIM* (CDK 阻害因子) や *SMR1* (CDK 阻害因子)、

CCS52A1 (エンドサイクル関連因子) の発現レベルを確認した (Fig. 4B)。いずれの遺伝子も t-SNE 平面の上部の細胞集団において発現が高く、この傾向は GO term enrichment score の結果と一致していた。また、有糸分裂特異的に機能する遺伝子、*KNOLLE* (細胞分裂特異的シタキシン) や *CSLD5* (細胞板形成)、*HIK* (細胞板形成) の発現は t-SNE 平面下部中央にある細胞で見られた (Fig. 4B)。これらの遺伝子の発現パターンは GO term 解析の結果と一致しており、t-SNE 平面上部の細胞がエンドサイクルであり、t-SNE 平面下部中央の細胞が有糸分裂サイクルにあることが確認された。

有糸分裂サイクルとエンドサイクルの細胞群の同定をより客観的に行うために、t-SNE 空間上での細胞の配置を基に教師なしクラスタリングアルゴリズム Density-based spatial clustering of applications with noise (DBSCAN) により 5 つのクラスターに分類した (Fig. 5A)。GO term 解析の結果と併せて、“Cell cycle”の GO term enrichment score が高いクラスター 1、クラスター 5 のうち、“DNA endoreduplication”の GO term enrichment score が高いクラスター 1 をエンドサイクルクラスター (977 細胞) とし、“DNA endoreduplication”の GO term enrichment score が低いクラスター 5 を有糸分裂サイクルクラスター (895 細胞) とした。この DBSCAN による分類の妥当性をさらに確認するため、各細胞周期の代表的なマーカー遺伝子の発現量を両クラスターで確認した。その結果、予想通り、エンドサイクルクラスターではエンドサイクル関連遺伝子の発現が強く、有糸分裂サイクルクラスターでは有糸分裂特異的な遺伝子の発現が強く見られ、こうした分類の妥当性が確かめられた (Fig. 5B)。これらの結果を総合し、Ryu らの scRNA-seq データからエンドサイクルおよび有糸分裂サイクルを示す細胞集団を抽出できていると判断した。

エンドサイクルは根のすべての細胞系譜で進行するため、エンドサイクルクラスターには多数の細胞種が混在していると想定される。そこで、まず、今回の解析に用いた細胞群が特定の細胞種のみで構成されていないことを確認した。Ryu et al. 2019 で用いられたセルタイプマーカーの発現量を t-SNE 平面上で可視化し、エンドサイクルクラスターに含まれる細胞種を特定したところ、根毛細胞、非根毛細胞、皮層、内皮、根幹など複数のマーカー遺伝子の発現がエンドサイクルクラスターで見られ、エンドサイクルクラスターは単一の細胞種で構成されるのではなく多様なセルタイプから構成されていることが確認された (Fig. 6)。こうしたことから、本研究における以降の解析は細胞種に依存した現象ではなく、複数の細胞種で共通している現象を計測していると結論づけた。その一

方で、有糸分裂サイクルクラスターでは根幹やコルメラのマーカ―遺伝子の発現に加え、静止中心 (QC) マーカ―の発現がみられたことから、有糸分裂サイクルクラスターは、想定通り、QC を含むメリステム近傍の細胞群で構成されることが確認された。

細胞周期時系列の再構築

有糸分裂サイクルとエンドサイクルの細胞群が同定されたことから、次にそれぞれの細胞周期におけるフェーズの同定を行った。一般に、根端における細胞分裂のタイミングは細胞間で同調していないため、有糸分裂サイクルおよびエンドサイクルの両クラスターには細胞周期の様々なフェーズにある細胞が十分に含まれると予想された (Cools et al. 2010)。そこで、それぞれの細胞周期における詳細な時系列を再構築するため、細胞周期の制御に関わる遺伝子の発現データのみを用いて次元圧縮を行い、細胞周期の進行に沿った軌跡の構築を目指した (Liu et al. 2017)。エンドサイクルクラスターと有糸分裂サイクルクラスターを合わせた 1,872 細胞のデータに対して再び t-SNE を行ったところ、これらの細胞群はリング状の軌跡に均一に配置された。このことは、このデータセットに細胞周期の様々なフェーズにある細胞が満遍なく含まれていることを示すものであった (Fig. 7A)。このリング状の軌跡が細胞周期の進行を反映したものであるか確認するため、細胞周期の各フェーズで特異的に発現するマーカ―遺伝子の発現パターンを確認した。これまで、S 期、G₂/M 期、M 期のマーカ―は代表的な遺伝子が示されているものの、G₁ 期のマーカ―として代表的な遺伝子は存在しない。シロイヌナズナの培養細胞を用いた研究から *KRPI* が G₁ 期に発現レベルが上昇することが知られており、*CDKA;1* は G₁/S 期の移行時から発現が上昇し、その後のフェーズにおいても発現が維持されることが知られている (Menges et al. 2002, Himanen et al. 2002)。そこで、G₁ 期のマーカ―として *KRPI* を、G₁/S 期以降のマーカ―として *CDKA;1* を、S 期のマーカ―として *PCNA2* と *CYCD2;1* を、G₂/M 期のマーカ―として *CDKB1;2* と *CDKB2;1*、M 期のマーカ―として *CYCB1;1* と *KNOLLE* を用いて (Gutierrez, 2009) 遺伝子発現パターンの変遷を確認したところ、時計回りに G₁ 期から M 期のマーカ―遺伝子の発現が変遷することを確認した (Fig. 7B、Table 1)。この結果から、t-SNE 平面上で細胞周期の進行がリング状に正確に再構築されていることを確認した。さらに、t-SNE 平面上の軌跡から擬時刻の時系列を再構築する Wishbone アルゴリズム (Setty et al. 2016) を用いることで、細胞周期の時系列データセットを構築した。算出された擬時刻の値がマーカ―遺伝子から確認

された細胞周期の進行と一致しているか調べるため、Wishbone により算出された擬時刻の値を t-SNE 平面上で可視化した (Fig. 7C)。細胞周期マーカー遺伝子の発現パターンの変遷と一致して、G₁ 期から M 期へと擬時刻の値が増加しており、再構築した細胞周期の擬時刻が概ね正確であることが確認された。擬時刻が正確な細胞周期の進行を再現しているかをより正確に検証するため、擬時刻上での細胞周期マーカー遺伝子の発現の変遷を確認した。S 期のマーカー遺伝子 (*PCNA 2*, *CYCD2;1*) の発現が 0.7-0.89 の間で認められ、M 期のマーカー (*CYCB1;1*, *KNOLLE*) はその後の 0.95-1.00 の間で見られた (Fig. 8)。また G₁-S マーカー遺伝子の発現は S 期マーカーの発現前から高発現を示していること、および G₂-M マーカー遺伝子の発現は M 期マーカーの発現前から高く発現していること、G₁ 期から M 期のマーカー遺伝子の発現ピークが正しく切り替わることも確認された。このことから、再構築された擬時刻が細胞周期の時系列を正確に再現していることが確かめられた。

こうした、細胞周期のフェーズをより正確に定義するため、GO term enrichment score の標準偏差+1 σ 以上を意味する Z 値が 1 を超える時間帯を基準として各フェーズを定義した。擬時刻上での“DNA replication”と“Mitotic cell cycle”の GO term enrichment score の変動パターンを調べ、“DNA replication”のスコアは 0.73-0.89 の範囲で、“Mitotic cell cycle”は 0.95-1.00 の範囲で Z 値が 1 を超えていた。このことから、擬時刻で 0.00-0.73 を G₁ 期、0.73-0.89 を S 期、0.89-以降を G₂/M 期と定義した (Fig. 9)。細胞周期のマーカー遺伝子の発現パターンもそれぞれのフェーズの範囲内で発現しており (Fig. 8)、擬時刻内の区分けが適当であることが支持された。

ここで定義された細胞周期のフェーズは有糸分裂サイクルとエンドサイクルを併せたものである。有糸分裂サイクルとエンドサイクルの比較を容易にするため、DBSCAN によるクラスタリングの結果をもとに細胞周期の時系列データをエンドサイクルと有糸分裂サイクルの 2 つに分割し、独立した時系列を作成した。その結果、いずれの細胞周期においても、分割前に見られた連続的なリング状の軌跡が維持されていた。このことから、細胞周期の擬時刻中にはそれぞれの細胞周期にある細胞が偏りなく配分されていることが示された (Fig. 10A)。各フェーズに含まれる細胞の割合はエンドサイクルと有糸分裂サイクルで異なり、有糸分裂サイクルに比べエンドサイクルに含まれる G 期の細胞の割合が増加し、S 期に含まれる細胞の割合は減少していた (Fig. 10B)。また、エンドサイクルでは G₂/M 期にある細胞は存在せず、有糸分裂サイクルにのみ含まれていた。こうしたことから、それぞれの細胞周期は概ね正しく分けられていること

が想定された。この G₂/M 期にある細胞集団が実際に有糸分裂制御の活発な集団であるか確認するため、この細胞集団で高発現している遺伝子群の GO term 解析を行った。p 値が低く有意に濃縮されている上位 25 個の GO term には有糸分裂に関する GO term が 7 個含まれていた (Fig. 11)。このことからエンドサイクルでは有糸分裂関連の遺伝子群が活性化された G₂/M 期の細胞は含まれておらず、2つの細胞周期の系譜の分割が正確に構築されていることを確認した。さらに、分割されたエンドサイクルと有糸分裂サイクルの時系列がそれぞれ正常に再構築されているか確認するため、細胞周期のマーカー遺伝子の発現をそれぞれの時系列で比較した (Fig. 12)。G₁期と S 期のマーカー遺伝子の発現パターンはおおむね一致していたものの、エンドサイクルの時系列では、有糸分裂サイクルに比べ G₂/M 期特異的な遺伝子の発現が強く抑制されていた。このことから、2つの細胞周期の系譜を示す時間軸もまた正常に構築されていることが示された。

エンドサイクル S 期におけるオーキシンレベルの制御機構

トランスクリプトームデータから細胞周期におけるオーキシンレベルの変動を直接計測することはできない。そのため、オーキシンに応答する遺伝子の発現レベルを細胞内オーキシンレベルとみなし、“Response to Auxin”の GO term enrichment score を算出することで、2つの細胞周期におけるオーキシンレベルの変遷を推定した (Fig. 13A)。エンドサイクルでは、GO term enrichment score は S 期前から上昇し、S 期前半でピークを迎え、S 期後半にかけて低下する傾向が見られた。この結果はエンドサイクルにおけるオーキシンの作用機序と一致した傾向であり、エンドサイクルではオーキシンレベルが変動することを強く示唆するものであった。一方の有糸分裂サイクルでは、エンドサイクルのピーク時に近い GO term enrichment score が維持されており大きな変動は見られなかった (Fig. 13A)。このことは有糸分裂サイクルでは、常にオーキシンレベルは高く維持されていることを示していた。さらに、オーキシンレベルの変化をより比較しやすくするため、S 期をほぼ三等分し、初期 (0.73-0.78)、中期 (0.78-0.84)、後期 (0.84-0.90) に分け、さらに G-S 期の移行期 (0.50-0.73) を加えて、それぞれの期間における GO term enrichment score の平均値を求めた。GO term enrichment score は G-S 期の移行期から S 期前半に上昇した後、中期から後期にかけて低下しており、エンドサイクルでは明確なオーキシンレベルの変動が見られ、S 期の前半にオーキシンレベルはピークに達していることが示された (Fig. 13B)。

オーキシンレベルの変動と有糸分裂の進行に必須な A、B タイプ *CYC*s (*CYCA2;3* と *CYCB1;1*) の発現の変動には相関があり、オーキシンレベルの低下は A、B タイプ *CYC*s の発現を低下させることで、エンドサイクルを進行させる (Ishida et al. 2010)。そのため、エンドサイクル内で見られたオーキシンレベルの変動、特に S 期後半のオーキシンレベルの低下は *CYC*s の発現抑制を介してエンドサイクルの進行を促進すると考えられたことから、S 期後期以降における A、B タイプ *CYC*s の発現量をエンドサイクルとオーキシンレベルの高い有糸分裂サイクルで比較した (Fig. 14, 15)。その結果、エンドサイクルでは *CYCB2;4* を除く全ての有糸分裂特異的なサイクリンの発現量が減少していた。この結果はエンドサイクルにおけるオーキシンレベルの変動とサイクリンの発現量に相関が見られていることを示しており、S 期後半のオーキシンレベルの低下が全体的な A、B タイプ *CYC*s の低下を誘導することで、エンドサイクルが進行することを示唆するものであった。

次に、エンドサイクルにおいてオーキシン応答レベルを変化させている制御機構を明らかにするため、細胞内オーキシンレベルの制御に重要であると考えられるオーキシンの合成・取り込み・不活性化・排出に関わる遺伝子の発現パターンをそれぞれ調べた。オーキシンの合成と取り込みは細胞内のオーキシンレベルを上昇させ、オーキシンの不活化と排出は細胞内のオーキシンレベルを低下させる。いずれの制御も細胞自律的な制御であり、細胞周期依存的なオーキシンレベルの変化の仕組みを知る上で重要である。

まず、エンドサイクルの G-S 期の移行時に発現が上昇するオーキシンの不活化と排出に関連する IAA-アミノ酸複合体合成酵素遺伝子やオーキシン排出輸送体遺伝子の発現パターンを調べたところ、オーキシンの不活化により根端において最もオーキシンレベルが低い領域であるオーキシンミニマムを形成する *ARR1-GH3.17* シグナルの二つの遺伝子の発現が S 期直前である G-S 期の移行時に上昇していた (Fig. 16)。次に、S 期前半において発現が上昇するオーキシンの合成と取り込みに関わる遺伝子を調べたところ、オーキシン合成に関わる *YUC9* と取り込みに関わる *AUX1* の発現が S 期前半に一過的に上昇していた (Fig. 17)。S 期後期にはオーキシンの排出を行う *PIN1*、*PIN2*、*PIN3* (*PIN1-3*) や PIN の排出を制御する *PID* の一過的な発現上昇が見られた (Fig. 18)。また、エンドサイクルに必須なオーキシンレベルの低下に関わる *ARR1*、*GH3.17*、*PID*、*PIN1-3* の発現はエンドサイクルでのみ G-S 期の移行時と S 期後期に見られ、有糸分裂サイクルでは見られなかった (Fig. 16-18)。これらの結果から、オーキシンレベルの制御に関わる因子群の発現パターンはエンドサ

イクル特異的に機能し、S期前後でのみ見られたオーキシンレベルの変動と時間的に一致することが明らかになった。このことから、これらの遺伝子が細胞周期依存的に発現することで細胞内オーキシンレベルの変動を生み出していることが強く示唆された。

オーキシンの排出によるオーキシンレベルの変動は根端におけるエンドサイクルの進行に必須である

scRNA-seq データの結果から、S期後期には *PINI-3* によりオーキシンが排出され、オーキシンレベルが低下した結果、有糸分裂特異的な *CYC*s の発現が低下する可能性が示された。そこで、根端細胞における *CYC*s の発現が実際にオーキシンの排出によって制御されているかを明らかにするため、オーキシンの排出阻害剤 (NPA) 処理により、*CYCB1* の発現がどのように変化するかを検証した。オーキシン (IAA) 添加により、無処理のコントロールに比べて *CYCB1;1* と *CYCB1;2* の発現は上昇することが確認され、高濃度のオーキシンが *CYC* の発現上昇に関わっていることを確認した (Fig. 19A)。さらに、IAA と NPA の同時添加により、*CYCB1;2* の発現量は IAA の単独処理時の発現量よりも上昇していた。このことから、オーキシンの排出は根端の *CYCB1* の発現量の抑制に関わっていることが示された。

オーキシンの排出抑制により上昇した有糸分裂を促進する *CYC*s の発現が実際にエンドサイクルの進行を促進しているのかを確認するため、NPA 処理時における核相の倍加レベルを調べた。IAA 処理により DNA 含量が 2C の細胞の割合はコントロールに比べて増加していたものの、エンドサイクルにある細胞を示す 8C 以上の細胞の割合はほとんど変化していなかった (Fig. 19B)。その一方で、NPA+IAA 処理により、エンドサイクルにある 8C と 16C の細胞の割合はコントロールおよび IAA 処理と比べて大きく減少していた。この結果は、オーキシン排出の阻害による強制的なオーキシンレベルの上昇により、エンドサイクルの進行が著しく抑制されることを示していた。以上の結果から、エンドサイクルの S 期後半特異的に見られる *PINI-3* の発現はオーキシンレベルの低下を介して有糸分裂特異的な *CYC*s の発現を抑制し、エンドサイクルの進行を支えることが明らかになり、scRNA-seq 解析の結論を裏付けた。

***PINI-3* は根端の様々な細胞種においてエンドサイクル S 期後期で発現する**

*PINI-3*は組織特異的に発現しオーキシンの極性輸送を行うことで根のオーキシンの濃度勾配を作り出す (Barrada et al. 2015)。そのため、すでにエンドサイクルの細胞は様々な細胞種を含むことを示していたものの、今回、エンドサイクルで観察された細胞周期依存的な *PINI-3* の発現上昇は特定の組織に由来する細胞でのみ起こっている現象である可能性は排除できない。そこで、これまでにエンドサイクルの細胞群として用いてきたクラスター1 以外のエンドサイクルにある細胞群 (クラスター3 に属し“DNA endoreduplication”の GO term enrichment score が2 以上の細胞) を用いて同様の解析を行った (Fig. 20)。新しいデータセットにおいても、S 期のマーカーである *PCNA2* の発現が擬時刻の後半に見られ、構築されたエンドサイクルの細胞周期は正確に構築できていることを確認した。そして、この時間軸上においても *PCNA2* が発現する S 期の後半に *PINI-3* のいずれの発現レベルも上昇していた。以上の結果から、異なるクラスターの細胞セットにおいても *PINI-3* の発現は S 期後期に上昇しており、*PINI-3* は根端の多様な細胞種で細胞周期依存的に発現する可能性があることが示唆された。

エンドサイクル過程におけるオーキシシンとサイトカイニンの拮抗的な働き

根ではサイトカイニンシグナルとオーキシニンシグナルは細胞周期の進行に拮抗的に働き、互いのシグナル内にある遺伝子の発現を抑制しあっている。このことから、エンドサイクルのオーキシシン変動はサイトカイニンシグナルの影響を受けていることが考えられたため、エンドサイクルにおける“Response to cytokinin”の GO term enrichment score の変化を調べた。その結果、サイトカイニンの応答レベルはエンドサイクルの S 期後半に一過的に上昇しており、これは Response to auxin”の結果と正反対のパターンであった (Fig. 13, 21A, B)。このことから、S 期後半にはサイトカイニンシグナルとオーキシニンシグナルが拮抗的に働く傾向があると考えられた。根の伸長領域では、サイトカイニンシグナルがオーキシシン応答の抑制因子 SHY2 を介して *PIN* 遺伝子群の発現抑制を行なっている (Weiste et al. 2017)。そのため、エンドサイクルの時系列においてもサイトカイニンシグナルが *PINI-3* の発現制御を行なっている可能性が考えられた。そこで、サイトカイニンの下流で *PINI-3* の発現制御を行なっており、かつエンドサイクルの S 期後半に発現が上昇する遺伝子を調べたところ *CRF2* と *PPP1* が見いだされた (Fig. 22) (Šimášková et al. 2015, Benjamins et al. 2016)。これらは *PINI-3* の発現制御を行うサイトカイニン応答遺伝子であり、サイトカイニンが *PIN* 遺伝子群の発現を介してオーキシシンレベルを制

御するという考えと矛盾しない結果であった。以上の結果から、サイトカニンシグナルとオーキシンシグナルはエンドサイクルの時系列内で拮抗的に働き、S期後期にはサイトカニンシグナルの活性化により *CRF2* と *PPP1* の発現が上昇することで *PINI-3* の発現が上昇し、オーキシンレベルが低下している可能性が考えられた。

1-3. 考察

エンドサイクルのオーキシン変動を制御する分子メカニズム

今回の結果から、エンドサイクルではオーキシンレベルが変動していることが示された。このオーキシンレベルの変動は、伸長領域におけるオーキシンレベルの増大という、これまで支持されてきたオーキシンの濃度勾配モデルと矛盾する条件下においてエンドサイクルの進行を可能にしている (Fig. 2, 3)。エンドサイクルのS期の進行にはオーキシンレベルの増大によるDタイプの *CYC*s の発現誘導が必要である一方で、G₂/M期のスキップにはオーキシンレベルの低減によるA,Bタイプの *CYC*s の発現抑制が必須であり、エンドサイクルの適切な進行制御においてオーキシンは細胞周期のフェーズによっては正反対の役割を担っていることが明らかになっていった (Himanen et al. 2002, Perrot-Rechenmann et al. 2010, Ishida et al. 2010)。本研究の結果でも、オーキシンレベルの上昇はS期前半で特異的に観察され、G/S期の移行時とS期後半には低下していた (Fig. 13)。こうしたオーキシンレベルの細胞周期内での変動パターンは、オーキシンがS期の進行には必要でS期以降には不要とするこれまでの研究と一致するものであった。また、G/S期の移行時にはオーキシンを不活化する *GH3.17* が発現しており、GH3.17によってオーキシンレベルが抑えられている可能性も新たに提示した (Fig. 16)。実際にGH3.17は根端の移行領域において近傍の領域よりもオーキシンレベルが低い「オーキシンミニマム」と呼ばれる領域の形成に関わっており、G/S期の移行時にオーキシンレベルが低減することと、本研究の結論に矛盾は無い (Di Mambro et al. 2017)。また、S期前半にはオーキシンの取り込みを行う *AUX1* とオーキシン合成を促進する *YUC9* が高発現しており、本研究では、S期前半のオーキシンレベルの上昇はこれらの因子によると結論づけた (Fig. 17)。*AUX1* はオーキシンの極性輸送を制御する因子であり、器官レベルでオーキシンの濃度勾配を作り出せるほど強力なオーキシンレベルの制御を行っている。また、*YUC9* は根端メリステム特異的に発現しており、メリステムでのオーキシンの合成を促進することでまたオーキシンの濃度勾配を作り出している。このように *AUX1* と *YUC9* によるオーキシンレベルの上昇は有糸分裂サイクルが進行する根端メリステムにおいて高いオーキシンレベルの維持に関わっており、これによって、S期の進行に必須なDタイプの *CYC*s の発現を誘導することでエンドサイクルが進行すると考えられる。さらに、S期後半にはオーキシンの排出を行う *PIN1-3* と *PID* が一過的に高発現していた (Fig. 18)。*PIN1-3* もまた根端におけるオーキシンの濃度勾配の形成に必須の因子であり、PINによるオーキシンの排出を阻害された細胞

ではオーキシンレベルが異常に上昇する (Mravec et al. 2008) 。そのため、PIN1-3によるオーキシンの排出はオーキシンレベルを低下させるのに十分であり、S 期後半のオーキシンレベルの低下も *PIN* 遺伝子の発現で十分に説明が可能である (Fig. 13, 18) 。さらに、オーキシンの排出阻害を行うと、B タイプサイクリンの発現上昇とともに、エンドサイクルの進行が阻害されることを本研究において実際に確認したことから、S 期後半で PIN1-3 がオーキシンレベルと A,B タイプの *CYC*s の抑制を介して G₂/M 期のスキップを制御していることが明らかになった (Fig. 19, 23) 。

今回の研究により、これまでのオーキシンの濃度勾配モデルの矛盾を細胞周期内でのオーキシンレベルの変動で説明できることを示してきたが、サイトカイニンにも同様の矛盾があることが知られている。サイトカイニンの濃度勾配はオーキシンと正反対であり、伸長領域でサイトカイニンレベルが最も高くメリステム領域にかけて低下すると考えられている。しかし、サイトカイニン応答遺伝子のレポーター系やマススペクトル分析の結果からは、メリステム領域ではサイトカイニンレベルが極めて高いレベルであることが示されている (Antoniadi et al. 2015) 。サイトカイニンもまた、細胞分化・分裂を制御しており、本研究でも、サイトカイニン応答レベルはエンドサイクルだけでなく有糸分裂サイクルにおいても細胞周期特異的な発現パターンが見られることを明らかにしている (Fig. 21, 22) 。そのため、細胞内のサイトカイニンレベルもまたオーキシン同様、合成や輸送に関わる遺伝子により細胞内レベルがダイナミックに制御されており、メリステム領域において有糸分裂サイクルの進行を制御している可能性が考えられる。また、エンドサイクルにおいてサイトカイニン応答は S 期後期に上昇しており、オーキシンとは正反対のパターンであった (Fig. 13, 21) 。これはよく知られたオーキシンとサイトカイニンの拮抗的な働きの結果であると考えられる。実際に、エンドサイクルが進行する中心柱の細胞ではサイトカイニンシグナルが *PIN* 遺伝子の発現制御を介してオーキシンレベルを下げるということが知られている (Tian et al. 2002) 。本研究でも、*PIN* 遺伝子の発現を促進するサイトカイニン応答遺伝子 *CRF2* や *PPP1* の S 期後期特異的な発現を示している (Fig. 22) 。このことから、オーキシンとサイトカイニンの拮抗的な制御は組織レベルの濃度勾配だけでなく、細胞周期レベルでも見られることが考えられた。

エンドサイクルを制御する植物ホルモンはオーキシンやサイトカイニン以外に、ジャスモン酸やエチレン、ブラシノステロイド、ジベレリンが知られている (Tank et al. 2014) 。今回、見られたオーキシンの変動のように、これらの植

物ホルモンのシグナルが細胞周期内で変動することにより、細胞は個々の情報処理を行う時間を切り分け、適切なタイミングで適切な制御を行うことが可能になると考えられる。本研究ではこのような細胞周期に沿った細胞外環境への応答のタイムスケジュール管理を細胞自律的に行う一例を明らかにしたと位置づけられる。

1 細胞マルチオミクスは包括的な細胞周期制御の理解に役立つ

これまでの細胞周期研究は主に転写後制御に焦点を当てており、転写制御以上に様々な制御が報告されている。一例として、ユビキチンリガーゼである APC/C は CYCB をポリユビキチン化させ、プロテアソームによる分解を誘導し CDK 活性を低下させることでエンドサイクルへの切り替えを制御している (Takahashi et al. 2013)。この転写後制御に加えて、本研究から、エンドサイクル過程では *CYCB* の転写レベルが抑制されていることが明らかとなり、転写制御もまた細胞周期の制御に重要な役割を持つことが示された (Fig15)。1 細胞解析の発展は目覚ましく、トランスクリプトームとプロテオームやエピゲノム、ジェネティクスを組み合わせたマルチモードなオミクス解析が数多く報告されている (Stuart et al. 2019)。細胞周期内ではダイナミックなエピゲノム制御が行われているはずであり、今後、トランスクリプトームとの比較を行うことで、転写に至るまでの広範な制御の重要性が示されるだろう。さらに、知見が蓄積されている転写後調節に様々なレベルの解析データを付け加えることで、より包括的な細胞周期制御の理解を進めることができるだろう。

概日時計と細胞周期のクロストーク

GO term 解析による細胞周期フェーズの決定により、S 期特異的に発現する遺伝子を調べたところ、時計遺伝子 *LUX* が含まれていた。第二章の研究では *LUX* の細胞種特異的な発現パターンについて明らかにしているが、PIN 遺伝子同様 *LUX* もまた細胞種特異的な発現パターンだけでなく細胞周期フェーズ特異的な発現パターンを持つことが明らかとなった。時計遺伝子は約 24 時間周期の発現変動を維持しており、これに加えて細胞周期フェーズ特異的な発現パターンを示すならば、*LUX* への二重の振動制御は概日時計と細胞周期のクロストークの起点となる可能性がある。実際に概日時計は細胞周期との関わりの中で獲得されたとする仮説が有力であり、このような転写制御が存在する可能性は十

分にあり、第二章では概日時計と細胞分裂を含めた細胞の運命決定との関係について明らかにしている (Pittendrigh 1993)。

scRNA-seq データ解析における GO term 解析の発展性

これまでの scRNA-seq では主に次元圧縮空間上でのクラスタリングとマーカー遺伝子の発現から目的の細胞を特定していた。しかし、この手法ではほんの数種のマーカー遺伝子の発現パターンに大きく依存しており安定性と信頼性に欠けていた。そのため、今回エンドサイクルや有糸分裂サイクルの細胞を選抜する際に用いた次元圧縮と GO term 解析の組み合わせは、より多くの遺伝子発現を包括的に捉えることで特定の現象に着目できるためより安定的であり、信頼できる結果を得ることができる。また、今回の研究では擬時刻と GO term 解析を組み合わせ、細胞周期の各フェーズの時間帯を定義することができた。このように、GO term 解析は次元圧縮空間上だけでなく擬時刻上においても対象の現象を特定することが可能であり、今後の scRNA-seq データの分類において有効なテクニックとなるだろう。

1-4. 材料と方法

エンドサイクルと有糸分裂サイクルにある各細胞群の抽出

scRNA-seq データから各細胞周期過程にある細胞集団を抽出するため、DESeq(ver: 1.34.1)を用いて野生型由来のデータセットを正規化し、各細胞において高発現する ($Z\text{-score} > 1$) 遺伝子のリストを作成した上で PANTHER14.1 (<http://www.pantherdb.org/>)を用いた GO term 解析をおこなった。算出された p 値は GO term enrichment score ($-\log_{10}(\text{p-value})$) として t-SNE 平面上にプロットされた各細胞にカラーコードとして示した。t-SNE 平面における座標軸の計算には、scRNA-seq の全データを用いた主成分分析により算出された第 1 成分から第 3 成分までを用いた。また t-SNE による次元圧縮には Barnes-Hut t-SNE (bhtsne, ver: 0.1.9) を用いており、パラメータは dimensions = 2, perplexity = 50, theta = 0.5, rand_seed = -1 である。t-SNE 平面内での各細胞集団の抽出には Density-based spatial clustering of applications with noise (DBSCAN) を用いており、パラメータは eps = 4.4, min_samples = 10 である。

Wishbone による細胞周期擬時刻の再構築

切り出された有糸分裂サイクルとエンドサイクルの各クラスターに含まれる細胞のデータセットを再度 DESeq により正規化した。正規化されたデータセットの中から、コア細胞周期遺伝子として報告がある遺伝子リストに含まれる遺伝子のデータのみを抽出し(Gutierrez, 2009)、PCA と t-SNE による次元圧縮を行なった。ここまでの全ての手順に用いたパラメータは各細胞群の抽出に用いた値と同じである。細胞周期の擬時刻を計算するため、得られた t-SNE 平面の座標軸を Wishbone (ver: 0.4.1) のクラス変数に代入した。さらに、以下のパラメータで Wishbone による擬時刻の推定を行った。component_list = [1]、branch = False。GO term enrichment score は有糸分裂サイクルとエンドサイクルの両方に属する細胞のデータセットから、PANTHER を用いて同様に算出した。

供試植物の育成条件

野生型としてシロイヌナズナの Columbia-0 (Col-0) を用いた。キッチンブリーチの原液を用いて滅菌した種子は 2 倍希釈したムラシゲ・スクーグ培地 (1.4 % [w/v]寒天と 0.5 % スクロースを含む) (以下、1/2MS 培地とする)

に無菌的に播種した。播種後は人工気象器（バイオマルチインキュベータ、日本医化器械製作所）内で 22 °C、12 時間明期（白色光、84 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）、12 時間暗期の明暗サイクル下で生育した。核相測定と qRT-PCR には上記の条件で 10 日間育成した植物を 1 μM の IAA もしくは 1 μM IAA と 10 μM NPA を加えた 1/2MS 培地もしくは無添加の培地に移し 12 時間経過したものをを用いている。

核相測定

40 本の野生型の根端 5 mm を用いた。根はカミソリで切断し、0.5 mL の各抽出バッファ（Cystain UV precise P の A 液、Partec）に移した。その後、30 μm のフィルターメッシュを用いて夾雑物を取り除き、DAPI 染色液（B 液）に移した。核相レベルの測定には核相測定装置（Partec）を用い、検出された最も低いピークを 2C とした。

qRT-PCR

マニュアルに従って、RNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）を用いて RNA を抽出し、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit（Roche）により逆転写を行った。遺伝子発現の解析には CFX96 Real-Time PCR 装置（Bio-Rad）を用いた。IPP2 をそれぞれの処理区の内部標準としており、プライマーリストとサーマルサイクルの設定を以下に挙げる。それぞれのサンプルの Ct 値はテクニカルエラーを減らすために 3 つのウェルで独立に測定しその平均値を用いており、エラーバーは 3 つのサンプルから算出した生物学的なバラツキを標準偏差で示している。

CYCB1;1-RT-F, 5'- CCTGGTGGAGTGGTTGATTGATG;

CYCB1;1-RT-R, 5'- CGACATGAGAAGAGCACTGAGAC;

CYCB1;2-RT-F, 5'- TACATTGCAGTTCCACACCGGCTA;

CYCB1;2-RT-R, 5'- TAGCAACACCTCCATTCTCTGCCT;

IPP2-RT-F, 5'- GAGGATGGCTGCAACAAGTGT; and

IPP2-RT-R, 5'- GTATGAGTTGCTTCTCCAGCAAAG.

CYCB1;1, 95 °C for 10 s, ~40 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 15 s and 72 °C for 15 s;

CYCB1;2, 95 °C for 10 s, ~40 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 15 s and 72 °C for 15 s; and

IPP2, 95 °C for 60 s, ~40 cycles of 95 °C for 10 s, 63.6 °C for 15 s and 72 °C for 15 s.

第2章

幹細胞における概日時計の構築が 細胞分化を制御する

2-1. 序論

第1章では普遍的な生物リズムである細胞周期を取り上げたが、もうひとつの普遍的でよく知られた生物リズムとして概日リズムが挙げられる。概日リズムは概日時計により生み出される約24時間周期のリズムのことであり、動物、植物、菌類、藻類などほとんどの生物種で見られる。動植物の概日時計は主に転写因子をコードする複数の時計遺伝子で構成されており、これらの時計遺伝子は相互に発現を制御することでフィードバックループを形成し、約24時間周期の細胞自律的なリズムを生み出している (Inoue et al., 2018)。概日リズムは様々な現象を制御しており、動物では脳波、ホルモン分泌、睡眠や摂食、植物では葉の就眠運動や気孔の開閉、光合成活性、花成時期などが挙げられる。また、加齢などにより概日リズムが変調してしまうと、動物では高血圧、糖尿病、睡眠障害など様々な疾患が生じる。このように概日リズムが広範で重要な制御を行うことから、概日リズムの変調の意義は注目されてこなかった。さらには、生体内の大半の細胞が自律的に概日リズムを発振し、細胞間で同調しているため、長らく生体内のあらゆる細胞は均質な概日時計システムを持ち、細胞ごとの概日リズムに差異はないと考えられてきた。しかし、2000年以降、動物の概日時計には階層性があり、脳の視交叉上核に位置する細胞群はより堅固な概日リズムを示し、末梢器官の概日時計に対して支配的な制御を行うことが明らかにされた (Honma et al. 2018)。これに続き、時計システムが機能していない細胞集団が生体内から発見された。精巣の始原細胞では時計遺伝子の発現に概日リズムが見られない一方で、周囲のすでに分化した細胞の時計遺伝子は明確な概日リズムを示していた (Morse et al. 2003)。このことから細胞分化と概日時計の関係が注目され、ES細胞やiPS細胞などの人工の幹細胞もまた概日リズムを示さないことが報告された (Yagita et al. 2010)。さらに、iPS細胞の再分化過程では、振幅が止まっていた時計遺伝子の発現が概日リズムを示すようになり、再度脱分化を誘導することでこのリズムが消失することも示されている。このように、長らく細胞の個性と切り離され画一的に捉えられてきた概日リズムも実際には神経幹細胞に見られた遺伝子発現リズムと同様に、多様に変調しうるということが動物細胞の研究から示されてきた。

動物の概日時計研究が特定の組織・細胞種を対象にすることで進んだ一方で、植物は外科的な組織単離や単一細胞種の培養が困難なことから、近年まで植物における時計システムの差異を扱った研究は存在しなかった。しかし、2014年に迅速な組織単離を可能にする実験系を用いることで、植物の概日時計にも組織特異的な発現パターンがあることが示された (Endo et al. 2014)。植物の概

日時計は *CCA1* と *LHY*、*TOC1* から成る中心的な振動子と、PSEUDO RESPONSE REGULATOR (PRR) ファミリーに属する *PRR5*、*PRR7*、*PRR9* や Evening Complex (EC) を形成する *ELF3*、*ELF4*、*LUX* などの因子が互いにフィードバックループを形成することで概日リズムを刻んでいる (Fig. 1)。*CCA1* と *LHY* は夜明け前に、*PRR5*、*PRR7*、*PRR9* と *TOC1* は朝から夕方にかけて、*ELF3*、*ELF4*、*LUX* は夕方から夜にかけて一過的に発現することが知られている。これらの因子は組織特異的な発現パターンを持ち、維管束では主に EC 関連の時計遺伝子が他の時計遺伝子に比べ優勢的に発現し、葉肉組織では *PRR* ファミリーや *CCA1* と *LHY* が EC 関連遺伝子よりも高発現することが報告された (Endo et al. 2014) (Fig. 1)。後に、このような時計遺伝子の発現パターンは組織特異的な環境応答制御を可能にし、植物組織ごとの概日時計は動物のような階層的な構造ではなく、協調的な制御を行い個体レベルでの情報の統合を行なっていることが示された (Shimizu et al. 2015)。さらに、植物の幹細胞が集中する根端と茎頂では時計遺伝子 *CCA1* の発現において概日リズムが消失していることが知られている (Fukuda et al. 2012)。そのため、iPS 細胞などでみられた幹細胞の分化過程における概日リズムの形成現象は植物のメリステム幹細胞でも存在が示唆されており、植物の概日リズムもまた細胞分化とともに生じる可能性があった。これらの研究から植物もまた細胞ごと異なる時計システムをもち、その概日リズムは様々に変化し機能することが明らかになっていた。

以上のように、時計遺伝子の発現プロファイルは組織・細胞ごとに大きく異なり概日リズムは様々に変調することが動植物で共通して示されていた。しかし、神経幹細胞で見られた遺伝子発現のリズムのように、時計遺伝子の変調が細胞の運命を左右するとは動植物どちらの分野でも考えられてこなかった。この原因として、神経幹細胞で発現変動する遺伝子群は細胞分化のマスター因子である一方で、概日時計は様々な現象に間接的に機能するハブであるため、細胞分化との結びつきが希薄であることが挙げられる。それゆえに、幹細胞の分化誘導時に見られた概日リズムの再発振は、細胞分化による制御が概日時計を制御した結果として捉えられ、概日リズムの再発振が細胞分化を制御する可能性は考慮されていなかった。しかし、動植物の概日時計機能の欠損は様々な発生・発達の表現型を示すことが知られており、概日時計から細胞分化への寄与は十分に示されている (Brown 2014, Aihara et al. 2013)。さらに、細胞の運命決定に関わる大部分の植物の遺伝子が明暗条件下で約 24 時間の発現周期を示すなど、

植物では概日時計による広範な細胞運命の制御が示唆されていた (Endo et al. 2014)。

これらの報告から、概日リズムの変調が細胞分化を制御する可能性は十分に想定できたものの、概日時計による細胞分化の制御は動植物を通じて単なる転写ネットワークの一部として見なされ、概日リズムの変調のようなダイナミックな概日時計の制御機構は見落とされてきた。そのため、実際に細胞の分化過程で概日リズムがどのように変調するのか、そしてその変調は細胞分化を制御するのか知ることで、これまでは見逃されていた概日時計の新たな制御様式が明らかになると考えた。特に、植物は分化全能性を持つことから、分化多能性を持つ iPS 細胞を用いた再生医療研究だけからは導き出せない、新規かつ普遍的な現象を明らかにできる可能性があった。しかし、植物研究には iPS 細胞のような幹細胞の培養細胞系がなく幹細胞単離も困難なため、器官・組織レベルの解析が主であり、単一細胞、特に幹細胞を対象とした概日時計研究はこれまで例がない。そのため、器官・組織レベルの概日時計システムの違いは明らかにされてきたものの、その概日時計システムの差異が分化過程でどのように生じるのか、そして発生・発達におけるその差異の意義は全く明らかになっていない。幹細胞の分化過程における概日リズムの変調を知るには従来以上の時空間解像度を持った解析手法の導入が必要である。この時空間解像度の問題を解決するためには、幹細胞を大量に誘導する系と scRNA-seq を組み合わせることが有効であると考えた。scRNA-seq データは擬時刻により時系列解析が可能であり、第 1 章で示した以外にもこれまで動植物の様々な細胞分化過程における分化関連因子の詳細な発現変化が示されてきた (Efroni et al. 2016, Jean-Baptiste et al. 2019, Ryu et al. 2019, Shulse et al. 2019, Zhang et al. 2019)。

このように、幹細胞からの分化過程における時系列解析自体の研究例は増えてきており、植物における幹細胞分化の研究においても scRNA-seq は非常に有効であると考えられた。しかし、これまでの擬時刻は既知の遺伝子発現変動の知見を取り込んでおらず、そのために、時系列情報の精度は必ずしも十分ではなかった。さらに、擬時刻はあくまでも遺伝子発現変動に基づいて再構築されるため、概日リズムにおける周期解析のような実際の時間スケール (実時刻) に基づいた解析は不可能であったため、概日リズムを 1 細胞レベルで解析した例はほとんど存在しなかった。そこで本研究では、既知のマーカー遺伝子の変動を加味し、scRNA-seq データから実時間軸を再構築する新たなアルゴリズムの開発を含めた新規解析パイプラインを作ることで、分化過程における概日リズムの変

調とその意義を明らかにすることを目的とした。具体的には、第一章で用いた Wishbone に加えて既知の遺伝子発現パターンの組み合わせに基づいて擬時刻を再構築する Seurat (Satija et al. 2015)、二部グラフマッチングによりバルクデータが持つ時間情報を擬時刻に付与する新規アルゴリズム PeakMatch を組み合わせた解析パイプライン Wishbone-Seurat-PeakMatch (WISP) を開発した。これにより、scRNA-seq データから再構築した実時間軸上において、概日リズムの約 24 時間の周期性を確認した。細胞運命決定に関わる遺伝子と概日時計遺伝子の発現を確認したところ、分化誘導後に概日時計システムが再構築されていることを確認し、これにより細胞分化や分裂が制御されていることが明らかになった。これらの結果から、概日リズムは細胞の運命転換過程においてダイナミックに変調し、その変調により様々な細胞運命の制御を行っていることを明らかにした。

2-2. 結果

植物の幹細胞は茎頂や根端といった限られた領域にごくわずかに存在しているため、生体内の幹細胞のみを取り出し、分化過程の様々な段階の遺伝子発現変化を解析することは困難である。そのため、幹細胞を大量に誘導し、任意のタイミングで分化過程の細胞をサンプリングできる、維管束の分化誘導系 Vascular Cell Induction Culture System Using Arabidopsis Leaves (VISUAL) を導入した (Kondo et al. 2016)。VISUAL では、液体培地に植物ホルモンであるオーキシシン (2,4-D) サイトカイニン (kinetin) と GSK3s の抑制を行う Bikinin を添加することで、子葉内の葉肉細胞から維管束幹細胞への脱分化を誘導し、連続して木部細胞と篩部細胞の2種類の細胞への分化を誘導する (Fig. 2)。この系を用いて、自律的な概日リズムが消失している *cca1 lhy toc1* の三重変異体において野生型 (Col.) に比べ木部細胞の分化誘導率が低下していることをすでに確認してきた (鳥井孝太郎 修士論文, 2017)。この結果をさらに発展させるため、本研究では、概日時計による細胞分化制御のダイナミクスとその分子メカニズムを理解することを目的とした。

まず、分化誘導系 VISUAL において、概日時計が分化誘導のどのステップで分化を制御しているかを明らかにするため、分化誘導の過程で誘導される細胞種のマーカー遺伝子の発現パターンを確認した。分化誘導前後4日の間、4時間おきに子葉をサンプリングし、qPCRによって葉肉細胞マーカー (*LHCB2;1*) と維管束幹細胞マーカー (*ANT*)、木部細胞マーカー (*VND7*) の発現量を計測した (Fig. 3)。その結果、*cca1 lhy toc1* では *ANT* と *VND7* の発現が野生型よりも低下しており、維管束幹細胞と木部細胞の誘導が阻害されていることが明らかになった。このことから、概日時計は葉肉細胞から維管束幹細胞、維管束幹細胞から木部細胞の2つのステップのいずれかもしくは両方の進行に関わっていることが明らかになった。ここでは、特に最初のステップである葉肉細胞から維管束幹細胞へのステップに着目し、以降の解析をおこなった。

cca1 lhy toc1 では自律的な概日リズムが消失していることから、概日時計によって生み出される概日リズムが分化誘導に重要ではないかと考え、次にこの分化誘導系において概日リズムがどのように変調するのかを調べた (Ding et al. 2007)。しかし、分化誘導の進行度合いは細胞ごとに異なっており、分化誘導過程の子葉には様々な細胞種が混在している。そのため、子葉全体を対象としたバルクでの遺伝子発現解析では異なる細胞種の平均発現量しか知ることができない。また、これまでの知見から幹細胞では概日リズムが見られず分化細胞では

概日リズムが見られると予想されることから、分化誘導の進行度合いが異なる細胞の平均により、概日リズムが正しく計測できない可能性があった。そこで、分化誘導過程の概日リズムの変化をより正確に捉えるためには、異なる細胞種で平均化された発現量ではなく、1細胞レベルでの発現量の解析が必要であると考え、scRNA-seqを導入した。

通常の scRNA-seq では細胞を単離することで1細胞由来の RNA を回収するが、植物は高い分化能を持つために、細胞単離によるストレスの影響により、細胞の運命が速やかに変化してしまうことが懸念された。そのため、本研究では細胞単離による細胞へのストレスを最小化するため、マイクロマニピュレーション法による RNA 抽出を採用した (Fig. 4)。まず、マイクロマニピュレーション法による RNA 抽出は細胞へ与えるストレスが十分に低いことを示すため、scRNA-seq データにおけるストレス応答性遺伝子 *ADHI*、*COR15A*、*RD29* の発現量を確認した (Fig. 5A)。scRNA-seq データと子葉全体を用いたバルクの RNA-seq データを用いて発現量を比較したところ、3つの遺伝子のいずれにおいてもバルクデータと同程度もしくは scRNA-seq の方が低い発現量であった。このことから、マイクロマニピュレーションによる細胞へのストレスは極めて軽微であり、特段のストレス誘導は起こっておらず、得られた scRNA-seq データは分化誘導過程における遺伝子発現プロファイルを正確に反映していることが確認された。しかし、マイクロマニピュレーションは細胞内容物を吸い出す方法であるため、液胞内にある RNAase 等の影響により RNA が分解した結果プロファイルが変わってしまっている可能性も考えられた。そこで、サンプリング直後にライブラリを調整したサンプルとサンプリング後に時間をおいてからライブラリを調整したサンプルとの間で遺伝子発現プロファイルを比較した (Fig. 5B)。サンプリング直後のサンプルに対する遺伝子発現プロファイルの相関係数を算出したところ、サンプリング後 10 秒から 10 分経過したサンプルのいずれも 0.7 以上の高い相関係数を示し、サンプリング後 10 分経過したサンプルにおいても相関係数の低下が見られなかった。これらの結果から、マイクロマニピュレーション法による発現プロファイルへの影響は極めて軽微であることが確認できた。以上の結果から導入した scRNA-seq 系を用いて安定かつ正確な scRNA-seq データが得られることが明らかになった。

分化過程の時系列データを得るため、分化誘導前の 1 日と分化誘導後 3.5 日の間、4 時間おきに各タイムポイント 7 細胞以上から 1 細胞由来の RNA を抽出し、最終的に 216 細胞分の scRNA-seq データを得た (Fig. 6)。この 216 細胞のデータセットが分化誘導過程の時系列をもれなく正確に捉えており、十分な

解析数であるか確認するため、分化誘導過程で生じる様々な細胞種がこのデータセットに含まれるのかを確認した。この分化誘導系では子葉の葉肉細胞が確率論的に分化誘導され複数の細胞種が混じる結果、分化が進行するにつれサンプル間の発現プロファイルの相関係数は低下すると考えられる。そこで、全 28 のタイムポイントそれぞれのデータ間での相関係数を算出した結果、分化誘導の進行とともに細胞間での発現プロファイルの相関が低下しており、個々に異なる発現プロファイルを持つ細胞が増加していた (Fig. 7)。しかし、様々な発現プロファイルを持つ細胞が含まれていることを確認しただけでは、このデータセットが分化誘導の時系列を漏れなく含んでいる証拠としては不十分であった。そこで、これら細胞が分化誘導過程における一連の細胞運命の変化全体を満遍なく含むことを確認するため、t-SNE による次元圧縮を行い、各細胞を二次元の t-SNE 平面上に投影した (Fig. 8)。その結果、第 1 章と同様に連続した細胞の軌跡が表され、このデータセットでは遺伝子発現プロファイルが連続的に変化することが示された。これにより、分化誘導過程において細胞は連続的に分化しており、分化誘導過程の時系列を偏りなく捉えていることが確認された。

次に、t-SNE 平面上で示された細胞の軌跡が分化誘導の時系列を正しく反映しているのかを確認するため、細胞種マーカー遺伝子の発現を調べた (Fig. 9)。葉肉細胞マーカー (*LHCB1;2*) の発現は t-SNE 平面の右下にある軌跡の一端から二又の分岐にかけて、発現量の勾配が見られた、維管束細胞のマーカーである *TDR* の発現量は二又の分岐の手前で強く、木部マーカーである *IRX3* は分岐の右側でのみ、篩部細胞のマーカーである *APL* の発現は左側でのみ強く発現していた。このことから、分化誘導過程の細胞運命は t-SNE 平面上の右下から上部にかけて変遷しており、これは既知の遺伝子発現パターンの変遷と一致するものであり、分化過程が正確に再構築されていることが示された。また、2 又の分岐はマーカー遺伝子の発現パターンから木部細胞と篩部細胞への分化過程を反映していると考えられたことから、木部細胞と篩部細胞のマーカー遺伝子の発現量をそれぞれの軌跡に含まれる細胞間で比較した (Fig. 10)。その結果、t-SNE 平面上で右側に位置する細胞系譜ではより多くの細胞で木部マーカー遺伝子 *VND7* や *IRX8* の高発現が確認された一方で、篩部細胞のマーカー *APL*、*SEOR1* の発現は低く、ごく少数の細胞でのみ確認された。これと一致して、左側の細胞系譜では右側の細胞集団とは逆の結果が見られたため、左右の軌跡はそれぞれ篩部細胞と木部細胞への分化過程を示していることを明らかにした。以上の結果から、t-SNE 平面上における細胞の軌跡は分化誘導過程の細胞運命の変化を正確に反映し、この軌跡を利用することで分化過程における時系列を再構築可

能であることが示された。本研究では特に木部細胞系譜にのみ解析対象を絞り、以降の解析を行った。

分化誘導過程の時系列を再構築するために t-SNE の軌跡から擬似的な時間軸 (擬時刻) を算出するアルゴリズム Wishbone を用いて、葉肉細胞から木部細胞への分化誘導過程における擬時刻を得た。この擬時刻が分化誘導過程の時系列を正確に再構築できているか確認するため、擬時刻上における各細胞タイプマーカーの発現を調べた (Fig. 11A)。図では点で各細胞における遺伝子発現量を示し、実線で移動平均 (window=7) を示し、実線を中心に色付けられた領域で移動標準誤差を表している。葉肉細胞マーカー (*LHCBI;2*) から木部細胞マーカー (*IRX8*) へ発現が移り変わる結果が得られ、Wishbone による擬時刻の構築が予想通りであることを示していた。

Wishbone では主成分解析によりノイズを抑えてはいるものの、既知の遺伝子発現パターンの情報は利用していない。そこで、分化誘導過程において明確に発現変動する遺伝子セットを絞り込むことで、scRNA-seq データからより正確に時系列を再構築できると考えられた。そこで、scRNA-seq と同様に分化誘導の前後 4.5 日間、4 時間おきにサンプリングした子葉からバルク RNA-seq データを取得した。このバルクおよび scRNA-seq のデータセットから発現が特徴的に変動していた 24 の遺伝子を選別し、マーカー遺伝子とした。これらの 24 の遺伝子の発現パターンをもとに、Seurat を用いて擬時刻を作成した。Wishbone のみによって作成した擬時刻 (Wishbone) と比べて Wishbone のあとで Seurat を作成した擬時刻 (Seurat) では、擬時刻 (Wishbone) の 70–110 で見られた、*LHCBI;2* を高発現する細胞と低発現する細胞の混在が抑えられ、*IRX8* を高発現する細胞は 160–180 に集められていた (Fig. 11B)。これにより、Wishbone だけでなく Seurat を組み合わせることでより精度の高い擬時刻を作成できることが確認され、この方法を以降の解析に用いた。

これまでにより、分化誘導過程を正確に反映した擬時刻が作成された。しかし、擬時刻では細胞の順序のみが示されており、細胞と細胞の間隔は等間隔に設定され時間の情報を含んでいない。概日リズムは 24 時間という実時間に基づく振動現象であるため、擬時刻を用いた概日リズムの解析は不可能であった。これに対して、細胞と細胞の間隔を適切に調節し、擬時刻に時間情報を付与することができれば、時間的な側面からの議論が可能となり、概日時計による細胞運命決定機構をより詳細に解析できると考えられた。そこで、バルクデータが持つ時間情報から擬時刻における各細胞の間隔を調整することで、実時間の情報を付

与するアルゴリズム PeakMatch を共同研究により新たに開発した (Fig. 12) 。PeakMatch ではバルクの時系列 RNA-seq データに含まれる遺伝子発現のピーク時刻の時間情報精度の高さに注目する。バルクデータにおけるピーク時刻は最大多数の細胞が最大の発現量を示したタイミングであり、高い時間情報を保持している。そこでまず、scRNA-seq データ内のある遺伝子の発現ピークの時刻と実時間情報を持つバルク RNA-seq データにおける同一の遺伝子の発現ピークを対応させるように細胞間隔を調節した。発現ピークにおける時刻は scRNA-seq から作られた時系列でもバルク RNA-seq から作られた時系列でも共通であると考えられることから、ピーク周辺の時間帯では高精度に時刻を予想することが可能となる。こうしたピーク同士の対応を多数の遺伝子で行い、ランキングアルゴリズムにより最適な間隔を最終的に決定し、擬時刻に時間情報を割り当てた。こうした時間情報の割り当てにより、最終的に、擬時刻軸の細胞の配列が実時間に沿った間隔に調整され実時間軸での時系列解析が可能となった。今回の PeakMatch 解析では、擬時刻上のシングルセルデータと子葉由来の時系列 RNA-seq データの間で 0.5 以上の相関係数を示した 2,217 遺伝子から実時間軸を作成した。こうした時間情報の付与により、バルク RNA-seq よりも時間解像度の向上が図られたかを確認するため、バルク RNA-seq データと scRNA-seq の遺伝子発現ピークの半値幅を比較した (Fig. 13) 。バルク RNA-seq で示される遺伝子発現ピークは少しずつタイミングが異なる複数の細胞の遺伝子発現の総和であるため、遺伝子発現ピークの半値幅は 1 細胞が示すであろう遺伝子発現ピークの半値幅より広くなると予想される。実際、全てのマーカー遺伝子の発現の半値幅は scRNA-seq でバルク RNA-seq の半値幅より低い値を示しており、PeakMatch により得られた実時間軸はより正確な時間情報を持つことが示された。PeakMatch による時間情報の付与が正しいことをさらに確認するために、PeakMatch 補正には用いなかった時計遺伝子の発現を確認した。代表的な時計遺伝子である *LHY* と *CCA1* の発現は分化誘導前には 24 時間周期の概日リズムを示していたが、分化誘導直後に位相がシフトし、分化誘導後 35 時間以降には約 24 時間周期の概日リズムを再度示していた (Fig. 16A) 。*LHY* と *CCA1* の発現に見られた位相のシフトは幹細胞における概日リズムの変調を意味していた。

こうして得られた実時間軸において、どのような細胞タイプが存在するかを明確にするため、階層クラスタリングにより遺伝子発現プロファイルを分類し、ヒートマップで可視化することで時間軸を区分けした (Fig. 14) 。最終的に、葉肉細胞のマーカーを含んだグループ、維管束幹細胞のマーカーを含んだグル

ープ、木部細胞のマーカールを含んだグループ、さらに、メリステム幹細胞マーカールである *LOM2*・*RGF6*や、カルス化に関わる *ACS6*・*OBP1*を高発現する未知なグループの4つのグループに分類された。未知のグループの特性をより明らかにするために、分化誘導過程における幹細胞マーカール(*LOM2*, *RGF6*, *ACS6*, *OBP1*)の発現をqPCRにより改めて解析した (Fig. 15)。その結果、*ACS6*は分化誘導後16時間目で発現ピークを示し、*LOM2*, *RGF6*, *OBP1*はそれぞれ分化誘導後24-32時間目で発現ピークを示した。その一方で、維管束幹細胞マーカールである *ANT*は分化誘導後36時間目で発現ピークを示し、分化誘導後16時間目で葉肉細胞マーカールである *LHCBI;2*の発現は消失することを確認した。こうしたことから、分化誘導過程において、幹細胞マーカールの発現は葉肉細胞と維管束幹細胞の間に位置づけられ、この分化誘導系においては葉肉細胞が脱分化しメリステム幹細胞になった後に維管束幹細胞へと分化することが示された。

こうして分類された4種の細胞種が実時間上でどの時間帯に位置するかを明らかにするために、4つのクラスに含まれる遺伝子の正規化された平均発現量が実時間軸上で交差する点を調べ、細胞タイプが切り替わる時間とした。その結果、分化誘導後7h 10mまでを葉肉細胞期、7h 10m - 35h 00mをメリステム幹細胞期、35h 00m - 57h 20mを維管束幹細胞期、57h 20m以降を木部細胞期と定義した (Fig. 14)。以上の結果から、分化誘導初期にはメリステム幹細胞が誘導されることを新たに明らかにした。

こうして得られた時系列データを基に、概日リズムが分化過程のいつどの細胞種において変調するのかに着目して解析をおこなった。実時間が再構築された時系列データにおける時計遺伝子の発現パターンを確認したところ、すでに示したように *CCA1*や *LHY*の発現は基本的には24時間周期を示していた。しかし、分化誘導直後のピークから次のピークまでの間は約36時間であり、一時的に概日リズムが見られない時間帯の存在が示唆された (Fig. 16A)。このような概日リズムの停止が他の時計遺伝子でも見られるのか確認したところ、分化誘導後8-24時間ではほとんどの時計遺伝子の発現レベルが減少しており、概日リズムの停止が示された (Fig. 16A-C)。分化誘導後8-24時間はメリステム幹細胞期の初期にあたることから、メリステム幹細胞では概日時計は一時的に停止しており、その後再び機能し始めるという概日リズムのリセットが行われていることが示された。くわえて、*CCA1*や *LHY*, *PRR5/7/9*など中枢時計と *PRR*ファミリーに属する時計遺伝子では分化誘導前の葉肉細胞で発現が強く、分化誘導直後から発現が弱くなる傾向が観察された (Fig. 16A, B)。このように分化誘導の進行とともに発現が減少する時計遺伝子が見られた一方で、転写

因子複合体 Evening complex (EC) を形成する *ELF4* や *LUX* といった時計遺伝子は分化誘導前には発現が弱く、分化誘導後 24 時間目から発現が強くなる全く逆の発現パターンを示した (Fig. 16C)。こうした結果は、メリステム幹細胞初期に概日リズムは一度消失し、その後、葉肉細胞で機能していた時計システムとは全く異なる EC を主体とした時計システムが再構築されていることを示していた。このような特徴的な時計システムの変化がどの細胞種で起こっているのかを調べるために、各細胞種マーカーの発現と時計遺伝子の発現の相関係数をヒートマップにより示した (Fig. 17)。その結果、*CCA1* や *LHY*、*PRR5*、*PRR7*、*PRR9* は葉肉細胞マーカーとの発現の相関が高く、メリステム幹細胞以降の細胞マーカーとは全く相関がないことが示された。これらの因子とは逆に、*ELF3* や *ELF4*、*LUX*、*NOX* といった EC を構成する遺伝子は葉肉マーカーと低い相関を示す一方で、メリステム幹細胞マーカーである *ACS6* や *OBP1* と高い相関を示し、その後の維管束幹細胞や木部細胞のマーカーとも高い相関関係にあることが明らかになった。この結果もまた、メリステム幹細胞への細胞運命変化を境に概日時計システムがダイナミックに変化していることを示すものであった。

メリステム幹細胞において概日時計システムが変化していることは明らかになったものの、両者の関係は不明のままであった。すなわち、メリステム幹細胞から分化する際に概日時計システムも併せて変化するのか、逆に、概日時計システムの変化がメリステム幹細胞からの分化に関わるのかについては、これまでの解析からはよくわからないままであった。そこで、メリステム幹細胞において最初に概日時計の変調が観察されるタイミングと最初に細胞分化関連遺伝子の発現が上昇するタイミングを比較することで、どちらが先に起こっているのかを判断することで、因果を推測できるのではないかと考えた。細胞分化が活性化されている時期では、細胞分化を示す GO term が濃縮されていると想定されることから、GO term 解析を用いて分化関連遺伝子の発現が活性化されている時間帯と概日リズムが変調する時間帯との前後関係を解析した (Fig. 18)。概日リズムの変調を示す EC 関連遺伝子 (*ELF4* と *LUX*) の発現の変調は分化誘導後 24 時間目以降で初めて観察された。一方で、“Cell wall biogenesis”、“Regulation of secondary cell wall biogenesis”など木部細胞分化を示す分化関連遺伝子群の発現上昇は分化誘導後 50 時間目以降に見られ、概日リズムの変調は細胞分化関連遺伝子の発現に先駆けて行われることが明らかになった。さらに、“Cell cycle”や“Positive regulation of cell proliferation”の細胞分裂関連の遺伝子群の活性化は分化誘導後 32 時間目以降に、見られていることから、概

日リズムの変調は細胞分裂関連の遺伝子の発現上昇よりもさらに早いことが明らかになった。同様に、概日リズムの変調は“DNA methylation”や“Regulation of histone H3-K27 methylation”などのエピジェネティックな制御を示す遺伝子群の活性化よりも早かった。こうしたことから、概日リズムの変調は細胞分裂・分化を含む細胞運命の決定に先駆けて起こり、これが細胞運命に関連する遺伝子の発現制御を行っている可能性が示された。

概日リズムの変調が細胞の分化を制御していることを確認づけるため、時計遺伝子の変異体では細胞分化がどのように阻害されるのか調べた。概日リズムの変調により発現が上昇する EC 関連遺伝子の中でも転写因子である *LUX* が分化誘導の進行に特に重要であると考えられた。そこで、*LUX* とそのホモログ *NOX* の二重変異体 *lux nox* の分化誘導系における木部細胞の誘導率を調べたところ、野生型 (*CAB2::LUC*) に比べ木部細胞の分化誘導率は顕著に低下していた (Fig. 19)。この結果は *LUX* の発現上昇が分化誘導の進行に必要であることを示していたものの、メリステム幹細胞への脱分化過程とメリステム幹細胞からの分化過程のうち *LUX* がどちらに重要な役割を果たしているかは不明であった。ただし、概日時計の変調が観察されるのはメリステム幹細胞からの分化の初期段階であることから、概日時計はメリステム幹細胞への脱分化ではなく、分化を制御していると考えられた。この仮説を証明するため、野生型と時計遺伝子変異体 *lux nox* および *cca1 lhy toc1* におけるメリステム幹細胞マーカー *LOM2*、*RGF6*、*ACS6*、*OBP1* の発現パターンを計測した (Fig. 20)。その結果、いずれの時計遺伝子変異体においてもメリステム幹細胞マーカーの発現量は野生型と同程度であった一方で、メリステム幹細胞から分化する維管束幹細胞や木部細胞のマーカーである *ANT* や *VND7* の発現量は野生型の半分以下に抑制されていた (Fig. 21)。こうした結果から、葉肉細胞からメリステム幹細胞への脱分化というよりはむしろ、概日リズムの変調が起こるメリステム幹細胞の分化で概日時計が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

これまでの結果で示された時計遺伝子変異体における遺伝子発現量の変化が、実際に細胞分化・分裂の異常を引き起こしているのかを確認するため、分化誘導後の核相の変化を確認した (Fig. 22)。野生型では分化誘導後に 2C と 16C の細胞を示すピークの値が増え、4C と 8C のピークが減少しており、細胞分裂と細胞分化がともに進行していることが示された。その一方で、時計遺伝子の変異体では 2C の増加がみられず、32C のピークが現れていたことから、エンドサイクルが亢進する一方で、有糸分裂活性が低下していることが示された。こうした結果から、概日時計の変調により実際に分裂活性や細胞分化の進行が制御され

ることが明らかとなった。さらに、観察された核相の変化が概日時計による遺伝子発現制御を介して行われていることをより直接的に明らかにするため (Fig. 23)、エンドサイクルと有糸分裂の切り替えを制御する *CYCD3;1* と *E2Fc* の発現量を野生型および *lux nox* で比較した。*CYCD3;1* はエンドサイクルへの移行を抑制し、その発現量の低下は 32C の細胞数の増加と 2C の細胞数の増加抑制を引き起こす。また、反対に、*E2Fc* はエンドサイクルへの移行を促進し、その発現量の上昇は 32C の細胞数の増加と 2C の細胞数の減少を引き起こす。解析の結果、野生型において *CYCD3;1* と *E2Fc* は共に分化誘導の進行とともに発現量が上昇していたが、*lux nox* では *CYCD3;1* の発現量は野生型の半分以下になり、*E2Fc* の発現は 2 倍以上に上昇していた。これらの結果は先に示された核相の結果をよく説明するものであり、分化誘導過程において概日リズムの変調は細胞の分化・分裂を制御することが示された。

こうした明らかになった概日時計による細胞分化制御メカニズムが、分化誘導系という特殊な状況でのみ観察される仕組みではなく、生体内でも普遍的に存在する普遍的な仕組みであることを確認するため、第 1 章で用いた Ryu らの scRNA-seq データを用いて根において同様の現象が観察されるかを検証した。野生型の根端細胞の scRNA-seq データを t-SNE 平面上にプロットし、*LUX* の発現パターンを調べたところ、これらの細胞は特定の時点でサンプリングされたにも関わらず細胞ごとに *LUX* の発現量は大きく変化しており、根端では概日リズムの変調が起こっていることが示された (Fig. 24A)。さらに、維管束分化誘導系のマスター制御因子である *BESI* と *LUX* の発現量の相関を調べた (Fig. 24B)。その結果、Ryu らのデータにおいても *BESI* と *LUX* の発現量の相関係数は 0.8 を超え、これらの因子が極めて高度に相関することが示された。この結果は *LUX* の発現が維管束分化誘導系と同様の制御を受けることで概日リズムの変調を促すことを示すものであった。さらに、この根端における概日リズムの変調が細胞分化・分裂の制御に関わっていることを示すため、*lux nox* と *cca1 lhy toc1* を用いて根端メリステムにおける表現型の観察を行った。*lux nox* と *cca1 lhy toc1* の両方でメリステム領域は減少しており、EdU 染色によるメリステム領域の S 期の細胞の割合も、野生型で見られた ZT16-0 にかけてのピークは、時計変異体では消失していた (Fig. 25A、Fig. 25B)。こうした観察結果はいずれも、根端においても分化誘導系と同様に、概日リズムの変調が細胞の分裂・分化を制御することを示すものであった。さらに、根以外の他の組織においてもこのような概日時計による細胞分裂・分化制御が存在するかを確認するため、*lux nox* と *cca1 lhy toc1* の子葉における葉脈の表現型を確認し、特に *lux*

*nox*では異常な形状の葉脈が多数見られることを明らかにした (Fig. 25C)。これらの結果を総合し、概日時計による細胞分裂・分化制御メカニズムが維管束分化誘系と同様に生体内においても確かに存在すると結論づけた。

2-3. 考察

本研究により、概日リズムは様々に変調し細胞の運命を左右することが示された。観察された変調は二つあり、メリステム幹細胞における概日リズムのリセットと新たな時計遺伝子の発現プロファイルで構成される時計システムの再構築である。これらのような概日リズムの変調は分化誘導系 VISUAL のマスター因子である転写因子 BES1 による時計遺伝子 *LHY* の直接的な発現抑制によって起こると考えられる (Yu et al. 2011)。そのため、分化誘導後に見られた *LHY* の発現レベルの低下は BES1 の制御によるものだと考えられる。そして、*LHY* は *ELF4* と *LUX* の発現を抑制しており、BES1 による *LHY* の抑制は *ELF4* と *LUX* の発現を上昇させると考えられる。実際に根端の scRNA-seq データの再解析結果から、*BES1* の発現と *LUX* の発現は高い相関を示しており、*BES1*-*LHY*-*ELF4*/*LUX* シグナル経路によって概日リズムのリセットと時計システムの再構築が行われることが示唆された (Fig. 26)。さらに、この概日リズムの変調は細胞の運命を制御することが明らかになった。*lux nox* 二重変異体では分化誘導が阻害され、分化誘導過程における *CYCD3;1* の発現が低下しており、木部分化のマスター因子 *VND6/7* の発現抑制を行う *E2Fc* の発現が上昇していた。このことは、細胞分裂と分化両方の制御を、概日リズムの変調によって発現が上昇した *LUX* が行なっていることを示していた。

幹細胞における概日リズムの振動停止は初期の側根原基でも見られ、動物の iPS 細胞や ES 細胞などでも観察されている (Voß et al. 2015, Yagita et al. 2010)。また、iPS 細胞では分化の進行とともに概日リズムが発振される点においても今回の研究結果と一致していることから、本研究で明らかになった幹細胞における概日リズムの振動停止は植物だけでなく種を超えた普遍的な現象であることが示された。さらに、メリステム幹細胞では、脱分化する前の葉肉細胞で強く発現していた *CCA1* や *LHY*、*PRR5*、*PRR7* の発現が減少し、逆に *ELF4* や *LUX* の発現が上昇していた。このような細胞種によって時計遺伝子の発現プロファイルが変化することは生体内の維管束と葉肉の間でも見られており (Endo et al. 2014)、本研究結果とよく一致する。さらに、ES 細胞における時計遺伝子の発現プロファイルもまた分化細胞とは異なっており、こういった点においても植物の幹細胞と共通した現象が観察された (Dierickx et al. 2017)。また、メリステム幹細胞における時計システムの再構築が細胞分化・分裂を制御することについても、動植物での類似性が考えられた。マウスの時計遺伝子 *Clock* の変異体では ES 細胞が自発的に分化することから、時計遺伝子の発現プロファイルの変化が細胞分化を誘導する可能性が示されていた (Lu et al. 2016)。

ES細胞における時計遺伝子 *Cry* の欠損はES細胞の分裂活性を低下させることも知られている (Dierickx et al. 2017)。このように時計遺伝子の発現プロファイルの変化による細胞分化・分裂の制御と幹細胞での概日リズムの消失は動物に共通した普遍的なメカニズムであることが示唆された (Fig. 27)。

このような種を超えた普遍的なメカニズムが実現する背景には、分子メカニズムの機能的な相同性がある。動植物の時計遺伝子は相同性を持たず全く異なる起源を持つにも関わらず、概日時計の仕組みとしては高度な普遍性を示している。動物の概日時計では *CLOCK/BMAL1* の正の転写因子複合体が負の転写因子である *PER/CRY* とフィードバックループを形成しており、転写フィードバックループによりリズムを形成している点での類似性は驚くほど高い。こうした事実はアミノ酸あるいはタンパク質の機能から生み出せる仕組みの有限性を示唆するものであり、安定したリズム形成を実現するための必然の形であり、ある種の収斂進化を見ていると考えられた。

こうした概日時計では分子レベルの機能の類似性は、より高次のシステムの機能の類似性を予感させるものであった。今回示唆された *BES1-LHY-LUX* 経路は、ブラシノステロイドシグナルによる入力を概日時計が受け細胞分化を制御することを示している。そしてこのブラシノステロイドシグナル伝達経路は、概日時計への入力を行いかつ細胞の運命制御を行う *Wnt* シグナルと高い相同性を示すことが指摘されている (Sharma et al. 2014)。ブラシノステロイドシグナルでは植物ホルモンであるブラシノステロイドや分泌性のペプチドである *TDIF* がそれぞれ膜上受容体キナーゼ *BRI* と *TDR* に結合する (Fig. 28)。それぞれの複合体は *GSK3s* によるリン酸化を促進し、*GSK3s* が *BES1* のリン酸化を介してプロテアソームによる *BES1* を分解し遺伝子発現を制御している (Kondo et al. 2014)。一方で *Wnt* シグナルでは、分泌された *Wnt* は細胞膜上の *Fz* と共役受容体である *LRP 5/6* に結合し、*GSK-3 β* のリン酸化活性を抑制することで転写因子である β -カテニンの分解を抑え、遺伝子発現制御を行う (Buechler et al. 2018)。そして、*Wnt* 経路では *GSK-3 β* が大半の時計遺伝子タンパク質のリン酸化を介して、ブラシノステロイドシグナル経路では *BES1* が *LHY* と *TIME FOR COFFEE (TIC)* などの転写制御を介して時計への入力を行っている (Bellet et al. 2010, Yu et al. 2011)。このように分泌性のシグナル因子を細胞膜上で受容し、*GSK* によるリン酸化活性の変化を介して転写因子の安定化・不安定化を行うといった、類似した分子機能を利用して、ブラシノステロイドシグナルと *Wnt* シグナルは共に分化制御に関わる遺伝子発現を制

御している。このことから、動植物における概日時計と細胞分化の高度な普遍性は、一連の分子機能の類似性によって実現されていることが考えられた。

これまで植物の研究は、動物でよく研究された遺伝子の相同遺伝子に着目することで機能解析をする例が多かったが、今回の例のように核酸あるいはアミノ酸配列の相同性ではなく分子機能の相同性に着目することで、あらたなシグナル伝達メカニズムの解明が可能になると予想される。こうした視点で見ると、動植物の免疫や光応答など進化的には異なる起源を持つものの、機能的には非常に類似している仕組みは数多くあり、こうした機能に着目した研究アプローチは今後さらに重要となると考えられる。

本研究では、scRNA-seq における概日リズムの計測のために、擬時刻に実時間情報を付与するアルゴリズム PeakMatch を開発した。scRNA-seq は対象となる細胞を破壊するため、1 細胞レベルでの時系列解析はこれまで困難であった。PeakMatch 技術はこうした限界を打ち破り、1 細胞レベルでの時系列解析を可能にしたことで 1 細胞トランスクリプトームの適用範囲をさらに拡大することに貢献した。概日リズム研究だけでなく、細胞周期やその他のリズムなど時間を考慮にいれるべき解析は多くあることから、本アプローチは当該研究分野だけでなく幅広い分野で利用されると期待される。ここまです示したように、概日リズムの変調は動植物で多くの共通点を持っているものの、本研究で示したような概日リズムの変調と細胞分化・分裂の関係性はまだ動物分野では明らかになっていない。そのため、iPS 細胞の分化過程における scRNA-seq データに PeakMatch を用いることで、動物分野でも概日リズムの変調を解析することが可能になると期待される。

2-4. 材料と方法

供試植物の育成条件

一章と同様に、使用した全ての野生型と形質転換体はシロイヌナズナの Columbia-0 (Col-0) である。キッチンブリーチの原液を用いて滅菌した種子は 2 倍希釈したムラシゲ・スクーグ培地 (1.4 % [w/v]寒天と 0.5 % スクロースを含む) (以下、1/2MS 培地とする) に無菌的に播種した。播種後は人工気象器 (バイオマルチインキュベータ、日本医化器械製作所) 内で 22 °C、12 時間明期 (白色光、84 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、12 時間暗期の明暗サイクル下 (12L12D) で生育した。分化誘導系では 12L12D で 7 日間育成した植物体を ZT0 のタイミングで *Bikinin*、*dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D)、*カイネチン*を加えた分化誘導培地に移し、連続明条件で培養した。*cca1-1 lhy1-1 tocl-2* と *cca1-1 lhy1-1* は山篠貴史准教授から *lux-4 nox* と親株の *CAB2::LUC* は Dmitri A. Nusinow 教授から頂いた。

細胞分化とセルサイクルの測定

リグニン染色では、植物体を酢酸エタノール固定剤(75%氷酢酸と 25%エタノール)で 1 日間固定し、99.5%エタノールと濃 HCl (1:19、v/v) 中の 20%フロログルシノールで 1 時間染色し、抱水クロラール/グリセロール/H₂O 混合物 (グリセロール 1 mL と H₂O 2 mL に抱水クロラール 8 g を加えたもの) で 2 時間透明化を行い、光学顕微鏡下で観察した。維管束細胞誘導比の定量のため、子葉内において木部細胞が占める面積を ImageJ により計算した。

細胞周期進行の定量化のために、Click-iT EdU イメージングキット(サーモフィッシュヤー)を用いてキットのプロトコルに従い S 期にある細胞を可視化した。播種後 L/D 条件下で生育した 7 日目の植物を 10 μM EdU を含む同一培地を含むプレートに移し、1 時間浸透した。その後、4%パラホルムアルデヒドで植物を固定し EdU の浸透を停止した。DNA に取り込まれた EdU は Alexa Fluor488 で染色し、FV1000 (OLYMPUS) を用いて観察した。コルテックスにおける EdU の蛍光強度を ImageJ により計測した。

メリステムサイズの測定のため、12L12D 条件下で垂直に生育した植物を用いた。7 日齢の植物を 20 g/mL の PI で染色し、上述のように FV1000 顕微鏡を用いて観察し、メリステム領域に含まれた皮質細胞数を計測した。

scRNA-seq とバルク RNA-seq

scRNA-seq ではスライドガラス上に子葉を平行に置き、セロハンテープなどの粘着テープで固定した。次に、カミソリで子葉の中心を切断し、ガラスキャピラリーで細胞内容物を採取した。得られた RNA から作成した cDNA ライブラリは NextSeq500(イルミナ)を用いて UMI タグ配列による定量化を行なった。全手順は Kubo et al. 2019 を参考にしている。バルク RNA-seq については、RNeasy Plant Mini Kit を用いて RNA を抽出し、10 サイクルの PCR 増幅を除いて scRNA-seq と同じ方法で cDNA ライブラリを作成し、UMI タグによる発現量の定量化を行った。scRNA-seq およびバルク RNA-seq データは、DESeq により正規化した。

scRNA-seq における実時間軸の再構築

木部細胞分化に関連する scRNA-seq データを同定するために、Wishbone を使用した。維管束分化誘導後のサンプルのみを Wishbone に用いた。主成分分析の第一および第三成分のみを t-SNE に用いた。木部細胞への分岐は t-SNE プロット上の木部細胞マーカー遺伝子の発現に従って選択した。

Seurat R パッケージ 2.0 を用いて細胞のクラスター化を行い、二値化した遺伝子発現マトリックスを列正規化し対数変換することで擬時刻を作成した。Seurat のランドマーク遺伝子セットを得るために、子葉から得たバルク RNA-seq データにおける全遺伝子から遺伝子発現のピーク時刻により分類し、ランドマーク遺伝子の候補を選別した。その中で scRNA-seq データと最も高い相関係数を示す 17 の遺伝子をランドマーク遺伝子として選択した。17 の遺伝子に加えて、細胞型特異的マーカー遺伝子(*CAB3*, *Lhcb 2.1*, *TDR*, *AtHB8*, *IRX3*, *IRX8*, *SEOR1*)も含めた合計 24 の遺伝子を Seurat のランドマーク遺伝子セットに用いた。

次に、scRNA-seq と cpRNA-seq の相関係数が 0.5 以上の 2,217 遺伝子を PeakMatch に用いた。これら 2,217 遺伝子それぞれの遺伝子発現量の合計値は木部系列に含まれる細胞数の 10 倍以上であることを確認している。PeakMatch のパラメータは T=2, last=0, intv=1, inter=7.を用いた。

核相測定

野生型と時計遺伝子変異体でそれぞれ 10 枚の子葉を用いた。子葉はカミソリで切断し、0.5 mL の各抽出バッファー (Cystain UV precise P の A 液、Partec) に移した。その後、30 μ m のフィルターメッシュを用いて夾雑物を取り除き、DAPI 染色液 (B 液) に移した。核相レベルの測定には核相測定装置 (Partec) を用い、検出された最も低いピークを 2C とした。

qRT-PCR

マニュアルに従って、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) により逆転写を行った。遺伝子発現の解析には CFX96 Real-Time PCR 装置 (Bio-Rad) を用いた。IPP2 をそれぞれの処理区の内部標準としており、プライマーリストとサーマルサイクルの設定を以下に挙げる。それぞれのサンプルの Ct 値はテクニカルエラーを減らすために 3 つのウェルで独立に測定しその平均値を用いており、エラーバーは 3 つのサンプルから算出した生物学的なバラツキを標準偏差で示している。

LHCB1;2-RT F, 5' ACCCAGAGGCTTTTCGCGGAGT;

LHCB1;2-RT R, 5' TGCGAAGGCCCATGCGTTGT;

ANT-RT-F, 5'- TGGTGGAAAGTTACTTTGAAGGAG;

ANT-RT-R, 5'- TTCAATCTCTGTAAACCACCGTAA;

VND7-RT-F, 5'- CCTCGGCCACAGCGGAGGAT;

VND7-RT-R, 5'- CGCCTGCCACTCGAACCAGG;

CYCD3;1-qPCR Fw, 5' CGAAGAATTCGTCAGGCTCT;

CYCD3;1-qPCR Rv, 5' ACTTCCACAACCGGCATATC;

E2Fc-qPCR Fw, 5' GAGTCTCC CACGGTTTCAG

E2Fc-qPCR Rv, 5' TCACCATCCGGTACTGTTGC

UBQ14-qPCR Fw, 5' TCCGGATCAGGAGAGGTT; and

UBQ14-qPCR Rv, 5' TCTGGATGTTGTAGTCAGCAAGA.

LHCB1;2, 95°C for 10 s, ~40 cycles of 95°C for 10 s, 62°C for 15 s and 72°C for 15 s;

VND7, 95°C for 60 s, ~40 cycles of 95°C for 10 s, 64.5°C for 15 s and 72°C for 10 s; and

ANT, CYCD3;1, E2Fc, and UBQ14, 95°C for 60 s, ~40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C 327 for 15 s and 72°C for 15 s.

結言

本論文では1細胞 RNA-seq を用いて、生物リズムの変調による細胞運命の制御を明らかにした。1章では、細胞分化により有糸分裂からエンドサイクルへ切り替わるとオーキシンレベルのリズムが形成され、そのオーキシンリズムはエンドサイクルの進行に寄与していることを示した。これまでトランスクリプトームデータの解析は転写レベルのリズム解析に利用されてきたが、GO term 解析と擬時刻を組み合わせることで様々な階層のリズム現象を推定することが可能であると示された。今後、植物ホルモン以外の外部環境因子である光や温度、pH など様々なシグナルへの応答性が細胞周期において変化することが GO term 解析と擬時刻を組み合わせから明らかにされるかもしれない。2章では、概日リズムが細胞運命転換の過程でリセットされ、さらに時計システムの再構築が細胞分裂・分化関連遺伝子の発現制御を介して細胞の運命を制御することを明らかにした。実時刻に基づく概日リズムを1細胞 RNA-seq の時系列解析において可能にするため、実時間軸の構築を行うアルゴリズム「PeakMatch」を開発した。今後、生物リズムの変調を解析する上で PeakMatch による実時間軸の構築を行うことでリズムの変調をより明確に記述することができるだろう。オーキシンリズムと概日リズムのどちらも幹細胞からの分化過程において生じる点で類似しているが、転写レベルとホルモンレベル、24時間周期と細胞周期など生物リズムとしては全く異なる。分化過程では、ホルモンレベルや転写レベルの他にも様々な生物リズムが変調することで生み出され、細胞の運命決定に関わると考えられる。本研究で明らかにした2つの生物リズムの解析を皮切りに様々な生物リズムの発見と変調が1細胞 RNA-seq を用いて明らかになることが今後は期待される。

参考文献

修士論文

鳥井孝太郎 (2017) 細胞運命決定過程における概日時計の役割

学術論文

Aihara, K., Naramoto, S., Hara, M., Mizoguchi, T. (2014) Increase in vascular pattern complexity caused by mutations in LHY and CCA1 in *Arabidopsis thaliana* under continuous light. *Plant Biotechnol.* 31: 43–47.

Antoniadi, I., Plačková, L., Simonovik, B., Doležal, K., Turnbull, C., Ljung, K., Novák, O. (2015) Cell-Type-Specific Cytokinin Distribution within the *Arabidopsis* Primary Root Apex. *Plant Cell* 27: 1955–1967.

Barrada, A., Montané, M-H., Robaglia, C., Menand, B. (2015) Spatial Regulation of Root Growth: Placing the Plant TOR Pathway in a Developmental Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 19671–19697.

Bellet, M.M., Sassone-Corsi, P. (2010) Mammalian circadian clock and metabolism – the epigenetic link. *J. Cell Sci.* 123: 3837–3848.

Benjamins, R., Barbez, E., Ortbauer, M., Terpstra, I., Lucyshyn, D. and Moulinier-Anzola, J. (2016) PPP1, a plant-specific regulator of transcription controls *Arabidopsis* development and PIN expression. *Sci. Rep.* 6: 32196.

Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G. et al. (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591–602.

Bloom, J. and Cross, F.R. (2007) Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 149–160.

Breuer, C., Ishida, T. and Sugimoto, K. (2010) Developmental control of endocycles and cell growth in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 654–660.

Brown, S.A. (2014) Circadian clock-mediated control of stem cell division and differentiation: beyond night and day. *Development* 141: 3105–3111.

Buechler, J., Salinas, P.C. (2018) Deficient Wnt Signaling and Synaptic Vulnerability in Alzheimer's Disease: Emerging Roles for the LRP6 Receptor. *Front. Synaptic Neurosci.* 10: 38.

Cools, T., Iantcheva, A., Maes, S., Van den Daele, H. and De Veylder, L. (2010) A replication stress-induced synchronization method for *Arabidopsis thaliana* root meristems. *Plant J.* 64: 705–714.

Del Pozo, J.C., Lopez-Matas, M.A., Ramirez-Parra, E. and Gutierrez C. (2005) Hormonal control of the plant cell cycle. *Physl. Plant.* 123: 173–183.

Di Mambro, R., De Ruvo, M., Pacifici, E., Salvi, E., Sozzani, R., Benfey, P.N., et al. (2017) Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the *Arabidopsis* root. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114: 7641–7649.

Dierickx, P., Vermunt, M.W., Muraro, M.J., Creyghton, M.P., Doevendans, P.A., van Oudenaarden, A., et al. (2017) Circadian networks in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *EMBO Rep.* 18: 1199–1212.

Ding, Z., Doyle, M.R., Amasino, R.M., Davis, S.J. (2007) A complex genetic interaction between *Arabidopsis thaliana* TOC1 and CCA1/LHY in driving the circadian clock and in output regulation. *Genetics* 76: 1501–1510.

Edgar, B. A., Orr-Weaver, T. L. (2001) Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* 105: 297–306.

Efroni, I., Mello, A., Nawy, T., Ip, P.L., Rahni, R., Del Rose, N., et al. (2016) Root regeneration triggers an embryo-like sequence guided by hormonal interactions. *Cell* 165: 1721–1733.

Endo, M., Shimizu, H., Nohales, M.A., Araki, T. and Kay, S.A. (2014) Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature* 515: 419–422.

Fukuda, H., Ukai, K. Oyama, T. (2012) Self arrangement of cellular circadian rhythms through phase resetting in plant roots. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 86: 041917.

Gutierrez, C. (2009) The *Arabidopsis* Cell Division Cycle. *Arabidopsis Book* 7: e0120

Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., Engler, J.D A., Inzé, D. and Beeckman, T. (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 14: 2339–2351.

- Honma, S. (2018) The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm. *J. Physiol. Sci.* 68: 207–219.
- Imayoshi, I., Isomura, A., Harima, Y., Kawaguchi, K., Kori, H., Miyachi, H., Fujiwara, T.K., Ishidate, F., Kageyama, R. (2013) Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science* 342: 1203–1208.
- Inoue, K., Araki, T., Endo, M. (2018) Circadian clock during plant development. *J. Plant Res.* 131: 59–66.
- Ioio, R.D., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., et al. (2008) A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* 322: 1380–1384.
- Ishida, T., Adachi, S., Yoshimura, M., Shimizu, K., Umeda, M. and Sugimoto, K. (2010) Auxin modulates the transition from the mitotic cycle to the endocycle in *Arabidopsis*. *Development* 137: 63–71.
- Jean-Baptiste, K., McFaline-Figueroa, J.L., Alexandre, C.M., Dorrity, M.W., Saunders, L., Bubb, K.L., et al. (2019) Dynamics of gene expression in single root cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 31: 993–1011.
- Kondo, Y. et al. (2014) Plant GSK3 proteins regulate xylem cell differentiation downstream of TDIF TDR signalling. *Nat. Commun.* 5: 3504.
- Kondo, Y. et al. (2016) Vascular Cell Induction Culture System Using *Arabidopsis* Leaves (VISUAL) reveals the sequential differentiation of sieve element like cells. *Plant Cell* 28: 1250–1262.
- Kubo, M. et al. (2019) Single cell transcriptome analysis of *Physcomitrella* leaf cells during reprogramming using microcapillary manipulation. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkz181
- Liu, Z., Lou, H., Xie, K., Wang, H., Chen, N., Aparicio, O.M., et al. (2017) Reconstructing cell cycle pseudo time-series via single-cell transcriptome data. *Nat. Commun.* 8.
- Lloyd, C. and Chan, J. (2006) Not so divided: the common basis of plant and animal cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 147–152.

Lu, C., Yang, Y., Zhao, R., Hua, B., Xu, C., Yan, Z. (2016) Role of circadian gene *Clock* during differentiation of mouse pluripotent stem cells. *Protein Cell*. 7: 820–832.

Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bakó, L., Inzé, D. and Bögre, L. (2005) The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell* 17: 2527–2541.

Menges, M. and Murray, J.A.H. (2002) Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J.* 30: 203–212.

Menges, M., De Jager, S. M., Gruissem, W., Murray, A. H. J. (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J.* 41: 546–566.

Morse, D., Cermakian, N., Brancorsini, S., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P. (2003) No circadian rhythms in testis: *Period1* expression is clock independent and developmentally regulated in the mouse. *Mol Endocrinol.* 17: 141–151.

Mravec, J., Kubes, M., Bielach, A., Gaykova, V., Petrásek, J., Skůpa, P., Chand, S., Benková, E., Zazimalová, E., Friml, J. (2008) Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development.* 135: 3345–3354.

Perrot-Rechenmann, C. (2010) Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2: a001446.

Pittendrigh, C. S. (1993) Temporal organization: Reflections of a darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55: 16–54.

Richard, C., Lescot, M., Inzé, D. and De Veylder, L. (2002) Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *PCTOC* 69: 167–176.

Ryu, K.H., Huang, L., Kang, H.M. and Schiefelbein, J. (2019) Single-cell RNA sequencing resolves molecular relationships among individual plant cells. *Plant Physiol.* 179: 1444–1456.

Sanz, L., Dewitte, W., Forzani, C., Patell, F., Nieuwland, J., Wen, B., et al. (2011) The *Arabidopsis* D-type cyclin *CYCD2;1* and the inhibitor

ICK2/KRP2 modulate auxin-induced lateral root formation. *Plant Cell* 23: 641–660.

Satija, R., Farrell, J.A., Gennert, D., Schier, A.F., Regev, A. (2015) Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nature Biotech.* 33: 495–502.

Setty, M., Tadmor, M.D., Reich-Zeliger, S., Angel, O., Salame, T.M., Kathail, P., et al. (2016) Wishbone identifies bifurcating developmental trajectories from single-cell data. *Nat. Biotechnol.* 34: 637–645.

Sharma, M., Pandey, A., Pandey, G.K. (2014) β -catenin in plants and animals: common players but different pathways. *Front. Plant Sci.* 5: 143.

Shimizu, H., Katayama, K., Koto, T. et al. (2015) Decentralized circadian clocks process thermal and photoperiodic cues in specific tissues. *Nature Plants* 1, 15163.

Shulse, C.N., Cole, B.J., Ciobanu, D., Lin, J., Yoshinaga, Y., Gouran, M., et al. (2019) High-throughput single-cell transcriptome profiling of plant cell types. *Curr. Biol.* 27: 2241–2247.

Šimášková, M., O'Brien, J.A., Khan, M., Van Noorden, G. Ötvös, K. and Vieten, A. (2015) Cytokinin response factors regulate PIN-FORMED auxin transporters. *Nat. Commun.* 6: 8717.

Sozzani, R., Maggio, C., Varotto, S., Canova, S., Bergounioux, C., Albani, D. and Cella, R. (2006) Interplay between Arabidopsis activating factors E2Fb and E2Fa in cell cycle progression and development. *Plant Physiol.* 140: 1355–1366.

Stuart, T. and Satija, R. (2019) Integrative single-cell analysis. *Nat. Rev. Genet.* 20: 257–272.

Sugimoto-Shirasu, K., Roberts, K. (2003). “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 544–553.

Takahashi, N., Kajihara, T., Okamura, C., Kim, Y., Katagiri, Y., Okushima, Y., et al. (2013) Cytokinins control endocycle onset by promoting the expression of an APC/C activator in Arabidopsis roots. *Curr. Biol.* 23: 1812–1817.

Tank, J.G., Pandya, R.V. and Thaker, V.S. (2014) Phytohormones in regulation of the cell division and endoreduplication process in the plant cell cycle. *RSC Adv.* 4: 12605.

Tian, Q., Uhler, N.J. and Reed, J.W. (2002) Arabidopsis SHY2/IAA3 Inhibits Auxin-Regulated Gene Expression. *Plant Physiol.* 14: 301–319.

Torii, K., Inoue, K., Bekki, K., Haraguchi, K., Kubo, M., Kondo, Y., et al. (2019) Origination of the circadian clock system in stem cells regulates cell differentiation. *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/710590>.

Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S. and Inzé, D. (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 903–916.

Verkest, A., Manes, C.L., Vercruysse, S., Maes, S., Van Der Schueren, E., Beeckman, T., et al. (2005) The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during Arabidopsis leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *Plant Cell* 17: 1723–1736.

Voß, U., Wilson, M., Kenobi, K. et al. (2015) The circadian clock rephases during lateral root organ initiation in Arabidopsis thaliana. *Nat Commun* 6, 7641.

Weiste, C., Pedrotti, L., Selvanayagam, J., Muralidhara, P., Fröschel, C., Novák, O., Ljung, K., Hanson, J., Dröge-Laser, W. (2017) The Arabidopsis bZIP11 transcription factor links low-energy signalling to auxin-mediated control of primary root growth. *PLoS Genet.* 13: e1006607.

Wu, G., Carville, S. J., Spalding, P. E. (2016) ABCB19-mediated polar auxin transport modulates Arabidopsis hypocotyl elongation and the endoreplication variant of the cell cycle. *Plant J.* 85: 209–218.

Yagita, K., Horie, K., Koinuma, S., Nakamura, W., Yamanaka, I. et al. (2010) Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107: 3846–3851.

Yu, X., Li, L., Zola, J., Aluru, M., Ye, H., Foudree, A. et al. (2011) A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of *BESI* target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 65: 634–646.

Zhang, T.Q., Xu, Z.G., Shang, G.D. and Wang, J.W. (2019) A single-cell RNA sequencing profiles the developmental landscape of Arabidopsis root. *Mol. Plant.* 12: 648–660.

謝辞

本研究は、京都大学生命科学研究科統合生命科学専攻環境応答制御学講座分子代謝制御学分野で行われました。遠藤求教授（奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス領域、前・京都大学生命科学研究科准教授）には、研究の機会を与えていただき、大変熱心にご指導いただきましたことを心より感謝いたします。荒木崇教授には、研究の機会を与えていただき、また多くの助言とご指導を頂きました。有難うございました。井上佳祐助教には実験に関する様々な相談にのっていただきました。久保田茜助教（奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス領域）には論文執筆にあたり細やかなご指導を頂きました。この場を借りてお礼申し上げます。

近藤侑貴助教（東京大学理学系研究科）には、分化誘導の導入にあたり様々な助言をいただきました。久保稔特任講師（熊本大学大学院先端科学研究部(理)）には1細胞RNA-seqの導入にあたり、私の様々な質問に細やかにご回答いただきました。鈴木孝征講師（中部大学応用生物学研究科）にはRNA-seqデータ解析のサポートをしていただきました。原口和也准教授（小樽商科大学商学部）にはPeakMatchアルゴリズムの開発における様々な依頼に応じていただきました。

また、清水華子技術補佐員には、サンプルやライブラリ調製など多くの実験をご助力いただきました。また、別城啓太さんには多くの実験を実際に行っていたいただき研究をサポートしていただきました。杉山輝樹さん（奈良先端大学バイオサイエンス領域）には研究を進める上での様々な相談に乗っていただきました。矢野めぐみ様には事務手続きの様々な面で助けていただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

また、分子代謝制御学分野の皆様、並びに奈良先端科学技術大学院大学植物生理学分野の皆様には多くのご助言、ご協力とご理解をいただき、本研究を行うことができました。この場を借りてお礼申し上げます。

最後に、今まで多くのご支援をいただいた全ての方に深く感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Kotaro Torii, Akane Kubota, Takashi Araki and Motomu Endo

Time-series single-cell RNA-seq data reveal auxin fluctuation during endocycle

Plant & Cell Physiology, doi:10.1093/pcp/pcz228, 2019

Table 1
各細胞周期マーカー遺伝子一覧表

CDKA;1	G ₁ /S移行期—M期
KRP1	G ₁ 期
CYCD2;1	S期
PCNA2	S期
CDKB1;2	G ₂ —M期
CDKB2;1	G ₂ —M期
CYCB1;2	M期
KNOLLE	M期

有糸分裂サイクル

エンドサイクル

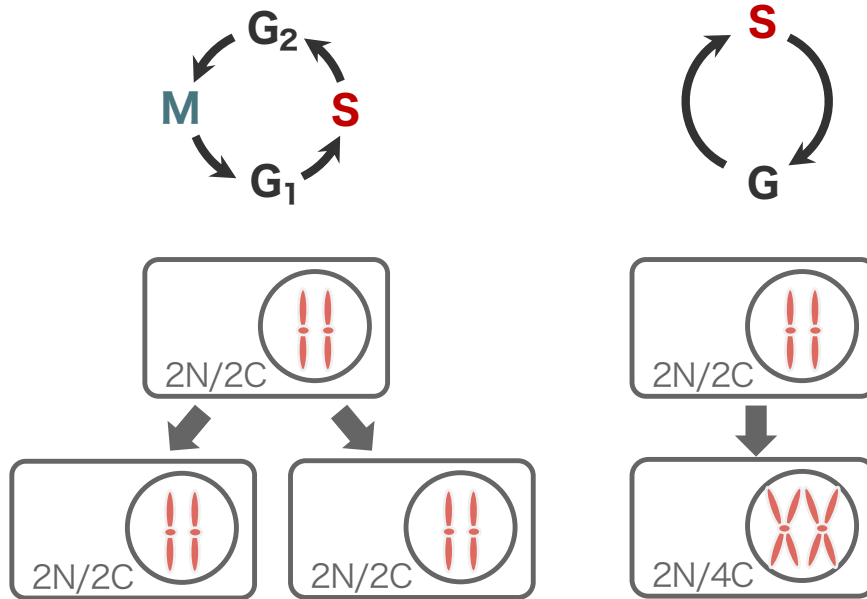


Figure 1
有糸分裂とエンドサイクルの模式図

有糸分裂はG₁、S、G₂、Mの4つのフェーズからなり、S期に合成された染色体はM期に有糸分裂によって2つの娘細胞に等分配される。一方でエンドサイクルではG₂/Mがスキップされており、S期に合成された染色体は分配されず、核相が倍加する。

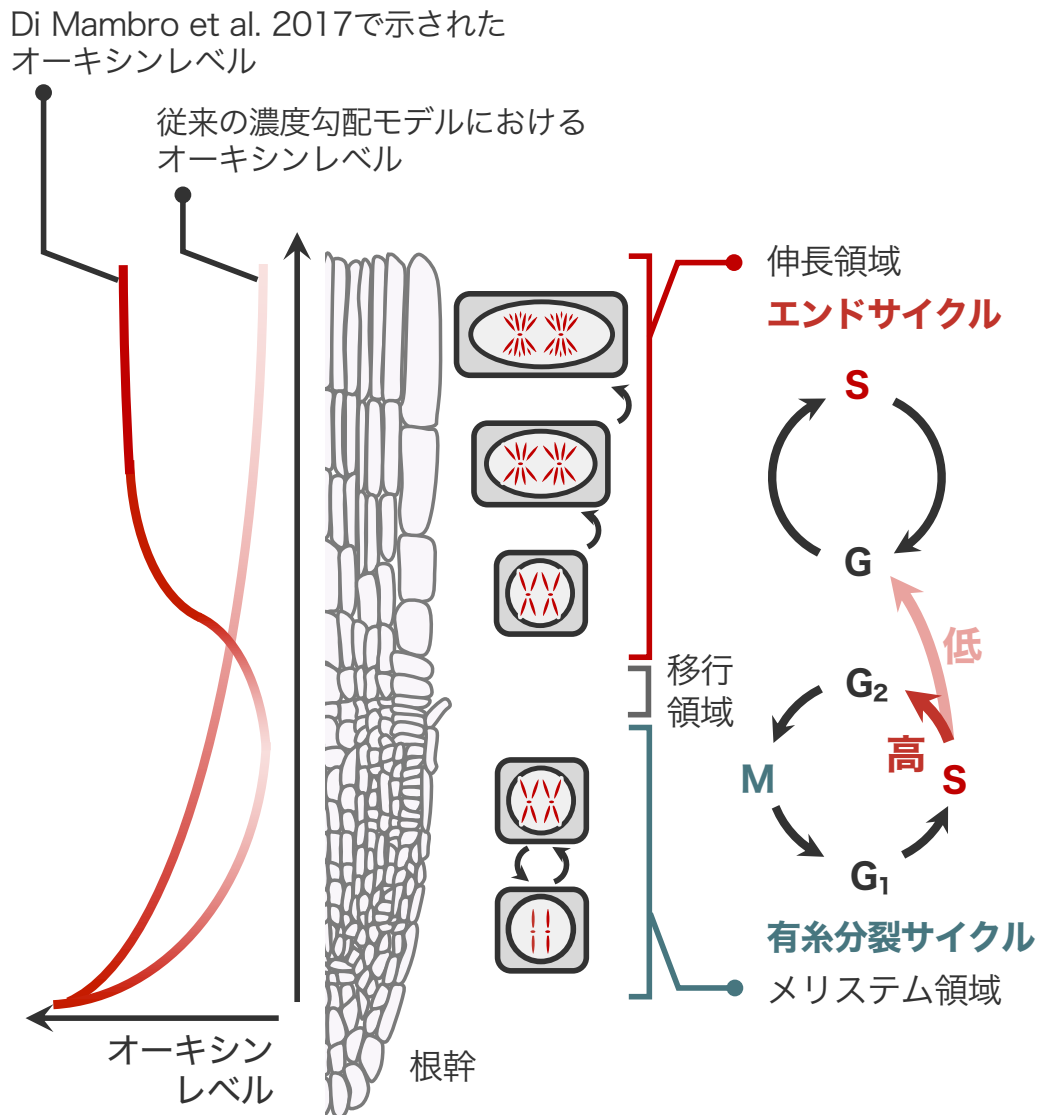


Figure 2

根端におけるオーキシンの濃度勾配モデルと実際のオーキシンの濃度勾配

根端には端から、メリステム領域、移行領域、伸長領域が並び、エンドサイクルは伸長領域で、有糸分裂サイクルはメリステム領域で進行するよう分画されている。メリステム領域ではオーキシン合成とオーキシンの輸送によりオーキシンレベルが高い一方で、移行領域、伸長領域へと遠ざかるにつれ、オーキシンレベルが低下する。S期以降オーキシンの濃度が高ければG₂/M期に進行し、低ければエンドサイクルが進行するため、この濃度勾配によりオーキシンレベルの低い伸長領域ではエンドサイクルが進行するというのがオーキシンの濃度勾配仮説である。しかし、Di Mambroら(2017)の研究からオーキシン濃度が最小になるのは移行領域であり、伸長領域ではオーキシン濃度が上昇していることを示していた。この結果は、伸長領域の低いオーキシンレベルがエンドサイクルの進行を促す、とする濃度勾配モデルとは矛盾していた。

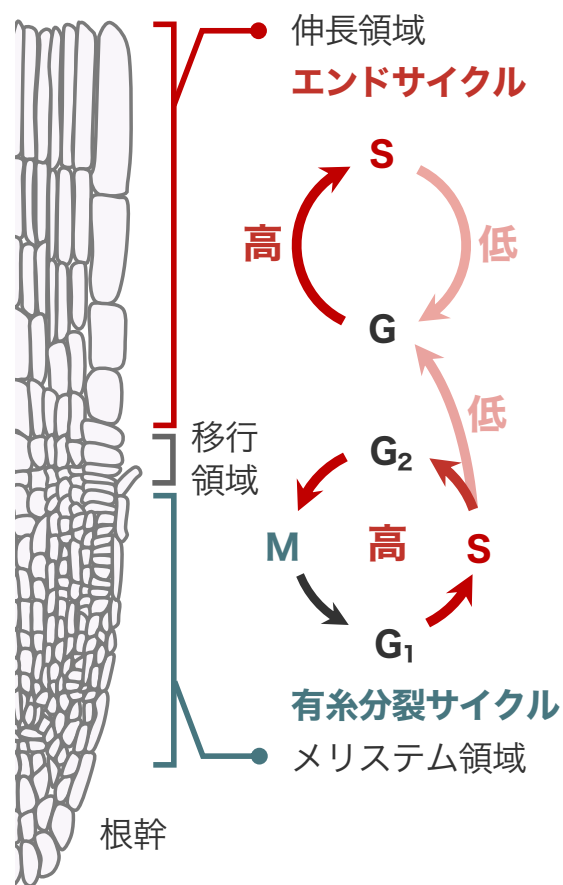


Figure 3

エンドサイクルではフェーズごとに必要とするオーキシンレベルが異なる

有糸分裂サイクルではG₁/S期とS/G₂期のどちらの移行にも高いオーキシンレベルが必要である。その一方で、エンドサイクルではG/S期の移行には高いオーキシンレベルが、S/G期の移行には低いオーキシンレベルが要求される。このことは、エンドサイクル内のフェーズ依存的なオーキシンレベルのリズムが存在することを示唆していた。

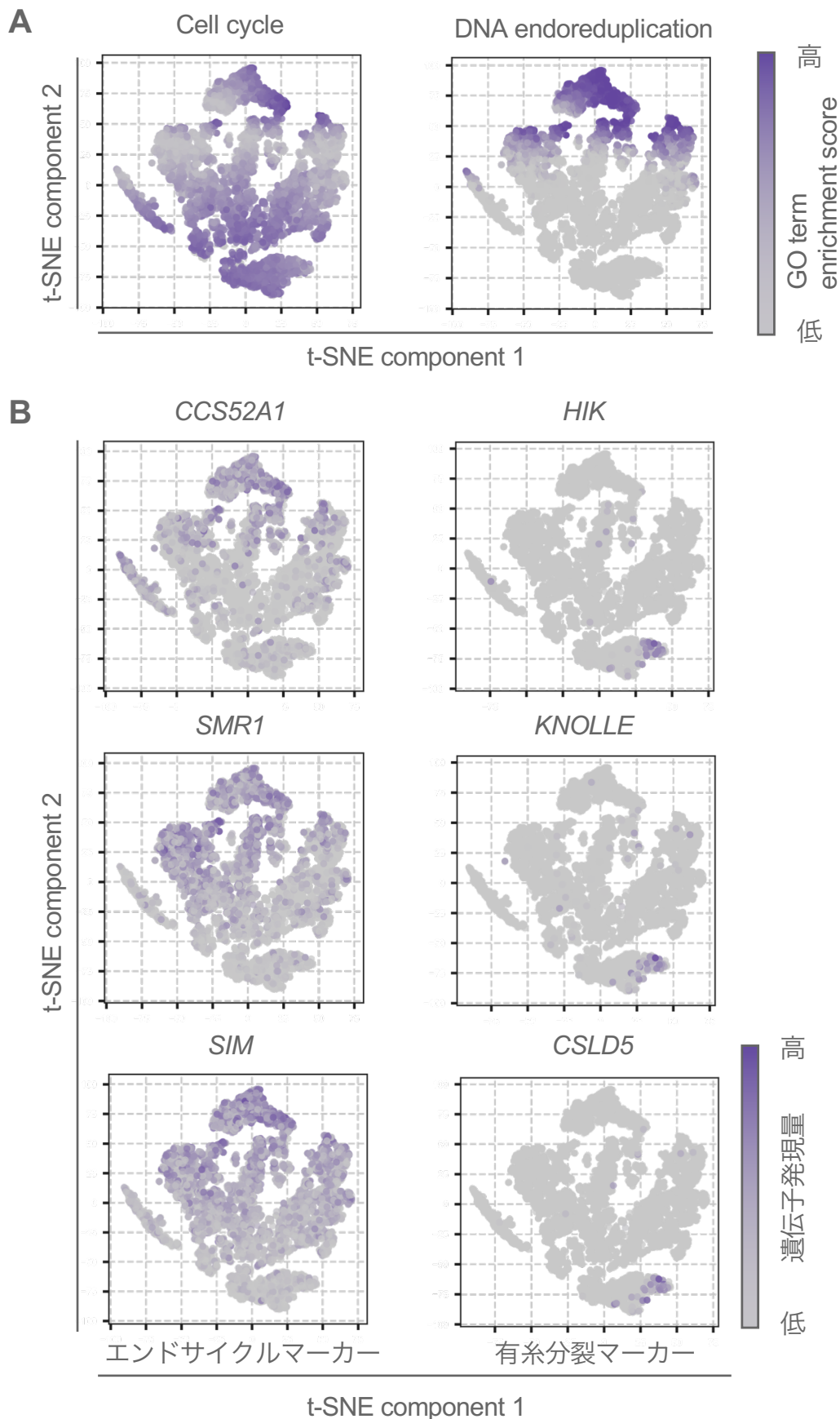


Figure 4

scRNA-seqデータにおける各細胞周期が進行する細胞の特定

A) Ryu et al. (2019) で報告されたscRNA-seqデータをt-SNEアルゴリズムを用いて次元圧縮し2次元平面上に可視化した。色の濃淡はGO term enrichment score $[-\log_{10}(\text{p-value})]$ を表している。B) t-SNE平面に投影されたそれぞれの細胞における有糸分裂サイクルとエンドサイクルの代表的な遺伝子の発現量を色の濃淡で示している。

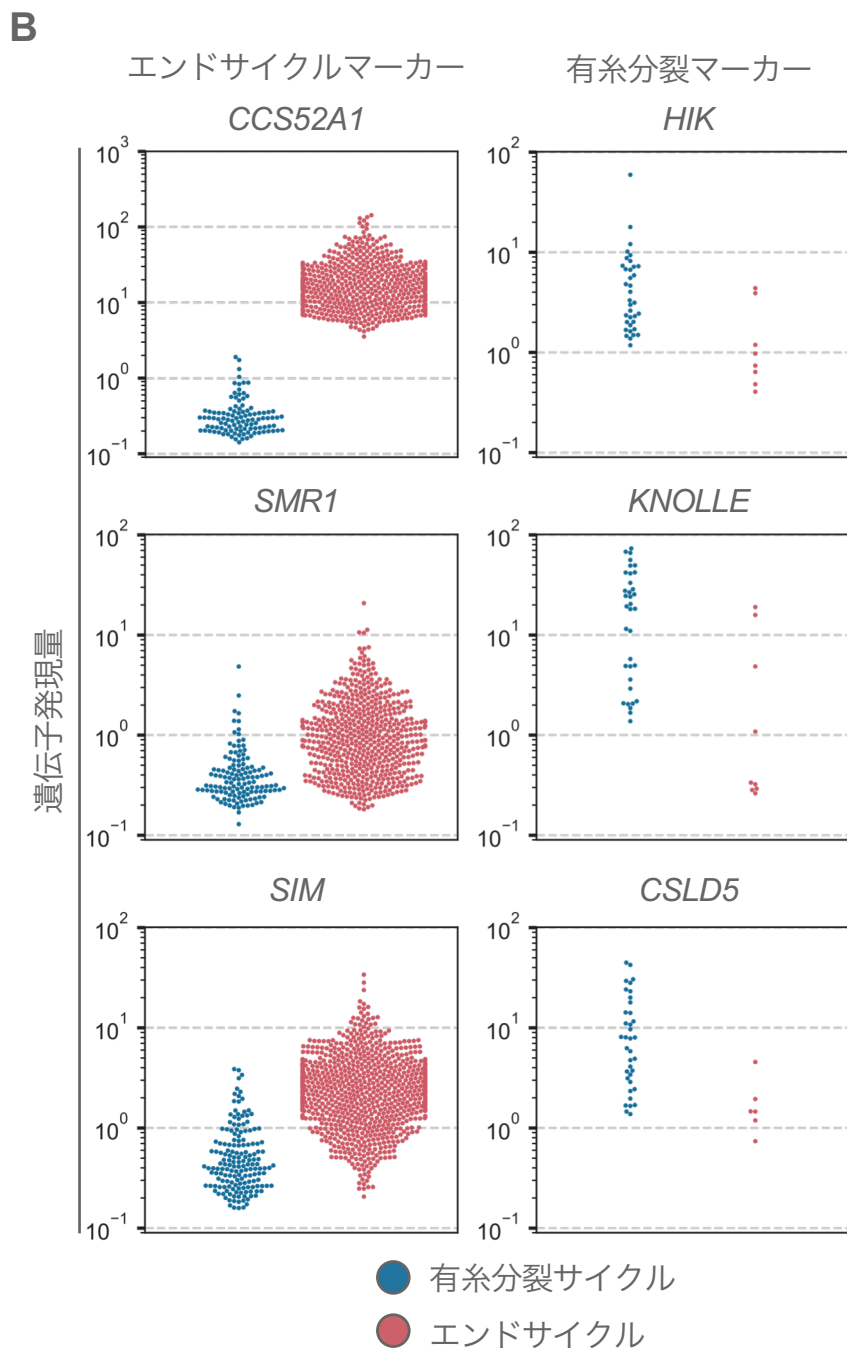
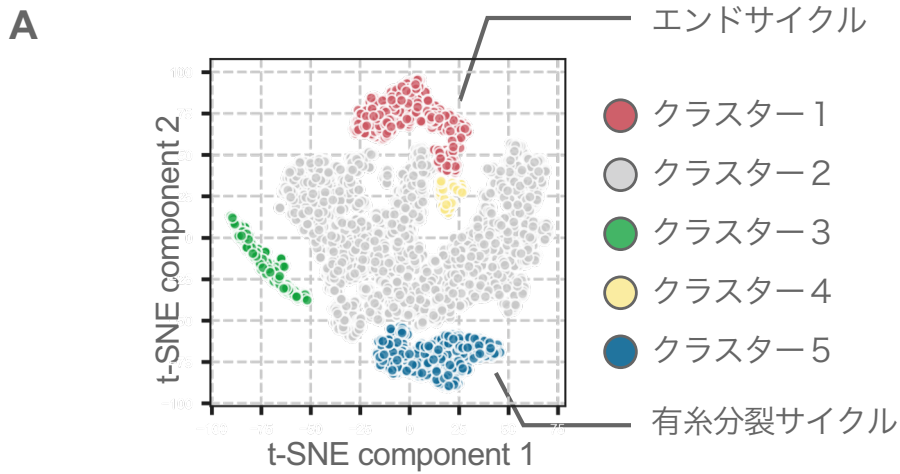


Figure 5
各細胞周期が進行する細胞群の抽出

A) DBSCANによって得られた5つのクラスターをt-SNE平面上において5色で示している。B) エンドサイクルクラスターと有糸分裂クラスターにおける各細胞周期マーカー遺伝子の発現量を示している。青は有糸分裂サイクルクラスター、赤はエンドサイクルクラスターを示す。

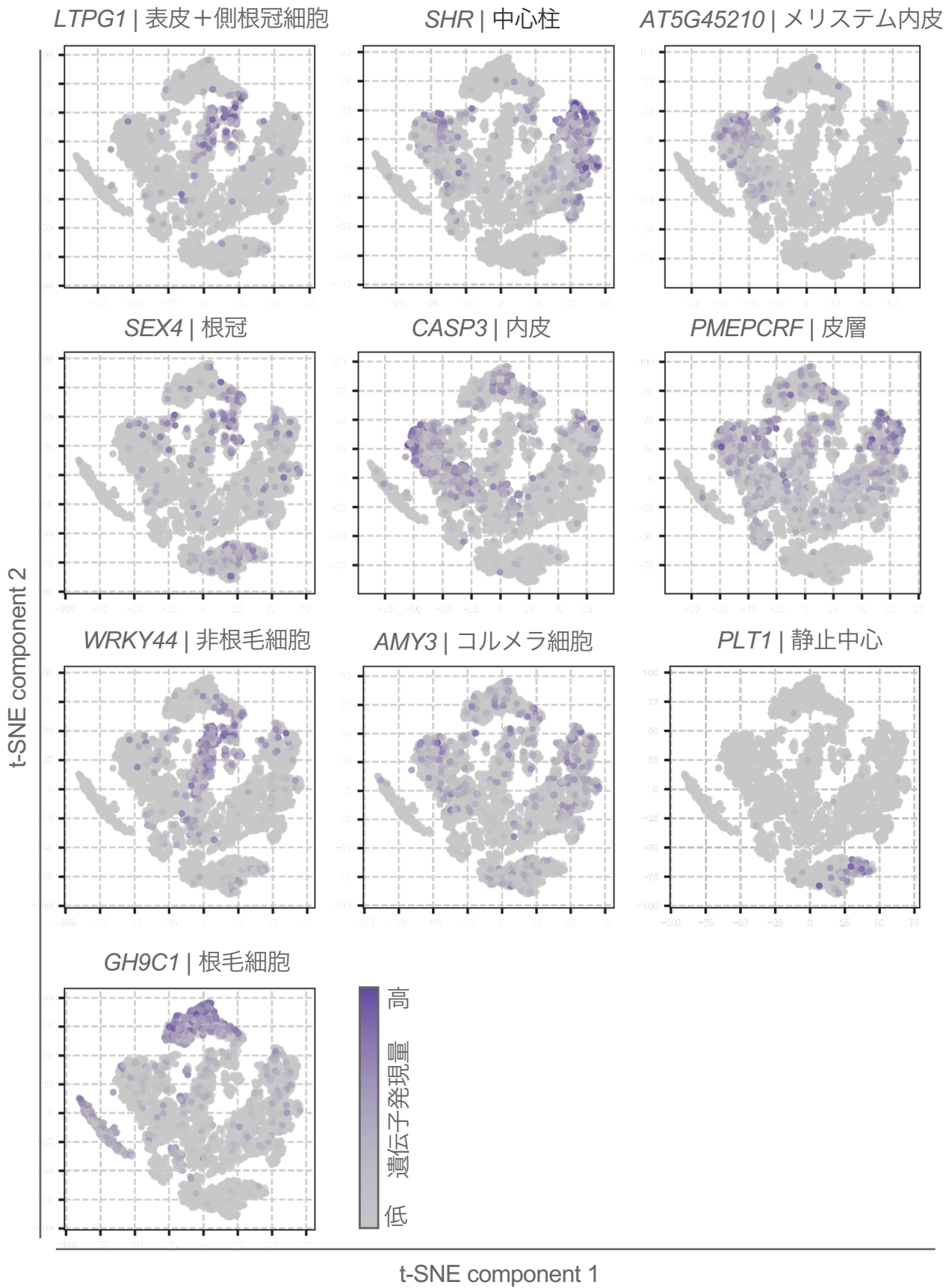
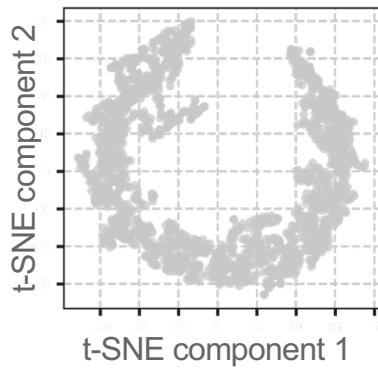
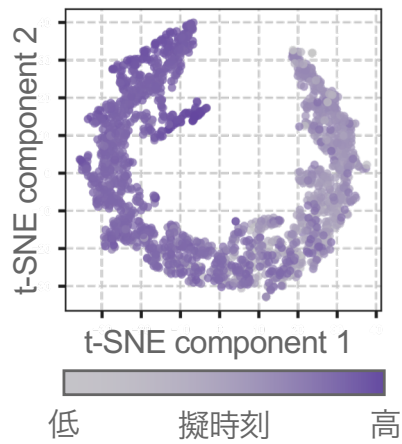
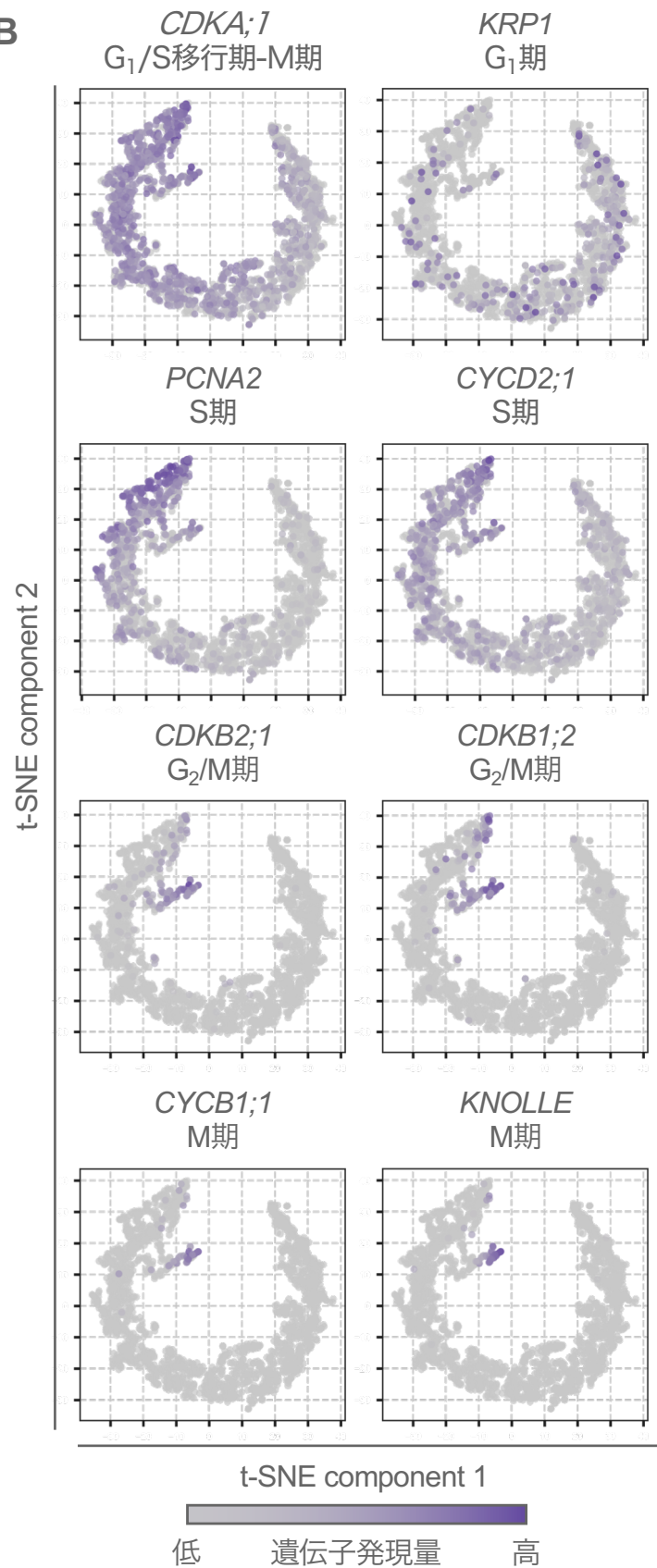


Figure 6

各細胞周期クラスターに含まれる細胞種の特定

Ryu et al (2019)で用いられていた、根端の各細胞タイプマーカー遺伝子の発現量をt-SNE平面上に投影し、色の濃淡で示している。

A**C****B****Figure 7**

細胞周期を反映した軌跡の構築と擬時刻の算出

A) 再度正規化された有糸分裂サイクルとエンドサイクルにある細胞をt-SNEを用いて2次元平面に投影している。B) 細胞周期マーカー遺伝子の発現量をt-SNE空間上に投影し、色の濃淡で示している。C) Wishboneにより算出された擬時刻の値をt-SNE平面上に投影し、色の濃淡で示している。

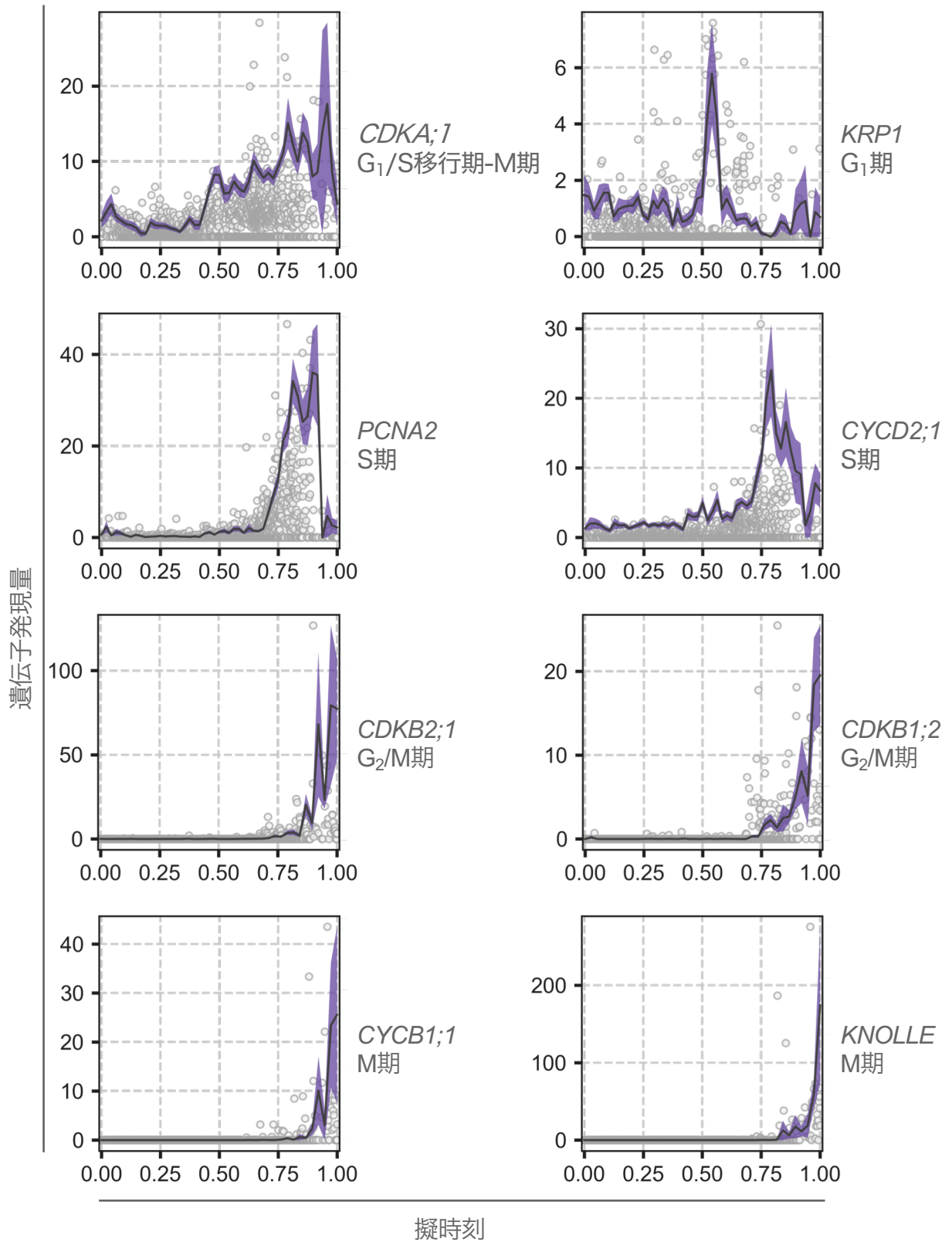


Figure 8

擬時刻上における細胞周期マーカーの発現パターンの確認

擬時刻上での各細胞の細胞周期マーカー遺伝子の発現量が点で、各細胞の移動平均 (window=0.01) が実線で、移動標準誤差 (window=0.01) が有色の帯で示されている。

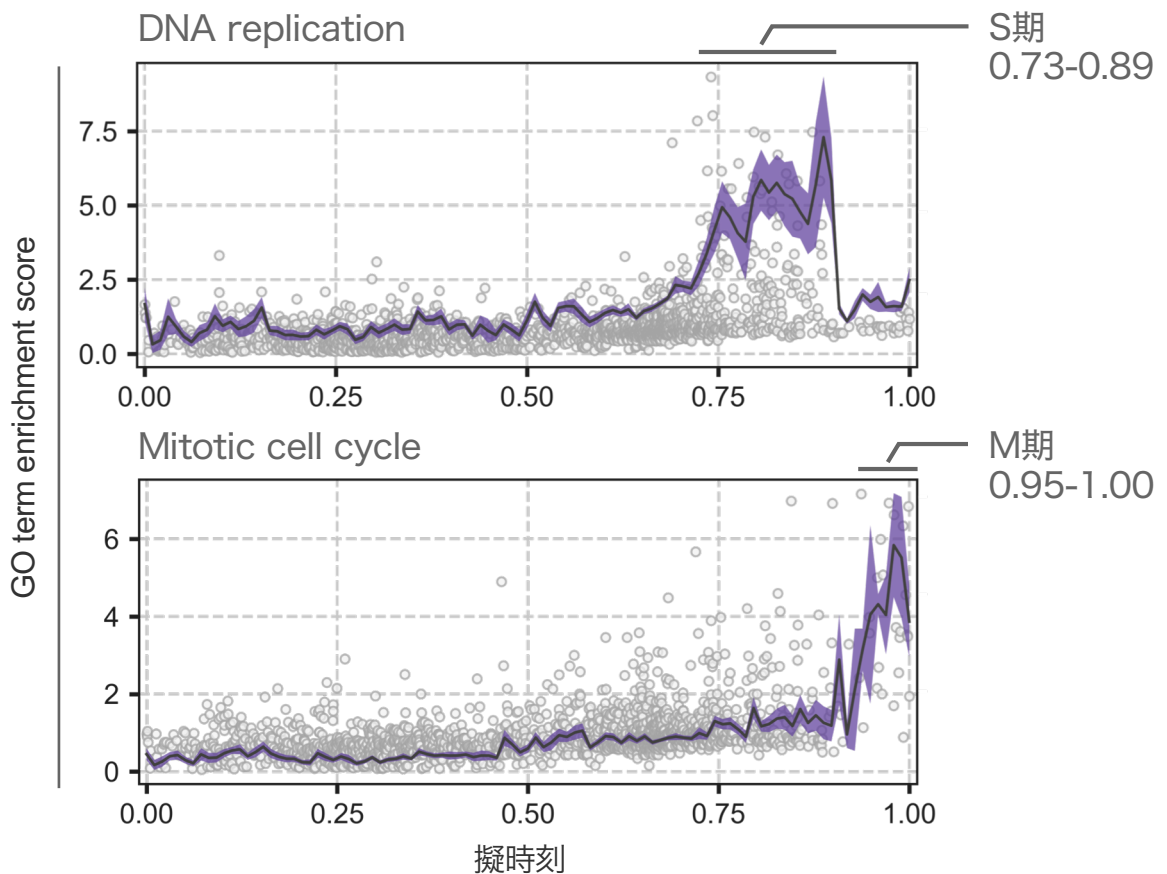


Figure 9
擬時刻上における細胞周期のフェーズの定義

擬時刻上に並んだ各細胞の” DNA replication”と” Mitotic cell cycle”のGO term enrichment score $[-\log_{10}(\text{p-value})]$ が点で、移動平均 (window=0.01) が実線で、移動標準誤差 (window=0.01) が有色の帯で示されている。また、各図の上部にはS期とM期として定義づけられた時間帯が示されている。GO term enrichment scoreの標準偏差+1 σ 以上を意味するZ値が1を超える時間帯を基準として各フェーズは定義されている。

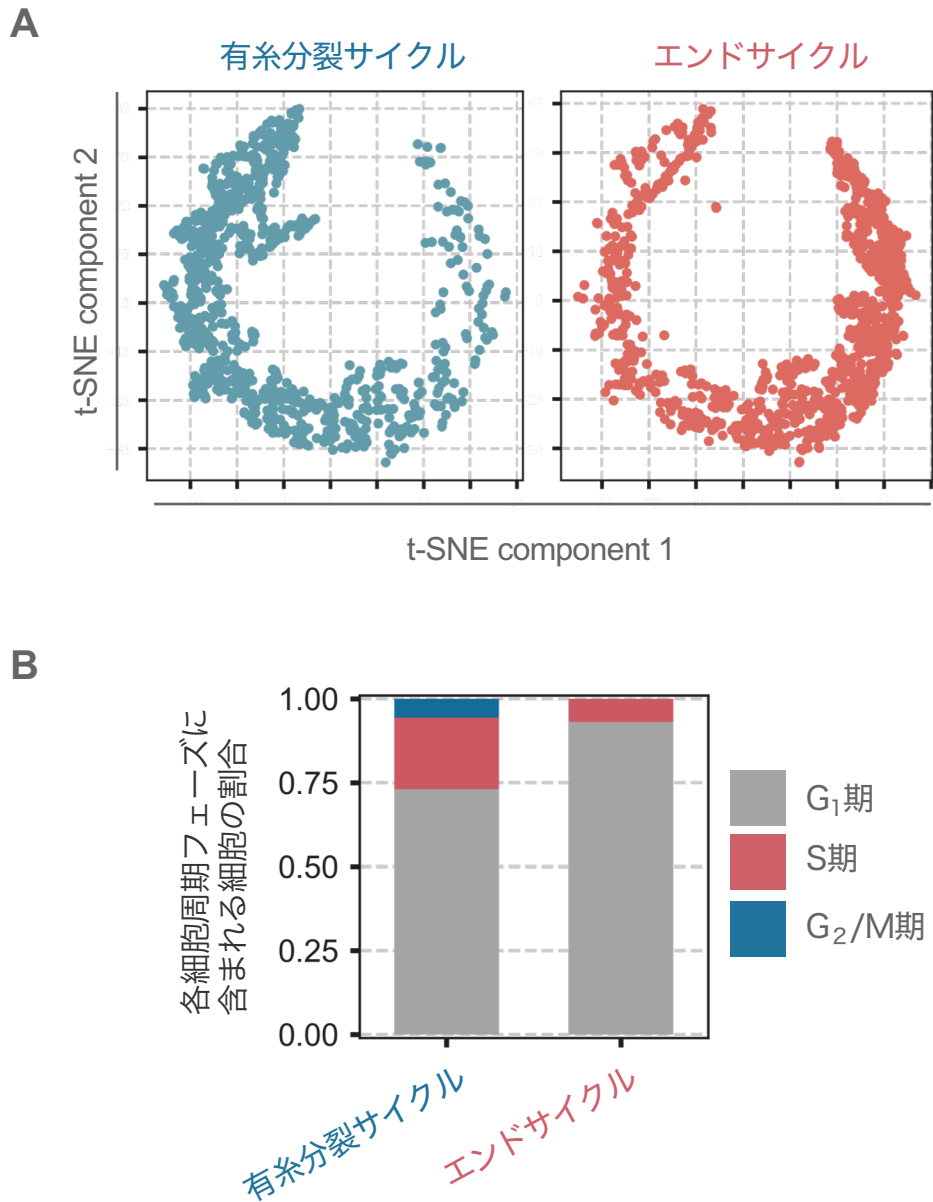


Figure 10

エンドサイクルと有糸分裂サイクルに由来する細胞の分割と各フェーズにある細胞の存在比の比較

A) DBSCANの結果 (Fig. 5A) をもとに、エンドサイクル (右) と有糸分裂サイクル (左) にある細胞を分割し、それぞれの軌跡を t-SNE 平面上に示している。B) Fig. 9 で定義された細胞周期の各フェーズに含まれる細胞の割合を示している。灰色は G₁ 期、赤は S 期、青は G₂/M 期を示している。

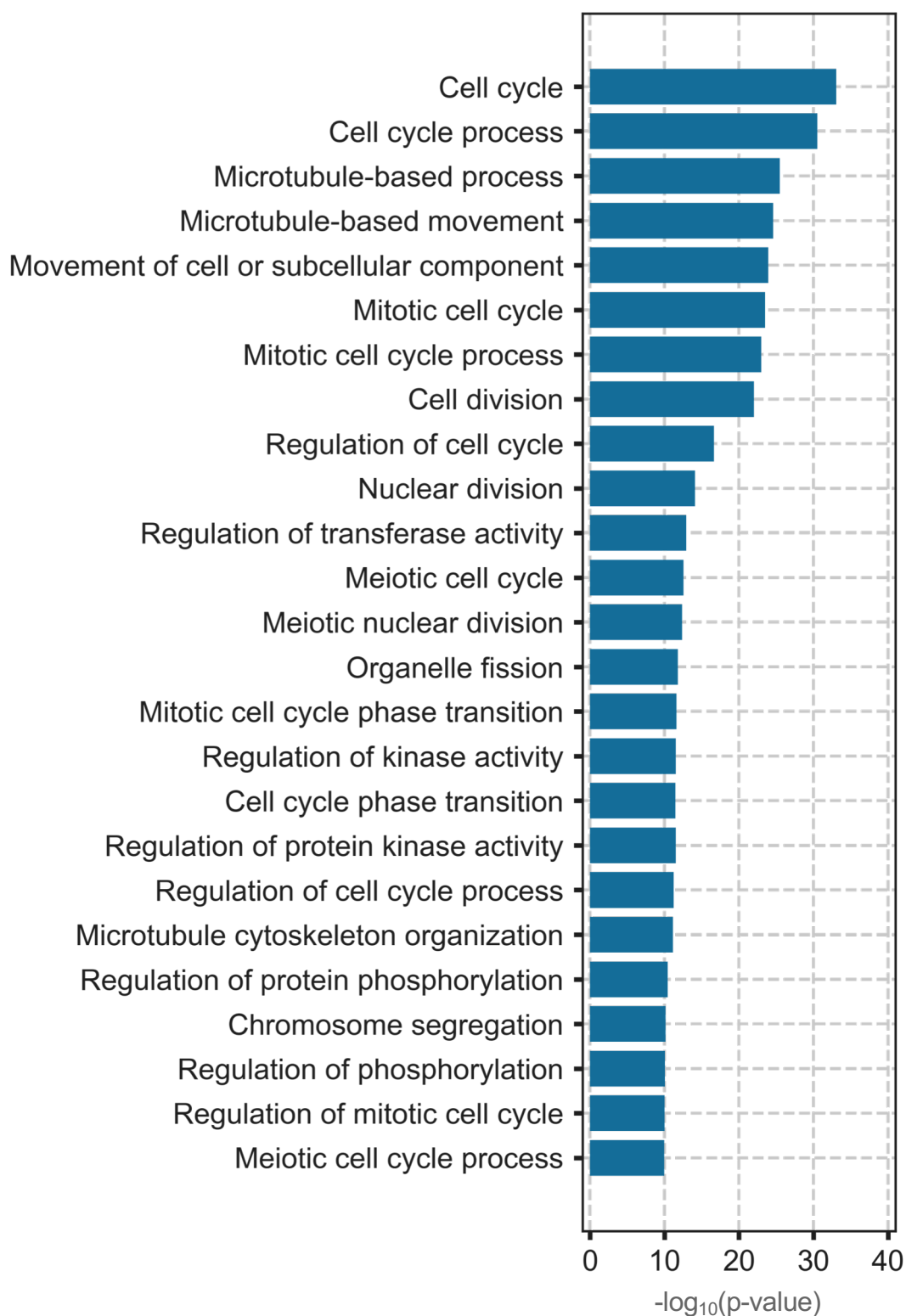


Figure 11

G₂/M期に割り当てられた細胞集団で高発現する遺伝子セットの有糸分裂との関連性の確認

Fig. 10AにおいてG₂/M期に割り当てられた細胞で高発現していた遺伝子群を用いてGO term解析を行い、最もp-valueが低かった上位25のGO termを示している。

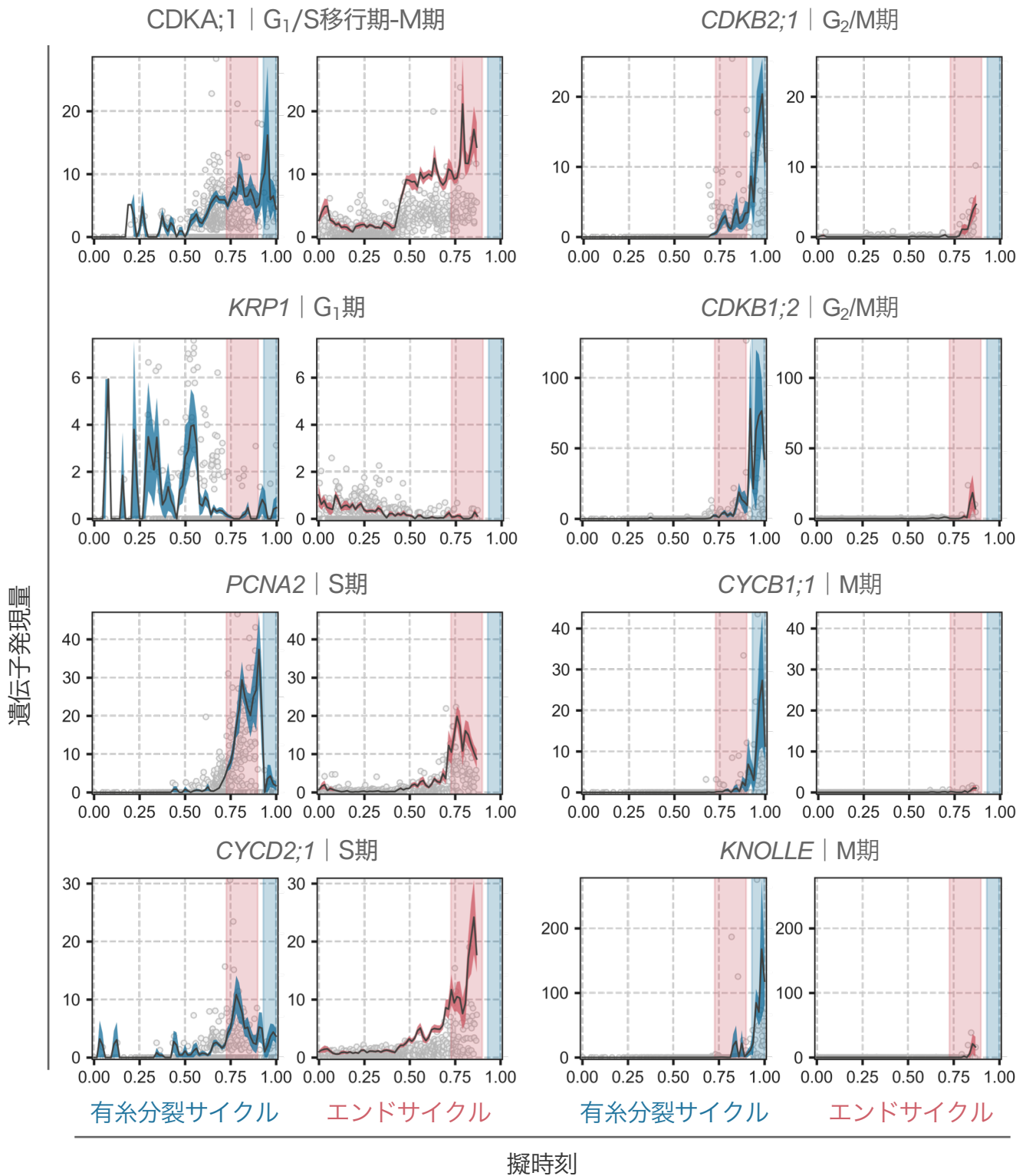


Figure 12

各細胞周期の擬時刻における細胞周期マーカーの発現パターン

DBSCANの結果 (Fig. 5A) をもとに、分割されたエンドサイクル (赤) と有糸分裂サイクル (青) のそれぞれの擬時刻上での細胞周期マーカー遺伝子の発現パターンを示している。各細胞の発現量が点で、各細胞の移動平均 (window=0.01) が実線で、移動標準誤差 (window=0.01) が有色の帯で示されている。

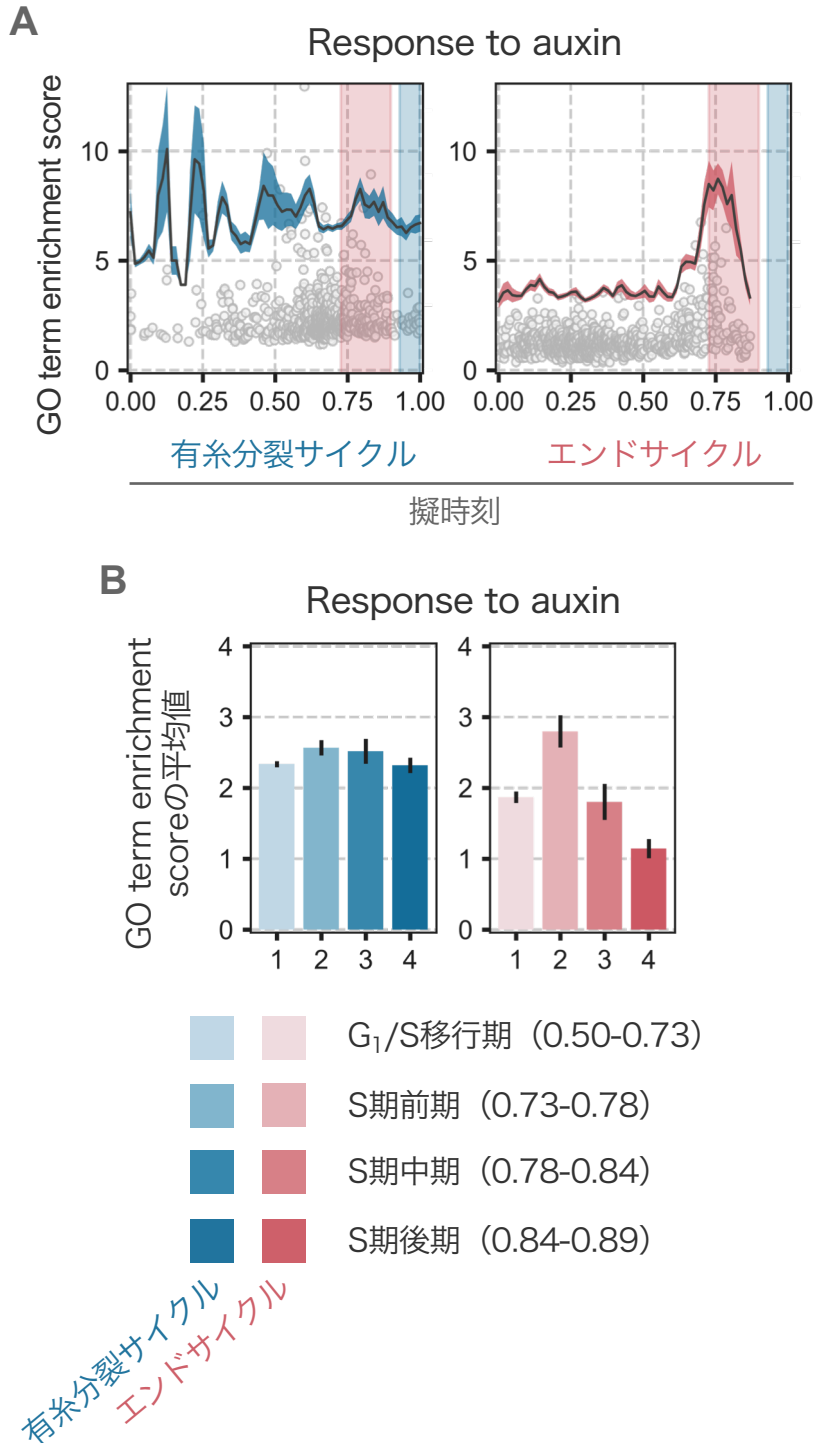


Figure 13

各細胞周期におけるオーキシンリズムの測定

A) エンドサイクル (赤) と有糸分裂サイクル (青) のそれぞれの擬時刻上での“Response to auxin”のGO term enrichment scoreを示している。各細胞におけるGO term enrichment scoreが点で、各細胞の移動平均 (window=0.01) が実線で、移動標準誤差 (window=0.01) が有色の帯で示されている。B) エンドサイクル (赤) と有糸分裂サイクル (青のG₁/S移行期、S期前期、S期中期、S期後期) それぞれに含まれた細胞間でのGO term enrichment scoreの平均値を示しており、エラーバーは標準偏差を示している。

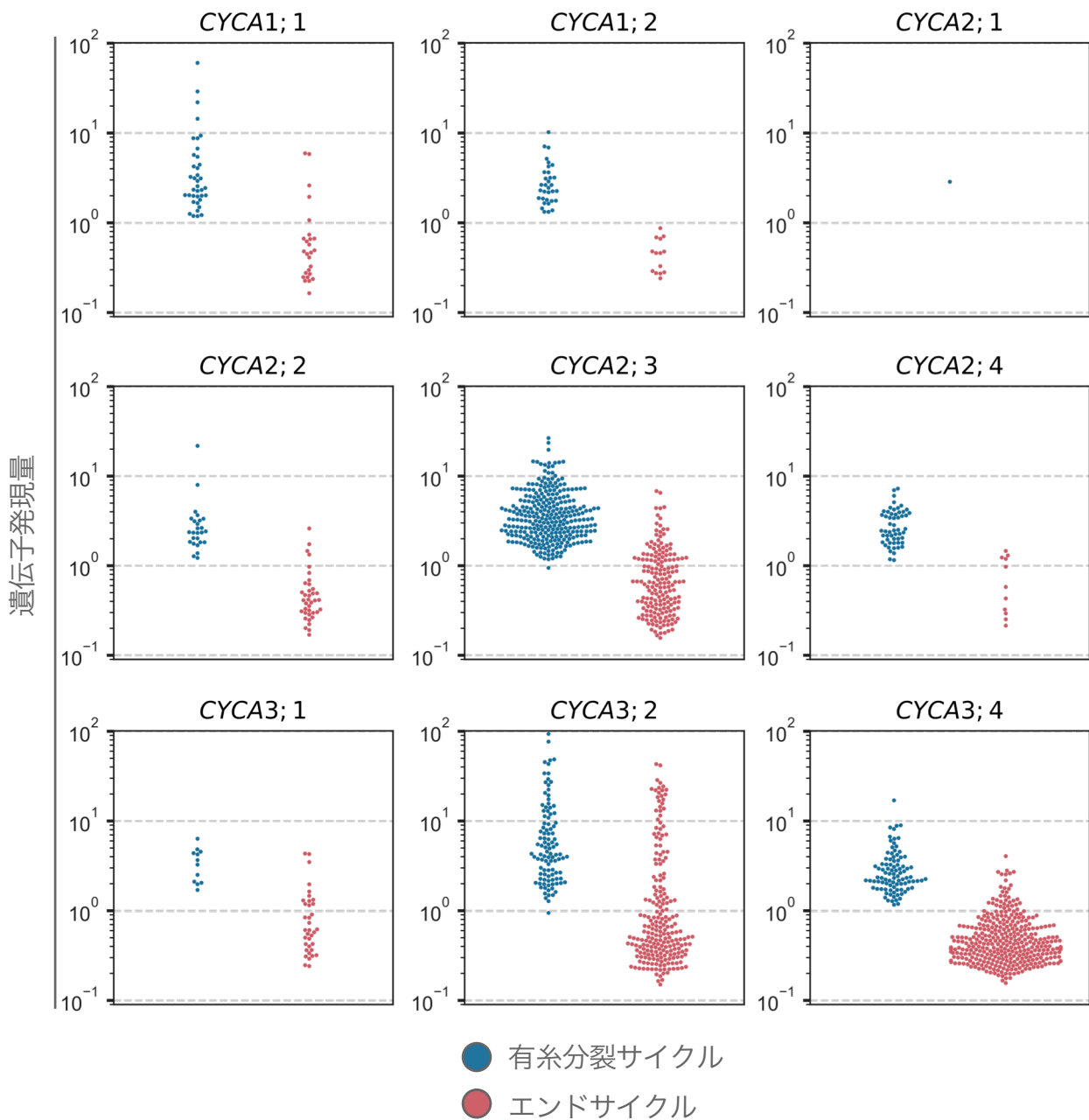


Figure 14

各細胞周期におけるCYCAの発現量の比較

エンドサイクルクラスターと有糸分裂クラスターにおけるAタイプサイクリンの発現量を示している。青は有糸分裂サイクルクラスター、赤はエンドサイクルクラスターを示す。

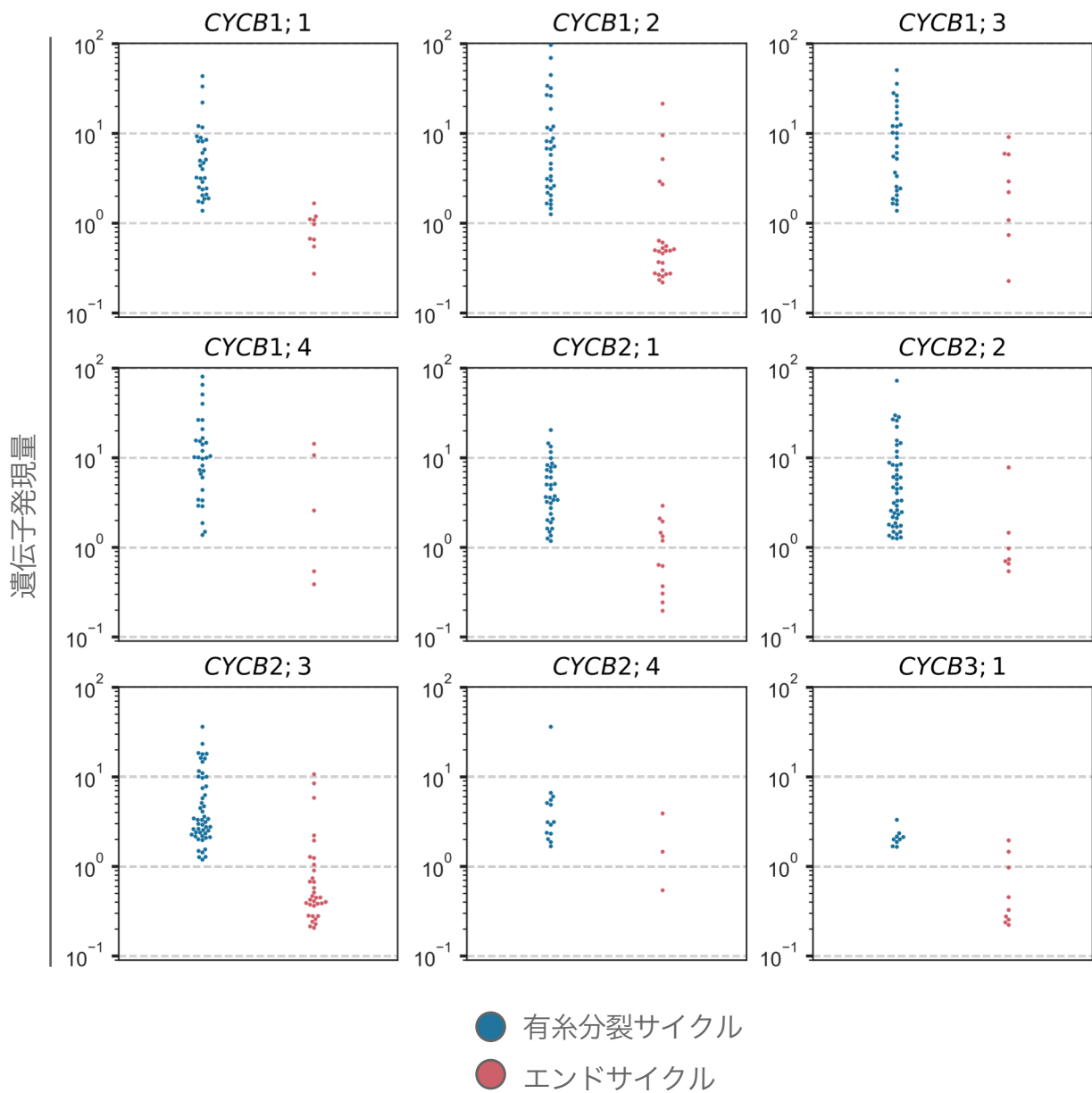


Figure 15

各細胞周期におけるCYCBの発現量の比較

エンドサイクルクラスターと有糸分裂クラスターにおけるBタイプサイクリンの発現量を示している。青は有糸分裂サイクルクラスター、赤はエンドサイクルクラスターを示す。

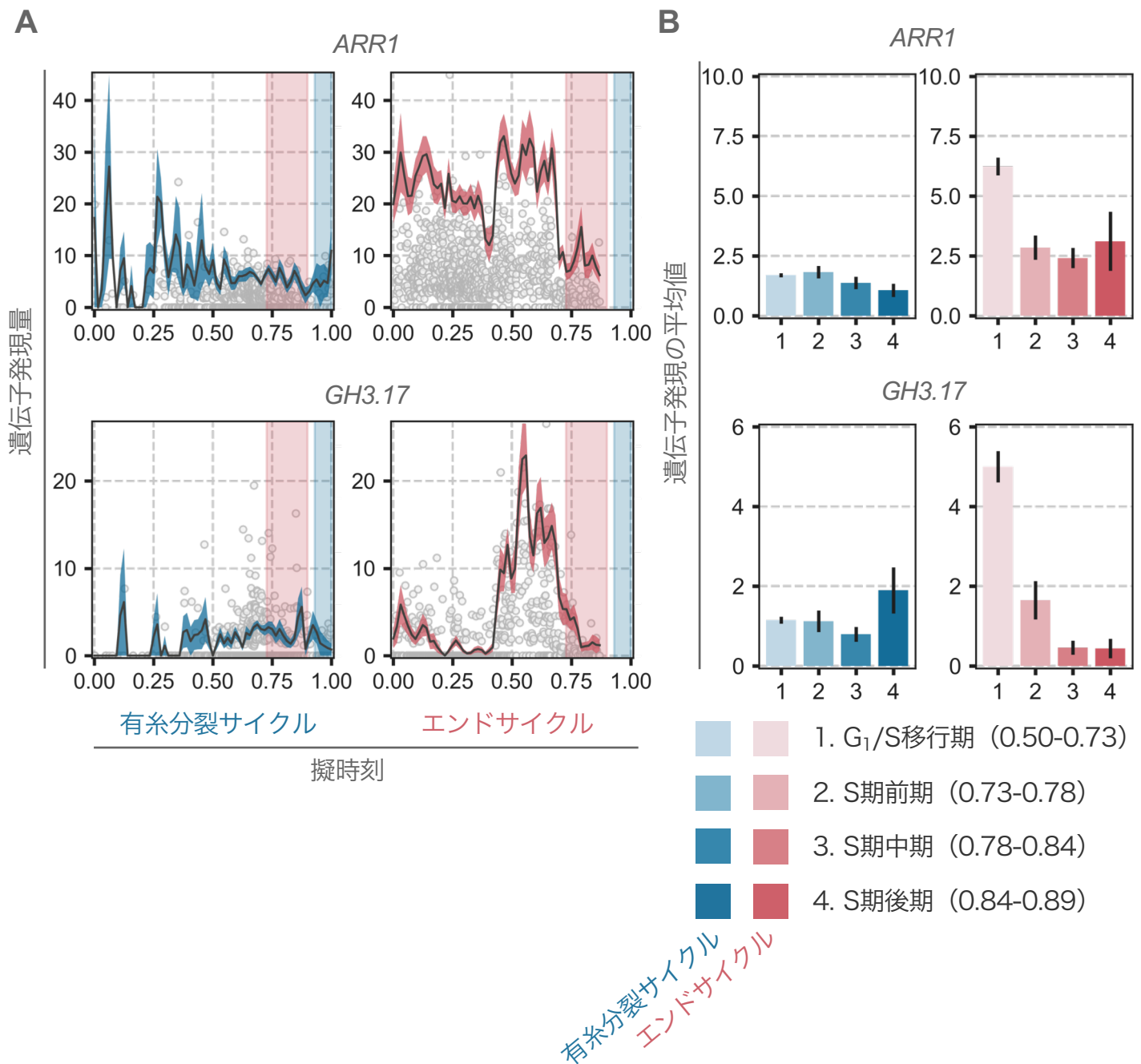


Figure 16

オーキシンの不活化を制御する*ARR1*と*GH3.17*の発現パターン

A) オーキシンの不活化を制御する*ARR1*と*GH3.17*の発現パターンをそれぞれの細胞周期の時系列において示している。各細胞の発現量が点で、各細胞の移動平均 (window=0.01) が実線で、移動標準誤差 (window=0.01) が有色の帯で示されている。B) エンドサイクル (赤) と有糸分裂サイクル (青の G_1/S 移行期、S期前期、S期中期、S期後期それぞれに含まれた細胞間での遺伝子発現の平均値を示しており、エラーバーは標準偏差を示している。

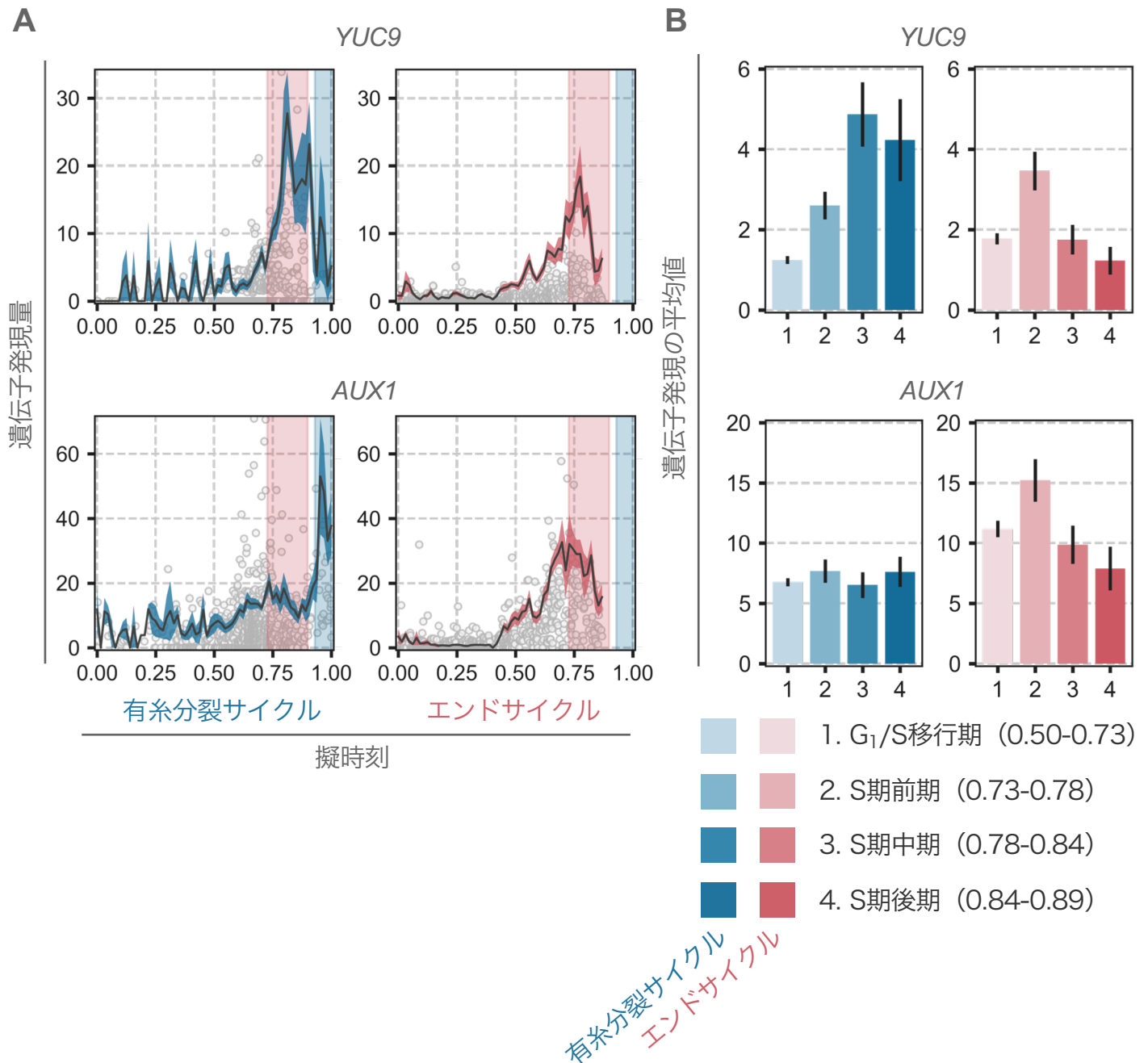
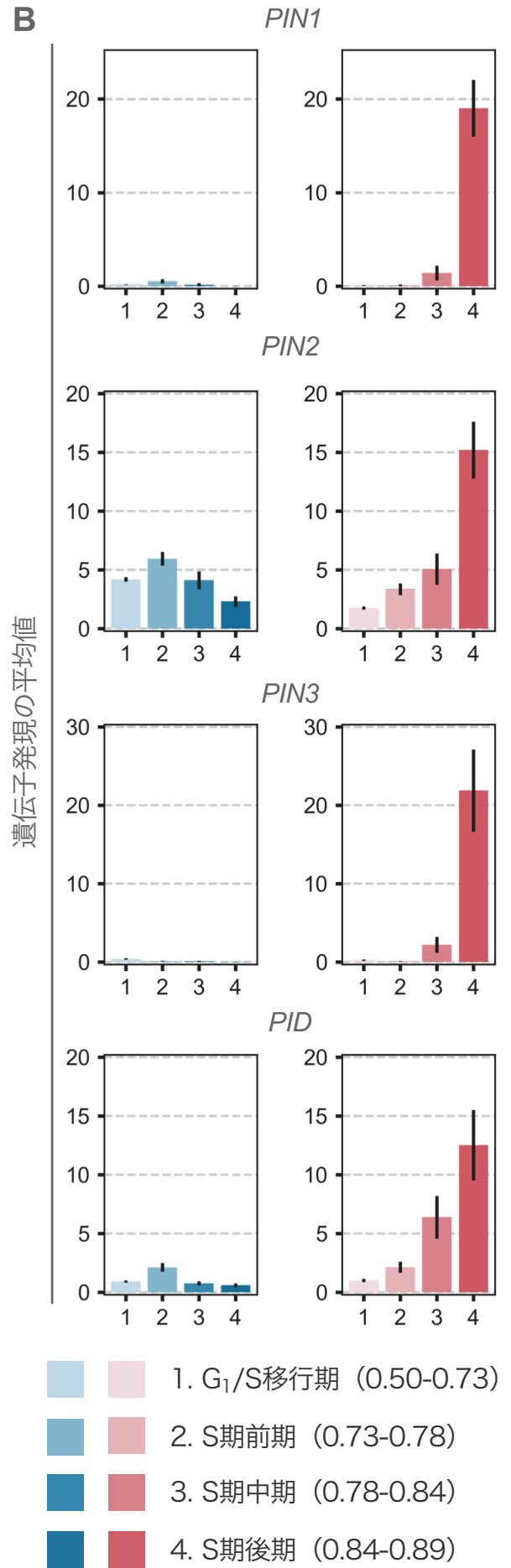
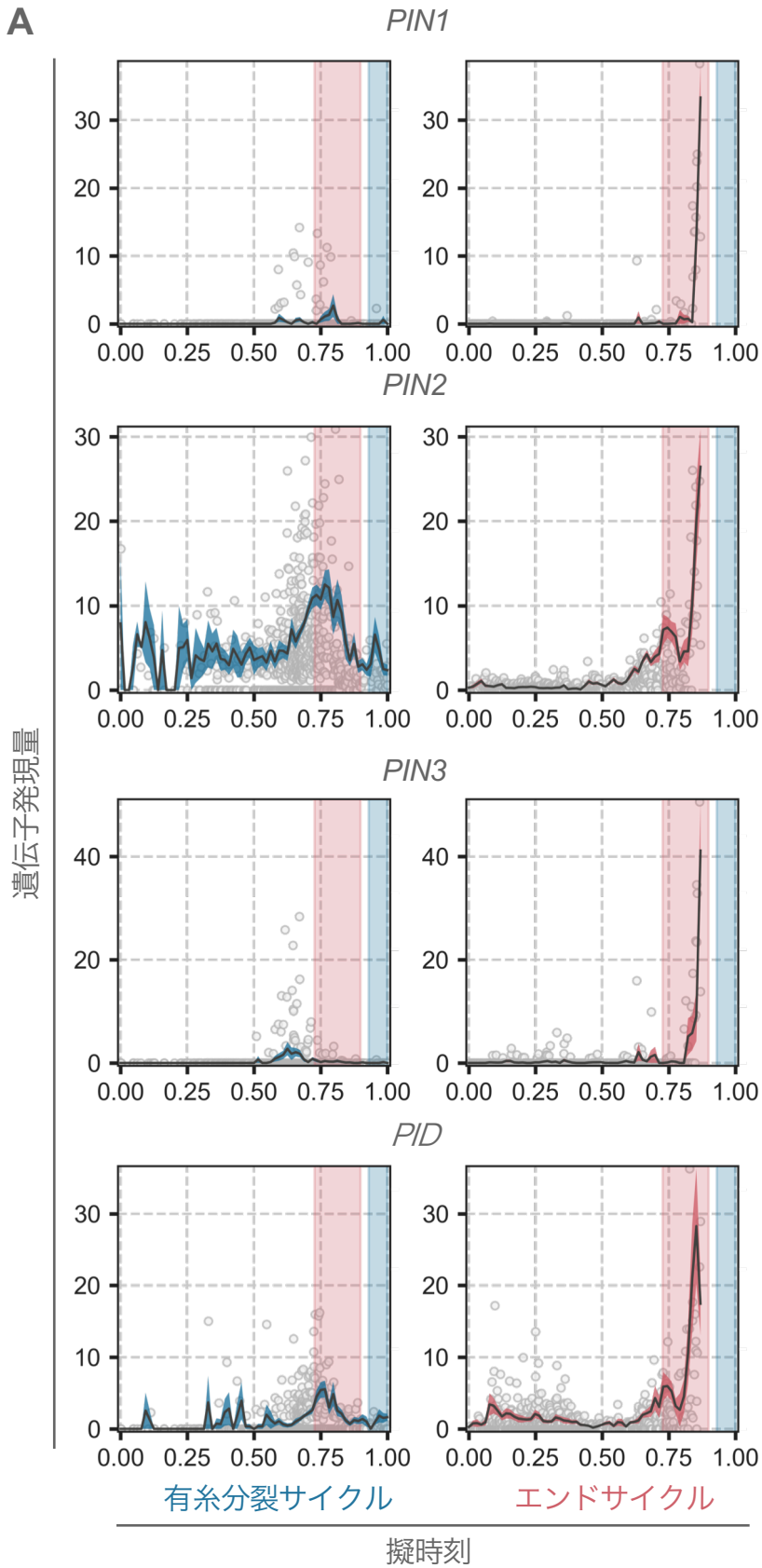


Figure 17

オーキシンの合成と取り込みを制御する *YUC9* と *AUX1* の発現パターン

A) オーキシンの合成を制御する *YUC9* とオーキシンの取り込みを行う *AUX1* の発現パターンをそれぞれの細胞周期の時系列において示している。各細胞の発現量が点で、各細胞の移動平均 (window=0.01) が実線で、移動標準誤差 (window=0.01) が有色の帯で示されている。B) エンドサイクル (赤) と有糸分裂サイクル (青のG₁/S移行期、S期前期、S期中期、S期後期それぞれに含まれた細胞間での遺伝子発現の平均値を示しており、エラーバーは標準偏差を示している。



有糸分裂サイクル
エンドサイクル

Figure 18

オーキシンの排出を制御する *PIN1-3* と *PID* の発現パターン

A) オーキシンの排出を行う *PIN1-3* と PINs の活性を制御する *PID* の発現パターンをそれぞれの細胞周期の時系列において示している。各細胞の発現量が点で、各細胞の移動平均 (window=0.01) が実線で、移動標準誤差 (window=0.01) が有色の帯で示されている。B) エンドサイクル (赤) と有糸分裂サイクル (青の G_1/S 移行期、S 期前期、S 期中期、S 期後期それぞれに含まれた細胞間での遺伝子発現の平均値を示しており、エラーバーは標準偏差を示している。

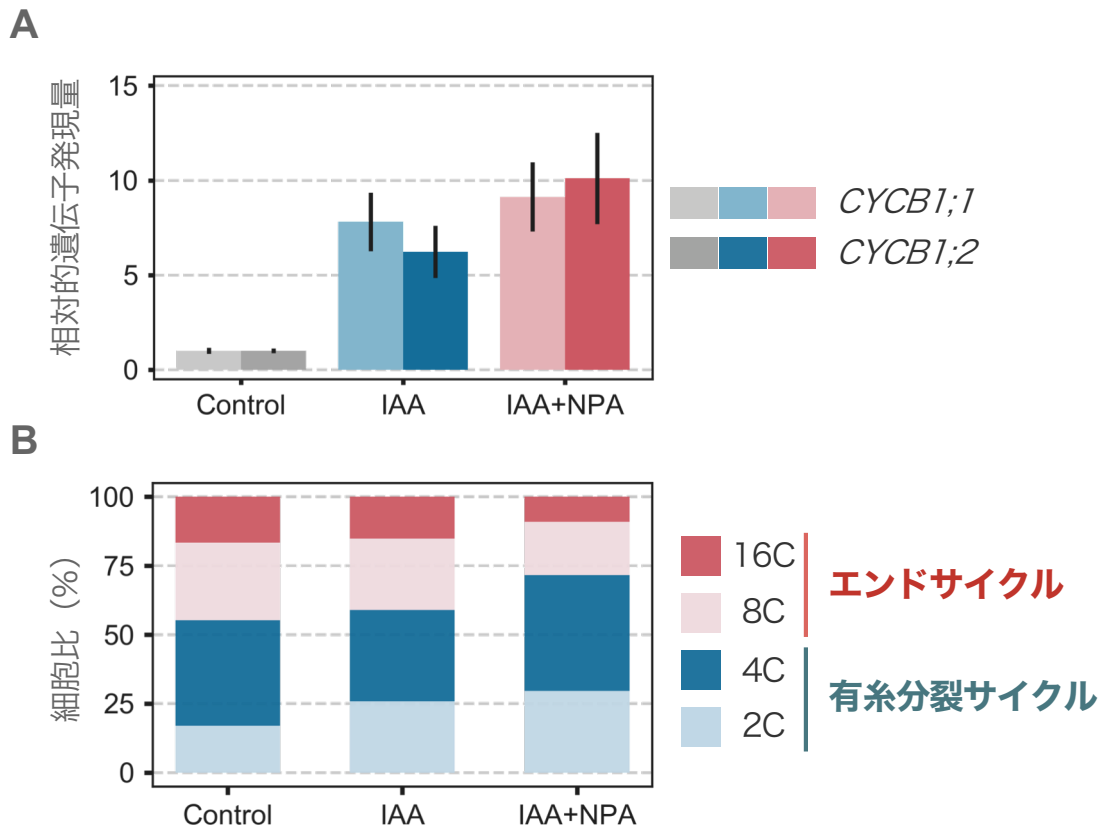


Figure 19

オーキシンの排出阻害によるエンドサイクルの進行への影響

A) *CYCB1;1* (淡色) と *CYCB1;2* (濃色) の発現量をqPCRにより測定した。根は水、IAA (1 μ M)、IAA (1 μ M) +NPA (10 μ M)を12時間処理されている。内部標準には*IPP2*を用いておりエラーバーは標準偏差を表す。B)水、IAA、IAA+NPAを12時間処理された根を用いて核相を測定している。2C-16Cの核相のクラスがあり、それぞれに含まれる細胞が百分率で示されている。IAA単独処理区とIAA+NPA処理区における2C4Cの細胞比と8C16Cの細胞比の間には有意な差が見られる (p-value < 0.01、カイ二乗検定)。

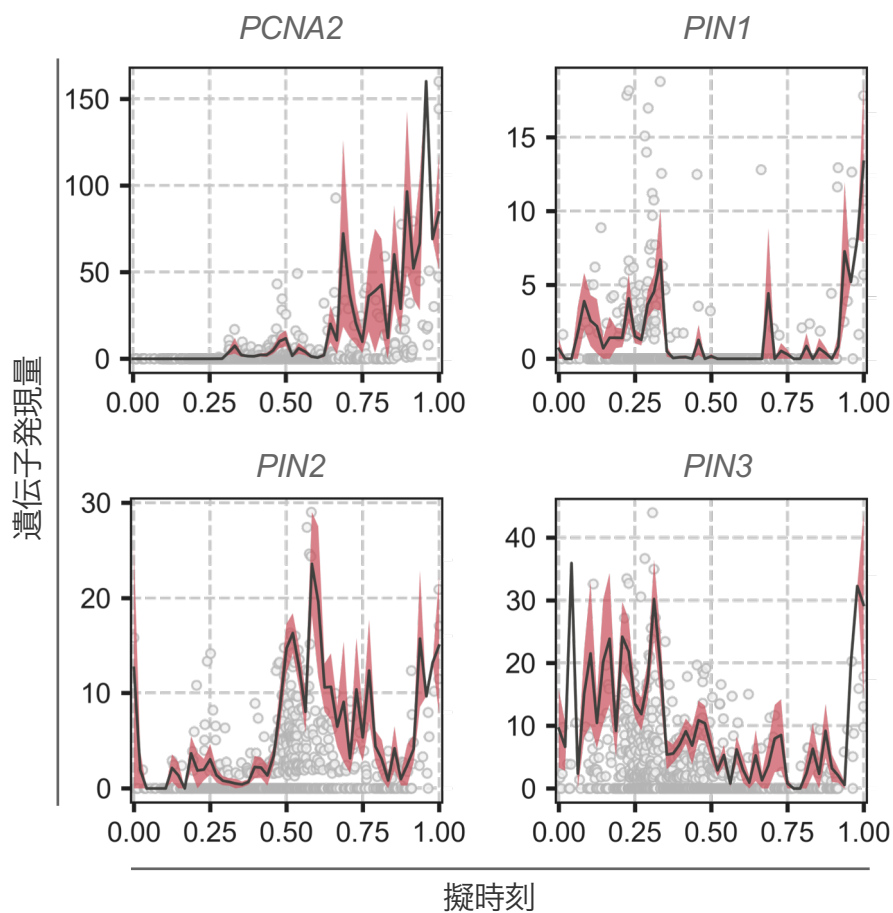


Figure 20

異なる細胞集団に由来する擬時刻におけるPIN1-3の発現パターンの確認

Fig.5Aにおいてクラスター3に属し“DNA endoreduplication”のGO term enrichment score $[-\log_{10}(\text{p-value})]$ が2以上の細胞を用いて擬時刻を作成し、*PCNA2*と*PIN1-3*の発現パターンを確認した。各細胞の細胞周期マーカー遺伝子の発現量が点で、各細胞の移動平均 (window=0.01) が実線で、移動標準誤差 (window=0.01) が有色の帯で示されている。

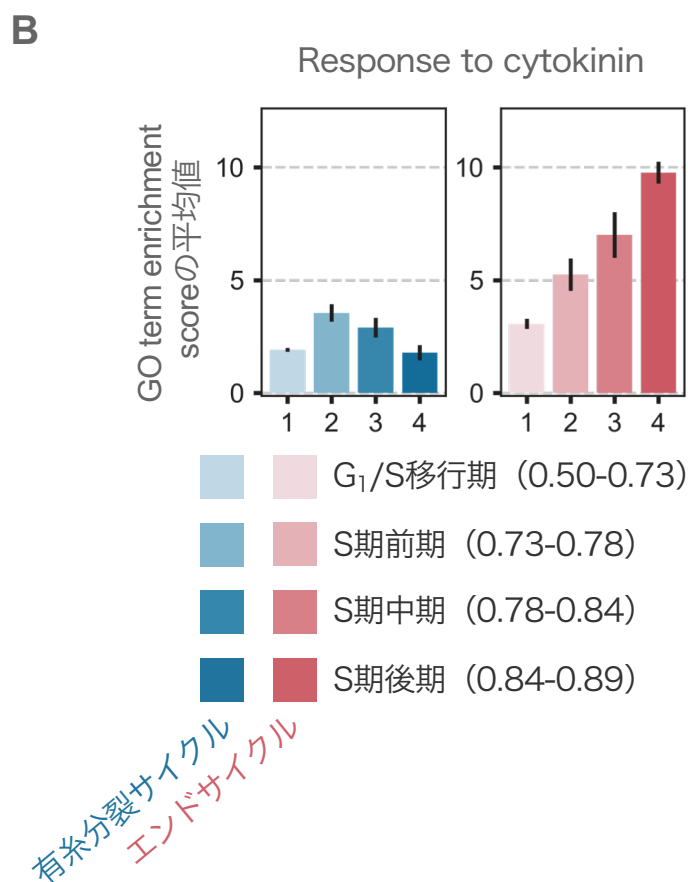
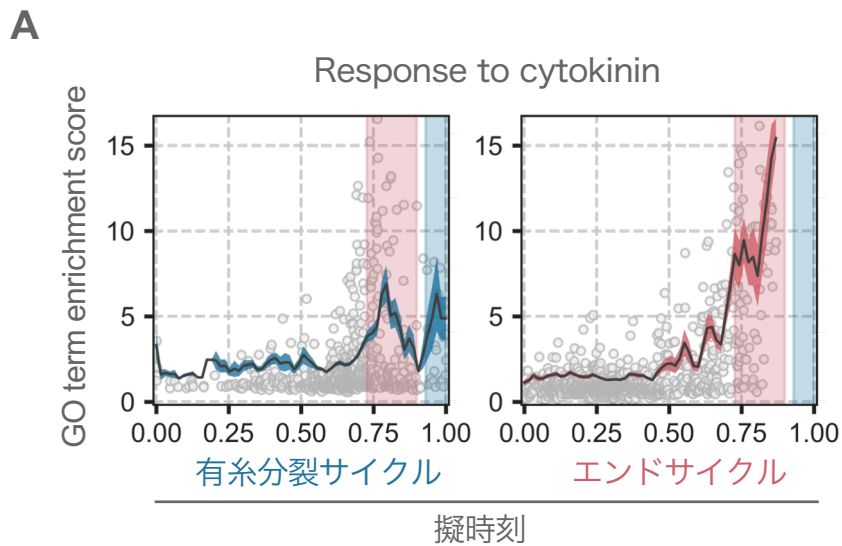


Figure 21

各細胞周期におけるサイトカニンリズムの測定

A) エンドサイクル (赤) と有糸分裂サイクル (青) のそれぞれの擬時刻上での “Response to cytokinin” のGO term enrichment score [$-\log_{10}(\text{p-value})$] を示している。各細胞のGO term enrichment scoreが点で、各細胞の移動平均 (window=0.01) が実線で、移動標準誤差 (window=0.01) が有色の帯で示されている。B) エンドサイクル (赤) と有糸分裂サイクル (青のG₁/S移行期、S期前期、S期中期、S期後期それぞれに含まれた細胞間でのGO term enrichment scoreの平均値を示しており、エラーバーは標準偏差を示している。

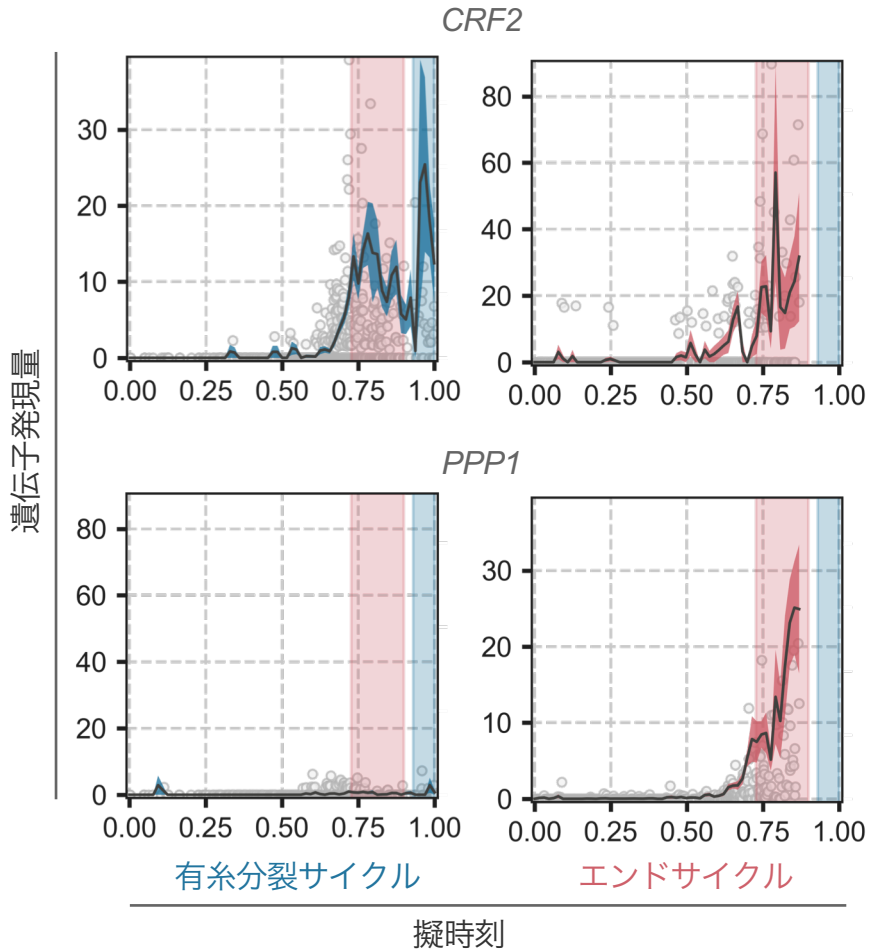


Figure 22

各細胞周期におけるサイトカニンリズムの測定

サイトカニン応答性があり、かつ *PIM* 遺伝子の発現制御を行う *CRF2* と *PPP1* の発現パターンをエンドサイクル（赤）と有糸分裂サイクル（青）のそれぞれの擬時刻上で示している。各細胞の発現量が点で、各細胞の移動平均（window=0.01）が実線で、移動標準誤差（window=0.01）が有色の帯で示されている。

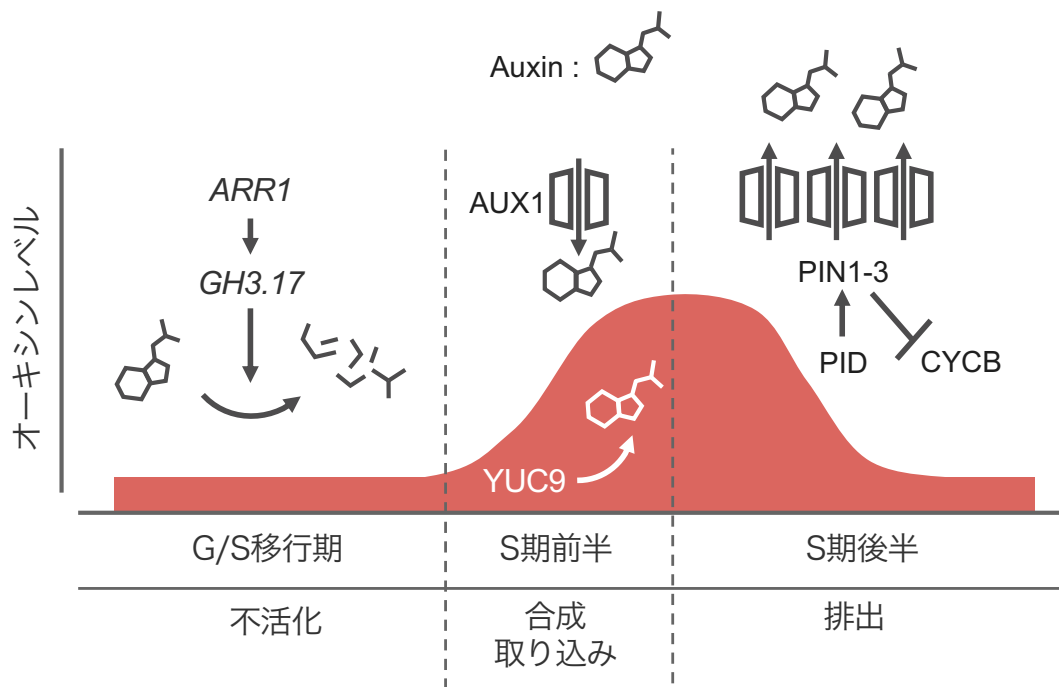


Figure 23
エンドサイクルにおけるオーキシンリズムモデル

本研究で示されたエンドサイクルにおけるオーキシンレベルの変動モデルの模式図を示している。赤の領域はオーキシンレベルを示しており、S期前半に一過的なピークを持つ。このピークはYUC9によるオーキシン合成の促進とAUX1によるオーキシンの取り込みにより生じる。また、G/S移行期にはARR1-GH3.17経路により、オーキシンが不活化されるため、オーキシンレベルが低下しており、S期後期にはPIDとPIN1-3によりオーキシンが排出されオーキシンレベルを低下させる。S期後期のオーキシンレベルの低下は有糸分裂を促進するCYCBの発現を抑制し、エンドサイクルの進行を促進する。

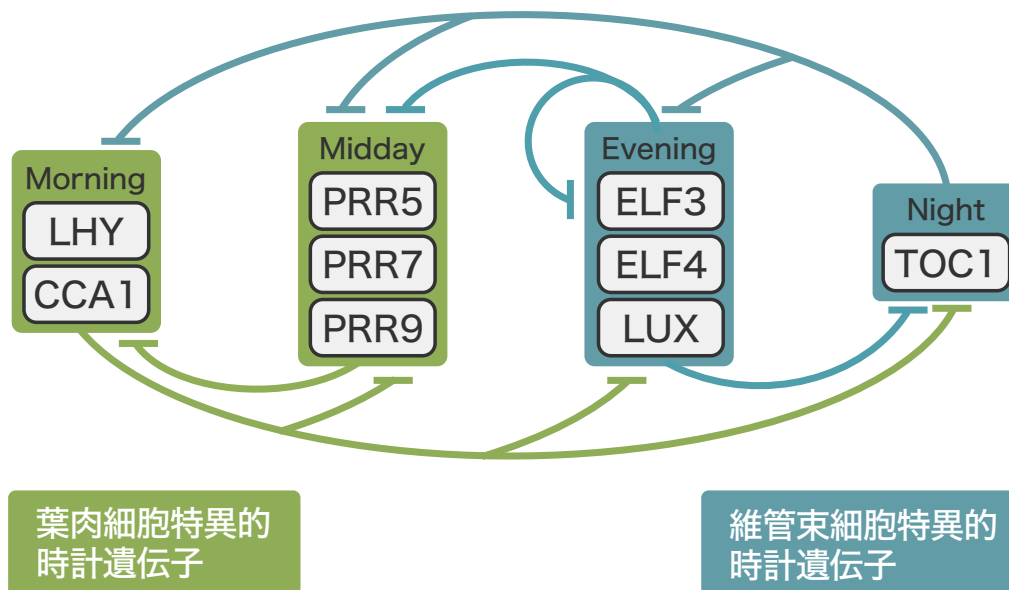


Figure 1
概日時計を構成する時計遺伝子のフィードバックループと組織特異性

植物の概日時計はCCA1とLHY、TOC1から成る中心的な振動子と、PSEUDO RESPONSE REGULATOR (PRR) ファミリーに属するPRR5、PRR7、PRR9やEvening Complex (EC) を形成するELF3、ELF4、LUXなどの因子が互いにフィードバックループを形成することで概日リズムを刻んでいる。CCA1とLHYは夜明け前に、PRR5/7/9とTOC1は朝から夕方にかけて、ELF3/4、LUXは夕方から夜にかけて一過的に発現することが知られている。これらの因子は組織特異的な発現パターンを持ち、維管束では主にEC関連の時計遺伝子が他の時計遺伝子に比べ優勢的に発現し、葉肉組織ではPRRファミリーやCCA1とLHYがEC関連遺伝子よりも高発現している。図では葉肉細胞特異的に発現する時計遺伝子を緑で、維管束特異的に発現する時計遺伝子を青で示している」

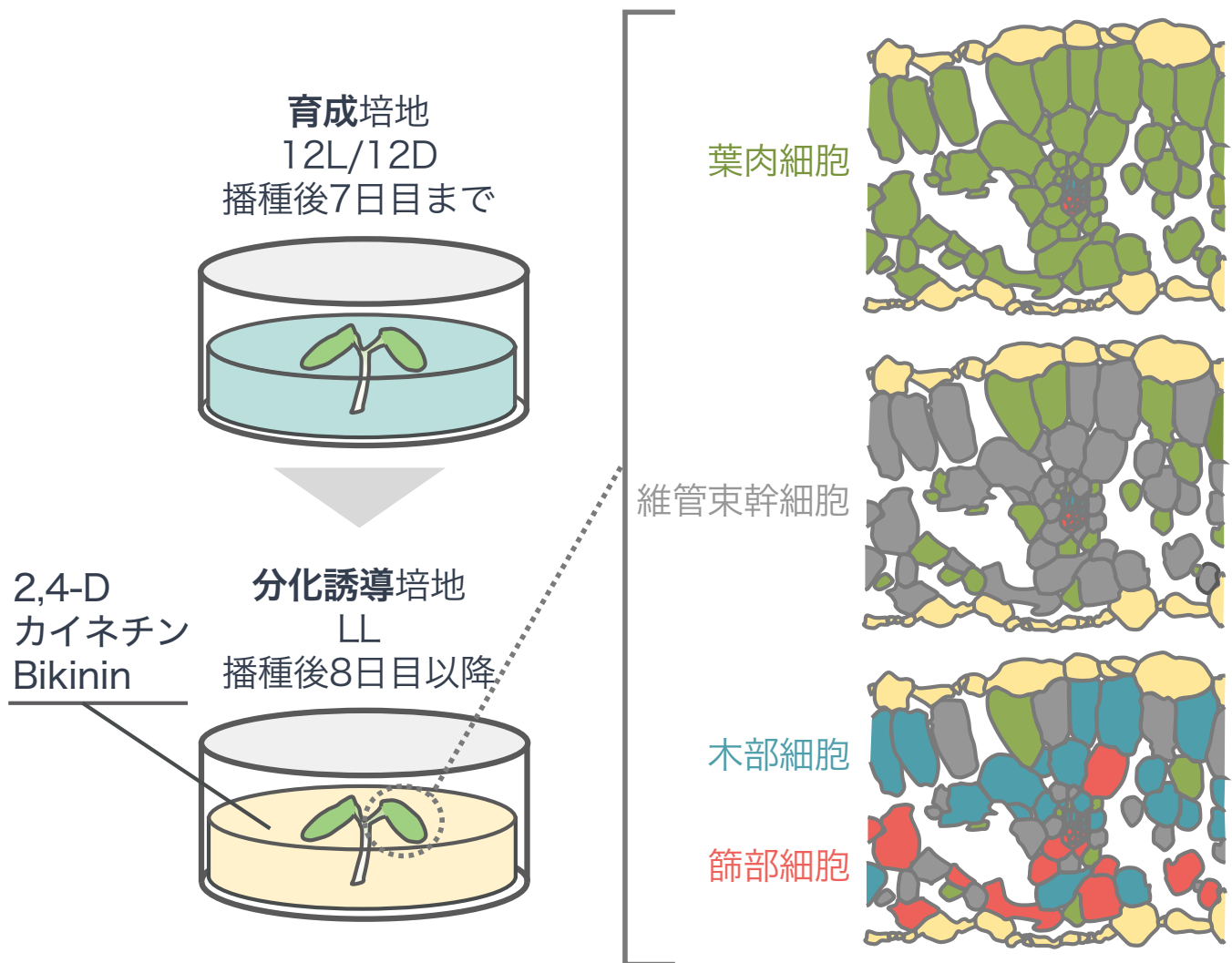


Figure 2
維管束分化誘導系VISUALの模式図

VISUALでは、7日間明暗条件下（12L12D）で育てた植物体の茎頂部を、2,4-D、カイネチン、Bkininを含んだ分化誘導培地に移し、恒明条件下で培養することで、子葉内の葉肉細胞（緑）から脱分化を誘導し維管束幹細胞（灰色）へ、その後、木部細胞（青）と篩部細胞（赤）への分化が誘導される。

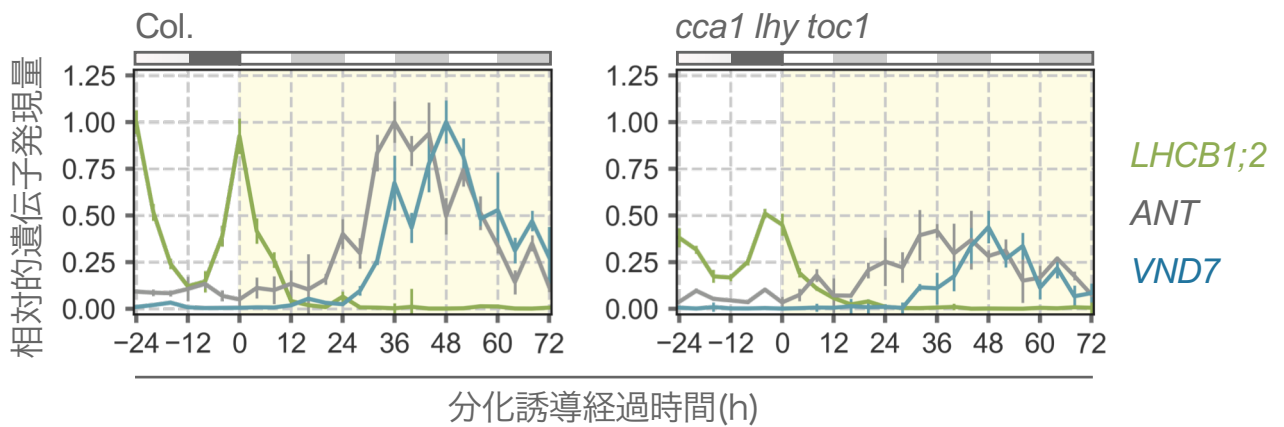


Figure 3

時計遺伝子変異体と野生型における各細胞種マーカー遺伝子の発現パターンの比較

分化誘導前1日と分化誘導後3日間に於けるCol.と *cca1 lhy toc1* での細胞種マーカー遺伝子 (*LHCb1;2* は葉肉細胞、*ANT* は維管束幹細胞、*VND7* は木部細胞) の発現量を示している。各マーカー遺伝子の発現量は野生型での発現ピークが1となるように正規化している。分化誘導が進行する時間帯は背景を薄い黄色で示している。また、図の上部には白と黒で12L12Dの明暗条件を表し、灰色は主観的暗期を表している。エラーバーは標準誤差を示す。

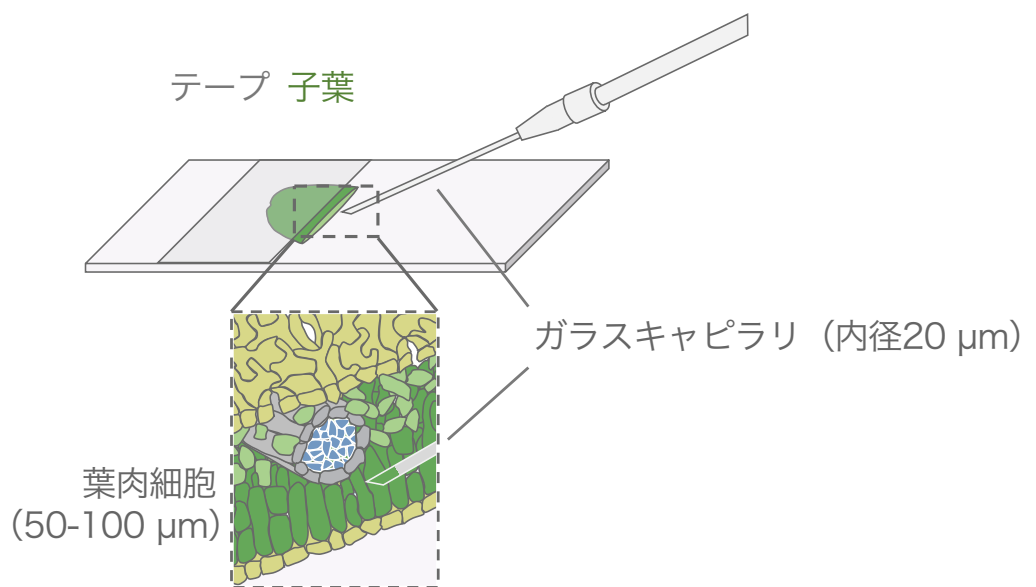
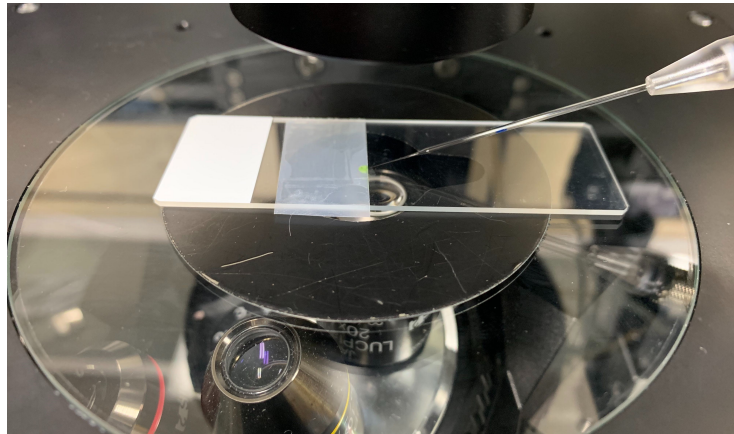


Figure 4

マイクロマニピュレーションによる1細胞内RNA抽出の模式図

マイクロマニピュレーションによる1細胞RNA抽出。上の図では実際の倒立顕微鏡上のステージと固定された子葉、ガラスキャピラリを示している。下図ではマイクロマニピュレーションの模式図を示しており、切断された子葉をスライドガラス上にテープで固定している。拡大図では葉肉細胞とガラスキャピラリの大きさを模式的に示している。

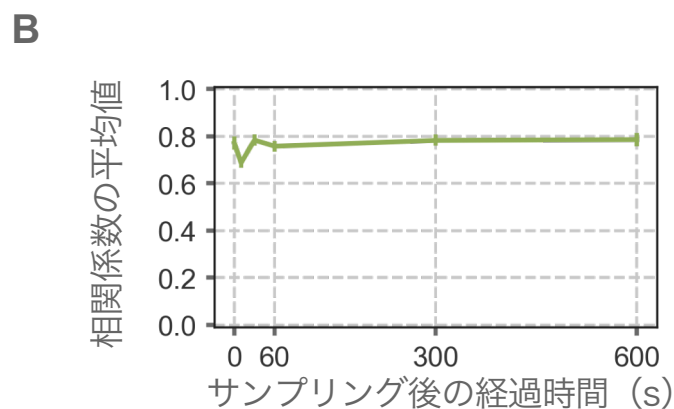
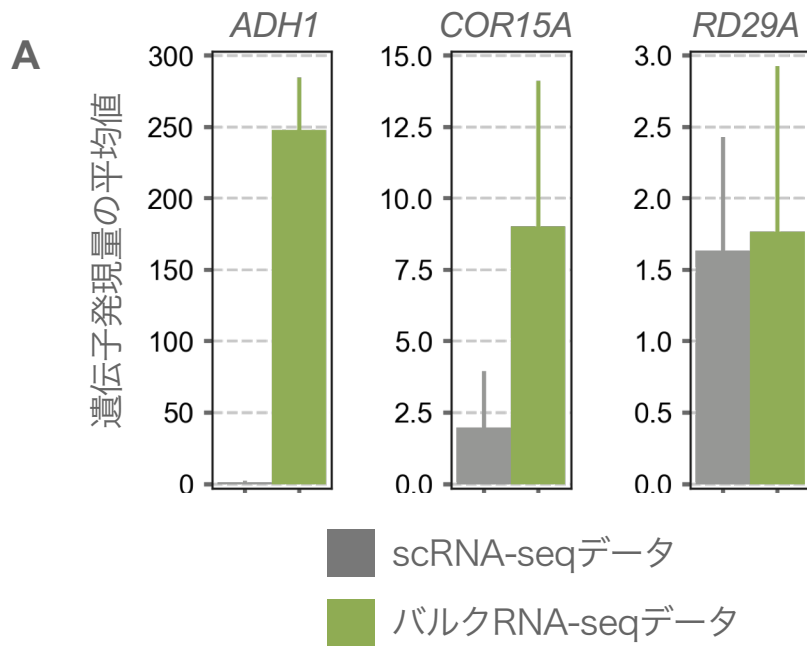


Figure 5
マイクロマニピュレーションによるRNA抽出の安定性の評価

A) マイクロマニピュレーションを用いたscRNA-seqデータ (灰) とバルクのRNA-seqデータ (緑) におけるストレス応答遺伝子の発現量の平均値を示している。エラーバーは標準誤差。B) マイクロマニピュレーションによるサンプリング直後に調整したサンプルと、サンプリング後、10秒、30秒、1分、5分、10分後に調整したサンプル (n=3) それぞれとの相関係数の平均値を示している。エラーバーは標準誤差。

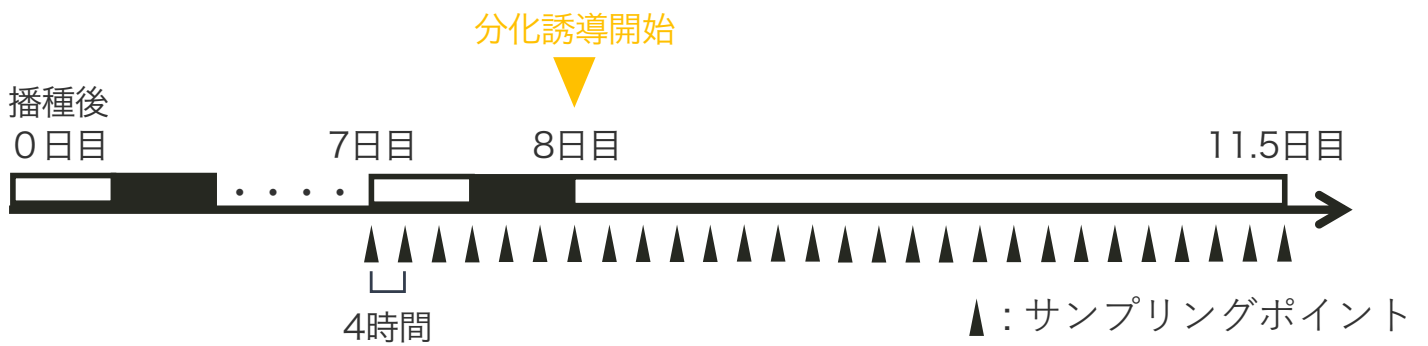


Figure 6
scRNA-seqにおけるサンプルングのタイムコース

分化誘導前の1日と分化誘導後3.5日の間、4時間おきに各タイムポイント7細胞以上の細胞からRNAを抽出し、scRNA-seqを行なった。図では白と黒で明暗条件を表している。

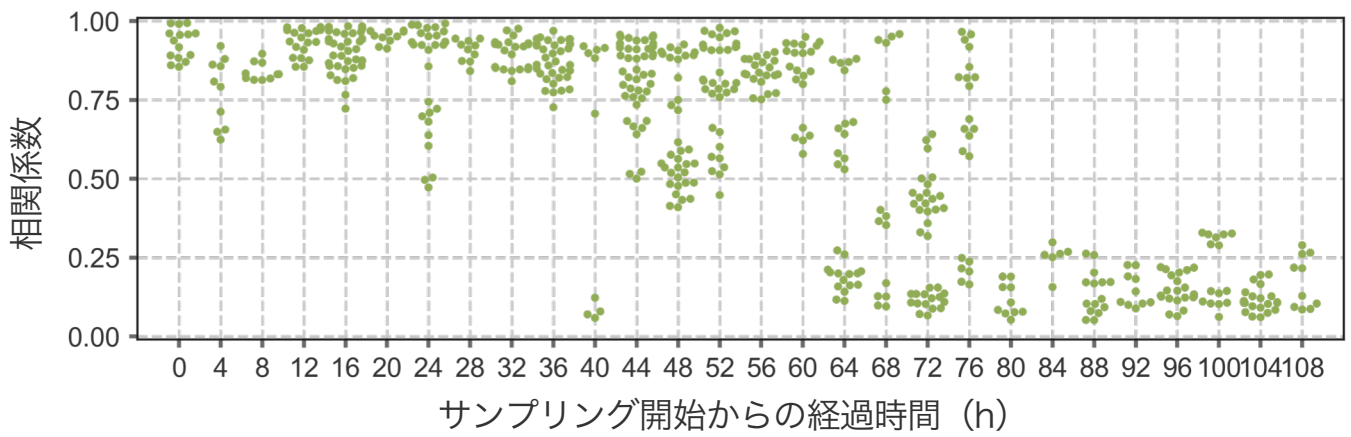


Figure 7

分化誘導過程における細胞種の混交度の確認

各サンプリング時刻におけるサンプル間での相関係数を示している。横軸にはサンプリング開始からの経過時間を示している。

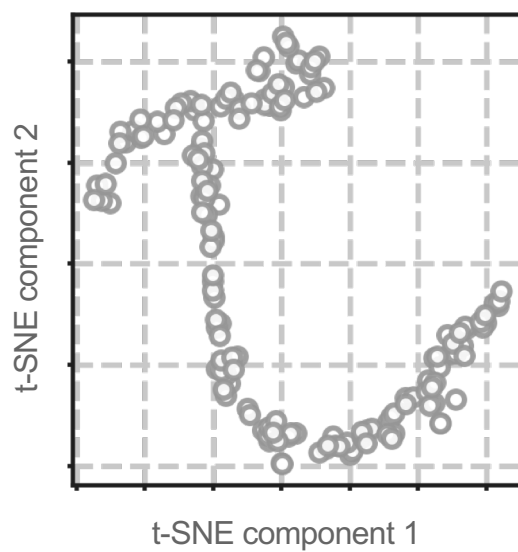


Figure 8
t-SNEによるscRNA-seqデータの可視化

分化誘導後にサンプリングされた細胞のscRNA-seqデータをt-SNEにより2次元平面に投影している。点が各細胞を表している。

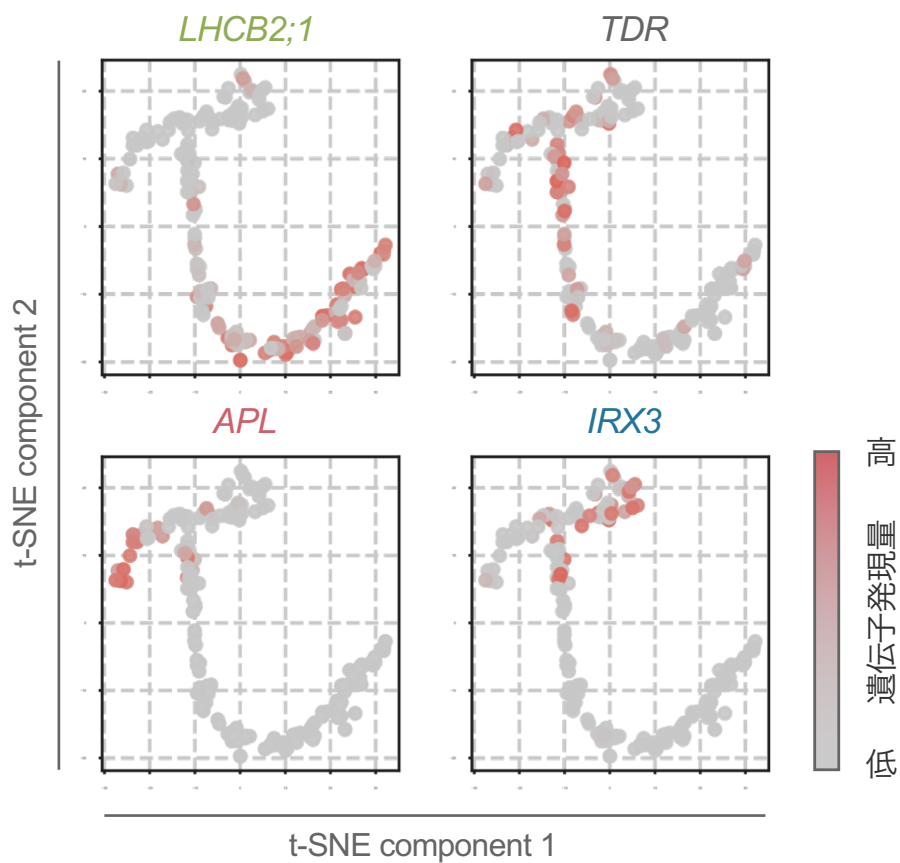


Figure 9

t-SNE平面上における各細胞種マーカー遺伝子パターン

各細胞における細胞タイプマーカー遺伝子 (*LHCb2;1* 葉肉、*TDR* 維管束幹細胞、*APL* 篩部細胞、*IRX3* 木部細胞) の発現量を色の濃淡で示している。

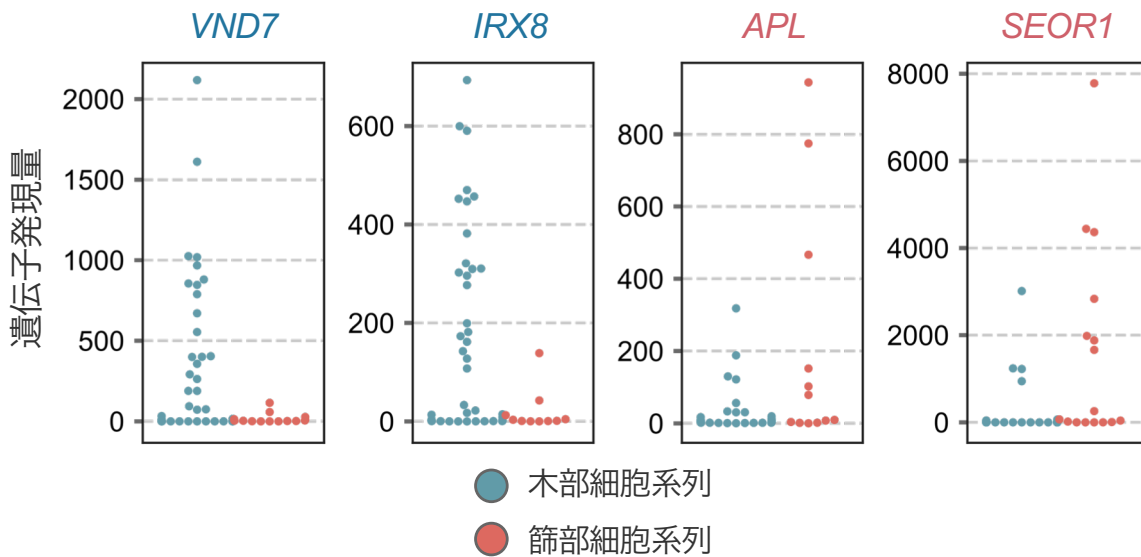


Figure 10

各分岐に含まれる細胞群における木部・篩部マーカー遺伝子の発現量の比較

t-SNE平面上で見られた木部細胞への分岐（青）と篩部細胞の分岐（赤）それぞれに含まれる細胞における木部マーカー遺伝子（*VND7*、*IRX8*）と篩部マーカー遺伝子（*APL*、*SEOR1*）の発現量を示している。

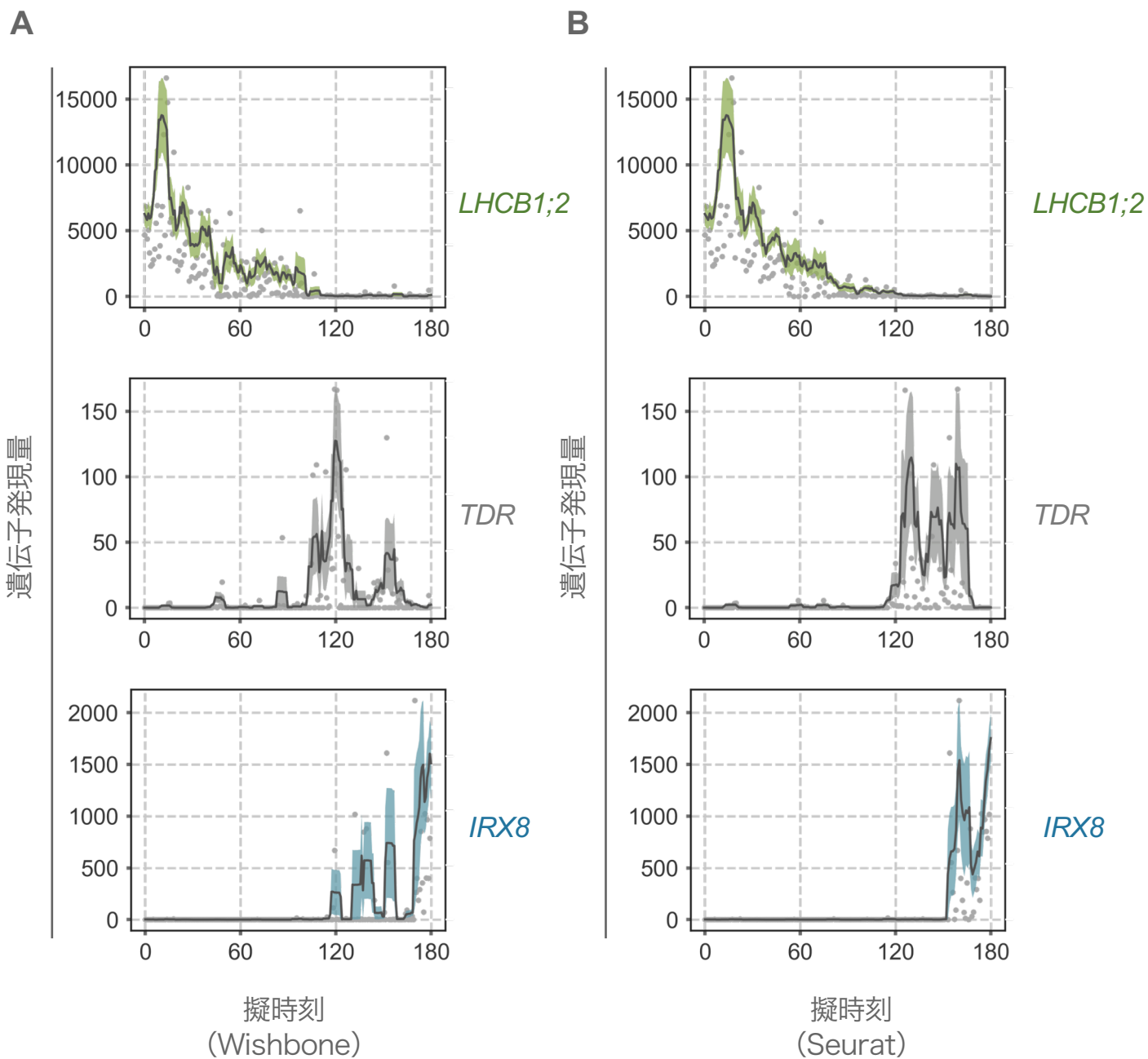


Figure 11

WishboneとSeuratによる擬時刻上でのマーカー遺伝子の発現パターンの比較

A) Wishboneにより得られた擬時刻における各細胞マーカー遺伝子 (*LHCb1;2* は葉肉細胞、*ANT* は維管束幹細胞、*VND7* は木部細胞) の発現パターンを示している。B) Seuratにより得られた擬時刻における各細胞マーカー遺伝子の発現パターンを示している。各細胞の各細胞マーカー遺伝子の発現量が点で、各細胞の移動平均 (window=0.01) が実線で、移動標準誤差 (window=0.01) が有色の帯で示されている。

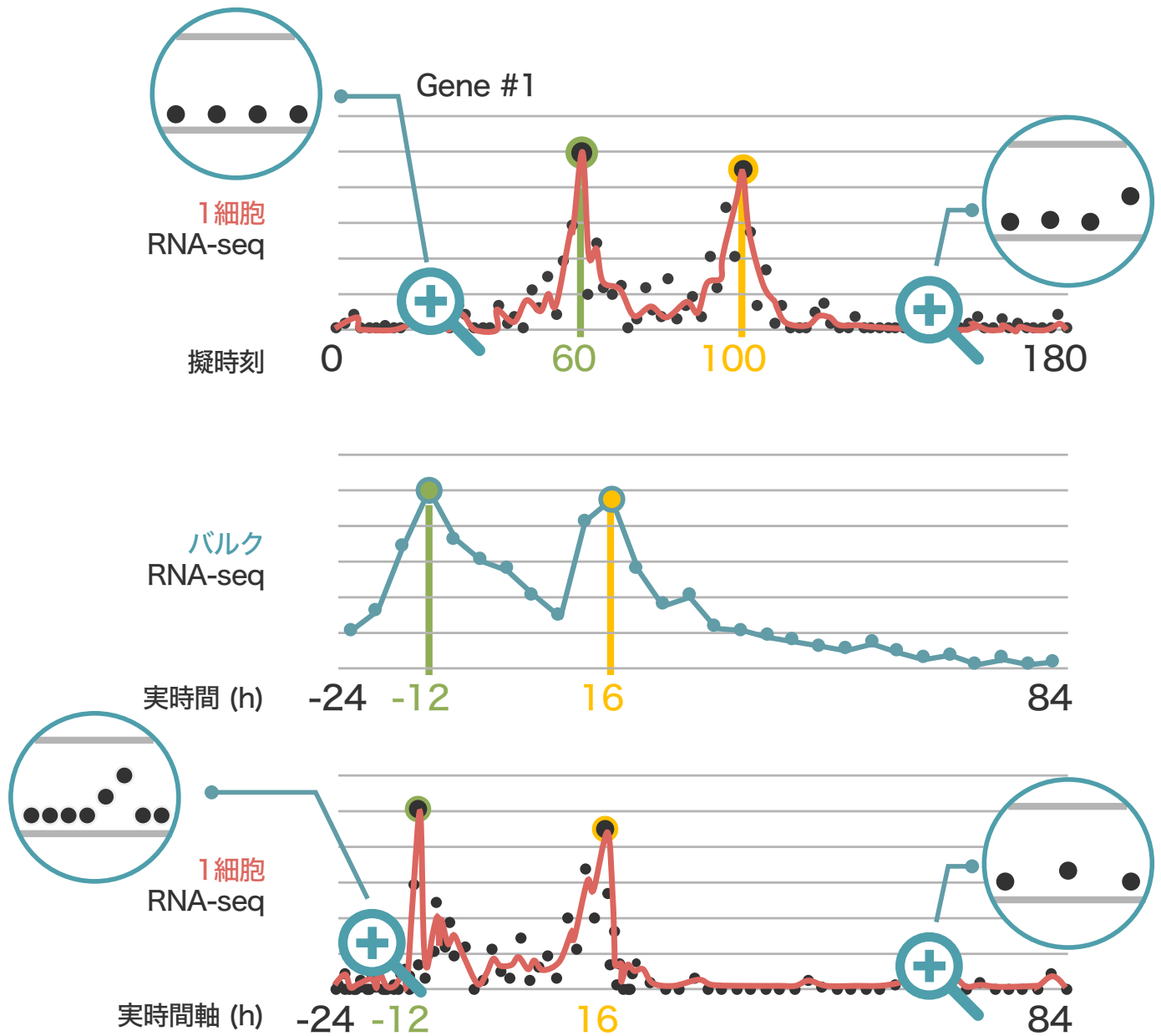


Figure 12
PeakMatchの概念図

scRNA-seqとバルクRNA-seqのピーク時刻を各遺伝子で比較し、擬時刻と実時刻を対応づけていく。図ではある遺伝子の擬時刻上の発現パターンとバルクデータの実時間上の発現パターンのピーク時刻を対応づけ、その組み合わせに合わせて擬時刻上の点間の距離を補正している。本研究ではこの擬時刻と実時間の対応づけを2,217遺伝子で行い、その組み合わせの中で最も多くの対応が可能なパターンを選択し、実時間軸を再構築している。

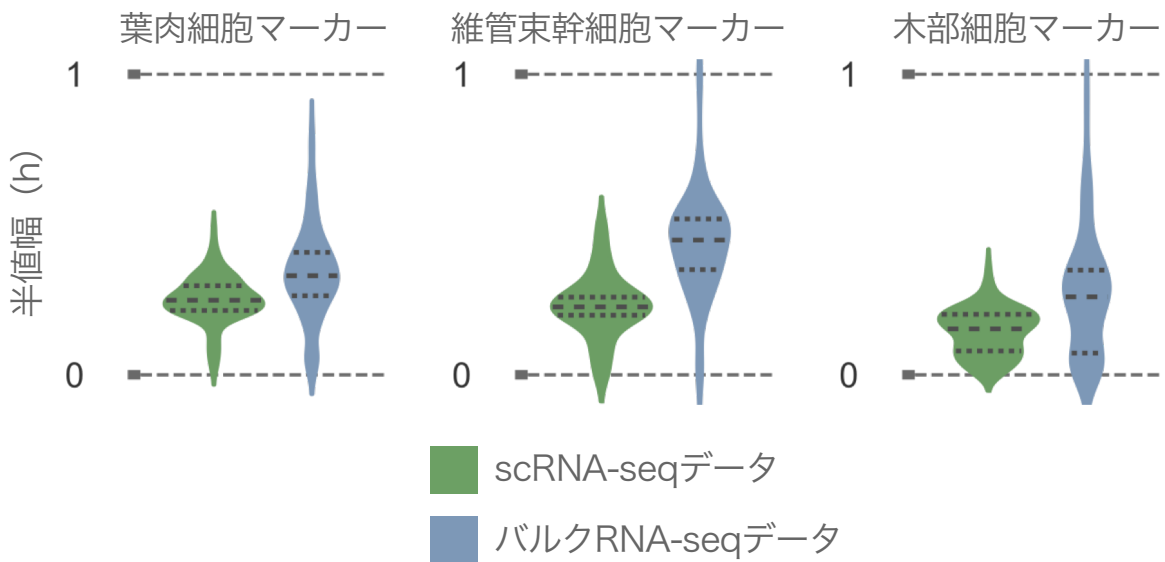


Figure 13

PeakMatchによる実時間軸の時間解像度の評価

実時刻上のscRNA-seq (緑) とバルクRNA-seq (青) における細胞マーカー遺伝子の発現パターンを正規分布で近似し、その半値幅をバイオリンプロットにより示している。図中上下の破線は四分位を、真ん中の破線は中央値を表している。

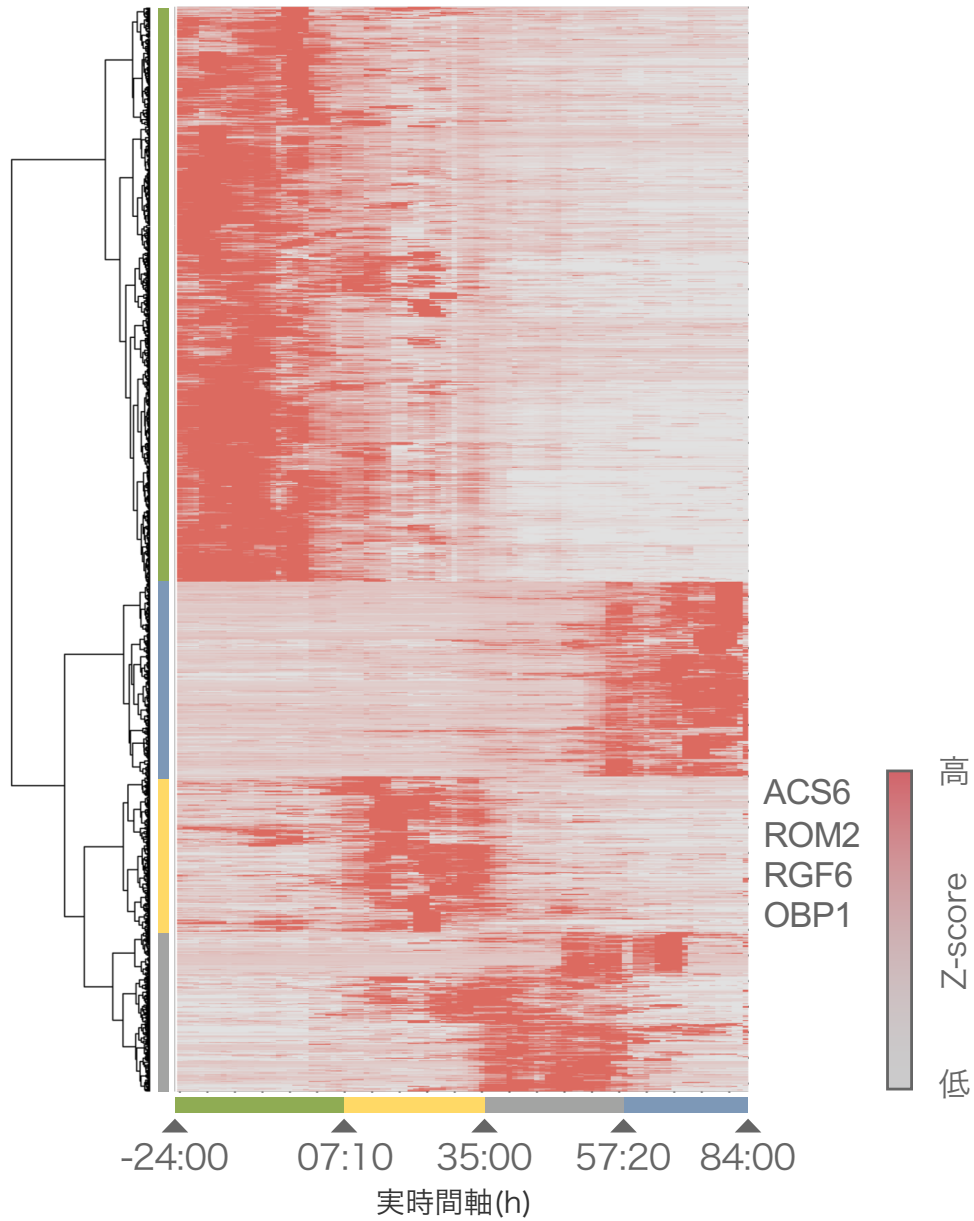


Figure 14

実時間軸上における細胞種マーカー遺伝子の発現パターン

実時間軸上において一過的に発現する遺伝子の発現パターンを、階層クラスタリングとヒートマップを用いて可視化した。色の濃淡は遺伝子発現を正規化したZ-scoreを示している。横軸には実時間軸を示しており4色のカラーコードにより、緑で葉肉細胞、黄色でメリステム幹細胞、灰色で維管束幹細胞、青で木部細胞を示している。その下には各細胞種が入れ替わる時間を示している。また縦軸には主要な4つのクラスタリングを遺伝子発現パターンから、葉肉細胞、メリステム幹細胞、維管束幹細胞、木部細胞それぞれに特異的に発現する遺伝子として分類している。

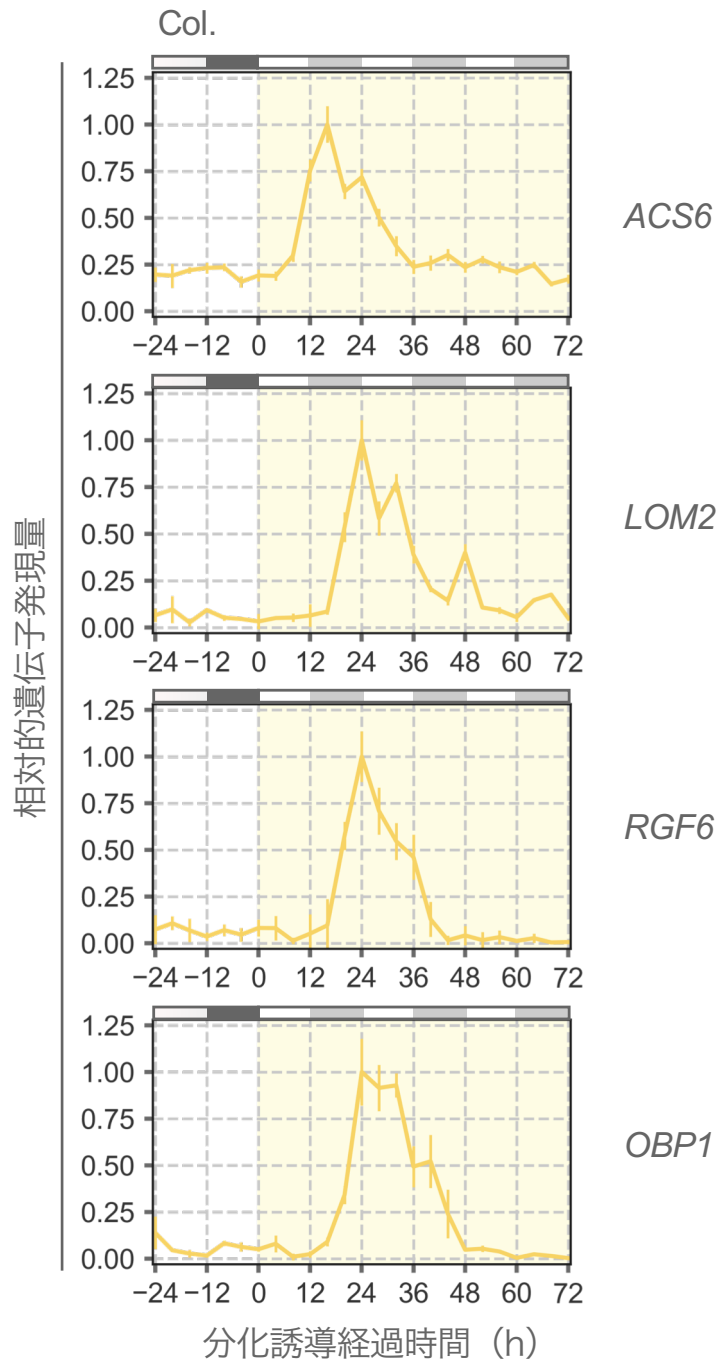


Figure 15
バルクデータにおけるメリステム幹細胞の発現パターン

分化誘導前1日と分化誘導後3日間に於けるCol.でのメリステム幹細胞マーカー遺伝子の発現量を示している。各マーカー遺伝子の発現量は発現ピークが1となるように正規化している。分化誘導が進行する時間帯は背景を薄い黄色で示している。また、図の上部には白と黒で12L12Dの明暗条件を表し、灰色は主観的暗期を表している。エラーバーは標準誤差を示す。

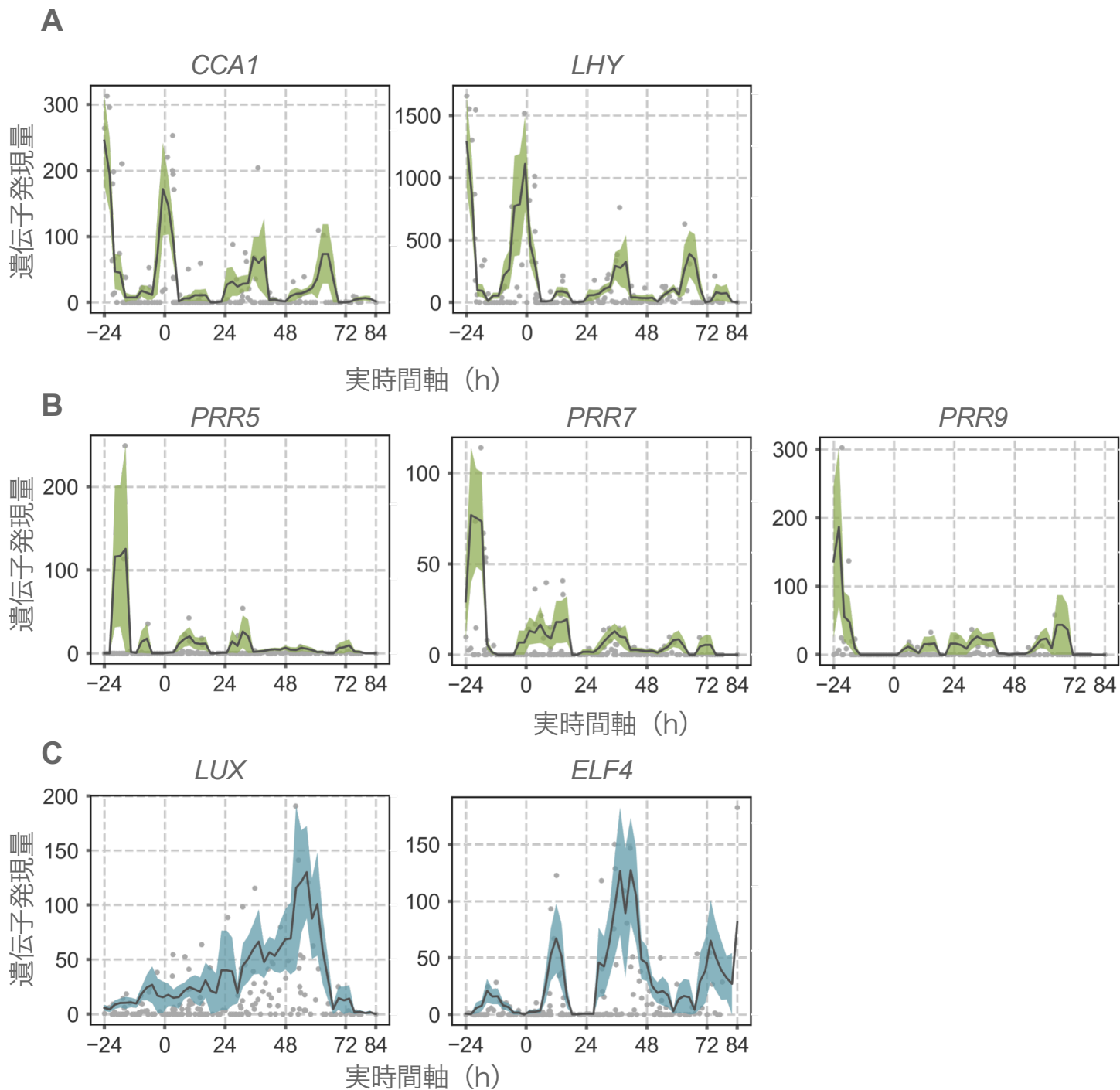


Figure 16
実時間軸上における各時計遺伝子の発現パターン

実時間軸上での時計遺伝子の発現パターンを示している。Aでは*CCA1*、*LHY*を、Bでは*PRR3*、*PRR5*、*PRR7*を、Cでは*LUX*と*ELF4*の発現を示している。各細胞の時計遺伝子の発現量が点で、各細胞の移動平均 (window=0.01) が実線で、移動標準誤差 (window=0.01) が有色の帯で示されている。

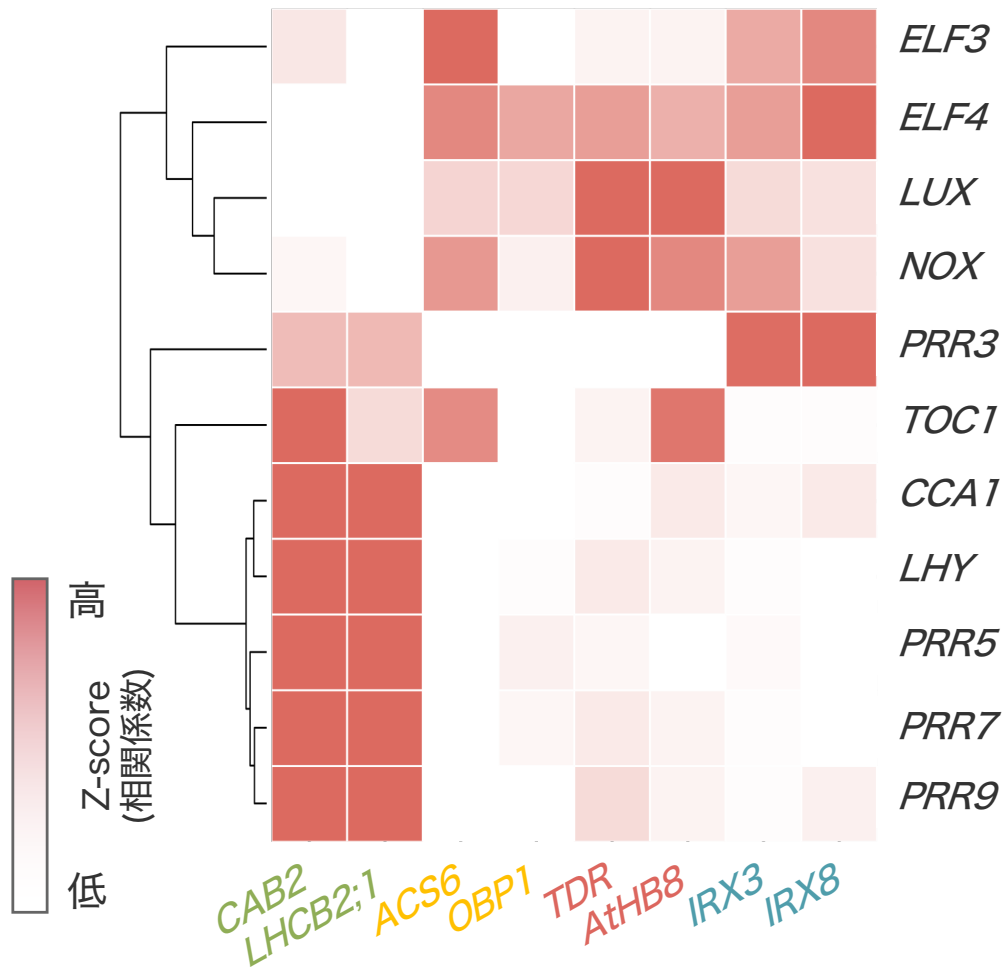
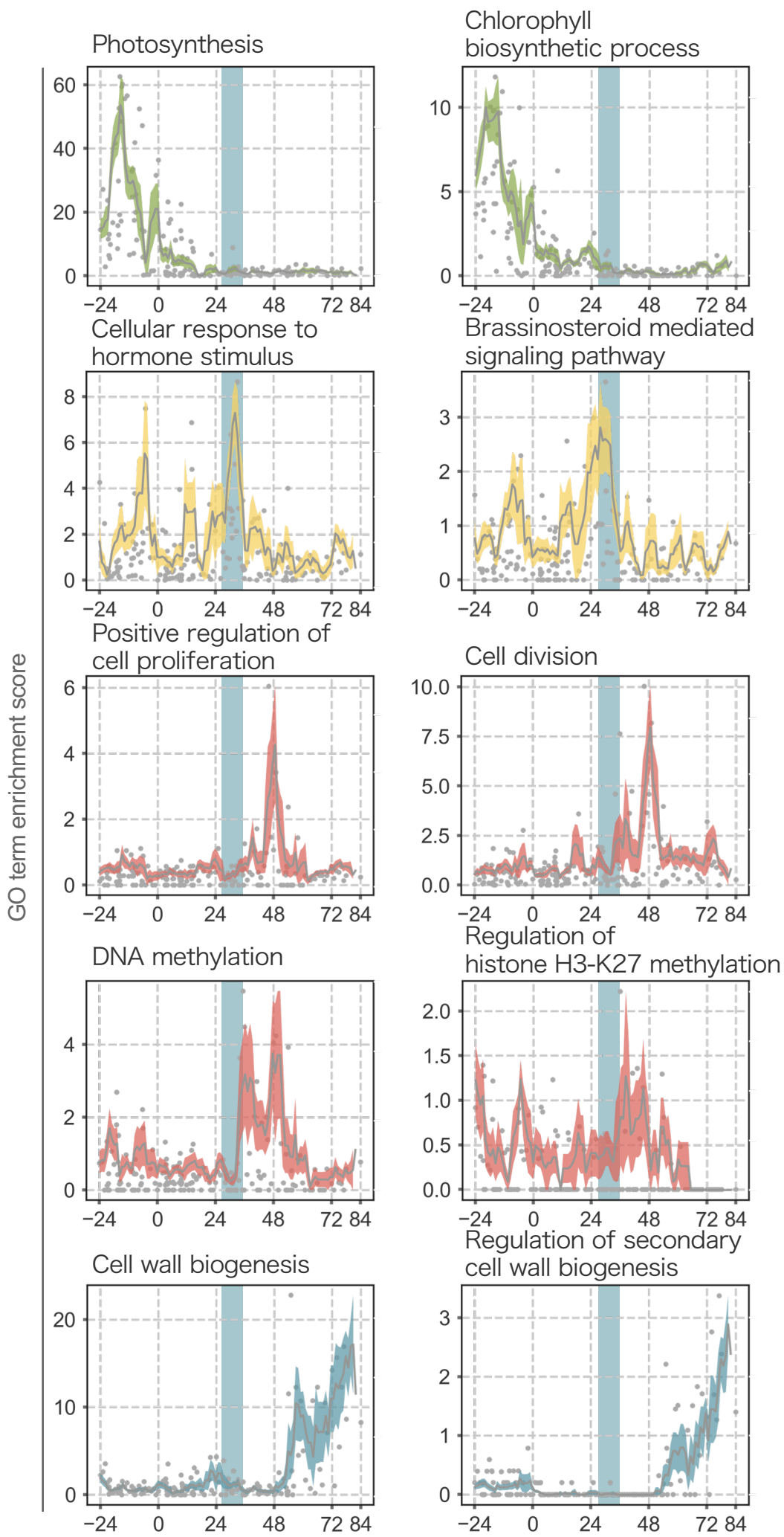


Figure 17

分化誘導過程における各時計遺伝子の発現量の変化

時計遺伝子と細胞種マーカー遺伝子の発現量パターンの相関係数を階層クラスタリングとヒートマップを用いて可視化した。遺伝子ごとに相関係数からZ-scoreを求めた。色の濃淡はZ-scoreを示している。



実時間軸 (h)

Figure 18

概日リズムの変調と細胞分裂・分化関連遺伝子の発現のタイミングの比較

実時刻上にける各GO termのパターンを示している。各細胞のGO term enrichment scoreが点で、各細胞の移動平均 (window=0.01) が実線で、移動標準誤差 (window=0.01) が有色の帯で示されている。背景の青い領域は*LUX*と*ELF4*の発現上昇のタイミングを表している。

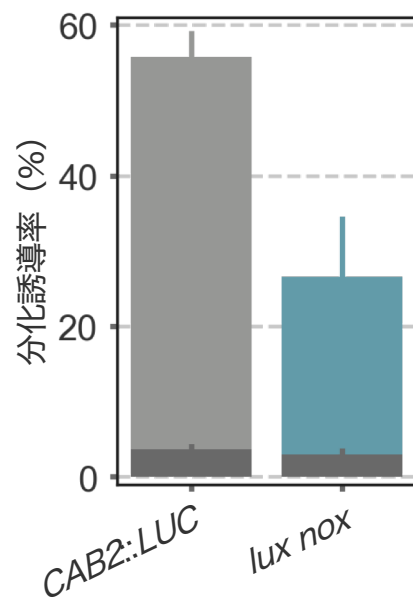


Figure 19

野生型と時計遺伝子変異体における分化誘導率の比較

*CAB2::LUC*と*lux nox*における分化誘導率を測定している。分化誘導率は葉面積において木部細胞が占める割合から算出した。図下部の暗い灰色は内在の維管束が占める割合を、上部は分化誘導によって生じた木部細胞の割合を示している。(n = 5)。エラーバーは標準誤差を示す。

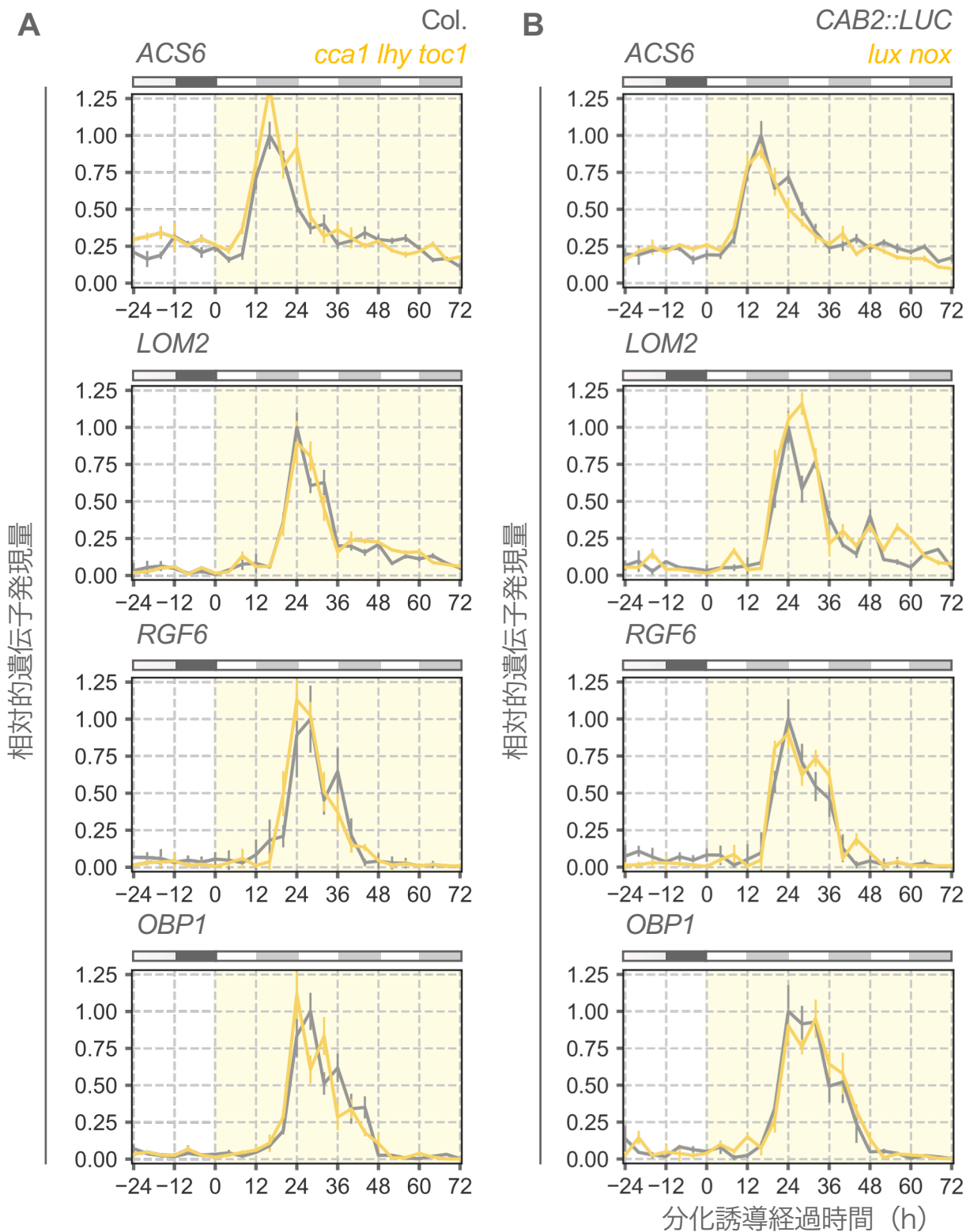


Figure 20

野生型と時計遺伝子変異体におけるメリステム幹細胞マーカー遺伝子の発現パターンの比較

分化誘導前1日と分化誘導後3日間におけるCol.と *cca1 lhy toc1* (A)、*CAB2::LUC*と *lux nox* (B)でのメリステム幹細胞マーカー遺伝子の発現量を示している。各マーカー遺伝子の発現量は野生型での発現ピークが1となるように正規化している。分化誘導が進行する時間帯は背景を薄い黄色で示している。また、図の上部には白と黒で12L12Dの明暗条件を表し、灰色は主観的暗期を表している。エラーバーは標準誤差を示す。

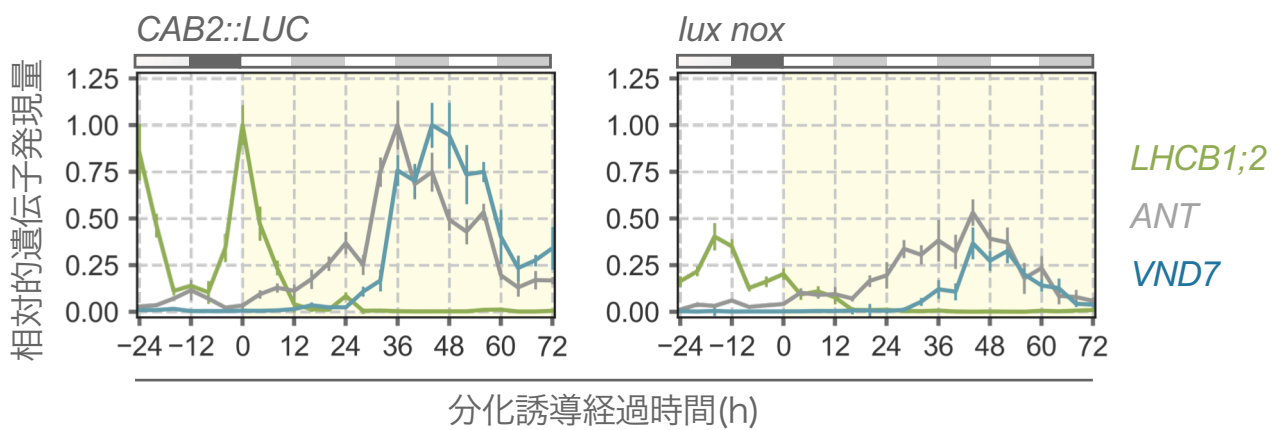


Figure 21

野生型と時計遺伝子変異体における細胞種マーカー遺伝子の発現パターンの比較

分化誘導前1日と分化誘導後3日間における *CAB2::LUC* と *lux nox* での細胞種マーカー遺伝子 (*LHCB1;2*は葉肉細胞、*ANT1*は維管束幹細胞、*VND7*は木部細胞) の発現量を示している。各マーカー遺伝子の発現量は野生型での発現ピークが1となるように正規化している。分化誘導が進行する時間帯は背景を薄い黄色で示している。また、図の上部には白と黒で12L12Dの明暗条件を表し、灰色は主観的暗期を表している。エラーバーは標準誤差を示す。

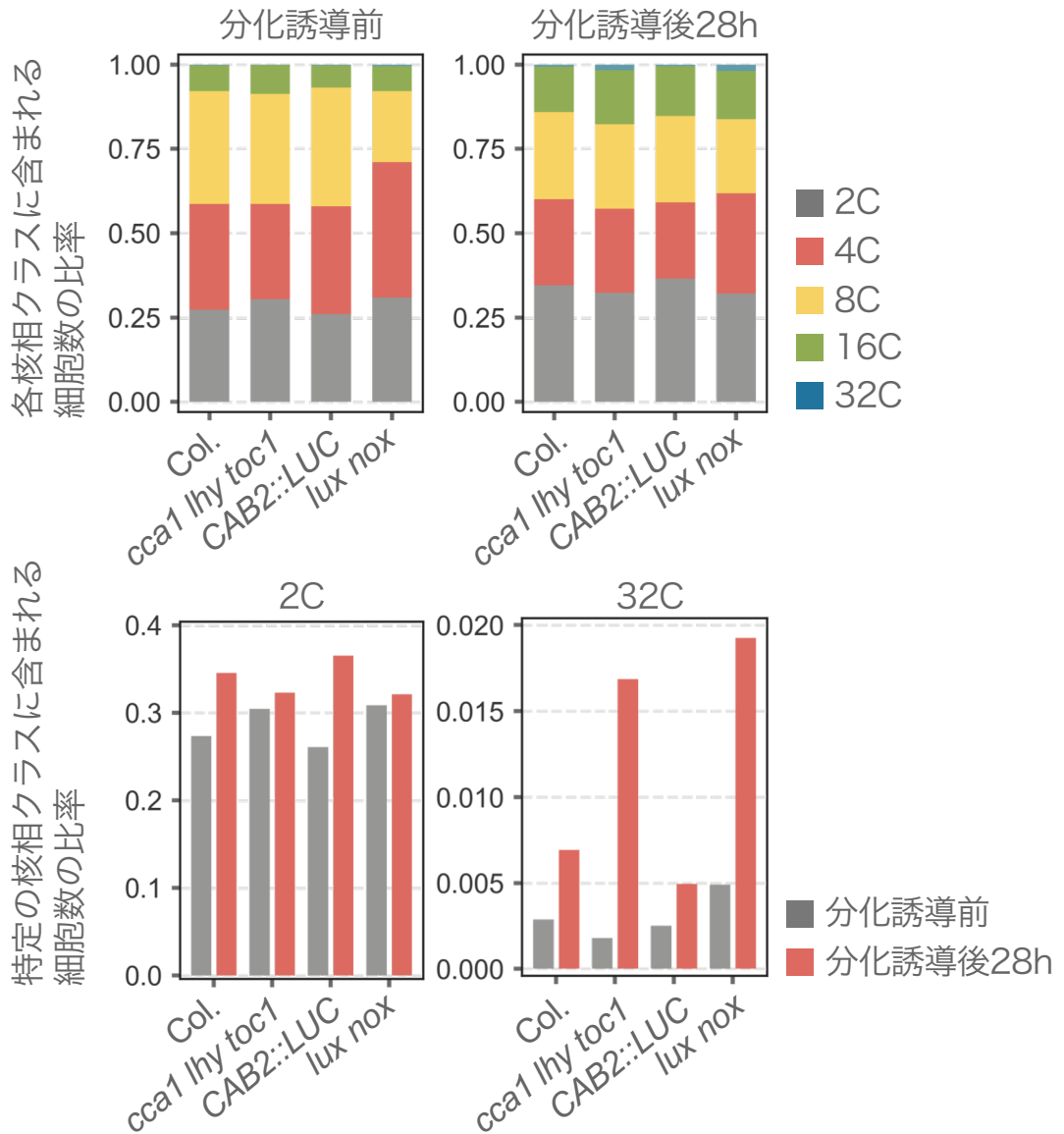


Figure 22

分化誘導前後における野生型と時計遺伝子変異体での核相パターンの比較

分化誘導直前と分化誘導後28時間のCol.と *cca1 lhy toc1*、*CAB2::LUC*と *lux nox*の子葉を用いた核相解析 (n = 10)。上図では分化誘導前後における野生型と時計遺伝子変異体の各核相クラスに含まれた細胞の割合を示している。下図では分化誘導前後での2Cと32Cの細胞数の変化を示している。

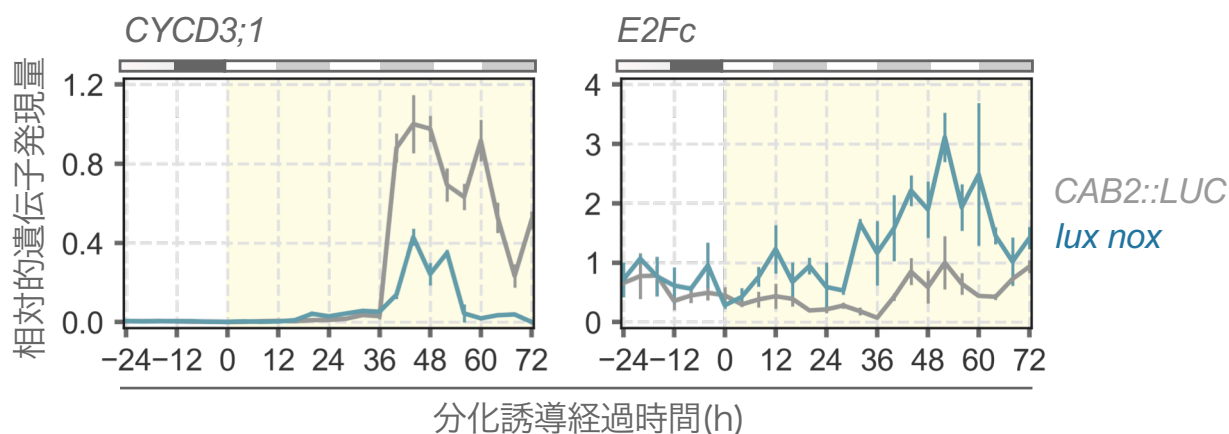


Figure 23

野生型と時計遺伝子変異体における細胞分裂・分化関連遺伝子の発現パターンの比較

分化誘導前1日と分化誘導後3日間における *CAB2::LUC* と *lux nox* での細胞分裂関連遺伝子 (*CYCD3;1* は左、*E2Fc* は右) の発現量を示している。各マーカー遺伝子の発現量は野生型での発現ピークが1となるように正規化している。分化誘導が進行する時間帯は背景を薄い黄色で示している。また、図の上部には白と黒で12L12Dの明暗条件を表し、灰色は主観的暗期を表している。エラーバーは標準誤差を示す。

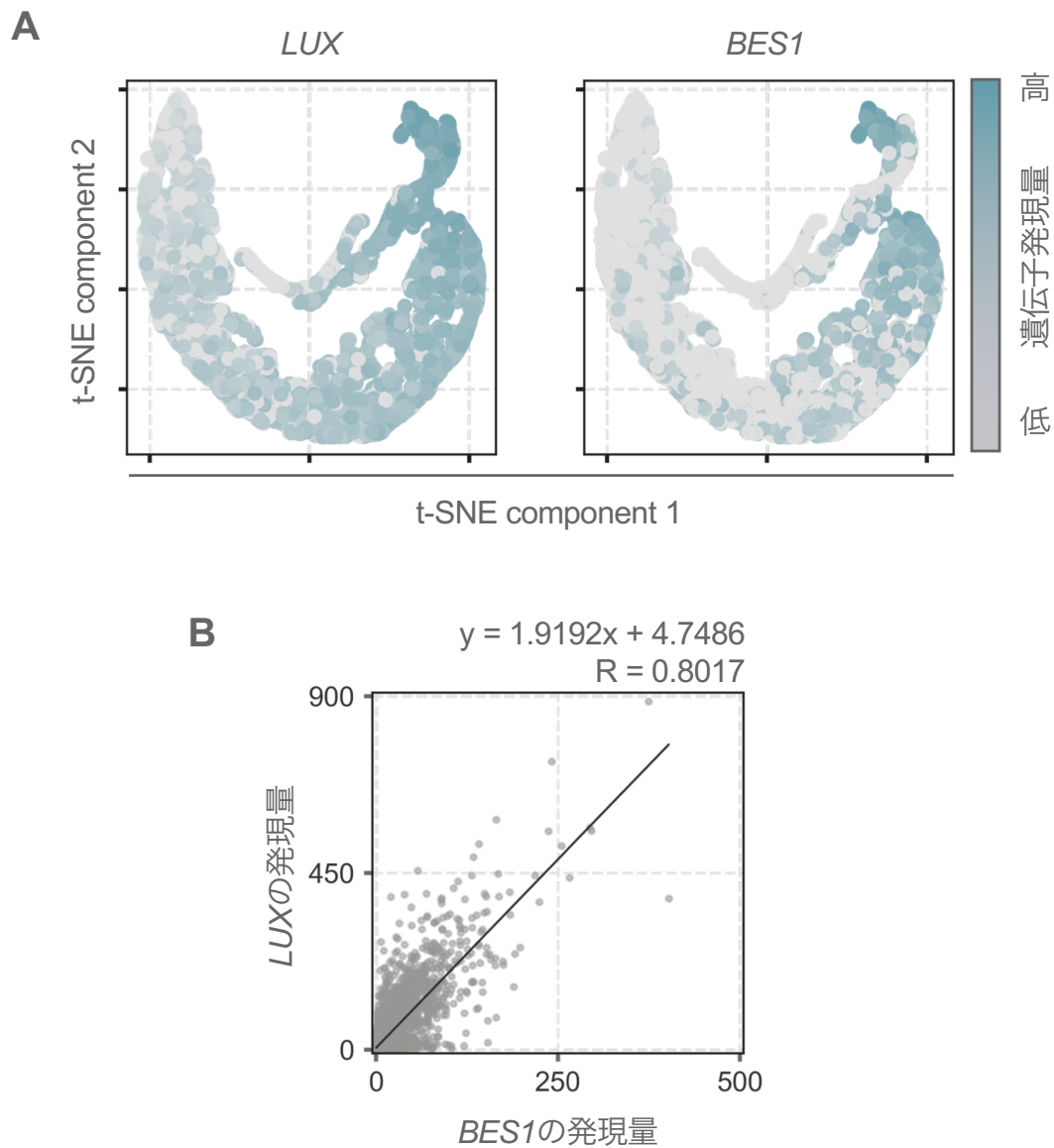


Figure 24

根端由来のscRNA-seqデータにおける*BES1*と*LUX*の発現パターンの相関

A) Ryu et al. 2019の論文データをt-SNE平面上に投影し、色の濃淡で*LUX*と*BES1*の発現量を示した。B) *BES1*と*LUX*の発現量の相関を示している。図の右上には単回帰による近似式と*BES1*と*LUX*の発現量の相関係数を記している。

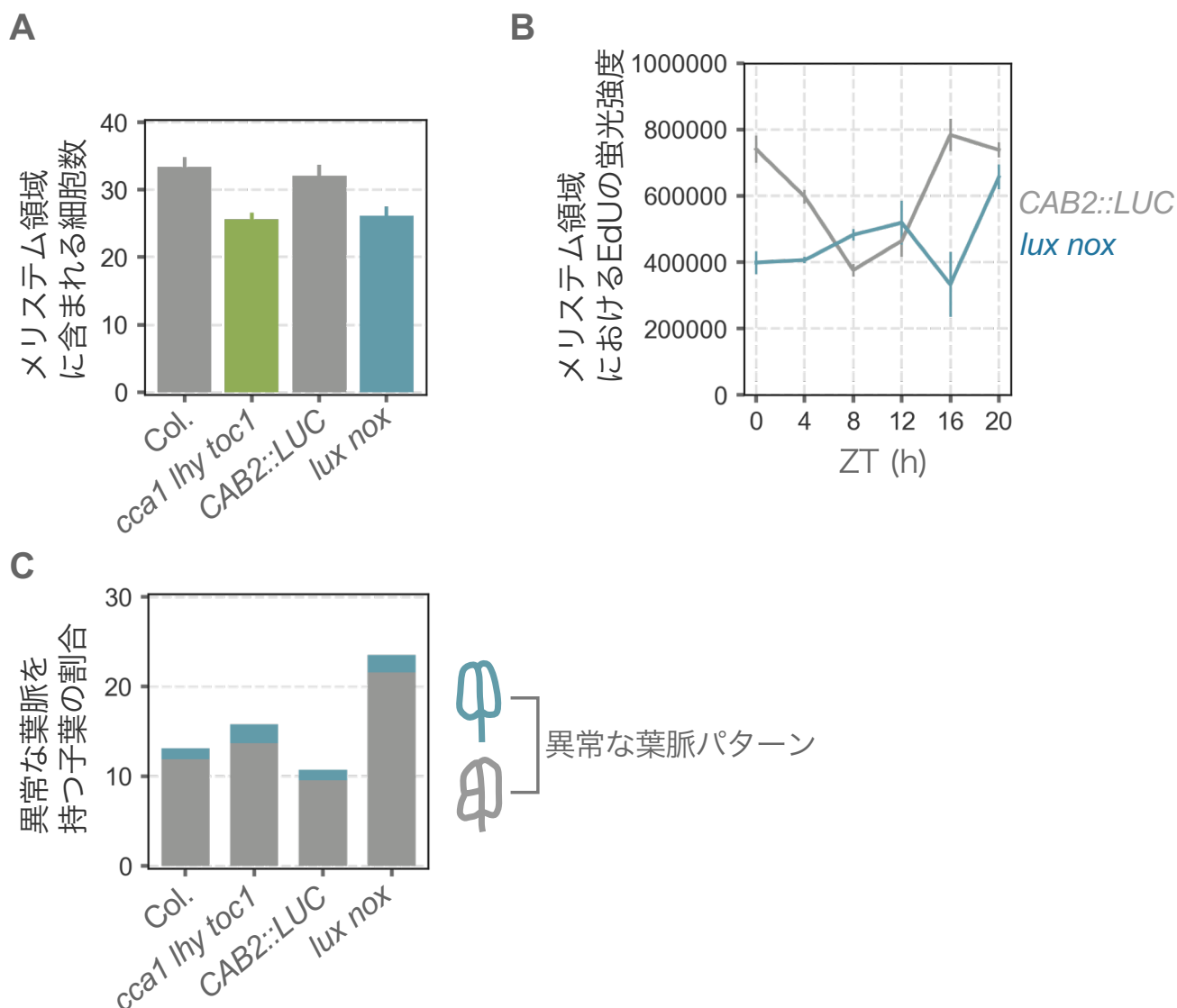


Figure 25
非分化誘導系における時計遺伝子変異体の表現系解析

A) メリステム領域に含まれる細胞数を野生型と時計変異体で比較している。n = 20。エラーバーは標準誤差。B) メリステムゾーンにおけるEdUの蛍光強度を野生型と時計変異体で比較している。n = 10。エラーバーは標準誤差。C) 葉脈パターンが異常な子葉の割合を野生型と時計変異体で比較している。カイニ乗検定により *CAB2::LUC* と *lux nox* の間には有意差が示されている (p-value < 0.01)。n = 100。

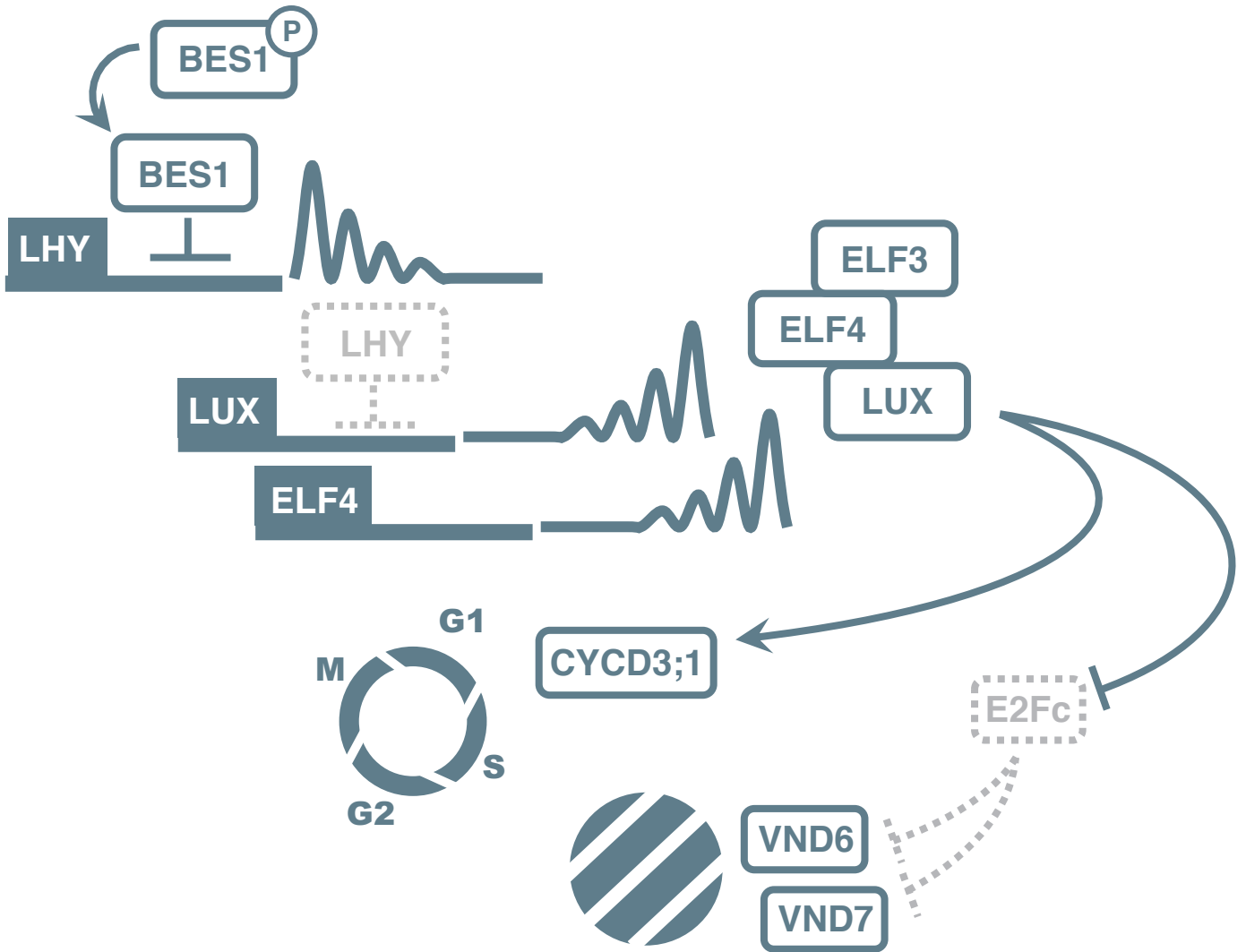


Figure 26

概日時計の変調による細胞運命制御機構

本研究で示された概日時計の変調による細胞運命の制御機構を示している。植物ではBES1の入力によりLHYとCCA1の発現が低下し、Evening complexを形成するELF4とLUXの発現が上昇する。そして発現が上昇したLUXはCYCD3;1やE2Fcを介して細胞分化・分裂を制御する。

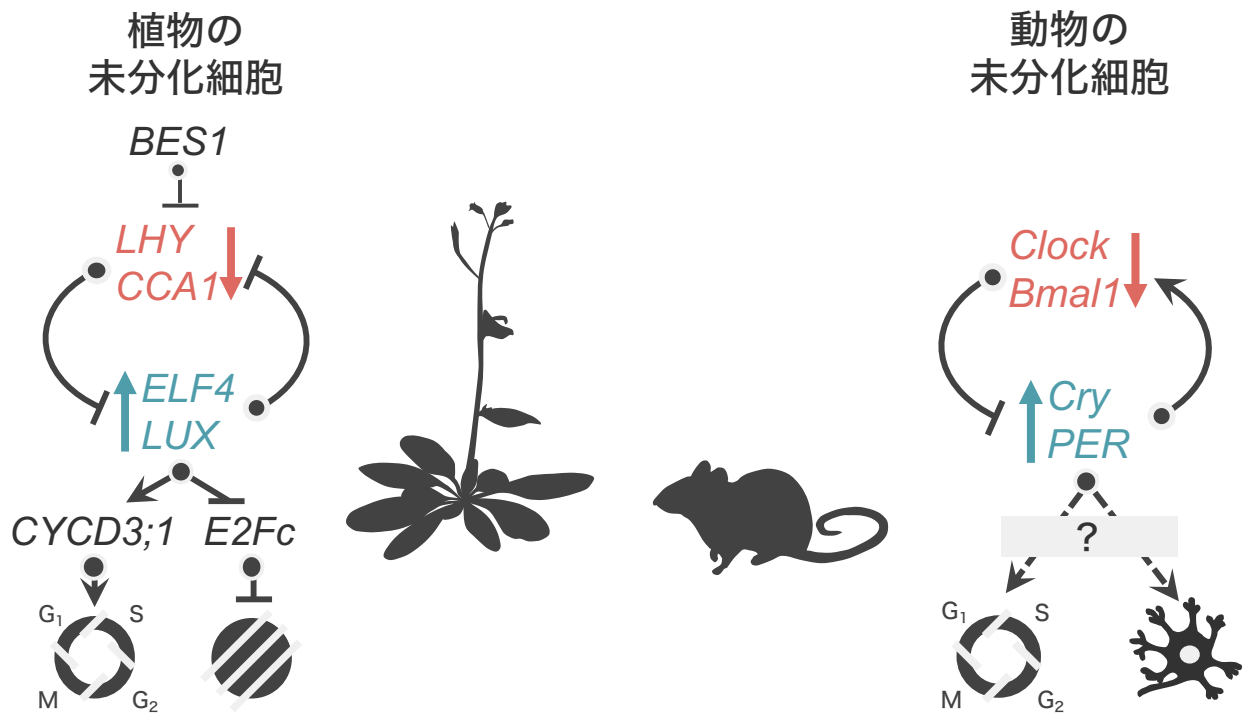


Figure 27

概日時計の変調による細胞運命制御の普遍性

本研究で示された概日時計の変調による細胞運命の制御機構は動物にも存在することが示唆されている。未分化細胞では特徴的な時計遺伝子の発現プロファイルが存在し、細胞分化・分裂の制御に重要であることが明らかになっている。また、ClockやCryの変異体では、未分化細胞が未分化性を維持できず分化してしまうことや分裂活性が低下することが知られている。このことは動物の未分化細胞においても特徴的な時計遺伝子の発現プロファイルが細胞運命の制御を行っていることを示唆していた。

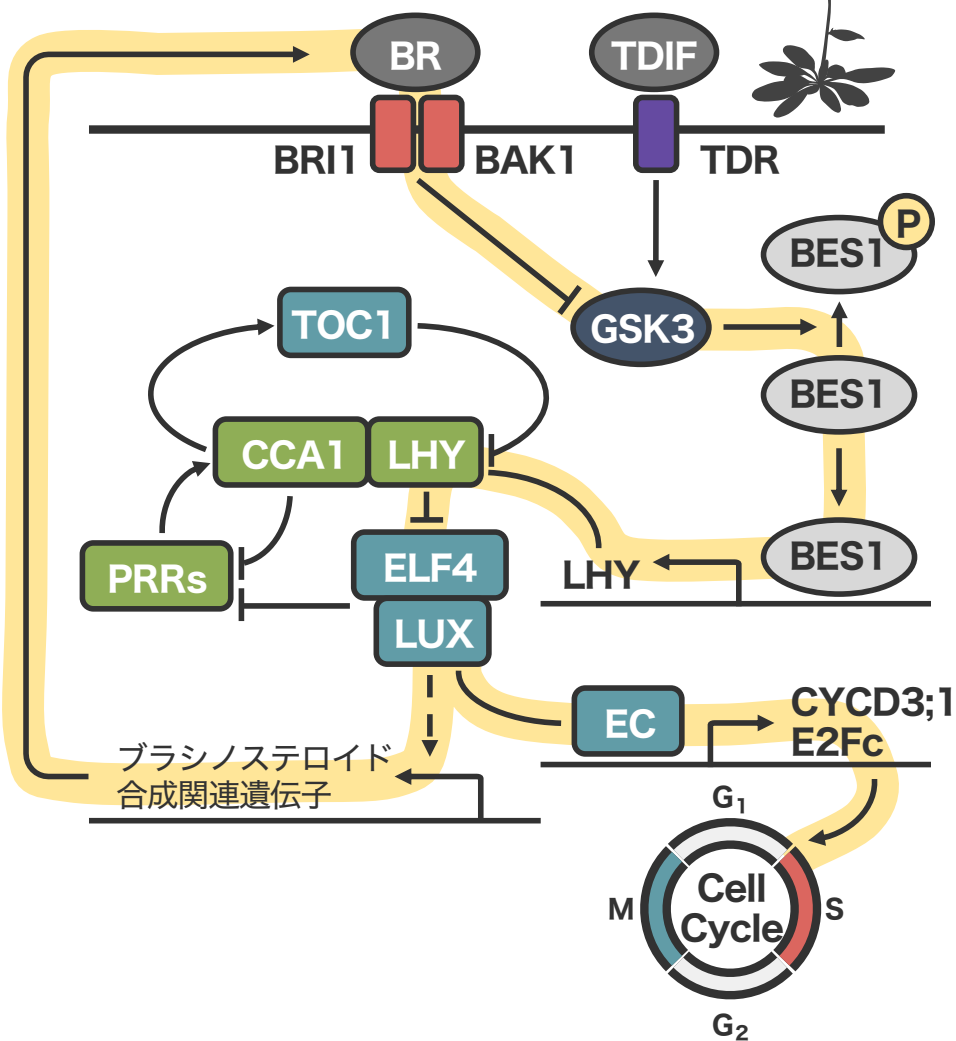
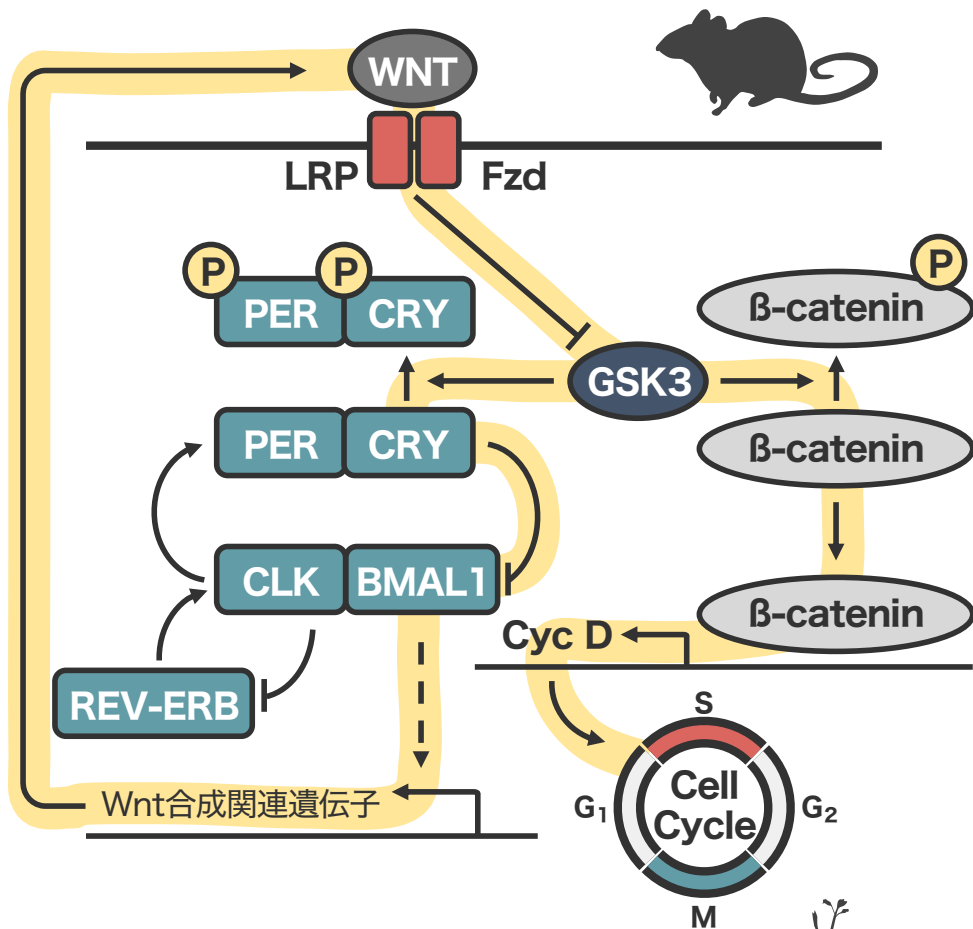


Figure 28
概日時計と介して細胞運命制を行う分子メカニズムの収斂進化

植物細胞の運命を制御するブラシノステロイドシグナル経路と動物細胞の運命を制御するWNTシグナル経路は互いに概日時計の入力を行っており、ブラシのステロイドとWNTの分泌や合成は概日時計による制御を受けている。このような概日時計と2つのシグナル経路の関わりが動植物で見られることは、分子メカニズムが収斂進化を果たした結果とも考えられる。