

主論文

学位申請論文

シロイヌナズナ単離細胞の概日リズム特性の研究

京都大学大学院 理学研究科 生物科学専攻

植物学教室 形態統御学分科

中村 駿志

# 要旨

地球の自転による周期的な環境変化である昼夜サイクルに適応するために、シアノバクテリア、アカパンカビ、シロイヌナズナ、ショウジョウバエ、マウスなど単細胞生物や多細胞生物に関係なく多くの生物が概日時計を有している。概日時計は生体内で約24時間の周期のリズム（概日リズム）を生成し、環境変動をあらかじめ予測することによって生体内の状態を最適化している。シロイヌナズナにおいては、約20個の時計遺伝子の転写—翻訳フィードバックループによって概日リズムが生み出されていることが明らかになっている。植物全体の細胞で時計遺伝子が発現することから、植物の概日時計は細胞時計の集合体として捉えることができる。しかし、時計遺伝子が発現しているからと言って全ての細胞が均質な概日時計を有しているわけではない。初期の概日リズムの研究において植物体内で気孔の開閉リズムや葉の上下運動のリズムの周期が異なることから植物は組織特異的な細胞概日時計の集合体であることが予想された。実際に時計遺伝子の発現量が組織ごとに異なっていることが報告され始めている。また、器官・組織レベルの概日リズム解析によって、維管束から葉肉組織、茎頂から根などの他の器官への時間情報伝達が示唆されている。さらに、細胞レベルの解析によって、組織内の細胞の概日リズムを検出することに成功し、組織内での細胞概日リズムの性質が明らかにされつつある。これらのことから、植物の概日時計は組織ごとに異なる不均一な細胞時計の集合体であり、植物は不均一な細胞時計間を統合することによって、植物個体として光や温度などの外部環境の変動や、細胞ごとの遺伝子発現のばらつきに適応している。しかし、組織からの影響を受けない細胞時計の性質や役割は依然として不明のままである。

本研究では、細胞自身が持つ固有の概日時計の特徴を明らかにすることによって、植物が細胞時計を統合し、個体として環境に適応する仕組みを理解することを目指した。植物組織内において細胞は他の組織や細胞からの影響を受けているため、細胞の概日リズムは細胞自身の振動システムと他細胞からの影響を反映した挙動を示す。プロトプラストとして細胞を物理的に単離し、細胞一つ一つの概日リズムを様々な条件で調べることで、細胞が本来持つ概日時計の特徴を明らかにした。

第1章では、シロイヌナズナの葉から単離した細胞の発光概日リズムを長期的に測定できる条件を検討した結果を報告した。刺激に対する概日リズムの位相応答を解析するなど概日リズムの性質を調べるためには概日リズムが1週間程度持続する必要がある。しかし、従来の方法ではシロイヌナズナの葉から単離した細胞の概日リズムは急激に減衰し、3日程度しか発光概日リズムを検出することができなかった。培地条件を検討することで単離細胞集団の概日リズムを11日以上測定することに成功した。また、細胞密度が概日リズムの持続に重要であることも示した。それらの条件を用いて明暗シグナルに対する細胞集団の概日リズムの位相応答を調べることによって、細胞集団が光に応答し概日時計

の時刻を調節できることを明確に示した。

第 2 章では、単一細胞レベルでの単離細胞の発光概日リズムを測定する実験系を確立し、その実験系を利用することによって明らかにした細胞概日時計の特徴を報告した。概日リズムの三大性質である「自由継続性」、「温度補償性」、「同調性」を単離細胞が有することを明らかにし、植物の細胞一つ一つの概日時計が細胞自律的に機能することを証明した。また、シロイヌナズナの葉から単離した細胞に加えて根から単離した細胞における発光概日リズムを調べることによって器官特異的な細胞概日時計の存在を示した。根由来細胞の概日リズムは葉由来細胞の概日リズムに比べて堅牢な温度補償性を有することを明らかにした。

第 3 章では、細胞密度が単離細胞の概日リズムに与える影響について報告した。時刻情報とは無関係に単離細胞の細胞間ではたらく作用によって単離細胞の概日リズムの安定性や明暗に対する細胞間での正確性が向上することを示した。シロイヌナズナの葉から単離した細胞を高細胞密度下で培養すると個々の細胞の概日リズムが安定化し、その細胞概日リズムの安定化が細胞の分泌物によって引き起こされていることを明らかにした。細胞密度の増大によって概日リズムが安定化する例は哺乳類の概日時計においても報告されている。高細胞密度による概日リズムの安定化は生物に関係なく普遍的な仕組みによって生じていることを提案した。

単離された細胞の発光概日リズムを単一細胞レベルで解析することによって、組織からの影響を受けない植物細胞時計が有する概日時計の特徴を明確に示した。単離細胞という人工的な条件ではあるが、植物の概日時計研究を発展させるための基本的な情報になると確信している。また、葉と根から単離された細胞において器官特異的な概日時計の特徴を示した。葉と根の細胞時計が植物の地上部や地下部といった植物内での不均一な環境に適合した性質を有することを提案した。

# 目次

要旨 .....	1
目次 .....	3
論文目録 .....	5
用語・略語 .....	6
序章 組織特異的な細胞時計と細胞時計の統合 .....	10
第1章 シロイヌナズナ葉から単離した細胞の測定条件の確立と概日リズムの解析 .....	16
導入 .....	16
結果 .....	18
シロイヌナズナ葉から単離した細胞の発光概日リズムを長期的に測定するための培地条件の探索 .....	18
PEG 法によるプロトプラストへの一過的な形質転換 .....	21
光条件による単離細胞の概日リズムの周期長変化 .....	23
FBS 添加による単離細胞の概日リズムの持続 .....	25
細胞密度依存的な単離細胞集団の発光概日リズムの持続性 .....	27
12 時間の暗期による単離細胞集団の概日リズムの位相リセット .....	28
考察 .....	30
材料と方法 .....	32
第2章 単一単離細胞の発光概日リズム測定系による葉と根由来細胞の概日リズムの三大性質の解析 .....	35
導入 .....	35
結果 .....	39
個々のプロトプラスト由来単離細胞の発光概日リズム測定系の確立 .....	39
概日リズム解析のための細胞の分類 .....	41
標準条件下での葉と根由来細胞の生物発光リズムの比較 .....	43
温度依存的な細胞概日リズムの頑健性 .....	48
12°C–27°Cの温度範囲における細胞概日リズムの温度補償性 .....	54
12°Cで生じる細胞概日リズムの不安定化と細胞間の脱同期 .....	55
短時間の光刺激に対する同調性（位相応答） .....	57
明暗サイクル下における細胞間のピーク時刻の正確性の比較 .....	59
考察 .....	61

材料と方法.....	64
資料 1.....	66
資料 2.....	68
<b>第 3 章 細胞密度依存的な葉由来単離細胞の概日リズムの安定性と明暗に対する正確性.....</b>	<b>70</b>
導入.....	70
結果.....	73
位相情報に非依存的な単離細胞集団の概日リズムの安定化.....	73
高細胞密度培地における細胞概日リズムの安定性と正確性の向上.....	77
細胞密度非依存的な細胞概日リズムの周期性.....	81
馴化培地における細胞概日リズムの安定性の向上.....	84
考察.....	87
材料と方法.....	89
資料 3.....	91
資料 4.....	92
<b>最終章 個々の細胞の性質から植物個体へ.....</b>	<b>93</b>
<b>結論と展望.....</b>	<b>98</b>
<b>引用文献.....</b>	<b>100</b>
<b>謝辞.....</b>	<b>108</b>

## 論文目録

本論文は以下の学術論文の内容にもとづいて書かれたものである。

Long-term monitoring of bioluminescence circadian rhythms of cells in a transgenic *Arabidopsis* mesophyll protoplast culture

Nakamura Shunji and Tokitaka Oyama

2018年7月発行

*Plant Biotechnology* 誌 第35巻 第3号 291頁から295頁に掲載

Adaptive diversification in the cellular circadian behavior of *Arabidopsis* leaf- and root-derived cells

Nakamura Shunji and Tokitaka Oyama

2022年1月公開

*Plant and Cell Physiology* 誌 掲載号未定

# 用語・略語

## 時間生物学で使用される用語

### 1. 概日リズムの三大性質：

自由継続性、温度補償性、同調性。

### 2. 自由継続性：

光や温度などの環境が変化しない恒常条件においても、約 24 時間周期のリズムが継続する性質。

### 3. 温度補償性：

生体内の酵素反応において温度が 10°C 上昇につれて反応速度は 2—3 倍に変化するが、概日リズムの周期は温度の影響を受けにくい性質。

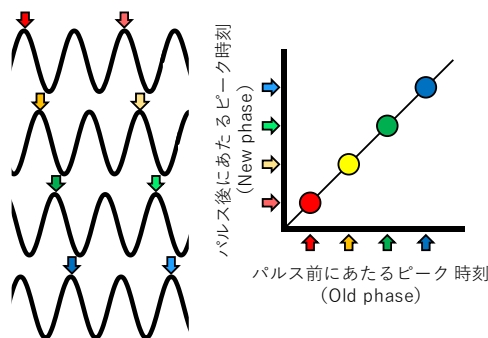
### 4. 同調性：

光や温度などの同調因子によって、概日リズムの位相が移行（シフト）し、概日時計の時刻が調整される性質。

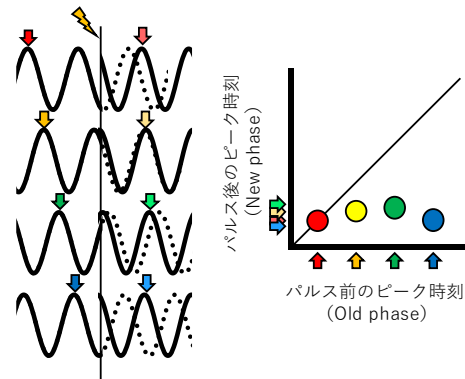
### 5. 位相移行曲線（Phase Transition Curve : PTC）：

同調は刺激に対して位相が前進もしくは後退する（シフトする）ことで生じる。位相シフトを視覚化する方法として位相移行曲線がある。位相移行曲線は横軸にパルス前のピーク時刻を縦軸にパルス後のピーク時刻を図示することで描画できる。位相移行曲線には 0 型と 1 型がある。0 型では刺激を与える時刻に関係なく概日リズムの位相がほぼ同じになるため、位相移行曲線の傾きが 0 付近になる。1 型では位相シフトは生じるが、位相がリセット（0 型で生じる完全な同調）されないため、位相移行曲線の傾きは 1 付近になる。未処理のコントロールでは 24 時間周期が継続され、傾き 1 の直線が見られる。

コントロール（未処理）



0型の位相シフト



## 本研究で使用される用語

### 1. プロトプラスト由来細胞：

シロイヌナズナからプロトプラストとして単離した細胞を指す。プロトプラストとして単離された細胞は培養中に細胞壁を再合成すると考えられるためプロトプラスト由来細胞としている。

### 2. 葉由来細胞：

シロイヌナズナの葉からプロトプラストとして単離した細胞。

### 3. 根由来細胞：

シロイヌナズナの根からプロトプラストとして単離した細胞。

### 4. 標準条件：

プロトプラスト由来細胞（葉由来細胞の場合は  $2 \times 10^4$  cell/4 ml、根由来細胞の場合は  $5 \times 10^4$  cell/4 ml）を 22°C、恒暗条件（DD）の W5+FBS 培地で培養・測定した条件。

## 概日リズムによる細胞の分類（第2章・第3章）

発光概日リズムを解析するために、概日リズムの挙動から単離細胞を分類した（[図 17：材料と方法を参照](#)）。EM-CCD カメラによって発光画像を取得することによって各細胞の発光を検出し、ImageJ を用いて各細胞の発光量を定量した。

### 5. 発光検出細胞：

発光画像上で発光が重ならず、他の細胞とは発光を区別できる細胞。

### 6. 解析可能細胞：

発光検出細胞において、発光リズムのピークが検出された細胞。ピークは二次関数フィッティングによって抽出されたものを手動で確認し、不適切に抽出された時刻に関してはその時刻のデータを削除した。

### 7. 概日リズム細胞（グループ0に分類される細胞）：

解析可能細胞の中から、測定期間中において発光概日リズムが持続した細胞。

### 8. 不完全リズム細胞（グループ1とグループ2）：

解析可能細胞の中から、測定期間中において最初のピーク時刻が見られなかったりピーク間隔が概日リズムの周期から大きく（35 時間より）外れていたり、発光が消失したりした不完全なリズムが部分的に見られた細胞。



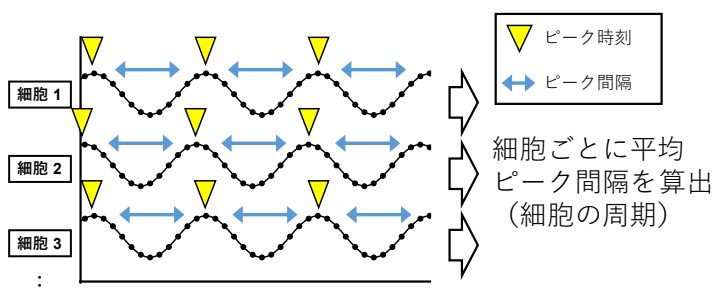
## 本研究のリズム解析で使用される用語

### 1. 細胞（の概日リズム）の周期：

1つの概日リズム細胞における発光リズムのピーク間隔の平均。

### 2. サイクル間のばらつき（CV）：

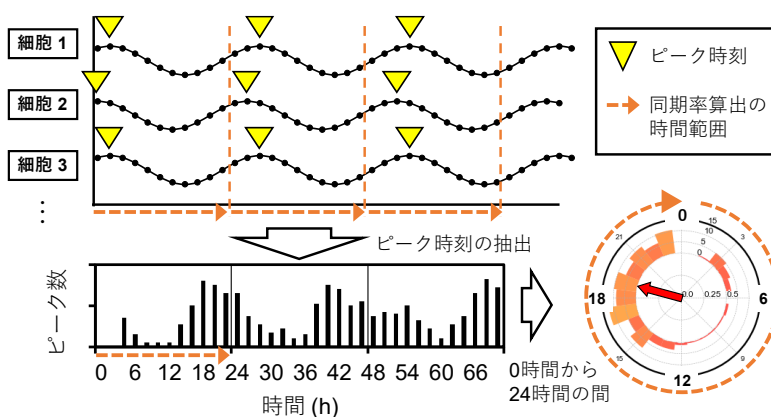
細胞概日リズムの安定性を評価するための指標。1つの概日リズム細胞において、概日リズムのピーク間隔の変動係数（CV = 標準偏差/平均）。



$$\frac{\text{1つの細胞のピーク間隔の標準偏差 (SD)}}{\text{1つの細胞の平均ピーク間隔}} = \text{1つの細胞の変動係数 (CV)}$$

### 3. 同期率：

細胞間の位相のばらつき度合いを評価するための指標。24時間の範囲における同期率はピーク時刻をもとに算出した。同期率は0（非同期）から1（同期）の範囲で、細胞集団のコヒーレンス（同期状態）を表し、値が大きいほど細胞間の位相（ピーク時刻）は揃っていることになる。



#### 4. 概日リズムの頑健性：

本研究では、Relative Amplitude Error (RAE) が 0.2 以下の値を示す発光変動を持つ細胞を頑健なリズムを示す細胞とした。RAE の値は Fast fourier transform–nonlinear least squares (FFT-NLLS) 解析によって算出される。FFT-NLLS 解析は時系列データに対してコサイン関数の線形和をフィッティングすることで概日リズムの周期を算出する方法である。フィッティングする際にフィッティングの精度を RAE の値として算出するため、概日リズムの頑健性を推定する指標の一つになる。RAE の値は 0 から 1 を示し、0 に近いほどフィッティングが正確であることを示すため、0 に近いほど頑健であると考えられる。

#### 5. $Q_{10}$ 値：

概日リズムの周期の温度補償性の指標となる値。 $Q_{10}$  は、温度が 10°C 異なる 2 つの条件で測定された反応速度 [リズムの周波数 (1/周期)] の比率として定義される。本研究では 12–17°C といった 5°C ごとに  $Q_{10}$  値を算出している。

$$Q_{10} = \left( \frac{\tau_1}{\tau_2} \right)^{\left( \frac{10}{T_2 - T_1} \right)}$$

$T_i$  : 温度 (°C)

$\tau_i$  : 周期 (h)

# 序章

## 組織特異的な細胞時計と細胞時計の統合

### 概日時計システム

地球の自転によって生じる 24 時間の昼夜サイクルに合わせて、多くの生物が概日的な生理リズムを示す。概日時計はシアノバクテリア、アカパンカビ、シロイヌナズナ、ショウジョウバエ、マウスなど多くの生物が有しているシステムである。それらの生物は概日時計を保持することで日周変動を予測し、環境変動に対して適応している。

概日時計は光や温度などが一定の恒常条件下においても約 24 時間の周期で自由継続し、さらに光や温度などの周期的な外部環境変動に応答して時刻合わせをする。植物は動物と異なり自由に移動することができず、様々な環境のもと、固定された場所で一生を送る。そのような植物にとっては、外部環境の変化に対応するために植物の概日時計を周期的な環境に同調し、生理反応を変化させることが重要である。植物の成長や代謝などの生理現象が概日時計の制御を受けている (図 1)。トランスクリプトーム解析の結果からシロイヌナズナの転写物の 6% が mRNA レベルで概日変動することが報告されている (Harmer et al., 2000)。さらに、エンハンサートラップ法によってプロモーターの 3 分の 1 が概日リズムを示し、転写制御に対する概日時計の影響が確認されている (Michael and McClung, 2003)。

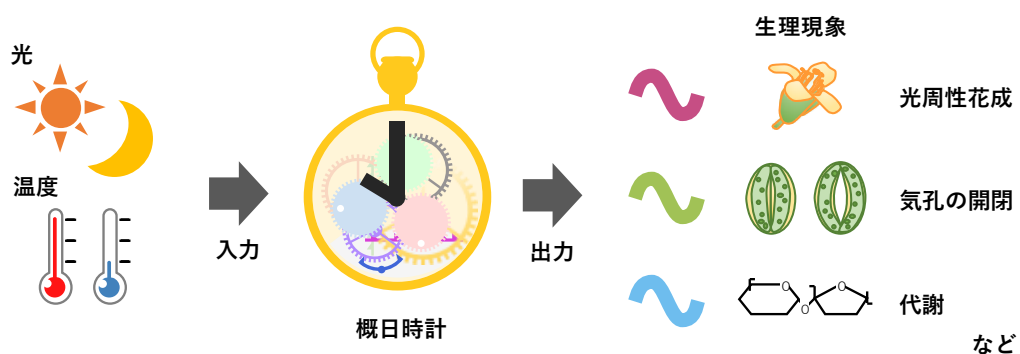


図 1 植物の概日時計システム

概日時計システムは光や温度などの入力によって時刻を調整し、様々な生理現象に関与している。

## 時計遺伝子の発現変動

モデル植物であるシロイヌナズナの概日時計は数々の時計遺伝子の転写翻訳フィードバックループにもとづいている (Pokhilko et al., 2012; Nohales and Kay, 2016) (図 2)。時計遺伝子である *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*) と *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (*LHY*) は夜明け付近で発現のピークを持つ。CCA1 と LHY は、夕暮れ・夜に発現のピークを持つ *GIGANTEA* (*GI*)、*TIMING OF CAB EXPRESSION 1* (*TOC1*)、*LUXARRHYTHMO* (*LUX*) と *EARLY FLOWERING 3* (*ELF3*) と *EARLY FLOWERING 4* (*ELF4*) の発現を抑制する。また、TOC1 と EC (Evening complex : LUX、ELF3、ELF4 で構成される複合体) は *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 9/7/5* (*PRR 9/7/5*) の発現を抑制し、振動の頑健性を高めていると考えられている (Creux and Harmer, 2019)。大半の組織の細胞で時計遺伝子が発現しているため、概日時計システムは個々の細胞に存在していると考えられている。実際、蛍光タグ付き CCA1 の発現変動を顕微鏡下で観測した結果、植物全体の個々の細胞が概日リズムを示すことが報告されている (Gould et al., 2018)。

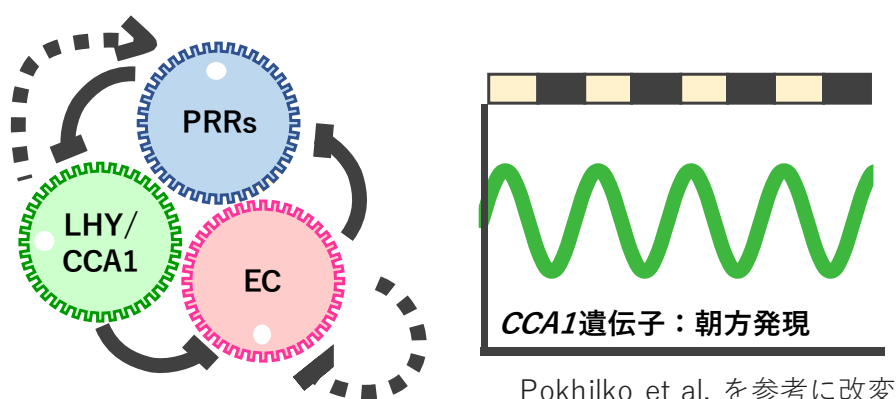


図 2 シロイヌナズナの概日時計の分子機構と *CCA1* 遺伝子の発現リズム

様々な時計遺伝子が互いに制御し合うことによって約 1 日の概日リズムを生み出している。簡易的な中心振動モデル (Pokhilko et al., 2012 を参考に作製した)。中心振動を形成する LHY/CCA1-PRRs-EC 相互作用モデルは 3 つの構成因子による抑制制御 (実線) を含んでいる。他の作用として LHY/CCA1 による PRRs への促進制御と EC による自己抑制 (点線) が含まれている。12 時間明期/12 時間暗期において *CCA1* 遺伝子は朝方 (明期の初め) に発現のピークを示す。

## 概日時計の入力機構（光刺激）

光は植物にとってエネルギー源の生産だけでなく、植物の成長や適応過程において幅広い生理現象を引き起こす支配的な環境刺激である。シロイヌナズナにおいて 5 つの光受容体 [フィトクロム、クリプトクロム、ZEITLUPE (ZTL) ファミリー、フォトトロピン、UV Resistance Locus 8 (UVR8)] が存在している (Sanchez et al., 2020)。これらの光受容体はそれぞれ異なる紫外可視吸収スペクトルを示し、シグナル伝達経路も様々である (Parihar et al., 2016; Paik and Huq, 2019)。概日時計の入力としても光受容体は重要であり、フォトトロピン以外の光受容体が光刺激による概日時計の同調に関与し、概日リズムの周期に影響を及ぼす (Litthauer et al., 2016; Sanchez et al., 2020)。初期の研究から赤色光受容体であるフィトクロムと青色光受容体であるクリプトクロムが光刺激の概日時計システムへの入力に重要であることが知られている (Somers et al., 1998; Devlin and Kay, 2000)。フィトクロムの 1 つである *PHYB* は植物体全体で発現している (Toth et al., 2001)。植物は個々の細胞に概日時計とその入力経路の一つである光受容体を有しているため、細胞自身が光に応答して概日時計の時刻を調節することができる。

## 器官・組織特異的な概日時計（細胞時計）

植物全体の細胞で時計遺伝子が発現しているからと言って全ての細胞が均質な概日時計を有しているわけではない。初期の研究によってマメ科の植物において気孔の開閉リズムの周期と葉の上下運動の周期が異なることや、タバコ植物において細胞質遊離カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 量の変動リズムと葉緑体関連遺伝子である *Lhcb* (*Light-harvesting complex b*) の発現リズムの周期が異なることから、植物体内に複数の異なる性質を持つ概日時計が存在すると考えられていた (Hennessey and Field, 1992; Sai and Johnson, 1999)。実際、様々な研究によって器官や組織ごとに特異的な概日リズムを示すことが報告されている。蛍光タグ付き CCA1 を形質転換したシロイヌナズナにおいて、孔辺細胞と周囲の表皮・葉肉細胞の概日リズムの周期が異なることが細胞レベルで示されている (Yakir et al., 2011)。時計遺伝子の一つである *PRR3* が維管束で強く発現していることや、葉肉組織に比べて維管束組織で発現量が高い時計遺伝子が複数存在することが報告されている (Para et al., 2007; Endo et al., 2014)。シュートと根における遺伝子発現解析によっても、いくつかの時計遺伝子の発現量が異なることが示されている (Lee and Seo, 2018)。また、植物全体の個々の細胞で蛍光タグ付き CCA1 の発現変動を顕微鏡下で観測した最近の研究では、植物の器官内および器官間で概日リズムの振幅、周期、位相が細胞ごとに異なることが報告されている (Gould et al., 2018)。

## 器官・組織・細胞間での時間情報伝達

植物の概日時計が異なる概日リズムの周期を有する細胞の単純な足し合わせであった場合、植物内で細胞ごとの時刻情報が不揃いになり、植物個体として環境変動を正確に予測することができない。植物個体として環境に適応するためには、潜在的に異なる性質を有すると考えられる細胞時計を統合する仕組みが必要である。

組織特異的な遺伝子発現によって葉肉組織の概日リズムを消失させても維管束組織の概日リズムに影響は見られない一方、維管束組織の概日リズムを消失させると葉肉組織の概日リズムも消失することが示されている (Endo et al., 2014)。つまり維管束組織は葉肉組織の概日リズムの発振 (振幅) を制御していることになる。また、茎頂 (地上部) が根の概日リズムの発振 (振幅) を制御することも報告されている (Takahashi et al., 2015)。加えて、概日リズムの位相合わせについても複数の報告がある (Fukuda et al., 2007; Wenden et al., 2012; Muranaka and Oyama, 2016; Greenwood et al., 2019)。これらの研究では、発光レポーターによって概日リズムを検出しており、近傍の細胞間で概日リズムの位相が揃っていることを示している。植物細胞間の時間情報の伝達様式は不明であるが、原形質連絡で細胞同士が繋がっているため、拡散性の物質が関与すると想定されている (Fukuda et al., 2007)。代謝産物であるシヨ糖は概日リズムの位相応答を引き起こすことから、シヨ糖などが時間情報伝達物質である可能性が示唆されている (Haydon et al., 2013)。シロイヌナズナの地上部と根における時計遺伝子の発現解析から、シヨ糖による地上部から根への時間情報の伝達が考えられている (James et al., 2008)。加えて、時計遺伝子の一つである ELF4 タンパク質が地上部から地下部に移動することによって根の概日リズムの周期を調節しているという報告もある (Chen et al., 2020) (図 3)。

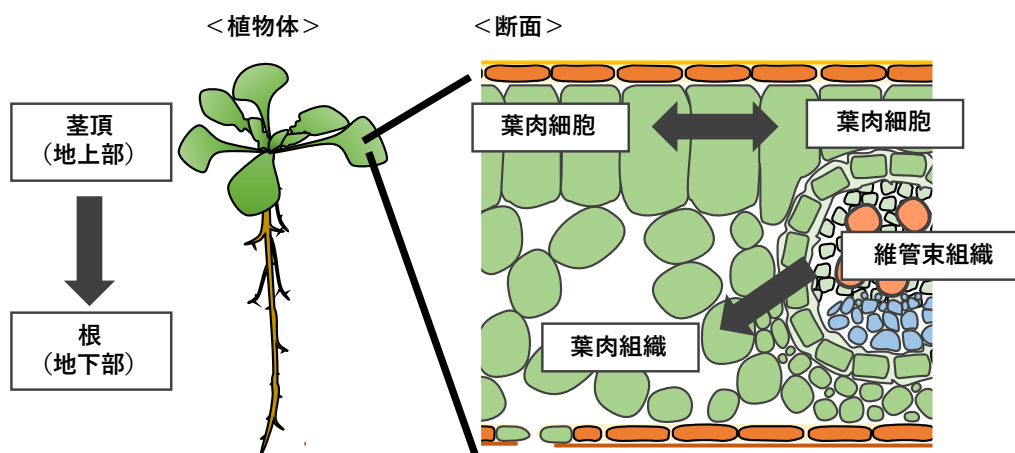


図 3 植物の概日時計における時間情報伝達

植物の概日時計において器官間、組織間、細胞間で時間情報が伝達されている。実線矢印は影響の方向を示す。

## **本研究の目的（問題提起）**

前述のように植物は組織特異的な概日時計を有し、異なる性質を持つ細胞時計を統合することで植物個体として環境に適応していると考えられる。植物組織内における細胞時計は他の細胞や組織からの影響を受けている。そのため、器官全体をすりつぶした遺伝子発現解析や、蛍光レポーターによる組織内の細胞概日リズム解析は、細胞時計の性質と周りの細胞の影響を含めた複合的な現象を観測していることになる。各細胞の概日時計を統合する機構を理解するためには、細胞自身が有する概日時計の性質を明らかにする必要がある。

## **問題解決のためのアプローチ（単離細胞の発光概日リズムの測定）**

組織からの影響を受けない細胞固有の概日時計の性質を明らかにするために、著者は単離細胞を用いることにした。プロトプラストとして物理的に単離された細胞は、原形質連絡といった物質移動に関わる構造を有しておらず、周りの細胞からの影響を抑えることができるため、細胞が本来有する概日時計の性質を明らかにすることができると考えた。植物の概日リズム解析の手法には、葉の上下運動などの生理リズム解析、遺伝子発現解析、発光・蛍光レポーター解析などが存在する。本研究では、発光レポーター解析によって単離細胞の概日リズムを測定することにした。時計遺伝子のプロモーターとルシフェラーゼを融合した概日発現発光レポーターを用いることで、時計遺伝子の発現量を発光量として検出することができる。細胞を破壊する遺伝子発現解析とは異なり、同一のサンプルを経時的に調べることができる。また蛍光レポーターとは異なり、細胞に励起光を与える必要がないため、細胞に与える刺激を減らすことができると考えた。先行研究においてシロイヌナズナの葉から単離したプロトプラストに、PEG 法を用いてプラスミド DNA（概日発現発光レポーター）を一過的に形質転換することによって単離細胞集団の発光概日リズムを検出することに成功している（Kim and Somers, 2010）。本研究では、あらかじめ概日発現発光レポーターが形質転換された植物体（Nakamichi et al., 2004, 2005）からプロトプラストとして細胞を単離することによって、プラスミド DNA の導入効率による細胞間のばらつきを考慮することなく再現度の高い発光変動を検出できると考えた。

## **本研究の概要と本論文の構成**

本研究では、単一細胞レベルでプロトプラストとして物理的に単離した細胞の発光概日リズムを調べることによって、細胞固有の概日時計の特徴を明らかにした。本論文は、著者が修士課程の 2 年間と博士課程の 3 年間を通して進めた研究成果をまとめたものである。修士課程では、単離細胞の概日リズムを測定する条件を検討し、長期間の測定を可能にした。また、単一細胞レベルで発光概日リズムを測定する実験系を確立し、細胞が有する概

日時計を解析する基盤を築いた。博士課程では、温度による影響や修士課程で得た実験結果を詳細に解析し、細胞時計の特徴を結論付けた。

本論文では研究成果を 3 章に分けて報告した。第 1 章では、単離細胞の発光概日リズムの長期測定を可能にした培地・条件を報告する。第 2 章では第 1 章で検討した培地に加えて単一細胞発光測定系を確立し、単一細胞レベルの解析によって明らかにした葉と根由来の単離細胞の概日リズムの性質を報告する。第 3 章では、単離した細胞においても周りの単離細胞からの影響によって細胞の概日リズムの安定性や振幅が変化することを明らかにした。最終章では数理モデルによる先行研究をもとに、植物の地上部と地下部といった局所的な環境に対する細胞時計の適応機構について考察した。



## 第 1 章

# シロイヌナズナ葉から単離した細胞の測定条件の確立と概日リズムの解析

### 導入

地球の自転によって繰り返される周期的な環境変化である昼夜サイクルに適応するために多くの生物は概日リズムを持っている。太陽光に大きく依存する植物では、様々な生理現象が概日時計によって調整される概日リズムを示す (Greenham and McClung, 2015)。

植物の概日時計は、時計遺伝子の転写-翻訳フィードバックループにもとづいている (Nagel and Kay, 2012)。時計遺伝子の一つである *CCA1* 遺伝子は夜明けごろに発現量が最大になり、恒常条件下では約 24 時間周期のリズミカルな発現を示す。植物は細胞ごとに自律した概日リズムを持っている (Muranaka and Oyama, 2018)。実際、時計遺伝子の発現変動を観測する発光レポーター解析や遺伝子発現解析によって、シロイヌナズナの培養細胞は無傷の植物と同様の頑健な概日リズムを示すことが報告されている (Nakamichi et al., 2004; Wang et al., 2013)。

各細胞が概日時計を有する一方で、組織や器官の異なる細胞において概日時計の性質が異なると考えられている。概日時計の性質が細胞種ごとに異なっているメカニズムや原理はよくわかっていないが、細胞自体でリズムを生み出す構成要素が異なること、もしくは細胞間での相互作用や環境からの入力が入力細胞の場所ごとに異なることがその原因であると考えられる。蛍光タグ付き *CCA1* レポーター遺伝子を形質転換したシロイヌナズナ植物の葉における個々の細胞の概日リズム特性を調べることにより、概日リズムの周期が孔辺細胞と表皮・葉肉細胞で異なることが示されている (Yakir et al., 2011)。また、維管束組織の概日リズムは、恒常条件において葉肉組織の概日リズムよりも高い振幅を維持することが示されており、維管束組織の概日リズムがより頑健であることが報告されている (Endo et al., 2014)。ウキクサにおいて単一細胞生物発光イメージングシステムを開発することにより、植物における個々の細胞の概日リズムの挙動が定量的に解析されている (Muranaka and Oyama, 2016)。ウキクサ植物の細胞概日時計は不均一で不安定な特徴を持つにもかかわらず、隣接する細胞間で部分的な同期が示唆されている。シロイヌナズナにおいても、細胞概日時計を同期させる細胞間相互作用の存在が指摘されている (Fukuda et al., 2007; Wenden et al., 2012)。シロイヌナズナを器官レベルで使用した研究では、接ぎ木実験や茎頂の切除によって根の概日リズムの振幅が減少したことから、茎頂は根の概日リズムを制御していると示唆されている (Takahashi et al., 2015)。これらの先行研究から

植物体の個々の概日時計は様々な階層の信号の影響を受け、細胞自身が協調的な挙動を示すと考えられる。植物の概日システムを理解するには、これらの影響を受けない独立した細胞概日時計の性質を調べ、細胞時計が有する基本的な特徴についての情報が必要である。

植物組織から単離されたプロトプラストは、原形質連絡を欠いているため細胞間で物質を移動させるための物理的な構造を持っていない。したがって、細胞自身が有する概日時計の特徴を調べることができると考えている。先行研究においてシロイヌナズナの葉から単離したプロトプラストに、PEG 法を用いてプラスミド DNA（概日発現発光レポーター）を一過的に形質転換することによって単離細胞集団の発光概日リズムを検出することを報告している（Kim and Somers, 2010）。また、W5 培地にウシ胎児血清（Fetal bovine serum : FBS）を添加することで単離細胞集団の概日リズムを長く測定できることも報告している。第 1 章では、主に *CCA1::LUC* 形質転換シロイヌナズナ（Nakamichi et al., 2004, 2005）の葉からプロトプラストを単離し、単離細胞集団の概日リズムを長期的に測定するための培地条件を検討した（図 4）。植物ホルモンや FBS（Kim and Somers, 2010）の添加によって単離細胞の概日リズムを長期間測定することに成功した。また、細胞密度が概日リズムの持続に重要であることを示した。加えて、光刺激によって単離細胞集団の概日リズムの位相（概日時計の時刻）を調節できることを明らかにし、植物細胞概日時計の高い独立性を支持する結果を得た。

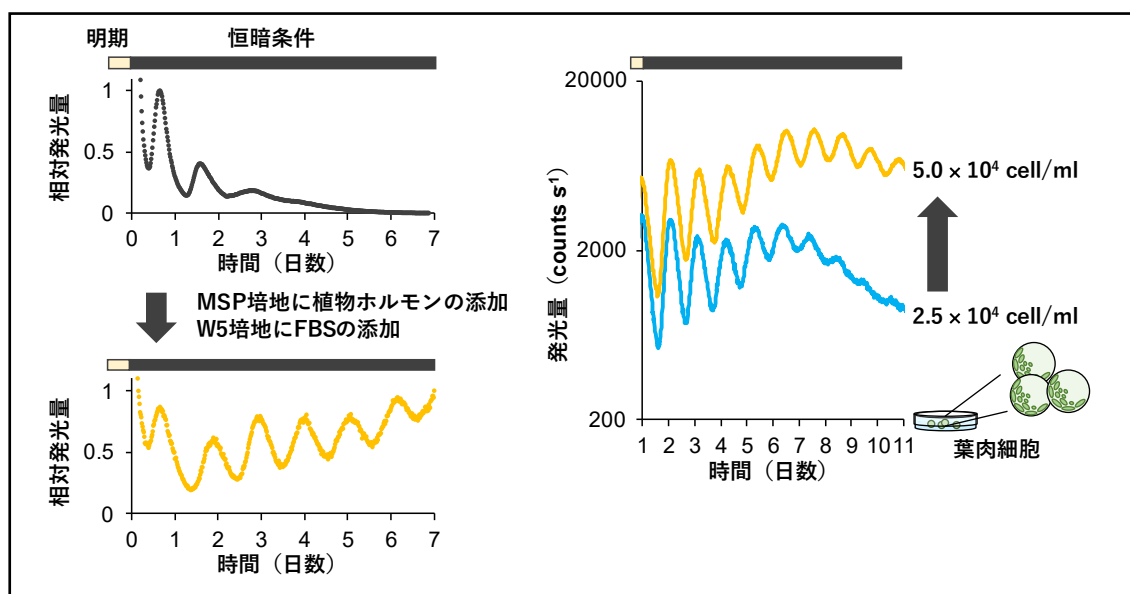


図 4 第 1 章のまとめ

MSP 培地（MS-based Protoplast 培地）に植物ホルモン（オーキシンとサイトカイニン）を、W5 培地に FBS を添加することによって、シロイヌナズナの葉からプロトプラストとして単離した細胞の発光概日リズムを長期間測定することに成功した。加えて、細胞密度が単離細胞の発光概日リズムの長期間測定に重要であることも示した。

## 結果

### シロイヌナズナ葉から単離した細胞の発光概日リズムを長期的に測定するため

#### の培地条件の探索

プロトプラストを単離する植物として概日発現発光レポーター遺伝子 (*CCA1::LUC*) を形質転換したシロイヌナズナを用いた (図 5A)。葉肉プロトプラストは無菌下で 3–4 週間生育させた植物の葉から単離し、浸透圧を調整した液体培地で培養した (図 5AB)。概日リズムを同調させるため、プロトプラストを単離する前に 2 回の 12 時間暗期処理を行った。液体培地中の多くのプロトプラストは沈むため、発光画像取得の際にはディッシュの底に焦点を合わせた。恒明条件下に移してから 30 時間と 42 時間において切り取った葉とプロトプラスト由来細胞集団の生物発光を撮影した (切り取った葉: 1 秒露光、プロトプラスト由来細胞: 240 秒露光) (図 5C)。その結果、取得された発光画像では一つの視野あたり葉の細胞よりも 100 分の 1 以下の生物発光量を示した。

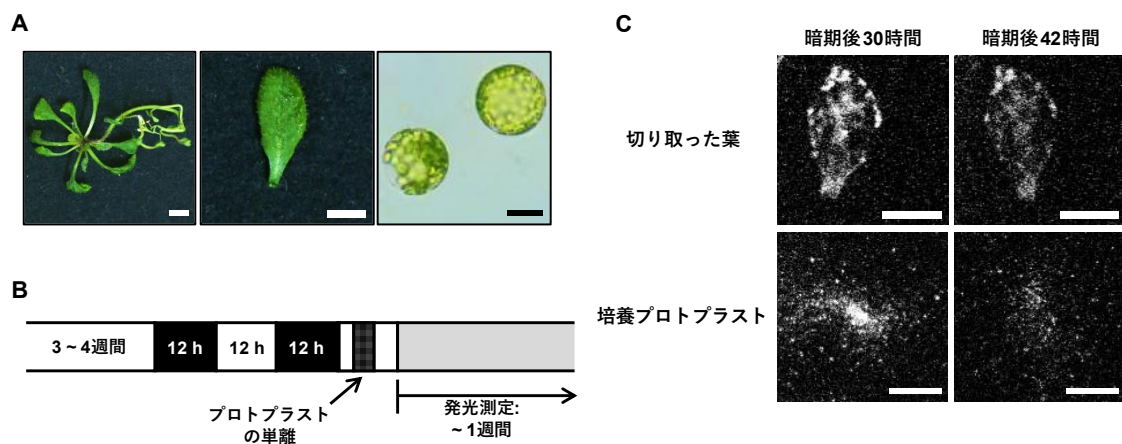


図 5 発光概日リズムを測定するためのプロトプラストの単離

(A) プロトプラストと単離前の植物。4 週間生育させたシロイヌナズナ (左) とシロイヌナズナの本葉 (中央) と本葉から単離したプロトプラスト。(B) 生物発光を測定するための実験スキーム。黒い箱と白い箱はそれぞれ暗期と明期を示す。(C) 切り取った葉 (上) とプロトプラスト (下) を培養した時の発光画像。培養には MSP+PH 培地を用いた。

(C) 切り取った葉 (上) とプロトプラストを培養した試料 (下) の発光画像。EM-CCD カメラ (ImagEM C9100-13; Hamamatsu Photonics) を用いて、恒暗条件になってから 30 時間後 (左)、42 時間後 (右) に撮影した。葉では 1 秒、プロトプラスト集団は 240 秒露光した。白のスケールバーは 5 mm、黒のスケールバーは 20 μm を表す。

プロトプラスト由来細胞の概日リズムを詳細に解析するために、生物発光の変動を長期間測定することが重要であった。植物にとって主要な成長制御因子であるオーキシンとサイトカイニンを持続的なプロトプラストの生育に必須であることが知られている (Davey et al., 2005)。初めに、プロトプラスト用に浸透圧を調整した MSP 培地 (MS-based Protoplast 培地) に植物ホルモン [1  $\mu$ M NAA (1-Naphthaleneacetic Acid)、0.2  $\mu$ M kinetin] を添加することによってプロトプラスト由来細胞集団の概日リズムを長期測定できるかを確かめた。単離細胞集団の発光概日リズムを長期的に測定できる条件を検討するため、一度に 40 サンプルの発光を自動的に高感度で測定できるプレート発光測定装置を使用した (図 6)。植物ホルモンなしの MSP 培地、植物ホルモンありの MSP 培地 [MSP+PH (phytohormone)]、プロトプラストを単離するとき使用される W5 培地の 3 種類の培地におけるプロトプラスト由来細胞の生物発光測定の結果を図 7 に示した。3 種類全ての培地において、生物発光概日リズムを測定することに成功し、プロトプラスト由来細胞集団においても概日時計が駆動していることを示した (図 7)。しかし、恒明条件下 (LL) において、MSP 培地と W5 培地の単離細胞集団の概日リズムの減衰と発光量の低下が生じ、3 日ほどで単離細胞の概日リズムが見られなくなった。恒明条件に比べて恒暗条件 (DD) における細胞集団の概日リズムは持続されやすい傾向であった (図 7)。MSP 培地と W5 培地の単離細胞集団の概日リズムは発光量の低下が見られ、生物発光概日リズムの長期的な測定には適さないことを確認した (図 7)。一方で、植物ホルモン (1  $\mu$ M NAA、0.2  $\mu$ M kinetin) を添加した MSP+PH 培地の単離細胞集団の概日リズムは、恒明・恒暗条件下で 1 週間程度概日リズムが持続し、単離細胞集団の概日リズムを長期間にわたって測定することに成功した (図 7)。

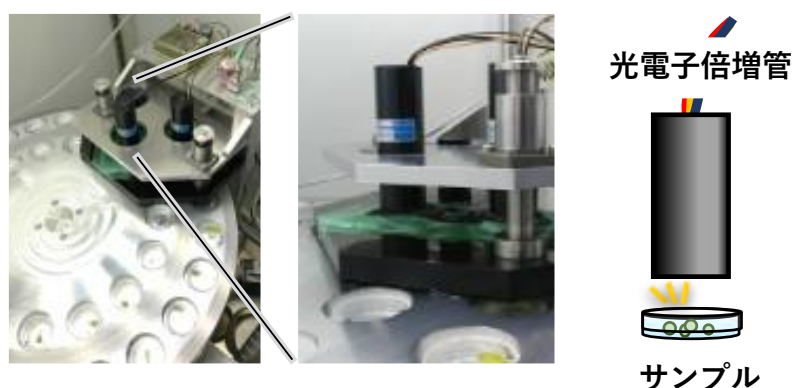
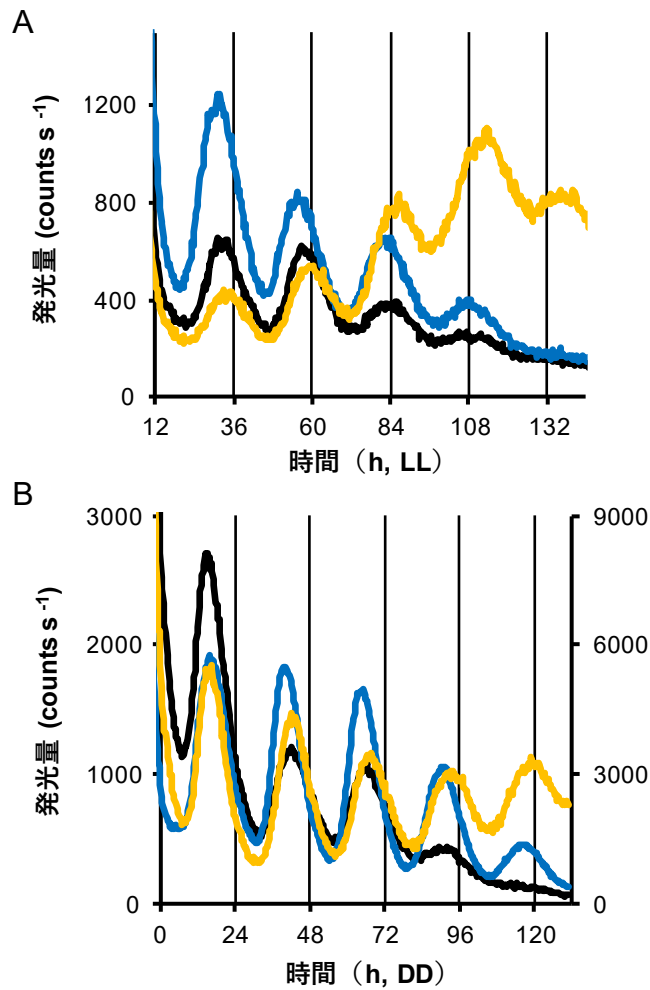


図 6 プレート発光測定装置を使用した生物発光測定法

プレート発光測定装置内の 35 mm ディッシュは 20 分ごとに光電子倍増管の下に移動し、ディッシュ内の総発光量が測定される。最大 40 サンプルの発光を自動的に測定することができる。

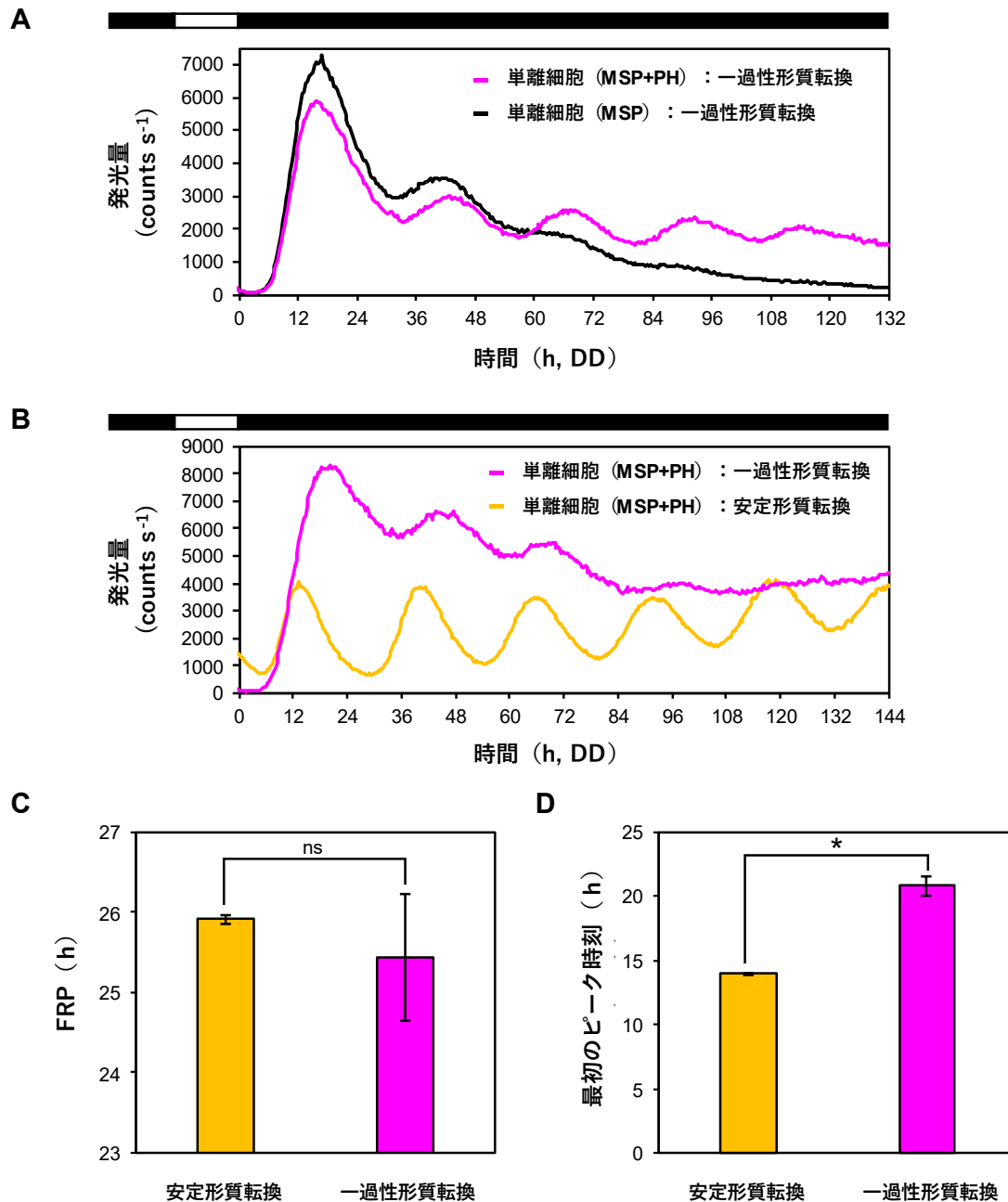


**図 7 恒明・恒暗条件下における *CCA1::LUC* 形質転換シロイヌナズナの葉から単離したプロトプラスト由来細胞の発光概日リズム**

MSP+PH 培地 (黄線)、MSP 培地 (黒線)、W5 培地 (青線) 中のプロトプラスト由来の細胞集団の発光概日リズム。実験スキームは図 5B を参照。パネル A の時間は、プロトプラストを分離するまでの時間を含めた恒明条件 (LL) になってからの時間を示している。パネル B の時間は、恒暗条件 (DD) に移ってからの時間を示している。B の W5 培地 (青線) における発光概日リズムは、右のスケールで図示されている。発光測定のために 3 サンプルずつ用意し、一例として試料の一つのデータを示している。

## PEG 法によるプロトプラストへの一過的な形質転換

前述の単離細胞の発光概日リズム測定系では、あらかじめ概日発現発光レポーターが形質転換された植物体からプロトプラストを単離することで、迅速に安定した実験系で単離細胞の概日リズムを測定することができる。一方で、植物体に外来遺伝子を導入し、ゲノムに組み込まれる必要があるため、形質転換された植物体の作出に時間を要する。プロトプラストに直接外来遺伝子を導入する形質転換法においても MSP+PH 培地において長期測定できるかを確かめるために、PEG 法によってプラスミド DNA (*CCA1::LUC* レポーター) をプロトプラストに一過的に導入した (図 8)。その結果、MSP 培地の単離細胞集団の概日リズムは急激に減衰し、発光量は低下した (図 8A)。一方で、MSP+PH 培地では 5 日以上、単離細胞集団の概日リズムが持続した。すでに形質転換された植物から単離された細胞集団 (安定形質転換) とプロトプラストに一過的に形質転換した細胞集団 (一過性形質転換) の概日リズムの周期を Fast fourier transform–nonlinear least squares (FFT-NLLS) 法によって算出し、概日リズムの周期を比較すると、安定形質転換と一過性形質転換で有意な差は見られなかった (図 8BC)。安定形質転換と一過性形質転換の間で、単離細胞集団の概日リズムの周期に違いは見られなかったが、恒暗条件に移行してから最初に検出される概日リズムのピーク時刻は有意に異なっていた (図 8D)。一過性形質転換では発現するまでに時間を要していると推測される。一過性形質転換に比べて安定形質転換の単離細胞集団の概日リズムの振幅は高かった (図 8B)。単離細胞集団の概日リズムの最初のピーク時刻や振幅に違いが見られたものの、PEG 法による一過的な形質転換法によっても単離細胞集団の概日リズムを長期的に測定することができたため、MSP+PH 培地はシロイヌナズナ葉から単離したプロトプラスト由来細胞の概日リズム測定に有用であると結論付けた。



**図 8 PEG 法による *CCA1::LUC* レポーターを一過的に形質転換したプロトプラスト由来細胞の発光概日リズム**

(A) MSP 培地 (黒線) と MSP+PH 培地 (紅紫線) における発光概日リズム。(B) プロトプラストに一過的に形質転換した時の発光概日リズムと形質転換された植物からプロトプラストとして単離した時の発光概日リズム。発光測定のために 3 サンプルずつ用意し、一例として試料の一つのデータを示している。(C) FFT-NLLS によって算出した周期 (Free-running period: FRP)。(D) 恒暗条件 (DD) になってから最初に検出されるピーク時刻。\* $p < 0.05$  : Student's  $t$  test. ns = not significant.  $n = 3$ 。

## 光条件による単離細胞の概日リズムの周期長変化

恒明・恒暗条件において MSP+PH 培地の単離細胞集団の概日リズムが持続した (図 7)。先行研究において単離細胞集団の概日リズムが持続することがすでに報告されている W5+FBS 培地 (W5 培地に Fetal bovine serum を添加した培地) においても概日リズムが持続するかどうかを確かめたところ、恒明・恒暗条件下でそれらの概日リズムが持続することが確認できた (Kim and Somers, 2010) (図 9AB)。次にリズム特性の一つである概日リズムの周期を概日リズムが持続する 2 種類の液体培地で調べた (図 9C)。単離細胞集団の概日リズムの周期を評価するために単離する前のシロイヌナズナの葉 1 枚を液体培地である NF 培地 (Muranaka et al., 2015) に浮かべ概日リズムを測定した (波形データは載せていない)。液体培地である NF 培地に浮かべた切り取った葉の概日リズムの周期と単離細胞集団の概日リズムの周期を比較すると、恒明・恒暗条件ともに単離細胞集団の概日リズムの周期が長くなっていた (図 9C)。組成の異なる 2 種類の培地における単離細胞集団の概日リズムの周期が長周期化していたため、培地の栄養素の問題ではなく、浸透圧を変えた培地による影響、もしくは組織・器官における個々の細胞の周期が他の細胞などによって変調されていることが理由であると推測される。興味深いことに、切り取った葉の周期は恒暗条件に比べて恒明条件の方が有意に短周期であるのに対して、単離細胞集団の概日リズムの周期は恒暗条件に比べて恒明条件の方が有意に長周期であった (図 9C)。プロトプラストとして単離された細胞は、プロトプラスト状態が維持されるのではなく、細胞壁が再生されることが報告されている (Tiew et al., 2015)。実際に光学顕微鏡下で別々の単離細胞を観察した一例を図 10 に示した。MSP+PH 培地では細胞分裂過程を想起させる細胞形態が観察され、W5+FBS 培地では細胞の肥大が観察された。恒明条件下の方が分裂過程のような細胞形態が観察される傾向にあったが、主に MSP+PH 培地では細胞分裂過程を想起させる細胞形態が、W5+FBS 培地では肥大した細胞形態が観察された。そのため、図 9C で示された周期の変化は培地 (MSP+PH 培地と W5+FBS 培地) ごとに異なる細胞の形態変化が原因ではなく、葉肉プロトプラスト由来細胞自身の概日時計の性質であると考えられる。



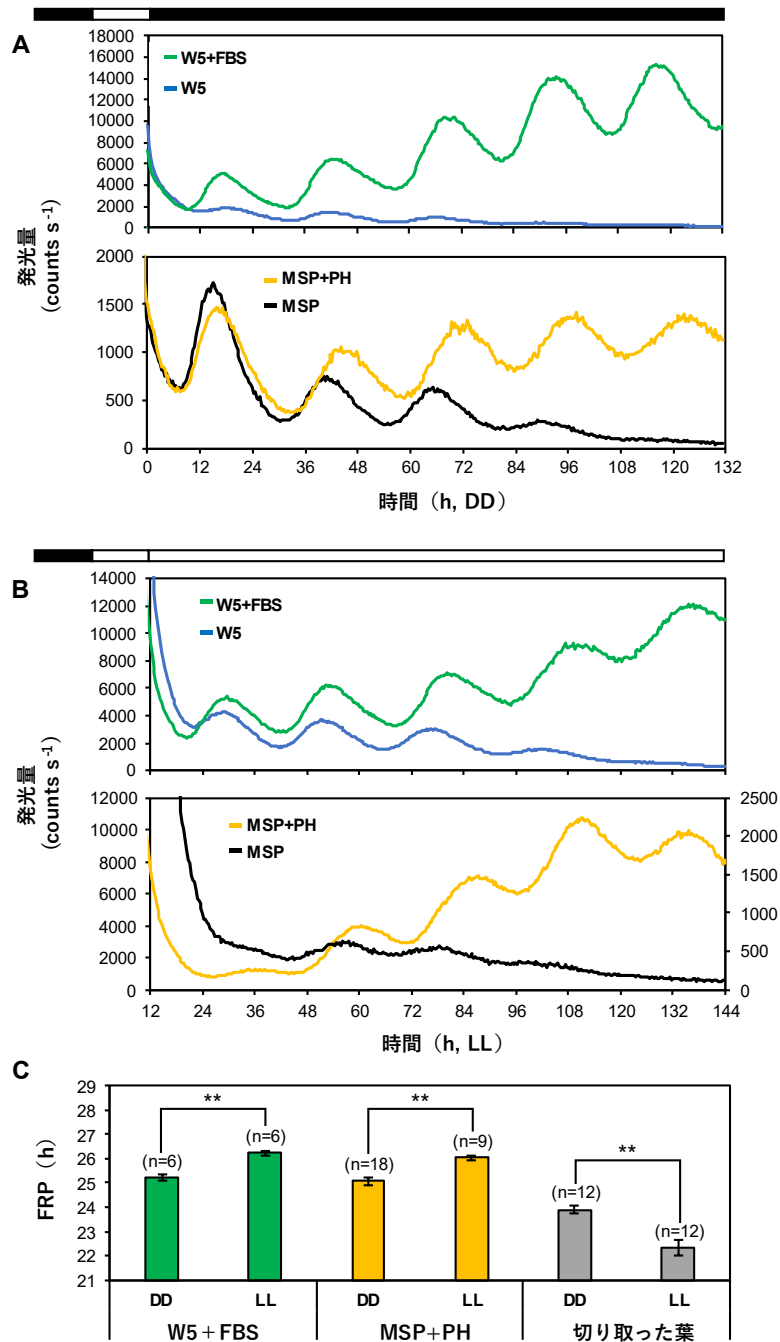


図9 恒明・恒暗条件における発光概日リズムの周期長の変化

恒暗 (A) と恒明 (B) 条件での各培地におけるプロトプラスト由来細胞の発光概日リズム。W5+FBS 培地 (緑線)、W5 培地 (青線)、MSP+PH 培地 (黄線) MSP 培地 (黒線)。発光測定のために 3 サンプルずつ用意し、一例として試料の一つのデータを示している。

(C) FFT-NLLS によって計算した周期 (Free-running period: FRP)。切り取った葉は NF 培地に浮かべた (Muranaka et al., 2015)。\*\* $p < 0.01$  : Student's  $t$  test。

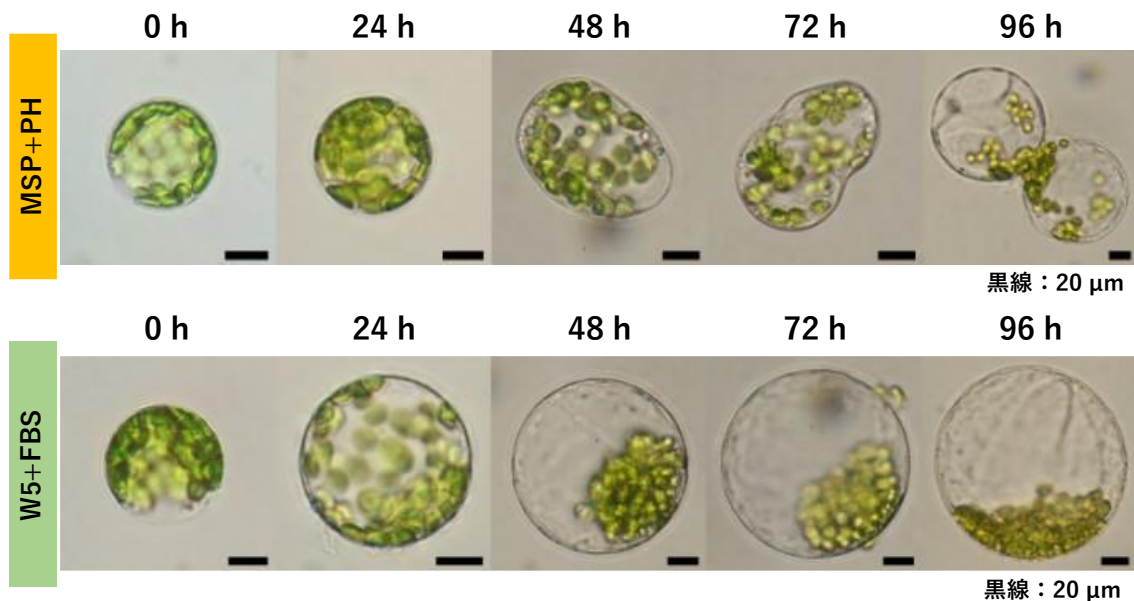


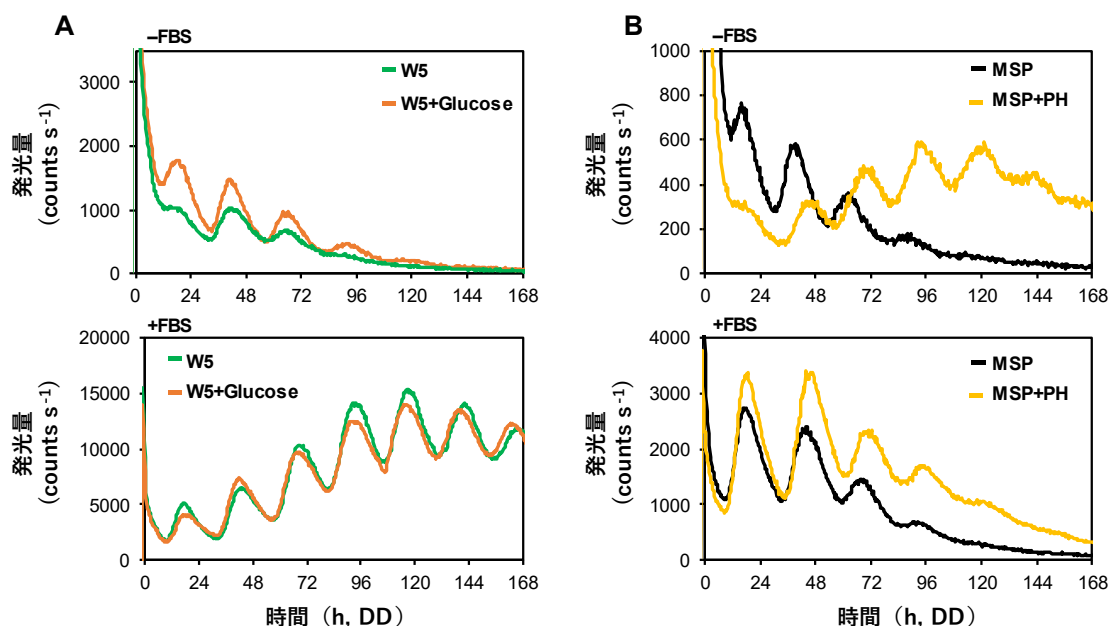
図 10 概日リズム持続培地における葉肉プロトプラストの形態変化

*CCA1::LUC* 形質転換シロイヌナズナの葉から単離した細胞を各培地（MSP+PH：上、W5+FBS：下）に加え、24 時間おきに別々の細胞を光学顕微鏡で観察した。各試料の代表的な変移がわかる一例を示した。黒線は 20 μm である。

### FBS 添加による単離細胞の概日リズムの持続

MSP+PH 培地は、Murashige and Skoog (MS) 培地用混合塩類をもとに調整した培地で、添加されている物質が全てわかっている完全合成培地である。W5+FBS 培地は、3 種の塩類に FBS を添加しているが FBS の正確な組成がわかっていないため不完全な合成培地である。FBS によって単離細胞集団の概日リズムが持続される原因を推測するため、グルコース存在下での FBS 添加の影響を確かめた (図 11A)。FBS はウシ胎児から得られた血清で、ロットによって異なるが一般的にタンパク質、電解質、グルコースなどの糖類、酵素などが含まれている。FBS に含まれるグルコースは植物にとっても直接の栄養となる可能性がある。FBS に含まれるグルコースが単離細胞集団の概日リズムの持続に関与するかどうかを確かめるため、グルコース (最終濃度 5 mM) を W5 培地に添加した (図 11A 上段)。グルコースが添加された培地 (W5+Glucose 培地) において単離細胞集団の概日リズムの持続性に影響は見られなかったが、グルコース添加によって単離細胞集団の発光量自体は増加していた。また、W5 培地とグルコースが含まれている W5 培地に FBS を添加してもリズムの持続性や周期に違いは見られなかった (図 11A 下段)。そのため FBS に含まれているグルコースが単離細胞集団の概日リズムの持続に寄与している可能性は極めて低かった。

次に、MSP 培地と MSP+PH 培地に FBS を添加した (図 11B)。前述のように MSP 培地に植物ホルモンを添加した MSP+PH 培地では概日リズムが持続した (図 11B 上段)。MSP 培地と MSP+PH 培地に FBS を添加すると発光量自体は大きく増加したが、概日リズムは減衰し、発光量は急激に低下した (図 11B 下段)。概日リズムの持続が見られていた MSP+PH 培地に FBS を添加すると単離細胞集団の概日リズムが持続しなかったため、FBS による単離細胞集団の概日リズムの持続は培地の組成に影響を受けることが明らかとなった。



**図 11 培地組成依存的な FBS 添加による概日リズムの持続効果**

(A) W5 培地 (緑線) とグルコースを添加した W5 培地 (橙線)、(B) MSP 培地 (黒線) と MSP+PH 培地 (黄線) における FBS 添加がプロトプラスト由来細胞の発光概日リズムに与える影響。発光測定のために 3 サンプルずつ用意し、一例として試料の一つのデータを示している。

## 細胞密度依存的な単離細胞集団の発光概日リズムの持続性

*CCA1::LUC* 形質転換シロイヌナズナの葉から単離した細胞集団の概日リズムは培地条件の改良によって6日間以上測定することが可能になった (図 9)。次に細胞密度と概日リズムの持続との関係性を調べた。葉から単離した細胞集団の細胞密度を変えて、それぞれ MSP+PH 培地に加え、恒暗条件下で単離細胞集団の発光概日リズムを測定した。単離細胞集団の概日リズムが1週間以上持続する培地 (MSP+PH 培地) において、5日目から単離細胞の濃度によって概日リズムの持続性に違いが生じた (図 12)。細胞密度と概日リズムの関係を調べた結果、単離細胞集団の細胞密度が  $2.5 \times 10^4$  cell/ml では6日目以降で概日リズムが減衰し、 $5.0 \times 10^4$  cell/ml では11日以上においても概日リズムが減衰しなかったため、単離細胞の細胞密度が概日リズムの持続性に影響することが示された。これらの結果から、プロトプラストとして単離した細胞集団の概日リズムを持続させるためには、浸透圧の調整やショ糖などの糖類の添加以外の物質的な要素が重要になっていると考えられた。本論文において具体的な物質を明らかにすることはできていないが、第3章でもこの作用について触れている。

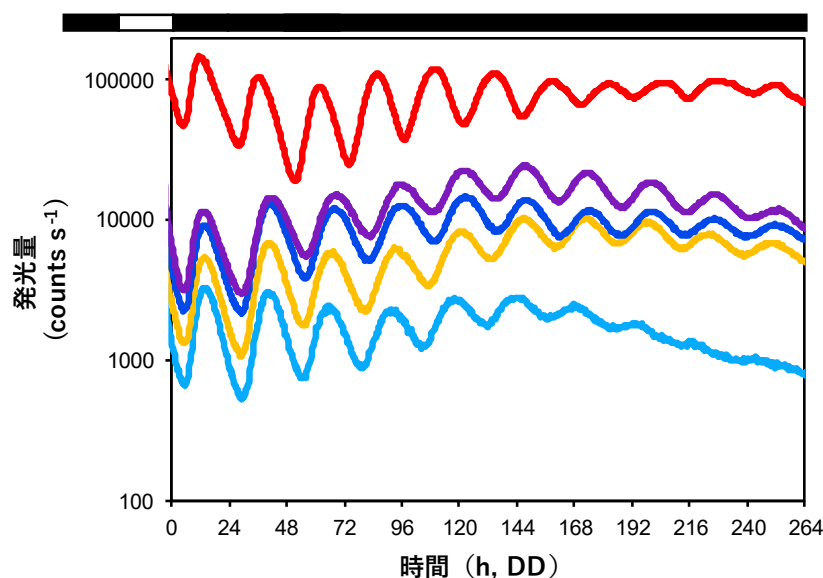


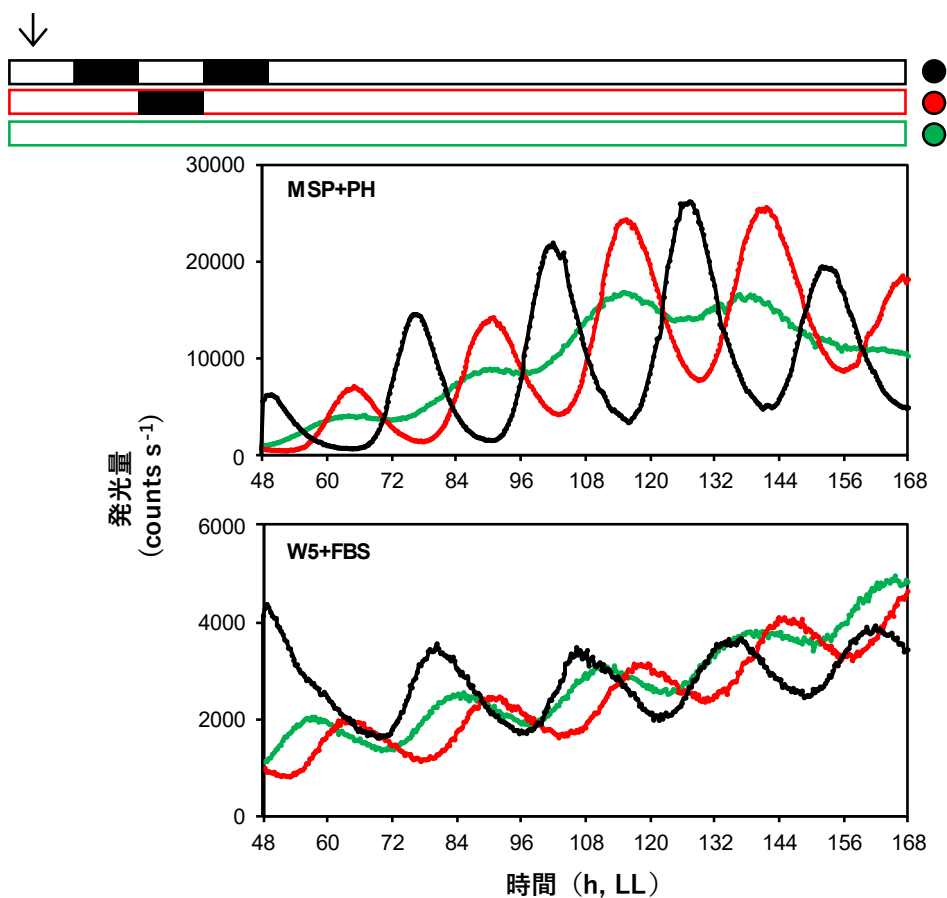
図 12 恒暗条件下での発光概日リズムの長期測定

培地に添加する細胞の数を変えた時の単離細胞の発光概日リズム。細胞密度はそれぞれ、 $1 \times 10^5$  cell/4 ml (水色線)、 $2 \times 10^5$  cell/4 ml (黄線)、 $4 \times 10^5$  cell/4 ml (青線)、 $6 \times 10^5$  cell/4 ml (紫線) に MSP+PH 培地中で調整した。赤線は NF 培地に浮かべた切り取った葉における *CCA1::LUC* の発光概日リズムを示した。発光測定のために3サンプルずつ用意し、一例として試料の一つのデータを示している。

## 12 時間の暗期による単離細胞集団の概日リズムの位相リセット

MSP+PH 培地と W5+FBS 培地を用いることでシロイヌナズナの葉から単離した細胞集団の概日リズムを長期的に観測することが可能となった (図 9)。次に単離細胞集団の概日時計に対する光応答性を調べた。先行研究においてシロイヌナズナの葉から単離したプロトプラストに概日発現発光レポーターを導入することで、プロトプラストの概日リズムを測定できることが知られていたが、単離細胞集団が光応答し概日リズムの位相を調節するかどうかは明らかになっていなかった (Kim and Somers, 2010)。CCA1 の遺伝子発現や CCA1::LUC レポーターの発光解析から CCA1 遺伝子は朝方 (明期の初め) に発現のピークを示すことが知られている (Nakamichi et al., 2005)。CCA1::LUC 形質転換シロイヌナズナの葉から単離した細胞集団を各培地 (MSP+PH、W5+FBS) に加え、単離前の植物体の時に与えられていた 12 時間明期/12 時間暗期の明暗サイクルの暗期にあたる時間に 12 時間暗期処理を 2 回行ったサンプル (順相に 12 時間暗期) と明期にあたる時間に 12 時間暗期処理を 1 回行ったサンプル (逆相に 12 時間暗期) と単離後に未処理のサンプル (暗期なし) を用意した (図 13)。明暗刺激の有無にかかわらず前述と同様に MSP+PH 培地中と W5+FBS 培地中のどちらの単離細胞集団においても単離後から 168 時間以上、恒明条件下で概日リズムが持続した (図 13)。さらに、12 時間暗期によってそれらの概日リズムの位相がリセット (外界の刺激によって概日リズムの位相が完全に同調) し、12 時間近く概日リズムのピーク時刻をずらした (図 13)。これらの結果から、シロイヌナズナの葉から単離した細胞が光に応答し、概日リズムの位相をリセットできることを明らかにした。

明暗サイクルの逆相にあたる時刻に単離細胞群を 12 時間の暗期処理を行うと、W5+FBS 培地中の単離細胞集団の概日リズムの振幅に変化は見られなかったが、MSP+PH 培地中の単離細胞集団の概日リズムの振幅は、未処理の恒明条件下の概日リズムの振幅に比べて大きくなっていた (図 13)。単離細胞集団の概日リズムの振幅の増加は 12 時間暗期に対して同調した細胞の数を反映していると考えられるため、W5 培地に比べて MSP+PH 培地中の単離細胞集団の概日リズムは 12 時間暗期に対して同調しやすく、培地によって単離細胞の概日リズムの光応答性が変化する可能性が考えられた。概日リズムの光応答性は、刺激が与えられる位相によって影響度が大きく変わるため、培地と光応答性の影響を詳細に調べるためには異なる概日リズムの位相に暗期刺激を与えて概日リズムの位相シフトを確かめること (位相応答実験) が今後重要になると考えている。



**図 13 明暗シグナルに対する概日リズムの同調能**

異なる明暗刺激を与えられた単離細胞の発光概日リズム [MSP+PH 培地 (上) と W5+FBS 培地 (下)]。各試料の明暗条件をグラフ上部に示した (黒丸、赤丸、緑丸)。12 時間の暗期を黒色の箱で示し、プロトプラストを単離したタイミングを矢印で示した。プロトプラスト単離前の植物に対して [図 5B](#) で示すように、2 回の 12 時間暗期処理を行った。発光測定のために 3 サンプルずつ用意し、一例として試料の一つのデータを示している。

## 考察

第 1 章では、シロイヌナズナの葉から単離した細胞を用いた発光概日リズムを観測するための培地と測定条件の確立を目指した。CCA1::LUC形質転換植物 (Nakamichi et al., 2004, 2005) の葉からプロトプラストとして単離された細胞の発光を W5 培地で時系列測定したところ、概日リズムを検出することはできたが、3 日程度で発光量が減少したため、長期的に単離細胞の概日リズムを解析できる条件を探する必要があった (図 7)。W5 培地に FBS (ウシ胎児血清) を添加 (Kim and Somers, 2010)、もしくは MSP 培地に植物ホルモンを添加することによって細胞集団の発光概日リズムは 10 日以上持続させることができた (図 9)。

先行研究において、シロイヌナズナから単離したプロトプラストにプラスミド DNA (概日発現発光レポーター) を一過的に形質転換 (PEG 法) することによって、単離細胞集団の概日リズムを測定できることが報告されている (Kim and Somers, 2010)。W5 培地に FBS を添加することで、プロトプラストの概日リズムを長く測定することができる。しかし、FBS の組成は複雑であり、その作用機序については全く分かっていない。W5+FBS 培地に加えて、MSP+PH 培地で単離細胞の概日リズムの長期測定に成功した。植物ホルモンであるオーキシシンとサイトカイニンがプロトプラストの生育維持に必須であることが知られており (Davey et al., 2005)、部分的なプロトプラストの脱分化を引き起こすことで長期間の生存に繋がっていると考えられる。特にオーキシシンは植物の発生に深く関与しており、細胞の膨圧、液胞の機能、分裂の基礎となる微小管の動態制御において重要視されている (Sablowski, 2016)。MSP+PH 培地は、培地の組成が完全にわかっている合成培地であり、W5+FBS 培地は血清に何が含まれているかを把握できない半合成培地である。そのため、完全合成培地である MSP+PH 培地を使用することで、化学物質添加などの薬理実験や栄養欠乏実験などによる単離細胞の概日リズムへの影響を調べることができると期待している。

今回の実験手順では、あらかじめ発光レポーターが形質転換されたシロイヌナズナから細胞を単離することによって、プロトプラストを単離してすぐに測定を開始することができる。そのため、簡便で迅速に発光能を有するプロトプラストを準備することができ、かつ長期測定の再現性を得る上で必要な細胞の均質性を保障しやすいと考えている。

W5+FBS 培地、特に FBS の添加は単離細胞の発光量を増加することができたため、各細胞自体からの発光量も増加していると推測できる。第 2 章と第 3 章では、個々の細胞を検出する必要があるため、発光量が増加した W5+FBS 培地における単離細胞の発光概日リズムの解析を試みた。加えて長期測定において細胞密度が重要であることも示された (図 12)。細胞密度の効果については第 3 章で詳細に解析した。

単離細胞集団の発光概日リズムを長期間測定できる実験系を確立することで、第1章の目的である単離細胞を用いた発光概日リズム解析の実験基盤を整備できたと考えられる。



## 材料と方法

### 植物と生育条件

実験にはシロイヌナズナ植物 (*Arabidopsis thaliana*) を使用した。シロイヌナズナは野生型 *Arabidopsis Columbia* (Col-0) エコタイプと、既に報告されている *CCA1::LUC* 形質転換シロイヌナズナ (Col-0) (Nakamichi et al., 2004, 2005) を用いた。概日発現発光レポーターである *CCA1::LUC* はシロイヌナズナの *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* 遺伝子のプロモーター領域と翻訳開始点から第 4 エキソンの一部までを含んだ DNA 配列にホタルルシフェラーゼ (*LUC+*) が結合している。

シロイヌナズナの培養は以下の操作で行った。シロイヌナズナの種子を必要量 1.5 ml チューブに取り、70%エタノールで洗浄した。1.5 ml チューブから溶液を取り除き、種子滅菌溶液 [5%ブリーチ (白物衣料専用)、0.05% Triton x-100] を加え 10 分間置き、種子を滅菌処理した。滅菌した種子を滅菌水で 3 回洗浄した。チューブに滅菌水を 1 ml 加え、4°Cの暗所で 2 日間低温処理した。滅菌水を取り除き、0.1% Agarose 1 ml を加えた。植物プレート [1%ショ糖入りの 0.5×MS (Murashige and Skoog) 培地 (0.8% agar)] に種子を播き、連続光条件下 ( $32 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 22°C) で生育させた。光源は 3 波長型昼白色蛍光灯 (NEC FLR40SEX-N / M-HG) を使用した。

### シロイヌナズナ葉からのプロトプラスト単離と培養

プロトプラストは 3—4 週間無菌状態で生育させたシロイヌナズナのロゼット葉から単離した。プロトプラストを単離する前に、それらの植物体に対して 2 回の 12 時間明期/12 時間暗期処理を行い、概日リズムを同調させた。プロトプラストの単離は先行研究の方法を一部改変した (Yoo et al., 2007)。光点灯から 3—4 時間後の植物体の葉を 50 枚切り取り、細かく切り刻んだ。酵素処理はそれらの切片を 20 ml の酵素液 [400 mM mannitol、20 mM KCl、20 mM MES-KOH (pH 5.7)、10 mM CaCl<sub>2</sub>、1% Cellulase R10、0.54% Macerozyme R10、0.1% BSA、0.1 mM luciferin] に入れ、弱光条件下 (25°C) で 3 時間振盪することで行った。プロトプラストは 70  $\mu\text{m}$  ナイロンメッシュで濾し、遠心分離 (500×g、2 分間、22°C) によって回収した。プロトプラストの沈殿は 45 ml の W5 溶液 [154 mM NaCl、125 mM CaCl<sub>2</sub>、5 mM KCl、1.5 mM MES-KOH (pH 5.7)] で 2 回洗浄した。沈殿を 4 ml の W5 溶液に再懸濁し、1 ml ずつ分注し、再度遠心分離 (100×g、3 分間、22°C) 後、0.1 mM ルシフェリン入りの液体培地に再懸濁した。液体培地は、W5 溶液、W5+FBS 溶液 [W5 溶液に 5% Fetal bovine serum (FBS) を添加] (Kim and Somers, 2010)、MSP 培地 [1×MS salts、1% sucrose、400 mM mannitol、2 mg/L glycine、100 mg/L myo-inositol、3 mg/L thiamin hydrochloride、5 mg/L nicotinic acid、0.5 mg/L pyridoxine hydrochloride、

1.5 mM MES-KOH (pH 5.7)] (Fukazawa et al., 2014; Satoh et al., 2004)、MSP+PH 培地 [MSP 培地に植物ホルモン (1  $\mu$ M NAA (1-Naphthaleneacetic Acid)、0.2  $\mu$ M kinetin) を添加] を使用した。

### 生物発光測定装置による発光概日リズムの測定

生物発光の測定は、プレート発光自動測定装置を用いた (Miwa et al., 2006)。この装置では 20 分毎に光電子倍增管 (H7360-01 浜松ホトニクス) により 35 mm ディッシュ全体から発生する光子数をカウントする。プロトプラストから単離した細胞集団を 35 mm ディッシュ内の液体培地に加えた。シロイヌナズナから切り取った 1 枚の葉を 35 mm ディッシュ内の液体培地 (NF 培地) (Muranaka et al., 2015) に浮かべた。測定装置は人工気象器 (NK system KCLP-1000I-CT) の中に設置され、約 30  $\mu$ mol  $m^{-2} s^{-1}$  の 3 波長型昼白色蛍光灯 (NEC FLR40SEX-N / M-HG) 下で稼動した。植物の自家蛍光を除去するために波長が 630 nm 以上の光をカットするフィルター (SVO630 朝日分光) を光電子倍增管に装着している。

### 概日リズムの周期の算出

概日リズムの周期は Fast fourier transform–nonlinear least squares (FFT-NLLS) 法を用いて推定した (Zielinski et al., 2014; Muranaka and Oyama, 2016)。試料を暗期から明期もしくは明期から暗期に切り替わり後 24 時間から 96 時間のデータを対象に周期を算出した。24 時間移動平均を減算することでトレンドを除去してデータを解析した。

### 概日リズムのピーク抽出

生物発光リズムのピーク時刻は、2 時間移動平均フィルター処理をした生物発光変動のデータに対して局所的 (6 時間の範囲) に二次関数をフィッティングさせることで抽出した (Muranaka and Oyama, 2016)。

### PEG 法によるプロトプラストへの一過的な形質転換

シロイヌナズナ (Col-0) の葉から単離したプロトプラストに MMg 溶液 (0.4 M マンニトール、15 mM  $MgCl_2$ 、4 mM MES) を添加し、その後、プラスミド DNA (*pUC18-CCA1ex4::LUC+*) と PEG 溶液 (40%PEG-4000、200 mM マンニトール、100 mM  $CaCl_2$ ) を加えた。その後、W5 溶液を加え、100 $\times$ g で 3 分間遠心し、それぞれの培地を加えた。

## 発光画像の取得

*CCA1::LUC*形質転換植物から切り取った葉と単離した細胞集団の発光画像を EM-CCD カメラ (ImagEM C9100-13 ; Hamamatsu Photonics、<http://www.hamamatsu.com/>) を用いて取得した。カメラにはマクロレンズ (Schneider 社製、f0.95/25mm) をとりつけた。レンズには、葉緑体由来の赤色自家蛍光を除去するためのカットフィルタ (SPF630 朝日分光) が装着されている。

## 第 2 章

# 単一単離細胞の発光概日リズム測定系による葉と根由来細胞の概日リズムの三大性質の解析

### 導入

概日時計システムによって、約 24 時間周期のリズム（概日リズム）が生み出されている。概日時計を構成する因子や仕組みは生物種によって様々であるが、時間を計る機構として三つの基本的な性質を備えている（Pittendrigh, 1960）。一つ目の性質である「自由継続性」は、外部環境の変化がない恒常条件において約 24 時間周期のリズムを自律的に継続する性質である。自由継続性によって、生物は刺激を受けてから対応するのではなく、あらかじめ環境変動を予測し準備しておくことができる。二つ目の性質である「温度補償性」は、概日リズムの周期が酵素反応に比べて温度の影響を受けにくい性質である。生物の体内で起こる生理現象は酵素反応が関与しているが、酵素反応は一般的に温度に依存しており、温度が 10°C 上昇すれば反応速度は 2—3 倍になることが知られている（Dunlap et al., 2004）。もし温度によって概日リズムの周期が大きく変わると、温度が変化することによって生物が認識する一日の長さは大きく変わってしまい、時間を正確に計ることはできなくなってしまう。温度補償性を有することによって、生物は異なる温度下においても正確に時を刻むことができる。三つ目の性質である「同調性」は、光や温度などの刺激によって概日リズムの位相（概日時計の時刻）を調整することができる性質である。概日システムが外部からの刺激が入らない閉じた系であると、生物が有する概日リズムの周期と 24 時間の昼夜サイクルなどの外部環境が完全に一致していない場合、生物内の概日時計と外部環境が乖離してしまう。同調性によって、生物は外部環境と概日時計のズレを認識し、外部環境に合わせて概日時計を調整することができる。そのため、概日時計は外部環境からの入力に対する応答性を持ちつつ、一定の周期性を保持する必要がある。

概日時計によって生じる概日リズムは植物だけでなく、他の生物種においても観測されている。哺乳類の概日時計は、転写—翻訳フィードバックループによって構成されており、時計遺伝子の発現を 24 時間周期で振動させる。その結果、細胞や生物レベルの行動が変化する。哺乳類の多くの組織の細胞は、生体から取り出して培養しても時計遺伝子の発現リズムが自由継続するため、全身の細胞は概日時計を有していると考えられている（Mohawk et al., 2012）。これらを末梢時計と呼び、各組織において位相や周期の異なる概日リズムを生み出す。哺乳類の場合、個体レベルの概日リズム形成には間脳視床下部の視交叉上核が重要な役割を果たしている（Mohawk et al., 2012; Hastings et al., 2018）。視交

又上核のように個体の概日リズム形成に支配的な概日時計を中枢時計と呼び、中枢時計は神経連絡などによって末梢時計を制御する。中枢時計と末梢時計はそれぞれに特異的な環境因子（同調因子）によって直接制御される。培養した組織の末梢時計は、高濃度の血清の添加などによって概日時計の時刻が調整されるが、光受容体を有していないため光刺激による直接的な調節は受けない（Damiola et al., 1998; Mohawk et al., 2012）。個体の概日リズムの同調にとって、光刺激は重要なシグナルであるが、光刺激による概日時計の時刻調整は中枢時計によって行われる。哺乳類の概日時計は、中枢時計である視交叉上核の概日時計が末梢組織の概日時計を調整するように階層的に配置されている。植物の概日時計も同様に個々の細胞における時計遺伝子の転写—翻訳フィードバックループにもとづいている（Nohales and Kay, 2016）。一方で、植物にとっても主要な概日時計への入力シグナルである光を受容する光受容体は、植物体全体で発現していることが報告されている（Toth et al., 2001; van Gelderen et al., 2018）。これらのことから、植物は個々の細胞に概日時計を有し、環境刺激に対して個々の細胞自身が応答して、概日時計の時刻を調整することができると考えられる（図 14）。実際に、第 1 章において、プロトプラストとして単離した葉肉細胞が明暗刺激によって概日時計の時刻を調整できることを明らかにしており、植物の細胞時計の高い独立性を支持する結果を得ている。

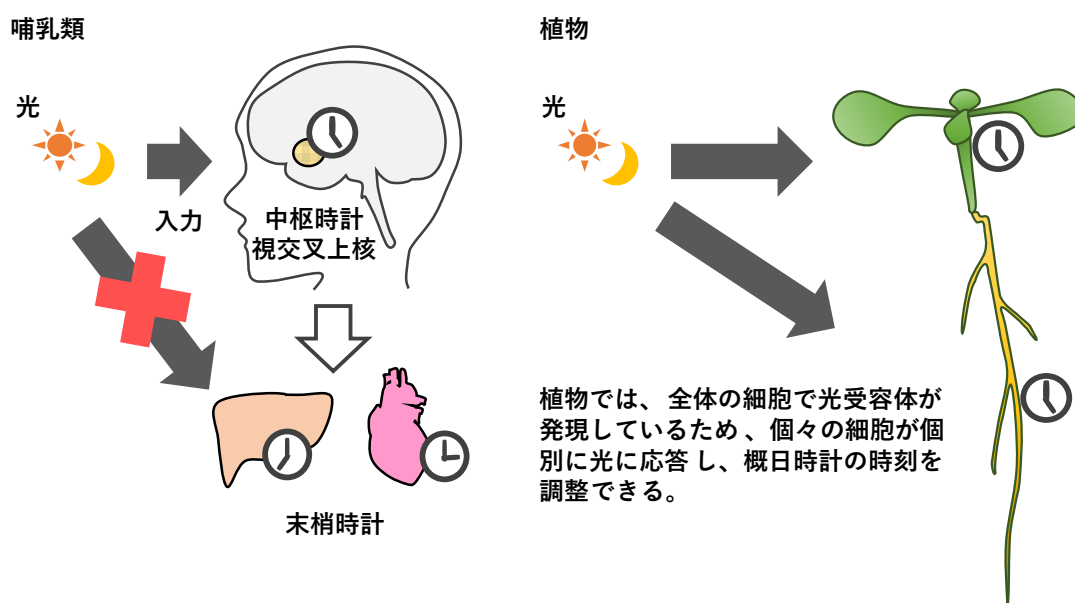


図 14 哺乳類と植物における概日時計への光入力経路

哺乳類の概日時計では、目で光を受容することによって、中枢時計の時刻が調整され、その後末梢時計の時刻が調整される。植物の概日時計では、植物体全体の細胞で光を受容し、時刻が調整される。

哺乳類の中樞時計と末梢時計のような明確で強固な階層性はないものの、植物の概日時計においても地上部から地下部の概日時計の制御など部分的な階層性がある (James et al., 2008; Endo et al., 2014; Takahashi et al., 2015)。また、シロイヌナズナの葉や根などの器官内において近傍細胞で概日時計の時刻が揃っていることが報告されており (Fukuda et al., 2007; Wenden et al., 2012; Greenwood et al., 2019)、植物体内における細胞時計は周りの組織や細胞からの影響を受けて相互同期していると考えられる。つまり、葉や根の概日時計は、周りの組織や細胞の影響を受ける細胞時計の集合体であると捉えることができる。一方で、双子葉植物の片方の子葉をアルミホイルで12時間おきに遮光し、もう片方の子葉を12時間ずらして遮光することによって、12時間位相の異なる概日リズムが生成されることが示されている (Thain et al., 2000)。その後、恒明条件下の各子葉において12時間位相の異なる概日リズムが持続されることが示された (Thain et al., 2000)。また、自然環境では、植物の根は土壌中に存在しているため、植物の地上部である葉に比べて光刺激にさらされにくい、恒暗条件下の根は光ファイバーのように維管束を通る微量な光を受容し、根の概日時計の時刻を調整できることが報告されている (Lee et al., 2016; Nimmo, 2018)。植物体の概日時計は、器官・組織・細胞間で時刻を統合する機能を有しているが、基本的には細胞自身が直接環境に適応する戦術を取っている。

植物の地上部と地下部の細胞では光や温度など全く異なる環境にさらされている。第2章では、葉と根由来の単離細胞を用いた単一細胞発光概日リズム測定系を確立し、その測定系を用いることで原形質連絡といった物質移動に関与する構造がない単離細胞においても概日時計の三大性質を満たしているかを調べた。独立性の高い植物の概日時計は、細胞種ごとに環境に適した概日時計を有している可能性がある。本章では、人工的な環境下ではあるが、プロトプラストとして単離した葉と根由来の細胞において解明された器官特異的な概日時計のシステムを報告する (図15)。

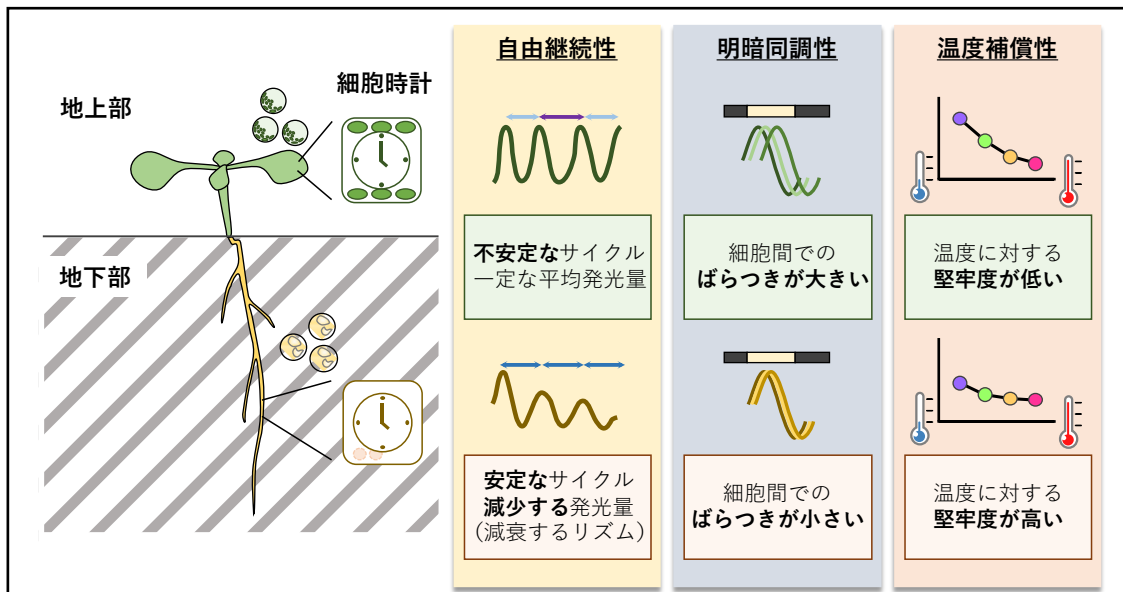


図 15 第 2 章のまとめ

植物の葉と根からプロプラストとして単離した細胞の概日リズムの特徴をまとめた。

## 結果

### 個々のプロトプラスト由来単離細胞の発光概日リズム測定系の確立

細胞自身が有する概日時計の性質を明らかにするために、プロトプラスト由来細胞の概日リズムを単一細胞レベルで観測できる発光モニタリングシステムを確立した (図 16)。第 1 章で確立された方法を参考にし、*CCA1::LUC* 形質転換シロイヌナズナ植物の葉と根からプロトプラストを調製した。葉から単離したほとんどのプロトプラストでは葉緑体が観察され、主に葉肉細胞であった (Nakamura and Oyama, 2018)。単離したプロトプラストを顕微鏡観察したところ、根から単離したプロトプラストのサイズは不揃いであった (図 16)。根のプロトプラストは異なる細胞種が含まれる不均一な集団であることが報告されている (Pettersson et al., 2009; Pasternak et al., 2021)。単離細胞の発光概日リズムを測定する際には、プロトプラストを単離する前に植物を 2 回の 12 時間明期/12 時間暗期 (2×LD) 処理を行い、植物の概日リズムを同調させた。各細胞の発光を個別に検出するためには、各細胞を分離して撮影するための高倍率の検出器が必要となる。そのため、顕微鏡付き高感度 EM-CCD カメラを使用して、プロトプラスト由来細胞の発光を測定した (図 16)。例として任意の細胞の発光画像を 1 時間おきに並べた画像を示した。約 1 日ごとに発光量が振動していることが確認できる。本論文では複数の条件における単離細胞の発光概日リズムを測定しているため、基準となる条件を定めた [プロトプラスト由来細胞 (葉由来細胞の場合は  $2 \times 10^4$  cell/4 ml、根由来細胞の場合は  $5 \times 10^4$  cell/4 ml) を 22°C の恒暗条件 (DD) の W5+FBS 培地で培養・測定した条件を「標準条件」とした]。

#### 概日リズム解析のための細胞の分類 (付録 1)

細胞の性質や概日リズムの特徴を解析するため、「概日リズム細胞 (グループ 0)」と「不完全リズム細胞 (グループ 1 と 2)」に分類した (図 17)。

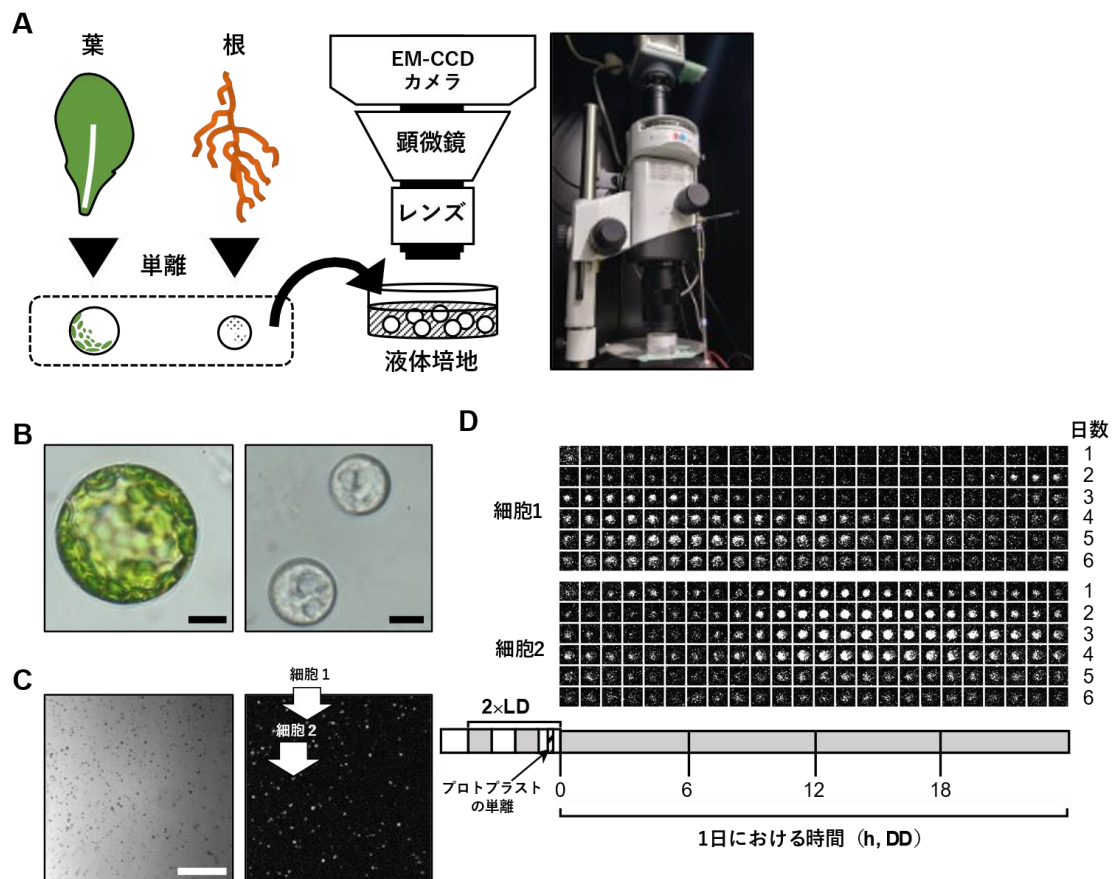
発光画像上で発光が重ならず、他の細胞とは発光を区別できる細胞を「発光検出細胞」とした。発光検出細胞の発光変動からピークを抽出できた細胞を「解析可能細胞」とした。

解析可能細胞を、①最初のピーク時刻 (測定開始から 24 時間)、②測定期間内の最後のピーク時刻 (108 時間以降)、③ピーク間隔 (35 時間未満) の 3 つの要素で分類した。

3 つ全ての要素を満たす細胞を「概日リズム細胞 (グループ 0)」とした。

1 つでも要素を満たさなかった細胞を「不完全リズム細胞 (グループ 1 と 2)」とした。不完全リズム細胞を、①最初のピーク時刻を満たし、③ピーク間隔 (35 時間未満) を満たさない細胞を「グループ 1」とした。①最初のピーク時刻を満たさない細胞を「グループ 2」とした。





**図 16** 個々のプロトプラスト由来細胞の生物発光を取得するための測定準備

(A) 発光画像測定系の概要。葉と根からプロトプラストとして細胞を単離し、単離細胞が入った培養液を 35 mm ディッシュに入れた。マクロズーム顕微鏡を装着した EM-CCD カメラを用いて発光画像を取得した。(B) 葉 (左) と根 (右) から単離したプロトプラスト。黒い棒は 10  $\mu\text{m}$ 。(C) 明視野画像 (左) と発光画像 (右)。タイムラプス撮影における発光画像の一例を示した。この発光画像は恒暗条件になってから 72 時間経過した葉から単離した細胞において 240 秒露光することで取得した。白い棒は 1 cm を表す。(D) 概日リズム細胞の発光変動の例 (パネル C の細胞 1 と 2)。生物発光測定の実験スケジュールを図下に示した。灰色の箱は暗期、白色の箱は明期を示す。

## 概日リズム解析のための細胞の分類

個々の単離細胞の発光を測定したところ、発光が測定時から測定終了まで検出できる細胞だけでなく、発光が測定下で観察されなくなる細胞や測定の途中で発光が検出される細胞が存在した。細胞の性質や概日リズムの特徴を解析するため、「概日リズム細胞（グループ 0）」と「不完全リズム細胞（グループ 1 と 2）」に分類した（[図 17](#)、[材料と方法](#)、[付録 1](#) を参照）。本論文では、測定期間中に不完全なリズムが部分的に見られた細胞を「不完全リズム細胞」と呼称し、その中においても概日周期を持続できなかった細胞を「グループ 1」に、測定初期に発光変動によるピークが検出されなかった細胞を「グループ 2」に分類した（[図 17](#)）。グループ 1 には測定中に不健康になった細胞や概日時計を止めた細胞を含み、グループ 2 には長周期の細胞や正確な位相応答が出来ないもしくは分化に伴って概日リズムを発振させた細胞を含むと思われる。

標準条件下では、葉と根の両方から単離された約 30%の解析可能細胞は、グループ 0 に分類された（[表 1](#)）。不完全リズム細胞と呼称しているが、グループ 1 とグループ 2 に分類された細胞は、ピーク間隔の中央値が約 23 時間であったため、約 24 時間周期（概日周期）の概日リズムの特性を部分的に保持していた（[表 1](#)、[図 18](#)）不完全リズム細胞のピーク間隔の分布は、概日リズム細胞の分布と類似しており、グループ 1 とグループ 2 の細胞が、測定中に概日リズムの持続性または位相調整が不完全になったことを示唆している（[表 1](#)、[図 18](#)）。第 2 章では、特に明記されていない限り、グループ 0 のみの細胞（概日リズム細胞）の生物発光リズムの結果を示す。

**表 1 標準条件下のプロトプラスト由来細胞の概日リズムの周期性のまとめ**

細胞の種類	細胞数 (%)		ピーク間隔 平均 ± SD (h) (中央値 ± *MAD)		**細胞の周期： 平均 ± SD (h) (中央値 ± *MAD)
	概日リズム 細胞	不完全リズム 細胞	概日リズム 細胞	不完全リズム 細胞	概日リズム 細胞
	葉由来細胞	80 (31.6)	173 (68.4)	22.9 ± 5.0 (23.3 ± 4.5)	24.7 ± 10.2 (23.3 ± 6.4)
根由来細胞	100 (36.6)	173 (63.4)	24.0 ± 3.0 (23.7 ± 2.5)	23.7 ± 4.2 (23.3 ± 3.0)	24.1 ± 1.9 (23.8 ± 1.5)

\*MAD：中央絶対偏差

\*\*細胞の周期：細胞概日リズムの平均ピーク間隔

葉由来細胞のデータは Exp1-3 の 3 回の測定の合計であり、根由来細胞のデータは Exp4-5 の 2 回の測定の合計である。詳細は資料 1 と 2 に記述してある。

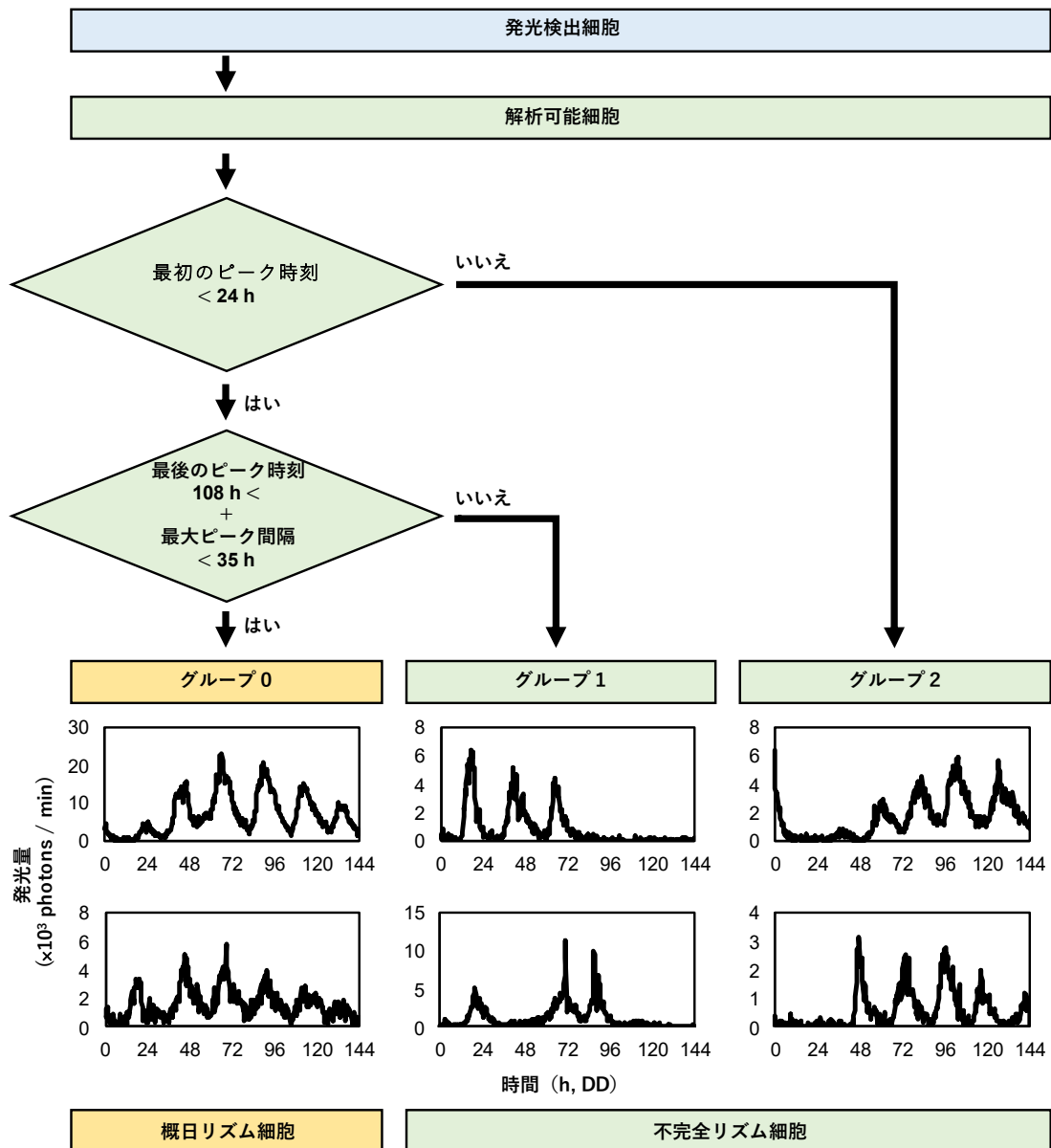


図 17 生物発光リズムの持続性による細胞の分類

他の細胞と発光が重ならない細胞を発光検出細胞とし、発光時系列にピークが検出された細胞を解析可能細胞とした。恒暗条件に移行してから24時間以内にピークのない発光リズムを示す細胞をグループ2に分類した。最初の24時間以内にピークが見られ、108時間以降に最後のピークが見られないもしくはピーク間隔が35時間以上の細胞をグループ1に分類した。最初のピークが見られ、ピーク間隔が35時間以下の細胞をグループ0（概日リズム細胞）とした。グループ1とグループ2は不完全なリズムが部分的に見られたため不完全リズム細胞とした。個々の細胞の生物発光リズムの例を示す。

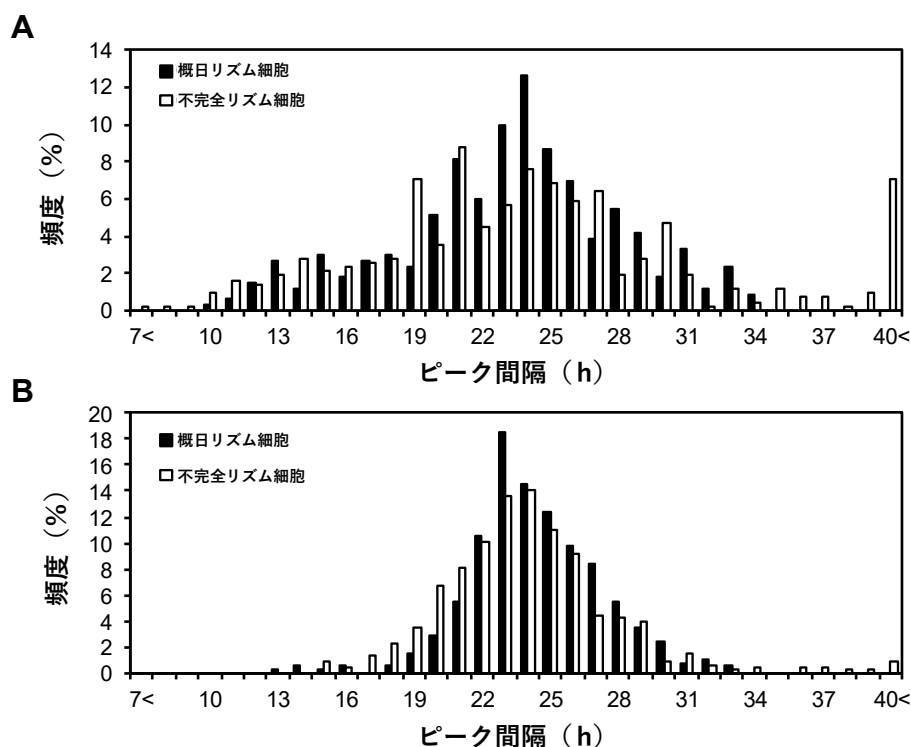


図 18 標準条件における各細胞の発光概日リズムのピーク間隔の頻度分布

(A) 葉由来の単離細胞。(B) 根由来の単離細胞。

### 標準条件下での葉と根由来細胞の生物発光リズムの比較

第 1 章において、シロイヌナズナの葉から単離した細胞集団の概日リズムが恒常条件下で持続することが示され (図 9)、個々の単離細胞においても自由継続性を有していると推測される。細胞集団ではなく個々の細胞時計の性質を調べるため、外界からの光刺激がない標準条件下 (恒暗条件下) におけるプロトプラスト由来細胞の個々の発光変動を解析した。その結果、シロイヌナズナの葉と根から単離した細胞において周期的な発光量の変動が観察された (図 19AB)。周期的な発光量の変化に加えて、平均発光量の時間ごとの変化も観察された (図 19AB、図 20A)。全体の傾向を詳細に捉えるために、平均発光量に加えて細胞ごとに発光量の変化を定量した (図 20B)。0—48 時間における平均発光量と 96—144 時間における平均発光量を細胞ごとに比較し、発光量の増減による細胞率を算出した。その結果、測定中に 60%の葉由来細胞の発光量が増加した一方、75%の根由来細胞の発光量が低下することが示された (図 19AB、図 20)。各細胞の概日リズムのトラフ (底) が増加せず発光量は徐々に減少することから、恒暗条件下で根由来細胞の概日時計は減衰振動子であると考えられる。

次に細胞ごとの概日リズムの周期を調べた。細胞の概日リズムの周期は、概日リズム細胞における概日リズムのピーク間隔の平均として定義した（用語・略語）。葉由来細胞と根由来細胞の両方の細胞概日リズムの周期は、平均値が約24時間の分布を示し、細胞集団として概日リズムを保持していることが示された（図19C、表1、表2）。平均値に加えて中央値においても周期長を算出したところ、葉由来細胞では23.3(h)、根由来細胞では23.7(h)となり、根由来細胞の方が葉由来細胞に比べて周期がわずかに長かった（表1）。実験環境に依存するが切り取った葉と根の概日リズムの周期では、葉に比べて根の概日リズムの周期の方が4時間ほど長いことが報告されている（Fukuda et al., 2007, 2012; Dalchau et al., 2011; Bordage et al., 2016; Nakamura and Oyama, 2018; Greenwood et al., 2019; Kanesaka et al., 2019）。単離細胞においても葉由来細胞に比べて根由来細胞の概日リズムの周期はわずかに長かったが、1時間程度の差であった（表1）。そのため、葉と根の概日リズムは器官全体として異なる周期長を示す一方、葉と根の細胞自体はほぼ同じ周期長の概日時計を有している可能性が示された。続いて、細胞概日リズムの安定性を評価するために、細胞概日リズムのサイクルごとのばらつき度合いを表す変動係数（CV = 標準偏差/平均）を計算した（用語・略語）。CVの値が小さいほどピーク間隔のばらつきが小さいことを示す。各細胞で算出されたCV値の頻度分布を図19Dで示した。葉由来細胞に比べて根由来細胞の方が低いCV値を示す細胞の割合が多かった（図19D）。平均値としても葉由来細胞の概日リズムの周期のCV値は根由来のCV値よりも高かったため、葉由来細胞の発光概日リズムはサイクル（ピーク間隔）ごとに不安定であることが示された（図19D、表2）。

概日リズムのピーク時刻を調べると、葉と根由来細胞で最初に検出されたピーク時刻は恒暗条件になってから18時間付近であった。ピーク時刻のヒストグラムから、葉由来細胞の0–24時間におけるピーク時刻は根由来細胞よりも分散していた（図19EF）。細胞間の位相のばらつき度合いを定量化するために、24時間の範囲における同期率を計算した（用語・略語）。同期率は0（非同期）から1（同期）の範囲で、細胞集団のコヒーレンス（同期状態）を表す。値が大きいほど、細胞間のピーク時刻が良く揃っている（同期している）ということになる。同期率を計算すると、葉と根由来細胞において対照的な時系列変化を示した（図19G）。葉由来の細胞は比較的低い同期率で始まり（0–24時間：0.59）、時間の経過とともに同期状態を持続した（96–120時間：0.48）。一方で、根由来の細胞は比較的高い同期率で始まったが（0–24h：0.75）、時間の経過とともに急激に減少した（96–120h：0.25）。

サイクル間のばらつき度合いを表す周期のCV値は根由来細胞に比べて葉由来細胞で大きかったが、時間を経るごとの同期率減少の程度は小さかった（図19DG）。これは細胞間の固有周期のばらつきが小さいことが原因であると推定される。中央値からのばらつき度合いを示す統計量のMAD（中央絶対偏差）を用いると、根由来細胞に比べて葉由来細胞の周期のMADの値はわずかに小さかった（表1）。このことから、葉由来細胞におけ

るピーク時刻の同期率の変化は細胞固有の周期の小さいばらつきによって生じていることが示された。

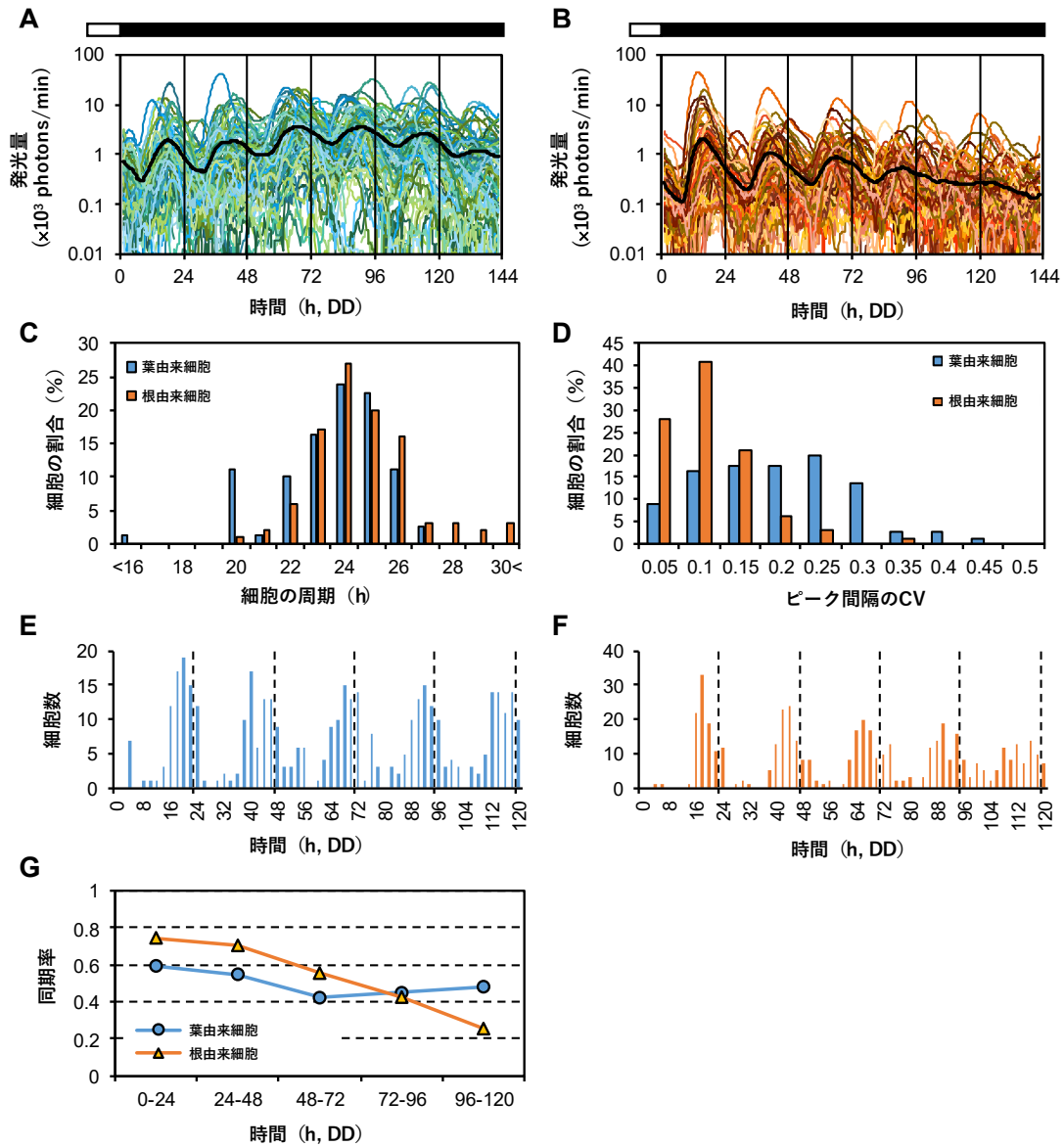
葉由来細胞の概日システムは、根由来細胞に比べて明期から暗期への移行刺激に対する位相調整の正確性が低いと考えられる (図 19G)。本研究で解析した葉由来細胞の細胞集団は、細胞間の固有周期のばらつきが小さかったため、根由来細胞に比べて葉から単離した細胞は均質な細胞時計集団であると考えられる。

**表 2 標準条件下での概日リズム細胞の概日リズムの平均周期のまとめ**

実験	細胞の種類	概日リズム細胞		
		*FRP ± SD (h)	周期 ± SD (h)	ピーク間隔の変動係数 (CV)
Exp1	葉由来細胞	22.9 ± 2.3	22.1 ± 1.7	0.15
Exp2	葉由来細胞	23.5 ± 3.8	23.5 ± 2.3	0.16
Exp3	葉由来細胞	25.9 ± 1.7	22.2 ± 1.8	0.27
Exp4	根由来細胞	25.0 ± 2.9	24.8 ± 2.0	0.08
Exp5	根由来細胞	23.1 ± 2.6	23.6 ± 1.5	0.09

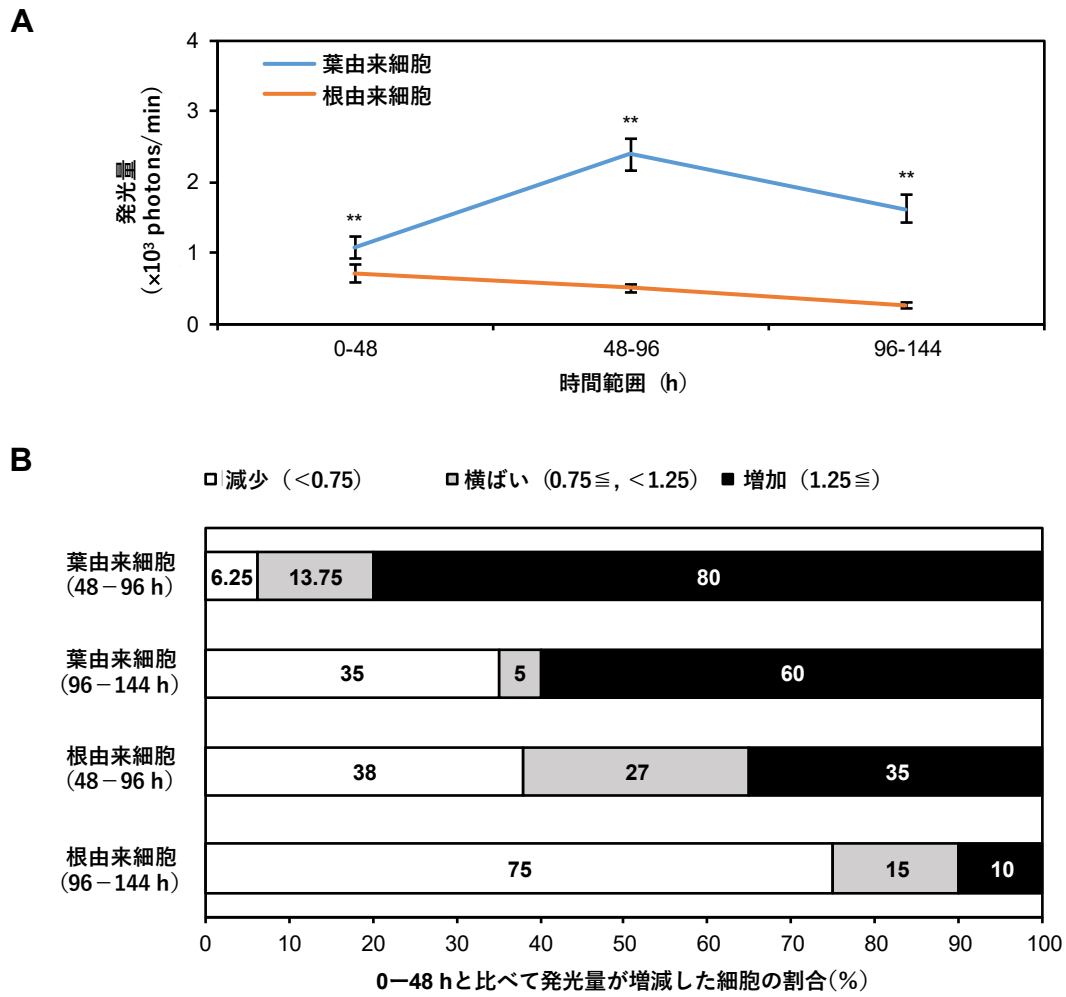
\*FRP : FFT-NLLS 解析によって算出された周期 (Free running period : FRP)。

実験条件・測定結果の詳細は資料 1 と 2 に記述してある。



**図 19** 標準条件下における葉と根由来細胞の自律した概日リズム

*CCA1::LUC*形質転換シロイヌナズナの葉と根からプロトプラストを単離する前に2回の明暗サイクル処理を行った。(A, B) 標準条件下の個々の発光概日リズム[80個の葉由来細胞 (A) ; 100個の根由来細胞 (B)]とそれらの細胞の平均発光量(黒線)。9点分(3時間分)の移動平均処理した発光リズムを示す。白い箱は明期、黒い箱は暗期を示す。(C) 葉と根由来細胞の周期の頻度分布(Brunner-Munzel検定;  $p < 0.05$ )。(D) ピーク間隔の変動係数(CV)の頻度分布。(E, F) 葉由来細胞(E)と根由来細胞(F)におけるピーク時刻の頻度分布(2時間区間)。(G) 24時間ごとの各細胞のピーク時刻の同期率(葉由来細胞:青線、根由来細胞:橙線)。解析区間の全てで統計的有意性を示しており、単位円を中心とした方向の一様な広がりのある分布とは有意に異なることを示した(Rayleigh検定;  $p < 0.01$ )。



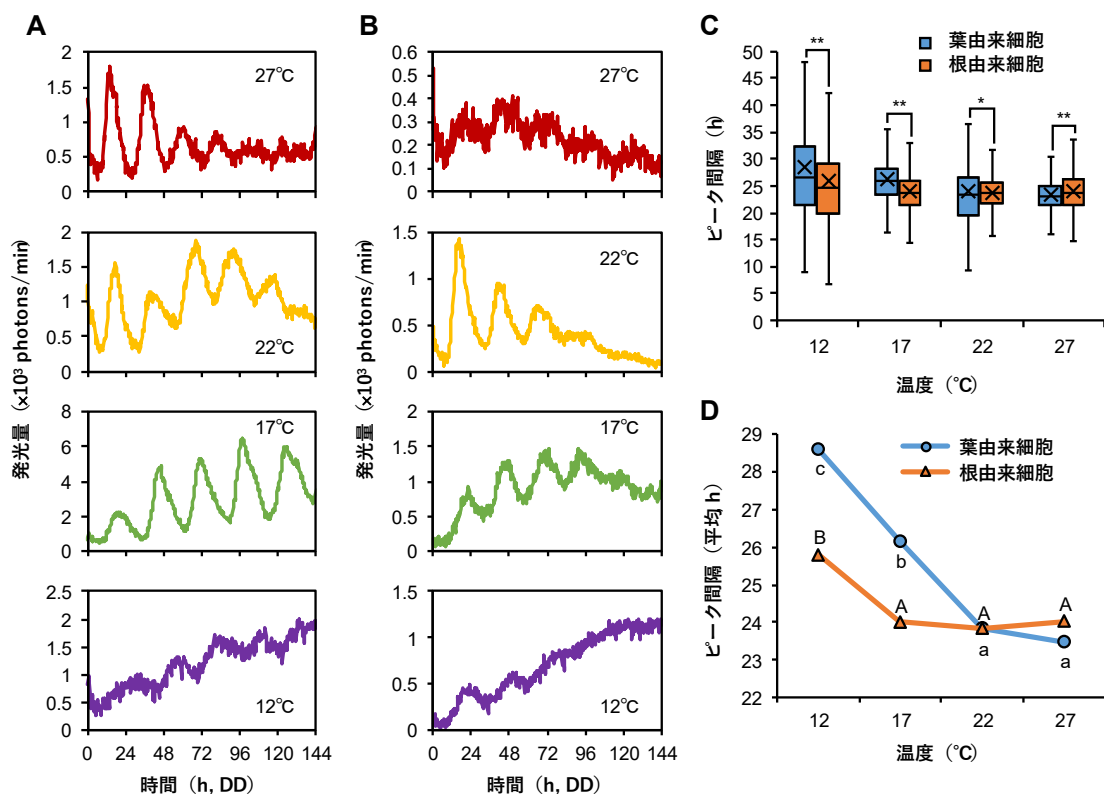
**図 20 標準条件下における葉と根由来細胞の生物発光量の変移**

(A) 恒暗条件に移行してから、48 時間ごとの葉由来細胞 (青線) と根由来細胞 (橙線) の生物発光量の平均値。データは平均±標準誤差で示した。Brunner-Munzel 検定、\*\* $p < 0.01$ 。(B) 発光が変動した細胞の割合を 100%積み上げグラフで図示した。0-48 時間に比べて 48-96 時間もしくは 96-144 時間において、発光量が減少 (<0.75)、横ばい (0.75 ≤, <1.25)、増加 (1.25 ≤) している細胞の割合を示す。



## 温度依存的な細胞概日リズムの頑健性

プロトプラスト由来細胞の周期の温度補償性を調べるために、初めに温度が細胞概日リズムの波形に与える影響を確かめた。プロトプラストを単離した後、葉と根由来細胞を各温度（27°C、22°C、17°C、12°C）の恒暗条件下に移し、各細胞の発光概日リズムを観測した。後述するように発光リズム特性によって分類される細胞の数が温度によって大きく変化するため、温度に関する解析では、全てのグループの細胞（解析可能細胞）に対してリズム特性を解析した。葉と根由来細胞の平均発光量の変動は、各温度で概日リズムを示したが、17°Cでの葉由来細胞を除いて、時間を経るとその振幅は減少した（[図 21AB](#)）。概日リズムの頑健性を調べるために、個々の細胞に対して FFT-NLLS 解析（用語・略語）を実行した（[図 22](#)、[図 23](#)、[図 24](#)）。FFT-NLLS 解析は時系列データに対してコサイン線形和をフィッティングすることで概日リズムの周期を算出する方法である。フィッティングする際にフィッティングの精度を Relative Amplitude Error (RAE) の値として算出するため、部分的には概日リズムの頑健性を推定する指標の一つになる。RAE の値は 0 から 1 を示し、0 に近いほどフィッティングと実数値との差が小さいことを示す。本研究では、RAE が 0.2 以下の値を示す発光変動を持つ細胞を頑健なリズムを示す細胞とした。頑健なリズム [Relative amplitude error (RAE)  $\leq$  0.2] を示す細胞の割合は、温度条件間で異なっていた。葉由来細胞では、17°C (85%) で最も高く、12°C (49%) で最も低かった（[図 24](#)）。22°Cでは 64%の細胞が 27°Cでは 73%の細胞が頑健なリズムを示した。これらのことから、葉由来細胞が頑健な概日リズムを示す最適温度は約 17°Cであった。根由来細胞では、17°Cと 22°Cで約 85%の細胞が頑健なリズムを示し、12°C (40%) や 27°C (72%) よりも高い割合を示した。22°Cでの頑健なリズムを示す細胞の割合は葉由来細胞よりも根由来細胞の方が高く、頑健な概日リズムの最適な温度条件は葉由来細胞と根由来細胞で異なることが示唆された。葉と根由来細胞の両方で、頑健なリズムを示す細胞の割合は 12°Cで非常に低く、シロイヌナズナの細胞概日リズムが 12°Cの低温で不安定であることを示唆している。さらに、グループ 0 に分類される細胞（概日リズム細胞）の割合は、最適温度付近で高かった（[図 25](#)）。これら 4 つの温度条件では、頑健なリズムの細胞の割合は異なるが、各温度での解析可能細胞のピーク間隔は、ピーク時刻ごとに定まっていた（時間経過によるトレンドが見られなかった）（[図 26](#)）。そのため、温度が概日リズムの周期長に与える影響は測定期間中に変化しないことが示された。



**図 21 葉と根由来細胞における概日リズムの周期の温度補償性**

*CCA1::LUC* 形質転換シロイヌナズナの葉と根からプロトプラストを単離し、27°C、22°C、17°C、12°Cのいずれかの恒暗条件に細胞を移し、発光変動を測定した。(A, B) 葉由来細胞 (A) と根由来細胞 (B) における解析可能細胞の細胞リズムの平均発光量を示した (27°C : 赤線、22°C : 黄線、17°C : 緑線、12°C : 紫線)。(C) 葉と根由来細胞の各温度における平均ピーク間隔。箱ひげ図では、中央線が中央値、上下の縁が第一・三四分位数 (25%と 75%)、ひげが最小値と最大値を示している。Brunner-Munzel 検定、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 。(D) 葉と根由来細胞の平均ピーク間隔の時系列変化。統計的に有意な差がある場合は異なる文字で示した [葉由来の細胞は a、b、c ; 根由来の細胞は A、B (one-way ANOVA with post hoc Tukey-Kramer 検定、 $p < 0.001$ )]。

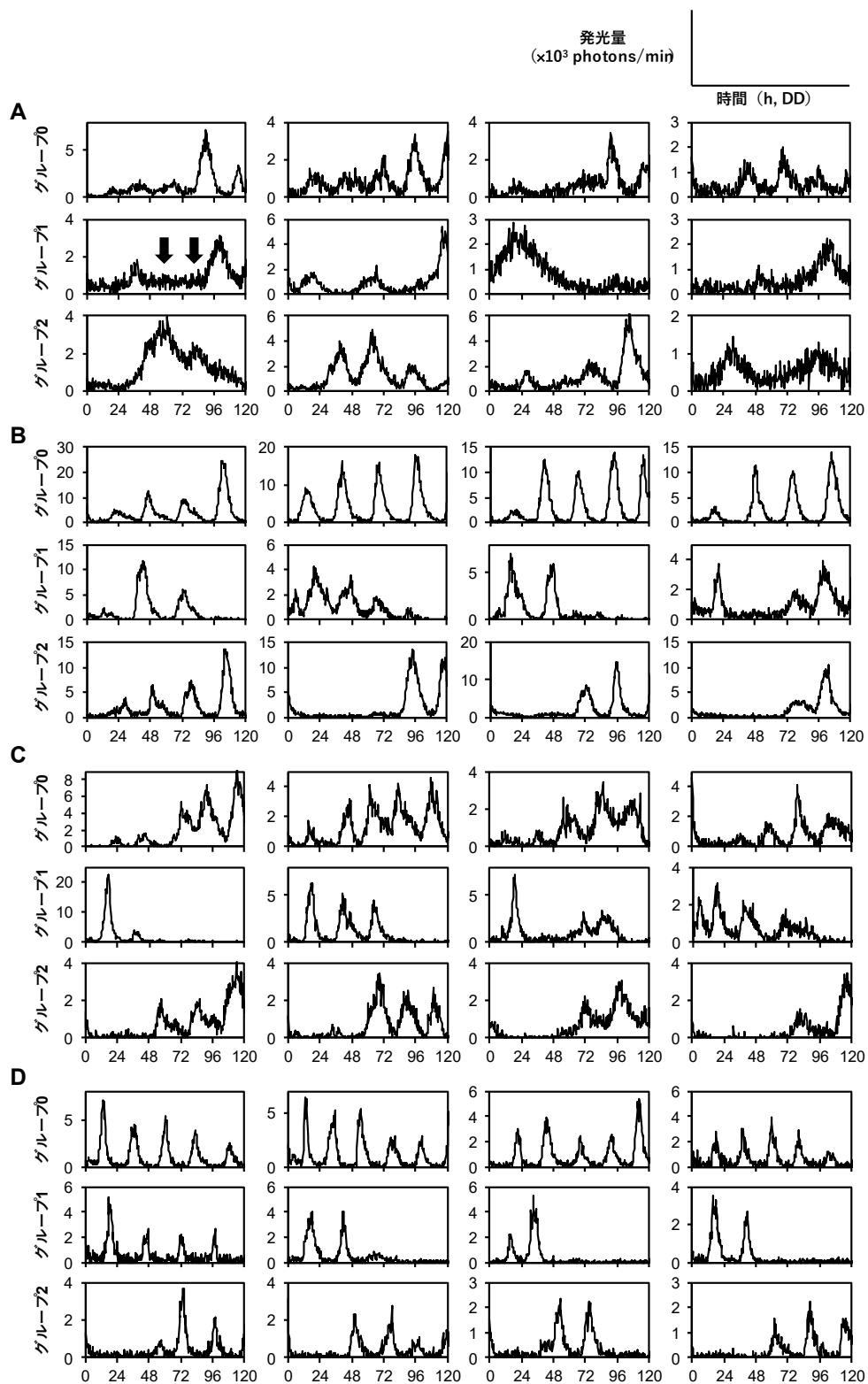


図 22 12°C、17°C、22°C、27°Cにおける葉由来細胞の発光変動の例

12°C (A)、17°C (B)、22°C (C)、27°C (D) におけるグループ 0、グループ 1、グループ 2 の 4 つの例。二つのピーク間にスキップもしくはかなり低いレベルのピークを示す例として、パネル A のグラフ中に矢印を加えた。

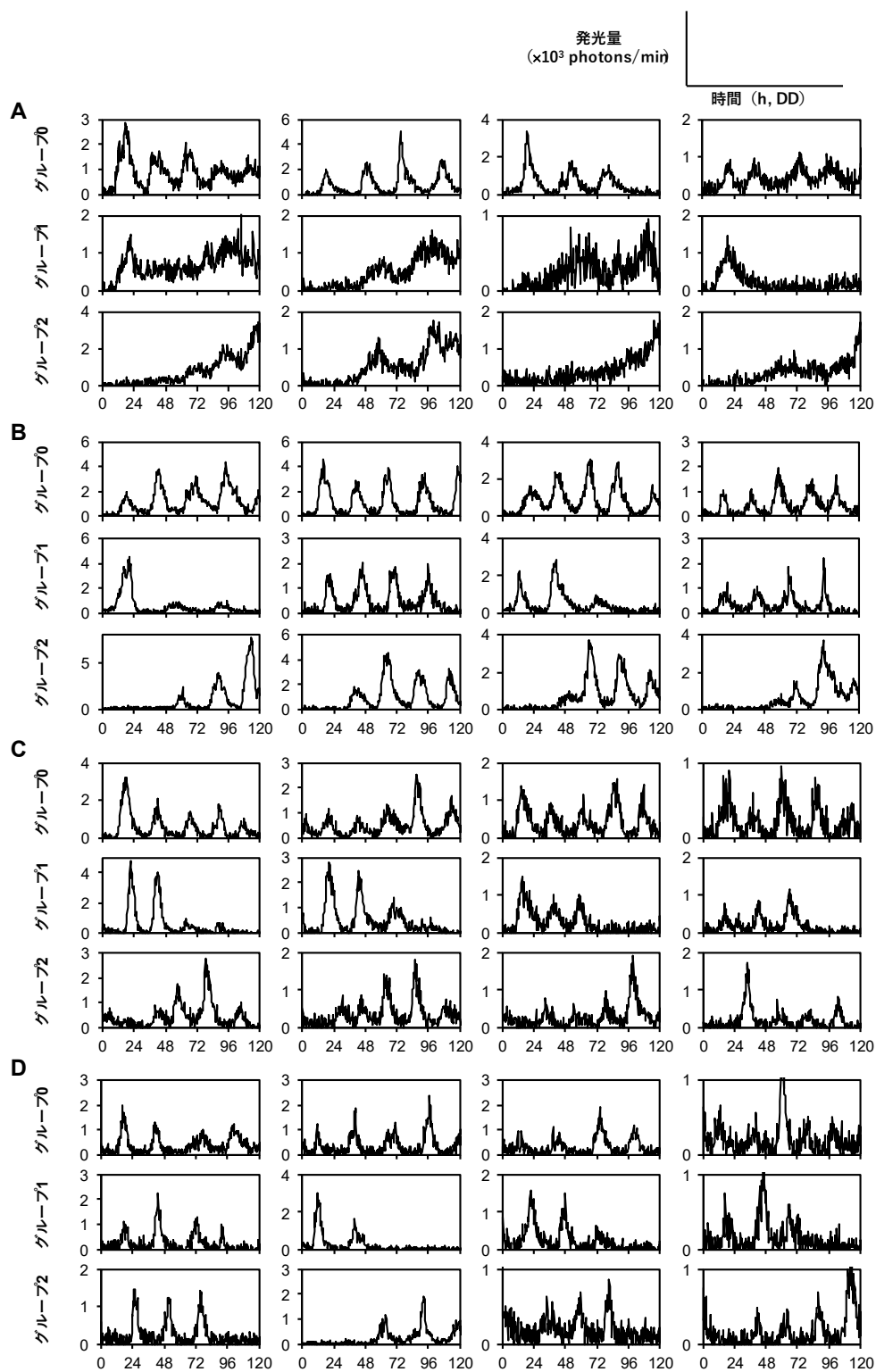


図 23 12°C、17°C、22°C、27°Cにおける根由来細胞の発光変動の例

12°C (A)、17°C (B)、22°C (C)、27°C (D) におけるグループ0、グループ1、グループ2の4つの例。

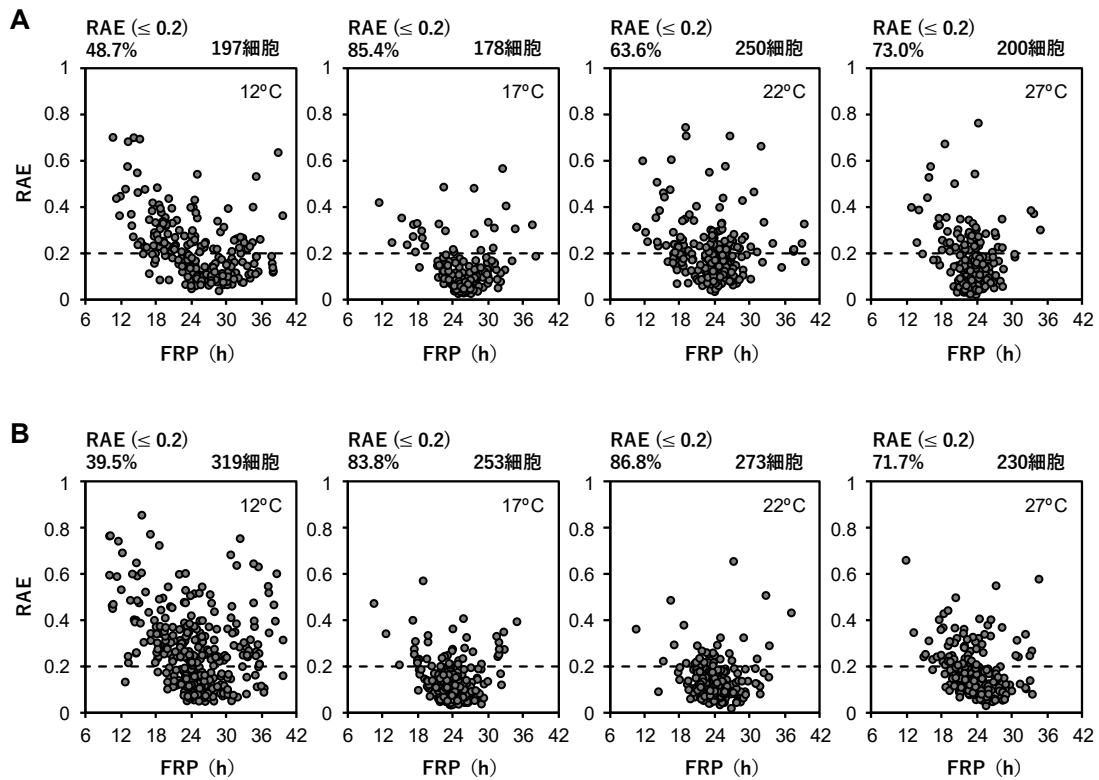


図 24 細胞の発光変動から算出された RAE 値と FRP 値の温度ごとの比較

12°C、17°C、22°C、27°Cにおける葉部由来の細胞 (A) と根部由来の細胞 (B) の個々の細胞の発光変動から算出された FRP と RAE の値。FRP と RAE は FFT-NLLS 解析により算出した。各条件において RAE (≦0.2) を示したサンプルの割合を表す。

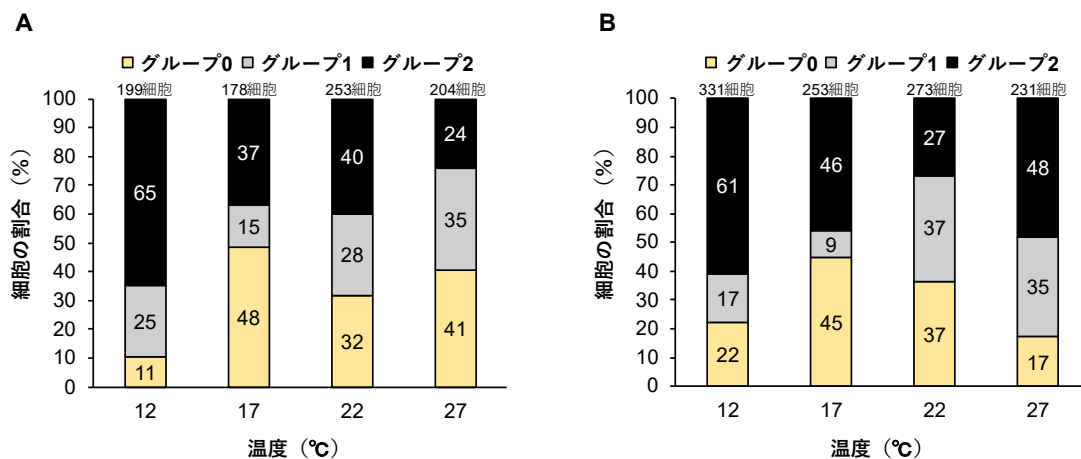


図 25 異なる温度条件でのグループ 0、グループ 1、グループ 2 の細胞割合の比較

12°C、17°C、22°C、27°Cの各温度における葉由来細胞 (A) と根由来細胞 (B) の三つの分類の細胞数の割合を 100%積み上げ棒グラフで表した。

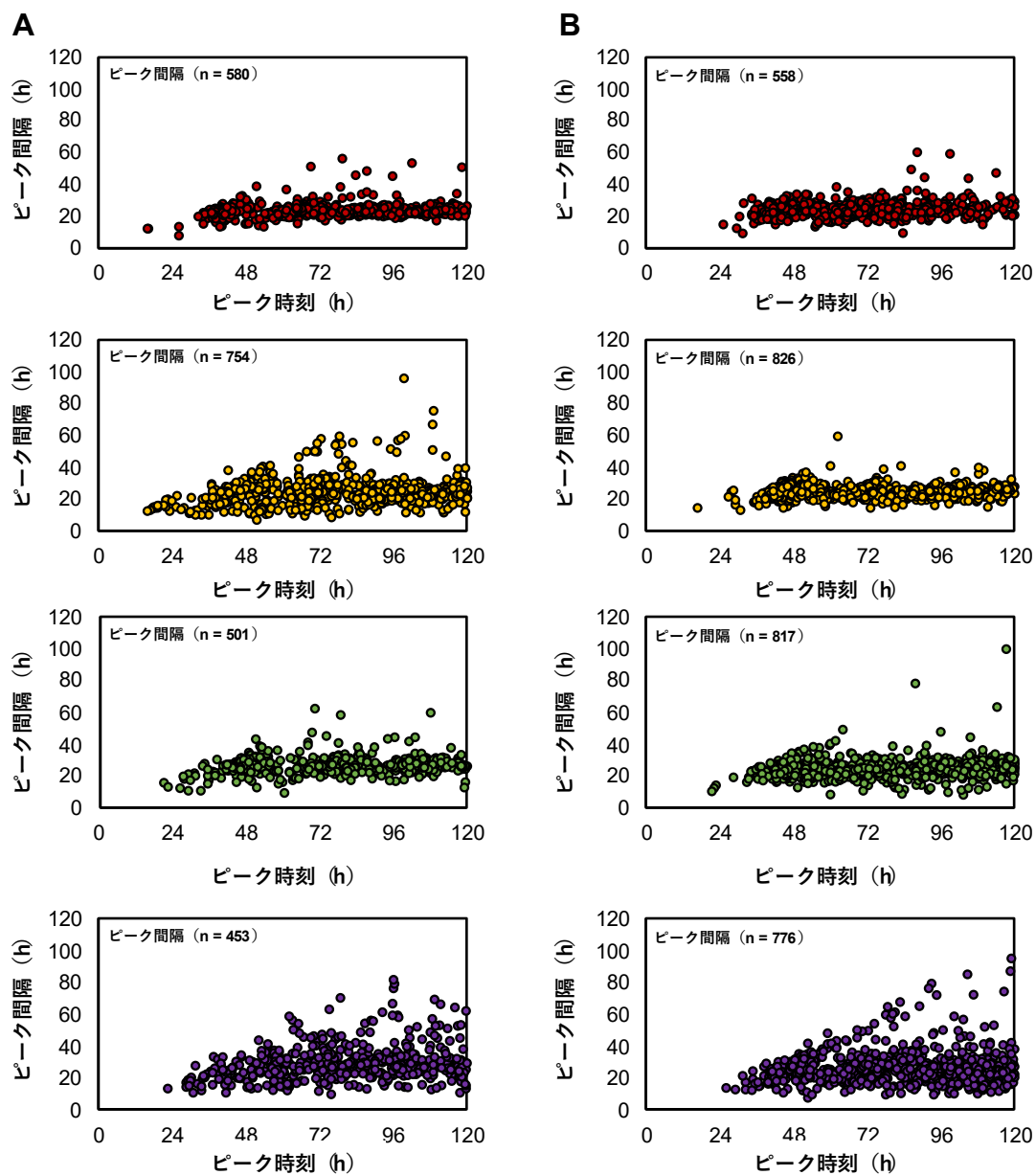


図 26 プロトプラスト由来細胞の異なる温度での培養中におけるピーク時刻に対するピーク間隔

細胞概日リズムの  $k$  番目のピーク時刻を  $t_k$  としたとき、時刻 ( $t_k$ ) におけるピーク間隔は  $t_k - t_{k-1}$  と定義される。27°C (赤)、22°C (黄)、17°C (緑)、12°C (紫) で、葉由来細胞 (A) と根由来細胞 (B) における解析可能細胞の細胞概日リズムのピーク間隔とピーク時刻のプロット。

## 12°C–27°Cの温度範囲における細胞概日リズムの温度補償性

プロトプラスト由来細胞の概日リズムの頑健性や持続性に温度は大きく影響することを示した (図 24、図 25)。概日リズムによる細胞の分類は温度によって影響し、特に 12°C では概日リズム細胞の割合が大きく低下した (図 25)。そのため、各温度におけるプロトプラスト由来細胞の (温度補償性を調べるための) 周期を算出する際には解析可能細胞の全てのピーク間隔の平均を用いた。各温度において葉と根由来細胞の概日リズムの周期は異なっていた (図 21CD、表 3)。葉由来細胞の周期を温度ごとに比較すると 22°C と 27°C では有意な差が見られず、17°C と 12°C では有意な差が見られた (図 21D)。つまり、12°C から 22°C において温度が上がるほど周期が短くなっていた。根由来細胞の周期を温度ごとに比較すると 17°C、22°C、27°C で有意な差が見られず、12°C では有意な差を示した (図 21D)。12°C から 17°C において温度が上がるほど周期が短くなっていた。そのため、葉由来細胞に比べて根由来細胞の概日リズムの周期は温度の影響を受けにくいことが示された (図 21D)。温度補償性の程度を評価するために、 $Q_{10}$  値を算出した。 $Q_{10}$  は、温度が 10°C 異なる 2 つの条件で測定された反応速度 [リズムの周波数 (1 / 周期)] の比率として定義される。一般的な酵素反応では、温度が 10°C 上昇すれば反応速度は 2–3 倍になることが知られている (Dunlap et al., 2004)。 $Q_{10}$  値が 1 に近いほど、温度によって周期長が変化しないことを示す。葉と根由来細胞の両方について 5°C の差ごとに計算された周期の  $Q_{10}$  値は 0.98 ~ 1.20 であり、温度補償性が測定温度の範囲で維持されたことを示している (表 3)。興味深いことに、頑健な概日リズムを示す細胞の割合が高い 17°C から 22°C の温度範囲では、葉由来細胞の  $Q_{10}$  値は 1 から 0.2 大きいものに対して、根由来細胞の  $Q_{10}$  値は 1 から 0.01 大きく、根由来細胞よりも葉由来細胞の方が 1 から離れていた。これらの結果から、根由来細胞が葉由来細胞よりも概日時計の針の進む速さ (概日リズムの角速度) をより厳密に制御する補償システムを有することを明らかにした。

**表 3 27°C、22°C、17°C、12°Cにおけるプロトプラスト由来細胞の概日リズムの周期（ピーク間隔の平均）。**

細胞の種類	ピーク間隔の平均 ± SD (h)				Q <sub>10</sub>		
	27°C	22°C	17°C	12°C	27-22°C	22-17°C	17-12°C
葉由来細胞	23.48 ±	23.85 ±	26.15 ±	28.59 ±	1.03	1.20	1.20
	4.42	8.34	5.52	11.44			
根由来細胞	24.04 ±	23.84 ±	24.01 ±	25.79 ±	0.98	1.01	1.15
	4.94	3.66	5.81	10.02			

算出には、解析可能細胞のデータを使用した。

ピーク間隔のデータは各温度の複数実験の合計を示している。

葉由来細胞：Exp17-19 (27°C)、Exp1-3 (22°C)、Exp6-8 (17°C)、Exp11-13 (12°C)。根由来細胞：Exp20-22 (27°C)、Exp4-5 (22°C)、Exp9-10 (17°C)、Exp14-16 (12°C)。詳細は資料 1 と 2 に記述してある。

### 12°Cで生じる細胞概日リズムの不安定化と細胞間の脱同期

温度補償性を調べる過程で、12°Cにおいて興味深い概日リズムやピーク間隔が観察された。そのため、温度補償性に加えて低温における単離細胞の概日リズムの不安定性についても報告する。生物に生存できる適温があるように、概日時計においても適温は存在し、適温より温度が低くなると概日リズムが消失することが知られている (Zimmerman, 1969; Kondo and Tsudzuki, 1980; Bieniawska et al., 2008; Murayama et al., 2017)。シアノバクテリアを用いた先行研究において、低温による概日リズムの消失はリズムの周期（ピーク間隔）が長くなることによって消失するわけではなく、リズムの振幅がなくなることによって消失するということが報告されている (Murayama et al., 2017)。個々の単離細胞の発光概日リズムの合成波であるプロトプラスト由来細胞の平均発光量の変動は、12°Cにおいて振幅の小さい概日リズム（葉由来細胞）または減衰リズム（根由来細胞）を示した (図 21AB)。シアノバクテリアと同様に単離細胞集団においても低温による概日リズムの消失は振幅の低下によって引き起こされていた。単離細胞の平均発光概日リズムにおける振幅の低下は、各細胞概日リズムの振幅の低下と細胞間の脱同期による平均発光リズムの振幅の低下が考えられる。個々の細胞の概日リズムを調べてみると、12°Cでは24時間よりもはるかに長いピーク間隔が観察される細胞や、ピークかどうかを判断することができない非常に低レベルのピークを示した細胞が観察された (図 22、図 23)。また、12°Cにおける解析可能細胞の全てのピーク間の分散は大きくなっており、低温での細胞概日リズムの不安



定性が全体での発光概日リズムの低振幅に寄与していることが示唆された (図 21C)。概日リズムのピーク間隔が大きくばらつくことによって、全体の概日リズムが消失したように見えたため、各温度の同期率を比較した (図 27)。葉由来細胞は 12°C でより低い同期率を示したため、低温がプロトプラスト単離後の同期率を著しく変化させたことを示唆している。対照的に、根由来細胞における最初の概日リズムのピークは、12°C より高い温度の細胞と同様の同期率を示した一方で、12°C に移してから 24 時間後から急激に脱同期していた。これらのことから、シロイヌナズナにおける低温での概日リズムの消失は、各細胞のピーク間隔がばらつくことによって脱同期が生じ、細胞集団の概日リズムの振幅が消失していると推測した。

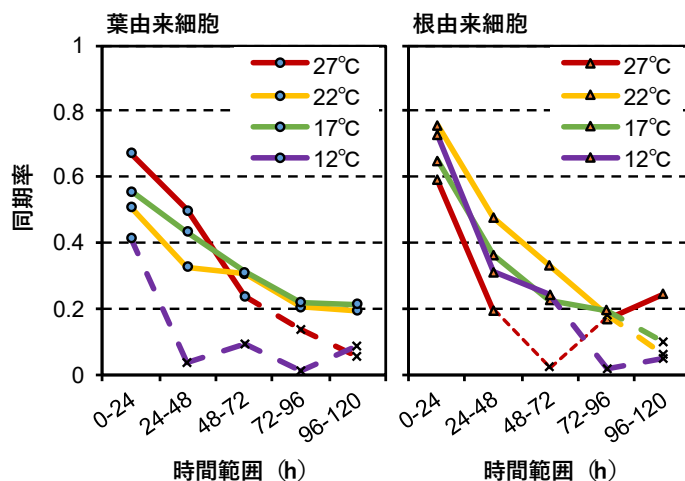


図 27 温度による細胞概日リズムの同期率の変化

4 つの温度条件 (27°C : 赤線、22°C : 黄線、17°C : 緑線、12°C : 紫線) で、葉由来細胞 (左パネル) と根由来細胞 (右パネル) のピーク時刻の 1 日ごとの同期率を示した。青丸と橙三角は統計的有意性 (Rayleigh 検定、 $p < 0.01$ ) を示し、ベクトルが単位円の周りに一様に広がる分布とは有意に異なることを示している。×マークは有意差がなかった点を示す。

## 短時間の光刺激に対する同調性（位相応答）

概日リズムの基本的な特性として、光刺激に対する細胞ごとの同調性を調べた。図 28A に示すように、光パルスの前後のピーク時刻（古い位相“Old phase”と新しい位相“New phase”）を用いて位相移行曲線（Phase Transition Curve: PTC）を作成した（用語・略語）。PTC は光刺激に対する概日リズムの位相応答を示す。細胞概日リズムの周期と最初のピーク時刻は細胞ごとに不揃いであったため（図 19CG）、測定中に異なる位相を示す細胞が生じた。PTC 自体は各位相に対して光刺激を与える必要があるため、位相を変化させた複数の実験を準備しなければならないが、細胞ごとの位相のばらつきを利用することで 2 点の光刺激によって PTC を作成することを可能にした。恒暗条件に移行してから 60 時間または 72 時間後において、プロトプラスト由来細胞に 1 時間の光刺激（光パルス）を与えた（図 28）。葉由来細胞において、光パルスが与えられた細胞概日リズムの位相に関係なく、ピーク時刻は光パルスの 16~30 時間後に現れた（図 28B）。PTC は、大きな位相シフトが生じる 0 型と小さな位相シフトが生じる 1 型に分けられる（Johnson, 1992）（用語・略語）。プロトプラスト由来細胞における PTC は 0 型であり、1 時間の光刺激によって概日リズムの位相が完全にリセットされることが示された。コントロールとして光パルスのない時の PTC を作成すると、線形近似の傾きはほぼ 1 であった（図 28C）（用語・略語）。この傾きは光パルスを照射したときの PTC の傾きとは対照的だった（平均傾きは 0 に近い）。根由来細胞の場合も同様に、概日リズムのピークはパルスの 12~27 時間後に現れた（図 28D）。光パルス後の位相は、葉由来の細胞よりも根由来の細胞の方が進んでいるように見えたが、両方のタイプの細胞の PTC は類似していた。根由来細胞も葉由来細胞と同様に光パルスを与えていない概日リズムで作成した PTC の線形近似の傾きは、1 に近かった（図 28CE）。これらのことから、プロトプラスト由来細胞が 1 時間の光刺激によって概日リズムの位相を調整し、同調できることを示した。

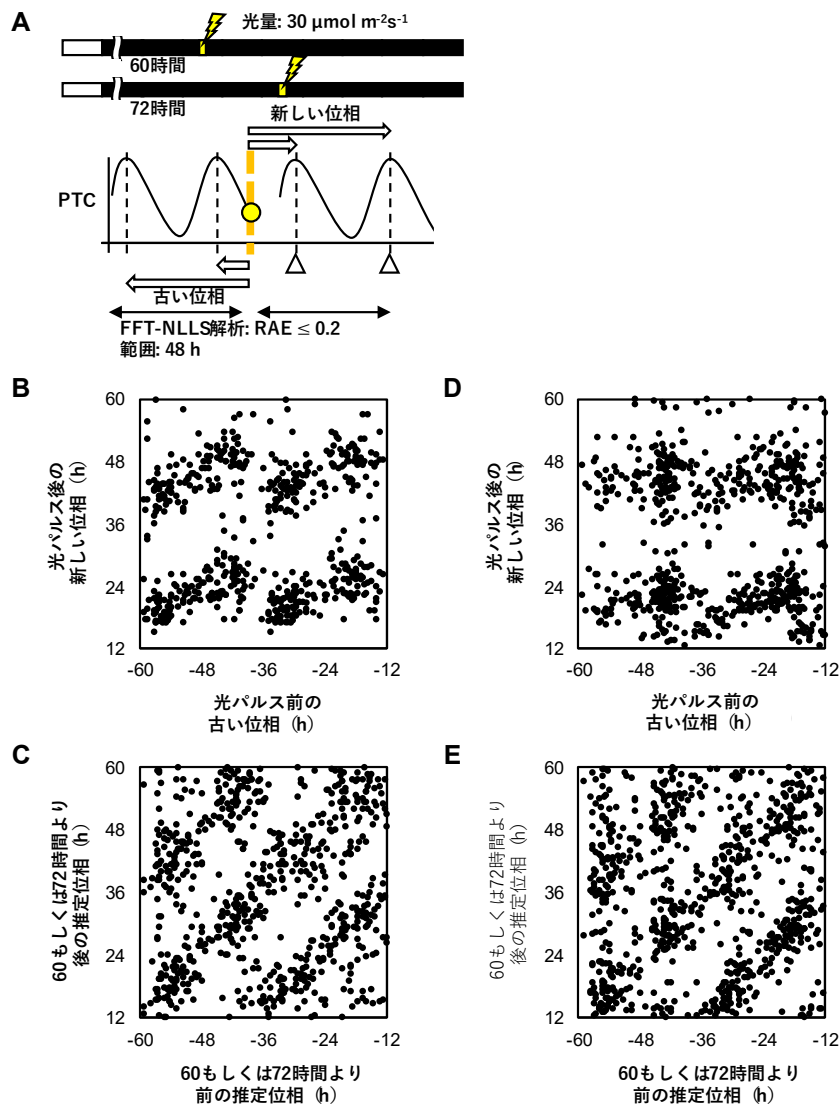


図 28 光パルスに対する細胞サーカディアンリズムの位相シフト

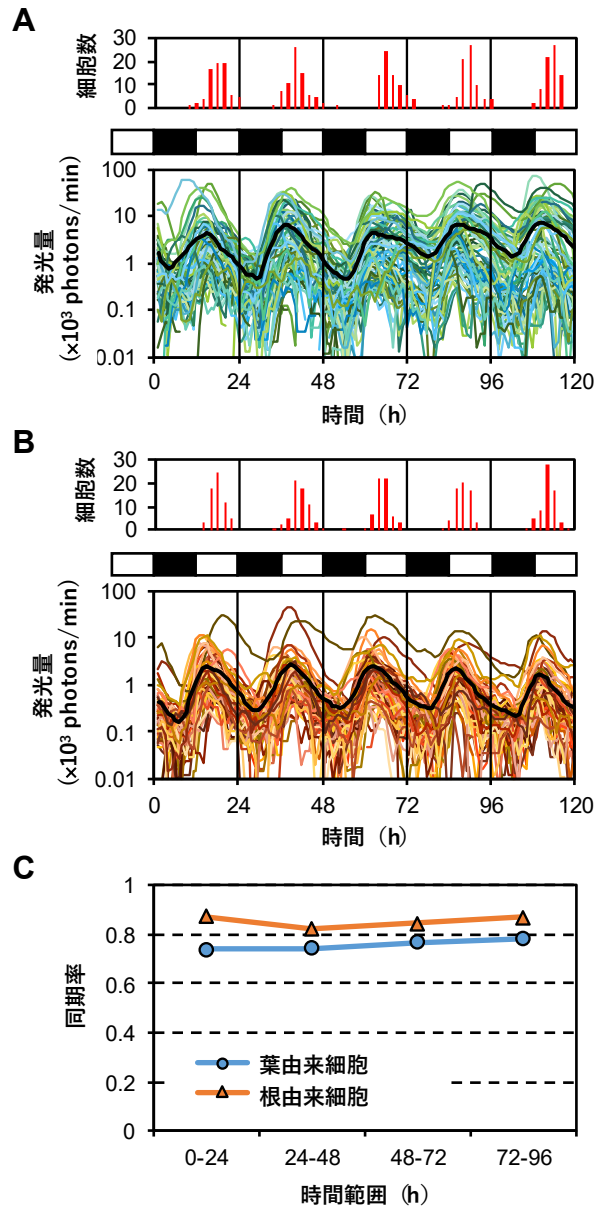
(A) 位相移行曲線 (PTC) を生成するための実験概要の模式図。古い位相 (Old phase) とは、光パルスが与えられた時のリズムの位相であり、本研究では光パルスの前のピーク時刻から光パルスの時刻を引いたものを古い位相と定義した。シフト後の新しい位相 (New phase) とは、光パルスによってシフトしたリズムの位相であり、本研究では光パルス後に見られたピーク時刻から光パルスの時刻を引いたものをシフト後の新しい位相と定義した。PTC は様々な位相を示す概日リズムの古い位相と新しい位相をプロットしたものを表す。概日特性を持つ発光変動 (光パルスの前後 48 時間の範囲で  $\text{RAE} \leq 0.2$ ) を解析に使用した。光パルス処理は恒暗条件になってから 60 時間または 72 時間後に実施した。

(B, C) 葉由来細胞における光パルスによって描画された PTC (B) と光パルスを照射しない場合のコントロール状態におけるピーク時刻の図 (C) を示した。(D, E) 根由来細胞における光パルスによって描画された PTC (D) と光パルスを照射しない場合のコントロール状態におけるピーク時刻の図 (E) を示した。

## 明暗サイクル下における細胞間のピーク時刻の正確性の比較

光パルスの実験に加えて、明暗サイクルに対する葉と根由来細胞の細胞間の同調様式を解析した。プロトプラストとして単離した細胞に12時間の明暗サイクルを与えながら発光リズムを測定した。その結果、葉由来細胞と根由来細胞のピーク時刻の94%は12時間の明期内に現れたため、葉と根由来細胞は明暗サイクルに同調できることが示された (図 29 AB)。明暗サイクルに対する細胞間のピーク時刻の正確性を調べるために同期率を算出したところ、葉由来細胞と根由来細胞の同期率は、それぞれ0.76と0.85であった (図 29 C) (用語・略語)。根由来細胞と比較して葉由来細胞の同期率が低いのは、概日リズムの周期が不安定である(サイクル間のばらつきが大きい)ことが原因になっていると考えられる (図 29 C)。

明暗サイクル下の根由来細胞の発光リズムにおいて、発光量の大きな減少は見られなかった (図 19 D)。前述のように恒暗条件下において、根由来細胞の個々の細胞の発光は減少し、概日リズムは減衰していく傾向にあったため、根由来細胞の概日時計は高振幅な振動のために明暗のシグナルを必要とする可能性が考えられる。これは葉由来細胞と根由来細胞の概日時計の特性の違いがあることを示していると考えられる。



**図 29** プロトプラスト由来細胞における概日リズムの明暗サイクルへの同調性

*CCA1::LUC*形質転換シロイヌナズナの葉と根からプロトプラストを単離する前に2回の明暗サイクル処理を行った。(A, B) 発光概日リズム (73個の葉由来細胞 (A)、63個の根由来細胞) と平均発光量 (黒線)。3点分の移動平均処理した発光リズムを示す。ピークを示す細胞数をグラフ上部に示した。白い箱と黒いはそれぞれ明期と暗期を示す。(C) 葉由来細胞 (青線) と根由来細胞 (橙線) のピーク時刻の1日ごとの同期率を図示した。

## 考察

第 2 章では、シロイヌナズナの葉と根から単離した細胞の発光概日リズムを単一細胞で観測する実験系を構築し、個々の単離細胞は概日リズムの三大性質を満たす概日時計を有することを明らかにした。加えて、細胞レベルで葉と根由来細胞の概日リズムの性質が異なっており、細胞レベルでの概日時計の器官特異性を明確にした。

単離細胞の概日リズムを調べるために、光条件は恒暗で、温度条件は 22°C で、培地条件は W5 液体培地（無機塩類、5%FBS）で、任意の細胞密度であることを標準条件とした。植物の概日リズムの周期は、照射する光量や光質によって変化することが知られている（Aschoff, 1979; Somers et al., 1998; Devlin and Kay, 2000; Battle and Jones, 2020）。また、光質に対するシュート（地上部）と根（地下部）の概日リズムの応答性が異なることが報告されている（Bordage et al., 2016）。W5 液体培地は主に Na、K、Ca、Cl で構成されており、植物にとって直接利用される栄養素としては FBS（ウシ胎児血清）に含まれる微量なグルコースぐらいである。そのため、標準条件における単離細胞の概日リズムは、光シグナルや栄養による概日時計への入力経路の違いに影響されない、細胞時計本来の特徴を反映していると考えられる。人工的な条件にもかかわらず葉由来の単離細胞の概日リズムの周期は、恒暗条件下における切り取った葉の概日リズムの周期と 1—2 時間の範囲の差であった（Fukuda et al., 2007; Nakamura and Oyama, 2018; Kanesaka et al., 2019）（[図 19C](#)、[表 1](#)）。一方、根由来の単離細胞の概日リズムの周期は、恒暗条件下における根の概日リズムの周期より 3—4 時間短かった（Dalchau et al., 2011; Fukuda et al., 2012; Bordage et al., 2016; Greenwood et al., 2019）（[図 19C](#)、[表 1](#)）。同じ根であっても周期の長さは根の領域によって大きく異なっている。根の領域において異なる周期が生み出される明確な理由はわかっていないが、局所的な細胞の結合（概日時計の相互同期現象）が一つの原因であると考えられている（Greenwood et al., 2019）。培養液中の根由来の単離細胞は、そのような概日時計の相互同期現象が存在しないため、細胞時計固有の性質としての周期を示していると思われる。

根由来の単離細胞の概日リズムの発光量が減少し、個々の細胞は振幅が徐々に減少する減衰振動であった（[図 19B](#)、[図 20B](#)）。未処理もしくは切り取った根の概日リズムにおいても、振幅が減衰する傾向にあることが知られていた（Takahashi et al., 2015; Bordage et al., 2016）。しかし、細胞集団を観察していたため、各細胞の概日リズムが減衰していたのか、各細胞概日リズムの位相が不揃いになる脱同期によって集団としての減衰が生じているのかを判断できていなかった。根由来単離細胞で観察された減衰振動は、根における概日リズムの減衰が、個々の細胞概日リズムの減衰に起因する可能性を示している。葉由来の単離細胞の概日リズムの振幅が持続しており、恒暗条件下の切り取った葉においても振幅の持続が確認されている（Fukuda et al., 2007; Nakamura and Oyama, 2018;

Kanesaka et al., 2019) (図 19A)。これらのことから、植物における器官の概日時計の特徴は、細胞自身の概日時計の特徴を部分的に反映していると考えられる。

葉と根由来細胞における光応答性を 1 時間の白色光パルスによって調べたところ、位相の完全リセットである 0 型の PTC が描画された (図 28)。30–32  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光量の光パルスにおいては位相のリセット機能に葉と根由来細胞で違いが見られなかった。植物の根の概日リズムは 0.15  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光に対して応答することができることが報告されている (Bordage et al., 2016)。また、恒暗条件下の根は光ファイバーのように維管束を通る微量な光を受容し、根の概日時計の時刻を調整できることが報告されている (Lee et al., 2016; Nimmo, 2018)。これらのことから、光受容による概日リズムの位相の調節において葉と根由来細胞において同様のシステムを有している一方で、概日リズムの位相に影響を与える光受容の感度 (光量の閾値) は根の細胞の方が高い可能性がある。

明暗サイクル下における光応答性 (7–8  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の白色光を 12 時間照射) においても葉と根由来細胞は概日リズムの位相を調節していた (図 29)。一方で、根由来細胞に比べて葉由来細胞の方が同期率は低く、細胞間でばらついていた。標準条件下において葉由来細胞は根由来細胞に比べて概日リズムが不安定であった (サイクル間のばらつきが大きかった) (図 19D)。概日リズムの位相調節における光応答においては十分な光量であるため、光応答後の位相が不正確であると考えられる。

温度補償性は、概日時計の周期性を保持する重要な性質である。葉と根由来の単離細胞の両方の概日リズムの周期は温度補償性を示した (図 21C、表 3)。これは異なる器官においても、細胞レベルで概日時計としてのシステムを有することを示している。一方、葉と根由来の単離細胞の概日リズムにおいて温度補償性の堅牢度が異なっていた (図 21D、表 3)。シュートと根での遺伝子発現解析から、いくつかの時計遺伝子の発現量が器官で異なることが報告されている (Lee and Seo, 2018)。植物の地上部と地下部の概日時計は、概日時計を構成する因子の種類の違いではなく、発現量によって性質が特徴づけられていることが考えられる。時計遺伝子の PRR7 と PRR9 が温度に対する応答性や温度補償性に直接関与することが報告されている (Nakamichi et al., 2005; Salomé et al., 2005)。PRR7 と PRR9 の二重変異体を用いて、シロイヌナズナのシュートと根の周期を発光レポーターを用いて調べたところ、根では温度補償性を示した一方で、シュートでは温度が高くなるほど概日リズムの周期が長くなり、時計遺伝子の役割が器官ごとに異なっていることが示された (Li et al., 2020)。本研究を含めて明らかになった植物の地上部と地下部の概日リズムの周期の温度補償性の違いが、シロイヌナズナの生育にとってどれだけ重要かは全く分かっていない。次に地上部と地下部で異なる温度補償性の役割について植物の生育環境から考察する。シロイヌナズナの地上部は一日の中で大きな温度変化が生じ、地下部は地上部に比べて温度の日周変化が生じにくい (Illston and Fiebrich, 2017)。温度変化の大きい地上部の概日時計が堅牢な温度補償性を持つ必要があると思われるが、単離細胞の発光概日リズム解析からは地下部に比べて地上部の概日時計は脆弱な温度補償性を示した (図 21D、

表 3)。温度刺激は概日リズムの位相を調節できることから、日周変動の大きい地上部では温度が変化した時の概日リズムの周期の維持よりも、温度変化による概日リズムの位相の調節に重きを置いているのかもしれない。一方、地下部における温度の日周変動は土壌の深度が深くなるほど少なくなることから、温度変化による概日リズムの位相の調節よりも、概日リズムの周期を維持しているのかもしれない。また、土壌深度による温度変化によって根は不均一な温度環境にさらされていることから、堅牢な温度補償性が地下部にとって重要であることが考えられる。

葉と根由来の単離細胞の概日時計は、単離前の器官の概日時計と似ている部分が多くあるが、異なる現象も観察された (図 22、図 23、図 27)。生物には生存できる適温が生物種によって異なっている。概日時計においても適温は存在し、適温より温度が低くなると概日リズムが消失することが知られている (Zimmerman, 1969; Kondo and Tsudzuki, 1980; Bieniawska et al., 2008; Murayama et al., 2017)。シロイヌナズナでは、4°Cの低温下で概日リズムが減衰し、リズムが見られなくなる (Gould et al., 2006; Bieniawska et al., 2008)。一方、12°Cの低温下では概日リズムを持続することが報告されているため、シロイヌナズナの概日リズムが消失する温度は 4°C以上 12°C未満である。一方、単離された細胞集団の概日リズムは 12°Cで消失した (図 21AB)。そのため、単離細胞の概日時計では機能せず、植物体では機能する 12°Cの低温で概日リズムの振幅を維持する仕組みが存在すると考えられる。今後、単離された細胞と組織内の細胞の概日時計を調べることによって、低温において植物が有する概日リズムの維持機構を明らかにすることができると考えられる。



## 材料と方法

### 植物と生育条件

実験には第 1 章と同様に *CCA1::LUC* 形質転換シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を使用した。シロイヌナズナの培養は第 1 章と同様の方法で実施した。

### シロイヌナズナ葉と根からのプロトプラスト単離と培養

*CCA1::LUC* 形質転換シロイヌナズナの葉と根からプロトプラストを単離した。葉からの単離は第 1 章と同様の方法で実施した。根からのプロトプラストの単離は、葉からの単離方法を改変し、以下のように遠心時間を変更した。光点灯から 3–4 時間後の植物体の根を 15 個体分切り取り、細かく切り刻んだ。酵素処理はそれらの切片を 20 ml の酵素液に入れ、弱光条件下 (25°C) で 3 時間振盪することで行った。プロトプラストは 70  $\mu\text{m}$  ナイロンメッシュで濾し、遠心分離 (1200 $\times$ g、5 分間、22°C) によって回収した。プロトプラストの沈殿は 45 ml の W5 溶液で 2 回洗浄した。沈殿を 1ml の W5 溶液に再懸濁し、再度遠心分離 (1200 $\times$ g、7 分間、22°C) 後、0.1 mM ルシフェリン入りの液体培地に再懸濁した。液体培地は、W5+FBS 培地 [W5 溶液に 5% Fetal bovine serum (FBS) を添加] を使用した。

### 単一細胞の生物発光測定

単一細胞の生物発光イメージングは、プロトプラスト由来の単離細胞の生物発光を測定するために、先行研究を改変した方法で実施した (Muranaka and Oyama, 2016)。マクロズーム顕微鏡 (MVPLAPO 2C レンズを装着した MVX-10; Olympus Optical、<https://www.olympus-lifescience.com/>) が装着された高感度 EM-CCD (electron-multiplying charge-coupled-device) カメラ (ImagEM C9100-13; Hamamatsu Photonics、<http://www.hamamatsu.com/>) で発光画像を取得した。発光測定装置はインキュベーター (KCLP-1000I-CT; NK system、<http://www.nihonika.co.jp/>) 内に設置した暗箱内に置き、温度を 27°C、22°C、17°C、12°C に維持した。EM-CCD カメラは、コンピュータソフトウェア (HOKAWO、Hamamatsu photonics) で制御した。HOKAWO で制御した発光ダイオード (LED) 光源 (RFB2-20SW; CCS Inc.、<http://www.ccs-grp.com/>) からの白色光を培養する細胞に照射した (12 時間の明暗サイクル実験で 7–8  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、光パルス実験で 30–32  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )。タイムラプスイメージングでは、EM-CCD カメラ (-80°C に冷却) を用いて、恒暗条件では 20 分ごと、明暗条件では 60 分ごとに生物発光画像を撮影した。発光画像を取得するために、葉由来細胞で 4 分、根由来細胞で 6 分間露光した。サンプルの発光に由来しない宇宙線によるノイズを除去するために、一度に 2 枚の連

続した画像を撮影し、各ピクセルの最小値を解析に用いた。明暗条件では、自家蛍光を減衰させるため、4 分間の暗処理後に生物発光画像を撮影した。個々の単離された発光細胞に対して、手動で ROI (Region of Interest) を定義した。各 ROI における生物発光量は、以下の式を用いて定量化した (Muranaka and Oyama, 2020)。光子数 (photon 数) = (出力輝度 - 背景輝度) × 5.8 / (1200 × 0.9)。各 ROI の発光量の時系列データに対して時系列解析を実行した。画像解析は ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) で実施した。

## 発光概日リズムによる細胞の分類

他の細胞と発光が重ならない細胞を発光検出細胞とし、発光のピークが複数検出された細胞を解析可能細胞とした。解析可能細胞を 3 つのグループに分類した (グループ 0、グループ 1、グループ 2) (図 17)。恒暗条件に移行してから 24 時間以内に最初のピークが見られない発光リズムを示す細胞をグループ 2 に分類した。グループ 2 の細胞は最初の発光概日リズムを正確にできていない。最初の 24 時間以内にピークが見られ、108 時間以降に最後のピークが見られないもしくはピーク間隔が 35 時間以上の細胞をグループ 1 に分類した。グループ 1 の細胞は、測定期間中に生物発光を失う部分があった。グループ 1 とグループ 2 は不完全なリズムが部分的に見られたため不完全リズム細胞とした。残りの細胞をグループ 0 (概日リズム細胞) に分類した。

## 時系列解析

ピーク抽出および FFT-NLLS 解析は、R 4.0.3. (<http://r-project.org/>) を用いて、既述のように実施した (Muranaka and Oyama, 2016) (第 1 章と同じ)。周期は、ピーク間隔と FFT-NLLS 解析の 2 つの方法で推定した。ピーク間隔は、連続した 2 つのピーク時刻を用いて計算した。細胞概日リズムの振幅は、24 時間枠を設定し、その枠を測定時刻ごとに移動するごとにその区間の時系列データの平均値と標準偏差を計算することで求めた。FFT-NLLS 解析において、フィッティング精度として RAE を算出した。本研究では、RAE が 0.2 以下の値を示す発光変動を持つ細胞を頑健なリズムを示す細胞とした。

## 同期率の計算

各 1 日 (24 時間) の細胞集団の概日リズムの同期率は、以下のようにして算出した。(1) 24 時間内の各細胞概日リズムのピーク時刻を単位円上にプロットし、各プロットのベクトルの大きさを 1 とした。(2) プロット内のベクトル和を算出する。(3) その範囲内のピーク数でベクトル和を割る。同期率は、0 (非同期) から 1 (同期) までの範囲で算出される。

## 資料 1

### 第 2 章の実験条件のまとめ

実験	細胞の種類	光条件	温度 (°C)	細胞密度 (cell/4 ml)	Medium
Exp1	葉由来細胞	DD	22	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp2	葉由来細胞	DD	22	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp3	葉由来細胞	DD	22	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp4	根由来細胞	DD	22	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp5	根由来細胞	DD	22	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp6	葉由来細胞	DD	17	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp7	葉由来細胞	DD	17	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp8	葉由来細胞	DD	17	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp9	根由来細胞	DD	17	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp10	根由来細胞	DD	17	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp11	葉由来細胞	DD	12	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp12	葉由来細胞	DD	12	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp13	葉由来細胞	DD	12	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp14	根由来細胞	DD	12	$5 \times 10^4$	W5+FBS
Exp15	根由来細胞	DD	12	$5 \times 10^4$	W5+FBS
Exp16	根由来細胞	DD	12	$5 \times 10^4$	W5+FBS
Exp17	葉由来細胞	DD	27	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp18	葉由来細胞	DD	27	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp19	葉由来細胞	DD	27	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp20	根由来細胞	DD	27	$5 \times 10^4$	W5+FBS
Exp21	根由来細胞	DD	27	$5 \times 10^4$	W5+FBS
Exp22	根由来細胞	DD	27	$5 \times 10^4$	W5+FBS
Exp23	葉由来細胞	LD	22	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp24	葉由来細胞	LD	22	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp25	葉由来細胞	LD	22	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp26	根由来細胞	LD	22	$5 \times 10^4$	W5+FBS
Exp27	根由来細胞	LD	22	$5 \times 10^4$	W5+FBS

Exp28	葉由来細胞	DD (光刺激)	22	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp29	葉由来細胞	DD (光刺激)	22	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp30	葉由来細胞	DD (光刺激)	22	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp31	葉由来細胞	DD (光刺激)	22	$2 \times 10^4$	W5+FBS
Exp32	根由来細胞	DD (光刺激)	22	$5 \times 10^4$	W5+FBS
Exp33	根由来細胞	DD (光刺激)	22	$5 \times 10^4$	W5+FBS

## 資料 2

### 第 2 章の実験ごとの解析データのまとめ

実験	細胞の種類	細胞数 (%)			平均ピーク間隔 ± SD		
		概日リズム細胞	不完全リズム細胞		概日リズム細胞	不完全リズム細胞	
		グループ 0	グループ 1	グループ 2	グループ 0	グループ 1	グループ 2
Exp1	葉由来	17 (27.0)	22 (34.9)	24 (38.1)	21.9 ± 4.1	24.0 ± 11.7	22.3 ± 4.9
Exp2	葉由来	54 (36.2)	34 (22.8)	61 (40.9)	23.3 ± 4.8	25.5 ± 12.8	25.5 ± 9.0
Exp3	葉由来	9 (22.0)	16 (39.0)	16 (39.0)	22.0 ± 6.5	25.1 ± 10.7	22.7 ± 7.3
Exp4	根由来	48 (40.0)	57 (47.5)	15 (12.5)	24.6 ± 2.9	24.1 ± 3.6	23.0 ± 3.4
Exp5	根由来	52 (34.0)	43 (28.1)	58 (37.9)	23.5 ± 2.9	24.2 ± 5.9	23.1 ± 3.2
Exp6	葉由来	38 (50.7)	7 (9.3)	30 (40.0)	26.7 ± 3.9	25.2 ± 7.2	24.8 ± 5.3
Exp7	葉由来	34 (46.6)	12 (16.4)	27 (37.0)	25.8 ± 3.0	31.9 ± 10.2	26.3 ± 4.7
Exp8	葉由来	14 (46.7)	7 (23.3)	9 (30.0)	24.5 ± 3.9	26.2 ± 10.7	24.1 ± 4.7
Exp9	根由来	50 (43.9)	8 (7.0)	56 (49.1)	23.9 ± 4.2	31.8 ± 7.9	22.7 ± 3.9
Exp10	根由来	63 (45.3)	16 (11.5)	60 (43.2)	24.0 ± 4.0	30.0 ± 16.2	23.1 ± 4.3
Exp11	葉由来	6 (8.5)	20 (28.2)	45 (63.4)	24.3 ± 6.4	34.0 ± 16.4	28.3 ± 10.6
Exp12	葉由来	5 (7.6)	15 (22.7)	46 (69.7)	22.8 ± 4.3	30.7 ± 13.0	28.2 ± 10.7
Exp13	葉由来	10 (16.1)	14 (22.6)	38 (61.3)	24.6 ± 5.6	30.2 ± 14.3	29.3 ± 10.3
Exp14	根由来	22 (31.0)	15 (21.1)	34 (47.9)	24.8 ± 5.1	31.8 ± 14.0	25.8 ± 11.2
Exp15	根由来	17 (19.3)	19 (21.6)	52 (59.1)	24.2 ± 5.8	34.1 ± 16.4	24.8 ± 9.8
Exp16	根由来	35 (20.3)	22 (12.8)	115 (66.9)	24.1 ± 5.7	34.7 ± 15.6	23.7 ± 7.8
Exp17	葉由来	24 (39.3)	14 (23.0)	23 (37.7)	23.0 ± 2.3	24.7 ± 6.0	23.9 ± 5.8
Exp18	葉由来	24 (30.0)	37 (46.3)	19 (23.8)	23.1 ± 3.2	24.1 ± 5.4	23.7 ± 5.0
Exp19	葉由来	35 (55.6)	21 (33.3)	7 (11.1)	22.9 ± 2.5	24.5 ± 7.8	24.2 ± 4.1

Exp20	根由来	20 (22.0)	35 (38.5)	36 (39.6)	24.6 ± 4.3	24.7 ± 6.2	24.2 ± 5.6
Exp21	根由来	16 (14.5)	35 (31.8)	59 (53.6)	24.7 ± 5.2	23.2 ± 3.7	23.5 ± 4.4
Exp22	根由来	4 (13.3)	10 (33.3)	16 (53.3)	29.5 ± 2.3	22.3 ± 4.8	22.6 ± 3.3
Exp23	葉由来	2 (11.8)	7 (41.2)	8 (47.1)	-	-	-
Exp24	葉由来	16 (29.1)	33 (60.0)	6 (10.9)	-	-	-
Exp25	葉由来	55 (41.4)	54 (40.6)	24 (18.0)	-	-	-
Exp26	根由来	27 (50.9)	16 (30.2)	10 (18.9)	-	-	-
Exp27	根由来	36 (43.4)	21 (25.3)	26 (31.3)	-	-	-

## 第 3 章

# 細胞密度依存的な葉由来単離細胞の概日リズムの安定性と明暗に対する正確性

### 導入

第 2 章で述べたように、植物の概日時計は、細胞時計の集合体であり、器官や組織ごとに特異的な性質を有する。初期の研究では、マメ科の植物において気孔の開閉リズムの周期と葉の上下運動の周期が異なることや、タバコ植物において細胞質遊離カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 量の変動リズムと葉緑体関連遺伝子である *Lhcb* (*Light-harvesting complex b*) の発現リズムの周期が異なることから (Hennessey and Field, 1992; Sai and Johnson, 1999)、植物体内に複数の性質の異なる概日時計が存在すると考えられていた。実際、蛍光タグ付き CCA1 を形質転換したシロイヌナズナにおいて、孔辺細胞と周囲の表皮・葉肉細胞の概日リズムの周期が異なることが細胞レベルで示された (Yakir et al., 2011)。また、植物全体の個々の細胞で蛍光タグ付き CCA1 の発現変動を顕微鏡下で観測した最近の研究では、植物の器官内および器官間で概日リズムの振幅、周期、位相が細胞ごとに異なることが報告された (Gould et al., 2018)。多くの植物の発生過程において細胞や組織は協調的な振り舞いを見せる必要があるため、個々の異なる概日時計が調整されて発生のタイミングを計っていると考えられる。例えば、恒常条件下で根の先端や側根原基では概日リズムの位相がリセットされることが知られている (Fukuda et al., 2012; Vofß et al., 2015)。

個々の細胞時計が協調する方法として、細胞間コミュニケーションが考えられる (Sorkin and Nusinow, 2021)。植物の局所的なシグナル伝達は、細胞壁もしくは原形質連絡を介して行われ、長距離のシグナル伝達は、維管束を介して行われている (Bloemendal and Kück, 2013)。時計遺伝子の発現を観測する発光レポーターを用いた複数の研究において、細胞時計の局所的な細胞間コミュニケーションの存在が示唆されている (Fukuda et al., 2007; Wenden et al., 2012; Muranaka and Oyama, 2016; Greenwood et al., 2019)。また、遺伝子発現解析や接ぎ木実験によって、地上部から地下部への時間情報の伝達が示唆されている (James et al., 2008; Takahashi et al., 2015; Chen et al., 2020)。加えて茎頂の切除が根の概日時計に影響を与えたことから、地上部、特に茎頂が離れた場所の概日時計を制御していることが報告された (Takahashi et al., 2015)。植物細胞間の時間情報の伝達様式は不明であるが、原形質連絡で繋がっているため、拡散性の物質が関与すると想定されている (Fukuda et al., 2007)。興味深いことに、プロトプラストとして単離した細胞において

も細胞間コミュニケーションの存在が指摘されている (Takahashi et al., 2015)。シロイヌナズナの茎頂から単離した細胞の細胞密度を低くすることによって、細胞集団の概日リズムが減衰することから、細胞間コミュニケーションが茎頂のプロトプラストの概日リズムに影響を与えていることが示唆された (Takahashi et al., 2015)。第 1 章で述べたように、この細胞密度による概日リズムの振幅の維持は、シロイヌナズナの葉由来の単離細胞の概日リズムにおいても確認されている。

細胞密度による概日リズムの振幅の維持 (発振) は、植物の単離細胞の概日時計だけでなく、哺乳類の概日時計においても知られている。約 1 万個の神経細胞からなる視交叉上核では、拡散性メッセンジャー (Silver et al., 1996; Maywood et al., 2011) やシナプスシグナル (Yamaguchi et al., 2003; Aton et al., 2005)などを介した結合によって細胞間コミュニケーションが行われ、単一細胞よりも遺伝的および環境的な摂動に強いコヒーレントなリズム (複数の概日振動子の位相や振幅が揃っているリズム) を生み出している (Liu et al., 2007)。視交叉上核の個々の細胞は独立した細胞概日時計として機能するが、視交叉上核細胞を低細胞密度で培養すると、概日リズムを示す細胞の割合が減少する (Webb et al., 2009)。これらの結果は、単一細胞の概日リズムの生成には、細胞間コミュニケーションが重要であることを示唆している。さらに、中枢時計である視交叉上核の概日リズムが細胞密度の影響を受けることと同様に、末梢時計である線維芽細胞の概日リズムも細胞密度によって概日リズムの安定性 (振幅の維持) に影響することが報告されている (Noguchi et al., 2013)。このように、個々の細胞の概日リズムの挙動を観測することによって哺乳類においては細胞一つ一つが細胞密度の効果を反映した概日リズムを示すことが報告されているが、第 1 章の研究も含めて、植物において細胞密度の効果は単離細胞集団としてしか調べられていない。

第 3 章では、シロイヌナズナ葉から単離した細胞を用いて、単一細胞レベルで細胞密度が細胞の概日時計に与える影響を報告した (図 30)。単一細胞発光解析では、個々の単離細胞の発光概日リズムを測定するために、単離細胞ごとの発光が重ならないようにする必要があった。そのため、発光しない細胞を添加することによって高細胞密度を単一細胞発光解析においても実現した。高細胞密度培養における葉由来細胞の発光概日リズムのピーク間隔は標準細胞密度培養に比べて安定化し、明暗に対する細胞間の正確性も向上した。細胞密度による概日リズムへの影響は時刻情報に依存しない単離細胞からの分泌物質によって部分的に引き起こされていた。



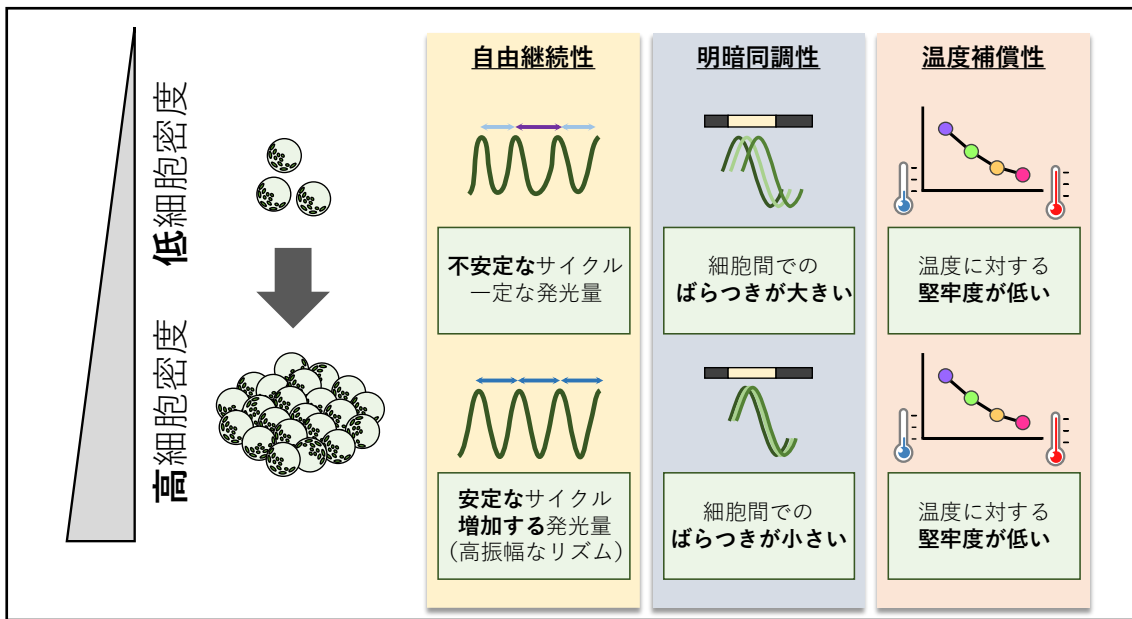


図 30 第 3 章のまとめ

高細胞密度が葉由来細胞の概日リズムに与える影響をまとめた。

## 結果

### 位相情報に非依存的な単離細胞集団の概日リズムの安定化

第 2 章で述べたように、根由来細胞に比べて葉由来細胞の概日リズム（標準条件での細胞密度、 $2 \times 10^4$  cell/4 ml）のピーク間隔は不安定で、かつ明暗に対して細胞間の低い同期率が示されている（[図 19D](#)、[図 29C](#)）。先行研究や第 1 章の結果から、茎頂や葉から単離したプロトプラストの概日リズムの振幅に細胞密度が影響を与えることが報告されている（Takahashi et al., 2015; Nakamura and Oyama, 2018）。細胞全体の平均概日リズムは各細胞の概日リズムを反映している。各細胞の概日リズムの振幅が等しい場合、細胞全体の平均概日リズムの振幅は細胞間の同期率によって決まり、細胞間の同期率が高いほど細胞全体の平均概日リズムの振幅は高くなる。複数の周期の異なる細胞概日リズムが存在する場合、恒常条件では細胞全体の平均概日リズムの振幅は各細胞の概日リズムの位相の不揃いによる脱同期によって低下する。恒常条件下で、概日リズムの振幅が等しい細胞によって構成される細胞集団の細胞全体の平均概日リズムの高い振幅が維持されるためには、細胞概日リズムの細胞間の周期のばらつきを小さくする、もしくは細胞概日リズムの位相を細胞間で揃える作用がはたらく必要がある。

細胞密度による概日リズムの振幅の維持が、細胞間の概日リズムの位相の同期によって生じるかどうかを調べた。まず、細胞集団レベルで概日リズムに対する細胞密度の影響を調べるために、第 1 章でも使用した多検体の発光を検出することができるプレート発光測定装置を用いて発光概日リズムを測定した（[図 6](#)）。*CCA1::LUC* レポーターを保持する発光細胞（ $1 \times 10^4$  cell/4 ml）と非発光細胞（レポーターが形質転換されていない細胞）を異なる非発光細胞密度比で共培養した [発光細胞：非発光細胞、1：4、1：20、1：40（最終的な細胞密度： $5 \times 10^4$  cell/4 ml、 $2 \times 10^5$  cell/4 ml、 $4 \times 10^5$  cell/4 ml）]（[図 31](#)）。第 1 章で示したように、恒常条件下の細胞集団の発光概日リズムは、高い細胞密度ほどより高い振幅を示した。

次に非発光細胞の時刻情報が発光細胞の概日リズムの振幅に影響を与えるかどうかを調べた。プロトプラスト単離後に明暗に同調した発光細胞（ $2 \times 10^4$  cell/4 ml）に、それと同じ明暗サイクル（順相）に同調した非発光細胞もしくは順相とは 12 時間ずらした逆相の明暗サイクルに同調した非発光細胞（ $4 \times 10^5$  cell/4 ml）を恒常条件下で添加し、共培養した（[図 32](#)）。その結果、順相と逆相に同調させた非発光細胞を添加した細胞集団では、いずれも同じピーク時刻を示す高振幅の概日リズムが観察された。細胞密度による細胞集団の高振幅な概日リズムの形成が位相を揃える作用によって生じている場合、逆相の非発光細胞を多量に添加すると発光細胞の概日リズムの位相が影響を受けるため、細胞集団の概日リズムの振幅は低下するはずだが、そのような現象は見られず、単離細胞集団の高振幅な概日リズムが観察された。また、有意な差は見られなかったが、不規則な概日リズム

を示す時計遺伝子の変異体である *elf3* の植物から単離した細胞（非発光細胞）を添加しても、発光細胞の概日リズムの振幅が増加する傾向にあった（図 33）。このことから、単離細胞集団は添加された細胞が有する概日リズムの位相情報に関係なく、高細胞密度によって高振幅化することが示された。

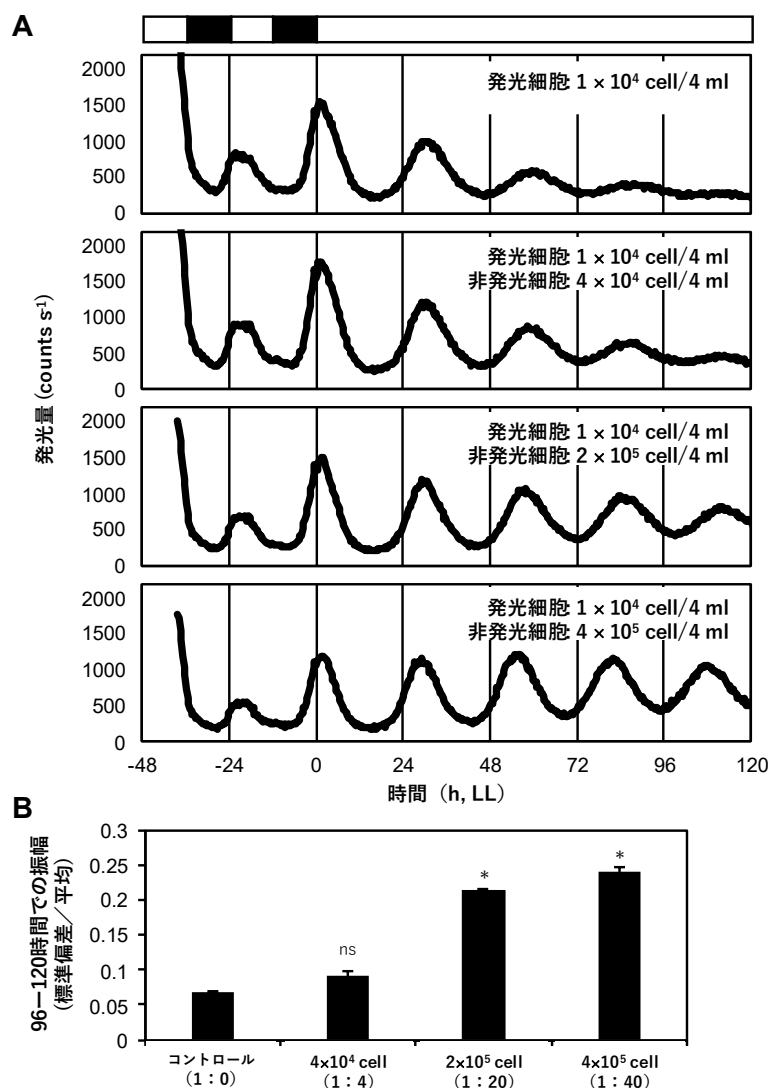


図 31 培養液中の細胞密度の上昇による細胞集団レベルの葉由来細胞概日リズムの振幅の増加

(A) 葉由来の非発光細胞の細胞密度を変化させたときの恒明条件 (LL) における細胞集団の発光概日リズム。発光細胞と非発光細胞は、*CCA1::LUC* 形質転換植物と野生型植物の葉から単離することによって準備した。白い箱と黒い箱は明期と暗期を示す。各共培養条件について、3 回の実験の代表的な概日リズムを示した。(B) 各細胞密度における概日リズムの振幅。振幅は 96-120 時間の 72 点における生物発光量の変動係数 (標準偏差/平均値) として定義した。3 回の実験の平均 ± 標準誤差として示した。コントロールと有意に異なる (\* $p < 0.01$ 、Student's *t* 検定)。ns = not significant。

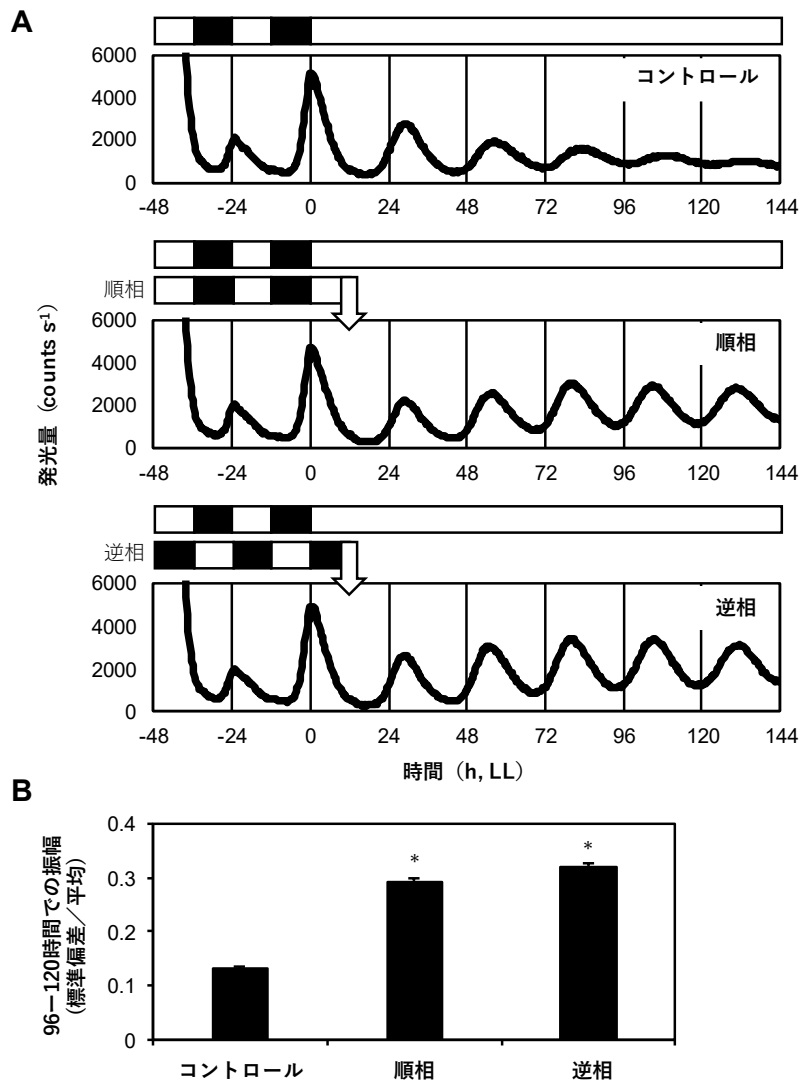
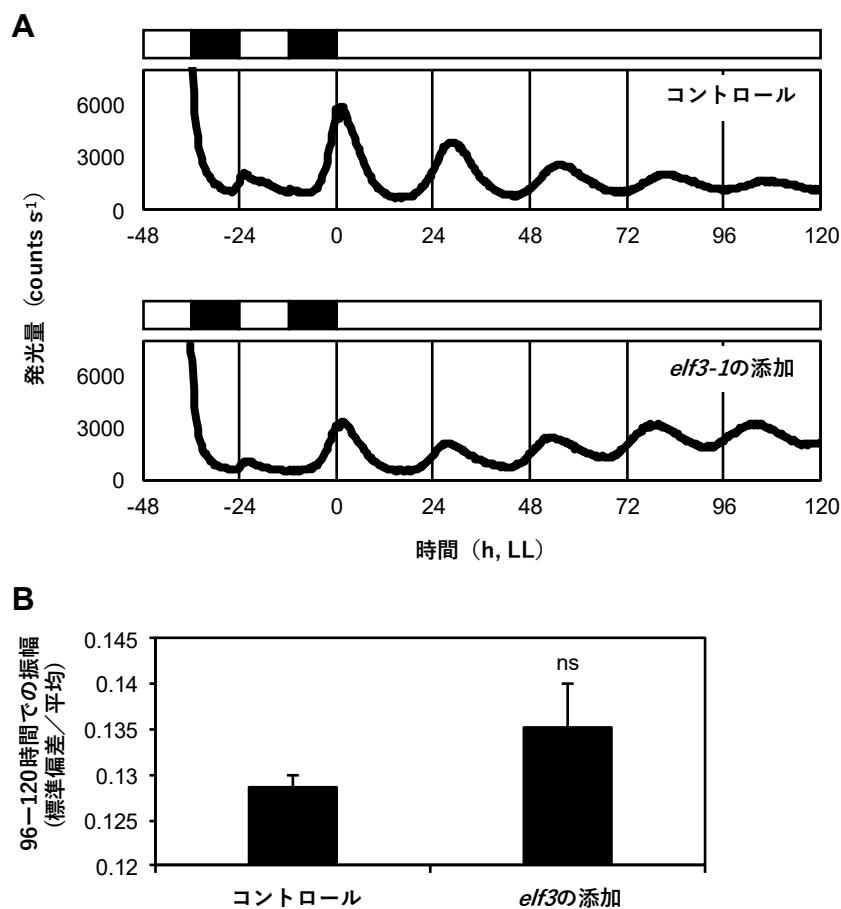


図 32 順相もしくは逆相に同調させた非発光細胞の添加による葉由来細胞の発光概日リズムへの影響

(A) 添加する葉由来の非発光細胞 ( $4 \times 10^5$  cell/4 ml) の概日リズムの位相を変化させたときの恒明条件 (LL) における細胞集団の発光概日リズム ( $2 \times 10^4$  cell/4 ml)。発光細胞と非発光細胞は、*CCA1::LUC* 形質転換植物と野生型植物の葉から単離することによって準備した。非発光性細胞は、矢印で示した時間に加えた。白い箱と黒い箱は明期と暗期を示す。各共培養条件について、3 回の実験の代表的な概日リズムを示した。(B) 各細胞密度における概日リズムの振幅。振幅は 96-120 時間の 72 点における生物発光量の変動係数 (標準偏差/平均値) として定義した。3 回の実験の平均  $\pm$  標準誤差として示した。未処理のコントロールと有意に異なる ( $*p < 0.01$ , Student's *t* 検定)。順相と逆相添加の間の振幅において有意な差は見られなかった ( $p = 0.24$ )。



**図 33** *elf3*添加による概日リズムの振幅への影響

(A) *elf3*変異体から単離した葉由来の非発光細胞 ( $3.8 \times 10^5$  cell/4 ml) を添加したときの恒明条件 (LL) における細胞集団の発光概日リズム ( $2 \times 10^4$  cell/4 ml)。発光細胞は *CCA1::LUC*形質転換植物の葉から、非発光細胞は *elf3*変異体から単離することによって準備した。白い箱と黒い箱は明期と暗期を示す。各共培養条件について、3 回の実験の代表的な概日リズムを示した。(B) 各細胞密度における概日リズムの振幅。振幅は 96-120 時間の 72 点における生物発光量の変動係数 (標準偏差/平均値) として定義した。3 回の実験の平均±標準誤差として示した。未処理のコントロールと非発光細胞添加の間の振幅において有意な差は見られなかった。

## 高細胞密度培地における細胞概日リズムの安定性と正確性の向上

高細胞密度による細胞集団の概日リズムの高振幅化がどのように生じるのかは大きな疑問である。細胞集団による解析ではどのような原因で概日リズムの高振幅化が引き起こされているかを明確にすることは難しいため、個々の細胞の概日リズムを単一細胞レベルで観測することによって直接的に細胞密度の影響を調べた。第 2 章で述べたように単一細胞の発光概日リズム解析では高感度 EM-CCD カメラによって各細胞の発光を検出するため、細胞同士が重なるような高細胞密度では細胞ごとの概日リズムを測定することはできない (図 17)。各単離細胞の生物発光を分けて観察するために、発光細胞 ( $2 \times 10^4$  cell/4 ml) と非発光細胞 ( $4 \times 10^5$  cell/4 ml) を含む高細胞密度培養液を調製した。この高細胞密度培養液を用いることで高細胞密度においても個々の細胞の発光概日リズムを測定することができる。標準細胞密度培養液と比較して、高細胞密度培養液の葉由来細胞 (概日リズム細胞) の概日リズムの波形自体がより明瞭になった (図 19A、図 34A)。解析可能細胞に対して FFT-NLLS 解析を実行することによって、頑健な概日リズムを示す (RAE  $\leq 0.2$ ) 細胞の割合は、標準細胞密度 (64%) よりも高細胞密度 (79%) の方が高いことが示された (図 35AB)。高細胞密度によって頑健な概日リズムを示す細胞が増えていたため、測定期間中において完全な概日リズムが検出されるグループ 0 の細胞の割合が高くなると考えた。表 4 は、3 種類に分類した細胞の割合を示している。概日リズム細胞の割合 (グループ 0) は、標準細胞密度培養液 (32%) よりも高細胞密度培養液 (39%) の方が高くなっていった。測定中に概日リズムが消失したグループ 1 の細胞の割合は、標準細胞密度培養液 (28%) よりも高細胞密度培養液 (11%) の方が低かった (図 17、表 4)。高細胞密度によって細胞概日リズムの持続性が向上し、測定途中で発光が見られなくなる細胞の割合は減っていることから、単離細胞の密度は細胞の概日リズムの持続性に影響を与えることが示された。

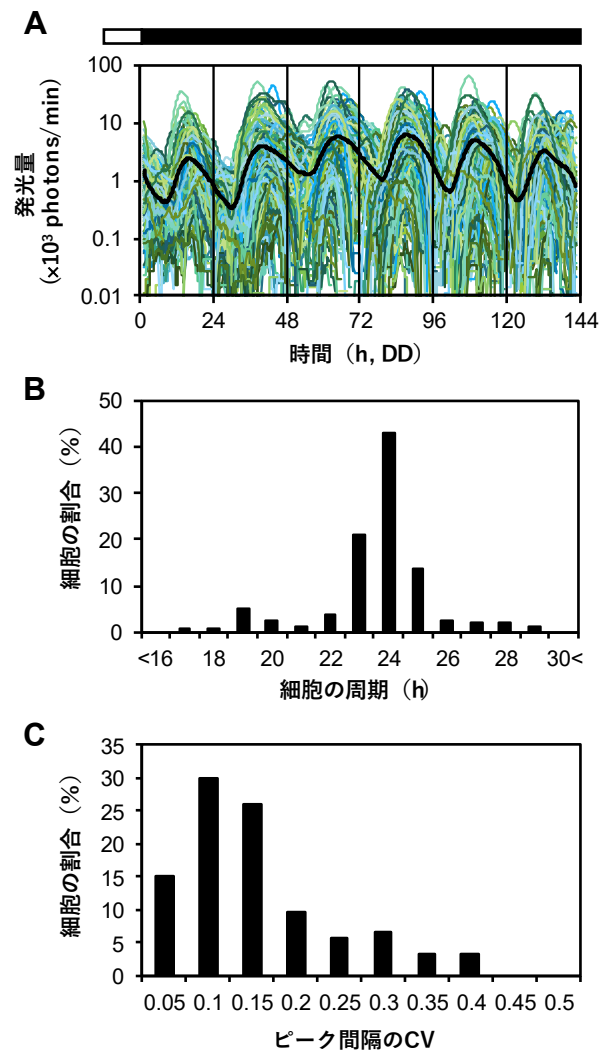
表 4 高細胞密度培養におけるグループごとの細胞の割合

実験	細胞数 (%)		
	グループ 0	グループ 1	グループ 2
Exp34	66 (47.1)	10 (7.1)	64 (45.7)
Exp35	51 (42.5)	12 (10.0)	57 (47.5)
Exp36	36 (27.5)	21 (16.0)	74 (56.5)
合計	153 (39.1)	43 (11.0)	195 (49.9)

実験条件・測定結果の詳細は資料 3 と 4 に記述してある。

標準細胞密度に比べて高細胞密度によって頑健な概日リズムを示す細胞の割合は増え、概日リズムが持続する細胞の割合が増えた。次に細胞概日リズムの周期を概日リズム細胞のピーク間隔の平均によって求めた（用語・略語）。高細胞密度培養液における葉由来細胞の細胞概日リズムの周期は  $23.2 \pm 1.9$  h であり、標準細胞密度培養液における葉由来細胞の細胞概日リズムの周期 ( $23.0 \pm 2.2$  h) との違いは見られなかった（図 19C：葉由来細胞、図 34B）。興味深いことに、細胞概日リズムのサイクル間のばらつき度合いを表す CV は、標準細胞密度培養液 (0.17) よりも高細胞密度培養液の方が低かった (0.13)（図 34C）。つまり、高細胞密度において各細胞の概日リズムの周期を変えることなく、サイクル間の安定性が向上していた。高細胞密度による細胞集団の概日リズムの高振幅化は、個々の細胞の概日リズムの安定化によって細胞間の位相のばらつきが小さくなることが原因の一つであることが示された。

第 2 章で明暗サイクル下における葉由来細胞の概日リズムの同期率（細胞間の明暗に対する正確性）の低さは、概日リズムの不安定性（サイクル間のばらつきが大きいこと）が原因であると考えられた（図 19D、図 29C）。高細胞密度によって葉由来細胞の概日リズムが安定化したため、高細胞密度における葉由来細胞の明暗サイクルに対する細胞間の正確性を同期率（用語・略語）で算出し、概日リズムの安定化が明暗に対する細胞間の正確性への影響を確かめた。その結果、高細胞密度の単離細胞において明暗に対する細胞間の正確性が向上していることが示された（図 36）。明暗サイクルに対する細胞間の正確性は概日リズムのサイクル間のばらつきが原因であることが示され、葉由来細胞においては細胞密度が概日リズムの安定性を調節することが明らかになった。



**図 34 高細胞密度培養による葉由来細胞の概日リズムリズムの安定化**

2 回の明暗サイクルに同調させた *CCA1::LUC* 形質転換シロイヌナズナと野生型植物の葉からプロトプラストを単離した。発光細胞 ( $2 \times 10^4$  cell/4 ml) と非発光細胞 ( $4 \times 10^5$  cell/4 ml) を準備した。(A) 個々の発光概日リズム (153 個の葉由来細胞) とそれらの細胞の平均発光量 (黒線)。9 点分の移動平均処理した発光リズムを示す。白い箱は明期、黒い箱は暗期を示す。(B) 周期の頻度分布。(C) ピーク間隔の変動係数 (CV) の頻度分布。



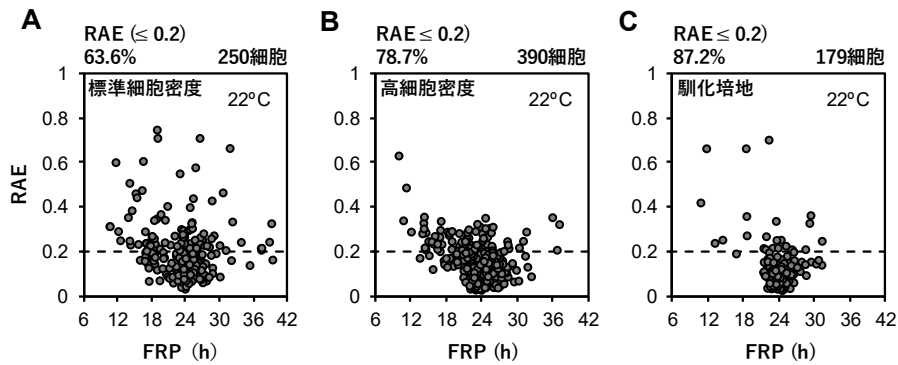


図 35 発光変動から算出された RAE 値と FRP 値の培地ごとの比較

標準細胞密度培養 (A)、高細胞密度培養 (B)、馴化培地 (C) における葉部由来の細胞の個々の細胞の発光変動から算出された FRP と RAE の値。FRP と RAE は FFT-NLLS 解析により算出した。各条件において RAE ( $\leq 0.2$ ) を示したサンプルの割合を表す。

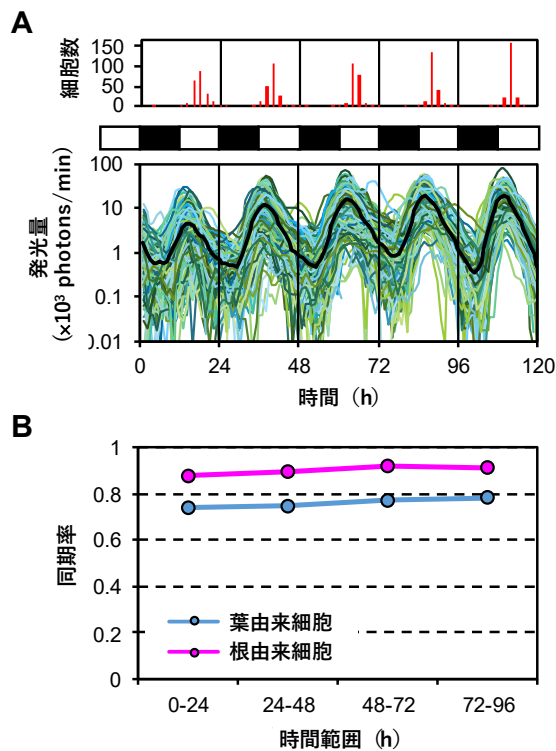


図 36 明暗サイクルに対する高細胞密度培養下の葉由来細胞における同期率の増加

(A) 明暗サイクル下での高細胞密度培養における発光概日リズム (203 個の葉由来細胞) と平均発光量 (黒線)。3 点分の移動平均処理した発光リズムを示す。ピークを示す細胞数をグラフ上部に示した。白い箱と黒いはそれぞれ明期と暗期を示す。(B) 標準細胞密度培養 (青線) と高細胞密度培養 (紅紫線) における葉由来細胞のピーク時刻の 1 日ごとの同期率を図示した。

## 細胞密度非依存的な細胞概日リズムの周期性

高細胞密度培養液における単離細胞の発光概日リズムのサイクル間の安定性が向上した一方、概日リズムの周期には影響が見られなかった (図 19CD : 葉由来細胞、図 34BC)。次にこの現象が 22°C 以外の温度においても観察されるかどうかを確かめた。第 2 章において、標準細胞密度培養液における葉由来細胞 (解析可能細胞) のピーク間隔を算出している (図 21CD、表 3)。第 2 章で述べたように温度によって分類されるグループの細胞の割合が変化するため (図 25)、高細胞密度においても解析可能細胞を用いた。高細胞密度培養液における葉由来細胞のピーク間隔を温度ごとに算出した (図 37)。図 37 の破線は図 21C のデータを示している。標準細胞密度培養液の葉由来細胞の周期 (ピーク間隔の平均) に比べて、27°C において高細胞密度培養液の解析可能細胞の周期 (ピーク間隔の平均) が短くなったものの、27°C、22°C、17°C において、高細胞密度培養液と標準細胞密度培養液での概日リズムの周期に大きな違いは見られなかった (図 37)。ピーク間隔の中央値においても同様に違いは見られなかった (表 5)。高細胞密度培養におけるサイクル間の安定性の向上は、温度条件に依存するよう見えた。概日リズム細胞のサイクル間の安定性はピーク間隔のばらつきを示す CV 値を用いていた。解析可能細胞では細胞ごとのサイクル間のばらつきを評価することはできないので、全ピーク間隔のばらつきを調べることにした。MAD (中央絶対偏差) によって全ピーク間隔のばらつきを評価した (表 5)。標準細胞密度培養液に比べて 27°C と 22°C ではピーク間隔の MAD が高細胞密度培養液で小さくなった。17°C ではピーク間隔の MAD に変化はなく、12°C においては MAD の値が大きくなっていた。(表 5)。各温度で細胞概日リズムの周期の平均値や中央値は細胞密度の影響をほとんど受けていなかったため、高細胞密度は細胞概日リズムの周期の長さに影響を与えないことが確かめられた。一方で高細胞密度による概日リズムの安定化は温度に依存していた。概日リズムの安定化を引き起こす物質の分泌が温度に依存していることが原因かもしれない。

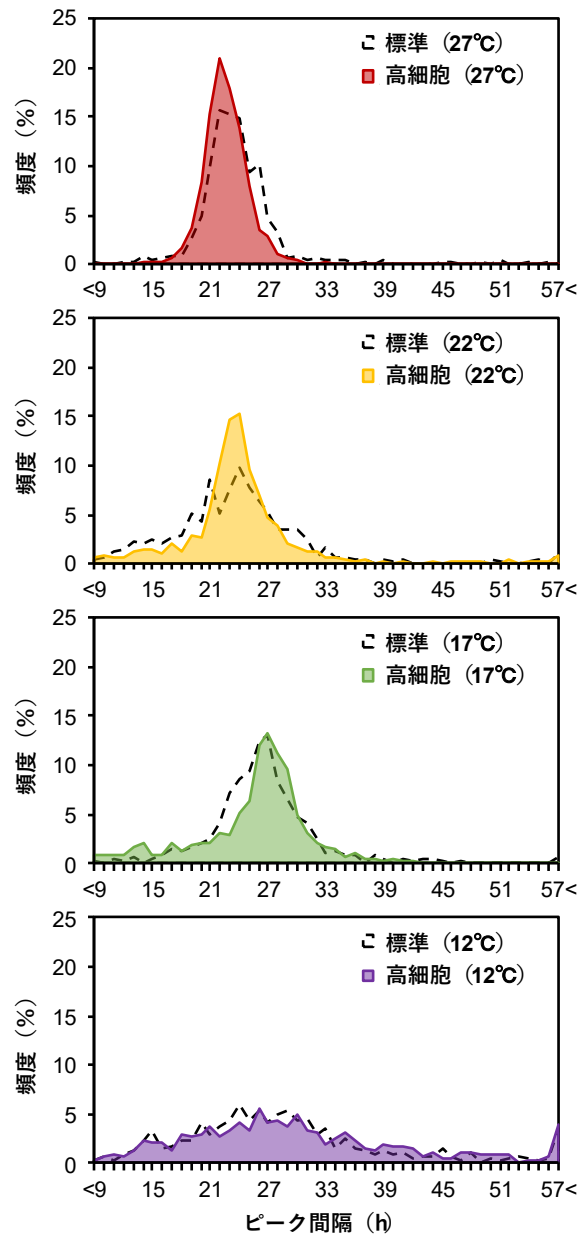
**表 5 各温度における標準細胞密度培養と高細胞密度培養した細胞概日リズムのピーク間隔の中央値**

培養条件	ピーク間隔の中央値 ± MAD (h)			
	27°C	22°C	17°C	12°C
標準細胞密度	23.00 ± 2.47	23.33 ± 4.94	26.00 ± 3.46	26.67 ± 8.40
高細胞密度	22.00 ± 1.98	23.33 ± 2.97	26.33 ± 3.46	27.67 ± 10.39

算出には、解析可能細胞のデータを使用した。

ピーク間隔のデータは各温度の複数実験の合計を示している。

標準細胞密度：Exp17—19 (27°C)、Exp1—3 (22°C)、Exp6—8 (17°C)、Exp11—13 (12°C)。高細胞密度：Exp43—44 (27°C)、Exp34—36 (22°C)、Exp39—40 (17°C)、Exp41—42 (12°C)。詳細は資料 1—4 に記述してある。



**図 37 高細胞密度培養における温度ごとの葉由来細胞のピーク間隔の頻度分布**

*CCA1::LUC* 形質転換シロイヌナズナの葉と根からプロトプラストを単離し、27°C、22°C、17°C、12°Cのいずれかの恒暗条件に細胞を移し、発光変動を測定した。発光細胞 ( $2 \times 10^4$  cell/4 ml) と非発光細胞 ( $4 \times 10^5$  cell/4 ml) を準備した。高細胞密度培養した葉由来細胞の各温度におけるピーク間隔を度数分布多角形で図示した (27°C : 赤、22°C : 黄、17°C : 緑、12°C : 紫)。各図の破線は、標準細胞密度培養での細胞の頻度分布を表す (図 25C 参照)。標準細胞密度培養と高細胞密度培養では、27°Cの条件でのみ有意な差が見られた (Brunner-Munzel 検定、 $p < 0.01$ )。

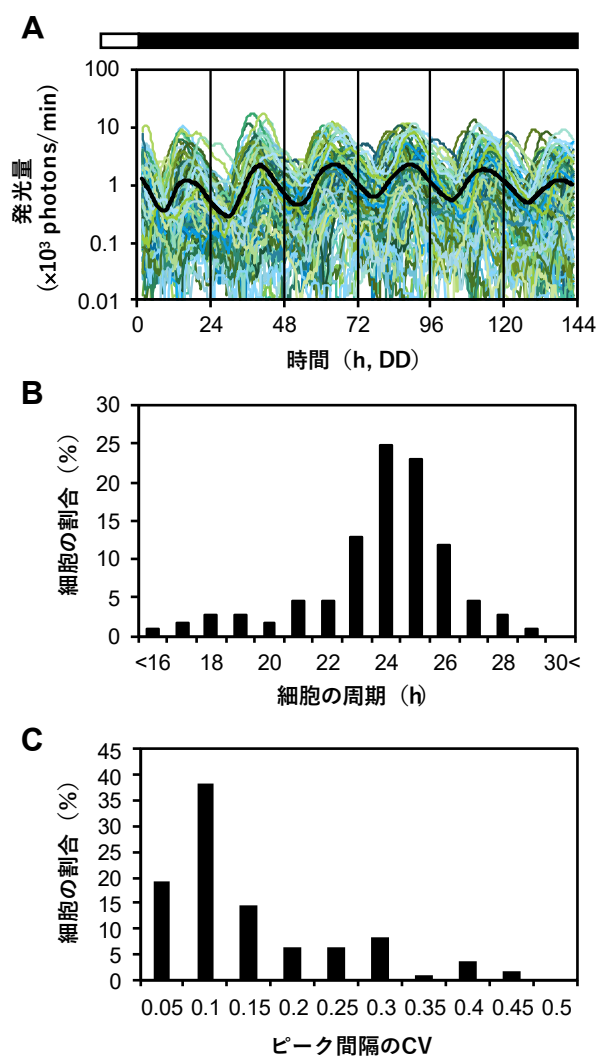
## 馴化培地における細胞概日リズムの安定性の向上

順相・逆相に同調させた細胞の添加実験や高細胞密度培養液における単離細胞の発光概日リズム測定の結果から、高細胞密度による細胞の概日リズムの安定化は、位相情報を含まない複合的な影響であると考えられるが、そのメカニズムは想定できていない。細胞密度による概日リズムへの影響の作用機序を考察するために馴化培地 (Conditioned medium) を使用した。馴化培地を使用することによって、単離細胞同士の接触が原因なのかどうかを確かめることができると考えた。馴化培地は、高細胞密度で 1 週間、葉由来細胞の概日リズムを測定した培養液から細胞を取り除くことで調整した。馴化培地によって単離細胞の概日リズムが安定化する場合、分泌物質による作用機序が推定できる。馴化培地に標準細胞密度に調整した葉由来細胞を加え、恒暗条件下で発光概日リズムを測定した (図 38)。初めに頑健な細胞の割合を FFT-NLLS 解析によって調べた。頑健なリズムを示す細胞 ( $RAE \leq 0.2$ ) の割合は、標準細胞密度培養液 (64%) よりも馴化培地 (87%) の方が高かった (図 35AC)。

馴化培地における概日リズム細胞の概日リズムの周期を算出すると、馴化培地における細胞の概日リズムの周期は  $23.3 \pm 2.3$  時間となり、標準条件や高細胞密度条件の単離細胞との周期の違いは見られなかった (図 19C、図 34B、図 38B)。標準密度培養に比べて高細胞密度培養における葉由来細胞の概日リズムのピーク間隔のばらつきは小さくなっていたため (図 19D、図 34C)、馴化培地においても概日リズムの安定性が向上しているかどうかを確かめた。標準細胞密度の馴化培地の葉由来細胞は、高細胞密度培養と同様に、低い CV 値 (0.12) を示し、概日リズムの安定性が向上していた (図 34C、図 38C)。これらのことから、高細胞密度によってもたらされる効果は、単離された細胞によって分泌される物質が関連していると考えられる。一方で、高細胞密度培養液において馴化培地では見られない細胞概日リズムへの影響も示された。高細胞密度下においては概日リズムのサイクルごとの安定性の向上に加えて、振幅が有意に増加していた (図 39)。馴化培地においても振幅が増加する傾向にあったものの有意な差は見られなかった。振幅の時系列ごとの変遷を調べると、標準細胞密度培養液では、振幅は徐々に減少し、高細胞密度培養液ではわずかに増加し、馴化培地では一定のままであった。

高細胞密度による概日リズムのサイクル間の安定化は分泌物質によって引き起こされ、概日リズムの振幅の増加は細胞間の直接の接触もしくは高濃度の分泌物質によって引き起こされていた。高細胞密度は概日リズムの位相の相互同期ではなく、概日リズムの

安定化による細胞間の位相の同期と振幅の増加によって、細胞全体としてコヒーレントなリズム（複数の概日振動子の位相や振幅が揃っているリズム）を誘導していた。



**図 38 馴化培地による標準細胞密度の葉由来細胞の概日リズムの安定化**

2 回の明暗サイクルに同調させた *CCA1::LUC* 形質転換シロイヌナズナからプロトプラストを単離した。発光細胞 ( $2 \times 10^4$  cell/4 ml) を葉由来細胞を 1 週間培養して調整した馴化培地に移した。(A) 個々の発光概日リズム (109 個の葉由来細胞) とそれらの細胞の平均発光量 (黒線)。9 点分の移動平均処理した発光リズムを示す。白い箱は明期、黒い箱は暗期を示す。(B) 周期の頻度分布。(C) ピーク間隔の変動係数 (CV) の頻度分布。

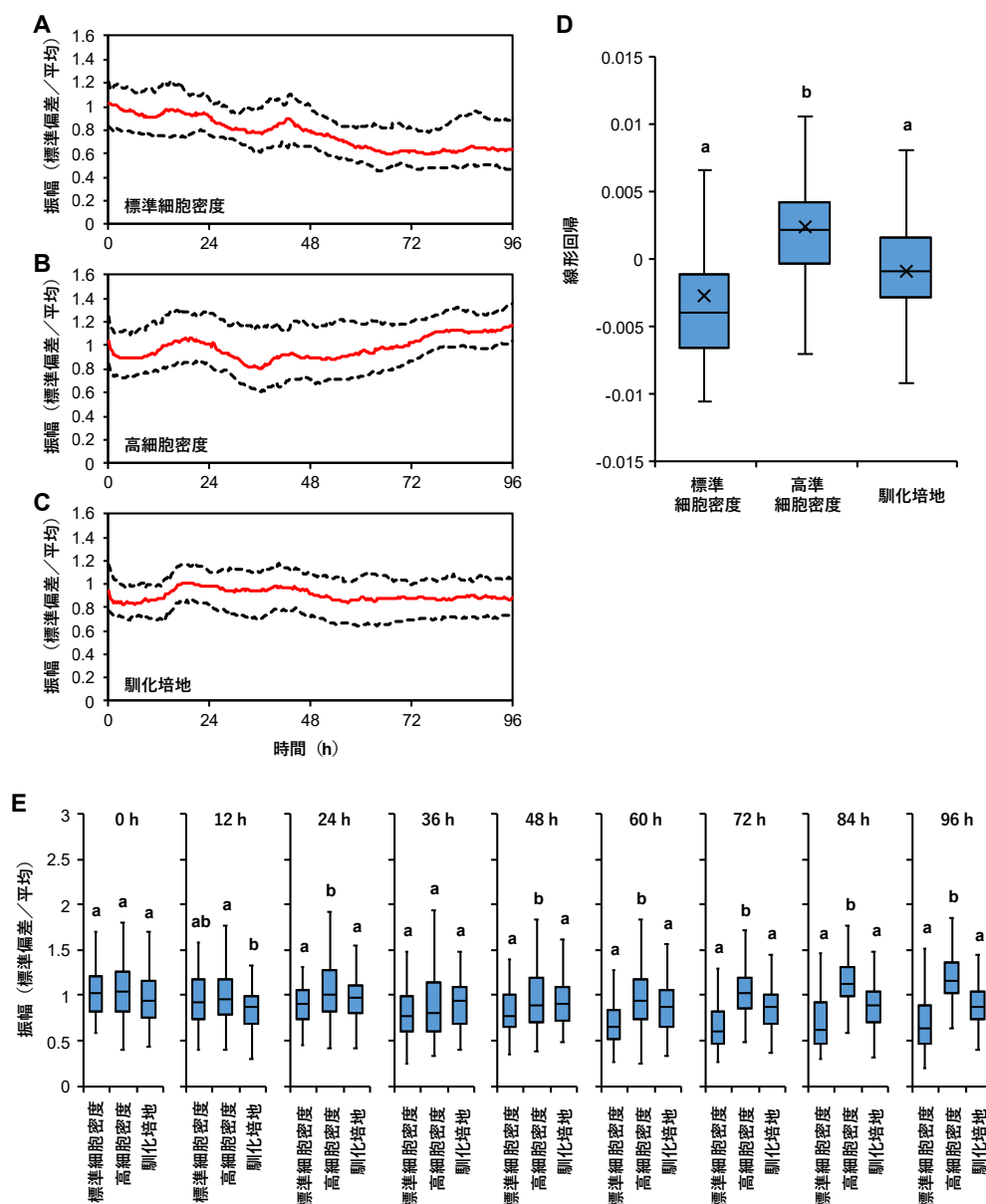


図 39 葉由来細胞の概日リズムの振幅の時系列変化

細胞概日リズムの振幅は、24 時間 (72 点分) における生物発光量の変動係数 (標準偏差 / 平均値) として定義した。標準細胞密度培養 (A : 80 葉由来の細胞)、高細胞密度培養 (B : 153 葉由来の細胞)、馴化培地における標準細胞密度培養 (C : 109 葉由来の細胞) の細胞概日リズムを解析した。各グラフにおいて、赤線は中央値、破線は 25% (第一四分位数) と 75% (第三四分位数) を表す。(D) 振幅の傾向を示す回帰係数の箱ひげ図。各培養条件で定常的な時系列 (傾向を示さない時系列) を示した細胞は 5% 以下であった (Augmented Dickey-Fuller 検定、 $p < 0.01$ )。 (E) 12 時間ごとの各細胞の振幅を箱ひげ図で示した。各図では中央線が中央値、上下の縁が第一・三四分位数 (25% と 75%)、ひげが最小値と最大値を示している。統計的な差は箱の上の文字で示した (one-way ANOVA with post hoc Tukey-Kramer 検定、 $p < 0.001$ )。

## 考察

第 3 章では、細胞密度による効果を単一細胞の挙動として検出することに成功した。植物の単離細胞において、高細胞密度による概日リズムの安定化は、時刻情報に非依存の分泌物質によって部分的に生じていることが明らかとなった。

先行研究においてプロトプラストの細胞密度が単離細胞集団の概日リズムの振幅に影響を及ぼすことが知られている (Takahashi et al., 2015)。茎頂から単離したプロトプラストの細胞溶液を薄めると単離細胞集団の概日リズムが減衰したことから、細胞間コミュニケーションの減少がプロトプラストの概日リズムの脱同期を引き起こしたと報告している。しかし、細胞レベルの解析結果から低細胞密度が概日リズムの脱同期を引き起こすと解釈するよりは、概日リズムが持続する細胞の減少と各細胞概日リズムの振幅の低下によって引き起こされていると解釈するべきである (図 25、表 4、図 39)。低細胞密度による概日リズムの不安定化 (サイクル間の大きいばらつき) は、細胞間の概日時計の時刻を不揃いにするが、細胞の概日リズムの周期には影響しないため、同期率の急激な低下は生じない (振幅は大きく低下しない) (図 19CD: 葉由来細胞、図 34)。そのため、概日リズムの不安定化による細胞集団の概日リズムの振幅の低下を説明することは難しい。しかし、先行研究では茎頂のプロトプラストを用いていたため、組織によって細胞密度の効果が異なる可能性は残っている。

プロトプラストから植物体に再生させる際にも細胞密度が重要であることは以前から議論されている。タバコの葉から単離した葉肉細胞のプロトプラストを植物に戻す際に細胞分裂やコロニー化に高細胞密度が必要であることが報告されている (Nagata and Takebe, 1971)。また、タバコ以外の植物においても細胞密度が重要であり、細胞壁の再合成、成長や細胞分裂に必須な物質を生産していると考えられているが、物質は未だに特定されていない (Kao and Michayluk, 1975; Davey et al., 2005)。動物においても細胞密度が概日リズムの振幅に関与している。概日発現発光レポーターを形質転換した線維芽細胞を用いて、細胞密度と概日リズムの関連性を調べると細胞密度が高いほど頑健な概日リズムが生じた (本研究での RAE と同様の指標を使用)。さらに、概日リズムの周期が異なる時計遺伝子変異体を加えても概日リズムの位相には影響を与えず、また馴化培地においても頑健な概日リズムが生じたことから、物質は特定されていないが分泌物質が線維芽細胞の時計遺伝子の頑健な概日リズムに必須であることが示された (Noguchi et al., 2013)。動物や植物にかかわらず、細胞の安定化が頑健な概日リズムを形成することに重要であると考えられる。概日リズムの安定化には細胞内の分子数の攪乱など概日時計内部のノイズが関与していると考えられているため (Gonze et al., 2002; Zhang and Gonze, 2021)、高細胞密度による影響は細胞の安定化を促進することによって概日時計 (細胞) 内部の攪乱を抑えているのかもしれない。この内部の攪乱については最終章でも記述した。

高細胞密度の効果によって、葉由来細胞の概日リズムの振幅が増加することが示



された (図 39)。時間生物学的な観点から見ると、細胞密度の影響によって時間を経るごとに振幅が増加していくことはかなり不思議な現象である。多細胞集団において、概日リズムの振幅が増加した場合は、各細胞概日リズムの振幅は変化せずに各細胞概日リズムの位相が揃う同期現象もしくは、各細胞概日リズムのある種の共鳴現象によって生じる各細胞概日リズムの振幅の増加が原因であると考えられる (Schmal et al., 2018)。単離細胞を用いた概日リズムの振幅の増加は、他細胞からの位相情報によって生じているとは考えにくい。前述のように高細胞密度は細胞の安定化を誘導している可能性がある。細胞の状態が良くなると概日リズムの振幅が増加する原理は不明だが、細胞の形態が変化することによって相対的に発光量が増加していることに原因があるかもしれない。

植物において細胞密度の高い場所は、分裂組織であると思われる。分裂組織である茎頂や根端では概日リズムの振幅が高いことが報告されている (Takahashi et al., 2015; Gould et al., 2018; Greenwood et al., 2019)。人工的な状況ではあるが、単離細胞においても細胞密度を上げると振幅が高くなることから、時刻情報を含まない細胞間コミュニケーションが分裂組織における高振幅な概日リズムに関与しているかもしれない。

## 材料と方法

### 植物と生育条件

実験には第 1 章と同様に *CCA1::LUC* 形質転換シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) と野生型 *Arabidopsis Columbia* (Col-0) エコタイプに加えて、*elf3-1* 変異体 (Hicks et al., 1996) を使用した。シロイヌナズナの培養は第 1 章と同様の方法で実施した。

### プロトプラスト単離と培養

第 1 章と第 2 章と同様の方法でシロイヌナズナからプロトプラストを単離した。

### 単一細胞の生物発光測定

第 2 章と同様の方法で単一細胞の生物発光を測定した。

### 発光概日リズムによる細胞の分類

第 2 章と同様の方法で発光情報から細胞を分類した。

### 時系列解析

第 2 章と同様の方法で発光変動の時系列 (タイムラプス) データを解析した。

### 同期率の計算

第 2 章と同様の方法で同期率を算出した。

### 生物発光測定装置による発光概日リズムの測定

第 1 章と同様の方法で、ディッシュ内の細胞集団の発光概日リズムを測定した。

### 馴化培地の調整

馴化培地は、高細胞密度で葉由来細胞を 1 週間培養した培地から回収した培養液を使用した。シロイヌナズナの葉から単離した細胞を W5+FBS 培地に移し、22°C の恒暗条件の高細

胞密度下（*CCA1::LUC* 形質転換体から単離した細胞： $2 \times 10^4$  cell/4 ml、形質転換されていない植物体から単離した細胞： $4 \times 10^5$  cell/4 ml）で発光変動を測定した。培養液を 22°C、1000×g で 3 分間遠心分離し、上清を 0.2 μm のセルロースフィルターでろ過した。得られたろ液を馴化培地として使用した。

### 資料 3

#### 第 3 章の実験条件のまとめ

実験	細胞の種類	光条件	温度 (°C)	細胞密度 (cell/4 ml)	Medium
Exp34	葉由来細胞	DD	22	$2 \times 10^4$ [ $+4 \times 10^5$ ]	W5+FBS
Exp35	葉由来細胞	DD	22	$2 \times 10^4$ [ $+4 \times 10^5$ ]	W5+FBS
Exp36	葉由来細胞	DD	22	$2 \times 10^4$ [ $+4 \times 10^5$ ]	W5+FBS
Exp37	葉由来細胞	LD	22	$2 \times 10^4$ [ $+4 \times 10^5$ ]	W5+FBS
Exp38	葉由来細胞	LD	22	$2 \times 10^4$ [ $+4 \times 10^5$ ]	W5+FBS
Exp39	葉由来細胞	DD	17	$2 \times 10^4$ [ $+4 \times 10^5$ ]	W5+FBS
Exp40	葉由来細胞	DD	17	$2 \times 10^4$ [ $+4 \times 10^5$ ]	W5+FBS
Exp41	葉由来細胞	DD	12	$2 \times 10^4$ [ $+4 \times 10^5$ ]	W5+FBS
Exp42	葉由来細胞	DD	12	$2 \times 10^4$ [ $+4 \times 10^5$ ]	W5+FBS
Exp43	葉由来細胞	DD	27	$2 \times 10^4$ [ $+4 \times 10^5$ ]	W5+FBS
Exp44	葉由来細胞	DD	27	$2 \times 10^4$ [ $+4 \times 10^5$ ]	W5+FBS
Exp45	葉由来細胞	DD	22	$2 \times 10^4$	馴化培地 (Conditioned medium)
Exp46	葉由来細胞	DD	22	$2 \times 10^4$	馴化培地 (Conditioned medium)

## 資料 4

### 第 3 章の実験ごとの解析データのまとめ

実験	細胞の種類	細胞数 (%)			平均ピーク間隔 ± SD		
		概日リズム細胞	不完全リズム細胞		概日リズム細胞	不完全リズム細胞	
		グループ 0	グループ 1	グループ 2	グループ 0	グループ 1	グループ 2
Exp34	葉由来	66 (47.1)	10 (7.1)	64 (45.7)	23.1 ± 3.7	29.4 ± 10.5	23.0 ± 5.1
Exp35	葉由来	51 (42.5)	12 (10.0)	57 (47.5)	22.8 ± 4.2	27.3 ± 11.6	23.6 ± 5.6
Exp36	葉由来	36 (27.5)	21 (16.0)	74 (56.5)	23.0 ± 4.3	28.8 ± 14.5	25.2 ± 10.5
Exp37	葉由来	117 (70.5)	0 (0.0)	49 (29.5)			
Exp38	葉由来	91 (52.0)	2 (1.1)	82 (46.9)			
Exp39	葉由来	76 (49.4)	15 (9.7)	63 (40.9)	24.9 ± 5.2	30.3 ± 8.0	25.3 ± 5.7
Exp40	葉由来	40 (39.6)	7 (6.9)	54 (53.5)	24.6 ± 5.4	29.0 ± 7.5	24.9 ± 6.4
Exp41	葉由来	13 (16.3)	28 (35.0)	39 (48.8)	24.5 ± 6.1	35.7 ± 17.2	27.8 ± 12.6
Exp42	葉由来	36 (12.9)	86 (30.9)	156 (56.1)	25.4 ± 5.8	32.5 ± 14.3	30.5 ± 12.4
Exp43	葉由来	53 (55.8)	10 (10.5)	32 (33.7)	22.7 ± 2.1	23.6 ± 4.6	23.5 ± 2.7
Exp44	葉由来	157 (80.1)	5 (2.6)	34 (17.3)	21.8 ± 2.1	22.4 ± 2.6	22.8 ± 2.4
Exp45	葉由来	60 (60.0)	6 (6.0)	34 (34.0)	23.3 ± 4.2	28.1 ± 9.2	24.1 ± 3.7
Exp46	葉由来	49 (62.0)	12 (15.2)	18 (22.8)	22.6 ± 4.3	26.0 ± 10.8	22.9 ± 3.9

## 最終章

### 個々の細胞の性質から植物個体へ

本研究では、単離された細胞の発光概日リズムを単一細胞レベルで解析することによって、植物の細胞時計の特徴を明確に示した。しかし、単離細胞を観察するために人工的な条件での細胞時計を調べているため、植物の組織や器官における細胞時計と単離細胞の概日時計との直接的な比較はできていない。最終章では、葉と根由来の単離細胞で見られた器官特異的な振る舞いを数理モデルによる先行研究にもとづいて、植物の地上部と地下部といった局所的な環境に対する細胞時計の適応機構について考察する。

まず初めに、葉と根の概日リズムに対する入力刺激に対して、概日リズムの振幅の観点から考察する。植物の根の概日リズムは  $0.15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光に対して応答することができることが報告されている (Bordage et al., 2016)。また予備的な結果ではあるが、切り取った葉と根の概日リズムを 48 時間の暗期処理によって時差ボケを引き起こした後に、何サイクルで明暗サイクルに同調できるかを調べたところ、根の方がより弱い光量で同調することがわかっている。概日時計への入力では、葉よりも根の方が応答感度は良いと思われる。植物において、光刺激は光受容体もしくは葉緑体の光合成による代謝産物を介して概日時計に入力される (Webb et al., 2019)。そのため、光刺激に対する概日リズムの応答性は、光受容体、葉緑体、概日時計によって決定づけられる。光受容体の発現量や色素体の状態は組織や器官ごとに異なっているため (Knudsen et al., 2018; van Gelderen et al., 2018)、それらの違いが葉と根の概日リズムの入力の違いになっている可能性がある。葉と根由来の単離細胞の概日リズムを恒暗条件下で調べたところ、葉由来細胞の概日リズムの振幅は維持され、根由来細胞の概日リズムの振幅は減少する傾向にあった (図 19AB、図 20)。概日時計の数理モデルの一つであるリミットサイクルモデルでは、概日リズムの振幅はリミットサイクルの直径を指す (図 40)。そのため、概日リズムの振幅が小さくなるとリミットサイクルの直径も小さくなる。根の概日リズムは減衰振動であるため、根の概日リズムは直径が時間を経るごとに小さくなるリミットサイクルであると言える。簡潔に考察するために根由来細胞の概日リズムを直径の小さいリミットサイクルとする。直径の異なる 2 つのリミットサイクルに対して、同等の位相応答を引き起こす刺激を与えると、直径の小さいリミットサイクルの方がより大きな位相応答を引き起こす (Johnson et al., 2003) (図 40)。概日リズムの振幅が減少すると、図 40 の赤矢印で表わしているように光刺激の相対的な影響が強くなり、同じ強度の光刺激に対する位相応答の感度が高くなる (位相シフトが大きくなる)。概日リズムの振幅の観点から、葉の概日時計に比べて根の概日時計の方が光に反応しやすいと考えられる。光の刺激が地上部よりも少ない根の細胞時計は、概日時計のシステムとして刺激に対する応答性を上げているのかもしれない。

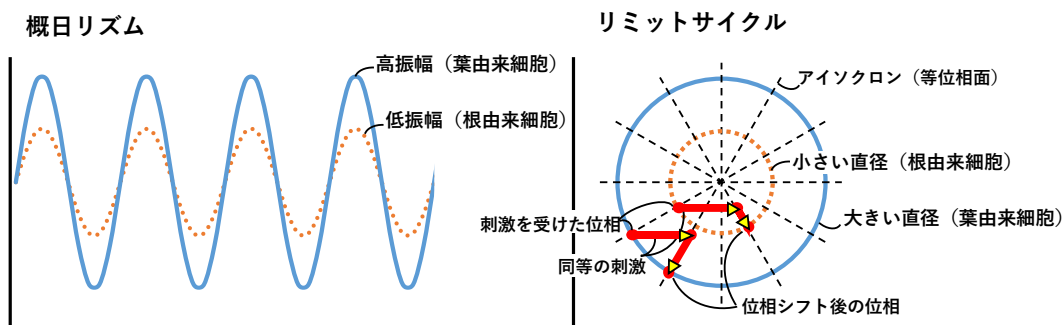


図 40 リミットサイクルの直径と位相シフト

高振幅・低振幅な概日リズムはそれぞれ、大きい・小さい直径のリミットサイクルとして見なす。直径の異なるリミットサイクルの同じ位相に、同等の刺激（赤矢印）を与えると直径の大きいリミットサイクルに比べて直径の小さいリミットサイクルの方がより大きな位相シフトを示す。

次に、概日時計における内的ノイズと外的ノイズのトレードオフを示した数理モデル研究をもとに、細胞密度の効果と細胞時計の適応機構について考察する。様々な生物が有する概日リズムは、温度や細胞分裂サイクルなどの外部や内部の攪乱に頑健であると思われている。単細胞生物であるシアノバクテリアの概日時計は細胞内の生化学的なネットワークによって内的なノイズ（攪乱）に抵抗していると考えられている（Barkai and Leibler, 2000; Mihalcescu et al., 2004; Amdaoud et al., 2007）。多細胞生物においては、細胞内の生化学的なネットワークに加えて、細胞間の相互作用によっても概日時計はノイズに抵抗していると思われる（Liu et al., 1997; Yamaguchi et al., 2003）。数理モデル研究において、ノイズを時計因子の分子数のゆらぎとして定義し、ノイズと概日リズムの安定性をシミュレーションすると、ノイズが大きい（時計因子の分子数が少ない）ほど概日リズムは不安定になり、サイクル間のばらつきが大きくなった（Gonze et al., 2002; Zhang and Gonze, 2021）（図 41）。また、明暗への応答も不正確になった。第 2 章と第 3 章で示したように、シロイヌナズナ葉から単離された細胞は、標準条件では概日リズムのサイクル間のばらつきが大きくなり不安定であったが、高細胞密度にするとサイクル間のばらつきは小さくなり安定になった（図 19D、図 34C）。明暗サイクルに対する細胞間の正確性も高細胞密度によって向上した（図 36B）。一方で、概日リズムの周期自体は細胞密度の効果を受けにくかったため、概日リズムを生み出す固有振動数が同じにもかかわらず、出力として観測されるリズムが揺らいでいると考えられる（高細胞密度： $23.2 \pm 1.9$  h、標準細胞密度： $23.0 \pm 2.2$  h）。そのため、細胞密度は内的ノイズを抑制することによって、概日リズムの安定性を上げている可能性がある。

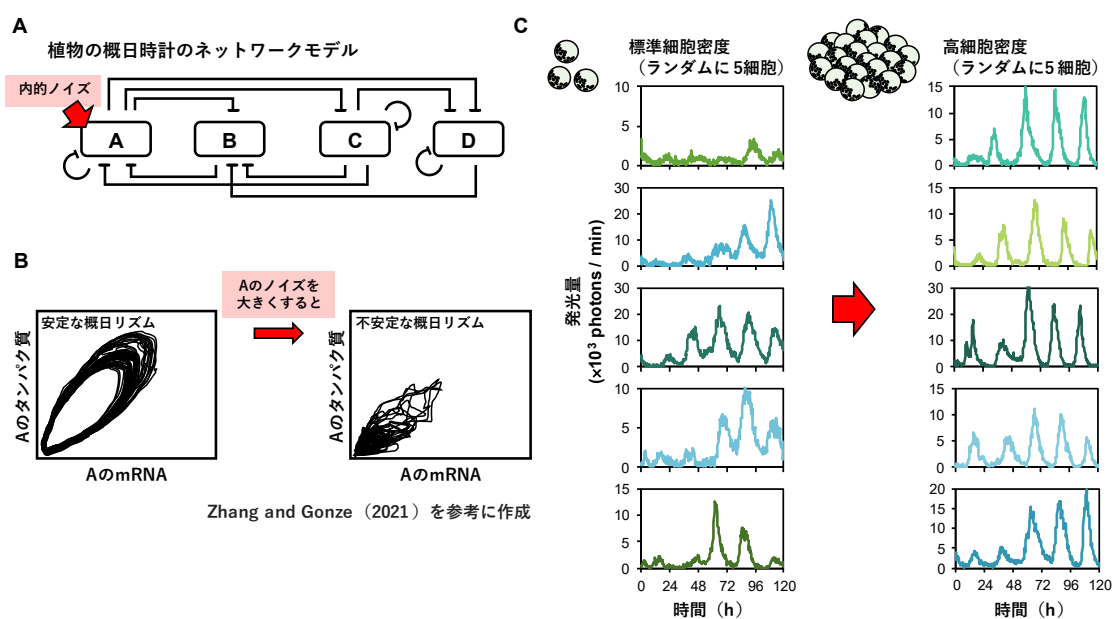


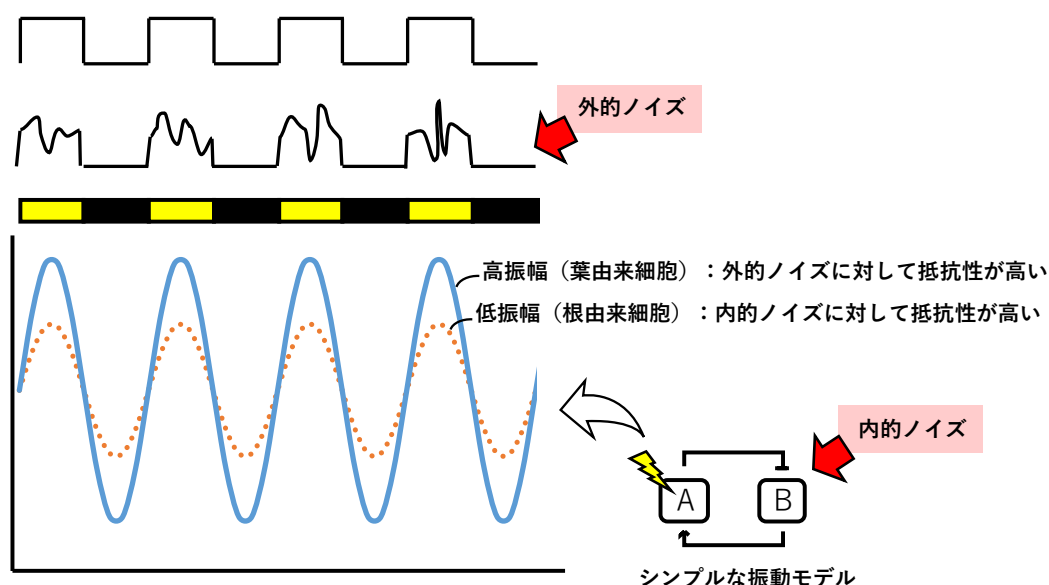
図 41 内的ノイズによる概日リズムの不安定化

(A, B) Zhang and Gonze (2021) を参考に作成した植物の概日時計のネットワーク (A) と時計因子 A の確率的軌道 (アトラクター) (B)。(A) 参考にした論文では光の入力刺激も含まれている。四角で囲まれた A-D は時計因子を表している。(B) 横軸を時計因子 A の mRNA 量、縦軸を時計因子 A のタンパク質量として 24 時間の発現量をプロットすると図のような軌道が生じる。参考にした論文では明暗下の概日振動に時計因子 A のノイズを大きくすると不安定な概日振動になることを複数の微分方程式によって算出している。(C) 恒暗条件下の葉由来細胞の概日リズムをランダム 5 細胞取り出し、波形を示している。

植物の概日時計は、構成因子の分子数のゆらぎによる内的ノイズだけでなく、気象の変化等に伴う外的ノイズの影響も受ける (Gonze et al., 2002; Troein et al., 2009; Pittayakanchit et al., 2018; Cortijo et al., 2019)。植物が生育する環境では、植物の地上部の方が地下部よりも物理的な環境要因による変動が大きい。第 2 章で示したように、シロイヌナズナの根から単離した細胞では標準条件であっても明暗に対する高い正確性を示した。第 2 章と第 3 章で示したように、葉由来の単離細胞では標準条件で明暗に対する低い正確性が見られた一方、高細胞密度培養において明暗サイクルに対する高い正確性を示した。数理モデルによる先行研究において、明暗サイクル下の概日リズムの正確性は、内的ノイズと外的ノイズのトレードオフになっており、概日時計の構造がどちらのノイズに対する抵抗性を上げるかを決定づけるという報告がある (Pittayakanchit et al., 2018) (図 42)。つまり、明暗サイクル下において内的ノイズに影響を受けやすい (抵抗性が低い) 概日時計は外的ノイズによる攪乱に強く、逆に、外的ノイズの影響を受けやすい概日時計は内的ノイズの攪乱に強いというトレードオフが示されている。この数理モデルによる先行研究



に当てはめると、葉由来の単離細胞の概日時計は内的ノイズに脆弱な概日システムであるが、細胞密度の効果が内的ノイズを減らすと考えると、標準細胞密度条件で低かった明暗サイクルに対する正確性が高細胞密度によって向上する実験結果と一致する。気象の変化等を仮定する外的ノイズを実験的に確かめることは難しいが、この数理モデルにおいては、葉由来の単離細胞の概日時計は、内的ノイズに対する抵抗性が低く、外的ノイズに対する抵抗性が高い概日時計としてみなされる。根由来の単離細胞の概日時計では、葉由来の単離細胞に比べて細胞密度が低い状態において明暗サイクルでの高い正確性を示したため、比較的内的ノイズに強く、外的ノイズに弱い概日時計であると考えられる。地下部に比べて、地上部の概日時計の方が外的ノイズの影響を受けると考えられるため、植物の組織・器官固有の細胞時計のシステムは、局所的な環境に適したものになっていると推測される (図 43)。



Pittayakanchit et al. (2018) を参考に作成

#### 図 42 内的ノイズと外的ノイズのトレードオフ

Pittayakanchit et al. (2018) を参考に作成した。明暗サイクルに対する概日リズムの正確性は内的ノイズと外的ノイズのトレードオフになっている。振幅の高い概日時計は、内的ノイズに対する抵抗性が低く、外的ノイズに対する抵抗性が高い。振幅の低い概日時計は、外的ノイズに対する抵抗性が低く、内的ノイズに対する抵抗性が高い。この数理モデルにおいて概日振動はシンプルな 2 種類の時計因子のネットワークにより形成されている。内的ノイズは時計因子の分子数のゆらぎであり、外的ノイズは天候を想定して、光 (明期) の刺激を変動させている。

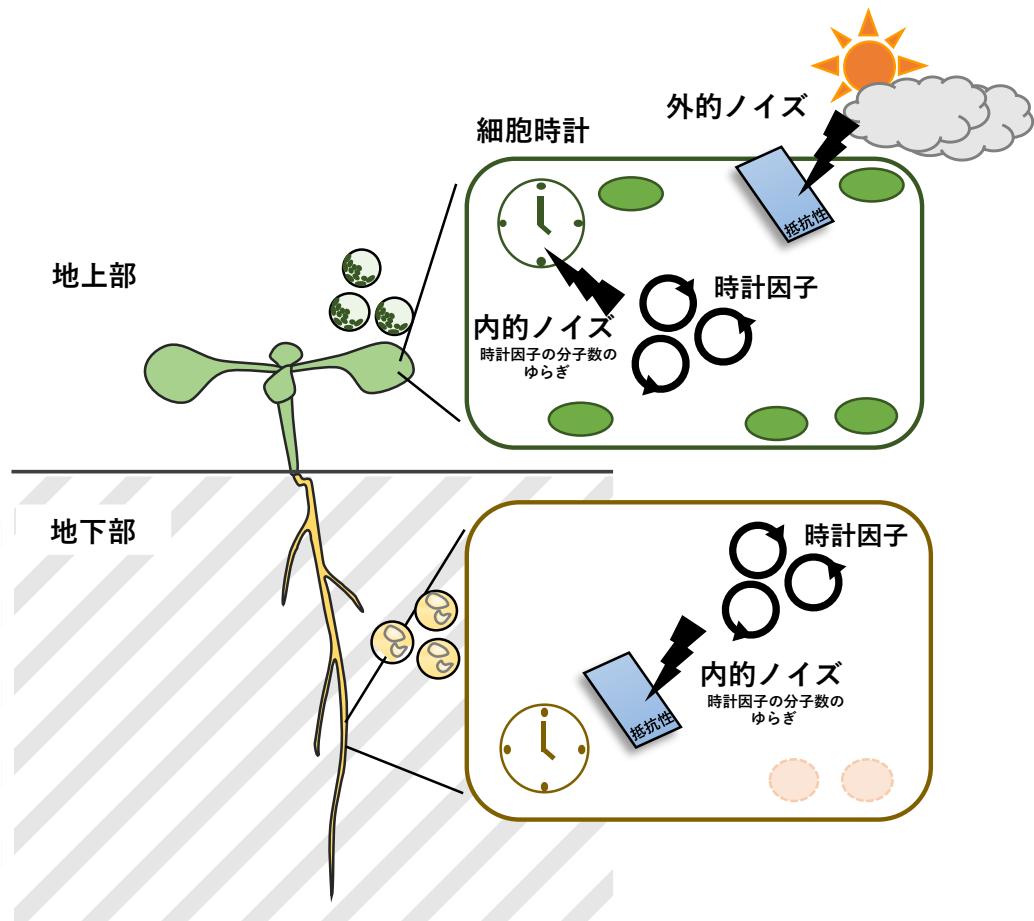


図 43 振幅の異なる細胞時計に対するノイズの影響

葉と根由来細胞の概日時計システムはノイズに対する抵抗性が異なると推測される。Pittayakanchit et al. (2018) において明暗サイクルに対する概日リズムの正確性は内的ノイズと外的ノイズのトレードオフになっていることが報告されている。葉由来細胞の概日時計は「振幅の高い概日時計」とみなされ、内的ノイズに対する抵抗性が低く、外的ノイズに対する抵抗性が高いと考えられる。根由来細胞の概日時計は「振幅の低い概日時計」とみなされ、外的ノイズに対する抵抗性が低く、内的ノイズに対する抵抗性が高いと考えられる。地上部の細胞では時計因子の分子数の揺らぎ（内的ノイズ）に対する抵抗性に弱く、気象の変化（外的ノイズ）に対する抵抗性が高い可能性がある。一方、地下部の細胞では内的ノイズに対する抵抗性に強く、外的ノイズに対する抵抗性が弱い可能性がある。地上部では高細胞密度で見られるように内的ノイズの影響を抑えているかもしれない。地下部では外的ノイズの影響を受けにくいいため、地上部と地下部の細胞時計のシステムは、局所的な環境に植物が適応するために効果的かもしれない。

## 結論と展望

植物の概日時計は、細胞時計を単純に集めた秩序のない烏合の衆ではなく、植物個体として統制の取れた細胞時計の集合体であると考えられる。個々の細胞において組織特異的な概日リズムが観察されているが、細胞自体が周りの細胞や組織から時間情報などの影響を受けるため、細胞が本来持つ概日時計の特徴を明確に示すことはできていなかった。本研究では、プロトプラストとして細胞を物理的に単離し、単一細胞レベルで単離細胞の発光概日リズムを調べることによって、シロイヌナズナの葉と根の細胞が有する本来の細胞時計の特徴を明らかにした。単離細胞という人工的な条件ではあるが、個々の単離細胞の概日リズムが三大性質（自由継続性、温度補償性、同調性）を満たすことを明確に示した。単離細胞は各細胞自身が光に応答し、時刻を調節する能力を有していた。これは植物の組織内で見られていた概日時計の高い独立性が、細胞自身の性質に起因することの裏付けとなる結果であった。葉と根由来の細胞で周期の温度補償性が示された一方で、堅牢度に葉と根の細胞で差が見られた。予備的な結果ではあるが切り取った葉と根においても温度補償性の堅牢度が異なることがわかっており、器官における概日時計の性質が細胞時計の性質にもとづいていることを示している。単離したことによって観測された事象として低温での概日リズムの振幅への影響がある。本研究において単離細胞集団の概日リズムの振幅は 12°Cにおいて著しく減少していた。これは細胞概日リズムのピーク間隔が不安定になることによって生じていた。一方で 12°Cでの植物体の概日リズムにおいて急激な振幅の低下は今のところ報告されていない。そのため、細胞間や組織間での時間情報の伝達によって概日リズムの振幅を低温においても維持している可能性がある。単一細胞を観測することによって細胞集団では観測することができない不安定な概日リズムの挙動も観測することができた。加えて高細胞密度によって不安定な葉由来細胞の概日リズムが安定化することも示すことができ、時刻情報とは無関係に単離細胞の細胞間ではたらく効果の作用機序の一つを推定することができた。本研究の成果によって、数々の細胞時計の特徴を明確にすることができ、概日時計研究の前提となる細胞の性質に関する基礎的な情報を提供することができたと確信している。

単離細胞の発光概日リズム解析によって様々な特徴を捉えることに成功した一方で、その具体的な分子機構に対する多くの課題が残った。細胞一つ一つの概日リズムを 1 週間程度の長期間にわたって観測することで初めて示すことができるため、遺伝子発現解析など網羅的な分子実験を行うことが難しいことも要因ではあるが、一番の問題点は測定の実行回数を増やすことができなかった点にある。本研究の細胞レベルの単離細胞の発光測定は、液体培地中の細胞を用いている。測定器や細胞が入っているディッシュなどが揺れた場合、液体培地中の細胞はカメラの視野外に動くことになる。そのため、1 週間要す

る測定において 1 つのディッシュの単離細胞集団の発光変動しか調べることができない。今後は測定における単離細胞の固定化が重要になると考えている。

本研究において高細胞密度によって細胞概日リズムが安定になることを示すことはできたが、植物の組織内で見られる概日リズムの位相に関する細胞間の連絡が確認できなかった。単離細胞を用いた研究においても、同調物質の添加によって細胞間の連絡を確かめることができる可能性があるが、組織内における細胞の解析が重要になると考えている。そのため、単離細胞と組織内の細胞の両方を研究対象にすることによって概日時計における時間情報伝達機構を解明することが必要である。

先行研究や本研究において、組織特異的な概日時計の性質が示されている。しかし、その性質がどれくらい植物の環境適応に寄与しているかは不明である。組織特異的な概日時計にもとづいた植物の生存戦略を明らかにすることで時間生物学や植物学における意義だけではなく、生物学的な意義のある研究になると期待している。

## 引用文献

- Amdaoud, M., Vallade, M., Weiss-Schaber, C., and Mihalcescu, I.** (2007). Cyanobacterial clock, a stable phase oscillator with negligible intercellular coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 7051–7056.
- Aschoff, J.** (1979). Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Zeitschrift für Tierpsychologie* **49**: 225–249.
- Aton, S.J., Colwell, C.S., Harnar, A.J., Waschek, J., and Herzog, E.D.** (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience* **8**: 476–483.
- Barkai, N. and Leibler, S.** (2000). Circadian clocks limited by noise. *Nature* **403**: 267–268.
- Battle, M.W. and Jones, M.A.** (2020). Cryptochromes integrate green light signals into the circadian system. *Plant, Cell and Environment* **43**: 16–27.
- Bieniawska, Z., Espinoza, C., Schlereth, A., Sulpice, R., Hinch, D.K., and Hannah, M.A.** (2008). Disruption of the *Arabidopsis* circadian clock is responsible for extensive variation in the cold-responsive transcriptome. *Plant Physiology* **147**: 263–279.
- Bloemendal, S. and Kück, U.** (2013). Cell-to-cell communication in plants, animals, and fungi: a comparative review. *Naturwissenschaften* **100**: 3–19.
- Bordage, S., Sullivan, S., Laird, J., Millar, A.J., and Nimmo, H.G.** (2016). Organ specificity in the plant circadian system is explained by different light inputs to the shoot and root clocks. *New Phytologist* **212**: 136–149.
- Chen, W.W., Takahashi, N., Hirata, Y., Ronald, J., Porco, S., Davis, S.J., Nusinow, D.A., Kay, S.A., and Mas, P.** (2020). A mobile ELF4 delivers circadian temperature information from shoots to roots. *Nature Plants* **6**: 416–426.
- Cortijo, S., Aydin, Z., Ahnert, S., and Locke, J.C.** (2019). Widespread inter-individual gene expression variability in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology* **15**: e8591.
- Creux, N. and Harmer, S.** (2019). Circadian rhythms in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **11**: a034611.
- Dalchau, N., Baek, S.J., Briggs, H.M., Robertson, F.C., Dodd, A.N., Gardner, M.J., Stancombe, M.A., Haydon, M.J., Stan, G.B., Gonçalves, J.M., and Webb, A.A.R.** (2011). The circadian oscillator gene *GIGANTEA* mediates a long-term response of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock to sucrose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 5104–5109.
- Damiola, F., Schibler, U., and Gene, C.** (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93**: 929–937.

- Davey, M.R., Anthony, P., Power, J.B., and Lowe, K.C. (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances* **23**: 131–171.
- Devlin, P.F. and Kay, S.A. (2000). Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *The Plant Cell* **12**: 2499–2510.
- Dunlap, J., Loros, J., and DeCoursey, P. (2004). *Chronobiology: biological timekeeping*. Sinauer Associates. MA.
- 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.
- Fukazawa, J., Teramura, H., Murakoshi, S., Nasuno, K., Nishida, N., Ito, T., Yoshida, M., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Takahashi, Y. (2014). DELLAs function as coactivators of GAI-ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of gibberellin homeostasis and signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **26**: 2920–2938.
- Fukuda, H., Nakamichi, N., Hisatsune, M., Murase, H., and Mizuno, T. (2007). Synchronization of plant circadian oscillators with a phase delay effect of the vein network. *Physical Review Letters* **99**: 098102.
- Fukuda, H., Ukai, K., and Oyama, T. (2012). Self-arrangement of cellular circadian rhythms through phase-resetting in plant roots. *Physical Review E* **86**: 041917.
- van Gelderen, K., Kang, C., and Pierik, R. (2018). Light signaling, root development, and plasticity. *Plant Physiology* **176**: 1049–1060.
- Gonze, D., Halloy, J., and Goldbeter, A. (2002). Robustness of circadian rhythms with respect to molecular noise. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 673–678.
- Gould, P.D., Domijan, M., Greenwood, M., Tokuda, I.T., Rees, H., Kozma-Bognar, L., Hall, A.J.W., and Locke, J.C.W. (2018). Coordination of robust single cell rhythms in the *Arabidopsis* circadian clock via spatial waves of gene expression. *eLife* **7**: e31700.
- Gould, P.D., Locke, J.C.W., Larue, C., Southern, M.M., Davis, S.J., Hanano, S., Moyle, R., Milich, R., Putterill, J., Millar, A.J., and Hall, A. (2006). The molecular basis of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant Cell* **18**: 1177–1187.
- Greenham, K. and McClung, C.R. (2015). Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nature Reviews Genetics* **16**: 598–610.
- Greenwood, M., Domijan, M., Gould, P.D., Hall, A.J.W., and Locke, J.C.W. (2019). Coordinated circadian timing through the integration of local inputs in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Biology* **17**: e3000407.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., and Kay, S.A. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by

- the circadian clock. *Science*. **290**: 2110–2113.
- Hastings, M.H., Maywood, E.S., and Brancaccio, M.** (2018). Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Reviews Neuroscience* **19**: 453–469.
- Haydon, M.J., Mielczarek, O., Robertson, F.C., Hubbard, K.E., and Webb, A.A.R.** (2013). Photosynthetic entrainment of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Nature* **502**: 689–692.
- Hennessey, T.L. and Field, C.B.** (1992). Evidence of multiple circadian oscillators in bean plants. *Journal of Biological Rhythms* **7**: 105–113.
- Hicks, K.A., Millar, A.J., Carré, I.A., Somers, D.E., Straume, M., Meeks-Wagner, D.R., and Kay, S.A.** (1996). Conditional circadian dysfunction of the *Arabidopsis early-flowering 3* mutant. *Science* **274**: 790–791.
- Illston, B.G. and Fiebrich, C.A.** (2017). Horizontal and vertical variability of observed soil temperatures. *Geoscience Data Journal* **4**: 40–46.
- James, A.B., Monreal, J.A., Nimmo, G.A., Kelly, C.L., Herzyk, P., Jenkins, G.I., and Nimmo, H.G.** (2008). The circadian clock in *Arabidopsis* roots is a simplified slave version of the clock in shoots. *Science* **322**: 1832–1835.
- Johnson, C.H.** (1992). Phase response curves: what can they tell us about circadian clocks. *Circadian Clocks from Cell to Human*: 209–246.
- Johnson, C.H., Elliott, J.A., and Foster, R.** (2003). Entrainment of circadian programs. *Chronobiology International* **20**: 741–774.
- Kanesaka, Y., Okada, M., Ito, S., and Oyama, T.** (2019). Monitoring single-cell bioluminescence of *Arabidopsis* leaves to quantitatively evaluate the efficiency of a transiently introduced CRISPR/Cas9 system targeting the circadian clock gene *ELF3*. *Plant Biotechnology* **36**: 187–193.
- Kao, K.N. and Michayluk, M.R.** (1975). Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* **126**: 105–110.
- Kim, J. and Somers, D.E.** (2010). Rapid assessment of gene function in the circadian clock using artificial microRNA in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiology* **154**: 611–621.
- Knudsen, C., Gallage, N.J., Hansen, C.C., Møller, B.L., and Laursen, T.** (2018). Dynamic metabolic solutions to the sessile life style of plants. *Natural Product Reports* **35**: 1140–1155.
- Kondo, T. and Tsudzuki, T.** (1980). Phase progress under low temperature treatment of the potassium uptake rhythm in a duckweed, *Lemna gibba G3*. *Plant and Cell Physiology* **21**: 95–103.

- Lee, H.G. and Seo, P.J. (2018). Dependence and independence of the root clock on the shoot clock in *Arabidopsis*. *Genes and Genomics* **40**: 1063–1068.
- Lee, H.J., Ha, J.H., Kim, S.G., Choi, H.K., Kim, Z.H., Han, Y.J., Kim, J.I., Oh, Y., Fragoso, V., Shin, K., Hyeon, T., Choi, H.G., Oh, K.H., Baldwin, I.T., and Park, C.M. (2016). Stem-piped light activates phytochrome B to trigger light responses in *Arabidopsis thaliana* roots. *Science Signaling* **9**: ra106.
- Li, Y., Wang, L., Yuan, L., Song, Y., Sun, J., Jia, Q., Xie, Q., and Xu, X. (2020). Molecular investigation of organ-autonomous expression of *Arabidopsis* circadian oscillators. *Plant, Cell and Environment* **43**: 1501–1512.
- Litthauer, S., Battle, M.W., and Jones, M.A. (2016). Phototropins do not alter accumulation of evening-phased circadian transcripts under blue light. *Plant Signaling and Behavior* **11**: e1126029.
- Liu, A.C., Welsh, D.K., Ko, C.H., Tran, H.G., Zhang, E.E., Priest, A.A., Buhr, E.D., Singer, O., Meeker, K., Verma, I.M., Doyle, F.J., Takahashi, J.S., and Kay, S.A. (2007). Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell* **129**: 605–616.
- Liu, C., Weaver, D.R., Strogatz, S.H., and Reppert, S.M. (1997). Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* **91**: 855–860.
- Maywood, E.S., Chesham, J.E., O'Brien, J.A., and Hastings, M.H. (2011). A diversity of paracrine signals sustains molecular circadian cycling in suprachiasmatic nucleus circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 14306–14311.
- Michael, T.P. and McClung, C.R. (2003). Enhancer trapping reveals widespread circadian clock transcriptional control in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**: 629–39.
- Mihalcescu, I., Hsing, W., and Leibler, S. (2004). Resilient circadian oscillator revealed in individual cyanobacteria. *Nature* **430**: 81–85.
- Miwa, K., Serikawa, M., Suzuki, S., Kondo, T., and Oyama, T. (2006). Conserved expression profiles of circadian clock-related genes in two *Lemna* species showing long-day and short-day photoperiodic flowering responses. *Plant and Cell Physiology* **47**: 601–612.
- Mohawk, J.A., Green, C.B., and Takahashi, J.S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual Review of Neuroscience* **35**: 445–462.
- Muranaka, T. and Oyama, T. (2020). Application of single-cell bioluminescent imaging to monitor circadian rhythms of individual plant cells. In *Methods in Molecular Biology* (Humana Press Inc.), pp. 231–242.
- Muranaka, T. and Oyama, T. (2016). Heterogeneity of cellular circadian clocks in intact plants and its correction under light-dark cycles. *Science Advances* **2**: e1600500.



- Muranaka, T. and Oyama, T.** (2018). Monitoring circadian rhythms of individual cells in plants. *Journal of Plant Research* **131**: 15–21.
- Murayama, Y., Kori, H., Oshima, C., Kondo, T., Iwasaki, H., and Ito, H.** (2017). Low temperature nullifies the circadian clock in cyanobacteria through Hopf bifurcation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**: 5641–5646.
- Nagata, T. and Takebe, I.** (1971). Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* **99**: 12–20.
- Nagel, D.H. and Kay, S.A.** (2012). Complexity in the wiring and regulation of plant circadian networks. *Current Biology* **22**: R648–657.
- Nakamichi, N., Ito, S., Oyama, T., Yamashino, T., Kondo, T., and Mizuno, T.** (2004). Characterization of plant circadian rhythms by employing *Arabidopsis* cultured cells with bioluminescence reporters. *Plant and Cell Physiology* **45**: 57–67.
- Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T., and Mizuno, T.** (2005). PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the circadian clock of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **46**: 686–98.
- Nakamura, S. and Oyama, T.** (2018). Long-term monitoring of bioluminescence circadian rhythms of cells in a transgenic *Arabidopsis* mesophyll protoplast culture. *Plant Biotechnology* **35**: 291–295.
- Nimmo, H.G.** (2018). Entrainment of *Arabidopsis* roots to the light:dark cycle by light piping. *Plant, Cell and Environment* **41**: 1742–1748.
- Noguchi, T., Wang, L.L., and Welsh, D.K.** (2013). Fibroblast PER2 circadian rhythmicity depends on cell density. *Journal of Biological Rhythms* **28**: 183–192.
- Nohales, M.A. and Kay, S.A.** (2016). Molecular mechanisms at the core of the plant circadian oscillator. *Nature Structural and Molecular Biology* **23**: 1061–1069.
- Paik, I. and Huq, E.** (2019). Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **92**: 114–121.
- Para, A., Farré, E.M., Imaizumi, T., Pruneda-Paz, J.L., Harmon, F.G., and Kay, S.A.** (2007). PRR3 is a vascular regulator of TOC1 stability in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* **19**: 3462–3473.
- Parihar, P., Singh, R., Singh, S., Tripathi, D.K., Chauhan, D.K., Singh, V.P., and Prasad, S.M.** (2016). Photoreceptors mapping from past history till date. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **162**: 223–231.
- Pasternak, T., Paponov, I.A., and Kondratenko, S.** (2021). Optimizing protocols for *Arabidopsis* shoot and root protoplast cultivation. *Plants* **10**: 375.
- Pettersson, S. v., Johansson, A.I., Kowalczyk, M., Makoveychuk, A., Wang, J.Y., Moritz, T.,**

- Grebe, M., Benfey, P.N., Sandberg, G., and Ljung, K.** (2009). An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *The Plant Cell* **21**: 1659–68.
- Pittayakanchit, W., Lu, Z., Chew, J., Rust, M.J., and Murugan, A.** (2018). Biophysical clocks face a trade-off between internal and external noise resistance. *eLife* **7**: 1–38.
- Pittendrigh, C.S.** (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **25**: 159–184.
- Pokhilko, A., Fernández, A.P., Edwards, K.D., Southern, M.M., Halliday, K.J., and Millar, A.J.** (2012). The clock gene circuit in *Arabidopsis* includes a repressilator with additional feedback loops. *Molecular Systems Biology* **8**: 574.
- Sablowski, R.** (2016). Coordination of plant cell growth and division: collective control or mutual agreement? *Current Opinion in Plant Biology* **34**: 54–60.
- Sai, J. and Johnson, C.H.** (1999). Different circadian oscillators control Ca<sup>2+</sup> fluxes and *Lhcb* gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 11659–11663.
- Salomé, P.A., McClung, C.R., Salome, P.A., and McClung, C.R.** (2005). *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7* and *9* are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant Cell* **17**: 791–803.
- Sanchez, S.E., Rugnone, M.L., and Kay, S.A.** (2020). Light perception: A matter of time. *Molecular Plant* **13**: 363–385.
- Satoh, R., Fujita, Y., Nakashima, K., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2004). A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **45**: 309–317.
- Schmal, C., Herzog, E.D., and Herzog, H.** (2018). Measuring relative coupling strength in circadian systems. *Journal of Biological Rhythms* **33**: 84–98.
- Silver, R., LeSauter, J., Tresco, P.A., and Lehman, M.N.** (1996). A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* **382**: 810–813.
- Somers, D.E., Paul, F.D., and Steve, A.K.** (1998). Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*. **282**: 1488–1490.
- Sorkin, M.L. and Nusinow, D.A.** (2021). Time will tell: intercellular communication in the plant clock. *Trends in Plant Science* **26**: 706–719.
- Takahashi, N., Hirata, Y., Aihara, K., and Mas, P.** (2015). A hierarchical multi-oscillator network orchestrates the *Arabidopsis* circadian system. *Cell* **163**: 148–159.

- Thain, S.C., Hall, A., and Millar, A.J.** (2000). Functional independence of circadian clocks that regulate plant gene expression. *Current Biology* **10**: 951–956.
- Tiew, T.W.-Y., Sheahan, M.B., and Rose, R.J.** (2015). Peroxisomes contribute to reactive oxygen species homeostasis and cell division induction in *Arabidopsis* protoplasts. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–16.
- Toth, R., Kevei, E., Hall, A., Millar, A.J., Nagy, F., and Kozma-Bognar, L.** (2001). Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**: 1607–1616.
- Troein, C., Locke, J.C.W., Turner, M.S., and Millar, A.J.** (2009). Weather and seasons together demand complex biological clocks. *Current Biology* **19**: 1961–1964.
- Voß, U., Wilson, M.H., Kenobi, K., Gould, P.D., Robertson, F.C., Peer, W.A., Lucas, M., Swarup, L., Casimiro, I., Holman T.J., Wells, D.M., Péret, B., Goh, T., Fukaki, H., Hodgman, T.C., Laplace, L., Halliday, K.J., Ljung, K., Murphy, A.S., Hall, A.J., Webb, A.A.R., Bennett, M.J.** (2015). The circadian clock rephases during lateral root organ initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Communications* **6**: 7641.
- Wang, L., Kim, J., and Somers, D.E.** (2013). Transcriptional corepressor TOPLESS complexes with pseudoresponse regulator proteins and histone deacetylases to regulate circadian transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 761–766.
- Webb, A.A.R., Seki, M., Satake, A., and Caldana, C.** (2019). Continuous dynamic adjustment of the plant circadian oscillator. *Nature Communications* **10**: 550.
- Webb, A.B., Angelo, N., Huettner, J.E., and Herzog, E.D.** (2009). Intrinsic, nondeterministic circadian rhythm generation in identified mammalian neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 16493–16498.
- Wenden, B., Toner, D.L.K., Hodge, S.K., Grima, R., and Millar, A.J.** (2012). Spontaneous spatiotemporal waves of gene expression from biological clocks in the leaf. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 6757–6762.
- Yakir, E., Hassidim, M., Melamed-Book, N., Hilman, D., Kron, I., and Green, R.M.** (2011). Cell autonomous and cell-type specific circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **68**: 520–531.
- Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., and Okamura, H.** (2003). Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* **302**: 1408–1412.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H., and Sheen, J.** (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols* **2**: 1565–1572.
- Zhang, R. and Gonze, D.** (2021). Stochastic simulation of a model for circadian rhythms in plants. *Journal of Theoretical Biology* **527**: 110790.

- Zielinski, T., Moore, A.M., Troup, E., Halliday, K.J., and Millar, A.J.** (2014). Strengths and limitations of period estimation methods for circadian data. *PLoS ONE* **9**: e96462.
- Zimmerman, W.F.** (1969). On the absence of circadian rhythmicity in *Drosophila pseudoobscura* pupae. *The Biological Bulletin* **136**: 494–500.

アルファベット順に表記

## 謝辞

本研究は京都大学大学院理学研究科・生物学専攻・植物学教室・形態統御学分科の小山時隆准教授のご指導のもとで行われました。小山先生には本研究を遂行するにあたり熱心なご指導を賜りました。修士課程から研究室に配属されて以来、電子工作や見慣れない測定機器の使い方から研究の進め方、生理現象の捉え方など非常に多くのことをご教授いただきました。修士課程在籍時の投稿論文執筆の際には、右も左もわからない私に対して、研究のまとめ方など基礎的なところから親身に指導していただきました。この経験は研究を進める上で非常に貴重な財産になっています。そして何より時間生物学を楽しむことができたのも小山先生のお陰です。心より感謝申し上げます。

伊藤照悟助教には実験手法や研究内容について具体的なご指導をしていただきました。また、シロイヌナズナを用いた研究や環境整備など研究活動の様々な面でサポートしていただきました。深く感謝申し上げます。

本研究のほとんど全てのデータは、中道範人教授（名古屋大学生命農学研究科）よりご提供していただいた *CCAI::LUC* 形質転換シロイヌナズナによって得られています。厚く感謝申し上げます。また、当研究室の卒業生である村中智明博士と岡田全朗博士には実験手法や解析方法をサポートしていただきました。厚く感謝申し上げます。プロトプラストの単離方法など基礎的な実験手法や研究の進め方は、高橋陽介教授（広島大学統合生命科学研究科）と深澤壽太郎助教（広島大学統合生命科学研究科）にご指導していただいた卒業研究が基になっています。厚く感謝申し上げます。

形態統御学研究室で関わった皆様には、大変お世話になりました。5年間楽しく元気に研究活動できたのも皆様のお陰です。深く感謝いたします。

植物学教室の皆様にも大変お世話になりました。分野の異なる皆様からのご指摘やご助言は大変参考になりました。また、スポーツ交流会など公私ともにお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

本研究は日本学術振興会より特別研究員としてのサポートをいただき遂行することができました。感謝申し上げます。

最後に、長い間見守って下さった両親に心より感謝いたします。

2021年12月  
中村 駿志