

増殖中の植物における
概日リズム動態の時空間的解析

上野 賢也

目次

要旨	2
論文目録	6
導入	7
材料と方法	12
結果	20
考察	31
謝辞	39
引用文献	40
図・表	46

要旨

高等植物は概日時計を持ち、昼夜のある環境に同調する約 24 時間周期の概日リズムを示している。概日リズムが様々な生理的な反応を調節し約 24 時間周期で変動させることで、植物の体内環境は外部の昼夜環境に適応している。そのため、多細胞生物にとって概日時計が個体内で協調的に働くことは重要である。概日時計は恒常条件下でも細胞自律的に概日リズムを持続させることが知られており、細胞間・組織間に自発的な同期作用があることが予想されている。これまで概日リズムの同期に関わる研究は、主に成熟した組織や細胞のリズムの解析によってなされてきたが、増殖中の概日リズム動態、特に新たに生み出される組織の概日リズム秩序形成についての研究は限られている。増殖中に新たに生み出された組織や個体内の概日リズム動態を解明することで、植物体内の時間秩序形成機構の理解につながると期待される。

本研究では概日リズムを示す生物発光レポーター *AtCCA1:LUC* を形質転換で導入したコウキクサ (*Lemna minor*) を材料とし、増殖中のウキクサのフロンド（葉状体）の生物発光リズムを細胞レベルの解像度で時空間的に解析した。ウキクサ植物は小型で扁平な形状であり生物発光を 2 次元的に非侵襲で観察できるため、植物体全体について細胞レベルの分解能で概日リズムを解析できる。また、増殖が速いため 7-10 日間の生物発光観察期間でも数世代にわたって新規に出現するフロンドを観察でき、フロンド間の親子情報を含めた解析が可能である。

外環境に同調した植物の概日リズムの秩序が外部刺激のない環境においてどのように維持されるかを明らかにするために、測定開始前に明暗同調を与えた個体（LDLL ウキクサ）を用意した。また、自発的に形成される概日リズムの秩序を明らかにするために事前に外環境からの同調刺激を受けていない個体（LLLL ウキクサ）を用意し

た。それぞれ恒明条件下で高感度カメラを用い、増殖する植物体全体の生物発光を高解像度で1週間以上観測した。

まず、各フロンドの平均発光量動態を解析することで、各フロンドの概日リズム特性を明らかにした。測定開始前に明暗同調を与えたLDLLウキクサは恒明条件下で測定中に新規に出現したフロンドを含め、高振幅な概日リズムを刻んでいた。新規に出現したフロンドの概日リズムの位相は遅れる傾向があったが、全体としてフロンド間の位相が高く同期していた。LLLLウキクサは長期間恒常条件下にあり外環境の変化を経験していないにもかかわらず、ほとんどのフロンドで低振幅な概日リズムが見られた。また、単一フロンドに由来するフロンド間では各フロンドの概日リズムの位相関係がランダムではなくある程度位相がそろっていた。よって増殖中の植物は新規に出現した組織に関しても位相の同期作用があり、概日リズムが組織全体で維持されることが示された。

次にフロンド内の概日リズムを細胞レベルの解像度で時空間的に解析することで、フロンド内の概日リズム動態を明らかにした。測定開始前に明暗同調を受けたLDLLウキクサは恒明条件下での測定中にフロンド内で空間的に概日リズムの位相が高く同期していたが、特徴的な空間パターンとしてフロンド中心部に比べて周辺部の位相が遅れる遠心性の位相パターンが見られた。この遠心性のパターンは中央部に比べて周辺部の周期が長いことにより発展していくことが明らかになった。さらに、新規に出現したフロンドはそれより古いフロンドに比べてフロンド内で高い同期性を示した。長時間恒常条件下にあるLLLLウキクサのフロンド内ではスパイラルパターンなどの移動波を伴う様々な位相パターンが観察されたが、それぞれのフロンドの空間パターンの特徴は観察期間にわたって保存されていた。いずれのパターンにおいても、ランダムに位相が決定されている場合と比べると近傍の細胞間の位相差が小さかった。こ

のことから細胞間で位相を同期させる作用があることが示唆された。この同期作用は古いフロンドに比べて若いフロンドの方が強いと考えられ、組織の概日リズムの秩序形成にはフロンドの齢が関わっていることが示唆された。

最後にフロンド内の概日リズム特性の空間パターンの発生メカニズムを理論的にとらえるために、フロンド内の細胞概日リズムを抽象化したモデルシミュレーションを行った。数理モデルとして、近接細胞間で結合がある動物組織での概日リズム動態の解明に用いられた modified Poincaré 振動子モデルを用いた。このモデルは Poincaré 振動子を基本とし、振幅が周期に影響を与える項と、近接した振動子との位相関係が振動子の位相および振幅に影響を与える項が追加されている。LDLL ウキクサで顕著に見られた位相・周期の遠心性の空間パターンは、振動子の位相をそろえた位相状態からの時間発展で再現された。LLLL ウキクサで観察された位相の空間パターン（スパイラルパターン）は、ランダムな位相状態からの時間発展で再現された。シロイヌナズナの切除葉で類似した位相パターンが報告されていることをふまえると、時間情報の長距離伝達がない植物では、局所的な細胞間の相互作用が組織内の位相・周期パターンを形成する主要な要素であると考えられた。

今回明らかにした増殖するウキクサの概日リズムの時空間的特性に基づいて、増殖中の植物のフロンドにおける、局所的な概日時計間の同期を基本とした枠組みを提案する。この枠組みは、フロンドの一生において、発生初期段階の強い同期作用に基づくリズムのパターン形成が起こり、続いて局所的な同期作用に基づいてパターンが進化し、齢が進むにつれて位相の脱同期化・ランダム化がおこる、という3つの段階で進んでいく。この枠組みはウキクサに限らず、植物の概日リズム動態の基盤になっている可能性がある。本研究で明らかにした局所的な概日リズムの同期を基本とし、加えて維管束などを通じた組織間の時間情報の長距離伝達を考慮した枠組みの中で、維

管束が発達した植物の自発的な概日リズム動態をとらえることによって、一般的な植
物体内の時間秩序形成機構の理解が進むと期待される。

論文目録

本論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

An endogenous basis for synchronisation characteristics of the circadian rhythm
in proliferating *Lemna minor* plants

Kenya Ueno, Shogo Ito, Tokitaka Oyama

First published: 18 December 2021

New Phytologist, Volume 233, Issue 5, March 2022, Pages 2203-2215

導入

多くの生物は概日時計を持ち、昼夜のある環境に同調した約 24 時間周期の概日リズムを示している。概日時計を持つ生物は外環境の変化がない恒常条件下においても、一定期間約 24 時間周期の概日リズムを持続させることが知られている。植物において概日リズムは気孔開閉などの様々な生理的な反応を昼夜環境に適応させる役割を果たしていることが知られているため、多細胞生物である植物にとって概日時計が個体内で協調的に働くことは重要である (Dodd *et al.*, 2005; Greenham & McClung, 2015)。真核生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よって自励振動を細胞内で起こしている (Jolma *et al.*, 2010)。概日遺伝子は植物・動物・菌類において異なっており、独立に獲得されたことが示唆されている。モデル植物であるシロイヌナズナの分子遺伝学により、*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)*, *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRRs)*, *LUX ARRHYTHMO (LUX)*, *EARLY FLOWERING 4 (ELF4)* など多くの時計遺伝子が転写翻訳フィードバックループを形成していることが明らかになっており、高等植物では時計遺伝子が広く保存されていることが知られている (McClung, 2019)。

多細胞生物が概日時計を個体全体で協調させるためには個々の細胞の持つ時間情報を統合する機構が必要になると考えられる。植物体内では近接細胞間の局所的な時間情報の伝達や組織間等の長距離の時間情報の伝達が起こっているという報告があり、これらが細胞時計間の同期に働いていると考えられている (Greenham & McClung, 2015; Muranaka & Oyama, 2018; McClung, 2019)。植物の組織内での概日リズム動態に関しては、生物発光リズムを示す概日リズムレポーター遺伝子を導入したシロイヌナズナやウキクサ植物を用いた研究により、恒常条件下での葉（シュート）と根で

の空間の位相パターンが報告されている (Thain *et al.*, 2000; Fukuda *et al.*, 2007, 2012; Wenden *et al.*, 2012; Muranaka & Oyama, 2016; Gould *et al.*, 2018; Greenwood *et al.*, 2019). 組織・器官内での空間パターンからは、近接した細胞時計間に位相を互いに近づける相互作用があることが示唆されているが、その強さはこれらの組織・器官の位相を完全に同期させるのには十分ではない。組織間、長距離の時間情報の統合に関しては組織特異的な機能が報告されている。維管束組織は頑健な概日リズムを示しており、他の組織に支配的な影響を与えていると考えられた (Endo *et al.*, 2014). また茎頂は植物体全体の概日時計を支配的に制御する役割があると考えられ、*ELF4* 遺伝子産物はシュートから根への時間情報の伝達を媒介することが示唆されている (Takahashi *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2020).

位相や周期の空間パターン形成の要因を調査する手法には、生物を用いた実験の他に現象を説明する数理モデルによる検証がある (Strogatz, 2000; Fukuda *et al.*, 2007; Myung *et al.*, 2018). 振動子集団の同期現象の説明をするモデルとして位相振動子が互いに結合する蔵本モデルが広く知られている (Strogatz, 2000). 植物の概日リズムの同期現象のモデル化では、複素平面上に軌道を持つリミットサイクル振動子である Stuart-Landau 振動子が互いに結合するモデルにより、シロイヌナズナの葉で観測された位相パターンが説明できることが示され、維管束組織と葉肉組織で概日リズムの頑健性・時間情報の伝達様式が異なることが示唆されている (Fukuda *et al.*, 2007). また、数理モデルを用いた細胞間の時間情報の伝達様式の研究は、動物組織を対象とした研究で広く行われている (Bordyugov *et al.*, 2013; Herzog *et al.*, 2017). 動物の概日リズム中枢は視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) にあるといわれており、これは神経細胞からなる組織であるため、遠距離のネットワーク構造を前提としたモデル化が行われ、これにより SCN の細胞が部位により異なる特徴を持つことが明らか

かになっている (Herzog *et al.*, 2017). 近年, 哺乳類の脳の脈絡叢 (choroid plexus, CP) 組織における概日リズムの位相の遠心性パターン形成が明らかになり, modified Poincaré 振動子の結合振動子モデルにより説明された (Myung *et al.*, 2018) (図 1a). CP ではギャップ結合により細胞間が結合しているため, 近接した細胞間での相互作用が想定される. このモデルシミュレーションで, 均一な振動子の集団であっても細胞間の概日リズム情報の結合により, 遠心性の位相の空間パターンが発生することが示されている.

植物の概日時計研究において, 概日リズムの観測期間中に植物はある程度成長をしているが, 成長中の植物の概日時計動態についてはほとんど明らかになっていない. シロイヌナズナ *CCA1:LUC* 形質転換体の成長する根では, 生物発光が縞模様の移動波として観察されることがある (Fukuda *et al.*, 2007). 根の先端で作られる細胞の概日リズムは周囲の細胞と同期しておらず, 外環境からの刺激のない発生段階で自発的にリセットされることが示唆されている. 根は先端で一時的に伸長する組織であり, 成長する器官の概日リズム動態の観測が容易である. 一方, シュートの成長機構は 3 次元であり複雑で, 概日リズム動態を実験的に研究することは困難である.

ウキクサ植物は 2 次元的に増殖し, 扁平で小さな植物体であり 2 次元的に非侵襲で観察できるため, 植物全体について細胞レベルの分解能で生物発光を観察しやすい (Muranaka & Oyama, 2018). 植物体は複数のフロンド (葉状体) からなり, コロニーを形成している. コウキクサ (*Lemna minor*) のフロンドは 2 つのポケットを持ち, このポケットの奥に分裂組織がある (Landolt, 1986) (図 2). 新しいフロンド (子フロンド) は増殖の過程で親フロンドから分離する. 分離が起こるころには子フロンドは成熟し, フロンドの大きさが変化しなくなるのが普通である. 増殖は速く 7-10 日間の生物発光観察期間でも数世代にわたって新規に発生するフロンドを観察できる. この

ような発生上の特徴により、増殖中の植物体（フロンド）の親子関係を追跡するとともに、フロンド内の位置ごとの概日リズム動態を取得することが可能となった。

ウキクサでは、 CO_2 や K^+ の取り込みなど、重要な生理現象に関連する機能に概日リズムが知られている (Miyata & Yamamoto, 1969; Hillman, 1970; Kondo & Tsudzuki, 1978). 最近では、ルシフェラーゼレポーター遺伝子をパーティクルボンバードメント法で導入することによる生物発光観測によって、ウキクサの概日リズムが観測されている (Miwa *et al.*, 2006; Serikawa *et al.*, 2008; Muranaka *et al.*, 2015). ウキクサの概日リズムレポーターとして *AtCCA1:LUC* が使われており、シロイヌナズナ形質転換体と同様の生物発光リズムを示す。その生物発光リズムは、イボウキクサ (*Lemna gibba*) *LgLHYH1:LUC* レポーターの発光リズムと一致しており、イボウキクサの *CCA1* ホモログ (*LgLHYH1*) の発現プロファイルと類似している (Ito-Miwa *et al.*, 2014). 時計関連遺伝子の発現と機能解析により、概日時計の必須構成要素がウキクサとシロイヌナズナの間で強く保存されていることが強く示唆されている (Ito-Miwa *et al.*, 2014; Serikawa *et al.*, 2008; Okada *et al.*, 2017). パーティクルボンバードメント法により *AtCCA1:LUC* などの生物発光レポーターを導入した細胞は、1細胞レベルで生物発光を観測することができる。これにより、イボウキクサでは、細胞の生物発光リズムが定量的に解析されている (Muranaka *et al.*, 2013; Muranaka & Oyama, 2016; Okada *et al.*, 2017). 細胞時計が不均一な概日リズム特性を持つことに加え、位相の局所的な同期や明暗サイクル下におけるフロンド内の遠心性の位相パターンなど、空間的な特徴も実証されている。しかしながら、パーティクルボンバードメント法では成熟したフロンドあたり 100 個以下の細胞にしか遺伝子導入できず、測定中に出現するフロンドには導入できない。そのため、この観測系は新たに出現するフロンドの概日リズムの測定や高解像度での観測には不向きであった。

本研究では、増殖中の植物における概日リズムの動態を明らかにするため、概日リズム発光レポーター *AtCCA1:LUC* を導入したコウキクサの形質転換体の生物発光を時空間的に分析した。細胞サイズに近い分解能でのリズム解析と数理モデル化、増殖中の植物のフロンド間の比較解析により、植物における自発的な概日リズムの動態の原理を提案する。

材料と方法

植物と培養条件

実験には本研究室の伊藤照悟助教が作成したコウキクサ (*Lemna minor* 5512 株) の *AtCCA1:LUC* 形質転換体を用いた。これは朝方に発現のピークを持つシロイヌナズナの概日遺伝子 *AtCCA1* プロモータの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子 *LUC+* を結合した配列を形質転換により導入した形質転換体である。形質転換体の系統として親株と形態に違いの見られない#1 と#3 を選択し、実験に使用した。*AtCCA1:LUC* 形質転換体は、先行論文と同様に温度を 25 °C に保った培養室において恒明条件下で 1% ショ糖入りの NF 培地で維持した (Muranaka *et al.*, 2015)。光源には白色蛍光灯 (FLR40SEX-W/M/36-HG; NEC) を用い、光量を 30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ とした。植物は、綿を詰めた 200 ml 三角フラスコ内にて培地 60 ml で培養した。実験の前条件として、12 時間明条件/12 時間暗条件の処理を 1 週間以上与え明暗同調させたウキクサ (LDLL) と、恒明条件下で育て暗条件を経験していないウキクサ (LLLL) を用意した。明暗培養にはインキュベーター (MIR-153; パナソニックヘルスケア) を使用した。このインキュベーターでは、白色蛍光ランプ (FL20SS-W; 三菱電機) を使用して光量を 30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ とし、温度は 25 °C に維持した。

ウキクサの生物発光測定条件

AtCCA1:LUC 形質転換体の生物発光イメージングは、以前本研究室で開発された 1 細胞生物発光観測系と同様に行った (Muranaka & Oyama, 2016; Isoda & Oyama, 2018)。コウキクサ 1 コロニーを 35 mm ディッシュに移し、1% ショ糖入りの NF 培地 4 mL にルシフェリンを 0.1 mM の濃度になるよう加えた。画像解析を容易にするため、1 個のフロンドのみいくつかのピン (Austerlitz Insect Pins, stainless steel 0.1 mm

diameter; Entomoravia) で囲うことで移動を抑制した。蓋の裏側にゴウルの曇り止め (メガクリア曇り止め; トラスコ中山) を塗布し, ディッシュの蓋が培地の蒸発により曇ることを軽減した。生物発光の検出には EM-CCD カメラ (ImagEM C9100-13; 浜松ホトニクス) を用いた。LDLL の 1 回目の実験 (LDLL1) および, LLLL の実験 (LLLL1, LLLL2) にはマクロズーム顕微鏡 (MVX-10, MVPLAPO 0.63 X; オリンパス) を用い, LDLL の 2 回目の実験 (LDLL2) にはカメラレンズ (XENON 0.95/25MM C-mount; Schneider optics) を用いた (Muranaka & Oyama, 2016; Isoda & Oyama, 2018)。LDLL2 回, LLLL2 回の全実験で, インキュベーター (KCLP-1000I-CT; NK system) 内に設置した遮光ボックス内に計測装置を設置し, 温度を 25°C に保った。白色発光ダイオード (RFB2-20SW; CCS 社) から光ファイバーで植物へ導光し, 光量を $30 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ とした恒明条件で測定を行った。明視野画像と生物発光画像の取得は 60 分ごとに行った。生物発光画像は, 事前に遅延蛍光を除去するため 240 秒間暗条件を加えたのち, 露光時間を 240 秒とし 2 回連続して撮影した。連続して撮影した 2 枚の画像の各ピクセルの最小値を取ることで宇宙線によるスパイク信号を除去した画像を作成し, 解析に用いた。生物発光を撮影したのち明視野画像を撮影し, この画像を用いてフロンド境界の抽出を行った。これらの撮影は 1 実験につき 1 週間以上連続して行った。

1 コロニーに由来する各フロンドのラベリング

各フロンドの生物発光データおよびフロンド内の各ピクセルの生物発光データを取得するため以下の 5 段階の処理を行った。

1. 明視野画像を用いたフロンド輪郭抽出
2. 画像間での各フロンドの対応付け

3. 生物発光画像との重ね合わせによる各フロンドの生物発光の時系列データの取得
4. フロンド形状を用いた各フロンドの移動補正
5. 生物発光画像への適応による各ピクセルの生物発光の時系列データの取得

詳細について以下に記載する.

LDLL1, LLLL1, LLLL2 の明視野画像を用いたフロンド輪郭抽出

フロンドの輪郭抽出は、背景除去、コロニー領域の推定、フロンド境界の推定、手作業による修正の順で行った。各時系列画像群から各ピクセルごとに最小値を取ることによって求めた画像を背景画像とし、各画像と背景画像の差分をとることで背景除去を行った。背景除去を行った画像群に対し、分散 σ を1とした 3×3 のガウシアンフィルタを適応し平滑化することで画像のノイズを除去した。ノイズを除去した画像を判別分析法の一つである大津の手法 (Otsu, 1979) により二値化（白黒画像に変換）することでコロニー領域の推定を行った。さらに Canny エッジ検出法によるエッジ検出、Sobel フィルタによる画像微分、などの画像処理を適宜実施しフロンド境界の推定を大まかに行った。フロンド間の境界は不明瞭であるため精度は十分でなく手作業により修正した。これらの画像処理は、python3 または ImageJ を用いて行った。なお、この作業に関しては伊藤助教とともに行った。

LDLL2 の明視野画像を用いたフロンド輪郭抽出

上述したこれまでの手法では手作業による修正以外にも、閾値の決定など目視による判別を行う工程が多く時間がかかっていた。また、ガウシアンフィルター等により画像を平滑化することはノイズを除去する一方でフロンド境界が判別しづらくなっており、精度の向上が見込めなかった。そのため、簡易な処理によって高い精度でフロンド境界を推定することを目的にして、深層学習による画像処理を用いた手法を新た

に開発した。本研究では、比較的少ない教師データで学習が可能であり画像から画像を生成できる pix2pix を用いることにした (Isola *et al.*, 2017)。pix2pix は教師あり学習の一つであり、入力画像と出力画像を教師データに用いて求めた関数によって、新規の入力画像に対して出力画像を出す手法である。教師データには、入力画像として明視野画像を、出力画像として手作業で決定したフロンド領域の画像を使用した。先行論文において提示されていた手法においては 256×256 の 8bit, 3channel カラー画像を入力画像、出力画像としていたが、本研究で撮影した明視野画像は 512×512 の 16bit モノクロ画像であるため、そのまま適応することはできなかった。pix2pix は最初に畳み込み計算を行った上で計算を行う手法であるため、畳み込み層を 1 層増やすことにより、 512×512 の画像へ対応させた。また、ピクセルのシグナル x に対して、 x を 256 で割った商と余りを求め、これを 3channel カラー画像のチャンネル 2 つに対して代入することでデータのロスなく 8bit, 3channel カラー画像に変換した。上記の手法を用いることで自動的にフロンド境界を推定することが可能となった。しかしながら、本データの解析にあたっては教師データが少ないため手作業による加筆作業が必要であった。本研究中は手作業により修正した画像を新たな教師データとすることで作業を進めるごとに修正量を減らした。これらは、Python3/Tensorflow により実装した。また、手作業による修正は ImageJ を用いて行った。

画像間での各フロンドの対応付け

画像間で各フロンドを対応付けた。フロンドは出現時を除き、1 時間では位置に大きな変化がないためサイズの大きいフロンドから順にそれぞれの重心の座標を用いてフロンドの対応付けを行った。この方法により、ほとんどの画像間でフロンドの対応付けに成功したが、目視で確認し必要に応じて手作業による修正を行った (頻度: 1% 未満)。

生物発光画像との重ね合わせによる各フロンドの生物発光の時系列データの取得

時系列画像上での各フロンドの輪郭情報と生物発光画像を重ね合わせることで、各フロンドの面積と面積当たりの発光量を算出した。

フロンド形状を用いた各フロンドの移動補正

測定期間中に成長拡大を停止した（成熟した）フロンドに対してフロンド存在領域を 1, その他を 0 とする二値化画像を用いて移動補正した。フロンドが成長拡大を終了した時間は目視により判定した。特定時間のフロンドを楕円に近似して回転することによりフロンドの向きを基部が下側となるように設定し、そのフロンドに対する回転移動行列を計算した。回転移動行列は Python3 で実装されている `findTransformECC` (Evangelidis & Psarakis, 2008) を用いて求めた。

生物発光画像への適応による各ピクセルの生物発光の時系列データの取得

求めた行列を生物発光画像に適応し、移動補正した各フロンドの生物発光画像群を取得した。この生物発光画像群から、フロンド内の各ピクセルの発光量を算出した。解析には 48 時間以上連続したデータを持つピクセルを使用した。このため、フロンド境界周辺のピクセルは除去された。

時系列データのリズム解析

各フロンド、各ピクセルのリズム解析では概日リズムの位相及び周期を、本研究室で以前開発された手法を用いて求めた (Muranaka & Oyama, 2016)。

各生物発光リズムのピークを以下のようにして検出した。まず、時系列データを 3 時間移動平均で平滑化し、ピーク位置を局所的な極大値として大まかに特定した。この極大値の時刻を中心に 5 時間分の領域を用いて局所的な 2 次関数フィッティングを行うことで、正確なピーク位置を推定した。生物発光リズムの位相 $\theta(t)$ を以下のように

に定義した (図 3a).

$$\theta(t) = 2\pi \frac{t - t_p^k}{t_p^{k+1} - t_p^k} (t_p^k \leq t < t_p^{k+1}, k = 1 \dots N_p)$$

ここで, t_p^k は k 番目のピークの発生時間を表し, N_p はピークの総数を表す.

各発光リズムの周期は, Fast Fourier Transform Non-Linear Least Square (FFT-NLLS) 法 (Zielinski *et al.*, 2014) を用いて推定した. FFT-NLLS 法ではリズムの有意性は, 統計的に有意でないリズムに近づくにつれて 0 から 1 に増加する Relative amplitude error (RAE) によって推定される. RAE が 0.3 以下のデータを有意なリズムとして採用した.

ピクセルの概日リズムの位相, ピクセル間距離, 位相差およびこれらの指標の統計量を計算した. ピクセル間距離の範囲 (ビン) における位相差の中央値の信頼限界を推定するために, ブートストラップリサンプリング法を用いた. 全ペアの位相差のデータセットから, N 個のサンプルをランダムにリサンプリングし, その中央値を計算した. N はピクセル間距離の範囲に含まれるサンプルの総数である. 上記のリサンプリングを 10000 回行うことで 95% 信頼限界を推定した.

同期率の算出

振動子集団の位相の同期の程度を評価するため, 蔵本モデルのオーダーパラメータとして知られる同期率 $R(t)$ を用いた (Wenden *et al.*, 2012; Muranaka & Oyama, 2016). 同期率 $R(t)$ は以下のように定義される (図 3b).

$$R(t) = \frac{1}{N(t)} \left| \sum_k \exp(i\theta_{k(t)}) \right|$$

ここで, $\theta_{k(t)}$ は時間 t における k 番目のフロンド (またはピクセル) の位相, $N(t)$ はフロンド (またはピクセル) の数である.

数理モデルによるシミュレーション

Myung らによって記述された modified Poincaré 振動子を 2 次元上に配置した結合振動子モデル (twist モデル) を採用した (Myung *et al.*, 2018). modified Poincaré 振動子の結合を記述する次の式を用いた.

$$\frac{dr_i}{dt} = \lambda r_i (A - r_i) + \sum_{j \neq i} K_{ij} \cos(\phi_j - \phi_i), \quad (1)$$

$$\frac{d\phi_i}{dt} = \epsilon (A - r_i) + \omega_i + \sum_{j \neq i} K_{ij} \frac{r_j}{r_i} \sin(\phi_j - \phi_i), \quad (2)$$

ここで, $\lambda, A, \epsilon, \omega_i, K_{ij}$ は半径方向の緩和率, 振動子の固有振幅, ねじれ係数 (twist), 角速度 ($2\pi/\tau_i$: τ_i は振動子 i の固有周期), 振動子 i と j の結合強度である. 式 1 と式 2 は, 半径成分 $r_i(t)$ と位相成分 $\phi_i(t)$ の動的な変化を記述している. パラメータは Myung らが用いたものを参考にしたうえで, フロンドの細胞数, 面積の形状を用いて我々の実験での観測に合うように調整した. シミュレーションに用いたパラメータは, $K = 0.01, \epsilon = -0.02, \lambda = 0.05, A = 1$ とした. τ はガウス分布 (平均: 27.0 h, 標準偏差: 0.5 h) に従ってランダムに設定し, 初期位相を 0 (同期条件: LDLL を模す) またはランダム (非同期条件: LLLL を模す) に設定して, 同一パラメータでシミュレーションを行った. 各振動子の初期振幅は 1 に設定した. セルに対する相互作用の範囲はムーア近傍, つまりそのセルを取り囲む 8 つのセルとした. また, 同期条件の場合はシミュレーション開始から 100 時間後, 非同期条件の場合は 720 時間後のタイミングの前後のピークの間隔をそれぞれの条件での周期と見なした. これらの詳細は結果の章で記す.

先行研究 (Myung *et al.*, 2018) では MATLAB によるコードが公開されているため, 同様のモデルを Python3 にて再実装した.

データとソースコードの公開

解析に用いた画像データは、京都大学学術情報リポジトリ (KURENAI) (<http://hdl.handle.net/2433/266601>) にある。上記の解析はすべて Python3 を用いて実装した。ソースコードは https://github.com/ukikusa/circadian_analysis および, https://github.com/ukikusa/twist_simulater にある。

結果

実験概要

本研究では *AtCCA1:LUC* 形質転換体の生物発光を観測することにより増殖中の植物の概日時計の時空間的な動態を調べた。恒明条件下で増殖する植物の生物発光を 1 時間おきに 1 週間以上、EM-CCD カメラを用いた自動撮影装置を用いて撮影した (図 4a,b)。外環境に同調した植物の概日リズムの秩序が外部刺激のない環境においてどのように維持されるかを明らかにするために、測定開始前に明暗同調を与えた LDLL ウキクサを用意した。また、自発的に形成される概日リズムの秩序を明らかにするために事前に外環境からの同調刺激を受けていない LLLL ウキクサを用意した。4 枚のフロンドで構成された 1 コロニー (図 5a) から測定を開始したため、1 回の実験で観測されたフロンドはすべて 1 個のフロンド由来であることが保証されており、また画像データからその親子関係を知ることができる。生物発光測定中には明視野画像も同時に撮影しており、これによりフロンドの境界の情報を得た。個々の成熟したフロンドについてフロンド形状に応じた画像の移動補正を行い、フロンドレベルおよびピクセルレベルでの概日リズムの時空間解析を可能とした (材料と方法)。恒明条件下の測定期間中、ウキクサ植物は全体として 2-2.5 日で 2 倍の表面積に成長した (図 5b)。測定開始後に出現した個々のフロンドはカメラで確認されたのち 2-3 日で成長拡大を停止 (成熟) した (図 5c-f)。増殖・成長に伴い測定期間中に移動してカメラの視野から外れたフロンドも存在し、これらは一部が視野から外れた段階で解析対象から外した。恒明条件下での測定中には、LDLL ウキクサ・LLLL ウキクサともに成長の概日リズムが観測されなかった (図 5b)。

LDLL ウキクサのフロンドの恒常条件下における概日リズムの維持

測定開始前に明暗同調を与えた LDLL ウキクサの生物発光リズムを恒常条件下で測定した (図 4a). 材料と方法に記した通り各フロンドについてピクセルあたりの平均発光量を算出した (図 6a). すべてのフロンドで, 一見して周期や位相が似ており, 明らかな概日リズムを示していた (図 6). 測定開始前に明暗同調を受けていたフロンドは, 恒常条件において 2-4 日目までは発光リズムの谷の発光量が非常に低く, その後徐々に増加した (図 7a). また, 恒常条件に移した後に新たに出現したフロンドの概日リズムは, 出現から 4-5 日間は発光リズムの谷の発光量が非常に低く, その後徐々に増加した (図 7b,c). このように, 明暗同調を受けたフロンドの子孫は, 恒常条件下で親フロンドの振幅が低下しており, 直接明暗刺激を受けていないにもかかわらず, 同時間帯の親フロンドに比べて振幅が高いリズムを示した (図 7d).

フロンド間の位相関係を比較するため, 48, 96, 144 時間後の位相を表示した (図 6b,c). この時, 測定可能なサイズであったフロンドの枚数はそれぞれ 7, 12, 21 枚であった. それぞれの時間において, 最も位相が離れていたフロンド間の位相差はそれぞれ, 0.57 ラジアン [概日時間 (CT) : 2.2 時間], 0.86 ラジアン (CT: 3.3 時間), 1.57 ラジアン (CT: 6.0 時間) であった. なお, ここで概日時間 (CT) とは概日リズムの周期 (約 24 時間, 2π ラジアン, 360 度) を, ちょうど 24 時間に見立てて, それを 24 等分した時間制である. したがって, 恒常条件では事前に明暗同調を与えた LDLL ウキクサのフロンド間の位相のばらつきは時間経過とともに大きくなることがわかった. 144 時間後でのフロンドの位相を単位円に表示すると, 古いフロンドに比べて新たに出現したフロンドの概日リズムは遅れた位相を示す傾向があり, これがフロンド間位相差の拡大の要因であると考えられた (図 6c). このように測定中にフロンド間の位相の同期率 (材料と方法, 図 3b) は低下していくが, 144 時間後における同期率

は 0.89 と高く、フロンド間の概日リズムの同期性は高いことが示された。

また、独立にとられた異なる *AiCCA1:LUC* 形質転換体を材料にした、LDLL の反復実験 (LDLL2) においても、LDLL1 と同様の結果が得られた (図 8)。つまり、フロンド間の位相差は時間経過とともに大きくなり、新たに出現したフロンドの概日リズムはより古いフロンドに比べて遅れた位相を示し、144 時間後においてもフロンド間の概日リズムの同期性は高かった。これらのことから、明暗同調を受けたコロニーから出現したフロンドの概日リズム位相は恒常条件においてもフロンド間で一定期間同期しているが、新しく出現したフロンドの位相は遅れる傾向があることが明らかになった。

LLLL ウキクサの各フロンドの概日リズムの同期

事前に恒明条件で培養した LLLL ウキクサの各フロンドの生物発光リズムを、LDLL ウキクサと同様に測定した。LLLL ウキクサは外環境からの同調刺激を受けておらず、ほとんどのフロンドは LDLL ウキクサのフロンドに比べて振幅の小さい概日リズムを示した (図 6a, 7, 9a, 10)。また、リズムが観測されたフロンドでは、LDLL ウキクサと異なりフロンドが出現したタイミングや親子関係にかかわらずピーク時間に大きなばらつきが見られ、フロンド間で位相が大きくばらついていた (図 9a, 10)。それにもかかわらず、植物体全体の平均生物発光は概日リズムを示すことから、明暗同調を受けていないフロンドの概日リズム位相はランダムに決まっているわけではないことが示唆された (図 9a)。また、具体例として 1 つの実験 (LLLL1) の 48, 96, 144 時間後でのフロンドの位相を分析した。この時、測定可能なフロンドの枚数はそれぞれ 9, 15, 21 枚であり、その際の同期率はそれぞれ 0.85, 0.63, 0.67 であった (図 9b,c)。これらの同期率はフロンドの位相がランダムに決定されていないことを意味し、明暗同調していない 1 フロンドに由来するフロンド間の位相はある程度同期していることが明らか

かになった。このことから、新たに出現するフロンドの位相は親フロンドの位相の影響を受け自発的に決定され、互いに同期していると考えられた。

これらの現象は同条件で行った LLLL の反復実験 (LLLL2) でもほとんど再現された (図 11)。つまり、LDLL ウキクサに比べ振幅の低いリズムを示し、フロンド間でピーク時間に大きなばらつきがあったものの、ほとんどの時間でフロンド間の位相関係はランダムではなくある程度位相が同期していた。ただし、48 時間後においてはフロンド間の位相の同期率は低く有意に同期しているとみなせなかった。この時間においてはフロンドが 6 枚と少ないため、リズムの不安定なフロンドが存在すると同期率は大きく影響を受けてしまうことが原因であると考えられた。実際、この実験においては最も古いフロンドの概日リズムは振幅が非常に低く、不安定であった。一方、96 時間後、144 時間後においてフロンド間の位相がある程度同期していたことから、新規に出現したフロンド間の概日リズムの同期は、親フロンド全体のリズムの状態の影響より、分裂組織などの局所的なリズムの状態の影響を受けて起こることが示唆された。

LDLL ウキクサのフロンド内の時空間的な概日リズム特性

先行研究において、ウキクサの成熟したフロンドやシロイヌナズナの葉 (シュート) や根で位相の空間パターンが生じていることが知られており、本研究においても一見してフロンド内の空間パターンが発生しているように見られた。位相の空間パターンは概日リズムの細胞間の同期現象によって引き起こされている可能性が高いため、このような概日リズムの空間パターンを調査した。空間パターンの解析のため、フロンド内の各ピクセルの生物発光時系列データから概日リズムの位相と周期を算出した (材料と方法)。図 12 に成熟したフロンドの各ピクセルの生物発光の例を示す。測定開始前に明暗同調を受けたフロンドでは各ピクセルの生物発光においても減衰する概日リズムが見られた (図 12a LDLL1_1, _1-1)。個々の細胞時計は動き続けているこ

とが知られているので、この減衰はピクセル周辺の狭い領域で細胞の概日リズムが脱同期したことに起因すると考えられた (Muranaka & Oyama, 2016). また、親フロンドで各ピクセルの概日リズムに減衰が見られている時間においても、測定開始後に新規に出現した子フロンドでは親フロンドより高い振幅のリズムがみられた (図 12a LDLL1_1-2). これらのことから、細胞の概日リズムの安定性や細胞間の同期の強さはフロンドの齢に依存していると考えられた.

フロンド内の個々のピクセルに対して、恒常条件においてから 48–168 時間後の間、24 時間ごとに位相をプロットした. また、測定開始 24 時間後またはフロンドが成熟した時間から 72 時間分の生物発光を用い算出した周期をプロットした (図 13a, 表 1). それぞれのフロンドは周辺部の位相に比べて中心付近の位相が進んでいる遠心性パターンを示した (図 1,13a). また、フロンド重心からの距離と周期の間には、全 7 枚のフロンドのうち 6 枚で高い相関があり、フロンド内では中央部に比べて周辺部の周期が 1–2 時間程度長く、遠心的に増加していた (図 13a,b; 表 1). これにより、フロンド内での位相の空間パターンは周期の空間パターンにより発展していくことが示された.

同期率 $R(t)$ を用いることでフロンド内のピクセル間の位相の同期状態を定量的に評価した (図 13c). 測定開始時に成熟していたフロンド (LDLL1_1, LDLL_1-1) の同期率は測定開始後 24 時間後に 0.98 と高い値を示したが、その後低下し、168 時間後 (7 日目) にはそれぞれ 0.74, 0.41 となった. また、測定開始時に成熟していなかったフロンドおよび目視できなかつたフロンドに関しても成熟直後の同期率は 0.9 以上と高く、その後徐々に減少した. 興味深いことに、新規に出現したフロンドはいずれも、最初に同期率が計算された時間において、同時間のより古いフロンドより高い同期率を示した. これは、新規に出現するフロンドは、親フロンドに比べてフロンド内の位

相がより揃った状態で出現していることを意味しており、分裂組織周辺の概日リズムはフロンド全体の概日リズムに比べ強く同期していることが示唆された。これらのことから、LDLL ウキクサからフロンドが発生する過程で概日リズムは空間的に同期し、フロンド間・フロンド内ともに同期が維持されていると考えられた。

前述したとおり、各フロンドの総発光量の概日リズムの谷の発光量は4-5日間非常に低く、その後徐々に増加した(図 6a, 7, 8a)。この生物発光リズムの減衰は、フロンド内で時間とともに生じる遠心性の位相パターンの発展と、老化していくフロンドで見られる細胞概日リズム間の局所的な脱同期によるものと考えられた。

また、独立にとられた異なる *AtCCA1:LUC* 形質転換体を材料に行った、LDLL の反復実験 (LDLL2) でも遠心性の位相と周期のパターンが観察された(図 14a,b)。このことは、LDLL 条件ではフロンド内における概日リズムの位相・周期の遠心性パターン形成が一般的であることを示唆している。一方で、個々のフロンドの脱同期の程度は全てのフロンドで LDLL1 のそれよりも小さかった(図 13c, 14c; 表 1)。

実際、本実験で用いているコウキクサの同属別種である *L. gibba* のフロンドやシロイヌナズナの切除葉でも遠心性パターンの形成が報告されている (Fukuda *et al.*, 2007; Isoda & Oyama, 2018; Muranaka & Oyama, 2016)。したがって、ウキクサのフロンドやシロイヌナズナの葉と似た形状・大きさの組織や器官では、一般にこのパターンが見られる可能性がある。

LLLL ウキクサのフロンドの時空間的な概日リズム特性

外環境の影響を受けず自律的に形成される概日リズムの特性を調べるため、LDLL ウキクサと同様に LLLL ウキクサのフロンド内の各ピクセルの生物発光時系列データを分析した(図 4b,d, 12, 15, 16)。図 12b,c に、成熟したフロンドのピクセルごとの発光時系列の例を示す。フロンド全体の平均発光量ではほとんどリズムの見られない発

光を示しているフロンド（例: LLLL2_1）においても、ほとんどのピクセルが概日リズムを示していた。また、LDLL と同様に観測時に既に成熟していたフロンド（例: LLLL1_1）では減衰を伴う概日リズムが観察されたが、観測後に新たに出現したフロンド（例: LLLL1_1-1-2）ではそのような急激な減衰はほとんど見られなかった。このように、概日リズムの安定性はフロンドが発生してからの時間に依存すると考えられた。これらの特徴は LDLL ウキクサのフロンドにおいて各ピクセルの生物発光で観測されたものと同じであり、局所的な概日リズムの基本的な特徴は、観測前の明暗同調の有無に影響されないことが示唆された（図 12）。

ピクセル単位での概日リズムが LDLL ウキクサと LLLL ウキクサで類似しているにもかかわらず、個々のフロンド内の概日リズムの空間パターンは LDLL ウキクサと LLLL ウキクサで大きく異なっていた（図 13a, 14a, 15a, 16a）。LLLL ウキクサの各フロンドでは移動波によって形成される様々な位相パターンが形成された。特徴的な位相パターンとして、LDLL と類似した周辺部の位相が中心部に比べ遅れるパターン（遠心性）（LLLL1_1-1）、横方向（LLLL1_1-3）、スパイラル（LLLL1_1-1-1）の3つが見られた（図 1, 15a）。これらの空間パターンは測定期間中、すなわち最長7日間は維持されていた。同一のフロンドから発生したフロンド間（1-1 と 1-3）、親フロンドと子フロンドの間（1-1 と 1-1-1）で位相の空間パターンが異なっていることから、フロンド発生の過程で確率的に形成されたものだと考えられた。この多様な位相パターンは、非常に大きなばらつきを持つ同期率（0.1-0.9）に反映された（図 15b）。非常に低い同期率から出現したフロンドをのぞき、ほとんどのフロンドで同期率が時間経過とともに下がる傾向があった。このことから、細胞の概日リズムは若いフロンドで高度に同期しており、成熟したフロンドでは全体として徐々に脱同期が起こっていることが示唆された。また、フロンド内の位置情報に着目し、細胞間の距離と位相差の関

係性を見ると、同期率が非常に低いフロンドにおいても、短距離 (<0.5 mm) で位相差が小さく高い同期性を示した (図 15c). 位相差と空間距離の関係性は、*L. gibba* を用いた単細胞レベルの研究でも観察されていた (Muranaka & Oyama, 2016). これらの結果は、隣接する細胞間で位相を近づけあう相互作用の存在を示唆している.

フロンド内の周期は様々な空間パターンが検出されており、その空間パターンはフロンド内の位置そのものではなく、そのフロンドが持つ位相の空間パターンと関連した. このことから、周期はフロンド内の位置そのものではなく、局所的な同期状態と関連していると示唆された. 観測開始時に最も高い同期性を示したフロンド (LLLL1_1-1) は、遠心性の位相パターンを示し、周辺部よりも中心部の方が周期が短かった (図 15a). 前述のとおりこの位相と周期の遠心性パターンは LDLL ウキクサのフロンドでも観察された (図 13a, 14a). このことから、フロンドの位相が高く同期している場合は明暗処理によらず位相・周期の遠心性パターンを形成することが示唆された.

同条件で行った LLLL の反復実験 (LLLL2) においてもフロンド内に様々な位相パターン及び、それに関連した周期のパターンが見られた (図 16). 特徴的な位相パターンとしては、LLLL1 と同様に位相の同期率が高く周辺部の位相が中心部に比べ遅れるパターン (遠心性) (LLLL2_1), 横方向 (LLLL2_1-3), スパイラル (LLLL2_1-1-1) が見られ、また縦方向 (LLLL2_1-1) も見られた (図 1, 16). LLLL1 と同様に、非常に大きなばらつきを持つ同期率 (0.0–0.8), 短距離 (<0.5 mm) のピクセル間の位相差が小さいという同期性も観測された.

2 回の実験から、LLLL ウキクサのフロンド内では局所的に高く同期した様々な位相パターンが見られ、このパターンは成長過程でランダムに生じたと考えられた. 一方で、フロンド_1, フロンド_1-1, フロンド_1-2 といった測定開始時のコロニーを形成

するフロンドでは位相の同期性が比較的高く、同期状態の低いフロンドは植え替えなどの刺激で位相がそろってしまっている可能性もあった。図 9, 11 の結果と合わせて考えると、増殖中の LLLL ウキクサでは個々のフロンドで様々な位相パターンが観察され、フロンドの成熟前から既に高い局所的な同期性が見られるが、同一フロンドから発生したフロンド同士は全体として類似した位相を示していた。

フロンド内の時空間的な概日リズム特性の数理モデルによる検証

生物発光リズムの時空間パターンで観察された興味深い特徴は、明暗同調を受けていたウキクサ (LDLL ウキクサ) が恒明条件下でフロンド中心部で短く、周辺部で長い周期パターンを示したことである。この周期のパターンは遠心性の位相パターンを引き起こし、結果的にフロンドの脱同期を引き起こしていた。この遠心性の位相・周期パターンは LDLL ウキクサに限らず LLLL ウキクサでも見られたが、測定開始時に高い同期率を持つフロンドにおいてのみ顕著であった。したがって、個々の細胞時計の固有振動数 (固有周期) が同様の遠心性パターンを示すとは考えにくかった。これらのことから、遠心性のパターンは、細胞間の相互作用によって細胞振動子の周波数が変わることで形成されたと考えられた。1次元および2次元領域における振動子の遠心性位相パターンをシミュレーションするモデルとして、modified Poincaré 振動子の結合振動子モデル (twist モデル) が提案されている (Myung *et al.*, 2018)。modified Poincaré 振動子は、振動子の角速度がその振幅によって変化するリミットサイクル挙動を示す (図 17a)。twist モデルは、哺乳類の脳の脈絡叢 (CP) 組織における概日リズムの位相の遠心性パターン形成の説明に用いられた (Myung *et al.*, 2018)。CP はギャップ結合により近傍の細胞間が結合しているため、相互作用の範囲は隣接した細胞と予想された。このモデルでは、隣接する振動子間で位相を同調させる相互作用および、近傍間で位相が近いほど振幅を高くする相互作用があると仮定された。組織の

境界に近い周辺部は中心部に比べて周辺に存在する細胞数が少ないことから、細胞間で位相が揃っている場合に周辺部の周期が長い遠心性のパターンが出現した。

この動物の CP で提唱された twist モデルをウキクサのフロンドで形成される位相・周期パターンのシミュレーションに適用した。シミュレーションの際の形状として、実際のフロンド形状を用いた。その上に $40\ \mu\text{m}$ と仮定した細胞サイズを基に計算した細胞数を用い、格子状に細胞振動子を配置した (図 17b,c)。本研究では、実験における振幅の定義は非常に難しい。そのため、本モデルでは振幅の変化率を仮に周辺細胞との位相の同期率と考える。すべての振動子の初期位相を 0 に設定した初期条件 (同期条件; LDLL を模す) でシミュレーションを行ったところ、予想された通り周辺部の位相が遅れ、周期が長い遠心性の空間パターンが形成された (図 17d, 19)。この結果は、LDLL ウキクサのフロンドで観測された遠心的な周期パターンと非常に類似していた (図 13a,b, 14a,b)。一方で、位相振動子の結合を考えた古典的な蔵本モデルや、振幅と周期の間に相関がないパラメータ設定 ($\epsilon = 0$) の twist モデルを用いたシミュレーションでは、遠心性のパターンは発生しなかった (図 17e)。また、LDLL を模したシミュレーションと同様のパラメータを用い、位相をランダムに設定した初期条件 (非同期条件: LLLL を模す) でシミュレーションを行った。結果として、位相の空間パターンとしてスパイラルが見られ、位相パターンに関連した周期パターンが形成された (図 18a, 19)。実際に位相のスパイラルウェーブと位相パターンに関連した周期パターンは、LLLL ウキクサの一部のフロンドで観察された (図 15a LLLL1_1-3, _1-1-1, _1-1-2)。さらに、ピクセル間の位相差とピクセル間距離の関係を計算すると、($<0.5\ \text{mm}$) でピクセル間の位相が近く、実験を定量的に再現した (図 15c, 16c, 18c)。したがって、twist モデルは LDLL ウキクサと LLLL ウキクサ、両方の位相・周期のパターンを初期条件以外全て同じパラメータで再現可能であることがわかった。この

ことは、隣接する細胞間で位相を同調させる相互作用が、恒常条件下でフロンドの細胞の概日振動子としての挙動を組織化する主要因であることを示唆している。

考察

本研究では、概日発光リズムを発現する *AtCCA1:LUC* 形質転換体を観測することで、恒明条件下で増殖する植物の自発的な概日リズムの秩序形成について時空間解析を実施した。2種類の前処理（LDLL: 明暗同調; LLLL: 恒明条件）を与えたウキクサを用いて、恒明条件下における1コロニーから増殖したフロンド間での位相の関係性と個々のフロンド内の空間的な概日リズム特性を観察した。本研究で観測されたウキクサの概日リズム特性を説明するために、次の2つの法則が考えられる。1つは、フロンド内の位相・周期空間パターン形成には局所的な細胞間相互作用が大きく関わっていること、もう1つは、時間情報は親フロンドから子フロンドに伝わり、増殖する植物間で保存されることである。これらの法則は、前処理によらず、様々な同期状態を持つウキクサで観測された。

植物組織における概日リズムの局所的・自発的な同期を引き起こす細胞間相互作用については、これまでもいくつかの研究で提案されている (Fukuda *et al.*, 2007; Wenden *et al.*, 2012; Muranaka & Oyama, 2016; Gould *et al.*, 2018; Greenwood *et al.*, 2019)。概日発光リズムを発現するシロイヌナズナ形質転換体の葉（シュート）や根で観察される位相パターンには、局所的な時間情報の伝達が寄与していると推定されている。また、ウキクサ植物においても、*L. gibba* の1細胞生物発光リズムの研究から、局所的な細胞間での相互作用が短距離での位相の同期性と関連していることが提案されている (Muranaka & Oyama, 2016)。本研究ではコウキクサの *AtCCA1:LUC* 形質転換体を高空間分解能で観察することで、明暗同調を与えたのちに恒明条件下に移した LDLL ウキクサにおいて、恒明条件で概日リズムの位相・周期の遠心性パターンがあることを示した。遠心性の位相パターンは明暗サイクル下の *L. gibba* でも報告

されている (Muranaka & Oyama, 2016). 興味深いことに, 明暗同調を与えたのちに恒明条件下で観察した (LDLL) シロイヌナズナの切除葉でも恒明条件下で位相・周期の遠心性パターンが報告されている (Fukuda *et al.*, 2007; Wenden *et al.*, 2012). シロイヌナズナの切除葉は本体の一部である無傷の葉とは異なる概日パターンを示す傾向があり, 個体内では維管束組織を介して葉に時間情報が長距離にわたって伝達されていることが示唆された. ウキクサでは維管束組織が退化しているため, 成熟したフロンドはコロニーのほかのフロンドから分離していると見なせる. このことから, シロイヌナズナの切除葉における概日パターンにおいて提案されているように, フロンドで見られる位相・周期の概日パターンは主に局所的な細胞間相互作用によって形成されていることが示唆された. 局所的な結合を持つ振動子の集団では, 空間的な位相パターンは境界条件や集団の大きさを含むネットワークの構造に依存する (Strogatz, 2000). ウキクサのフロンドとシロイヌナズナの葉は形状やサイズが比較的似ているため, これらの器官における遠心性パターンは局所的な相互作用を含め同様の原理で形成されている可能性がある.

フロンドの遠心性パターンを解釈するため, 本研究では modified Poincaré 振動子の結合振動子モデル (twist モデル) を適応した (Myung *et al.*, 2018). これは哺乳類の脳の CP における概日リズムの遠心性位相パターン形成を説明する数理モデルである. 本研究ではウキクサ植物に合わせパラメータを修正することで, LDLL ウキクサでの遠心性位相・周期パターン形成だけでなく, LLLL ウキクサで見られたスパイラルの移動波のパターン形成も再現できた (図 18). 動物の CP では, ギャップ結合が隣接する細胞間の局所的な相互作用の通路になっていると考えられている (Myung *et al.*, 2018). 植物では動物におけるギャップ結合と類似した役割を果たすものとして原形質連絡がある. 実際, 原形質連絡により近接した細胞に伝達される物質には,

Ca^{2+} などのイオン、低分子代謝物、ELF4 などの時計関連タンパク質が含まれており、これらは概日リズムの調整因子として働くため局所的な相互作用に機能を持つ可能性がある (Johnson *et al.*, 1995; Haydon *et al.*, 2013; Martí Ruiz *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020). ウキクサ植物では、同一細胞内に導入された 2 種類の生物発光レポーターのリズム (*AtCCA1:LUC* と *CaMV35S:luciferase*) の間に位相の非同期が報告されており、*CaMV35S:luciferase* のリズムは植物体の同期状態と関連していた (Watanabe *et al.*, 2021). *CaMV35S* は恒常的に転写されるとされているプロモータであり、これにより駆動されるルシフェラーゼレポーターの低振幅生物発光リズムは、ATP、酸素、ルシフェリンなどの酵素基質の細胞内濃度の概日リズムを示唆するものであった。これらの分子の生成や取り込みに関連する細胞内概日リズムは、細胞間の同期現象を理解するうえで興味深い対象だといえる。一方、*CaMV35S:luciferase* の生物発光リズムの空間パターンは本研究と解像度の違いはあるが、コウキクサのフロンドで観察されていない (Watanabe *et al.*, 2021). このように概日リズムを持つ細胞内・細胞間の生理現象が局所的な概日リズムの同期作用に関与している可能性がある。

Myung らのモデルにおいて、細胞間の同期現象は各振動子の振幅に影響を与え、各振動子の振幅は振動数（周期）を変化させる要素である。本研究では、隣接する細胞の同期状態が振幅であると仮定した。この仮定と本研究のパラメータの下では、同期状態が高いと振動子は固有振動数より高い振動数、すなわち短い周期を持つ。この仮定を持たないモデル、すなわち振幅に依存しない周期を持つパラメータ（式 2 において $\epsilon = 0$ ）に設定したモデルでは、均一な初期位相分布からは遠心性パターンが生じなかった（図 17e）。また、位相振動子からなる蔵本モデル (r_j, r_i を 1 に固定し、 $\epsilon = 0$ としたモデル) は結合振動子のモデルとして古くから研究されており、このモデルにおいても均一な初期位相分布からは遠心性パターンが生じる確率が非常に低いことが

知られている (Strogatz, 2000; Myung *et al.*, 2018). 本研究で用いたモデルにおいては、位相が同期したフロンドでは、フロンドの境界に存在する細胞はフロンド中央部に存在する細胞よりも隣接する細胞の数が少ないため、フロンド境界付近の細胞の振幅は中央付近より小さくなり、結果的により長い周期を示す。このシミュレーションにより、同期率の高いフロンドでは同期の仕方にかかわらず、恒常条件下で遠心性パターンが自然に出現することが示された (図 18a)。実際、LLLL ウキクサにおいても高い同期率を示すフロンドには遠心性パターンが見られた (図 15, 16)。一方、同期率の低いフロンドでは、振動子の周期は隣接する細胞との同期率に依存して決まり、振動子の周期は空間的な位相パターンに大きく依存する (図 15a, 16a)。また、細胞間の同期率が高くないため、隣接する細胞の数によって生じる境界条件による影響より空間的な位相パターンの影響の方が大きく、遠心性パターンが生じなかった (図 15a, 16a, 18a)。このような位相パターンに依存した周期決定は、事前に受けた同調により恒常条件下で周期が影響を受ける ‘after effect’ を引き起こす可能性がある (Daan & Pittendrigh, 1976)。シロイヌナズナにて、明暗による同調と温度変化による同調が、2 種類の概日リズムを示す遺伝子の間でリズムの周期や互いの位相関係に違いを生じさせることが報告されている (Michael *et al.*, 2003)。このような刺激後の概日リズムの違いは、植物内における空間的な同期状態の違いが引き起こしている可能性がある。

本研究では、増殖中の植物における自発的な概日リズムの組織化が明確に観察された。新しく出現したフロンドは、LDLL ウキクサだけでなく LLLL ウキクサでも、親子・姉妹間で類似した位相を維持する傾向があった。このような概日リズムの組織化は、シロイヌナズナの成長する根で観察される組織化とは対照的であるように見える (Fukuda *et al.*, 2012)。根の先端部では、各細胞が伸長段階で概日時計をリセットしているようで、根の成長方向に沿って縞模様の位相パターンを持つ移動波が形成されて

いる。フロンド内に着目すると、LLLL ウキクサにおいて新たに出現したフロンド内には発生直後から様々な位相の空間パターンが形成されていた。それにもかかわらず全体で見ると親子姉妹間で類似した位相を維持していることから、初期の位相決定は親フロンドの細胞と子フロンドの細胞の間を含めた細胞振動子間の局所的な相互作用が重要であることが示唆された。このように、新しいフロンドの原基とその親フロンドとの同期は、子フロンド間の同期に寄与していると推定される。LDLL ウキクサで新たに出現するフロンドは、同時間の親フロンドと比べても高い位相の空間的な同期を示し、また位相の空間パターンも一様であった。このことは、フロンドが発生の早い段階で高い同期性を持つことを強く示唆している。シロイヌナズナの地上部の成長点である茎頂は、他の器官よりも強固な概日リズムを示した (Takahashi *et al.*, 2015)。これらのことから、LDLL ウキクサでは、フロンドの分裂組織が安定な概日リズムを示し、結果として新規に出現するフロンドも含めて高い同期性が維持されている可能性がある。この安定性は親フロンドのポケット内にある分裂組織の細胞間の概日リズムの相互作用によるものと考えられた。しかし、LLLL ウキクサにおいてフロンド内の位相の同期性が低い親フロンドから生じた新しいフロンドは、フロンド内で低い同期率と多様な位相空間パターンを示したため、分裂組織における細胞間相互作用は自発的にフロンド原基を完全に同期させるほど強くはないことがわかった。

以上のことから、増殖中の植物のフロンドにおいて、自発的にフロンド内の位相パターンが形成される局所的な概日時計間の同期作用を基本とした枠組みを提案する (図 20)。この枠組みでは、フロンドの一生において、発生初期段階の強い同期作用に基づくリズムのパターン形成が起り、続いて局所的な同期作用に基づいてパターンが進化し、齢が進むにつれて位相の脱同期化・ランダム化がおこる、という3つの段階で進んでいく。具体的なシナリオは以下のとおりである。発生初期には、フロンドの

原基で親子間の相互作用と細胞間の相互作用によって位相パターンが形成される。親フロンドのポケット内から飛び出し、最初の位相パターンに基づいて位相パターンが形成され、成熟した後もそのパターンが1週間以上持続する。このパターン形成は主に細胞間相互作用によって引き起こされる。外環境のリズムに同調した植物では、フロンド発生初期の位相が非常に高い同期状態を持ち、成熟したフロンドでは遠心性の位相パターンになる。一方、外環境にリズムがなく同調していない植物では、フロンド原基の空間位相パターンに起因する初期の低い位相の同期状態が、成熟フロンドの位相パターンを決定する。このように、様々な初期位相パターンに応じた様々な位相パターンが派生する。位相の脱同期とランダム化は、加齢に伴い起こる。加齢に伴い細胞間相互作用が減少し位相の乱れが生じる。以上の通り、フロンドにおける概日リズムの時空間的動態が、主に局所的な細胞間相互作用に基づく枠組みを提案した。また、1細胞のリズムを観測した実験によって、このような空間的に脱同期した細胞リズムを持つフロンドでも、その概日リズムは細胞自律的に明暗周期に速やかに同調することが確かめられている (Muranaka & Oyama, 2016)。このことから位相の脱同期とランダム化が起こる段階においても個々の細胞において細胞時計のリズムと位相応答能力は個々の細胞で維持されていると示唆された。

ウキクサと異なり、シロイヌナズナを含むほとんどの顕花植物は維管束組織を発達させている。この組織は時間情報を長距離伝達する機能があると考えられおり、葉における概日リズムの自発的な同期現象に支配的な役割を持つことが示唆されている (Fukuda *et al.*, 2007; Endo *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2020)。したがって、ウキクサ植物の概日リズムの動態は顕花植物を簡略化したモデルとみなすことができ、増殖中のウキクサで観察された概日リズムの局所的な同期は、ウキクサ以外の成長する植物の概日時計の動態でも起こっている可能性が高い。実際、シロイヌナズナの成長する根で

は、局所的な相互作用が伸長方向の概日リズムのパターン形成に重要な因子であることが示されている (Fukuda *et al.*, 2012; Greenwood *et al.*, 2019). これらのことより、個々の植物の概日リズムの動態は局所的な相互作用に基づいて、組織・器官の大きさや形などの構造的特徴によって規定されると考えられる。

本研究では、定常条件下における個々のフロンドの概日リズムの位相と周期が、その発生段階と同期状態に影響されることを示した。植物全体レベルでの概日リズムは、測定した植物の組織・器官の特徴だけではなく、その発生段階にも影響される可能性がある。ウキクサ植物の場合、新しいフロンドの概日リズムの位相は親の位相に比べて遅れている (図 6,8)。これは増殖中の植物全体でのリズムの振幅が減衰する要因である。概日リズムを持つ遺伝子のうち発生段階に特異的な遺伝子として、*chlorophyll a/b binding protein genes* (CAB genes) があり、若い成長するフロンドで高発現を示す傾向があり、少なくともその一部は概日発現リズムを示すことが報告されている (Hensel *et al.*, 1993; Piechulla, 1993)。新規に出現したフロンドの位相が遅れていることを考慮すると、増殖中の植物におけるこれらの遺伝子の概日リズムは植物を構成する個々のフロンドの概日リズムより長い周期であると想定される。さらに、植物ホルモンのような成長を調整する化合物による処理は、植物の増殖速度を変化させることによって、間接的に植物全体レベルでの概日リズム特性を変化させる要因となる可能性がある。実際、複数の植物ホルモンが植物の概日時計のパラメータに影響を与えることが報告されている (Hanano *et al.*, 2006)。今後、発生段階や組織特性を有する様々な概日リズムレポーターを調べることで増殖中の植物における概日リズムの特性が明らかになるものと期待される。

本研究で示したように、生物発光レポーターを発現するウキクサ植物は増殖中の植物における様々な組織階層 (1 細胞, 組織, 植物体) で 2 次元的な時空間イメージング

により容易に観測できる (Muranaka *et al.*, 2013; Muranaka & Oyama, 2016). また, 2次元的な画像の解析は, 特に近年深層学習手法の発達により容易になってきている. 実際, 本研究のウキクサのフロンド境界の抽出は一部教師ありの深層学習を用いている. 教師あり学習は, 教師データ (フロンド境界を抽出済みの画像) の数が増えると精度が向上していく. そのため, 実験回数や類似した実験が増え教師データが増えるにしたがって, より精度の高いフロンド境界の推定が可能となり, 手作業の時間が削減される. ウキクサ植物は実験的・理論的アプローチに用いる植物材料として今後も有効であると期待される.

謝辞

本研究は京都大学大学院理学研究科・生物科学専攻・植物学教室・形態統御学分科の小山時隆准教授の指導のもとで行われました。小山准教授には、研究の進め方や考え方など非常に多くのことをご教授いただきました。また、データや解析に対して常にポジティブなアドバイスを頂けたこと、粘り強いサポートを頂けたことは大変支えになりました。深く感謝申し上げます。

伊藤照悟助教には、実験手法や進め方についてご指導いただきました。また本研究は伊藤さんの作成した形質転換体ウキクサが無ければ行えずまた多くの実験データも伊藤さんが取得したものを提供いただきました。実験の下手な私にとって実験指導、伊藤さんの取得したきれいなデータは研究を進めるうえで不可欠でした。深く感謝申し上げます。

本研究の解析は、村中智明博士によって構築された解析手法を元に行われています。学部で研究室に配属された時から実験手法や解析、解析の解釈など非常に有意義なアドバイスをいただきました。また、研究だけでなく、様々な悩みについてもご相談させていただき、非常に助けになっていました。深く感謝申し上げます。本研究においてウキクサのフロンド境界の修正作業は伊藤助教、アルバイトの栗生さん、形態統御学分科学生の北山さんにお手伝いいただきました。ありがとうございます。京都大学 MACS プログラムにおいて、理学研究科 物理学第一教室の市川正敏講師・幕田将宏博士にモデルシミュレーションをはじめとした物理学的側面の議論をして頂きました。ありがとうございます。

形態統御学分科のメンバーの皆様には大変お世話になりました。6年間にわたりセミナーでの議論や研究室生活を楽しく送れたのは皆さんのおかげです。ありがとうございます。

本研究期間、たくさんの友人の支えなしには走りきることができませんでした。また、理学研究科旧社会交流室は日常的な楽しみであり、研究室外との繋がりを保つことができました。深く感謝申し上げます。

最後に、いつも暖かく見守り支えてくださっている家族に心より感謝します。ありがとうございました。

引用文献

- Bordyugov G, Westermark PO, Korenčič A, Bernard S, Herzel H. 2013.** Mathematical modeling in chronobiology. *Circadian clocks* 335–357.
- Chen WW, Takahashi N, Hirata Y, Ronald J, Porco S, Davis SJ, Nusinow DA, Kay SA, Mas P. 2020.** A mobile ELF4 delivers circadian temperature information from shoots to roots. *Nature Plants* 6: 416–426.
- Daan S, Pittendrigh CS. 1976.** A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of comparative physiology* 106: 267–290.
- Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kévei E, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AAR. 2005.** Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* 309: 630–633.
- Endo M, Shimizu H, Nohales MA, Araki T, Kay SA. 2014.** Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature* 515: 419–422.
- Evangelidis G, Psarakis E. 2008.** Parametric image alignment using enhanced correlation coefficient maximization. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 30: 1858.
- Fukuda H, Nakamichi N, Hisatsune M, Murase H, 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, Oyama T. 2012.** Self-arrangement of cellular circadian rhythms through phase-resetting in plant roots. *Physical Review E* 86: 041917.
- Gould PD, Domijan M, Greenwood M, Tokuda IT, Rees H, Kozma-Bognar L,**

- Hall AJ, Locke JC. 2018.** Coordination of robust single cell rhythms in the *Arabidopsis* circadian clock via spatial waves of gene expression. *eLife* **7**: e31700.
- Greenham K, McClung CR. 2015.** Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nature Reviews Genetics* **16**: 598–610.
- Greenwood M, Domijan M, Gould PD, Hall AJW, Locke JCW. 2019.** Coordinated circadian timing through the integration of local inputs in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Biology* **17**: e3000407.
- Hanano S, Domagalska MA, Nagy F, Davis SJ. 2006.** Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes to Cells* **11**: 1381–1392.
- Haydon MJ, Hearn TJ, Bell LJ, Hannah MA, Webb AAR. 2013.** Metabolic regulation of circadian clocks. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **24**: 414–421.
- Hensell LL, Grbić V, Baumgarten DA, Bleecker AB. 1993.** Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **5**: 553–564.
- Herzog ED, Hermanstyn T, Smyllie NJ, Hastings MH. 2017.** Regulating the suprachiasmatic nucleus (scn) circadian clockwork: interplay between cell-autonomous and circuit-level mechanisms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **9**(1): a027706.
- Hillman WS. 1970.** Carbon dioxide output as an index of circadian timing in *Lemna* photoperiodism. *Plant Physiology* **45**: 273–279.
- Isoda M, Oyama T. 2018.** Use of a duckweed species, *Wolffiella hyalina*, for

- whole-plant observation of physiological behavior at the single-cell level. *Plant Biotechnology* **35**: 387–391.
- Isola P, Zhu JY, Zhou T, Efros AA. 2017.** Image-to-Image translation with conditional adversarial networks. *2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)* .
- Ito-Miwa K, Serikawa M, Kondo T, Oyama T. 2014.** Overexpression of a CO homologue disrupts the rhythmic expression of clock gene *LgLHYH1* in *Lemna gibba*. *Plant Biotechnology* **31**: 319–328.
- Johnson CH, Knight MR, Kondo T, Masson P, Sedbrook J, Haley A, Trewavas A. 1995.** Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science* **269**: 1863–1865.
- Jolma IW, Laerum OD, Lillo C, Ruoff P. 2010.** Circadian oscillators in eukaryotes. *WIREs Systems Biology and Medicine* **2**: 533–549.
- Kondo T, Tsudzuki T. 1978.** Rhythm in potassium uptake by a duckweed, *Lemna gibba* G3. *Plant and Cell Physiology* **19**: 1465–1473.
- Landolt E, 1986.** *The Family of Lemnaceae: A Monographic Study 1*. Biosystematic investigations in the family of duckweeds, Lemnaceae. Veröff. Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübel, Zürich.
- Martí Ruiz MC, Hubbard KE, Gardner MJ, Jung HJ, Aubry S, Hotta CT, Mohd-Noh NI, Robertson FC, Hearn TJ, Tsai YC et al. 2018.** Circadian oscillations of cytosolic free calcium regulate the *Arabidopsis* circadian clock. *Nature Plants* **4**: 690–698.
- McClung CR. 2019.** The plant circadian oscillator. *Biology* **8**: 14.

- Michael TP, Salomé PA, McClung CR. 2003.** Two *Arabidopsis* circadian oscillators can be distinguished by differential temperature sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100**: 6878–6883.
- Miwa K, Serikawa M, Suzuki S, Kondo T, 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.
- Miyata H, Yamamoto Y. 1969.** Rhythms in respiratory metabolism of *Lemna gibba* G3 under continuous illumination. *Plant and Cell Physiology* **10**: 875–889.
- Muranaka T, Oyama T. 2016.** Heterogeneity of cellular circadian clocks in intact plants and its correction under light-dark cycles. *Science Advances* **2**: e1600500.
- Muranaka T, Oyama T. 2018.** Monitoring circadian rhythms of individual cells in plants. *Journal of Plant Research* **131**: 15–21.
- Muranaka T, Kubota S, Oyama T. 2013.** A single-cell bioluminescence imaging system for monitoring cellular gene expression in a plant body. *Plant and Cell Physiology* **54**: 2085–2093.
- Muranaka T, Okada M, Yomo J, Kubota S, Oyama T. 2015.** Characterisation of circadian rhythms of various duckweeds. *Plant Biology* **17**: 66–74.
- Myung J, Schmal C, Hong S, Tsukizawa Y, Rose P, Zhang Y, Holtzman MJ, De Schutter E, Herzog H, Bordeyugov G et al. 2018.** The choroid plexus is an important circadian clock component. *Nature communications* **9**: 1062.
- Okada M, Muranaka T, Ito S, Oyama T. 2017.** Synchrony of plant cellular circadian clocks with heterogeneous properties under light/dark cycles. *Scientific*

Reports 7: 317.

Otsu N. 1979. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9(1): 62–66.

Piechulla B. 1993. 'Circadian clock' directs the expression of plant genes. *Plant Molecular Biology* 22: 533–542.

Serikawa M, Miwa K, Kondo T, Oyama T. 2008. Functional conservation of clock-related genes in flowering plants: overexpression and RNA interference analyses of the circadian rhythm in the monocotyledon *Lemna gibba*. *Plant Physiology* 146: 1952–1963.

Strogatz SH. 2000. From Kuramoto to Crawford: exploring the onset of synchronization in populations of coupled oscillators. *Physica D: Nonlinear Phenomena* 143: 1–20.

Takahashi N, Hirata Y, Aihara K, Mas P. 2015. A hierarchical multi-oscillator network orchestrates the *Arabidopsis* circadian system. *Cell* 163: 148–159.

Thain SC, Hall A, Millar AJ. 2000. Functional independence of circadian clocks that regulate plant gene expression. *Current Biology* 10: 951–956.

Watanabe E, Isoda M, Muranaka T, Ito S, Oyama T. 2021. Detection of uncoupled circadian rhythms in individual cells of *Lemna minor* using a dual-color bioluminescence monitoring system. *Plant and Cell Physiology* 62: 815–826.

Wenden B, Toner DLK, Hodge SK, Grima R, Millar AJ. 2012. Spontaneous spatiotemporal waves of gene expression from biological clocks in the leaf. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 109: 6757–6762.

Zielinski T, Moore AM, Troup E, Halliday KJ, Millar AJ. 2014. Strengths and

limitations of period estimation methods for circadian data. *PLOS ONE* 9:
e96462.

図・表

表 1: ピクセルレベルでの各フロンドの周期

フロンド名	解析期間 (h)	ピクセル数 (RAE < 0.3)	平均周期 ± SD (h)	相関係数 (周期 vs. 中心からの距離)
LDLL1_1	0 - 213	4155	25.0 ± 0.57	0.11
LDLL1_1-1	10 - 213	4317	24.5 ± 0.68	0.61
LDLL1_1-2	71 - 213	3237	25.4 ± 0.67	0.38
LDLL1_1-1-1	48 - 186	3941	24.8 ± 0.56	0.31
LDLL1_1-1-2	98 - 213	2945	25.3 ± 0.84	0.64
LDLL1_1-1-1-1	132 - 213	3288	23.3 ± 0.93	0.42
LDLL1_1-3	130 - 213	2953	24.0 ± 1.16	0.55
LDLL2_1	0 - 175	3021	24.9 ± 0.42	0.58
LDLL2_1-1*	(0 - 86)	N/A	N/A	N/A
LDLL2_1-2-1	63 - 175	1879	25.1 ± 0.51	0.82
LDLL2_1-2	0 - 175	1979	24.2 ± 0.22	0.02
LDLL2_1-1-1	0 - 142	1444	24.9 ± 0.26	0.60
LDLL2_1-1-2	81 - 175	2242	23.9 ± 0.32	0.70
LDLL2_1-3	90 - 175	1852	24.9 ± 0.57	0.83
LDLL2_1-1-1-1	84 - 175	2385	24.1 ± 0.21	0.01
LLLL1_1	0 - 199	1982	25.4 ± 0.90	-0.10
LLLL1_1-1	0 - 175	3595	24.4 ± 0.66	0.41
LLLL1_1-2-1	35 - 172	2677	26.1 ± 0.97	-0.03
LLLL1_1-2	67 - 172	3477	24.7 ± 1.27	0.27
LLLL1_1-1-1	92 - 199	3008	23.9 ± 1.50	0.06
LLLL1_1-1-2	95 - 199	3581	25.6 ± 0.80	0.11
LLLL1_1-3	94 - 199	3514	24.7 ± 1.08	-0.27
LLLL2_1	0 - 183	322	25.1 ± 1.68	0.38
LLLL2_1-1	0 - 183	2420	24.1 ± 0.58	0.12
LLLL2_1-2	46 - 133	2794	23.5 ± 0.68	0.27
LLLL2_1-1-1	50 - 127	1564	24.7 ± 1.81	0.19
LLLL2_1-1-2	90 - 183	1526	25.0 ± 1.26	0.12
LLLL2_1-2-1	100 - 149	N/A	N/A	N/A
LLLL2_1-3	97 - 183	1718	24.8 ± 1.48	-0.02
LLLL2_1-1-1-1	106 - 180	2507	26.0 ± 1.29	-0.04

*LDLL2_1-1 は周期算出に必要な観測期間に満たなかった。

N/A: Not applicable.

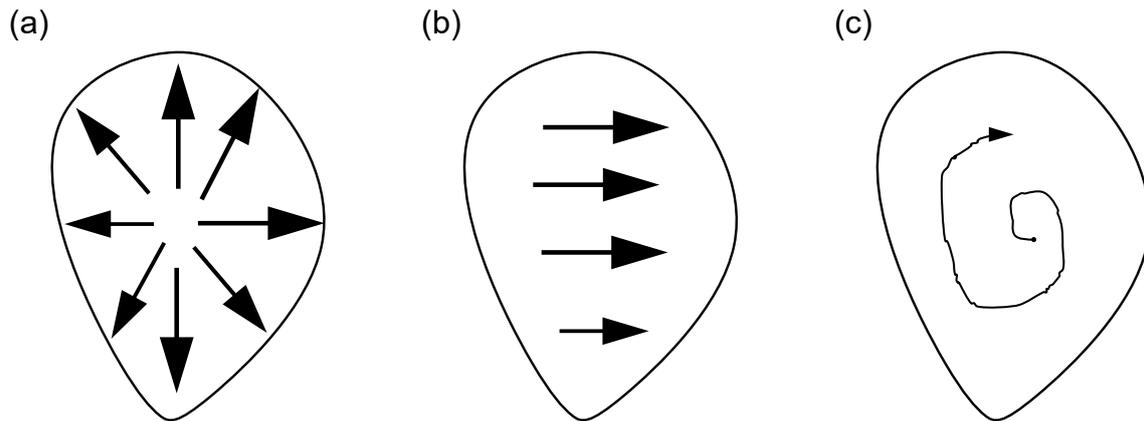


図 1: 位相の移動波のパターンの模式図

矢印の基部から先端にかけて位相が遅れていく。(a) 遠心性 (b) 一方性 (c) スパイラル

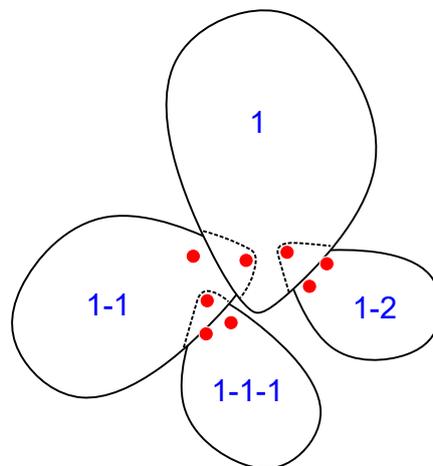


図 2: フロンドの模式図

コウキクサのフロンドは2つのポケットを持ち、このポケットの奥に分裂組織がある。点線はポケットを示す。赤点は分裂組織の存在位置を示す。青字は本研究で用いるフロンド名を示し。末尾の数字は親フロンドから何番目に出現したフロンドかを示す。

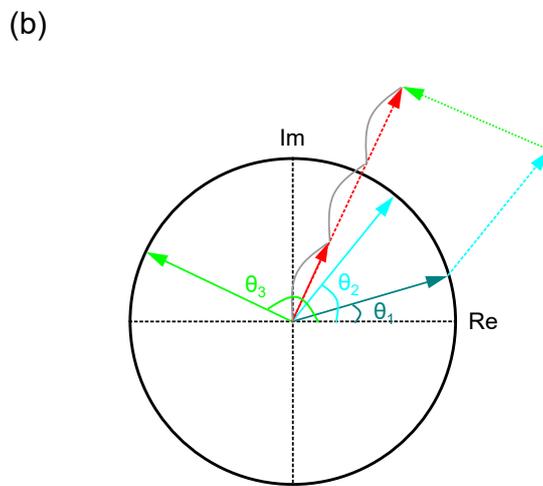
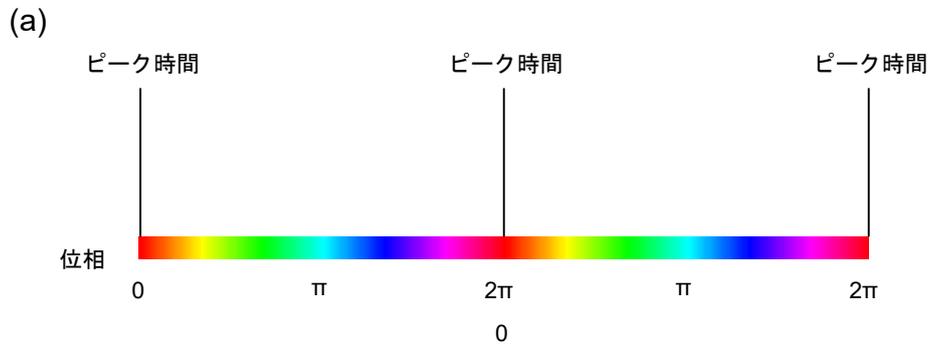


図 3: 位相と同期率の模式図

(a) 位相の決定方法の模式図. ピーク時間の位相を 0, 次のピーク時間の位相を 2π とし、間の位相を均等に割り振っている. (b) 同期率の模式図. 位相 $\theta_1, \theta_2, \theta_3$ の 3 つの振動子の同期率を示す. 単位円上にそれぞれの位相角 $\theta_1, \theta_2, \theta_3$ をもつ単位ベクトル (実線) を置く. この時、単位ベクトルの和 (点線) を振動子の数で割ったベクトル (赤実線) の大きさが同期率である.

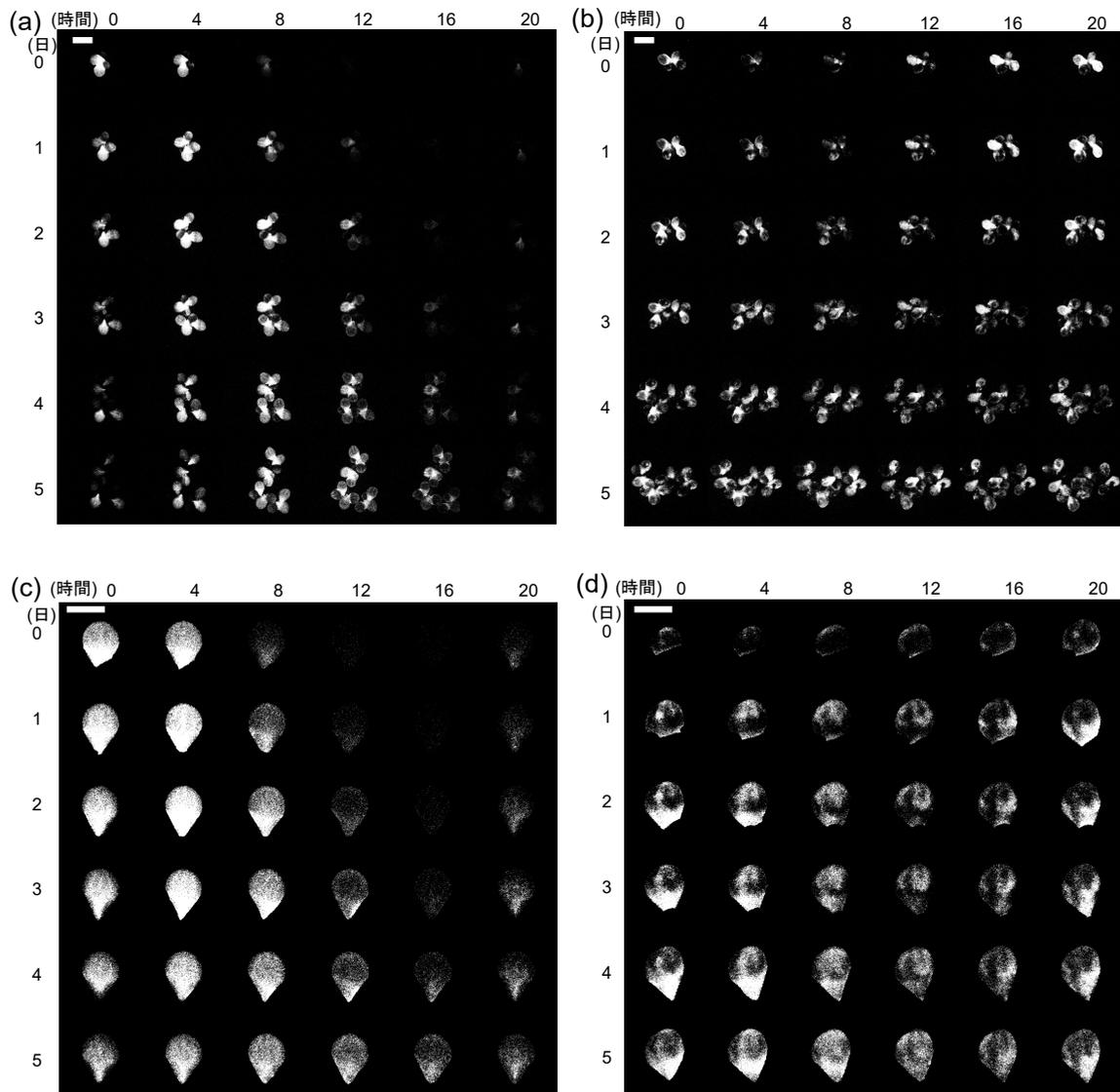


図 4: *AtCCA1:LUC* 形質転換体の時系列生物発光画像

4時間ごと6日間のスナップショット。恒明条件下で増殖する植物の生物発光画像 [(a) LDLL1, (b) LLLL1]. 特定のフロンドの生物発光画像 [(c) LDLL1 1-1, (d) LLLL1 1-1-1]. スケールバー: (a) と (b) では 5 mm, (c) と (d) では 3 mm.

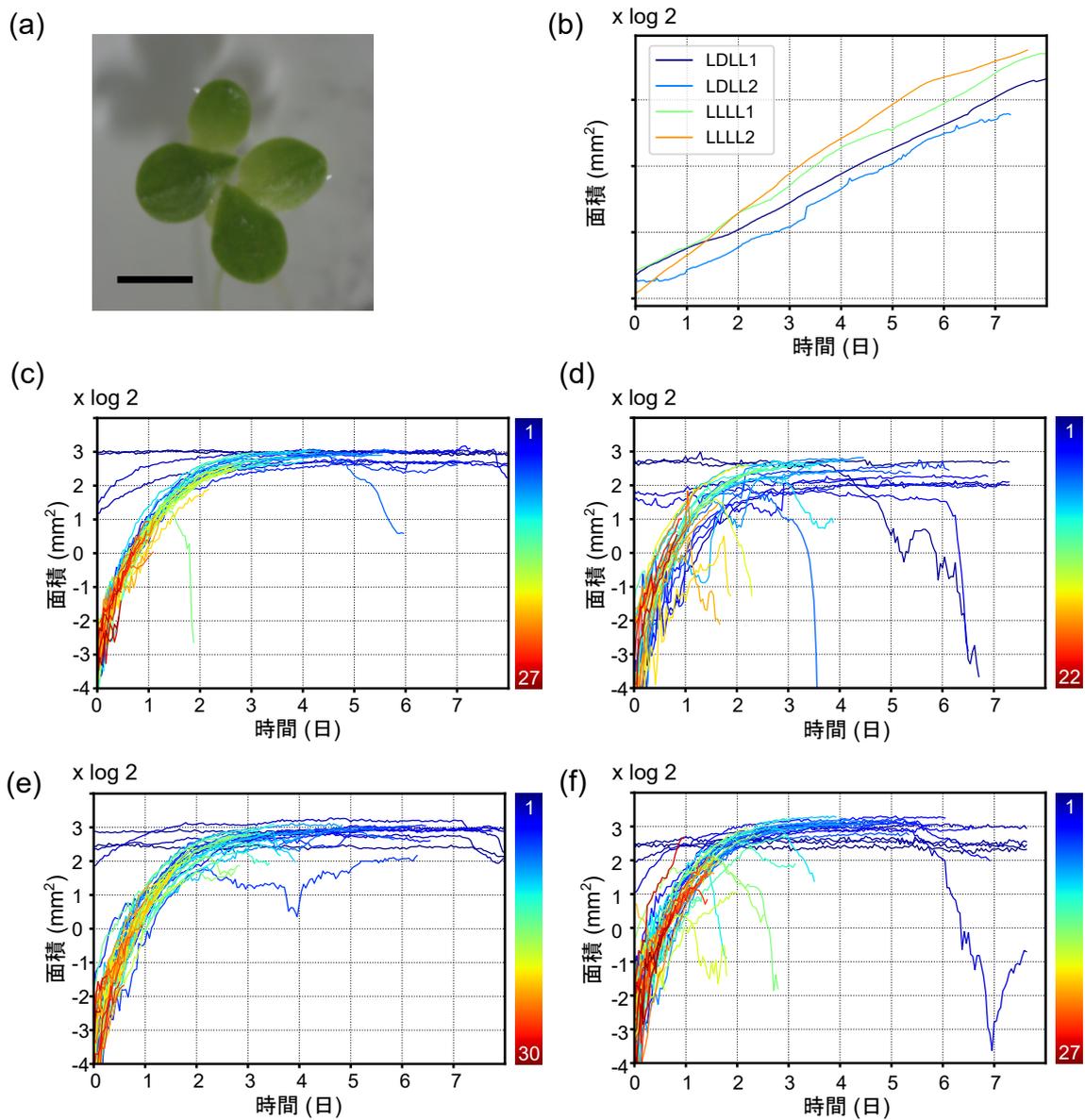


図5: 生物発光測定期間中のウキクサ植物の成長

(a) *AtCCA1::LUC#1* 形質転換体ウキクサのコロニーを上から見た図. スケールバー: 3 mm. (b) 表面積で表したウキクサの成長曲線. (c-f) LDLL1 (c), LDLL2 (d), LLLL1 (e), LLLL2 (f) における各フロンドの成長曲線. 色はフロンドの出現順に従って設定した. 一部のフロンドはカメラの視界から外れ, プロット上では成長曲線が減少した.

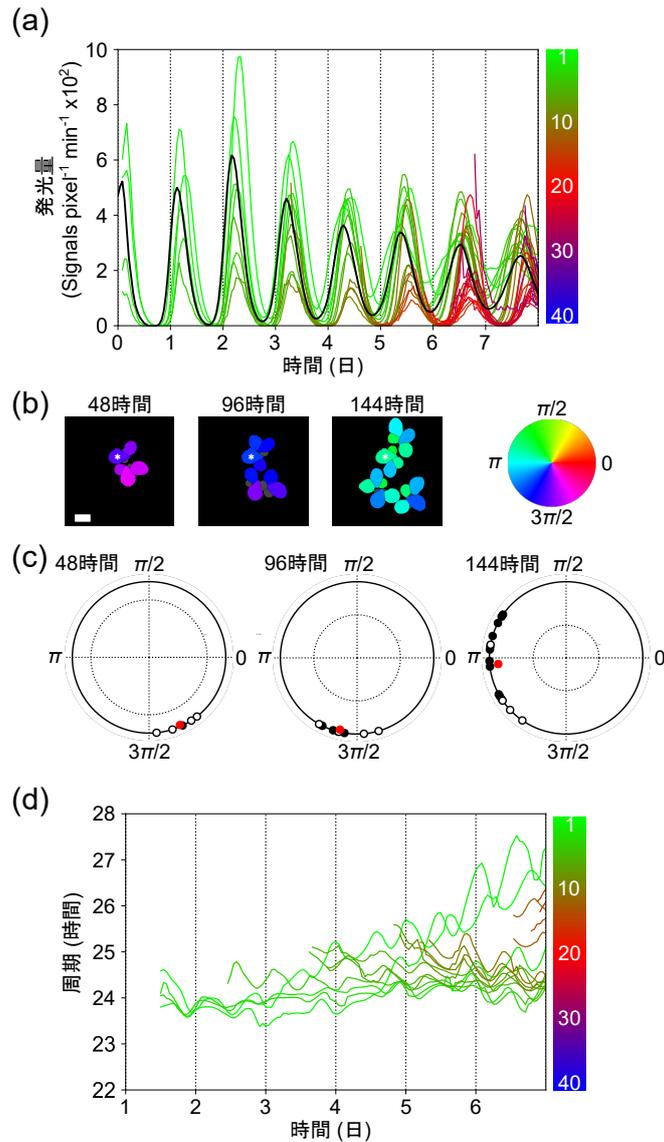


図 6: LDLL1 ウキクサの各フロンドの発光リズムと位相・周期特性

(a) 恒明条件下における各フロンドの生物発光のリズム。色彩はフロンドの出現順序に従って設定した。黒線は全フロンドの平均値。時間 0 は恒明条件に移動した時間。(b) 48, 96, 144 時間後のフロンドの位相の比較。灰色は位相が定義できなかったフロンド。アスタリスクは最も古いフロンド。スケールバー: 3 mm。(c) 48, 96, 144 時間後のフロンドの位相を単位円周上にプロットしたもの。各単位円上の白抜き点は観測開始時に存在したコロニーの 4 フロンド、黒点は新しく出現したフロンドの位相。赤い点は単位円上の各プロットのベクトル平均。ベクトルの長さや角度は、同期率と代表的な位相。点線円は有意水準 95%。有意水準はランダムサンプリング (10000 回) に基づき算出した。(d) 周期の推移。時間 t における周期は、 t を中心とした 72 時間分のデータから FFT-NLLS 法で算出した、。

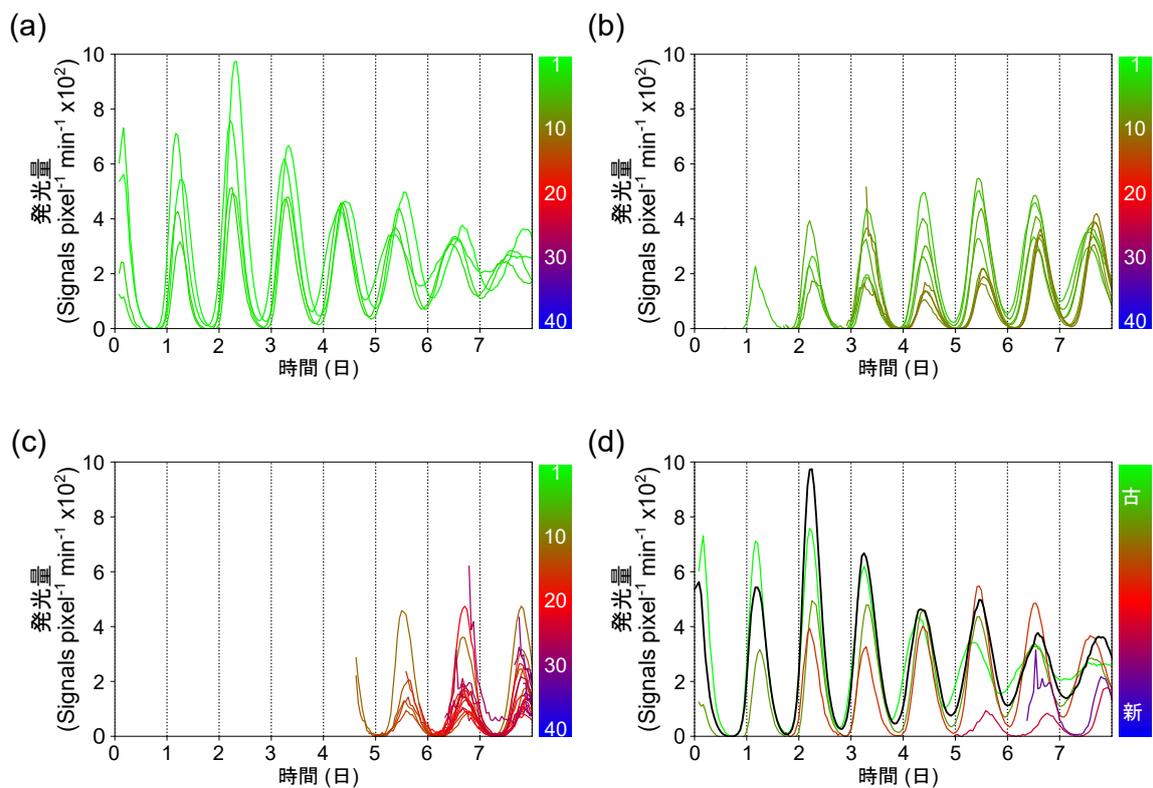


図7: LDLL1 ウキクサの各フロンドの出現時間別の生物発光リズム。図 6a にプロットした発光リズムを、(a) 初期コロニーのフロンド、(b) 最初の 4 日間に出現したフロンド、(c) 4 日目以降に出現したフロンド、の 3 つに分けた。(d) 親フロンドとその子フロンドの発光リズム。黒線と色線は、それぞれ親フロンド LDLL1_1 とその子フロンドのリズム (1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5) を示す。(a-c) の色は図 6a のものと同じ。(d) の色はフロンドの出現順に設定した。

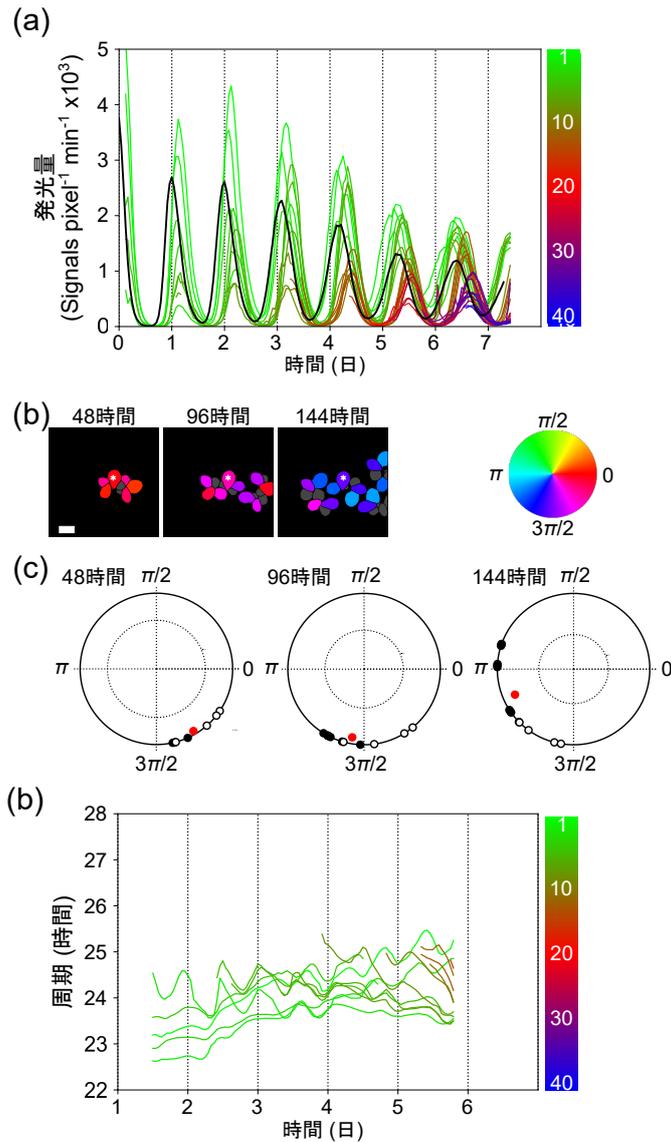


図 8: LDLL2 ウキクサの各フロンドの発光リズムと位相・周期特性

(a) 恒明条件下における各フロンドの生物発光のリズム。色はフロンドの出現順序に従って設定した。黒線は全フロンドの平均値。時間 0 は恒明条件に移動した時間。(b) 48, 96, 144 時間後のフロンドの位相の比較。灰色は位相が計算できなかったフロンド。白のアスタリスクは最も古いフロンド。スケールバー: 3 mm。(c) 48, 96, 144 時間後ににおけるフロンドの位相を単位円周上にプロットしたもの。各单位円上の白抜き点は観測開始時に存在したコロニーの 4 フロンド, 黒点は新しく出現したフロンドの位相。赤い点は単位円上の各プロットのベクトル平均。ベクトルの長さや角度は、同期率と代表的な位相。点線円は有意水準 95%。有意水準はランダムサンプリング (10000 回) に基づき算出した。(d) 周期の推移。時間 t における周期は、 t を中心とした 72 時間分のデータから FFT-NLLS 法で算出した、

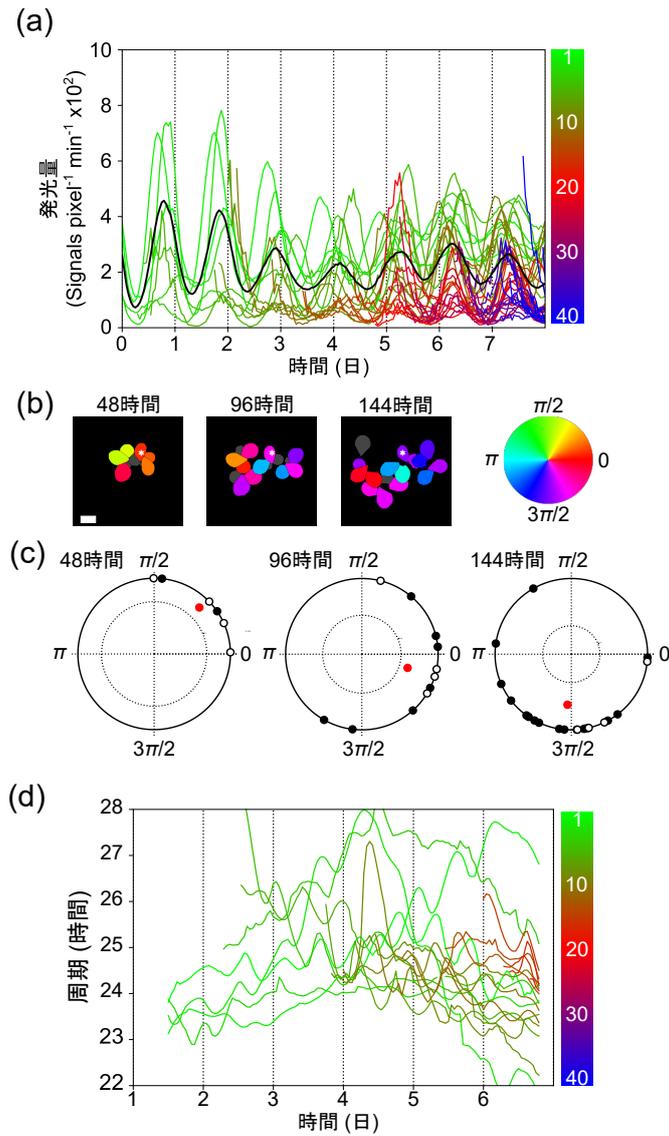


図9: LLLL1 ウキクサの各フロンドの発光リズムと位相・周期特性

(a) 恒明条件下における各フロンドの生物発光のリズム。色はフロンドの出現順序に従って設定した。黒線は全フロンドの平均値。時間0は計測開始時間。(b) 48, 96, 144時間後のフロンドの位相の比較。灰色は位相が計算できなかったフロンド。白のアスタリスクは最も古いフロンド。スケールバー: 3 mm。(c) 48, 96, 144時間後におけるフロンドの位相を単位円周上にプロットした。各単位円上の白抜き点は観測開始時に存在したコロニーの4フロンド、黒点は新しく出現したフロンドの位相。赤い点は単位円上の各プロットのベクトル平均。ベクトルの長さや角度は、同期率と代表的な位相。点線円は有意水準95%。有意水準はランダムサンプリング(10000回)に基づき算出した。(d) 周期の推移。時間 t における周期は、 t を中心とした72時間分のデータからFFT-NLLS法で算出した。

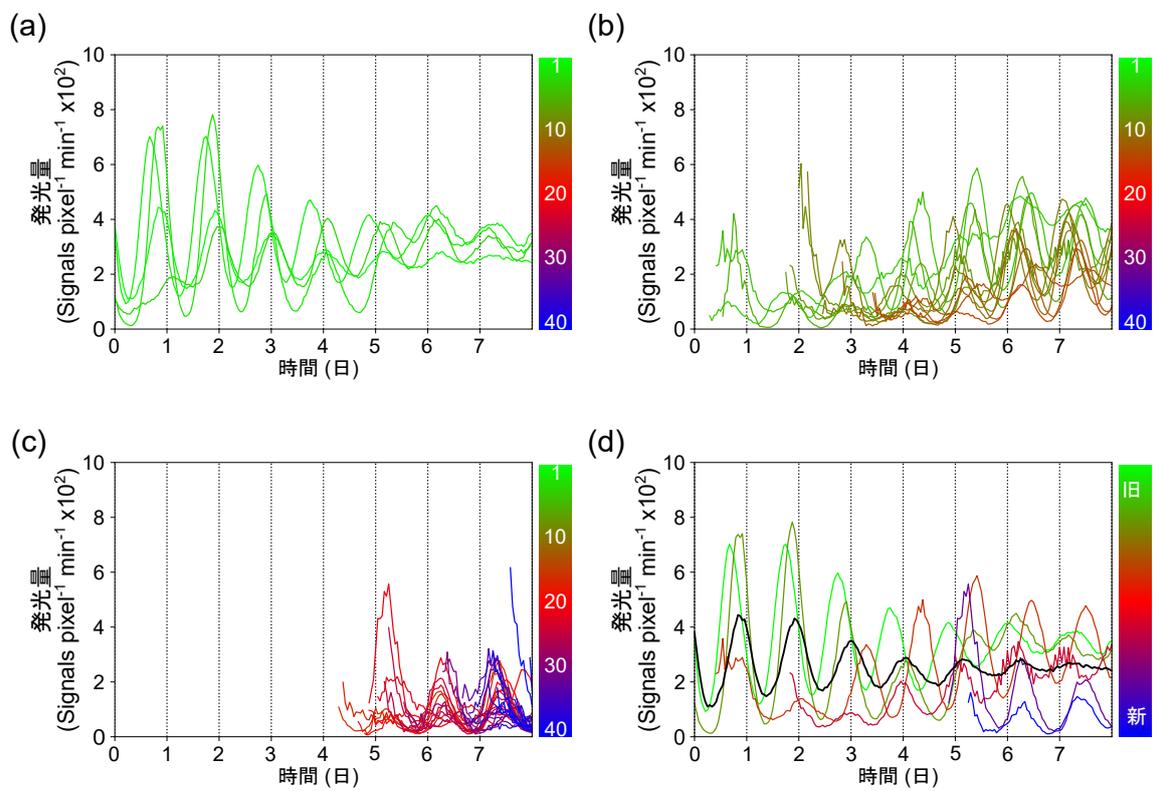


図 10: LLLL1 ウキクサの各フロンドの出現時間別の生物発光リズム. 図 9a にプロットした発光リズムを, (a) 初期コロニーのフロンド, (b) 最初の 4 日間に出現したフロンド, (c) 4 日目以降に出現したフロンド, の 3 つに分けた. (d) 親フロンドとその子フロンドの発光リズム. 黒線と色線は, それぞれ親フロンド LLLL1_1 とその子フロンドのリズム (1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5) を表している. (a-c) の色は図 9a のものと同じ. (d) の色はフロンドの出現順に設定した.

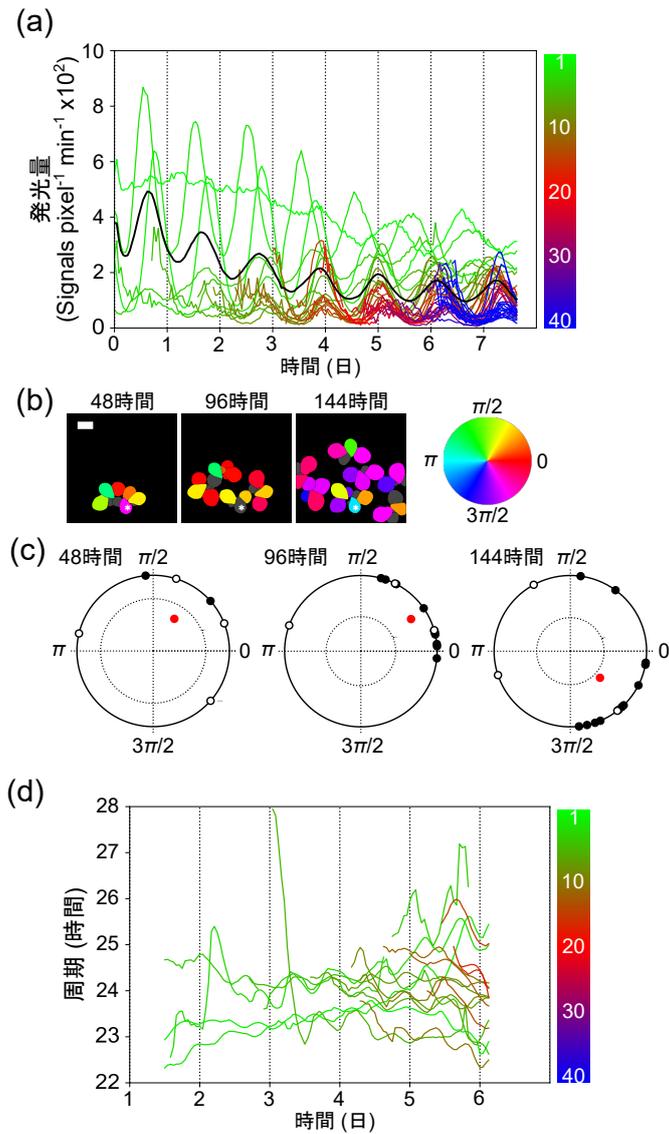


図 11: LLLL2 ウキクサの各フロンドの発光リズムと位相・周期特性

(a) 恒明条件下における個々のフロンドの生物発光のリズム。色はフロンドの出現順序に従って設定した。黒線は全フロンドの平均値。時間 0 は計測開始時間。(b) 48, 96, 144 時間後のフロンドの位相の比較。灰色は位相が計算できなかったフロンド。白のアスタリスクは最も古いフロンド。スケールバー: 3 mm。(c) 48, 96, 144 時間後におけるフロンドの位相を単位円周上にプロットした。各単位円上の白抜き点は観測開始時に存在したコロニーの 4 フロンド、黒点は新しく出現したフロンドの位相。赤い点は単位円上の各プロットのベクトル平均。ベクトルの長さや角度は、同期率と代表的な位相。点線円は有意水準 95%。有意水準はランダムサンプリング (10000 回) に基づき算出した。

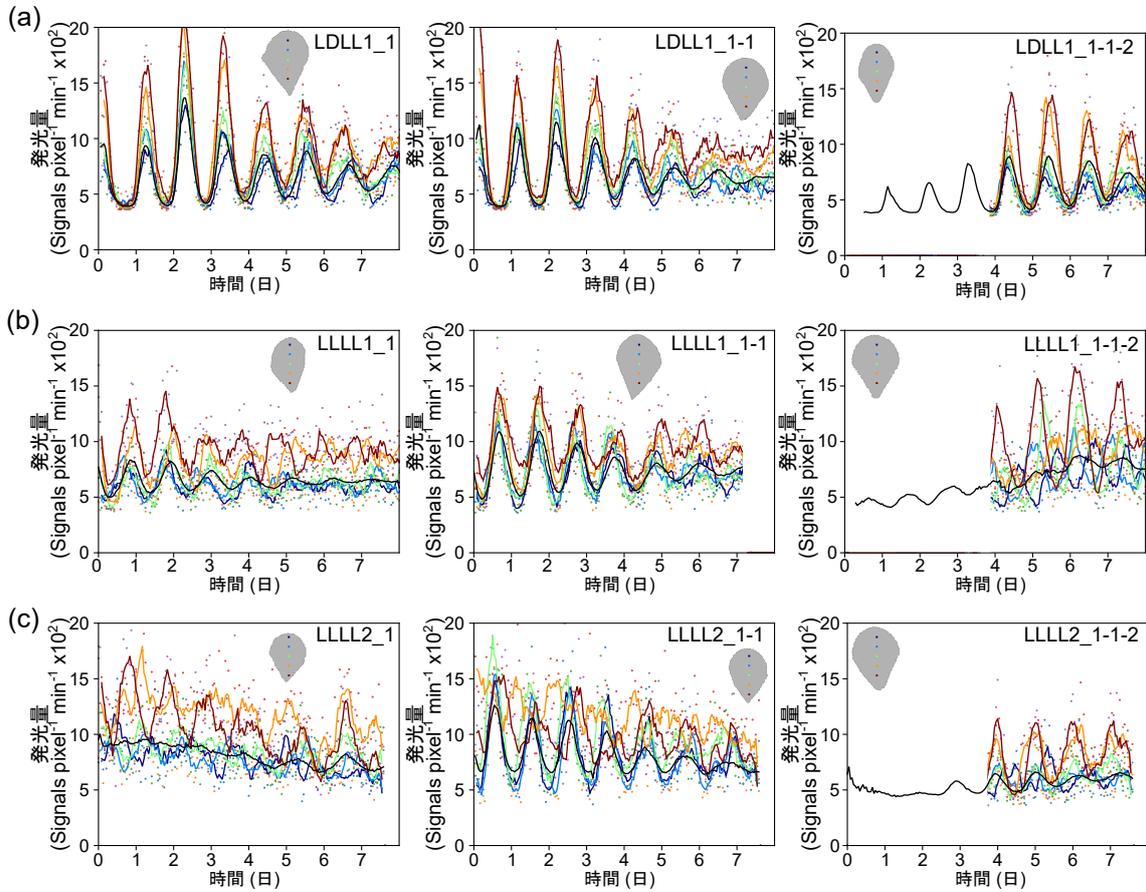


図 12: 各ピクセルの生物発光リズム

フロンドの長軸方向に 5 ピクセルを選び、バックグラウンドを含む発光量を、異なる 3 つのフロンドについてプロットした。実験条件は (a) LDLL1, (b) LLLL1, (c) LLLL2 である。各グラフ内に、5 つのピクセルを示すフロンドを配置した。これらは重心を含み 15 ピクセルごとにプロットした。線は各プロットの 3 時間移動平均を表している。赤から青へのグラデーションは図示した通り、基部（フロンドポケット側）から先端へのピクセルの位置を表している。黒線は全ピクセルの平均値を表している。

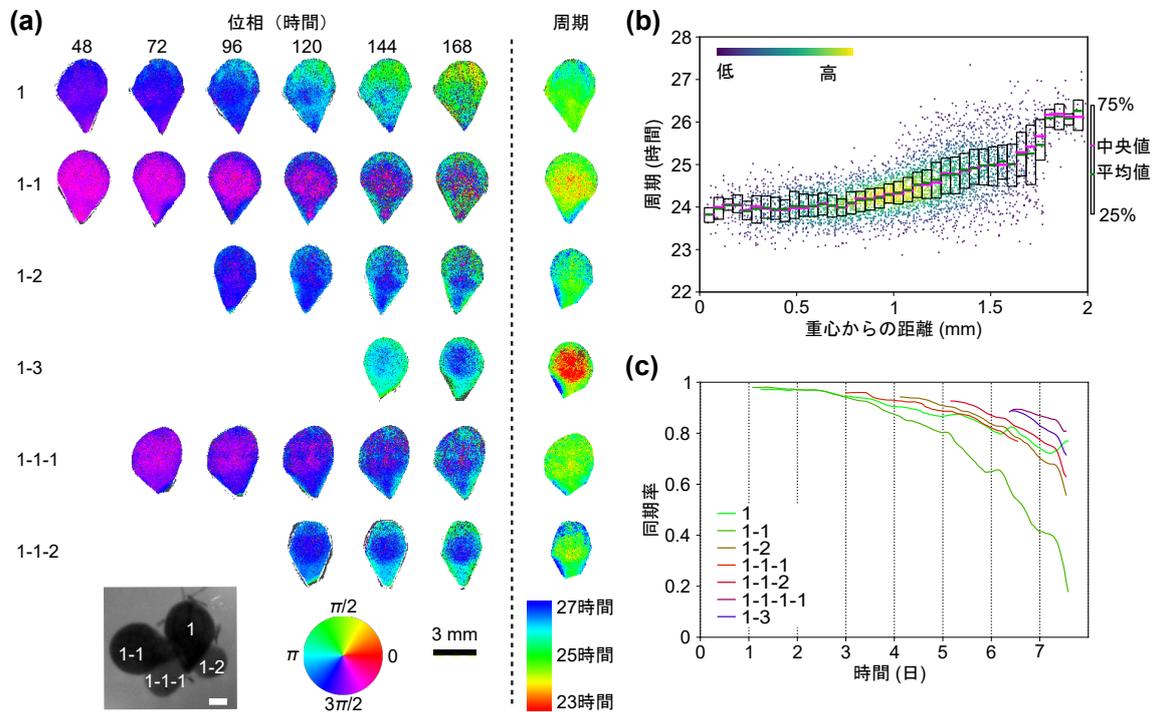


図 13: LDLL1 ウキササのフロンドにおける生物発光リズムのピクセルレベルでの特性

(a) 位相マップと周期マップ. それぞれの時間について, フロンドの各ピクセルにおける概日リズムの位相と周期を示した. 左側にはフロンドの名称を示している. スケールバー (黒): 3 mm. また, 測定開始時の明視野画像を付した. スケールバー (白): 1 mm. 周期は, 観測開始後 24 時間目またはフロンドが成熟した時間から計 72 時間分の時系列データを用いて計算した. 灰色のピクセルは, 位相または周期が定義されていないピクセル. (b) 周期とフロンド重心からの距離の関係 (フロンド 1-1). 各ピクセルについて, 周期とフロンド重心からピクセルまでの距離をドットでプロットしている. プロットは密度によって色分けした. ボックスプロットは重心からの距離 0.05 mm ごとに周期について行った. (c) 各フロンドの同期率の時間的变化.

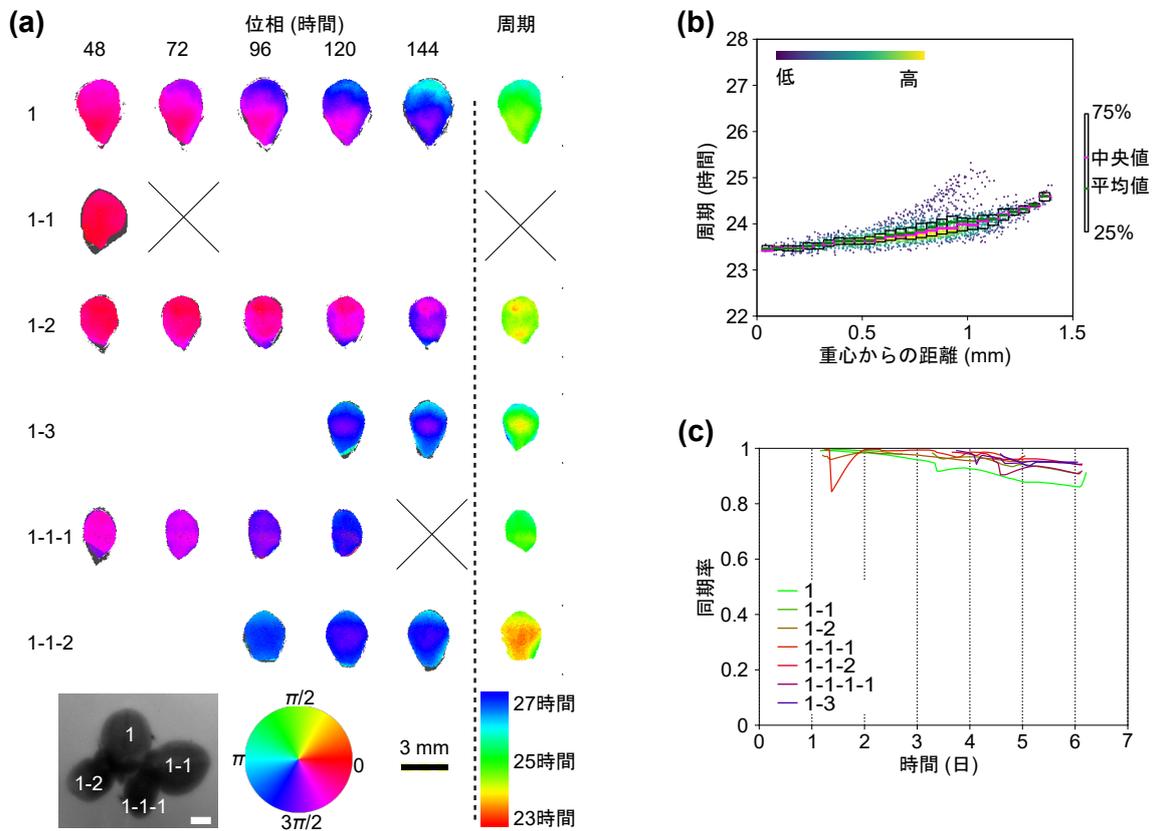


図 14: LDLL2 のフロンドにおける生物発光リズムのピクセルレベルでの特性

(a) 位相マップと周期マップ. それぞれの時間について, フロンドの各ピクセルにおける概日リズムの位相と周期を示した. 左側にはフロンドの名称を示している. スケールバー (黒): 3 mm. また, 測定開始時の明視野画像を付した. スケールバー (白): 1 mm. 周期は, 観測開始後 24 時間目またはフロンドが成熟した時間から計 72 時間分の時系列データを用いて計算した. 灰色のピクセルは, 位相または周期が定義されていないピクセル. バツ印は, フロンドがカメラの視野から外れたためにデータが欠落したことを示す.

(b) 周期とフロンド重心からの距離の関係 (フロンド 1-1-2). 各ピクセルについて, 周期とフロンド重心からピクセルまでの距離をドットでプロットしている. プロットは密度によって色分けした. ボックスプロットは重心からの距離 0.05 mm ごとに周期について行った.

(c) 各フロンドの同期率の時間的变化.

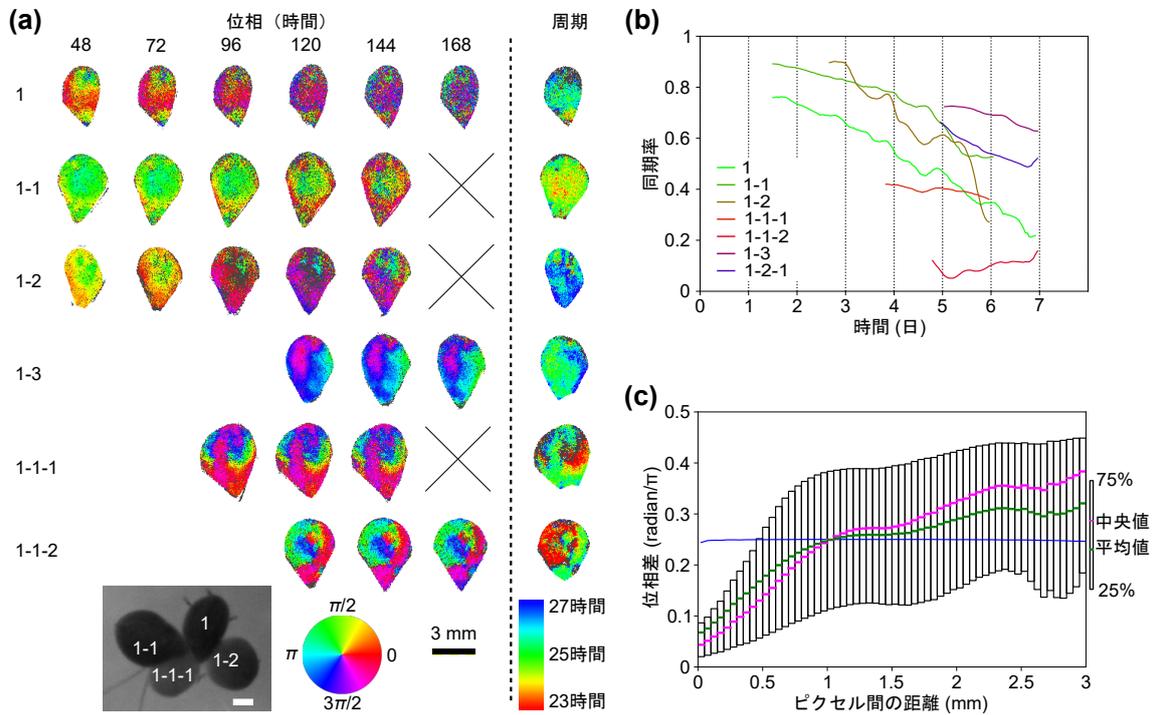


図 15: LLLL1 のフロンドにおける生物発光リズムのピクセルレベルでの特性

(a) 位相マップと周期マップ. それぞれの時間について, フロンドの各ピクセルにおける概日リズムの位相と周期を示した. 左側にはフロンドの名称を示している. スケールバー (黒): 3 mm. また, 測定開始時の明視野画像を付した. スケールバー (白): 1 mm. 周期は, 観測開始後 24 時間目またはフロンドが成熟した時間から 72 時間分の時系列データを用いて計算した. 灰色のピクセルは, 位相または周期が定義されていないピクセル. バツ印は, フロンドがカメラの視野から外れたためにデータが欠落したことを示す.

(b) 各フロンドの同期率の時間的変化. (c) ピクセル間の位相差とピクセル間距離の関係. 120 時間後のフロンド (1-1-2) の全ピクセル間のペアの位相差と, そのペアに対応するピクセル間距離をプロットした. ボックスプロットはピクセル間距離, 0.05mm 間隔ごとに行った. 青い線は各ピクセル間距離において中央値の 95% 信頼限界を示している.

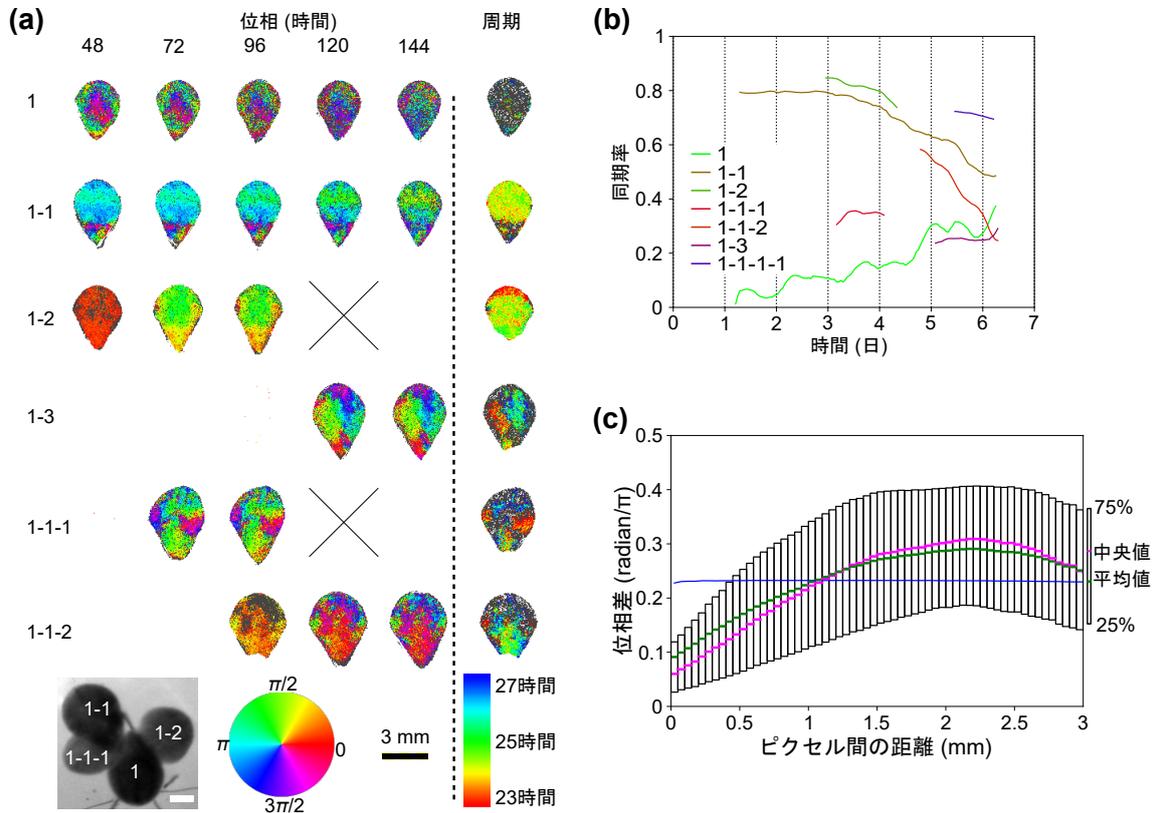


図 16: LLLL2 のフロンドにおける生物発光リズムのピクセルレベルでの特性

(a) 位相マップと周期マップ. それぞれの時間について, フロンドの各ピクセルにおける概日リズムの位相と周期を示した. 左側にはフロンドの名称を示している. スケールバー (黒): 3 mm. また, 測定開始時の明視野画像を付した. スケールバー (白): 1 mm. 周期は, 観測開始後 24 時間目またはフロンドが成熟した時間から計 72 時間分の時系列データを用いて計算した. 灰色のピクセルは, 位相または周期が定義されていないピクセル. バツ印は, フロンドがカメラの視野から外れたためにデータが欠落したことを示す.

(b) 各フロンドの同期率の時間的变化. (c) ピクセル間の位相差とピクセル間距離の関係. 120 時間後のフロンド (1-3) の全ピクセル間のペアの位相差と, そのペアに対応するピクセル間距離をプロットした. ボックスプロットはピクセル間距離, 0.05mm 間隔ごとに行った. 青い線は各ピクセル間距離において中央値の 95% 信頼限界を示している.

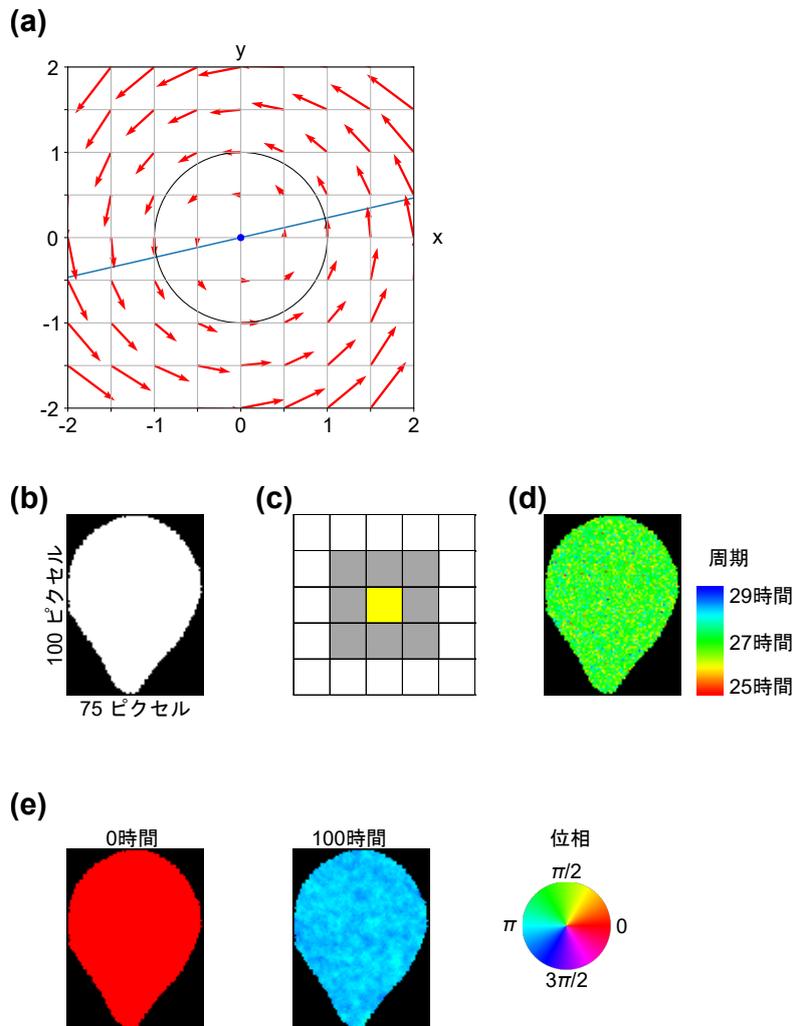


図 17: モデルシミュレーションの概要

(a) パラメータ $K = 0.01, \epsilon = -0.02, \lambda = 0.05, A = 1, \omega = 2\pi/27, x = r \cos \phi, y = r \sin \phi, r = \sqrt{x^2 + y^2}$ における微分方程式 (材料と方法の式 1 と式 2, twist モデル) の位相図. 青い線はねじれ (twist) のない振動子 ($\epsilon = 0$) の場合の $y = 0$ のときのベクトルの先端. ϵ が負の値で $r > 1$ のとき, $d\phi/dt$ が ϵ によって大きくなる. 例として, $(2, 0)$ のベクトルがわかりやすい. (b) モデルシミュレーションのために用いたフロント形状. (c) ムーア近傍の模式図. 中央のピクセル (黄色) は, その周囲の 8 つのピクセル (灰色) と相互作用する. (d) モデルシミュレーションに使用した各ピクセルの固有周期. 周期で色付けした. (e) ねじれの無い振動子 ($\epsilon = 0$) を用いたシミュレーション. $t = 0$ と $t = 100$ の位相マップを示す. 各ピクセルの初期位相は 0 である. 位相で色付けした.

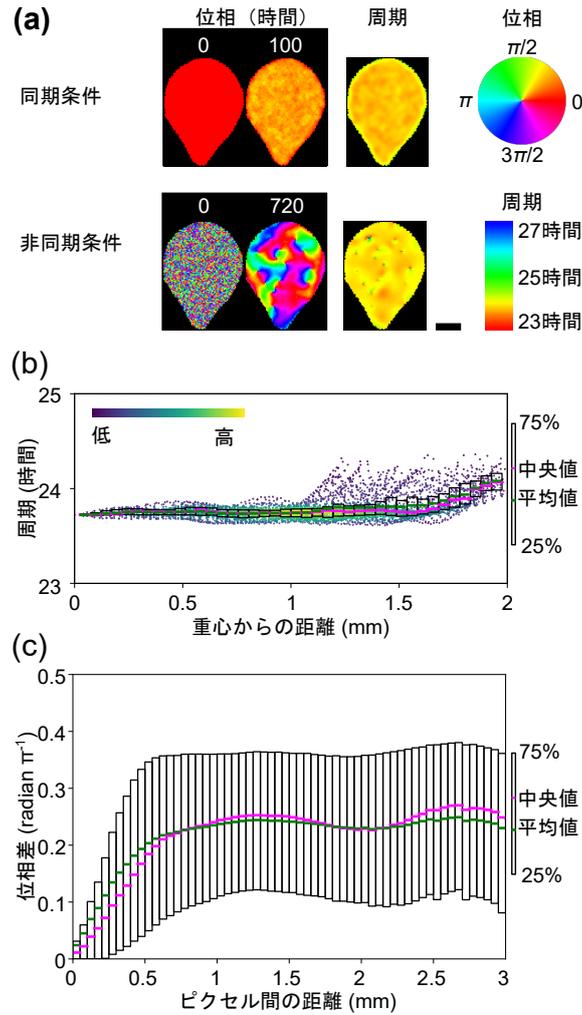


図 18: モデルシミュレーションでのフロントの位相と周期のパターン

実際のフロントの形状で twist モデル (材料と方法の式 1 と式 2) によるシミュレーションを行った. 4809 個のグリッドセル (細胞サイズを $40\ \mu\text{m}$ とおいて算出した) をシミュレーションに用いている. (a) フロントの位相・周期マップ. 初期位相を全て 0 に置いた同期振動子 (同期条件, LDLL を模す) と初期位相をランダムに設定した振動子 (非同期条件, LLLL を模す) を設定し, 同じパラメータでシミュレーションを行った. フロントの各ピクセルにおける指定時間の位相と周期を図示した. スケールバー: $1\ \text{mm}$. (b) 初期位相を全て 0 に置いた同期振動子 (同期条件) の 100 時間後における周期とフロントの重心からの距離の関係. 各ピクセルについて, 周期と重心からその位置までの距離をプロットした. プロットは密度にしたがって色付けした. ボックスプロットは重心中心からの距離, $0.05\ \text{mm}$ ごとに分割した. (c) ピクセル間の位相差とピクセル間距離の関係. 初期位相をランダムに設定した振動子 (非同期条件) の 720 時間後における全ピクセル間の位相差と, そのピクセル間の距離を算出し, ピクセル間距離の $0.05\ \text{mm}$ ごとにプロットした.

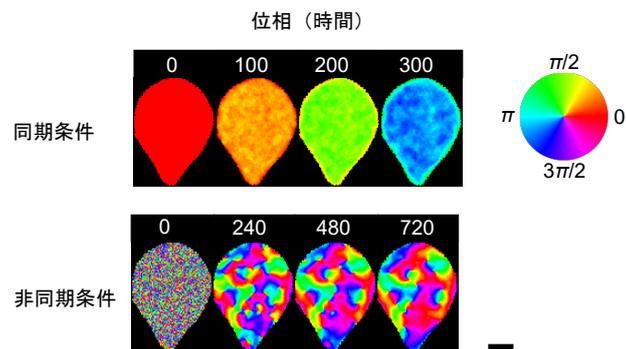


図 19: モデルシミュレーションによるフロンドの位相パターンの時間発展

図 18 のシミュレーションの時間発展. フロンドの各ピクセルにおける表示時間の位相を表示した. スケールバー: 1 mm.

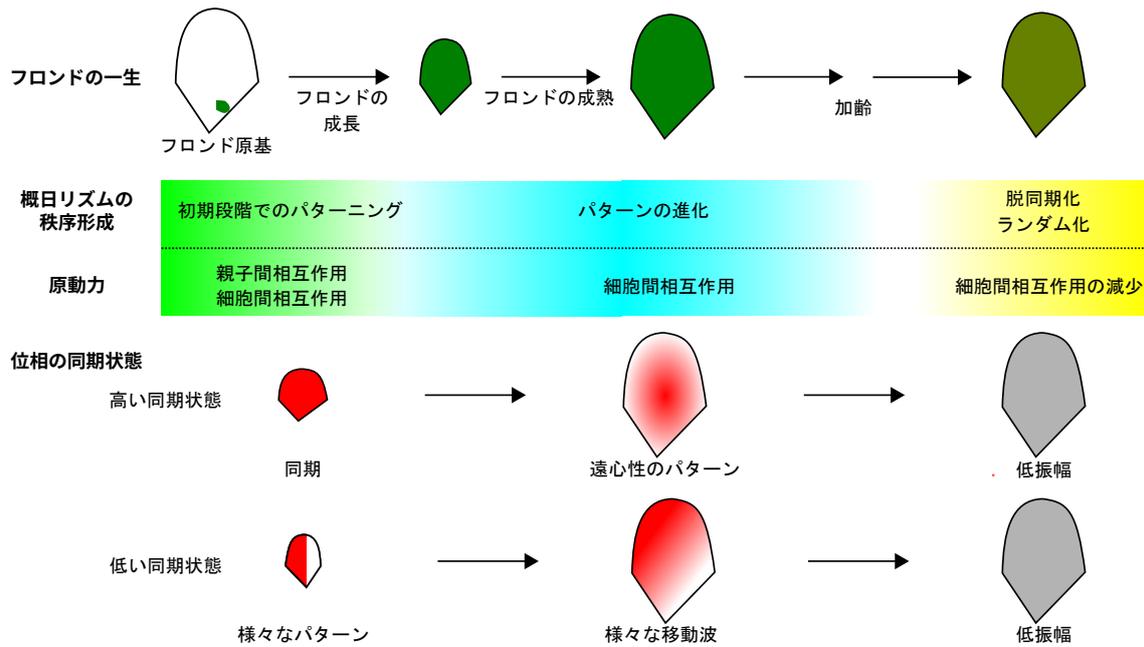


図 20: 増殖するウキクサのフロンドにおける自発的な位相パターン形成の仮説

上段に原基から古いフロンドまでのフロンドの一生を緑色で描いている。中央は空間的な概日リズムの状態の変化とその原動力をグラデーションで表した。下段には、異なる初期位相の状態を持つフロンドの位相の同期状態の変化を模式的に記した。フロンドの赤色は位相パターンを、灰色は概日リズムの低振幅を模式的に表している。