

称号及び氏名 博士（工学） 関 直基

学位授与の日付 2018年3月31日

論文名 「植物概日時計における位相特異点の生成と
植物生産への応用に関する研究」

論文審査委員 主査 吉田 篤正
副査 横山 良平
副査 須賀 一彦
副査 福田 弘和

論文要旨

近年、農業従事者不足や食の安心・安全の問題から植物工場が注目を集めてきている。世界での植物工場の始まりは、1957年のデンマークだと言われている。日本では1974年に日立製作所中央研究所において始まっている。植物工場とは施設内で植物の生育環境を制御して栽培を行う施設園芸のうち、環境および生産のモニタリングを基準として高度な環境制御と生育予測を行うことにより、野菜等の植物の周年ならびに計画生産が可能な栽培施設とされている。この植物工場には大きく分けて2種類ある。一つは太陽光利用型と呼ばれるもので、もう一つが完全制御型と呼ばれるものである。完全制御型植物工場では太陽光を使用せず蛍光灯やLEDを用いたり、気温や湿度、気流、養液、二酸化炭素濃度などを調整したりして栽培をしている。そのため、完全制御型の植物工場では厳密な環境調節のもと収量の増加や高付加価値化のための研究が行われている。

光環境の調整は他の環境条件に比べて容易なため、光の強度や周期などに関する研究が行われている。これにより、生育期間の短縮や収量の増加が期待されている。また、植物はストレスを受けると、二次代謝物を生成することにより食料ならびに医薬品原料としての品質が変わることが知られている。そのため、光により制御が容易で、広範囲に代謝活動を調整していると知られている概日時計に注目が集まっている。

概日時計はほとんどの生物がもっている約24時間のリズムであり、体内時計とも呼ばれる。植物においては哺乳類における視交叉上核のような中枢時計と呼ばれるものは存在せず、それぞれの細胞が自律的にリズムを刻む自律分散系であるとされている。このリズムは時計遺伝子とよばれる遺伝子群の発現ネットワークによって生み出されている。これらの遺伝子は発現するピークがそれぞれで異なっており、互いに転写を抑制するネガティブフィードバックループを形成し、それにより約24時間の概日リズムが形成されている。植物ではそれぞれの細胞でリズムが生み

出され、そのリズムは細胞間の相互作用により個体全体として同期している。このようなシステムは多振動子系と呼ばれており、特に葉においては葉の平面に対して厚みがおおよそ無視できるので2次元の多振動子系、根は1次元または円柱状の多振動子系と考えることができる。このようなシステムでは、様々な時空間パターンが形成されることが知られており、物理学の観点から研究が行われてきた。

通常の葉では細胞間の相互作用や外環境からの刺激などにより細胞集団で同期しており、細胞毎の概日リズムに大きな差はない。しかしながら、特殊な光条件下や、外環境からの刺激がない恒常条件下におくと各細胞の概日リズムの位相（体内時刻）に差が生じ、スパイラル波やスクロール波と呼ばれる時空間パターンが発生することがある。スパイラル波とは、ある点（細胞）を中心としてその周辺の細胞の体内時刻が時計回りあるいは反時計回りに連続して存在し、これが渦状に回転している現象である。この中心点は位相特異点と呼ばれる。スパイラル波が3次元の構造になるとスクロール波と呼ばれ、スクロール波の中心は位相特異線となる。これらの時空間パターンはトポロジカルに安定して存在することができるため、継続的に植物へ影響を与えることができるかと予想される。しかしながら、スパイラル波はヒトの心臓でも起こることが知られているが、植物においてはほとんど観察されていない。

本研究では、植物の概日時計におけるスパイラル波ならびにスクロール波に着目した。概日時計は光を用いて制御することが容易である。そこで、制御が単純な短時間の暗期刺激（ダークパルス）を概日時計への摂動として用いてスパイラル波の生成を行った。この環境操作は、単純な照明のON/OFF制御によって実現できるため、植物生産に応用することが容易である。また、スパイラル波などの現象は植物種に関わらず起こると考えられる普遍的な現象であり一般性が高い。そこで本研究では、まずはスパイラル波を制御するために遺伝子組換え植物を用いた細胞レベルの概日リズムの計測や数値計算による光条件の探索をおこない、それらによって作物のレタスを対象にスパイラル波による生育への影響の解析と生産への応用方法を検討した。

本論文は5章構成となっている。以下に各章の構成と概要を記す。

第1章では研究の背景・目的について述べ、各章の構成について述べる。

第2章では、植物におけるスパイラル波ならびにスクロール波の生成について述べている。実験ではモデル植物であるシロイヌナズナの遺伝子組換え体を用いた。これは、時計遺伝子である**CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1(CCA1)**遺伝子の発現量に応じて発光する。このシロイヌナズナの切除葉または根を、高感度冷却**CCD**カメラを用いて撮影して画像を解析することで、細胞レベルの概日リズムを可視化した。計測は外環境からの刺激をなくすために暗箱内の温度制御された環境で行った。葉では時計回りと反時計回りのスパイラル波が同時に生成する対生成や、逆に2つのスパイラル波が衝突して消滅する対消滅が観察できた。根においてもスパイラル波が発生している様子が観察できた。これらのスパイラル波は計測開始から1週間近く経過してから観察された。スパイラル波が観測されなかった葉では1週間も経過しない内に劣化し、発光が計測できなくなった。数値シミュレーションでは葉と根でそれぞれ個別の数理モデルを構築して計算を行った。葉では先行研究の数理モデルに細胞の劣化を表すパラメータを追加することでスパイラル波が自発的に対生成・対消滅することを示した。根においては3次元でモデルを構築し解析をすることで根の表面に発生したスパイラル波がその内部に伸びてスクロール波を形成していることを示した。また、スクロール波の形成プロセスを数値シミュレーションすることができた。

第3章では、植物概日時計の細胞レベルでの制御について述べている。ここでは植物工場における主要な生産品目であるレタスを供試植物として用いた。本章では概日リズムを計測するために遺伝子組換えレタス(**AtCCA1::LUC**)の切除葉を使用した。概日時計の制御には光を用いた。光源は液晶プロジェクタとレーザープロジェクタを用いて光質による違いを考察した。いずれの光源においても照射した光に細胞レベルで同期する様子が計測できた。レーザープロジェクタの光は栽培に必要な光量と比べると非常に弱い光であったが概日リズムの制御を行うことが可能であることが示された。これらの実験結果によって、概日リズムの制御には光量や光質よりも明暗のコントラストが大きいことが重要であることが示唆された。また、光に同期した状態は数日間維

持された後、同期状態が崩壊していった。これは先行研究での細胞間の位相遅れによる影響や細胞の概日リズムの振幅が時間とともに減衰したことによると推察された。

第4章では短い暗期刺激であるダークパルスを用いたスパイラル波の人工生成による影響について述べている。ここではダークパルスの照射によってスパイラル波が生成する条件を数値シミュレーションによって求めた。ダークパルスの強さとパルスを照射するタイミング、そして照射回数に対するスパイラル波の生成確率を求めたところ、植物の体内時刻が主観的な夜の位相にダークパルスを与えることでスパイラル波が発生することが分かった。また、実験では植物工場での主要な生産品目であるレタスを供試植物として用いた。ダークパルスを照射すると同時に乾燥ストレスへの耐性を調べる栽培実験を行った。乾燥ストレスとして塩水を使用し塩水溶液の濃度の違いに対する生育の影響を調べた。ダークパルスを与える条件としては、スパイラル波を生成するタイミングの条件と、コントロール条件としてその時刻から12時間(半周期)遅らせたタイミングの条件ならびにダークパルスを与えない条件で行った。栽培実験では生重量と乾燥重量を計測した。生重量・乾燥重量ともにダークパルスを与えない条件が最大値となった。一方で、スパイラル波の生成する条件は最小値になり、生育においてストレスとなっていることが分かった。また、塩水での栽培実験では葉面積を比較することで、スパイラル波による塩(乾燥)ストレスへのストレス耐性の獲得について明らかにした。

第5章では結論について述べている。

以上により、本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナでの葉と根においてスパイラル波とスクロール波の計測と数値シミュレーションにおける生成条件を示した。また、ダークパルスにより概日時計に位相特異点を発生させることができることを示した。この手法を用いてスパイラル波を植物に発生させ栽培することで、植物にストレス耐性や生育の調整ができる可能性を示した。これによって、位相特異点(スパイラル波ならびにスクロール波)の植物生産への応用の可能性を示すことができた。

審査結果の要旨

本研究では、スパイラル波を制御するために遺伝子組換え植物を用いた細胞レベルの概日リズムの計測や数値計算による光条件の探索を行い、それらによって作物のレタスを対象にスパイラル波による生育への影響の解析と生産への応用方法を検討した。本研究で得られた知見は以下の通りである。

(1) モデル植物であるシロイヌナズナの遺伝子組換え体を用いた実験を実施し、時計遺伝子の発現量に応じて発光を、高感度冷却 CCD カメラを用いて撮影して画像を解析することで、細胞レベルの概日リズムを可視化した。葉ではスパイラル波の対生成や対消滅が観察できた。根においてもスパイラル波が発生している様子が観察できた。数値シミュレーションでは葉と根でそれぞれ個別の数理モデルを構築して計算を行った。葉ではスパイラル波の自発的な対生成・対消滅、根においてはスクロール波の形成を示した。

(2) 植物概日時計の細胞レベルでの制御を、レタスの切除葉を対象に、液晶プロジェクタとレーザープロジェクタによる光刺激により実現した。概日リズムの制御には光量や光質よりも明暗のコントラストが大きいことが重要であることが示唆された。光に同期した状態は数日間維持された後、同期状態が崩壊することが観測された。

(3) 短い暗期刺激であるダークパルスの照射によってスパイラル波が生成する条件を数値シミュレーションによって求めた。実験ではレタスを供試植物として用い、ダークパルスを照射すると同時に乾燥ストレスへの耐性を調べる栽培実験を行った。生重量・乾燥重量ともにダークパルスを与えない条件が最大値となった。一方で、スパイラル波の生成する条件は最小値になり、生育においてストレスとなっ

ていることが分かった。葉面積を比較することで、スパイラル波による乾燥ストレスへのストレス耐性の獲得について明らかにした。

以上の研究成果は、位相特異点（スパイラル波ならびにスクロール波）を植物に発生させ栽培することで、植物にストレス耐性や生育の調整ができる可能性を示した。植物概日時計を組み込んだ新たな植物生産の実現に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動をおこなうにあたり、十分な能力と学識を有することを証するものである。