

植物発芽時期における概日リズムの発現と非線形協力現象

九大・工 福田弘和 (Hirokazu Fukuda)¹、 甲斐昌一 (Shoichi Kai)²

¹Graduate School of Engineering, Kyushu University

²Faculty of Engineering, Kyushu University

(概要) 個体レベルの概日リズムは、時計遺伝子の発現による自律振動細胞の形成、そして自律振動細胞集団の同期という二つの段階を経て発生する。植物種子の発芽・生長過程は、時計遺伝子の発現から個体レベルの概日リズムが形成されるまでの一連のプロセスを示す。本研究では、発芽・生長過程において概日リズムの自律的な発生とその温度摂動に対する応答を調べた。その結果、概日リズムの発生が生長ダイナミクスと密接な関係を持ち、温度摂動がリズム発生の促進、位相のリセット効果を示すことを明らかにした。

1. はじめに

原核生物からヒトに至るほとんどの生物で、約24時間の周期を示す内因性のリズムが観測される。この生体リズムは概日リズム (circadian rhythm) と呼ばれ、光や温度などの外部環境因子に対する位相同調機能、環境温度によらず周期が一定に保たれるという温度補償性、さまざまな細胞内のゆらぎに対して周期を一定に保つロバスト性など多様な高次機能を持っている。

現在、概日リズムは生物種によらず時計遺伝子の発現によって生み出されていることが分かっている。それは、時計遺伝子の転写にポジティブおよびネガティブ因子が作用し、その結果リミットサイクル振動を形成するというものである。このリズム形成機構は細胞レベルで完結し、自律振動細胞を形成する。植物や動物などの多細胞生物では、この自律振動細胞が多数存在し、これらが同期するために個体レベルの概日リズムが発生する。このように、個体レベルの概日リズムは、細胞レベルの基本リミットサイクル振動要素形成機構と個体レベルの同調機構の二つの機構から発生している。しかし、現在のところ遺伝子・細胞レベルのリミットサイクル振動の形成機構は詳細に調べられているが、個体レベルの振動子集団の同調機構についてはほとんど解明されていない。

そこで本研究では、時計遺伝子の発現から個体レベルの概日リズムが形成されるまでの一連のプロセスを示す植物種子の発芽・生長過程に着目し、その二段階のリズム形成機構を解明することを目的として研究を行った。その結果、概日リズムが生長ダイナミクスの加速度最大点で発生し、また、温度摂動により概日リズムの発生を促進し位相をリセットできることが明らかになった。

2. 実験方法

植物の概日リズムの形成機構を解明するためには、リズムの自律的な発現過程と外部からの摂動に対する応答を調べることが必要である。そこで本研究では、暗黒そして温度・湿度一定の定常環境下で植物種子を発芽・生長させ、概日リズムの自律的な発生過程を調べた。また外部摂動として温度摂動を与えそれに対するリズム発生の変化を調べた。

本研究では試料として大納言秋アズキ(学名 *Vigna angularis*)を採用した。また、平均から大きくはずれた種子を取り除くために、3500個の中から標準偏差内の重量を持つ種子だけを測定に用いた。そして、発芽生長の種子間の個体差を低減し平均的挙動を計測するために、アズキ種子30個をまとめて1つの生育容器内(W30×D5×H20cm)で発芽・生育させた。培地としてバーミキュライト500mlと純水400mlを用い、定常環境下(暗黒、温度24℃、湿度100%)で発芽させた。暗黒下での生長は子葉の養分だけを使用するために、養分を使い切ると生長は停止する。

概日リズムは呼吸代謝で発生するCO₂の放出量を計測することで求めた。呼吸代謝は生体内エネルギー物質であるアデノシン・3-リン酸(ATP)を合成する基礎的な生理代謝であり、呼吸代謝量は植物の生理活性度を反映する。また、温度摂動は全細胞に均一に作用して概日リズムの位相シフトを引き起こすことが知られている。今回の実験では3つのサンプルを用意し、それぞれ給水開始から84[h]、120[h]、144[h]の各時刻に温度摂動(12時間の間、8℃温度上昇)を与えた。

3. 実験結果

3.1 概日リズムの自発的な発生過程

温度湿度一定かつ暗黒下でアズキ種子を生育したときに見られるCO₂放出量の経時変化Qを図1(a)に示す。生育時間0[h]に種子に給水し、発芽を開始させた。CO₂放出量は生育時間0[h]から約70[h]までに急速に増加し、約70[h]から100[h]の間は一定値をとり、その後再び増加して約200[h]に最大値をとり、その後減少した。

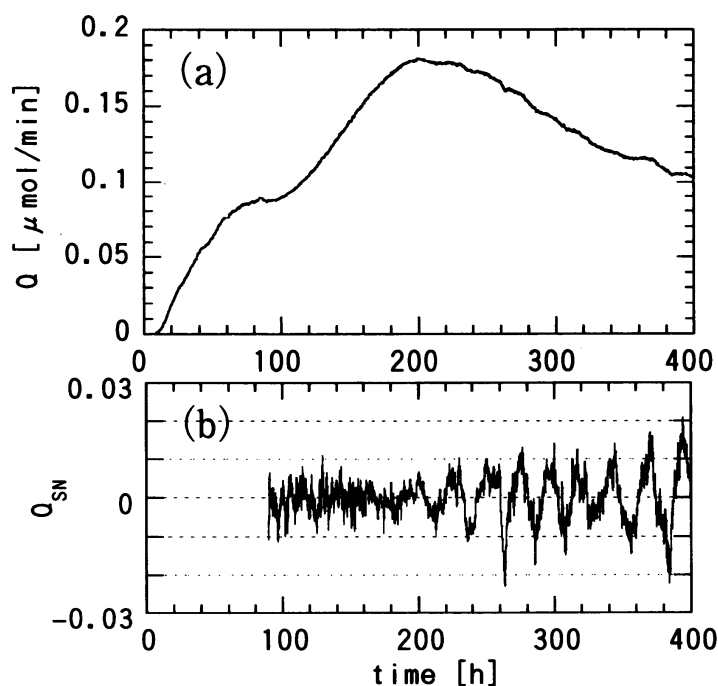


図1 CO₂放出量の経時変化
(a):1個体当たりCO₂放出量Qの経時変化。(b):短周期変動 Q_{SNO}

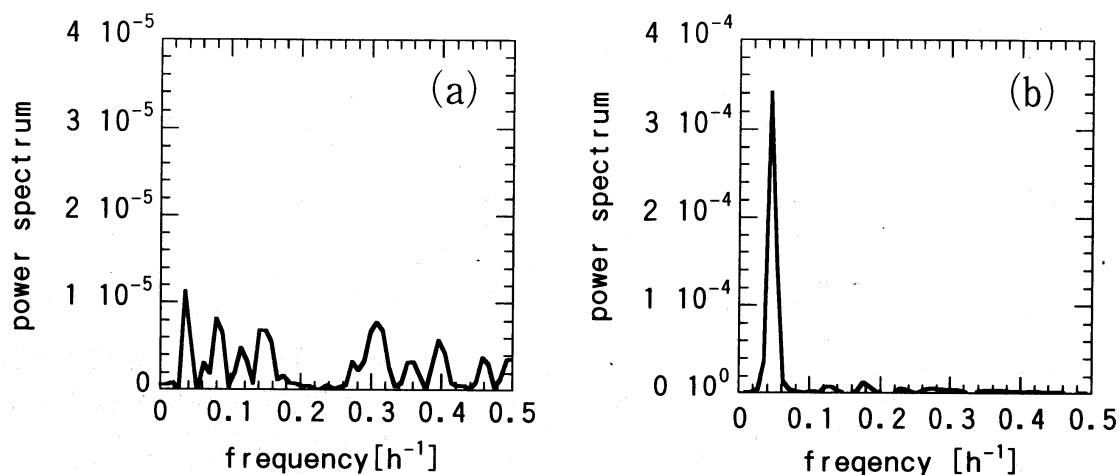


図2 短周期変動 Q_{SN} のパワースペクトル

(a)は図1(b)の時系列90-204[h]のパワースペクトル。(b)は時系列250-364[h]のパワースペクトルで周期22.8時間にピークを持つ。

CO_2 放出量 Q に見られるゆっくりとした背景変動 Q_L を差し引き、規格化した変動 $Q_{SN} = (Q - Q_L) / Q_L$ を図1(b)に示す。この Q_{SN} をもとに呼吸代謝に現れる概日リズムの発現について解析を行った。

図2(a)は Q_{SN} の90[h]から204[h]までのパワースペクトル、図2(b)は250[h]から364[h]までのパワースペクトルである。パワースペクトルを見ると90~204[h]の間には目立った周期性は観測されないが、250~364[h]では22.8時間に相当する周期に非常に鋭いパワーピークが見られる。これらから、生長段階が進み250[h]以降になると概日リズムが発生していることがわかる。

また、24時間周期成分の強度 $P(f_c)$ と全周波数成分の強度 P_0 をそれぞれ

$$P(f_c) = \int_{f_1}^{f_2} P(f) df \quad ; \quad f_1 = 0.0527 [h^{-1}], \quad f_2 = 0.0352 [h^{-1}]$$

$$P_0 = \int_{f_1'}^{f_2'} P(f) df \quad ; \quad f_1' = 0.00878 [h^{-1}], \quad f_2' = 36 [h^{-1}]$$

とし、概日リズムの規格化振幅を $P(f_c)/P_0$ と定義して、それを図3に示した。 $t=180[h]$ で $P(f_c)/P_0$ の急激な増加が観測され、この時点で概日リズムが発生していることがわかる。また、図1によればこの時刻は CO_2 放出量 Q が最大値をとる時点である。なお、ここでは Q_{SN} を20時間ずつシフトしながら113時間間隔で区切り、各区間における $P(f_c)/P_0$ をプロットした。

3.2 茎の生長と概日リズムの発生

暗黒条件、定常環境下(温度24℃、湿度100%)においてアズキを生育した場合の、茎の生長を図4に示す。発芽発根期の茎や根の生長はロジスティック方程式 $dL/dt = (a - bL)L$ で記述されることが知られている。 L は茎の長さ、 a 、 b は係数である。茎の生長データにロジスティック曲線をフィッティングし、生長の速度 (dL/dt)と加速度 (d^2L/dt^2)を求めると、生長の速度が最大になる

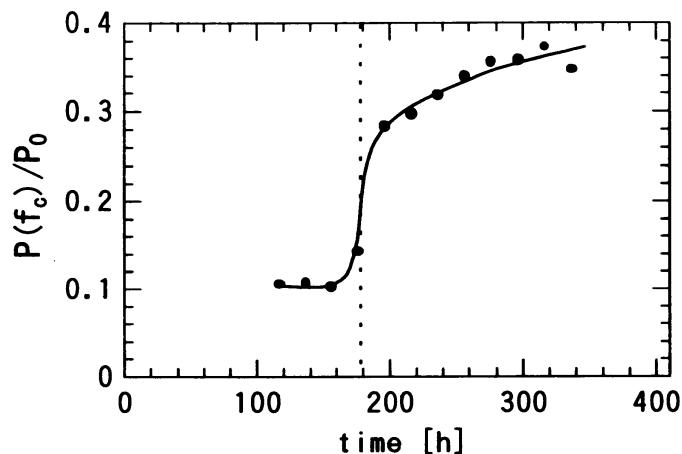


図3 概日リズムの規格化振幅
生育時間 180[h]で概日リズムの振幅が急激に増加している。

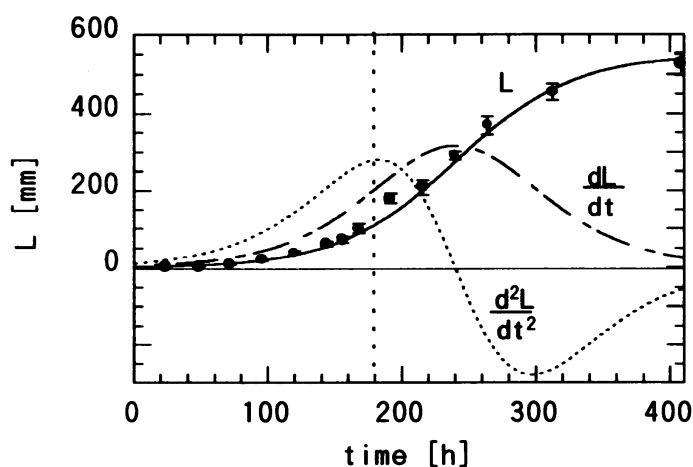


図4 茎の生長
各点は 15～30個体の平均値であり、エラーバーは標準誤差である。茎の生長をロジスティック曲線でフィッティングし、生長速度(dL/dt)と生長加速度(d^2L/dt^2)を求めた。

のは生育時間 240[h]、加速度が最大になる時点は生育時間 180[h]であった。このことから、生長の加速度が最大になる時間と概日リズムが形成される時間、呼吸量が最大になる時間の三つが一致していることがわかった。

3.3 温度摂動による概日リズム発現と位相リセット

図5に温度摂動を各々 84、120、144[h]に与えたときに得られる CO_2 放出量 Q の経時変化を示した。3つの実験とも温度摂動を与えた時点で CO_2 放出量の大きな増加が見られた。これは温度上昇による植物の生理活性の上昇による。また、これらから図2(b)と同じ方法によって規格化した変動 Q_{SN} を求めた(図6)。この結果、温度摂動を給水開始から 120[h]、144[h]後に与えると、本来摂動がない場合にはリズムが存在しないにもかかわらず、摂動直後から概日リズムが発現することがわかった(図6(b)、(c))。しかし、温度摂動を 84[h]後に与えた場合には、摂動による概日リズムの誘起はなかった(図6(a))。このことから、生長段階に応じて温度摂動によるリズム発生が異なり、リズム発現機能がどの生長段階で生まれるかが判別できる。

一方、温度摂動を与えた時点と概日リズムの位相との関係に着目すると、温度摂動を与え始めた時点がその後発現する概日リズムの頂点位相に一致していた(図6)。このことから、温度摂動には概日リズムの位相をリセットする効果があることがわかった。これも、発現機能の形成と密接な関係を持つと考えられる。

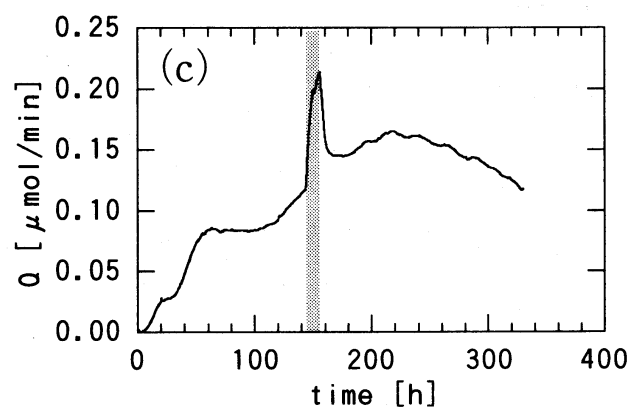
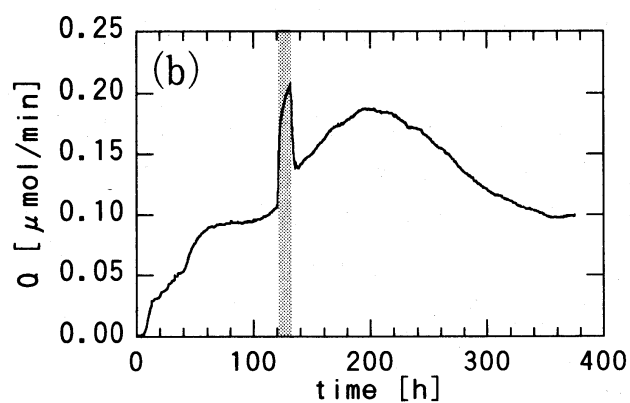
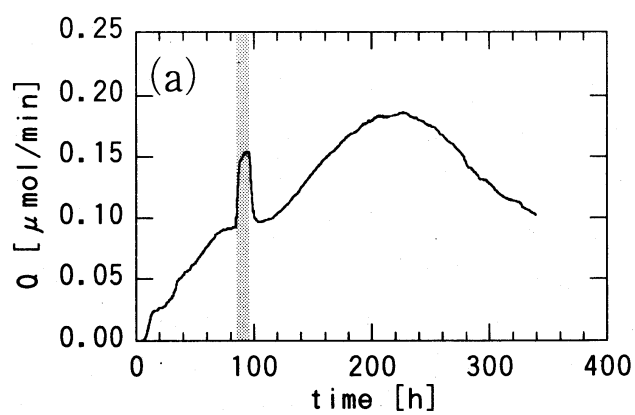


図5 CO₂放出量 Q の経時変化

(a)、(b)、(c)はそれぞれ生育時間84、120、144時間に温度摂動を与えている。■は温度摂動を表している。

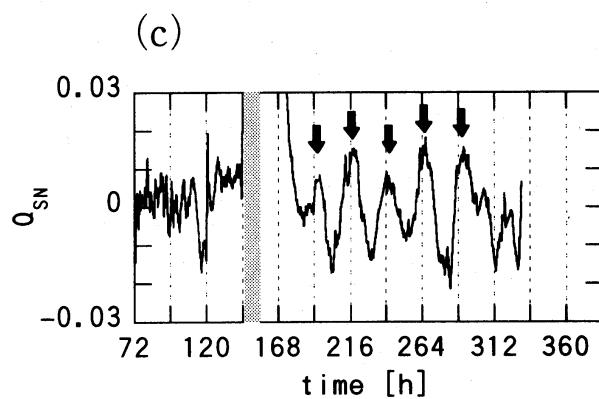
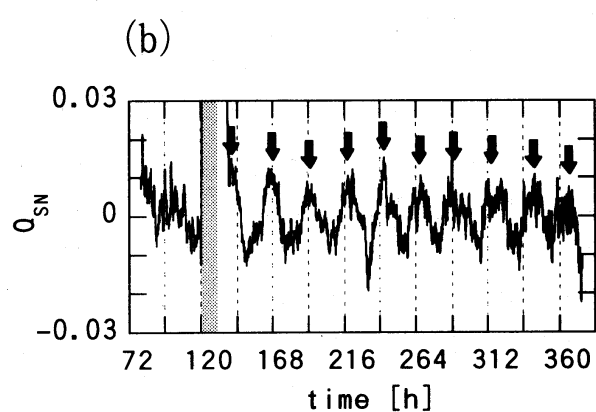
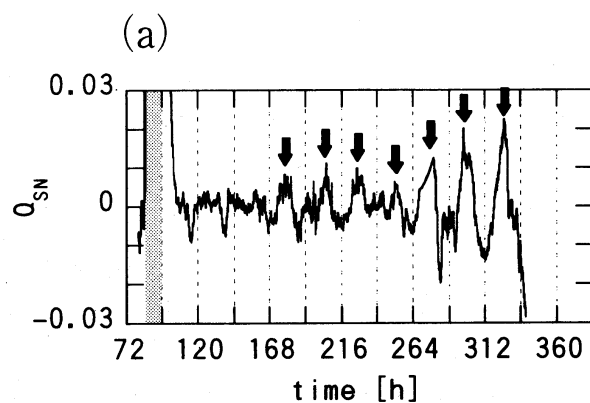


図6 短周期変動 Q_{SN}

(a)、(b)、(c)はそれぞれ生育時間84、120、144時間に温度摂動を与えている。■は温度摂動を表している。温度刺激によりリズムの発生が促進され位相がリセットされている。

概日リズムが自発的に発生する時間は、呼吸代謝が最も盛んであり、茎の生長加速度が最大になる時間であることが明らかになった。呼吸代謝量や生長の加速度は細胞分裂・細胞伸長などの活性度を反映していることから、概日リズムは生体物質の生成がもっとも盛んな生長段階、すなわち多くの器官が形成・分化する段階から発生していると考えられる。このことから、概日リズムの発生は、生長ダイナミクスをベースにしてそのダイナミクスを記述することが可能と考えられる。

個体レベルのマクロな概日リズムは、大きく分けて2つプロセスから発生している。一つは時計遺伝子の転写制御による自律振動細胞の形成であり、もう一つは自律振動細胞集団の同期である。つまり、細胞レベルのリミットサイクル形成機構と個体レベルの振動子集団の同期機構という異なった二つの機構からマクロな概日リズムは生み出されている。そこで、今回得られた実験結果をもとにマクロな概日リズムの発生過程を考察すると、現時点では二つのリズム発生過程が考えられる。

(仮説1) 生育時間0から180時間までに、時計遺伝子の転写・翻訳により自律振動細胞が多数形成される。しかし、形成されてすぐの自律振動細胞の集団はある種の伝達物質の介在がまだ十分ないために位相が揃っていない(あるいは揃えられていない)ため、集団としての個体全体の概日リズムは現れない。しかし、この状態に温度摂動を与え個々の振動細胞の位相をリセットし強制的に同期させると、個体全体のリズムが現れる。一方、摂動がない場合には、生育時間が180時間を過ぎると同期のための条件が整い、振動細胞集団が自律的に同期し個体全体としてのリズムが現れる。

(仮説2) 生育時間180時間までに、時計遺伝子は発現しておらず、細胞レベルの概日リズムは形成されていない。そのため、個体レベルの概日リズムも現れない。しかし、この状態に温度摂動を与えると、時計遺伝子の発現が促進され、同時に多数の自律振動細胞が形成される。その結果、個体レベルの概日リズムも同時に形成される。一方、摂動がない場合には生育時間が180時間を過ぎると、時計遺伝子の発現が始まり概日リズムが形成される。

仮説1、2のどちらが正しいかは現在わからないが、リミットサイクル形成機構と振動子集団の同期機構の二つの異なった機構が関与していることには変わりない。これらを分離して計測できる手法を開発することが必要であり、現在その試みを行っている。

5. 結論

本研究では、植物の発芽生長期における概日リズムの発生過程と、発生点近傍における温度摂動に対する応答を調べた。その結果、生理活性が最も高まる生長段階に達すると概日リズムが自発的に発生すること、温度摂動によってリズムの発生を促進でき位相をリセットできることが明らかになった。しかし、概日リズムでは細胞レベルのリミットサイクルの形成機構と個体レベルの振動子集団の同期機構がどのように組み合わさっているのかまだ明らかになっていない。今後、いろいろな生長段階に様々な強度のパルス型摂動、ノイズ型摂動を与えその応答を調べることで、概日リズムの発生機構を解明することができると期待される。