

主論文

学位申請論文

植物の概日時計が多細胞系として示す挙動の研究

京都大学大学院理学研究科 生物科学専攻

植物学系 形態統御学分科

村中 智明

目次

目次	1
要旨	2
論文目録	4
序章 植物における概日時計研究の現状と課題	5
第1章 1 細胞生物発光イメージング系を用いた 植物個体内の細胞における遺伝子発現変動の測定	
導入	17
結果	19
考察	28
材料と方法	31
第2章 植物個体内における細胞概日時計の不均一性と、 明暗条件下でのその不顕在化	
導入	34
結果	47
考察	84
材料と方法	92
第3章 様々なウキクサ植物における概日リズムの解析	
導入	96
結果	98
考察	109
材料と方法	112
第4章 結論と展望	114
引用文献	116
謝辞	122

要旨

生物は刻一刻と変化する自然環境の中で進化し、環境変動に適切に応答する機構を獲得してきた。とくに地球の自転に伴う 24 時間周期の環境変動を予測し、先んじた応答を可能とする概日時計は様々な生物にみられる。概日時計は生物の内部に約 24 時間周期の振動を生み出す機構であることが明らかとなっており、この振動が昼夜サイクルへと同調することで外環境変動の予測が可能となると考えられている。植物においては、時計遺伝子群がフィードバックループを構成することで、この概日振動を生成することが明らかとなっている。そのため、多細胞生物の個体内では、個々の細胞が独立に概日振動を生成する細胞時計として機能すると考えられる。このことは、植物において観察される個体レベルでの概日振動が、多細胞の振動が統合された結果であることを意味している。しかしながら、植物個体内における細胞時計の挙動に関する知見は乏しく、リズムの安定性や細胞間でのバラつきなど基本的な性質すらわかっていないのが現状である。そこで本研究では、ウキクサ植物におけるパーティクルガンによるルシフェラーゼ発光レポーター導入技術を利用して細胞レベルから植物の概日時計機構を理解することを目指した。

第 1 章では、個体内における個々の細胞の遺伝子発現変動を測定する技術の開発を行った。パーティクルガンによる遺伝子導入では、個体表面近くの細胞に遺伝子がまばらに導入される。この点に注目し、発光レポーターをパーティクルガンで植物個体に導入し、高感度カメラでイメージングすることで、個々の細胞由来の発光を分離して測定することを試みた。材料として小型で平坦なウキクサ植物を用いたことにより、個体全体から 50 細胞以上の発光シグナルを取得することに成功した。さらに、概日発現型発光レポーターを用いることで、個々の細胞時計が示す挙動を長期間にわたって観察できることを示した。また、レポーターが導入される細胞の種類や、細胞発光特性の導入 DNA 量依存性について解析を行い、本測定系を使用した解析の基盤となる知見をまとめた。

第 2 章では、開発した 1 細胞発光測定系を用いてイボウキクサ個体内における個々の細胞の概日リズムを解析し、植物の概日時計を多細胞系として理解することを目指した。まず、連続明条件や連続暗条件といった定常条件下では、各細胞の概日リズムは徐々に脱同期し、個体全体での時間情報の共有が長期間は維持できないことが明らかとなった。脱同期が生じる要因として、細胞間で概日リズムの周期が異なること、個々の細胞の周期自体が不安定であることが推定された。個体全体では脱同期が見られた一方で、脱同期時の細胞が示す概日リズムの位相差は近傍細胞で低い傾向がみられた。このことは、細胞間に互いの概日リズムを同期させるような相互作用が働いていることを示唆している。しかしながら、相互作用の強度は細胞時計間の周期不均一性や、細胞時計自体の周期不安定性を打ち消すほど大きくはなく、個体全体で細胞時計を同期させることはできないと考えられた。次に、細胞時計が脱同期状態にある植物個体に明暗条件を与え、個々の細胞の概日リズムが外環境変動へ応答する様子を観察した。その結果、位相の異なる細胞発光リズムが外部

明暗周期に同調していく過程が観察できた。解析の結果、個々の細胞発光リズムは 2 日で外部明暗条件へ完全に同調し、同調過程における細胞時計の挙動は、明暗条件前の位相にのみ依存すると考えられた。このことは、個体内の細胞は各々の時間情報に従い、細胞自律的に明暗条件に同調することを示唆している。さらに、明暗条件下において、細胞発光リズムの位相は個体内に空間パターンを形成することを発見した。これはウキクサ葉状体の中心部の細胞において位相が先行するというパターンであり、再現よく観察できた。また、明暗条件への同調前の細胞発光リズムの周期・位相に同様のパターン構造が見出されなかったことから、明暗条件下における位相の空間パターンは、細胞の位置情報に基づき新たに形成されると考えられた。以上の解析から、植物個体内の細胞は、連続明条件では独立した時計として振る舞うが、明暗条件下では連結した時計として機能し得ることが明らかとなった。

第 3 章では、ウキクサ植物にみられる個体レベルの概日リズムの多様性について解析を行った。ここではパーティクルガンによる遺伝子導入の簡便さに注目し 4 属 5 種のウキクサ植物 9 株へ概日発現型発光レポーターを導入し、発光変動の測定を行った。明暗条件下では、測定を行った株すべてで発光変動の明瞭な日周リズムが観察された。連続明条件では、概日リズムの周期や安定性に多様性がみられた。このことからウキクサ植物の概日時計において、昼夜サイクル下で時間情報を保持する機構は保存されているが、その分子機構はある程度多様化していることが示唆された。また、本解析を進める上で、様々なウキクサ植物における生物発光の測定を同一条件で行うことができる培養培地の開発に成功した。

本研究で構築した 1 細胞発光測定系により、これまで知見の乏しかった植物個体内における細胞概日時計の基本的性質を明らかにすることができた。また、本研究で発見された明暗条件下における位相空間パターンは再現よく観察できるため、この空間パターンの形成機構を解析することで、細胞時計間の相互作用機構の研究を実証的に進めることができる。さらに、維管束組織の発達度や個体サイズに大きな多様性があるウキクサ植物を用いることで、個体の構造が細胞時計集団の挙動に与える影響を検証することが可能になると考えている。

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。

第 1 章

A single-cell bioluminescence imaging system for monitoring cellular gene expression in a plant body

Tomoaki Muranaka, Saya Kubota and Tokitaka Oyama

2013 年 12 月発行

Plant and Cell Physiology 誌 第 54 卷 第 12 号 2085 頁～2093 頁に掲載

第 2 章 [2016 年 7 月 15 日改定]

Heterogeneity of cellular circadian clocks in intact plants and its correction under light-dark cycles.

Tomoaki Muranaka and Tokitaka Oyama

2016 年 7 月発行

Science Advances 誌 第 2 卷 e1600500 に掲載

第 3 章

Characterisation of circadian rhythms of various duckweeds

Tomoaki Muranaka, Masaaki Okada, Jun Yomo, Saya Kubota and Tokitaka Oyama

2015 年 1 月発行

Plant Biology 誌 第 17 卷 第 s1 号 66 頁～74 頁に掲載

序章

植物における概日時計研究の現状と課題

概日時計の発見

生物が日々さらされている自然環境は、刻一刻と変化する。とくに地球の自転に起因する24時間周期の環境変動は自然界のいたるところで見出すことができる。この日周変動は天体の運行というきわめて正確な自然現象により生じるため、ある程度の予測が可能である。地球上の多くの生物は概日時計を体内に保持することで、それぞれの生活環境における日周変動を予測し、先んじて適応的な行動を行っている。概日時計は生物の内部に24時間周期の振動を作り出す仕組みであり、この振動を昼夜サイクルへと同調させることで環境変動の予測を可能にすると考えられている。つまり、概日時計が生成する振動は、入力系を通して受け取った刺激により外環境変動へと同調し、出力系を通して多くの生理現象へと伝えられる(図0.1)。この機構を用いて生物は日々の規則正しい生命活動を行っている。例えば、ニワトリは早朝陽が昇る前に鳴きはじめ、ショウジョウバエは朝と夕方に活動し、インゲンの葉は夜間に閉じ朝に開く。

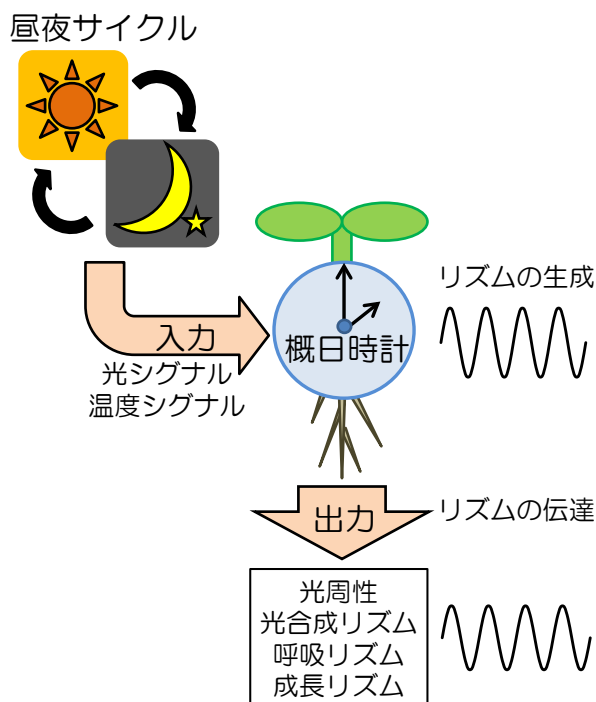


図0.1 植物における概日時計システム

植物は、体内の概日時計が生成する振動(リズム)を昼夜サイクルに同調させることで、種々の生理現象を効率よく運用している。外部環境からの時計への入力と同調因子としても、出力のトリガーとしても作用する。

概日時計が生成する振動は環境変動のない定常状態でも継続し、この振動は様々な生理現象における約24時間周期の概日リズム(自由継続リズム)として観測することができる。例えば、温度一定の暗室中において、ニワトリの鳴く頻度、ショウジョウバエの活動、インゲンの葉の位置は概日リズムを示す(Shimmura and Yoshimura 2013、Grima et al. 2004、Bünning 1960)。概日リズムの発見は古く、1729年にフランスの天文学者であったド・メラン(de Mairan)が暗室中に置いたオジギソウの葉がひとりでの開閉を繰り返す様子を観察したのが最初の報告である(de Mairan 1729)。ド・メランの報告以降、多くの研究者が葉の周期的な運動の研究を行ってきた。その中の一人であるビュニング(Bünning)が葉の周期的な運動を「時計」という計時機構と結びつけた最初の人物であった。この着想には1920年にガーナー(Garner)とアラード(Allard)が発見した光周性が大きな影響をもたらしている。彼らはダイズが日長に依存して花成時期を決定していることを明らかとし、植物が日長を測定できることを示唆していた(Garner and Allard 1920)。ビュニングは概日リズムに時間情報が埋め込まれていることを指摘し、植物が概日リズムを用いて日長を認識できる可能性を指摘した(図0.2)。そして、実験により概日リズムのどの時刻(位相)に光が照射されるかで花成誘導が決定されることを実証した(Bünning 1936)。概日リズムは古くから知られていた現象であったが、ビュニングがその中に時刻を見出した時に、概日時計は発見されたといえる。ビュニングの発見以降、生物には計時機構が備わっていること、それが内在性の24時間周期の振動を基盤とすることが認知されていった。

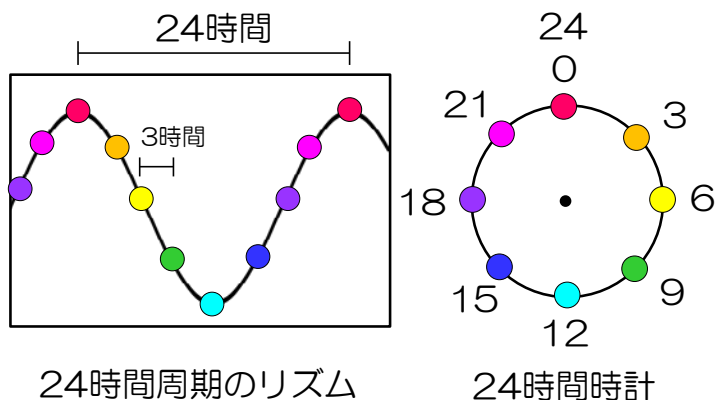


図0.2 リズムには時間情報が埋め込まれている

概日リズムの周期は約24時間であるが、簡単のため24時間周期のリズムを考える。この場合、ピークとピークの間隔は24時間である。ピーク間を8等分し、色の異なる点でプロットすると点同士の間隔は3時間となる(左)。このように考えると、概日リズムは時間を測る「ものさし」となることが分かる。この点を円周上に並べると、24時間時計となる(右)。各色の点は、植物の主観的な時刻ともいえる。ビュニングは植物に光が照射された時に、植物が示す概日リズムがどの色の状態(時刻; 位相)であったかにより花成誘導が決定されることを示した。

概日時計の分子機構

概日時計の存在が広く認知されて以降、約 24 時間周期の振動を生成する分子機構の解明に多くの研究者が取り組み、ショウジョウバエにおいて、羽化と活動のリズムが異常となる変異体が得られた (Konopka and Benzer 1971)。そして、この変異体より *Period* 遺伝子が時計遺伝子として世界で初めて同定された (Reddy et al. 1984)。「時計遺伝子」とは、概日時計において振動生成機構に深く関わる遺伝子のことである。それ以降、シアノバクテリア、シロイヌナズナ、ショウジョウバエ、マウス、アカパンカビなどのモデル生物において時計遺伝子が複数同定された。驚くべきことに、各生物で単離された時計遺伝子はマウス-ショウジョウバエ間を除き相同ではなく、概日時計機構はシアノバクテリア、植物、動物、菌類で独自に獲得されたことが示唆された。各生物において概日時計の分子機構が解析された結果、真核生物における時計遺伝子は、どの生物においても、その発現が特定の時刻にピークを示して振動することが明らかとなった。これらの時計遺伝はそのほとんどが転写因子であり、転写・翻訳フィードバックループを形成することで自励振動を生成すると考えられている (Jolma et al. 2010)。つまり、真核生物の概日時計における振動生成機構の実体は、転写・翻訳フィードバックループによって構成される遺伝子ネットワークである。一方で、原核生物であるシアノバクテリアの概日時計は、KaiA、KaiB、KaiC の 3 種のタンパクの相互作用や KaiC のリン酸化状態の振動がその実体を構成していることが明らかとなり、KaiC リン酸化状態の概日リズムは、上記 3 種のタンパクと ATP のみをいれた試験管内で再構成できることが示されている (Nakajima et al. 2005)。このため、シアノバクテリアの概日時計は振動生成において転写・翻訳フィードバックループを必要とせず、真核生物の概日時計とはその機構が本質的に異なると考えられる。

シロイヌナズナにおける概日時計の分子機構

植物では、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、概日時計機構の解析が進められてきた。とくに、時計遺伝子の解析に際しては 1992 年に開発されたルシフェラーゼ発光レポーターを用いた概日リズム測定法が広く用いられてきた (Millar et al. 1992)。発光レポーターは特定の遺伝子の発現活性を測定する手法であり、ホタルルシフェラーゼ (*LUCIFERASE*, *LUC*) 遺伝子を標的遺伝子のプロモーター下流に結合することで、プロモーター活性を生物発光量として測定する。概日時計の研究においては、概日発現を示す *Chlorophyll a/b-binding protein 2* (*CAB2*) 遺伝子のプロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合した *CAB2:LUC* の形質転換体がまず作出され、概日リズム変異体のスクリーニングや、表現型解析に用いられてきた。また、発光レポーターを用いたスクリーニング以外にも、光周性の変異体解析などから時計遺伝子が単離されてきた。その結果、代表的な時計遺伝子として、朝方に発現する *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*) と *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (*LHY*)、昼から夕方にかけて連続的に発現する

PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRR) ファミリー (発現時刻が早い順に、*PRR9*、*PRR7*、*PRR5*、*PRR1*)、夕方に発現する *GIGANTEA (GI)*、夜に発現する *LUX ARRHYTHMO (LUX)* と *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* と *EARLY FLOWERING 4 (ELF4)* が、それぞれ単離されている (Hsu and Harmer 2014)。解析の結果、これらの遺伝子は、複数のフィードバックループが結合した複雑な遺伝子ネットワークを形成し、自励振動を生成していると考えられている (図 0.3A)。このようなモデルの構築にあたって、発現変動を高時間分解能かつ非侵襲的に測定できる発光レポーター系は強力なツールとなっている。図 0.3A に示した遺伝子ネットワークモデルも、発光レポーターが導入された形質転換体において様々な時計遺伝子の変異体を作り出し生物発光変動の表現型を解析することで、その正当性が検証されている (Pokhilko et al. 2013)。また、振動生成機構に着目した形で主要構造だけを取り出したモデルも提出されている (図 0.3B)。このモデルでは、シロイヌナズナの時計遺伝子ネットワークは抑制型の転写因子群が 3 つ連結した形をしている。この形の遺伝子ネットワークは **Repressilator** とよばれ、発現する遺伝子が順に切り変わることで振動を生成することが示されている (Elowitz and Leibler 2000)。

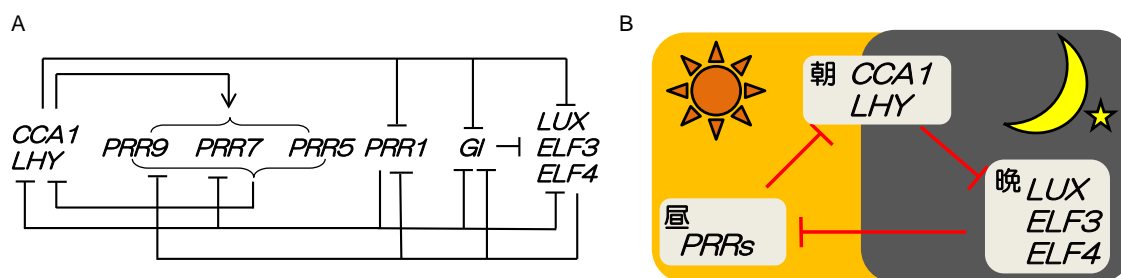


図 0.3 シロイヌナズナ概日時計遺伝子の遺伝子ネットワークモデル

(A) 時計遺伝子は転写因子であり、フィードバックループを形成することで自励振動を生成する。現在、多くの時計遺伝子が同定され、様々なモデルが提示されているが、ここでは Pokhilko et al.(2013)にならってモデル図を作成した。矢印は促進、Tバーは抑制を示す。時計遺伝子は、左から夜明けからの発現タイミング順に並んでいる。(B) (A)を簡略化したモデル。このように抑制型転写因子群が 3 個連結した遺伝子フィードバックループは **Repressilator** と呼ばれ、振動解の存在が証明されている。各遺伝子に、昼夜サイクル中でのおよその発現タイミングを併記した。本研究では主に、朝方に発現する *CCA1* 遺伝子の発現を測定することで概日リズムの解析を行った。

植物における時計遺伝子の保存性

前述したとおり、概日時計は進化上独立に何度も獲得されたと考えられる。そのため、シロイヌナズナを用いた研究で明らかとなった時計遺伝子が、他の植物でどの程度保存されているかは重要な問題である。また、シロイヌナズナは長日植物であり、日長応答が逆転する短日植物においても時計遺伝子の機能が保存されているかには大きな興味もたれる。そのため、様々な植物の概日時計についてシロイヌナズナで得られた知見をもとに解

析が進められてきた。その結果、多くの植物の間で時計遺伝子が保存されていることが明らかとなっている。とくに、*CCA1/LHY*と *PRR1*のホモログは単細胞緑藻であるオストレオコッカス (*Ostreococcus tauri*)、コケ植物であるヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)、そして多くの種子植物において単離されている (McClung 2013)。また、これらのホモログの解析の結果、発現変動パターンが共通していることが明らかとなり、概日時計を構成する遺伝子ネットワークの構造も広く保存されていることが示唆されている (Song et al. 2010)。とくに単子葉類の短日植物であるイネの *PRR* 遺伝子がシロイヌナズナにおいて *PRR* 遺伝子欠損を相補することが報告されたことで、時計遺伝子の機能が、双子葉類と単子葉類の間で、また、長日植物と短日植物の間で保存されていることが強く示唆されている (Murakami et al. 2007)。また、単子葉類の長日植物であるイボウキクサ (*Lemna gibba*)、短日植物であるアオウキクサ (*Lemna aequinoctialis*) においても、*LHY*、*PRRs*、*GI*、*ELF3*のホモログが単離され、発現変動パターンの保存性が明らかとなっている (Miwa et al. 2006)。さらにイボウキクサにおいては、パーティクルガン法による一過的な発光レポーター導入技術を利用した、時計遺伝子の過剰発現や RNAi ノックダウン時の表現形解析により、*LHY*、*GI*、*ELF3* の機能がウキクサーシロイヌナズナ間で保存されていることが明らかとなっている。(Serikawa et al. 2008)。ただし、イボウキクサにおいて *GI*の RNAi ノックダウンは概日リズムの消失を引き起こすが、シロイヌナズナにおける *GI*の欠損は概日リズムの短周期を引き起こすなど、一部の時計遺伝子の機能が分化していることが示唆されている (Locke et al. 2006)。

このように単細胞藻類から種子植物まで時計遺伝子は多様性をもちつつも系統的に保存されていることが明らかとなっているが、時計遺伝子ネットワークの構造という点では進化とともに複雑化していることが指摘されている。オストレオコッカスとヒメツリガネゴケでは *CCA1* ホモログと *PRR1* ホモログが形成する1つのフィードバックループから構成される単純な遺伝子ネットワークモデルが提出されている (Troein et al. 2011, Holm et al. 2010)。数理モデルを用いた解析では、時計遺伝子ネットワークに含まれるフィードバックループの数や光入力経路の数が増えることで概日時計の柔軟性が向上することが示唆されている (Dixon et al. 2014)。植物は、進化の過程で時計遺伝子の回路を複雑化することで、様々な環境において安定に機能する柔軟な概日時計を獲得してきたと考えられる。実際に、野外で生育するシロイヌナズナには、概日リズムの周期に大きな多型が存在することが明らかとなっており、同一種内においても時計遺伝子ネットワークに多様性が生じていることが示唆されている (Michael et al. 2003, Kusakina et al. 2014)。さらに、概日リズムの周期は生育地域における夏至の日長と相関を示したため、概日時計ネットワークが多様な生息地に適応する形で柔軟に変化し得ることが示唆されている。

多細胞系としての概日時計

次世代シーケンサーの開発などにより、モデル生物以外でのゲノム解析が加速する中、概日時計における遺伝子回路の進化・多様化の研究は今後大いに進むことが期待される。一方で、植物における概日時計システムの進化を考える上で無視できないもう1つの要素として、植物個体内の組織・細胞間における時間情報の統合機構がある(図0.4)。植物では個体内の多くの細胞が時計遺伝子を発現しており、個々の細胞は、自律的に概日リズムを生成する細胞概日時計として機能すると考えられる。そのため、植物が多細胞化していく過程において、多数の細胞時計が持つ時間情報を体内で統合する機構が必要になると考えられる。

組織間での時間情報の伝達には、維管束組織が関与することが示唆されている。シロイヌナズナの地上部と地下部(根)を分けて時計遺伝子の発現変動を解析した結果、明暗条件を地上部だけに与えても、地下部の時計遺伝子が明暗条件に同調することが明らかとなった。さらに、培地にショ糖が含まれている場合、地下部は地上部に与えられた明暗条件に同調しないことが明らかとなり、維管束組織によるショ糖の輸送が組織間での時間情報の伝達に関与することが示唆されている(James et al. 2008)。また、維管束組織と葉肉組織を分離して時計遺伝子の発現パターンを解析した例では、維管束組織の概日リズムが長期間維持される頑健なものであることや、維管束組織特異的に概日時計を攪乱すると葉肉組織の概日リズムが減衰することが報告されている(Endo et al. 2014)。さらに、シロイヌナズナ *CCA1:LUC* 形質転換体を用いた葉のイメージングでは、葉脈が近傍の細胞の概日リズムに影響をあたえる可能性が示唆されている(Fukuda et al. 2007)。これらの研究から、組織間の時間情報の統合には維管束組織が深く関与していると考えられる。

一方で、葉や根のような組織内における細胞間での時間情報の統合機構は不明な点が多い。発光レポーター形質転換体を用いたイメージングにより、組織内の概日リズムの分離測定が行われているが、これまでの測定全てにおいて、組織内の領域間での概日リズムの脱同期が観察されている。概日リズムが脱同期するということは組織内で時間情報が統合されていないことを意味している。しかしながら、シロイヌナズナの葉の測定では、葉内の概日リズムが完全に脱同期することはなく、近傍領域間では概日リズムのズレが小さい傾向がある(Fukuda et al. 2007, Wenden et al. 2012)。また、2時間の暗期刺激により概日リズムを攪乱した際には、まず葉と葉の間で脱同期が生じ、ついで葉の中で脱同期が生じることが報告されている(Fukuda et al. 2013)。これらの観察結果から、細胞間での時間情報の統合機構はなんらかの形で存在すると考えられている。しかしながら、葉における概日リズムの脱同期過程は実験ごとに大きく異なるため、脱同期現象そのものの解析もままならないのが現状であり、時間情報の統合機構の解析は非常に困難となっている(Wenden et al. 2012)。さらに、個々の細胞の概日リズムを長期間測定する技術が確立していなかったため、個々の細胞時計の性質が不明であったことも詳細な解析ができない大きな理由となっていた。発光レポーター形質転換体を用いたイメージングでは、受光部に

複数の細胞由来の発光が入射するため、個々の細胞の概日リズムを分離して測定することは原理的に不可能である。本研究では、以下で述べる理由により、ウキクサ植物で開発されていたパーティクルガンによる発光レポーター導入技術に着目し、この問題にアプローチした。

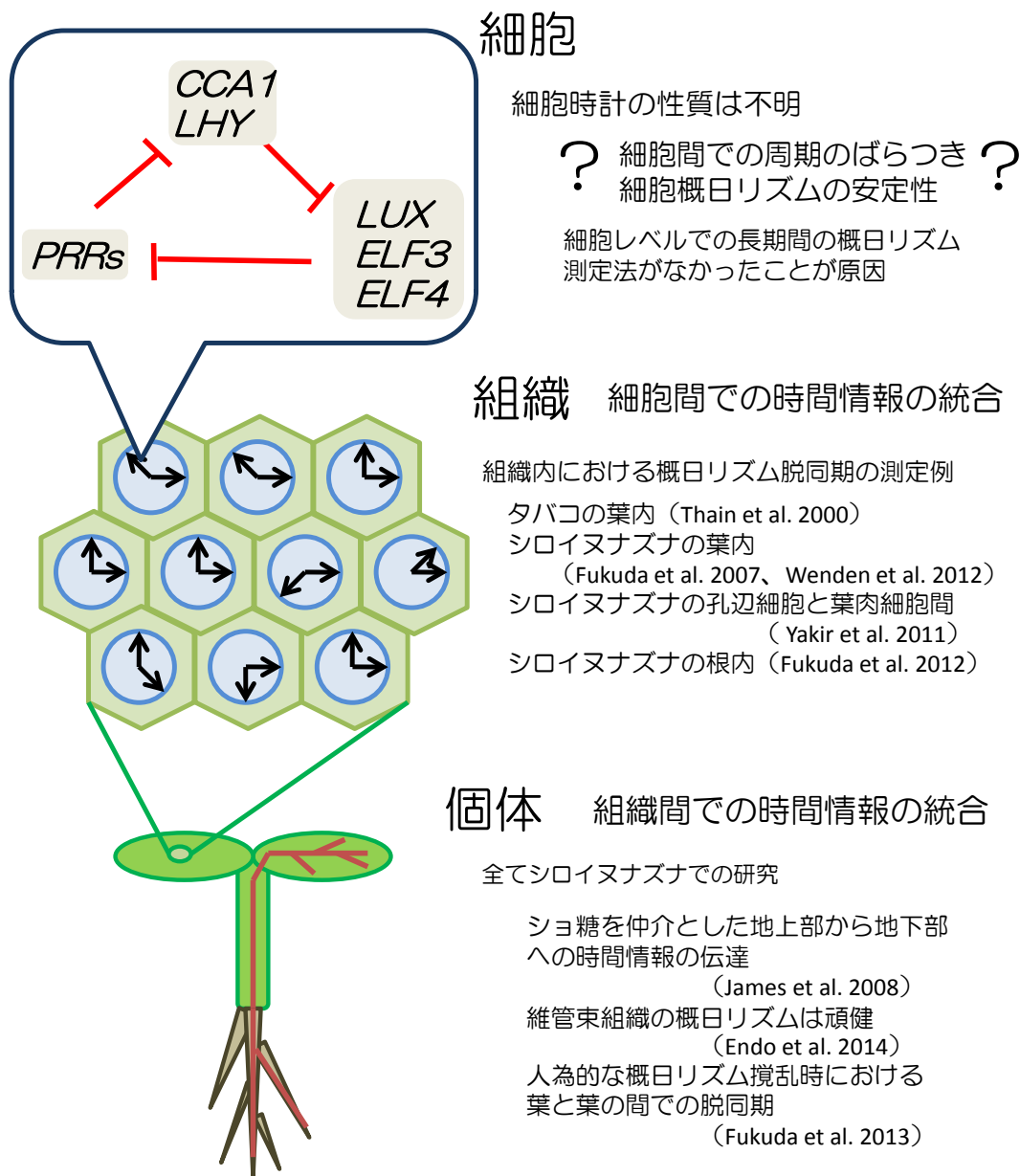


図 0.4 植物における概日時計の階層構造とこれまでの知見

個々の細胞は時計遺伝子を発現しており、独立した細胞時計として機能できると考えられる。組織を分離しての発現解析や、発光レポーターや蛍光レポーターを利用したイメージングにより、組織レベルでの概日リズムの測定は行われているが、細胞レベルで概日リズムを1日以上測定した例はなかった。

ウキクサ植物

ウキクサ植物は単子葉類オモダカ目サトイモ科に属する、小型で水に浮いて生育する植物である。ウキクサ植物は 5 属でウキクサ亜科を形成しており、属間で形態が多様化している (図 0.5)。ここでは代表例として、本研究で主に用いたイボウキクサ (*Lemna gibba*) を図 0.6A に示す。ウキクサ植物は、フロンドと呼ばれる葉状体が数個連なった形状をしており、このフロンドの集合をコロニーと呼ぶ (図 0.6B)。フロンドは茎と葉が癒合したものであり、単一のシュートと考えられている。また、*Lemna* 属ではフロンドの裏面に 1 本の不定根が生じる。フロンド基部の両側面にはポケットがあり、そこから娘フロンドが成長し新たなコロニーとして独立することで無性的に増殖する。ウキクサ植物は水面を浮遊するために個体内部に多くの気室を形成し浮力を得ている (図 0.6C)。維管束組織は、陸上植物に比べて簡素な作りをしており、イボウキクサではフロンド内に葉脈様の組織が 3-4 本みられるが、各葉脈様組織には通導組織が 1-2 本確認できるのみである。

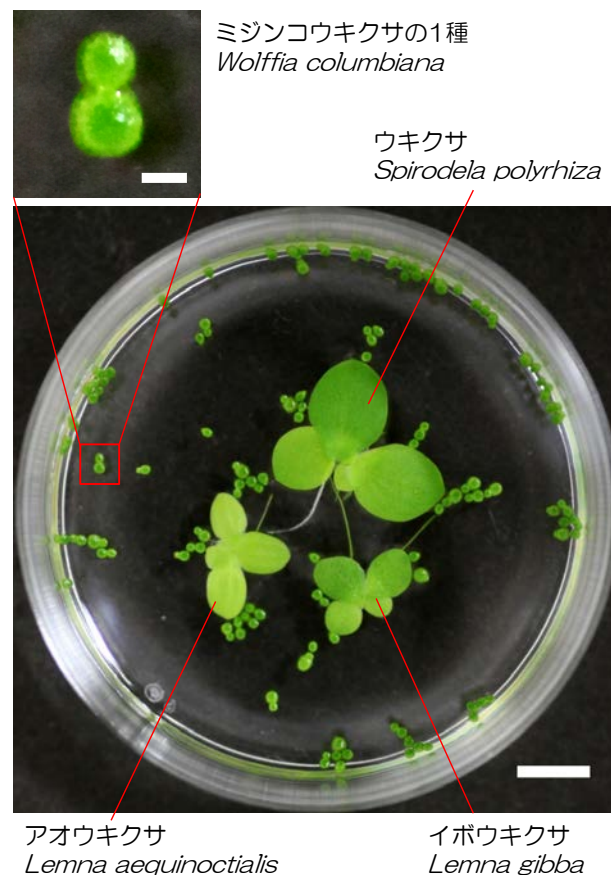


図 0.5 ウキクサ植物の多様な形態

多くの生理学実験で用いられてきた *Lemna* 属の 2 種と、最も大型な *Spirodela* 属の 1 種、最も小型な *Wolffia* 属の 1 種を 35 mm シャーレに浮かべた。Bar: 5 mm (集合写真)、0.5 mm (拡大図)

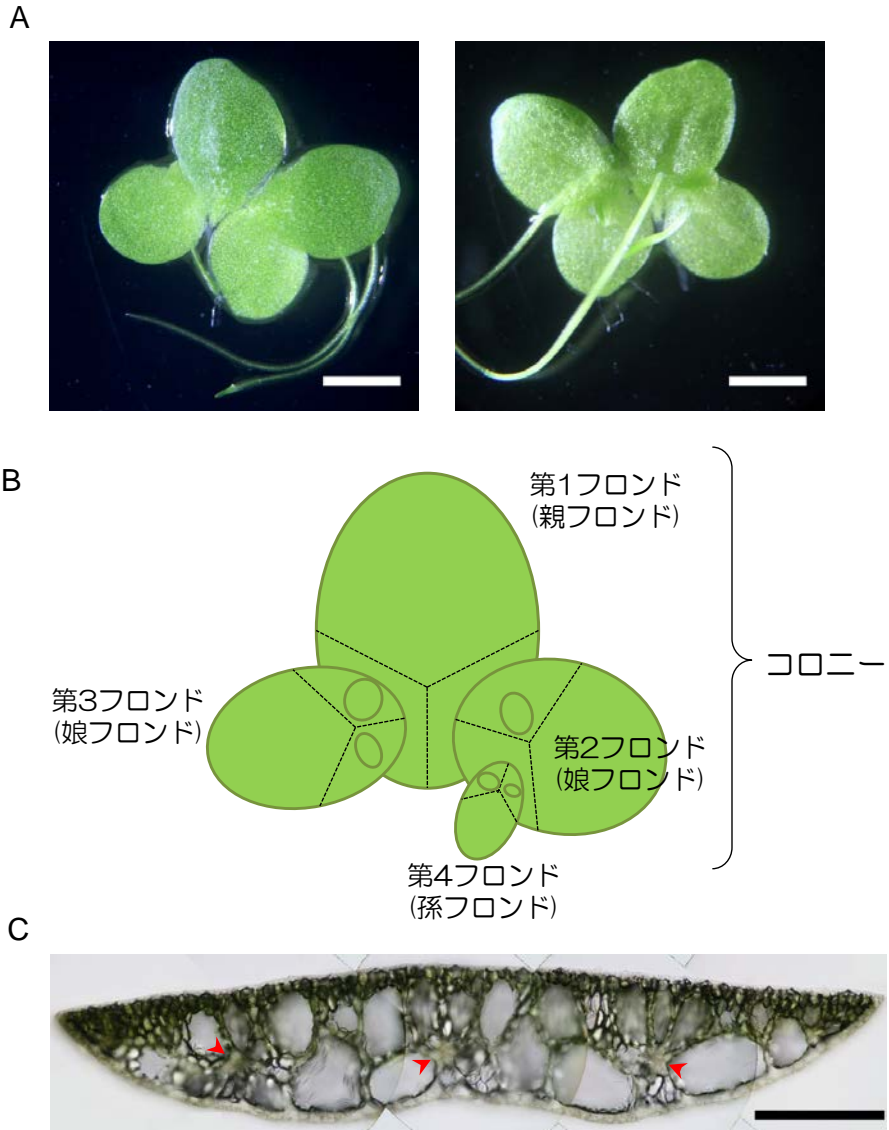


図 0.6 イボウキクサの構造

(A) 本研究で主に用いたイボウキクサの写真。表(左)と裏(右)。植物体の裏には不定根が1本生えている。Bars: 2 mm (B) ウキクサ植物の構造。葉状体をフロンドと呼び、フロンドの集合体をコロニーと呼ぶ。フロンド基部の両側面にはポケットがあり、そこから娘フロンドが成長する。成長した娘フロンドは親フロンドから独立し、新たなコロニーを形成する。娘フロンドが目視で確認できる頃には、その中で孫フロンドがすでに成長している。各フロンドのポケットの境界線を点線で示した。(C) イボウキクサの横断面。第1フロンドの中心付近をカミソリで切り出し、光学顕微鏡で観察した。ウキクサ植物は個体内に大きな気室を持つ。維管束様組織を赤矢頭で示した。Bar: 0.5 mm

ウキクサ植物を用いた概日時計研究

ウキクサ植物は小型で無菌培養が可能であり無性生殖で増殖することができるため、古くから生理学実験に用いられてきた (Hillman 1961)。また、*Lemna* 属内の近縁種に長日植物であるイボウキクサと短日植物であるアオウキクサが存在するため、光周性花成の解析に古くから用いられてきた。また、光周性の基盤である概日時計の研究も光周性の解析と平行して進められており、酸素の吸収や二酸化炭素の排出、カリウムイオンの吸収が概日リズムを示すことが報告されている (Miyata and Yamamoto 1969、Hillman 1970、Kondo and Tsudzuki 1978)。最近になって、主要な時計遺伝子である *LHY*、*PRR*、*GI*、*ELF3* のホモログがイボウキクサとアオウキクサから単離された (Miwa et al. 2006)。さらに、パーティクルガンによる遺伝子導入技術を利用した発光レポーターによる概日リズム測定法が開発され、分子生物学的な概日時計研究の基盤が整備されている (Miwa et al. 2006、Serikawa et al. 2008)。パーティクルガン法を用いた概日リズム測定法では、概日発現型発光レポーター DNA をコーティングした金粒子を、ヘリウムガス銃で植物体に打ち込む。導入 DNA が核内に取り込まれた細胞では、発光レポーターが発現し、発光リズムが観察できるようになる (図 0.7)。

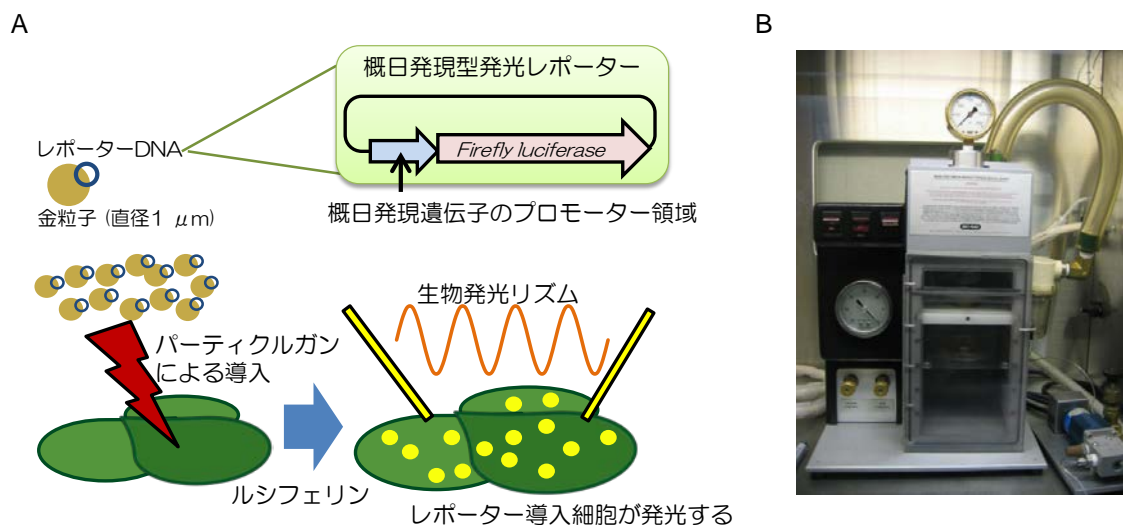


図 0.7 パーティクルガンによる発光レポーターの導入

(A) パーティクルガンを用いた発光レポーターの導入。生物発光レポーター遺伝子の DNA をコーティングした金粒を He ガス銃により植物体に打ち込む。レポーターが導入された細胞は生物発光レポーター遺伝子中のプロモーター活性にしたがってルシフェラーゼを合成し、発光基質であるルシフェリン存在下で発光を示す。(B) 本研究で用いたパーティクルガン装置。

本研究の概要

パーティクルガン法では、遺伝子は植物体の表面近くの細胞に導入されるが、どの細胞に導入されるかは確率的に決まるため、遺伝子導入細胞は個体内にまばらに存在する (Klein et al. 1988)。著者は、この性質を利用することで個体内の細胞が示す発光を分離して測定できると考えた。そこで本研究では、パーティクルガン法によるウキクサ植物への発光レポーター導入技術を基盤として、個体内の細胞が示す概日リズムを個別に測定する技術を開発し、これを用いることで植物の概日時計システムを細胞レベルから理解することを目指した。研究の結果を以下の3章に分けて報告する。

第1章

1 細胞生物発光イメージング系を用いた植物個体内の細胞における遺伝子発現変動の測定

発光レポーターをパーティクルガンでイボウキクサに導入し、高感度カメラでイメージングすることで、個々の細胞由来の発光を分離して測定することに成功した。さらに、概日発現型発光レポーターの導入実験では、個々の細胞時計が示す挙動を長期間にわたって観察可能なことを示した。また、レポーターが導入される細胞の種類や、細胞発光特性の導入 DNA 量依存性について解析を行い、本測定系を用いる解析の基盤となる知見をまとめた。

第2章

植物個体内における細胞概日時計の不均一性と、明暗条件下でのその不顕在化

第1章で構築した1細胞発光測定系を用い、イボウキクサにおいて個体内の個々の細胞が示す概日リズムを解析した。その結果、定常条件では個体内の細胞時計の独立性が高く、その性質も不均一であることが明らかとなった。そのため、定常条件において細胞間での概日リズムの脱同期が観察された。明暗条件に同調した個々の細胞時計が示すピーク時刻を解析した結果、空間パターンが見出された。この空間パターンは、定常条件での測定から推定された細胞時計の性質とは相関がなかったため、細胞の位置情報に基づき明暗条件下で新たに形成されると考えられた。このことは明暗条件下における細胞時計の挙動は、個体上の位置に大きく影響されることを意味する。そのため、明暗条件下では細胞時計の独立性は低くなり、個体レベルの概日時計システムの一部として統合されることが示唆された。

第3章

様々なウキクサ植物における概日リズムの解析

第2章ではイボウキクサのみを材料として用いたが、多様な形態をもつウキクサ植物全般を材料として使用できれば個体構造などが細胞時計に与える影響が検証できる。そこで4属5種のウキクサ植物について同一条件で概日リズムを測定する基盤を構築した。さらに、

個体レベルでの概日リズムの解析を行った結果、明暗条件下では全てのウキクサ植物が明瞭な日周リズムを示したが、連続明条件では概日リズムの周期や安定性に多様性が見られた。このことから、ウキクサ植物の概日時計において、昼夜サイクル下で時間情報を保持する機構は保存されているが、その分子機構はある程度多様化していることが示唆された。

上記のように、本研究では、ウキクサ植物へのパーティクルガンによる発光レポーター導入による概日リズム測定系が、測定器を変更するだけで、細胞レベルの解析から生態レベルの解析まで幅広く対応できることを示した。この 2 つの階層は現在の生物学では遠く離れたものという印象を受けるが、本来は不可分なものである。ウキクサ植物を材料として、この階層をシームレスに行き来できることを示した本研究の意義は大きいと考えている。

第1章

1 細胞生物発光イメージング系を用いた

植物個体内の細胞における遺伝子発現変動の測定

導入

環境応答に代表される生物の挙動を分子レベルで理解する上で、遺伝子発現の時間変化を解析する技術は重要な基盤である。とくに、ルシフェラーゼ遺伝子を用いた遺伝子発現測定は、その非侵襲性と高い定量性から様々な生物種において用いられている。この手法ではルシフェラーゼ遺伝子を標的遺伝子プロモーター下流に結合した発光レポーターを作成し、対象生物に導入する。生体内のルシフェラーゼは発光基質であるルシフェリンを充分量与えられると発光反応を起こし、その発光強度はタンパク量を反映する。ルシフェラーゼタンパク量は発光レポーターのプロモーター活性を反映しているため、発光量を定量することで遺伝子発現活性が推定できる。

植物における発光レポーターを利用した遺伝子発現変動の最初の測定例は、タバコの形質転換体による概日リズムの測定であった (Millar et al. 1992)。生物発光の定量は対象への刺激や傷害が非常に少ないため、同一個体において発現変動を長期間、高い時間解像度で測定することが可能である。この性質は長期間の概日リズム測定が必要となる概日時計の研究において大きな利点であり、発光レポーターは優れた概日リズムのマーカーとして多くの生物で用いられている (Ishiura et al. 1998, Welsh et al. 2005)。植物においても概日発現型発光レポーターは、シロイヌナズナ、イネ、ヒメツリガネゴケ、クラミドモナス、*Osterioccus tauri* などの様々な植物や藻類に導入され、概日時計研究の強力なツールとして活躍してきた (Millar et al. 1995, Sugiyama et al. 2001, Aoki et al. 2004, Matsuo et al. 2008, Corellou et al. 2009)。また、一過的な遺伝子発現を用いた測定としてパーティクルガンによる植物個体への発光レポーター導入や、PEG 法によるプロトプラスト細胞への発光レポーター導入による概日リズムの測定例も報告されている (Miwa et al. 2006, Kim and Somers 2009)。

近年の光学技術の発達により、発光レポーターによる細胞レベルでの遺伝子発現変動の観測が可能となり、発光レポーター技術は生物個体を多細胞系として理解する上でも強力なツールとなっている (Welsh et al. 2005)。しかしながら植物では、発光レポーターを用いた細胞レベルでの遺伝子発現の解析は進んでいない。これは、形質転換体では全ての細胞が発光を示し、1 細胞由来の発光を分離して測定することが困難なためだと考えられる。一方で、パーティクルガンによる遺伝子導入では、個体表面近くのまばらな細胞に遺伝子

が導入されるため、細胞発光を分離して測定できることが予想される。そこで、パーティクルガンにより発光レポーターを導入することで、植物個体内の複数細胞における遺伝子発現変動を同時測定する技術の開発を目指した。

測定系の開発にあたって、すでにパーティクルガンによる発光レポーター導入技術が確立していたウキクサ植物を実験材料として用いた (Miwa et al. 2006)。小型で平坦なウキクサ植物は高解像度での全身撮影が可能であり、成熟したフロンドは成長せず、鉛直方向に移動しないため、長期間の撮影に適している。本研究では、これまで多くの研究で用いられてきた代表的なウキクサであるイボウキクサ (*Lemna gibba*) G3 株を材料として 1 細胞生物発光イメージング系の開発を行った。本章では、開発の過程と、開発した測定系を用いて測定した個体内の細胞における遺伝子発現の解析結果について報告する。

結果

個体内における細胞発光の分離測定

パーティクルガンにより、構成発現型発光レポーターである *CaMV35S:LUC* をイボウキクサへと導入し、導入レポーター発現のために1日培養した。植物体を高感度 CCD カメラによるマクロ接写で撮影した結果、単一細胞由来と思われる発光が植物個体上のスポットとして観察できた (図 1.1)。これらのスポットの発光は、レンズの最大倍率で取得した画像において、画像処理ソフトで分離して定量することが可能であった。このことから、個体中の各細胞の遺伝子発現活性を各スポットの発光強度として分離して測定できることが示唆された。また、白色 LED に接続された光ファイバから植物用の照明を PC による制御で照射することで様々な光環境での生物発光の自動測定を可能とした。

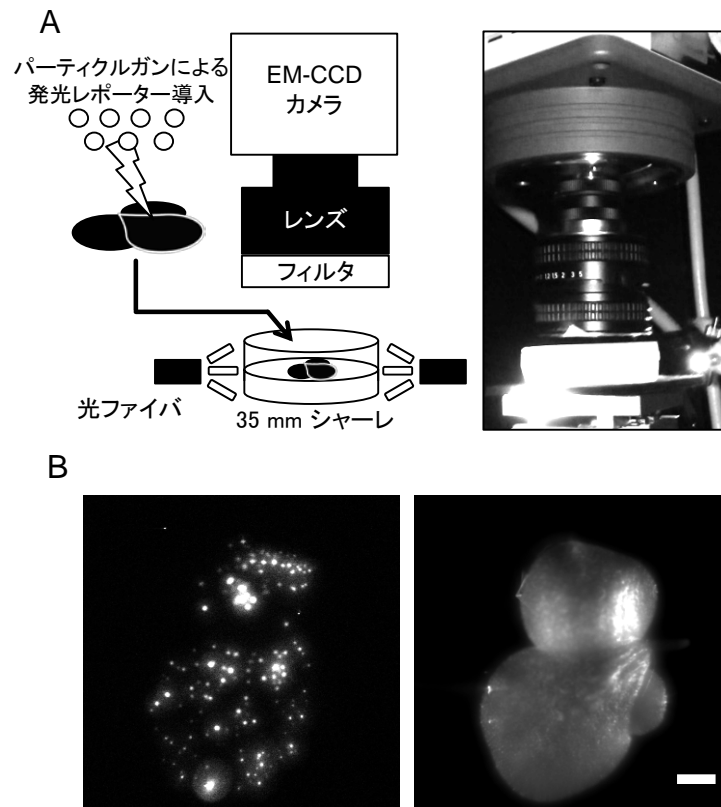


図 1.1 1 細胞発光測定装置

(A) 1 細胞発光測定装置の概略 (左) と側面からの近影 (右)。レンズには葉緑体由来の蛍光を除去するための光学フィルタが装着されている。(B) *CaMV35S:LUC* が導入されたイボウキクサの生物発光画像 (左) と明視野像 (右)。白色スポットが一細胞由来の発光。生物発光は 300 秒の露光で取得。Bar: 1 mm

発光数と細胞発光量は導入 DNA 量依存的に増加する

発光強度はスポットごとに大きく異なっていたため、細胞発光の分布解析を行った。パーティクルガンによる遺伝子導入では、金粒子に導入遺伝子の DNA をコーティングしたものを細胞へ打ち込むため、導入 DNA 量が細胞ごとに異なると予想される。そこで、細胞発光の分布特性の DNA 量依存性もあわせて解析した。*CaMV35S:LUC* の DNA 量を 0.1、1、10 μg と変えて金粒子を調製し、35 mm シャーレに並べた約 15 コロニーのイボウキクサへ導入した。約 1 日培養し、シャーレ全体の発光を測定した結果、DNA 量依存的に発光スポット数と発光強度が増加する傾向が確認できた (図 1.2A)。そこで、各シャーレから導入効率の高い 5 コロニーを選び、レンズの最大倍率で生物発光を測定し、発光スポット数と発光量を算出した。この際、大きな幅を持つ細胞発光量を正確に定量するために、露光時間を 6 秒、60 秒、600 秒と変えて生物発光を測定し、細胞ごとに CCD 素子が飽和していない露光時間のデータを用いて発光量を定量した。測定できた発光細胞の数は DNA 依存的に増加した (表 1.1)。発光細胞密度は 1 μg での導入で約 2 cells/mm² であり、0.1 μg での導入の約 5 倍、10 μg での導入の約半分であった。DNA 量が多い時のほうが発光細胞密度の増加率が低いことは、金粒子にコーティング可能な DNA 量に上限があることを反映していると考えられる。

細胞発光量はどの DNA 量での導入においても 1000 倍程度の幅に分布した (図 1-2B)。分布は対数正規様の分布を示した。正規性は Kolmogorov-Smirnov 検定では全ての分布で支持されたが、Shapiro-Wilk 検定では支持されない分布もあった (表 1.1)。発光量も DNA 量依存的に増加したが、幾何平均の増加率は 0.1 μg から 1 μg で 3 倍程度、1 μg から 10 μg では 2 倍以下であり、DNA 量増加による発光量の上昇率は、細胞密度の上昇率に比べ低かった。分布の形状は 0.1 μg での導入では非対称であったが、1 μg と 10 μg での導入では再現よく対称な分布が得られた (図 1.2B)。このことから、金粒子調製に用いる DNA 量は 1 μg 以上で十分だと結論づけた。

表1.1 細胞発光量分布の統計量

DNA量 (mg)	試行数	発光細胞数 (個)	発光細胞密度 (cells mm ⁻²)	発光量算術平均 (photons min ⁻¹)	発光量幾何平均 (photons min ⁻¹)	発光量幾何平均 (常用対数) mean \pm SD	KS ^a test <i>P</i> 値 ^b	Shapiro-Wilk <i>P</i> 値 ^b
0.1	Exp. 1	91	0.473	494	144	2.16 \pm 0.58	0.12	<0.001
0.1	Exp. 2	70	0.443	305	97.2	1.99 \pm 0.62	0.57	0.067
1	Exp. 1	413	1.86	582	285	2.45 \pm 0.51	0.29	0.011
1	Exp. 2	384	2.34	528	276	2.44 \pm 0.45	0.28	0.004
10	Exp. 1	751	3.81	828	436	2.64 \pm 0.47	0.58	0.053
10	Exp. 2	845	4.38	994	509	2.71 \pm 0.45	0.13	<0.001

^a Kolmogorov-Smirnov

^b Kolmogorov-Smirnov 検定 と Shapiro-Wilk 検定では、 $P > 0.05$ で正規分布が棄却されない

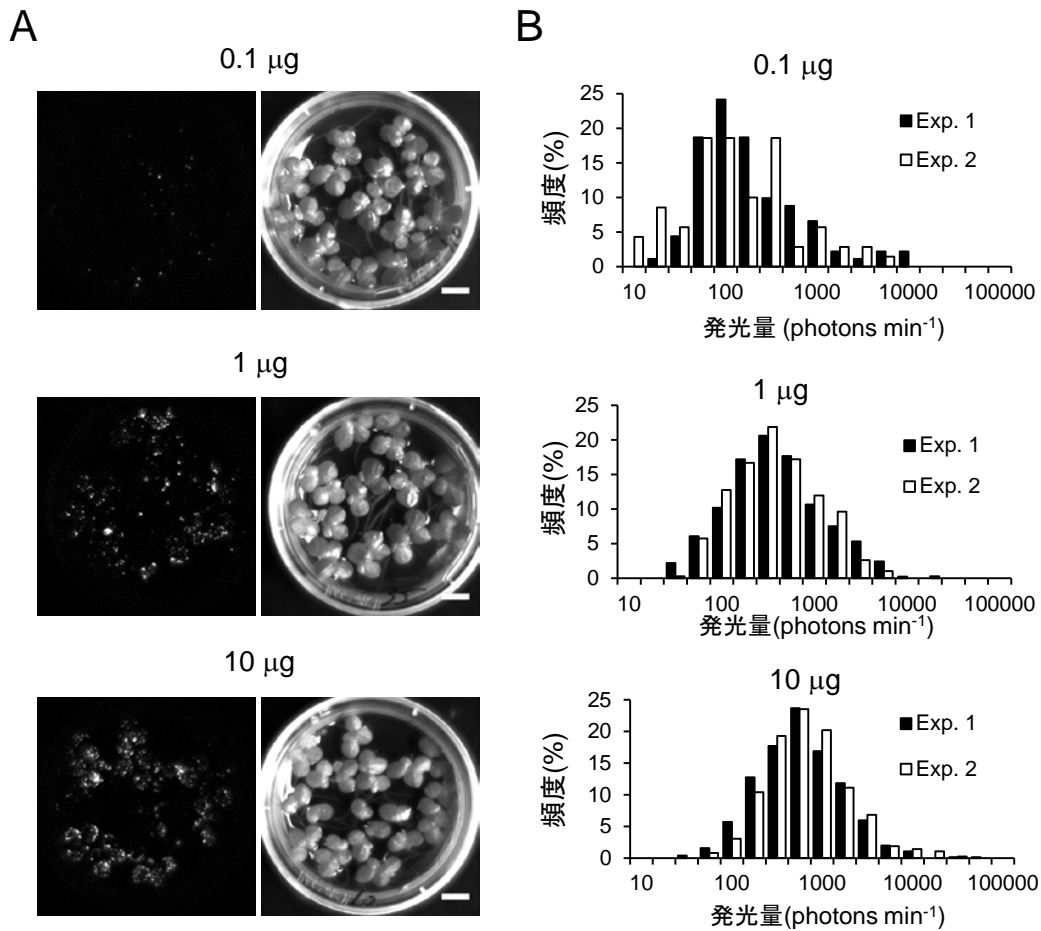


図 1.2 細胞発光量の DNA 量依存性

35 mm シャーレに並べたイボウキクサに *CaMV35S:LUC* を導入した。DNA 量を 0.1、1、10 μg と変えて導入を行った。導入後、暗条件で 12 時間培養後、明条件で 6 時間培養し、発光画像を撮影した。(A) 35 mm シャーレ全体の生物発光画像(左)と明視野像(右)。Bar: 5 mm。(B) 細胞発光量の頻度分布。シャーレ 1 枚につき、導入効率の高かった上位 5 コロニーを選びレンズの最大倍率で撮影し細胞発光量を定量した。発光量是对数表示。実験は 2 回行った。

同一コピー数の生物発光遺伝子を発現する細胞の発光分布

大腸菌やマウスでは、遺伝背景が同一な培養細胞においても、構成発現遺伝子のタンパク質量や mRNA 量が対数正規分布を示すことが報告されている (Furusawa et al 2005、Bengtsson et al. 2005)。そのため、植物でも遺伝子発現の活性が細胞ごとに大きく異なるのは妥当だと考えられる。しかしながら、1000 倍の分布幅はこれまで他の生物種で報告されている分布幅 (10-100 倍程度) よりも大きい。パーティクルガンによる遺伝子導入では細胞ごとに導入遺伝子のコピー数が異なることが予想される。このことが発光の分布に影響を与えるか検討するために、形質転換植物を用いることで同一コピー数の発光遺伝子を持つ細胞の発光を測定した。*AtCAB3:LUC* を発現するシロイヌナズナ形質転換体の本葉からプロトプラストを抽出し細胞発光量を定量した (図 1.3)。その結果、発光量は 50 倍程度の幅に分布し、その分布は対数正規分布であった (Shapiro-Wilk 検定 $P = 0.94$)。得られた分布幅が小さかったことから、パーティクルガン法において導入細胞ごとに導入コピー数が異なることが、今回開発した測定系における細胞発光量の大きな分布幅の要因の一つだと考えられた。

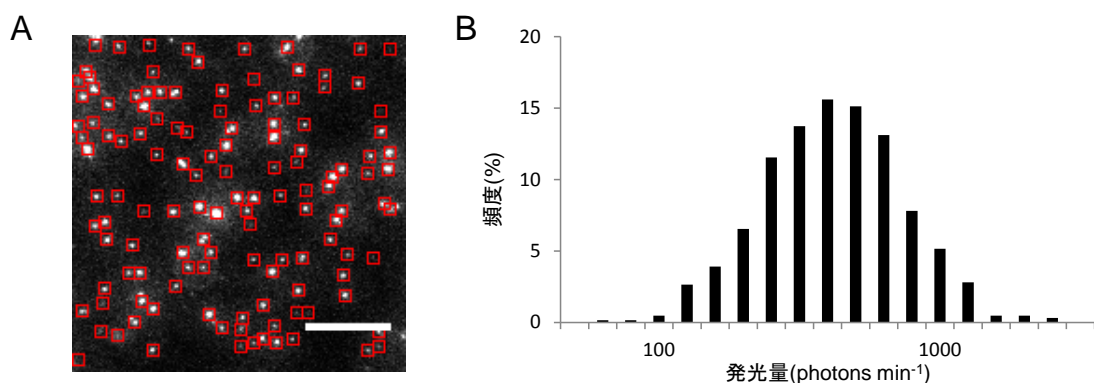


図 1.3 *CAB3:LUC* 形質転換シロイヌナズナのプロトプラストの発光量分布

CAB3:LUC 形質転換シロイヌナズナからプロトプラストを抽出し、スライドガラスに広げた。ルシフェリンを終濃度が 1 mM になるように滴下した直後に、生物発光を異なる 5 つの領域を撮影した。露光時間を 60 秒と 180 秒として撮影を行い、細胞ごとに適した露光時間で発光量を定量した。(A) プロトプラストの細胞発光。測定用の ROI を赤枠で表示。Bar: 1 mm。(B) 細胞発光量の分布。5 回の測定をまとめて表示している。測定細胞数は 647 個。

レポーターが導入される組織の解析

パーティクルガンによる遺伝子導入では植物個体の表面近くの細胞層に存在する、表皮細胞、孔辺細胞、葉肉細胞のいずれかにレポーター遺伝子が導入されると予想される。しかしながら、発光スポットの観察では空間解像度が低いため細胞種の判別は不可能であった。そこで、小胞体局在 GFP レポーター(*CaMV35S:GFP-h*, Nakano et al. 2009)を用いることでパーティクルガンによってレポーター遺伝子が導入される細胞の種類とその割合を解析した。共焦点レーザー顕微鏡で GFP 蛍光を観察することで細胞の形態、葉緑体の有無から細胞種を判別した (図 1.4 AB)。GFP レポーター導入細胞の内、約 80%が葉肉細胞、約 20%が表皮細胞であり、その他の細胞への導入は観察されなかった (図 1.4C)。4 回の測定において、この比率は大きくは変化しなかった。また、隣接する細胞の両方から GFP 蛍光が観察されることはなく、マクロ接写での生物発光でみられた発光スポットが単一細胞由来であることが支持された。

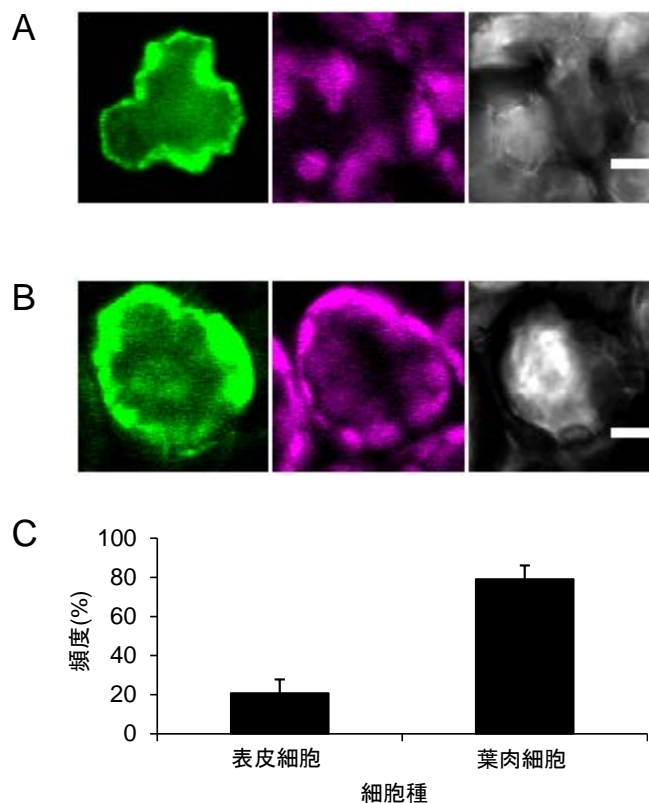


図 1.4 レポーターは 2 種類の細胞に導入される

GFP レポーターを導入した細胞を共焦点レーザー顕微鏡により観察し、細胞種を判別した。*CaMV35S:LUC* を共導入することで、生物発光測定により導入効率の高いフロンドを選別し、フロンド内で蛍光シグナルが検出できた全細胞について細胞腫を決定した。(A-B) 代表的な表皮細胞(A)と葉肉細胞(B)。左から、GFP 蛍光、葉緑体自家蛍光、明視野像。Bars: 10 μ m。(C) 観察された細胞腫の割合。Mean \pm SD ($n = 4$)。

構成発現型発光レポーター導入時の細胞発光変動の測定

構成発現型発光レポーターを用いて、細胞発光の経時的な測定を試みた。15 コロニーほどのイボウキクサに *CaMV35S:LUC* を導入後、1 mM ルシフェリンを含む培地で 12 時間暗 12 時間明条件下において 1 日培養した。最も導入効率がよかったフロンドを選び、明暗条件下において細胞発光の変動を 2 日間測定した。測定は 1 時間に一度、180 秒露光で行った。画像処理によりウキクサの移動補正を行い、分離可能であった 50 細胞の発光を測定した (図 1.5A)。50 細胞の発光量の総和は測定開始の約 5 時間に最大になり、その後徐々に減少し、測定終了時には最大時の約 30% となった (図 1.5B)。細胞発光は光環境の変化に対して明確な応答を示さなかったが、それぞれの細胞で独立に小刻みな変動を示した。また、その変動様式は近傍の細胞間においても異なっていた。図 1.5CD に局所領域の 4 細胞の発光変動の例を示す。各細胞の細胞発光の最大値は 561 から 3,475 photons min⁻¹ であり、最大発光を示した時刻も測定開始から 5 から 12 時間と異なっていた。Cell 3 では発光量が最大値の 40% 程度に維持されたが、Cell 2 と Cell 4 では発光量が急速に減少した。このように近傍細胞における発光変動の差異を検出できたことから、細胞間での発光の干渉は、少なくとも今回の細胞間距離 (~150 μm) においては、測定に問題ない程度だと結論づけた。

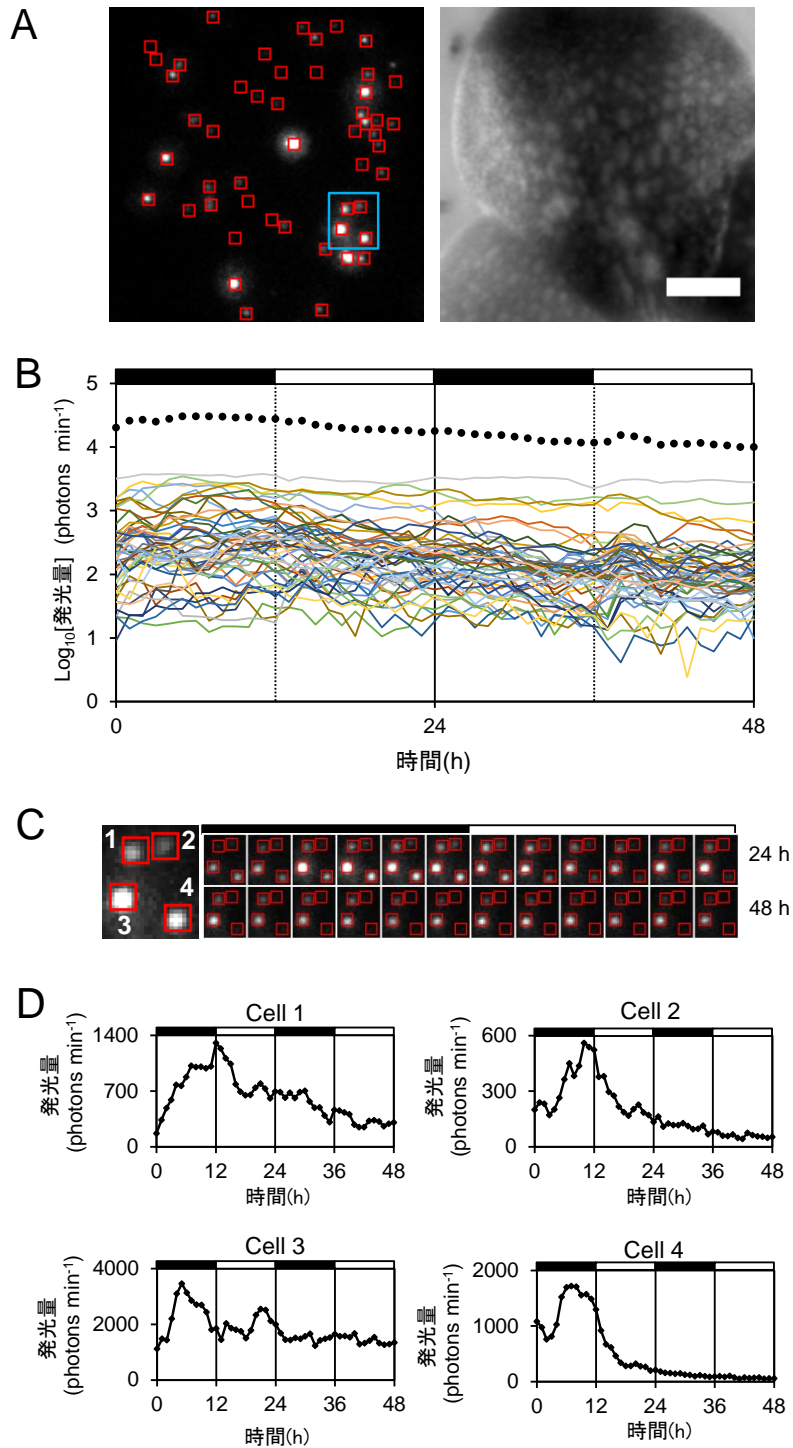


図 1.5 構成発現型発光レポーター導入時の細胞発光の経時測定

イボウキクサに *CaMV35S:LUC* を導入し、12 時間暗 12 時間明条件で培養後、明暗条件で生物発光を観察した。白線は明期、黒線は暗期を示す。(A) 測定フロンドの生物発光像 (左) と明視野像 (右)。測定用の ROI を赤枠で表示。Bar: 1 mm (B) 50 細胞の発光変動 (実線) と総発光量変動 (点線)。(C) (A)において青枠で囲んだ領域の連続写真。間隔は 2 時間。(D) (C)で示した各細胞の発光変動

概日発現型発光レポーター導入時の細胞発光変動の測定

概日発現型発光レポーターを用いて、概日時計の細胞レベルでの挙動解析が可能か検証した。概日発現型発光レポーターとして、シロイヌナズナの朝方に発現する時計遺伝子である *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*) のプロモーター下にルシフェラーゼを結合した *AtCCA1:LUC* を用いた。この発光レポーターは、本実験の材料であるイボウキクサを含む 2 種の *Lemna* 属のウキクサで概日リズムレポーターとして機能することが報告されている。15 コロニーほどのイボウキクサに *AtCCA1:LUC* を導入後、1 mM ルシフェリンを含む培地で 12 時間暗 12 時間明条件下において 1 日培養した。最も導入効率がよかつたフロンドを選び、明暗条件下において細胞発光の変動を 2 日間測定した。*AtCCA1:LUC* の導入効率は *CaMV35S:LUC* と同程度であったが、発光量が低かったため、測定は 900 秒露光で行った(図 1.6A)。測定頻度は *CaMV35S:LUC* での測定と同様に、1 時間に 1 度とした。画像処理によりウキクサの移動補正を行い、発光が分離可能であった 60 細胞の発光を測定した。60 細胞の発光量の総和は明瞭な日周リズムを示し、夜明けの 1-2 時間後に発光量はピークを示した。1 日目のピークに対して、2 日目のピークの発光量は 60% 程度に減少していた。個々の細胞発光をみても、全ての細胞が日周リズムを示し、ピーク時刻は 1 日目で夜明け後 1.4 ± 1.09 h (mean \pm SD)、2 日目で夜明け後 2.1 ± 0.88 h (mean \pm SD) と細胞間でよく揃っていた。各細胞のピーク発光量は 30 倍程度の幅でばらついていた。観察された日周リズムの振幅を評価するために、リズムのピーク(山)とトラフ(谷)の発光量の差を発光量の平均で割ったものを相対振幅として求めた。相対振幅は 0 から 1 の値を取り、振幅が大きいほど、値は 1 に近づく。細胞発光の相対振幅は 0.88 ± 0.06 (mean \pm SD) であり、細胞が示す日周リズムは、細胞の発光強度の程度によらず同程度の高振幅で振動していた。このことは発光レポーターが発光量によらず細胞内の時計の状態を反映していることを示唆している。このように多くの細胞が性質のよく似た日周リズムを示したが、波形を詳細に観察すると細胞ごとに違いが見られた。図 1.6CD に局所領域の 4 細胞の発光変動の例を示したが、各細胞の最大発光量は 80 から 224 photons min⁻¹ であり、ピーク時刻も多少異なっている。また、1 日目のピーク発光量に対する 2 日目のピーク発光量の減少率は 45-75% と細胞ごとに異なっていた。このように、明暗条件に同調しよく似た挙動を示す概日時計の発現変動分析においても、近傍細胞間での差異を検出することができた。

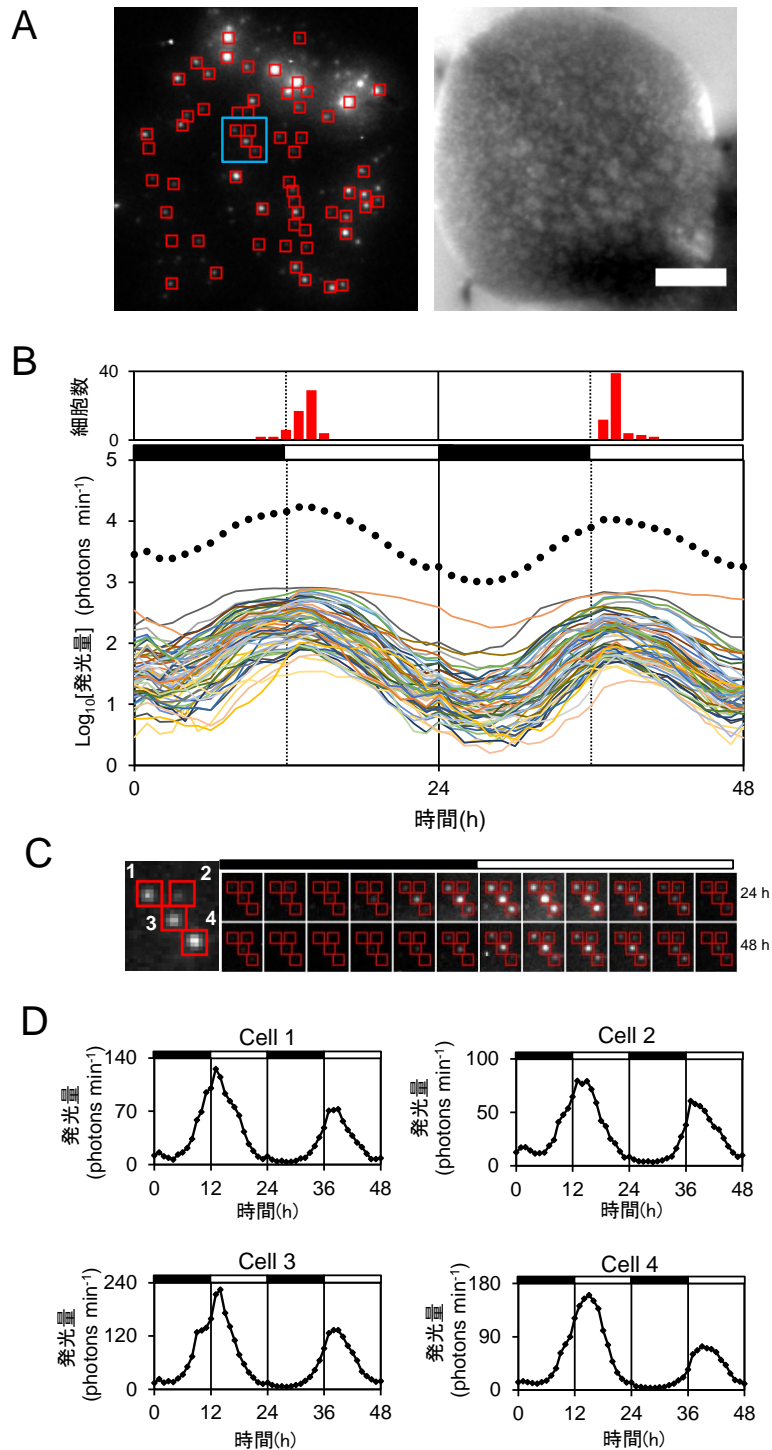


図 1.6 概日発現型発光レポーター導入時の細胞発光の経時測定

イボウキクサに *AtCCA1::LUC* を導入し、12 時間暗 12 時間明条件で培養後、明暗条件で生物発光を観察した。白線は明期、黒線は暗期を示す。(A) 測定フロンドの生物発光像 (左) と明視野像 (右)。測定用の ROI を赤枠で表示。Bar: 1 mm。(B) 60 細胞の発光変動 (実線) と総発光量変動 (点線)。上部にピーク時刻の頻度分布を表示。(C) (A)において青枠で囲んだ領域の連続写真。間隔は 2 時間。(D) (C)で示した各細胞の発光変動。

考察

1 細胞発光測定技術の開発

本章では、個体内における個々の細胞の遺伝子発現変動を測定する技術の開発を目標とした。まず、パーティクルガンにより生物発光レポーターを個体内の細胞にまばらに導入し、その発光を分離して測定することで、個々の細胞での遺伝子発現量を定量することに成功した(図 1.1)。さらに、カメラと照明を PC 制御とすることで自動測定を行い、細胞発光の時系列データの取得に成功した(図 1.5、図 1.6)。概日発現型レポーターである *AtCCA1:LUC* を用いた測定では、個々の細胞発光が夜明けにピークを持つ日周リズムを示した(図 1.6)。この特徴は先行研究で報告されている *CCA1* 遺伝子の発現パターンと同じである (Nakamichi et al. 2004, Miwa et al. 2006)。このことから、個々の細胞発光の変化は *CCA1* 遺伝子の発現量の変化を反映していると考えられる。

構成発現レポーター導入時でも、概日発現レポーター導入時でも、細胞ごとにその発光量は大きく異なっていた(図 1.2、図 1.5、図 1.6)。この違いは、細胞そのものの活性の違いに加え、細胞ごとに導入 DNA 量が異なるなど、パーティクルガン特異的な影響を反映していることが示唆された(図 1.3)。そのため、本測定系において、発光量の絶対値を細胞間で比較することは意味が無いと考えられる。また、構成発現レポーターと概日発現レポーターを用いた時系列測定においても細胞発光量は大きくばらついたが、発光量と発光変動パターン間に明瞭な相関は見られなかった(図 1.5、図 1.6)。このことは、細胞間における発光活性の大きなばらつきは、発光レポーターの「発現変動を反映する」という機能には影響しないことを示唆している。

以上のことから、個々の細胞発光の変動を、個々の細胞におけるレポーター遺伝子の発現変動として捉えてよいと結論づけ、本章の目標は達成できたと考えている。

細胞発光のばらつき

細胞発光量は、対数正規様分布を示した(図 1.2)。レポーター遺伝子を同一コピー数もつと考えられるシロイヌナズナ *AtCAB3:LUC* のプロトプラスト細胞においても発光量が対数正規分布を示した(図 1.3)。ことから、細胞発光の大きなばらつきの要因の1つとして、細胞活性自体のばらつきが考えられる。しかしながら、シロイヌナズナ *AtCAB3:LUC* プロトプラストで見られた分布幅は、パーティクルガンによる遺伝子導入で見られた細胞発光の分布幅よりも小さかった。そのため、パーティクルガン法には細胞発光の分布幅を広げる要素があると考えられる。金粒子調製時の DNA 量依存的に細胞発光量の上昇が見られたことから、細胞に導入される DNA 量と発光量には相関があると考えられる(図 1.2)。パーティクルガン法では、細胞ごとに導入される DNA 量が異なると考えられるため、細胞間で導入された DNA 量が異なることが分布の幅を大きくする要因だと考えられる。

また、金粒子が細胞のどこに導入されるかも重要だと思われる。金粒子が核内に導入された場合は、金粒子にコーティングされた DNA 量に応じた発現量を示すと考えられるが、核以外の場所に金粒子が打ち込まれた際には、金粒子表面から溶け出した DNA が細胞内に拡散し、核内に入ることで発光レポーターが発現すると考えられる。この場合、核に入る DNA 量は、金粒子が直接核内に入るよりも、極端に少なくなり、発現量が低くなると予想される。このように、金粒子が細胞のどこに導入されるかによっても発現量は変化すると考えられる。発光細胞数も DNA 量依存的に変化したことについても、核以外に導入された金粒子から溶け出す DNA 量が減ることで、核に DNA が取り込まれる確率が減少することが要因の一つと考えられる。GUS 染色をマーカーとした解析では、パーティクルガンによる遺伝子導入において発現が見られた細胞の 90%で核に金粒子が打ち込まれていることが報告されている (Yamashita et al. 1991)。GUS 染色の感度が、生物発光測定の感度と同程度だとすると、我々が測定した発光細胞でも、その 90%において金粒子が核内に導入されていたことになる。その場合、核内に金粒子が導入されていない 10%の細胞の発光量が変化することによって発光細胞全体の数や分布構造が大きく変化するとは考えにくい。金粒子の細胞内の位置以外の要素、例えば、核内での金粒子の位置などを考慮する必要がある。逆に、GUS 染色の感度が発光測定の感度より大きく低い場合は、我々が測定した発光細胞のうち発光量が高い細胞では、そのほとんどで金粒子が核内に導入されていることとなり、前述の仮説と矛盾はない。

導入細胞の種類

GFP レポーターを用いた解析で、パーティクルガンによる遺伝子導入においてレポーター遺伝子は、イボウキクサでは少なくとも表皮細胞と葉肉細胞に導入されることが明らかとなった (図 1.4)。表皮細胞と葉肉細胞の比率は 20%と 80%であった。時系列測定では構成発現レポーターでも概日発現レポーターでも 50 細胞以上を測定したため、10 細胞程度は表皮細胞の発光を観察していると考えられる。しかしながら、どちらのレポーターによる測定においても発光変動を 2つの異なるタイプに分けることはできなかった。このことは、今回測定に用いたレポーターの発現様式は表皮細胞と葉肉細胞で大きな違いがないことを示唆している。Yakir らの GFP を用いた時計遺伝子発現の時系列測定においても、表皮細胞と葉肉細胞で顕著な差は見られておらず、この結果は妥当だと考えている (Yakir et al. 2011)。この報告では、孔辺細胞において時計遺伝子の挙動が表皮細胞と葉肉細胞と異なることが示唆されたが、イボウキクサではレポーター遺伝子の孔辺細胞への導入自体が観察されなかった。イボウキクサの孔辺細胞には葉緑体が見られず、開口運動も見られないことが報告されている (Park et al. 1990, Les et al. 1997)。そのため、イボウキクサでは孔辺細胞の活性が他の植物に比べて著しく低く、レポーター遺伝子のシグナルが検出できないほど弱かった可能性がある。

今回行ったマクロレンズによる接写による細胞発光の測定では、細胞の種類や組織中で

の詳細な位置を決定することはできなかった。しかしながら、細胞間における遺伝子発現様式の差異を細胞の種類や組織中での位置情報と組み合わせる技術は、細胞レベルから多細胞生物を理解する上で大変有用だと考えられる。光学系をマクロレンズから顕微鏡に変えることで、細胞の形状を判別できる解像度での細胞発光測定が可能となるかもしれない。ただし、光学系の複雑さからシグナル損失が大きい顕微鏡を用いた測定では、感度が大幅に低下することが予想される。そのため活性の高い発光レポーターを使用する必要がある。また、顕微鏡による測定では個体の一部分のみを拡大するため、個体全体を捉えることができるマクロレンズによる測定に比べて得られる情報が制限される。そのため、現在は GFP レポーターを共導入する方法を検討している。細胞発光の時系列測定のあつて、測定したフロンド全領域を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、GFP 発現細胞の個体中での位置を生物発光画像と照らし合わせることで、各発光細胞の種類決定が可能だと考えている。また、シロイヌナズナでは各細胞種に特異的に発現するマーカー遺伝子が同定されている。これらの遺伝子を用いた細胞種特異的な蛍光レポーターを利用しても細胞種決定できると考えられる。この場合は、現在のマクロレンズに蛍光フィルタを取り付けるだけで蛍光シグナルが取得できるため蛍光シグナルと発光シグナルを対応付けることが容易である。また、蛍光レポーターのかわりに、発光スペクトルの異なるルシフェラーゼを用いた細胞種マーカーを利用することで励起光の照射装置なしに細胞種決定することも可能かもしれない。

材料と方法

植物と培養条件

実験に用いたイボウキクサ (*Lemna gibba*) G3 株は、40 年以上、実験室で培養され維持されてきたものを使用した。イボウキクサは、温度が 25 ± 1 °C に保たれた培養室において、連続明条件下で、1 % ショ糖入りの M 培地で維持したものをを用いた (Hillman 1961)。光源として 3 波長型昼白色蛍光灯 (NEC FLR40SEX-N/M-HG) を用い、光量は約 $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で培養した。植物は 100 mL フラスコに 30 mL の培地、もしくは 200 mL フラスコに 60 mL の培地を入れて綿栓とアルミホイルで蓋をしたものをを用いて無菌状態で培養した。1 週間に一度植え継ぎを行い、よく成長したコロニーを実験に用いた。

遺伝子導入コンストラクト

構成発現型発光レポーターとして、*pUC-CaMV35S:LUC+* (*CaMV35S:LUC+*、名古屋大学 芹川雅之・三輪久美子博士より分与) を用いた。*Cauliflower mosaic virus 35S* (*CaMV35S*) のプロモーター領域にホタルルシフェラーゼ (*LUC+*) が結合している。Clontech 社の pBI221 の *CaMV35S* プロモーター下流の *GUS* 遺伝子を、Preomga 社の *LUC+* 遺伝子で置換して作成した。

概日発現型発光レポーターとして、*pUC-AtCCA1:LUC+* (*AtCCA1:LUC+*、名古屋大学 中道範人博士より分与) を用いた。朝方に発現するシロイヌナズナの時計遺伝子である、*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*) 遺伝子の第四エキソンの 5' 端にホタルルシフェラーゼ (*LUC+*) が結合している。結合点より約 1.8kb 上流までをプロモーターとして含んでいる。Nakamichi et al. (2004) における construct C と同様のもの。

GFP レポーターとして、*pBI121-35S:GFP-h* (*CaMV35S:GFP-h*、京都大学 西村いくこ教授より分与) を用いた (Nakano et al. 2009)。GFP タンパクに小胞体局在シグナル配列が結合している。

パーティクルガンによる遺伝子の導入

各コンストラクトはパーティクルガン法を用いて、ウキクサに導入された(図 0.5、Miwa et al. 2006)。遺伝子導入用の金粒子は以下の手順で調整した。

- ① エッペンドルフチューブに、直径 $1 \mu\text{m}$ の金粒子を 50%グリセロールで懸濁した液 (60 mg ml^{-1}) を $8 \mu\text{L}$ 、スペルミジン溶液 (1 M) を $3.3 \mu\text{L}$ 入れて、1 分間ボルテックス。
- ② レポーターDNA 溶液 (up to $10 \mu\text{L}$)、 CaCl_2 溶液 (2.5 M) を $8 \mu\text{L}$ 加えてボルテックス。
- ③ 室温で 15 分以上静置。
- ④ 卓上遠心機により遠心し上清を除いたのち、80%エタノールを $80 \mu\text{L}$ 加えて洗浄。
- ⑤ 卓上遠心機により遠心し上清を除いたのち、100%エタノールを $80 \mu\text{L}$ 加えて洗浄。

⑥ 卓上遠心機により遠心し上清を除いたのち、100%エタノールを 15 μ L 加えて軽く懸濁。導入には BIO-RAD の PDS-1000/He をマニュアルに従って使用した。打ち込みは、ウキクサを載せた 35 mm シャーレを金粒子発射点より約 8 cm 離れた位置にセットし 25 mmHg まで脱気した後に 650 psi のラプチャーディスクを用いて行った。打ち込み後すぐに 1 mM ルシフェリン入りの培地 3 mL を加えた。

細胞発光自動測定システム

細胞発光イメージングには、高感度 EM-CCD カメラ (ImagEM C9100-13 浜松ホトニクス) を -80 $^{\circ}$ C に冷却して用いた (図 1.1)。カメラにはマクロレンズ (Schneider 社製, f 0.95/25 mm) をとりつけた。レンズには、葉緑体由来の赤色自家蛍光を除去するため、波長が 630 nm 以上の光をカットするフィルタ (SPF630 朝日分光) を装着した。35 mm シャーレ全体のイメージングは 5 mm のエクステンションリングを使い、レンズの焦点距離を無限遠にして行った。ウキクサ個体の拡大像のイメージングは 16.5 mm のエクステンションリングを使い、レンズの焦点距離を 0.3 にして行った。植物用の光源には光ファイバ付き白色 LED 光源 (PFB2-20SW CCS) を用いた。測定装置は人工気象器 (NK system KCLP-1000I-CT) の中に入れた暗箱中に設置され、測定中の温度は 25 ± 1 $^{\circ}$ C に維持された。EM-CCD カメラ、LED 光源ともコンピュータ上のソフトウェア (HOKAWO 浜松ホトニクス) により自動制御した。

細胞発光量の定量

EM-CCD カメラを用いて取得した画像データ (16bit TIFF) から CCD 素子に入射した光子数を以下の式で求めた。

$$\begin{aligned} \text{光子数} &= (\text{出力輝度} - \text{ダーク輝度}) \times \text{変換係数} / (\text{アナログゲイン} \times \text{EM ゲイン} \times \text{変換効率} / 100) \\ &= (\text{出力輝度} - \text{ダーク輝度}) \times 5.8 / (1 \times 1200 \times 0.9 / 100) \end{aligned}$$

ダーク輝度はレンズに蓋をした状態で 5 回撮影を行って得られたデータの中央値とした。測定領域内の全ピクセルの総和を光子数に変換したものを発光量とした。

シロイヌナズナ CAB3:LUC 形質転換体からのプロトプラスト単離と生物発光測定

シロイヌナズナ *Chlorophyll a/b-binding protein 3 (CAB3:LUC)* 形質転換体 (京都大学 望月伸悦 助教より分与) を 3% ショ糖入りの MS1% 寒天培地へ撒き、22 $^{\circ}$ C、光量 30 μ E $m^{-2} s^{-1}$ の 12 時間明 12 時間暗条件で 38 日間培養したものをを用いた。本葉を 10 枚切り取り、カミソリにより切り刻んだ後に、50 mL フラスコ中の酵素液 [Cellulase onozuka R-10 1%、Macerozyme R-10 0.3%、Mannitol 0.4 M、CaCl₂ 8 mM、Mes-KOH (pH 5.6) 5 mM] 10 mL に入れ一晩浸透した。処理液を 100 μ m ナイロンフィルターで濾過した液に W5

Solution [NaCl 154 mM、KCl 5 mM、Glucose 5 mM、CaCl₂ 125 mM、MES-KOH (pH 5.6) 1.5 mM] を加えたものを遠心 (50 g 室温 5 min) してプロトプラストを回収した。回収後 1 mM ルシフェリンを含む W5 Solution にプロトプラストを懸濁し、生物発光を測定した。なお、生物発光測定時に *AtCAB3:LUC* の生物発光活性のピークが来るように実験を行った。

GFP 蛍光の観察

イボウキクサに *CaMV35S:LUC* と *CaMV35S:GFP-h* を共導入し、明暗条件下において 1 mM ルシフェリン入りの培地で 1 日間培養した後、共焦点レーザー顕微鏡(カールツァイス LSM510-META)を用いて GFP 蛍光と葉緑体の自家蛍光を測定した。GFP 発現細胞の形状と葉緑体の有無から、細胞の種類を判断した。

細胞発光の時系列測定

ウキクサ植物は鉛直方向の運動をしないが、浮いているため水平方向へは容易に動く。そこで小型の針でウキクサを傷つけないように檻をつくりイボウキクサの位置を固定した。針の固定のためにシャーレの底にシリコンゴムを敷いた。檻の中における多少の動きは避けられなかったため、測定後に画像処理による位置補正を行った。1つのフロンド内の2つの発光細胞を手作業で追いかけて、その位置情報からウキクサの平行移動距離と回転角度を検出し位置の補正を行った。位置補正を行った画像について、近接する細胞発光と分離可能だった発光スポットについて、手動で測定領域 (ROI: Region of interest) を設定し細胞発光の変動を測定した。ROI のサイズは全て 6×6 ピクセルとした (1 ピクセルは約 0.25 mm)。

ピーク時刻の決定

AtCCA1:LUC 導入時に細胞が示した発光変動の日周リズムのピーク時刻は R 言語で作成したスクリプトで決定した。まず、発光時系列データに対して、全体平均を減算し、全体の分散で除算することで、時系列データを正規化した。正規化した時系列データを 3 点移動平均処理で平滑化し、リズムのピーク付近において発光量が最大であった時刻をピーク時刻とした。

統計解析

本研究で行った統計解析は全て R 言語の内部関数によった。

第2章

植物個体内における細胞概日時計の不均一性と、 明暗条件下でのその不顕在化

導入

生物は環境変動から様々な情報を取り出し、適切に応答することで日々を生き抜いている。この巧妙なシステムは個々の細胞に内蔵されており、多細胞生物が示す応答も個々の細胞の応答を基盤として成立している。概日時計は環境変動から時間情報を取り出す機構であるが、この機構も個々の細胞が生成する概日リズムを基盤として成立している。本章では、第1章で開発した1細胞発光測定系を用いて、植物個体内の細胞時計が示す挙動を解析し、細胞レベルからの植物の概日時計を理解することを目指す。ここでは、これまでに行われてきた「個体レベルでの概日時計の挙動を細胞レベルから理解する」ための試みを、生物種を問わず概観することで本研究の前提を確認し、研究の目標をまとめる。

個体が示すリズムは、細胞時計の集団状態を反映する

個体内の細胞一つ一つが示す概日リズムへ興味向けられたのは最近のことではない。むしろ概日時計研究の黎明期から個々の細胞時計への言及はなされてきた。概日時計研究の基礎を築いたビュニング (Bünning) はその著書『生理時計』の中で、いくつかの実例を挙げて、個体内の細胞間でリズムがずれることを指摘している (Bünning 1973)。とくに自身が行ったベニバナインゲンの葉が連続暗条件で示す上下運動リズムの解析結果について詳しく述べており、ある時刻に光刺激を受けたベニバナインゲンでは葉の上下運動リズムの振幅が著しく減衰すること、減衰したリズムにはいくつかのピークが見て取れること、これらのピークには間隔が約24時間となる組み合わせがあること、を解説している (図 2.1A)。この実験結果は、葉の運動という個体レベルでの概日リズムは、構成要素となっているいくつかの概日リズムの重ね合わせであり、要素リズムが脱同期したために減衰が生じたと考えることができる。また、この減衰は、新たな光刺激により解消され、もとの振幅のリズムが復活することも紹介されている (図 2.1A)。これは脱同期していた要素リズムが、光刺激により再同期したことを示唆している。そして、ビュニングは概日リズムの構成要素の最小単位として細胞を想定していた。これらの解析は1935年にドイツの科学誌に発表されており (Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik 81:411-418)、概日時計研究の先駆者が、その研究の初期から、多細胞生物が示す個体レベルの概日リズムを、個々の細胞が示す概日リズムの集合だと捉えていたことを端的に表している。

一方で、ビュニングは、個体が示す概日リズムの消失が、個々の細胞におけるリズムの消失に起因する場合もあることを指摘している。実際に、Sweeney は渦鞭毛藻ゴニオラクス (*Gonyaulax polyedra*) の光合成活性を個々の細胞で測定する技術を開発し、強光条件で培養したゴニオラクスでは光合成活性の概日リズムが細胞レベルで消失することを報告している (Sweeney 1960)。ただし、弱光で培養したゴニオラクスでは光合成活性リズムが確認されたことから、強光条件が概日時計の出力系を乱したと考えることもできるため、概日時計の振動そのものが停止したことが確定したわけではない。しかしながら、細胞レベルで観察される概日リズムが消失したことは事実である。このような観察例から、多細胞生物において個体が示す概日リズムの解析を行う際には、細胞間での概日リズムの同期の程度と個々の細胞における概日リズムの強度の 2 つを考慮する必要があることが分かる (図 2.1B)。

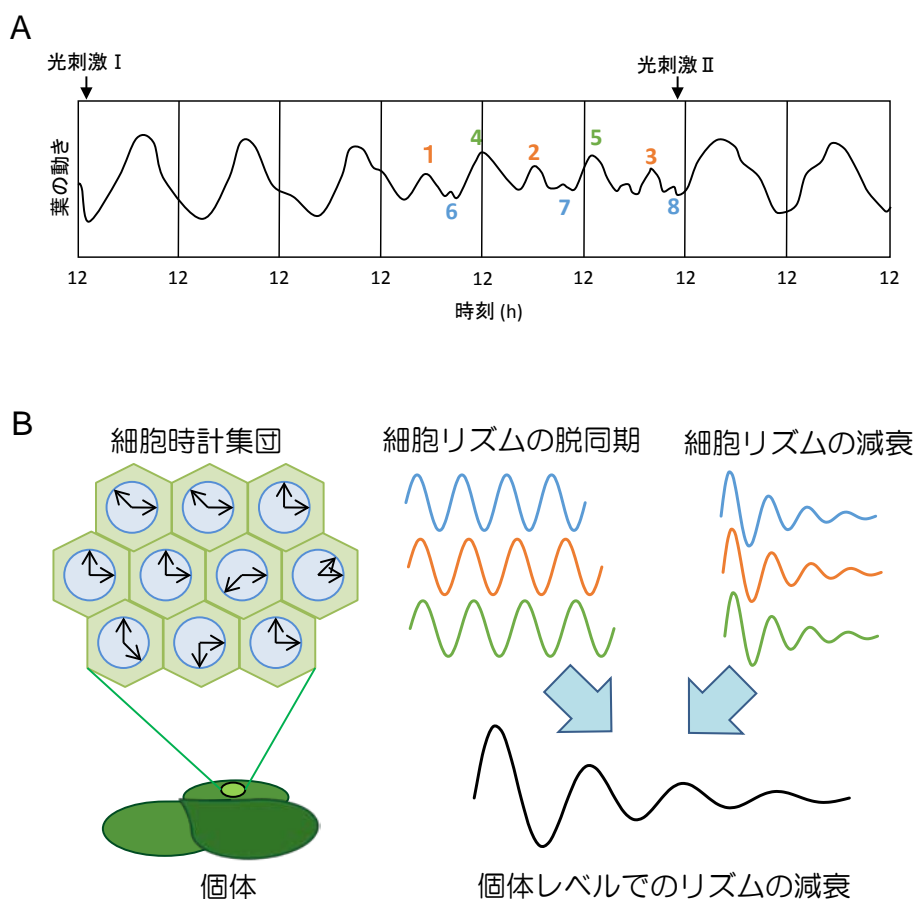


図 2.1 個体リズムの減衰には 2 つの要因がある

(A) ビュニングが行った連続暗条件におけるベニバナインゲンの葉の上下運動に対する光照射実験。ビュニングは、個体内の複数の概日リズムが、光刺激 I により脱同期し、光刺激 II で再同期したと考えた。頂点 1、2、3 と、頂点 4、5 と、頂点 6、7、8 とはそれぞれ約 24 時間周期の要素リズムに起因すると考えられる。生理時計 (Bünning 1975) p40 の図 27 より模写。(B) 個体レベルでのリズムの減衰は、細胞レベルでのリズムにおける脱同期と減衰の両方で生じる。

個体内における細胞間での概日リズムの脱同期の直接的な観察例

発光レポーターの開発と光学的測定技術の進歩により、培養組織や培養細胞において、個々の細胞における時計遺伝子の発現リズムが観測可能となった (Welsh et al. 2005)。その結果、個体内における細胞間での概日リズムの脱同期が直接的に観察されるようになっている。マウスを連続明条件で長期間育成すると、個体の活動リズムが消失する個体があるが、このような個体から取り出した脳組織を観察すると個々の細胞において時計遺伝子の発現リズムは消失しておらず、脱同期状態にあることが明らかとなっている (Ohta et al. 2005)。逆に、活動リズムが持続していた個体では、個々の細胞は同期を保っていることも報告されている。植物では個々の細胞のリズムの測定ではないが、葉や根のような組織間もしくは組織内において、概日リズムが脱同期する様子が観察されている (Fukuda et al. 2007, Fukuda et al. 2012, Wenden et al. 2012)。また、蛍光レポーターを用いた細胞リズムの観察では、孔辺細胞と葉肉・表皮細胞間でリズムが脱同期している例が報告されている (Yakir et al. 2011)。これらの観察例から、多細胞生物の個体内においても細胞が示す概日リズムが消失することは少なく、個体レベルでのリズムの減衰は細胞間でのリズムの脱同期により起きることが多いと考えられる。このことは時計遺伝子ネットワーク自体が自励振動を生成するように構成されている点を考えても自然なことだと思われる (Jolma et al. 2010)。

細胞概日リズムの自発的な脱同期には2つの要素がある

ゴニオラクスを用いた概日リズム研究の第一人者である Hastings のグループは、細胞間での概日リズムの脱同期現象には、細胞間での周期の不均一性、周期の不安定性の 2 つの要素があると指摘している (図 2.2A, Njus et al. 1981)。ゴニオラクスはルシフェラーゼを持ち生物発光を示す単細胞性の藻類であるが、発光に概日リズムがみられることから、発光レポーターの開発以前より概日リズムの解析に用いられてきた。ゴニオラクスを連続明条件で培養すると、集団全体が示す発光リズムの波形は徐々に広がり、リズムが低振幅化する。このことは細胞間でリズムが脱同期していると考えれば理解できる。個々の細胞の発光リズムが完全に同期している際には、集団が示す発光波形は個々の細胞の発光波形と同一となる。脱同期している場合には、各細胞の発光ピークが揃っていないために、集団が示す発光波形は低振幅となる。Njus らはこの脱同期が、細胞間での周期の不均一性と周期の不安定性のどちらによるものか解析を行った。その際、上記の 2 つの場合で細胞概日リズムのピーク時刻の分布の変化様式が異なる点に注目した (図 2.2B)。細胞間で周期が違う場合、各細胞の周期が分散 σ^2 の正規分布に従うとすると、 n サイクルにおけるピーク時刻の分布は分散が $n^2\sigma^2$ の正規分布となる。細胞の周期が不安定な場合、サイクル間での周期の変化が分散 σ^2 の正規分布に従うとすると、 n サイクル目におけるピーク時刻の分布は $n\sigma^2$ の正規分布となる。つまり、ピーク時刻の分散は、細胞ごとに周期が異なる場合は分散

がサイクル数の 2 乗に比例し、周期が不安定な場合は分散がサイクル数に正比例する (図 2.2C)。そこで Njus らは細胞集団の発光リズムの波形の変化から、ピーク時刻の分散の変化を推定し、サイクル数に正比例するか、その二乗に比例するかを検証した。その結果、分散の上昇率が直線よりも大きかったため、脱同期が周期の不安定性だけでは説明できず、細胞間で周期が異なると推定している。

Njus らの解析は深い洞察にもとづく見事なものであったが、実際には細胞間における周期の不均一性と、周期の不安定性は同時に考慮する必要があり、分散はその線形和となる。しかしながら、集団が示す発光の波形のみの解析からは、この 2 つを分離して推定することは非常に困難であった。近年、発光レポーターによる、細胞が示す発光リズムの直接的な測定が可能となったことで、この 2 つの成分を分離して測定できるようになった。Leise らはマウスの概日時計遺伝子である *PER2* の発光レポーターを発現するマウス線維芽細胞を培養して、細胞リズムを 6 週間もの長期間測定した (Leise et al. 2012)。そのデータを用いて、細胞間の周期の違いと、周期の不安定性を推定した。その結果、線維芽細胞間には有意な周期の不均一性が見られたが、周期不安定の程度 (標準偏差で 1.96 h) のほうが細胞間での周期不均一性の程度 (標準偏差で 0.77 h) よりも大きいことを明らかとした。このことは、個々の細胞は周期が不安定な時計であり、細胞レベルの脱同期を解析する際は、細胞間での周期の違いだけでなく周期の不安定性を考慮する必要があることを示している。

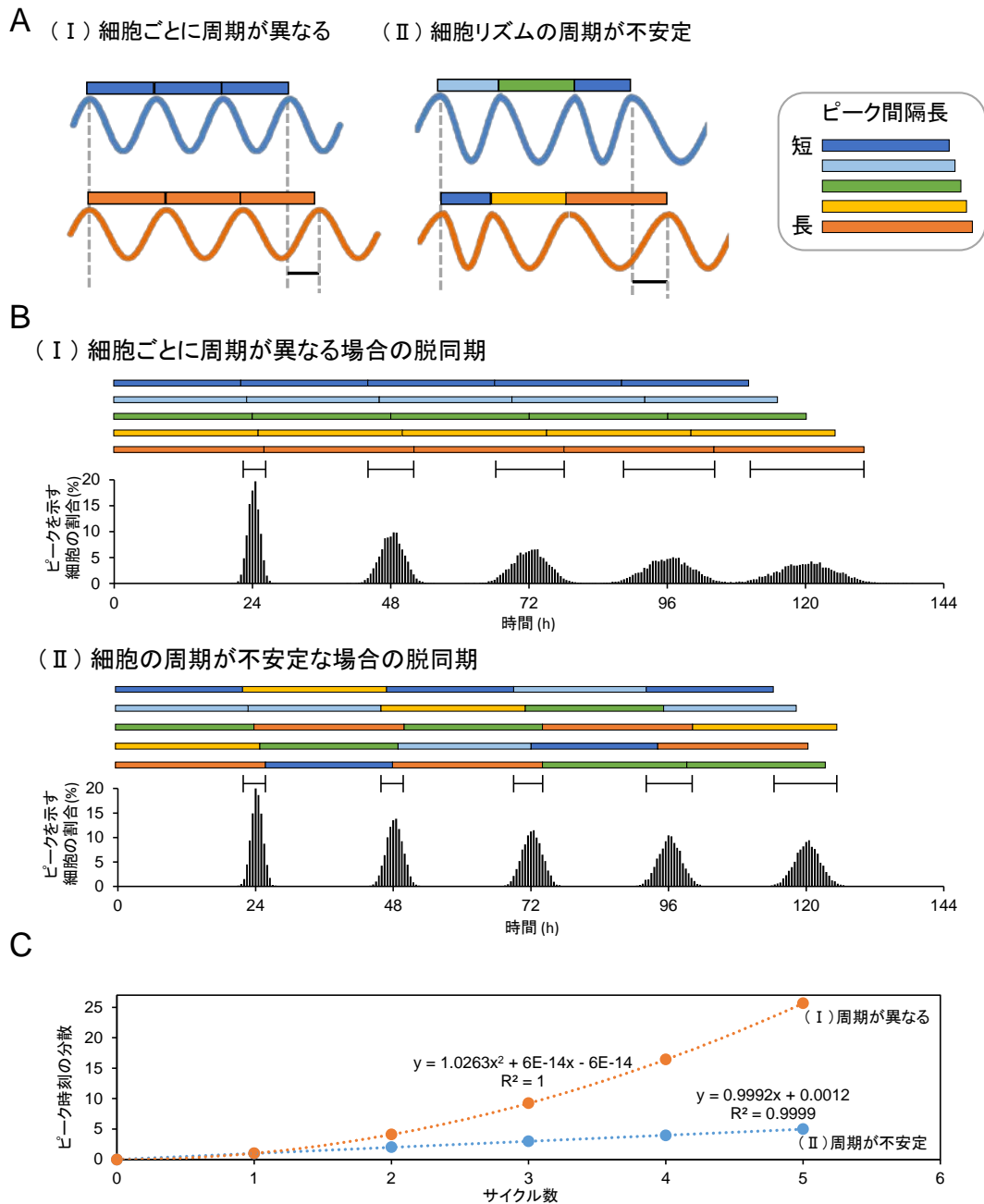


図 2.2 細胞リズムの脱同期における 2 つの要素

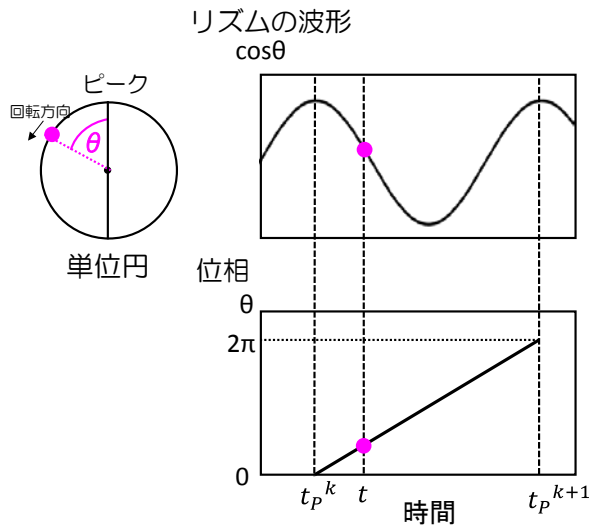
(A) 細胞リズムの脱同期は、2 つの要因によって起こる。1 サイクルごとのピーク間隔の長さを色で表している。(B) 2 タイプの脱同期の例。模式図の下に、5000 細胞を対象としたシミュレーション結果を表示した。(I) では細胞の周期を、平均周期 24 時間、標準偏差 1 時間の正規分布として与えた。(II) では細胞の周期は全て 24 時間とし、1 サイクルごとの周期変動として、標準偏差 1 時間の正規分布を与えた。(I) と (II) で与えた正規分布の標準偏差はともに 1 時間だが、ピーク時刻分布の広がる速度、つまり脱同期の速度が異なる。(C) 脱同期の程度は、ピーク時刻の分散によって評価できる。そこで、シミュレーション結果においてピーク時刻の分散を算出した。細胞ごとに周期が異なる場合は分散がサイクル数の 2 乗に比例し、周期が不安定な場合は分散がサイクル数に正比例することが分かる。

細胞間相互作用による不均一で不安定な細胞時計の統合

マウスの線維芽細胞では細胞時計の性質として、細胞間で概日リズムの周期が異なるという「周期不均一性」と、個々の細胞において概日リズムの周期がゆらぐという「周期不安定性」が観測された。このような不正確な時計で個体が構成された場合、細胞間で概日リズムの脱同期が生じ、個体レベルの概日リズムはすぐに減衰し消滅するように思える。しかしながら実際には、マウスの活動リズムは 4 ヶ月以上もの間、安定した周期で継続可能である (Ohta et al. 2005)。これは、哺乳類の概日時計システムには、安定した概日リズムを生成する中枢時計があり、線維芽細胞のような抹消時計を統御しているためである (Gachon et al. 2004)。哺乳類の中枢時計は間脳にある視交叉上核という組織であり、数万の神経細胞から構成されている。この視交叉上核をマウスから切り出した視交叉上核スライスを組織培養しても、スライス内において細胞間での概日リズムは 1 ヶ月以上同期を保ち、組織レベルでの概日リズムは消失しない (Yamazaki et al. 2002)。しかしながら、視交叉上核に神経毒であるテトロドトキシンを処理すると細胞間で概日リズムは急速に脱同期し、テトロドトキシンを洗い流すと細胞間でリズムはすぐに再同期する。(Yamaguchi et al. 2003)。このことから、視交叉上核の神経細胞はシナプス結合を介した細胞間相互作用により細胞間で概日リズムを同期させていると考えられている (Aton and Herzog 2005)。また、神経細胞を視交叉上核から取り出した場合でも、神経細胞は概日リズムを示すが、その周期は視交叉上核スライス内の細胞よりも不均一であり、周期自体も不安定であることが明らかとなっている (Honma et al. 2004)。つまり、視交叉上核を構成する細胞時計もその性質は「不均一」かつ「不安定」であるが、細胞時計間で相互作用を行うことで、概日リズムの周期を揃え、安定化していると考えられる。

同期現象の定量的解析

視交叉上核でみられるような細胞間での概日リズムの同期現象は、リズムの位相のみに着目すると見通しがよくなることが知られている。位相は各細胞の主観的な時刻であり、単位円上の点として表すことができる (図 2.3)。位相を表す点は、単位円上を周回し、単位円 1 周がリズムの 1 サイクルに相当する。実際のデータ解析においては、位相は、ピークからピークの間、単調に増加する変数として定義される。そのため、時系列データからピーク時刻を抽出するだけで各時刻の位相が定義できる。位相を用いることで任意の時刻における細胞間での概日リズムのズレを定量化することができる。また、細胞間で働く概日リズムを同期させようとする相互作用は、互いの位相を近づけようとする作用と捉えることができる (図 2.4)。このような利便性から、同期現象のダイナミクスは位相のみの方程式で記述されることが多い (Strogatz 2000)。位相のみに着目することで、波形などの複雑な要素を考慮する必要がなくなり、同期現象の取り扱いが簡単になる。



本研究では、位相をピークからピークの間を0から 2π まで単調に増加する変数と定義する

$$\theta(t) = 2\pi \frac{t - t_p^k}{t_p^{k+1} - t_p^k}$$

$$= \frac{2\pi}{\text{ピーク間隔}} (t - t_p^k)$$

t_p^k はk番目のピーク時刻を表す

図 2.3 位相の定義

位相は主観的な時刻に対応する。本研究では位相を、ピークからピークの間を0から 2π まで単調に増加する変数と定義する。単調に増加するということは、角速度、つまり周期が一定ということである。位相は単位円上の点に1対1対応する。

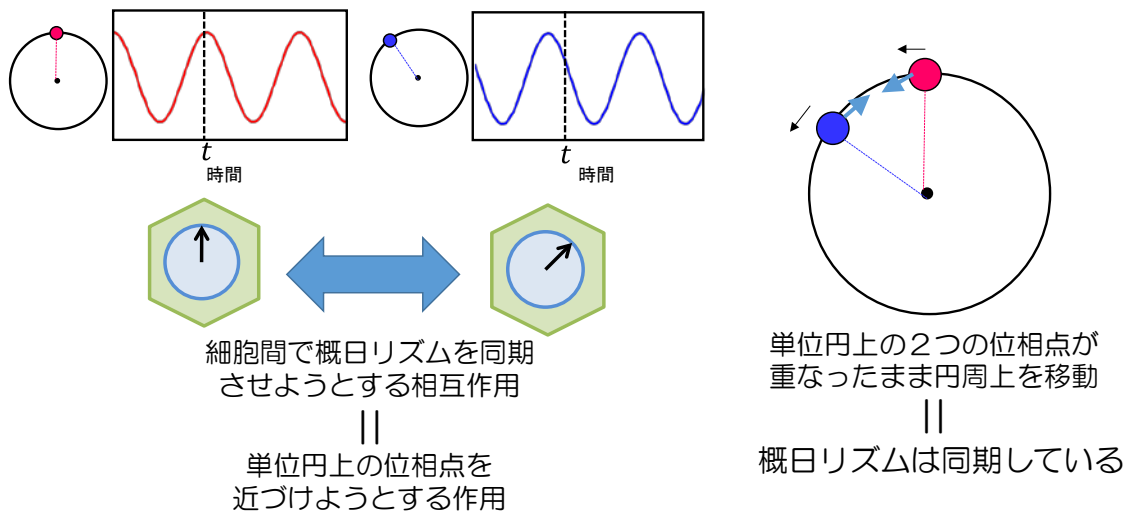


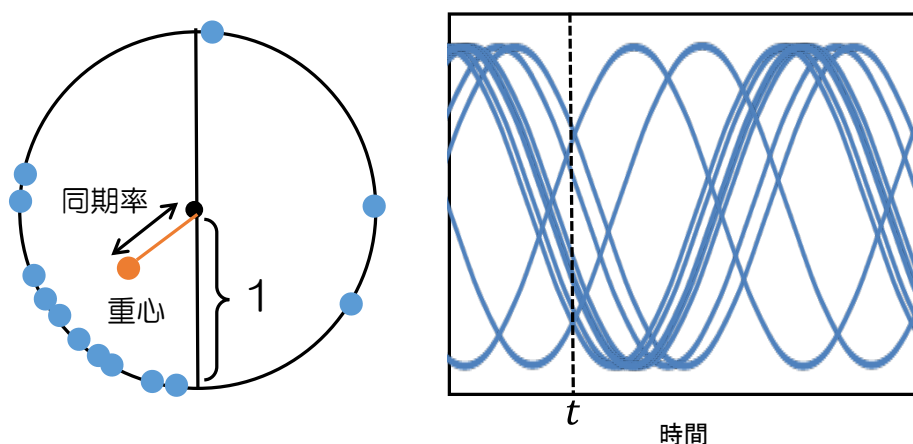
図 2.4 位相を用いた細胞間相互作用の捉え方

細胞が示す概日リズムの間でピーク時刻が異なる場合、そのリズムは脱同期していると考えられる。これを位相であらわすと、単位円上にプロットされる異なる点となる。細胞間で細胞リズムを同期させようとする相互作用がある場合、単位円上の位相点を重ねようとする力として表される。

また、複数のリズムの位相を単位円上にプロットすることにより、リズムの同期の程度を可視化できる (図 2.5)。この時、位相を表す点の重心を計算し、単位円の中心からの距離を求めることで、同期の程度を定量できる。この尺度は、同期理論の枠組みでは秩序変数 (Order parameter) と呼ばれ、同期現象の数理モデルを構築する際に、鍵となる変数であることが明らかとなっている (Strogatz 2000)。しかしながら本研究では単純に同期率とよぶ。同期率は 0 から 1 の値をとり、リズムが同期しているほど 1 に近づく。

同期率は集団が示すリズムを解析する上で便利な尺度であるが、空間分布を考慮していない点で注意が必要である。すなわち、同期率が同じ場合でも位相の空間分布に秩序がある場合とない場合が存在する (図 2.6)。とくに近傍細胞間で位相を近づけるような作用が存在するような場合、位相には連続的な空間パターンが形成されると考えられる。実際に細胞間で位相を揃えるような相互作用を仮定した数理モデルにおいては、位相の空間パターンが形成されることが示されている (Fukuda et al. 2011)。

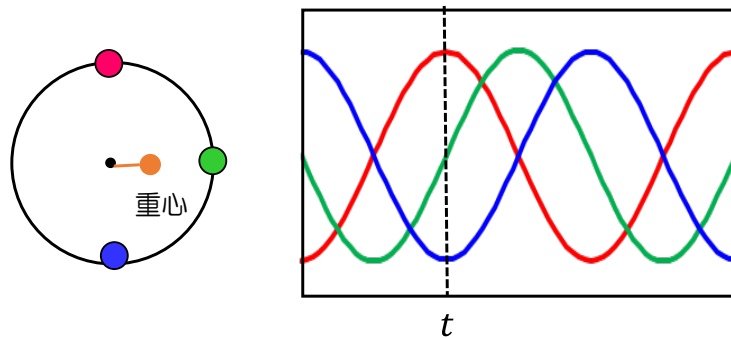
視交叉上核スライスにおいて個々の細胞の概日リズムを測定し、上記手法で位相の解析を行った例では、細胞間での同期率が約 0.8 を維持することが明らかとなっている。また、スライス全体に位相の空間パターンが存在することも明らかとなっている (Fukuda et al. 2011)。



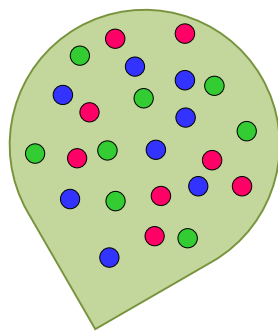
同期率 = 1 : 完全に同期
同期率 = 0 : 完全に脱同期

図 2.5 同期率の定義

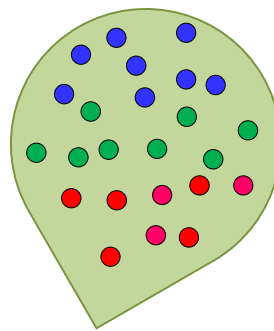
複数のリズムについて、ある時刻 t の位相を同じ単位円上にプロットする。リズムが同期しているなら位相を表す点は円周上の一部に集中し、リズムが脱同期していれば、位相点は円周上に散らばる。つまり、位相点のバラつきが同期率となる。これを定量化するために位相点の重心を求め、重心と単位円の中心との距離を同期率と定義する。リズムが完全に同期してれば同期率は 1 であり、完全に脱同期していれば同期率は 0 になる。



どちらも同期率は0.33



空間パターンなし



空間パターンあり

図 2.6 同期率は同じだが、位相の空間分布が異なる場合の例

ある時刻 t の各細胞時計の位相を色であらわした。各色の点が、同色のリズムに対応している。各色の点が、同じ数だけプロットされているため、位相の空間分布におけるパターンの有無に関わらず、どちらの場合も同期率は 0.33 となる。

植物の細胞時計は独立性が高い

概日発現型発光レポーター形質転換シロイヌナズナの葉における脱同期現象の解析においても、概日リズムの位相に着目したアプローチがとられている。取得した生物発光画像において、各ピクセルの発光リズムに対して位相 (図 2.3) を計算し、同期率 (図 2.5) を算出している。その結果、明暗条件下での葉内の概日リズムの同期率は 1 に近いが、連続明条件へと移行した後は、同期率が減少していく様子が観察されている。しかしながら、同一の葉では同期率は 0.4 を下回ることはなく、細胞間での概日リズムの同期がある程度は維持されていることが示唆されている (Wenden et al. 2012)。

また、位相の空間分布を検証した結果、シロイヌナズナの葉では、位相が連続的に変化するような空間パターンが見出されている (Fukuda et al. 2007, 2013, Wenden et al. 2012)。とくに、植物体から切り離れた葉において、明瞭な空間パターンが見られた (Fukuda et al. 2007, Wenden et al. 2012)。植物体から切り離されていない葉の観察では、葉脈が周辺組織の概日リズムに影響を与えることが明らかとなっており、数理モデルにおいても葉脈における物質の拡散が細胞時計の位相を遅らせる効果を持つことが示されている (Fukuda et al. 2007)。植物体から切り離された葉では葉脈内の物質転流が消失するため、近接細胞間での相互作用の影響が顕れるようになり、葉内における位相の空間パターンが形成されたと考えられている (Fukuda et al. 2007)。細胞間での相互作用の様式は未だ不明であるが、植物においては細胞同士が原形質連絡で繋がっているため拡散性の物質を介した機構が想定されている (Fukuda et al. 2007)。最近、ショ糖添加により、概日時計の位相が変化することが明らかとなり、細胞間での相互作用の仲介物質としての注目が高まっている (Haydon et al. 2013)。

以上のように、シロイヌナズナの葉を用いた先行研究では、位相に着目した解析を行うことで、発光変動を目視で解析するだけでは認識が難しい葉内の空間パターンを抽出することに成功しており、その解析から細胞時計間で位相を近づけるような相互作用の存在が示唆されている。しかしながら、以下の解析例は、植物の組織内における細胞時計の独立性の高さを示唆している。シロイヌナズナの葉では、測定領域間での概日リズムの周期が異なることが報告されている (Wenden et al. 2012)。周期が異なる場合、位相の空間パターンは長期間維持されない (図 2.7)。また、連続明条件においてシロイヌナズナの葉にみられる位相の空間パターンは、明暗条件へと同調すると消失することが報告されており、細胞間での相互作用よりも、光刺激への応答が優先されることが示唆されている (Wenden et al. 2012)。また、タバコの子葉の一部のみにアルミホイルを被せることで明暗条件を逆転させた実験では、アルミホイルが被せられた部分のみが逆相のリズムを示し、連続明条件への移行後も、脱同期状態は維持された (Thain et al. 2000)。この実験においても、細胞間での相互作用よりも明暗条件への同調が優先されることが示唆されている。植物では、ほぼ全ての細胞で光受容体が発現しているため、個々の細胞が光刺激に応答できると考えられる (Toth et al. 2001)。これは哺乳類の概日時計システムと大きく異なる点である。マ

ウスの中樞時計である視交叉上核は、視神経を通して光刺激を受容するが、光刺激は一部の細胞にしか入力されない (Yan et al. 2007)。一部の細胞に入力された光刺激を組織全体で共有するために、視交叉上核では細胞時計間での相互作用機構が発達したと考えられる。植物において細胞時計の独立性が高い要因の1つは、個々の細胞時計が外部環境サイクルに同調する能力を持つことだと考えられる。

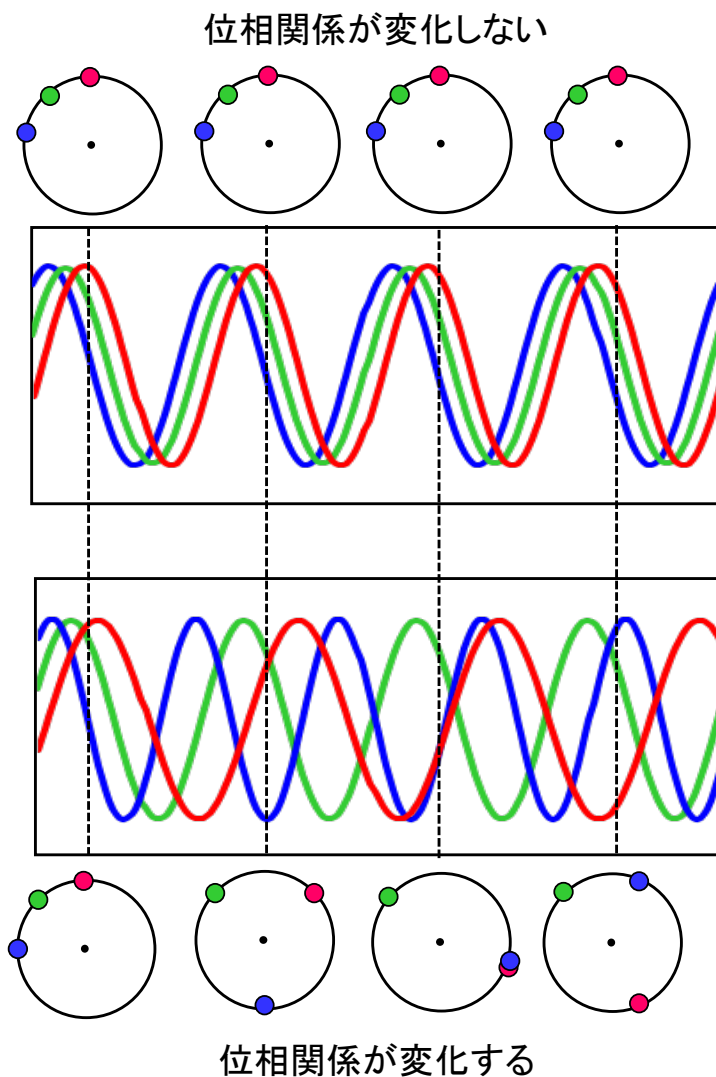


図 2.7 リズム間で周期が異なる場合、位相関係は保たれない

リズム間で周期が同じ場合は、リズム間で位相関係は維持される。リズム間で周期が異なる場合、位相関係は時間とともに変化する。位相に見られる空間パターンは、細胞間の位相関係を可視化したものであるため、細胞間で位相関係が変化する場合は空間パターンも変化していく。

概日時計の周期の違いは、明暗条件下での挙動に反映される

これまでの組織レベルでの概日リズムの測定により、植物では葉などの組織内において、細胞時計の独立性が高いことが明らかとなってきた。では、細胞時計の独立性が高いことで何か不都合なことないのだろうか。定常条件において、組織内で概日リズムが脱同期し、細胞間での時間情報の統合がなされないことは既に多くの研究で指摘されている。そこで、明暗条件において細胞時計の独立性が高い場合に生じる問題について考える。この場合、個々の細胞時計が自律的に外部明暗条件に同調していると考えられる。その場合でも、個体内の細胞時計は一律に外環境に同調しているために、個体内の細胞が示すリズムは揃っているように見える。では、明暗条件下における概日時計の挙動に影響を与える要素はあるのだろうか。

シロイヌナズナにおいて概日時計の周期が極端に短い変異体や極端に長い変異体は、24時間周期の明暗条件下では生産性が下がることが明らかとなっている (Dodd et al. 2005)。この現象は、概日時計が行う夜明け時刻の予測において、短周期変異体では予測時刻が早すぎるため、長期間変異体では予測時刻が遅すぎるため生じると考えられている (Dodd et al. 2014)。これは、明暗条件下である時刻に発現すべき遺伝子の発現時刻が、短周期変異体では早い時刻に発現してしまい、長期間変異体では遅い時刻に発現してしまうこと意味している。つまり、概日時計の周期の違いは、明暗条件下での概日時計の挙動に反映される (図 2.8)。この現象は、振動体が外環境に同調する際にみられる一般的な性質であることが理論的に示されている (Granada et al. 2013)。また、様々な生物種において、概日時計の周期と同調する明暗条件の周期の関係が、同調後のリズムのピーク時刻に反映されることが明らかとなっている (Ashoff et al. 1978、Remi et al. 2010)。このことから、同じ明暗条件に同調した際には、長周期の細胞時計のピーク時刻は、短周期の細胞時計のピーク時刻に比べて遅れると考えられる。細胞時計に周期の不均一性が見られた場合、この性質を利用して明暗条件下における細胞時計の独立性を検証することが可能だと考えられる。

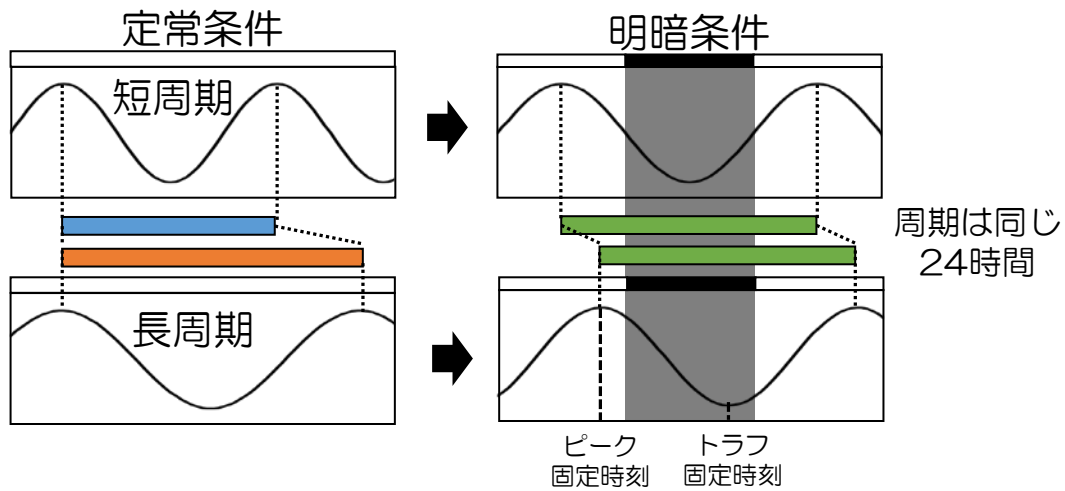


図 2.8 周期と固定位相の関係

異なる周期の概日時計が 24 時間周期の明暗条件へと同調する場合を考える。同調の結果、2 つの概日時計の「みかけの周期」は 24 時間となる。このとき、ピークやトラフは明暗周期中の特定の時刻に固定されている。定常条件におけるリズム周期は、明暗条件中のリズム周期（24 時間）には反映されないが、ピークやトラフの固定時刻には反映される。つまり、長周期の細胞時計のピーク固定時刻は、短周期の細胞時計のピーク固定時刻よりも遅れる。

本章で明らかにしたこと

以上のことから、イボウキクサにおいても、個々の細胞時計は独立性が高いこと、さらに、その性質として「周期不均一性」と「周期不安定性」が予想される。そこで本研究では、まず細胞時計の独立性とその性質を推定した。その結果、個々の細胞時計の独立性が高いことが明らかとなった。また、イボウキクサの細胞時計は、個体内において周期不均一性と周期不安定性を示し、その程度はマウス線維芽細胞と同程度であった。さらに周期不均一性が明暗条件下での細胞時計に与える影響を検証した結果、細胞時計の挙動は個体上の位置に強く影響されることが示唆された。これは、これまでに指摘されてきた植物における細胞時計の独立性の高さは定常条件にのみ当てはまることであり、明暗条件においては、個々の細胞時計は協調し統合された個体レベルの概日時計システムを構成することを示唆している。

結果

1 細胞発光測定システムの改良

個体中の細胞が示す概日リズムを長期間測定するにあたって、第一章で開発した 1 細胞発光測定システムに改良を加えた (図 2.9A)。照明を植物個体に均一に照射できるように、照明用光ファイバを測定植物の直上に設置した。その際、測定植物を回転ステージに載せることで、高感度カメラ下と光ファイバ下の位置を移動できるようにした。また、露光時間の検討の結果、200 秒の露光で細胞発光を十分定量できると結論づけた。そこで、細胞発光測定のための暗期を 5 分に設定し、測定は 30 分に一度とした。つまり、明条件での測定では、測定植物は照明下に 25 分間位置し、カメラの下に 5 分間位置するという状態を繰り返す。カメラ、照明、回転ステージは PC 制御されており一連の測定は自動で行われる。

測定中の培地の乾燥を防ぐための工夫も行った。測定植物を入れた 35 mm シャーレを 2 つ重ねた 60 mm シャーレの上段に入れた。上段のシャーレの底、下段のシャーレの蓋には穴が開いており繋がっている。下段のシャーレに水を満たすことで上段のシャーレ内の湿度を高く保つことで培地の蒸発を防いだ。

この測定システムを用いて、概日発現型発光レポーターである *AtCCA1:LUC* を導入したイボウキクサを測定し、細胞発光リズムを 16 日間という長期間にわたり測定することに成功した (図 2.9BC)。一般的な概日リズムの解析において測定期間は 1 週間程度であるので、この測定システムは十分実用的だと結論づけた。

リズム解析手法の検討 1: ピークとトラフの抽出法の検討

細胞発光リズムの測定では、一度の測定で多数の時系列データが取得されるため、データ解析の自動化が必要である。そこで本研究では、R 言語を用いてデータ解析用のアルゴリズムを自作した。

まず、時系列データ中のピーク (山) とトラフ (谷) の抽出法を検討した。測定された時系列データには概日リズム以外の変動成分が多分に含まれており、このようなノイズの多いデータからピークとトラフを推定する必要がある。まず、Wavelet 変換を利用したローパスフィルタによるノイズ除去の検討を行った。検討の結果、ピークを抽出するには周期 8 時間以下の振動成分をカットすることが必要であることが分かった。しかしながら、このフィルタではデータの両端で元の波形が保持されないことが多く、見た目のピーク位置と推定されたピーク位置の誤差が大きかった。また、ピーク位置は時系列データの局所最大値として推定したが、この方法では時間解像度が時系列データと同じ 30 分であり細胞間でのピーク時刻の差異について詳細な比較を行う上でも実用的ではなかった。

次に、局所的な二次関数フィッティングによるピークとトラフの抽出法を検討した。未処理の時系列データではデータ中のノイズが大きくフィッティングが収束しないことが多

かったため、移動平均によるノイズ低減処理を前処理として行った。検討の結果、2時間移動平均フィルタによるノイズ低減処理で十分であることがわかった。そこで、細胞発光の時系列データについて、2時間移動平均フィルタ処理をおこない、局所二次関数フィッティングを行うことで、ピークとトラフの推定を行った (図 2.9D)。また、推定されたピークとトラフから、リズムの振幅と位相を時間の関数として計算した (図 2.9EF、材料と方法)。

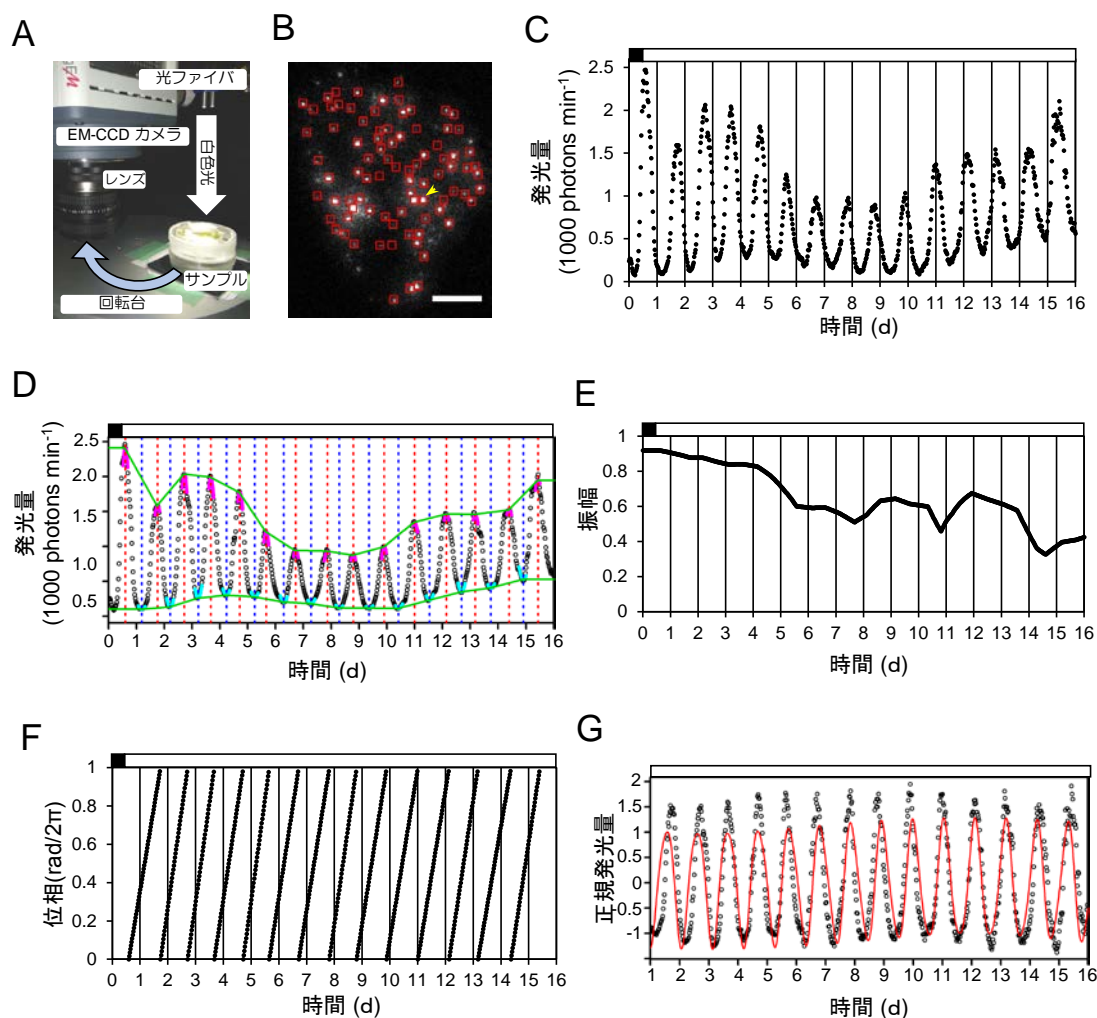


図 2.9 細胞発光リズムの定量的解析

図中の白横棒は明期、黒横棒は暗期を示す。(A) 発光測定装置の概略。(B) 生物発光画像。細胞発光測定用の ROI (6x6 ピクセル) を赤枠で表示。Bar: 1 mm。(C) 1 細胞発光の変動。B において黄色矢印で示した細胞の発光変動を表示。(D) (C)の時系列データに対するピーク/トラフ抽出の結果。2 時間移動平均処理を行った時系列データ (白丸) に、ピーク位置決定用の二次関数フィッティング結果がマゼンダの実線、トラフ位置推定用二次関数フィッティング結果がシアンの実線、推定されたピーク時刻が赤の点縦軸、推定されたトラフ時刻が青の点縦軸、ピークとトラフの包絡線が緑の実線で表示されている。(E) (D)のピーク/トラフ抽出結果から計算された各時刻の振幅。(F) (D)で推定されたピーク時刻から算出された各時刻の位相。(G) FFT-NLLS 法におけるフィッティングの結果。(C)の時系列データを正規化したもの (白丸) へフィッティングされたコサイン線形和関数を赤の実線で表示した。

リズム解析手法の検討 2: リズム持続細胞の選別手法の検討

作成したピークトラフ抽出アルゴリズムは、発光量が低いデータやリズムが不明瞭なデータにおいて、ピーク以外の発光変動をピークとして抽出することが多かった。そのため、正確な解析を行うためには、このようなリズム解析が難しい時系列データを自動で認識して解析対象から外す必要があった。そこで、測定期間中に明瞭なリズムが持続した細胞（以下、リズム持続細胞）を選別する手法を検討した。

まず、リズムの明瞭さを評価する指標について検討した。多くの概日リズム研究において、Fast Fourier Transform Non-Linear Least Square (FFT-NLLS) 法における Relative Amplitude Error (RAE) がこの目的で用いられている (Zielinski et al. 2014)。FFT-NLLS 法は時系列データの周期をコサイン関数線形和によるフィッティングにより推定する手法である。RAE はフィッティング結果の有意性の指標であり、0 から 1 の値をとる。フィッティングの有意性が小さいほど、RAE は 1 に近づく。そこで、本研究でも、FFT-NLLS 法を用いて細胞発光リズムの RAE を求めることで、リズム持続細胞の選別を行うこととした。

FFT-NLLS 法では、リズムのベース発光量や振幅が変化することを想定していない。そのため、これらが大きく変化する細胞発光リズムにそのまま適用するとフィッティング時の誤差が大きくなり、RAE が高く見積もられる。そこで Izumo らの手法を参考に、データの前処理を行った (Izumo et al. 2006)。まず、リズムデータから 24 時間移動平均を減算することで、トレンドを除いた。さらに、24 時間移動標準偏差を除算することで振幅を正規化した。(図 2.9G)。この処理を行った時系列データを FFT-NLLS 法により解析した結果、RAE はリズムの明瞭さとよく一致した。明瞭なリズムを示した細胞ではそのほとんどで RAE が 0.15 より小さかったため、リズム持続細胞の選別閾値は 0.15 とした。

FFT-NLLS 法では周期の変化を想定していない。そのため、周期が変化している細胞発光リズムについても RAE が高く見積もられる可能性がある。本研究では周期の不安定性の解析も行うため、周期変化が大きいことでリズムデータが解析対象から除かれることは解析結果に偏りを生み出すことにつながる。そこで、RAE が 0.15 よりも高いデータにおいて、測定期間中の振幅が常に 0.3 以上であり十分な振幅を持って発光が振動していたデータを解析対象に加えることとした。

上記のリズム持続細胞選別アルゴリズムを R 言語で実装し、以下の解析を進めた。また、以下の解析において、各細胞の発光リズムの周期は FFT-NLLS 法で推定した。

連続明条件下の個体内における細胞発光リズムの脱同期

細胞概日リズムの解析にあたって、まず明暗条件に同調した細胞集団を連続明条件へリリースする実験を行った。連続明条件で培養したイボウキクサに *AtCCA1:LUC* を導入し、明暗条件で1日培養した。培養後、導入効率の高いフロンドを選別し、細胞発光を測定した。測定の最初は12時間暗条件とし、その後連続明条件で測定を行った。測定終了後、発光が分離可能だった細胞について、発光量を定量し解析を行った。測定は2回行い、各測定を以下では LDtoLL1、LDtoLL2 と呼ぶ (表 2.1)。

連続明条件において各細胞の発光はよく持続し、多くの細胞で発光リズムが持続した (図 2.10AB)。FFT-NLLS 法による解析の結果、約 90%の細胞がリズム持続細胞と判定された (図 2.10CD、表 2.1)。細胞発光リズムの振幅は連続明条件への移行後、徐々に減少したが、測定8日後以降の振幅の細胞平均は 0.5 程度に維持された (図 2.10E)。このことから、個々の細胞における発光概日リズムは連続明条件で継続することが示唆された。

各細胞のピーク時刻は明暗条件では揃っていたが、連続明条件へのリリース後、その分布は徐々に広がり、細胞発光の総和にみられる概日リズムの振幅も減少した (図 2.10B)。このことから、測定フロンド内において、個々の細胞発光リズムは徐々に脱同期したと考えられた。そこで、脱同期過程を定量的に解析するために各時刻における細胞発光リズムの同期率を求めた (図 2.10F)。同期率は各細胞時計の位相から算出され、0 から 1 の値を取る (図 2.5)。リズムが同期していれば 1 となり、脱同期していれば 0 となる。同期率は明暗条件終了時には 1 に近かったが、10 日ほどかけて徐々に減少し、その後大きく上昇することはなく 0.3 程度の値が維持された。このことから、測定フロンド内の脱同期状態はこれ以降も解消されないと考えられた。

シロイヌナズナの葉を用いた先行研究では、脱同期状態における位相の空間パターンの存在が報告されている (Wenden et al. 2012)。そのため、イボウキクサにおいても脱同期状態における位相の空間分布を可視化して解析を行う必要がある。この際、各時刻における各細胞発光リズムの位相を色で表示し、細胞の位置にプロットすることで空間分布の可視化が可能である (図 2.6)。そこで、位相を値に応じて虹色で塗り分けて測定細胞の位置にプロットした (図 2.11)。脱同期状態の位相の空間分布に加えて脱同期過程における位相の空間分布変化も解析するために、LDtoLL1 のデータを用いて測定 2 日、6 日、10 日、14 日の位相の空間分布を示した。その結果、細胞間での概日リズムの脱同期は測定フロンド全体で偏りなく生じており、脱同期状態においても位相の空間分布に大きな偏りがないことが明らかとなった。このことは細胞時計の性質は測定フロンド内の位置に大きくは依存しないことを示唆している。その一方で、近接した細胞間では位相が比較的揃っている傾向が見られた。このことは近接細胞間において位相を揃えるような力が働いていることを示唆している。

FFT-NLLS 法で推定された細胞発光リズムの周期は 20 h から 28 h と大きな幅で分布していた (24.5 ± 1.2 h、mean \pm SD、図 2.10CD、表 2.1)。細胞発光リズムの周期の別の

推定法として、細胞ごとにピーク間隔の平均を計算したところ、細胞間で同様のバラつきが見られた (SD = 1.1 h、表 2.1)。このことから、細胞時計間には周期の不均一性が存在することが明らかとなり、これが脱同期の要因の1つだと考えられた。さらに、細胞時計の周期安定性を評価するためにピーク間隔の CV (coefficient variance、変動係数) を細胞ごとに計算した。CV は標準偏差を平均で割ったものを 100 倍し、百分率とした。CV が高いほど周期は不安定だと考えられる。計算の結果、ピーク間隔の CV は 7-10%程度であった (表 2.1)。この値は細胞間での周期の不均一性 (CV~5%) と比べて大きかったため、個々の細胞時計における周期の不安定性も脱同期の要因として無視できないと考えられた。

以上の解析から、連続明条件において、イボウキクサ個体内の細胞はそれぞれ独立した概日時計として振る舞うことが示唆された。また、個々の細胞時計の性質として、周期の不均一性と周期の不安定性が示唆された。

表 2.1 連続明条件へのリリース実験における細胞発光リズムの解析結果

実験	測定細胞数 (個)	解析区間 (d)	リズム持続細胞数 (個)	周期 (h) mean ± SD	RAE mean ± SD	ピーク間隔の平均 ^a (h) mean ± SD	ピーク間隔の CV (%) mean ± SD
LDtoLL1	85	1-16	78	24.5 ± 1.2	0.09 ± 0.04	24.2 ± 1.1	10.6 ± 4.6
		1-9	77	23.8 ± 1.3	0.06 ± 0.02	23.6 ± 1.2	7.3 ± 3.8
LDtoLL2	82	1-9	75	23.6 ± 1.4	0.06 ± 0.02	23.5 ± 1.4	7.2 ± 3.6

^a 細胞ごとにピーク間隔の平均を計算した結果

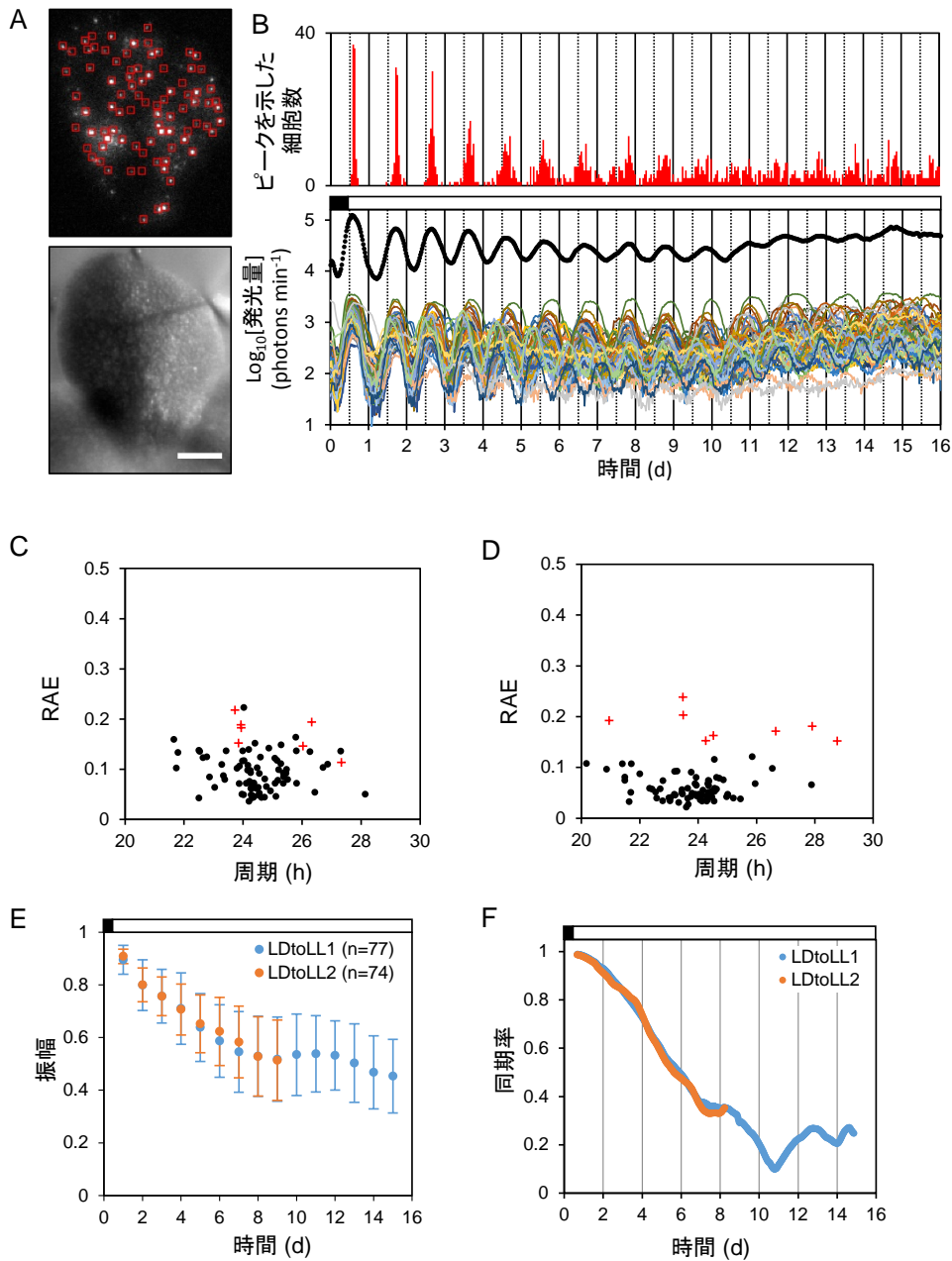


図 2.10 連続明条件下の脱同期過程における細胞概日リズムの解析

イボウキクサに *AtCCA1:LUC* を導入し、12 時間暗 12 時間明条件で培養後、生物発光の測定を開始した。図中の白横棒は明期、黒横棒は暗期を示す。(A) 測定したフロント (LDtoLL1) の生物発光像 (上) と明視野像 (下)。Bar: 1 mm。(B) LDtoLL1 における 85 細胞の発光変動 (実線) と総発光量変動 (黒点線)。上部にピーク時刻の頻度分布 (1 時間区間) を表示した。(C) LDtoLL1 における細胞発光リズムの FFT-NLLS 法による解析結果。対象期間は 1-16 日。リズム持続細胞の周期に対する RAE を黒丸で、それ以外の細胞について赤十字でプロットした。(D) LDtoLL2 における細胞発光リズムの FFT-NLLS による解析結果。対象期間は 1-8 日。リズム持続細胞の周期に対する RAE を黒丸で、それ以外の細胞について赤十字でプロットした。(E) 各実験における細胞発光リズムの振幅の変動。リズム持続細胞の mean \pm SD を表示。(F) 各実験における細胞発光リズムの同期率の変動。リズム持続細胞の位相から算出した。

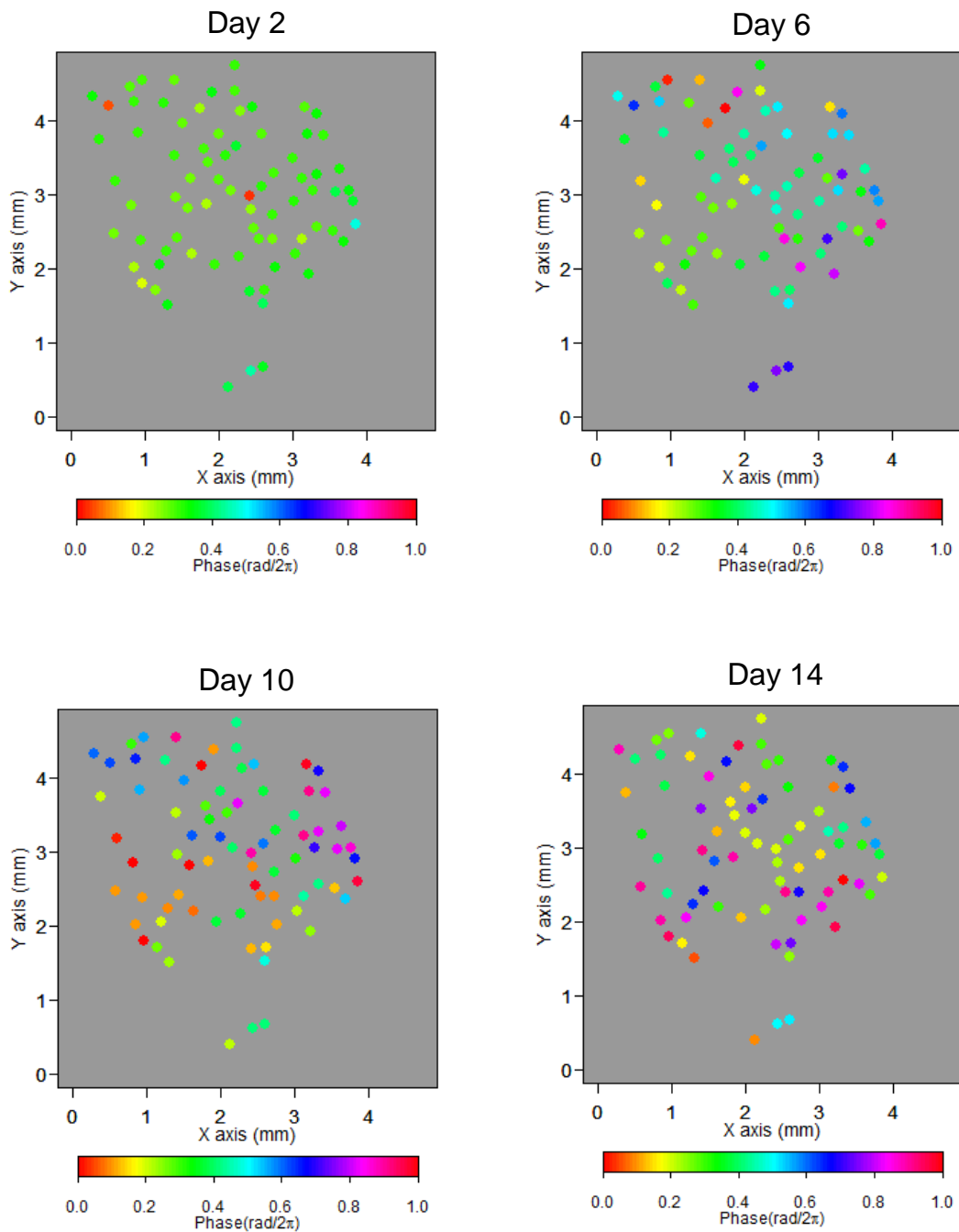


図 2.11 連続明条件での脱同期過程における位相の空間分布の遷移

各時刻における細胞発光リズムの位相を色で表し、個体上において発光が観察された位置にプロットした。LDtoLL1のリズム持続細胞のデータを表示した。個体全体で偏りなく、細胞リズム間の脱同期が生じていることが分かる。同期率が0.2程度のDay10やDay14において、明瞭な空間パターンは見られなかった。しかしながら近傍細胞間で位相が揃う傾向がみられた。

連続暗条件下の個体内における細胞発光リズムの脱同期

次に、連続暗条件へのリリース実験を行った。連続明条件で培養したイボウキクサに *AtCCA1:LUC* を導入し、明暗条件で1日培養した。培養後、導入効率の高いフロンドを選別し細胞発光を測定した。測定の最初1日は明暗条件とし、その後連続明条件で測定を行った。測定終了後、発光が分離可能だった細胞について発光量を定量し解析を行った。

各細胞の発光は徐々に減少していき、細胞発光リズムは最初の数サイクル程度しか明瞭ではなかった (図 2.12AB)。そこで、まず連続暗条件の最初の4日間を対象に FFT-NLLS 法による解析を行った。その結果、多くの細胞が低い RAE を示し、90%の細胞がリズム持続細胞と判定された (図 2.12C、表 2.2)。次に連続暗条件の全期間を対象に FFT-NLLS による解析を行った結果、多くの細胞で RAE が上昇し、リズム持続細胞と判断された細胞は60%程度に減少した (図 2.12D、表 2.2)。発光リズムが持続した細胞においても振幅が大きく減少していた (図 2.12E)。振幅は減少したものの、測定期間を通して明瞭なリズムが継続し、RAE が低い細胞も存在した (図 2.12D)。このことから連続暗条件における概日リズムの持続性が細胞間で異なることが示唆された。どちらの測定区間を対象にした解析においても、細胞発光リズムの周期は約 31 h であり、連続明条件よりも長周期であった (表 2.1、表 2.2)。

リズム持続細胞は、連続明条件と同様に脱同期した (図 2.12B)。同期率の減少速度は連続明条件へのリリース実験とほぼ同じであった (図 2.12F)。各細胞の発光リズムの周期は 27 h から 37 h の幅に分布しており不均一であった (図 2.12CD)。またピーク間隔の CV も大きく、周期の安定性も低かった (表 2.2)。

以上の解析により、連続暗条件においても、測定フロンド内の細胞はそれぞれ固有の周期をもつ細胞概日時計として振る舞うが、細胞発光リズムはあまり持続しないことが示唆された。

表2.2 連続暗条件へのリリース実験の解析結果

実験	測定細胞数 (個)	解析区間 (d)	リズム持続細胞数 (個)	リズム (h)	RAE	ピーク間隔の平均 ^a (h)	ピーク間隔のCV (%)
				mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD
LDtoDD1	73	1-9	41	31.2 ± 1.7	0.09 ± 0.03	31.4 ± 2.2	12.3 ± 4.4
		1-5	66	31.2 ± 1.6	0.07 ± 0.02	31.1 ± 2.3	12.0 ± 6.3

^a 細胞ごとにピーク間隔の平均を計算した結果

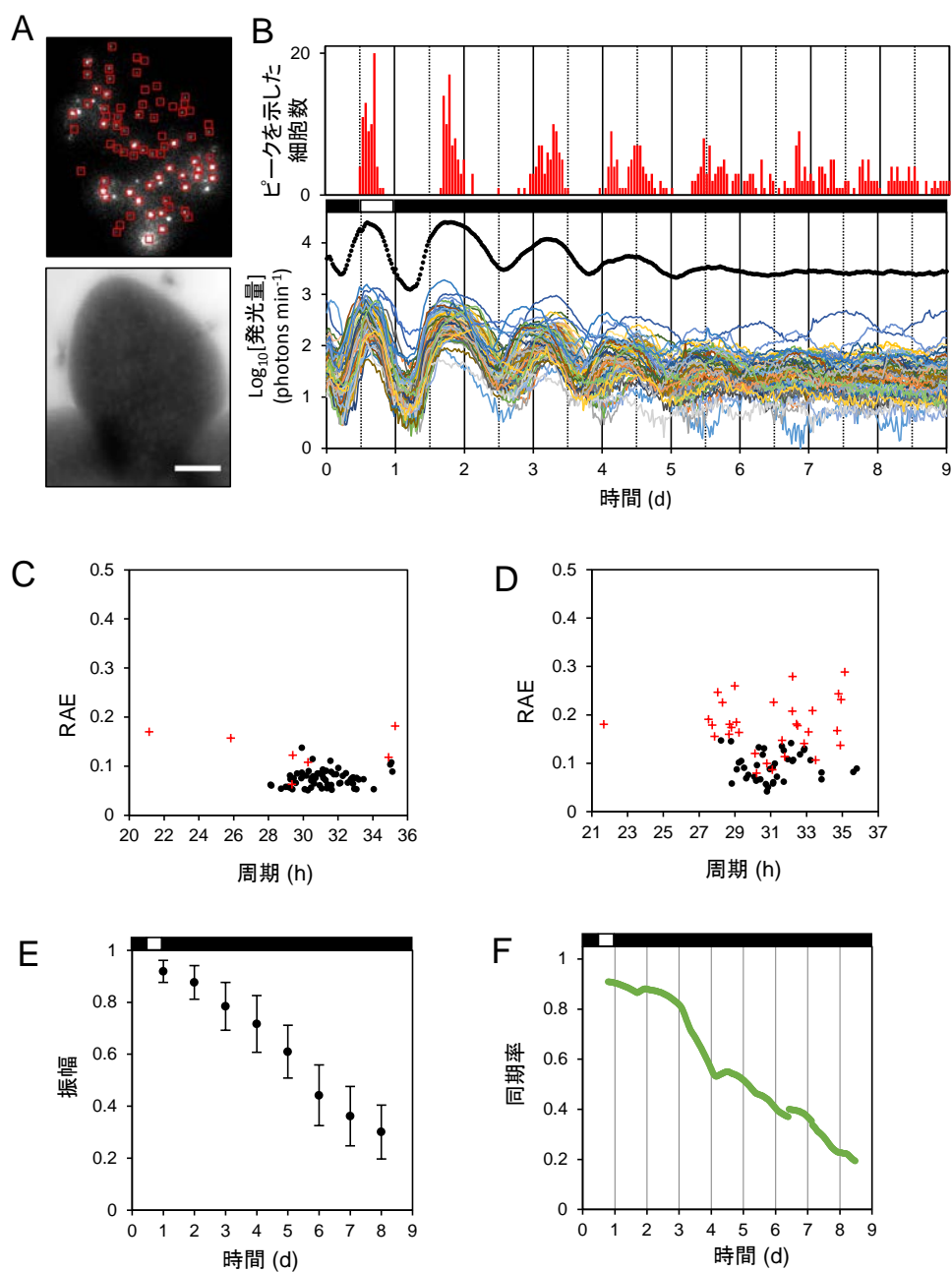


図 2.12 連続暗条件下の脱同期過程における細胞概日リズムの解析

イボウキクサに *AtCCA1:LUC* を導入し、12 時間暗 12 時間明条件で培養後、生物発光の測定を開始した。図中の白横棒は明期、黒横棒は暗期を示す。(A) 測定したフロント (LDtoDD1) の生物発光像 (上) と明視野像 (下)。Bar: 1 mm。(B) LDtoDD1 における 73 細胞の発光変動 (実線) と総発光量変動 (黒点線)。上部にピーク時刻の頻度分布 (1 時間区間) を表示した。(C) LDtoDD1 における細胞発光リズム FFT-NLLS 法による解析結果。対象期間は 1-4 日。リズム持続細胞の周期に対する RAE を黒丸で、それ以外の細胞について赤十字でプロットした。(D) LDtoDD1 における細胞発光リズム FFT-NLLS による解析結果。対象期間は 1-8 日。リズム持続細胞の周期に対する RAE を黒丸で、それ以外の細胞について赤十字でプロットした。(E) LDtoDD1 における細胞発光リズムの振幅の変動。リズム持続細胞の $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($n = 44$) を表示。(F) LDtoDD1 における細胞発光リズムの同期率の変動。リズム持続細胞の位相から算出した。

明暗条件を経験していない個体を用いた連続明条件下の細胞リズムの解析

連続明条件では、個々の細胞発光リズムは継続し多くの時系列データで定量的な解析が可能であった。位相の空間パターンの解析では近傍細胞間で位相が揃う傾向がみられた(図 2.11)。また、細胞時計間での周期不均一性と個々の細胞時計における周期不安定性が明らかとなった(表 2.1)。しかしながら、以下の理由から連続明条件へのリリース実験はこれらの現象の詳細な解析には不適切だと考えられる。リリース後、細胞発光リズムの同期率は 10 日ほどかけて徐々に減少した(図 2.10E)。このことはリリース後 1 週間以上の間、植物個体はリズムの同期状態から脱同期状態への遷移期間にあることを意味している。この期間中は、細胞発光リズムの性質が徐々に変化していく可能性がある。実際、細胞発光リズムの振幅は 8 日ほどかけて徐々に減少していった(図 2.10F)。そのため、連続明条件下の細胞時計の性質を解析するにあたり、この遷移期間中の細胞発光リズムを対象とするのは適切ではないと判断した。そこで、連続明条件下において細胞が示す概日リズムの解析を、一度も明暗条件を経験していない植物個体を用いて行うこととした。連続明条件で培養したイボウキクサに *AtCCA1:LUC* を導入し、連続明条件で 1 日培養した。培養後、導入効率の高いフロンドを選別し、連続明条件で細胞発光を測定した。測定終了後、発光が分離可能だった細胞について、発光量を定量し解析を行った。

個々の細胞時計は明暗条件を経験してなくても、明瞭な発光リズムを示し、細胞発光リズムは測定開始時から脱同期状態であった(図 2.13AB)。測定期間は異なるが 9 回の測定を行った(表 2.3)。9 回の測定(LLtoLL1-9)で取得した生物発光の時系列データを FFT-NLLS 法で解析した結果を図 2.13C にまとめてプロットした。ほぼ全ての細胞において RAE は低く、どの測定においても測定した細胞の約 80% がリズム持続細胞だと判断された(表 2.3)。最も長期間であった 8 日間の測定を行った 3 実験(LLtoLL1-3)において、リズム持続細胞の振幅は細胞平均で約 0.6 を維持しており、細胞時計の性質は測定期間中において大きくは変化していないことが示唆された(図 2.13D)。

リリース実験では測定した細胞の約 90% がリズム持続細胞と判断されたが、本測定では約 80% だった(表 2.2、表 2.3)。この違いは測定初期の振幅の大きさが違うためシグナル・ノイズ比が異なることに起因すると考えられる(図 2.10E、図 2.13D)。リズムが持続しなかったと判断された細胞でもリズムが完全に消失していたわけではなく、発光変動におけるリズム成分は目視で確認可能な程度は存在した。また、多くの細胞の RAE は 0.3 よりも低かった(図 2.13C)。そのため、リズム持続細胞が測定細胞の約 80% ということは、個体内の細胞の 20% 程度で概日リズムが消失していることを意味しない。

9 回の測定(LLtoLL1-9)において、同期率は測定期間中低く維持され、細胞発光リズムの脱同期状態が持続していることが示唆された(図 2.13E)。測定開始時の同期率は測定開始後 1.5 日時点で 0.50 ± 0.16 ($n = 9$) と高く、測定期間中に徐々に減少していく傾向がみられた。しかしながら同期率が測定期間中に大きく変動することはなかった。

以下では、本実験で取得した脱同期状態にあるリズム持続細胞の時系列データ (LLtoLL1-9、表 2.3) を用いて、連続明条件へのリリース実験において示唆された、近傍細胞間で位相が揃う傾向、細胞時計の周期不均一性・周期不安定性について解析を行う。

表2.3 連続明条件における概日リズムの解析結果

実験	測定細胞数 (個)	解析区間 (d)	リズム持続細胞数 (個)	リズム (h) mean ± SD	RAE mean ± SD	ピーク間隔の平均 ^a (h) mean ± SD	ピーク間隔のCV (%) mean ± SD
LLtoLL1	89	0-8	74	23.7 ± 1.4	0.10 ± 0.03	23.5 ± 1.3	10.2 ± 4.0
LLtoLL2	59	0-8	50	23.8 ± 1.4	0.09 ± 0.02	23.7 ± 1.5	9.5 ± 3.7
LLtoLL3	60	0-8	47	23.4 ± 1.6	0.08 ± 0.03	23.3 ± 1.7	9.1 ± 3.6
LLtoLL4	85	0-3	69	22.3 ± 1.8	0.09 ± 0.03	22.6 ± 2.0	9.3 ± 6.4
LLtoLL5	76	0-3.5	71	23.2 ± 1.3	0.08 ± 0.02	23.0 ± 1.5	4.9 ± 2.5
LLtoLL6	65	0-6	54	23.9 ± 1.7	0.08 ± 0.02	23.9 ± 1.7	7.6 ± 3.5
LLtoLL7	90	0-3	80	22.2 ± 1.0	0.08 ± 0.02	22.1 ± 1.2	6.7 ± 5.7
LLtoLL8	67	0-3	50	22.7 ± 2.1	0.09 ± 0.03	22.7 ± 2.2	7.9 ± 6.4
LLtoLL9	75	0-3	75	22.6 ± 1.1	0.09 ± 0.02	22.7 ± 1.2	8.2 ± 5.6

^a 細胞ごとにピーク間隔の平均を計算した結果

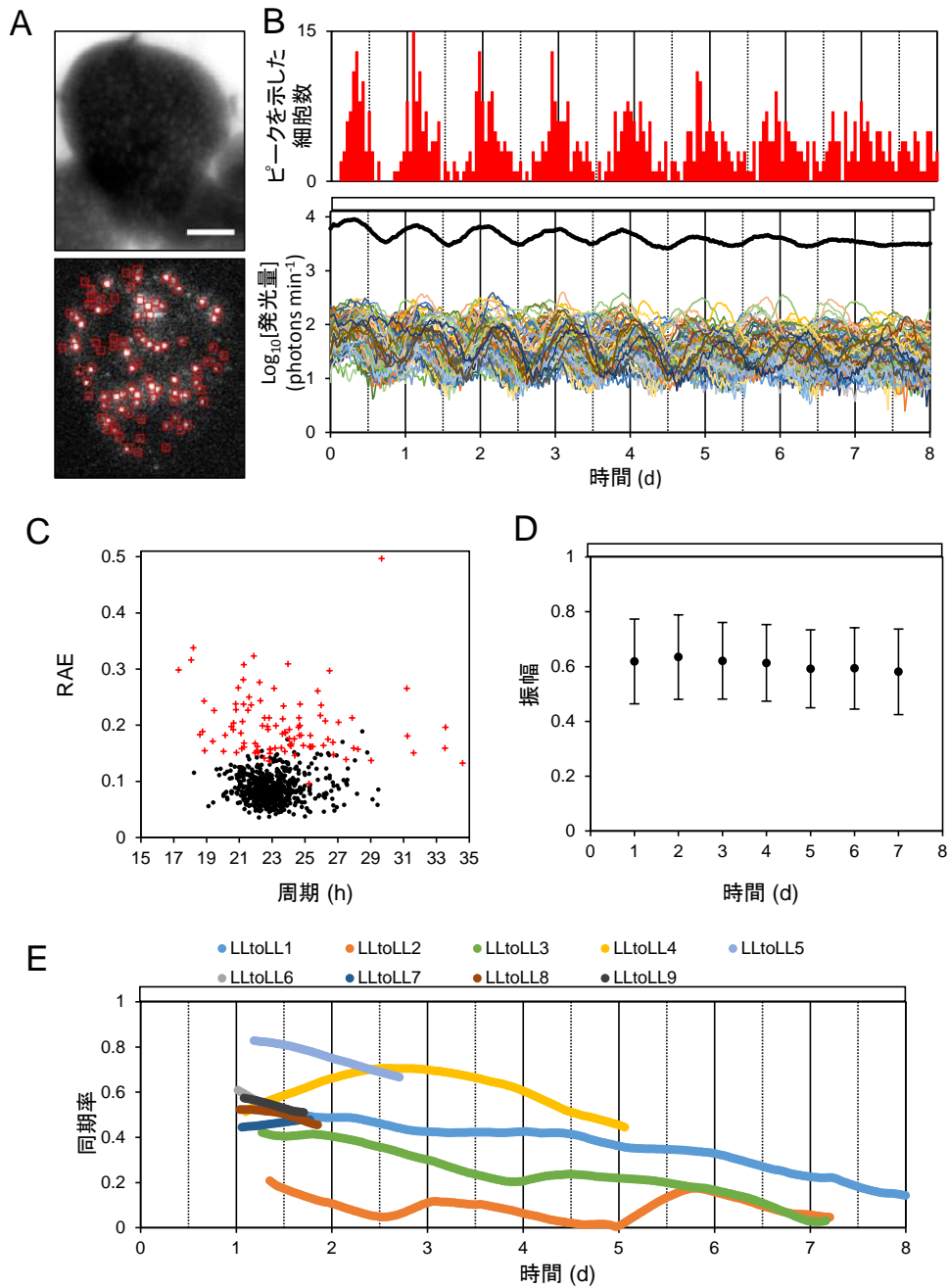


図 2.13 連続明条件下の細胞発光リズムの解析

イボウキクサに *AtCCA1:LUC* を導入し、連続明条件下で 24 時間培養した後、生物発光の測定を開始した。図中の白横棒は明期を示す。(A) 測定したフロンド (LLtoLL1) の生物発光像 (上) と明視野像 (下)。Bar: 1 mm。(B) LLtoLL1 の 89 細胞の発光変動 (実線) と総発光量変動 (黒点線)。上部にピーク時刻の頻度分布 (1 時間区間) を表示した。(C) LLtoLL1-9 における細胞発光リズムの FFT-NLLS 法による解析結果。解析区間は表 2.3 を参照。リズム持続細胞の RAE を黒丸で、それ以外を赤十字で周期に対してプロットし、9 回の実験をまとめて表示した。(D) LLtoLL1-3 における細胞発光リズムの振幅の変動。3 実験のリズム持続細胞の $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($n = 171$) を表示 (E) LLtoLL1-9 における細胞発光リズムの同期率の変動。リズム持続細胞の位相から算出した。

近接細胞間において位相が揃う傾向の解析

まず、近傍細胞間で位相が揃う傾向について解析を行った。連続明条件へのリリース実験での解析と同様に、まず位相の空間分布を可視化した (図 2.14)。その結果、位相は個体内で偏りなく分布していたが、近傍細胞間で位相が揃う傾向が見られた。これは連続明条件へのリリース実験において、脱同期状態のフロンドでみられた傾向と同様であった (図 2.11)。さらにこの傾向は 9 回の測定 (LLtoLL1-9) のいずれにおいても確認されたことから、位相の揃った細胞集団は脱同期状態にあるフロンド内に一定量存在することが示唆された。そこで、このような位相の揃った細胞集団領域のサイズ推定を試みた。

各実験のリズム持続細胞において、全ての可能な細胞ペアについて、細胞間距離と位相差を求めた (図 2.15A)。位相差は 0 から π の値をとるが、ここでは π で正規化し、0 rad/ π から 1 rad/ π と表記する。解析の結果、細胞間距離が 0.5 mm より小さい領域では、細胞間の位相差は細胞間距離が短いほど小さくなる傾向が見られた (図 2.15B)。また、この傾向は 8 日間の測定期間を通して維持されていた。この位相差が小さい領域が、位相の揃った細胞集団だと考えられる。逆に、胞間距離が 0.5 mm より大きい場合、位相差の平均は細胞間距離に依らず 0.5 rad/ π 程度となり、25%タイル-75%タイル間の幅が広がった。このことは、細胞間の位相差は細胞間距離によって決まっておらず、幅広い値を取りうることを示している。このことから、位相の揃った細胞集団領域のサイズは 0.5 mm よりも小さいことが示唆された。

次に、位相の揃った細胞集団が、脱同期中のフロンド内で安定に維持されるかを検証した。細胞間での位相関係を維持するには、細胞集団の周期が同じである必要がある (図 2.7)。そこで、周期が同じ細胞集団が存在するかを検証した。位相の場合と同様に、各個体のリズム持続細胞において全ての可能な細胞ペアについて細胞間距離と周期差を求めた。その結果、細胞間の周期差が小さい領域は 0.2 mm 程度と、位相差が小さい領域 (0.5 mm 程度) と比べて小さいことが明らかとなった (図 2.15B、図 2.16A)。このことは位相の揃った細胞集団においても細胞間で周期は異なっており、細胞間で位相の揃った状態は、長期間は維持されないことを示唆している (図 2.7)。

また、細胞間距離が 0.3 mm よりも長い領域において細胞間の周期差の平均は細胞間距離によらず一定であり、25%タイル-75%タイル間も細胞間距離によらず大きな幅を持っていた。このことから、細胞時計の周期の空間分布には大きな偏りがないと考えられた。実際に、8 日間の測定 (LLtoLL1-3、表 2.3) において、FFT-NLLS 法により推定された各細胞発光リズムの周期には明瞭な空間パターンが見られなかった (図 2.16B)。

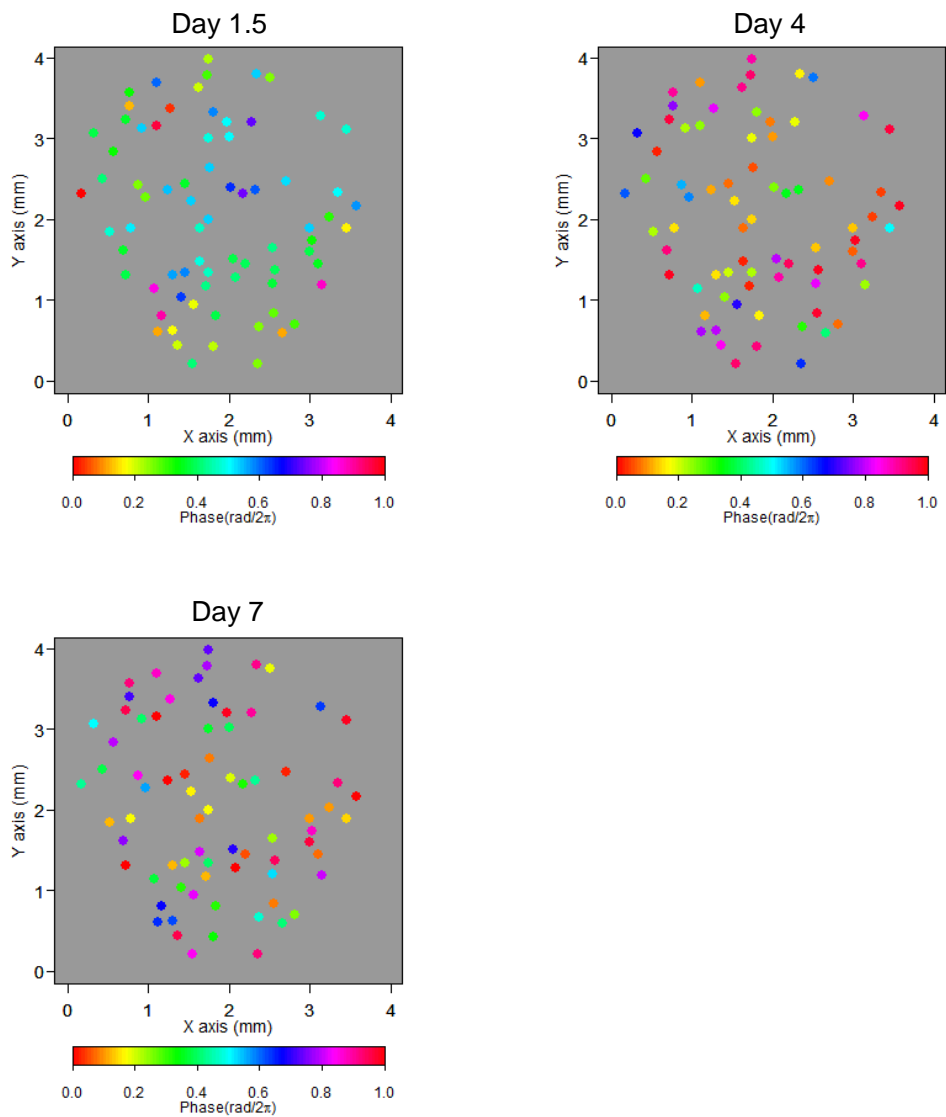


図 2.14 連続明条件における位相の空間分布の遷移

各時刻における細胞発光リズムの位相を色であらわし、個体上において発光が観察された位置にプロットした。LLtoLL1 のリズム持続細胞のデータを表示した。明瞭な空間パターンは見られな
いが、近傍細胞で位相が近い傾向がみとれる。

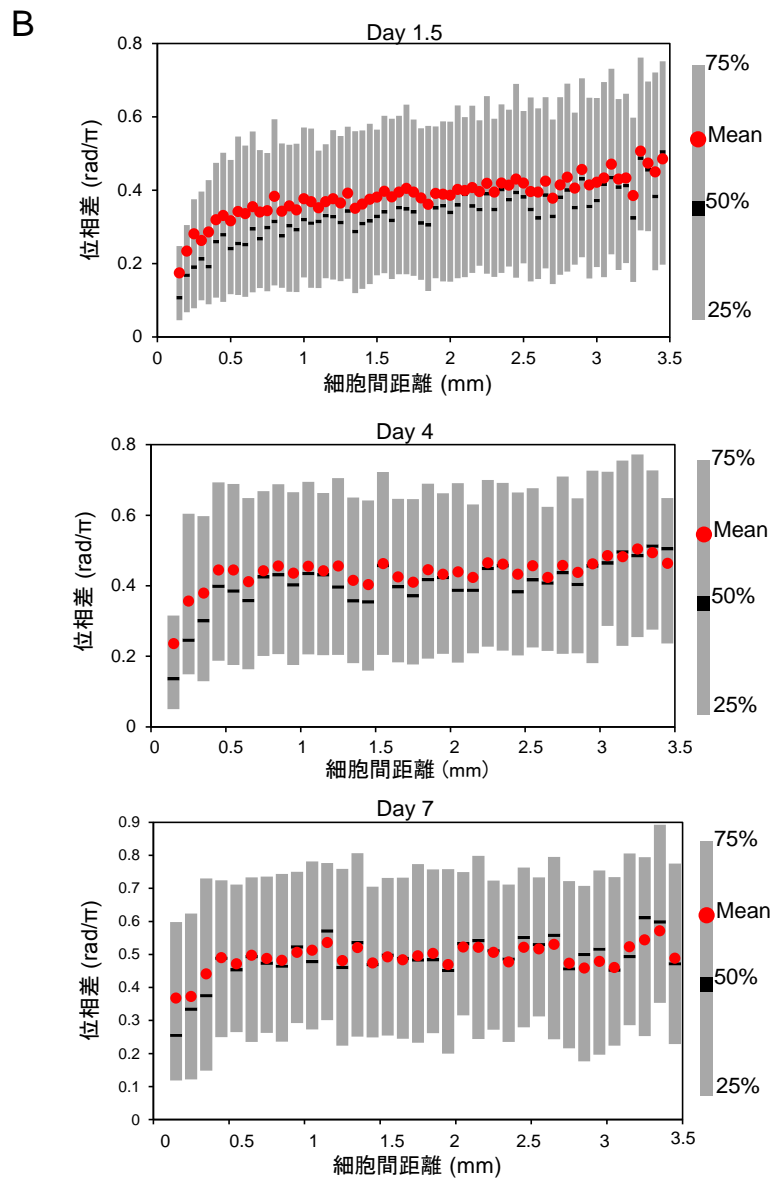
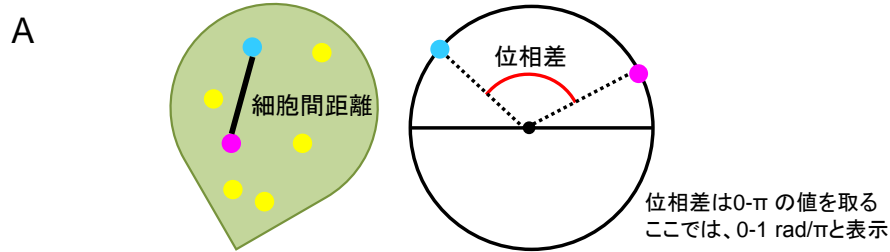


図 2.15 細胞間の距離と位相差の関係

(A) フロンド中の全細胞ペアについて、細胞間距離と位相差を求めた。(B) 各時刻における、細胞間距離と、細胞間位相差の関係。Day 1.5 は LLtoLL1-9 のリズム持続細胞のデータを用いた。計算された位相差について、その統計量を細胞間距離 0.05 mm 区間ごとに求めてプロットした。Day 4 は LLtoLL1-4 のデータを用い、統計量は 0.1 mm 区間ごとに求めた。Day 7 は LLtoLL1-3 のデータを用い、統計量は 0.1mm 区間ごとに求めた。

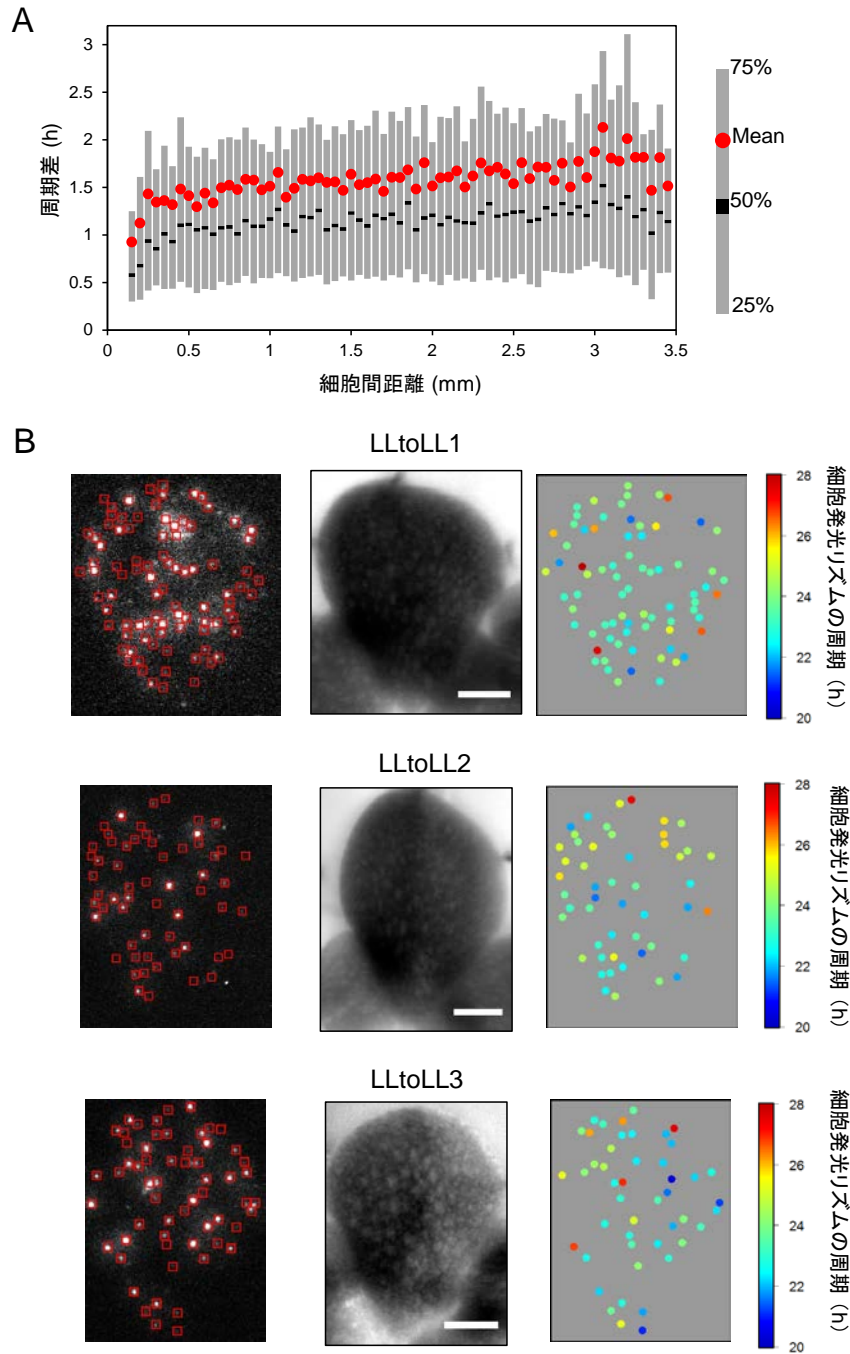


図 2.16 連続明条件における細胞時計の周期の空間分布

(A) 細胞間距離と、細胞間周期差の関係。LLtoLL1-9 のリズム持続細胞について、FFT-NLLS 法で推定された周期と細胞間距離を図 2.12 と同様に求めた。周期差について、その統計量を細胞間距離 0.05 mm 区間ごとに求めてプロットした。平坦な周期差の平均は、個体内において、細胞の周期が位置によらず不均一であることを示唆している。(B) LLtoLL1-3 について、細胞時計の周期に空間的な偏りがないか検証するために、FFT-NLLS 法で推定された周期を色で表し、発光が観察された個体上の位置にプロットした。個体内に周期に明瞭な空間パターンは見られなかった。左から生物発光画像、明視野像、周期プロット。 Bars: 1mm

個体内の細胞時計の周期は有意に異なる

連続明条件において、個々の細胞のリズム周期は 18.2 h から 29.4 h と大きな幅に分布し大きくバラついていた ($23.0 \text{ h} \pm 1.6 \text{ h}$, mean \pm SD, $n = 563$, 図 2.13C)。また、ピーク間隔の CV はどの実験においても 5-10%であり、個々の細胞時計の周期不安定性も高かった (表 2.3)。周期が不安定である場合、細胞の本来の周期が同じでも、不安定性に起因する見かけ上の周期の違いがあらわれる可能性がある (図 2.2)。そこで、8 日間の測定データ (LLtoLL1-3、表 2.3) を用いて、細胞間における周期が有意に異なるかを分散分析により検定した。今回の分散分析では、 i 細胞の j サイクルにおけるピーク間隔 (PPI: peak-to-peak interval) が $PPI_{ij} = \tau_i + \varepsilon_{ij}$ に従うと仮定し、一元配置分散分析モデルで検定を行った。ここで、 τ_i は i 細胞の周期に対応し、 ε_{ij} は周期の不安定性に起因する i 細胞の j サイクルにおける正規分布に従う周期ゆらぎに対応する。検定の結果、今回解析に用いた 171 個の細胞間における周期の違いの有意性が示された (ANOVA, $F = 2.43$, $P < 0.001$)。また、実験ごとの検定においても、個体内における細胞間の周期の違いの有意性も示された (LLtoLL1, $F = 1.66$, $P = 0.001$; LLtoLL2, $F = 2.69$, $P < 0.001$; LLtoLL3, $F = 3.65$, $P < 0.001$)。以上の解析により、細胞概日時計の周期は、細胞間で有意に異なることが示された。

細胞発光リズムの周期不均一性・不安定性の定量的解析

分散分析で用いた統計モデル: $PPI_{ij} = \tau_i + \varepsilon_{ij}$ において、 τ_i も正規分布に従うと仮定した場合、 τ_i と ε_{ij} の母集団の標準偏差を推定することができる。これを利用して、細胞リズムの周期不均一性と不安定性を定量的に解析した。まず、3 つの実験データ (LLtoLL1-3) で取得した時系列データを統合して取り扱ってよいかを検討した。分散分析により検定した結果、3 つの実験間には細胞発光リズムの周期の有意な違いはなかった (ANOVA, $F = 0.97$, $P = 0.38$)。また、細胞ごとにピーク間隔の平均と CV を計算してプロットした結果、3 実験のプロット領域の重なりは大きかった (図 2.17A)。このことから実験ごとに観察された細胞発光リズムの性質は大きく変わらず、その母集団は同じと考えてよいと判断した。次に、細胞ごとのピーク間隔の平均について、分布の形状を検定した。その結果、正規分布性は棄却されなかった (Kolmogorov-Smirnov, $P = 0.22$)。そのため、 τ_i も正規分布に従うと仮定した。そこで、3 実験のリズム持続細胞の時系列データを統合し分散分析表から、細胞の周期 τ_i と周期ゆらぎ ε_{ij} の標準偏差を推定した。その結果、周期 τ_i の標準偏差は 1.1 h、周期不安定性に起因する周期ゆらぎ ε_{ij} の標準偏差は 2.4 h と推定された。以上の解析から、個々の細胞の周期不安定性の程度は細胞間での周期の不均一性の程度より 2 倍以上大きいことが明らかとなった。これはマウスの線維芽細胞と同じ傾向であった (Leise et al. 2012)。

また、ピーク間隔の CV は細胞ごとに異なっており、周期安定性も細胞間で異なることが示唆された (図 2.17A)。ピーク間隔の平均とピーク間隔の CV には相関が見られなかったことから、細胞時計の周期に影響する要因と、周期の不安定性に影響する要因は異なるこ

とが示唆された。また、ピーク間隔の平均とピーク間隔の CV はそれぞれ、各細胞の生物発光量と相関を示さなかった (図 2.17BC)。このことは、本研究で明らかとなった細胞時計間での周期や周期不安定性の不均一性が、レポーター導入量の違いや生物発光量の測定におけるシグナル・ノイズ比の違いなどの影響によるものでないことを示している。また、周期不安定性の空間分布には、周期と同じく、明瞭な空間パターンがみられなかった (図 2.18)。このことから、細胞の個体内における位置は、周期の不安定性には影響しないと考えられた。

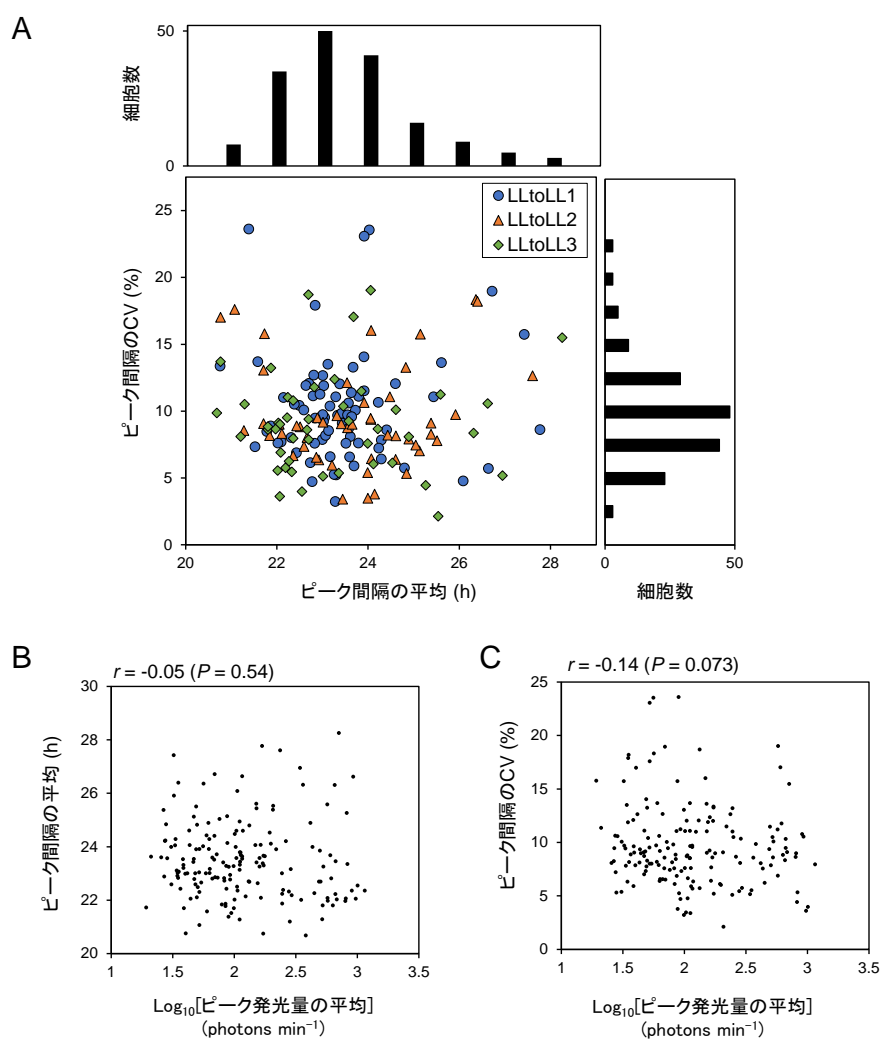


図 2.17 細胞発光リズムのピーク間隔の平均とピーク間隔 CV

(A) LLtoLL1-3 のリズム持続細胞において、ピーク間隔の CV をピーク間隔の平均に対してプロットした。ピーク間隔の平均の分布を上部に、ピーク間隔の CV の分布を右に示した。(B) ピーク間隔の平均をピーク発光量に対してプロットし、グラフ上部に相関係数を示した。発光量は分布幅が大きかったため、対数スケールで表示した。相関係数の計算においても発光量は対数化した値を用いた。(C) ピーク間隔の CV をピーク発光量に対してプロットし、グラフ上部に相関係数を示した。発光量は分布幅が大きかったため、対数スケールで表示した。相関係数の計算においても発光量は対数化した値を用いた。

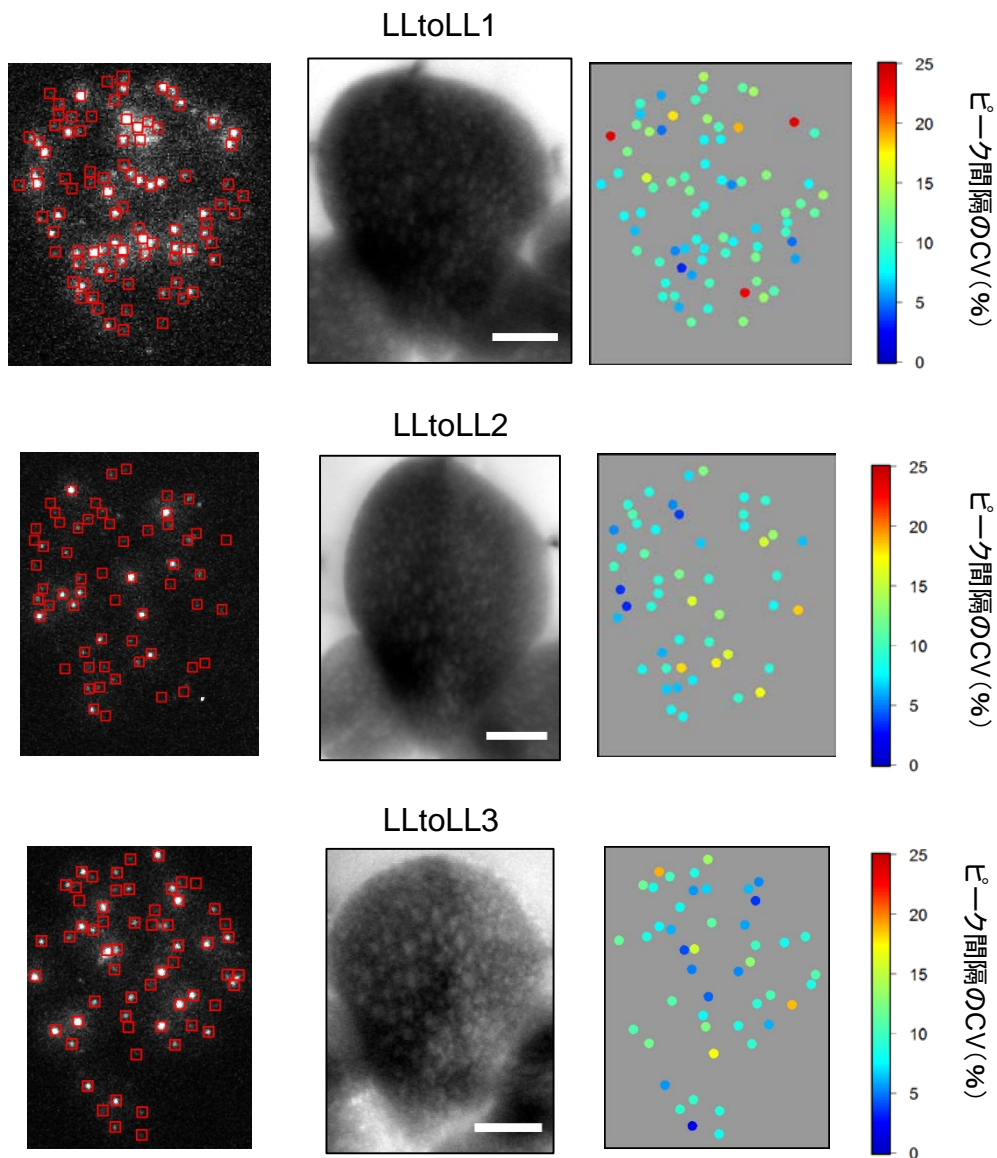


図 2.18 連続明条件における細胞時計のピーク間隔の CV の空間分布

LLtoLL1-3 について、細胞時計の不安定性に空間的な偏りがないか検証するために、個々の細胞時計のピーク間隔の CV を色で表し、発光が観察された個体上の位置にプロットした。周期と同様に不安定性においても明瞭な空間パターンは見られなかった。左から生物発光画像、明視野像、周期プロット。 Bars: 1mm。

細胞時計の集団的挙動に対する相互作用の影響

個体中における細胞間の位相差の解析から、細胞時計間における相互作用の存在が示唆された (図 2.15)。しかしながら、この相互作用の影響は細胞時計間での周期の違いを是正するほどは大きくないことも示唆された (図 2.16)。そこで、個体中の細胞時計の挙動に細胞間相互作用がどの程度影響しているかの検証を行った。相互作用が全くない場合、細胞リズムのピーク間隔は、分散分析で用いた統計モデル: $PPI_{ij} = \tau_i + \varepsilon_{ij}$ に従うと考えられる。この際、 n サイクル目のピーク時刻の分散 V_n は、 $V_n = \sigma_\tau^2 n^2 + \sigma_\varepsilon^2 n$ として求められる (図 2.2)。ここで、 σ_τ は τ_i 母集団の標準偏差、 σ_ε は ε_{ij} 母集団の標準偏差であり、前項の解析から、 $\sigma_\tau = 1.1 \text{ h}$ 、 $\sigma_\varepsilon = 2.4 \text{ h}$ と推定されている。そのため、相互作用を考慮していない上記モデルにおける分散の変化は実際に計算可能である。そこで、このモデルの予測と実際に観察されたピーク時刻の分散変化を比較することで、細胞時計集団の挙動が相互作用を考慮しないモデルでどの程度説明できるかを検証する。

実際に測定された生物発光リズムは測定の最初から脱同期しているため、最初のピーク時刻が揃っていない。そこで、各細胞のピーク時刻データから第 1 ピークの時刻を引くことにより、第 1 ピーク時刻を 0 h に揃える操作を行った。以下、操作後のピーク時刻 (PT: peak time) を PT* と書き表す。各実験において、PT* のサイクルごとの細胞間での分散を計算した結果、すべての実験で分散は放物線用のカーブを描いて上昇した (図 2.19)。この分散の描く曲線は、モデルで予想された分散の曲線とよくフィットし、決定係数を算出したところ 0.73 と高い値を示した。このことから、周期不均一性と周期不安定性のみを考慮した単純な統計モデルを用いても、細胞時計が示す集団的な挙動はかなりの程度説明できると考えられた。

また、LLtoLL1 における同期率は 5 日間ほど 0.5 程度を維持し、大きく変動していなかったが (図 2.13E)、PT* の分散は 5 日間で上昇している (図 2.19)。このことは、同期率に変化が見られない状態でも、細胞時計間の位相関係は固定されていないことを示唆している。この結果は、近傍領域においても細胞間で発光リズムの周期が異なることから予想される (図 2.16)。

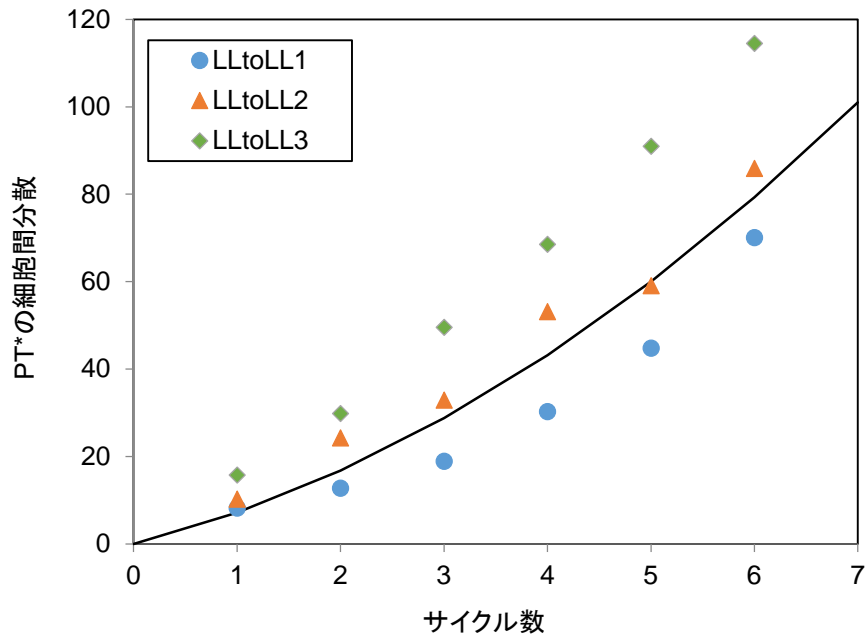


図 2.19 ピーク時刻 PT^* のサイクルごとの分散とモデルによる予測曲線

LLtoLL1-3 の各細胞のピーク時刻系列 PT から第 1 ピークを減算し、第 1 ピークの時刻を 0 h であるピーク時刻系列 PT^* を求めた。各サイクルについて PT^* の細胞間の分散を実験ごとに算出しプロットした。統計モデルによる予測曲線（黒線）は $V_n = \sigma_\tau^2 n^2 + \sigma_\varepsilon^2 n$ ($\sigma_\tau=1.1$ 、 $\sigma_\varepsilon=2.4$) により計算した。予測曲線は 3 実験の分散によくフィットし、決定係数は 0.73 であった。

周期不均一性が明暗条件における細胞時計の挙動に与える影響を解析実験条件

連続明条件における細胞発光リズムに対して行った一連の解析によって、個体内の細胞時計における周期の不均一性が明らかとなった。それでは、概日時計が計時機構としての機能を発揮する明暗条件において、周期の不均一性は、個々の細胞時計の挙動にどのような影響を与えるのだろうか。先行研究により、概日時計の周期の違いは明暗条件への同調後の固定位相の違いに反映されること、周期と固定位相には正の相関があることが理論的にも実験的にも明らかとなっている（図 2.8、Ashoff et al. 1978、Remi et al. 2010、Granda et al. 2013、Dodd et al. 2013）。そこで、周期の不均一性が個々の細胞時計の明暗条件における挙動に影響を与えるかを検証するために、連続明条件での細胞発光リズム測定後に明暗条件において同一個体が示す細胞発光リズムを測定し、個々の細胞時計における概日リズム周期と明暗周期での固定位相との相関を解析した。

まず、各細胞の周期を推定するのに必要な連続明条件の測定期間を検討した。先の連続明条件での 8 日間の測定データ（LLtoLL1-3、表 2.3）において、最初の 3 日間のデータを用いて推定された各細胞時計の周期は、3 日後以降のデータを用いて推定された周期と相関を示した（図 2.20）。このことから、連続明条件下で 3 日間測定を行えば各細胞時計の周期を推定できると判断した。そこで、測定最初に 3 日間連続明条件で細胞発光変動を測定した後、光条件を 12 時間明 12 時間暗条件に切り替えて測定を行うこととした。

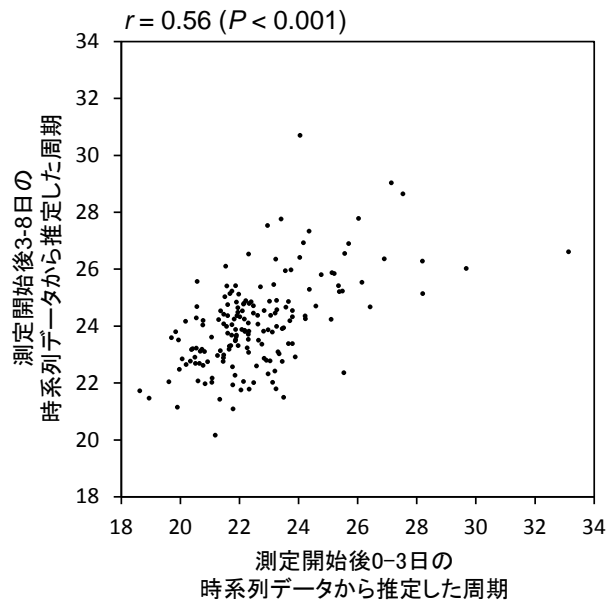


図 2.20 前半 3 日間の測定での推定周期と後半 5 日間の測定での推定周期の相関

LLtoLL1-3 の時系列データを用いて細胞発光リズムの周期を推定するのに必要な測定期間について検証した。8 日間の測定で取得された各細胞発光リズムについて、前半 3 日間の測定データのみ、後半 5 日間の測定データのみを用いて FFT-NLLS 法で周期を推定した。2 つの解析期間から推定された周期は相関を示した。このことは測定最初の 3 日間の時系列データからそれ以降の時系列データの周期を推定できることを示している。相関係数をグラフ上部に示した。

脱同期状態の細胞発光リズムは2日間で明暗条件に同調する

連続明条件で培養したイボウキクサに *AtCCA1::LUC* を導入し、連続明条件で1日培養した。培養後、導入効率の高いフロンドを選別し、連続明条件で細胞発光を測定した。3日間の測定の後、光条件を明暗条件に切り替えて測定を続けた。測定終了後、発光が分離可能だった細胞について発光量を定量し解析を行った。

測定開始時から脱同期状態にあった細胞発光リズムは明暗条件へと短期間で同調した (図 2.21AB)。細胞発光リズムの同期率は連続明条件下である測定後1.5日において 0.49 ± 0.01 (mean \pm SD, $n = 3$) であったが、明暗条件開始2日後である測定後5日において 0.98 ± 0.01 (mean \pm SD, $n = 3$) まで上昇し、以降高い値を維持した (図 2.21C)。また、細胞発光リズムの振幅も、連続明条件では0.6程度であったが、明暗条件開始1日後には0.8程度まで上昇し、以降高い値が維持された (図 2.21D)。連続明条件 (0-3日) における細胞発光リズムの周期を FFT-NLLS 法で推定した結果、周期は約19hから約29hに分布し、不均一であった (図 2.21E、表 2.4)。これらの周期に不均一性をもつ細胞時計は明暗条件に同調した後 (5-8日) は、周期24時間の発光リズムを示した (図 2.21F、表 2.4)。以上の解析により、5日目以降の細胞発光リズムは明暗条件への安定した同調状態にあると考えられた。

表2.4 脱同期リズムの明暗条件への同調実験におけるリズム解析結果

実験	測定細胞数 (個)	解析区間 (d)	リズム持続細胞数 (個)	リズム (h)	RAE	ピーク間隔の平均 ^a (h)	ピーク間隔のCV (%)
				mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD
LLtoLD1	90	0-3 ^b	80	22.2 \pm 1.0	0.08 \pm 0.02	22.1 \pm 1.2	6.7 \pm 5.7
		5-8	90	23.9 \pm 0.2	0.04 \pm 0.01	24.0 \pm 0.2	1.3 \pm 1.3
LLtoLD2	67	0-3 ^c	50	22.7 \pm 2.1	0.09 \pm 0.03	22.7 \pm 2.2	7.9 \pm 6.4
		5-8	66	24.1 \pm 0.3	0.06 \pm 0.02	24.1 \pm 0.4	3.4 \pm 3.4
LLtoLD3	75	0-3 ^d	75	22.6 \pm 1.1	0.09 \pm 0.02	22.7 \pm 1.2	8.2 \pm 5.6
		5-8	75	24.0 \pm 0.2	0.05 \pm 0.01	24.0 \pm 0.3	2.5 \pm 3.0

^a 細胞ごとにピーク間隔の平均を計算した結果

LLtoLD1,2,3の連続明条件下の測定結果は、表2.2のLLtoLL7,8,9としてそれぞれ解析。

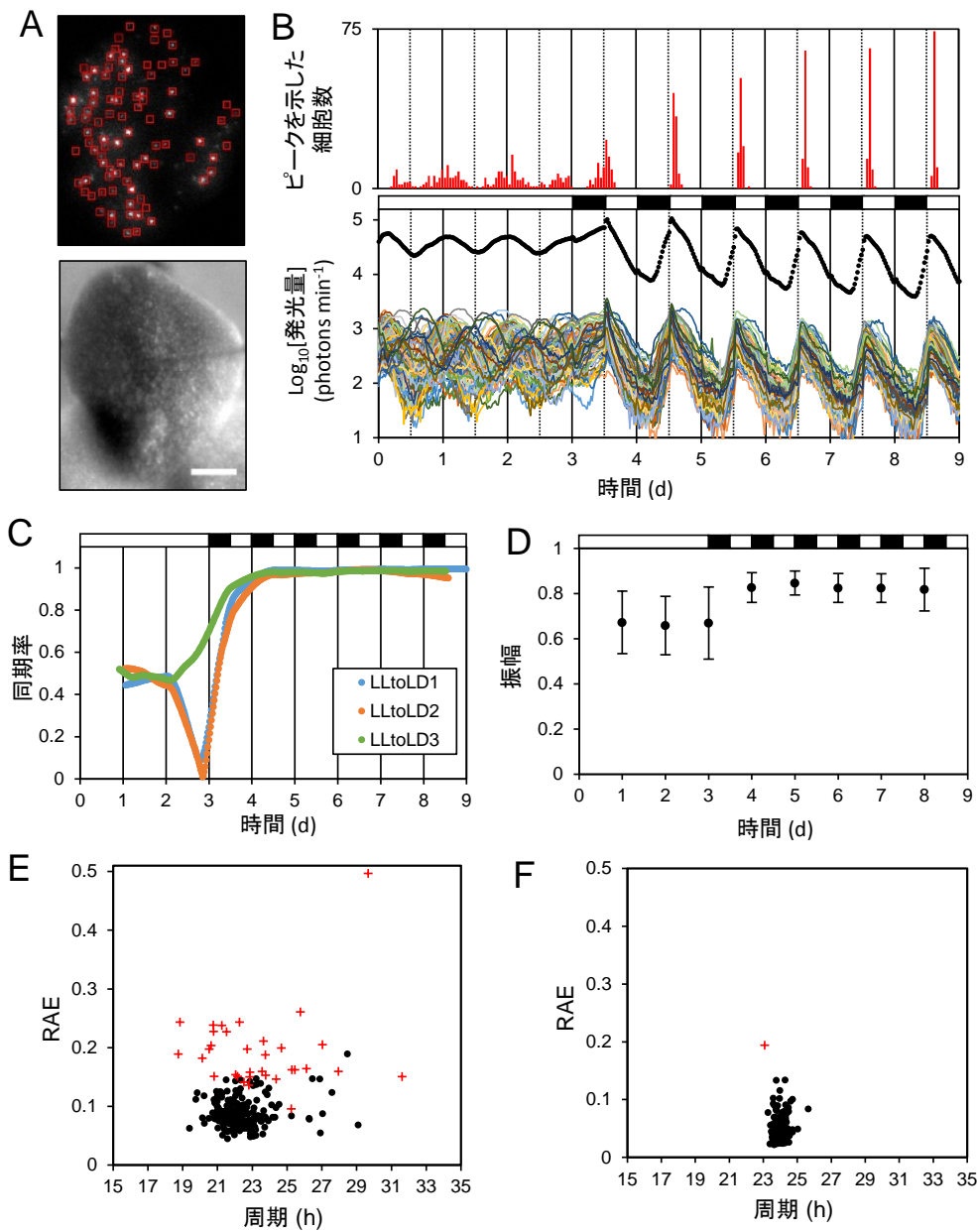


図 2.21 明暗条件への同調実験における細胞発光リズムの解析

イボウキクサに *AtCCA1:LUC* を導入し、連続明条件下で 24 時間培養した後、生物発光の測定を開始した。図中の白横棒は明期、黒横棒は暗期を示す。(A) 測定したフロント (LLtoLD1) の生物発光像 (上) と明視野像 (下)。Bar: 1 mm。(B) LLtoLD1 における 90 細胞の発光変動 (実線) と総発光量変動 (黒点線)。上部にピーク時刻の頻度分布 (1 時間区間) を表示した。(C) LLtoLD1-3 における細胞発光リズムの同期率の変動。リズム持続細胞の位相から算出した。計算の都合上、同期率は位相変化の影響を 1 サイクル前から受けることに留意。(D) LLtoLD1-3 における細胞発光リズムの振幅の変動。3 実験の解析区間 0-3 日におけるリズム持続細胞の $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($n = 205$) を表示。(E) LDtoLL1-3 で取得された連続明条件下における細胞発光リズムの FFT-NLLS による解析結果。解析区間は 0-3 日。リズム持続細胞の RAE を黒丸で、それ以外を赤十字で周期に対してプロットした。3 実験の結果をまとめて表示している。(F) LDtoLL1-3 で取得された明暗条件下における細胞発光リズムの FFT-NLLS による解析結果。対象期間は 5-8 日。リズム持続細胞の RAE を黒丸で、それ以外を赤十字で周期に対してプロットした。3 実験の結果をまとめて表示している。

個体内の細胞時計は細胞自律的に環境変化へ応答する

明暗条件中の固定位相の解析を行う前に、脱同期状態の細胞発光リズムが明暗条件へ同調する過程の解析を行った。まず、同調過程における個々の細胞発光リズムの挙動を解析した。本実験 (LLtoLD1-3) において細胞時計が最初に経験する環境変化は、測定開始後 3 日の暗期である。この第 1 暗期への応答様式は、細胞時計が刺激を受けた際の位相に依存すると予想される。そこで、第 1 暗期直前のピーク時刻を指標に細胞発光リズムを分類することを検討したが、明暗遷移時の前後でピークそのものが不明瞭となる場合が多く、指標として用いるのが困難であった。第 1 暗期直前のトラフ時刻を位相の指標として用いた際は、そのような問題が生じなかったため、この解析ではトラフ時刻を基準とした。

3 回の実験で取得した細胞発光の時系列データをまとめて、第 1 暗期直前のトラフ時刻が 48-51 h、51-54 h、54-57 h、57-60 h、60-63 h、63-66 h、66-69 h、69-72 h の計 8 グループに分けたところ、明暗条件への同調様式はグループ内では似ており、グループ間では大きく異なっていた (図 2.22A)。とくに、トラフ時刻が 57-60 h のグループでは第 1 暗期中にトラフが観察されたが、60-63 h のグループでは第 1 暗期中にピークが観察され、応答が大きく異なった。このような位相による応答様式の違いを明瞭化するためにグループごとのピーク時刻とトラフ時刻を並べてプロットした (図 2.22B)。トラフ時刻が 60 h の前後で、暗期中に現れるトラフがピークに入れ替わることが分かる。このことは、細胞時計が明暗条件に同調する際に、位相の前進 (トラフを経由して次にピークへ達する: 主観的 1 日を短くする) か、位相の後退 (次のピークへの到達を遅らせる: 主観的 1 日を長くする) のどちらを行うかを自身の位相を参照して決定していることを示唆している。また、同調前の位相が同調後の位相と近かった細胞時計 (トラフ時刻が 48-54 h、66-72 h) では 1 日でピークとトラフの時刻が同調後の時刻と同じになっているが、同調前の位相が同調後の位相と大きく異なる細胞時計では明暗条件 2 日目のトラフ時刻が前進する傾向が見られた。このことは、同一個体内の細胞時計であっても、位相が異なる場合には同調に要する期間が異なることを示している。

以上の解析より、同調過程における細胞時計の挙動は、明暗条件前の位相に依存することが明らかとなった。また、第 1 暗期前のトラフ時刻には明瞭な空間パターンはなかった (図 2.23)。このことは、個々の細胞の個体内の位置が環境刺激への応答様式に影響しないことを示唆している。このことから個体内の細胞時計は光環境変化に対して、自身の位相のみを参照して細胞自律的に応答すると考えられる。

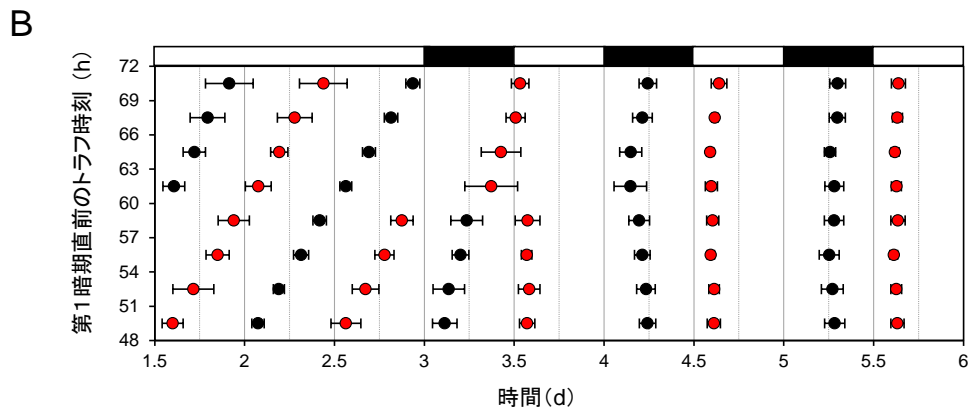
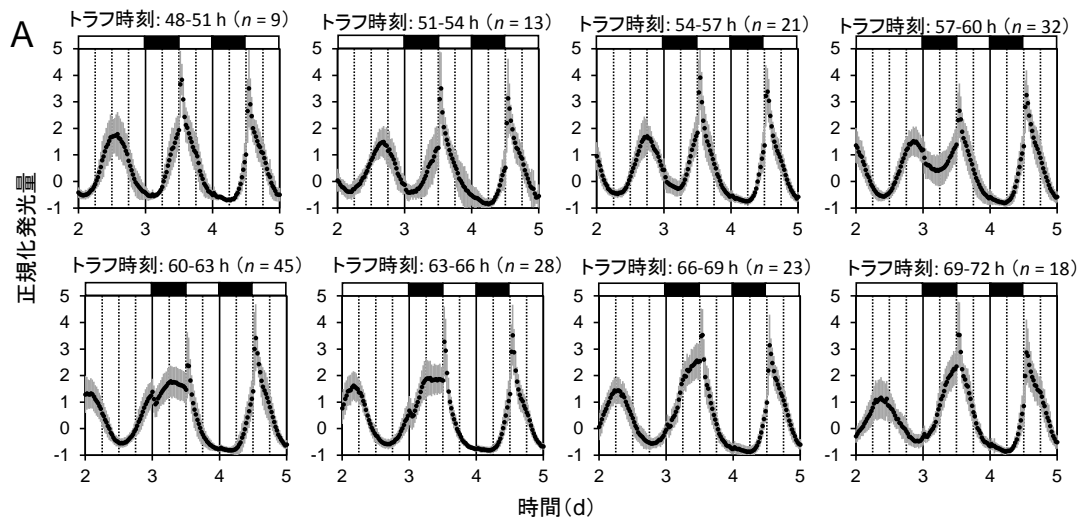


図 2.22 明暗条件への同調過程における細胞時計の挙動

(A) LLtoLD1-3 の細胞発光リズムを第 1 暗期直前のトラフ時刻により 8 グループに分類し、各グループについて正規化発光量の mean \pm SD を表示した。時系列データの正規化は、24 時間移動平均を減算することでトレンドを除去し、さらに全体の分散で割ることで行った。(B) (A) の各グループについて、ピーク時刻 (赤丸) とトラフ時刻 (黒丸) の mean \pm SD を表示。

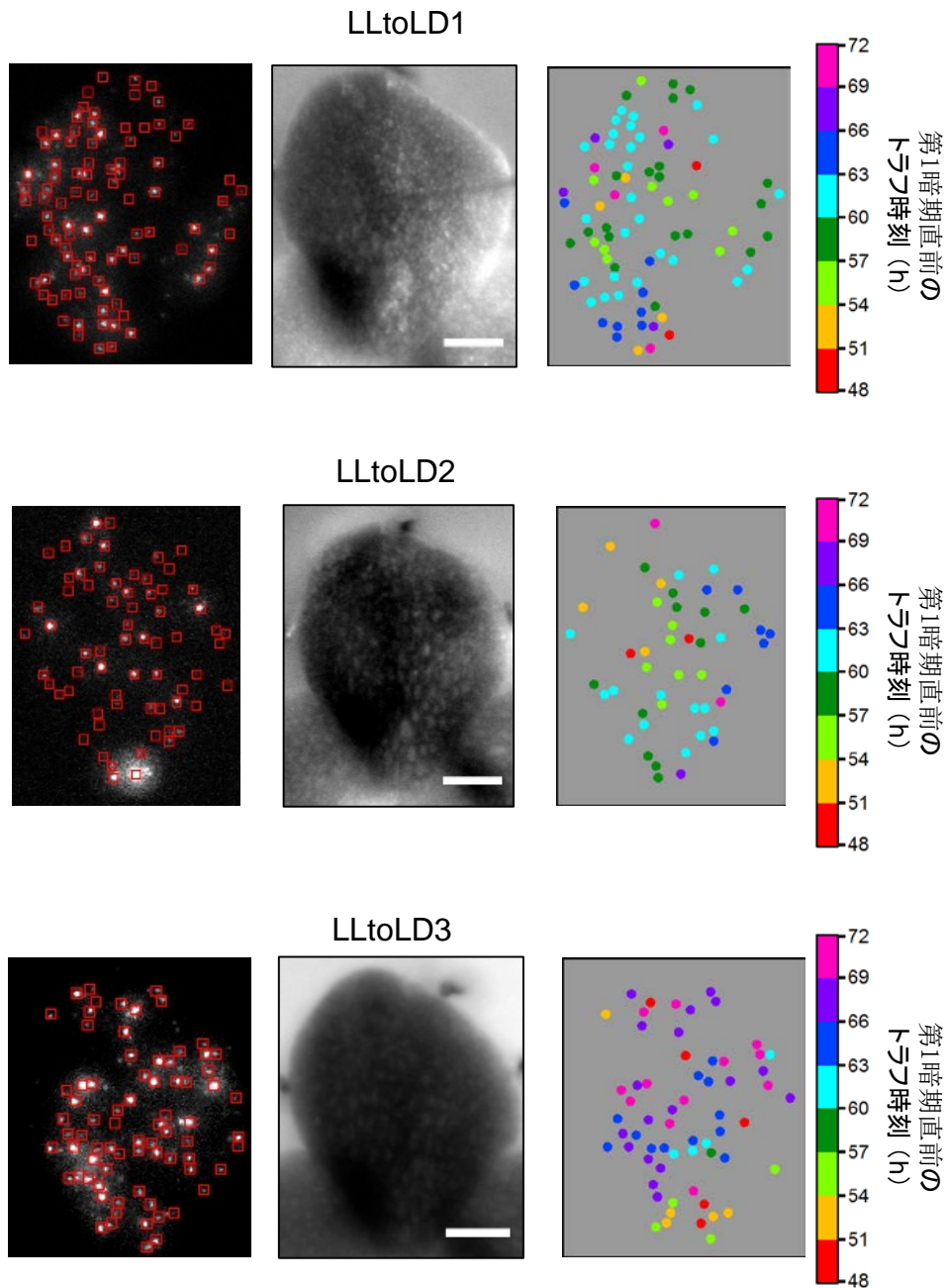


図 2.23 明暗条件への同調実験における第 1 暗期直前のトラフ時刻の分布
 LLtoLD1-3 における第 1 暗期直前のトラフ時刻の分布。明瞭な空間パターンはみられなかった。
 連続明条件下でのリズム持続細胞と判定された細胞の中で、トラフを 48-72 h の間に示したもの
 のみを表示。左から生物発光画像、明視野像、トラフ時刻のプロット。 Bars: 1mm。

明暗条件下の細胞発光リズムの固定位相は細胞によって異なる

明暗条件における細胞時計の固定位相の指標として、細胞発光リズムのピーク時刻が固定された時刻の推定を行った。まず、5日から8日の測定で取得した3回のピーク時刻の平均が細胞間で有意に異なるかを分散分析によって検定した。その結果、各実験において細胞間でピーク時刻は有意な違いを示した(LLtoLD1、 $F=9.9$ 、 $P<0.001$; LLtoLD2、 $F=4.6$ 、 $P<0.001$; LLtoLD3、 $F=6.0$ 、 $P<0.001$)。そこで3回のピーク時刻の平均を各細胞のピーク固定時刻とした。明暗条件中のピーク固定時刻が同一フロンド内の細胞間で異なるということは、細胞時計の固定位相が異なることを示唆している。しかしながら、明暗条件での *AtCCA1:LUC* のピーク時刻は夜明けに近いいため、ピーク時刻は光応答の影響を大きく受けている可能性が考えられる(図 2.21B)。そこでトラフ時刻に関しても、6日から9日の測定で取得した3回のトラフ時刻の平均が細胞間で異なるかを分散分析で検定した。その結果、各実験においてトラフ時刻は細胞間で有意な違いを示した(LLtoLD1、 $F=2.9$ 、 $P<0.001$; LLtoLD2、 $F=7.0$ 、 $P<0.001$; LLtoLD3、 $F=5.0$ 、 $P<0.001$)。そこで、ピーク時刻と同様に、3回のトラフ時刻の平均を各細胞のトラフ固定時刻とした。ピーク固定時刻とトラフ固定時刻がともに細胞時計の位相を反映しているならば、両者は相関を示すはずである。実際に、ピーク固定時刻とトラフ固定時刻は明瞭な相関を示した(図 2.24)。そのため、ピーク固定時刻とトラフ固定時刻はともに細胞時計の明暗条件中の位相を反映していると考えられた。また、ピーク固定時刻は夜明け後 1.8 h から 5.5 h に分布しており、明暗条件において、個々の細胞時計間で数時間程度の時刻差があることが示唆された。

以上の解析により、明暗条件中の細胞時計の固定位相は細胞ごとに異なることが明らかとなった。以下では、固定位相の指標としてピーク固定時刻を用いて解析を進める。また、3回の実験間において、連続明条件下での細胞発光リズムの周期が有意に異なること(ANOVA、 $F=2.4$ 、 $P=0.1$)、ピーク固定時刻が有意に異なること(Kruskal-Wallis、 $P=0.78$)から、以降の解析は3回の実験データを統合したものを使用して進める。

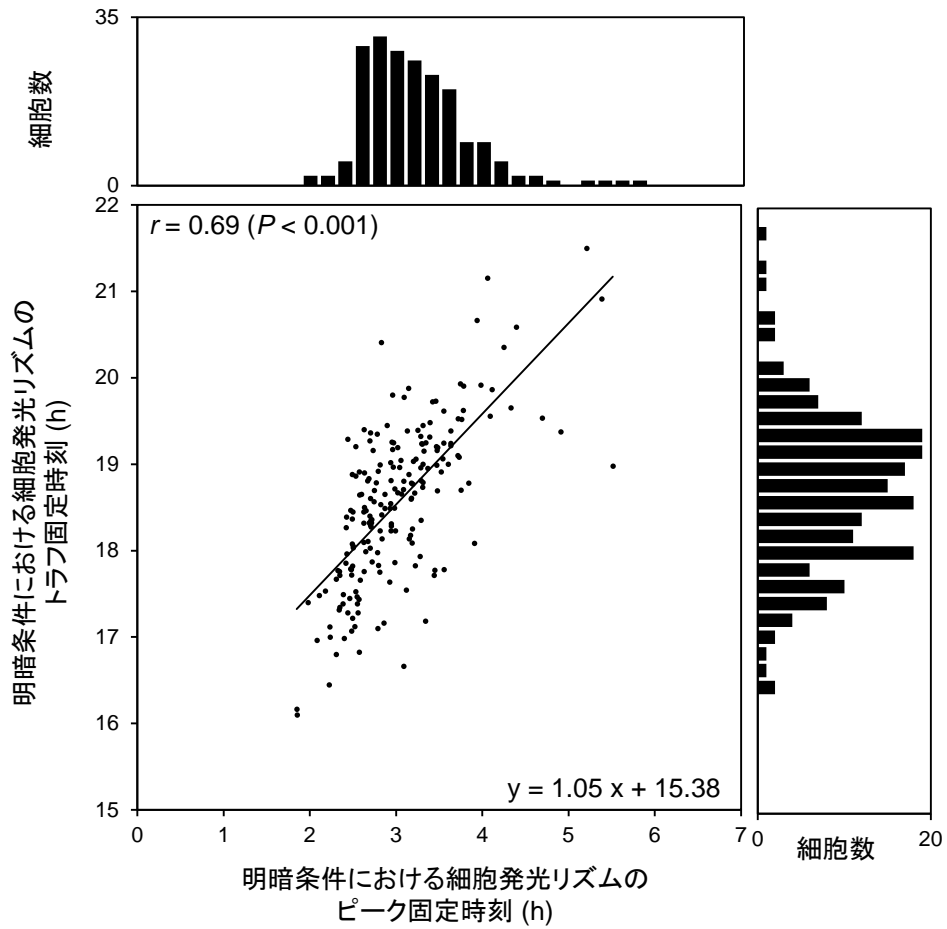


図 2.24 明暗条件下におけるピーク固定時刻とトラフ固定時刻の相関

LLtoLD1-3 の連続明条件 (0-3 日) においてリズム持続細胞と判定された時系列データを用いて解析を行った。明暗条件下におけるピーク固定時刻をトラフ固定時刻に対してプロットした。ピーク固定時刻とトラフ固定時刻はともに数時間の幅に分布しており、明瞭な相関を示した。ピークとトラフの固定時刻は夜明けを基準 (0 h) とした。回帰直線 (黒線) と式を表示。

明暗条件下のピーク固定時刻は細胞時計の周期よりも個体上の位置に依存する

細胞間で見られた明暗条件下での固定位相の差異は、細胞時計の周期の不均一性に起因するものかを検証するために、明暗条件下のピーク固定時刻と連続明条件下での細胞発光リズムの周期との相関を調べた (図 2.25)。ピーク固定時刻は細胞発光リズムの周期と正の相関を示した。このことは長周期の細胞時計の明暗条件下での固定位相が遅れることを意味しており、理論的な予測やこれまでの実験事実と合致する。そのため、個々の細胞時計の周期は明暗条件下での固定位相に影響すると考えられ、細胞間で固定位相が異なることは細胞時計の周期不均一性が要因の可能性もある。しかしながら、相関係数が 0.4 程度と相関は明瞭ではなく、別の要因の存在が示唆された。そこで、固定位相の空間構造を解析するために、ピーク固定時刻を色で表示し測定細胞の位置にプロットしたところ、明瞭な空間パターンがみられた (図 2.26)。3 回の実験 (LLtoLD1-3) において、空間パターンはよく似ており、フロンドの中心付近の細胞のピーク固定時刻が早く、外縁部ほどピーク固定時刻が遅れる傾向があった。この空間パターンの構造を解析するために空間パターンの中心を推定した。ピーク固定時刻の空間分布に楕円放物面をフィッティングし、変曲点を空間パターンの中心とした (図 2.26 に白箱として表示)。ここで推定した空間パターンの中心は、最もピーク固定時刻が早い点に対応する。推定された空間パターンは、3 回の実験に全てにおいてフロンドの中心から少し基部側に位置していた。細胞時計のピーク固定時刻はパターン中心からの距離と明瞭な相関を示した ($r = 0.76$, $P < 0.001$, 図 2.27A)。ピーク固定時刻はパターン中心からの距離にほぼ正比例しており、比例定数は約 0.6 h / mm であった。この比例定数は、個体中の位相進行波の速度と捉えることができる。連続明条件下での測定から推定された細胞時計の周期は、推定されたピーク中心からの距離とは明瞭な相関を示さなかった ($r = 0.21$, $P < 0.01$, 図 2.27B)。このことから、明暗条件への同調時における細胞時計のピーク固定時刻は、内在的な周期よりも個体上の位置に依存して決定されることが示唆された。

以上の解析から、明暗条件へ同調した個体内では、細胞時計の固定位相に空間パターンが存在することが明らかとなり、細胞時計の固定位相は周期よりも、個体上の細胞位置の大きく依存することが示唆された。このことから、細胞時計の周期不均一性は、明暗条件下での細胞時計の挙動には大きくは影響せず、不顕在化していると考えられる。

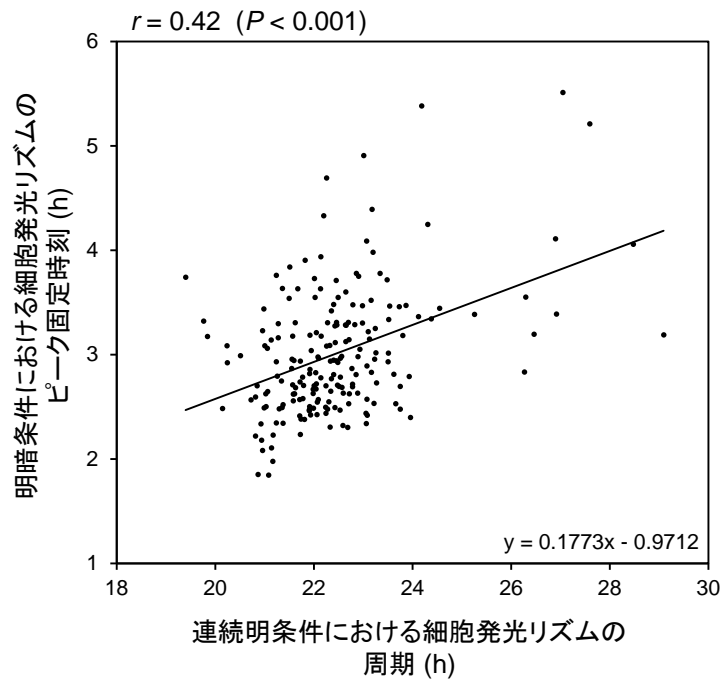


図 2.25 明暗条件下でのピーク固定時刻と連続明条件での周期との相関

概日時計の周期と、明暗条件下における固定位相には相関があることが知られている。LLtoLD1-3で取得した細胞発光リズムにおいて、連続明条件（0-3日）における発光リズムの周期をFFT-NLLS法で推定した。明暗条件（5-9日）におけるピーク固定時刻を、ピーク時刻を細胞ごとに平均することで求めた。ピークの固定時刻は連続明条件下における細胞発光リズムの周期と相関を示した。ピーク固定時刻は夜明けを基準（0 h）とした。回帰直線（黒線）と式を表示。

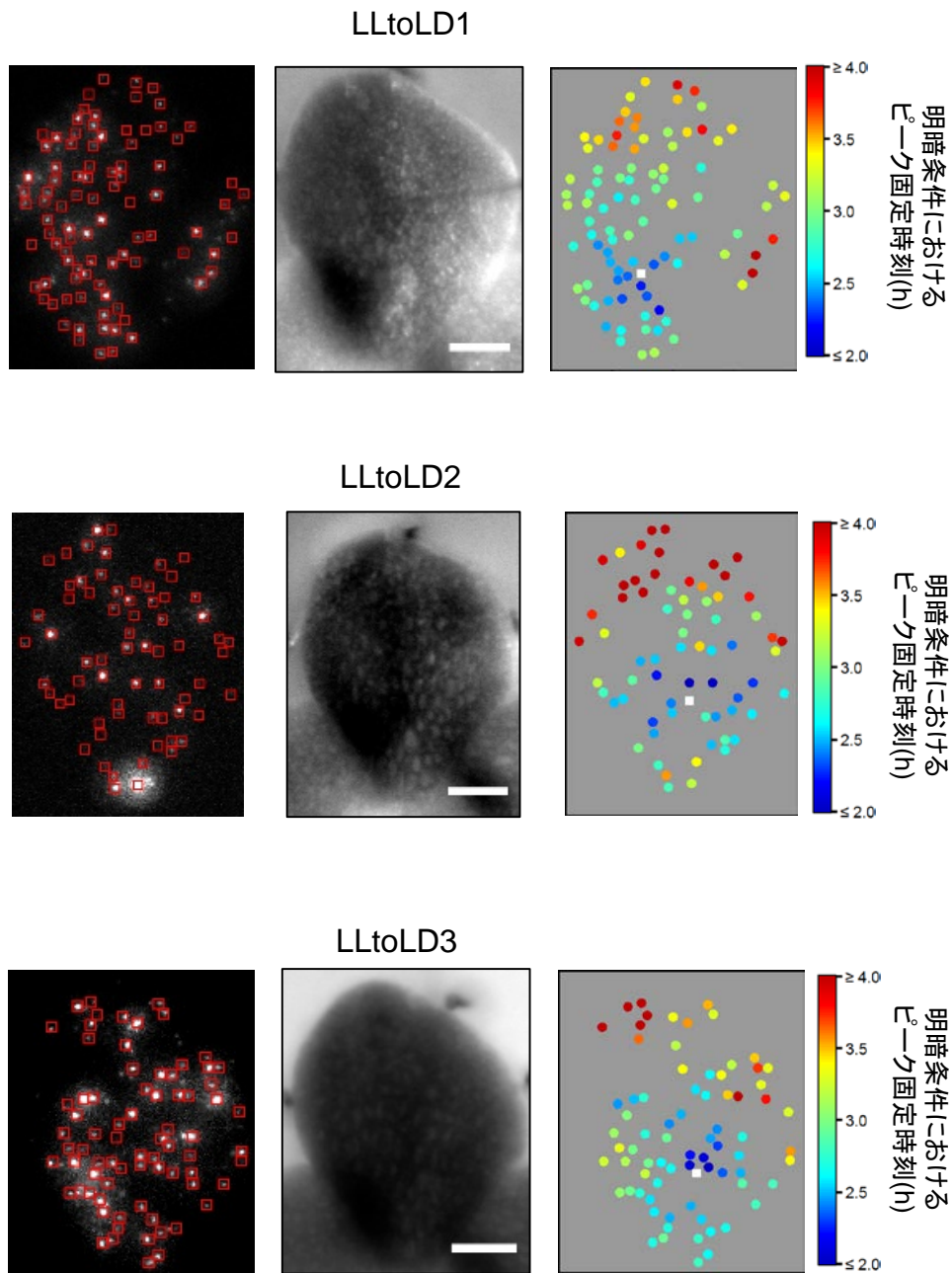
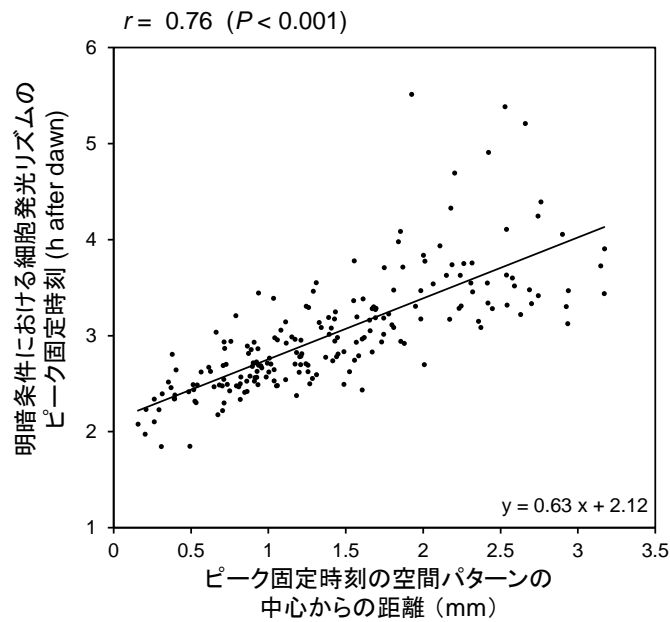


図 2.26 明暗条件下におけるピーク固定時刻の空間パターン

LLtoLD1-3 で取得した細胞発光リズムにおいて、明暗条件（5-9 日）におけるピーク時刻を細胞ごとに平均することで、各細胞のピーク固定時刻を求めた。ピーク固定時刻を色であらわし、細胞発光が観察された位置にプロットした。フロンドの中心でピークが先行するパターンがみられた。ピーク固定時刻の空間パターンに二次曲面をフィッティングすることで、その中心を求め、ピーク固定時刻プロット（右）において白箱で示した。左から生物発光画像、明視野像、ピーク固定時刻プロット。ピーク固定時刻は夜明けを基準（0 h）とした。Bar: 1mm

A



B

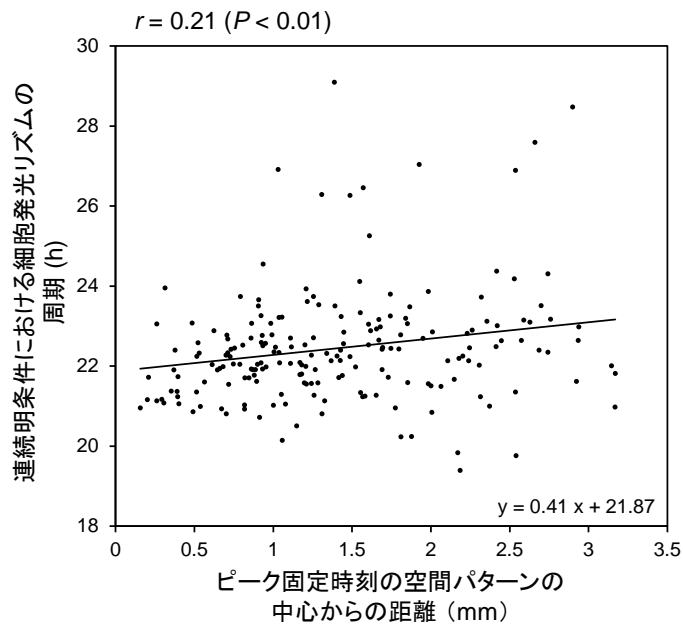


図 2.27 明暗条件におけるピーク固定時刻と連続明条件での周期の空間分布解析

LLtoLD1-3 で取得した生物発光リズムにおいて、明暗条件でみられたピーク固定時刻のパターンに二次曲面をフィッティングすることで、その中心を求めた。各細胞の空間パターンの中心と、ピーク固定時刻 (A)、連続明条件における発光リズムの周期 (B) との相関を解析した。ピーク固定時刻はパターン中心からの距離と明瞭な相関を示し、フロンド全体に空間パターンが形成されていることが示唆された。周期は相関が低く、同様の空間パターンが存在しないことが示唆された。回帰直線 (黒線) と式を表示。

固定位相の空間パターンは長期間の明暗条件下において維持される

前項までの固定位相の空間パターンの解析は、明暗条件開始後から 3 日から 6 日の間に測定した時系列データを用いて行った。そのため、観察された固定位相の空間パターンは、同調過程のみに存在する可能性がある。そこで、長期間明暗条件下で培養したイボウキクサを測定に用いることで、空間パターンの明暗条件下での持続性を検証した。さらに、明暗条件下での測定後に連続明条件へのリリース実験を行うことで、明暗条件下における細胞間での位相の違いが、概日リズムの初期位相の違いとしてあらわれるかを検証した。

1 ヶ月以上明暗条件下で培養したイボウキクサに *AtCCA1:LUC* を導入し、明暗条件下で 1 日培養した。培養後、導入効率の高いフロンドを選別し、明暗条件下で細胞発光を測定した。3 日間の測定の後、光条件を連続明条件に切り替えて測定を続けた。測定終了後、発光が分離可能だった細胞について、発光量を定量し解析を行った (図 2.28AB)。明暗条件下のピーク固定時刻を 0 日から 3 日の測定で取得した 3 回のピーク時刻の平均として求めた。その結果、ピーク固定時刻はフロンドの中心が先行する空間パターンを示した (図 2.28C)。明暗条件下で培養し続けたイボウキクサにおいてもピーク固定時刻の空間パターンが観察されたことから、空間パターンは明暗条件下で維持されると考えられる。また、連続明条件に移行した後に観察された第 2 ピークの時刻にも似た空間パターンが見られ、明暗条件下中のピーク固定時刻と有意な相関を示した (図 2.28DE)。このことは、明暗条件下で生じていた位相の空間パターンの構造が、連続明条件下での挙動に影響を与え得ることを示唆している。また、定常状態で測定されたピーク時刻は細胞時計の位相を反映していると考えられるため、明暗条件下中のピーク固定時刻が、細胞時計の位相を反映していることが確かめられた。

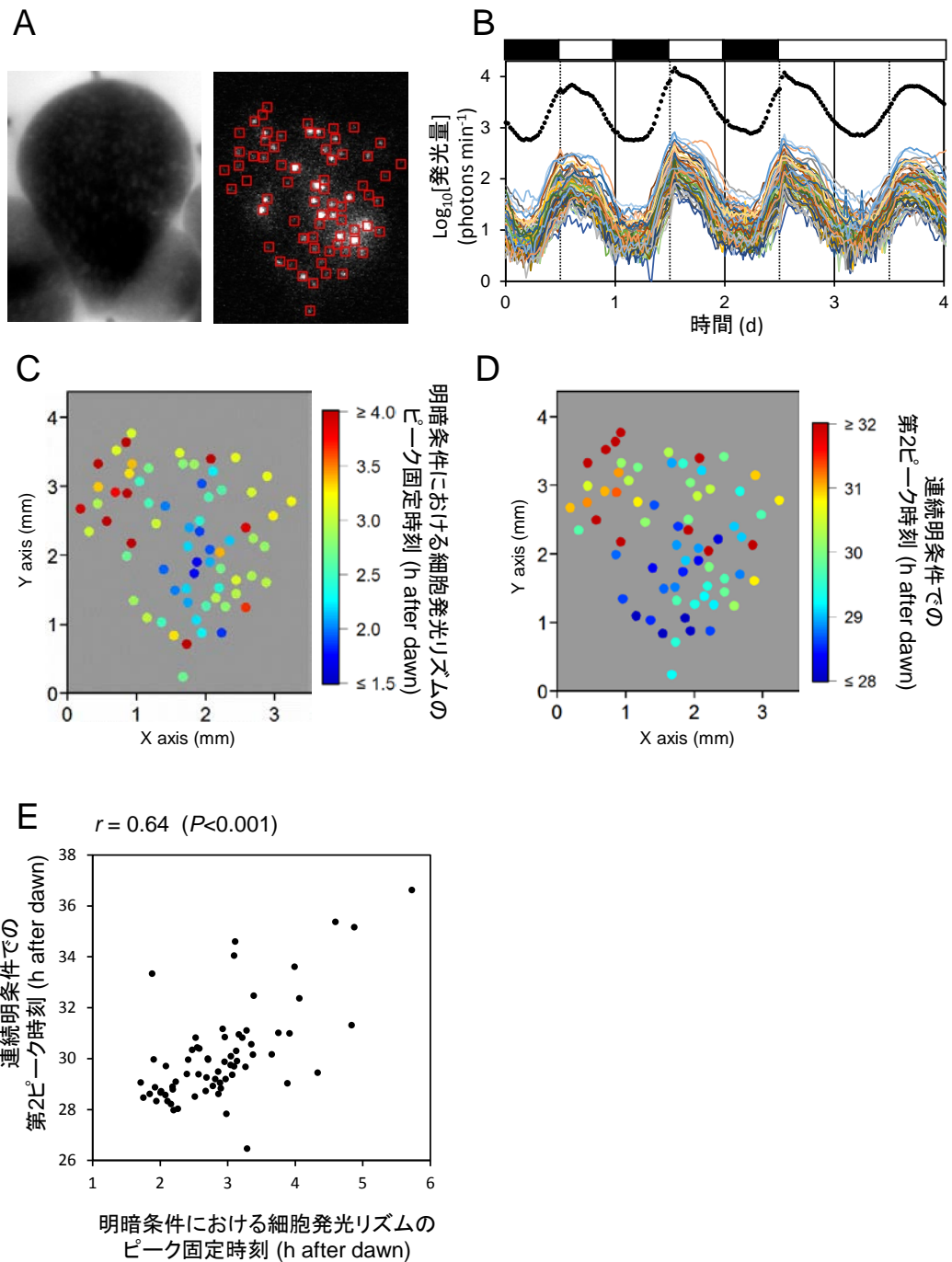


図 2.28 明暗条件からのリリース後のピーク時刻の空間パターン

明暗条件下で 1 ヶ月以上培養したイボウキクサに *AtCCA1:LUC* を導入し、12 時間暗 12 時間明条件で 24 時間培養した後、生物発光の測定を開始した。図中の白線は明期、黒線は暗期を示す。

(A) 測定したフロンドの生物発光像 (上) と明視野像 (下)。(B) 90 細胞の発光変動 (実線) と総発光量変動 (点線)。(C) 明暗条件における細胞発光リズムのピーク固定時刻のプロット。時刻を色で表示。(D) 連続明条件での第 2 ピーク時刻のプロット。時刻を色で表示。(E) 明暗条件におけるピーク固定時刻と連続明条件での第 2 ピーク時刻は相関を示す。

遅延蛍光リズムにおける位相の空間パターン

これまでの細胞発光リズムの解析では、レポーターとして *AtCCA1:LUC* を用いて時計遺伝子の発現リズムを解析してきた。そのため今回明らかとなった明暗条件下での固定位相の空間パターンが植物の生理現象に見られるかは不明である。光合成活性を反映すると考えられている遅延蛍光量に概日リズムがあることがシロイヌナズナで報告されている (Gould et al. 2009)。そこで、この遅延蛍光概日リズムを細胞発光と同様に高感度 CCD カメラで測定することで、出力系のリズムの位相にも空間パターンが存在するか検証した。まず、イボウキクサの遅延蛍光概日リズムの測定法を検討した。遅延蛍光は、消灯からの経過時間によりその由来が異なる。そこで、細胞発光リズムの測定と同じ測定条件で、照明消灯 10-20 s、20-30 s、30-60 s の 3 種の露光期間の蛍光を経時測定した。なお、撮影はレンズに取り付けた葉緑体由来の蛍光除去フィルタを取り外して行った。明暗条件で 2 日以上遅延蛍光を測定した後で、光条件を連続明条件として測定を行った。測定の結果、どの露光期間でも植物体全体からの蛍光シグナルが検出でき、30-60 s の露光期間で取得したシグナルで概日リズムがよく測定できた (図 2.29AB)。また、明暗条件では遅延蛍光は昼過ぎにトラフを示した。光合成活性は昼過ぎに最も活発になるため、今回測定した遅延蛍光は光合成活性をネガティブに反映していると考えられる。測定したフロンドを 60 程度の ROI に分割し、空間パターンの解析を行った。各 ROI の蛍光時系列データはノイズが多く、移動平均フィルタ処理後に二次関数フィッティングによりトラフ時刻を決定する必要があった。しかしながら、遅延蛍光の測定には光照射が必要であり暗期中の測定ができなため、トラフ近傍のデータ数がたりず、明暗条件における遅延蛍光リズムのトラフ時刻をフィッティングによって推定するのは困難であった。そこで連続明条件に移行直後のトラフの位置をフィッティングによって求めた。その結果、トラフ時刻はフロンドの中心部で早く、上部周辺部で遅い傾向が見られた (図 2.29CD)。この傾向は細胞発光リズムで見られた空間パターンと似ていた。フロンドの基部側でトラフ時刻が早い傾向が見られたが、この領域ではフロンド内にある娘フロンドからの遅延蛍光シグナルが加算されているため、その影響だと考えられた。遅延蛍光リズムにも空間パターンが見られたことから、明暗条件下において、概日時計からの出力系の 1 つである光合成活性の制御も細胞時計の位相の空間パターンの影響を受けていると考えられた。

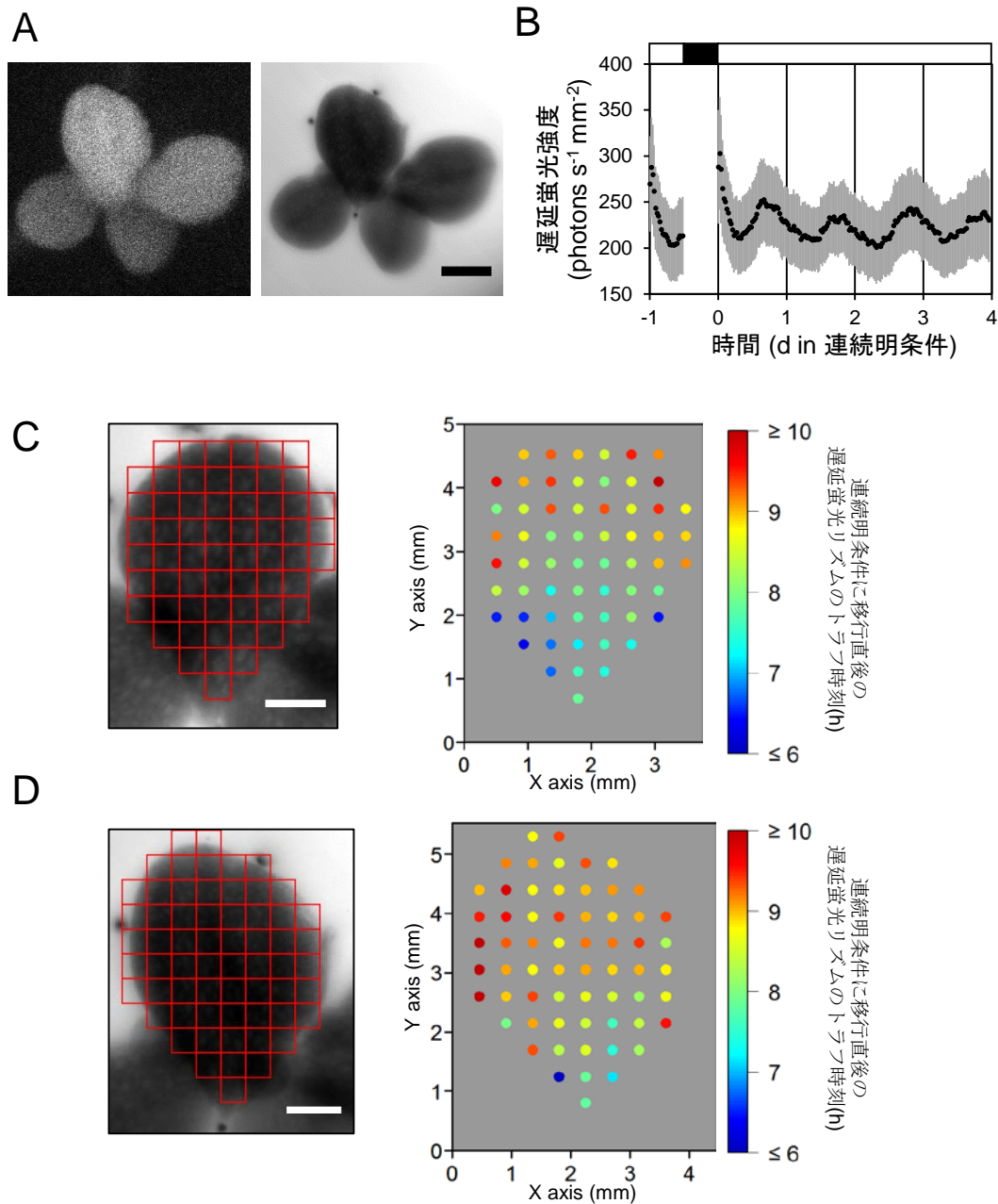


図 2.29 遅延蛍光リズムにおける空間パターン

イボウキクサのフロンドが示す遅延蛍光を測定した。図中の白横棒は明期、黒横棒は暗期を示す。
 (A) イボウキクサの遅延蛍光像 (左) と明視野像 (右)。Bar: 2 mm。(B) 遅延蛍光量の変動。暗期中は照明の照射ができないため測定できない。(C) の測定領域の mean ± SD。(C) 測定したフロンド (左)。遅延蛍光の測定領域を赤枠で示した。連続明条件に移行直後の遅延蛍光リズムのトラフ時刻のプロット (右)。時刻を色で表示。Bar: 1 mm。(D) 測定したフロンド (左)。遅延蛍光の測定領域を赤枠で示した。連続明条件に移行直後の遅延蛍光リズムのトラフ時刻のプロット (右)。時刻を色で表示。Bar: 1 mm。

考察

個体内における細胞時計の脱同期

定常状態において、個体内の細胞発光リズムには顕著な脱同期が見られた（図 2.10F、2.12F）。連続明条件においても、同期率は 0.2 程度まで減少した。シロイヌナズナの葉では同期率は連続明条件で減少するものの、0.4 よりも高く保たれることが報告されている（Fukuda et al. 2007、Wenden et al. 2012）。このような同期率の違いは実験手法の違いに起因している可能性がある。シロイヌナズナを用いた先行研究では形質転換体を使用しており、測定対象は個々の細胞の発光ではなく、上下方向の細胞発光が足しあわされた発光である。また、葉が上下運動や個体から切り離れた葉では長期間は鮮度を保てないため最大でも 5 日程度の測定しかなされていない。シロイヌナズナの葉では領域間で概日リズムの周期が異なることが報告されており、これまでの測定よりも長期間の測定では同期率が減少する可能性がある（Wenden et al. 2012）。このような実験手法の違いがある一方で、イボウキクサでは定常状態における細胞間での同期の程度がシロイヌナズナよりも低い可能性が考えられる。例えば、シロイヌナズナでの研究では葉全体にみられるスケールの移動波が観察されているが、今回の測定では同一スケールの位相移動波は検出されなかった。

イボウキクサは進化の過程で維管束組織を退化させており、成熟した個体においても明瞭な維管束組織が発達しない。シロイヌナズナで行われた部位特異的なリズム解析では、維管束組織の概日リズムが葉肉組織の概日リズムよりも安定して続くことが報告されている（Endo et al. 2014）。また、維管束特異的に概日時計を攪乱すると葉肉組織全体の概日リズムが減衰することが報告されている。ここで見られた葉肉組織全体の概日リズムの減衰が、葉肉細胞間での概日リズムの脱同期に起因するならば、維管束組織は植物個体内における細胞時計の同期において重要な役割を持つと考えられる。そのため維管束組織があまり発達しないイボウキクサでは、細胞時計の同期を保てなかった可能性がある。

気孔開閉に伴うガス交換は、気孔空隙に接する細胞全てに共通の刺激となりうるため、気孔の開閉運動も細胞間の同期を促進すると考えられる。しかしながら、イボウキクサの気孔は開閉運動を示さない（Park et al. 1990）。そのため、他の植物でみられるようなガス交換効率の概日変動はないと考えられる。このこともイボウキクサにおいて細胞時計間で脱同期が生じる要因かもしれない。

近接細胞間の相互作用で同期を維持する場合、相互作用を行う細胞数が多いほうが同期の安定度は高くなると考えられる。イボウキクサ個体の内部には大きな気室が多数存在し、気室の壁は 1 細胞層と薄い（図 0.6）。表皮近くの細胞層の厚さも数細胞程度であり、さらに、気孔空隙が多数存在する。そのため、表層付近において密集した細胞は数十細胞程度だと推測される。このように細胞の密集度が低い構造は、同期状態の安定性を低下させる可能性がある。また、表層細胞と維管束組織の間には気室があるため、現在仮定されている維管束組織を介した同期機構の影響も弱くなる構造だと考えられる。

このように、イボウキクサでは、シロイヌナズナよりも細胞時計の同期率が低くなる要素が多数ある。イボウキクサの概日リズム同期を促進する要素が少ないという性質は、個々の時計細胞の性質を解析する上では大きな利点でもある。また、維管束組織が発達し、気孔の開閉運動がみられる他のウキクサ植物では、同期率は高く維持される可能性がある。

明暗条件を経験していない植物を用いた測定における初期の高い同期率

明暗条件を一度も経験していないイボウキクサを用いた測定 (LLtoLL1-9) では、多くの実験で同期率が測定初期で約 0.5 であった (図 2.13)。明暗条件から連続明条件へのリリース実験では同期率は約 0.2 まで低下し、その後上昇しなかったことから考えると、約 0.5 は高い値に思える (図 2.10F)。しかしながら、連続明条件において同期率は徐々に減少していったので、この高い同期率は一過的であった可能性が高い (図 2.13)。

測定開始時には、植物を新しい培地の入った測定用シャーレに移しており、光源も蛍光灯から白色 LED に変化するなど、様々な環境変化が生じる。このような操作が弱い同調刺激として機能し、細胞リズムの同期率が高くなった可能性がある。

パーティクルガン法による遺伝子導入が各細胞の概日リズムの位相に影響を与える可能性もある。本研究において概日発現型発光レポーターとして用いた *AtCCA1:LUC* にはシロイヌナズナ *CCA1* 遺伝子のプロモーターを用いており、他の時計遺伝子が転写因子として結合すると考えられる。もともと核内には、1 個の遺伝子のプロモーターは 2 箇所しかない。ここにパーティクルガン法によりレポーター DNA が大量に投入されると、多くの転写因子がレポーター DNA に結合すると考えられる。その結果、一時的に遺伝子フィードバックループが攪乱され、位相が変化する可能性がある。この攪乱様式が、各細胞時計の位相をある値に近づける作用を持っていれば、レポーター導入そのものが同調刺激となると考えられる。

シロイヌナズナの根では、細胞分裂後の細胞伸長時に、細胞時計が特定の位相にリセットされることが報告されている (Fukuda et al. 2012)。今回の実験では、測定するイボウキクサの成長ステージを揃えるため、成熟した個体の中から、根の長さなどを指標に若い植物体を選んだ。そのため、本実験で測定したフロンドは成長から数日しか経過しておらず、このような発生に伴う細胞時計の位相リセットの影響を受けている可能性がある。

連続暗条件における細胞発光リズムの急速な減衰

連続暗条件において、細胞発光リズムは急速に減衰し、発光量も低下した (図 2.3)。シロイヌナズナでは、培地にショ糖が含まれていれば連続暗条件においても概日リズムが持続する。今回のイボウキクサを用いた実験ではショ糖が含まれた培地を用いたが、連続暗条件での顕著な減衰が見られた。時計遺伝子である *GIGANTEA (GI)* を欠損したシロイヌナズナでは連続暗条件において、培地にショ糖が含まれていても概日リズムが持続しな

いことが報告されている (Dalchau et al. 2011)。一方で、連続明条件では、シロイヌナズナ *GI* 欠損株の時計遺伝子の発現リズムは、短周期化するもののリズム自体は持続する (Locke et al. 2006)。イボウキクサでも *GI* のホモログが単離されているが、パーティクルガンでのエフェクタ共導入による *GI* の RNAi ノックダウンでは時計遺伝子の発現リズムが連続明条件下においても消失することが明らかとなっている (Miwa et al. 2006、Serikawa et al. 2008)。このことから、イボウキクサの *GI* はシロイヌナズナの *GI* と機能が分化していると考えられる。そのため、イボウキクサでみられた連続暗条件での減衰は *GI* 遺伝子の機能分化と関係があるかもしれない。ただし、イボウキクサは連続暗期中では成長しないため細胞の転写活性そのものが低下している可能性も大きい。

細胞時計にみられる不均一性

連続明条件における細胞発光リズムを解析した結果、個々の細胞時計の性質として「周期不均一性」と「周期不安定性」が明らかとなった。細胞時計の周期と周期不安定性には相関はなく、細胞の個体内の位置とも関係性は見られなかった (図 2.16B、図 2.17、図 2.18)。このことから、細胞時計の性質は偶発的に決定されているように見える。そのため、本研究で明らかとなった細胞時計の不均一性は、概日時計システムが積極的に作り出しているのではなく、細胞にみられるノイズに起因するものではないかと考えている。

哺乳類であるマウスの線維芽細胞や神経細胞においても、細胞間で概日リズムの周期が異なることや、周期が不安定であることが報告されている (Honma et al. 2004、Leise et al. 2012)。本研究では、分散分析モデルを用いて細胞発光リズムにおける周期不均一性と周期不安定性の大きさを、周期と周期ゆらぎの母集団の標準偏差として推定した。その結果、細胞時計の周期不均一性の標準偏差は 1.1 h、周期不安定性の標準偏差は 2.4 h と推定され、周期不安定性の大きさは、細胞間での周期不均一性の大きさよりも 2 倍以上大きかった。Leise らは同様の方法で、マウスの線維芽培養細胞が示す概日リズムを解析しており、周期不均一性の標準偏差は 0.77 h、周期不安定性の標準偏差は 1.96 h と推定している。こちらでも周期不安定性の程度は、細胞間での周期不均一性の程度よりも 2 倍以上大きかった。またどちらにおいても、周期不均一性の程度は 1 時間程度であり、植物と哺乳類間で細胞時計の性質は同じ傾向を示すことが明らかとなった。

真核生物の細胞時計が不安定である一方で、シアノバクテリアの細胞が示すリズムは極めて安定で、細胞間での周期差もほとんどないことが明らかとなっている (Mihalcescu et al. 2004、Amdaoud et al. 2007、Teng et al. 2011)。このことは、シアノバクテリアの概日時計における振動生成機構が遺伝子回路を基盤としておらず、タンパクのみで構築されていることに由来すると考えられている。遺伝子回路では、プロモーター領域が細胞内に 2 分子しかなく、発現の制御も確率的に生じる (Guerriero et al. 2012)。このような少数性に起因する確率的な攪乱は、多数の分子からなるタンパクのみで構築された系では生じないと考えられる。

原核生物の概日時計機構は細胞レベルでの挙動が正確であるため、不安定な真核生物の概日時計機構よりも優れているような印象をうけるが一概にはいえない。シアノバクテリアでは概日発現遺伝子の多くで発現タイミングが揃っていることが報告されている (Ito et al. 2009)。このことは、シアノバクテリアの概日時計機構では遺伝子ごとに発現タイミングを変えるような柔軟な制御がなされていないことを示唆している。逆にシロイヌナズナにおいては概日発現遺伝子は様々な時刻に発現ピークを示すように巧妙に制御されていることが明らかとなっている (Convington et al. 2008、Nakamichi et al. 2012)。真核生物は、このような柔軟な制御を可能とするために、遺伝子回路を用いた概日時計機構を獲得してきた可能性がある。また、遺伝子回路による振動生成においては、mRNA の核外移行やスプライシングなどの真核生物特有の機構により時間遅れが発生することが鍵となることが指摘されており、原核生物には遺伝子回路を用いた概日時計機構を獲得できない可能性もある (Dilão 2014)。

真核生物における概日時計の進化過程において、柔軟な制御が可能である遺伝子回路を基盤とする概日時計機構が選択されたと仮定すると、細胞時計の周期不均一性は遺伝子回路の少数性に起因する進化上の避けられないノイズであったと考えることができる。しかしながら周期不安定性については、高い不安定性が進化上選択される可能性が指摘されている。数理モデルによる研究では、個々の細胞の周期に不均一性がある場合、周期に不安定性があったほうが細胞全体を同期させることが容易になることが示されている (Rougemont 2006)。このことは、周期に不均一性がある場合には、周期が不安定化するような選択圧が生じる可能性を示唆している。また、不安定な時計のほうが同調できる周期の範囲が広く同調に要する速度が早いことも明らかとなっている (Webb et al. 2012)。

植物と哺乳類では概日時計遺伝子の起源が全く異なる。また、哺乳類では神経系が概日時計の中核として機能するのに対して、植物には神経系はなく概日時計は分散システムとして働く。このような大きな差異にも関わらず植物と動物で細胞時計の挙動に見られる基本的な性質は驚くほど似通っていた。このことは、上記で考察した真核生物における概日時計機構の進化プロセスが、哺乳類・植物の垣根を超えて細胞時計という素子の設計原理を決定している可能性を示唆しているのかもしれない。

細胞時計における周期不均一性の起源

前述したように、タンパクを基盤とした概日時計機構を持つシアノバクテリアでは細胞間での周期の不均一性は殆ど見られない (Mihalcescu et al. 2004、Amdaoud et al. 2007、Teng et al. 2011)。そのため、真核生物にみられる細胞時計間の周期不均一性は遺伝子回路が要因の1つと考えられる。しかしながら、周期不均一性が生じる具体的な機構は、いまだ明らかとなっていない。数理モデルによる研究では、同じ遺伝子回路であっても、発現するタンパク量が多いほうが概日リズムは短周期化することが示されている (Gonze et al. 2002)。第1章では、個々の細胞の遺伝子発現量は対数スケールで異なることが示唆された

ため、細胞間の遺伝子発現活性の違いにより分子数が異なることが周期不均一性の起源である可能性は十分考えられる。しかしながら、細胞発光リズムの周期は、遺伝子発現活性をある程度反映していると考えられる発光量と相関を示さなかった（図 2.17）。また、発現タンパク量が少ない場合は、周期の不安定性が高くなることが予想されているが、今回の解析では周期と周期の不安定性には相関が見られなかった。そのため、今回観察された周期の不均一性の起源として、発現タンパク量以外の要素を検討する必要があるだろう。

さらなる解析を進めるには、細胞発光リズムを測定した細胞について、様々な情報を得る技術を新たに開発する必要がある。例えば、発光レポーターと共に蛍光レポーターを用いたバイオセンサーを共導入することで、代謝産物量やエネルギー量や細胞サイズなどを測定することができると考えられる。このような技術を利用することで、植物・動物などの生物種を問わず大きな謎として残されている、細胞間における概日リズムの周期不均一性の起源を解明する糸口がつかめるかもしれない。

脱同期状態の植物は問題なく生育する

本研究により連続明条件下のイボウキクサでは、個体内の細胞時計は脱同期していることが明らかとなった。このことは個々の細胞が勝手な日内スケジュールで生命活動を行っていること意味しており、細胞間での代謝産物の変動が同期しないなど、多くの不都合が生じるように思われる。しかしながら、連続明条件においてイボウキクサは問題なく生育する。脱同期状態においても正常に生育できる理由を解明することは、植物を多細胞生物、個々の細胞が協調して生命活動を行う生物、として捉える上で重要だと考えている。

連続明条件では、0.5 mm よりも小さい領域では、位相の近い細胞集団が存在することが示唆された（図 2.15）。植物細胞はプロトプラスト化しても、適した環境におかれると問題なく生育する。このように植物細胞は独立性が高いため、近傍細胞とだけ代謝産物の変動が一致していれば大きな問題は生じないのかもしれない。また、この考えを進めれば、連続明条件のイボウキクサは個体として統合されていないと捉えることもできる。神経系を持たず個体サイズや形態に大きな多様性を持つ植物にとって、全身を完全に統合するのは大きな困難を伴うように思える。そのため、近傍細胞とだけ生命活動を統合するという分散処理型の機構が進化上選択されてきたのかもしれない。

また、遺伝子回路の構成物である転写・翻訳物は細胞間を拡散しないが、概日時計の制御対象である代謝物は原形質連絡や細胞間隙を介して細胞間を拡散する。そのため、代謝物は近傍細胞間で拡散することにより細胞間で平均化される可能性がある。その場合、代謝変動の概日リズムは、遺伝子発現の概日リズムよりも同期する領域が大きく、振幅が低いリズムになると予想される。今後の研究では、細胞レベルで遺伝子の転写活性の変化だけでなく、制御対象である代謝物の変動も合わせて解析することが脱同期状態の植物を理解する上で重要だと考えられる。

個体内の細胞は、定常条件において独立した概日時計として振る舞う

連続明条件において個体全体での脱同期状態が観察されたが、近傍細胞では位相が揃う傾向が見られた(図 2.15)。このことは、近傍細胞間において細胞間相互作用による概日リズムの同期が生じることを示唆している。しかしながら、位相が揃った細胞集団は最大でも 0.5 mm 程度の領域に限定的にしか存在しなかった。このことから、細胞間での相互作用は存在するとしても、周期の不均一性や不安定性を抑えこむほどは強くないと考えられる。

細胞時計間での相互作用を考慮せず、周期不均一性・不安定性のみを考慮した統計モデルにより、細胞時計の集団的挙動をかなりの程度を説明することが出来た(決定係数 0.73、図 2.19)。このことは、脱同期状態にある個体内の細胞時計は、固有の周期を持つ個々の概日振動体だと捉えることができること示している。また、連続明条件中の細胞時計の挙動を理解するには、周期の不安定性が無視できない要因であることも示すことができた。

連続明条件で脱同期状態にある概日リズムが明暗条件へ同調していく過程を解析した結果、個体内の細胞時計は自身の位相を参照して自律的に外環境へと応答することが明らかとなった(図 2.22)。応答様式は、細胞の位置によらず、位相のみに依存していた(図 2.23)。

以上のことから、個体内の細胞時計は、連続明条件においては、固有の周期で振動し、外環境からの刺激に自律的に応答する、独立した概日時計として振る舞うと考えられる。

植物個体内における細胞時計間の相互作用様式

連続明条件での脱同期状態における位相が揃った細胞集団領域のサイズは 0.5 mm 程度であったのに対して、概日リズムの周期がある程度一致した細胞集団領域のサイズは 0.2 mm 程度と小さかった(図 2.15、図 2.16)。このことは、近傍細胞における小さい位相差が長期間は維持されないことを示唆している(図 2.7)。一方で、近傍細胞で位相差が小さい傾向は測定期間を通して見られたため、位相が揃った細胞集団はフロンド内に一定量は存在していると考えられる。これは「うなり」に細胞間相互作用が働いたことが一因と考えられる。「うなり」は周期が異なる細胞間において位相差が周期的に変化する現象であるが、細胞間を同期させるような相互作用は周期的に訪れる位相差が小さい期間を延長する効果を持つと予想される。その場合、近傍細胞間で脱同期はしているが、位相が揃っている期間が相対的に長いという結果となり、今回観察された状況が形成されることが考えられる。実際の個体では、多数の細胞時計による複雑な「うなり」が生じており、どの領域の細胞間で位相差が一時的に小さくなるかは簡単に決定されない。そのため、脱同期状態における位相の空間分布は複雑な変化を見せたと考えられる(図 2.14)。

明暗条件では細胞時計のピーク固定時刻に空間的なパターンが見られたが、このパターンは連続的であり、細胞間相互作用が形成に関与する可能性がある(図 2.26、図 2.27A)。明暗条件では各細胞時計の周期は 24 時間にセットされるが、周期不均一性に応じて細胞間で数時間程度のピーク固定時刻の不均一性が生じると予想される。このような近傍細胞間

における数時間のピーク時刻差を是正するには、細胞間相互作用は十分大きいのかもしれない。植物概日時計システムにおける細胞間相互作用の本来の役割が、細胞時計が細胞自律的に明暗条件へ同調した際に生じるピーク固定時刻の不均一性を是正することだと考えると、連続明条件という不自然な状況において脱同期が生じるのは不思議ではない。この場合、明暗条件における周期的な光シグナルは、時間情報の入力としての役割だけでなく、個々の細胞時計の周期を 24 時間にセットすることで、細胞間相互作用が個体内の細胞時計を統合できる状況を作り出す役割を持つと考えられる。

本研究では、細胞間相互作用が関与すると期待できる現象を捉えることに成功したが、その具体的な機構は明らかに出来なかった。相互作用の分子機構に関する知見は多くないが、最近、ショ糖が概日時計の位相に影響を与えることが明らかとなった (Haydon et al. 2013)。このことは、ある細胞時計の出力結果であるショ糖が変動する場合、原形質連絡などを介してその変動が伝達され、他の細胞時計の入力として作用することを意味している。ショ糖に限らず、ある代謝物が、概日時計の出力結果として変動し、さらに概日時計の入力にもなる場合、その代謝物は細胞間相互作用の分子的な実体になり得ると考えられる。そのような代謝物の変動を加味したモデルを構築した上で、今回観察された現象の解析を進めることが相互作用の分子機構に迫る上で重要だと考えられる。

明暗条件における周期不均一性の不顕在化

連続明条件での解析では、個体内における細胞時計の独立性の高さが明らかとなった。明暗条件においても、細胞時計の独立性が高いのかを検証するために、細胞時計の周期が明暗条件への同調時の位相に反映されるかを解析した。その結果、明暗条件下でのピーク固定時刻と、明暗条件移行前の連続明条件における概日リズムの周期には有意な相関が見られた (図 2.25)。このことは、これまでの個体レベルでの解析で明らかとなっていた概日時計の周期と明暗条件下での固定位相との関連が、細胞時計においても同様であることを示唆しており、連続明条件での解析によって明らかとなった細胞時計における遺伝背景の違いを起源としない周期不均一性は、明暗条件下でも消失しないことを示唆している。一方で、ピーク固定時刻と細胞時計の周期には相関が見られたものの、その関係は明瞭ではなく、ピーク固定時刻はむしろ明瞭な空間パターンを形成していることが明らかとなった (図 2.26、図 2.27A)。明暗条件へ移行前の連続明条件下での測定から推定された細胞時計の周期にはそのような空間パターンが見られなかったことから (図 2.27B)、明暗条件における細胞時計のピーク固定時刻は、細胞時計の周期よりも、細胞が個体上のどこにいるかにより強く依存するが明らかとなった。これらを合わせて考えると、明暗条件下においても細胞時計の周期不均一性は依然として存在するが、この不均一性は明暗条件での細胞時計の挙動には大きく影響せず、不顕在化していると結論づけることができる。連続明条件では独立性の高かった細胞時計は、明暗条件では、周期不均一性の影響を受けず連続的な空間パターンを形成するという意味において独立性が低くなることが明らかとなった。

明暗条件で生じるピーク時刻の空間パターン

今回明暗条件で観察された空間パターンでは、フロンドの中心から外縁まで 2 時間程度の時刻ずれがみられた (図 2.26、図 2.27A、図 2.29)。このような空間パターンが生じる機構は残念ながら不明であるが、細胞時計間で固定位相が異なるということは細胞時計間で光刺激による位相の変化様式が異なることを意味しており、この違いが何に起因するかを解析することがパターン形成機構の理解において重要だろう。現在は、フロンドの内と外で細胞時計の性質や周辺環境が異なる可能性を検討しており、具体的には、細胞時計への入力系の挙動が異なる、分裂組織や根などの植物体の構造からの影響を強く受ける、転流のような方向性のある代謝物の流れが個体内に存在する、などを想定している。これまで行われてきた植物における細胞レベルでの概日リズム解析は、観測される現象の複雑性から現象の記述に追われていたが、今回見出した空間パターンは大変単純であり再現性よく観察できるため、今後はこれらの可能性に対して実証的な解析が可能になると考えている。植物体の切断や局所的な光照射を行うことで空間パターンに摂動を与え、パターン構造の変化を解析することで、個体内中の細胞時計の挙動に影響を与える要素について多くの知見を得ることができるだろう。

観察された空間パターンには個体内における 2 時間の時刻差が内包されていたが、その意義についても今後検討していく必要がある。外環境変動への同調という観点からは、個体内の時刻差は不必要に思われる。しかしながら現在、光周性における日長測定において時刻差の持つ利便性を検討している。植物が野外において日長測定を行う際には、多量のノイズを含んだ環境変動から日出と日没を認識する必要がある。この際、細胞時計が一律な環境応答を示す場合、あるノイズにより個体内の細胞全てが誤認識を起こす可能性が考えられる。逆に、細胞時計の環境応答性がある程度の幅を持つ場合、あるノイズにより誤認識を起こす細胞は個体内の一部に留まると考えられる。このように、個体内における細胞時計間の時刻差は、ノイズ存在下での日長測定の安定性を向上させる可能性があると考えている。この仮説の検証には数理モデル解析と実験の双方を進める必要があるが、もし空間パターンにおける時刻差に上記の利便性が認められた場合、細胞時計は空間パターンの形成により個体レベルの機能を創発し得ることを意味し、植物概日時計の多細胞系としての新たな側面を明らかにできると考えている。

また、個体内の空間パターンに意義が存在するならば、他の植物においても空間パターンが形成されるはずである。そのため、植物における明暗条件下での空間パターンの普遍性を検証していく必要がある。今回イボウキクサで観察された空間パターンでは、ピーク固定時刻はフロンドの内から外へ線形に増加したが、この構造はフロンドサイズが大きくなるほど時刻ずれが拡大するため、個体サイズが変化すると空間パターンの構造が変化することが想定される。パーティクルガン法によるレポーター導入は対象植物を選ばないため、今後ウキクサ植物に限らず解析を進めることで、植物における空間パターンの共通性や多様性を明らかにできると考えられる。

材料と方法

植物と培養条件

実験に用いたイボウキクサ (*Lemna gibba*) p8L 株は、イボウキクサ G3 株の純系株である。所属研究室で自殖を 8 回行うことで樹立された。実験に用いたイボウキクサは基本的に連続明条件において 1% ショ糖を含む NF 培地で培養したものである。NF 培地に関しては第 3 章で詳しく述べる。200 mL フラスコに 60 mL の培地を入れて綿栓とアルミホイルで蓋をしたものを用いて無菌状態で培養を行った。実験前に明暗条件で培養と記す場合、1 ヶ月以上明暗条件で培養したものを使用した。培養室の条件は第 1 章と同じである。

発光レポーターコンストラクト

概日発現型発光レポーターとして用いた *pUC-AtCCA1:LUC+* (*AtCCA1:LUC*) は第 1 章で用いたものと同じである。

パーティクルガンによる発光レポーター導入

第 1 章とほぼ同じ手順でレポーター導入を行った。変更点として、導入に用いる DNA 量を 2 μg とし、450 psi のラプチャーディスクを導入時に使用した。レポーター導入は 60 mm シャーレに並べたイボウキクサに対して行った。

細胞発光自動測定システム

細胞発光測定システムは、第 1 章で構築した測定系にサンプルを載せる回転台を追加するなどの改良を施したものを用いた。回転台は市販の回転モータ (中央精機、ARS-6306-GM) にアルミニウム製の円盤を取り付けることで作成し、モータ用コントローラ (中央精機、QT-ADM3) を介してコンピュータ上のソフトウェア (HOKAWO、浜松ホトニクス) により自動制御した。生物発光の測定は 30 分に 1 回、200 秒もしくは 240 秒の露光時間で行った。葉緑体由来の遅延蛍光の減衰を待つために、露光は消灯後に 60 秒以上待った後で行った。生物発光測定に要する消灯は露光時間によらず 5 分とした。植物用の照明は光ファイバ付き白色 LED 光源 (PFB2-20SW CCS) を用い、植物体上部から 30 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の白色光を照射した。測定終了後の生物発光の定量は ImageJ を用い、第 1 章と同様の方法で行った。

遅延蛍光の測定法

遅延蛍光の測定は、レンズに取り付けてある自家蛍光除去フィルタを外した以外は、基本的に細胞発光測定と同様に行った。測定植物を設置した回転台は光ファイバ下の位置か

らカメラ下の位置へ移動するのに 10 秒程度かかるため、照明を消灯後の 10-20 秒、20-30 秒、30-60 秒間について遅延蛍光を測定した。このうち明瞭な概日リズムが観察できた 30-60 秒間の遅延蛍光データを解析に用いた。

ピーク/トラフ抽出

細胞発光リズムにおけるピークとトラフは、局所的に二次関数をフィッティングすることで推定した。まず 8 時間の移動平均フィルタ処理をした時系列データから極大値と極小値をとる時刻を探索し、ピークとトラフのおおよその時刻を推定した。次に、推定された時刻をもとに局所的な二次関数フィッティングを行い、ピークとトラフの詳細な時刻を推定した。局所フィッティングは 2 時間移動平均フィルタ処理をした時系列データに対して行った。フィッティングを行う領域幅は 6 時間とした。

細胞発光リズムの定量解析

抽出したピークとトラフから位相 $\theta(t)$ と振幅 $A(t)$ を以下の要領で求めた。

位相 $\theta(t)$ は、ピークからピークの間を 0 から 2π まで単調に増加する変数として定義した (図 2.3)。実際の計算式は以下の通りである。

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

ここで、 t_p^k は k 番目のピーク時刻である。

振幅 $A(t)$ は、細胞間での発光量が大きく異なるため、相対振幅を採用した。すなわち、ピーク発光量とトラフ発光量の差を、ピーク発光量とトラフ発光量の平均で割ったものを計算し振幅とした。また、各時刻における振幅を求めるためにピーク包絡線 $U(t)$ と、トラフ包絡線 $L(t)$ を求め、そこから相対振幅を計算した。包絡線は、ピーク間、トラフ間を線形につないだものを採用した。実際の計算式は以下のとおりである。

$$A(t) = \frac{U(t) - L(t)}{U(t) + L(t)}$$

$$U(t) = \begin{cases} x_p^1, & t < t_p^1 \\ \frac{x_p^{k+1} - x_p^k}{t_p^{k+1} - t_p^k} t + \frac{x_p^k t_p^{k+1} - x_p^{k+1} t_p^k}{t_p^{k+1} - t_p^k}, & k = 1 \dots N_p, \quad t_p^k \leq t < t_p^{k+1} \\ x_p^{N_p}, & t_p^{N_p} \leq t \end{cases}$$

$$L(t) = \begin{cases} x_T^1, & t < t_T^1 \\ \frac{x_T^{k+1} - x_T^k}{t_T^{k+1} - t_T^k} t + \frac{x_T^k t_T^{k+1} - x_T^{k+1} t_T^k}{t_T^{k+1} - t_T^k}, & k = 1 \dots N_T \quad t_T^k \leq t < t_T^{k+1} \\ x_T^{N_T}, & t_T^{N_T} \leq t \end{cases}$$

ここで、 t_p^k と t_T^k は k 番目のピーク時刻と k 番目のトラフ時刻を、 x_p^k と x_T^k は k 番目のピーク発光量と k 番目のトラフ発光量を、 N_p と N_T はピークの総数とトラフの総数を、 $U(t)$ と $L(t)$ はピーク包絡線とトラフ包絡線をそれぞれあらわす。

Fast Fourier transform–nonlinear least squares (FFT-NLLS) 法

FFT-NLLS 法は、コサイン線形和でリズムデータをフィッティングすることで、その周期を推定する手法である。本研究用に FFT-NLLS 法を実行する R スクリプトを作成した。以下に FFT-NLLS 法の原理を解説する。

FFT-NLLS 法では、まず高速フーリエ変換 (FFT) によりリズムデータの周波数スペクトルを計算し、そこから主要周波数を決定する。決定された主要周波数をもとに、コサイン関数の線形和を作成し、リズムデータへ非線形最小二乗法 (NLLS) でフィッティングする。この際、フィッティング対象となるパラメータは各周波数成分につき振幅、周期、初期位相の 3 つである。NLLS 法ではフィッティングにより推定されたパラメータについて信頼区間を求めることができる。そのため、各周波数成分について、推定振幅の 95%信頼区間の幅を求め、その幅の半分を推定振幅で割ることで、振幅推定の有意度を正規化して見積もることができる。この推定有意度は **Relative Amplitude Error (RAE)** と呼ばれ、原理的に 0 から 1 の値をとり、推定された振幅の有意度が低いほど値が大きくなる。そこで、FFT-NLLS 法では、RAE が最も小さい周波数成分の振幅、周期、初期位相をリズムデータの解析結果とする。この RAE はリズムデータにおける振幅の明瞭さを反映しており、目視でのリズムの確からしさと良い相関を持つことが経験的に知られている。

リズム持続細胞の抽出

まず FFT-NLLS 法を行い、RAE が 0.15 以下の時系列データ、RAE とは無関係に常に振幅が 0.3 以上であった時系列データを抽出し、1 つのグループにまとめる。このグループの中から FFT-NLLS 法で推定した周期とピーク間隔の平均の差が 2.5 時間以上であったものを除く。これはピーク抽出を失敗している時系列データを除く操作である。残った細胞をリズム持続細胞とした。リズム持続細胞は、解析区間中において全てのピークが正しく識別されている細胞のことであり、位相や振幅を用いた解析に使用する細胞のことを指す。

同期率の計算

細胞時計集団の同期率 R はピーク時刻から求めた位相 θ をもとに以下の式で算出した (図 2.5)。

$$R \exp(i\Phi) = 1/N \sum_j \exp(i\theta_j)$$

ここで、 N は細胞の総数。 θ_j は j 細胞の位相、 Φ は細胞平均位相を表す。

解析アルゴリズムの実装・統計解析

全て R 言語 (ver. 3.1.1) によって行った。

第3章

様々なウキクサ植物における概日リズムの解析

導入

第2章では、イボウキクサを材料に、個体内において細胞が示す概日リズムの解析を行った。連続明条件では個々の細胞は独立した細胞時計ように振る舞うこと、明暗条件下では個体内にピーク時刻の空間パターンが生じることが明らかとなった。シロイヌナズナでは、維管束組織が近傍の組織の概日リズムに影響をあたえることが指摘されている (Fukuda et al. 2007、Endo et al. 2014)。そのため、個体中の維管束組織の構造が、明暗条件における空間パターンの構造に影響を与える可能性が考えられる。イボウキクサが属する *Lemna* 属の植物には葉脈状の構造が見られるものの維管束組織はあまり発達していない。しかしながら、ウキクサ植物には、*Spirodela* 属や *Landoltia* 属など、維管束組織が発達する一群や、逆に、葉脈状の構造や根も持たない *Wolffia* 属のような一群が存在する (Landolt 1986)。つまり、ウキクサ植物は維管束組織の発達度に大きな多様性をもつ植物群だといえる。また、*Spirodela* 属はフロンド径が 1 cm を超えるが、*Wolffia* 属はフロンド径が 1 mm に満たないなど、個体サイズにも大きな多様性がみられる (図 0.6)。そのためウキクサ植物全般を材料として細胞リズムの解析ができれば、維管束組織や個体サイズなど植物体の構造が個々の細胞時計の挙動にどのような影響を与えるかを検討する上でよいモデルになると期待できる。

のみならず、ウキクサ植物は概日時計の多様性解析の材料として魅力的な要素を持っている。シロイヌナズナを用いた実験では、概日時計の周期は外環境の周期と一致している場合、生産量が向上し適応的であることが報告されている (Dodd et al. 2005)。1日の長さは地球上どこでも 24 時間であるので、自然条件で生育するシロイヌナズナの概日時計の周期は淘汰により 24 時間へと収束するように思われる。しかしながら、野外に生育するシロイヌナズナにおいて、概日時計の周期に幅広い自然多型が存在することが報告されている (Michael et al. 2003)。このような周期多様性は植物の概日時計研究において興味深い問題であるが、概日時計の多型解析はどの植物種においても進んでいないのが現状である。これは概日時計の振動が複雑なフィードバックループによって生成されていることに起因すると考えられる (Jolma et al. 2010)。概日リズムの性質は様々な時計遺伝子の様々な変異により変化してしまうため、概日時計機構の自然多型を解析するには複数の時計遺伝子の発現変動パターンを網羅的に測定する必要がある (Michael et al. 2003)。また、概日リズムの解析には高時間分解能での測定が必要となる。これまで述べてきた通り、発光レポーターは非侵襲的に高時間分解能での測定が可能である。しかしながら形質転換体の作出は

煩雑であり、多様性解析のような多検体での測定においては現実的ではない。本研究で用いたパーティクルガンによる簡便な発光レポーター導入は、対象植物種を限定せず、前処理もとくに必要としないため、多様性解析において強力なツールとなると考えられる。また、ウキクサ植物は小型であるため、ハイスループットな生物発光自動測定装置を組み合わせることで多検体での測定が容易である。さらに、ウキクサ植物は少ない種数が世界各地に分布しているため、概日時計の適応進化を考える上でも良いモデルになると期待できる (Landolt 1986)。

これまで、パーティクルガンによる発光レポーターの導入は *Lemna* 属のイボウキクサ (*L. gibba*) とアオウキクサ (*L. aequinoctialis*) でしか試みられてこなかった。そこで、本章では、他の属のウキクサ植物においてもパーティクルガン法による発光レポーターの導入による概日リズム測定が可能かを検証し、各ウキクサ植物が示す概日リズムの性質を解析した。

結果

測定条件の検討

パーティクルガンによる発光レポーター導入は、原理の単純さから様々な植物に利用可能である。この特性を利用してウキクサ植物における概日リズムの多様性の解析を試みた。ウキクサ植物内の多様性を幅広く捉えるために所属研究室で維持されていたウキクサ植物の中から、4属に属するイボウキクサ (*Lemna gibba*)、アオウキクサ (*L. aequinoctialis*)、ヒメウキクサ (*Landoltia punctata*)、ウキクサ (*Spirodela polyrhiza*)、ミジンコウキクサの1種 (*Wolffia columbiana*) の5種を選び、実験に用いることとした。ミジンコウキクサ以外は、各種2株を実験に用いて合計9株のウキクサ植物で概日リズムの測定を行い、その性質の比較を試みた (図 3.1)。これらのウキクサ植物は種ごとに培養培地が異なるために、まず、培地の違いが概日リズムの性質に影響するかを検証した。

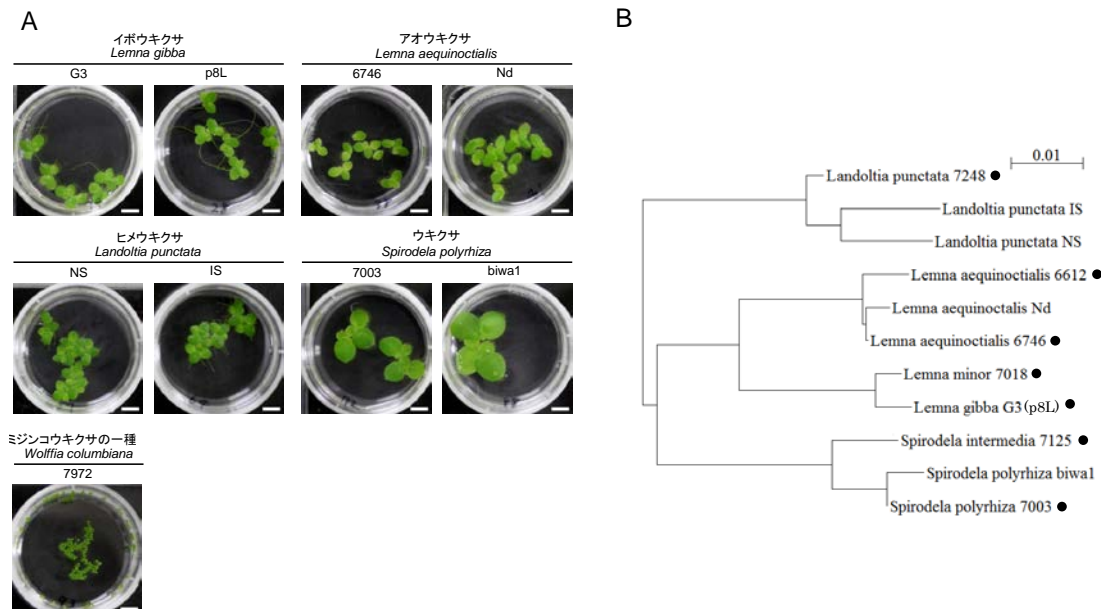


図 3.1 概日リズム測定を行ったウキクサ植物

(A) NF 培地で培養した 4 属 5 種 9 株のウキクサ植物。測定用の 35 mm シャーレに入っており、写真は発光リズム測定開始時に撮影された。Bar: 5 mm。(B) *atpF-atpH* 配列情報に基づいた系統樹 (近隣結合法)。黒丸はリファレンス配列を表す。リファレンス配列情報は Wang et al. (2010) に依った。本系統樹は著者自身が採集したウキクサ植物の種同定のために作成した。

E 培地と H 培地で培養したイボウキクサ (*Lemna gibba*) G3 株に概日発現型発光レポーターである *AtCCA1:LUC* を導入し、プレート発光自動測定器にセットすることで各培養培地条件における生物発光変動を測定した (図 3.2)。明暗条件において、生物発光は E 培地、H 培地で培養したイボウキクサの双方で明瞭な日周リズムを示したが、連続明条件における概日リズムの性質は培地間で異なっていた (図 3.3AB)。E 培地ではリズム周期は $22.62 \pm$

0.07 h (mean \pm SEM, $n = 4$) であり、発光レベルは徐々に低下していった (図 3.3A)。H 培地ではリズム周期は 24.26 ± 1.01 h ($n = 4$) であり、発光レベルは測定期間中維持された (図 3.3B)。この解析により、生物発光概日リズムの性質は培地組成の影響を強く受けることが示唆され、概日リズムの性質比較は同一の培地で培養したウキクサ植物間で行う必要があることが明らかとなった。

H 培地は古くからウキクサ植物の培養に用いられており、多くのウキクサ植物を培養可能である。そこで、H 培地を種間比較解析で用いることを検討した。H 培地で培養した多くのウキクサ植物において生物発光での概日リズム測定が可能であったが、ウキクサ (*Spirodela polyrhiza*) 7003 株では *AtCCA1:LUC* 導入時の発光量が弱く、リズムの定量解析が難しかった (図 1.3C)。構成発現型発光レポーターである *ZmUBQ1:LUC* 導入時においても、発光量がイボウキクサと比べて 1/10 程度であったため (村中 未発表データ)、H 培地で培養したウキクサでは、生物発光の活性が著しく低いと考えられる。このため、H 培地を概日リズムの種間比較解析に用いることは困難である。そこで、培地の組成を検討した結果、Pirson-Seidel 培地を元にした培地で上記の 9 株のウキクサ植物全てが十分な発光活性をした。以下では、この培地を NF 培地と呼称する。NF 培地では、実験に用いた 9 株のウキクサ植物全てが正常に成長した (図 3.1A)。以下では、NF 培地を用いて、ウキクサ植物間における概日リズムの比較を行った。

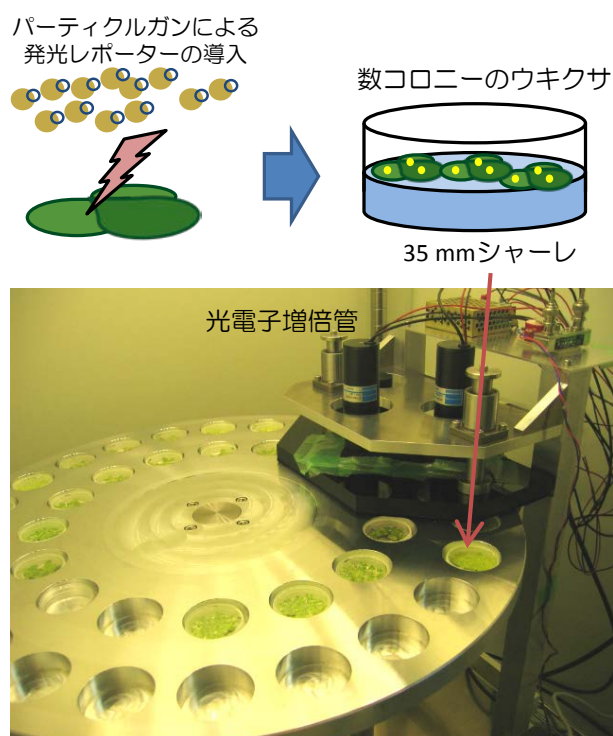


図 3.2 プレート発光測定装置

発光レポーターを導入したウキクサ植物からの発光は、プレート発光自動測定システムで測定される。シャーレが設置されたテーブルは回転しており、シャーレは 20 分毎に光電子増倍管の下に移動し、シャーレ全体の発光量が測定される。測定装置は人口気象器の中に設置されている。

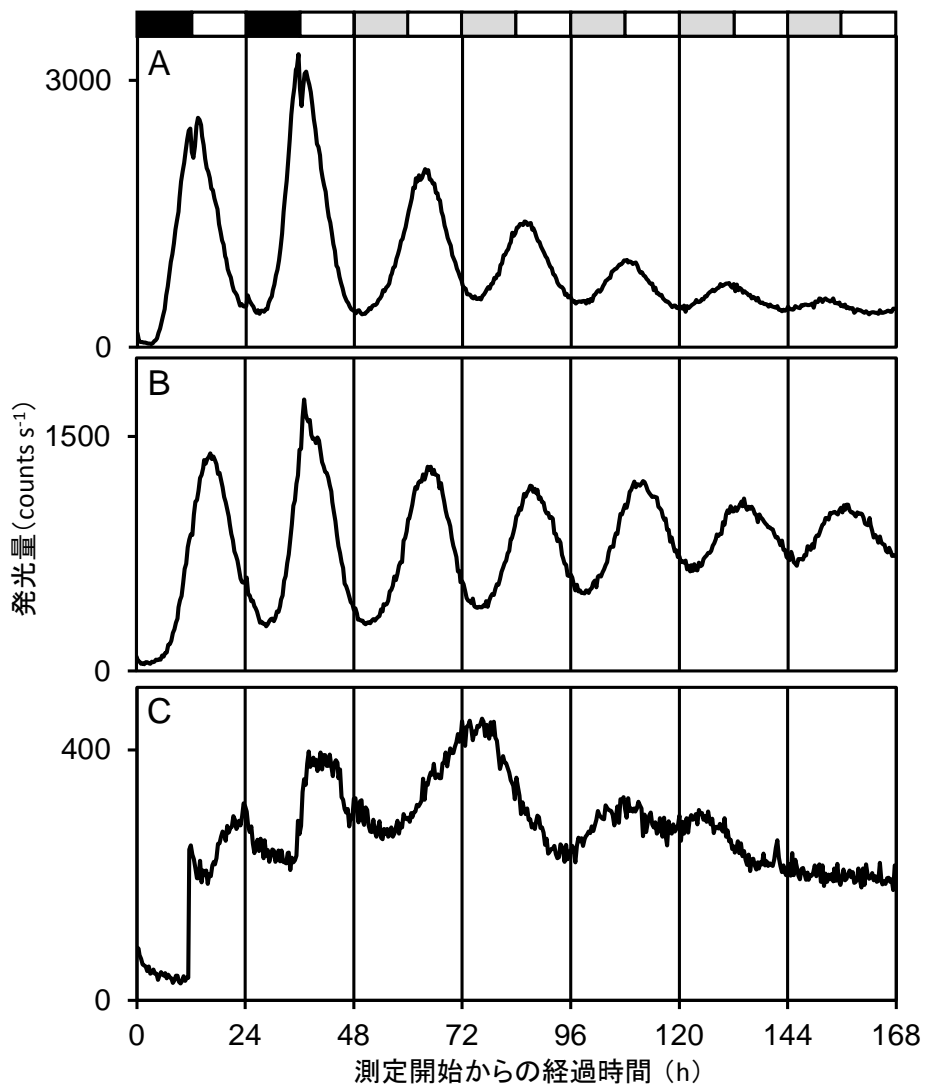


図 3.3 生物発光概日リズムの性質は培地組成の影響をうける

AtCCA1:LUC をイボウキクサ G3 株を E 培地で培養したもの (A)、H 培地で培養したもの (B)、ウキクサ 7003 株を H 培地で培養したもの (C) に導入し、生物発光変動を測定した。植物は連続明条件で培養されたものを使用し、レポーター導入後すぐに測定を開始した。最初の 2 日間は明暗条件下で測定し、その後、連続明条件で測定を行った。それぞれ、4 回行った測定の中から代表的なデータを表示した。黒線は暗期、白線は明期、灰線は主観的暗期を表す。

明暗条件における日周リズムの比較

概日発現型発光レポーターである *AtCCA1:LUC* に加え、構成発現型発光レポーターとして *ZmUBQ1:LUC* を9株のウキクサ植物に導入し、発光変動を明暗条件で測定した (図 3.4)。 *AtCCA1:LUC* 導入時の発光変動は、どの株でも明瞭な日周リズムを示した (図 3.4A-I)。発光のピークは朝であり、これはシロイヌナズナや、異なる培地条件で培養された *Lemna* 属の植物で観察されたリズムと同様であった (Nakamichi et al. 2004, Miwa et al. 2006)。発光がピークを示した時刻は、*Lemna* 属で夜明け後 0-2 h、他の属で夜明け後 3-4 h と異なっていた (表 3.1)。 *ZmUBQ1:LUC* 導入時の発光変動は、どの株においても明瞭な日周リズムを示さなかった (図 3.4J-R)。どちらのレポーターでも、発光強度は同一種内の株間では同程度であり、種間では異なる傾向が見られた (表 3.1)。

表3.1 明暗条件におけるピーク発光量とピーク時刻

種名	株名	<i>AtCCA1:LUC</i>		<i>ZmUBQ1:LUC</i>	
		ピーク発光量 ^a (counts s ⁻¹ mm ⁻²)	ピーク時刻 ^b (h)	ピーク発光量 ^a (counts s ⁻¹ mm ⁻²)	ピーク時刻 ^b (h)
イボウキクサ (<i>Lemna gibba</i>)	G3	26.3 ± 1.9	0.50 ± 0.08	319.8 ± 30.2	16.54 ± 2.35
	p8L	26.3 ± 2.5	1.25 ± 0.22	298.8 ± 19.6	14.46 ± 1.96
アオウキクサ (<i>Lemna aequinoctialis</i>)	6746	161.4 ± 44.5	1.08 ± 0.07	482.0 ± 50.1	14.92 ± 1.31
	Nd	172.0 ± 28.3	0.38 ± 0.06	1047.1 ± 211.4	0.63 ± 0.06
ヒメウキクサ (<i>Landoltia punctata</i>)	NS	23.4 ± 3.5	3.33 ± 0.12	648.7 ± 68.2	17.88 ± 2.64
	IS	17.9 ± 3.7	3.21 ± 0.17	515.3 ± 138.2	19.00 ± 2.83
ウキクサ (<i>Spilodela polyrhiza</i>)	7003	8.8 ± 1.1	3.46 ± 0.51	394.2 ± 92.3	12.33 ± 0.00
	biwa1	14.8 ± 2.5	3.29 ± 0.23	441.1 ± 90.0	13.42 ± 0.97
ミジンコウキクサの1種 (<i>Wolffia columbiana</i>)	7972	218.9 ± 33.3	3.58 ± 0.54	1368.6 ± 380.0	12.00 ± 0.00

a ピーク発光量は、測定開始時の植物体の表面積で割った。

b 0 hは夜明け、12 hは日暮れに相当する。

Mean ± SEM (n = 8)

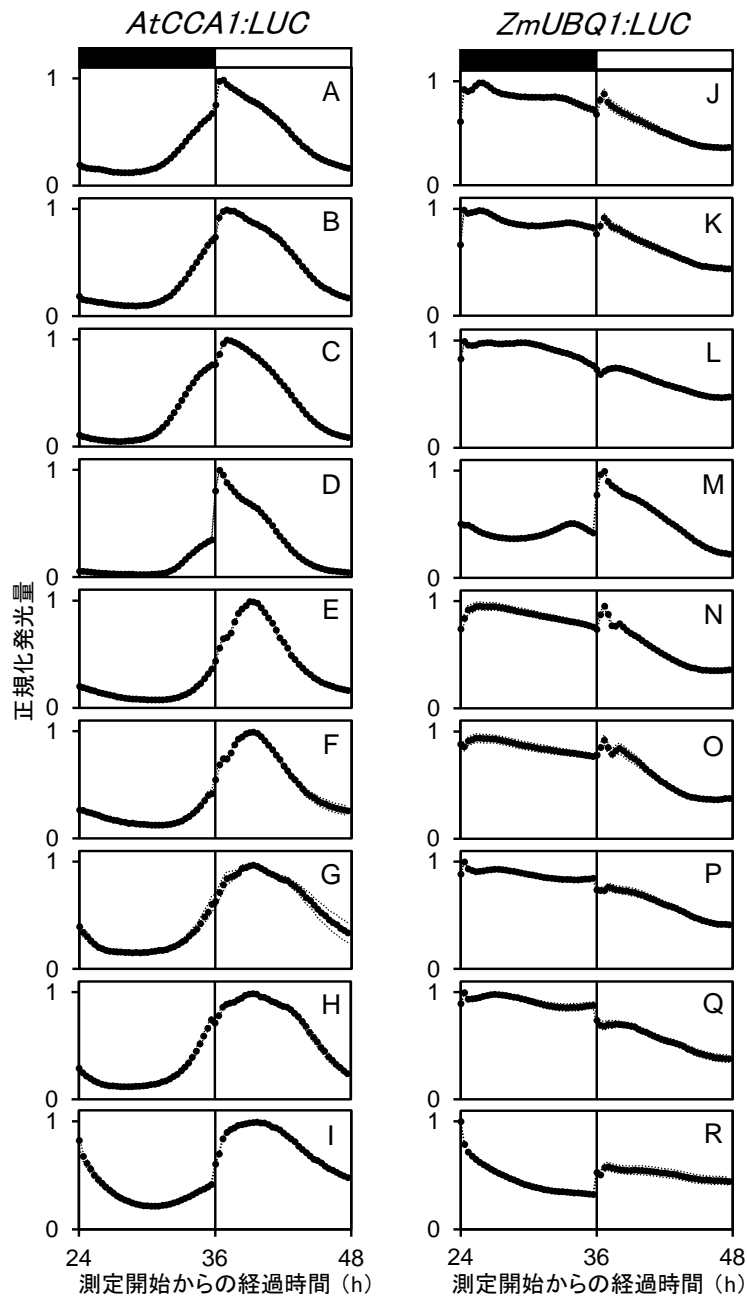


図 3.4 明暗条件における *AtCCA1:LUC* と *ZmUBQ1:LUC* の発光変動

AtCCA1:LUC をイボウキクサ G3 株 (A) と p8L 株 (B)、アオウキクサ 6746 株 (C) と Nd 株 (D)、ヒメウキクサ NS 株 (E) と IS 株 (F)、ウキクサ 7003 株 (G) と *biwa1* 株 (H)、ミジンコウキクサ 7972 株 (I) に、*ZmUBQ1:LUC* をイボウキクサ G3 株 (J) と p8L 株 (K)、アオウキクサ 6746 株 (L) と Nd 株 (M)、ヒメウキクサ NS 株 (N) と IS 株 (O)、ウキクサ 7003 株 (P) と *biwa1* 株 (Q)、ミジンコウキクサ 7972 株 (R) に導入し、明暗条件下での生物発光変動を測定した。植物は連続明条件で培養されたものを使用し、レポーター導入後すぐに明暗条件下での測定を開始した。発光データは測定開始後 24-48 時間における最大発光量で割ることにより正規化した。8 回の測定の平均を黒丸、標準誤差を点線で表示した。黒線は暗期、白線は明期を表す。

連続明条件における概日リズムの比較

*AtCCA1:LUC*と *ZmUBQ1:LUC*を 9 株のウキクサ植物に導入し、発光変動を連続明条件で測定した (図 3.5)。発光レポーターの導入直後から明暗条件で 2 日間測定し、その後、連続明条件で測定を行った (図 3.3 と同様の実験スケジュール)。得られた発光変動データは FFT-NLLS 法で解析した。FFT-NLLS 法では、リズムの周期をコサイン線形和によるフィッティングで推定する。その際、フィッティングの有意度が **Relative amplitude error (RAE)** により評価される。RAE は 0 から 1 の値をとり、値が小さいほどフィッティング有意度が高い。発光変動にリズム成分が少ない場合はフィッティング有意度が減少するため、RAE は上昇する。つまり、低い RAE はリズムが明瞭であることを示唆している。測定開始から 48-168 h の発光変動データを FFT-NLLS で解析した結果を下表にまとめた (表 3.2)。

表3.2 連続明条件での生物発光変動に対するFFT-NLLS解析の結果

種名	株名	<i>AtCCA1:LUC</i>		<i>ZmUBQ1:LUC</i>	
		周期 (h)	RAE ^a	周期 (h)	RAE ^a
イボウキクサ (<i>Lemna gibba</i>)	G3	25.00 ± 0.15	0.07 ± 0.011	25.95 ± 0.48	0.12 ± 0.010
	p8L	24.78 ± 0.16	0.08 ± 0.013	25.63 ± 0.17	0.10 ± 0.012
アオウキクサ (<i>Lemna aequinoctialis</i>)	6746	22.73 ± 1.38	0.31 ± 0.004	30.31 ± 1.71	0.27 ± 0.017
	Nd	21.55 ± 0.02	0.16 ± 0.004	21.76 ± 0.15	0.20 ± 0.014
ヒメウキクサ (<i>Landoltia punctata</i>)	NS	22.39 ± 0.05	0.08 ± 0.011	22.34 ± 0.11	0.10 ± 0.007
	IS	22.91 ± 0.15	0.08 ± 0.006	22.82 ± 0.21	0.09 ± 0.008
ウキクサ (<i>Spilodela polyrhiza</i>)	7003	25.84 ± 0.43	0.16 ± 0.012	26.44 ± 0.15	0.18 ± 0.015
	biwa1	24.42 ± 0.29	0.18 ± 0.004	24.40 ± 0.25	0.16 ± 0.008
ミジンコウキクサの1種 (<i>Wolffia columbiana</i>)	7972	25.57 ± 0.03	0.13 ± 0.007	23.79 ± 2.03	0.21 ± 0.021

^a Relative Amplitude Error

Mean ± SEM (n = 4)

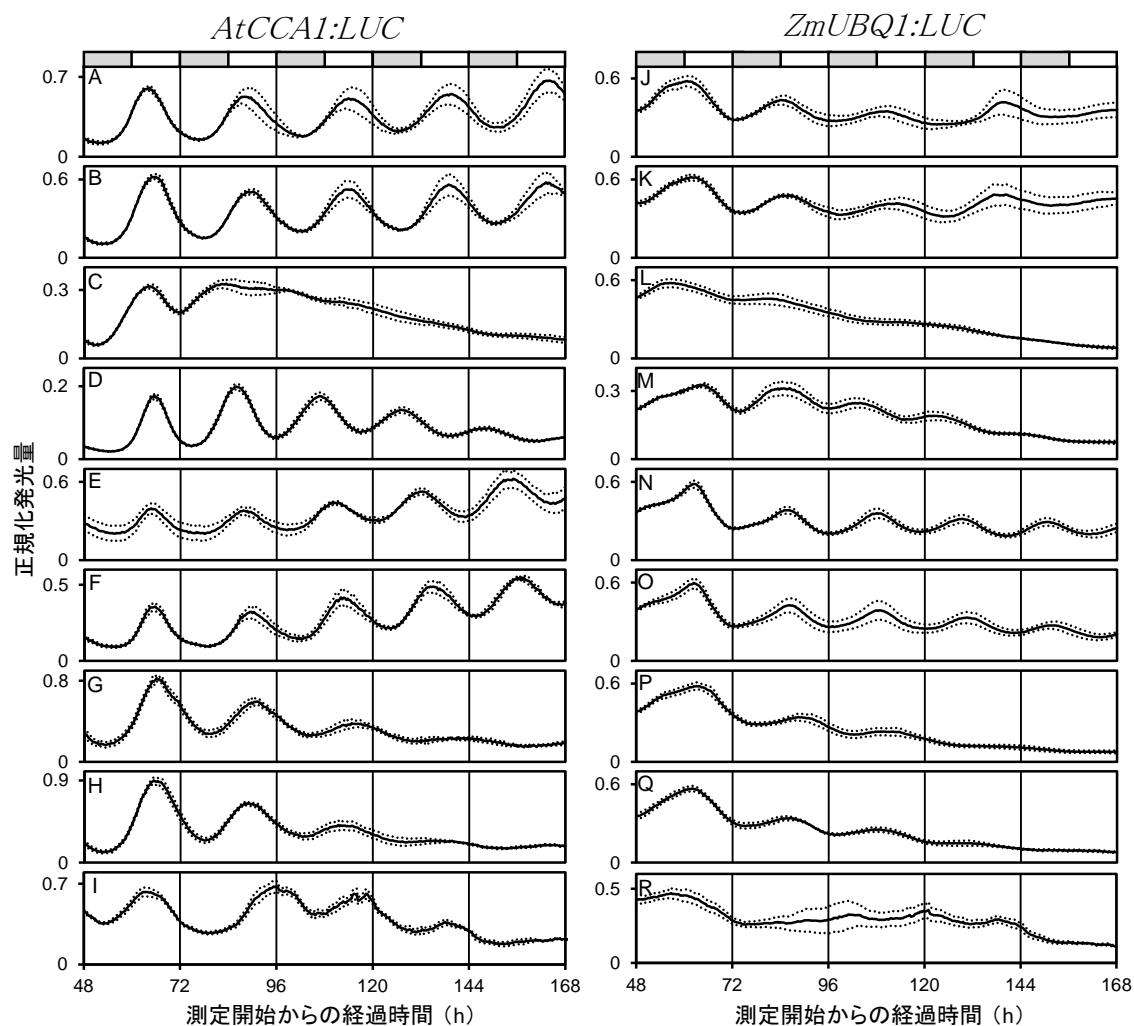


図 3.5 連続明条件における *AtCCA1:LUC* と *ZmUBQ1:LUC* の発光変動

AtCCA1:LUC をイボウキクサ G3 株 (A) と p8L 株 (B)、アオウキクサ 6746 株 (C) と Nd 株 (D)、ヒメウキクサ NS 株 (E) と IS 株 (F)、ウキクサ 7003 株 (G) と biwa1 株 (H)、ミジンコウキクサ 7972 株 (I) に、*ZmUBQ1:LUC* をイボウキクサ G3 株 (J) と p8L 株 (K)、アオウキクサ 6746 株 (L) と Nd 株 (M)、ヒメウキクサ NS 株 (N) と IS 株 (O)、ウキクサ 7003 株 (P) と biwa1 株 (Q)、ミジンコウキクサ 7972 株 (R) に導入し、連続明条件下での生物発光を測定した。植物は連続明条件で培養されたものを使用し、レポーター導入後すぐに生物発光の測定を開始した。明暗条件で発光変動を 2 日間測定した後、連続明条件で発光変動を測定した。発光データは測定開始後 24-48 時間における最大発光量で割ることにより正規化した。4 回の測定の平均を黒線、標準誤差を点線で表示した。白線は明期、灰線は主観的暗期を表す。

イボウキクサ (*Lemna gibba*) G3、p8L 株において、*AtCCA1:LUC* 導入時の発光変動は明瞭な概日リズムを示し、その周期は株間でほぼ同じだった (図 3.5AB、表 3.2)。*ZmUBQ1:LUC* 導入時の発光変動は、減衰する概日リズムを示し、主観的な夜明け付近に 4 回のピークが観察された。*ZmUBQ1:LUC* が示したリズムの周期は、*AtCCA1:LUC* が示したリズムの周期より約 1 時間長かった (表 3.2)。*ZmUBQ1:LUC* はトウモロコシで構成発

現する *UBQUITIN1* のプロモーターを用いたレポーターであり、構成的な発光が期待されていた (Christensen et al. 1992)。そのため、発光変動が概日リズムを示したことは予想外であった。そこで、植物において構成発現プロモーターとして広く用いられているカリフラワモザイクウイルス 35S (*CaMV35S*) プロモーターを用いた *CaMV35S:LUC* をイボウキクサ p8L 株に導入し、同一条件で測定を行った。その結果、*CaMV35S:LUC* 導入時の生物発光は減衰する概日リズムを示し 3 回のピークが観察された。ピーク的位置は *ZmUBQ1:LUC* 導入時と同じ、主観的夜明けであった (図 3.6A)。リズム周期は 25.59 ± 0.08 h ($n = 4$) であり、*ZmUBQ1:LUC* 導入時の周期 (25.63 h) とほぼ同じであった。これらの結果から、植物における典型的な構成発現性のプロモーターを用いた 2 つの発光レポーターは、我々の実験条件では、導入時の発光が概日リズムを示すレポーターであることが明らかとなった。また、2 つの発光レポーターの示したリズムの特徴がよく似ていたことから、この主観的夜明けにピークをもつ発光変動リズムはプロモーターに依存しない可能性が考えられる。そこで、夜明けにピークを持つこれらのリズムと逆位相である夕暮れにピークをもつ概日発現を示すシロイヌナズナ *PRR1* 遺伝子の発光レポーターである *AtPRR1:LUC* をイボウキクサ p8L 株に導入し、同一条件で測定を行った。その結果、発光変動は、夕暮れにピークを持つ概日リズムを示した (図 3.6B)。

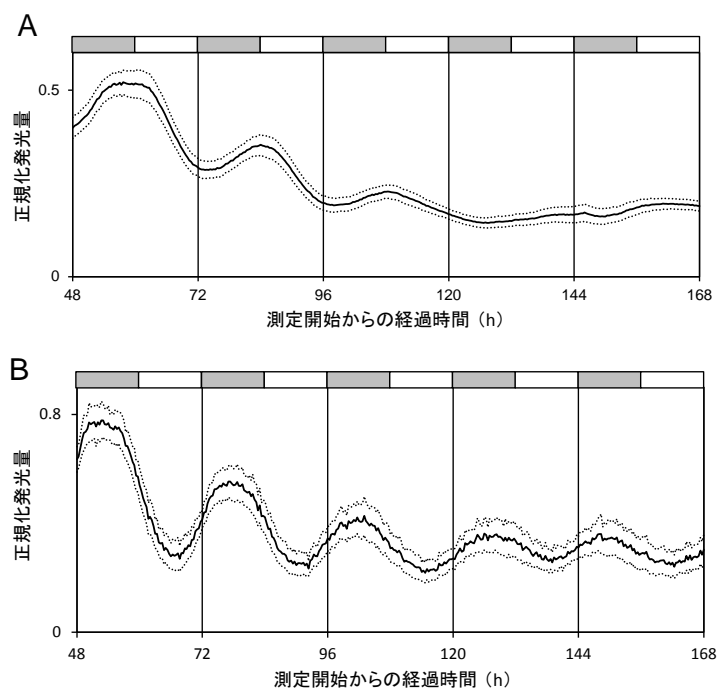


図 3.6 連続明条件における *CaMV35S:LUC* と *AtPRR1:LUC* の発光変動

CaMV35S:LUC (A) と *AtPRR1:LUC* (B) をイボウキクサ p8L 株に導入し、連続明条件下での生物発光を測定した。植物は連続明条件で培養されたものを用い、レポーター導入後すぐに生物発光の測定を開始した。明暗条件で発光変動を 2 日間測定した後、連続明条件で発光変動を測定した。発光データは測定開始後 24-48 時間における最大発光量で割ることにより正規化した。4 回の測定の平均を黒線、標準誤差を点線で表示した。白線は明期、灰線は主観的暗期を表す。

アオウキクサ (*Lemna aequinoctialis*) では、*AtCCA1:LUC* 導入時の発光変動様式は、6746 株と Nd 株で大きく異なった。6746 株での発光変動は急速に減衰する概日リズムを示し、ピークは 1 回しか観察できなかった (図 3.5C)。一方で、Nd 株での発光変動は徐々に減衰する概日リズムを示し、5 回のピークが観察できた (図 3.5D)。*ZmUBQ1:LUC* 導入時の発光変動も株間で異なっていた。6746 株の発光変動は明瞭な概日リズムを示さず (RAE = 0.27)、発光量は徐々に低下した (図 3.5L、表 3.2)。Nd 株でも発光量は徐々に低下したが、発光変動は明瞭な概日リズムを示し、4 回のピークが観察された (RAE = 0.20、図 3.5M)。Nd 株では *AtCCA1:LUC* 導入時のリズム周期 (21.55 h) と *ZmUBQ1:LUC* 導入時のリズム周期 (21.76 h) は同程度であった (表 3.2)。どちらの株でも、*AtCCA1:LUC* 導入時の連続明条件での発光量は、明暗条件下での発光量に比べて 30%以下と低かった (図 3.5CD)。

ヒメウキクサ (*Landoltia punctata*) では、NS 株と IS 株の両方で *AtCCA1:LUC* 導入時の発光変動は明瞭な概日リズムを示した (図 3.5EF)。NS 株のリズム周期 (22.39 h) は IS 株のリズム周期 (22.91 h) よりも約 0.5 h 短かった (表 3.2)。*ZmUBQ1:LUC* 導入時の発光変動も 2 つの株で概日リズムを示した (図 3.5NO)。このリズムは徐々に減衰したが、5 回のピークが確認できた。それぞれの株で、*ZmUBQ1:LUC* 導入時のリズム周期は *AtCCA1:LUC* 導入時のリズム周期とほぼ同じであった (表 3.2)。

ウキクサ (*Spirodela polyrhiza*) では、7003 株と biwa1 株の両方で *AtCCA1:LUC* 導入時の発光変動は減衰する概日リズムを示し、観察できたピークは 3 つだった (図 3.5GH)。7003 株のリズム周期 (25.84 h) は biwa1 株のリズム周期 (24.42 h) より約 1.5 h 長かった。*ZmUBQ1:LUC* 導入時の発光変動は、両方の株で減衰する概日リズムを示し、観察できたピークは 3 回であった (図 3.5PQ)。biwa1 株では *AtCCA1:LUC* 導入時と *ZmUBQ1:LUC* 導入時のリズム周期はほぼ同じであったが、7003 株では *ZmUBQ1:LUC* 導入時の方が約 0.5 h 長かった (表 3.2)。

ミジンコウキクサの一種 (*Wolffia columbiana*) 7972 株では *AtCCA1:LUC* 導入時の発光変動は減衰する概日リズムを示し、4 回のピークが確認できた (図 3.5I)。1 サイクル目のピーク間隔 (約 30 h) は 2、3 サイクル目のピーク間隔 (約 20 h、約 22 h) よりも長く、周期が不安定なリズムであった。この株では *ZmUBQ1:LUC* 導入時の発光変動は明瞭な概日リズムを示さなかった (図 3.5R)。

連続暗条件における概日リズムの比較

*AtCCA1:LUC*と*ZmUBQ1:LUC*を9株のウキクサ植物に導入し、発光変動を連続暗条件で測定した(図3.7)。測定開始後48hから連続暗条件で測定した以外は、連続明条件での測定と同様に測定した。*AtCCA1:LUC*導入時の発光変動はすべての株で減衰する概日リズムを示し、観察できたピークは3回程度だった(図3.7A-I)。FFT-NLLS解析の結果、ミジンコウキクサの一種(*Wolffia columbiana*)7972株を除くすべての株で、暗条件でのリズムは明条件でのリズムよりも長周期化することが明らかとなった(表3.3)。しかしながら前述したように、連続明条件でのミジンコウキクサの一種(*Wolffia columbiana*)のリズムは周期が不安定であり、2サイクル目のピーク間隔(約20h)と3サイクル目のピーク間隔(約22h)は連続暗条件でのリズム周期(約24h)よりも短かった。そのため、今回測定したウキクサ植物の全株で、明条件に比べ、暗条件でリズムが長周期化したと考えて良い。この傾向はシロイヌナズナでも報告されている(Dalchau et al. 2011)。

*ZmUBQ1:LUC*導入時の発光変動は、すべての株で、明瞭な概日リズムを示さなかった(RAE > 0.25、図3.7J-R、表3.3)。連続明条件において明瞭な概日リズムを示したヒメウキクサにおいても概日リズムが見られなかったことから、*ZmUBQ1:LUC*導入時にみられる生物発光の概日リズムは光依存的であることが示唆された(図3.5NO、図3.7NO)。

表3.3 連続暗条件での生物発光変動に対するFFT-NLLS解析の結果

種名	株名	<i>AtCCA1:LUC</i>		<i>ZmUBQ1:LUC</i>	
		周期 (h)	RAE ^a	周期 (h)	RAE ^a
イボウキクサ (<i>Lemna gibba</i>)	G3	28.42 ± 0.58	0.19 ± 0.003	37.11 ± 7.42	0.46 ± 0.049
	p8L	29.71 ± 0.60	0.19 ± 0.006	34.64 ± 3.81	0.35 ± 0.015
アオウキクサ (<i>Lemna aequinoctialis</i>)	6746	23.97 ± 0.24	0.24 ± 0.010	23.11 ± 0.23	0.33 ± 0.026
	Nd	23.59 ± 0.89	0.34 ± 0.008	20.12 ± 0.31	0.37 ± 0.008
ヒメウキクサ (<i>Landoltia punctata</i>)	NS	25.19 ± 0.97	0.29 ± 0.005	22.84 ± 3.13	0.48 ± 0.010
	IS	26.58 ± 0.20	0.29 ± 0.008	33.02 ± 0.53	0.49 ± 0.027
ウキクサ (<i>Spilodela polyrhiza</i>)	7003	27.54 ± 1.20	0.24 ± 0.008	26.53 ± 0.76	0.26 ± 0.014
	biwa1	27.18 ± 0.15	0.23 ± 0.004	28.46 ± 1.21	0.32 ± 0.009
ミジンコウキクサの1種 (<i>Wolffia columbiana</i>)	7972	24.40 ± 0.51	0.23 ± 0.021	23.07 ± 0.21	0.33 ± 0.022

^a Relative Amplitude Error

Mean ± SEM (n = 4)

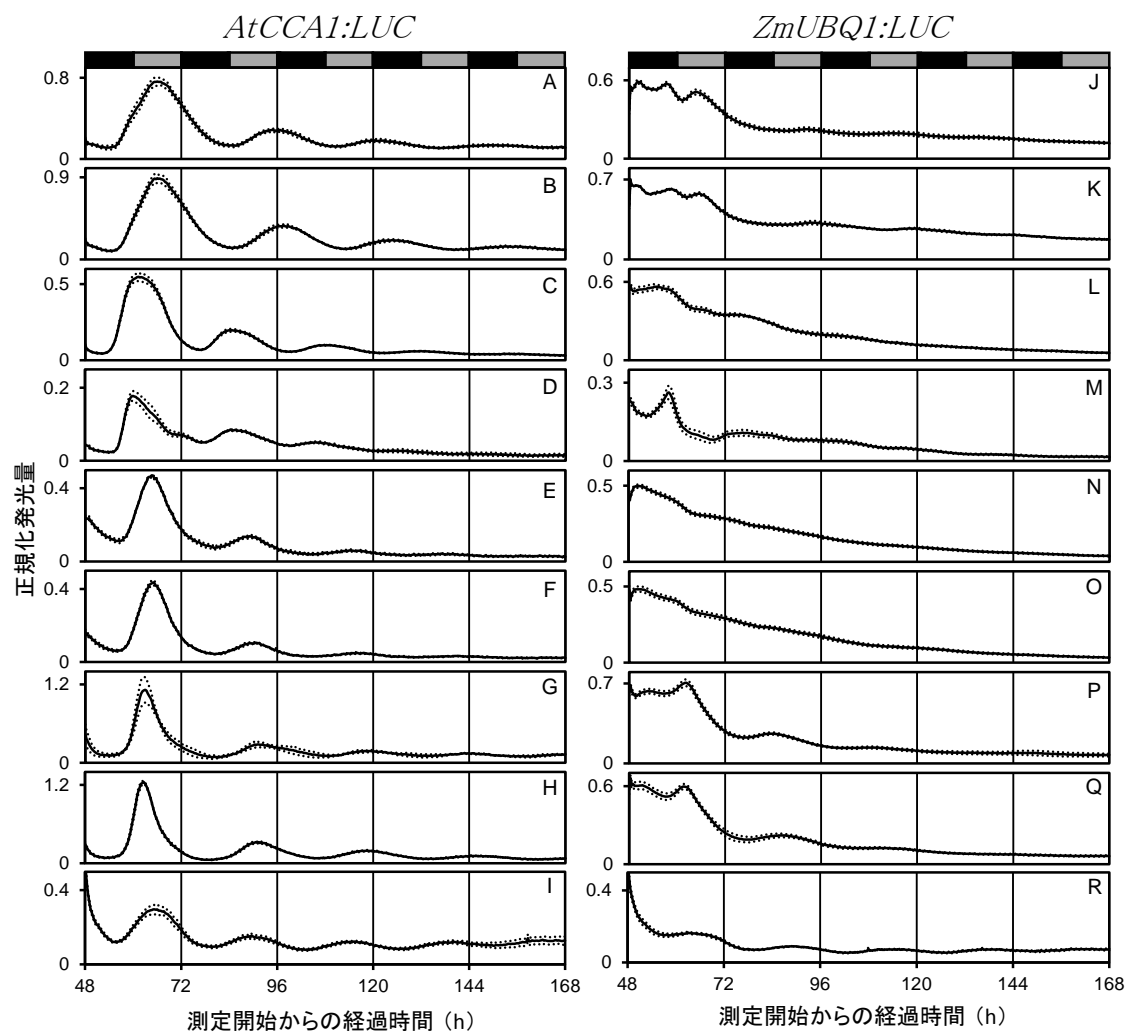


図 3.7 連続暗条件における *AtCCA1:LUC* と *ZmUBQ1:LUC* の発光変動

AtCCA1:LUC をイボウキクサ G3 株 (A) と p8L 株 (B)、アオウキクサ 6746 株 (C) と Nd 株 (D)、ヒメウキクサ NS 株 (E) と IS 株 (F)、ウキクサ 7003 株 (G) と biwa1 株 (H)、ミジンコウキクサ 7972 株 (I) に、*ZmUBQ1:LUC* をイボウキクサ G3 株 (J) と p8L 株 (K)、アオウキクサ 6746 株 (L) と Nd 株 (M)、ヒメウキクサ NS 株 (N) と IS 株 (O)、ウキクサ 7003 株 (P) と biwa1 株 (Q)、ミジンコウキクサ 7972 株 (R) に導入し、連続明条件下での生物発光を測定した。植物は連続明条件で培養されたものを使用し、レポーター導入後すぐに生物発光の測定を開始した。明暗条件で発光変動を 2 日間測定した後、連続明条件で発光変動を測定した。発光データは測定開始後 24-48 時間における最大発光量で割ることにより正規化した。4 回の測定の平均を黒線、標準誤差を点線で表示した。黒線は暗期、灰線は主観的明期を表す。

考察

ウキクサ植物における概日リズム多様性

今回測定した4属5種9株のウキクサ植物は、*AtCCA1:LUC*導入時の発光概日リズムにおいて周期と持続性に多様性を示した。周期は連続明条件で21.55から25.84 h、連続暗条件で23.59から29.71 hの範囲に分布しており、観察されたピーク数も1から5回と測定した株ごとに大きく異なっていた(図3.5、3.7、表3.2、3.3)。このことはウキクサ植物間で概日時計の分子機構が多様化していることを示唆している。同種内での周期の差は最大で2 h程度であり、種間で見られた周期の差よりも小さかった。シロイヌナズナの株間では、葉の上下運動の周期が5時間以上異なることも報告されているため(Michael et al. 2003)、今後さらに多くのウキクサ植物を対象とした測定においては、種内の株間に今回よりも大きな周期差がみられる可能性がある。

リズムの持続性については、とくにアオウキクサ種内で大きな多様性が見られた。連続明条件において6746株が示した概日リズムは急速に減衰したのに対して、Nd株のリズムはよく持続した(図3.5CD)。一方で、この持続性の違いは連続暗条件では見られなかった(図3.7CD)。このような光依存性が見られたことから、2株の持続性の違いが光シグナル経路の差異に起因している可能性が考えられる。アオウキクサは短日植物であるが、花芽形成の限界日長に大きな多型(0-13.5 h)を示し、高緯度の生育する個体ほど限界日長が長い傾向が報告されている(Yukawa and Takimoto 1976)。日長応答の基盤は概日時計であるため、このような日長応答の地域適応は概日時計の多様化と関連がある可能性がある。

明暗条件における日周リズム

明暗条件における*AtCCA1:LUC*導入時の発光は、今回測定した9株全てにおいて朝にピークをもつ明瞭な日周リズムを示した(図3.5A-I)。このことは昼夜サイクルの中で適切な時刻に生理現象を制御する機能がウキクサ植物間で保存されていることを示唆している。しかしながら、*Lemna*属の植物は他の属の植物よりもピーク時刻が約2時間早かった。今回解析を行った4属の中で*Lemna*属の植物のみが孔辺細胞に葉緑体を持たないことが報告されている(Les et al. 1997)。さらに、*Lemna*属のイボウキクサの気孔は、常時開いており開口運動を示さないことが報告されている(Park et al. 1990)。孔辺細胞が動かないことでガス交換効率の日内変動がなくなるため、光合成活性や呼吸など代謝の日内変動へ影響すると考えられる。ショ糖などの代謝物が時計の位相を変化させることが報告されており(Haydon et al. 2013)、属間にみられる気孔の性質の違いは明暗条件におけるピーク時刻の違いと関連があるかもしれない。

定常条件において、全ての株が明瞭な第1ピークを示したことは重要な点である(図3.5A-I)。このことは明暗条件における光刺激などの時刻合わせのための情報がなくなって

も、すべての株が少なくとも1日間は時間情報を保持することができることを示している。概日時計の重要な役割の1つが、夜明けの予想であることが報告されている (Dodd et al. 2014)。今回の解析により、ウキクサ植物の進化の過程において概日リズムの性質は多様化しているが、1日後の夜明けを予測する機構は広く保存されていることを示すことができたと考えている。

構成発現型発光レポーターでみられた概日リズム

連続明条件において、構成発現が期待される *ZmUBQ1:LUC* 導入時の発光変動は多くの株で概日リズムを示した (図 3.5J-R)。同じく構成発現が期待される *CaMV35S:LUC* 導入時の発光変動もイボウキクサにおいて、*ZmUBQ1:LUC* 導入時とよく似た概日リズムを示した (図 3.6A)。これらのリズムの周期は、各株において *AtCCA1:LUC* 導入時の発光リズムの周期と相関があったため、内在性の概日時計により生じたリズムだと考えられる (表 3.2)。今回プロモーターとして用いたトウモロコシ *UBIQUITIN1* 遺伝子はトウモロコシにおいて構成的に発現していることが報告されている (Christensen et al. 1992)。シロイヌナズナにおいても内在性の *UBQUITIN* 遺伝子のプロモーター活性はほとんど変動をしめさず、遺伝子発現解析においてリファレンス遺伝子として使用されている (Czechowsk et al. 2005)。*CaMV35S* プロモーターも、構成発現プロモーターとしてよく用いられており、シロイヌナズナの *CaMV35S* 発光レポーター形質転換体においても、生物発光に概日リズムは観察されていない (Millar et al. 1992)。そのため、今回の測定で観察された構成発現型発光レポーター導入時の発光概日リズムは、転写変動以外の機構で生じている可能性がある (Kojima et al. 2011, Pal et al. 2013)。生物発光の強度は、細胞内のルシフェラーゼのタンパク量だけでなく、発光反応における基質の濃度にも依存すると考えられる。今回用いたホタルルシフェラーゼは、基質であるルシフェリンを ATP 依存的に酸化することで発光する (Leeuwen et al. 2000)。酸素と ATP は光合成によって産出されるが、これまで多くの植物で光合成活性が概日時計の制御をうけることが明らかとなっている (Dodd et al. 2014)。ヒメウキクサ (*Landoltia punctata*) においても、光化学系 II の D1 タンパクのリン酸化状態が概日時計の制御をうけることが報告されている (Booij-James et al. 2002)。光合成活性の概日変動により細胞内の酸素や ATP の濃度が変化し、その濃度依存的にルシフェラーゼの発光活性が変化することで、今回観察された発光リズムが生成された可能性がある。構成発現型発光レポーターでみられたリズムが光合成活性の変動に起因するものであればリズムの光依存性についても説明できる (図 3.7J-R)。また、発光基質であるルシフェリン濃度の細胞内変動も発光活性の変動を生じさせる可能性がある (Scheel et al. 2001, Patrick et al. 2014)。イボウキクサ (*Lemna gibba*) においてカリウム吸収量の概日リズムが報告されているが、この変動は細胞膜における電解質の透過性が概日変動を示すためだと考えられている (Kondo and Tsudzuki 1978)。ルシフェリンはカリウム塩として培地中に溶解しているが、細胞内のカリウム濃度の取り込み量の概日変動に伴い、細胞

内へのルシフェリンの取り込みも概日変動を示すのかもしれない。報告されているカリウム吸収のピークは主観的夜明け頃であり、構成発現型発光レポーター導入時の発光に見られた概日リズムにおけるピーク時刻とほぼ同じである。

今回観察された主観的夜明けにピークを持つ発光概日リズムがルシフェラーゼの発光活性変動に起因するものならば、プロモーターによらず全ての発光レポーター導入時に同様の発光変動が観察される可能性がある。*AtCCA1:LUC* 導入時の発光変動はピークの位置が主観的夜明けに近い概日リズムを示したが、このリズムも *CCA1* プロモーターの活性を反映していない可能性がある。しかしながら、パーティクルガンによる発光レポーター導入時に時計遺伝子の過剰発現や RNAi エフェクタを共導入した解析では、*AtCCA1:LUC* 導入時の発光変動のみが変化し、*ZmUBQ1:LUC* 導入時の発光変動は変化しなかった (Serikawa et al. 2008)。このことから、*AtCCA1:LUC* 導入時の発光変動は *CCA1* プロモーターの活性を反映していると考えられる。また、*AtPRR1:LUC* 導入時の発光変動が、プロモーターの発現変動パターンと同じく、夕暮れにピークを持つ発光変動を示したことから、ルシフェラーゼの発光活性に変動があるとしてもその影響はプロモーター活性の概日リズムを隠すほどは大きくないと考えられる (図 3.6B)。

概日時計機構の多様性研究のモデルとしてのウキクサ植物

今回の解析で、ウキクサ植物の概日リズム多様性を明らかとすることができた。このことは、本解析で採用したパーティクルガンによる簡便な発光レポーター導入が、概日時計の多様性解析のツールとして有用であることを示唆している。これまでシロイヌナズナで行われてきた概日リズムの多様性解析の多くでは、葉の上下運動リズムや遅延蛍光リズムなどの出力系の概日リズムをマーカーとして利用してきた (Michael et al 2003, Gould et al 2009)。このような出力系は概日時計以外の制御も受けるため、概日時計の性質を正確に反映しない可能性がある (Kusakina et al. 2014)。本解析では、パーティクルガンによる簡便な発光レポーター導入を用いて、概日時計機構の中心である時計遺伝子の発現変動を直接観察した。さらにパーティクルガンによる遺伝子導入では、発光レポーターが成熟した表皮細胞か葉肉細胞にしか導入されない (本論文 第 1 章)。このことにより、細胞の種類の違いや成長による攪乱をうけることなく概日時計の性質を推定できたと考えている (Fukuda et al. 2007, 2012, Yakir et al 2011)。平らで滑らかなウキクサ植物の形態はパーティクルガンによる遺伝子導入に適している。さらに小型なウキクサ植物は小さなプレート上でも正常に長期間成長できるため、今回の解析のように生物発光自動測定器の利用が可能である。ウキクサ植物とパーティクルガン法の組み合わせにみられるこれらの特徴は、概日リズムの種間・種内多様性を解析する上で大きな利点だと考えられる。以上のことから、ウキクサ植物は植物における概日時計機構の多様性や進化の研究の良いモデルになると思われる。

材料と方法

植物と培養条件

実験に用いたウキクサ植物を図 3.1 に示した。イボウキクサ G3 株とアオウキクサ 6746 株は実験室において維持されていたものを使用した (Miwa et al. 2006)。イボウキクサ p8L 株は G3 株から樹立された純系株 (第 8 自殖世代) である。ウキクサ 7003 株とミジンコウキクサ 7972 株は Landolt コレクション由来であり、米国 Ibis Biosciences の Todd Michael 博士より分与いただいた。アオウキクサ Nd 株、ヒメウキクサ NS 株、IS 株、ウキクサ biwa1 株は所属研究室で単離された。アオウキクサ Nd 株、ヒメウキクサ NS 株、IS 株は京都で採集された。Nd 株は単離株より樹立された純系株である (第 7 自殖世代)。ウキクサ biwa1 株は滋賀で採集された。

イボウキクサは E 培地、それ以外の植物は H 培地で培養され維持された。維持培地と異なる培地で実験を行う場合は、3 週間の前培養を行った。E 培地は M 培地に 30 μ M の EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) を加えたものである (Cleland and Birggs 1969)。M 培地と H 培地の組成は Hillman (1961) によった。H 培地は規定の濃度を半分に希釈したものを培養に用いた。NF 培地の組成は、2.7 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1mM KH₂PO₄, 5 mM KNO₃, 18 μ M MnCl₂, 46 μ M H₃BO₃, 0.77 μ M ZnSO₄, 0.32 μ M CuSO₄, 0.49 μ M MoO₃, 20 μ M FeSO₄, 50 μ M Na₂EDTA であり、KOH により pH を 5.0 に調節したものを使用した。全ての培地はショ糖を 1% 加えた上で使用した。

植物の培養条件は、培地条件以外は第一章と同様である。

実験に用いたウキクサ植物の種同定

所属研究室で単離されたウキクサ植物はまず形態学的特徴から種の同定を試みた (Les et al. 1997)。その後、*atpF-atpH* マーカー配列をシーケンスし、公開されているレファレンス配列比較することで種名を確かめた (図 3.1A、Wang et al. 2010)。植物体からの DNA 抽出は Extract-N-Amp Plant PCR Kits (Sigma-Aldrich) により行った。*atpF-atpH* マーカー配列は、Wang et al. (2010) のプライマーを用いて PCR によって増幅し、GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) で精製されたものを Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems,) でシーケンスした。

発光レポーターコンストラクト

概日発現型発光レポーターとして用いた *pUC-AtCCA1:LUC+(AtCCA1:LUC)* は第 1 章、第 2 章で用いたものと同じである。

同じく概日発現型発光レポーターとして用いた *pSP1-AtPRR1:LUC+(AtPRR1:LUC)* は名古屋大学 芹川雅之・三輪久美子博士より分与いただいた (Miwa et al. 2006, Serikawa

et al. 2008)。夕方に発現するシロイヌナズナを時計遺伝子である *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR1 (PRR1)* 遺伝子のプロモーター下流にルシフェラーゼが結合している。

構成発現型発光レポーターとして用いた *pSP1-ZmUBQ1:LUC+* (*ZmUBQ1:LUC*) は名古屋大学 芹川雅之・三輪久美子博士より分与いただいた (Miwa et al. 2006、Serikawa et al. 2008)。トウモロコシの *UBQUITIN1* 遺伝子のプロモーター下流にルシフェラーゼが結合している (Christensen et al. 1992)。同じく構成発現型発光レポーターとして用いた *pUC18-CaMV35S:LUC+* (*CaMV35S:LUC*) は第1章で用いたコンストラクトにイントロン配列を追加したものである。イントロン配列はルシフェラーゼの開始コドンから 148bp 下流に挿入されている。イントロン配列は Ohta et al. (1990)を参照。

パーティクルガンによるレポーター導入

60 mm シャーレにウキクサ植物を並べ、第2章と同様の方法でレポーターを導入した。導入後のウキクサは 35 mm シャーレに分けられ、生物発光測定装置にセットされた。シャーレには 0.5 mM のルシフェリンを含む 3 mL の培地を入れた。

生物発光測定装置

生物発光の測定は、プレート発光自動測定装置を用いて行った (図 3.2、Miwa et al. 2006)。この装置では 20 分毎に光電子増倍管 (H7360-01 浜松ホトニクス) により 35 mm シャーレ全体が発する光子数をカウントする。測定装置は人工気象器 (NK system KCLP-1000I-CT) の中に設置され 25 °C、約 30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の昼光色蛍光灯 (三菱 OSRAM FLR20SD/M) 下で稼動した。植物の蛍光を除去するために波長が 630 nm 以上の光をカットするフィルタ (SVO630 朝日分光) を光電子増倍管に装着している。

Fast Fourier transform–nonlinear least squares (FFT-NLLS) 法

概日リズムの周期は FFT-NLLS 法を用いて推定した。測定開始後 48-168 h のデータを対象に周期をもとめた。データ解析は 24 時間移動平均を減算することでトレンドを除去して行った。FFT-NLLS を行うプログラムは、The Biological Rhythms Analysis software system (BRASS, available from <http://www.amillar.org>) に含まれているものを用いた。

第4章

結論と展望

本研究では、パーティクルガン法によるウキクサ植物への発光レポーター導入技術を基盤として個体内の細胞の概日リズムを個別に測定する技術を開発した。さらにそれをもとに、イボウキクサにおいて個体内の個々の細胞が示す概日リズムを解析し、植物の概日時計システムを細胞レベルから理解することを目指した。

第1章では、発光レポーターをパーティクルガンでイボウキクサに導入し、高感度カメラでイメージングすることで、個々の細胞由来の発光を分離して測定することに成功した。

第2章ではイボウキクサにおいて個体内の個々の細胞が示す概日リズムを解析し、植物における細胞時計の性質を初めて明らかとした。とくに、周期不均一性と周期不安定性を定量的に解析し、哺乳類であるマウスの細胞時計の性質と似通っていることを明らかとした。定常条件では個々の細胞の概日リズムは脱同期を示し、個体内の細胞時計の独立性が高いことが示唆された。しかしながら、明暗条件において細胞時計の位相は空間パターンを示し、その挙動が個体上の位置に強く影響を受けることが明らかとなった。このことは明暗条件では細胞時計の独立性は低くなり、個体レベルの計時システムの一部として統合される可能性を示唆している。

第3章ではパーティクルガンによる遺伝子導入の簡便さに注目し、ウキクサ植物にみられる個体レベルの概日リズムの多様性について解析を行った。その結果、ウキクサ植物の概日時計において、昼夜サイクル下で時間情報を保持する機構は保存されているが、その分子機構はある程度多様化していることが示唆された。

本研究で構築した1細胞発光測定系により、これまで知見の乏しかった植物個体内における細胞概日時計の基本的性質を明らかにすることができた。また、本研究で発見された明暗条件下における位相空間パターンは再現よく観察できるため、この空間パターンの形成機構を解析することで、細胞時計間の相互作用機構の研究を実証的に進めることができる。さらに、維管束組織の発達度や個体サイズに大きな多様性があるウキクサ植物全般を実験に用いることで、個体の構造が細胞時計集団の挙動に与える影響を検証することが可能になると考えている。

概日時計遺伝子の起源が全く異なる哺乳類と植物において、細胞時計の挙動における基本的な性質である不均一性と不安定性の程度が似ていることは重要な点だと思われる。第2章では、真核生物の進化において、様々な環境に対応するために柔軟な概日時計システムを獲得する中で、個々の細胞時計の正確性が低くなる可能性について考察した。このこと

は第3章で見出したウキクサ植物における概日リズムの多様性と密接に関わる問題である。個体の挙動は細胞の挙動を基礎としているが、個体の進化もまた、細胞の性質の変化を基礎としている。本研究では、ウキクサ植物へのパーティクルガンによる発光レポーター導入による概日リズム測定系が、測定器を変更するだけで、細胞レベルの解析から生態レベルの解析まで幅広く対応できることを示した。この2つの階層は現在の生物学では遠く離れたものという印象を受けるが、本来は不可分なものである。ウキクサ植物を材料としてこの階層をシームレスに行き来できることを示した本研究の意義は大きいと考えている。今後この技術を発展させ、細胞・組織・個体・生態と様々な階層・スケールで研究を展開することで、遺伝子の変異に起因する細胞の性質の変化が、どのように個体の振る舞いを変化させ、多様な環境に適した形質を生み出し、進化へと波及していくのかという、生物学における本質的な問に答えることが可能になると期待している。

引用文献

- Amdaoud, M., Vallade, M., Weiss-Schaber, C. and Mihalcescu, I. (2007) Cyanobacterial clock, a stable phase oscillator with negligible intercellular coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 7051–7056.
- Aoki, S., Kato, S., Ichikawa, K. and Shimizu, M. (2004) Circadian Expression of the PpLhcb2 Gene Encoding a Major Light-Harvesting Chlorophyll a/b-Binding Protein in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 68–76.
- Aschoff, J. and Pohl, H. (1978) Phase relations between a circadian rhythm and its zeitgeber within the range of entrainment. *Naturwissenschaften*, **65**, 80–84.
- Aton, S.J. and Herzog, E.D. (2005) Come together, right...now: Synchronization of rhythms in a mammalian circadian clock. *Neuron*, **48**, 531–534.
- Bengtsson, M., Ståhlberg, A., Rorsman, P. and Kubista, M. (2005) Gene expression profiling in single cells from the pancreatic islets of Langerhans reveals lognormal distribution of mRNA levels. *Genome Res.*, **15**, 1388–1392.
- Beppu, T. and Takimoto, A. (1981) Further studies on the flowering of *Lemna paucicostata* in Japan. *Bot. Mag. Tokyo*, **94**, 69–76.
- Booij-James, I.S., Swegle, W.M., Edelman, M. and Mattoo, A.K. (2002) Phosphorylation of the D1 photosystem II reaction center protein is controlled by an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol.*, **130**, 2069–2075.
- Bünning, E. (1960) Opening Address: Biological Clocks. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **25**, 1–9.
- Bünning, E. (1973) "The physiological clock." *Heidelberg Sci. Libr* 1. (古谷 雅樹・古谷 妙子 (訳) (1977) 生理時計 東京大学出版会
- Christensen, A.H., Sharrock, R. a. and Quail, P.H. (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.*, **18**, 675–689.
- Cleland, C.F. and Briggs, W.S. (1969) Gibberellin and CCC Effects on Flowering and Growth in the Long-day Plant *Lemna gibba* G3. *Plant Physiol.*, **44**, 503–507.
- Corellou, F., Schwartz, C., Motta, J.-P., Djouani-Tahri, E.B., Sanchez, F. and Bouget, F.-Y. (2009) Clocks in the green lineage: comparative functional analysis of the circadian architecture of the picoeukaryote *ostreococcus*. *Plant Cell*, **21**, 3436–3449.
- Covington, M.F., Maloof, J.N., Straume, M., Kay, S. a and Harmer, S.L. (2008) Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol.*, **9**, R130.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K. and Scheible, W.-R. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **139**, 5–17.
- Dalchau, N., Baek, S.J., Briggs, H.M., et al. (2011) The circadian oscillator gene *GIGANTEA* mediates a long-term response of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock to sucrose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 5104–5109.

- Dilão, R.** (2014) The regulation of gene expression in eukaryotes: Bistability and oscillations in repressilator models. *J. Theor. Biol.*, **340**, 199–208.
- Dodd, A.N., Dalchau, N., Gardner, M.J., Baek, S.J. and Webb, A. a R.** (2014) The circadian clock has transient plasticity of period and is required for timing of nocturnal processes in Arabidopsis. *New Phytol.*, **201**, 168–179.
- Dodd, A.N., Salathia, N., Hall, A., Kévei, E., Tóth, R., Nagy, F., Hibberd, J.M., Millar, A.J. and Webb, A. a R.** (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science*, **309**, 630–633.
- Elowitz, M.B. and Leibler, S.** (2000) A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, **403**, 335–338.
- Endo, M., Shimizu, H., Nohales, M. a., Araki, T. and Kay, S. a.** (2014) Tissue-specific clocks in Arabidopsis show asymmetric coupling. *Nature*.
- Fukuda, H., Murase, H. and Tokuda, I.** (2013) Controlling Circadian Rhythms by Dark-Pulse Perturbations in Arabidopsis thaliana. *Sci. Rep.*, **3**, 1533.
- Fukuda, H., Nakamichi, N., Hisatsune, M., Murase, H. and Mizuno, T.** (2007) Synchronization of plant circadian oscillators with a phase delay effect of the vein network. *Phys. Rev. Lett.*, **99**, 1–4.
- Fukuda, H., Tokuda, I., Hashimoto, S. and Hayasaka, N.** (2011) Quantitative analysis of phase wave of gene expression in the mammalian central circadian clock network. *PLoS One*, **6**, 1–8.
- Fukuda, H., Ukai, K. and Oyama, T.** (2012) Self-arrangement of cellular circadian rhythms through phase-resetting in plant roots. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, **86**, 1–5.
- Furusawa, C., Suzuki, T., Kashiwagi, A., Yomo, T. and Kaneko, K.** (2005) Ubiquity of Log-normal Distributions in Intra-cellular Reaction Dynamic. *Biophysics (Oxf.)*, **1**, 15.
- Gachon, F., Nagoshi, E., Brown, S. a, Ripperger, J. and Schibler, U.** (2004) The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma*, **113**, 103–112.
- Garner, W.W. and Allard, H.A.** (1920) Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J Agric Res*, **18**, 553–606.
- Gonze, D., Halloy, J. and Goldbeter, A.** (2002) Robustness of circadian rhythms with respect to molecular noise. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 673–678.
- Gould, P.D., Diaz, P., Hogben, C., Kusakina, J., Salem, R., Hartwell, J. and Hall, A.** (2009) Delayed fluorescence as a universal tool for the measurement of circadian rhythms in higher plants. *Plant J.*, **58**, 893–901.
- Granada, A.E., Bordyugov, G., Kramer, A. and Herzog, H.** (2013) Human Chronotypes from a Theoretical Perspective. *PLoS One*, **8**.
- Grima, B., Chélot, E., Xia, R. and Rouyer, F.** (2004) Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the Drosophila brain. *Nature*, **431**, 869–873.
- Guerriero, M.L., Pokhilko, a., Fernandez, a. P., Halliday, K.J., Millar, a. J. and Hillston, J.** (2012) Stochastic properties of the plant circadian clock. *J. R. Soc. Interface*, **9**, 744–756.

- Haydon, M.J., Mielczarek, O., Robertson, F.C., Hubbard, K.E. and Webb, A. a R.** (2013) Photosynthetic entrainment of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Nature*, **502**, 689–92.
- Hillman, W.S.** (1970) Carbon Dioxide Output Lemna Photoperiodism ' Index of Circadian Timing. *Symp. A Q. J. Mod. Foreign Lit.*, 273–279.
- Hillman, W.S.** (1961) The Lemnaceae, or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. *Bot. Rev.*, **27**, 221–287.
- Holm, K., Källman, T., Gyllenstrand, N., Hedman, H. and Lagercrantz, U.** (2010) Does the core circadian clock in the moss *Physcomitrella patens* (Bryophyta) comprise a single loop? *BMC Plant Biol.*, **10**, 109.
- Honma, S., Nakamura, W., Shirakawa, T. and Honma, K.I.** (2004) Diversity in the circadian periods of single neurons of the rat suprachiasmatic nucleus depends on nuclear structure and intrinsic period. *Neurosci. Lett.*, **358**, 173–176.
- Hsu, P.Y. and Harmer, S.L.** (2014) Wheels within wheels: The plant circadian system. *Trends Plant Sci.*, **19**, 240–249.
- Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C.R., Tanabe, A., Golden, S.S., Johnson, C.H. and Kondo, T.** (1998) Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science*, **281**, 1519–1523.
- Izumo, M., Sato, T.R., Straume, M. and Johnson, C.H.** (2006) Quantitative analyses of circadian gene expression in mammalian cell cultures. *PLoS Comput. Biol.*, **2**, 1248–1261.
- James, A.B., Monreal, J. a, Nimmo, G. a, Kelly, C.L., Herzyk, P., Jenkins, G.I. and Nimmo, H.G.** (2008) The circadian clock in *Arabidopsis* roots is a simplified slave version of the clock in shoots. *Science*, **322**, 1832–1835.
- Jolma, I.W., Laerum, O.D., Lillo, C. and Ruoff, P.** (2010) Circadian oscillators in eukaryotes. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, **2**, 533–549.
- Kim, J. and Somers, D.E.** (2010) Rapid assessment of gene function in the circadian clock using artificial microRNA in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiol.*, **154**, 611–621.
- Klein, T.M., Harper, E.C., Svab, Z., Sanford, J.C., Fromm, M.E. and Maliga, P.** (1988) Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 8502–8505.
- Kondo, T. and Takahiko Tsudzuki** (1978) Rhythm in potassium uptake by a duckweed, *Lemna gibba* G3. *Plant Cell Physiol.*, **19**, 1465–1473.
- Konopka, R.J. and Benzer, S.** (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **68**, 2112–2116.
- Kusakina, J., Gould, P.D. and Hall, A.** (2014) A fast circadian clock at high temperatures is a conserved feature across *Arabidopsis* accessions and likely to be important for vegetative yield. *Plant, Cell Environ.*, **37**, 327–340.
- Landolt E.** (1986) *Biosystematic investigations on the family of duckweeds: the family of Lemnaceae – A Monograph Study*. Veröffentlichungen des Geobotanischen Instituts ETH, Stiftung Rubel, Zurich, Switzerland.

- Leeuwen, W., Hagendoorn, M.J.M., Ruttink, T., Poecke, R., Plas, L.H.W. and Krol, A.R.** (2000) The use of the luciferase reporter system for in planta gene expression studies. *Plant Mol. Biol. Report.*, **18**, 143–144.
- Leise, T.L., Wang, C.W., Gitis, P.J. and Welsh, D.K.** (2012) Persistent cell-autonomous circadian oscillations in fibroblasts revealed by six-week single-cell imaging of PER2::LUC bioluminescence. *PLoS One*, **7**, 1–10.
- Les, D.H., Landolt, E. and Crawford, D.J.** (1997) Systematics of the Lemnaceae (duckweeds): Inferences from micromolecular and morphological data. *Plant Syst. Evol.*, **204**, 161–177.
- Locke, J.C.W., Kozma-Bognár, L., Gould, P.D., Fehér, B., Kevei, E., Nagy, F., Turner, M.S., Hall, A. and Millar, A.J.** (2006) Experimental validation of a predicted feedback loop in the multi-oscillator clock of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 59.
- Mairan, De** (1729) Observation botanique. *Hist. Acad. Roy. Sci*, **35**.
- Matsuo, T., Okamoto, K., Onai, K., Niwa, Y., Shimogawara, K. and Ishiura, M.** (2008) A systematic forward genetic analysis identified components of the *Chlamydomonas* circadian system. *Genes Dev.*, **22**, 918–930.
- McClung, C.R.** (2013) Beyond *Arabidopsis*: The circadian clock in non-model plant species. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **24**, 430–436.
- Michael, T.P., Salomé, P. a, Yu, H.J., Spencer, T.R., Sharp, E.L., McPeck, M. a, Alonso, J.M., Ecker, J.R. and McClung, C.R.** (2003) Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock. *Science*, **302**, 1049–1053.
- Millar, a J., Short, S.R., Chua, N.H. and Kay, S. a** (1992) A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell*, **4**, 1075–1087.
- Millar, A.J., Carré, I.A., Strayer, C. a, Chua, N.H. and Kay, S. a** (1995) Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science*, **267**, 1161–1163.
- Miwa, K., Serikawa, M., Suzuki, S., Kondo, T. and Oyama, T.** (2006) Conserved expression profiles of circadian clock-related genes in two *Lemna* species showing long-day and short-day photoperiodic flowering responses. *Plant Cell Physiol.*, **47**, 601–612.
- Miyata, H. and Yamamoto, Y.** (1969) Rhythms in respiratory metabolism of *Lemna gibba* G3 under continuous illumination. *Plant Cell Physiol.*, **10**, 875–889.
- Murakami, M., Tago, Y., Yamashino, T. and Mizuno, T.** (2007) Comparative overviews of clock-associated genes of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.*, **48**, 110–121.
- Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T. and Kondo, T.** (2005) Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science*, **308**, 414–415.
- Nakamichi, N., Ito, S., Oyama, T., Yamashino, T., Kondo, T. and Mizuno, T.** (2004) Characterization of Plant Circadian Rhythms by Employing *Arabidopsis* Cultured Cells with Bioluminescence Reporters. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 57–67.
- 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.*, **109**, 17123–17128.

- Nakano, R.T., Matsushima, R., Ueda, H., et al.** (2009) GNOM-LIKE1/ERMO1 and SEC24a/ERMO2 are required for maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **21**, 3672–3685.
- Nass, N. and Scheel, D.** (2001) Enhanced luciferin entry causes rapid wound-induced light emission in plants expressing high levels of luciferase. *Planta*, **212**, 149–154.
- Njus, D., Gooch, D. Van and Hastings, J.W.** (1981) Precision of the *Gonyaulax* circadian clock. *Cell Biochem. Biophys.*, **3**, 223–231.
- Ohta, H., Yamazaki, S. and McMahon, D.G.** (2005) Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.*, **8**, 267–269.
- Ohta, S., Mita, S., Hattori, T. and Nakamura, K.** (1990) Construction and Expression in Tobacco of a β -Glucuronidase (GUS) Reporter Gene Containing an Intron Within the Coding Sequence. *Plant Cell Physiol.*, **31**, 805–813.
- Park, K.H., Hahn, K.W. and Kang, B.G.** (1990) Lack of Correlation between Senescence and Stomatal Aperture in *Lemna gibba* G3. *Plant Cell Physiol.*, **31**, 731–733.
- Patrick, P.S., Lyons, S.K., Rodrigues, T.B. and Brindle, K.M.** (2014) Oatp1 Enhances Bioluminescence by Acting as a Plasma Membrane Transporter for D-luciferin. *Mol. Imaging Biol.*, 626–634.
- Plautz, J.D., Straume, M., Stanewsky, R., Jamison, C.F., Brandes, C., Dowse, H.B., Hall, J.C. and Kay, S. a** (1997) Quantitative analysis of *Drosophila* period gene transcription in living animals. *J. Biol. Rhythms*, **12**, 204–217.
- Pokhilko, A., Fernández, A.P., Edwards, K.D., Southern, M.M., Halliday, K.J. and Millar, A.J.** (2012) The clock gene circuit in *Arabidopsis* includes a repressilator with additional feedback loops. , 1–13.
- Rémi, J., Merrow, M. and Roenneberg, T.** (2010) A circadian surface of entrainment: varying T , τ , and photoperiod in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Rhythms*, **25**, 318–328.
- Rougemont, J. and Naef, F.** (2006) Collective synchronization in populations of globally coupled phase oscillators with drifting frequencies. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, **73**, 1–5.
- Serikawa, M., Miwa, K., Kondo, T. and 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 Physiol.*, **146**, 1952–1963.
- Shimmura, T. and Yoshimura, T.** (2013) Circadian clock determines the timing of rooster crowing. *Curr. Biol.*, **23**, R231–R233.
- Strogatz, S.H.** (2000) From Kuramoto to Crawford: exploring the onset of synchronization in populations of coupled oscillators. *Phys. D Nonlinear Phenom.*, **143**, 1–20.
- Sugiyama, N., Izawa, T. and Oikawa, T.** (2001) Light regulation of circadian clock-controlled gene expression in rice. *Plant J.*, **26**, 607–615.
- Sweeney, B.M.** (1960) The photosynthetic rhythm in single cells of *Gonyaulax polyedra*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **25**, 145–148.
- Teng, S.-W., Mukherji, S., Moffitt, J.R., Buyl, S. de and O'Shea, E.K.** (2013) Robust Circadian Oscillations in Growing Cyanobacteria Require Transcriptional Feedback. *Science (80-)*, **340**, 737–740.

- Thain, S.C., Hall, a and Millar, a J.** (2000) Functional independence of circadian clocks that regulate plant gene expression. *Curr. Biol.*, **10**, 951–956.
- Tóth, R., Kevei, E., Hall, a, Millar, a J., Nagy, F. and Kozma-Bognár, L.** (2001) Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **127**, 1607–1616.
- Troein, C., Corellou, F., Dixon, L.E., Ooijen, G. Van, O'Neill, J.S., Bouget, F.Y. and Millar, A.J.** (2011) Multiple light inputs to a simple clock circuit allow complex biological rhythms. *Plant J.*, **66**, 375–385.
- Wang, W., Wu, Y., Yan, Y., Ermakova, M., Kerstetter, R. and Messing, J.** (2010) DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. *BMC Plant Biol.*, **10**, 205.
- Webb, A.B., Taylor, S.R., Thoroughman, K. a., Doyle, F.J. and Herzog, E.D.** (2012) Weakly Circadian Cells Improve Resynchrony. *PLoS Comput. Biol.*, **8**.
- Welsh, D.K., Imaizumi, T. and Kay, S. a.** (2005) Real-time reporting of circadian-regulated gene expression by luciferase imaging in plants and mammalian cells. *Methods Enzymol.*, **393**, 269–288.
- Wenden, B., Toner, D.L.K., Hodge, S.K., Grima, R. and Millar, a. J.** (2012) Spontaneous spatiotemporal waves of gene expression from biological clocks in the leaf. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109**, 6757–6762.
- Yakir, E., Hassidim, M., Melamed-Book, N., Hilman, D., Kron, I. and Green, R.M.** (2011) Cell autonomous and cell-type specific circadian rhythms in Arabidopsis. *Plant J.*, **68**, 520–531.
- Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M. and Okamura, H.** (2003) Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science*, **302**, 1408–1412.
- Yamashita, T., Iida, A. and Morikawa, H.** (1991) Evidence That More than 90% of beta-Glucuronidase-Expressing Cells after Particle Bombardment Directly Receive the Foreign Gene in their Nucleus. *Plant Physiol.*, **97**, 829–831.
- Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M. and Block, G.D.** (2002) Effects of aging on central and peripheral mammalian clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 10801–10806.
- Yan, L., Karatsoreos, I., LeSauter, J., Welsh, D.K., Kay, S., Foley, D. and Silver, R.** (2007) Exploring spatiotemporal organization of SCN circuits. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **72**, 527–541.
- Yukawa, I. and Takimoto, A.** Flowering Response of *Lemna paucicostata* in Japan. *Bot. Mag. Tokyo*, **89**, 241–250.
- Zielinski, T., Moore, A.M., Troup, E., Halliday, K.J. and Millar, A.J.** (2014) Strengths and limitations of period estimation methods for circadian data. *PLoS One*, **9**.

謝辞

本研究は京都大学大学院理学研究科・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。学部生として研究室に配属されて以来、小山時隆准教授には基本的な実験手法から研究の進め方、さらには研究者としての心構えまで、非常に多くのことをご教授いただきました。また、怠慢な私を長期間にわたって粘り強くサポートして下さいました。心より感謝申し上げます。

井上敬講師には、長きにわたって様々な助言をいただきました。また、その研究姿勢や視点からも学ぶところが多く、6年以上に渡る研究生活を非常に実り多い期間とすることができました。篤く御礼を申し上げます。伊藤照悟助教には、種々の実験技術に加え、研究をまとめる際の考え方など多くのアドバイスをいただき、参考にさせていただきました。深く感謝申し上げます。

本研究は三輪久美子博士と芹川雅之博士（ともに名古屋大学理学研究科）が開発された実験手法を基盤としています。お二方には発光レポーターコンストラクトもご提供いただき、本研究を支援して頂きました。感謝申し上げます。また、中道範人特任准教授（名古屋大学 ITbM）より頂いた発光レポーターを用いた解析により、本研究成果のほとんどが得られています。厚く感謝申し上げます。第1章で用いたシロイヌナズナ *CAB3::LUC* 形質転換体は望月伸悦助教（京都大学理学研究科）に、GFP レポーターは西村いくこ教授（京都大学理学研究科）に、それぞれご提供いただきました。感謝申し上げます。第3章で用いた発光測定装置は近藤孝男教授（名古屋大学理学研究科）が考案されたものを使用しました。近藤孝男教授はウキクサ植物を用いた概日時計研究の先駆者でもあり、本研究に様々なアドバイスをいただきました。心より感謝申し上げます。

本研究の解析手法には学会でお会いした、中島昭彦特任助教（東京大学総合文化研究科）と Hanspeter Herzel 教授（ベルリン大学）から頂いたアドバイスが大きく反映されています。お話したのはそれぞれ 30 分ほどでしたが、その際の議論の結果、本研究は大きく進展しました。深く感謝申し上げます。

本研究が行われた京都大学大学院理学研究科・植物学教室・形態統御学分科のみなさまには大変お世話になりました。6年以上にわたって研究室が楽しい場所であり続けたことは本当に幸運なことだと感じています。この場には書ききれませんが研究室のメンバー全員に深く感謝しています。とくにウキクサ班として共に研究を進めた久保田佐綾さん、吉原聡宏さん、岡田全朗さん、四方純さんからは、多くのご意見、ときには実験材料の提供をいただきました。ありがとうございました。また、木村泰裕さんには分子生物の基礎をご指導頂きました。感謝を申し上げます。

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

最後に、9年以上に渡って続いた学生生活を、暖かく見守り、支えて下さった両親に心より感謝いたします。本当にありがとうございました。

2015年8月 村中智明