

# 研究報告書

## 「体内時計に見る植物システムの創発原理」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 福田 弘和

### 1. 研究のねらい

21世紀は植物利用が広まると予想されている。農作物としての植物はこれまでも重要視されてきたが、今後は環境保全のための緑化植物、医薬用原材料となる有用遺伝子導入植物、セラピー用植物、環境浄化植物、代替エネルギーとしてのバイオマス、さらには植物システムの工学的模倣(プラント・ミメティックス)など、多くの植物利用が期待されている。これらにおいて植物システムの数理科学的解明、特に「植物システムの動作原理の数理科学的解明」は、植物生産技術の発展に貢献し、工学応用に対する基盤となり重要である。また、植物は地球上で最も繁栄している種の一つであり、山岳、海辺、砂漠、熱帯雨林など、環境条件が大きく異なっても植物システムの基本構造は変わらない。この構造普遍性は、植物システムが多様な環境適応機能を発するシステムとして理想的であることを意味している。理想的なシステムである植物システムは、独自の創発原理に基づいた自己組織化現象を利用しながら、情報を処理し、環境適応していると思われる。その創発原理を見出すことは、生物の基本原理の解明に貢献すると考えられる。しかしながら、植物特有の自己組織化現象やそれを司る原理(創発原理)を探索する研究はほとんどない。

過去に植物の自己組織化現象がほとんど研究されてこなかった原因は、実験方法が充分でなかったことにある。しかし最近では、植物分子生物学の進展や計測システムの発達の結果、特に体内時計に関わる自己組織化現象が明らかにされつつある。例えば、葉におけるスパイラル波の解析の結果、細胞間の長距離結合を担う葉脈ネットワークの特徴が明らかにされ、また根の先端における縞状の時空間パターンの観察から根端における時計細胞増殖過程について新たな知見が得られている。現在のところ、器官レベルにおける断片的な知見しか得られていないが、断片的な知見を数理モデル用いて繋ぎ合わせ、コンピュータ・シミュレーションを利用することで、個体統合レベルにおける創発現象の発見とメカニズムの解明が可能になると考えられる。

そこで本研究では、体内時計の結合振動子モデルを構築することで、植物特有のネットワーク構造を数理モデル化し、その数理モデルの中に植物特有の創発原理を見出すことを試みる。また、応用研究を積極的に行い、産業利用への可能性を探索する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

植物システムに特有の自己組織化現象やそれを司る創発原理の解明は、植物の高度な環境適応機能の解明とその工学的応用、ならびに植物生産技術イノベーションの視点から重要である。特に、分子機構が解明されその生理的重要性が指摘されている体内時計に着目することは、応用面で大きな利点がある。本研究では、一つ一つの細胞に備わった体内時計が近

接・長距離の相互作用を通じて様々な時空間パターンを形成する様子を解析し、その形成機構を数理モデル化することを目指した。また、外部摂動に対する概日リズムの位相応答に着目し、時空間パターンの制御法についても研究を行った。これにより、植物システムがもつ特有の創発原理を明らかにしつつ、産業利用への可能性を探索した。

## (2) 詳細

### 1) 成長点が生み出す特異的な脱同期パターンの発見

胚や成長点など、形成されたばかりの細胞集団において、「体内時計」はどのように振舞っているのか？「多細胞生物の器官発生」におけるこの基本課題は、最近、ES 細胞や iPS 細胞を用いた研究によって解明の糸口が見出されつつあるが、器官形成過程における時空間ダイナミクスの精密な観察データは得られていなかった。そこで、本研究では植物の根が成長点を半永久的に維持できる「無限成長器官」であることに着目し、器官形成過程における体内時計の振る舞いを明らかにすることを試みた。ルシフェラーゼ遺伝子を用いた時計遺伝子の時空間的な発現解析を行った結果、①根の先端における成長点の体内時計は常に位相のリセットを受けていること、そして驚くべきことに、②その位相リセットの効果は根全体に波及し2階層の“脱”同期パターンを自発形成することが分かった(H. Fukuda, et al., Phys. Rev. E, 2012) (図1)。一つは、根全体の位相がストライプ状に脱同期した「マクロな脱同期パターン(ストライプ波)」であり、もう一つは根の断面内の細胞集団が脱同期する「ミクロな脱同期パターン(シンギュラリティ現象)」である。さらに、その脱同期パターンと根の形態形成(側根の成長点の発生)には明確な関係があることも判明した。

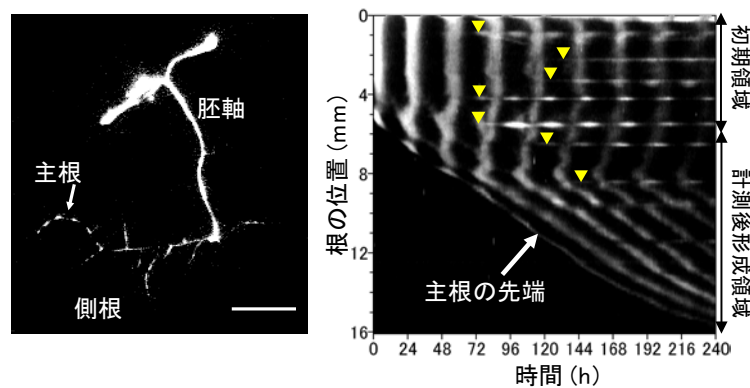


図1 連続暗条件下で成長するシロイヌナズナにおけるルシフェラーゼ発光。時計遺伝子 *CCA1* の発現 LUC 発光解析(左)とその時空間プロット(右)

### 2) 個体レベルの体内時計の挙動解明

本研究者は、さきがけ研究以前に、器官レベル(葉)における体内時計の時空間ダイナミクスの解析に成功していた。そこでは、原形質連絡による細胞間の近接相互作用と維管束系を利用した長距離の相互作用を数理モデルに取り込み、器官レベルでのモデリングにも成功していた。しかしながら、器官同士の同期現象については観察できていなかった。今回、*in situ*における概日リズムの時空間計測に成功し、器官間の同期が自身では維持できないことを示した。

つまり維管束を介した長距離の相互作用が個体全体を同期させるほど強くないことを明らかにした。この実験事実は、個体全体のモデル構築において重要な知見となっている。

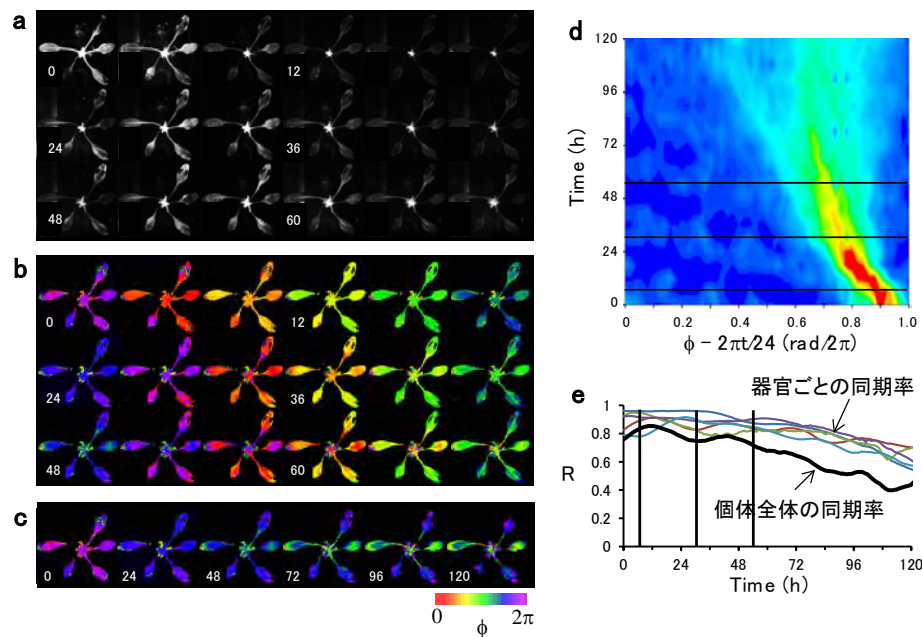


図2 個体レベルにおける *CCA1* の発現レポーター発光と位相イメージ。*CCA1::LUC* 発光(a)と位相(b,c)のスナップショット。(d)位相分布の時間変化。(e)同期率  $R$  の時間変化。

### 3) 環境摂動による体内時計の制御法の開発

植物の体内時計システムが無数の細胞レベルの振動子の集団で構成されていることから、その同期制御によって個体レベルのリズム制御が可能であると期待される。まず短時間の暗期(ダークパルス)に対する位相応答関数(図3b)と位相振動子モデルを利用して数値シミュレーションによって細胞集団の同期応答を予測した(図3d)。また複数回ダークパルスによる、リズムの消失(シンギュラリティー現象)、リズムの減衰と回復、短周期(長周期)外力による引き込み現象を予測した。次にその予測に基づいて、シロイヌナズナ *CCA1::LUC* を用いた実験を行い、理論の精度が高いことを実証した。これらの成果は、人工光を用いた植物栽培における高度な体内時計制御の基礎として重要となっている。

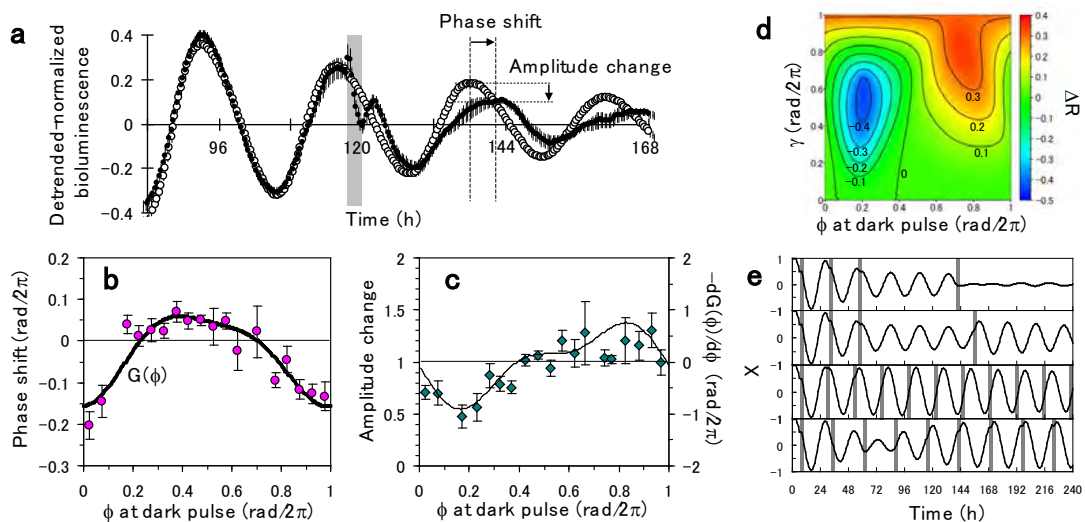


図3 ダークパルスによる概日リズムの制御。(a)ダークパルスによる位相シフトと振幅変化。(b)位相応答曲線。(c)振幅応答曲線。(d)ダークパルスが細胞集団の同期率  $R$  に与える影響をシミュレーションした結果。(e)複数回のダークパルスによる、リズムの消失(シンギュラリティー現象)、リズムの減衰と回復、短周期(長周期)外力による引き込み、の数値シミュレーションの結果。

#### 4) 体内時計の制御理論を実践するための基礎研究と制御機器開発

農産業イノベーションとして注目されている植物工場を念頭に、商業用として普及しているレタスに着目した研究を行った。まず、レタスの体内時計を計測システム同定するためにレポーター遺伝子 *LUC* を導入した遺伝子組換えレタス *AtCCA1::LUC* を作出し、これまでシロイヌナズナで明らかにしてきた時空間ダイナミクス(葉における位相波や根におけるストライプ波)がレタスにおいても同様に生じることを示した(図4a)。次に、レタスはシロイヌナズナと比べサイズが大きく専用計測機器を必要としたため、レタス用の特殊計測システムを開発した(図4b)。これによって、3)で開発した環境摂動による体内時計の制御法を応用する研究を行うことができた。

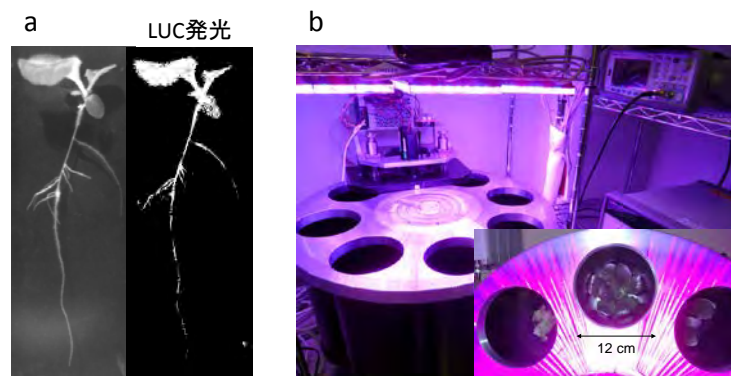


図4 *AtCCA1::LUC* レタスのルシフェラーゼ発光に見られるストライプパターン(a)とレタス用概日リズム計測システム(b)



### 3. 今後の展開

さきがけ研究の成果を利用し、農産業イノベーションの一つとして注目されている植物工場に特化した研究を推進する。特に、細胞から個体レベルに渡って植物の生理代謝を包括的に制御することを目指し、新規の学術体系である「体内時計制御工学」を創生していく。ここでは最新鋭の研究システム(研究装置)を独自に開発しながら、「数万の遺伝子や数千の代謝情報を包括的に扱うための理論基盤・技術の創出」と「細胞から個体レベルまでの全階層を繋ぎ、全体として制御するための理論基盤・技術の創出」を目的に行う。最終的には、膨大な分子診断データから細胞間・器官間の相互作用までを記述できる複合的な数理モデルを開発し、植物生産を最適化する代謝制御のための全階層型で包括的な理論体系を構築していく。体内時計制御工学の理論体系として、3つのモデルを想定している。①Clock Cells Network (CCN)モデル、②Clock Genes Network (CGN)モデル、③Omics in Dynamic Multi-Environment (ODME)モデルである。本さきがけ研究では、①に関する研究を世界に先駆けて展開した。今後、②と③のモデル構築ならびに、その実用化に向けた研究を推進する。

このような基礎研究を推進することで、植物工場の作物対象として近年急速に拡大傾向にある高機能植物(ハーブ類や薬用植物)の2次代謝産物も取扱い可能な技術開発を目指す。ここ数年は、レタスとシソをモデル作物として研究を進める。

### 4. 自己評価

本研究では、分子機構が解明されその生理的重要性が指摘されている体内時計に着目し、植物システムに特有の自己組織化現象やそれを司る創発原理の解明、ならびにその応用研究を実施した。この研究テーマは基礎と応用の両方において一体となった発展が期待できるにもかかわらず、それを示す研究例がないという状況があった。つまり、さきがけ研究の後に継続して発展させることができるかどうか不安を抱えた出発であった。そこで本研究では、研究テーマの全体像を浮き上がらせ、研究テーマの意義を広く説明できるように、基礎から応用までの幅広い取り組みを行った。

本研究の成果、①【新規現象の発見と数理モデル構築】根の成長点が自発形成するストライプ波(Phys.Rev.E 2012)、②【制御のための数理モデル開発と実証実験】環境摂動による概日リズム制御(submitted)、③【応用のための基盤的研究】商用植物レタスにおける時空間パターンの観察(Environ. Control Biol. 2012)、④【基礎と応用の展開】現在研究中である非公開の成果は、どれも先進的であり当該研究分野の歴史に残る業績となると考えている。

体内時計の数理モデルという一つの研究アイデアを、生命科学の根本課題(成長点における体内時計の挙動解明など)や産業イノベーション(植物工場における体内時計制御)へ展開できた点は、評価できる一歩であったと考えている。

### 5. 研究総括の見解

植物は独自の創発原理にもとづいた自己組織化現象により多様な環境への適応機能を有しているという認識のもとに、植物の体内時計に関する自己組織化現象に着目して、細胞を自立振動子として捉えて数理モデル化することによりその創発原理の解明に挑戦した。まず、シロイヌナズナの根の先端における時計遺伝子の発現解析から、根の成長点における特異的な脱同期現象を見出し、それを数理モデルを用いて再現するという興味深い基礎的な研究成果をあげた。さ

らに環境摂動による体内時計の制御法も開発して、人工光を用いてレタス等の植物を水耕栽培する植物工場での応用に結び付けるなど、実用への道を開拓した。なお、本人の属する大阪府立大学では植物工場が目玉プロジェクトになっており、そのキーマンとしても活動中で、これらさがけ研究の成果を大阪府立大学から植物工場の特許として、国内2件、海外1件の特許出願を行ったことも特筆される。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Kazuya Ukai, Kouji Inai, Norihito Nakamichi, Hiroki Ashida, Akiho Yokota, Yusuf Hendrawan, Haruhiko Murase, Hirokazu Fukuda\* “Traveling waves of circadian gene expression in lettuce” *Environ. Control Biol.*, vol. 50, 237–246 (2012).
2. Hirokazu Fukuda, Kazuya Ukai, Tokitaka Oyama “Self-arrangement of Cellular Circadian Rhythms Through Phase Resetting in Plant Roots” *Physical Review E* 86, 041917(1–5) (2012).
3. Hirokazu Fukuda, Isao Tokuda, Seiichi Hashimoto, Naoto Hayasaka “Quantitative Analysis of Phase Wave of Gene Expression in the Mammalian Central Circadian Clock Network” *PloS one*, 6, e23568(1–8) (2011).
4. Hirokazu Fukuda, Haruhiko Murase, Isao Tokuda “Controlling Circadian Rhythms by Dark-Pulse Perturbations in *Arabidopsis thaliana*”, submitted.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 3 件

1.

発 明 者: 福田 弘和、山川 浩延

発明の名称: 植物栽培方法及び体内時計最適化植物栽培装置

出 願 人: 公立大学法人大阪府立大学、三洋電機株式会社

出 願 日: 2011/1/27

出 願 番 号: 特願2011-44317

2.

発 明 者: 福田 弘和、山川 浩延

発明の名称: 分子診断型植物工場及び分子診断方法

出 願 人: 公立大学法人大阪府立大学、三洋電機株式会社

出 願 日: 2011/3/1

出 願 番 号: 特願2011-14721

3.

発 明 者: 福田 弘和

発明の名称: 植物栽培装置

出 願 人: 公立大学法人大阪府立大学

出 願 日: 2012/1/27

出 願 番 号: PCT/JP2012/51784



(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. ゴードン会議(化学反応系における振動と動的不安定性)(ルッカ、イタリア)

Spiral waves in two-dimensional circadian oscillator networks in plant leaf. 2010/7/2

2. 欧州時間生物学会 short communication にて依頼講演(オックスフォード、イギリス)

Striped moving pattern of circadian rhythm in plant roots. 2011/8/19

3. ゴードン会議(化学反応系における振動と動的不安定性)(ウォータールー、アメリカ)

Striped moving pattern and self-desynchronization of circadian rhythms in plant roots.  
2012/7/15

受賞

1. 計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会 SI2011 優秀講演賞, 計測自動制御学会, 2011/12/25

2. 日本生物環境工学会 論文賞「時計遺伝子の発現解析による早期苗診断法」, 日本生物環境工学会, 2012/9/6

著作物

1. 福田弘和、「多振動子系としてみた植物の概日時計システム」時間生物学, vol. 17, pp. 75-81 (2011).

2. 福田弘和, 鶴飼和也、「植物工場における体内時計の制御技術」化学工学, vol.75, pp. 802-806 (2011).

3. 福田弘和、「体内時計制御の植物工場への応用」体内時計の科学と産業応用, シーエムシー, (2011).

4. 岡山毅、福田弘和\*, 村瀬治比古

「植物工場のシステム制御」太陽光型植物工場(第3章), 養賢堂 (2012).

プレスリリース等

1. BS ジャパン・地球アステク(テレビ放送) #67 「植物工場の最新技術に迫る!」/大阪府立大学 植物工場研究センター2012/7/12(出演時間約10分)

2. NHK・あほやねんすきやねん(テレビ放送)

大阪府立大学バイオプロダクション工学研究室 2012/12/12(出演時間約40分)