

植物の体内時計はどこにある？

京都大学大学院生命科学研究科
分子代謝制御学 准教授 遠藤 求

地球は約 24 時間で自転しているため、昼と夜が周期的に訪れる。同様に、地球は 1 年をかけて公転しているため、極地や赤道直下を除いた大部分の地域では、季節は規則的に移り変わる。こうした明暗周期や日長変化は、気温や降水量、日照量といった他の環境刺激に比べても極めて安定的に起こるので、多くの生物種がこうした変化を時刻変動や季節変動の指標として用いてきた。具体的には、生物は体内時計（または生物時計）とよばれる時間を測る仕組みを発達させることで、時間や季節など周期的な変化を予測し、それに応答することで適応度を向上させてきた。体内時計には、概日時計を始め、概月時計や、概年時計、概潮汐時計など様々な種類の時計が知られており、中でも概日時計は私たちの生活にも深く関わっている。

概日時計はおよそ 24 時間の周期を持っており、

光や温度の外部環境刺激が無くともリズムが持続する（自由継続性）。また、明暗サイクルに同調できる（光位相同調性）、周期が温度によって影響されにくい（温度補償性）、といった特徴も知られている（図 1）。

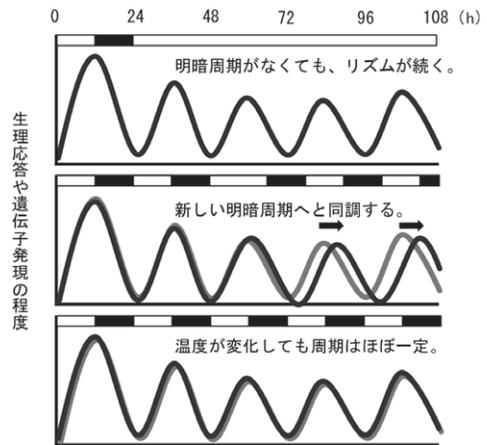


図 1 概日リズムの 3 要件

◆ も く じ ◆

サイエンス・プラザ	授業実践
植物の体内時計はどこにある？…………… 1	理科教育に関する ICT 教育について …… 19
集中豪雨のメカニズム②…………… 6	高校生へ私が選んだ 1 冊の本
バナナの皮の科学…………… 10	錯視入門…………… 22
なぜヤモリは壁に貼りついて歩けるのか？… 14	「進化論」を書き換える …… 23

こうした概日時計の働きの身近な例としては、海外旅行での時差ボケが挙げられる。時差ボケは、その人が持つ概日リズムと実際の昼夜リズムが一致しないために起こる現象であり、概日時計がすぐには新しい明暗周期に同調できないことによる。また、別の例としては、植物が決まって春に花を咲かせるのも概日時計の働きによるものであることが知られている。植物は概日時計を利用して日長を測ることで季節を知り、適切な季節に花を咲かせることを可能にしている。

概日時計の進化的起源

こうした概日時計はどのように進化してきたのであろうか。シアノバクテリアのような原始的な単細胞生物から植物、昆虫、鳥類、哺乳類のような複雑な体制を持つ多細胞生物に至るまで多くの生物種が概日時計を持っている。原始的な生物では、概日時計によって細胞分裂のタイミングが夕方から夜間に制御されていることから、おそらく初期の概日時計はDNA複製のタイミングを調節することで、有害な紫外線からDNA損傷を回避する仕組みとして発達したのだと考えられている。その後、生物が多細胞化するにつれて概日時計はさまざまな形で転用され、行動・生殖のタイミング、イオンの取り込み、転写・翻訳制御など個体レベルの現象から分子レベルの現象に至るまで、生命現象のあらゆる階層で重要な役割を持つようになったのであろう。

しかし、面白いことに概日時計を構成しているタンパク質は少なくともシアノバクテリアと動物、植物の間で異なっており、相同性は全く見られない(図2)。特にシアノバクテリアで見られる概日時計の仕組みは、特定のタンパク質のリン酸化が24時間周期のリズムを持つというものであり、他の生物種で見られる概日時計の仕組みとは全く異なっている。こうしたことから、概日時計の仕組みは進化の過程で独立に獲得されたものであると現在は考えられている。それでもなお、どの生物種の概日時計においても先に挙げた概日時計の3要件(自由継続性、光位相同調性、温度補償

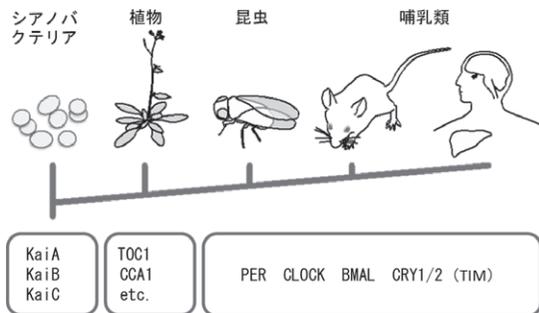


図2 生物の進化と時計遺伝子

性)を満たしていることや、シアノバクテリア以外の生物種では、転写・翻訳を基本とするフィードバックループが概日時計の実態であることから、それぞれの生物種で得られた知見が、他の生物種に適用できることも多い。

植物に脳はあるの？

多細胞生物は単なる細胞の集合体ではなく、細胞の機能分担や情報の共有など細胞間のコミュニケーションを行うことで、個体として成り立っている。これまでの研究から、多細胞生物の体細胞一つ一つが概日時計を持っていることが明らかとなっている。

では、多細胞生物ではどのようにして個々の細胞が持つ時間情報を個体レベルで統合しているのだろうか。また、動物と植物の概日時計の仕組みはどれくらい違っていて、どれくらい似ているのだろうか。私たちヒトを含む哺乳類の場合、脳にある視交叉上核と呼ばれる小さな領域が、概日時計にとって特に重要な場所であることが知られている。目から入った光刺激は視神経を介して視交叉上核に達し、そこで生み出される概日リズムは液性・神経性のシグナル伝達により肝臓などの末梢臓器に存在する概日時計を同調させる(図3左)。つまり、視交叉上核の概日時計は末梢臓器の概日時計の上位階層に位置しており、このことから、視交叉上核の時計を中枢時計(主要時計)、末梢臓器の時計を末梢時計と呼んだりもする。実際、睡眠覚醒リズムを始めとして多くの応答が、視交叉上核の時計によって制御されていることが知られている。

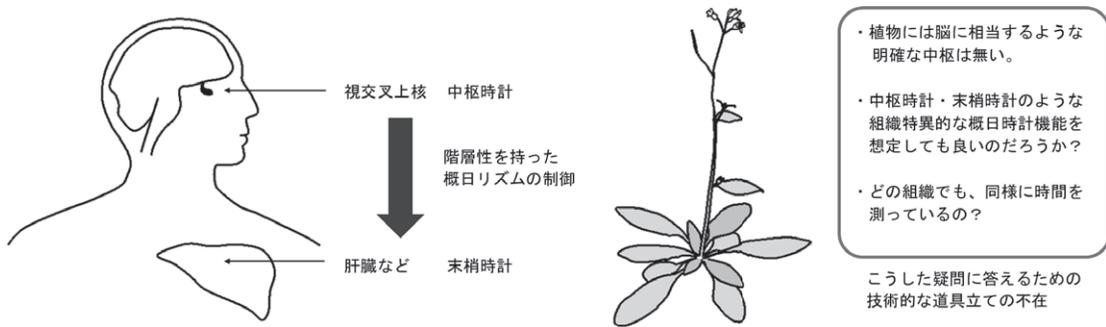


図3 ヒトの概日リズムの中心は視交叉上核，では植物は？

ただし、視交叉上核が概日リズムの全ての中核かという点必ずしもそうではない。視交叉上核の機能を失った動物では、多くの生理応答において概日リズムは消失するが、定刻に給餌されている動物が給餌直前の空腹時に活動性が増すという現象（食物予期活動）は変わらず見られる。こうしたことから、視交叉上核以外に存在する概日時計が食物予期活動に重要であると考えられている。しかし、こうした多少の例外はあるものの、私たちヒトを含む哺乳類の概日時計において、脳の視交叉上核の重要性は疑う余地はなく、概日時計の中核は（大部分の意味において）脳に存在すると言って良いだろう。

では、植物の概日時計はどのようなのであろうか（図3右）。すでに述べたように植物にも概日時計の仕組みは存在しており、概日時計システムとしては動物のそれと似ている点も多い。しかし、植物には動物の脳に対応するような明確な中枢は存在しない。また、植物はカルスからのニンジンの再生や挿し木で見られるように、個々の細胞が分化全能性を持っていることから、「植物は半ば細胞自律的に時刻を刻んでおり、植物はどの細胞でも同じように時間を測っている」と長らく信じられてきた。こうした事情もあり、植物では細胞や組織の種類による概日時計機能の違いはあまり考慮に入れられてこず、個体全体もしくは葉全体を用いた概日リズム研究がほとんどであった。

果たして、この考えは正しいのだろうか？植物といえども多細胞生物である以上は、個々の細胞が持つ時間情報は個体として統合されるべきで

はないのだろうか？私たちは、植物でもこの考えが妥当なのかどうかについて、モデル植物であるシロイヌナズナ（アブラナ科の草本）を用いて検討した。

概日リズムを組織ごとに測るための3つの工夫

動物では、外科的な手術により脳の一部を切除・移植するといった実験や培養細胞を用いた実験から、各組織の体内時計の役割、特に視交叉上核にある概日時計の重要性が明らかにされてきた。しかし植物では、特定の組織だけを切除・移植することは難しく、また、機能を維持したまま組織を培養することができない。さらに、細胞壁によって細胞同士が固く接着しているため、組織単離を行うにしても、細胞壁を溶かし一度バラバラにしてやる必要がある。

私たちはまず、これまで植物では未整備だった特定の組織における概日リズムおよび概日時計の機能を測定するための3つの新しい系を確立した。

1つ目は、葉を構成する主要な組織である葉肉、維管束、表皮を直接単離する方法である。これまでは植物から特定の組織を単離するのに約1時間30分～4時間30分ほどかかっていたため、操作中に時計遺伝子の発現量が変化してしまい、体内時計を定量的に測定することは困難だった。私たちは、超音波処理と酵素処理を組み合わせることで、モデル植物であるシロイヌナズナから30分以内という非常に短時間で葉を構成する葉肉、維管束、表皮の全ての組織を高純度に単離することに成功した（図4）。これにより、単離操作中の

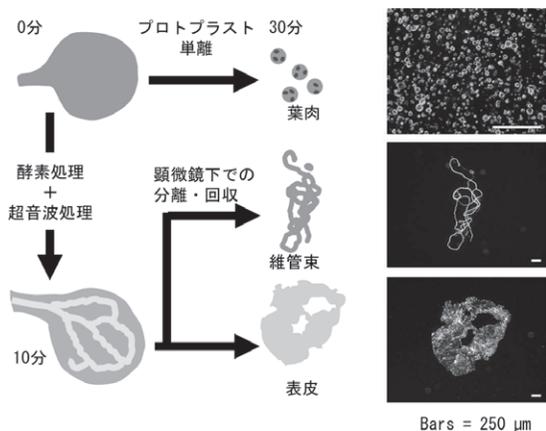


図4 新たに開発した組織単離法

遺伝子発現量の変化をほとんど気にする必要がなくなり、初めて定量的に各組織の体内時計を解析することが可能になった。

2つ目に、組織レベルでの遺伝子発現を非侵襲で測定するための新しい方法として Tissue-specific luciferase assay (TSLA) 法を世界で初めて開発した。これまでは、時計遺伝子のプロモーターの下流で、ホタルなどから単離されたルシフェラーゼ遺伝子を発現させることで、時計遺伝子の概日リズムを測定してきた。しかし、時計遺伝子は基本的には植物体の全ての組織で発現しており、このままの方法では、全ての組織で発光リズムが見られ、特定の組織における発光量を定量することは困難だった。今回、開発した方法では、ルシフェラーゼをコードする遺伝子を2つに分け、

一方は目的の組織でのみ発現するプロモーターの下流で、もう一方は時計遺伝子のプロモーターの下流で発現させる。分割されたルシフェラーゼには、それぞれヘテロ二量体を形成させるためのタンパク質断片も融合してある。これにより、それぞれのルシフェラーゼ断片が時空間的に共在するとき、両者はヘテロ二量体を形成することで機能的なルシフェラーゼが再構成され、特定の組織における時計遺伝子の発現を発光リズムとしてとらえることができる (図5)。

そして3つ目として、特定の組織で概日時計機能を破壊した形質転換体を作出した。すでに述べたように、概日時計遺伝子はほとんどの細胞で発現しているため、時計遺伝子の変異体を用いた解析からは、どの組織に存在する概日時計がどういった生理応答に重要であるかは不明であった。そこで、私たちは時計遺伝子を過剰発現させると概日時計機能が失われることに着目した。これまでの研究から、シロイヌナズナには特定の組織でのみ発現する遺伝子が数多く報告されている。こうした遺伝子のプロモーターで時計遺伝子を組織特異的に発現させることで、組織特異的に概日時計機能を失わせることができる。具体的には葉の全ての組織で発現している時計遺伝子自身のプロモーター、葉肉、維管束、表皮で特異的に発現しているプロモーターを用いて、各組織で時計機能を失わせた形質転換植物を作出した。

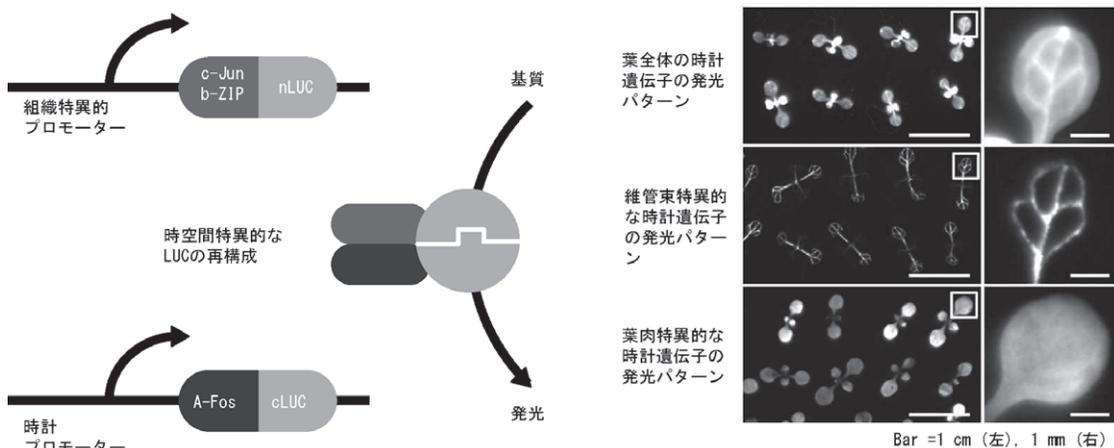


図5 Tissue-specific luciferase assay (TSLA) 法の概要

維管束の概日時計は他とは異なる性質を持つ

こうして実験の道具立てが揃ったので、私たちは、維管束における概日リズムを調べることにした。概日時計によって制御される生理応答の一つに光周性花成（季節に応じて花を咲かせる現象）があり、日長に応答した花成ホルモン（フロリゲン）の産生が重要であることが知られている。フロリゲンは葉の維管束で産生されることから、維管束の概日時計の機能が他の組織のものとは異なる可能性は十分に考えられた。

シロイヌナズナの葉全体、葉肉と維管束を一定の間隔で単離し、時計遺伝子の発現を定量的に測定したところ、発現量や発現リズム、標的遺伝子などが、葉全体と葉肉の発現様式はよく似ているのに対し、維管束はそのどちらとも大きく異なっていることが明らかとなった。こうしたことから、植物でも動物と同様に体内時計システムは組織ごとに異なっていることが考えられた。さらに、面白いことに、維管束で時計の働きを阻害すると葉肉の体内時計の働きも阻害される一方で、葉肉の時計の働きを阻害しても維管束の時計の働きには影響がなかった。こうした時計制御の非対称性は動物でも見られており、植物の体内時計システムは動物と同様に階層構造を持っていることが初めて明らかになった（図6）。

TSLA法を用いた解析においても、同じ時計遺伝子でも維管束と葉全体では異なる遺伝子発現リズムが見られることから、葉肉と維管束の時計システムが異なっていることが支持された。

さらに、維管束を含む葉全体や維管束で概日時計機能を阻害した系統でだけ、遅咲きを示したこ



特定の組織で時計機能を阻害した系統

図7 維管束の時計機能によって制御される花芽形成

とから、維管束の概日時計は花成ホルモンの産生を通じて、個体全体の生理応答を制御していることが示された（図7）。

今後の展開

植物にはもちろん脳に相当する組織は無いのだが、光周性花成に関わる概日時計という意味では、維管束に存在する概日時計が極めて重要であることが示された。今後は、概日時計によって制御されている他の生理応答についても同様の解析を進めていくことで、動物における視交叉上核のように維管束が多く生理応答を担っている集中型の概日時計ネットワークを構築しているのか、生理応答ごとに異なる組織が重要な役割を担っている分散型の概日時計ネットワークなのかが明らかになるだろう。本研究で開発した手法を用いることで、こうした組織レベルでの解析が大きく進むことが期待される。

また、維管束の時計機能を阻害するだけで植物の花の咲くタイミングが制御できたことから、概日時計は植物の生長調節法開発の新たなターゲットになる可能性が期待される。

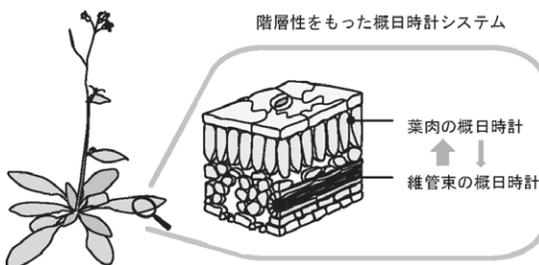


図6 今回明らかになった植物の概日時計システム