

長日性ウキウサ, *Lemna gibba* G3, における  
カリウム流出および吸収の概日性リズム  
の機構に関する生理学的研究

近藤孝男

1 水処理による花成阻害—電解質  
流出の概日性リズム ----- (1)

2 カリウム吸収の概日性リズム  
----- (10)

3 カリウム吸収リズムの解析  
〈リズム発生のメカニズムについて〉  
----- (13)

4 カリウム吸収リズムの生理的意味  
----- (42)

謝辞 ----- (46)

# 1. 水処理による花成阻害 - 電解質流出の概日性リズム

## < 水処理による花成阻害 >

短日性ウキクサ (*Lemna perpusilla* 6746) を塩類とショ糖を含む Hutner 培地から蒸留水へ一時的に移すこと (水処理) によつて、このウキクサの花芽誘導 (花成) が阻害される事ハ Halaban と Hillman によつて報告された (1)。この阻害効果には日周性があり主観的夜の中央に与えられる水処理によつて阻害が著しい。

このような水処理の効果は、我々の研究室で使用されてゐる長日性ウキクサ (*Lemna gibba* 93) においても見いだされた。即ち、連続明期の開始から 12 時間づつ水処理を施すとこの処理の主観的夜に与えられた場合に限つて、このウキクサの花成は著しく阻害される (図 1)。

このような水処理の選択的な効果から、まず主観的夜の間に花芽誘導過程に必要な物質が流出してしまうことが予想される (2)。一方、*L. gibba* の場合、この水処理によつて生じ

る花成阻害は、処理後 cAMP (Adenosine 3',5' cyclic monophosphate) を投与する事によって除去される事が見いだされた(図-2)。このことから、当然、cAMP の花芽誘導過程への関与が予想され(35)、さらにこの物質が主観的に高積される事が期待される。また、この効果はその他の類似のアデニンヌクレオチドには見られず(図2)、cAMP が動物組織で示すホルモンの二次情報伝達物質としての効果(3)とも考え合せて上記の可能性が高い。

そこで cAMP のウキクサからの抽出と定量を試みた。ウキクサに含まれる cAMP 含量は、0.5 p.moles/g. FW. 程度の<sup>の</sup>測定値が得られたが、これは採用した測定法(Isotope-dilution method, 4)の測定限界に近い。え、動物組織で cAMP が調節因子として作用する濃度の1%以下である(3)。このためこのウキクサには細胞内分布を考慮しない限り有意の cAMP は存在しないと考えるを得ない(5)。

一方、外部から与えた cAMP はほとんどウキ

ク体内には取り込まれないので、c-AMP は細胞の外側<sup>に</sup>作用しているものと思われる。

先の氷処理阻害の cAMP による回復は氷処理によって生じた何らかの損傷が薬理的に復元されるためであろうと思われる。

一方、氷処理により浸透圧ストレスが膜に作用する事は当然予想され、その花芽に対する効果が日周的に変化するのであるから、ストレスを受ける側の膜の何らかの性質が日周的に変動している事が期待される。

これまで光周的花芽誘導過程の計時機構に  
い関する概日性リズムがどのように関与して  
いるかは Bümmig 以来、たびたび議論されてき  
た(6, 7)。ここでは上記のように予想される  
膜の性質の日周性変動を探る事によって、こ  
の問題に対して寄与出来る事を期待して、以  
下に報告する実験を行った。また、概日性リ  
ズムの細胞下のレベルでの仕組みに関して膜過  
程が重要な役割を示す事が、最近、示唆され

ているが(8), 膜の変動を扱う事によって, この仮説に対しても何らかの貢献が出来るかも知れない。

### <電解質流出の概日性リズム>

水処理による花成阻害の機作は不明であるが, 先述した様に, このウキクサの膜の性質が日周的に変化している可能性が高い。このような膜の状態の変化を検出するために, Jaffe, Galston によら, て(9), 水処理期間中の電解質の流出を調べた。植物が蒸留水にさらされたために生じる浸透圧落差によって流出する電解質の量が, 直接, 間接に膜の状態を反映すると考えるのである。この方法は簡便であるうえ, 高感度である。即ち, 溶液の電気抵抗は電解質量の逆数に比例するから, 低濃度域では僅かな流出量も大きな抵抗変化となつて検出される。

まず, 花成阻害の実験と同じように12時間ウキクサと接触させた蒸留水の伝導度を比較

してみたが主観的昼と夜の両者に差は見い出されなかった。これは先述の水処理の花成阻害効果が流出して失われる電解質に基づくものではない事を示唆する。しかし比較的恒照度(300 lux)で水処理開始時から連続測定を試みた結果、電解質の流出速度には主観的な昼と夜とに差のある事が判った(図3)。処理液の電気抵抗は処理開始と共に低下し、約6時間後に最小値に達するが、この抵抗変化の経過と絶対量には主観的昼と夜との間に明らかな差が見られる。この結果は膜の透過性が主観的昼と夜とで異なることを示唆する。

水処理を開始した時々の膜透過性を数時間後に達成される最大の流出量で表わす(この仮定の妥当性はすぐ後の実験で示される)と、連続明期の各時々の膜透過性は図4の様に少くとも3日間は日周的に変動する事が判った。この様に膜透過性の日周的な変動は連続明期下で継続され、しかもその周期は温度を変えても変わらない(図5, 図6)。これらの事実

から、この変動は内因性概日性リズムであると判断される。さらにこのリズムの位相が Light-ON, Light-OFF, いずれで規定されているかを調査するために、9~27時間の暗期の後、連続明期に移した試料について水処理を施した(図7)。この実験結果はこのリズムの位相は Light-ONシグナルによって決定されていることを示唆する。なお、図5は主観的夜明けにリズムの頂点か、その12時間後にリズムの谷底が訪れることを示す。

この様に水処理によって流出する最大電解質量から推定される膜透過性は概日性リズムをえがいて変化するが、このリズムのより正確な内容を明らかにするため、二、三の実験を試みた。まず、流出する電解質の組成を陽イオンについて調べてみた。表1に示すように流出するイオンはカリウムが主体であり、実際の伝導度増加の $\frac{1}{2}$ を占める。このカリウム流出量は伝導度変化に対応しており、先の膜

透過性に見られるリズムはカリウムの流出に基くものと考えられる。伝導度増肥の残り $1/2$ は陰イオン流出によるものと思われるが、これはまだ調査していない。

一方、ウキクサ組織内のカリウム量は一日を通じて一定であり変動を示さない(表2)。さらに流出の過程が単純な受動的拡散であると仮定して計算される外部処理液の電気抵抗の時間的変化<sup>(と実測)</sup>された電気抵抗の時間的変化とは図8に示す様にほぼ一致する。

これらの実験結果から、われわれは電解質流出に関する概日性リズムは、ウキクサの膜の、主にカリウムに対する、受動的な透過性の変化を反映するものと結論する。

この結論は以下に示す薬剤の効果とも符合一致する。即ち、この流出の日周差はDNP (dinitrophenol,  $3 \times 10^{-5} M$ ) 投与下でも観察されるので、同題の電解質流出は受動的過程であることかうかがわれる。さらに、50 lux という低照度下でもリズムが見られることは上記の



過程が光エネルギーに依存するものではないことを示している(表3)。

おもしろいことに強光(3000 lux)下での水処理ではこのリズムは見られない(表3)。p4~5に12時間の水処理後の伝導度に主観的昼と夜とで差のないことを述べたが、その実験の場合は水処理を2600 luxで行っているから、この強光効果が現われたものと考えられる。また、この強光効果はDNP( $3 \times 10^{-5} M$ )では消去されないがDCMU( $10^{-5} M$ )の添加で除去される；即ち、3000 lux下でもDCMUが与えてあれば、リズムは観察される(表3)。植物の緑色組織ではDCMUによ、て著しく阻害される、光依存性のイオン吸収が数多く報告されている(10)。このウキクサにおける強光下でのリズム消失は光依存性のイオン吸収が受動的イオン流出を相殺することによるものではないかと思われる。

膜の透過性の日周的変動が、*Chenopodium* (11), *Euglena* (12) につづいてウキクサにおいても見

いゝされたのであるが、この場合はイオニ透  
過性の変動であることは、特に最近 Njus の提  
出した概日性リズムに用するモデル(8)との  
関連において興味深い。

## 2 カリウム吸収の概日性リズム

前節で述べた強光効果は、光依在性のカリウム吸収の存在を予測させた。日周性カリウム流出リズムが相殺されるためにはカリウム吸収能もまた日周性リズムを描く必要がある。この問題はカリウム吸収と放出とを同一条件下で測定することから困難なため間接的な方法で検討することとした。

ウキウサの吸収によって充令濃度に変化する程度の稀薄培養液を連続的に流し<sup>\*</sup>、ウキウサに接触したために起る培養液中のカリウム濃度減少からウキウサのカリウム吸収能の時間的变化を調べた。

<sup>\*</sup> (Flow-medium culture)

図9にこのようにして調べたウキウサの連続明(3000 lux)下のカリウム吸収能の変化を示す。吸収活性はきれいな正弦波を描いてほぼ25時間周期で変動する。このリズムは条件を適当に選べば、10日以上持続する。周期は16~30°Cの間でよく温度補償されている(図10)。

温度が $31^{\circ}\text{C}$ 以上になると、僅かだが、周期が延長される傾向が見られる (over-compensation)。これらの事実からカリウム吸収のリズミカルな変動も内因性概日リズムの一種であると結論される。

図11は暗期の長さを変えて、引き続き連続明期下でのリズムの頂点の位置を調べた結果である。頂点の位置は暗期の長さに依存して微妙に変化するが、Light-ONから約24時間後に訪れるので、このリズムはいわゆる Light-ON型に属するといえてよいだろう。即ち、連続明下では主観的夜明け付近で最大の取り込みが、12時間後に最小の取り込みが行なわれる。

なお、このリズムを観察するためには、上述のように、通常のM培地 (Sucrose 2% を含む) から  $1/100$  に薄められたM培地 ( $M/100$  培地) へ移さなければならない。この処理によ、コウキリサのカリウム吸収は影響を受けるとも考えられるが、稀薄培地への移植後、15hrの暗期を与えれば、その後の連続明期でのリズムの

位相はうえつぎのタイミンクによって変化させられない。しかし連続明期 1 日目には波形は少々歪む。2 日目以後は対称的な正弦波となるので位相解析のためのさまざまな処理は主に 2 日目に実施した。

なお、非日周性の明暗サイクル (12, 20, 28 および 48 時間周期) 下で 3ヵ月程、育ったウチリサのカリウム吸収リズムは、明暗サイクル下におかれる限り、その明暗サイクルに entrain された状態を維持するが、連続明に移されると直ちに個々の周期 (25hr) に復する。このことはカリウム吸収リズムが内因性概日リズムであることのもう一つの傍証となる。

### 3 カリウム吸収リズムの解析

#### — リズム発生のメカニズムについて —

前項で示したカリウム吸収リズムはリズム研究の実験系としては下記の3点で高く評価される。即ち、1°; リズムの主要属性としての位相及び周期を充分な精度をもって観察することが出来ること。つまり、このリズムは同一検体について連続してモニターすることが出来、しかも連続明下で一週間以上にわたって持続される。2°; 比較的単純な生理活性のリズムである事。多くの過程の連関の結果として現われる活性のリズムに比べ、このリズムの発現にかかわる過程は単純で細胞レベルでの議論が比較的容易だと思われる。3°; このウキウサでは、リズムが計時機構として利用されていると考えられるさまざまな光周現象が詳細に記載されている(13)。したがって、リズムの「生理的応用」といって、観察での解析が期待できる。

ここでは上記の特徴のうち、1°と2°に注目して、このリズムの「からくり」の生理学的な探索を試みる。一般にリズムのメカニズムに関連して「てんぷ」と「針」の問題がある。まず、ある振動系を分析してもそれは時計の針を調査しているにすぎず、「針」を駆動している「てんぷ」(Master Clock, 又は基礎振動子)の仕組みの解明には直接結びつくとはいえない、という場合が考えられる。Gonyaulax や Drosophila を用いて得られたさまざまな実験結果は master clock の存在を印象づける(14, 15)。これに対して個々の振動系はそれに個々の発振系に対応する、したがって複数の自立性のあるリズムが存在すると考えられる場合もありうる。

前述したように、カリウム吸収リズムは比較的単純な生化学的反応に基づくものと期待されるので、カリウム吸収系自体が Feed-back 系にふくまれていたとの期待をもつて、このリズムの機構の解析を試みた。

## ＜リズム発現のためのエネルギー＞

ここでは overt-rhythm として観察されるカリウム吸収に必要なエネルギーがどのようにして賄われているかを調べた結果を示す。種々の処理がカリウム吸収リズムの振幅と平均レベルとにどのような変化をもたらすかに注意した。

われわれの実験系では培地に有機栄養（シロ糖）は加えられていないのでウキワサの生活は主として光エネルギーに依存せざるを得ない。図 12 に種々の照度下のリズムを示す。

1500 lux 以上の光が与えられれば、リズムは正弦曲線を描き、観測中には目立った減衰は見られない。しかし 700 lux 下では波形は歪み、減衰も早い。このことは光依存の条件下では、1000 lux 前後にリズム発現のための限界エネルギー水準があることを示唆する。なお、この図には示されていないが全暗黒中では 1 つの小ピークを生じただけでリズムは消えてしまう。さて、1000 lux 以上の光が与えられた条



件の下でのカリウム吸収の極大値と極小値とを図13に示す。振巾(極大値と極小値の差)も、レベルも光強度に比例して増大している。しかし8000 lux以上の強光が与えられると吸収は明らかに飽和し、13000 luxではリズムは消失する(図12)。このようにカリウム吸収リズム発現のためには適当な強度の光エネルギーが与えられることが必要である。

先述したようにFlow-medium cultureでは有機栄養は与えていないので、弱光や暗黒中で能動的なカリウム吸収が行なわれないのは当然である。M/100培地に1%のショ糖を加えた場合を図14に示す。まず、毎日9:00 JST(日本標準時、24時間制で扱う)に3000 lux白色光の15分パルスを与えた場合は、パルスによって吸収は急激に低下し始める。低下から6時間続いた後、次のパルスが与えられるまで吸収が直線的に増加する。即ち、リズムは、無糖連続明下の正弦波リズムとは異なり鋸状の波形を示し、しかも、パルスが与えられる限り減衰の微候はみられない。

い。一方、連続暗下ではリズムは不規則な波形で3サイクル程度しか継続されない。

暗期中でのカリウム吸収は糖に依存している筈であり、このウキクサのイオン吸収過程が呼吸系、光合成系のいずれにも依存していること加うか加われる。そしてエネルギー供給系の違いに対応して違った波形のリズムが得られることは、すなわち、連続明下の光依存性リズムが典型的な正弦波になるのに対して暗期中の糖依存性リズムは減衰の早い不規則な波形となることは興味深い。おそらく、光合成系からのエネルギー供給がカリウム吸収系との間で Feed-back 系を形成しているのに対し、呼吸系からのそれとは Feed-back 系を形成していないのではないか。もう一つの可能性として2種類のエネルギー供給系がそれぞれ異なり、カリウム吸収系と共役している事も考えられる(図38参照)。

なお、糖添加によつてリズムが現われる事は Simon 等が *Samanea* の葉枕におけるカリウム移

動のリズムで(16), Hillman がこのウキウサの  $\text{CO}_2$  排出リズムにおいて(17); それぞれ, 示している。また, Kandeler は糖添加によつて, 代謝パターンが変化する事を示唆している(18)。

図14は, なお, 光が信号として機能することによつてカリウム吸収に影響しうることを教えている。換言すれば, 暗期中で糖によつて生起させられるリズムは信号としての光の役割を解析するのに利用できると考えられる。ここから, あるいは, 光周性と概日性リズムとの相関を分析するのに有用なデータを抽出出来るかも知れない。しかし, ここでは, 専ら, 光依存性リズムにのみ注目する。リズムの仕組の解析には, 光依存性リズムのように減衰の少ない正弦波リズムは有利な実験対象と考えられるからである。

以下, しばらくは, リズム発現に必要なエネルギーの供給源を探るために, 各種の代謝阻害剤の効果と調べた結果について述べる。

図15はNaCN存在下と除去後とのカリウム吸収リズムを示す。NaCNはリズムの振巾とレベルを非特異的に阻害する、すなわち、レベルの低下と振巾の減少は並行して起る。しかし吸収を負とするような濃度のNaCN存在下においても弱いリズムは残っている。これらの事実はリズムがNaCNに対して非感受性の系からエネルギーを供給されている事を示唆する。

図16はAzideの効果を示す。AzideはNaCNと同程度に強力なCytochrome系の阻害剤として知られる。このAzideは比較的低い濃度( $3 \times 10^{-5} M$ )でカリウム吸収を全く消失させ、リズムは完全に消失する。NaCNがカリウム吸収のレベルを負にまで低下させてもまだリズムを完全には消去しないのと同対照的である。より低濃度では一定の吸収レベルを保ったまま、リズムはほぼ消失する( $10^{-6}$ ,  $10^{-7} M$ )。さらに $10^{-8} M$ というウキクサの生育にはほとんど影響しない低濃度(19)でも振巾はかなり抑制される。Azideは呼吸を阻害する一方、光化学系IIへの電子伝

達を阻害すること知られていゝ(20)。上記の低濃度の Azide による吸収阻害は呼吸系に作用するものとしては理解し難く、光合成系への作用が考えられなくてはなるまい。一定の吸収レベルの維持には呼吸エネルギーが利用されていゝと思われゝ。呼吸源は無糖条件下では当然、光合成産物であらうから、光合成の活性も全体的に低下したとは考えられまいことになる。おそらく、Azide の効果は光合成明反応系とカリウム吸収系との共役部分の阻害に基くと思われゝ。

脱共役剤 DNP (dinitrophenol) と CCCP (carbonic cyanide - *m*-chlorophenyl hydrazon) の効果を図 17. 18 に示す。 $3 \times 10^{-5} M$  DNP は吸収をほぼ 0 に低下させるが、リズムはまだ残つていゝ。これは NaCN の場合と似ていゝ。DNP の阻害点である酸化の過程はカリウム吸収には重要であるにしても、リズム自体は別の系からのエネルギー供給に依存しうることかかわれゝ。CCCP は DNP より強力な効果をもち  $10^{-5} M$  で  $3 \times 10^{-5} M$  の

DNP と同様の効果を示す。

光合成明反応系と呼吸系のいづれをも抑制すると言われる Antimycin A と o-phenanthroline の効果を図 19, 20 に示す。Antimycin A はカリウム吸収リズムのレベルよりも振巾に強い阻害を示す(10%)。これは Azide と同じように光合成系に作用したものである。o-phenanthroline の効果は NaCN のそれと良く似ている。リズムが消失するのは吸収レベルが負になっただけである。ところで、これら2つの薬剤の場合、投与期間(48時間)の後半で阻害が回復する。この実験では薬剤は一定濃度を連続的に流して与えているので、この回復は薬剤濃度の低下によるものとは考えられない。恐らくカリウム吸収に係る前記の2つの系のいずれかの(光による)回復によるものではあるまいか。

光化学系IIの特異的な阻害剤と言われる DC MU (dichlorophenyl-dimethylurea) はカリウム吸収リズムのレベル、振巾を共に著しく低下させる(図 21)。適当な濃度( $10^{-6}$  M あるいは  $3 \times 10^{-7}$  M) では、阻害

は葉剤投与と共に強まり、ほぼ24時間後に吸収は消失する。この効果の遅れは後の $\text{CO}_2$ 除去に基く阻害の場合と似ており、恐らく、一定の貯えのあった光合成産物が消費されるまでの時間を反映すると思われる。

図22に $\text{N}_2$ および $\text{CO}_2$ 除去空気の効果を示す。 $\text{N}_2$ の吸収は $\text{N}_2$ 通気と共に消失しリズムも見られなくなる。ウキクサのカリウム吸収は好気的な過程である事が判る(36)。 $\text{N}_2$ を通気した場合は $\text{CO}_2$ も除去されているので光合成系の活性も低下し、リズムが完全に消失するものと思われる。(先述の $\text{NaCN}$ 等の効果と比較せよ。)

$\text{CO}_2$ 除去空気の下では、カリウム吸収は先の $\text{DCMU}$ の場合と同様に一定の遅れの後低下する。これはやはり貯られていた光合成産物の消費に基くものであろう。なお、光合成系と呼吸系の両面からイオン吸収が支えられている事は植物の緑色組織では、たびたび示されている(10)。そして、これらの葉剤の効果から、リズム自体の維持には、光合成系の

明反応からのエネルギーが重要であることがわかれる。

なお、これまで試みられた阻害剤の中でカリウム吸収リズムの周期を変化させたものは一つも無かった(21)。

一方、Wagner等は *Chenopodium* において細胞内の Adenylate pool へのエネルギー充満量 (Energy charge, E.C.) を測定し、連続暗下で E.C. の日周的变化を示すこと、さらに、NADPH/NADP の比も日周的に変動する事を示した(22)。このように overt-rhythms の基礎として細胞内の利用可能なエネルギーポテンシャルが変化するという仮説は興味深い。

しかしながら、連続明下のウキクサでは、E.C. や ATP 量の日周的变化は認められない(図 23)。ちなみに、ウキクサの overt-rhythms はほとんどすべて連続明条件下でのみ出現する(13)。さらに図 24, 25 はウキクサの E.C. が明暗サイクルや連続暗の下でも一定に保たれていることを



示す。これらの結果はウキウサのリズムが E.C. の変動によつて規定されているとは考え難い事を示唆する。リズム発現に要するエネルギーは ATP 等によつてある程度賄われているのであろうがそのレベルの変動がカリウム吸収リズムを惹起するのではなく、吸収系自体に Feed-back 系が組み込まれている事が期待される。

これまで調査から想定されるカリウム吸収系へのエネルギーの流れを図 38 に示しておく。

### ＜振動子の性格＞

Overt-rhythm の基礎的機構としての特性を探るためには、そのより忠実なパラメーターと考えられる overt-rhythm の位相を調べる必要があると思われる。

恒常条件下での概日性リズムの維持には外部から一定のエネルギー供給が必要な筈であり、リズムは自励振動（周期的な外力を受けずに維持される振動）と見なす事が出来よう。

Wever は van-der Pol の式'の修正式が概日性リズムの諸特性を表すことを示したが、この式には振動子にエネルギーの与えられる相と奪われる相がある事が示されている(23)。

カリウム吸収リズムの場合、光合成系がエネルギーを供給する事であるが、ここでは、この overt-rhythm のどの位相がエネルギーの充填に、どの位相が放出に対応するのかを調べてみたい。このような振動子へのエネルギーの出入を調査するには低温下でのリズムの位相進行が調べられる。低温はエネルギーの充填相の進行を阻害し放出の進行を阻害しないであろう(15,24)。

このウキワサのカリウム吸収リズムは約10°C近くまで冷却されると消失する(図26)。この処理が24時間以上続くと、どの位相から処理が始まっても、リズムは処理後の26°C下でCT(Circadian time; 明期の始まりをCT=0としそのリズムの1周期を1日24時間とみなした時間制)1/2から再開される。この点については

後で解れた。また  $39^{\circ}\text{C}$  処理も  $10^{\circ}\text{C}$  と同様の経過を示す。いづれの処理の場合も、処理中の位相は不明だが、低温処理後の  $26^{\circ}\text{C}$  下で再開されたリズムの位相位置から、温度処理期間中にリズムかどの位相まで進行していたかを推定できる。比較的短い低温処理をさまざまな位相臭に施す事によ、リズム進行を調査してみた。

この場合、温度変更自体による位相の変化が問題となる。温度の一過性の小変更によって位相が変化させられることはよく知られている(25)。ここで温度小変更とはリズムの生起しうき範囲内の温度変更を意味する。上記のような著しい温度変更が施された場合にはリズムは消失するから、位相の変化を調べることは出来ない。そこでリズムを消失させない温度範囲での温度変化 ( $30^{\circ}\rightleftharpoons 20^{\circ}\text{C}$ ) の効果を調べたがそれほど大きな位相の変化は見られなかった(図27A, B)。さらに、 $30^{\circ}\rightleftharpoons 15^{\circ}\text{C}$  の変化を与えるとリズムの位相は不規則に変化する

し、波形は乱れることが多い(図28)。これに対して低温( $10^{\circ}\text{C}$ )から $26^{\circ}\text{C}$ に戻すと正常な規則正しい波形のリズムが回復する(図26, 28)。これらの観察から、われわれはリズムを消失させてしまうような低温への、あるいは、からの温度変更自体は位相をずらさないと仮定した。(15)。

さて、さまざまな位相角で低温処理( $9^{\circ}\text{C}$ )を行なう結果を図29に示す。上記の仮定に従って低温処理後に出現したリズムの進行状況から処理終了時における潜在的なリズムの位相角を決定する。種々の長さの低温処理の効果プロットしたものは処理期間中の位相の動きを示すはずである。図で傾きが1の時は、正常な位相進行を意味し、1より大きくなれば進行の遅延を、小さくなれば加速を意味する。

この図からまず $9^{\circ}\text{C}$ 下でのリズムの位相進行は主観的昼(CT0~CT12)に低下するものと考えられる。平均して進行速度は正常のそれの $2/3$ にまで低下している。これに対して、主

観的夜 (CT12~24) ではリズム進行はあまり阻害されない。さらに、 $9^{\circ}\text{C}$  では CT12 を越えて位相が進行することはない。

図30には同じスケジュールで  $4^{\circ}\text{C}$  処理を与えた結果を示す。主観的昼と夜との低温に対する反応の違いは上記  $9^{\circ}\text{C}$  の場合と同じであるが、 $4^{\circ}\text{C}$  ではその差はよりはっきりしている。主観的昼に  $4^{\circ}\text{C}$  処理を与えられると、リズムは時として、あたかも凍りついたようにその位相表に停止する。それに対して主観的夜に与えられた低温はやはり進行を阻害しない。

このような低温下での位相進行の結果から、このリズムは主観的昼に振動子へエネルギーが充填され、主観的夜にはその放出が起ると考えられる。なお、ウキウサでは Bunnig 等が Phaseolus で示したような位相の逆転 (充填相に与えられた低温で充填された状態が解消させられ、位相が逆戻りする) は観察されなかった (26)。

このようにフクサのカリウム吸収リズムのエネルギー充填相と放出相とのCTスケール上での位置関係は、多くのリズムのそれと逆の関係になっている。同様な低温処理の実験結果は、一般に主観的夜がエネルギー充填相であることを示唆するものが多い(24)。この相違は何に基くものであるかは不明だが、多くの概日性リズムを維持するためのエネルギーは呼吸系から与えられているのに対して、フクサのリズムの場合は、光合成系に依存すると考えられることと関係があるのかも知れない。そうだとすれば、主観的~~夜~~昼にエネルギーが充填されるのも当然といえる。また、先述のようにLight-ONシグナルで発動するカリウム吸収リズムのエネルギー充填相があるのは、暗期中にはエネルギーの供給はないのだから、合目的々ともいえる。

さて、この主観的昼と主観的夜が、それぞれ、どのような性質のものかを調べるために、それぞれの6時間ずつ(12-18, 00-06 JST)に種

々の処理を施し、カリウム吸収リズムの位相に及ぼす効果を調べた(表4)。4°C処理は、上述のように、主観的昼期間内ではリズムの進行を遅らせる。一方、高温処理は主観的夜には効果がなく、主観的昼での位相進行を加速する。光強度を一時的に13000 luxに強めると主に主観的昼での位相進行が加速され主観的~~昼~~<sup>夜?</sup>でのそれは減速される。光強度を逆に500 luxまで低下させると、あるいは暗期を与えると逆の結果がもたらされる。なお、8000 luxや1000 luxにしても位相の変化は見られない。先に示したように光合成産物の貯えは約1サイクルのリズム進行を賄いうるのであるから、この一時的な光強度の変化による位相の動きは、光の(明反応系を介して)直接リズム進行に係っていることを示唆する。

一方呼吸系の阻害剤であるNaCN, DNPは最初のピークの出現を遅らせるが2-3サイクル目には、この位相の遅れは解消してしまう(表5)。したがって呼吸系から供給されるエネルギー

は直接、振動系に作用してゐないと考えられる。その他の代謝阻害剤添加では目立った位相の変化は見い出されなかった(表5)。他の conophore である Nonactin や Valinomycin (図33) は、Gonyaulax (27) や Phaeolus (28) と違、位相に効果を与えなかった。

以上、主観的昼が振動系にエネルギーを与えられる相であり、主観的夜がエネルギーの振動系から放出される相であることを示した。充填相に与えられる位温が、位相を逆転する事はないので、エネルギー充填の過程は非可逆的な性質をもつ、ということうかがわせる。また充填過程が呼吸系からのエネルギー供給が遮断されても阻害されないのは、それが光エネルギーに直接依存することとして理解出来る。

### ＜カリウム吸収リズムの仕組み＞

われわれの実験は、種々の処理に対するリズムの応答を調べることに限られており、組



腔下のレベルの知見はまだ得られていない。  
ここでは、リズムの細胞下レベルの仕組みを暗示すると思われる結果を報告し、前2節で述べた知見をも含めて現象面の知見を整理しつつ、カリウム吸収リズムの仕組みについて考えてみたい。

さきにも述べた様にリズムの細胞水準の機構として膜系の役割が、最近、注目されてきた。リズムの見られるのは真核生物に限られるが、真核細胞の重要な特徴は膜系が発達していることであり、リズムへの膜の関与を期待させる。実際、膜に影響を及ぼすと思われる処理、薬剤がリズムの周期や位相に効果を及ぼす例が数多く報告されている(29)。

図31にはウキクサのカリウム吸収リズムの周期に対するLiイオンとEt-OHの効果を示している。これらは共にイオン透過性に影響を与える薬剤であり、概日性リズムの周期を延長すると言われる(30)。このウキクサのリズムでもこれらの薬剤は周期を変化させる。ただし

EtOHの効果は一般に知られてゐるのとは逆に  
周期を短縮する。

Njus等は振動子の膜モデルを提出した(831)。  
彼等はリズムの重要な特性である温度補償を  
膜の脂質の流動性の温度変化に対する特殊な  
応答で説明する；イオンの能動的吸収が膜系  
内外におけるイオン濃度の勾配を生じ、その  
勾配が膜系の状態を変化させて、イオンの動  
きを能動的吸収から受動的排出へと切りかえ  
るものと考える。

ウキウサでは先きに示した様に、カリウム  
吸収リズムと、水処理によつて明らかにされ  
る電解質(主として $K^+$  ion)の流出リズムとは、  
位相的には一致する。即ち、主観的夜明け(明  
期の開始時)に吸収の極大と流出の極大が見  
られる。カリウムの移動に係るこれら2つの  
リズムの位相関係は、Njusのように膜がActive  
な状態とPassiveな状態とを交互にくりかえす  
と考えたのでは説明出来ない。ちなみにカリ  
ウム吸収リズムの内容は専ら吸収であり、排

出過程を含まない。そこでこのウキウサでは膜の ion-gate の変動が、カリウム吸収（充分な光量下で）、あるいは流出（水処理によって）に対応すると考えるのが都合がいい。

このような膜の状態の変化は次に示す高温処理の実験から示唆される。カリウム吸収リズムは  $39^{\circ}\text{C}$  下で消失するが(図26), 低温の場合と同様な方法で、高温下での潜在的位相進行を調べた(図32)。リズムは高温処理の吸収の大きな相に施されるか小さな相に施されるかに応じて異なったふるまいを示す。即ち, CT18~06 (吸収の大きな相) ではリズム進行は加速され, CT06-CT18 では加速されない。この結果は直接に ion-gate の状態を示すものではないにしても, 吸収の大小に対応して膜の性質が変化していることを示唆する。

なお, この高温処理下で位相が CT12 を越えて進行することが注意される。長時間の高温処理の下では結局, リズムは CT12 に落ちつくのであるから, この現象は振動子の「慣性」

の大きさも物語、をいす。

次に  $Mj$ us に従って考えれば、イオン濃度の落差が吸収に伴って形成されなければならないが、ウキクサの湿重量あたりのカリウム含量には日周性は見い出されない(表2)。たとえばミカルにカリウムが吸収されても、それがもともとときわめて高いウキクサのカリウム含量(約  $100 \text{ mM}$ )を変化させるには吸収量は少なすぎる。なお、リスミカルなカリウムの吸収に対応するウキクサの成長速度の日周変動は見いだされなかった(32)。細胞内に吸収されたカリウムの局在が期待されるが、カリウムの細胞内分布を調査するのは、かなり困難である。

*Gonyaulax* などで  $\text{Et-OH}$ , *Valinomycin* などの薬剤によって、あるいは直接に外部カリウムの濃度を変える事でリスムの位相を変える事が出来ると報告されていす(27,33)。ウキクサでも、同様の効果が期待されるが、この期待は満たされ

ない(表5, 図33, 34)。このことはカリウムの細胞内局在の考之にとつて好都合であらう。即ち, 細胞内部の膜系がNjusに従つて挙動するものとするれば, 外から与えられたionophore等が効果をもたないとしても不思議はない。なおionophoreはカリウム吸収自体を増加させるが, これはionophoreが細胞膜に作用したためと説明される。

これまでに得られた知見に基づいてこのウキワサで見られるカリウム吸収能の概日性リズムの機構を推測してみよう。

先に細胞内の膜でかこまれた部分(小胞)のカリウム濃度がカリウム吸収に伴つて変動すると考えたが, 定常的なウキワサの成長(32)には原形質の増大に伴うから, 原形質の濃度が一定に保たれるためには成長期を通じて小胞から絶えずカリウムが補給されなくてはならないと考えられる。したがつて小胞内のカリウム濃度は吸収リズムと90°だけ遅れた位相をもつてリズムカルに変化してゐるものと期待される。

そして、この小腔のイオン濃度が高くなるとそれか小腔膜に stress を与え小腔膜を高エネルギー状態（活性状態）に変化させると考えたい。とするとイオン濃度の高い状態は主観的に相当し、この期間が振動子へのエネルギーの充満期に相当することになる。高いイオン濃度による stress が ion-gate の開口度と小さくするものと仮定すれば、エネルギーの充満された状態が ion-gate 開口度の最小の時であり、そのような状態は CT12 に起ると考えられる。そして、ion-gate 開口度の減少に伴って吸収量は低下し、したがってイオン濃度が低下する。つづいて逆過程が起り吸収の増大が起りサイクルは完結する。そして、この後半の過程（膜の状態の変化）は、連続明下では見かけ上、取り込みの増大<sup>が</sup>起るにもかかわらず、基本的には膜に貯えられたエネルギーの放出（収縮性タンパクの弛緩？）で支えられるので、エネルギーの必要でない相ということになるだろう。図35に連続明期下での上

記のパラメータそれぞれについて推定された  
時間的变化を表す。なお問題の小腔については  
今のところ何も判っていない。

つぎにこの様な考えに立つことにより、  
カリウム吸収リズムのいくつかのふるまいが  
理解できることを示す。

ウキクサを長い暗期から明期に移した時、  
リズムが再開されるさいの位相点は暗期中で  
あるリズムの停止位相点を意味するものとする  
と、その停止点はCT1~2になる(図36)。すなわ  
ち、明期開始とともに、カリウムの吸収は徐  
々に増加し22~23時前後に最大となる。暗期  
中ではウキクサに対するエネルギー供給はな  
いのでリズムはどの位相から暗期が始まっ  
ても、CT1~2まで進行した後停止すると考えら  
れる。即ちCT1~2は、おそらく、振動系のエ  
ネルギー放出相の終点を意味するであろう。  
引き続き考えられる明期では、小腔内のカ  
リウム濃度が一定のレベルに戻るまで吸収は  
単調に増加してゆく。

非生理的な温度下での停止位置が CT12 である事 (図26) は次の様に説明される。暗期中に進行する多くの overt-rhythms も CT12 で停止することが多い (24)。CT12 は、この場合、エネルギー放出相の終りであろう。しかし、ウキクワのカリウム吸収リズムの場合には CT12 は充満相の終りに当る。これはエネルギーの供給系の性質に係る問題であろう。カリウム吸収は、光合成産物からと、明反応系からとの二種類のエネルギー供給系によって支えられておりと考えられるが、低温では暗反応系がより早く阻害され、これに依存すると思われる成長が低下するものと思われる。一方、明反応系からのエネルギーのみでリズムの位相は CT12 に達するが、先に想定した成長に伴う小胞からのカリウムの流出が起らず、それ以上、リズムは進行せず、カリウムが小胞内に保たれたまま、CT12 に停止するものと思われる。そして  $26^{\circ}\text{C}$  に戻されると、この場合は、長い暗期の後とは違、てリズムはすみやかに再開



されるであろう(図26)。

先に糖投与の暗期中に与えたパルス光がカリウム吸収を大きく調節しうることを示した(図14)。これは当然、信号としての光の効果である。この場合、関与する光受容系はまだ調査されていないが、連続明下では、この効果はマスキングされていると思われる。しかし暗期中では糖に依存して活動するカリウム吸収系が明期中のカリウム吸収系とは異質である可能性もある。たとえば、暗期中のカリウム吸収の変動は、小胞膜ではなく細胞膜のカリウム透過を反映するかも知れない。

このような2つの透過系の存在するとすれば、明暗サイクルのもとで観察される不規則なカリウム吸収リズム(図37)が説明出来るかも知れない。

最後に、ウキウサのカリウム吸収リズムの仕組みを現時点でまとめたものを図38に示す。なお、周期の温度補償の問題は何も調べられなかった。現在のところ想定した小胞膜の脂

質の流動性に基くものと考えている。

なお、ここで、概日性リズムの特性である位相応答曲線について言及しておきたい。ここには示されていないが(34)、連続明下で Free-run しているリズムに大きなエネルギー変化を伴う強光を与えることで、位相応答曲線が得られる。強光が一時的にカリウム吸収を増加させるとすれば、イオン勾配の最小となるであろう CT18 に応答曲線の不連続点が生じる事が、図 35 から説明出来る。

## 4. カリウム吸収リズムの生理的意味

連続暗下のウキクサは活発に成長してゐる。われわれはこの成長に伴う原形質の増加のためのカリウムが小胞から供給されると考えたが、実際、續の計算によればリズムの1サイクルあたりのカリウム吸収量はウキクサの成長に必要なカリウム量とほぼ一致する(32)。光強度が増せば、カリウム吸収も増加するが成長速度も増加し、これに消費される量も増え、小胞内のイオン濃度変化は影響を受けずカリウムリズムの周期は一定に保たれてゐるのではなからうか。

興味深いのはFBU (5'-fluoro-2'-uridine) の効果である(図39)。この核酸代謝の阻害剤は $10^{-7} \sim 10^{-6} M$ でウキクサの成長をほぼ完全に止める。この時、カリウム吸収リズムのレベルは低下するが、リズムの振巾はほとんど変化しない。即ち、カリウムの動きは吸収と排出の2相となり、正味のカリウムの蓄積は生じない。この

事實は、外部から吸収されたカリウムが成長に伴う原形質の増加分を賄うといふ、カリウムの収支と一致するか、さらに、リズムの定常的な吸収に相当する部分は成長と同じ系からの制御下にあるにしても、リズムそのものはその制御を受けず、リズムはそれ自身で振動しうる事を示すものである。

自然条件下では、カリウム吸収リズムは、夜間（日光不在下）の定常的な成長に必要なカリウムを貯える働きをしているのかも知れない。ウキウサの生活は最終的には日光に依存しているので、昼間にカリウムを貯えるのは意味のある事であろう。（野外でウキウサのおかれていた条件はわれわれの Flow-medium culture の条件とよく似ていると思われる。）

これまで概日性リズムとしては、連続暗条件で進行するものが多く記載されてきた。それに対して、このウキウサでは、カリウム吸収リズムも含め、多くの overt-rhythms は連続

明のもとでのみ見られる(13)。この相違は先に示した振動子へのエネルギー供給機構のちがいに帰せられるだろう。

以上、ウキクサの示すカリウム吸収リズムを中心に、このウキクサのイオン透過系の状態の変化を調べてきた。報告した結果は、ほとんど、種々の処理に伴う overt-rhythm の亢進の観察であった。我々は現在、糖を除去し、専ら、光に依存しつつ成長しているウキクサの示すカリウム吸収リズムはカリウム吸収系自身の中に含まれる feed-back 系の活動を反映するものだと考えている。この意味で、この実験系は内因性概日リズムの仕組みの解析にと、きわめて有利であると期待される。

一連の研究の発端でもあり、重要な目的の一つでもあることから、即ち、光周性現象の計時機構としての概日性リズムの役割については、これまでの実験系では、光の信号としての役割を抽出して扱うことが困難であるため、残念ながらほとんど手つかずのままにな

っている。しかし、糖添加培地上のウキウサ  
が暗期中に示すカリウム吸収リズムは、信号  
としての光の作用の解析により適していると思  
われるので、今後は、この方向の調査を進め  
たいと考えている。

## 謝辞

本研究の大部分は、名古屋大学理学部生物学教室で、一部は基礎生物学研究所で行なわれた。この間、研究を指導し、励まして下さった太田行人教授に深く感謝の意を表したい。同教室E研の諸氏には、有益な助言を頂き、さらに実験の実施にも協力して頂いた。あわせて御礼を申しあげたい。

## References

- (1) Halaban, H. and W. S. Hillman: Responses of Lemna perpusilla to periodic transfer to distilled water. Plant Physiol. 46: 641-644 (1970)
- (2). Halaban, R. and W. S. Hillman: Factors affecting the water-sensitive phase of flowering in the short-day plant Lemna perpusilla. Plant Physiol. 46: 760-764 (1971)
- (3) Robison, G. A., R.W. Butcher and E. W. Sutherland: Cyclic AMP Ann. Rev. Biochem. 37: 149-174 (1968)
- (4) Gillman, A. G. : A protein binding assay for adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. Proc. N. A. S. 67: 305-312 (1970)
- (5) Bressan, R. A. and C. W. Ross: Attempt to detect cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in higher plants by three assay methods. Plant Physiol. 57: 29-37 (1976)
- (6) Bünning, E. : Circadian rhythms and the time measurement in photoperiodism. Cold Spring Harbot Symp. Quant. Biol. 25: 249-256 (1960)
- (7) Pittendrigh, C. S. : The circadian oscillation in Drosophila pseudoobscura pupae. A model for photoperiodic clock. Z. Pflanzenphysiol. 54: 275-307 (1966)
- (8) Njus, D., F. M. Sulzman and J. W. Hasting: Membrane model for circadian clock. Nature 248 116-120 (1974)
- (9) Jaffe, M. J. and A. W. Galston: Phytochrome control of rapid nyctinastic movements and membrane permeability. Planta 77: 135-141 (1967)
- (10) Jeschke, W. D.: Ionic relations of leaf cells. In Encyclopedia of Plant Physiology Vol.2 160-194 (1977)
- (11) Wagner, E. and B. G. Cumming: Betacyanine accumulation, chlorophyll content, and flower initiation in Chenopodium rubrum as related to endogenous rhythmicity and phytochromeaction. Can. J. Bot. 48: 1-18 (1970)
- (12) Brinkman, K.G. : Circadian rhythm in the kinetics of acid denaturation of cell membrane of Euglena gracilis. Planta. 129: 221-227 (1976)



- (13) Oota, Y. and H. Nakashima: Photoperiodic flowering in Lemna gibba G3 --- Time measurement. Bot. Mag. (Tokyo) Special issue 1: 177-198 (1978)
- (14) Memurry, L. and J. W. Hasting: No desynchronization among four circadian rhythms in the unicellular alga, Gonyaulax polyedra. Science 175: 1137-1139 (1972)
- (15) Bünning, E. : The physiological clock 3rd ed. 1973 Springer Verlag (Berlin)
- (16) Simon, E., R. L. Satter and A. W. Galston: Circadian rhythmicity in excised Samanea pulvini; I. Sucrose-whitelight interactions. Plant Physiol. 58: 417-420 (1976)
- (17) Hillman, W. S. : Photoperiodic entrainment patterns in the CO<sub>2</sub> out put of Lemna perpusilla 6746 and of several other Lemnaceae. Plant Physiol. 49: 907-911 (1972)
- (18) Kandeler, R. : Hemmung der Blütenbildung von Lemna gibba durch Ammonium. Planta 84: 279-291 (1969)
- (19) Oota, Y. : Frond and flower production in Lemna gibba G3 in presence of respiratory inhibitors. Plant and Cell Physiol. 10: 621-633 (1969)
- (20) Katoh, S., I. Ikegami and A. Takamiya: Arch. Biochem. Biophys. 141: 207- (1970)
- (21) Bühnenmann, F. : Das endodiurnal System der Oedogonium zelle II. Biol. Zentralblatt. 74: 691-705 (1955)
- (22) Wagner, E. : Endogenous oscillations in pathways of energy transduction as related to circadian rhythmicity and photoperiodic control. Biosystems 7: 68-76 (1975)
- (23) Wever, R.: A mathematical model for circadian rhythms. In Circadian clock. p47-66 (1965) Amsterdam,
- (24) Pittendrigh, C. S.: Circadian clock: What are they?. In The molecular basis for circadian rhythms. p11-48 Dahlem Konferenzen, Berlin (1975)
- (25) Wilkins, M.B.: An endogenous rhythm in the rate of CO<sub>2</sub> out put of Bryophyllum. III. The effects of temperature changes on the phase and period of the rhythm. J. Exp. Bot. 13 : 220-241 (1962)

- (26) Bünning, E. and M. Tazawa: Über den Temperatureinfluss auf die Tagesperiodik bei Phaseolus. *Planta* 50: 107-121 (1957)
- (27) Sweeney, B. M. : The potassium content of Gonyaulax polyedra and phase changes in the circadian rhythm of stimulated bioluminescence by short exposures to ethanol and valinomycin. *Plant Physiol.* 53: 337-342 (1974)
- (28) Bünning, E. and I. Moser.: Influence of valinomycin on circadian leaf movements of Phaseolus. *Proc. N. A. S.* 69: 2732-2733 (1972)
- (29) Sweeney, B. M. : Evidence that membranes are components of circadian oscillators. In *The molecular basis for circadian rhythms.* p. 267- 281 Dahlem Konferenzen, Berlin (1975)
- (30) Engelmann, W. : A slowing down of circadian rhythms by lithium ions. *Z. Naturforsch.* 28: 733-736 (1973)
- (31) Njus, D.: Experimental approaches to membrane models. In *The molecular basis for circadian rhythms.* p.283-294 Dahlem Konferenzen Berlin, (1975)
- (32) Tsudzuki, T. and T. Kondo: Correlation between growth and potassium uptake rhythm in a duckweed, Lemna gibba G3 (1979) in preparation
- (33) Eskin, A. : Phase shifting a circadian rhythms in the eye of Aplysia by high potassium pulses. *J. Comp. Physiol.* 80: 353-376 (1972)
- (34) Tsudzuki, T. and T. Kondo: Lemna における *Potassium uptake rhythm* (Ⅳ) 種々の環境因子に対する *rhythm* の応答 日本植物学会42回大会(福岡1977)
- (35) Oota, Y.: A possible mechanism for sugar inhibition of duckweed flowering. *Plant and Cell Physiol.* 13: 195-199 (1972)
- (36) Ball, N. G. and I. Dyke: The effects of decapitation, lack of oxygen and low temperature on the endogenous 24-hour rhythm in the growth-rate of the Avena coleoptile. *J. Exp. Bot.* 8: 322-338 (1957)
- (37) Kondo, T.: Diurnal change in leakage of electrolytes from a long-day duckweed, Lemna gibba G3, under osmotic stress induced by water treatment. *Plant and Cell Physiol.* 19: 985-995 (1978)
- (38) Kondo, T. and T. Tsudzuki : Rhythm in potassium uptake by a duckweed, Lemna gibba G3. *Plant and Cell Physiol.* (1978) in press

- (39) Oota, Y. and T. Kondo : Removal by cyclic AMP of the inhibition of duckweed flowering due to ammonium and water treatment. *Plant and Cell Physiol.* 15: 403-411 (1974)
- (40) Young, M. and A. P. Sims: The potassium relations of Lemna minor L. I. Potassium uptake and plant growth. *J. Exp. Bot.* 23: 658-669 (1972)
- (41) Kondo, T. and T. Tsudzuki: (1977) Lemna における *Potassium uptake rhythm* (II) Lemna gibba G3 のカリウム透過系; 日本植物生理学会 1977 年度年会 (大阪)
- (42) Kondo, T. and H. Nakashima: Contents of adenosine phosphate compounds in a long-day duckweed, Lemna gibba G3, under different light and nutritional conditions. *Physiol. Plant.* (1978) in press .
- (43) Kondo, T. and T. Tsudzuki: (1978) Lemna における *Potassium uptake rhythm* (I) 温度変化と位相の動き; 日本植物生理学会 1978 年度年会 (広島)
- (44) Nakashima, H. and T. Kondo (1978) 植物における根日性リズムの時計機構. 『バイオリズムとその機構 II』 講談社.

	Leakage ( $\mu\text{moles/g F.W.}$ )		Electroconductivity ( $10^{-8}\text{ mho/g F.W.}$ )	
	Period of water treatment		Period of water treatment	
	(JST)		(JST)	
	12-18	00-06	12-18	00-06
$\text{K}^+$	9.31	5.44	680*	400*
$\text{Ca}^{++}$	0.16	0.21	19*	25*
$\text{Mg}^{++}$	0.51	0.54	50*	53*
$\downarrow$				
Total electrolytes			1130	880

表1 水処理によ，て流出する陽イオン (37)

[9(15)] の短日条件から，9:00 JST に3000 lux の連続明に移した。第1日目の12:00~18:00，20:00~06:00 の各6時間，100ml の蒸留水により水処理を施した。処理後の処理溶液の電気伝導度を測定すると共に，濃縮後，原子吸光法で陽イオン量を測定した。更にこうして得られた各濃度のイオンが元の処理溶液中で示すと期待される電気伝導度をイオン当量伝導度から算出して示した(\*)。

Culture condition	Potassium concentration ( $\mu$ moles/g F.W.) at						
	09	15	21	03	09	15	21
Flow-medium cultures	---	117	116	123	120	127	127
Stock cultures (ca.20 days old)	120*	115	127*				

表-2 Flow-medium (図9の註参照) 及び M-sucrose 培地  
でのウキクサのK<sup>+</sup>含量(38)

Flow medium culture (図9の註参照) 2~3日目のウキクサ  
に含まれるK量を0.1NHClで10分間、100°Cで処理し抽  
出した後、原子吸光法で測定した。又、約20日の短日  
条件下で生育しているウキクサについても、充分洗滌  
後、同様の方法で定量した。(40)

Light intensity (lux)	Chemical	Permeability (k*)		Maximum leakage ( $10^{-8}$ mho/20 colonies)	
		Day	Night	Day	Night
50		4.9	2.9	690	370
300		7.1	4.6	610	380
3000		6.0	5.9	420	440
300	$2 \times 10^{-5}$ M DNP	4.5	2.8	440	340
3000	$2 \times 10^{-5}$ M DNP	3.2	3.3	270	340
3000	$10^{-5}$ M DCMU	5.3	2.6	500	190

表-3 水処理中に与えた種々の処理の電解質  
流出に対する効果(37)。

連続明, 第1日目の12:00 (Day) と 00:00 (Night) に  
水処理を施した(図1の註参照)。この水処理に, 光  
強度と薬剤を表に示す様に与え, みかけの透過係数  
(図8 参照) と, 水処理中得られる最大の伝導度を測  
定した。

Treatment	Time of the treatment	
	12 - 18	00- 06
	Time of the peaks	Time of the peaks (JST)

26° C	10.4	2.1
39° C	4	9
13000 lux	5.5	11
500 lux	12	7
Dark	11	6

表-4 温度及び光条件のK<sup>+</sup>吸収リズムの位相に対する効果

連続明期2日目の12:00-18:00 JST及び00:00-06:00 JSTに光温度条件を3000 lux, 26°Cから、表に示した様に6時間変更した。3000 lux, 26°Cに戻した後のリズムの頂点(吸収の極大)の見られる時間E (JST)を示した。

Treatment	Time of the treatment					
	12 - 18			00 - 06		
	Time of the peaks			Time of the peaks (JST)		
	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd
NaCN (0.3mM)	10	9.5	10	7	9.5	9
NaN <sub>3</sub> (1μM)	8	7		11	10.5	10
DNP (30μM)	8	9	10	12	10	8
CCCP (5μM)		8	9		9	9
Antimycin(10μM)		10	10.5		10	10
o-Phenanthlorin (25μM)		7.5	9	7	9	9
DCMU (1μM)		9	9		9	8
Nonactin (1mg/l)		9	10		9	9
DCCD (0.1mM)		9	9		8	8

表 5 代謝阻害剤の K<sup>+</sup> 吸収リズムの位相に対する効果

連続明期 2 日の Flow-medium culture (図 9 註参照) に 6 時間、種々の薬剤を Flow-medium と経口して与えた。投与の始めと終りには 20ml の Flow-medium で洗った。処理後のリズムの頂点 (吸収の極大) が生じる時刻を示してある (JST)。その他の条件は図 9 の場合と同様である。



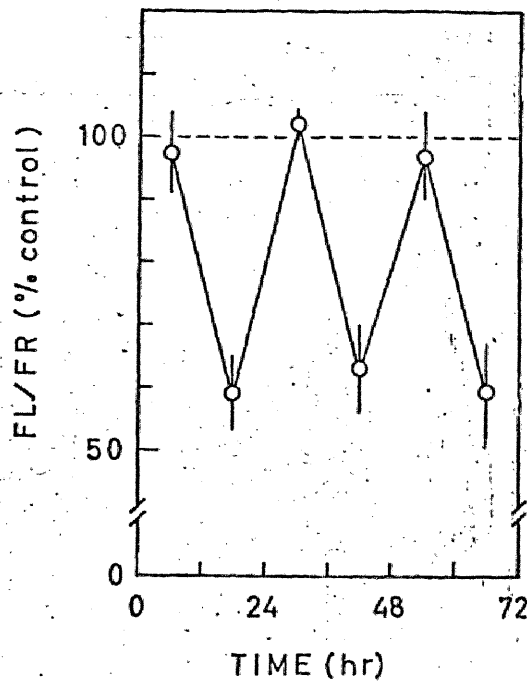


図1 水処理の花芽誘導に及ぼす効果(39)

長日性ウキウサ, *Lemma gibba* G3, の1コロニーを100mlのM-sucrose (1%) メディウムに移し, 26°Cで9時間明, 15時間暗(これを[9(15)]と表記する)の短日条件下で3~4週間培養する。明期には白色蛍光灯 (Hitachi Hiline Ace) により2600 luxを与えた。(前培養)

良く揃ったコロニーを選び25mlのM-sucrose培地に移し, 1日の[9(15)]の短日条件の後, 連続明に移した。連続明開始後12時間ずつ水処理(25mlの蒸留水に移す。)を施した。元の培地に戻し, 連続明7日目のフロント数と花芽数を調べた。処理時間の中央で, 花芽率が無処理の場合の百分率(花芽数/フロント数)で示してある。

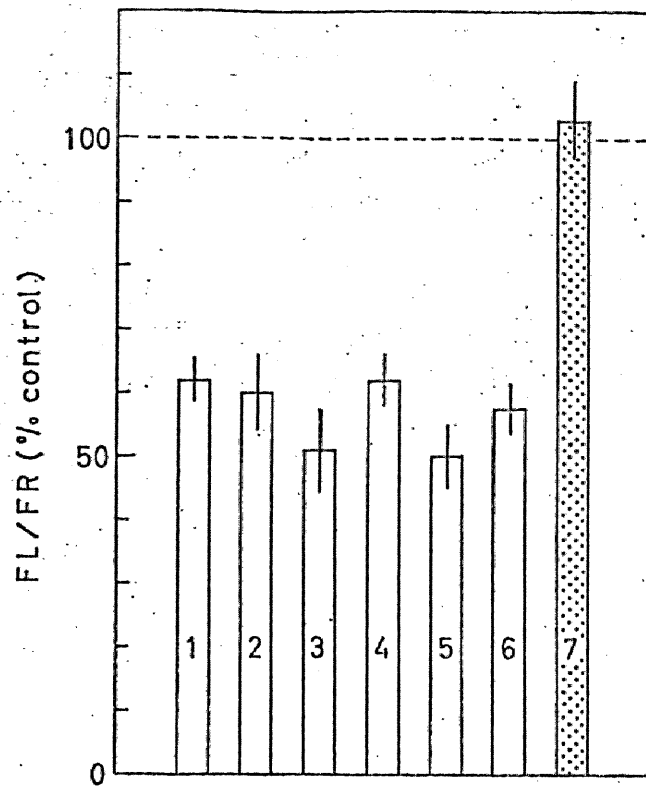


図2 cyclic AMP による水処理阻害の除去(39)

連続明期の12~24時間目に水処理を与え、処理後、元のメデューサに戻すとともに、以下の薬剤を与えた。他の条件は図1と同様である。

- 1, 水処理のみ
- 2, 水処理 + Adenine ( $10^{-5}M$ )
- 3, 水処理 + Adenosine ( $10^{-5}M$ )
- 4, 水処理 + 5'-AMP ( $10^{-5}M$ )
- 5, 水処理 + 5'-ADP ( $10^{-5}M$ )
- 6, 水処理 + 5'-ATP ( $10^{-5}M$ )
- 7, 水処理 + c-AMP ( $10^{-5}M$ )

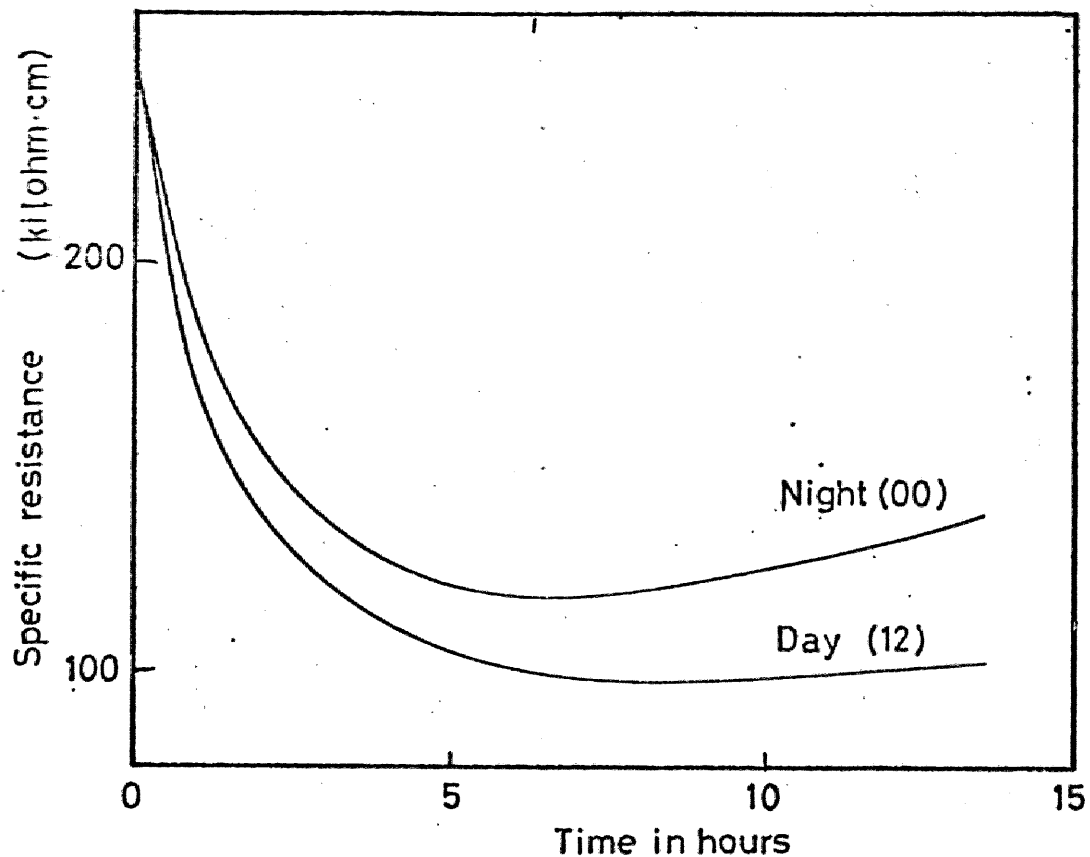


図3 蒸留水処理中の抵抗変化(37)

1コロニーのウキクサを、100 ml の M-Sucrose 培地に移し [9(15)] の短日条件下で3週間培養する。明期は、9:00 JST に開始し、3000 lux の白色光と蛍光灯から与える。この様にして、無菌的に育成したウキクサを用いた。

20コロニーのよく揃ったウキクサを蒸留水で2度洗い、外部に付着している電解質を除去したのち100 ml の蒸留水に移す。炭酸による伝導度変化を防ぐため 300ppm の  $\text{CO}_2$  を含んだ空気を通気した。交流ブリッジで抵抗変化を記録した。

Day は、連続明期第1日目、12:00 JST. Night は 00:00 JST に水処理を開始した。

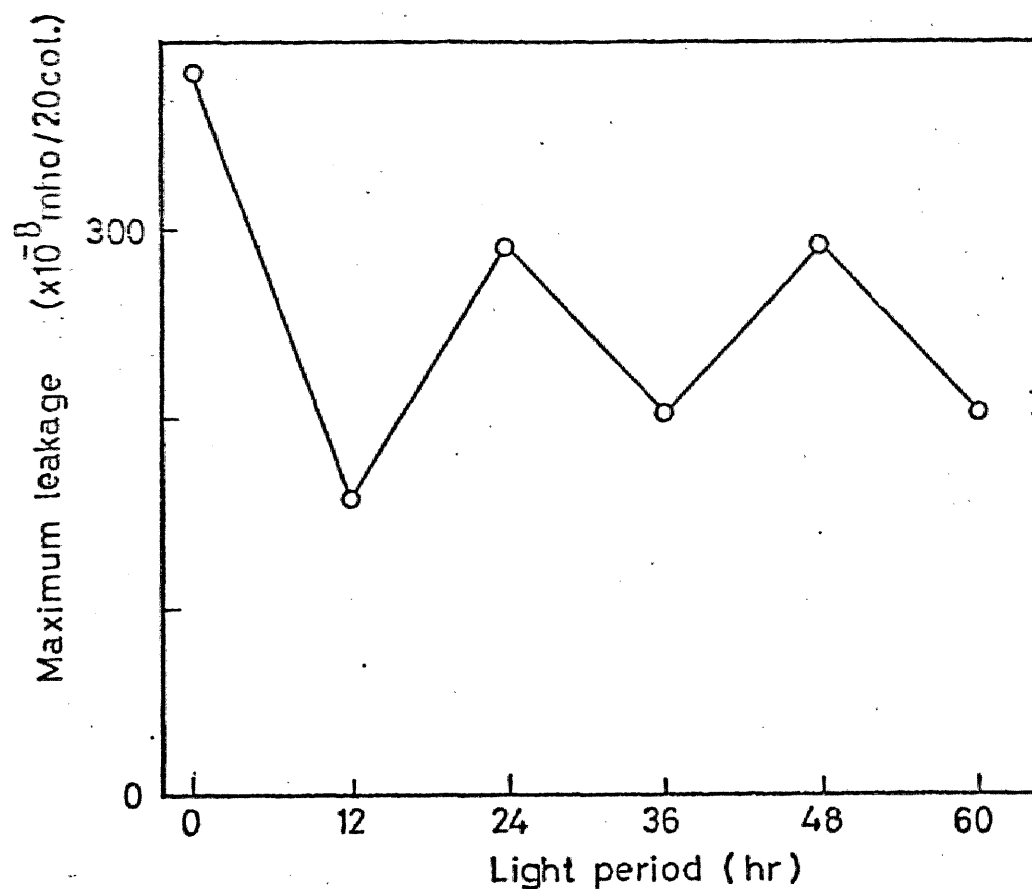


図4 電解質流出の日周変動(37)

連続明期の各時間毎に水処理を施した。水処理中に示された最大の伝導度から処理前の伝導度を示してある。なお、時間毎は処理開始時刻であり、水処理については図3の註を参照。

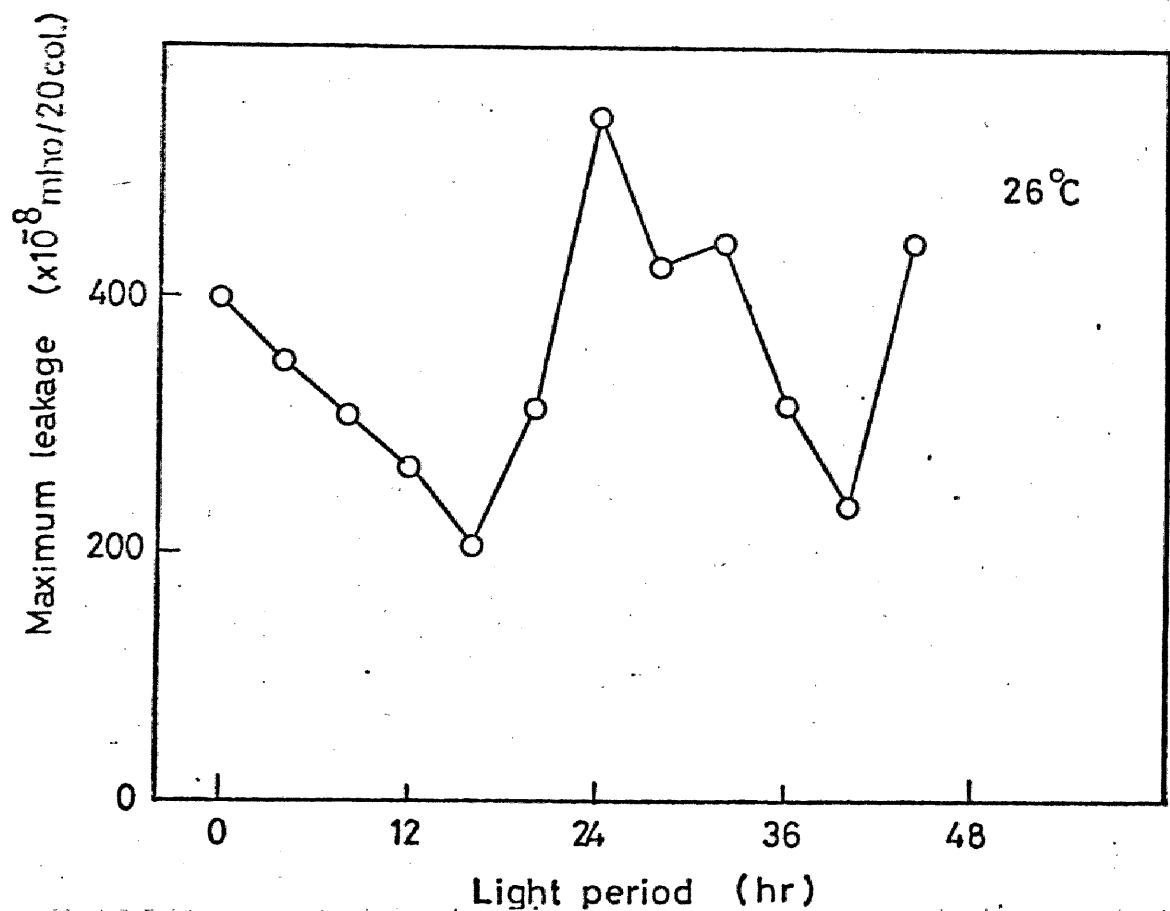


図5 電解質流出のリズム (26°C) (37)

連続明期下で4時間ごとに水処理を行い、電解質の流出量を調べた。図3の註を参照

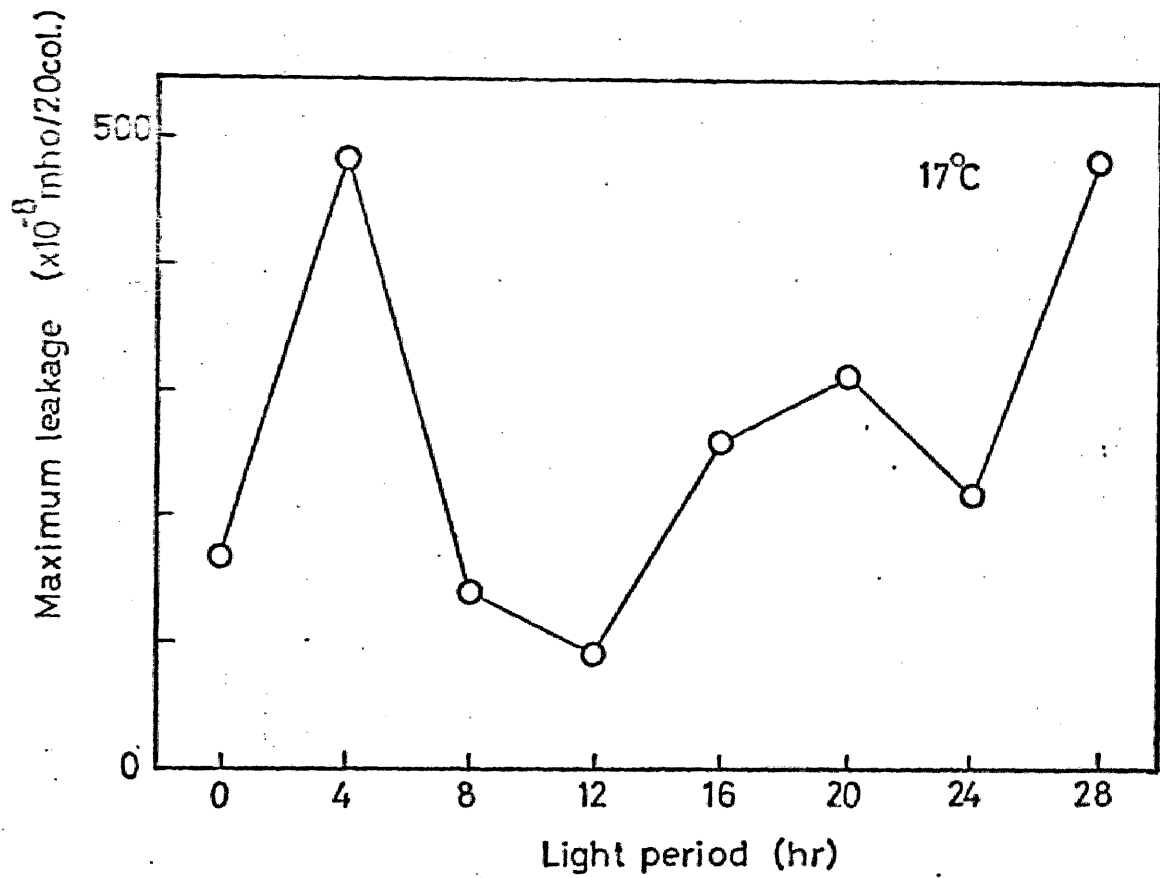


図6 電解質流出のリズム(17°C)(37)

連続明期開始の15時間前に温度を26°Cから17°Cに変更した。他は図5と同じ。位相が4時間遅れているがこれは上記の温度変更によるものと思われる。

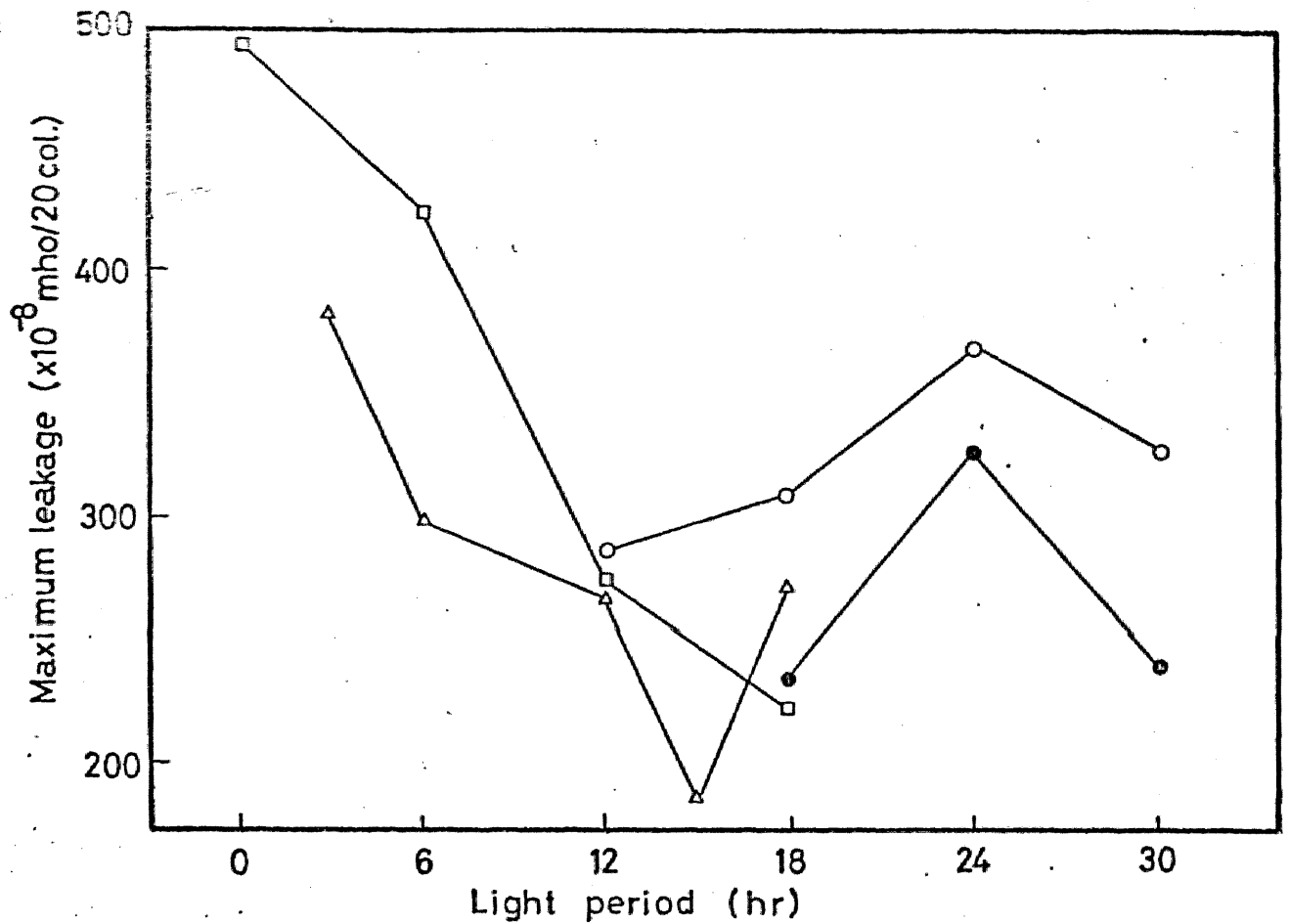


図7 電解質流出リズムの位相に対する暗期の効果 (37)

連続明始用始に先だつ暗期の長さを変え、連続明期下での位相を調べた。水処理等については、図3,4の註を参照のこと。 9hr(—○—), 15hr(—△—), 21hr(—□—), 27hr(—●—)

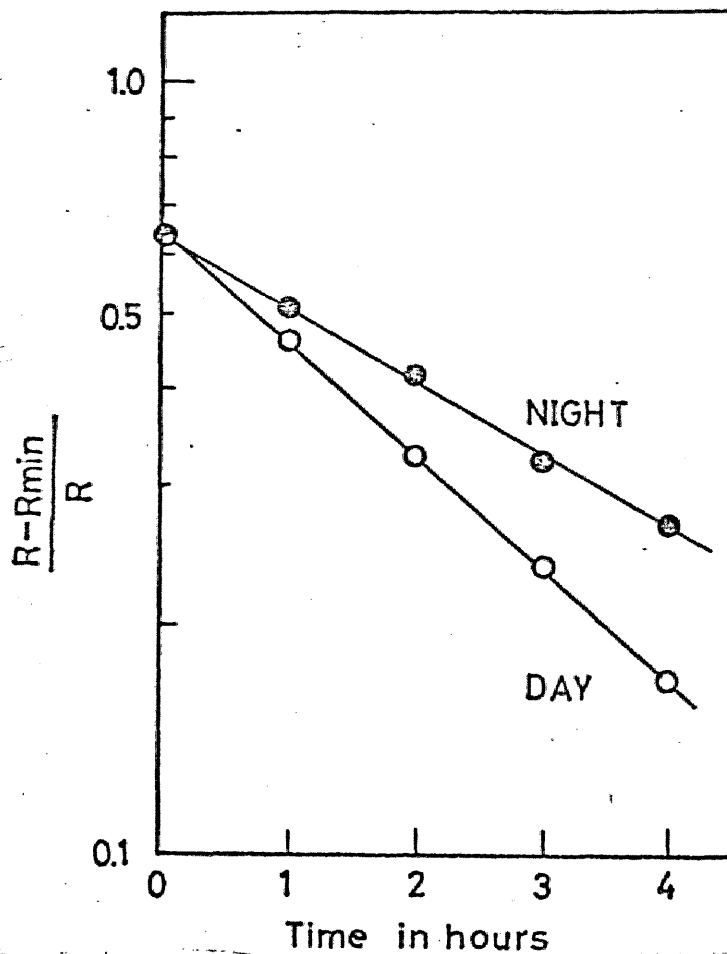


図 8. 水処理溶液の抵抗の時間変化 (37)

水処理中に見られる電解質の流出が単純な拡散であるとすれば流出速度は次式で与えられる。

$$\frac{dx}{dt} = kS(C_i - C_o) \quad \left( \begin{array}{l} C_i, C_o \text{ はそれぞれ細胞内外の濃度} \\ S \text{ は表面積 } k \text{ は定数} \end{array} \right)$$

これを積分して

$$C_o = C_{o\max} (1 - e^{-\frac{V+v}{Vv} kSt}) \quad \left( \begin{array}{l} C_{o\max} \text{ は平衡状態の } C_o \\ V, v \text{ は外部溶液および細胞の体積} \end{array} \right)$$

そうする。濃度の逆数が溶液の電気抵抗に比例するから、

$$\log \frac{R - R_{\min}}{R} = k^* t \quad \left( \begin{array}{l} R_{\min} \text{ は } A/C_{o\max} \text{ } A \text{ は定数} \\ k^* = -kS \frac{V+v}{Vv} \end{array} \right)$$

そうする。

この図には図3に示した抵抗変化のデータから  $(R - R_{\min})/R$  を算出し示した。仮定に従えば、 $\log(R - R_{\min})/R$  の時間経過は直線になるはずである。



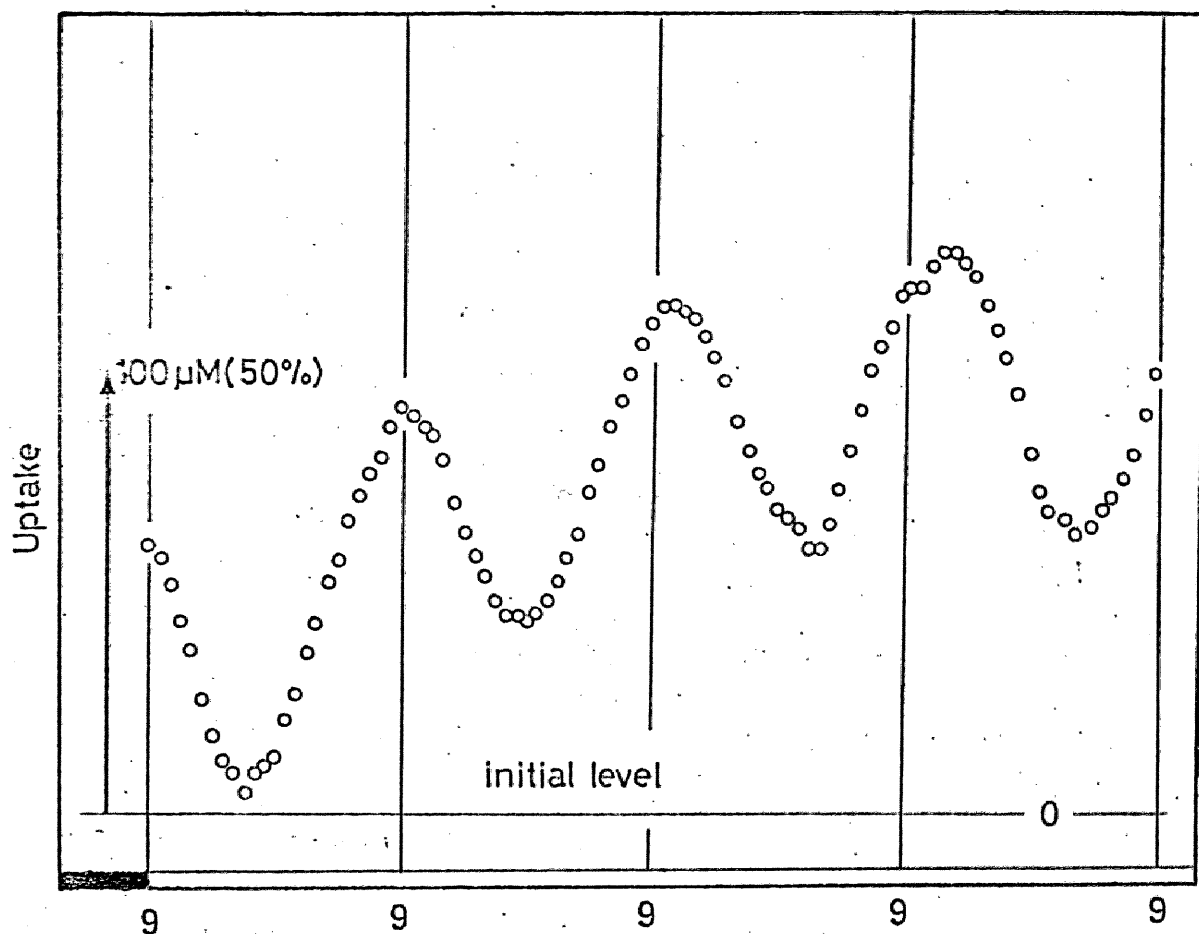


図9 カリウム吸収リズム(38)

JST

短日条件の前培養から 18:00 JST に 20 コロニーのウキクサを Flow-medium culture の容器 (約  $10 \text{ cm}^2$ ) に移す。これに  $1/100$  に薄め、ヨ糖を除いた Mx デイウム ( $1/100 \text{ M}$  培地) を  $5 \text{ ml/hr}$  で与え続ける。同時に空気を送り、ウキクサと接触した後流れ去ってくる培地を 1 時間毎にフラクションコレクターで集める。通常、うえつぎに引き続き 15 時間の暗期を与え、引きつづき  $3000 \text{ lux}$ ,  $26^\circ \text{C}$  の連続明条件下での変動を調べた。こうして集めた試料の K 含量を原子吸光法により定量し、K の増減をウキクサによる排出、吸収と考えた。Initial level<sup>o</sup> が  $1/100$  培地の K 量を示し土向きに K 量の低下を示してあるのでこのレベルより上に行く程、吸収の増大を意味する。(—O—で示す)。

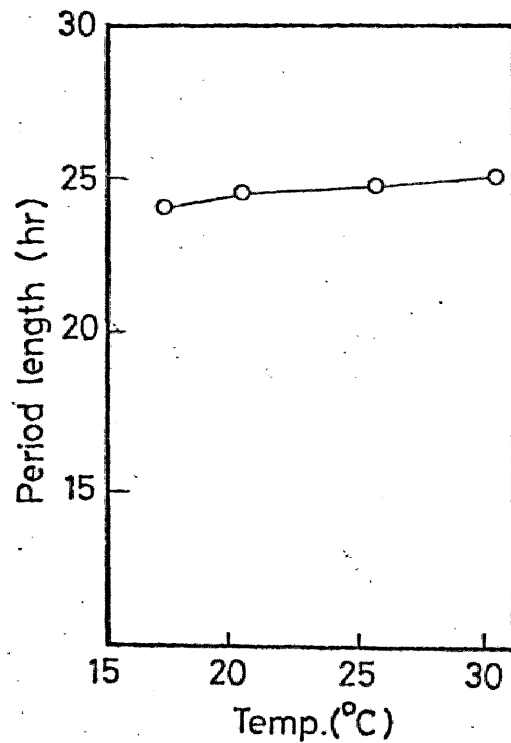


図10 カリウム吸収リズムの周期に対する  
温度の効果 (38)

図に示された各温度でカリウム吸収リズムを観察し、第3, 4, 5の頂点間の時間と測定し平均した。他の条件は図9と同様である。

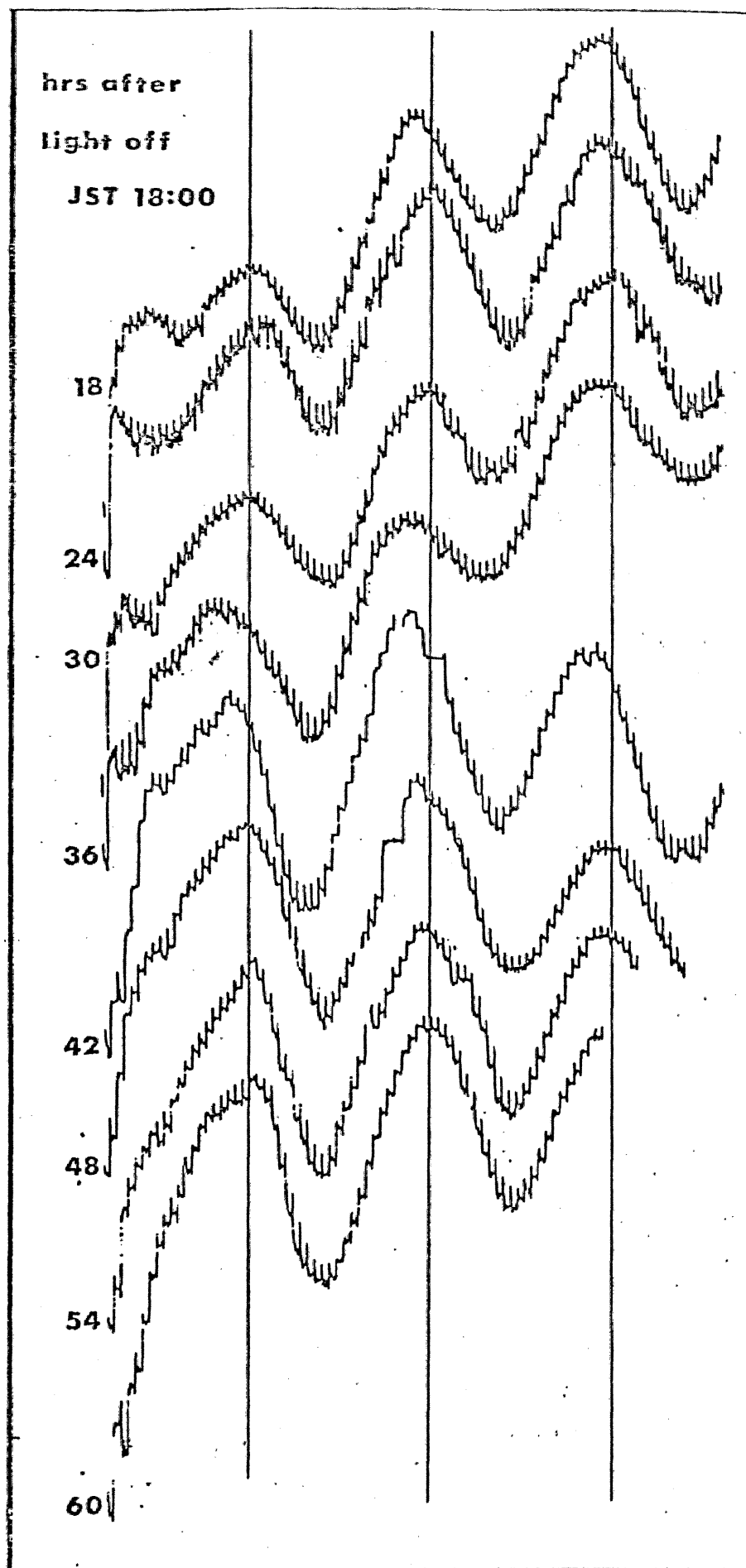


図 11. Light-ON に于る カリウム吸収リズムの位相決定 (34)

うえつき後、図に示されている時間の暗期を与え、引きつづく連続明下でのリズムを示す。Light ON をそろえて表示しており、リズムの周期 (25 時間) が表示してある。他の条件は図 9 と同じである。

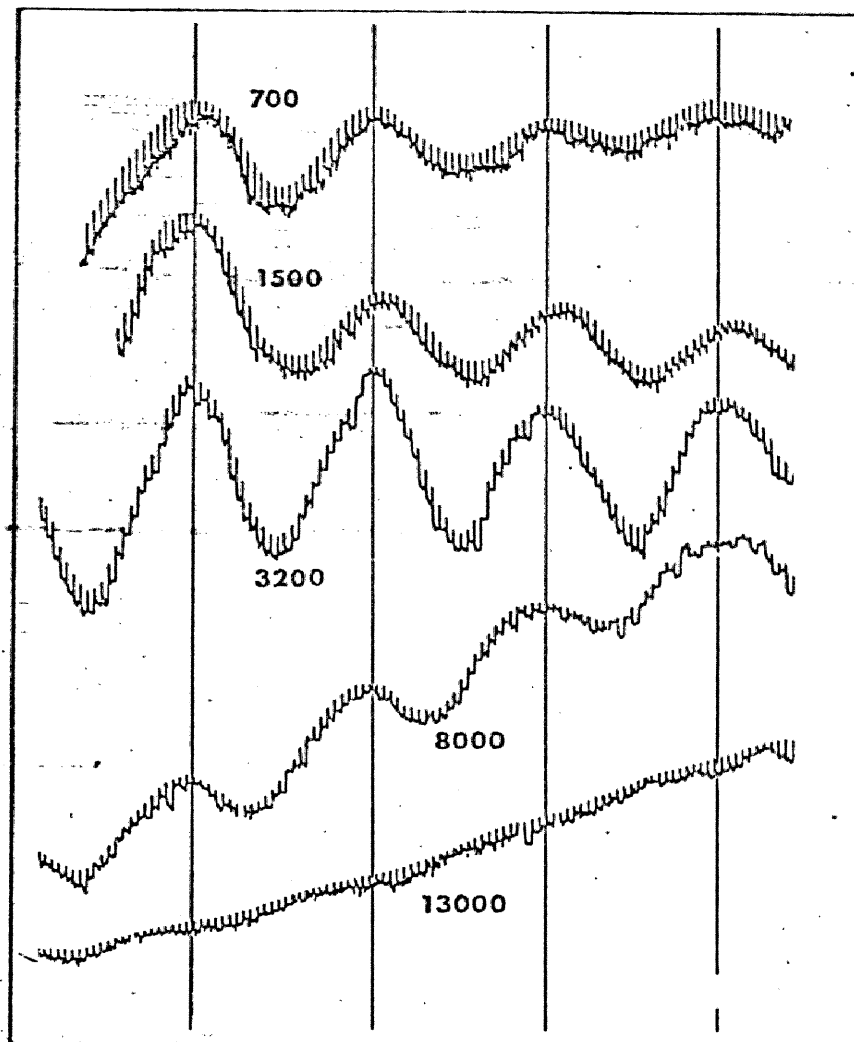


図12 カリウム吸収リズムに対する光強度の効果(32)

種々の強度の白色光下の連続明期のカリウム吸収リズムの進行を示す。縦線は3200 lux 下の頂点の位置を示す。他の条件は図9と同じである。

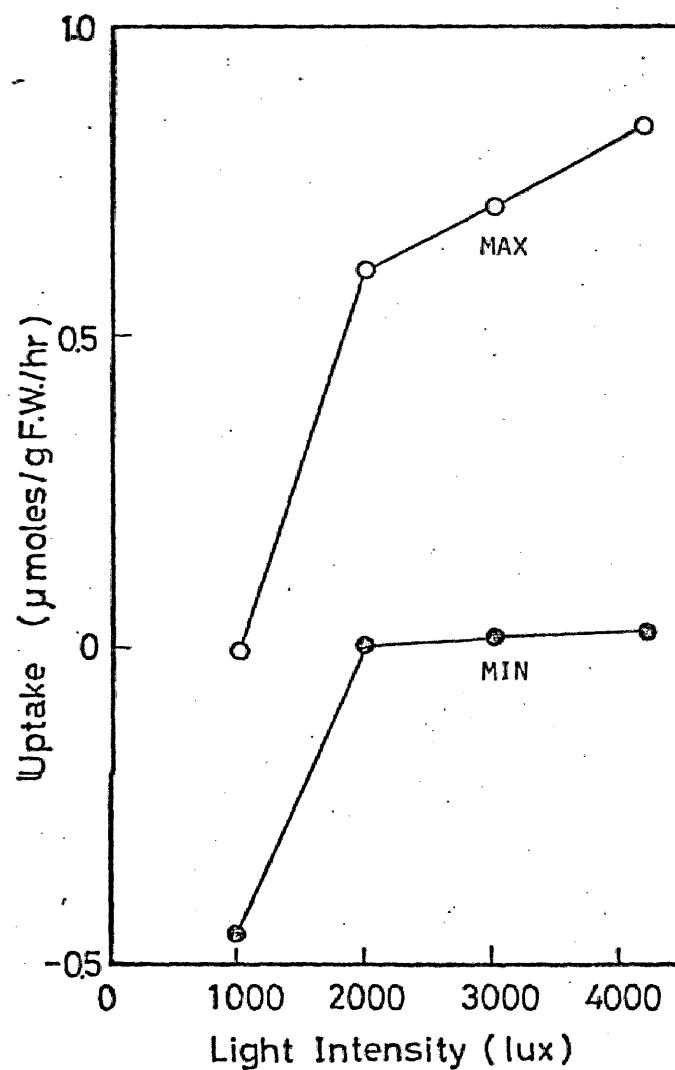


図13 カリウム吸収リズムの振巾(38)

種々の光強度下で、カリウム吸収リズムを観察し、連続明期中3番目の頂点(吸収の極大)と谷(吸収の極小)で、カリウム吸収速度を求めた。

他の実験条件については図9の註を参照のこと。

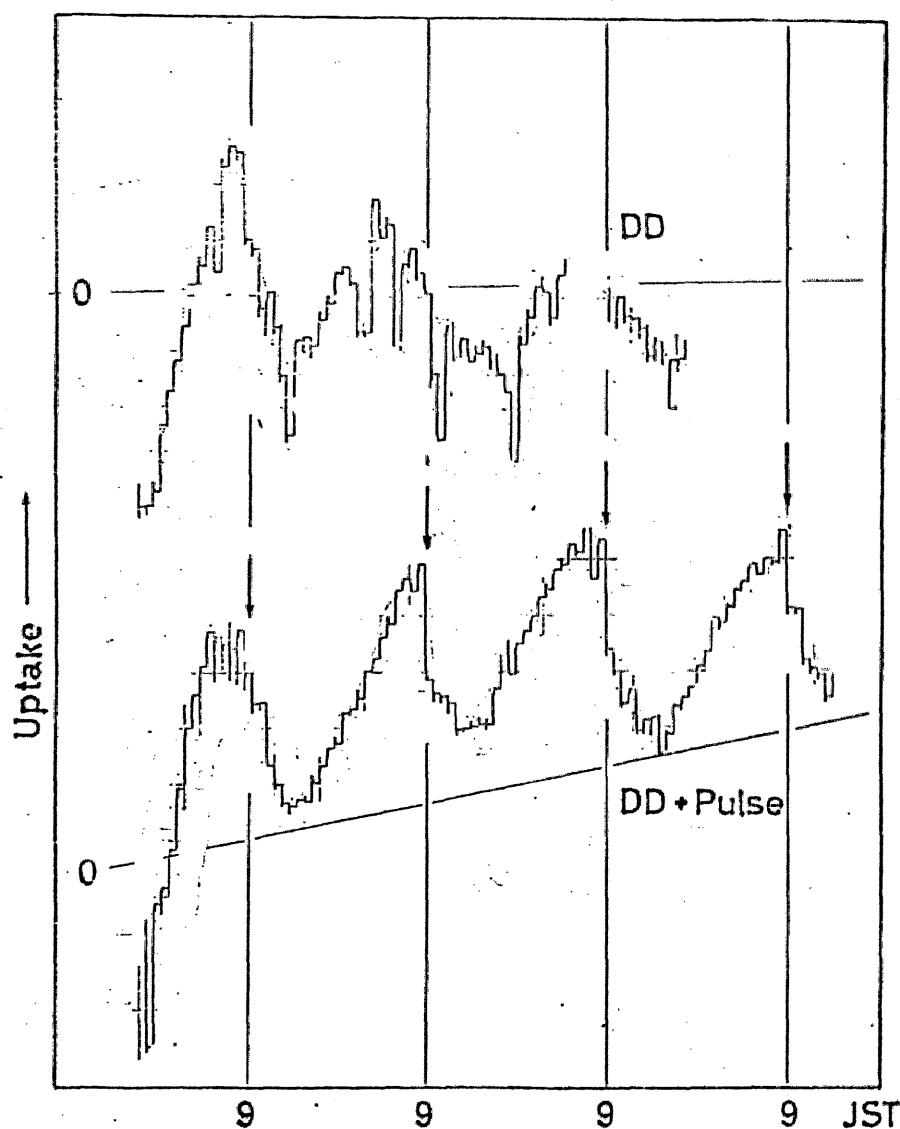


図14 糖投与条件下のカリウム吸収リズム

$1/100$  M メディウムに 1% Sucrose を加えたものを Flow-medium として使用し、実験は無菌状態で行った。DD は連続暗期中の、DD + pulse は毎日 9:00 JST に 15 分、3000 lux の白色光パルスを与えたものである。うえつぎは前培養の明期の終り (JST 18:00) に行い、にだちに吸収能をモニターした。0 は initial level を示す、図 9 の註を参照。

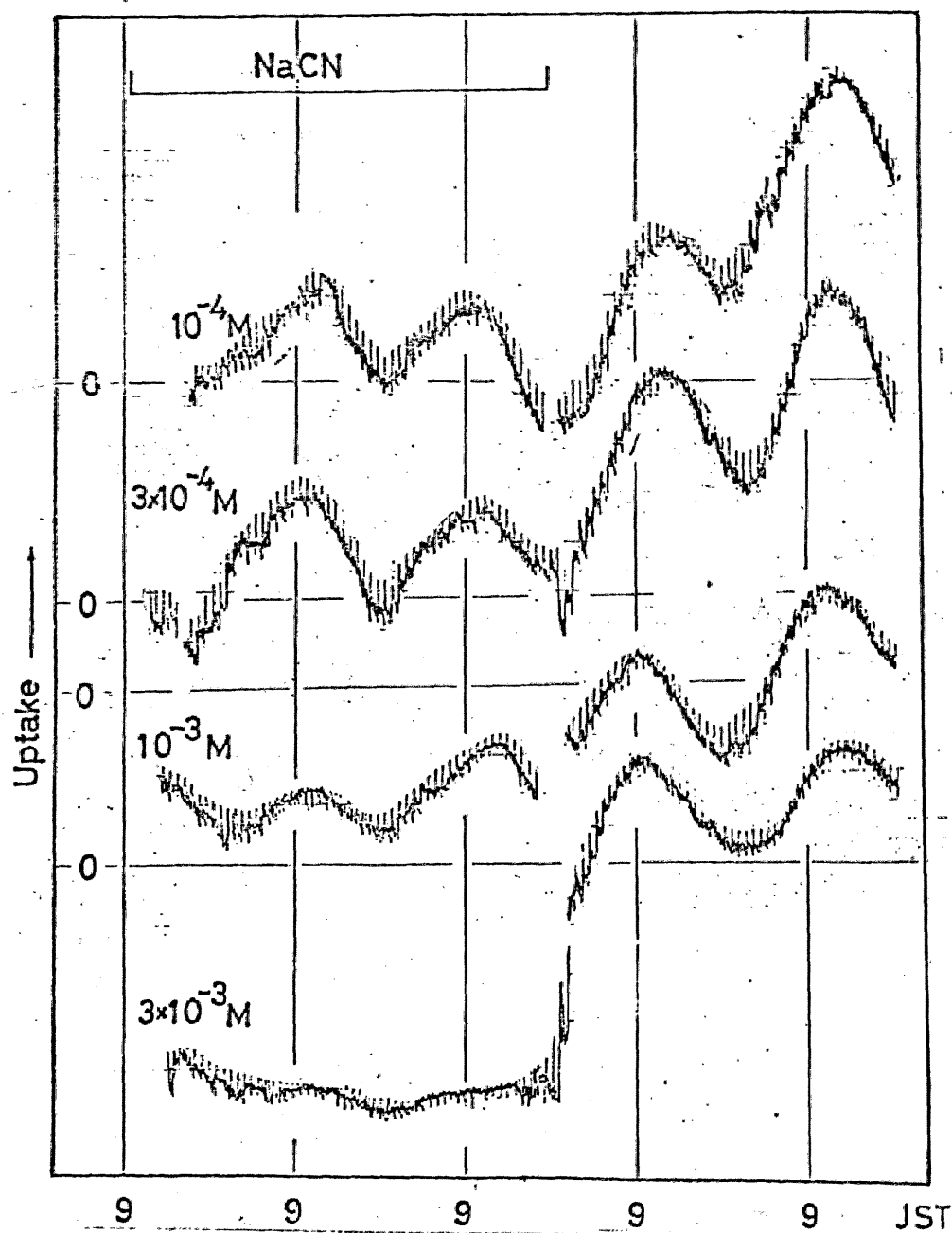


図15 NaCN の効果(4)

薬剤を図に示した投与期間の間、Flow-medium を介して与えた。投与期間の始めと終りは、それぞれ薬剤を含んだ  $1/100$  M 培地、 $1/100$  M 培地 20 ml で洗い、すみやかに置換される様にした。

この図には、連続明期 2 日目以後のカリウム吸収リズムが示されている。他の条件については図 9 の註を参照のこと。

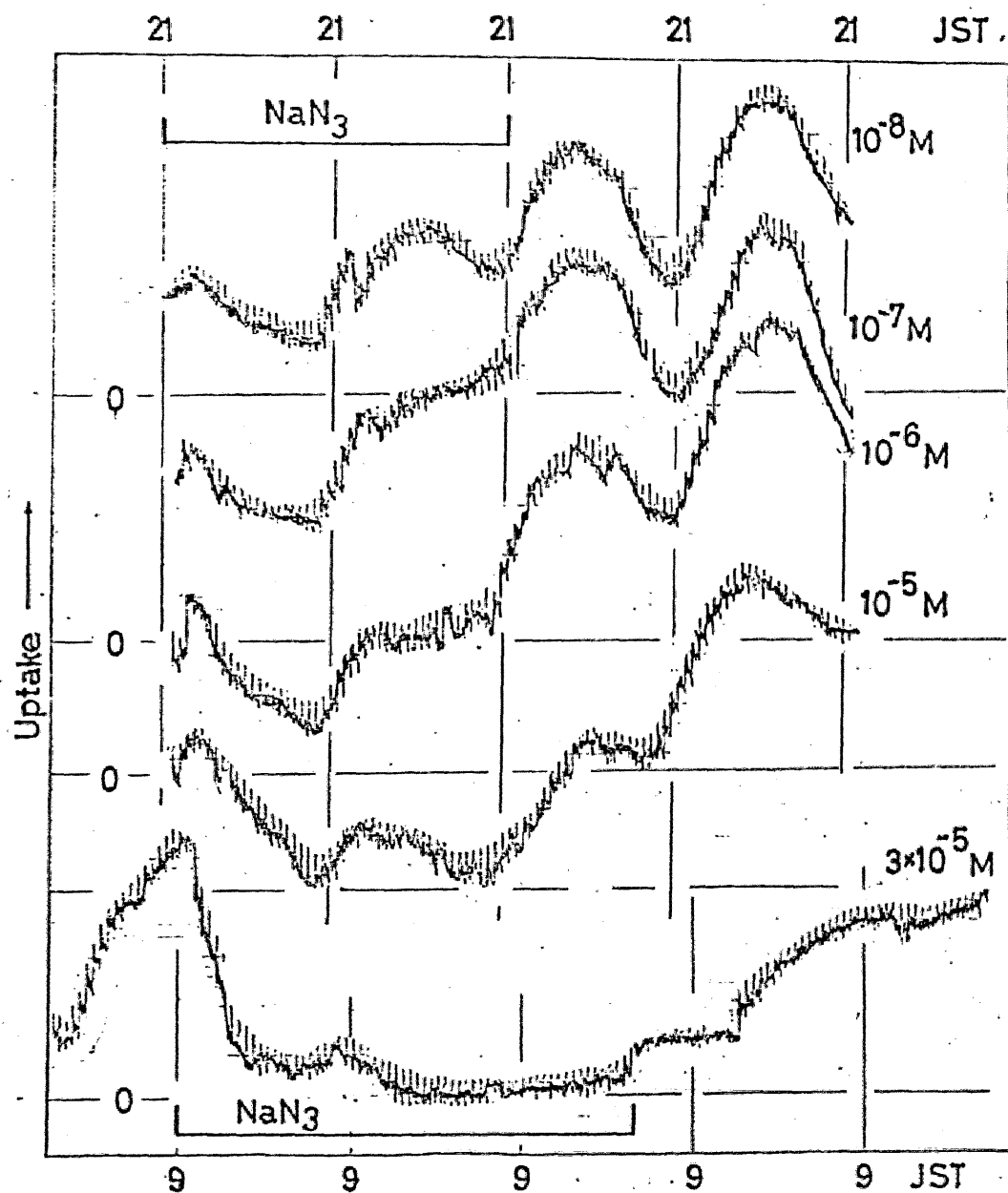


図16 Azideの効果(4)

図に示された様に  $\text{NaN}_3$  を与えた。  $10^{-8} \sim 10^{-5} \text{M}$  は連続明2日目の21時以後、  $3 \times 10^{-5}$  は連続明第1日の15時以後のカリウム吸収リズムが示されてゐる。葉利投与については図15、その他の実験条件については図9の註を参照のこと。



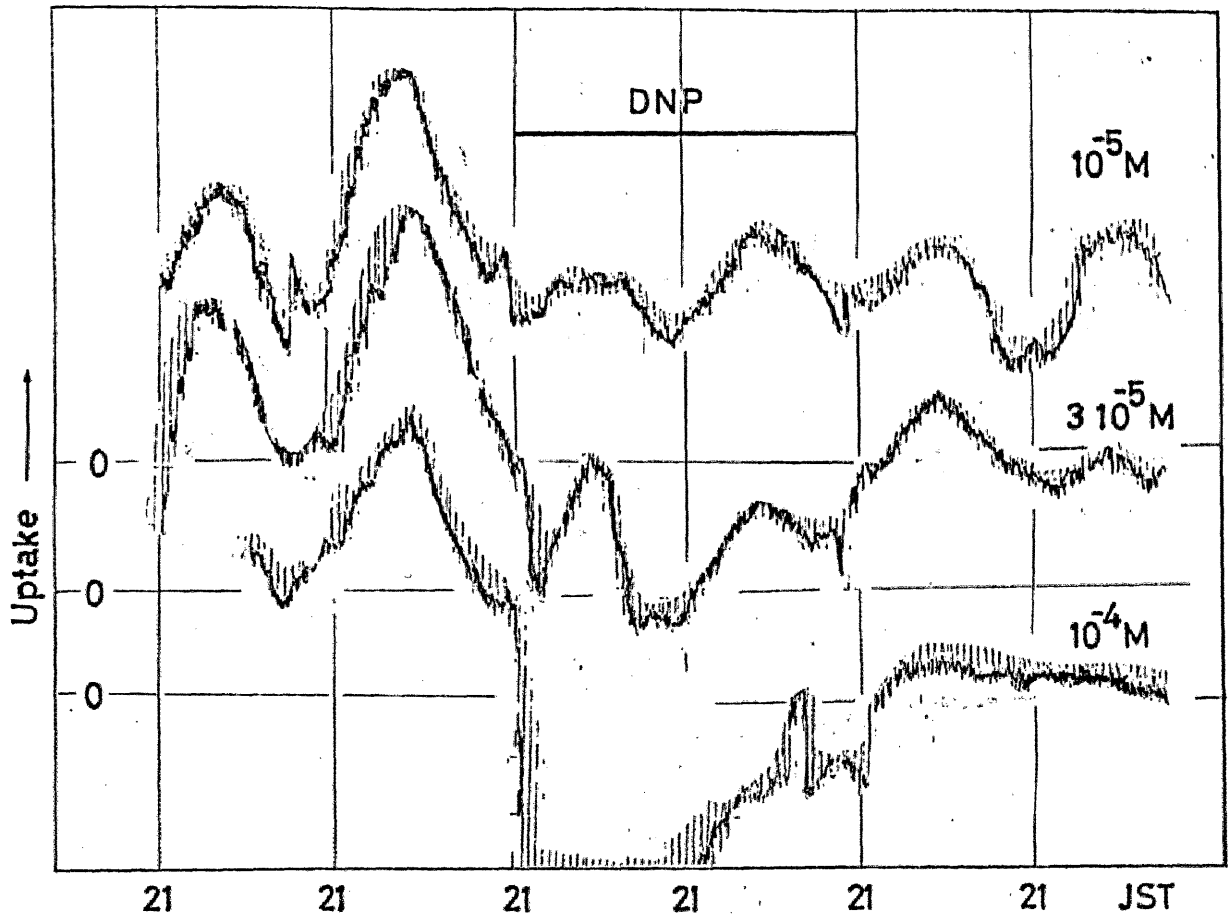


図17 DNP (Dinitrophenol) の効果 (41)

図9および15の註を参照。その他の条件は図9と同じである。薬剤投与期間が示してある。

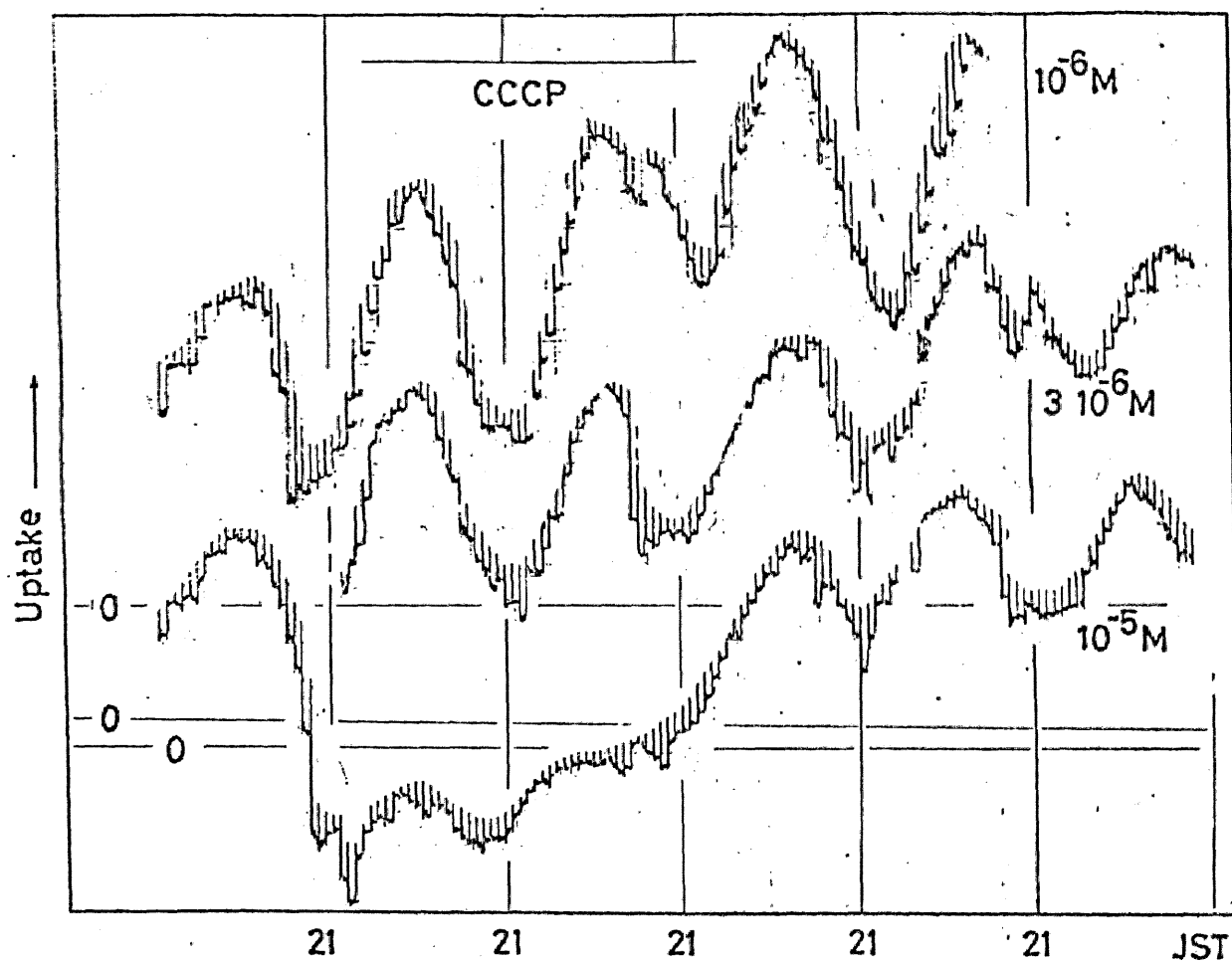


図18 CCCP (Carbonyl cyanide-*m*-chlorophenyl hydrazide) の効果  
 図中に示した様に各濃度のCCCPを与えた。図9  
 および図15の註を参照のこと。その他の条件は図9と同じである。

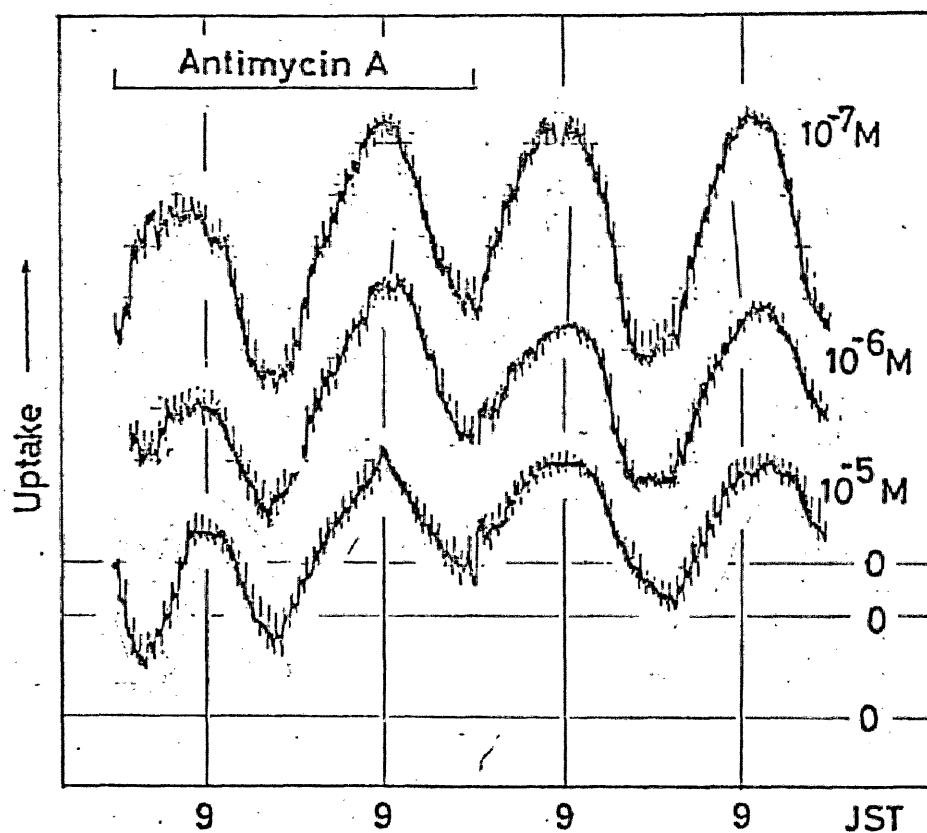


図 19 Antimycin A の効果 (41)

図中に示した様に各濃度の Antimycin-A を与えた。  
図 9, 15 の註を参照。その他の条件は図 9 と同じ  
である。

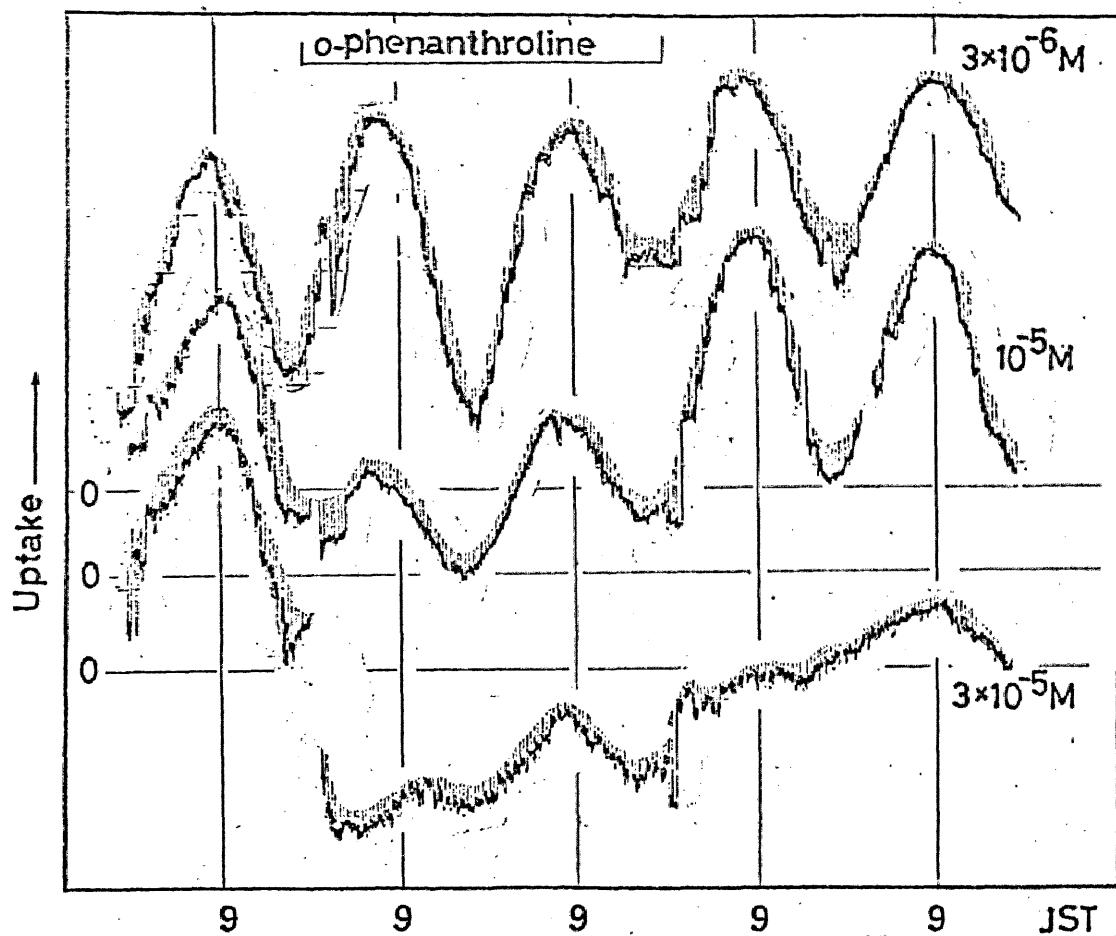


図 20 o-phenanthroline の効果

図に示すように o-phenanthroline を与えた。薬剤投与については図 15。その他の条件は図 9 と同じである。

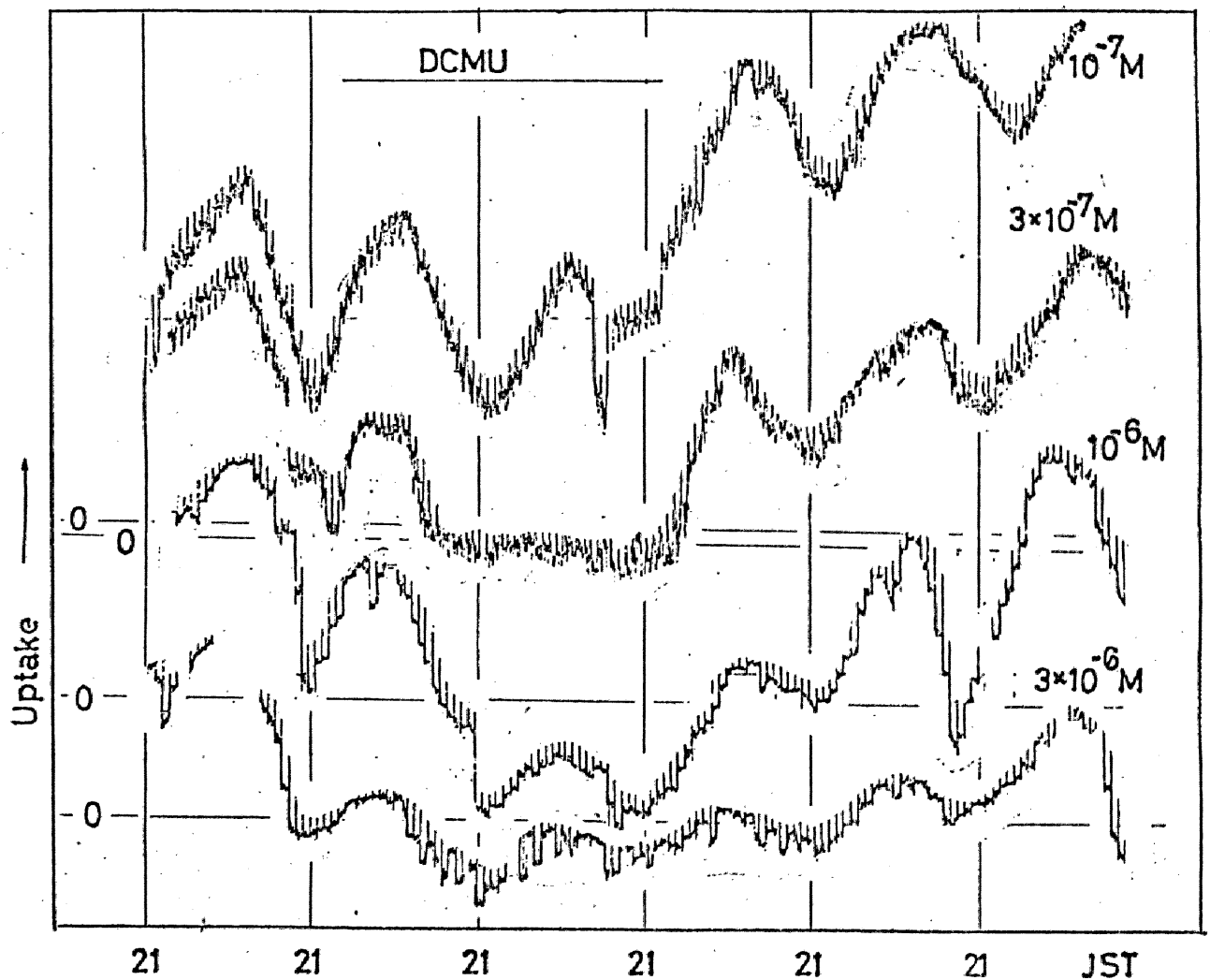


図 21 DCMU (dichlorophenyl - dimethyl urea) の効果 (41)

図に示す様に DCMU を与えた。薬剤投与については  
は図 15, 他の条件は図 9 と同じである。

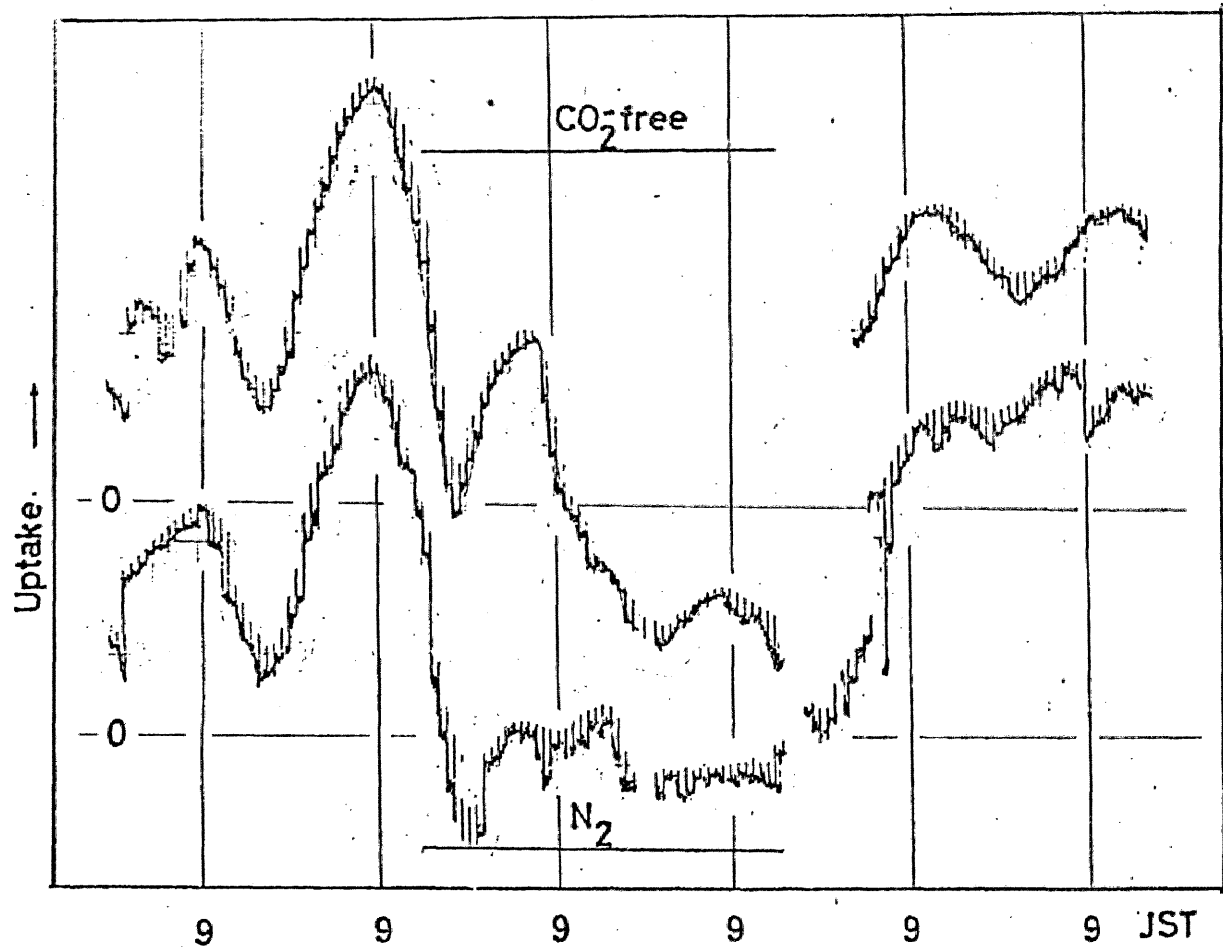


図 22  $N_2$  および  $CO_2$  の効果

図に示した期間だけ  $N_2$  および 5N KOH を通した空気を約  $1 L/min$  で流した。他の条件は図 9 と同じである。

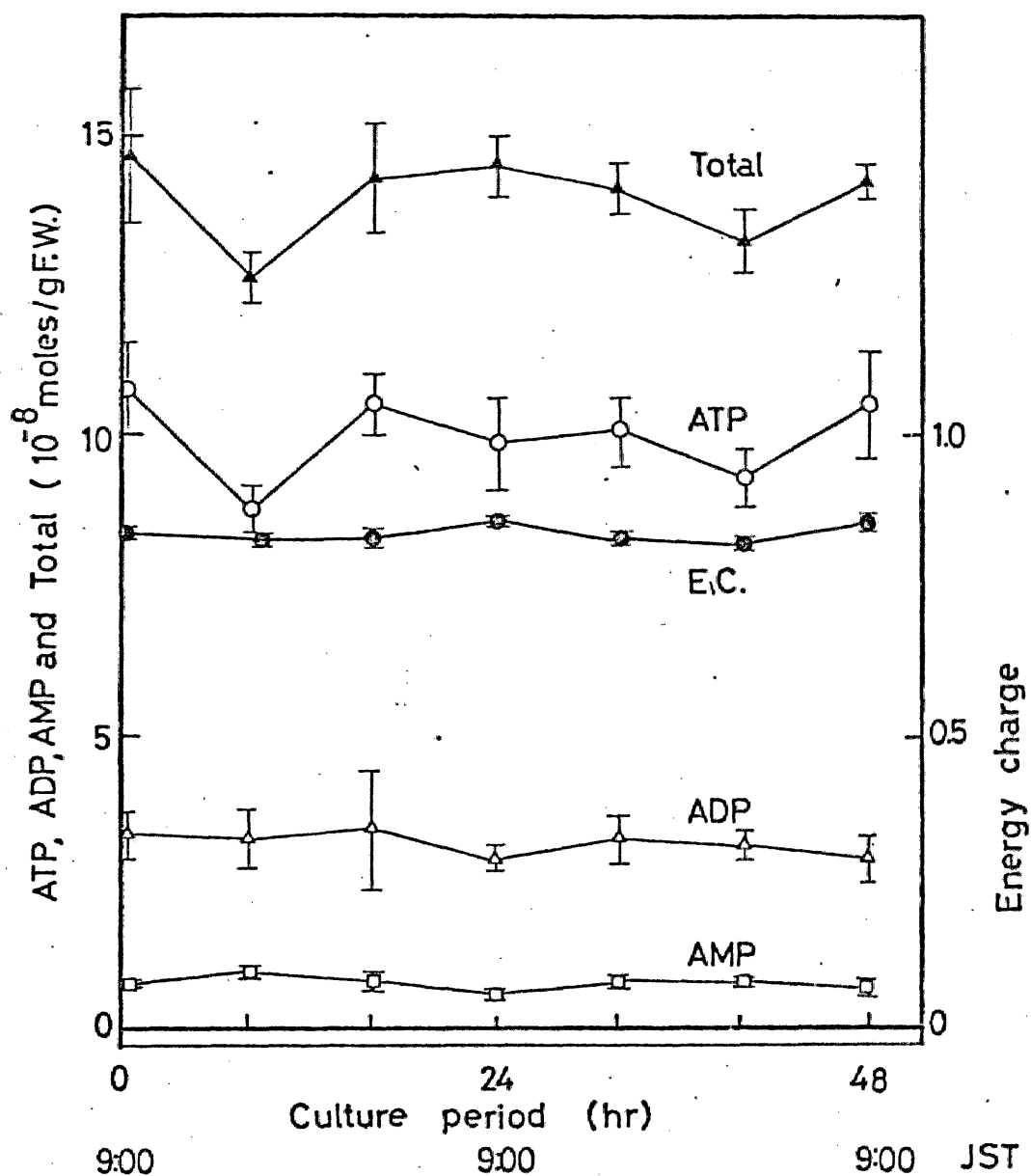


図 23 連続明期下でのアデニンヌクレオチド含量(42)

M-Sucrose 培地, 連続明期下に培養したウキワサ約 1g を過塩素酸で抽出し中和した。ホタルの Luciferin-Luciferase 系を準備し, これに抽出液を加え生じる光をシンチレーションカウンタで測定し ATP 量を定量した。又, myokinase, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase の組み合わせにより, ADP もしくは AMP から, NADH<sub>2</sub> の酸化を導き, NADH<sub>2</sub> 量を光的に定量する事により, ADP, AMP を定量した。Energy charge は次式で算出した。
$$\frac{(ATP + \frac{1}{2} ADP)}{(ATP + ADP + AMP)} = \text{Energy charge}$$
。培養条件については図 1 の註を参照のこと。

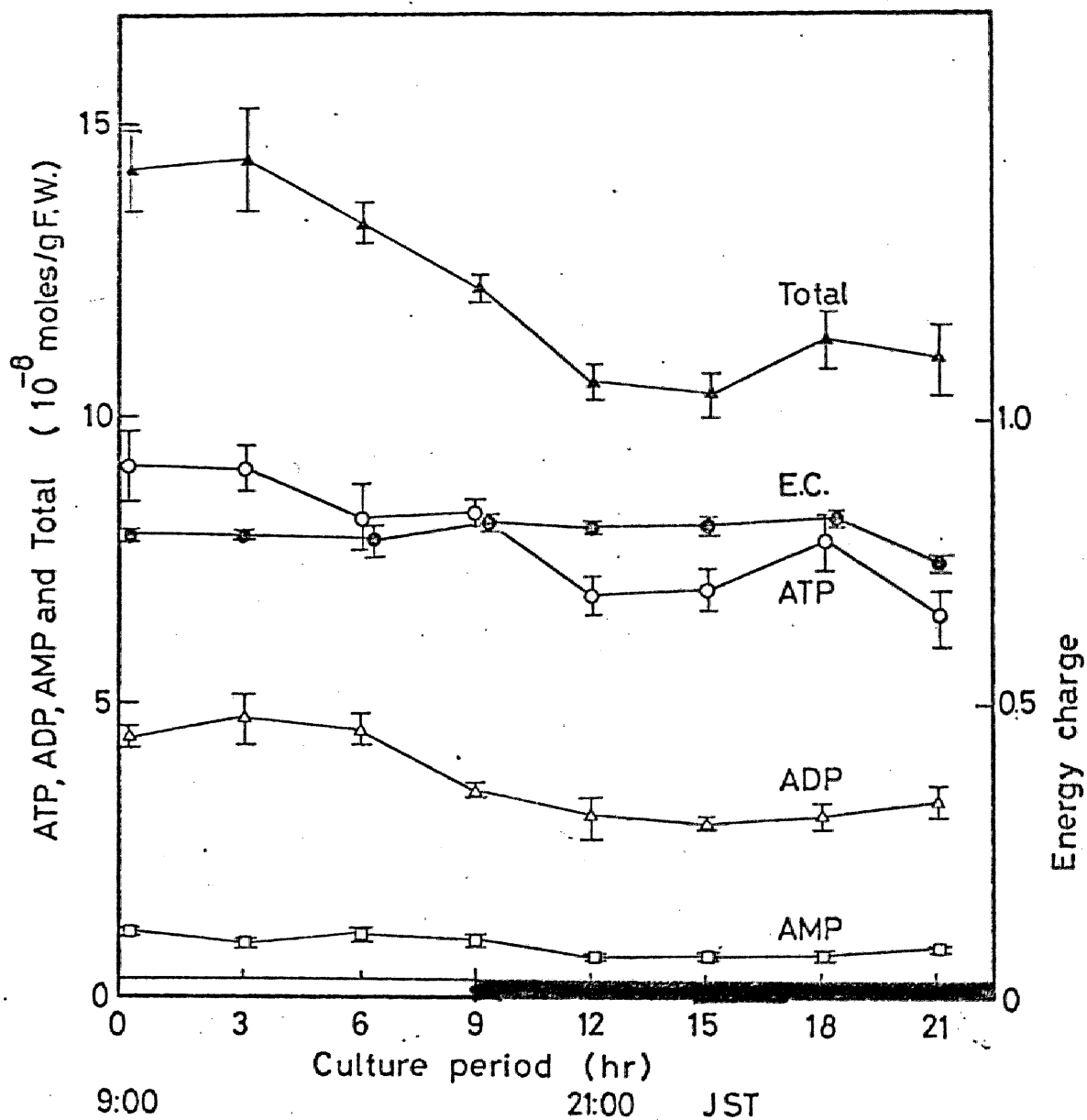


図24 短日条件 ([9(15)]) 下でのアデニンヌクレオチド含量の変化(42)

短日条件下で育成したウキワカについで図23と同様の方法で ATP, ADP, AMP を定量した。培養は M-Sucrose 培地で行った。前培養については図1の註を参照のこと。



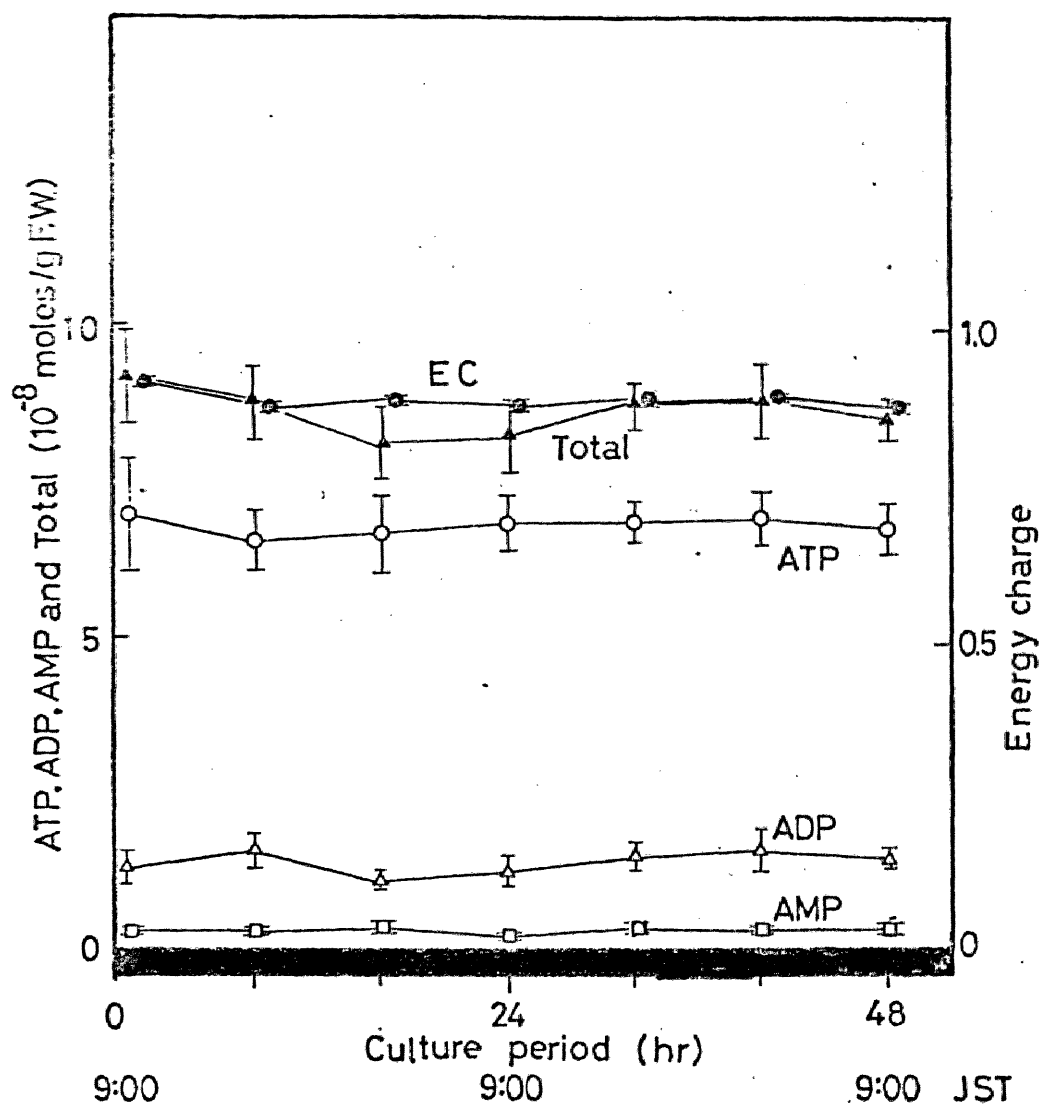


図25 連続暗期でのアデニンヌクレオチド含量の変化(42)

全暗黒, M-Sucrose(1%)メディウム上で育てたウキクサのATP, ADP, AMP量を測定した。測定法は図23と同じである。前培養については、図1の註を参照。

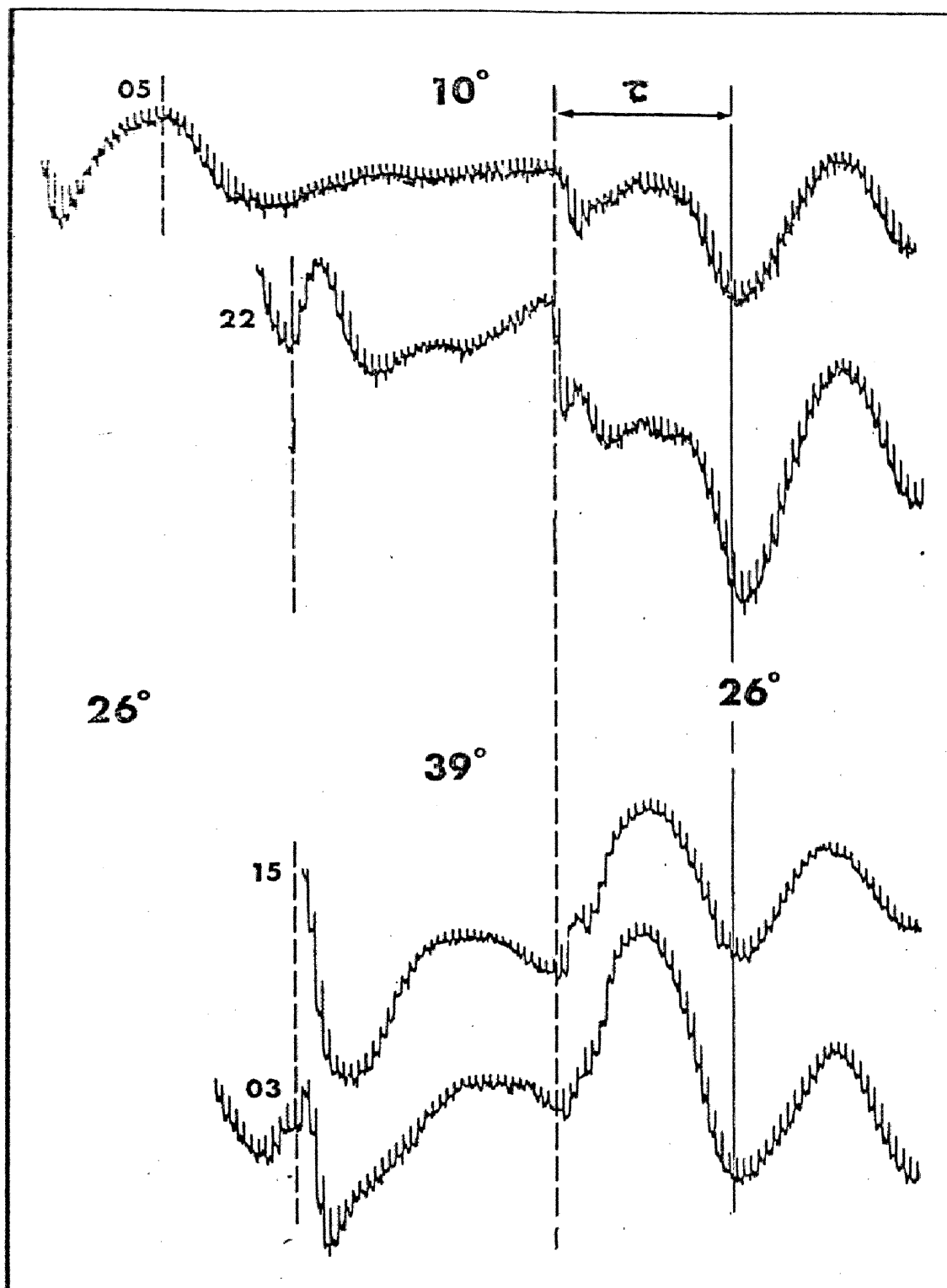


図26 長時間の10°C処理の位相に及ぼす効果(43)

連続明期第1日目の05:00 JSTと2日目22:00 JSTにFlow-medium cultureの温度を26°Cから10°Cに変更した。それぞれ54h, 36hr 10°Cに保った後26°Cに戻した。図は10°Cから26°Cに戻した時をとりえて示してある。τはこのリズムの26°C下での周期である。その他の培養条件は図9と同じである。なお39°C処理の結果も同様に示してある。

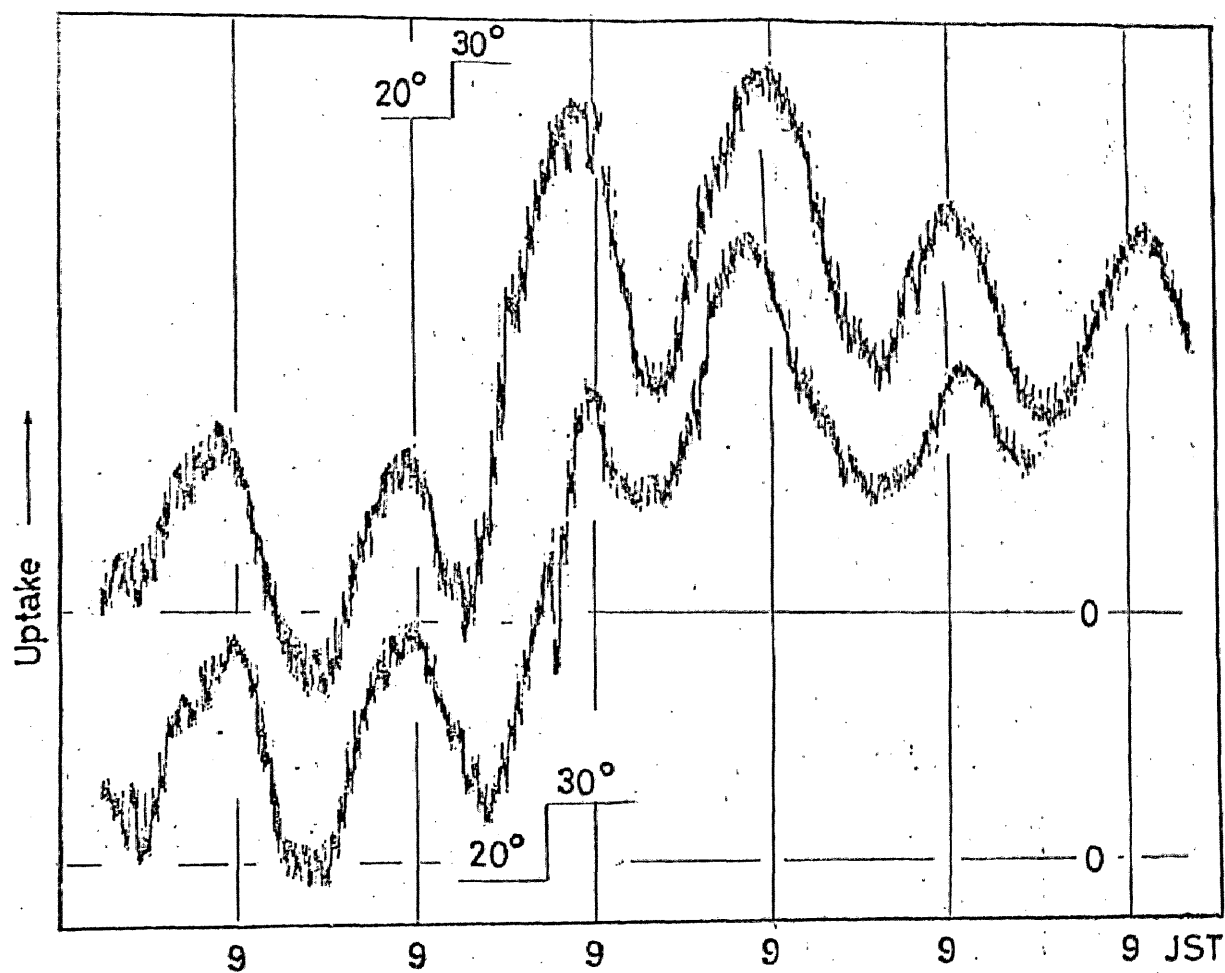


図 27 A 温度変更 ( $20^{\circ} \rightarrow 30^{\circ}\text{C}$ ) に伴う位相の動き (43)

図に示した時期に連続明開始時から  $20^{\circ}\text{C}$  に保たれていた Flow-medium Culture の温度を  $30^{\circ}\text{C}$  にした。他の条件は図 9 と同じである。

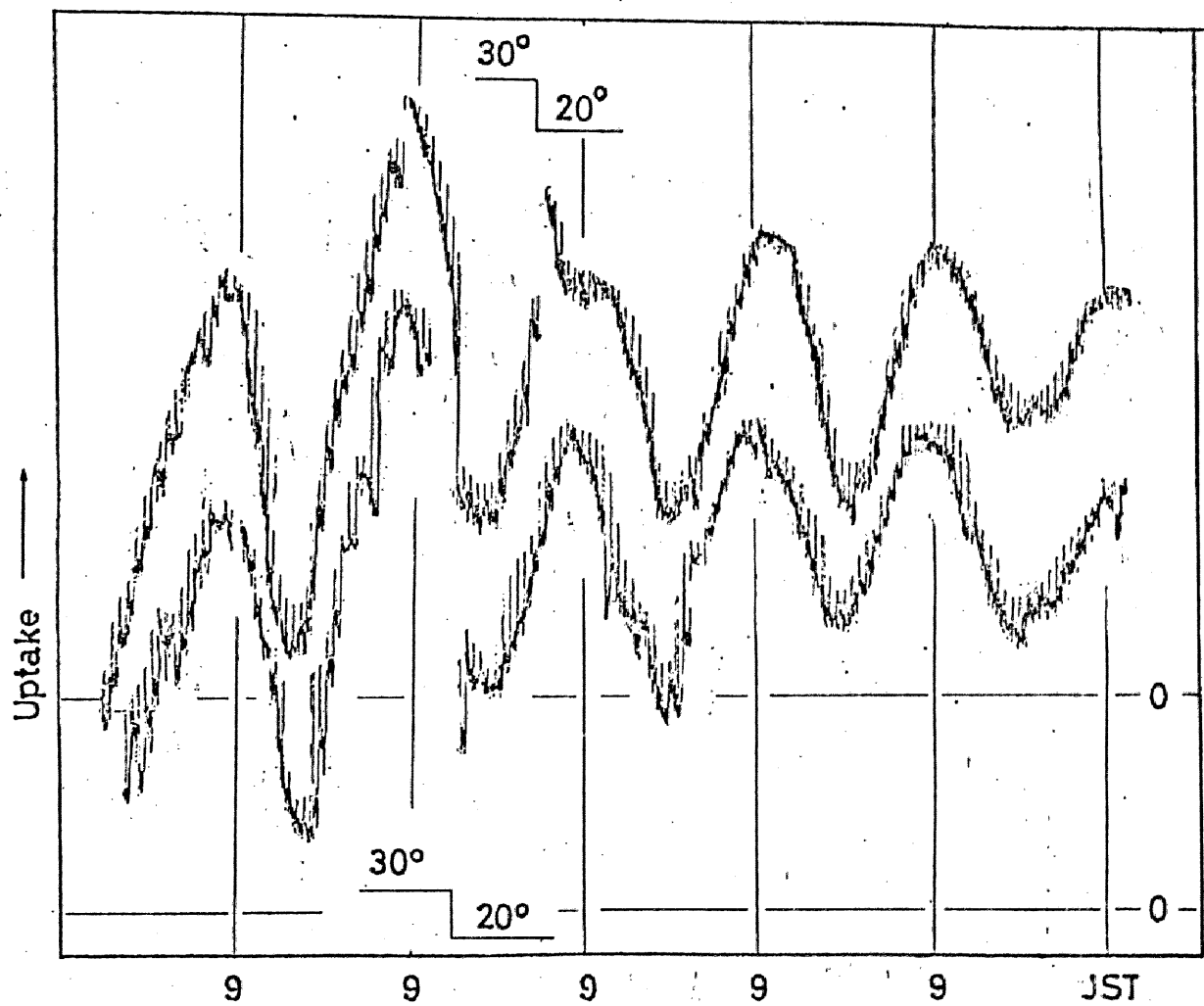


図 27 B 温度変更 ( $30^{\circ} \rightarrow 20^{\circ}\text{C}$ ) に伴う位相の動き (43)

A とは 遂に  $30^{\circ} \rightarrow 20^{\circ}\text{C}$  の温度変更を与えた。

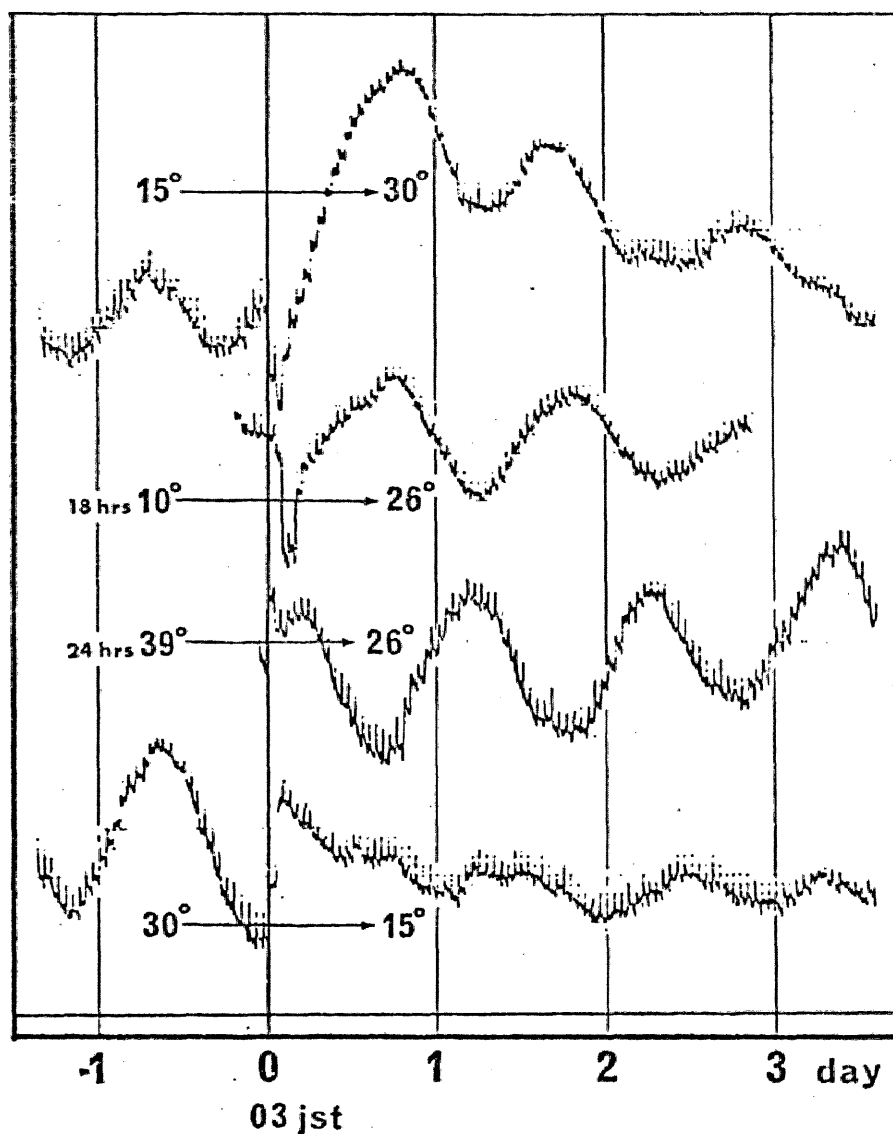


図28 温度変更 ( $15^{\circ} \rightleftharpoons 30^{\circ}\text{C}$ ) のカリウム吸収リズムへの効果 (43)

(図中 time 0)

連続明期3日目の03:00 JST に温度を  $30^{\circ} \rightarrow 15^{\circ}\text{C}$ ,  $15^{\circ}\text{C} \rightarrow 30^{\circ}\text{C}$  に変更した。また,  $10^{\circ}\text{C}$  18時間, および  $39^{\circ}\text{C}$  24時間の温度処理の後, 同時刻に  $26^{\circ}\text{C}$  に戻した後のリズムも示してある。同様の結果が09, 15, 21 JST にあり行った実験からも得られる。他の条件は図9と同じである。



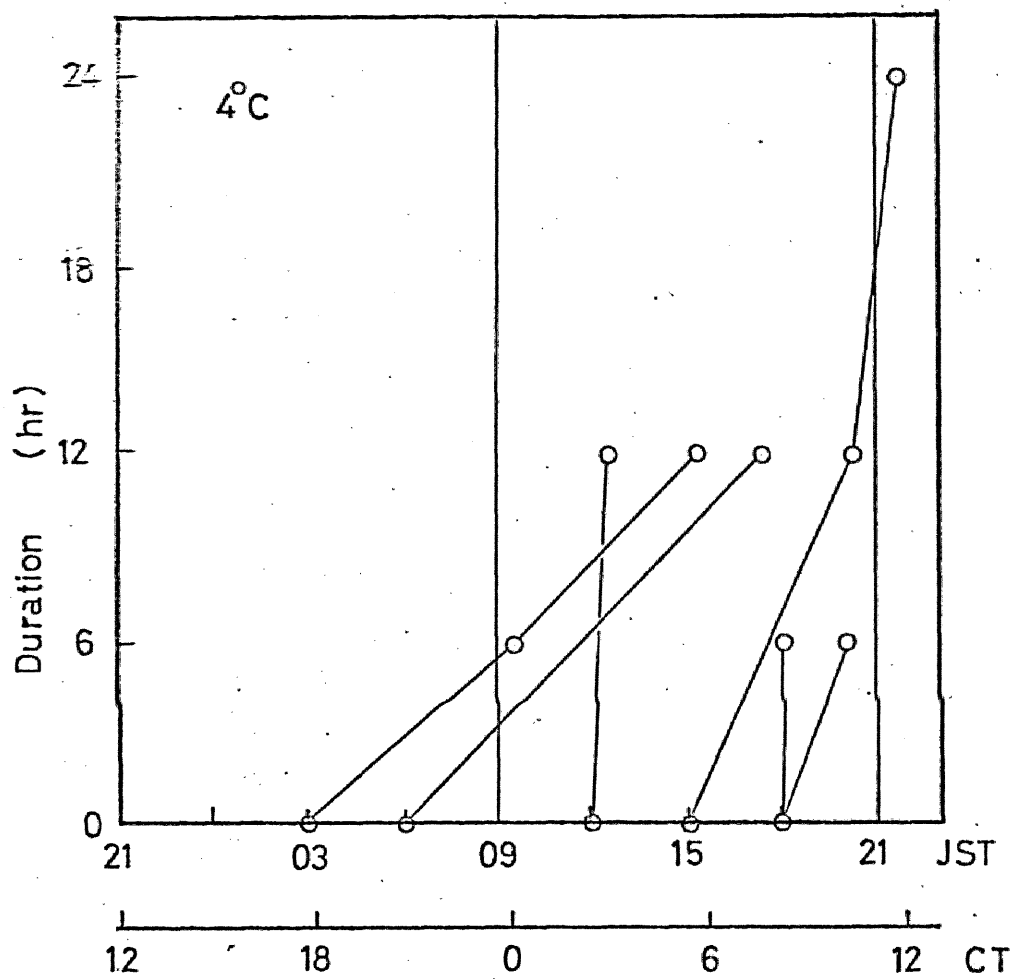


図3D 4°C下でのリズムの位相進行(43)

図29と同様の実験も4°Cで行った。

図29の註を参照。

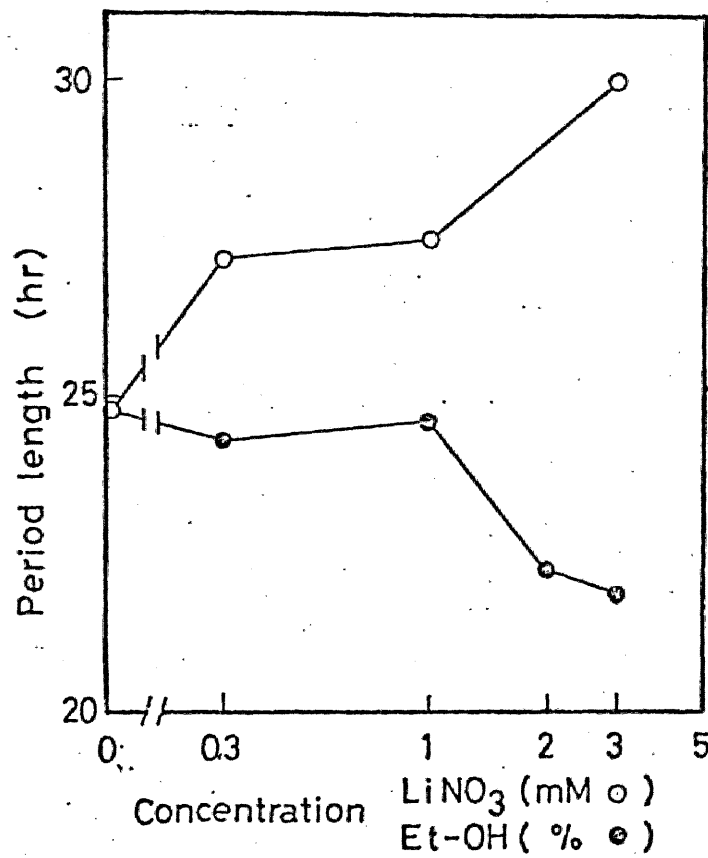


図31  $\text{LiNO}_3$  およびエタノールの周期に及ぼす影響(44)

Flow-mediumに表記の濃度の  $\text{LiNO}_3$  またはエタノールを加え、連続培養下での第2日目以後の頂矢の間隔から周期を測定した。他の条件は図9と同じ。



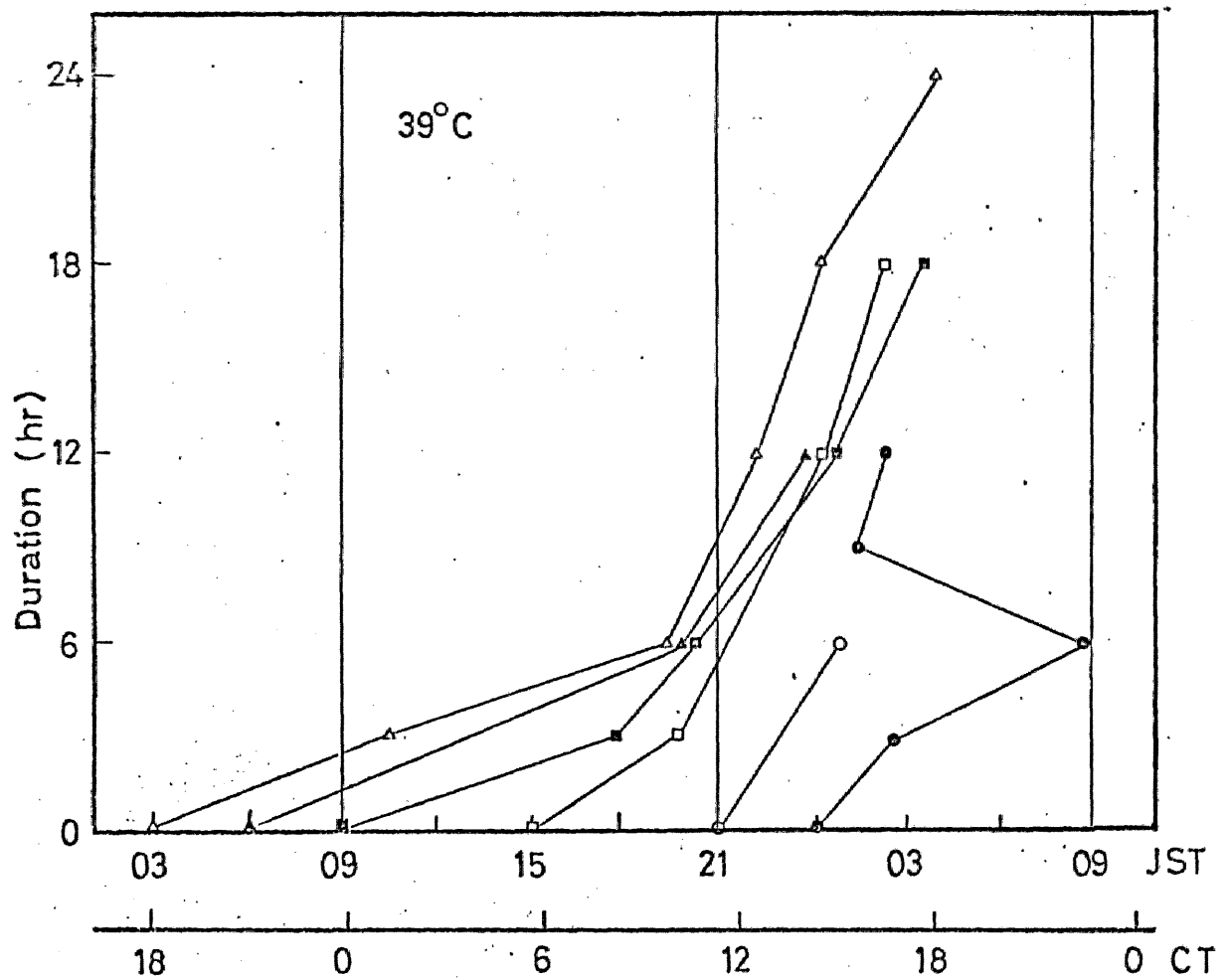


図 32 39°C 下でのリズムの位相進行 (43)

連続明期第 1 日目の 03 JST から 2 日目の 00 JST の間に図 29 と同様の温度処理を 39°C で与えた。その他の説明は図 29 の註と参照のこと。

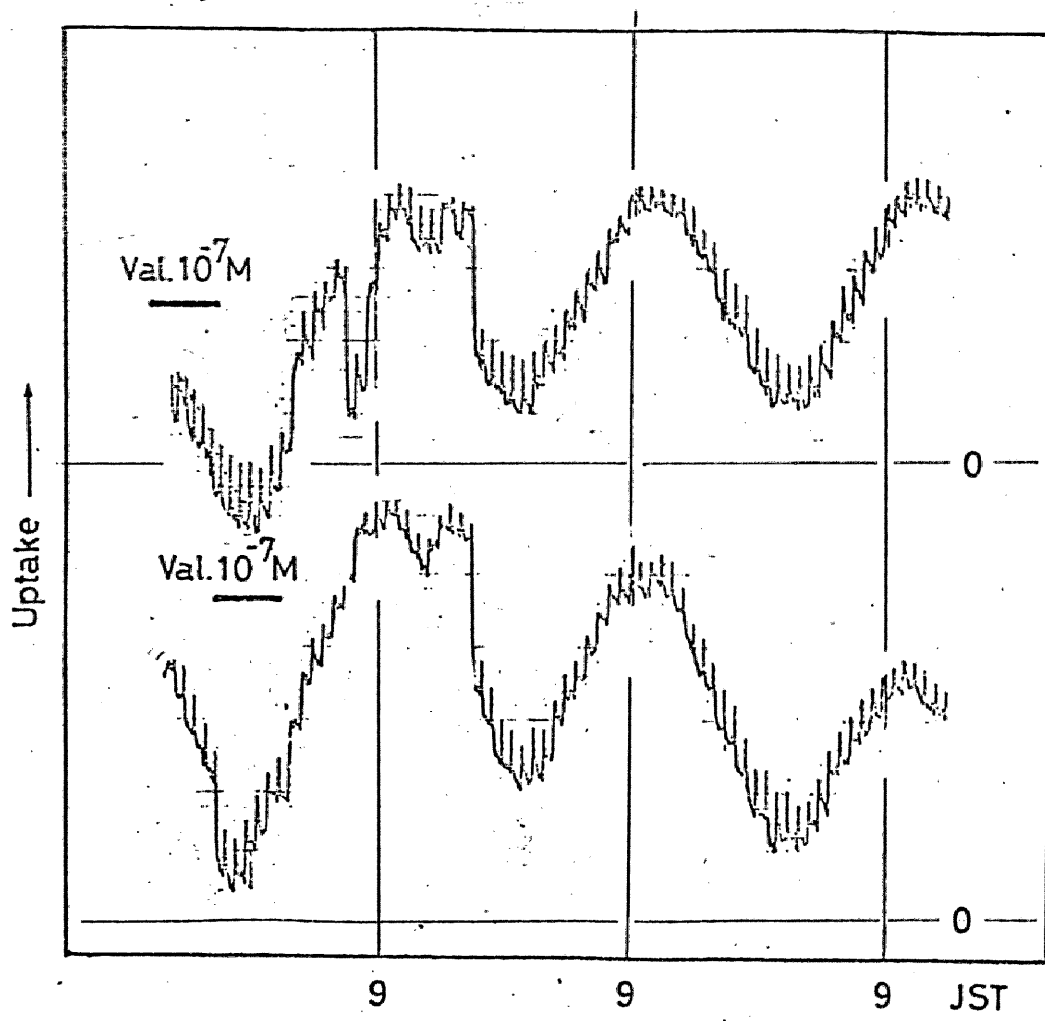


図33 Valinomycin の位相に対する効果

連続明期の第2日目に図に示したように  $10^{-7}M$  の Valinomycin を与え、位相に対する効果を調べた。その他の条件は図9の場合と同様である。

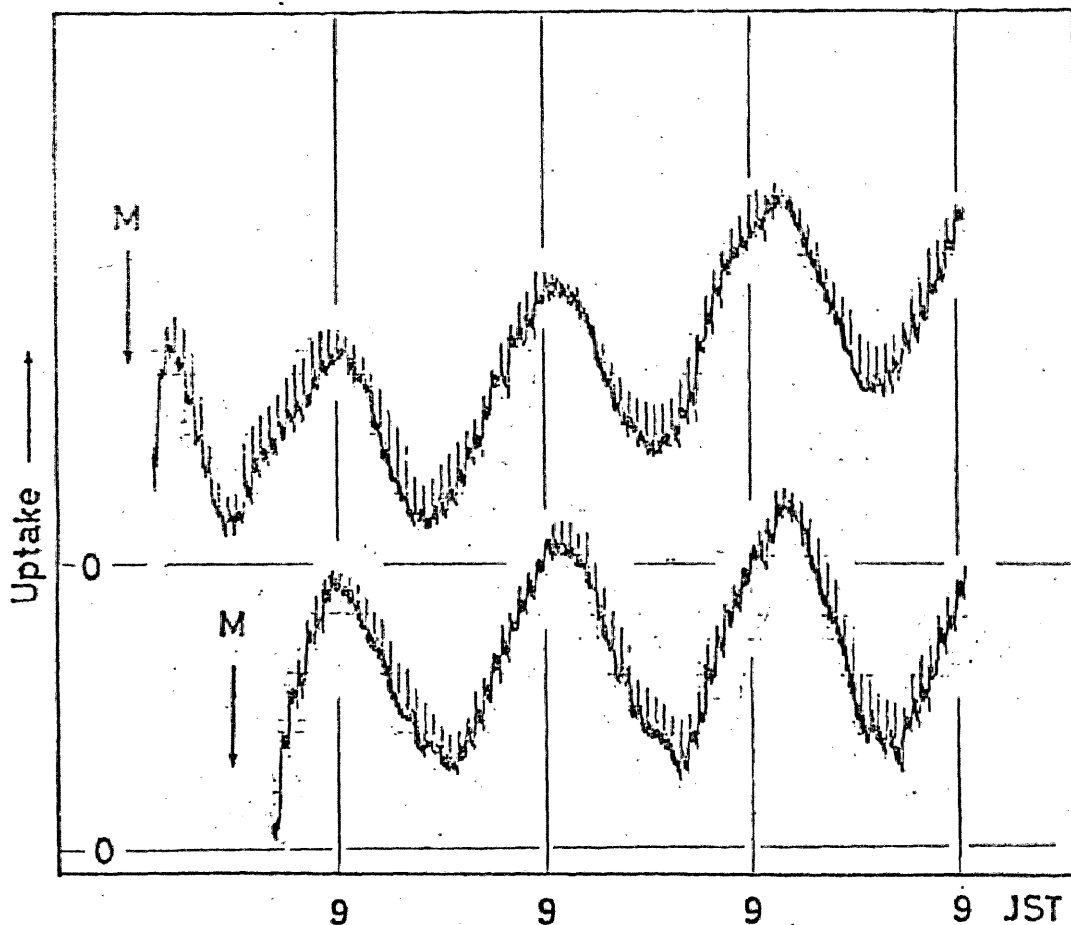


図34 外部カリウムの位相に対する効果

連続明期2日目の09, 21 JST (矢印) に50mLのMメティウムを与え、外部カリウムの濃度を100倍にして、位相に対する効果を調べた。その他の条件は図9の場合と同様である。なお、図には示されていないが09~21 JSTの間Mメティウムを与え続けても位相には大きな変化はない。

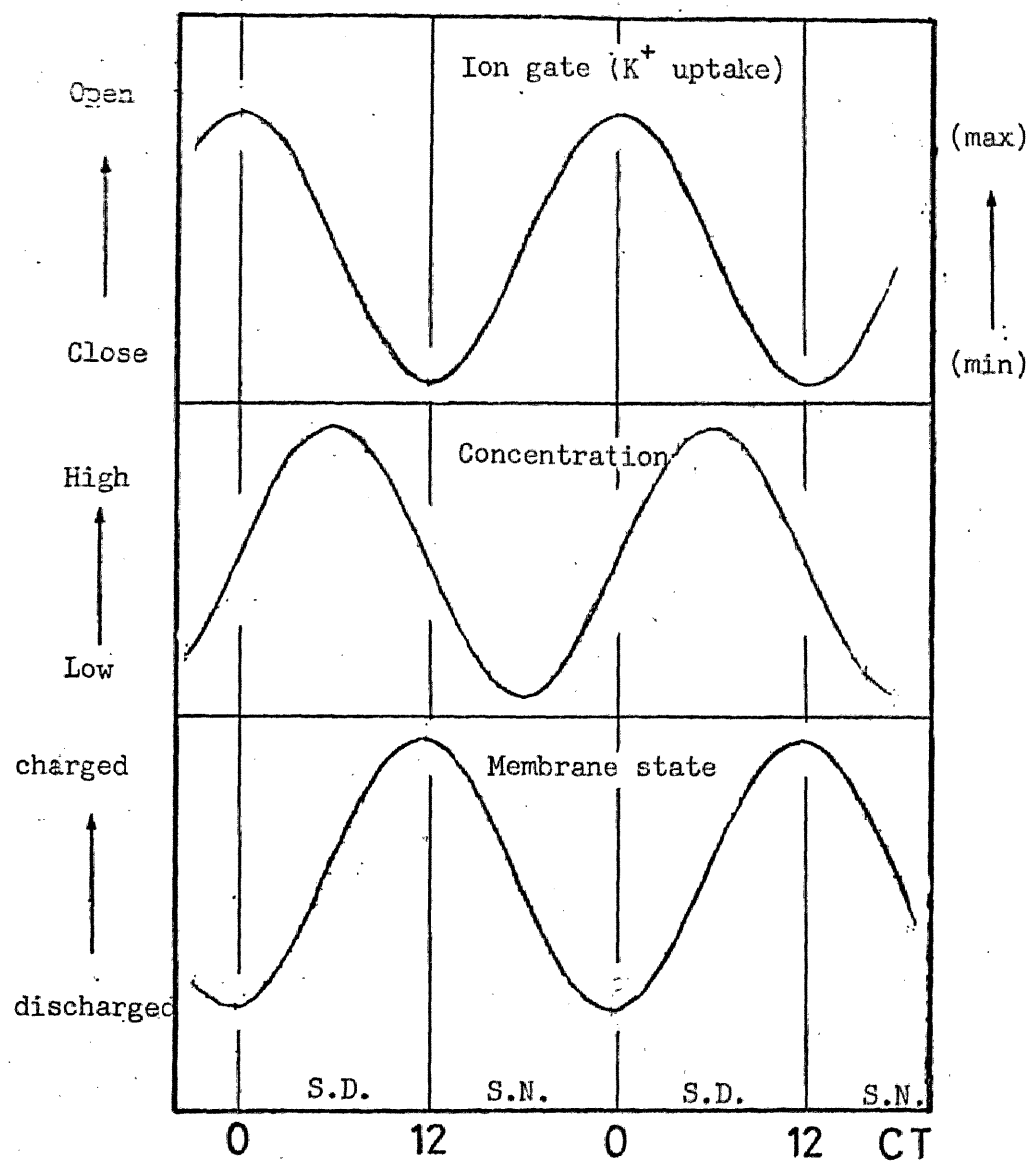


図35. リズム発現に係るパラメーターの時間経過

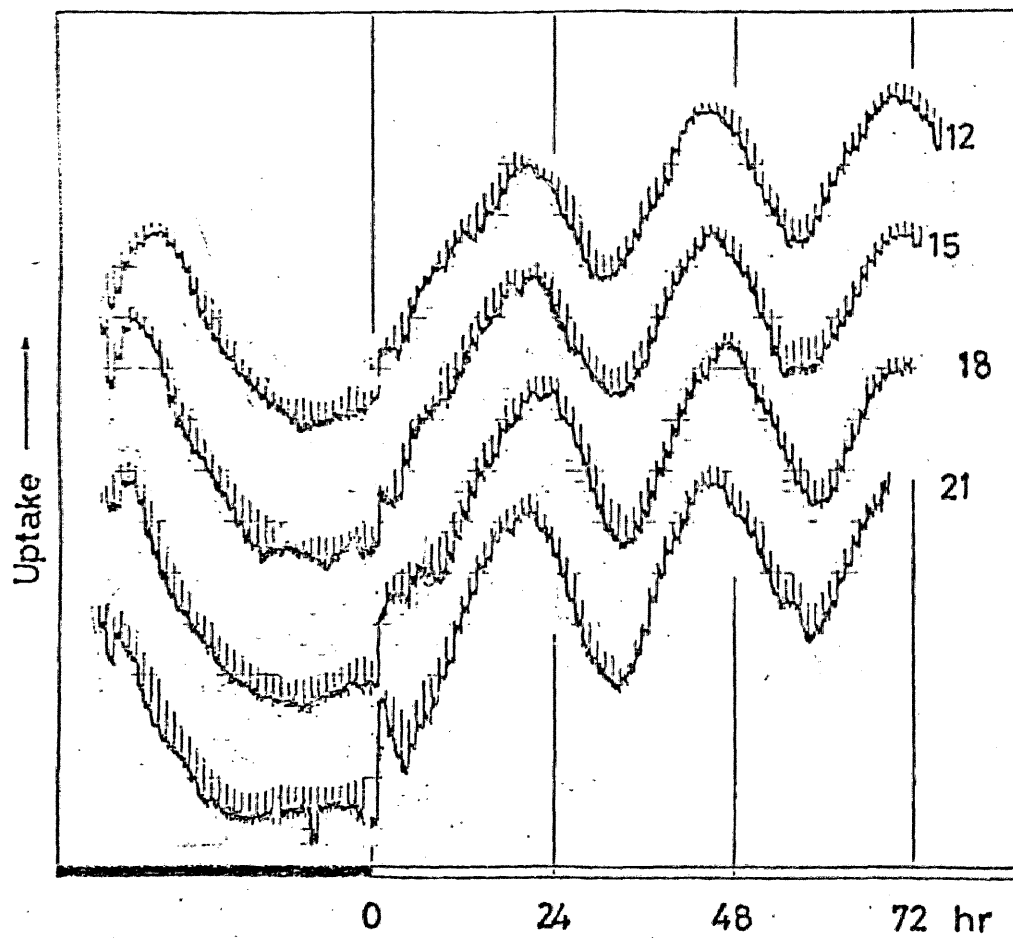


図36 長い暗期の後のリズムの再建。

36時間の暗期ののち、連続明に移した。連続明の開始時間は3日目の12, 15, 18, 21 JSTである。他の条件は図9の註を参照のこと。

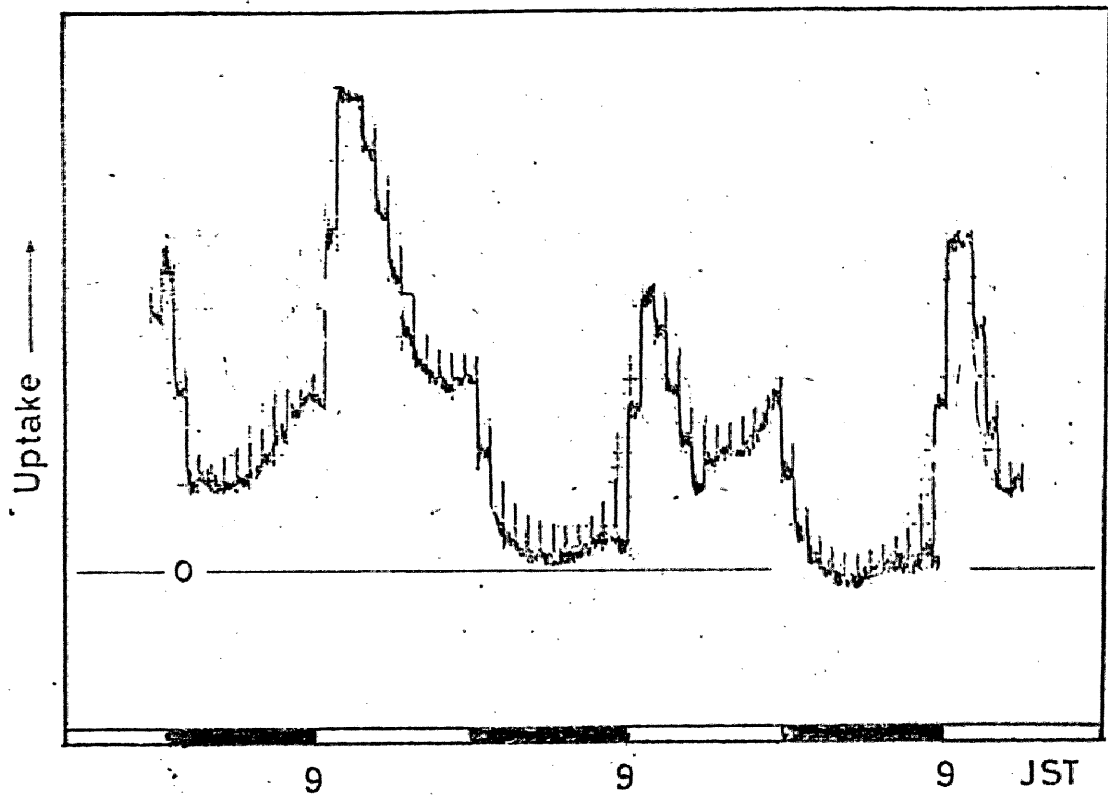
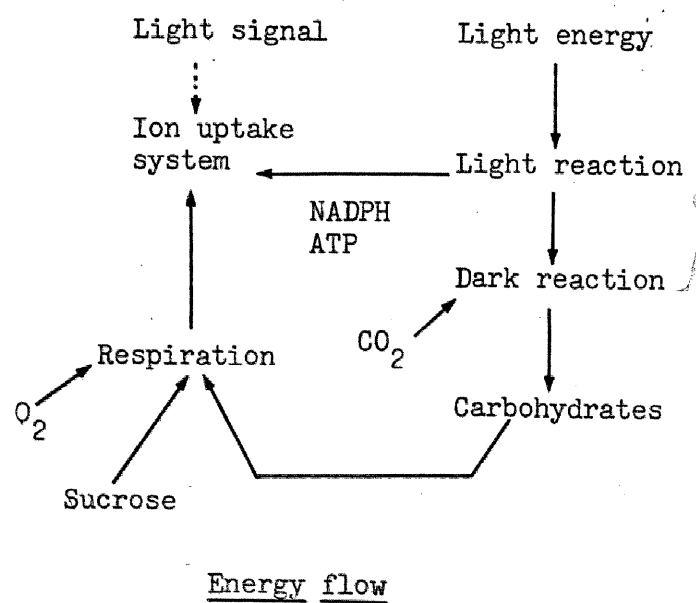
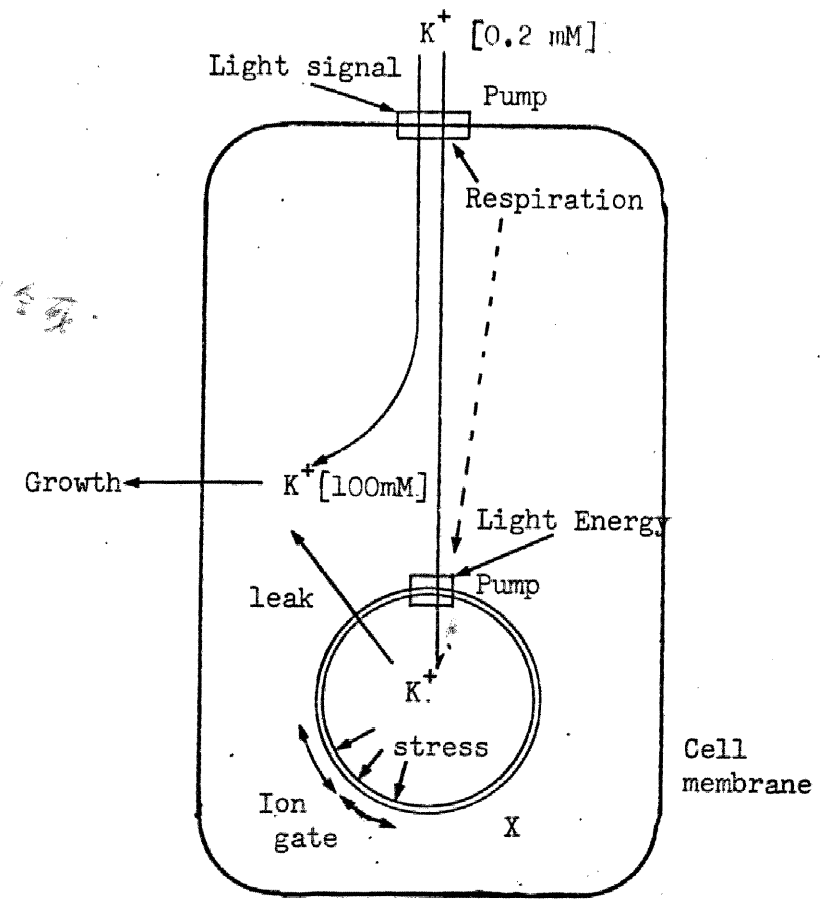


図 37 明暗条件下でのカリウム吸収リズム

うえつぎ後、15時頃の暗期の後、[12(12)]の明暗条件下でのカリウム吸収の変動も示す。図には第1回目の暗期からの変動が示してある。他の条件は図9の場合と同様である。



Energy flow



Model

図 38 K<sup>+</sup>吸収リズム 左) エネルギーの流れ  
 右) モデル Xは想定された小胞  
 Pumpは細胞の膜全体に存在すると考へる。

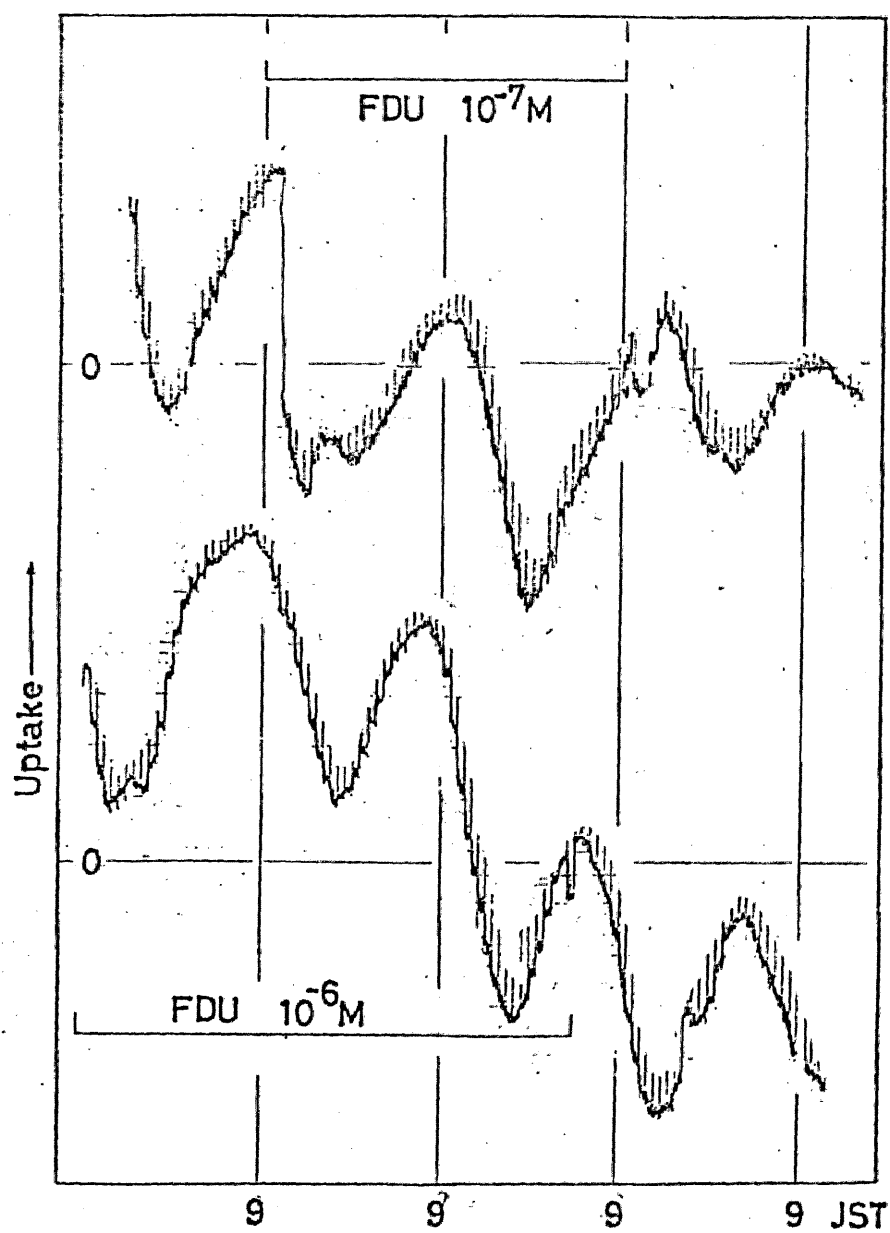


図 39. FDU (5-fluoro deoxyuridine) の効果

図に示した様に FDU を与えた。  $10^{-6}M$  は連続明期開始直後から、  $10^{-7}M$  の場合は 2 日目の 09:00 JST から処理を始めた。その他の条件は図 9 と同様である。