

概日リズムデータの数理解析： 振幅モデルによるアプローチ

徳田 功[✉]

立命館大学理工学部機械工学科

概日リズム実験を行う研究者の立場からすると、実験設計や計測結果の解析に際して、どのような数理モデルを選択するのが適切かを判断するのは悩ましい問題かと思われる。数理モデルには、抽象化された振動体モデルから、より現実的な遺伝子ネットワークモデルまで多様な種類が存在し、それぞれに、長所と短所がある。本稿では、抽象モデルの一つである、位相振幅モデルについて取り上げる。位相振幅モデルはパラメータへの依存性の少ない、一般性の高いモデルであり、個体レベルから、組織、細胞と幅広いスケールの問題に応用可能である。ここでは特に、「強い振動体と弱い振動体」および「自律振動と減衰振動」に着目しつつ、振幅モデルの基礎と応用について紹介し、振幅モデルが、概日リズム系の実験データを分析する有力なツールとなることを示す。

1. はじめに

1729年のオジギソウの就眠運動の観察に端を発する概日リズム研究は、転写フィードバックループの発見¹を経て、遺伝子改変技術、細胞計測・制御技術、分子計測技術などの進歩でさらなる発展を遂げている。ともすると実験的アプローチが中心と考えられがちな概日リズム研究において、理論的アプローチも重要な役割を果たしてきた。Pittendrigh^{2,3}による位相応答曲線概念は、振動理論に基づいて実験データを解釈する土台を築き、Winfreeの振動体の集団モデル⁴は、時計細胞が発見される以前から、時計集団の協働現象のコンセプトを確立した。Goodwin⁵による転写翻訳フィードバックループモデルは、時計遺伝子の発見に先駆けて、遺伝子制御機構を予測するものであった。

一般論としての振動子や振動子集団の理論⁶⁻¹⁰も、時計の引込みや細胞間同期の理解を深める役割を果たしてきた。例えば、周期入力を受ける自律振動の引き込み特性を表す「アーノルドの舌（詳細は2節を参照）」^{7,8}は、概日時計の環境因子への同調を説明する基礎となる。また、蔵本モデル^{6,9}は、時計集団の同期現象に関して強力な解析手法を与える。このような一般の振動子理論に加えて、新たに発見された時計遺伝子を網羅的に取り込み、詳細の生化学反応を考慮に入れた大規模な遺伝子ネットワークモデルも、実験を説明する際に活用されている¹¹⁻¹³。

このように、実験と理論は互いを補完し合いながら

概日時計研究を支えてきた。実験技術が高度化し、複雑で解釈の困難な実験結果も蓄積される現在、実験データの数理解析が、生物時計研究の推進には重要となっている。実験家の立場からすると、多様な要素を含む実験結果のメカニズムを説明するために、どのような数理モデルを選択するのが適切かを判断するのは常に悩ましい問題かと思われる。数理モデルには大きく分けると、「抽象化された振動体モデル」と「より現実的な遺伝子ネットワークモデル」に分けられる。それぞれ、長所と短所をまとめると、以下のようになる。

抽象化モデル： 単純で、厳密な解析が可能である。パラメータ依存性も少なく、一般性の高い議論が可能である。一方で、現実のデータとの対応が必ずしも明確でなく、解釈が一意ではない。

遺伝子ネットワークモデル： 現実の遺伝子等との対応が取れているため、解釈が容易である。一方で次元が高く、厳密な解析は難しく、数値計算に頼らなければならない。また計測不可能な多数のパラメータが存在し、実験データに合わせるには冗長性が存在する。データへのパラメータの過適合のため、汎化性が低くなる危険がある（「過適合」および「汎化性」は機械学習の用語で、現有のデータにパラメータを過度に適合させてしまうと、計測されていない部分については適合が悪くなり、未知のデータの予測性能が下がるこ

✉ isao@fc.ritsumeai.ac.jp

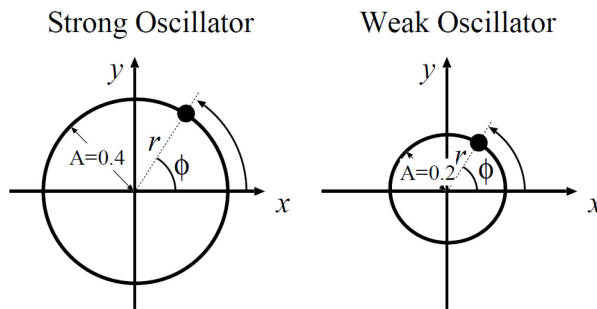


図1 振幅 r と位相 ϕ の極座標で表される位相振幅モデル。システムは振幅 A 、周期 τ のリミットサイクルに収束する。振幅 $A = 0.4$ の場合を「強い振動体」、振幅 $A = 0.2$ の場合を「弱い振動体」と呼ぶことにする。

とを意味する)。

状況によって、これらを上手く使い分ける、あるいは併用することが肝要と思われる。筆者は理論の立場から、これらの二つの研究アプローチに関わってきた。本稿では、抽象モデルの一つである、位相振幅モデルについて取り上げ、その特徴や応用例について紹介する。抽象モデルで最もシンプルなのは位相の一変数のみからなる位相モデル^{4,6}であるのに対して、もう一つの変数として振幅を加えたものが、位相振幅モデルであり、概日リズム研究でも黎明期から盛んに用いられてきた¹⁴⁻¹⁸。振幅モデルは、単一細胞から、組織、および個体レベルまでの幅広いスケールで見られるリズムに応用可能であり、汎用性が高い。ここでは特に、「強い振動体と弱い振動体」および「自律振動と減衰振動」に着目しつつ、振幅モデルの基礎と応用について紹介することにする。

2. 位相振幅モデルの基礎

位相振幅モデルには線形モデル、ポアンカレ振動子、ホップ振動子など何種類¹⁹も存在するが、本稿では、最も基本的な以下の線形モデルを紹介する^{7,20,21}：

$$\frac{dr}{dt} = \lambda(A - r), \quad (1)$$

$$\frac{d\phi}{dt} = \frac{2\pi}{\tau}. \quad (2)$$

図1の極座標で表されるこのシステムは、振幅 r と位相 ϕ を動的な変数に持つ。 A 、 τ 、 λ はそれぞれ、振幅の大きさ、内因性周期、緩和率を表すパラメータである。簡単な計算から、システムは振幅 A 、周期 τ の周期解 ($r = A$ 、 $\phi = \phi_0 + 2\pi t/\tau$) に収束することが分かる。この周期解のことを、「リミットサイクル」

と呼ぶ。摂動などによってリミットサイクルから引き離された軌道は、緩和率 λ でリミットサイクルに戻される。緩和率 λ が大きいと、振動は剛直 (rigid) になり、緩和率 λ を下げると、弛緩的 (sloppy) な振動になる^{20,21}。

ここでは、システムの特徴を決める主要なパラメータとして、振幅 A に着目する。振幅が大きいほど、「強い振動体」(図1左)となり、外的因子からの影響を受けにくくなる。例えば、中枢時計(視交叉上核)や、野生型の個体リズム、EM振動体などが強い振動体の例である。一方で、振幅 A が小さいと、「弱い振動体」(図1右)となり、末梢時計や時計遺伝子変異体、単細胞生物などのように、外的因子からの影響を受け易くなる。ここでは、 $A = 0.4$ と設定した場合を強い振動体、 $A = 0.2$ と設定した場合を弱い振動体と呼ぶことにする。

この振幅モデルに、同調因子 $L(t)$ を加えることによって、モデルの引き込み特性を調べることができる[極座標形式を (x, y) 座標に変換し、同調因子 $L(t)$ を加えると、振幅モデルは、 $\dot{x} = -\lambda x(A - r) - \omega y + L$ 、 $\dot{y} = -\lambda y(A - r) + \omega x$ 、 $r = \sqrt{x^2 + y^2}$ となる]。簡単のため、環境サイクル長を $T = 24$ h として、正弦関数型の同調因子 $L(t) = I \sin(2\pi t/T)$ ($I = 0.01$) とした場合のモデルの特性を図2Aに示す。横軸は内因性周期 τ 、縦軸は振動振幅 A を表す。領域の内側が、同調範囲 (range of entrainment) を表し、例えば、強い振動体 ($A = 0.4$) の場合には、23 時間から 25.2 時間の内因性周期 τ を持つ個体が環境サイクルに引き込まれることが分かる。一方で、弱い振動体 ($A = 0.2$) の場合には、21.9 時間から 26.5 時間のより幅広い範囲の内因性周期 τ を持つ個体が引き込まれる(図の両端で同調範囲を表す曲線が途切れているのは、計算が限られていたためで、実際にはさらに広がりを持つ)。これは、弱い振動体の方が、内因性周期と隔たった環境サイクル長に、より同調しやすいためである。

序論で触れた「アーノルドの舌」は、振動体のパラメータを固定し、同調因子の周期 T および振幅 I を変動させた際に得られる同調範囲を指すが、定性的には図2Aと同様の逆三角形の形状が得られる(名前は、逆三角形が舌に似ていることに由来する)。

強い振動体 ($A = 0.4$) の同調範囲の両端 B および D すなわち、内因性周期が $\tau = 23$ 時間と $\tau = 25$ 時間の場合について、それぞれの個体の振動の様子を示したものが図2B, D である。横軸が時間 t 、縦軸が活動レベルを表す変数 $x(t)$ を示し、上のバーが明暗サイクルを示す。図2Bでは日没の18時に活動のピークが現

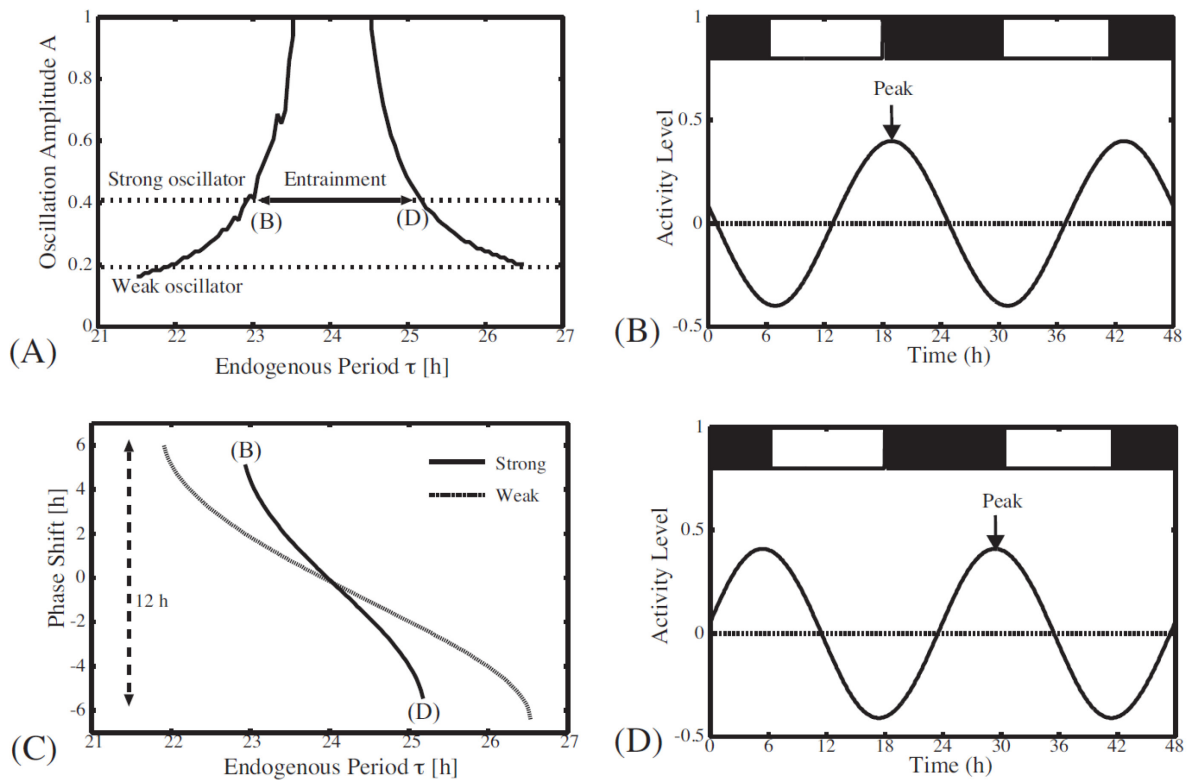


図2 環境サイクルへの同調。A: 振幅モデルが環境サイクル長 $T=24$ h に同調する範囲を示したグラフ。横軸は内因性周期 τ 、縦軸は振動振幅 A を表す。B,D: 活動レベルを表す波形(横軸: 時間 t 、縦軸: $x(t)$)。上のバーは明暗サイクルを示す。B では、内因性周期 $\tau = 23$ 時間、D では、 $\tau = 25$ 時間。C: 同調位相の内因性周期への依存性。実線が強い振動体、点線が弱い振動体を示す。

れるのに対して、図 2D では日昇の 6 時にピークが現れ、二つの間には約 12 時間の位相にズレが生じていることが分かる。これは、内因性周期の短い個体の方が、暗期の始まる前から活動レベルを上げているのに対して、周期の長い個体は遅れて活動が始まることを意味する。このように、内因性周期の短い個体ほど、活動ピークが早まる性質は、概日時計の一般的性質としても知られており²²、クロノタイプの要因とも考えられる²³⁻²⁵。内因性周期が僅か 2 時間異なるだけで約 12 時間の位相差が生じることは驚きかもしれないが、両端では同期の限界に近付き、振動体がフリーランを始める直前であることを考えれば、位相が大きく変動することは不思議ではない。このような同調位相 (phase of entrainment) は、内因性周期の 24 時間からのズレと、同調因子と位相応答曲線の組み合わせで決まる。

次に、明暗サイクルとの活動レベルの間の位相関係を定量的に調べるために、同調位相を測ることにする。 $t = 0$ を基準として、活動ピークの時刻 (前方を正とする) を同調位相として定義すると、図 2B における活動ピークの位相は 5.2 時間であるのに対して図 2D

の位相は -5.5 時間と、両端で 11 時間のズレが生じていることが分かる。同様に弱い振動体 ($A=0.2$) に対しても同調位相を測ると、同調限界の両端での位相は、6 時間から -6.4 時間と、約 12 時間のズレが生じていることが分かる。このように、両端でほぼ 12 時間の位相のズレが生じることは、振幅に依らない振動体の一般的な力学的性質であることが分かっている²¹。概日リズムにおいても、同調限界において、位相差に 12 時間 (180 度) のズレが生じることは、Aschoff が既に議論している^{26,27}。

面白いのは、内因性周期の差異による同調位相の感度である。図 2C に示される様に、強い振動体では、同調限界幅の 2.2 時間で同調位相が約 12 時間変動したことから、内因性周期が 1 時間ずれると、位相が $12/2.2 = 5.5$ 時間変動することになる。一方で弱い振動体では、同調限界幅の 4.6 時間で同調位相が約 12 時間変動したことから、内因性周期が 1 時間ずれると、位相が $12/4.6 = 2.6$ 時間変動することが分かる。これは、強い振動体ほど、同調位相が周期に対して鋭敏に変動することを表している。脊椎動物、昆虫、植物の概日リズムでも、個体変動において同様の特徴が

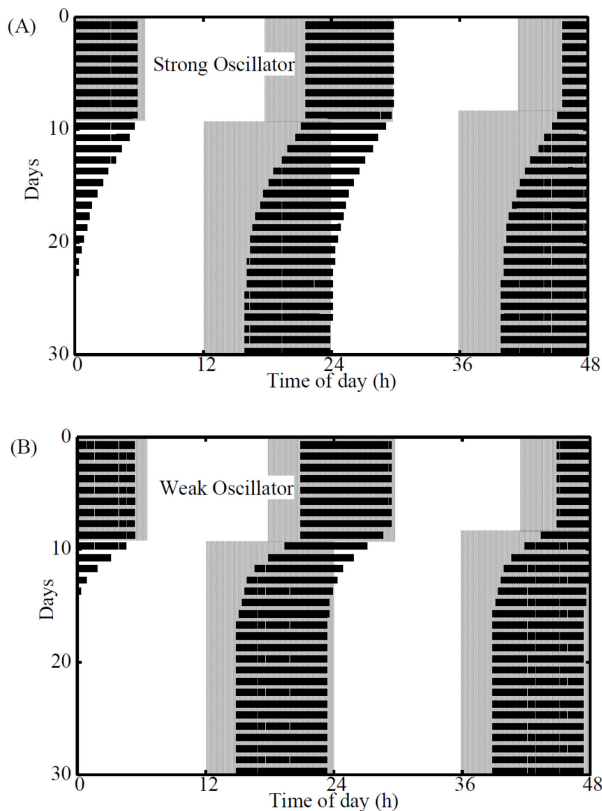


図 3 明暗サイクルに引き込まれていた振動体に対して、10 日目に 6 時間位相を前進させたアクトグラム、A は強い振動体、B は弱い振動体を表す。

見られる^{26,27}。例えば脊椎動物では、ズアオアトリ (*Fringilla coelebs*) やベニヒワ (*Acanthis cabaret*) で、同調因子に 2 時間の周期差が起こったときに、約 12 時間の位相差が生じることが示されている^{26,27}。最近のヒトの研究でも、内因性周期の分布幅は 1 時間程度であるのに対して、位相には 8 時間のズレが生じることが報告されている²⁵。このように、内因性周期の僅かな違いが、位相には大きな変化をもたらすのは面白い特徴である。

最後に、強い振動体と弱い振動体の特徴として、時差ボケについても紹介しよう。図 3 に示すアクトグラムは、12:12 LD の明暗サイクルで引き込まれていた振動体に対して、10 日目に 6 時間位相を前進させた結果を示したものである。強い振動体 (図 3A) は、時差ボケからの回復に 10 日程度の期間を要しているのに対して、弱い振動体 (図 3C) では、5、6 日で時差ボケから速やかに回復していることが分かる。これは、弱い振動体が明暗サイクルに引き込まれやすいためと考えられる。時計遺伝子変異体において、速やかな時差ボケからの回復がいくつか報告されているが^{28,29}、その要因の一つとして、振動体が弱まっている

ことが考えられる。

以上、振幅モデルを用いて、個体の行動リズムをシミュレートした例について紹介した。特に振幅の大きさを変えることによって、強い振動体と弱い振動体の特徴を再現できることを示した。また、概日リズム個体でみられる同調範囲や同調位相は、振動体の一般的な性質であり、振幅モデルを用いることで十分に表現できることが分かる。実用面では、3 つのパラメーター (内因性周期 τ 、振幅 A 、緩和率 λ) をどのように設定するかが重要となる。周期 τ には個体で計測されたフリーラン周期を用いればよい。振幅 A は、同調因子の強さとの相対関係に依存するため、同調因子の強度 I を固定した上で、時差ボケ回復期等が実験系に近くなる様に振幅 A を決めるのがよい。緩和率は $\lambda = \ln 2 / \Delta T$ (ΔT は摂動が半減するのに要する時間) を目安に設定することができる。これらの性質を計測することが難しい場合でも、個体のマクロな性質、例えば、位相応答曲線の振幅、時差ボケ回復期間、同調位相の変動量などを指標に、パラメータを自動最適化する技法も提案されている³⁰。

3. 細胞データへの応用

前節では、個体リズムへの応用を紹介したが、異なるスケールの問題にも振幅モデルは有効である。ここでは、視交叉上核における時計細胞のデータ解析に、振幅モデルを応用した例を紹介する。視交叉上核では固有の概日周期をもつ約 20,000 の神経細胞が集団同期し、安定した概日周期を維持している。細胞集団の刻む同期リズムは高精度 (誤差数%以内) で、かつ時差ボケや温度変化などの外的環境の変化に対して速やかに適応可能である。これほど多数の振動体集団が、時差ボケなどによる脱同調から数サイクルで再同調し、リズムを回復することは力学的には不思議な現象である。このため、外的因子に引き込まれやすい減衰振動が一定の割合で含まれているとする仮説が存在する^{31,32}。

このような疑問に対して、振幅モデルを用いて、個々の時計細胞が自律振動体なのか、あるいは減衰振動なのかを判定することが可能である³³。このアプローチでは、(1)、(2) 式にガウス型白色ノイズを加えてノイズの影響を考慮し、3 つのパラメーター (内因性周期 τ 、振幅 A 、緩和率 λ) に加えてノイズの強度 δ も推定する。注目すべき値は、変動係数 $CV = \delta / A$ である。変動係数は、リミットサイクル振動の振幅の大きさに対するノイズ強度の比率を表し、 CV が 1 よりも小さいと、ノイズよりも振動成分の方が大きく、

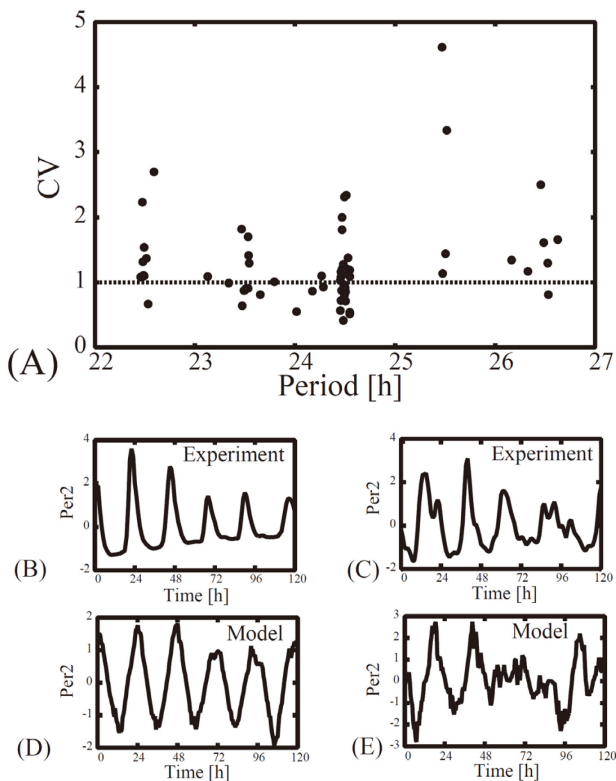


図4 SCN 分散培養データの分析結果。A: 74 個の細胞データに対して推定された周期 τ (横軸) と変動係数 CV (縦軸)。点線 ($CV = 1$) 以下が自律振動の領域に対応する。BC: 実験で計測された 2 例の波形 (PER2::LUC マウス)。DE: 振幅モデルにより再現された波形。

自律振動性が強いことを示す。一方で CV が 1 よりも大きいと、振動成分以上にノイズが強いことを表し、減衰振動にノイズが加わったために顕在化した周期性なのか、自律振動かを区別できないことになる。

ルシフェラーゼ遺伝子を導入したマウス (PER2::LUC マウス) に対する、SCN 分散培養データを分析した結果を示す³⁴。図 4B は比較的周期性の明確なリズムを示す細胞の例で、周期 $\tau = 23.5$ 時間、変動係数 $CV = 0.87$ と推定された。これは、細胞が自律振動性を持つことを示している。図 4D で振幅モデルにより再現された波形では、モデルの性質から元々のデータに見られる鋭いスパイクは生成されていないが、周期などのデータの定性的性質を再現するには十分であることが分かる。一方、図 4C に示す別の細胞の例では、ノイズ成分が強く、不規則な波形が見えている。推定されたパラメータは、周期 $\tau = 25.5$ 時間、変動係数 $CV = 4.6$ であり、減衰振動がノイズで駆動されている状況が推測される。図 4E で振幅モデルにより再現された波形は、元々のデータの不規則性を再現出来ている。

最後に、74 個の細胞のデータに対する推定結果をまとめたのが図 4A である。横軸が周期 τ 、縦軸が変

動係数 CV を示す。 $CV < 1$ の強い自律振動を示す細胞は 39 % であった。残り 6 割の細胞はノイズで、弱い自律振動体がノイズに埋もれているのか、減衰振動がノイズで駆動されているかを区別できないカテゴリーとなる。このことから、視交叉上核では、全ての細胞が強い自律振動を行なっている訳ではなく、引き込まれやすい弱い振動体が一定数含まれていることが示唆される。このようなデータ解析のアプローチは、シアノバクテリアの時計遺伝子における減衰振動の定量化にも応用されている³⁵。

4. おわりに

本解説では、振幅モデルを用いた概日リズム系の数理モデルとデータ解析について駆け足で紹介した。振幅モデルはパラメータへの依存性の少ない、一般性の高いモデルであり、個体レベルから、組織、細胞と幅広いスケールの問題に応用可能である。個体リズムのモデルでは、同調範囲や同調位相が振動体の一般的な性質に起因していることを紹介し、強い振動体と弱い振動体に注目することの重要性を示した。細胞データの解析では、視交叉上核のような巨大な細胞集団において、減衰特性を持つ弱い振動体が一定の割合で含まれている可能性について議論した。

振幅モデルは、概日リズム系の実験データを説明する強力なツールとなるが、より詳細の遺伝子ネットワークや生化学プロセスのメカニズムを説明するには、変数の対応が付かないなどの限界がある。このような場合には、より包括的な、大規模遺伝子ネットワークモデル¹¹⁻¹³と併用することが実践的と思われる。序論で述べた通り、これらの大規模な数理モデルの問題は、自由度が高く、未知のパラメータが多数含まれる点にあるが、類似した遺伝子群をクラスター化³⁶し、タンパク生成過程を遅延 (タンパクの発現量を、mRNA の発現量を一定時間遅らせた変数で代用すること)³⁷で置き換えるなどによって、状態変数やパラメータを削減する方法も進展している。

最後に、理論に興味はあるが、敷居が高いと感じられる実験系研究者の方々も多いかと思われる。一方で理論研究者は、モデル対象を探し求めているものの、最新の実験結果の解釈に行き詰まるのが常である。両者が気軽に議論し、実験と理論の共同研究がこれからも益々活性化することを祈念したい。

5. 謝辞

本稿は、本間研一先生、本間さと先生、小野大輔先生、中村渉先生、中村孝博先生、Hanspeter Herzl 先

生を始めとする共同研究者の方々との議論に基づいています。本間研一先生、本間さと先生、小野大輔先生には、PER2::LUC マウスのデータをご提供いただきました。ここに感謝いたします。

参考文献

1. Hardin, P. E., Hall, J. C. & Rosbash, M. Feedback of the drosophila period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* **343**, 536–540 (1990).
2. Pittendrigh, C.S. Perspectives in the study of biological clocks. In *Perspectives in Marine Biology* (ed. Buzati-Traverso, A.A.) University of California Press, 239-268 (1958).
3. Pittendrigh, C. S. & Daan, S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *J. Comp. Physiol.* **106**, 223-252 (1976).
4. Winfree, A. T. *The Geometry of Biological Time*. Springer-Verlag (1980).
5. Goodwin, B. C. Oscillatory behavior in enzymatic control processes. *Advances in enzyme regulation*, **3**, 425-437(1965).
6. Kuramoto, Y. *Chemical Oscillations, Waves, and Turbulence*. Springer (1984).
7. Glass, L., & Mackey, M. C. *From Clocks to Chaos: The Rhythms of Life*. Princeton University Press (1988).
8. アルカディ・ピコフスキー, ミヒャエル・ローゼンブラム, ユルゲン・クルツ, 「同期理論の基礎と応用」丸善 (2009).
9. 郡宏, 森田善久, 「生物リズムと力学系」共立出版 (2011).
10. スティーヴン・ストロガッツ, 「非線形ダイナミクスとカオス」丸善 (2015).
11. Leloup, J. C., & Goldbeter, A. Toward a detailed computational model for the mammalian circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 7051–7056 (2003).
12. Forger, D. B., & Peskin, C. S. A detailed predictive model of the mammalian circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 14806–14811 (2003).
13. Mirsky, H. P., Liu, A. C., Welsh, D. K., Kay, S. A., & Doyle, F. J. A model of the cell-autonomous mammalian circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 11107–11112 (2009).
14. Klotter, K. Theoretical analysis of some biological models. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology Vol. 25* (ed. Frisch, L.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, 189–196 (1960).
15. Wever, R. Zum mechanismus der biologischen 24-stunden-periodik. *Kybernetik* **1**, 139–154 (1962).
16. Daan, S., & Berde, C. Two coupled oscillators: simulations of the circadian pacemaker in mammalian activity rhythms. *J. Theor. Biol.* **70**, 297–313 (1978).
17. Kronauer, R. E., Czeisler, C. A., Pilato, S. F., Moore-Ede, M. C., & Weitzman, E. D. Mathematical model of the human circadian system with two interacting oscillators. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **242**, R3–R17 (1982).
18. Fukuda, H., Nakamichi, N., Hisatsune, M., Murase, H., & Mizuno, T. Synchronization of plant circadian oscillators with a phase delay effect of the vein network. *Phys. Rev. Lett.* **99**, 098102 (2007).
19. Bordyugov, G., Granada, A. E., & Herzl, H. How coupling determines the entrainment of circadian clocks. *The European Physical Journal B* **82**, 227 (2011).
20. Abraham, U. *et al.* Coupling governs entrainment range of circadian clocks. *Mol. Syst. Biol.* **6**, 438 (2010).
21. Granada, A.E., Bordyugov, G., Kramer, A., & Herzl, H. Human chronotypes from a theoretical perspective. *PLoS ONE* **8**, e59464 (2013).
22. Aschoff, J., & Wever, R. Circadian period and phase-angle difference in chaffinches (*Fringilla coelebs L.*). *Comp. Biochem. Physiol.* **18**, 397-404 (1966).
23. Roenneberg, T., Wirz-Justice, A., & Mellow, M. Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *J. Biol. Rhythms*, **18**, 80-90 (2003).
24. Emens, J. S. *et al.* Phase angle of entrainment in morning - and evening - types under naturalistic conditions. *Chronobiol. Int.* **26**, 474-493 (2009).

25. Eastman, C. I., Suh, C., Tomaka, V. A., & Crowley, S. J. Circadian rhythm phase shifts and endogenous free-running circadian period differ between African-Americans and European-Americans. *Sci. Rep.* **5**, 8381 (2015).
26. Aschoff, J. Problems of re-entrainment of circadian rhythms: Asymmetry effect, dissociation and partition. In *Environmental endocrinology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 185-195 (1978).
27. Aschoff, J., & Pohl, H. Phase relations between a circadian rhythm and its Zeitgeber within the range of entrainment. *Naturwissenschaften* **65**, 80-84 (1978).
28. Nakamura, W. *et al.* In vivo monitoring of circadian timing in freely moving mice. *Cur. Biol.* **18**, 381-385 (2008).
29. Yamaguchi, Y. *et al.* Mice genetically deficient in vasopressin V1a and V1b receptors are resistant to jet lag. *Science* **342**, 85-90 (2013).
30. Tokuda, I. T., Schmal, C., Ananthasubramaniam, B., & Herzog, H. Conceptual models of entrainment, jet lag, and seasonality. *Front. Physiol.* **11**, 334 (2020).
31. Gonze, D., Bernard, S., Waltermann, C., Kramer, A., & Herzog, H. Spontaneous synchronization of coupled circadian oscillators. *Biophysical Journal*, **89**, 120-129 (2005).
32. Webb, A. B., Angelo, N., Huettner, J. E., & Herzog, E. D. Intrinsic, nondeterministic circadian rhythm generation in identified mammalian neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 16493-16498 (2009).
33. Westermarck, P. O., Welsh, D. K., Okamura, H., & Herzog, H. Quantification of circadian rhythms in single cells. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000580 (2009).
34. Tokuda, I. T. *et al.* Coupling controls the synchrony of clock cells in development and knockouts. *Biophysical Journal*, **109**, 2159-2170 (2015).
35. Kawamoto, N., Ito, H., Tokuda, I. T., & Iwasaki, H. Damped circadian oscillation in the absence of KaiA in *Synechococcus*. *Nat. Commun.* **11**, 2242 (2020).
36. De Caluwé, J. *et al.* A compact model for the complex plant circadian clock. *Front. Plant Sci.* **7**, 74 (2016).
37. Tokuda, I. T., Akman, O. E., & Locke, J. C. Reducing the complexity of mathematical models for the plant circadian clock by distributed delays. *J. Theor. Biol.* **463**, 155-166 (2019).

～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～

以下は、査読者と執筆者とのやりとりです。
(重吉)

～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～

査読者 1

Q1. 私の理解不足かもしれませんが、「振幅 A は同調因子との相対強度として決定し...」の部分がよくわからないと思いました。位相振幅モデルのそれ以外の量（周期と緩和率）は、説明にあるやり方ですぐに定量化できそうです。それに対して、A については、実験系研究者が自分の実験データに位相振幅モデルを適用しようとする時、問題になるかと思いました。説明を加えていただけますか。

A1. 振幅 A の大きさは、光入力の強度 I との関係で決まります。たとえ振幅 A が大きくても、光入力 I も大きい場合には、振動体は同調因子の影響を強く受けます。逆に、振幅 A が小さくても、光入力 I も小さければ、振動体は同調因の影響をそれほど受けません。この意味で、振幅 A の大きさは光入力 I との相対的な関係で評価されるべきです。本文ではこの点について補足しました。

Q2. 図 2A。Weak oscillator の文字のあたりで、線が切れています。線が切れている部分が同調の限界ということでしょうか。あるいは、計算をした範囲がここまでということでしょうか。いずれの場合も説明を加えた方が良くと思いました。

A2. 計算した範囲がここまでだったということ、同調範囲はさらに広がります。本文ではそのように補足しました。

Q3. マイナー点 -はじめにの「アーノルドの舌」。これだけだとわからないかもしれないので（全員わかる？）、説明を加えた方がよいと思いました。可能なら図 2A を関連して説明されても良いかもしれません。

A3. アーノルドの舌は確かに特殊でした。修正原稿では、図 2A の説明箇所、アーノルドの舌との関係を補足しました。

査読者 2

（本文）以下が位相振幅モデルを表す微分方程式である^{7,18,19}: Q1. これはリミットサイクルの一例でしょうか（一例であれば、どうしてこれを用いるのか）？それともすべての（多くの）リミットサイクルをつくる微分方程式は、縮約によってこの形に落ちると考えてよろしいのでしょうか？

A1. 位相振幅モデルには何種類かの関数があり、最も基本となる形式として、 $dr/dt=\lambda(A-r)$, $dr/dt=\lambda r(A-r)$, $dr/dt=\lambda r(A-r^2)$ の3種類が知られています。最初の式が線形モデル、二番目がポアンカレ振動子、三番目がホップ振動子（修正ファン・デル・ポール振動子）と呼ばれ、 r の次数がそれぞれ異なります。振幅応答特性が少し異なりますが、いずれも振幅 A のリミットサイクルを生成します。本稿では、最も基本的な線形モデルを用いました。修正原稿では、これら三種類についても簡単に言及しました。

Q2. （本文）「強い振動体($A=0.4$)の同調範囲の両端 B および D すなわち、内因性周期が=23 時間と=25 時間の場合について、それぞれの個体の振動の様子を示したものが図 2BD である。横軸が時間 t 、縦軸が活動レベルを表す変数 $x(t)$ を示し、上のバーが明暗サイクルを示す。図 2B では日没の 18 時に活動のピークが現れるのに対して、図 2D では日昇の 6 時にピークが現れ、二つの間には約 12 時間の位相にズレが生じていることが分かる。」この文章の理解が困難でした。以下の疑問について可能なら解説いただきたい存じます。

Q2-1. L が光入力を表していると考えてよいのでしょうか。

A2-1. その通りです。

Q2-2. 周期の二時間の差でどうして逆位相になるのか。理解が難しいです。なにか直感的な説明加えることができませんでしょうか。

A2-2. 時間の範囲の両端では同期の限界に近づいているところがポイントになります。両端の外側では同期が外れ、左端では振動体が LD サイクルを追い越し続ける状況が発生します。他方で、右端では、振動体が LD サイクルから遅れ続ける状況が発生します。このように、振動体が反対方向にフリーランする直前の状況と考えれば、同調位相に 180 度の大きな差が生じるのも想像しやすいのではないかと思います(数学的にも線形振動子の共振現象で 180 度の位相差が生じることが厳密に示せます)。Aschoff^{26,27}も、脊椎動物から植物、昆虫までの多様な種の実データを用いて、この 180 度のルールが成り立つことを議論しています。彼の用いたデータでは内因性周期の変動に対してではなく、同調因子の周期変動に対して位相の変化を示していますが、状況は同じです。脊椎動物の例では、ズアオアトリ (*Fringilla coelebs*) やベニヒワ (*Acanthis cabaret*) で、同調因子に 2 時間の周期差が起こったときに、12 時間の位相差が生じることが示されています。最近のヒトの研究²⁵でも、内因性周期の分布幅は 1 時間程度であるのに対して、位相は 8 時間のズレが生じていることが報告されています。このように、内因性周期(あるいは同調因子の周期)の僅かな違いが、位相には大きな変化をもたらすのは面白い特徴です。修正原稿ではより状況が伝わる様にこれらのデータについても紹介を加えました。

Q3. この 2 つの周期の異なる振動子は LD、DL の transition をとられているように見えます。そういった解釈でよろしいでしょうか。また、transition をとらえるとすると朝時計、夕時計のモデルとなるものでしょうか。

A3. 波形の図では、明暗の帯で LD サイクルを表していますが、実際の入力には正弦関数を用いているので、LD の遷移は滑らかです。ですので、振動体は LD の切り替えの急激な変化に反応している訳では必ずしもありません。位相を決めているのは、同調因子と位相応答曲線の組み合わせが、内因性周期の 24 時間からのズレを補った状況です。修正原稿では、「同調位

相は、内因性周期の 24 時間からのズレと、同調因子と位相応答曲線の組み合わせで決まる」ことを注釈しました。

Q4. (本文)「これは、内因性周期の短い個体の方が、暗期の始まる前から活動レベルを上げているのに対して、周期の長い個体は遅れて活動が始まることを意味する。」このセンテンスは周期の異なる振動子が引き込まれる場合は、6 時と 18 時といったように逆位相で引き込まれるという意味でしょうか。解説いただ

けるとありがたいです。

A4. その通りで、内因性周期の短い個体は、例えば 6 時という早い時間に位相のピークが現れ、内因性周期の長い個体は、例えば 18 時という遅い時間に位相のピークが現れます(12 時間の差が、180 度の位相差に対応します)。これによって、朝型と夜型違いが出てきます。ヒトの場合も、体内周期の短い人が朝型、体内周期の長い人が夜型と捉えられることが多いですが、この考えと一致します。

