

地上部と根の概日時計間における
シグナル伝達とその機能

上本 恭平

目次

要旨	3
略号	5
序論	6
材料と方法.....	15
結果	29
考察	75
参考文献	80
謝辞	89

要旨

生物は 1 日単位で繰り返される周期的な外部環境の変動を予測し、それに対して適切な生理応答を引き起こすことで適応度を上げており、固着生活を営む植物では、より正確で安定した予測が求められている。そのための仕組みとして概日時計が知られており、植物を含めたほとんどの生物が何らかの形の概日時計を有していることが明らかとなっている。植物の概日時計は転写・翻訳を介したフィードバック制御によって形成されているが、遺伝子間のフィードバック制御だけでなく、オルガネラ間や組織間といったより大きなスケールでのフィードバックループの存在も報告されている。しかし、器官間のフィードバックループの存在は明らかになっていない。唯一、植物個体全体を用いた解析からシヨ糖が概日リズムの維持に関わっていることが示されており、このことから地上部から根への時間情報の伝達にシヨ糖シグナルが関与するのではないかと予想されているのみであった。

そこで本研究では、地上部と根の間で輸送される栄養素（シヨ糖とイオン）に着目することで、これらが相互に時間情報を伝達していることを明らかにし、植物の新たな概日リズムの制御様式を明らかにし、その意義についての洞察を得ることを目的とした。

まず、根のみを対象とした解析を行うことで、シヨ糖輸送が根の概日時計に与える影響を詳細に解析した。根に輸送されるシヨ糖量は概日時計による制御を受け、さらに、シヨ糖量に応じて *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 (PRR7)* を含む複数の時計遺伝子の発現量が変動することを明らかにし、地上部の概日時計によって制御されているシヨ糖の産生・輸送が、根の時計遺伝子の発現を制御することを明らかにした。

時計遺伝子のなかでも *PRR7* はとくに鋭敏にシヨ糖に応答したことから、つぎに、根の *PRR7* の機能を解析した。根の概日時計は陽イオンの吸収や輸送を制御することが知られており、また、これらの陽イオンの欠乏は概日リズムの周期や位相を制御することも知られていたことから、根の *PRR7* が栄養の取り込み・輸送を介して地上部に時間情報伝達している可能性を考えた。そこで、接木実験によりこの可能性を検証したところ、根の *PRR7* は地上部が示す概日リズム

ムの周期長の安定性、すなわち概日時計の精度に重要であることが示された。興味深いことに、同様の表現型は K^+ 欠乏条件によっても引き起こされていた。そこで、道管液中のイオン濃度を経時的に測定したところ、*prr7* 変異体や PRR7 の過剰発現体では、野生型で見られた道管液中の K^+ 濃度の時間変動が失われていた。こうしたことから、根の PRR7 が K^+ 輸送を制御することで、地上部における概日リズムの安定化に寄与している可能性が考えられた。

根から地上部への時間情報伝達の意義についての洞察を得るため、地上部と根で異なる特性を持つ概日時計が時間遅れをもって相互に結合する数理モデルを構築し、これを用いたシミュレーションから、こうした地上部と根の相互結合はノイズの影響を強く受ける地上部の概日リズムの安定化に寄与していることを示した。

地上部から根への時間情報伝達のみを遮断、あるいは、根から地上部への時間情報伝達のみを遮断することは技術的に困難であったことから、実際に地上部と根の間での相互作用が植物に存在することを直接は示せなかったものの、DCMU による光合成阻害が K^+ 輸送を阻害し、同時に地上部における概日リズムの安定性を低下させること、根の PRR7 はイオンの取り込みに間接的に関わっている *AHA1* が関与している可能性を示すデータが得られていることなどから、植物は糖および K^+ の輸送を介して地上部と根の間で時間情報を相互に伝達しており、そこで PRR7 が重要な働きをしていると考えられた。

こうした結果から、PRR7 と K^+ 輸送を介した根から地上部への新規の時間情報伝達メカニズムの一端を明らかにし、これが概日リズムの安定性に寄与していることを明らかにした。これらの結果は、概日リズムの安定化が器官レベルの大きなスケールで起こっていることを意味しており、概日時計の機能を明らかにしていくうえで、器官や組織の違いを考慮した解析が今後必要であることを意味している。

根から地上部へと輸送された K^+ の蓄積量は葉肉細胞の柵状組織と海綿状組織で異なっていることが示されていることから、 K^+ がどのように概日リズムの安定性を制御しているかを明らかにするためには、葉肉細胞を柵状組織と海綿状組織に分けて解析する必要がある。そこで、すでに報告されている方法に改良を加えた新たな方法を確立し、今後の解析の道筋をつけた。

略号

AHA1:	AUTOINHIBITED H ⁺ -ATPASE 1
APUM24:	ARABIDOPSIS PUMILIO PROTEIN24
bZIP63:	BASIC LEUCINE ZIPPER 63
BRX1-1:	BIOGENESIS OF RIBOSOMES IN XENOPUS1-1
CML24:	CALMODULIN-LIKE 24
CCA1:	CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1
CBF1/DREB1a:	COLD-INDUCIBLE C-REPEAT/DROUGHT-RESPONSIVEELEMENT-BINDING FACTOR
Col-0:	Columbia-0
CEP:	C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE
cps:	counts per second
DCMU:	3- (3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
DIN6:	DARK INDUCIBLE6
ELF:	EARLY FLOWERING
EC:	evening complex
FIL:	FILAMENTOUS FLOWER
GI:	GIGANTEA
IPP2:	ISOPENTENYL PYROPHOSPHATE DIMETHYLALLYL PYROPHOSPHATE ISOMERASE 2
LD:	12 時間明期 12 時間暗期条件
LL:	恒明条件
LHY:	LATE ELONGATED HYPOCOTYL
LUC:	LUCIFERASE
LUX:	LUX ARRHYTHMO
PRR:	PSEUDO-RESPONSE REGULATOR
PIF:	PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR
ROS:	reactive oxygen species
SCN:	suprachiasmatic nucleus
SEN5:	SENESCENCE - ASSOCIATED PROTEIN5
SnRK1:	SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 1
TOC1:	TIMING OF CAB EXPRESSION1
ZTL:	ZEITLUPE
1/2 MS:	1/2 Murashige and Skoog

序論

植物の概日時計と時計遺伝子

約 24 時間周期を持つ植物の概日時計は、光合成活性や花成時期、栄養素の吸収・輸送など様々な生理応答を制御することで、周期的に変動する外部環境を予測し、適切に応答することを可能にしている (Dodd et al., 2005; Haydon et al., 2015)。これまでに十数個の遺伝子が時計遺伝子として報告されており、その多くは転写因子をコードしている。これらの時計遺伝子はいずれも 1 日 1 回の発現ピークを持っており、それらの複雑な相互制御により複数の転写・翻訳フィードバックループを形成している (Creux and Harmer, 2019; Nakamichi, 2020; Sanchez et al., 2020)。こうしたマルチフィードバックループは概日リズムの安定性の向上に寄与していると考えられ、ノイズの大きい自然環境下で固着生活を営む植物が生き抜くために必須の仕組みであると考えられている (図 1)。

朝に発現ピークを示す *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*) と *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (*LHY*) は類似した機能を持つ Myb 型転写因子であり、ともに夕方に発現ピークを示す *TIMING OF CAB EXPRESSION 1* (*TOC1*) の転写を抑制する。一方で *TOC1* も *CCA1* や *LHY* の転写を抑制し、これら遺伝子はダブルネガティブフィードバックループを形成している。*CCA1/LHY* と *TOC1* によって形成されるフィードバックループはシロイヌナズナで最初期に発見されたループであると同時に機能的にも特に重要であることから、中心振動体と呼ばれることもある。*CCA1* と *LHY* は、*PSEUDO-RESPONSE REGULATOR* (*PRR*) ファミリーに属する *TOC1* 以外にも *PRR5*, *PRR7*, *PRR9* の発現抑制に関わっている。*PRR5*, *PRR7*, *PRR9* は *PRR* ファミリータンパク質の中でも特に機能的な冗長性が高く、花成など一部の表現型は多重変異体にしないと顕著な表現型を示さないことが報告されている。さらに、*CCA1* と *LHY* は日没から夜間にかけて発現ピークを持つ *EARLY FLOWERING 4* (*ELF4*)、*LUX ARRHYTHMO* (*LUX*)、*GIGANTEA* (*GI*) などの時計遺伝子も標的とすることが知られている。これらの時計遺伝子のうち、*ELF4* と *LUX* は *ELF3* とともに evening complex (EC) 複合体を形成し、*PRR7* や *PRR9*、*LUX* 自身の発現を抑制している。

概日時計の制御は転写以外にも、タンパク質レベルや翻訳後修飾レベルでの制御も報告されている。たとえば、TOC1 タンパク質の蓄積は他の時計遺伝子の発現量やタイミングを制御するため、周期長の制御に重要である。E3 ユビキチンリガーゼである ZEITLUPE (ZTL)は GI と相互作用することで TOC1 タンパク質の分解を促進する。また、ZTL-GI の相互作用は PRR5 タンパク質の分解も促進する。

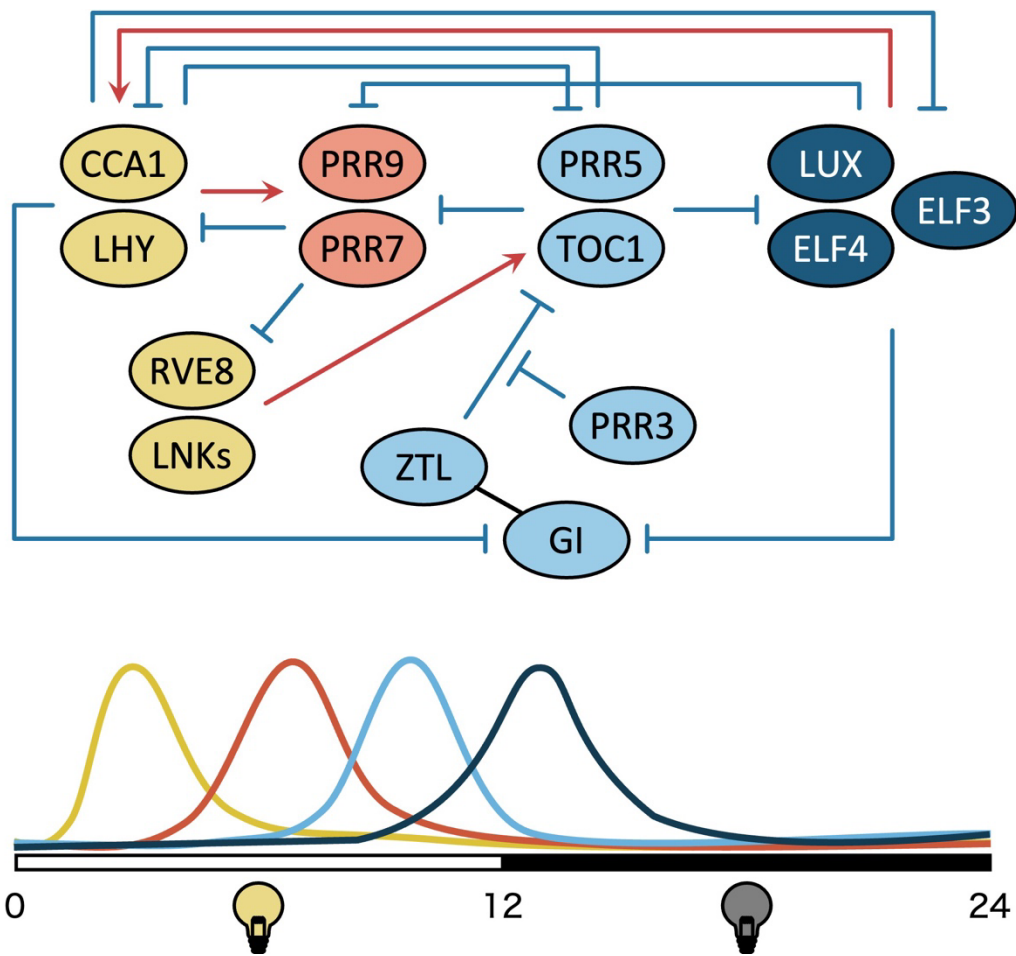


図 1 : シロイヌナズナの概日時計を構成する時計遺伝子、その制御関係、および大まかな発現時期

植物の概日時計は中心的な振動子を構成している CCA1、LHY、TOC1 にくわえて、PRR ファミリーに属する PRR5、PRR7、PRR9 や EC を構成する ELF3、ELF4、LUX を主要な構成因子とした、複雑なフィードバックループを形成することで約 24 時間の概日リズムを安定的に刻んでいる。図では、上部に時計遺伝子の代表的な制御関係を示し（赤：促進、青：抑制）、下部には時計遺伝子の発現ピークがどの時刻に相当するかを大まかに示した。

植物の概日時計の相互作用

正確な概日リズムを刻むためには、前述した高度に体系化された細胞内でのフィードバックループだけでなく、より高次のフィードバックループも重要であることが知られている。たとえば、シグマ因子である SIG5 は核と葉緑体を結び、概日リズムのオルガネラ間でのフィードバックループに関わっている (Noordally et al., 2013)。

さらに、植物が利用できる温度や光、栄養といった環境シグナルの可用性は組織や器官によって大きく異なっているため、概日リズムの特性は組織や器官ごとに大きく異なっている (Thain et al., 2002; James et al., 2008; Yakir et al., 2011; Takahashi et al., 2015; Bordage et al., 2016; Endo, 2016; Gould et al., 2018)。たとえば、葉全体と比べて、孔辺細胞はより長周期かつ低振幅の概日リズムを示す (Yakir et al., 2011)。根の中でも、根端部と根中央部の細胞は周期長が異なることが観察されている (Gould et al., 2018)。また組織レベルでは、葉と比べて根の概日リズムはより長周期かつ低振幅であることが報告されている (Takahashi et al., 2015; Gould et al., 2018)。

こうした細胞・組織・器官ごとに異なる特性を持つ概日時計が指し示す「時刻」を共有することは、複数の環境刺激からもたらされる時間情報を統合することにつながり、個体全体での概日リズムの安定性の向上に寄与すると考えられる。実際、葉や根では細胞間での時間情報伝達が報告されており (Wenden et al., 2012; Greenwood et al., 2019)、葉肉組織と維管束組織の間の時間情報伝達も報告されている (Endo et al., 2014)。さらにより高次の器官レベルにおいても、地上部 (茎頂) の概日時計が根の概日リズムを制御していることが報告されている (図 2; Takahashi et al., 2015; Chen et al., 2020)。

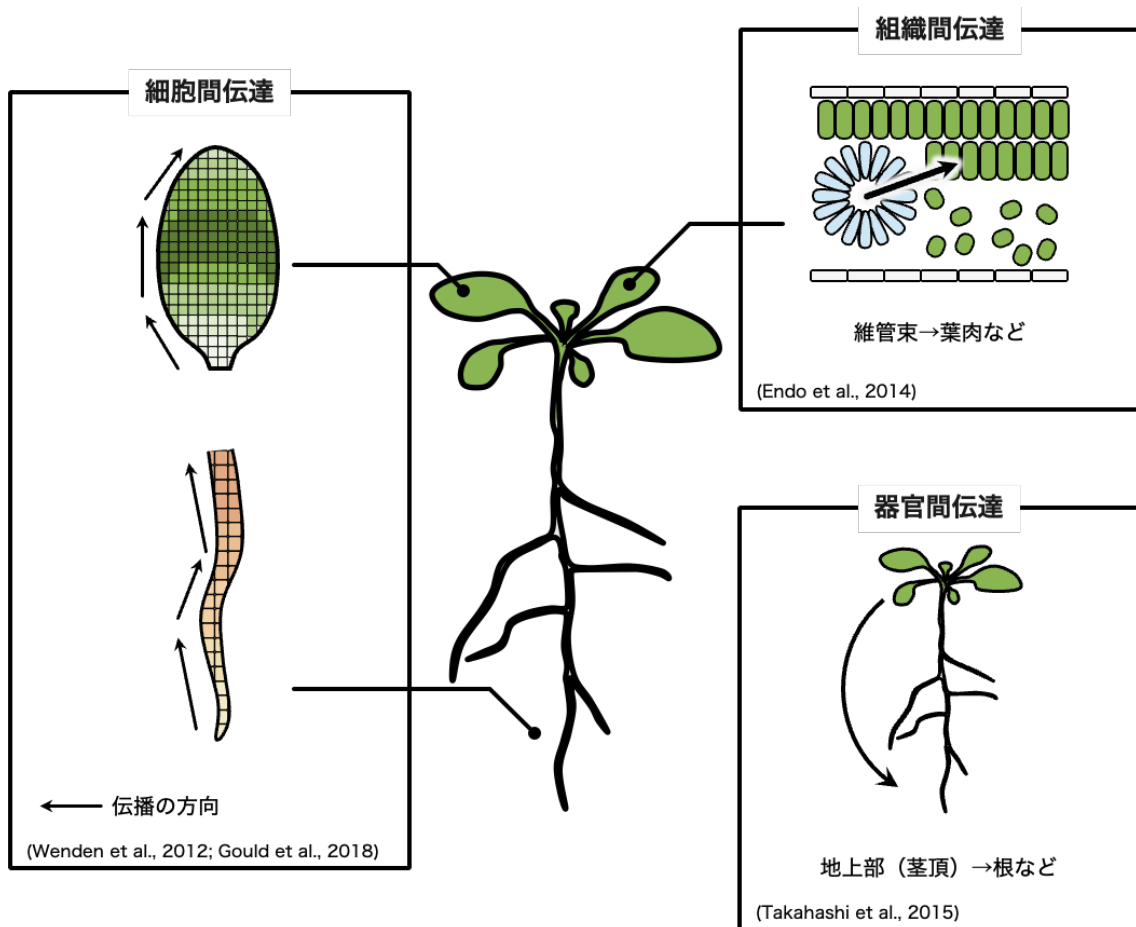


図2：シロイヌナズナにおける時間情報伝達の例

葉および根の先端部において、時計遺伝子のプロモーター活性が細胞間で伝播し、波のように進行していくことが観察されており、細胞間での時間情報伝達の存在が示されている（左パネル）。組織間レベルでも、維管束組織が葉肉組織の概日時計を制御していることが示されている（右上パネル）。さらに、報告されているなかでもっとも大きいスケールである器官間での時間情報伝達として、根の概日時計が地上部（茎頂）の概日時計と同調することが示されている（右下パネル）。

また、特定の条件下では細胞間・組織間での概日リズムの同調性が低下する現象（脱同調）が観察されており、たとえば、恒明条件下で生育した根では基部側から根端側にかけての *CCA1* のリズムは同調しておらず、根端から基部側へと一定の間隔で発光リズムのピークを示す領域が表れることが観察されている (Gould et al., 2018; Greenwood et al., 2019)。さらに、恒明条件では、地上部が示す周期長にくらべて、根が示す周期長の方が長いことも観察されている (Takahashi et al., 2015; Greenwood et al., 2019; Chen et al., 2020)。

このように、植物の概日時計は細胞内の転写・翻訳を介したフィードバックループだけでなく、細胞・組織・器官間のフィードバックループを通じて、概日リズムの安定性を制御していると考えられている。たとえば、光や温度の変動は地下部よりも地上部で顕著であることから、フィトクロムやクリプトクロム、PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR (PIF) などからの光シグナルや、地上部で COLD-INDUCIBLE C-REPEAT/DROUGHT-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING FACTOR (CBF1/DREB1a) などを通して感知された低温シグナルは、全身に伝達され、時計遺伝子の発現やタンパク質の機能を制御していると考えられる。

実際、光合成産物であるシヨ糖は地上部からの時間情報伝達のシグナル物質である可能性が指摘されている。植物体全体をサンプルとして用いた解析から、*PRR7* および *PRR5* の発現は光合成阻害剤である 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) を地上部に投与することで上昇し、また *CCA1* および *LHY* の発現は DCMU 投与によって低下する。また、これら時計遺伝子の発現に対する DCMU の効果はシヨ糖の同時添加によって回復する (Haydon et al., 2013)。植物体内のエネルギーセンサーとして機能する SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 1 (SnRK1) が飢餓状態を感知することで活性化が促される転写因子 BASIC LEUCINE ZIPPER 63 (bZIP63) を介して DCMU およびシヨ糖は *PRR7* の発現を制御している (Frank et al., 2018)。また、飢餓条件においてシヨ糖投与は位相応答を起こすことから、シヨ糖が概日リズムの同調因子として機能することも示されている。さらに、*prp7* 変異体を用いた実験から、*PRR7* はシヨ糖シグナルを介した周期長制御における重要因子であることが示唆されている (Haydon et al., 2013; Frank et al., 2018)。その一方で、植物体内におけるシヨ糖合成に大きく影響する光合成とデンプン分解もまた、概日時計による

制御を受けており、ショ糖は概日時計によって制御を受けると同時に概日時計を制御している。

さらに、分子量が小さい時計タンパク質 ELF4 自身も地上部から根への時間情報伝達物質であることが明らかにされており、ELF4 は地上部の温度情報を根へと伝え、周期長を調節することも示されている (Chen et al., 2020)。このように、地上部から根へは時間情報を伝達する物質についての知見は蓄積しつつある。

概日時計の栄養シグナルへの応答

一方で、栄養欠乏や乾燥ストレスなど、主に地下部で感知されていると考えられる環境情報もまた、概日リズムの周期長や位相、振幅の調節に関わることが個体レベルでの研究から明らかにされている。しかし、根から地上部への時間情報伝達物質の実体やその生物学的な意義についての研究はなく、実際に地上部と根の間で器官レベルのフィードバックループが存在するかについても明らかにされていない。

地上部と根の間でやり取りされる因子として栄養素 (イオン) が挙げられ、実際これら栄養素に関連するシグナルが概日リズムに影響を与えうることが報告されている。たとえば、マグネシウムイオン (Mg^{2+}) の欠乏は概日リズムの長周期化や振幅の減衰を引き起こすことが示されており、これは生体内の Mg^{2+} 欠乏による転写・翻訳機構の阻害が原因であると考えられている (de Melo et al., 2021; Rivière et al., 2021)。鉄イオン (Fe^{2+}) の欠乏は、概日リズムの長周期化を引き起こし (Chen et al., 2013; Hong et al., 2013; Salomé et al., 2013)、この効果は、ショ糖を含む培地でも観察されることから、鉄欠乏による光合成活性の低下とは独立した反応であると考えられている (Hong et al., 2013; Salomé et al., 2013)。鉄欠乏による概日リズムの長周期化が光依存的な応答であることや、葉緑体の形成や機能に鉄が重要であることから、この効果には葉緑体からのレトログレードシグナルが関与していると考えられている。培地中の銅イオン (Cu^{2+}) は *CCA1* や *GI* などの時計遺伝子の発現量低下を介して概日リズムの振幅に影響を与えることが報告されている (Andrés-Colás et al., 2010; Perea-García et al., 2016)。

このように、植物は生体内の栄養状態および栄養シグナルを感知することで、

概日時計の機能を調節している可能性が示唆されている。さらに、イオンそのものがシグナル分子として機能し、概日時計に作用する例も報告されている。無機態窒素 (NO_3^- , NH_4^+) や有機態窒素 (グルタミン酸) の投与は、概日リズムの位相を調節する (Gutiérrez et al., 2008)。また、細胞質中カルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度の振動は概日リズムを調節することが知られており、CALMODULIN-LIKE 24 (CML24) と TOC1 の相互作用が入力系に関与すると示唆されている (Martí Ruiz et al., 2018)。こうした報告の一方で、カリウムイオン (K^+) が概日時計の機能調節に関わることは報告されていない。しかし、 K^+ は概日時計によって制御されている生理機能を制御することが報告されており、シグナル分子として機能している可能性が示唆されている (Rubio et al., 2014; Brauer et al., 2016; Shabala, 2017)。

以上のように、植物は栄養素および栄養素の関連するシグナルを感知することで概日時計を調節しており、栄養素を概日時計システム的一端に組み込んでいる。これらのイオンが根で吸収され、地上部に輸送されることを考慮すると、根から地上部の概日時計へと送られるシグナル伝達機構にイオンが関与する可能性が考えられた。

概日時計システムにおける、時計間での相互作用の意義

概日時計の研究では、概日時計の環境変化に対する同調メカニズムや、時計間での相互作用の影響などについて理解する上で、数理モデルによる解析が盛んに行われてきている。概日時計は様々な環境刺激を受けることでそれぞれの時間情報を調節しているが、これは同時に環境ノイズによる影響も受けることを意味している。実際、外因性および内因性の確率的なノイズが周期長に影響を与えることが示されている (Hastings and Herzog, 2004)。このようなノイズは安定的な約 24 時間の周期を形成する上で大きな障害となることが考えられるため、概日時計はノイズの大きい環境下でもリズムの安定性を維持する機構を備えていると考えられている。近年の数理モデルを用いた解析によって、振動体を構成する要素間の結合が増加することで、ノイズに対するリズムの安定性が上昇することが示されている (Forger and Peskin, 2005)。また、哺乳動物の概日時計を基としたモデルからは、視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus; SCN) の中枢時計においては細胞間での概日時計の結合が摂動に対して安定的なリズム

形成に重要であることが予想されている。これらの理論的アプローチによる結果は、多数の概日時計同士が概日時計システム全体の安定性を担保する上で重要であることを指し示している。しかし、これらのモデルは解析の容易さや一般性を担保するために比較的簡潔に記述されており、実際の植物体で観察されているような恒常条件下における周期長や振幅の違いといった概日時計の組織特異性や相互作用における情報伝達の時間遅れなどは考慮されていない。

本研究の目的

以上のように、植物の概日リズムを安定化するうえで、時間情報の長距離シグナル伝達は重要な役割を果たすと考えられるものの、その分子実体や生物学的な報告はほとんど存在しない。特に、遺伝子間、オルガネラ間、細胞間、組織間のフィードバックループが示されつつあり、また地上部から根への長距離シグナル伝達を示されている中において、根から地上部への器官間の概日時計間における時間情報の伝達は植物体内で最も大きなスケールのものであり、重要な要素であるにも関わらず、先行研究は地上部から根へと向かうシグナル伝達の報告に限られており、地上部と根の概日時計の関係について十分に理解されているとは言い難い。

そこで本研究では、ショ糖及びイオンの輸送に着目した解析、およびより実態に即した数理モデルを利用したシミュレーションを行い、地上部と根の概日時計間で行われるシグナル伝達に関する新たな知見を得ることを目的として研究を行った。

材料と方法

植物と生育条件

本研究では、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)の野生株として Col-0 (WT)を用いた。また、T-DNA の挿入によって正常よりも短い転写産物をもつ *prp7-3* 変異体 (*prp7*; Farré et al., 2005)、および T-DNA の挿入によるヌル変異体である *aha1-9* (*aha1*; Yamauchi et al., 2016)は、それぞれ Eva M Farré 博士および木下俊則博士から分与いただいた。カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター (CaMV35S) の制御下で N 末端側に HA タグを付加した PRR7 を過剰発現する形質転換体 (*PRR7-OX*; Farré and Kay, 2007)は、Eva M Farré 博士から分与いただいた。時計遺伝子 *LHY* のプロモーター活性を測定するため、*LHY*プロモーターで北米産ホタル由来の *LUCIFERASE* (*LUC*)遺伝子を発現させた形質転換体 (*LHYpro:LUC*)は当研究室で作出されたものを使用した (Torii et al., 2021)。

植物種子は、2 倍に希釈したキッチンブリーチで種子表面を滅菌した後、事前に滅菌した超純水で洗浄し、0.8% [w/v]の寒天培地上に無菌的に播種した。播種した種子は、動物個別飼育装置 (日本医化器械製作所) 内で、22°C、白色光下 ($60-80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で生育し実験に供した。植物は 12 時間明期 12 時間暗期の明暗周期条件 (LD 条件) で 14 日間または 7 日間生育した後に、栄養素などの条件を適宜調節した新規の生育培地に植え替え、さらに 2 日間 LD 条件で生育し、新たな環境で概日リズムを同調させた。その後、明暗条件をつけない恒明条件 (LL 条件) に植物個体を移し、概日リズムを計測した。植物体の撮影は、LL 条件下 3 日目に行っており、iPhone Xs (Apple)で撮影した。

先行研究を基にコントロールとなる通常条件の生育培地を作製した (表 1, Negishi et al., 2017)。通常培地では、1/2 Murashige and Skoog (1/2 MS)培地で含まれていた KNO_3 、 KH_2PO_4 、 KI をそれぞれ NH_4NO_3 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 NaI に変更している。この時、培地に含まれる N の濃度 (NO_3^- と NH_4^+ の合計)は 20 mM となるようにし、1/2 MS 培地と同等になるようにしている。さらに、 K^+ を KCl 添加によって補うことで 10 mM に調整し、1/2 MS 培地と同等になるようにしている。その他のイオンに関しては、 MgSO_4 、 FeSO_4 、 MnSO_4 、 ZnSO_4 、 H_3BO_3 、

Na_2MoO_4 、 CuSO_4 、 CoCl_2 で加えている（表1；Negishi et al., 2017）。全ての実験において、植物種子の播種は通常培地で行った。 K^+ 欠乏培地、 Mg^{2+} 欠乏培地、 Ca^{2+} 欠乏培地、 Fe^{2+} 欠乏培地、および Cu^{2+} 欠乏培地は、それぞれ KCl 、 MgSO_4 、 CaCl_2 、 FeSO_4 、 CuSO_4 の添加量を調整することで作成した。 KCl は、培地中 K^+ 濃度が0.01 mMとなるように添加し、培地作成時にそれぞれ MgSO_4 、 CaCl_2 、 FeSO_4 、 CuSO_4 を抜くことで、各イオンの欠乏培地を作成した。なお、各物質の添加量の調整に際して減少する Cl^- および SO_4^{2-} については、それぞれ HCl および H_2SO_4 の添加を行うことで対応した（表1）。また、 K^+ 過剰培地は KCl の添加量を増やし、通常よりも濃い100 mMに調整した。培地pHは Tris-HCl (pH 9.0)によって調整し、pH 6.3となるようにした。また、シヨ糖添加実験を除いて、全ての培地はシヨ糖を含んでいない。シヨ糖およびDCMUは、培地が完全に固化する前に20%シヨ糖溶液または20 mM DCMU溶液を添加することで、それぞれ2% [w/v]および2 μM となるように調製した（シヨ糖培地、DCMU培地）。また、一部の実験で用いた水耕培地は、上記の各生育培地と同じイオン組成となるように作製しており、寒天は含まない。

表 1 : 培地の組成

化合物名	通常条件 培地	K ⁺ 欠乏培地	Mg ²⁺ 欠乏培地	Ca ²⁺ 欠乏培地	Fe ²⁺ 欠乏培地	Cu ²⁺ 欠乏培地
NH ₄ NO ₃	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.625 mM	0.625 mM	0.625 mM	0.625 mM	0.625 mM	0.625 mM
H ₃ BO ₃	0.05 mM	0.05 mM	0.05 mM	0.05 mM	0.05 mM	0.05 mM
MgSO ₄	0.75 mM	0.75 mM	(H ₂ SO ₄ に変更) 0.75 mM	0.75 mM	0.75 mM	0.75 mM
ZnSO ₄	0.015 mM	0.015 mM	0.015 mM	0.015 mM	0.015 mM	0.015 mM
MnSO ₄	0.05 mM	0.05 mM	0.05 mM	0.05 mM	0.05 mM	0.05 mM
FeSO ₄	0.05 mM	0.05 mM	0.05 mM	0.05 mM	(H ₂ SO ₄ に変更) 0.05 mM	0.05 mM
CaCl ₂	1.5 mM	1.5 mM	1.5 mM	(HClに変更) 1.5 mM	1.5 mM	1.5 mM
Na ₂ -EDTA	0.05 mM	0.05 mM	0.05 mM	0.05 mM	0.05 mM	0.05 mM
NaI	2.5 μM	2.5 μM	2.5 μM	2.5 μM	2.5 μM	2.5 μM
Na ₂ MoO ₄	0.5 μM	0.5 μM	0.5 μM	0.5 μM	0.5 μM	0.5 μM
CoCl ₂	0.05 μM	0.05 μM	0.05 μM	0.05 μM	0.05 μM	0.05 μM
CuSO ₄	0.05 μM	0.05 μM	0.05 μM	0.05 μM	0.05 μM	(H ₂ SO ₄ に変更) 0.05 μM
KCl	10 mM	0.01 mM *不足する Cl は HCl で補充	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM

シヨ糖定量

前述の通り、LD 条件で 14 日間生育した植物を新規の通常培地に植え替え、さらに LD 条件で 2 日間生育させて概日リズムを同調させた。その後、植物を LL 条件に移したタイミングを起点として、48 時間後から 4 時間おきに 68 時間後まで、植物個体の根を 30 個体分サンプリングし、生重量を測定した後に Müller, 2016 で用いられている方法にしたがってシヨ糖の抽出を行った。抽出されたシヨ糖は、100 μ L の超純水に溶解した後に、Glucose and Sucrose Assay Kit (BioVision)を用いてシヨ糖定量を行った。

RNA 抽出および qRT-PCR

前述の通り、LD 条件で 14 日間、シヨ糖を含まない培地で生育した植物を、シヨ糖を含まない通常培地または DCMU 培地、シヨ糖を含むシヨ糖培地に植え替え、さらに LD 条件で 2 日間生育させて概日リズムを同調させた。その後、植物を LL 条件に移し、48 時間後から 4 時間おきに 68 時間後まで、植物個体の地上部もしくは根（胚軸の下部より下側を根とした）を 30 個体分サンプリングし、地上部のサンプルはセパゾール RNA I（ナカライ）で、根のサンプルは Maxwell RSC Plant kit (Promega)を用いてそれぞれ RNA 抽出を行った。

抽出した RNA は NanoDrop One (Thermo Scientific)で濃度を測定した後に、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa)を用いて 500 μ g の RNA を 20 μ L の反応系で逆転写し cDNA を合成した。得られた cDNA を 1/3 倍に希釈したものを鋳型とし、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用いて、CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)で qRT-PCR を行った。95°C 30 秒の初期変性の後、95°C 5 秒の熱変性と 60°C 30 秒の伸長を 45 回繰り返す温度サイクル条件で、内部標準遺伝子として、*ISOPENTENYL PYROPHOSPHATE DIMETHYLALLYL PYROPHOSPHATE ISOMERASE 2* (*IPP2*)を用い、標的遺伝子の相対発現量を定量した。使用したプライマーを表 2 に示す。

表 2 : qRT-PCR および RT-PCR に使用したプライマーセット

標的遺伝子	プライマー配列 (5'→3')	文献
<i>IPP2</i>	GTATGAGTTGCTTCTCCAGCAAAG GAGGATGGCTGCAACAAGTGT	Shimizu et al., 2015
<i>DIN6</i>	AACTTGTCGCCAGATCAAGG GGAACACGTGCCTCTAGTCC	Baena-González et al., 2007
<i>SEN5</i>	GCGAAACTCTCTCCGACTTC CCACAGAACAACCTTTGACG	Rodrigues et al., 2013
<i>APUM24</i>	GCTTGTCAACAGTGGCCTTG TCACACAGCTTCTCGCTCAG	Maekawa et al., 2018
<i>BRX1-1</i>	GAATGATAAAAGTCGACCAAAGTTTC CTTCTTCGTGACATAGCAGTCTTTAC	Maekawa et al., 2018
<i>CCA1</i>	GAGGCTTTATGGTAGAGCATGGCA TCAGCCTCTTTCTCTACCTTGGAGA	Endo et al., 2014
<i>LHY</i>	GGTTCTGTACCATATTACCC GTAGCAGATGACATATAGACC	
<i>TOC1</i>	GCCTCTTCGCACCAACGAGCT TCAGCAAGTCCTAGCATGCGTCT	Endo et al., 2014
<i>PRR5</i>	ATTCCGAATGAAGCGAAAGGA TCGTAACGAACCTTTTTCTCATAACAT	Mockler et al., 2004
<i>PRR7</i>	AGGTGCTTCCGAAAGAAGGTACGA TGGGCTGAGAAATAGTGGGTTTTGT	Frank et al., 2018
<i>PRR9</i>	TGCTTTGACAAAAGGTTCCGGTACCAGAGCAGGA ACGCGTCTGAATTCACGGTTCGCACG	
<i>LUX</i>	ATCATGGAGCTGGTGGAAATGG TGCAATTTGGGACTTTGCGGT	
<i>AHA1</i>	GCTATGGCTTCTAGGGTGG GCCAGTTACCATCAGAGTCG	Yamauchi et al., 2016
<i>FIL</i>	TGGTACAGCAACCACATCGGACAG GCCAAACCATCCTTGC GGTTAATG	Schliep et al., 2010

接木実験

接木実験の手法は、Turnbull et al., 2002 を参考にした。植物個体は、栄養素を含まない寒天培地 (2.5% [w/v]) に播種し、22°C LD 条件で 5 日間生育したものを使用した。胚軸の切断には外科手術用替刃メス No. 11 (FEATHER) を使用した。接木処理後、27°C LL 条件で 5 日間生育して癒合を促し、地上部と根が癒合したと見られる個体を通常培地に植え替えた。さらに 10 日間、22°C LD 条件で生育した後、植物体の成長が観察された個体を接木成功個体とした。接木成功個体はその後、新規の通常培地に植え替え、100 μ L の 250 mM D-ルシフェリンカリウム (Wako) を投与した後に Kondotron を納めている培養器内で 2 日間 LD 条件を経験させることで概日リズムを同調させた。その後、22°C LL 条件に移し、概日リズムの測定を行った。

生物発光測定

寒天培地上での発光測定では、LD 条件で 14 日間生育した植物を新規の通常培地および各種条件の生育培地に植え替え、植物個体に 250 mM の D-ルシフェリンカリウム (Wako) を 100 μ L 投与した (図 3 A)。K⁺欠乏培地で生育した植物に対する K⁺回復条件では、滅菌したプラスチックシートを植物の根を覆うように被せ、シートの下部の根に対してのみに 250 mM KCl を 200 μ L K⁺を投与した (図 3 B)。その後、後述する発光測定装置の中で 2 日間 LD 条件を経験させることで概日リズムを同調させた。K⁺回復条件では、LL 条件に移したタイミングで KCl と同様の方法でルシフェリンを投与し、地上部に KCl が飛散しないように工夫した (図 3 B)。

水耕培地中での発光測定では、通常液体培地および K⁺欠乏液体培地それぞれ 50 mL につき、250 mM D-luciferin potassium salt を 1 mL 加えたストック溶液を事前に調製し、4°C で遮光保存しておいたものを用いて実験を行った。LD 条件で 14 日間生育した植物を室温に戻した 5 mL のストック溶液に移し替え、発光測定装置の中で 2 日間 LD 条件を経験させることで概日リズムを同調させた。K⁺パルス処理は、通常液体培地と K⁺欠乏液体培地の溶液を入れ替えることで行い、溶液交換の際には、滅菌済みの超純水で植物を洗浄し、培地の持ち込みを最小限に抑える工夫をした。なお、通常条件および K⁺欠乏条件では、新規の培地に交換するものの、パルス期間を含めた計測期間全体で通常液体培地および K⁺

欠乏液体培地で生育している。K⁺パルス条件では、パルスの前後では K⁺欠乏液体培地で生育し、パルス期間は通常液体培地で生育している (図 4)。

生物発光の測定は、Kondo et al., 1994 で用いられた発光測定装置 (通称: Kondotron) を用いて行った。得られた生物発光の波形データは、Zielinski et al., 2014 で開発された解析ソフトを、Muranaka and Oyama, 2016 で統計分析フリーソフト R (version 3.6.2) に移植したものを使用した。この解析ソフトでは、計測時間全体に対して、移動する 24 時間の窓 (ウィンドウ) を設定して線形回帰による補正を行い、平均が 0、分散が 1 となるような回帰直線を算出した。計算された回帰直線を平均化し、時刻ごとに得られた値を生データから引くことで、トレンド除去を行った。上記の方法でトレンド除去された波形データに対して、もう一度移動する 24 時間窓での線形回帰を行うことで標準偏差を算出した。各時刻のデータに対して、算出されていた標準偏差を平均化した値で割ることで、振幅のトレンドを除去した。

ピーク時刻の算出についても Muranaka and Oyama, 2016 の手法にしたがった。波形データを 8 時間の窓の移動平均で平滑化し、ピークの位置を局所的な極大値として大まかに特定した。その後、さらに 2 時間窓の移動平均で平滑化し、局所的に二次関数にフィッティングさせることで正確なピーク時刻を推定した (Muranaka and Oyama, 2016)。LL 条件 120 時間の内に検出される 4 つの周期に関して、ピーク間の周期長を算出し、周期長の平均および周期長の標準偏差 (ばらつき) を個体ごとに計算した (図 5)。

植物個体内における空間的なプロモーター活性を計測するために、Multifunctional In vivo Imaging System (MIIS; Molecular Devices) を用いて発光測定を行った。22°C LD 条件下において通常培地で 14 日間生育した植物体を、新規の通常培地に植え替え、MIIS の中で 2 日間 LD 条件を経験させることで概日リズムを同調させた。その後、22°C LL 条件に移し、2 時間後に発光測定を行った。また、地上部と根における発光強度は、胚軸基部から上の輝度値の積算および下の輝度値の積算として算出した。

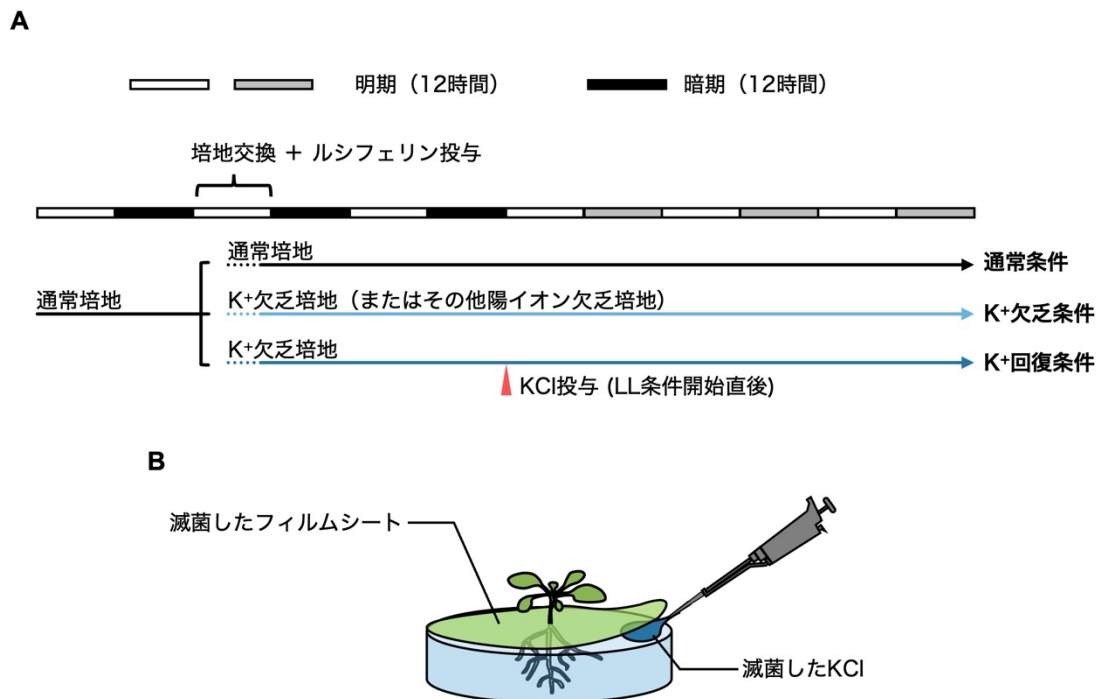


図3：陽イオン欠乏培地を用いた実験条件の模式図

陽イオン欠乏培地を用いた実験条件の模式図。K⁺欠乏以外の陽イオン欠乏培地についても同様にして実験を行った。(A) 通常培地で生育した14日齢の植物を、通常培地またはK⁺欠乏培地に植え替えた後、さらに発光測定装置内で2日間LD条件に置いて概日リズムを同調させてから、LL条件へと移した。KClの投与はLL条件開始直後に行い、培地中K⁺濃度が通常培地と同等になるように調整した。(B) KClの投与時の模式図。滅菌したシートで植物体の根を覆い、シートの下にKClを投与することで、KClの地上部への飛散を防ぐ工夫をした。

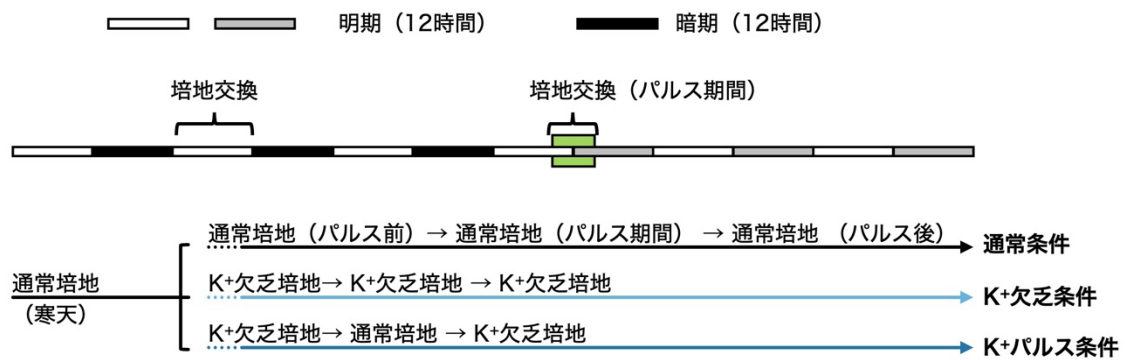


図4：培地交換による K⁺パルスの実験条件の模式図

K⁺パルスを用いた実験条件の模式図。通常培地（寒天）で生育した14日齢の植物を、通常培地（液体）または K⁺欠乏培地（液体）に植え替えた後、さらに発光測定装置内で2日間 LD 条件に置いて概日リズムを同調させてから、LL 条件へと移した。LL 条件下9時間後～15 時間後までの期間を培地交換によって、新規の通常培地または K⁺欠乏培地へと切り替え、その後パルス前の条件へと戻した。パルス期間は緑帯で示した。また、培地交換の前後では、超純水での洗浄を行うことで交換前の培地の混入を最小限に抑える工夫をした。

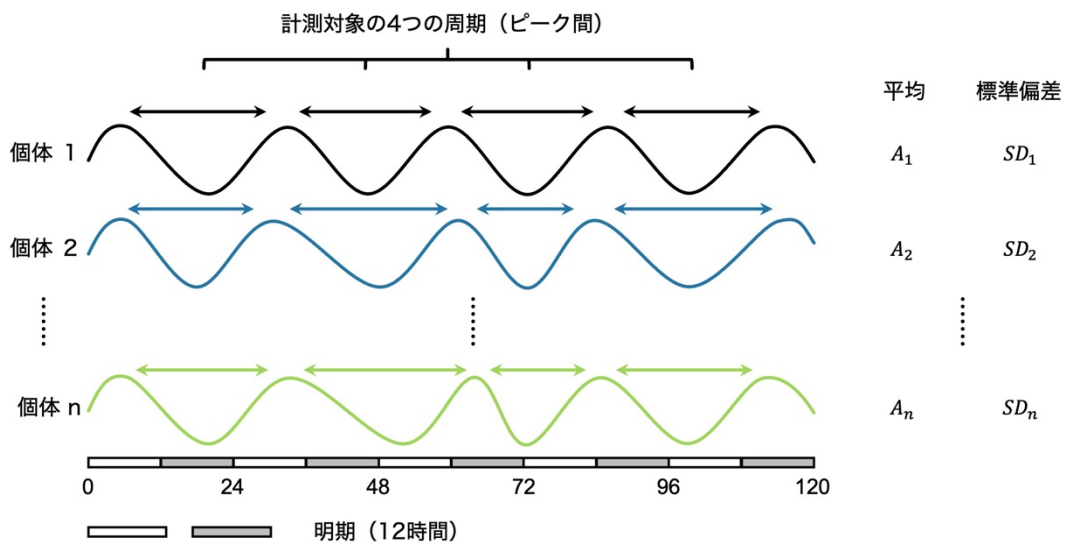


図 5：平均周期長および周期長のばらつきの算出方法

LL 条件 120 時間後までに観察される 4 つのピークとピークの間隔を周期と定義し、個体ごとに周期長を算出した後に平均値 ($A_1 \sim A_n$) と標準偏差 ($SD_1 \sim SD_n$) を計算した。その後、 $A_1 \sim A_n$ の平均値を平均周期長、 $SD_1 \sim SD_n$ の平均値を周期長のばらつきと定義した。

気象データの取得、および解析

US National Oceanic and Atmospheric Administration National Center for Environmental Information website

(<https://www.ncei.noaa.gov/pub/data/uscrn/products/hourly02/2019/>)において公開されているデータベースから気象データを取得した。アメリカ 3 都市 (Cape Charles、Durham、Redding) の 2019 年春の観測データの中から、実験条件と比較しやすい日長が 11.5 ~ 12.5 時間であった日の気象データを使用した。該当した日数は、Cape Charles で 2019/3/5 から 2019/3/28 までの 24 日間、Durham で 2019/3/4 から 2019/3/29 までの 26 日間、Redding で 2019/3/6 から 2019/3/27 までの 22 日間であった。

容積絶対湿度 (*volumetric humidity, VH*) は、以下に示す計算式から算出した (Bai and Wen, 2019)。また、*RH* と *t* はそれぞれ相対湿度と温度を示す。

$$VH = a \cdot \frac{RH}{100}$$
$$a = \frac{217 \cdot e}{t + 273.15}$$
$$e = 6.1078 \cdot 10^{\frac{7.5t}{t+237.3}}$$

Seasonal Trend-decomposition procedure based on Loess (STL) 分解によって、気象データをトレンド、季節性および残差の成分に分けた。また、この解析には統計分析ソフト R (version 3.6.2) を用いており、パッケージは stats (version 4.1.0) を使用した。

数理解析

地上部と根における概日時計間のカップリングは、スチュワート・ランダウ方程式を基に構築した。それぞれの振動子には、リズムが崩壊しない範囲での微弱的なノイズを独立に与えている。さらに現実に即して、ノイズ項と結合の強さ (結合強度) および作用までの時間遅れを示す項を追加した。計算で使用した式は、以下に示す。

$$\frac{d}{dt} z_1(t) = \alpha_1 z_1(t) - \beta_1 |z_1(t)|^2 z_1(t) + k_2 z_2(t - \Delta t) + \sqrt{D_1} \xi_1(t)$$
$$\frac{d}{dt} z_2(t) = \alpha_2 z_2(t) - \beta_2 |z_2(t)|^2 z_2(t) + k_1 z_1(t - \Delta t) + \sqrt{D_2} \xi_2(t)$$

z_1 と z_2 は複素変数であり、周期と振幅の情報を含む。 α_1 と β_1 は地上部モデルの

振動体が、 α_2 と β_2 は根モデルの振動体が示す固有振動子数および振幅を決定する定数である。 $\xi_1(t)$ と $\xi_2(t)$ は、地上部と根に入力される、平均 0 で標準偏差 1 の正規分布に従ったランダムな値を出力する。 D 、 k および Δt は、それぞれノイズの大きさ、結合強度および時間遅れの大きさを示す。パラメーターについては、 $\alpha_1 = 0.4 + 2i$, $\beta_1 = 0.4$, $k_1 = 1.2$, $D_1 = 0.5$, $\alpha_2 = 0.1 + 1.9i$, $\beta_2 = 0.2$, $k_2 = 0.25$, $D_2 = 0.35$ に設定しており、時間遅れ (Δt) は約 1 時間に相当するように設定した。また、地上部と根の結合が切れている状態は、 k の値を 0 にすることで対応した。

道管液の採取、およびイオン濃度の測定

道管液の採取方法は、Tabata et al., 2014 および Nakayama et al., 2017 を参考にした。22°C LD 条件下において通常培地で 14 日間生育した植物体を、新規の通常培地、またはその他の生育培地に植え替え、2 日間 LD 条件を経験させることで概日リズムを同調させた。その後、22°C LL 条件に移し、LL 条件下 48 時間後から 68 時間後までの期間で 4 時間おきに、サンプリングを行った。胚軸の先端部分をマイクロ剪刀で切除し、残された胚軸部分に内径 0.4 mm シリコンチューブを被せた。30 個体に対して同様の処理を行い、1 時間の間にシリコンチューブ内に溜まった滲出液を道管液として回収した。回収した道管液のうち、2 μL を 98 μL の超純水で薄め、凍結保存した。保存されたサンプルを融解した後、Dionex Aquion ion chromatography system (Thermo) で K^+ 、 Mg^{2+} および Ca^{2+} の濃度を測定した。

蒸散速度の測定

22°C LD 条件下において通常培地で 14 日間生育した植物体を、栽培土とバーミキュライトを 1:1 で混ぜたポットに植え替え、23°C 12L12D 条件、白色光照射下 ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で、さらに 14 日間生育を行った。その後、23°C LL 条件に移して気孔コンダクタンスを計測することで蒸散速度を計算した。気孔コンダクタンスは 6400-15 Arabidopsis leaf chamber (Li-Cor) 内で、LI-6400 portable gas exchange system (Li-Cor) を用いて測定した。測定条件は、 CO_2 濃度 350 ppm、Air flow 200 L h⁻¹、相対湿度 40 ~ 60%、温度 24°C で行った。測定間隔は 10 秒とした。

柵状組織・海綿状組織の単離、RNA 抽出および cDNA 合成

事前に酵素液 (0.75% セルラーゼ オノヅカ R-10 (Yakult)、0.25% マセロザイム R-10 (Yakult)、400 mM マンニトール、5 mM MES-KOH (pH 5.6)、8 mM CaCl₂、1 U/μL RNase Inhibitor (Roche))の調製を行った。酵素液は組織単離のたびに新たに調製した。

420 μL の Buffer RLT (RNeasy Plant Mini Kit)を 1.5 mL チューブに分注し、氷上に設置した 6 枚以上のシロイヌナズナの第 3 葉をマイクロ剪刀で切り取り、ラベルテープで挟み、ゆっくりとはがした。この際、葉の組織をつぶさないように注意しながらテープに葉を接着させ、葉が完全に伸展していることを確認した。組織が十分に分離している様子が確認されたものについて、組織が露出している部分に用意しておいた酵素液を 7 μL ずつ加え、室温で 2 分間放置した。組織上で数回、ゆっくりとピペッティングを行い、2 μL をスライドグラス上に乗せ、光学顕微鏡を用いて細胞内容物が含まれているかを確認した。細胞内容物が含まれていることが確認されたものから 5 μL を Buffer RLT の入ったチューブに分注し、6 枚以上の葉から回収した細胞内容物を含む酵素液 30 μL を回収した。RNeasy Plant Mini Kit の clean-up RNA protocol に従って、14~16 μL の RNA を溶出した。溶出した RNA 溶液を 8 μL から Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen)を用いてゲノム DNA の除去を行った。この反応液 10 μL を使用し、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)を用いて cDNA の合成を行った (Uemoto et al., 2018)。

半定量的 RT-PCR

柵状組織・海綿状組織由来の RNA より合成した cDNA を 2.5 μL 鋳型とし、2.5 μL の 10x PCR Buffer for KOD-Plus-Neo、3 μL の 2 mM dNTPs、2 μL の 25 mM MgSO₄、0.75 μL の 10 μM Primer、0.5 μL の KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を含む 25 μL の反応系で PCR を行った。使用したプライマーは、表 2 に記した。PCR 産物は 3%アガロースゲルを用いて分離し、エチジウムブロマイドにより染色した後に紫外線照射下で検出した。

テクノビット包埋

事前に 50 mL の FAA 溶液 (25mL のエタノール、5 mL の 37% ホルムアルデヒド、2.5 mL の酢酸、2 mL の 25% グルタルアルデヒド、5 μL の Tween 20 を含む)の調製を行った。なお、FAA 溶液は組織固定ごとに調製した。14 日齢の植物の第 3 葉をマイクロ剪刀で切り取り、アシストチューブに分注した FAA 溶

液内に沈めた。葉が完全に FAA 溶液に沈むまで、気泡が発生しないように脱気を繰り返した。新しい FAA 溶液に交換し、4°Cで一晩静置した。FAA 溶液を除去した後、50% エタノールで葉を洗った。FAA 溶液を完全に除去した後、15 分ごとに 50%、70%、80% エタノールの順で溶液を交換し、4°Cで静置した。さらに、10 分ごとに 90%、95% エタノールの順に交換し、室温で静置した後、99.5% エタノールで 1 時間静置した。

次に FAA 溶液による組織固定を行った葉に Technovit 溶液の浸透を行った。Technovit 7100 (Kulzer)を用いて、事前に浸透液 (100 mL の 7100 original solution に 1 g の Harter 1 powder を加えたもの)および固化液 (7100 original solution : Harter 2 solution = 15 : 1)を調製した。なお、固化液の調製は氷上で行った。アシストチューブ内の溶液を、モレキュラーシーブを用いて溶液内の水分を除いたエタノールに溶液を交換し、室温で 1 分間静置した。シェーカー上で加えたエタノールの 1/4 量の浸透液を、15 分ごとに加え、徐々に浸透液の濃度を上げ、浸透液の濃度を 87.5%にした。溶液を除去した後、浸透液を加え室温で 1 時間、シェーカー上で放置した。浸透液を新しいものに交換し、さらに 3~4 時間シェーカー上で放置した。葉を固化容器内に移し、固化液を加え、空気に触れないようにラップで覆った。固化が完全に終わるまで室温で静置した。固化完了したのからマイクロトームを用いて切片の作製を行い、光学顕微鏡で観察した。

結果

根の *PRR7* の発現パターンは、根におけるシヨ糖蓄積の振動と相関する

概日時計は様々な生理応答を制御しており、光合成活性およびシヨ糖の産生量も概日時計によって制御されることが知られている。これまでの研究から、シヨ糖は時計遺伝子 *PRR7* の発現を抑制することが示されていた (Haydon et al., 2013; Frank et al., 2018)。こうした結果から、光合成で作られたシヨ糖は輸送された先で *PRR7* の発現抑制を通じて概日リズムの機能制御に関わる可能性が示唆されていた。しかし、これらの研究は個体全体を解析対象としていたため、実際に地上部で合成されたシヨ糖の輸送にリズムがあるのか、輸送されたシヨ糖が実際にシグナル分子として根の概日時計の発現制御に関わっているかについては、明確な答えは得られていない。

シヨ糖の合成は、主に地上部における光合成およびデンプン分解により、いずれも概日時計の影響を強く受けている。そのため、根へと輸送されるシヨ糖量は、地上部の概日リズムの影響を強く反映していると考えられる。そこで、根へと輸送されるシヨ糖量が1日の中でどのように変動しているかを明らかにするため、根のみを解析対象とした経時的なシヨ糖定量を行った (図 6 A)。外部からの時間情報がなく、純粹に概日時計の特性を反映する LL 条件下においても、WT では LL 条件に移してから 60 時間後の日没に相当する時刻に最も蓄積量が低下し、明確な振動を示した (図 6 B)。一方で、LL 条件下で概日リズムが完全に消失する時計遺伝子の三重変異体 *cca1 lhy toc1* では、根におけるシヨ糖量の変動はほぼ消失していた。このことは、根へと輸送されるシヨ糖量は概日時計による制御を受けていることを示している。

次に、遺伝子発現に対するシヨ糖量の変動の意義を明らかにするため、根のみを対象とした qRT-PCR を行い、糖応答性の遺伝子の発現パターンを解析した。WT における、糖によって抑制される *DARK INDUCIBLE6 (DIN6)*、および *SENESCENCE-ASSOCIATED PROTEIN5 (SEN5)* の発現パターンは、シヨ糖量の変動に対して逆位相の振動パターンを示した (図 6 C)。また、糖によって促進される *ARABIDOPSIS PUMILIO PROTEIN24 (APUM24)* および *BIOGENESIS OF RIBOSOMES IN XENOPUS1-1 (BRX1-1)* の発現パターンは、シヨ糖の変動と同じ位相の振動パターンを示した (図 6 D)。これらの結果から、

根におけるシヨ糖量の変動は糖応答性の遺伝子発現を変化させるのに十分なレベルであることが示された。さらに、*cca1 lhytoc1* 変異体の根では、WT で観察された明瞭なシヨ糖量の変動が消失しており、ほとんど変化が見られなかった (図 6 C、図 6 D)。このことは地上部から輸送されるシヨ糖の量の変動が、根の遺伝子発現を制御している可能性を示している。

図 6 : 根におけるショ糖の蓄積リズム、およびショ糖応答性遺伝子の発現パターン

(A) 実験条件の模式図。サンプリングは LL 条件における 48 時間後から 4 時間おきに 68 時間後までの範囲で行った。(B) WT と *cca1 lhy toc1* の根における、ショ糖蓄積量の変動。(C) ショ糖によって発現抑制を受ける遺伝子 (*DIN6*, *SEN5*) の発現パターン。(D) ショ糖によって発現促進を受ける遺伝子 (*APUM24*, *BRX1-1*) の発現パターン。エラーバーは標準誤差を示す。 $n = 3$ 。

* $P < 0.05$ 。Student's *t*-test を用いて、WT との比較を行った。

次に、地上部からのシヨ糖輸送が根の概日時計を制御しているかを明らかにするため、シヨ糖を培地に加えた条件（シヨ糖条件）、および光合成阻害剤 DCMU を培地に加えた条件（DCMU 条件）での、根の時計遺伝子の発現を解析した（図 7A）。*CCA1*、*TOC1*、*LUX* は DCMU 条件で発現が上昇したもののシヨ糖条件には応答せず、*LHY* はシヨ糖条件と DCMU 条件のいずれにも応答しなかった。一方で、*PRR7* はシヨ糖条件で発現が低下し、反対に DCMU 条件では発現が上昇しており、明確な糖応答性が見られた。これは、植物個体全体を用いた先行研究での解析結果を概ね再現しており（Haydon et al., 2013; Frank et al., 2018）、本研究により初めて根の *PRR7* は地上部から輸送された糖に対して応答性を持つこと、すなわち糖がシグナル分子として時間情報を伝達しうることが示された。

また、応答の程度は弱いものの、*PRR7* と同じ *PRR* ファミリーに属する *PRR5* と *PRR9* も *PRR7* と同様の傾向を示すことが確認され、*PRR7* を始めとする *PRR* ファミリー遺伝子は根においてシヨ糖応答性を示すことが明らかとなった。とくに *PRR7* は、地上部と根の両方の部位において他の時計遺伝子よりもシヨ糖条件と DCMU 条件に対する発現量の変動が大きく（図 7A、図 7B）、地上部から輸送されるシヨ糖量に概日リズムが見られていることを考えると、根の *PRR7* はシヨ糖リズムに応答することで地上部からの時間情報を根の概日時計へと伝えるインターフェースとして機能している可能性が考えられた。

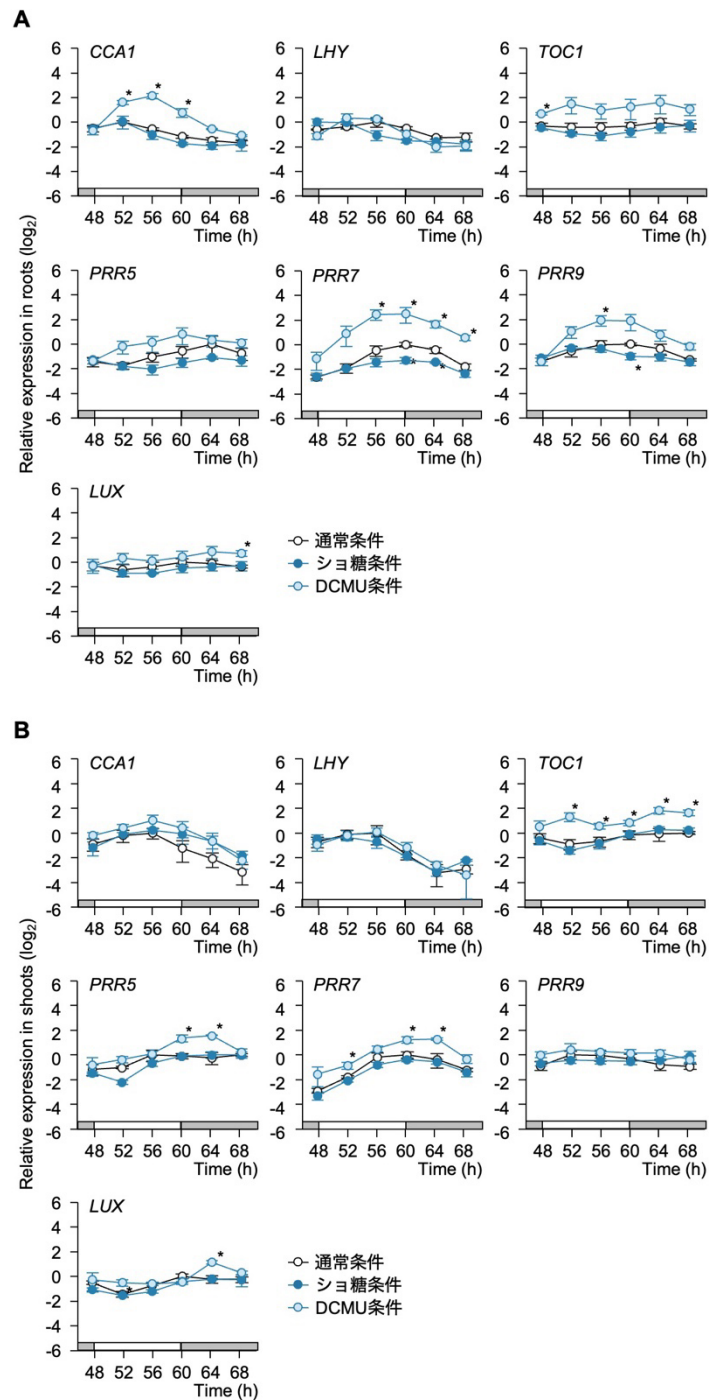


図7：ショ糖およびDCMUに対する、根の時計遺伝子の応答性

ショ糖とDCMU添加培地における、根(A)および地上部(B)の時計遺伝子の発現パターンを、片対数グラフで示した。エラーバーは標準誤差を示す。 $n = 3$ 。* $P < 0.05$ 。Dunnett's testを用いて、通常条件との比較を行った。

根の PRR7 は、地上部における周期長の維持に寄与する

これまでの研究から根の概日時計は栄養素の吸収や輸送に関わりうること、栄養素の欠乏は概日リズムに影響しうることが示されている。こうしたことから、ショ糖によって制御される根の PRR7 もまた何らかのシグナル伝達を介して地上部の概日時計を制御している可能性が考えられるものの、これまでに根から地上部への時間情報伝達を直接的に示した報告は存在していない。

そこで、根の PRR7 が地上部の概日時計にどのような影響を及ぼすかを明らかにするため、地上部の概日リズムを計測するための穂木（地上部）として *LHYpro:LUC* を用い、台木（根）として WT や *prp7*、*PRR7-OX* を用いて、根における PRR7 の発現量だけを変化させた接ぎ木植物を作出した（これ以降、穂木/台木の形式で接ぎ木植物の遺伝型を記載し、それぞれ *LHYpro:LUC*/WT、*LHYpro:LUC/prp7*、*LHYpro:LUC/PRR7-OX* とする）（図 8）。これを用いて、地上部の概日リズムを計測することで、根の影響を調べた。

これら接ぎ木植物を LD 条件で 2 日間生育することで概日リズムを同調させたあと、LL 条件に移し穂木（地上部）に由来する生物発光リズムを 120 時間程度にわたって測定した（図 9 A）。この計測条件ではそれぞれ 4 周期分の概日リズムが計測され、その平均周期長および振幅の減衰の早さを算出したところ、*LHYpro:LUC*/WT、*LHYpro:LUC/prp7*、*LHYpro:LUC/PRR7-OX* のいずれの接ぎ木植物の間でも顕著な差は認められなかった（図 9 B、図 9 C）。この結果から、根の PRR7 は概日リズムの周期と振幅には影響しなかった。また、本研究の条件においては周期が変化しないと位相が変化しないことは自明であることから、概日リズムを規定する周期、振幅、位相の 3 つの特性に根の PRR7 は影響しないことが確認された。

しかし、興味深いことに、平均した周期長には差が見られなかった一方で、個々の植物個体の周期長の安定性（ばらつき）には顕著な違いが認められた。すなわち、*LHYpro:LUC*/WT と比較して、*LHYpro:LUC/prp7* や *LHYpro:LUC/PRR7-OX* では概日リズムが安定せず、たとえば LL 条件に移して 5 周期目のピークとなる 96-100 時間目あたりのピーク付近を見るとばらつきの増大傾向が観察された（図 9 D）。LL 条件開始直後では、それまでの LD 条件での同調の効果から個体間での概日リズムにばらつきは観察されなかったことから、ここで観察されたばらつきの増大は、概日リズムの位相が変化した（位

相ジャンプした) のではなく、LL 条件において *LHYpro:LUC/prr7* や *LHYpro:LUC/PRR7-OX* では周期長の安定性が低下したことに起因するのではないかと考えられた。そこで、LL 条件に移した直後から観察された4つの周期分の周期長の標準偏差を個体ごとに算出し、これを周期長のばらつきとして定義した (図 5)。 *LHYpro:LUC/WT* と比べて、 *LHYpro:LUC/prr7* および *LHYpro:LUC/PRR7-OX* では周期長のばらつきは有意に増大していること、すなわち概日リズムの安定性が低下していることが示された (図 9 E)。これらの結果から、根の *PRR7* は、地上部の概日時計の精度を維持し、一定のリズムを刻むうえで重要な役割を担っていることが明らかとなった。

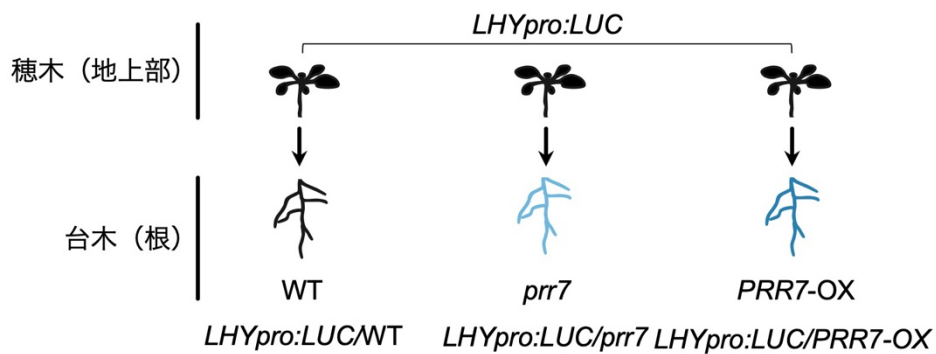


図 8 : 接木実験の概要

接木実験では、穂木 (地上部) として *LHYpro:LUC* を、台木 (根) として *WT*、*prr7*、*PRR7-OX* を用いた。できた接ぎ木植物それぞれを *LHYpro:LUC/WT*、*LHYpro:LUC/prr7* および *LHYpro:LUC/PRR7-OX* とした。

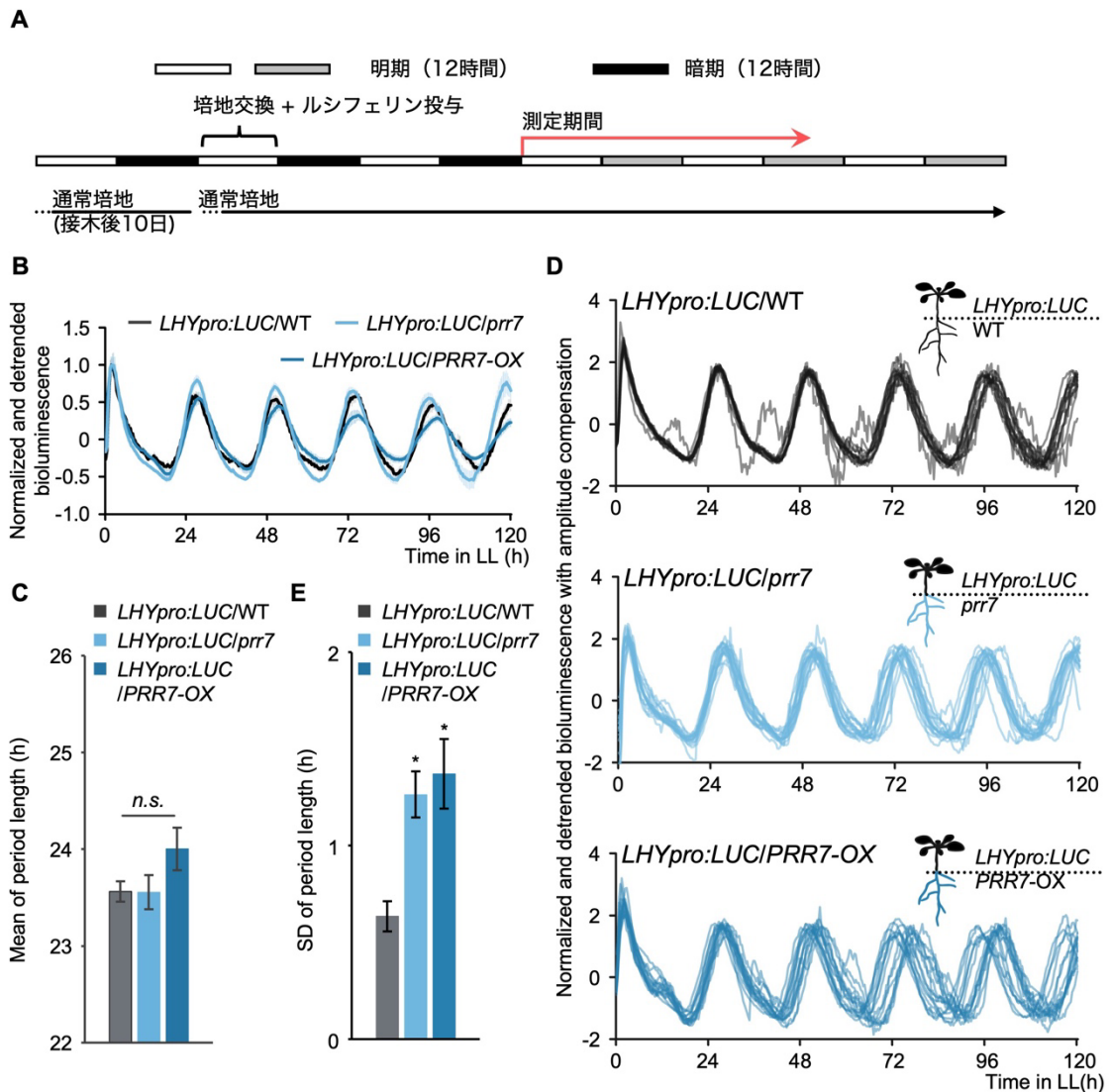


図9：接木個体における *LHYpro:LUC* の発光リズム

(A) 実験条件の模式図。(B) *LHYpro:LUC/WT*、*LHYpro:LUC/prr7*、*LHYpro:LUC/PRR7-OX* の個体ごとの発光リズムを示す。トレンド除去のみを行った接木個体の平均発光リズムを示す。(D)それぞれの波形は、ピークの位置がわかりやすいようにトレンド除去処理および振幅の減衰補正を行っている。(C, E) LL 条件下 120 時間以内に観察できる 4 つの周期の長さを個体ごとに測定し、平均周期長および周期長のばらつき (標準偏差、SD) を算出した。n = 15。エラーバーは標準誤差を示す。* $P < 0.05$ 。Dunnett's test を用いて、*LHYpro:LUC/WT* との比較を行った。

K⁺の輸送は、地上部における周期長の安定化に寄与する

根の概日時計は栄養素の輸送に関わる遺伝子の発現制御を通じて (Haydon et al., 2015)、栄養素の取り込みや地上部への栄養素の輸送を制御している可能性が考えられている。また、Mg²⁺や Ca²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺などの陽イオン自身が、あるいは栄養欠乏や栄養過剰を感知してその情報を全身に伝えるシグナル物質が、概日リズムの周期や振幅を制御していることが数多くの栄養素の欠乏実験や過剰投与実験などから示されている (Andrés-Colás et al., 2010; Chen et al., 2013; Hong et al., 2013; Salomé et al., 2013; Perea-García et al., 2016; Martí Ruiz et al., 2018; de Melo et al., 2021; Rivière et al., 2021)。こうした報告を総合すると、根から地上部への陽イオンの輸送が、地上部の概日リズムの精度を制御する可能性が考えられた。

陽イオンの輸送量の変動が、新たに見いだされた地上部における概日リズムの安定性制御に関わっているかを検証するため、すでに概日リズムの周期長や振幅に作用することが示されている陽イオン Mg²⁺、Ca²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺にくわえて、植物体内にもっとも多く含まれており、陽イオンの状態で機能する K⁺を欠乏させた寒天培地を調製し、これらの培地で植物を生育させることで概日リズムの安定性を評価した。

全ての実験を接ぎ木実験で行うことは、材料の準備の手間を考えると現実的ではない。植物の 80-90%の RNA が地上部に由来することから、*LHYpro:LUC* で観察される生物発光のほとんどは地上部に由来し、このリズムを地上部の概日リズムと見なすことができると考えられた。このことを確認するため、EM-CCD カメラを用いて *LHYpro:LUC* の空間発現パターンおよび輝度を定量的に計測した。その結果、*LHYpro:LUC* の生物発光は植物体全体で認められるものの、ほとんどは地上部 (主に葉) に由来することが明らかになり、*LHYpro:LUC* が示す概日リズムは地上部の概日リズムを反映しているとみなせることを確認した (図 10A、図 10B)。この方法によって地上部の概日リズムを計測し、周期長のばらつきを算出したところ、K⁺欠乏条件および Fe²⁺欠乏条件では、通常条件に比べてばらつきが顕著に増大していた (図 11A、図 11B、図 11C)。このことから、K⁺および Fe²⁺の輸送の阻害、もしくは欠乏シグナルが地上部における概日リズムの安定性を低下させることが明らかとなった。

K⁺欠乏条件において周期長のばらつきが特に著しかったことから、本研究で

は概日リズムの安定性と K^+ の関係に着目してさらに解析を行った。次に、こうした K^+ 欠乏条件で見られた概日リズムのばらつきが、根への K^+ 投与で回復できるのかを調べるため、 K^+ 欠乏培地で生育した植物の根に対して外部から KCl を投与することで培地中 K^+ 濃度を回復させた条件 (K^+ 回復条件) を設定し、この条件における *LHYpro:LUC* が示す概日リズムのばらつき、および平均周期長、振幅を解析した。なお、根からの K^+ の輸送の影響を正確に解析するために、根を滅菌済みのプラスチックシートで覆い、シート下部に KCl を投与することで、地上部への KCl の飛散を防ぐ工夫をした (図 1 2 A)。

すでに示したように、 K^+ 欠乏条件では概日リズムの周期長のばらつきは通常条件よりも有意に増大していた。同じ実験環境において、 K^+ 回復条件では周期長のばらつきは通常条件と同程度であり、 K^+ 欠乏条件で見られたばらつきは抑制されていた (図 1 2 B、図 1 2 C)。この結果は、根からの K^+ の輸送が地上部における概日時計の精度を向上させていることを意味し、根が地上部の概日リズムの安定性を制御していることが示された。ただし、 K^+ 欠乏条件で観察されていた概日リズムの長周期化および低振幅化は、 K^+ 回復条件では回復しなかったことから (図 1 2 D、図 1 2 E)、根からの K^+ の輸送が地上部における概日リズムの平均周期長や振幅には影響せず、独立のパラメーターであると予想された。

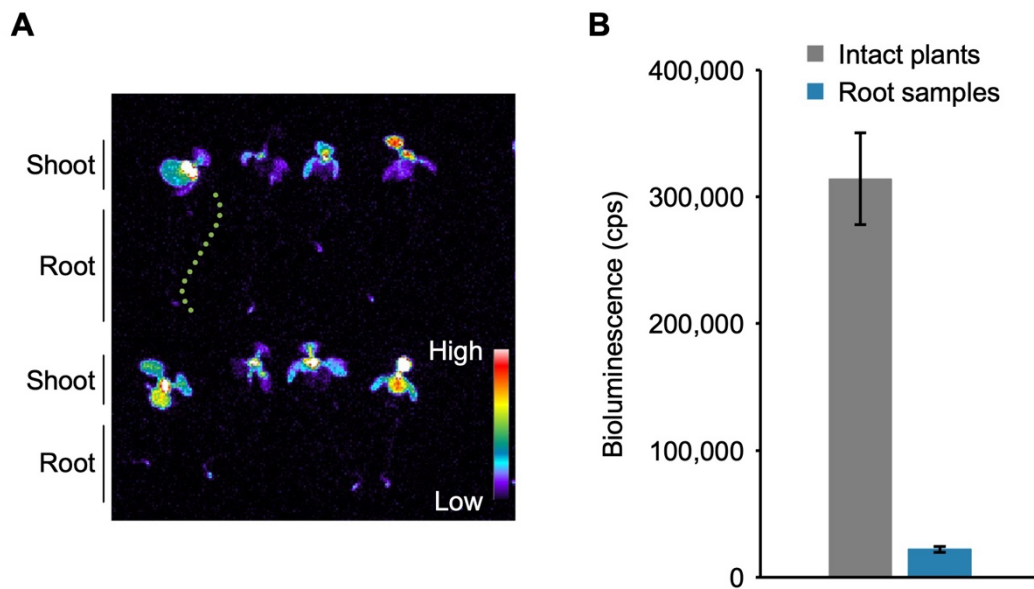


図 10 : *LHYpro:LUC*における、芽生え全体および根の発光強度の比較

LL 条件開始後 2 時間の時点での *LHYpro:LUC* の発光イメージングと定量した発光量。(A) 通常条件における *LHYpro:LUC* の発光を擬似カラーで示した。緑の破線は根の位置を示す。(B) 芽生え全体と根のみのサンプルからの発光強度の比較。 $n = 5$ 。エラーバーは標準誤差を示す。cps は counts per second であり検出した 1 秒あたりの光子数を表す。

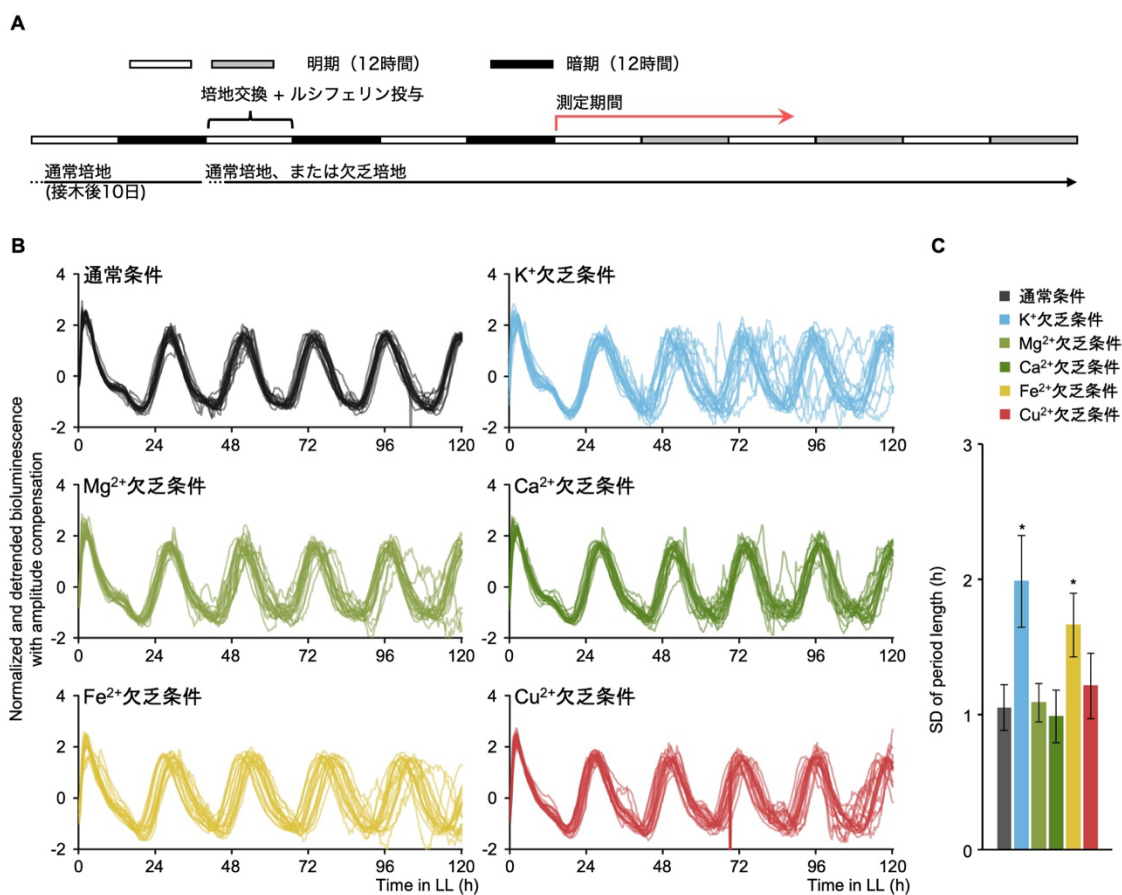


図 1 1 : 各陽イオン欠乏条件における *LHYpro:LUC* の発光リズム

(A) 実験条件の模式図。(B) 通常条件、K⁺欠乏条件、Mg²⁺欠乏条件、Ca²⁺欠乏条件、Fe²⁺欠乏条件、Cu²⁺欠乏条件における *LHYpro:LUC* の個体ごとの発光リズムを示す。それぞれの波形は、ピークの位置がわかりやすいようにトレンド除去処理および振幅トレンドの除去を行った。(C) LL 条件下 120 時間以内に観察できる 4 つの周期の長さを個体ごとに測定し、周期長のばらつき (標準偏差, SD) を算出した。n = 20。エラーバーは標準誤差を示す。* P < 0.05。Dunnett's test を用いて、通常条件との比較を行った。

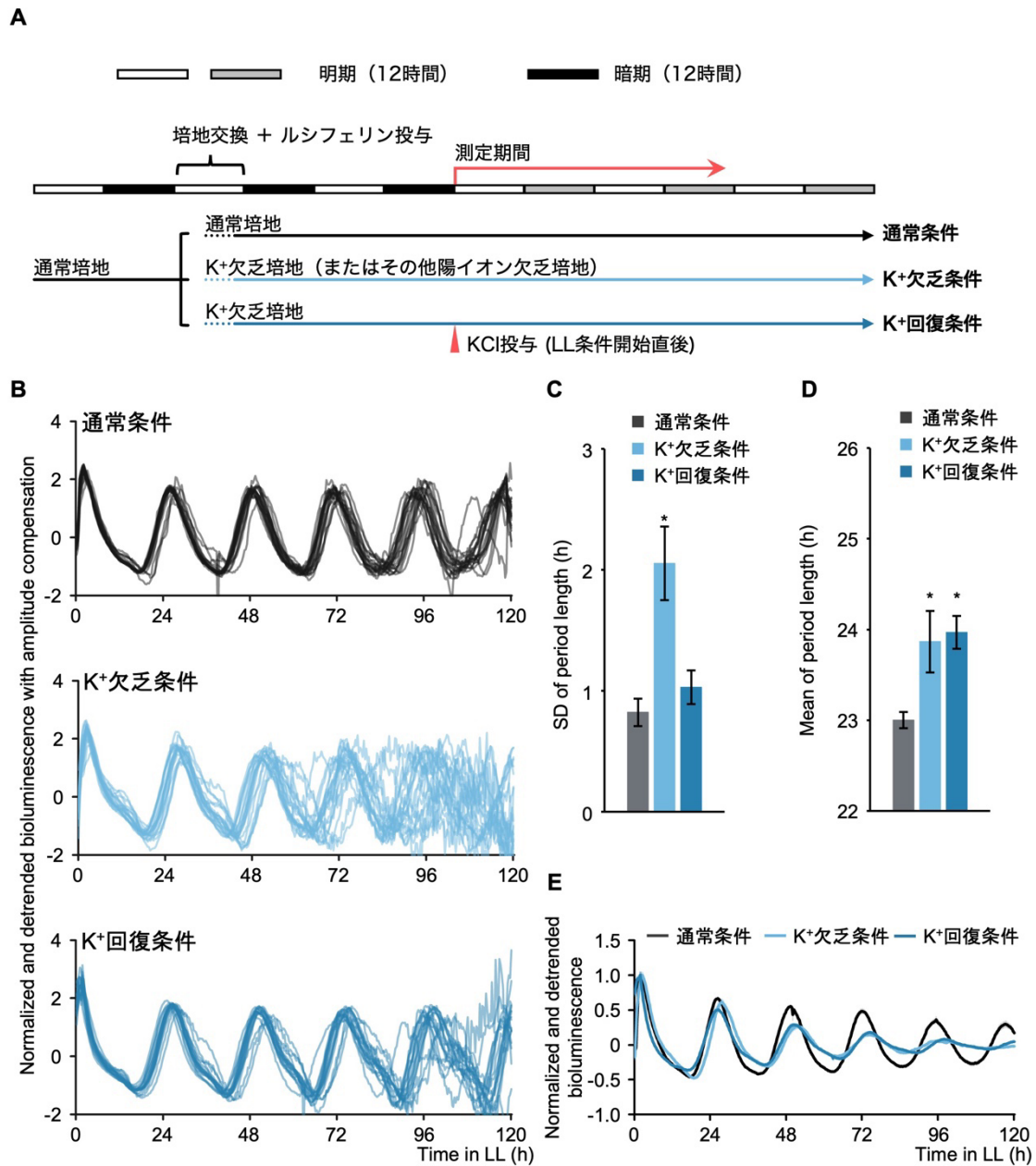


図 1 2 : K⁺欠乏条件における *LHYpro:LUC* の発光リズム

(A) 実験条件の模式図。(B) 通常条件、K⁺欠乏条件、および K⁺回復条件における *LHYpro:LUC* の個体ごとの発光リズムを示す。それぞれの波形は、ピークの位置がわかりやすいようにトレンド除去処理および振幅の減衰補正を行っている。K⁺回復条件における KCl の投与は LL 条件開始直後 (Time 0) に行った。(C, D) LL 条件下 120 時間以内に観察できる 4 つの周期の長さを個体ごとに測定し、平均周期長および周期長のばらつき (標準偏差、SD) を算出した。(E) ト

レンド除去のみを行った *LHYpro:LUC* の平均発光リズムを示す。 $n = 20$ 。エラーバーは標準誤差を示す。 * $P < 0.05$ 。 Dunnett's test を用いて、通常条件との比較を行った。

K⁺は植物体内で最も要求量の多い陽イオンであり、植物体内の pH 制御や膜電位の形成、タンパク質合成などの重要な生理機能において重要な因子である (Clarkson and Hanson, 1980; Leigh and Jones, 1984)。また、葉緑体において K⁺は高濃度に維持されており、光合成関連因子の活性化を促している (Szczerba et al., 2009)。さらに、長期間の K⁺欠乏に晒された植物では活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) が蓄積することで、白化現象が誘発される (Armengaud et al., 2004) など、K⁺は植物体内で多面的な機能を有しており、その欠乏は植物体内の様々な恒常性を破綻させ、植物の生理機能を大きく損なう。こうしたことから、本研究で観察された地上部における概日リズムの周期長のばらつきの増大は、K⁺輸送の阻害ではなく、地上部での K⁺欠乏による生理機能の低下に起因する可能性は排除できていない。そこで、K⁺欠乏条件による生育不良、白化現象、および光合成活性の低下に着目し、これらが周期長のばらつきの原因であるかどうかについて検証を行なった。

本研究で用いた K⁺欠乏条件が植物の成長に与える影響を観察したところ、K⁺欠乏条件で生育した植物は少なくとも計測期間中において顕著な植物個体サイズの縮小や白化現象は観察されなかった (図 1 3)。さらに、K⁺欠乏条件にショ糖を添加することで、仮に光合成活性が低下しているならば、その影響を緩和できると考えた。しかし、ショ糖を投与しエネルギー不足ではない条件においても、K⁺欠乏条件で引き起こされる周期長のばらつきは抑えることができなかった (図 1 4 A、図 1 4 B)。さらに、K⁺欠乏によるその他の生理機能の低下が周期長のばらつきを生み出している可能性を検証するため、通常よりも K⁺濃度の高い培地条 (K⁺過剰条件) において概日リズムの測定を行なった。一般に K⁺は野外において慢性的に不足している元素であり、この条件では見た目にも大きな変化は観察されなかった一方で、K⁺過剰条件でも周期長のばらつきの増大が認められた (図 1 5 A、図 1 5 B)。

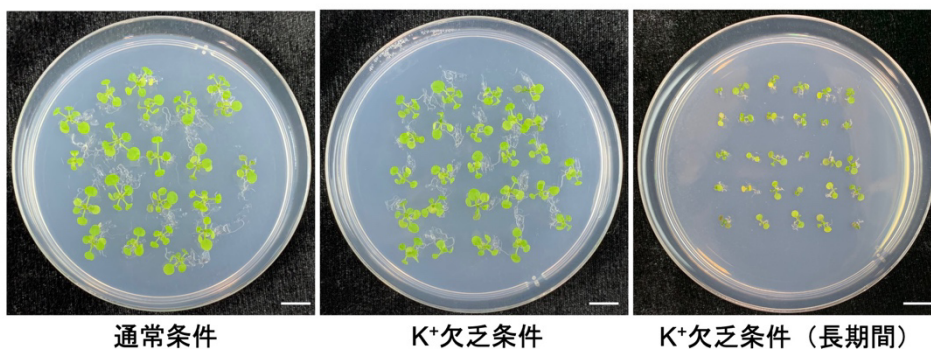
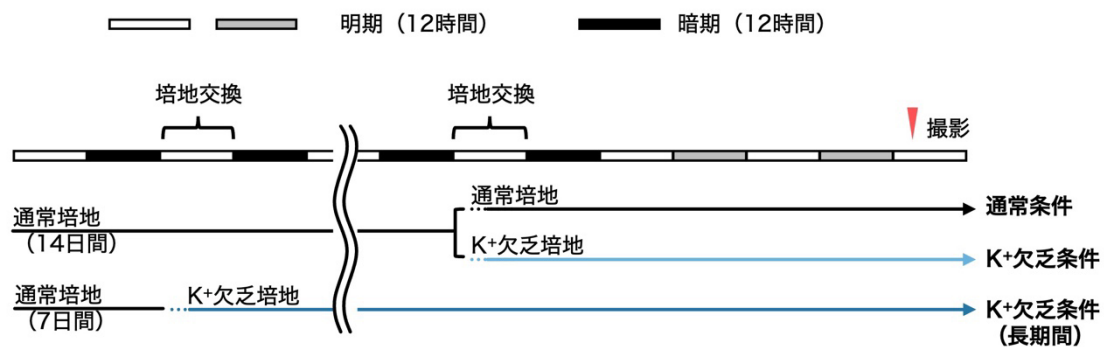


図 1 3 : K⁺欠乏条件における成長への影響

通常条件、K⁺欠乏条件、より長期間の K⁺欠乏条件に暴露した条件における、LL 条件下 3 日目での植物体の様子。図上部には、実験条件の模式図を示した。より長期間の K⁺欠乏条件においた植物では、通常条件で生育した 7 日齢植物体を K⁺欠乏条件に移植し、さらに 9 日間生育し、その後 LL 条件に切り替えた。スケールバーは 1cm。

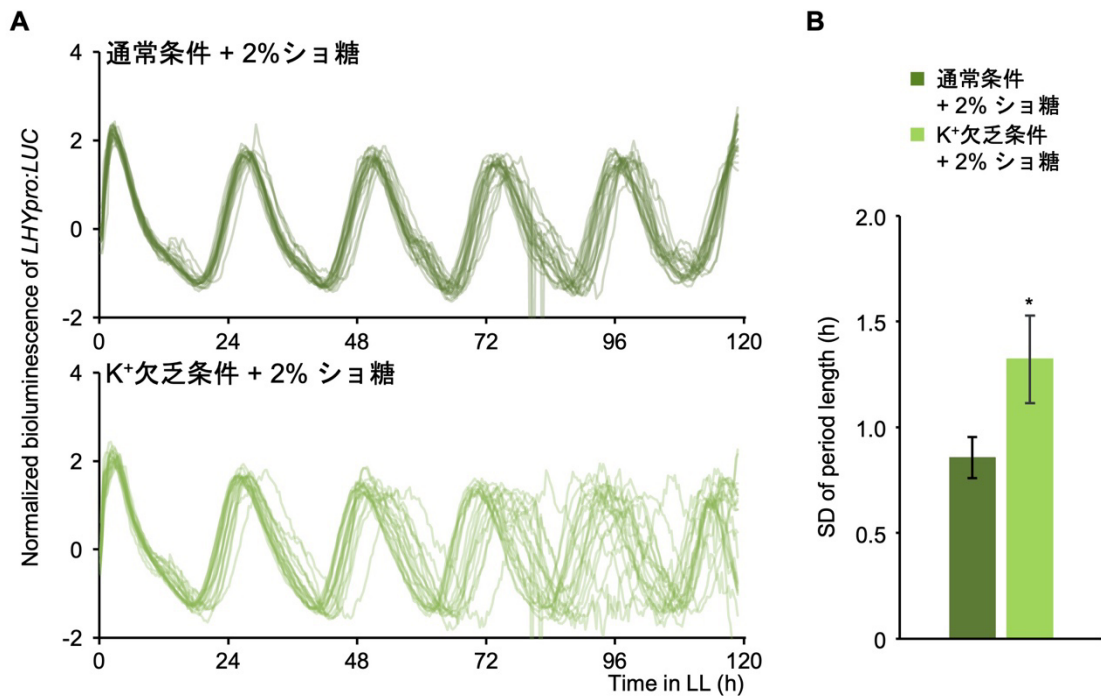


図 1 4 : シヨ糖添加時の、 K^+ 欠乏条件における *LHYpro:LUC* の発光リズム

(A) 通常条件、および K^+ 欠乏条件にシヨ糖を加えた際の、*LHYpro:LUC* の個体ごとの発光リズムを示す。それぞれの波形は、ピークの位置がわかりやすいようにトレンド除去処理および振幅の減衰補正を行っている。(B) 植物個体ごとの周期長の標準偏差 (SD) から求めた、周期長のばらつき。 $n = 20$ 。エラーバーは標準誤差を示す。* $P < 0.05$ 。Student's *t*-test を用いて、通常条件に 2%シヨ糖をくわえた条件との比較を行った。

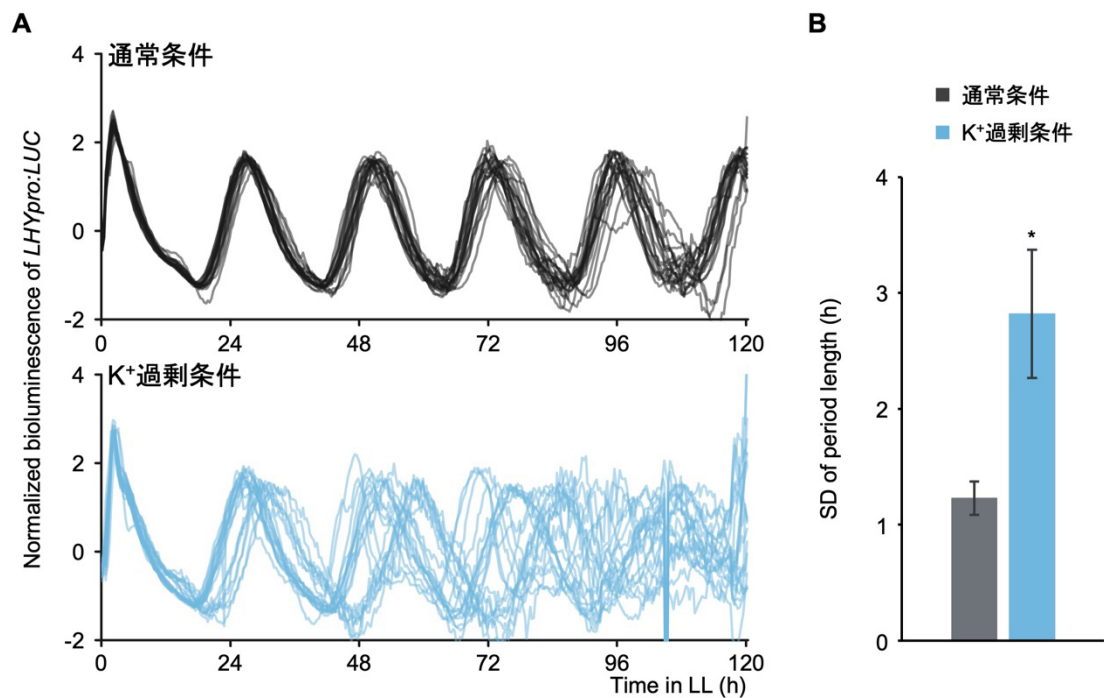


図 15 : K⁺過剰条件における *LHYpro:LUC* の発光リズム

(A) 通常条件、および K⁺過剰条件にショ糖を加えた際の、*LHYpro:LUC* の個体ごとの発光リズムを示す。それぞれの波形は、ピークの位置がわかりやすいようにトレンド除去処理および振幅の減衰補正を行っている。(B) 植物個体ごとの周期長の標準偏差 (SD) から求めた、周期長のばらつき。n = 20。エラーバーは標準誤差を示す。* P < 0.05。Student's *t*-test を用いて、通常条件との比較を行った。

さらに、地上部の概日リズムの安定性に対する根からの K^+ の輸送の重要性をより詳細に確認するため、水耕培地を用いて一過的に K^+ を植物に与え、地上部の概日リズムの周期長のばらつきを測定した。寒天培地での結果と同様に、 K^+ 欠乏条件では顕著に周期長のばらつきが増大していた (図 1 6 A、図 1 6 B)。一方で、LL 条件下 9 時間後から 15 時間後までの期間で通常培地に切り替え、一過的に培地中 K^+ 濃度を回復させた条件 (K^+ パルス条件) では周期長のばらつきが抑制されていた。こうしたことから、概日リズムを安定化させるうえで K^+ は常に必要ではないことが明らかとなり、他の概日時計の入力刺激と同様、あるタイミングで入力される一過的な刺激が時間情報を伝えている可能性が示唆された。

これらの結果から、地上部における概日リズムの周期長のばらつきは、植物体内の K^+ 欠乏シグナルおよび K^+ 欠乏に伴う生理機能の低下が原因ではなく、時間情報シグナル分子としての K^+ が根から地上部へと正常に伝達できなかったことが原因であると考えられた。

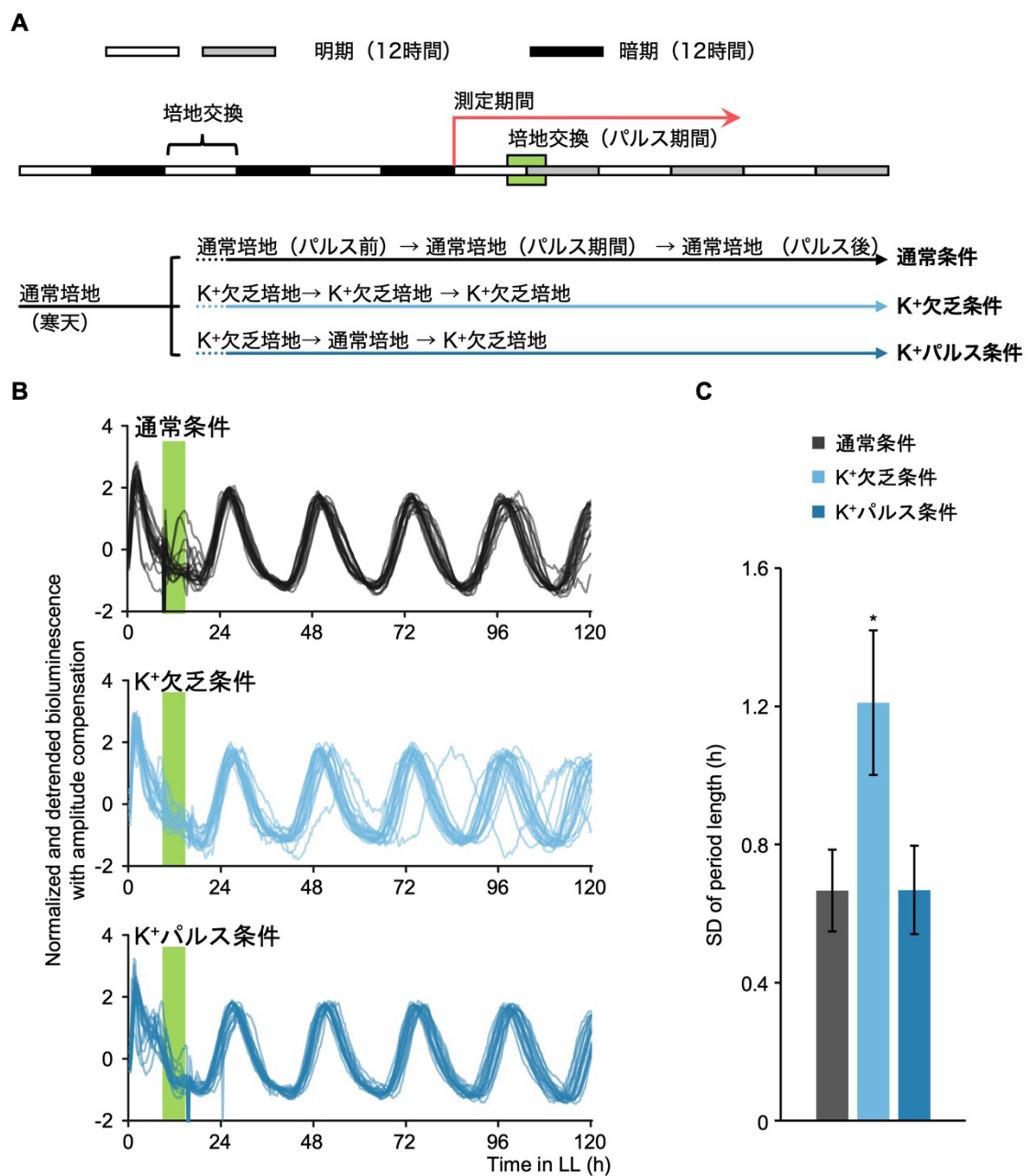


図 16 : K⁺パルス条件における *LHYpro:LUC* の発光リズム

(A) 実験条件の模式図。(B) 通常条件、K⁺欠乏条件、および K⁺パルス条件の、*LHYpro:LUC* の個体ごとの発光リズムを示す。それぞれの波形は、ピークの位置がわかりやすいようにトレンド除去処理および振幅の減衰補正を行っている。なお、緑帯は K⁺ のパルス処理期間 (6h) を示す。(C) 植物個体ごとの周期長の標準偏差 (SD) から求めた、周期長のばらつき。n = 20。エラーバーは標準誤差を示す。* P < 0.05。Dunnett's test を用いて、通常条件との比較を行った。

根の PRR7 は地上部への陽イオン輸送の制御に関わる

接木実験および K^+ 欠乏培地を用いた実験により、根の PRR7 および K^+ の輸送がそれぞれ地上部における概日時計の精度に重要であることが明らかとなった。これらの結果から、根の PRR7 が K^+ の輸送を制御することで、地上部における概日時計の精度を向上させている可能性が考えられた。そこで、PRR7 が K^+ の輸送を制御しているかどうかを検証するため、道管液を対象に解析を行い、イオン濃度の変動を測定した。本研究では、 K^+ の濃度にくわえて、測定が可能であった Mg^{2+} および Ca^{2+} の濃度変動についても解析を行った。発光測定で用いた実験条件と同様に、 $22^{\circ}C$ LD 条件下において通常培地で 14 日間生育した植物体を、新規の通常培地に植え替え、さらに 2 日間 $22^{\circ}C$ LD 条件でエントレインを行った後、LL 条件に移行した。LL 条件 48 時間後から 68 時間後の期間で、4 時間おきにサンプリングを行った。また、解析は各サンプリング時刻から 1 時間以内に、30 個体の胚軸先端から得られた道管液に対して行った (図 1 7A)。

WT、*prp7* および *PRR7-OX* に対して解析を行ったところ、WT では最大で 2 倍程度のイオン濃度の時間変動が見られたのに対して、*prp7* および *PRR7-OX* の両方では K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} の道管液中濃度の時間変動がほぼ失われ、 K^+ や Mg^{2+} では低いレベルでほぼ一定のイオン濃度を示しており (図 1 7B、図 1 7C)、PRR7 が道管液中のイオン濃度の時間変動に関わっていることが示唆された。

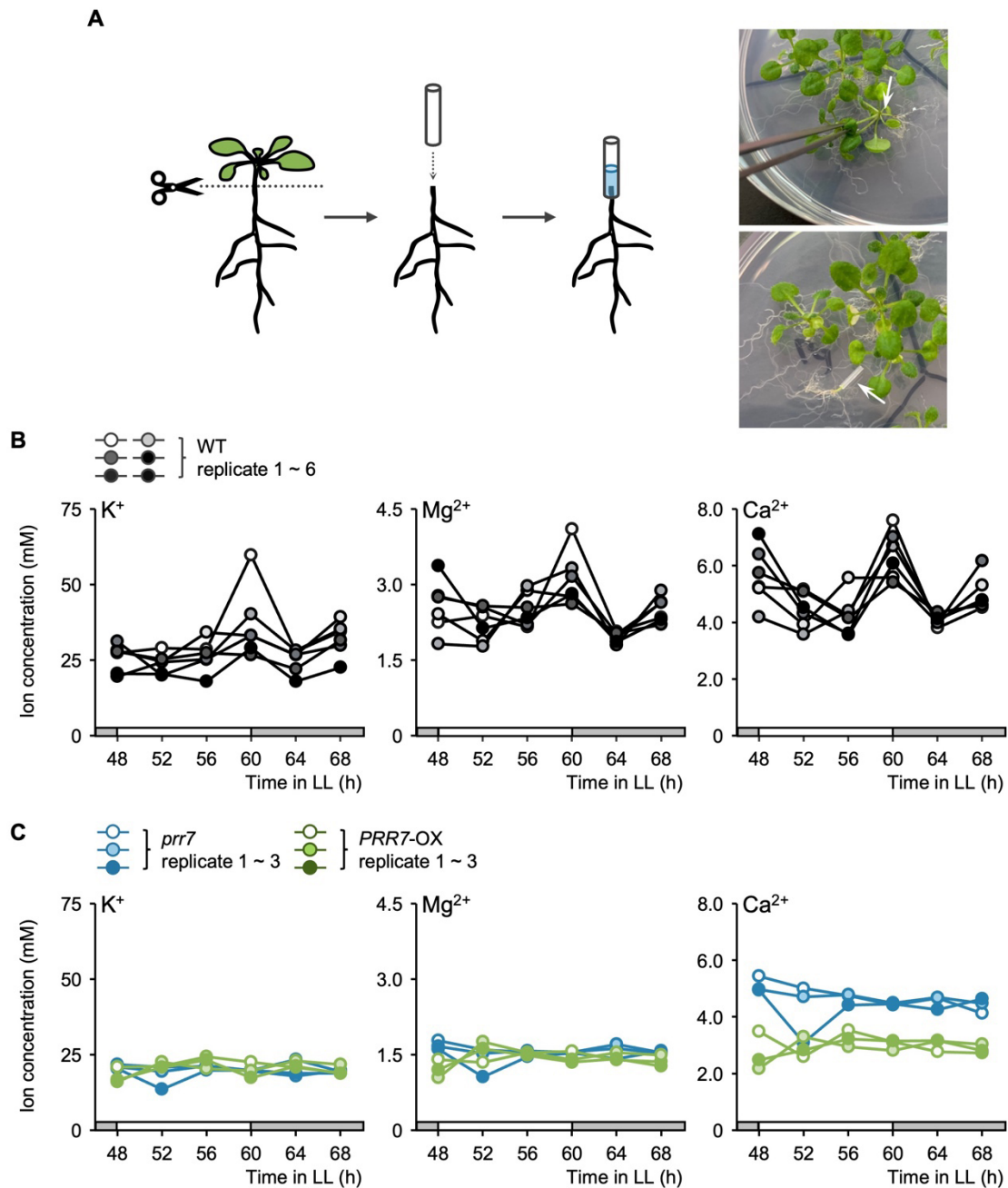


図 17：道管液中陽イオン濃度の変動

(A) 道管液採取の様子。胚軸の先端部分をマイクロ剪刀で切断し、内径 0.5 mm のシリコンチューブを被せる。1 時間のうちに、シリコンチューブ内に溜まった滲出液を回収し、イオンクロマトグラフィーを用いて解析を行った。右上図は切断の箇所を、右下図はシリコンチューブを被せた状態の実際の様子。(B, C) 道管液中陽イオン濃度 (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) の変動。試行ごとの濃度変動を示した。

道管液中陽イオン濃度は、外部環境からの陽イオンの取り込み、および道管への陽イオンの積み込みだけでなく、道管を通る水の量にも大きく左右される。先行研究によって、PRR7が気孔コンダクタンスを上昇させ、蒸散を促進する可能性が示唆されていたため (Liu et al., 2013)、実際に PRR7 が根における陽イオンの取り込み・輸送を制御しているかどうかについては疑問が残った。そこで、蒸散速度から単位時間あたりに輸送される水分量を測定し、地上部に輸送された陽イオンの総量を推定することで、陽イオンの輸送における根の PRR7 の関与を検証した。なお、蒸散速度の測定は、山口大学 植物細胞シグナル学研究室の武宮淳史准教授および山内翔太博士と共同で行った。蒸散速度の測定は PRR7 の発現ピークが観察された LL 条件 60 時間後と、逆位相の LL 条件 48 時間後で測定を行い、PRR7 が蒸散に及ぼす影響を観察した。LL 条件 48 時間後および 60 時間後の両方において、WT と比べて、*prrr7*には明確な蒸散速度の変化は観察されなかったが、*PRR7-OX*では顕著に増加していた (図 1 8 A、図 1 8 B)。この結果は、少なくとも *PRR7-OX*では気孔コンダクタンスが上昇し、蒸散速度が向上していることを示している。これは先行研究で示されていた傾向とも一致している。

次に、得られた蒸散速度の平均値と道管液中陽イオン濃度の平均値を乗算することで、単位時間あたりに根から地上部へと輸送される陽イオンの量を推定した。WT と比べて、*prrr7*では K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} の全てで輸送量が低下していた (図 1 8 C)。また、WT では LL 条件 48 時間後と 60 時間後とで、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} の全て輸送量の差はほとんど観察されなかったのに対して、*PRR7-OX*では LL 条件 60 時間後で顕著に輸送量が上昇していた。LL 条件において *PRR7-OX*は概日リズムの振動が完全に消失する形質転換体であるため、この結果には他の時計遺伝子の発現が変化した影響も含まれることが予想されるが、少なくとも PRR7 が陽イオンの輸送量を直接的または間接的に制御していることが明らかとなった。陽イオンの輸送量は、根における培地からの陽イオンの吸収または道管への積み込み (もしくはその両方) に強く依存すると考えられる。このことを考慮すると、PRR7 は根における K^+ を含む陽イオンの吸収または道管への積み込みを制御している可能性が示された。根の PRR7 および K^+ の輸送のそれぞれが地上部における概日時計の精度に貢献しているとする結果を考慮すると、PRR7 が K^+ の輸送を制御することを示唆したこの実験結果は、根の PRR7 が K^+ 輸送の制御を介して地上部における概日時計の精度を向上させる可能性を示唆している。

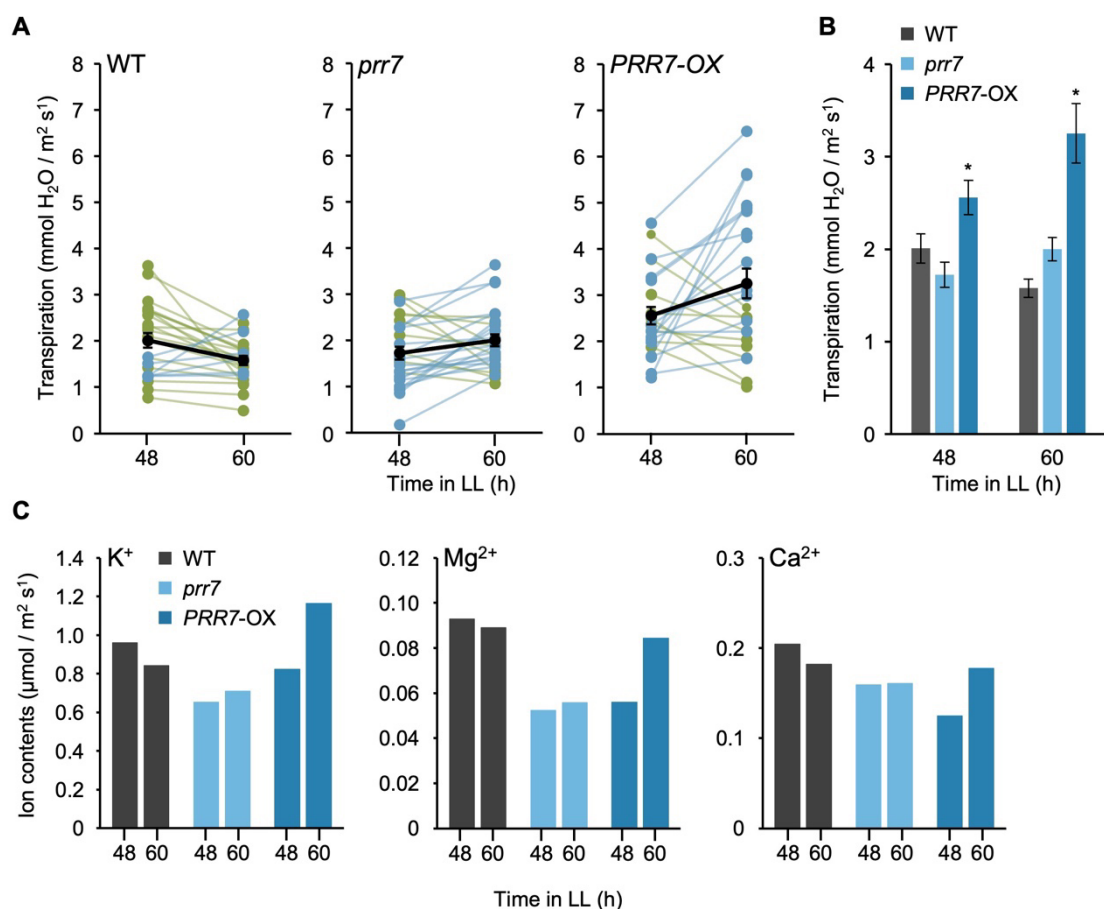


図 18 : 蒸散量、および想定される各イオンの輸送量

(A) 通常培地で 2 週間生育した後、土植えに移行し、さらに 2 週間生育した個体を用いた。LL 条件下 48 時間後と 60 時間後の蒸散速度を示した。48 時間後よりも 60 時間後の蒸散速度が増加傾向にあった個体を青、減少傾向にあった個体を緑で示している。黒線は平均を示す。(WT; $n = 24$, *prr7*; $n = 27$, *PRR7-OX*; $n = 23$)。 (B) 蒸散速度の平均値の比較。* $P < 0.05$ 。Dunnett's test を用いて、WT との比較を行った。(C) 道管液中陽イオン濃度と蒸散速度から算出した単位時間あたりの陽イオン (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) の想定される輸送量。

根の PRR7 は、*AHA1* の発現を介して陽イオンの輸送を制御している可能性がある

根の PRR7 が K^+ を含めた陽イオンの吸収または道管への積み込みを制御する可能性が示されたことから、転写因子である PRR7 の直接の下流で陽イオンの吸収や道管への積み込みに関与する遺伝子の探索を目指した。公開されている ChIP-seq のデータの中から、*AUTOINHIBITED H⁺-ATPASE 1 (AHA1)* に着目した (Liu et al., 2013)。*AHA1* は細胞膜 H^+ -ATPase をコードしており、細胞膜内外での電気化学的勾配の形成を通じてチャネルを介したイオンの移動を促進する機能をもつ (Palmgren, 2001)。実際、孔辺細胞においては H^+ -ATPase が活性化することで、 K^+ チャネルを介した K^+ の移動が促進されることが示されている (Shimazaki et al., 2007; Kim et al., 2010)。このことから、PRR7 による根からの K^+ 輸送の制御に *AHA1* が関与している可能性を考えられた。

そこで、WT、*prp7*、*PRR7-OX* の根における *AHA1* の発現を qPCR で確認した。WT と比べて、*prp7* では *AHA1* の発現は上昇しており、*PRR7-OX* では *AHA1* の発現が低下していることが観察された (図 1 9 A)。一般に PRR7 を含む PRR ファミリーの転写因子は転写抑制因子として機能することが多いことから、この結果は PRR7 が根の *AHA1* に対して直接的に発現制御を行っているとの仮説と矛盾しない結果であった。

次に、*AHA1* が実際に K^+ を含む陽イオンの吸収または輸送に関与しているかどうかを検証するため、*aha1* における道管液中の陽イオン濃度を解析した。興味深いことに、*aha1* においても *prp7* や *PRR7-OX* と類似したイオン濃度の表現型を示し、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} の道管液中濃度の時間変動は野生型よりも低減していた (図 1 7 B、図 1 9 B)。*prp7* や *PRR7-OX* の場合とは異なり、*aha1* では蒸散速度には WT と顕著な差は観察されなかったが、道管液中陽イオン濃度の平均値と蒸散速度の平均値を乗算することで得られた陽イオンの推定輸送量は K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} のいずれにおいても *aha1* で減少する傾向が観察された (図 1 9 C、図 1 9 D)。このことから、*AHA1* も根における K^+ を含む陽イオンの吸収または道管への積み込みを制御している可能性が示された。

しかし、*PRR7-OX* では *AHA1* の発現量が低下したことから、ヌル変異体である *aha1* は *PRR7-OX* 同じ傾向を示すと予想されたにも関わらず、実際には推定される陽イオンの輸送量においては異なる傾向を示し、*prp7* と同様に全ての陽イオンの推定輸送量が低下する傾向が観察された (図 1 8 C、図 1 9 A、図 1 9 D)。以上のことから、PRR7 による K^+ 輸送の制御は *AHA1* の発現制御を介して行われる可能性は示唆されたものの、本実験だけからは *AHA1* の積極的な

関与は結論づけられなかった。

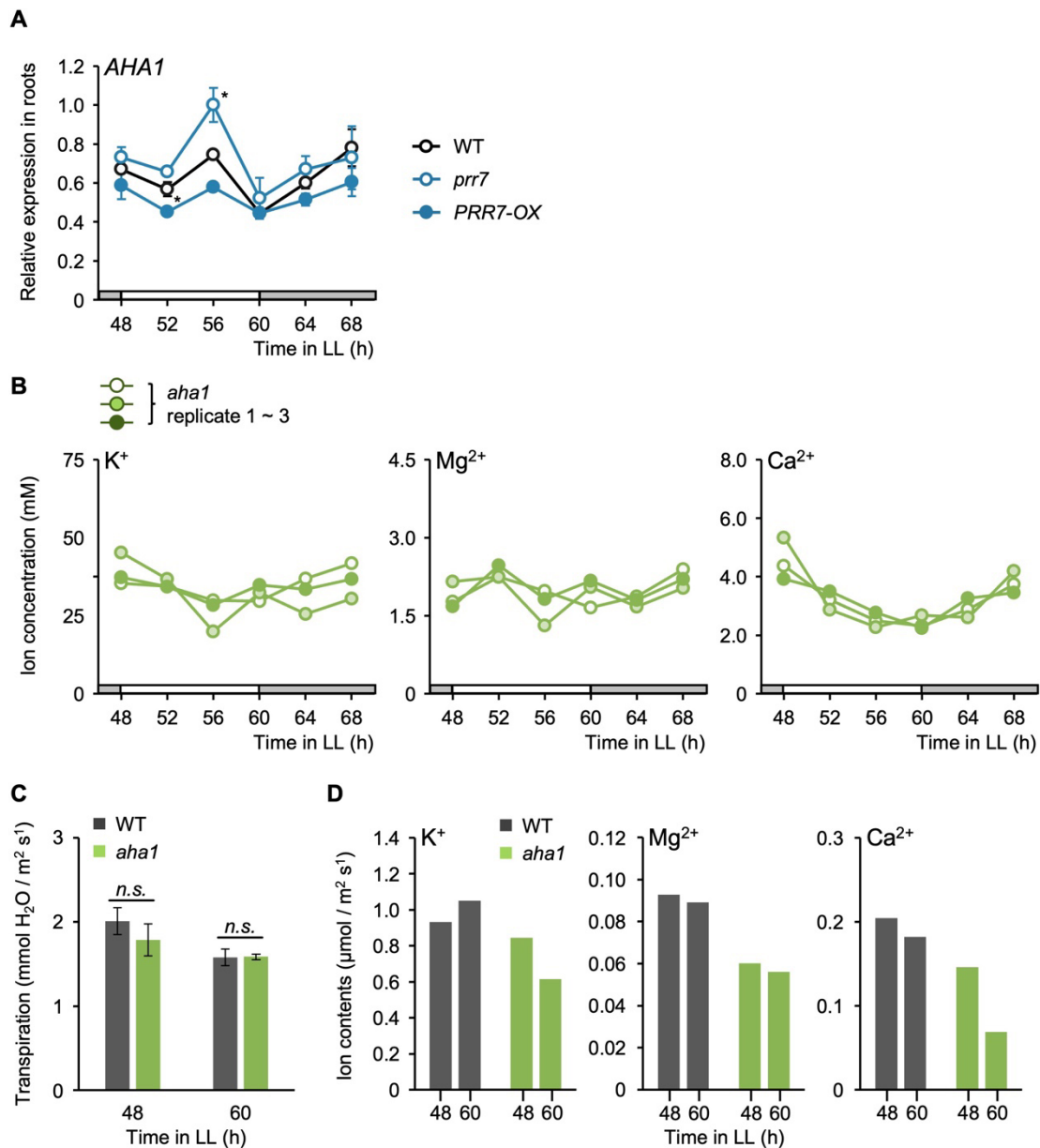


図 19：蒸散量、および想定される各イオンの輸送量

(A) WT、*prr7* および *PRR7-OX* の根における *AHA1* の発現パターン。エラーバーは標準誤差を示す。n = 3。* $P < 0.05$ 。Dunnnett's test を用いて、WT との比較を行った。(B) *aha1* における道管液中陽イオン濃度 (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) の変動。試行ごとの濃度変動を示した。(C) 蒸散速度の平均値の比較。* $P < 0.05$ 。Student's *t*-test を用いて、WT との比較を行った。(D) 道管液中陽イオン濃度と蒸散速度から算出した単位時間あたりの陽イオン (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) の想定される輸送量。

根からのシグナル伝達は、ノイズの大きい環境条件下での周期長の安定性に寄与する可能性がある

ここまでの結果から、地上部から根の概日時計に対するシグナル伝達にくわえて、根から地上部の概日時計に対するシグナル伝達が存在し、地上部における概日時計の精度に重要であることが強く示唆された。同質の2つの振動子が結合した単純な2振動子モデルを用いた研究から、振動子の結合が互いの生み出すリズムを安定化し、ノイズの影響を小さくすることが知られている (Forger and Peskin, 2005)。本研究で観察された、根の PRR7 が地上部における概日時計の精度に貢献するのは、地上部と根の概日時計が互いに結合することによって引き起こされている可能性が考えられた。しかし、近年の報告から、周期長や振幅の違いといった概日時計の組織特異性、相互作用における情報伝達の手速やシグナル強度の違いなどが明らかになりつつあり、実際の地上部-根間における概日時計の相互作用はより複雑であることが予想された。少なくとも、これまでの単純な2振動子モデルでは以下の四つの点について考慮されていない。

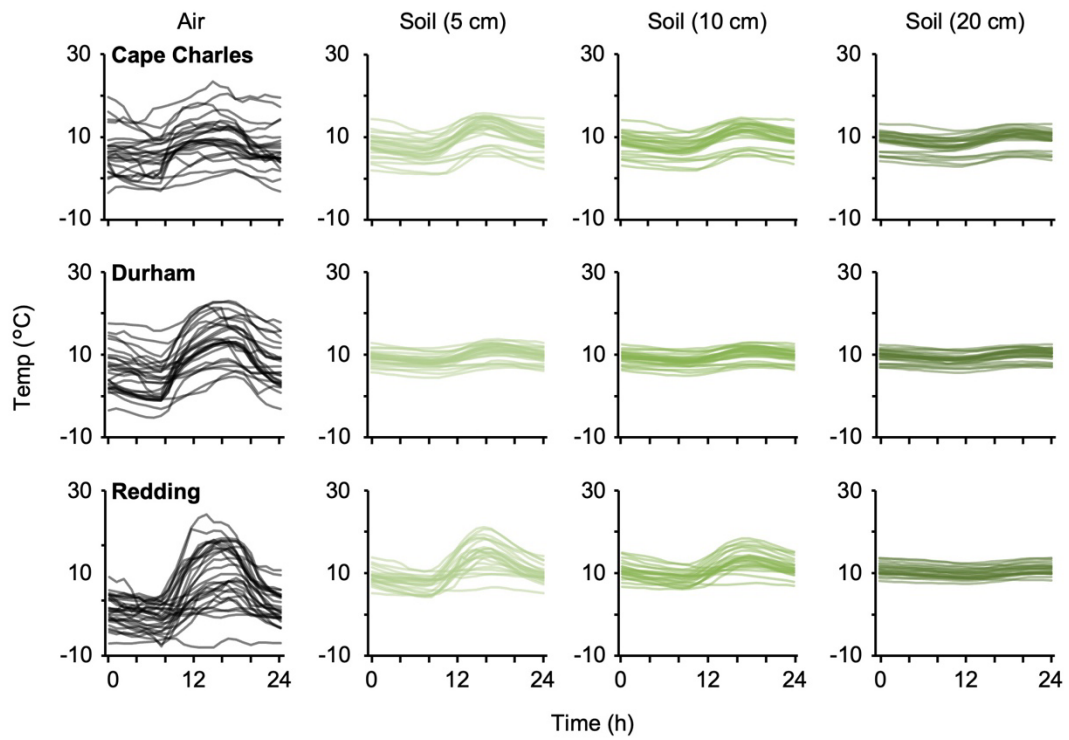
第一に、地上部と根の概日時計は同質な振動子ではない (Takahashi et al., 2015; Greenwood et al., 2019; Chen et al., 2020)。根の概日リズムは地上部の概日リズムよりも長周期かつ低振幅であるが、これまでの数理モデルでは同質な概日時計を前提としていた。

第二に、地上部と根の間でのシグナルに対する感受性には違いがある。先行研究によって、根の概日リズムは地上部の概日リズムの周期、振幅、位相の影響を強く受ける一方で、地上部の概日リズムが根の概日リズムから受ける影響は小さいことが示唆されている (Takahashi et al., 2015)。しかし、一方の振動子が他方への振動子に与える影響は計算の簡便さから等価とされていた。

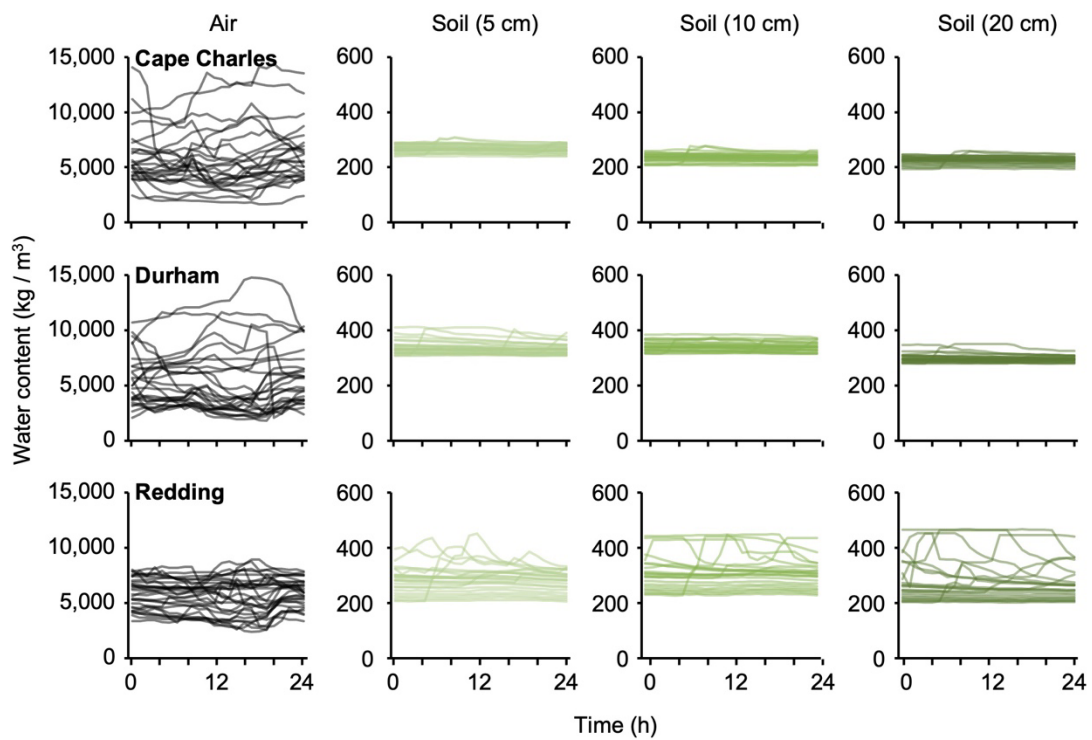
第三に、シグナル伝達が維管束を介した物質輸送にかかる時間遅れを考慮していない。道管液および篩管液の流速から、地上部-根間での物質のやり取りに約 0.5~1.0 時間ほど要することが示唆されている (Knox et al., 2018; Endo et al., 2019)。これまでの数理モデルでは、現実に即した時間遅れは考慮されておらず、ある振動子への影響は即座にもう一方の振動子に伝わると仮定されていた。

第四に、地上部と根が受ける環境ノイズの大きさは異なる。実際、公開されたデータベースより取得したアメリカ3都市における大気中と土中の温度および水分量の時系列データ（**図20A**、**図20B**；<https://www.ncei.noaa.gov/pub/data/uscrn/products/hourly02/2019/>）を Seasonal Trend-decomposition procedure based on Loess (STL)分解することで、長期的な変動を示すトレンド、周期的な変動を示すサイクル、および時系列データからそれらを引いた残差（ノイズ）に分解した。土中と大気中のノイズの大きさを比較したところ、大気中（地上部）の方が気温および湿度の変動にノイズが大きく、根は比較的ノイズが低い環境であることが示された（**図20C**）。しかし、2振動子モデルは主に理論的な枠組みでしか考えられてこなかったことから、ノイズの強さが異なる仮定は入っていない。

A



B



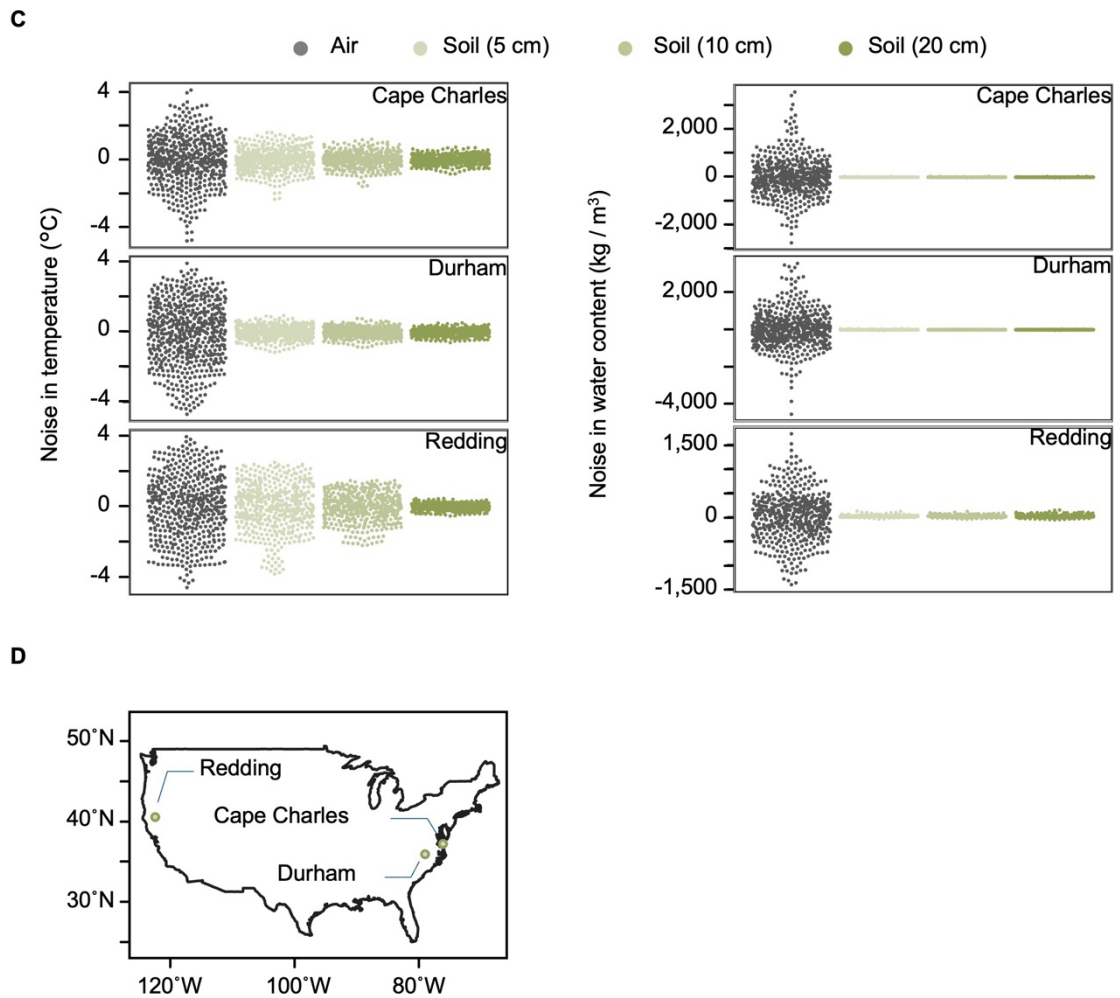


図 2 0 : 2019 年における、アメリカ 3 都市での気温および湿度の変動

2019 年春におけるアメリカ 3 都市 (Cape Charles, Durham, Redding) における気温 (または地温) (A) と絶対容積湿度 (B) を示した。(C) STL 分解によって算出された残差。(D) アメリカ 3 都市の位置。Cape Charles; $n = 576$, Durham; $n = 624$, Redding; $n = 528$ 。

共同研究者である九州大学 生体情報数理学講座 伊藤浩史・准教授および森史・助教の指導のもと、私自身がこうした事実を取り込んだ数理モデルを構築し、これを用いることで、根の概日時計が地上部における概日時計の精度に貢献するかどうかを検証した。

本研究で新たに確立したモデルでは、周期長の異なる 2 つの振動子を結合させ、その結合強度と時間遅れ、および各振動子に入力されるノイズの大きさを調節している (図 2 1)。地上部モデルと根モデルの示す挙動は、周期と振幅の情報を含んだ z_1 と z_2 の複素変数でそれぞれ示した。 α_1 と β_1 、および α_2 と β_2 は、それぞれ地上部モデルと根モデルの振動体が示す固有振動子数および振幅を決定する定数であり、地上部モデルと比べて根モデルがより長周期で低振幅になるように設定した。地上部モデルと根モデルに入力されるノイズは $\xi_1(t)$ と $\xi_2(t)$ として設定し、その強度を D_1 と D_2 で調整した。シグナル伝達に伴う時間遅れは Δt で設定し、結合強度の強さは k で設定している。

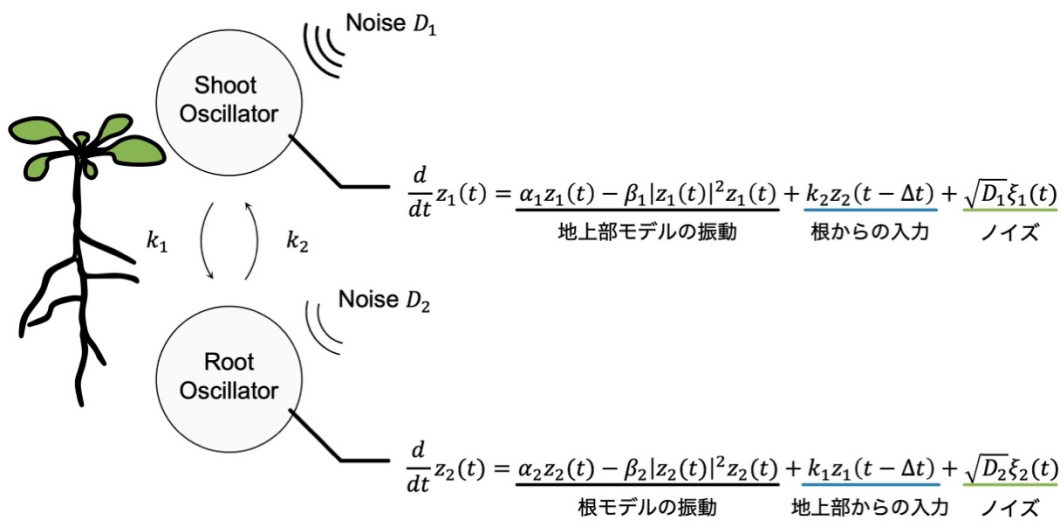


図 2 1 : 構築した数理モデルの模式図

$\alpha_1 z_1(t) - \beta_1 |z_1(t)|^2 z_1(t)$ と $\alpha_2 z_2(t) - \beta_2 |z_2(t)|^2 z_2(t)$ は時間 t における、地上部と根の振動子が示す位相および振幅である。 $k_1 z_1(t - \Delta t)$ と $k_2 z_2(t - \Delta t)$ は、それぞれ地上部と根からの入力シグナルを示している。 $\sqrt{D_1} \xi_1(t)$ と $\sqrt{D_2} \xi_2(t)$ はそれぞれ地上部と根に入力されるノイズを示す。

このモデルを用いて、振動子間におけるシグナル伝達が与える周期長のばらつきへの影響を検証した（図 2 2 A、図 2 2 B）。2 振動子が独立している条件と比較して、「根から地上部への結合」のみ、あるいは、「地上部から根への結合」と「根から地上部への結合」の両方がある条件では、地上部における概日リズムの周期長のばらつきは低下しており、概日リズムが安定化することが示され、とくに双方向の結合がある時にもっとも概日リズムは安定化した。一方で、「地上部から根への結合」のみの条件では、地上部の示す周期長のばらつきに変化は観察されなかった。このことから、根から地上部へのシグナル伝達は、地上部における周期長の安定化に貢献しうることが示された。

こうした結果は、本研究で植物を用いた実験で観察されてきた場合にも、これと同様の地上部と根の概日時計が互いに時間情報を伝達しあうことで、概日リズムを安定化していることを示唆するものであった。しかし、こうした結果が特定のパラメーターでしか見られない極めて限定的な結果である可能性があったため、より広いパラメーター空間においても同様の結果を導けるのかを確認するため、ノイズ、結合強度、時間遅れのそれぞれについてグリッドサーチを行い、2 つの概日時計の双方向的な結合が概日リズムを安定化するという結果の一般性を検討した。ただし、実際の自然条件を鑑みて、ノイズパラメーターに関しては地上部モデルがより強いノイズを受ける範囲 ($D_1 \geq D_2$) で、結合強度のパラメーターに関しては地上部からの影響がより強くなる範囲 ($k_1 \geq k_2$) で、時間遅れのパラメーターに関しては Δt が 0 ~ 3 時間となるような範囲でグリッドサーチを行った。

2 振動子が独立している条件と比較して、「根から地上部への結合」のみ、あるいは、「地上部から根への結合」と「根から地上部への結合」の両方がある条件では、これら 3 つのパラメーターに関して行ったグリッドサーチの範囲全体にわたって地上部の示す周期長のばらつきが抑えられ、概日リズムは安定化していた（図 2 3 A、図 2 3 B、図 2 3 C）。

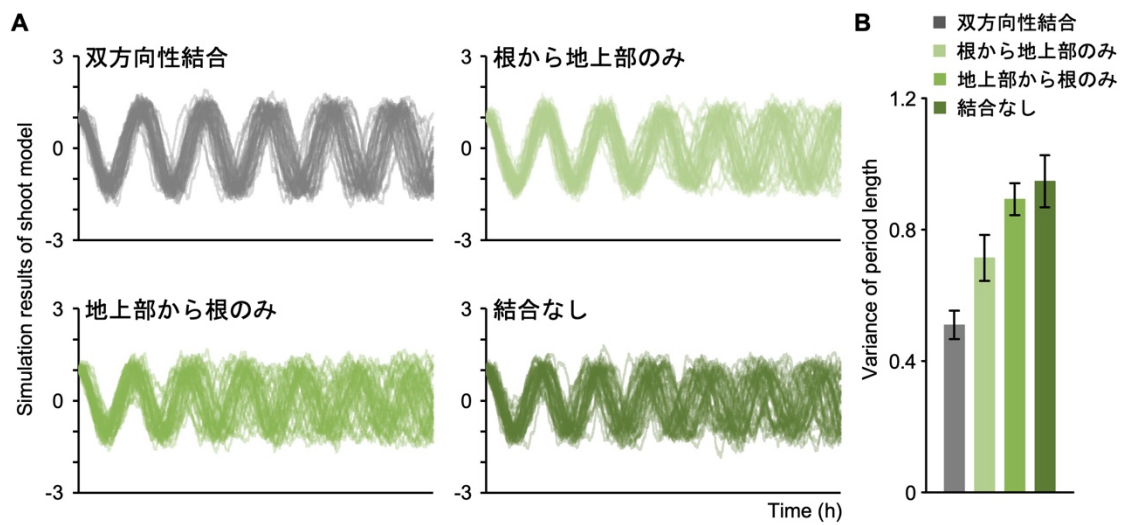


図 2 2 : 結合の有無による周期長のばらつきへの影響

(A) 地上部の振動子が根の振動子に相互に接続されている場合（双方向性結合）、一方の結合のみが維持されている場合（根から地上部のみ、地上部から根のみ）、振動子が結合されていない場合（結合なし）でのシミュレーション結果（ $n = 50$ ）。(B) 植物個体ごとの周期長の標準偏差（SD）から求めた、周期長のばらつき。

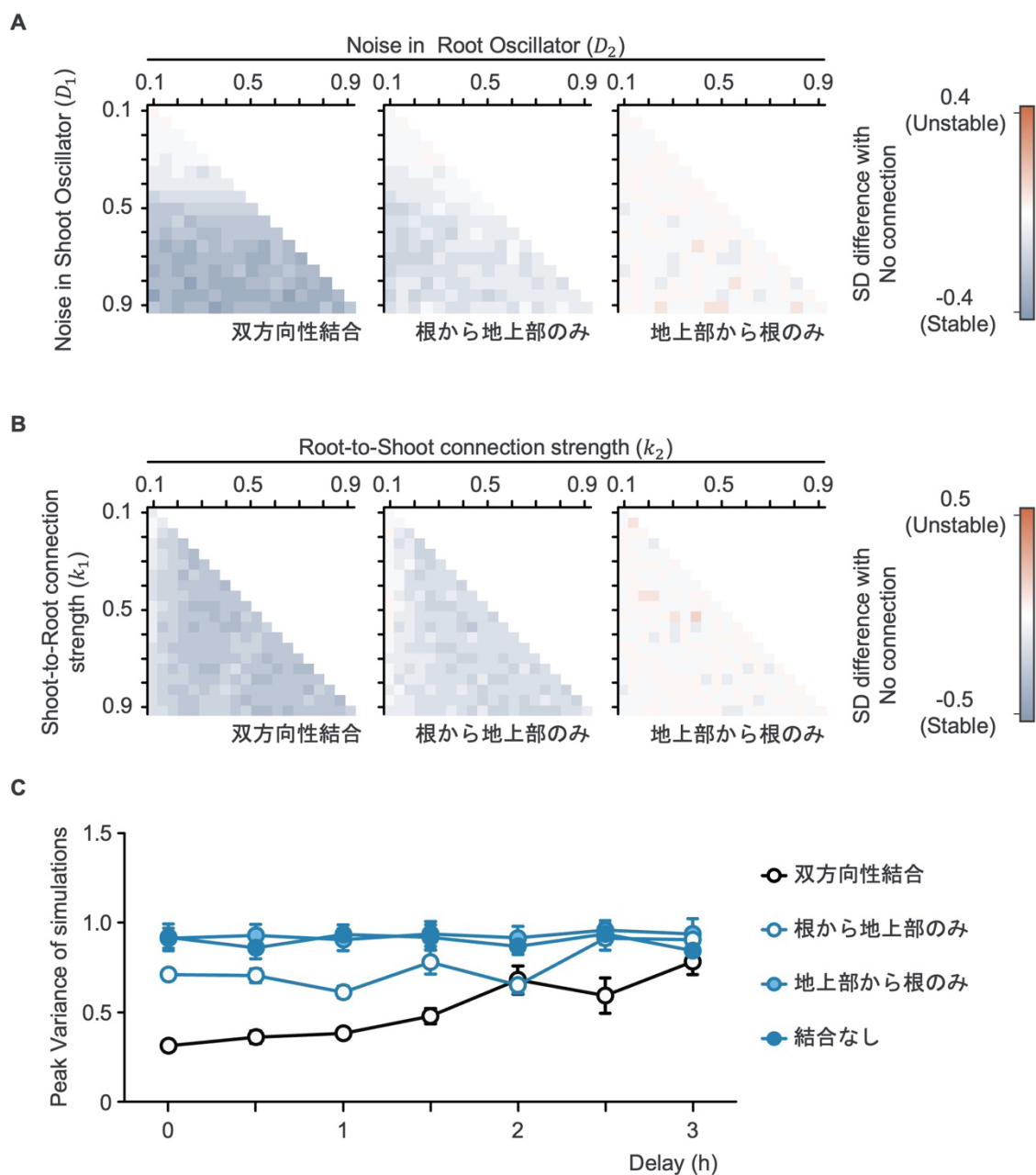


図 2 3 : グリッドサーチによるパラメーターの一般性の検証

(A, B) ノイズおよび結合強度の値について、結合なし条件に対する周期長のばらつき的大小を示した。赤はよりばらつきが大きく、青はばらつきが小さいことを意味する。(C) 時間遅れのパラメーターに対する結果。 $n = 50$ 。エラーバーは標準誤差を示す。

シヨ糖合成の阻害は、周期長のばらつきを増大させる

数理モデルを用いたシミュレーションの結果から、植物が地上部と根の概日時計が相互作用することで、より安定した概日リズムを実現している可能性が考えられた。根の *PRR7* がシヨ糖条件と DCMU 条件で発現量が変化し、また *PRR7* が K^+ を含む陽イオンの輸送に関与すること (図 7 A および図 1 8) を考え合わせると、地上部からのシヨ糖輸送が根の *PRR7* の発現制御を介して陽イオンの輸送を制御している可能性が考えられた。そこで、シヨ糖条件および DCMU 条件における道管液中陽イオン濃度を測定したところ、いずれの条件においても野生型で見られたようなイオン濃度の時間変動は失われ、どの時間においてもほぼ一定の陽イオン濃度であった (図 2 4)。この結果は、*prp7* および *PRR7-OX* あるいは *aha1* においてイオン濃度の時間変動が失われていた結果と一致していた (図 1 7 B、図 1 7 C、図 1 9 B)。

次に、これらの条件における地上部での周期長のばらつきを測定したところ、DCMU 条件において顕著に周期長のばらつきが増大していた (図 2 5 A、図 2 5 B)。この結果は、DCMU による光合成反応の阻害が地上部における概日時計の精度を低下させることを示している。DCMU による光合成反応の阻害による副作用の可能性が排除できていないものの、DCMU 条件で根からの K^+ 輸送を変化したことから、シヨ糖輸送が K^+ 輸送の制御を介して地上部における概日時計の精度を向上させている可能性が示唆された。一方で、シヨ糖添加は道管液中陽イオン濃度に影響を与えたにも関わらず、周期長のばらつきを増大させなかった (図 2 5 A、図 2 5 B)。この結果は、シヨ糖が別の作用機序により地上部での周期長の安定化に重要である可能性を示唆している。過去の研究においても、シヨ糖が周期長の維持に重要である可能性が示唆されており、本研究での結果と矛盾していない (Knight et al., 2008)。

これらの結果から、根の *PRR7* の制御を介して、地上部と根の概日時計が栄養素の輸送を介した双方向性の結合を形成し、概日時計の精度を向上させている可能性が示唆され、数理モデルから理論的に支持された地上部と根の双方向的な結合の重要性をさらに指示する結果を得た (図 2 6)。

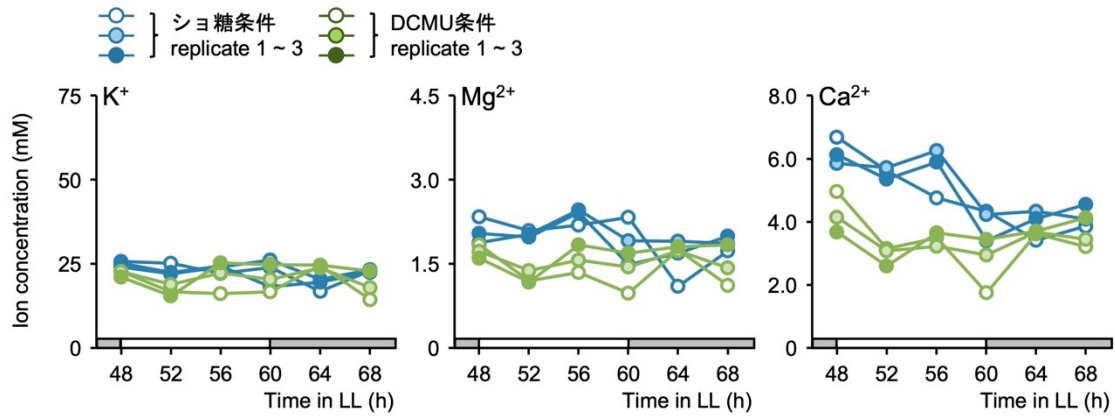


図 2 4 : シヨ糖および DCMU 条件における、道管液中陽イオン濃度の変動

シヨ糖および DCMU 条件における道管液中陽イオン濃度 (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) の変動。試行ごとの濃度変動を示した。

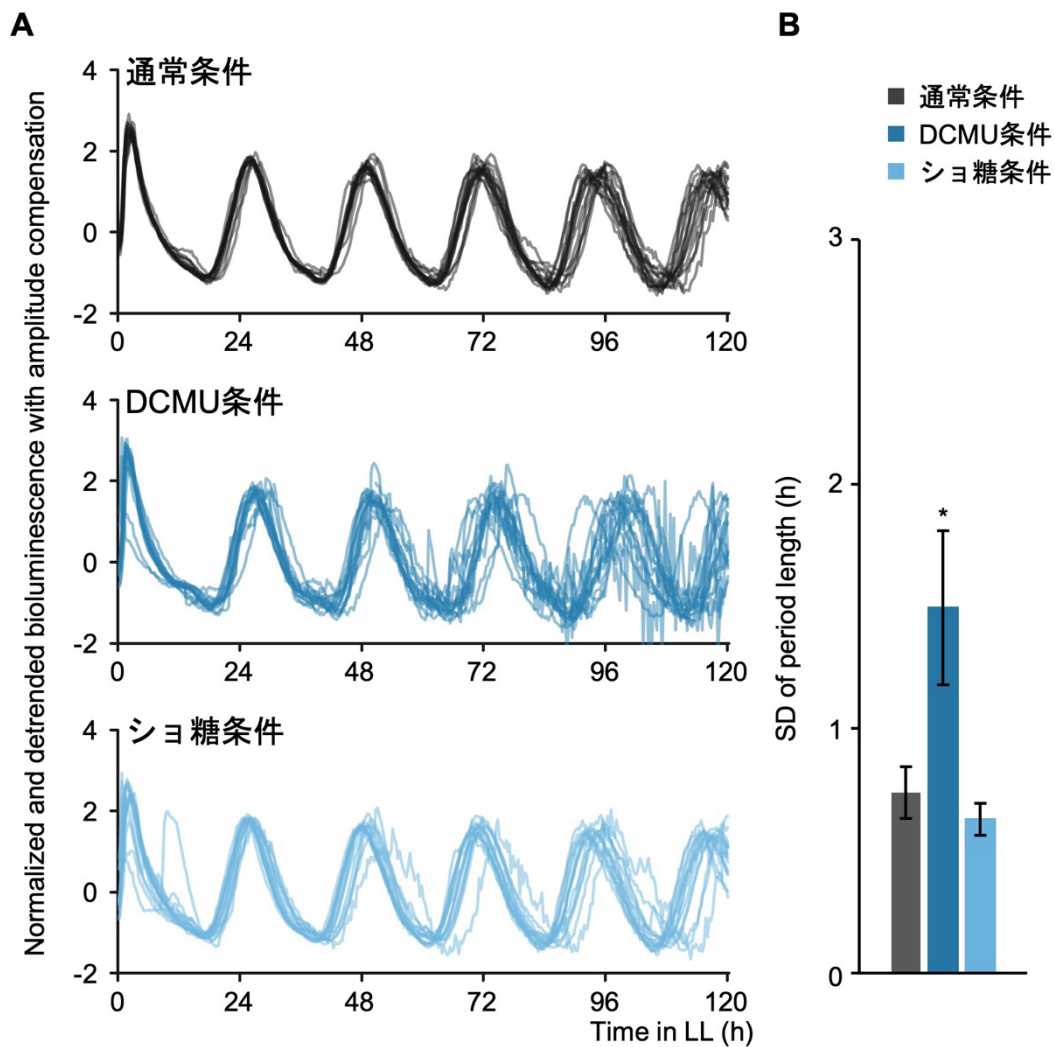


図 25 : DCMU およびシヨ糖条件における *LHYpro:LUC* の発光リズム

(A) 通常条件、DCMU 条件、およびシヨ糖条件における *LHYpro:LUC* の個体ごとの発光リズムを示す。それぞれの波形は、ピークの位置がわかりやすいようにトレンド除去処理および振幅の減衰補正を行っている。(B) LL 条件下 120 時間以内に観察できる 4 つの周期の長さを個体ごとに測定し、平均周期長および周期長のばらつき (標準偏差, SD) を算出した。n = 15。エラーバーは標準誤差を示す。* $P < 0.05$ 。Dunnett's test を用いて、通常条件との比較を行った。

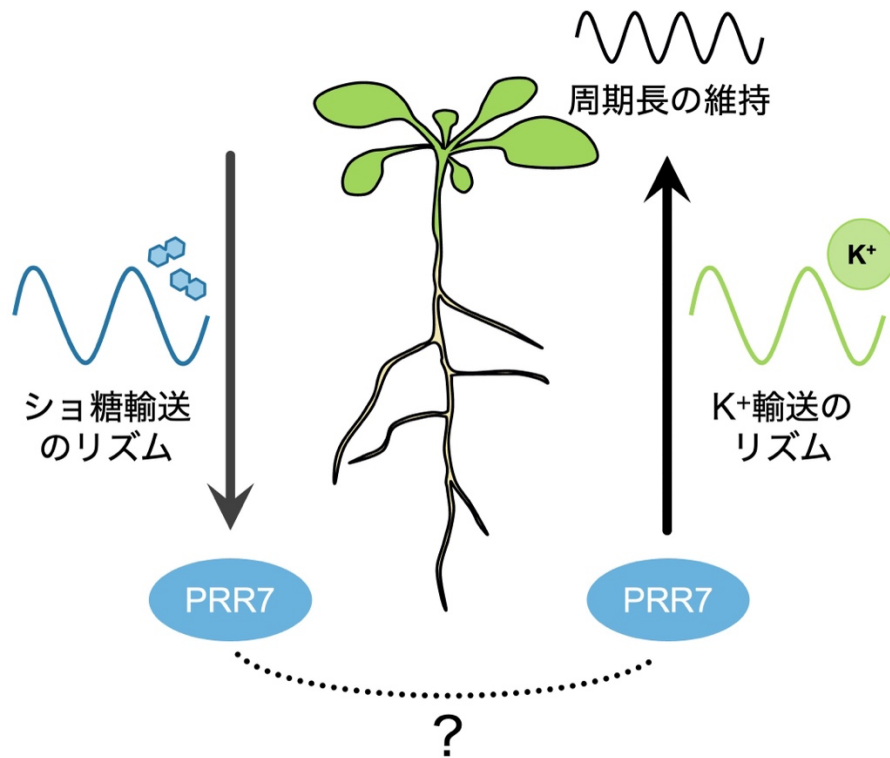


図 2 6 : 地上部と根の概日時計間で行われる時間情報伝達のモデル図

地上部から根の概日時計へと向けた時間情報伝達は、概日時計による制御を受けたショ糖の輸送リズムが関与し、根における *PRR7* を含む時計遺伝子の発現制御を介して行われていることが示唆された。また、根の *PRR7* および K^+ 輸送のリズムがそれぞれ地上部における概日リズムの周期長の維持に重要であることが明らかとなった。導管液中イオン濃度の解析から、*PRR7* が K^+ の輸送を制御することで、周期長の維持を行っている可能性が考えられた。また、数理モデルによるシミュレーションおよび DCMU を用いた実験から、根の *PRR7* が栄養素を介した地上部と根の概日時計間でのカップリングを形成している可能性が示唆された。

柵状組織および海綿状組織の単離技術の開発

これまでの実験から、根からの K^+ 輸送が地上部における概日時計の精度に寄与することが明らかとなった。図 8 に示すとおり、植物個体全体を計測した際の概日リズムのほとんどは葉における概日リズムに由来しており、これまでの結果は地上部、とくに葉肉組織における概日リズムを反映していると考えられる。

K^+ は光合成活性に関わる酵素の補酵素として機能することが知られていること、本研究からショ糖が地上部から根への時間情報伝達物質であることが明らかとなったこと、数理モデルからは地上部と根の双方向的な結合が概日リズムの安定性に重要であると予想されていることを考慮すると、根から地上部へと輸送された K^+ は葉肉組織における光合成機能を通じて概日時計の安定化に関わっていると考えられた。

さらに、葉肉組織の中でも K^+ の分布は柵状組織に多く、海綿状組織に少ないことがアッケシソウの仲間の植物においては報告されている (David and James, 1985)。さらに、道管はおもに柵状組織と隣接していることなどから、 K^+ の輸送を介した概日時計の制御には柵状組織と海綿状組織で違いが生じている可能性が考えられ、柵状組織と海綿状組織のそれぞれでの概日リズムを計測することが、概日リズムの安定性における K^+ の作用機序を明らかにするうえで重要となる。

葉肉細胞は葉の表側に位置し、葉緑体が多く含まれた円筒形の細胞が密に並んだ柵状組織と、葉の裏側に位置し、多くの空気間隙が存在する海綿状組織に分けられる (Terashima and Saeki, 1983; Vogelmann and Martin, 1993; Vogelmann and Evans, 2002) が、葉肉細胞を解析する手法としては一般的であるプロトプラスト単離ではこれらの細胞を分けることはできない。そこでこの問題に取り組むための第一歩として、柵状組織と海綿状組織を単離する技術の開発を行った。

単離技術の開発にあたって、テープを使用した単離手法に着目した (Wu et al., 2009; Endo et al., 2016)。これらの手法では、簡便かつ迅速に葉肉、維管束、表皮の単離に成功している。この手法を改良することで、簡便かつ迅速に柵状組織および海綿状組織の単離ができると考えた。まず、これら 2 つの組織細胞の形態がより明瞭に変化している光条件を探索した。柵状組織に特徴的な細胞形態である円筒形の形状は、強光下においてより促進されるということが先行研究より明らかであったため、実験室条件で可能であった強光条件 ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で行った。

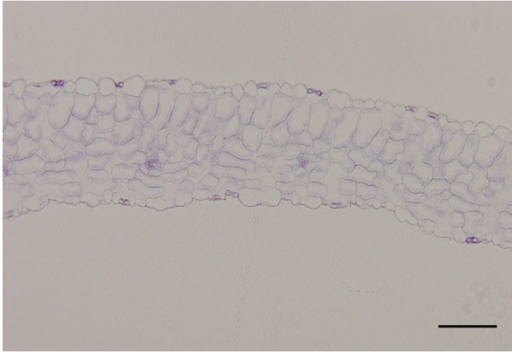
形態上の違いが明瞭に現れているかを確認するため、野生型の第 3 葉を用い

てテクノビット切片を作製・観察したところ、明瞭な違いが確認された(図 2 7 A)。この条件下で、柵状組織・海綿状組織の分離技術を検討した。いくつかのテープの組み合わせを試行したところ、ラベルテープ (Shamrock)で本葉を挟み込み、剥がすことで簡便にかつ迅速に行えることが分かった(図 2 7 B)。分離が十分であるかを確認するため、テープによる分離後、柵状組織および海綿状組織があると推定される部分の寒天切片の作製および顕微鏡観察によって確認した。柵状組織があると推定される部分の寒天切片では、主に円筒形の細胞が一行に並び、密に詰まっていることが確認されたことから、柵状組織の細胞が主に分離できていると考えられた(図 2 8 A)。さらに海綿状組織があると推定される側では、光学顕微鏡画像から多くの空気間隙が観察でき、気孔も確認された(図 2 8 A)。

以上のことから、本研究で開発した方法によって柵状組織および海綿状組織の分離が十分であると確認された。テープによる分離では、完全に葉全体を柵状組織および海綿状組織に分離できないため、テープとともに酵素液に浸し、プロトプラスト化して回収することが困難であると考えられた。そのため、RNase inhibitor を含む酵素液を、分離が問題なく出来ていると思われる部分だけに注いだ。その場でピペッティングを行い、表面に露出したそれぞれの組織細胞を回収した。この酵素液を顕微鏡で観察したところ、細胞内容物が確認された。この酵素液から RNA 抽出キット (RNeasy Plant mini Kit、QIAGEN)を用いて RNA を回収した。分離の精度が十分であるかを遺伝子レベルで詳細に確認するため、これらの RNA を用いて半定量 RT-PCR を行った。本葉における柵状組織および海綿状組織特異的なマーカー遺伝子の報告は無いため、代替的に *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)* の発現を分離の指標とした。*FIL* は、葉の発生段階初期において、葉の裏側に発現が見られる遺伝子であることが知られている。海綿状組織があると推定される部分で *FIL* の発現が強く見られた(図 2 8 B)、この分離技術による柵状組織と海綿状組織の分離は十分であることが確認された。

この手法は、今後、 K^+ の輸送がどのようにして概日時計を制御しているかを明らかにするうえで重要な基盤技術となると期待される。

A



B

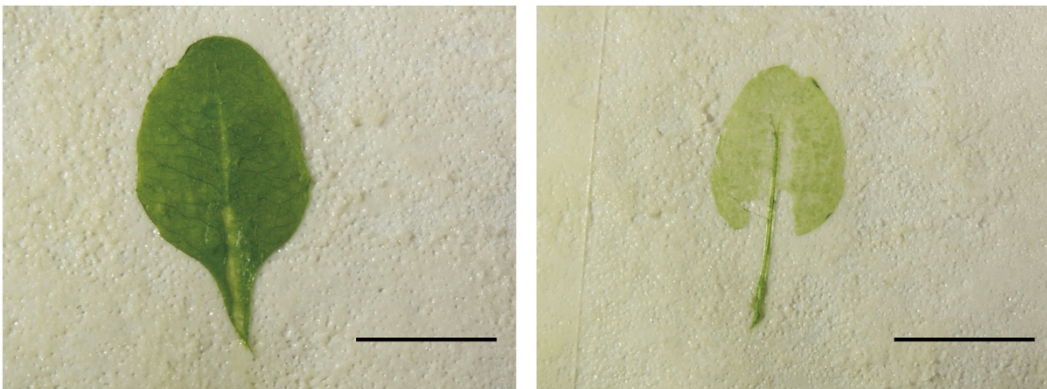


図 2 7 : 組織単離の様子

(A) 強光条件下 ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で育成した際のテクノビット切片。(B) テープによる単離後の様子。スケールバーは 5 mm。

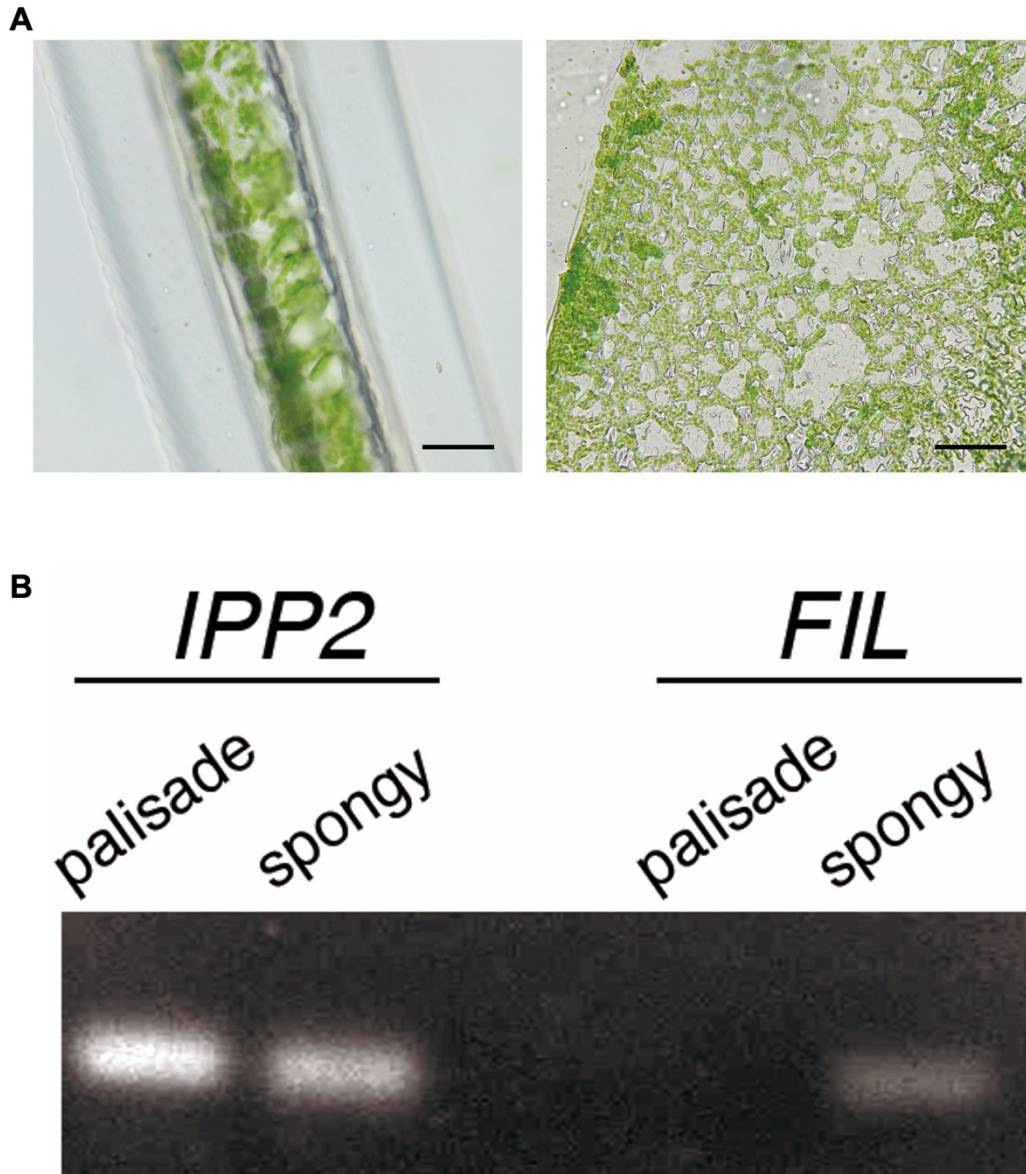


図 2 8 : 組織単離後の分離の様子

(A) 単離後における柵状組織側 (左) と海綿状組織側 (右) の様子。左は断面図を示しており、右は単離後の様子を上部から撮影した。スケールバーは左図が 50 μm 、右図が 100 μm 。(B) 単離後した組織からの半定量 RT-PCR。左は内部標準遺伝子の *IPP2* を、右には *FIL* を表示している。

考察

根は栄養に関連したシグナルを地上部へと送ることで、下流因子を制御し、栄養素の輸送や取り込みを調節している。たとえば、C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE (CEP)ペプチドや trans-zeatin 型サイトカイニンは、窒素欠乏を感知した根から地上部へと輸送され、地上部における窒素欠乏応答を引き起こす (Kiba et al., 2013; Ko et al., 2014; Tabata et al., 2014)。また、ストリゴラクトンやエチレンの前駆体であるアミノシクロプロパン-1-カルボン酸は、それぞれリン酸 (Pi) および K^+ 欠乏に応じて産生され、根からのシグナル伝達物質として機能することが知られている (Kohlen et al., 2011; Martínez-Andújar et al., 2016)。本研究では、道管を介した周期的な K^+ の輸送が根からのシグナル伝達として機能し、地上部における周期長の維持に寄与していることを明らかにした。いくつかの生物種において、 K^+ の取り込みや輸送が概日時計による制御を受けることが報告されている (Kondo and Tsudzuki, 1978; Sato et al., 1985; Feeney et al., 2016)。特に、ウキクサにおいて培地中からの K^+ の取り込みが概日リズムを示すことが示されている。さらに、近年の研究から K^+ そのものがシグナル伝達物質として機能する可能性が示唆されている。これらの報告は、 K^+ の輸送が地上部の概日時計に作用するとする本研究の結果を支持している。本研究で明らかとなった道管液中の K^+ 濃度の変動がどのようにして感知され、概日時計に作用するかの分子メカニズムは不明のままである。しかし、本研究の数値モデルでは、振動子間の結合はリズムの位相に作用するモデルを使用しており、位相への作用のみで周期長のばらつきを抑制することが出来ることが示された。この結果は、 K^+ 濃度の変動が、概日リズムの位相に作用することで周期長の維持に寄与している可能性を示唆している。道管液中 K^+ 濃度をより精密に変化させる実験を行うことで、 K^+ 濃度の変動がどのようにして周期長の維持を行っているかが明らかになると考えられる。

本研究では、 K^+ の輸送が地上部における周期長の維持に重要な役割を持つことが示された。同様に、 Fe^{2+} 欠乏が K^+ 欠乏と同様に地上部における周期長の維持に関与していることも観察された (図 1 1)。いくつかの陽イオンの欠乏や過剰条件は、その電気化学的勾配の維持を背景に他の陽イオンの輸送や吸収に影響を与えることが知られているが、 K^+ 欠乏と Fe^{2+} 欠乏条件はそれぞれ互いのイオ

ンの蓄積量に大きく影響を与えないことから、互いのイオンの輸送や吸収にほとんど影響しないことが示唆される (Forieri et al., 2017)。他の報告では、 K^+ の供給が Fe^{2+} の根から地上部への輸送を促進することが示されているものの、 K^+ の供給時の地上部 Fe^{2+} の蓄積量の増加は十分ではなく、通常条件で生育した際の約 0.7 倍に留まっている (Ye et al., 2019)。また、 K^+ および Fe^{2+} を含まない培地と比べても、地上部 Fe^{2+} の蓄積量の回復は僅かなものである (Ye et al., 2019)。したがって、low- K^+ および low- Fe^{2+} 条件で観察された周期長のばらつきの増大は、一方のイオン欠乏が他方のイオンの輸送を妨げることに由来したものではないと考えられる。

K^+ および Fe^{2+} 欠乏条件の両方で有意に発現変動する遺伝子に重複は少ないものの、公開されたマイクロアレイの結果では時計遺伝子 *GI*が K^+ および Fe^{2+} 欠乏条件の両方で最も発現誘導された遺伝子の一つに挙げられている (Forieri et al., 2017)。*GI*タンパク質は、概日時計の構成要素として数えられる ZTL と相互作用し、ZTL タンパク質の安定化させる。E3 ユビキチンリガーゼである ZTL は、時計遺伝子 *TOC1* タンパク質の分解を促進することで、概日リズムに作用する。また、*TOC1* タンパク質の安定化が概日リズムの位相に作用することが示されており、*TOC1* タンパク質の蓄積量の正確な制御が概日リズムの精度に関与することが示唆されている (Yan et al., 2021)。これらのことを考慮すると、本研究で観察された周期長への影響は *GI*の発現制御を介して行われているかもしれない。また、*GI*は鉄欠乏シグナルの概日時計への入力に関わる可能性が示唆されており (Chen et al., 2013; Hong et al., 2013)、この仮説を支持している。ただし、これらのマイクロアレイは全て解析対象を根としている。シヨ糖シグナルへの応答にも見られたように、地上部と根の概日時計では環境シグナルへの応答が異なっていることが考えられるため、 K^+ 欠乏に対する応答が地上部と根の概日時計で異なる可能性が残ることには留意しておくべきだろう (図 7)。また、本研究で、周期長のばらつき増大には K^+ 欠乏または K^+ 欠乏シグナルが原因ではなく、 K^+ の輸送が重要であると考えられた (図 1 2、図 1 6)。 K^+ の濃度 (または蓄積量) を感知することで *GI*の発現制御が行われているかどうかは不明であるため、更なる解析が必要と考えられる。

植物個体全体を対象とした研究により、*PRR7*の発現がシヨ糖によって制御されることが示されている (Haydon et al., 2013; Frank et al., 2018)。根の概日リズムが地上部に同調することや、シヨ糖が維管束を通じて根へと輸送されるこ

とを考えると、シヨ糖が地上部から根へと輸送される時間情報伝達物質として機能する可能性が示唆されてきた (Takahashi et al., 2015)。しかしながら、植物個体全体を対象とした解析は組織量の多い地上部 (主に葉) での応答を反映していると考えられる。そのため、シヨ糖の輸送が根の概日時計に与える影響についてはほとんど不明であった。本研究では、根のみを解析対象とすることで、根におけるシヨ糖の蓄積量が概日振動を示し、かつ根の *PRR7* がシヨ糖応答性を有することが明らかとなった (図 7)。根が非光合成器官であることを考慮すると、根で観察されたシヨ糖量の変動はシヨ糖輸送のリズムを反映していると考えられる。これらの結果から、地上部の概日時計がシヨ糖の輸送リズム、およびシヨ糖による根の *PRR7* の発現制御を介することで、根の概日時計に時間情報を伝達している可能性が示唆された。一方で、*PRR7* と同じファミリーに属する *PRR5* と *PRR9* の発現についても、明瞭なシヨ糖応答性が観察された (図 7)。また、*CCA1* も DCMU 処理に応じて発現が上昇していることが観察されている。興味深いことに、これら 3 つの時計遺伝子 (*PRR5*, *PRR9*, *CCA1*) のシヨ糖および DCMU 添加に対する発現量の変化は、地上部 (葉) においては観察されていない。こうした応答性の違いは、恐らく地上部 (葉) および根の概日時計の器官特異性に由来するものであると考えられる。実際、イネにおいては DCMU 処理に対する *CCA1* の発現変動が、地上部と根で異なることが報告されており、シヨ糖に対する応答性が器官ごとに異なっている可能性を示唆している (Wang et al., 2020)。また、地上部 (葉) と比べて、根においてより多くの時計遺伝子がシヨ糖応答性を示したことは、根の概日時計がシヨ糖シグナルに対してより鋭敏に反応している可能性を示唆している。環境変動が比較的小さく、時間情報の取得が難しい環境にある根の概日時計は、地上部からのシヨ糖輸送に鋭敏に反応することで、正確に時間情報を取得しようとしているのかもしれない。

今回行った道管液の時系列解析によって、陽イオンの輸送に根の *PRR7* が関与していることが明らかとなった (図 17B、図 17C)。多くの先行研究から、*PRR* ファミリー (特に *PRR5*, *PRR7*, *PRR9*) の遺伝的冗長性が報告されており、これら遺伝子の単独変異体で観察される表現型が弱いことが多い (Farré et al., 2005; Nakamichi et al., 2005; Salomé and McClung, 2005)。しかしながら、今回の実験では *PRR7* の単独変異体において、顕著に陽イオンの輸送が変化していることが明らかとなった。このことは、根の *PRR7* が陽イオンの輸送を特異的に調節している可能性を示唆している。*PRR* ファミリー遺伝子は別の転写因子

と相互作用することで、下流遺伝子の発現制御を行っていることが知られている (Nakamichi et al., 2012; Liu et al., 2016; Hayama et al., 2017; Zhang et al., 2020)。このことを考慮すると、陽イオンの輸送に関する PRR7 の特異的な機能は、相互作用因子の違いによって生み出される可能性があるかもしれない。PRR7 を対象とした組織特異的な相互作用因子の解析などが今後重要となると考えられる。

ChIP-seq (Liu et al., 2013)の結果から、PRR7 の下流で AHA1 が機能している可能性を見出し、発現解析の結果などから PRR7 が *AHA1* の発現制御を行っていることが示された (図 19A)。しかし、表現型解析のレベルでは PRR7 の下流で AHA1 が中心的な役割をもって陽イオンの輸送を制御していることを示す決定的な証拠を得ることが出来なかった (図 19B、図 19C、図 19D)。しかし、AHA1 はショ糖シグナルを受容することでリン酸化修飾を受けて活性化されることで、強い H⁺輸送の効果を生み出すことが知られている (Okumura et al., 2016)。本研究においては、PRR7 が転写因子であることに着目して、*AHA1* の転写制御のみに着目していたが、活性化された AHA1 タンパク質の量や、膜電位の測定などを加えることで、実際に PRR7 による AHA1 の発現制御の重要性を明らかにできると考えられる。AHA1 は根から地上部への他のシグナル伝達に関与することが報告されている (Ladwig et al., 2015; Kumari et al., 2019; Shao et al., 2020)ことを考慮すると、根の PRR7 が AHA1 の制御を介することで陽イオンの輸送を制御し、地上部における概日時計の精度に寄与している可能性は十分に考えられる。

これまでの概日時計に関する研究では、複数の個体から測定された概日リズムの平均を評価した研究が主流であった。本研究では、1 個体内における周期長のばらつきに着目することで、根の概日時計 (とくに *PRR7*) が地上部における周期長の維持に重要であることを明らかにすることが出来た (図 9)。また、今回着目した周期長の安定性と、平均周期長または振幅との間には明確な相関関係が認められなかった。このことは、周期長の安定性が、平均周期長や振幅とは独立した新たな概日リズムのパラメーターとして注目に値することを示唆している。また、周期長の安定性は概日時計の頑健性を評価する上でも重要なパラメーターとなり得る。概日時計の頑健性は、下流因子および生理応答の制御における時間的な正確性に繋がる (Abraham et al., 2010; Yan et al., 2021; Greenwood

et al., 2022; Wu et al., 2022)。実際、イネの花成制御メカニズムにおいて、僅か30分の日長変化を感じ取ることができ、花成関連遺伝子の発現に影響することが知られている (Itoh et al., 2010)。今回発見した概日時計の頑健性を維持するメカニズムは、このような生理応答を適切に制御する上で重要である可能性がある。概日時計の頑健性によって生理応答がどれほど正確に制御され、またその制御がどれほど重要であるかは、今後重要な研究対象となると考えられる。

参考文献

Abraham U, Granada AE, Westermark PO, Heine M, Kramer A, and Herzog H (2010) Coupling governs entrainment range of circadian clocks. *Mol Syst Biol.* 6: 438.

Armengaud P, Breitling R and Amtmann A (2004) The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiol.* 136: 2556–2576.

Andrés-Colás N, Perea-García A, Puig S and Peñarrubia L (2010) Deregulated copper transport affects *Arabidopsis* development especially in the absence of environmental cycles. *Plant Physiol.* 153: 170-184.

Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, and Sheen J (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling. *Nature* 448: 938–942.

Bordage S, Sullivan S, Laird J, Millar AJ, and Nimmo HG (2016) Organ specificity in the plant circadian system is explained by different light inputs to the shoot and root clocks. *New Phytol* 212: 136-149.

Brauer EK, Ahsan N, Dale R, Kato N, Coluccio AE, Piñeros MA, Kochian LV, Thelen JJ, and Popescu SC (2016) The raf-like kinase ILK1 and the high affinity K⁺ transporter HAK5 are required for innate immunity and abiotic stress response. *Plant Physiol* 171: 1470-1484.

Chen WW, Takahashi N, Hirata Y, Ronald J, Porco S, Davis SJ, Nusinow DA, Kay SA, and Mas P (2020) A mobile ELF4 delivers circadian temperature information from shoots to roots. *Nat Plants* 6: 416–426.

Chen YY, Wang Y, Shin LJ, Wu JF, Shanmugam V, Tsednee M, Lo JC, Chen CC, Wu SH and Yeh KC (2013) Iron is involved in the maintenance of circadian period length in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161: 1409-1420.

Clarkson DT and Hanson JB (1980) The mineral nutrition of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 31: 239–298.

Creux N and Harmer S (2019) Circadian Rhythms in Plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 11: a034611.

David KS. and James WO. (1985) The Distribution of Na⁺, K⁺ and Glycinebetaine in

Salicornia bigelovii. *J Exp Bot.* 36: 550-555.

Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kévei E, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, and Webb AA (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* 309: 630–633.

Endo M, Shimizu H, Nohales MA, Araki T, and Kay SA (2014) Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature* 515: 419–422.

Endo M (2016) Tissue-specific circadian clocks in plants. *Curr Opin Plant Biol* 29: 44–49.

Endo M, Shimizu H, and Araki T (2016) Rapid and simple isolation of vascular, epidermal and mesophyll cells from plant leaf tissue. *Nat Protoc* 11:1388-1395.

Endo S, Iwai Y, and Fukuda H (2019) Cargo-dependent and cell wall-associated xylem transport in *Arabidopsis*. *New Phytol* 222: 159–170.

Farré EM, Harmer SL, Harmon FG, Yanovsky MJ, and Kay SA (2005) Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the *Arabidopsis* circadian clock. *Curr Biol* 15: 47-54.

Farré EM, and Kay SA (2007) PRR7 protein levels are regulated by light and the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant J* 52: 548–560.

Feeney KA, Hansen LL, Putker M, Olivares-Yañez C, Day J, Eades LJ, Larrondo LF, Hoyle NP, O'Neill JS, and van Ooijen G (2016) Daily magnesium fluxes regulate cellular timekeeping and energy balance. *Nature* 532: 375–379.

Frank A, Matioli CC, Viana AJC, Hearn TJ, Kusakina J, Belbin FE, Wells Newman D, Yochikawa A, Cano-Ramirez DL, Chembath A, Cragg-Barber K, Haydon MJ, Hotta CT, Vincentz M, Webb AAR, and Dodd AN (2018) Circadian entrainment in *Arabidopsis* by the sugar-responsive transcription factor bZIP63. *Curr Biol* 28:2597–2606.

Forger DB and Peskin CS (2005) Stochastic simulation of the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 321-324.

Forieri I, Sticht C, Reichelt M, Gretz N, Hawkesford MJ, Malagoli M, Wirtz M, and Hell R (2017) System analysis of metabolism and the transcriptome in *Arabidopsis thaliana* roots reveals differential co-regulation upon iron, sulfur and potassium deficiency. *Plant Cell Environ* 40: 95-107.

Greenwood M, Domijan M, Gould PD, Hall AJW, and Locke JCW (2019) Coordinated circadian timing through the integration of local inputs in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol* 17: e3000407.

Greenwood M, Tokuda IT, and Locke JCW (2022) A spatial model of the plant circadian clock reveals design principles for coordinated timing. *Mol Syst Biol*. 18: e10140.

Gould PD, Domijan M, Greenwood M, Tokuda IT, Rees H, Kozma-Bognar L, Hall AJ, and Locke JC (2018) Coordination of robust single cell rhythms in the *Arabidopsis* circadian clock via spatial waves of gene expression. *Elife* 7: e31700.

Gutiérrez RA, Stokes TL, Thum K, Xu X, Obertello M, Katari MS, Tanurdzic M, Dean A, Nero DC, McClung CR and Coruzzi GM (2008) Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene *CCA1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 4939-4944.

Hastings MH and Herzog ED (2004) Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Rhythms*. 19: 400-413.

Hayama R, Sarid-Krebs L, Richter R, Fernández V, Jang S, and Coupland G (2017) PSEUDO RESPONSE REGULATORS stabilize CONSTANS protein to promote flowering in response to day length. *EMBO J*. 36: 904-918.

Haydon MJ, Mielczarek O, Robertson FC, Hubbard KE, and Webb AA (2013) Photosynthetic entrainment of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Nature* 502: 689–692.

Haydon MJ, Román Á, and Arshad W (2015) Nutrient homeostasis within the plant circadian network. *Front Plant Sci* 6: 299.

Hong S, Kim SA, Guerinot ML and McClung CR (2013) Reciprocal interaction of the circadian clock with the iron homeostasis network in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 161: 893-903.

Itoh H, Nonoue Y, Yano M, and Izawa T (2010) A pair of floral regulators sets critical day length for *Hd3a* florigen expression in rice. *Nat Genet*. 42: 635-638.

James AB, Monreal JA, Nimmo GA, Kelly CL, Herzyk P, Jenkins GI, and Nimmo HG (2008) The circadian clock in *Arabidopsis* roots is a simplified slave version of the clock in shoots. *Science* 322: 1832–1835.

Kiba T, Takei K, Kojima M, and Sakakibara H (2013) Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in Arabidopsis. *Dev Cell* 27: 452-461.

Kim TH, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI (2010) Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu Rev Plant Biol* 61: 561–591

Knight H, Thomson AJ and McWatters HG (2008) Sensitive to freezing6 integrates cellular and environmental inputs to the plant circadian clock. *Plant Physiol* 148: 293-303.

Knox K, Paterlini A, Thomson S, and Oparka K (2018) The coumarin glucoside, esculin, reveals rapid changes in phloem-transport velocity in response to environmental cues. *Plant Physiol* 178: 795–807.

Ko D, Kang J, Kiba T, Park J, Kojima M, Do J, Kim KY, Kwon M, Endler A, Song WY, Martinoia E, Sakakibara H, and Lee Y (2014) Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111: 7150-7155.

Kohlen W, Charnikhova T, Liu Q, Bours R, Domagalska MA, Beguerie S, Verstappen F, Leyser O, Bouwmeester H, and Ruyter-Spira C (2011) Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host Arabidopsis. *Plant Physiol*. 155: 974-987.

Kondo T, and Tsudzuki T (1978) Rhythm in potassium uptake by a duckweed, *Lemna gibba* G3 *Plant Cell Physiology* 19: 1465–1473.

Kondo T, Tsinoremas NF, Golden SS, Johnson CH, Kutsuna S, and Ishiura M (1994) Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science* 266: 1233–1236.

Liu T, Carlsson J, Takeuchi T, Newton L, and Farré EM (2013) Direct regulation of abiotic responses by the Arabidopsis circadian clock component PRR7. *Plant J* 76: 101–114.

Kumari A, Chételat A, Nguyen CT and Farmer EE (2019) Arabidopsis H⁺-ATPase AHA1 controls slow wave potential duration and wound-response jasmonate pathway activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 116: 20226-20231.

Ladwig F, Dahlke RI, Stührwohldt N, Hartmann J, Harter K and Sauter M (2015) Phytosulfokine Regulates Growth in Arabidopsis through a Response Module at the Plasma Membrane That Includes CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL17, H⁺-

ATPase, and BAK1. *Plant Cell*. 27: 1718-1729.

Leigh RA and Jones RGW (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytol*. 97: 1–13.

Liu TL, Newton L, Liu MJ, Shiu SH, and Farré EM (2016) A G-Box-Like Motif Is Necessary for Transcriptional Regulation by Circadian Pseudo-Response Regulators in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 170: 528-539.

Maekawa S, Ishida T, and Yanagisawa S (2018) Reduced expression of APUM24, encoding a novel rRNA processing factor, induces sugar-dependent nucleolar stress and altered sugar responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 30: 209–227.

Martí Ruiz MC, Hubbard KE, Gardner MJ, Jung HJ, Aubry S, Hotta CT, Mohd-Noh NI, Robertson FC, Hearn TJ, Tsai YC, Dodd AN, Hannah M, Carré IA, Davies JM, Braam J, and Webb AAR (2018) Circadian oscillations of cytosolic free calcium regulate the *Arabidopsis* circadian clock. *Nat Plants* 4: 690–698.

Martínez-Andújar C, Albacete A, Martínez-Pérez A, Pérez-Pérez JM, Asins MJ, and Pérez-Alfocea F (2016) Root-to-Shoot Hormonal Communication in Contrasting Rootstocks Suggests an Important Role for the Ethylene Precursor Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid in Mediating Plant Growth under Low-Potassium Nutrition in Tomato. *Front Plant Sci*. 7: 1782.

Masuda K, Kitaoka R, Ukai K, Tokuda IT, and Fukuda H (2017) Multicellularity enriches the entrainment of *Arabidopsis* circadian clock. *Sci Adv* 3: e1700808.

de Melo JRF, Gutsch A, Caluwé T, Leloup JC, Gonze D, Hermans C, Webb AAR, and Verbruggen N (2021) Magnesium maintains the length of the circadian period in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 185: 519–532.

Mockler TC, Yu X, Shalitin D, Parikh D, Michael TP, Liou J, Huang J, Smith Z, Alonso JM, Ecker JR, Chory J, and Lin C (2004) Regulation of flowering time in *Arabidopsis* by K homology domain proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12759-12764.

Müller L (2016) The sucrose storage metabolism regulates carbohydrate supply and growth independently from the circadian clock in barley. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.

Muranaka T and Oyama T (2016) Heterogeneity of cellular circadian clocks in intact

plants and its correction under light-dark cycles. *Sci Adv.* 2: e1600500.

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 Cell Physiol* 46: 686-698.

Nakamichi N, Kiba T, Kamioka M, Suzuki T, Yamashino T, Higashiyama T, Sakakibara H, and Mizuno T (2012) Transcriptional repressor PRR5 directly regulates clock-output pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: 17123-17128.

Nakamichi N (2020) The transcriptional network in the *Arabidopsis* circadian clock system. *Genes (Basel)* 11: 1284.

Nakayama T, Shinohara H, Tanaka M, Baba K, Ogawa-Ohnishi M, and Matsubayashi Y (2017) A peptide hormone required for Casparian strip diffusion barrier formation in *Arabidopsis* roots. *Science.* 355: 284-286.

Negishi K, Endo M, Abe M, and Araki T (2018) SODIUM POTASSIUM ROOT DEFECTIVE1 regulates FLOWERING LOCUS T expression via the microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 module in response to potassium conditions. *Plant Cell Physiol* 59: 404–413.

Noordally ZB, Ishii K, Atkins KA, Wetherill SJ, Kusakina J, Walton EJ, Kato M, Azuma M, Tanaka K, Hanaoka M, and Dodd AN (2013) Circadian control of chloroplast transcription by a nuclear-encoded timing signal. *339: 1316-9.*

Okumura M, Inoue S, Kuwata K and Kinoshita T (2016) Photosynthesis activates plasma membrane H⁺-ATPase via sugar accumulation. *Plant Physiol* 171: 580–589

Palmgren MG. (2001) PLANT PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPASE: powerhouses for nutrient uptake. *Annu Rev Plant Physiol* 52: 817–845

Perea-García A, Andrés-Bordería A, Mayo de Andrés S, Sanz A, Davis AM, Davis SJ, Huijser P, Peñarrubia L (2016) Modulation of copper deficiency responses by diurnal and circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot.* 67: 391-403.

Rivière Q, Xiao Q, Gutsch A, Defrance M, Webb AAR, and Verbruggen N (2021) Mg deficiency interacts with the circadian clock and phytochromes pathways in *Arabidopsis*. *Ann Appl Biol* 178: 387– 399.

Rodrigues A, Adamo M, Crozet P, Margalha L, Confraria A, Martinho C, Elias A, Rabissi

A, Lumbreras V, González-Guzmán M, Antoni R, Rodríguez PL, and Baena-González E (2013) ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 25: 3871–3884.

Rubio F, Fon M, Ródenas R, Nieves-Cordones M, Alemán F, Rivero RM, and Martínez V (2014) A low K⁺ signal is required for functional high-affinity K⁺ uptake through HAK5 transporters. *Physiol Plant* 152: 558-570.

Sato R, Kondo T, and Miyoshi Y (1985) Circadian rhythms of potassium and sodium contents in the growing front of *Neurospora crassa*. *Plant Cell Physiology* 26: 447–453.

Salomé PA, and McClung CR (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell* 17: 791-803.

Salomé PA, Oliva M, Weigel D and Krämer U (2013) Circadian clock adjustment to plant iron status depends on chloroplast and phytochrome function. *EMBO J.* 32: 511-523.

Sanchez SE, Rugnone ML and Kay SA (2020) Light Perception: A Matter of Time. *Mol Plant* 13): 363-385.

Schliep M, Ebert B, Simon-Rosin U, Zoeller D, and Fisahn J. (2010) Quantitative expression analysis of selected transcription factors in pavement, basal and trichome cells of mature leaves from *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma.* 241: 29-36

Shabala S (2017) Signalling by potassium: another second messenger to add to the list? *J Exp Bot* 68: 4003-4007.

Shao Q, Gao Q, Lhamo D, Zhang H and Luan S (2020) Two glutamate- and pH-regulated Ca²⁺ channels are required for systemic wound signaling in Arabidopsis. *Sci Signal.* 13: eaba1453.

Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annu Rev Plant Biol* 58: 219–247

Shimizu H, Katayama K, Koto T, Torii K, Araki T, and Endo M (2015) Decentralized circadian clocks process thermal and photoperiodic cues in specific tissues. *Nat Plants* 1: 15163.

Shin J, Sánchez-Villarreal A, Davis AM, Du SX, Berendzen KW, Koncz C, Ding Z, Li C, and Davis SJ (2017) The metabolic sensor AKIN10 modulates the Arabidopsis

circadian clock in a light-dependent manner. *Plant Cell Environ* 40: 997–1008.

Szczerba MW, Britto DT and Kronzucker HJ (2009) K⁺ transport in plants: physiology and molecular biology. *J Plant Physiol.* 166: 447-466.

Tabata R, Sumida K, Yoshii T, Ohyama K, Shinohara H, and Matsubayashi Y (2014) Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science* 346: 343-346.

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

Terashima I. and Saeki T. (1983) Light environment within a leaf I. Optical properties of paradermal sections of Camellia leaves with special reference to differences in the optical properties of palisade and spongy tissues. *Plant Cell Physiol.* 24: 1493-1501.

Thain SC, Murtas G, Lynn JR, McGrath RB, and Millar AJ (2002) The circadian clock that controls gene expression in Arabidopsis is tissue specific. *Plant Physiol* 130: 102-110.

Torii K, Inoue K, Bekki K, Haraguchi K, Kubo M, Kondo Y, Suzuki T, Kubota A, Uemoto K, Shimizu H, Saito M, Fukuda H, Araki T, and Endo M (2022) A guiding role of the Arabidopsis circadian clock in cell differentiation revealed by time-series single-cell RNA sequencing. *Cell Rep* 40: 111059.

Turnbull CG, Booker JP, and Leyser HM (2002) Micrografting techniques for testing long-distance signalling in Arabidopsis. *Plant J* 32: 255–262.

Uemoto K., Araki T., Endo M. (2018) Isolation of Arabidopsis Palisade and Spongy Mesophyll Cells. *Methods Mol Biol.* 1830: 141-148.

Vogelmann TC. and Evans JR. (2002) Profiles of light absorption and chlorophyll within spinach leaves from chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Environ.* 25: 1313–1323.

Vogelmann TC. and Martin G. (1993) The functional significance of palisade tissue: penetration of directional vs. diffuse light. *Plant Cell Environ.* 16. 65–72.

Wang F, Han T, Song Q, Ye W, Song X, Chu J, Li J, and Chen ZJ (2020) The Rice Circadian Clock Regulates Tiller Growth and Panicle Development Through

Strigolactone Signaling and Sugar Sensing. *Plant Cell* 32: 3124-3138.

Wenden B, Toner DL, Hodge SK, Grima R, and Millar AJ (2012) Spontaneous spatiotemporal waves of gene expression from biological clocks in the leaf. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 6757–6762.

Wu HW, Fajiculay E, Wu JF, Yan CS, Hsu CP, and Wu SH (2022) Noise reduction by upstream open reading frames. *Nat Plants* 8: 474-480.

Wu FH., Shen SC., Lee LY., Lee SH., Chan MT., Lin CS. (2009) Tape-Arabidopsis Sandwich - a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. *Plant Methods*. 5:16.

Yan J, Li S, Kim YJ, Zeng Q, Radziejwoski A, Wang L, Nomura Y, Nakagami H, and Somers DE (2021) TOC1 clock protein phosphorylation controls complex formation with NF-YB/C to repress hypocotyl growth. *EMBO J* 40: e108684.

Yakir E, Hassidim M, Melamed-Book N, Hilman D, Kron I, and Green RM (2011) Cell autonomous and cell-type specific circadian rhythms in Arabidopsis. *Plant J* 68: 520-531.

Ye Yi, Luo Hong, Li Mao, Zhang Jia, Cao Guang, Lin Kai, Lin Si and Xu Shan (2019) Potassium ameliorates iron deficiency by facilitating the remobilization of iron from root cell walls and promoting its translocation from roots to shoots. *Plant and Soil*. 440.

Zhang Y, Pfeiffer A, Tepperman JM, Dalton-Roesler J, Leivar P, Gonzalez Grandio E, and Quail PH (2020) Central clock components modulate plant shade avoidance by directly repressing transcriptional activation activity of PIF proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117: 3261-3269.

Zhao W, Faust F, and Schubert S (2020) Potassium is a potential toxicant for Arabidopsis thaliana under saline conditions. *J. Plant Nutr. Soil Sci*. 183: 455-467.

Zielinski T, Moore AM, Troup E, Halliday KJ and Millar AJ (2014) Strengths and limitations of period estimation methods for circadian data. *PLoS One*. 9: e96462.

謝辞

本研究は、京都大学 大学院生命科学研究科 統合生命科学専攻 分子代謝制御学分野で行われました。荒木崇教授には、研究の機会と多くの助言を与えていただきました。特に遠藤求教授（奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科）には、研究の機会および大変熱心なご指導をいただきましたことを心より感謝申し上げます。

松林嘉克教授（名古屋大学 大学院理学研究科）には、道管液中イオン濃度測定におけるイオンクロマトグラフィーの利用において大変お世話になりました。木下俊則教授（名古屋大学 大学院理学研究科）には、*aha1-9*の種子をいただくなど、お世話になりました。伊藤浩史准教授（九州大学 芸術工学大学院）、森史助教（九州大学 芸術工学大学院）には、数理モデルの確立および実験デザインのアドバイスを頂きました。武宮淳史准教授（山口大学 創成科学研究科）および山内翔太博士（山口大学 創成科学研究科）には、気孔コンダクタンスの測定および実験デザインのアドバイスを頂きました。峠隆之准教授（奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科）および渡邊むつみ博士（奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科）には、実験上のアドバイスなどを頂きました。久保田茜助教、高橋望助教、清水華子博士（京都大学生態学研究センター）、富田由妃博士には、実験上のご指導や助言をしていただきました。古藤知子技術補佐員には水やり、種取りなどをしていただきました。近藤由子技術補佐員には実験材料の整備をしていただきました。矢野めぐみさん、山中美和子さん（奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科）には、事務上の多くのサポートをしていただきました。

また分子代謝制御学分野の皆様、奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 植物生理学分野の皆様には、多くの助言、ご協力とご支援をいただき、本研究を行うことが出来ました。ありがとうございました。

最後に、多くの助言、ご支援をいただいたすべての方々に重ねて感謝申し上げます。

本学位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。

Kyohei Uemoto, Fumito Mori, Shota Yamauchi, Akane Kubota, Nozomu Takahashi, Haruki Egashira, Yumi Kunimoto, Takashi Araki, Atsushi Takemiya, Hiroshi Ito, Motomu Endo.

Root PRR7 improves the accuracy of the shoot circadian clock through nutrient transport

Plant and Cell Physiology, in press, 2023. doi: 10.1093/pcp/pcad003.

Kyohei Uemoto, Takashi Araki, Motomu Endo.

Isolation of Arabidopsis palisade and spongy mesophyll cells

Methods in Molecular Biology, volume 1830 p 141-148, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-8657-6_9.