

植物における概日時計の組織特異的な役割

遠藤 求[✉]

京都大学 大学院生命科学研究所 分子代謝制御学分野

はじめに

私は光受容体の研究から研究生生活をスタートし、そこからシグナル伝達の流れに沿って、概日時計の研究を始めました。見様見真似で研究を行ってきたにも関わらず温かく日本時間生物学会に迎え入れていただき、また、この度は名誉ある奨励賞をいただき大変光栄に思います。これからは襟を正して自分の目標に向かって努力するだけでなく、時間生物学の研究分野の発展に貢献できるよう精進してまいりますので、今後ともよろしく願い申し上げます。また、選考にあたり多くの方々にお時間を割いていただき、大変感謝しております。ありがとうございました。

1. 植物との出会い

私はもともと研究者志望であったが、それまでは、「せっかく研究を行うのであれば世界が抱える問題を解決したい」と漠然と考えていただけであった。植物を研究対象にしようと決めたのは高校生の頃で、ちょうどその頃に「原油はあと20年で底を尽く」と盛んに言われ始めたように思う。こうしたことから、私は「植物の光合成の仕組みを人工的に再現できればエネルギー問題を解決できるに違いない」と考え、緑色をした自動車や人間を妄想し、将来は植物研究をしようと決めた。その当時、植物のゲノムはまだ解読されていなかったが、遺伝子工学の言葉はすでにあり、植物を使えばいかにも何でもできそうな予感があったのを記憶している。

無事に大学へ入学、いざ研究室を選択する段になって私は重大なミスに気づいた。入学した大学の理学部には、光合成の研究室が存在しなかったのである。それならそうと農学部や工学部に行くなり他の大学に行くなりして、光合成を研究しているところを探せば良かったのだが、当時はそこまで頭が回

らず、しょうがなく植物系の研究室をひとつずつ訪ねて回った。その中で、私の興味と比較的近かった長谷あきら先生の研究室に行くことに決めた。長谷先生は植物の光受容体の研究で有名であり、研究室では光を情報源として用いる光受容体・光応答の研究を行っており、光をエネルギー源として用いる光合成の研究は行っていなかった。

こうして、人工光合成の野望は研究室選びの段階で早くもつまづいたのだが、振り返ってみればこの時の選択があったおかげで、今も何とかやれていることを考えると、あながち悪くない選択であった。ともかくも私の研究生生活はこのように予想とは異なる形でスタートした。

2. 組織特異生との出会い

「植物はどこで情報としての光を認識しているか」と問われればほとんどの人は葉だと答えるだろう。実際、葉をアルミホイルで覆ったり、光ファイバーを使ったりした古典的な部分照射実験から、どうやら植物は葉で環境情報としての光を認識しているらしいということは知られていた[1]。しかし、分子生物学的な実験からは、植物の光受容体は植物個体のほぼ全ての器官・組織で発現しているという結果が得られ始めており、両者の間には矛盾があるように思われた。そこで私たちは、赤色光受容体 phyB が実際に植物体のどこで機能しているのかを明らかにする目的で、エンハンサートラップ法を用いて *phyB* 変異体背景で、特定の器官・組織でだけ *phyB*-GFP を発現させた形質転換植物を400系統以上作出した。花芽形成（花成）の速度や胚軸（植物の芽生えの茎の部分）の長さを測ることで、どこで *phyB* を発現させれば表現型が相補されるかをひとつずつ調べることにした。すでに前任者からの蓄積があったとはいえ、一つずつ GFP の発現パターンと

✉moendo@lif.kyoto-u.ac.jp

表現型を調べる作業は大変であった。当時は、研究とはこんなに大変なものかという感想であったが、今から思い返しても二度とやりたくないほどである。こうした努力が報われたのか、phyBは葉の中でも光合成のための組織である葉肉で花成を制御していることを明らかにすることができた[2]。この結果は、phyBの機能が必要とされる場所は発現場所のほんの一部でしかなく、遺伝子の発現場所の解析だけでは実際に機能する組織は予測できないことを意味していた。

赤色光受容体phyBは、植物が他の植物の日陰になったことを感知して緊急避難的に花を咲かせる時に利用される光受容体である一方で、青色光受容体cry2は日長を測定することで、やがて来る適切な季節を予期しそれに向けて花を咲かせる時に利用される光受容体である。cry2についても同様の戦略で、cry2変異体背景にcry2-GFPを組織特異的プロモーター下で発現させた系統を多数作出し、花成時期を調べた。驚くべきことに、phyBが葉肉で機能し花成を制御していた一方で、cry2は維管束でのみ機能して花成を制御していることが明らかとなった[3]。こうした結果は、光受容体の機能には組織特性があるばかりでなく、植物は光受容体の種類ごとに、さらに言うと、環境刺激の種類ごとに応答する組織を使い分けていることを意味するものであった。

3. 時間生物学との出会い

こうして光受容体に組織特異性があることを明らかにし、無事に学位を取得できたものの、植物がどのような仕組みで組織ごとの生理応答を制御しているのかについては依然とわからないままであった。そこで私は、光受容体からのシグナル伝達経路の下流に位置する概日時計に着目し、概日時計にもまた同様の仕組みがあるのではないかと考えた。今もそうだが、当時、国内で高等植物の概日時計を研究しているところは数えるほどしかなかったため、せっかくの機会でもあることから海外でポストドクをやることにした。植物の時間生物学の研究が盛んなヨーロッパかアメリカの二択で迷ったが、結局はアメリカ・カリフォルニア州立大学サンディエゴ校(UCSD)のSteve Kay先生のところに行くことを決めた。Steve Kay先生も植物の光受容体を研究していたこと、長谷あきら先生とも旧知であったこと、サンディエゴの陽気さは落ち込んだ時に助けになるだろうという判断からであった。

予想通り、サンディエゴの雰囲気は明るいものであった。太陽は眩しく、空と海はどこまでも青く広がっており、京都盆地の底で長いこと過ごしていた私にとっては新鮮な感覚であった。しかし、残念なことに私は車を持たなかったため、実際には実験と寝る以外にすることがなく、ほぼ家と大学を往復するだけの生活であった。もう少し遊びに行っておいた方が良かったと思うこともあるが、あの時ほど研究が出来た時間も無いので、トータルとしてはとても贅沢な時間を過ごすことができた満足している。

研究テーマは、光受容体が組織特異的に機能する理由を明らかにする目的で、概日時計機能の組織特異性を研究することにした。概日時計もまた、植物ではほぼ全ての器官/組織で発現しており、これまでの研究は植物個体丸ごとを使ったものがほとんどであった。私は、葉から葉肉と維管束を単離して遺伝子発現の時系列解析を行い、それぞれの組織間で時計遺伝子の概日リズムがどう異なるかを解析することにした。Kay labにあった組織単離に用いるための超音波処理装置が予想以上にボロかったことや、まだ単離方法が完全には確立していなかったことなどもあり、この時は1回の操作に1時間以上かかっていた。そのため、サンプルの損傷は激しく、いくら解析しても、おもしろい結果が出ていないような…という結果が安定しない苦しい時間を過ごしていた。

そんな時に、かつての共同研究者であった荒木崇先生から声を掛けて頂き、助教として京大に帰るチャンスが巡ってきた。アメリカでポストドクを始めて11ヶ月目であった。当然、研究は中途半端であったので、もう少しこの研究を続けていたい気持ちもあったが、ちょうどその時アメリカはリーマンショックの余波で揺れに揺れており、誰に相談しても「職が見つかったんなら早く帰った方が良い」と言われ、引き止めてくれる人は誰もいなかった。形だけでも、もう少し引き止めてくれても良かったのになとは今でも思う。

帰国後も自分のテーマとして概日時計の組織特異性の研究はあったものの、アメリカでの経験から一緒にやってくれる人がいない限り組織単離のスピードアップは難しそうだという感触を得ており、今はその時では無いと感じていた。そこで、組織単離は一旦やめ、大学院生時代の仕事の続きである光受容体のシグナル伝達因子の研究や、荒木先生のテーマである植物の花芽形成ホルモン(フロリゲン)の輸

送メカニズムに関する仕事を進める傍らで、組織単離とは別アプローチによる検証のための形質転換体(約30種類)を1人で細々と作出していた。

4. さきがけとの出会い

そんなこんなで帰国して最初の数年は、時間生物学とはほとんど縁の無い状態が続いた。また、概日時計の研究を始めようとしても、「良い論文がでない」→「研究費取れない」→「やりたいことが出来ない」の悪循環に陥っており、なかなかきっかけがつかめなかった。ちょうどその時、上田泰己先生を総括とするJSTさきがけ「細胞構成」の第一期生の募集を見つけ、これならばやりたいことがやれるのではと思い応募したのがターニングポイントであった。幸いにも採択され、他のメンバーを見てみると、皆優秀で分野もバラバラであり何もかもが新しく知らないことだらけだったので非常に刺激的であった。特に、同年代の異分野研究者との交流を通じて幅広い視点を身につけることができた点は私にとって非常に有用であり、現在でも役立っている。さらに、この時期に小山時隆先生に時間生物学会に誘っていただき、この頃から概日時計研究を再開する素地が整ってきた。

自由になる研究費ができたのでさっそくテクニシャンを雇用し、一緒に組織単離を行うと、1人でやっていた時より4倍ほど早くなった上に、収量・品質ともに向上し、結果が安定するようになった。それからは早かった。組織別の時系列マイクロアレイの解析から、植物の概日時計にも組織特異的な機能分担が存在すること、維管束の概日時計が葉肉の概日リズムを制御しうること、維管束の概日時計が光周性花成の制御に重要であり他の組織の概日時計は花成制御にはほとんど関与していないことなどを明らかにすることができた[4]。さらに、この考え方を細胞伸長制御にも適用したところ、今度は維管束の概日時計ではなく、表皮の概日時計が重要であるという結果を得ることができ、さらに、表皮の概日時計は常温シグナルを入力としていることを示すことができた[5]。こうした一連の結果はもちろん幸運であったことも大きいのだが、人・研究費・環境がうまく噛み合うとすごい爆発力になるのだということを思い知らされた。そして、さきがけは、研究費と環境を提供するという意味では若手にとってかなり良いグラントであり、これに採択されたことはとても幸運であった。また生物種や解析手法で括られた学会では見られない多様性が時間生物学会に

はあり、このことも研究の幅を広げる意味で大きかった。

6. これからの出会いを求めて

これまでの研究を通じて明らかになったのは、植物の場合、環境刺激の種類ごとに特徴的な光受容体や概日時計システムが、それぞれの組織で使い分けられているということである。すなわち、概日時計の機能を明らかにするためには、解析対象の細胞・組織を限定する必要がある、それらをごちゃ混ぜにした解析からは結局何もわからないという単純なことであった。そこで私は、より高い時空間分解能で植物における概日時計の機能を理解・制御するために、解析の空間解像度を極限にまで高め、生体内の1細胞を対象に時系列トランスクリプトーム解析を行っている。現在の1細胞解析の主流は培養細胞など単離した細胞を用いたものであるが、多細胞生物は単なる細胞・組織の集合体ではなく、そこには細胞間や組織間の相互作用が存在する。それらを考慮すると1細胞解析は生体内のコンテキストで行うべきであるが、植物においては、そもそも1細胞解析はわずか2例しか報告されておらず[6,7]、それらは全て単離した細胞で行われたものである。すなわち、植物においてはまだ誰も正しい遺伝子発現プロファイルを1細胞レベルで検出できていない可能性が高い。私たちは、植物細胞が大きいことや植物の体制が比較的単純であることを利用して生体内の1細胞の内容物を直接回収することで時系列解析を可能にし、現在、植物の分化・脱分化過程に着目して概日リズムの解析を行っている。動物では八木田先生を始めとして概日時計と細胞運命決定の間の深い関係が明らかにされつつあるが[8,9]、植物にも同様の仕組みが存在しそうであることが見え始めている。分化全能性を普通に発揮できる植物とそうではない動物の比較を概日時計という共通の切り口から行うことで、生物種を超えた分化全能性の基盤原理を理解したいと考えている。そして、こうした展開は再分化された学問分野を再び統合し、幅広い分野の研究者との出会い・議論を活性化させることにつながると期待している。

また、組織特異的な概日時計の機能を利用して、特定の組織の概日時計機能を標的とした形質制御の研究も始めている。植物の概日時計は光周性花成や成長など農業上有用な形質制御に関わっているが、あまりに多くの生理応答に関わることから、これまで概日時計は制御標的として有望だとは考えられて

こなかった。しかし、私たちの研究は、これらの生理応答が組織ごとに切り分けられることを示しており、特定の組織の概日時計を標的とすることで効率的な生長制御の達成を目指している。こちらについても、化学や農学系といったこれまでにつながりの無かった研究者たちと進めており、新たな出会いが生まれている。

おわりに

概日時計は多様な生命現象に関わっており、ここに軸足を置くことで多くの新しい出会いが生まれ、新しい研究へとつながった。今後もこうした方向性の研究を極めることで植物科学そして時間生物学の広がりをもたらすことは、私のこれからの目標の一つである。それに加えて、応用志向の研究を行うことが私のもう一つの目標である。光合成研究をやりたいという思いは形を変え、光受容体、概日時計、1細胞解析など様々な研究へと発展した。その時々でやっていることが変わっているように見られることがあり、「結局何がしたいのか」という御指摘をいただくことも多いが、冒頭に述べたように、私の研究の目的は「植物で世界を救う」ことであり、それを達成するために「植物の応答を高い時間分解能で計測・制御する」という研究スタンスは変わっていないと自分では思っている。「一朝一夕で世界はかわらない」、「1人では世界を変えられない」等の指摘はそのとおりだと思う。しかし、それでも私は世界が自分の力で少しでも世界が良くなった（ている）という実感が欲しい。概日時計は花成や温度応答など農業上重要な生理応答を包括的かつワンストップで制御するための良い仕組みであり、これを標的とすることは、高校生の頃の私が解決を目指したエネルギー問題だけでなく、食糧問題や温暖化問題など地球規模の諸問題に取り組むための力となり得ると考えている。また、細胞運命決定と概日時計の研究についても、動植物を超えた普遍的な原理の発見からもしかしたら再生医療への展開が見つかるかもしれないと夢想している。

こうしたアプローチが本当に世界を変える力になり得るのかは正直わからないが、狙わなければ絶対に到達できない高みが存在することも事実である。今回の受賞論文を書くにあたり、私は世界を植物で変えたいと願って研究を始めたことを改めて認識した。欲張りと言われようが何と言われようが「基礎も応用も全部やる、そして植物で世界を変えるの精

神で臨む」ということを、ここに表明し、これからの自分の研究の道標としたい。

これまで一緒に仕事をしてくれた学生や共同研究者を含め多くの方々にご支援でここまでやってくれました。これからもお世話になるかと思いますが、今後ともよろしくお願い致します。この度はありがとうございました。

参考文献

- 1) Tanaka S, Nakamura S, Mochizuki N, Nagatani A: *Plant Cell Physiol* 43:1171-1181 (2002)
- 2) Endo M, Nakamura S, Araki T, Mochizuki N, Nagatani A: *Plant Cell* 17:1941-1952 (2005)
- 3) Endo M, Mochizuki N, Suzuki T, Nagatani A: *Plant Cell* 19:84-93 (2007)
- 4) Endo M, Shimizu H, Nohales MA, Araki T, Kay SA: *Nature* 515:419-422 (2014)
- 5) Shimizu H, Katayama K, Koto T, Torii K, Araki T, Endo M: *Nature Plants* 1:15163 (2015)
- 6) Efroni I, Ip PL, Nawy T, Mello A, Birnbaum KD: *Genome Biol* 16:9 (2015)
- 7) Efroni I, Birnbaum KD: *Genome Biol* 17:65 (2016)
- 8) Yagita K *et al.*: *Proc Natl Acad Sci USA* 107:3846-3851 (2010)
- 9) Umemura Y *et al.*: *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E5039-5048 (2014)