

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03245

研究課題名(和文)植物の概日時計遺伝子機能に関する細胞自律性と組織依存性の解明

研究課題名(英文)Studies of the cell autonomy and tissue dependency of clock-gene functions in plants

研究代表者

小山 時隆(Oyama, Tokitaka)

京都大学・理学研究科・准教授

研究者番号：30324396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は概日時計単位である細胞から時計機能が意味を持つ個体レベルまでの統合的な概日時計システムの理解を目指して、植物の細胞概日リズムの挙動の解析と時計遺伝子に対する影響評価をおこなった。シロイヌナズナおよびウキクサ植物を材料に新たな発光概日レポーター観測系を構築することで、孤立した細胞の概日時計の性質、増殖する個体レベルでの自律的な概日リズムの秩序形成様式、さらには同一細胞内で細胞時計の影響から独立した生理学的概日リズムの存在を実証的に明らかにした。これらはそれ以前の常識的な発想を超える革新的な成果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物個体内で細胞時計と細胞の概日リズムが分離可能であることを本研究で明確に示したことで、植物の概日時計システムの基本的な概念を新たに提案することができた。この点は、時間生物学分野に加えて一般的な植物生理学分野にも広く新たな展開を引き起こすと期待される。また、生物発光測定技術や遺伝子改変技術についての革新的な成果は、植物に限らず細胞レベルの遺伝子発現解析・機能解析に広く応用されていくと期待される。

研究成果の概要(英文)：The plant circadian system is based on self-sustained cellular oscillations and these cellular clocks are coordinated in the plant body. In order to understand the plant circadian system from the aspect of cellular clocks, the bioluminescence reporter system was utilized for Arabidopsis and duckweed plants at a single cell level. Characterization of circadian rhythms of isolated cells, cells in the plant, and proliferating plants was done and the spontaneous order formation of circadian rhythms in the plant was analyzed. A Tool for gene disruption by the CRISPR/cas9 system and a dual-color luminescence monitoring system were developed and evaluated. A cellular circadian rhythm that was unaffected by perturbation of clock gene expression was revealed. The existence of a cellular physiological rhythm that is uncoupled with the cellular clock provides a new insight into our understanding of the plant circadian system.

研究分野：時間生物学、植物生理学

キーワード：概日時計 植物細胞 時計遺伝子 発光レポーター 細胞間相互作用 細胞自律性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物は1日の周期的環境変動への適応機構を数多くもつが、約24時間の周期を生み出す概日時計はその鍵となる装置に位置付けられる。真核生物では転写調節に関わる因子をコードする時計遺伝子群がフィードバック回路を構成することで、細胞自律的に発振する概日時計(細胞時計)を形成している。また、これらの時計遺伝子機能(活性)が生物内外の環境変動の影響を受けることで概日時計の時刻/ペースが変化し、昼夜の周期的外部環境に時計が同調することができる。このような概日時計システムの基本構造は生物で一般的に当てはまる。さらに、動物や植物など多細胞生物においては個々の細胞時計が生み出す時間を統合して、個体レベルで調和した時間を刻んでいると考えられている。

本研究の対象材料である植物においては、モデル植物であるシロイヌナズナから20を超える時計関連遺伝子が同定されており、それらの遺伝子に異常をもつ変異体の概日リズム表現型やコードするタンパク質の機能などから概日時計システムでの働きが理解されてきた。一方で、植物の時計関連遺伝子のほとんどは個体あるいは器官/組織レベルでの概日リズム解析に基づいて機能や役割が論じられており、細胞時計の発振に直接関与するのか、あるいは個体レベルでの概日リズムに働くなど高次の時間統合/調和に関与するのかについては不明な点が多かった。

研究代表者は、植物個体内の個々の細胞概日リズムを生物発光レポーター系を用いて測定することに成功しており、ウキクサ植物においては基本的にすべての細胞が個体レベルのリズムの同調状態によらず概日発振していることなどを明らかにしていた。この測定系では、パーティクルボンバードメント法による一過的に遺伝子導入を用いることで、導入される細胞の数を非常に少なくし(発光する細胞がまばらに分散する)個々の細胞発光測定を可能にしている。また、概日発光レポーターと時計遺伝子の過剰発現や遺伝子破壊を引き起こすエフェクターを共導入することで時計遺伝子の機能推定が既に行われてきた。これらの実験手法を用いて、細胞時計の精度や細胞自律的な同調作用などが明らかとなっていた。一方で、植物において、細胞時計の挙動をそれらの集団である個体/組織レベルで調和させるロジックは理論的に研究されていたが、直接的な観測結果に基づく研究はほとんどなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は、概日時計単位である細胞から時計機能が意味を持つ個体レベルまでの統合的な理解を目指して、植物の概日時計遺伝子機能の細胞自律性と組織依存性、同期状態依存性(非依存性)に注目し、同調機構を含めた時計システムの全体像にアプローチすることを目的とした。細胞概日リズム観測技術が進んでいるウキクサおよび遺伝子関連情報/素材が豊富なシロイヌナズナを用いて、概日時計に関する遺伝的背景が周囲の細胞と異なる細胞の観測などを通して、その遺伝子機能(周期長制御や位相決定)が細胞自律的か周囲の組織(細胞)に依存するか、個体内環境としての同期状態に依存するかの検証を当初の目標とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) シロイヌナズナの細胞概日発光リズム観測

切除葉(本葉)での細胞発光観測:パーティクルボンバードメント法により、切除葉の細胞に概日発光レポーター遺伝子(時計遺伝子 *CCA1* プロモーター下でホタルルシフェラーゼを発現する *CCA1:LUC*)を導入した。切除葉は発光基質ルシフェリン入りの培地に浮かべた状態で、発光モニタリングをおこなった。微弱な生物発光検出には冷却 EM-CCD カメラを用い、20分~1時間間隔で取得した時系列発光画像をデータとし、細胞発光リズムの時空間解析を行なった。

単離プロトプラストの細胞発光観測: *CCA1:LUC* が導入されている形質転換シロイヌナズナの本葉および根からプロトプラストを単離し、それらをルシフェリン入りの培地中で培養し、単離細胞からの発光を同様の方法で検出・解析した。実験では栄養源がほとんどなく、細胞の増殖は起こらない培地を用いた。

#### (2) 時計遺伝子改変エフェクターの導入

エフェクターとしては、時計遺伝子の1つ *ELF3* をターゲットとする CRISPR/cas9 系エフェクター(シロイヌナズナを対象)およびコウキクサ(*Lemna minor*)の時計遺伝子 *LmELF3*, *LmLUX*, *LmZTL* を *CaMV35S* プロモーター下で過剰発現させるエフェクター(コウキクサを対象)を用意した。これらはパーティクルボンバードメント法で概日発光レポーターと共導入し、細胞発光概日リズムへの影響を評価した。

#### (3) 概日発光レポーターをもつ形質転換コウキクサの発光リズム観測

*CCA1:LUC* をもつ形質転換コウキクサの概日リズムを細胞発光概日リズム測定と同様の手法で観測した。ウキクサはフロンド(葉状体)と呼ばれる基本単位で構成され、増殖する個体(群)では1つのフロンドの2箇所(ポケット)から複数の(子)フロンドが形成され、順次分離し、新たな個体となっていく。発光イメージの空間解像度は細胞サイズであり、フロンド内の時空間

解析を可能とした。

#### (4) 2 波長発光測定系による 2 種類の概日発光レポーター活性の同時観測

単一細胞レベルで 2 つの発光レポーター活性を同時にモニタリングする系であり、*CCA1:LUC* 細胞時計の挙動：ホタルルシフェラーゼ、黄緑色)と *CaMV35S::PtRLUC* (一般には恒常発現が期待されるが、少なくともウキクサでは概日リズムをもつ：ヒカリコメツキムシ改変ルシフェラーゼ、赤色)をパーティクルボンバードメント法でコウキクサに遺伝子導入した。それぞれの波長の発光向けのフィルタの透過光量から、それぞれの元の発光量を推定した。エフェクターの共導入実験もおこなった。

#### 4. 研究成果

本研究をとおして、(1)シロイヌナズナにおける CRISPR/cas9 エフェクターの一過的導入での遺伝子破壊効率推定、(2)細胞相互作用のないシロイヌナズナ単離細胞の概日リズム特性の解明、(3)概日発光形質転換ウキクサを用いた増殖植物の自律的概日リズム形成様式の解明、(4)時計遺伝子非依存的細胞内概日リズムの実証、の 4 点で成果を挙げた。これらは、植物の概日時計システムにおいて未知の領域であった『細胞から組織 / 個体をつなぐロジック』を直接的な観測から導く世界的に先駆的な研究成果となった。

##### (1) シロイヌナズナにおける CRISPR/cas9 エフェクターの一過的導入での遺伝子破壊効率推定。

遺伝子破壊エフェクターの設計・作成の容易な CRISPR/cas9 系がシロイヌナズナに対する一過的導入法でも作用することを実証的に明らかにした。シロイヌナズナの成熟組織の細胞は染色体の核内倍化 (16n ぐらいまで) が生じており、野生型遺伝子が顕性の場合はずべての染色体を破壊しなければその影響が現れないことが予想される。研究代表者によるイボウキクサ (*Lemna gibba*, 染色体 2n) を用いた先行研究において、時計遺伝子 *LgELF3* をターゲットにした CRISPR/cas9 系が非常に有効に働くことが知られていたため (Okada et al. *Scientific Reports*, 2017)、対応するシロイヌナズナの *ELF3* 遺伝子内に 3 箇所のターゲット部位 (3 種のガイド RNA) を設置した。また、通常のシロイヌナズナ (2n) に加えて倍数性 (4n) のシロイヌナズナも植物材料とし、細胞時計破壊の程度を定量的に解析した。その結果、ガイド RNA を選べば両者ともエフェクターは十分有効であることを示した。この成果により、シロイヌナズナでのパーティクルガン法による細胞レベルの遺伝子操作の可能性を広げることができた。一方で、細胞概日リズムへ影響を与える効率が 3 種のガイド RNA で異なる原因や、その効率は 3 種類混ぜても相乗的に増加することがない点、倍数性の影響もあまりみられない点など理論的にうまく説明しにくい現象もみられ、この実験系ではエフェクターの影響が出なかった時の解釈が困難になることもわかった。 (Kanesaka et al., *Plant Biotechnology*, 2019)

##### (2) 細胞相互作用のないシロイヌナズナ単離細胞の概日リズム特性の解明

概日発光シロイヌナズナ形質転換体から単離したプロトプラスト (葉由来の葉肉細胞と根由来細胞) の発光概日リズムの解析を行なった。単離細胞でも概日リズムを示すことは知られていたが、多数の細胞のリズムを単一細胞レベルで長期的に観測した例はなかった。恒暗条件で行なった観測の結果から、葉由来細胞も根由来細胞も周期の温度補償性や明暗同調性を示すいわゆる概日リズムを持つことを明確に示した。一方で葉由来細胞と根由来細胞を比較すると、葉由来細胞は高振幅だが明暗同調が不正確になり、根由来細胞は低振幅 (減衰型) だが明暗同調の正確性が高い傾向を示した。また、リズムの安定性つまり周期の安定性は細胞の状態 / 環境によって大きく変化する一方で、安定性が異なっても細胞時計の周期分布のモードはほとんど変わらないことを明らかにした。このことから、リズムの安定性と周期性のそれぞれに働くメカニズムは異なっていることが示唆された。また、一般的に、高振幅の振動子は低振幅のものと比較して、外部環境の影響を受けにくい、外部環境周期に正確に合わせるためには正確性の高い振動子でなければならない。昼夜 (光 / 温度) 環境は地下部と比べて地上部において非常に大きな揺らぎやノイズを持つが昼夜の環境変動量も非常に大きい。葉由来細胞の概日時計は高振幅 / 高正確性であり、根由来細胞のものは低振幅 / 不安定であることから、それぞれ地上部と地下部の環境に適した特性をもっていると考えられた。この成果は、葉と根の概日振動システムは個々の細胞レベルでそれぞれ地上部と地下部に適応していることを強く示唆する画期的なものとなった。 (Nakamura, Oyama, *Plant and Cell Physiology*, 2022)

##### (3) 概日発光形質転換ウキクサを用いた増殖植物の自律的概日リズム形成様式の解明

概日発光レポーターを持つ形質転換コウキクサの概日発光リズムの時空間的な解析から個体 (フロンド) 形成時とフロンド成熟後のフロンド内の時間秩序形成様式について明らかにした。恒明条件下でみられる基本法則として、子フロンドは親フロンドより高い振幅の概日リズムをもって生じてくるということを明らかにした。ここで測定された振幅は基本的にはフロンドにある細胞間の概日リズムの同期の程度を意味している。子フロンドはフロンド原基 (分裂組織) から生じるが、シロイヌナズナにおいて分裂組織で高い同期状態が観測されている点と符合した。フロンドが成熟した後は徐々にフロンド内の概日リズムの脱同期が観測され、同期の度合いが低いレベルで維持されることから、少なくとも成熟後はフロンド内の細胞概日リズムの連結

性（相互作用）が低いレベルになることが明らかとなった。高い同期状態にあるフロンドでは、恒明条件で求心的（フロンド中心に向かう）リズムの位相波が観測された。哺乳類でも同様の概日リズム位相波が観測される臓器（脈絡叢：脳内で脳髄液を産出する器官）があり、その現象の説明に使われた結合振動子系の数理モデルがウキクサでの位相波においても非常によく当てはまることがわかった。このモデルでは細胞振動子の振幅が重要であるが、ウキクサにおいてはその振幅を周辺細胞の時計との同期度で表すことでうまく表現できることから、原形質連絡などを通過できる概日リズム性の（低）分子やイオンが細胞間同期の介在物質である可能性が考えられた。これらの成果は植物に限らず増殖する多細胞体の時計による時間秩序形成を明確に示した世界で最初の例となった。（Ueno et al. *New Phytologist*, 2022）

#### （4）時計遺伝子非依存的細胞内概日リズムの実証

##### 2 波長細胞発光測定系の開発と同一細胞内での非連結性概日リズムの検出

これまでの発光概日リズムは主に *CCA1:LUC* レポーターの発光活性変動として観測してきたが、*CaMV35S:LUC* もウキクサ類では発光概日リズムを生じることが研究代表者の先行研究で明らかとなっていた（Muranaka et al., *Plant Biology*, 2015）。これら2つの発光レポーター活性を同一細胞で同時に観測することを目的に、コウキクサを材料に黄緑色発光 *CCA1:LUC* と赤色発光 *CaMV35S:PtRLUC* を使った2波長発光レポーター系を開発した。2種（色）のルシフェラーゼ用発光分離フィルタ / 発光比率等を最適化することで、再現性の良い発光強度再構築（計算）を可能とした。非常に興味深いことに、明暗同調していない植物で、*CCA1:LUC* は基本的に全ての細胞が発光概日リズムを生じるのに対して、*CaMV35S:PtRLUC* の細胞発光リズムは同一個体内でリズムのある細胞とない細胞を生じていた。その状況において、*CCA1:LUC* は同一個体内でも細胞間でのリズムの位相が揃っていないのに対して、*CaMV35S:PtRLUC* では、発光リズムが見られる細胞間ではそれらのリズムの位相が揃っていることを明らかにした。また、これら2つのレポーター由来の細胞発光リズムは周期も位相関係も一致しないことから、これらは細胞内非連結性の概日リズムと結論づけられた。植物において同一細胞内で特性が根本的に異なる概日リズムを実証した最初の例となった。（Watanabe et al., *Plant Cell Physiology*, 2021）

##### 細胞内の時計回路に依存しない概日リズムの実証

前述のように *CaMV35S:PtRLUC* の細胞発光リズムはメカニズムは *CCA1:LUC* の発光リズムと異なることが強く示唆されていた。*CCA1:LUC* の発光リズムは細胞時計の挙動を著していると考えられ、時計を構成する時計遺伝子に異常（擾乱）を与えると細胞時計の挙動も異常をきたすことが研究代表者の先行研究で明らかとなっていた（Miwa et al., *Plant and Cell Physiology*, 2006; Serikawa et al., *Plant Physiology*, 2008; Okada et al., *Scientific Reports*, 2017）。そこで、コウキクサの時計遺伝子の過剰発現エフェクター（*LmZTL*, *LmLUX*, *LmELF3*）を *CCA1:LUC* と *CaMV35S:PtRLUC* とパーティクルボンバードメント法で共導入し、2波長発光測定系を用いて、それぞれのレポーターに由来する発光細胞リズムを解析した。*LmZTL* を過剰発現した場合は、*CCA1:LUC* の発光概日リズムが消失するのに対して、*CaMV35S:PtRLUC* の発光概日リズムはエフェクターの影響を受けずに維持された。また、*LmLUX* を過剰発現した場合は、*CCA1:LUC* の発光概日リズムの周期が短くなるのに対して、*CaMV35S:PtRLUC* の発光概日リズムはエフェクターの影響を受けずに維持された。*LmELF3* を過剰発現した場合も、*CCA1:LUC* の発光概日リズムのみ不安定化した。これらのことから、この観測系でみられた *CaMV35S:PtRLUC* の発光概日リズムは発光している細胞内の時計遺伝子の影響（つまり、時計回路の影響）を受けないことが示された。一方で、このエフェクター導入系では、発光している細胞のみで時計遺伝子の過剰発現（つまり、正常な時計回路の破壊）が生じており、その近傍の細胞も含め植物個体のほとんどの細胞は正常な概日時計を持っている。そのため、*CaMV35S:PtRLUC* の発光概日リズムは他の正常な細胞の概日時計を反映した概日リズムを示している可能性が考えられた。この可能性を検証するために、高張液でウキクサ個体を処理し原形質分離を生じさせることで細胞間相互作用を破断させたところ、*CCA1:LUC* の発光概日リズムは持続するのに対して、*CaMV35S:PtRLUC* の発光概日リズムは消失することがわかった。*CaMV35S:PtRLUC* の発光概日リズムの生成メカニズムは不明であるが、これらの結果から *CaMV35S:PtRLUC* の発光概日リズムは原形質連絡を透過する様々な代謝産物変動に見られる概日リズムを反映したものとされている可能性が考えられた。（Watanabe et al. *bioRxiv*, 2022）

本研究以前は、細胞時計の挙動がその細胞の生理学的な概日リズムの状態を決めているとの前提で、個体レベルの概日リズムや時計遺伝子変異体の挙動の解釈がなされていた。本研究で各細胞の生理学的なリズムがその細胞の時計の影響を全く受けない状況を作り出せることが実証されたため、個体レベルでの様々な生理学的リズムと各細胞の時計の挙動を分離して捉えることの重要性が新たに認識されるようになった。概日リズムの認識方法に根本的な変化を引き起こすこれらの成果は、本研究の目的である、『概日時計単位である細胞から時計機能が意味を持つ個体レベルまでの統合的な理解』を大きく前進させることになると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Watanabe Emiri, Muranaka Tomoaki, Nakamura Shunji, Isoda Minako, Ito Shogo, Oyama Tokitaka	4. 巻 -
2. 論文標題 No circadian clock-gene circuit in the generation of cellular bioluminescence rhythm of <i>CaMV35S::PtRLUC</i> in duckweed	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.05.12.491730	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Isoda Minako, Ito Shogo, Oyama Tokitaka	4. 巻 45
2. 論文標題 Interspecific divergence of circadian properties in duckweed plants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 1942 ~ 1953
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pce.14297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Shunji, Oyama Tokitaka	4. 巻 63
2. 論文標題 Adaptive Diversification in the Cellular Circadian Behavior of Arabidopsis Leaf- and Root-Derived Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 421 ~ 432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcac008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ueno Kenya, Ito Shogo, Oyama Tokitaka	4. 巻 233
2. 論文標題 An endogenous basis for synchronisation characteristics of the circadian rhythm in proliferating <i>Lemna minor</i> plants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 2203 ~ 2215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.17925	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Emiri, Isoda Minako, Muranaka Tomoaki, Ito Shogo, Oyama Tokitaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of uncoupled circadian rhythms in individual cells of Lemna minor using a dual-color bioluminescence monitoring system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Acosta Kenneth, Appenroth Klaus J, Borisjuk Ljudmilla, Edelman Marvin, Heinig Uwe, Jansen Marcel A K, Oyama Tokitaka, Pasaribu Buntora, Schubert Ingo, Sorreles Shawn, Sree K Sowjanya, Xu Shuqing, Michael Todd P, Lam Eric	4. 巻 33
2. 論文標題 Return of the Lemnaceae: duckweed as a model plant system in the genomics and postgenomics era	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 3207 ~ 3234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koab189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kanesaka Yuki, Okada Masaaki, Ito Shogo, Oyama Tokitaka	4. 巻 36
2. 論文標題 Monitoring single-cell bioluminescence of Arabidopsis leaves to quantitatively evaluate the efficiency of a transiently introduced CRISPR/Cas9 system targeting the circadian clock gene ELF3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 187 ~ 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.19.0531a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takakura Ren, Ichikawa Masatoshi, Oyama Tokitaka	4. 巻 -
2. 論文標題 A solvable model of entrainment ranges for the circadian rhythm under light/dark cycles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/683615	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 中村 駿志、小山 時隆
2. 発表標題 シロイヌナズナ葉を用いた低温における概日リズムの維持機構の解明に向けて
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野 稜平、伊藤 照悟、 小山 時隆
2. 発表標題 Construction of a CRISPR/Cas9-Induced One-Cell Bioluminescence Reporter System in Individual Plants
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 駿志、小山 時隆
2. 発表標題 原形質分離がシロイヌナズナ葉内組織の細胞概日リズムに与える影響の解析
3. 学会等名 第28回時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tokitaka Oyama
2. 発表標題 Evaluation of plant circadian rhythms based on the cellular circadian behaviour
3. 学会等名 19th Congress of the European Society for Photobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shunji Nakamura, Tokitaka Oyama
2. 発表標題 Robustness of the circadian periodicity of Arabidopsis mesophyll cells against influences of cell density on their rhythms
3. 学会等名 85th Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Quantitative Biology Biological Time Keeping, (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 駿志、小山 時隆
2. 発表標題 シロイヌナズナの単離細胞における細胞間コミュニケーションが与える細胞概日リズムの安定性への影響
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 絵美理、伊藤 照悟、小山 時隆
2. 発表標題 2 波長発光レポーター測定系を用いたウキクサの細胞内非連結性リズムの挙動の解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 駿志、小山 時隆
2. 発表標題 温度条件がシロイヌナズナの単離細胞の概日時計に与える影響の解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 渡邊 絵美理、伊藤 照悟、小山 時隆
2. 発表標題 コウキクサにみられる細胞内非連結性概日リズムの解析
3. 学会等名 第27回時間生物学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 駿志、小山 時隆
2. 発表標題 シロイヌナズナの単離細胞を用いた温度補償性の細胞基盤の解析
3. 学会等名 第27回時間生物学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tokitaka Oyama
2. 発表標題 Circadian rhythms and single-cell analysis in duckweed
3. 学会等名 The 5th International Conference on Duckweed Research and Application (Rehovot, Israel) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山時隆
2. 発表標題 細胞から見る植物概日リズム
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会・シンポジウム「細胞・組織・個体に表出されるリズムの自律性・非自律性の分界」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 駿志、伊藤 照悟、小山 時隆
2. 発表標題 シロイヌナズナの単離した細胞を用いた細胞概日リズムの安定性の解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会（大阪大学）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊給美理，伊藤照悟，小山時隆
2. 発表標題 波長の異なる概日発光レポーターの共導入によるウキクサの細胞内非連結性リズムの観測
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会（大阪大学）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野賢也、磯田珠奈子、伊藤照悟、小山時隆
2. 発表標題 植物における明暗同調の有無による恒明条件下での概日周期・振幅の時空間特性の違い
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会（金沢市文化ホール）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊給美理、伊藤照悟、小山時隆
2. 発表標題 コウキクサの細胞内非連結性リズムの2波長発光レポーター測定系による検出
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会（金沢市文化ホール）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉永彩夏、四方純、伊藤照悟、小山市隆
2. 発表標題 弱光および局所的な明暗刺激を与えたウキクサ個体の概日リズムの応答
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会（金沢市文化ホール）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯田珠奈子、小山市隆
2. 発表標題 異なる温度環境下でのウキクサ植物 <i>Lemna</i> 属と <i>Wolffiella</i> 属の概日リズム特性の比較
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会（金沢市文化ホール）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村駿志、伊藤照悟、小山市隆
2. 発表標題 シロイヌナズナの葉と根における光応答に対する細胞概日リズム特性の解析
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会（金沢市文化ホール）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 T. Muranaka, T. Oyama.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Humana Press (Springer Nature)	5. 総ページ数 246
3. 書名 "The application of single cell bioluminescent imaging to monitor circadian rhythms of individual plant cells. pp 231- 242" in "Methods in Molecular Biology (Ripp, S. ed.)"	

1. 著者名 村中智明、小山時隆	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 222
3. 書名 "植物個体内の単一細胞発光モニタリング" 実験医学別冊 『発光イメージング実験ガイド(永井健治、小澤岳昌編), 145- 158頁』	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------