

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	金坂 侑紀
論文題目	概日時計の一細胞レベルでの観測と日長依存的な相転換における役割に関する研究		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>地球の自転に伴い、生物を取り巻く環境は 24 時間周期で変化する。地球上の多くの生物は、その変化を予測し適応するための仕組みとして概日時計を獲得した。多細胞生物では体内のほぼ全ての細胞が概日時計を有しており、複数の時計遺伝子の転写・翻訳のフィードバックループによって約 24 時間周期のリズムを生じ、遺伝子発現制御を介して様々な生理応答を適切なタイミングで誘導する。本研究では、細胞レベルでの概日時計機能の解析方法と個体レベルでの生理応答の一つである日長認識に着目した。</p> <p>第 1 章では、1 細胞レベルでの概日リズム測定系に CRISPR/Cas9 システムを導入する際の標的遺伝子の破壊効率を調べた。概日時計の研究においては、発光レポーターを導入した形質転換体を用いた概日リズム測定法が広く用いられている。パーティクルボンバードメント法により発光レポーターを植物体に一過的に導入することで、形質転換なしに簡便に概日リズムを測定することのできる系が開発されている。さらに、発光レポーターとともに CRISPR/Cas9 システムを誘導するエフェクターを導入することで、破壊の標的とする遺伝子が概日リズムに与える影響を調べる試みが行われているが、どの程度の効率で遺伝子破壊が起こるのかは不明であった。そこで本研究ではモデル植物のシロイヌナズナを用いて、概日リズムの維持に必須な時計遺伝子 <i>ELF3</i> を遺伝子破壊の標的として、細胞毎に概日リズムの消失の有無を調べることで遺伝子破壊の効率を定量的に評価した。その結果、用いた複数のガイド RNA の間で効率に差はあったが、いずれにおいても一定の遺伝子破壊効果がみられ、エフェクターが有効に機能することが示された。本システムを用いることで、簡便かつ迅速に時計遺伝子を主とする目的遺伝子の機能解析が可能となると考えられる。</p> <p>第 2 章では、ゼニゴケの日長認識における概日時計の役割について検討した。植物は日長を測ることで季節を認識し、繁殖に適した季節に栄養成長相から生殖成長相への相転換 (被子植物では花成) を行う。被子植物では概日時計が中心的な役割を果たし日長を測定する。具体的には、概日時計が遺伝子発現制御を介して 1 日の中の時刻を設定し、特定の時刻における光の照射の有無により日長を判別するというものである。被子植物の間では、この概日時計と光の相互作用による日長認識機構が広く保存されていることが示されているが、被子植物以外の植物種を対象とした解析はほとんど行われておらず、日長認識機構がどのように成立し進化していったのかは未だ不明である。そこで本研究では基部陸上植物である長日植物の苔類ゼニゴケを用いて、相転換 (生殖枝形成) における日長認識機構の解明を目指し、概日時計の役割に着目して解析を行った。まず始めに、野生型植物 (Tak-1) の限界日長は 10 時間付近に存在すること、相転換の誘導には長日条件を連続して 8 日間以上与える必要があることを示した。次に、主要な時計遺伝子である <i>MpTOC1</i> と <i>MpPRR</i> の変異体、および概日リズムの周期を延長させる化合物を用いて、概日リズムの異常が日長認識に与える影響を調べた。その結果、いずれも顕著な影響を及ぼさなかった。続いて、非 24 時間の明暗サイクルの様々な日長条件を用いて概日リズムを攪乱させ、日長認識に与える影響を調べた。すると、一貫して概日リズムの攪乱は日長認識に影響を及ぼさなかったが、1 サイクル中に明期の占める割合が高いほど相転換のタイミングが早くなり、低いほど遅くなる傾向がみられた。これらの知見は、被子植物の概日時計を中心とした日長認識機構とは異なり、ゼニゴケが 1 サイクル中の明期と暗期の比率を基にした新規の日長認識機構をもつことを示唆する。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

24時間周期で変化する環境に対する適応のために、多細胞生物では、体内のほぼ全ての細胞が複数の時計遺伝子の転写・翻訳のフィードバックループによって約24時間周期のリズムを生じ、適切なタイミングでさまざまな反応をおこなう。個体レベルでは、それらにより適応的な生理応答が実現される。申請者は、細胞レベルでの概日時計機能の解析方法と個体レベルでの生理応答の一つである日長認識に着目して研究をおこなった。

植物では、1細胞レベルの概日時計機能の研究において、パーティクル・ボンバードメント法による概日リズムの発光レポーター遺伝子を細胞で一過的に発現させる系が広く用いられている。この系では、CRISPR/Cas9システムを誘導するエフェクター・コンストラクトを同時に導入することで、時計遺伝子の遺伝子破壊が概日リズムに与える影響を調べる試みがなされている。申請者は、シロイヌナズナを用いて、そうした系においてどの程度の効率で遺伝子破壊が起こるかを明らかにする研究をおこなった。概日リズムの維持に必須である *ELF3* 遺伝子を遺伝子破壊の標的として、細胞ごとに概日リズムの消失の有無を調べることで、遺伝子破壊の効率を定量的に評価した。その結果、用いた複数のガイドRNAの間で効率に差はあるものの、いずれにおいても一定の遺伝子破壊効果がみられ、この系を用いることで、簡便かつ迅速に時計遺伝子の機能解析が可能であることが示された。

概日時計に関わる個体レベルの適応的な生理応答として、被子植物の栄養成長相から生殖成長相への相転換(花成)における日長認識が、シロイヌナズナを中心によく研究されている。シロイヌナズナでは、日長認識には概日時計が遺伝子発現制御を介して一日の中の時刻を設定するという必須の役割を持ち、特定の時刻における光の照射の有無により日長を判別する。被子植物では、この概日時計と光の相互作用による日長認識機構が広く保存されていると考えられる。しかし、被子植物以外の植物でも同様の機構が働いているかについては不明である。そこで、申請者は、ゼニゴケの栄養成長相から生殖成長相への相転換(生殖枝分化)における日長認識において概日時計が果たす役割について研究をおこなった。まず、野生型植物(Tak-1株)の限界日長が10時間付近に存在すること、成長相転換の誘導には長日条件を連続して8日間以上与える必要があることを示した。次いで、主要な時計遺伝子であるMp *TOC1*とMp *PRR*の機能欠損変異体、概日リズムの周期を延伸させる化合物、様々な非24時間の明暗サイクルの日長条件のそれぞれを用いた実験によって、遺伝学的、薬理的、生理学的な概日リズムの攪乱が、いずれも日長認識に顕著な影響を及ぼさないことを見出した。これらの知見は、ゼニゴケが概日時計が中心的な役割を持つ被子植物の機構とは異なる日長認識機構を持つことを示唆する。その機構の解明は今後の重要な課題である。

以上のように、本論文では、生命科学に関する高度で幅広い学識、植物科学分野における優れた研究能力、生命科学の理解・発展に寄与する新しい概念等が示されており、論理的かつ一貫性のある記述がなされている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和6年2月5日に論文内容とそれに関連した口頭試問をおこなった結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日