

# 時計細胞集団の同期状態に着目した 位相応答曲線の効率的な測定方法

福田 弘和<sup>1</sup>✉、増田 巨作<sup>2,3</sup>

1 大阪公立大学大学院 工学研究科 機械工学分野、2 筑波大学 医学医療系、

3 筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構

概日時計が環境サイクルに同期するプロセスを解き明かすためには、光や温度などの様々な同調因子に対する概日時計の位相応答曲線 (phase response curve (PRC)) を求める必要がある。しかしながら、PRC の測定には手間がかかるため、様々な同調因子に対する PRC を網羅的に解析することは困難とされてきた。また、得られた PRC のデータ点は個体差によるノイズを含むことが多く、しかも、データ数がそもそも不十分であり PRC が正確に求まらないことも多い。そこで本稿では、まず、概日時計の内部状態 (細胞集団の同期状態) に応じて PRC がどのように変化するかを説明し、その特徴に着目することで PRC をより正確に求める方法を紹介する。そして、データ数を効率よく増やす方法や、1 回の実験だけで PRC を推定できる方法を紹介する。これらの方法は、PRC 測定の高精度化と高効率化に役立つだけでなく、概日時計が時計細胞集団としてどのような位相応答を経て環境サイクルに同期しているかを理解することにも役立つ。

## 1. はじめに

概日時計は光や温度などの入力に対して、位相シフトを示す。ただし、位相シフトの量は入力時における概日時計の位相に依存する。入力時の様々な位相に対する位相シフト量をプロットした曲線を位相応答曲線 (PRC) という<sup>1</sup>。PRC の形状から入力の強さや概日時計の引き込み特性を知ることができる。位相応答がプラス (位相前進) からマイナス (位相後退) に変わる点は「安定点」と呼ばれ、この前後に刺激が加わった場合、リズムの位相は安定点に向かってシフトする。そのため、入力が周期的である場合は、安定点は概日リズムが引き込まれる位相を示す。また、位相応答がマイナスからプラスに変わる点は「不安定点」と呼ばれ、安定点とは逆に不安定点付近での刺激は不安定点から離れるように位相を変化させる。PRC の曲線の振幅が、比較的小さく連続的に繋がったものは「1 型」の PRC と呼ばれる (図 1A)。一方で、位相シフト量が大きく、PRC の曲線が上下でつながり、グラフとしては不連続に見えるものは「0 型」と呼ばれる (図 1B)。1 型と 0 型は、刺激前の位相に対し

て刺激後の位相をプロットした位相移行 (遷移) 曲線 (phase transition curve) の傾きが 1 であるか 0 であるかで判断できる<sup>1</sup> (Winfree のテキストでは、刺激前後の旧位相と新位相を表現するトラスに対して PRC のプロットを繋げた線の巻き数 (0 型は 0 回巻く (巻かない)、1 型は 1 回巻く) と定義されている<sup>2</sup>)。特に 0 型の PRC では、不連続となる位相 (不安定点) の直前と直後で、それぞれ -12 時間と +12 時間もの位相シフトが生じ得る。これにより、逆位相にある安定点に位相がリセットされることになる。PRC が 0 型を示す入力は、概日時計を 1 回の入力だけでリセットさせるほどの力がある。さらに、PRC により、概日時計の環境サイクルへの同期プロセスを正確に予測できるだけでなく、複雑な入力下における生物内部の細胞集団の同期状態も予測できる<sup>3,4</sup>。このため、PRC は概日時計の状態を予測し制御する上で重要である。

しかしながら、PRC を求めるためには、面倒で時間のかかる実験が必要である。これまでの一般的な方法では、複数の個体や細胞を用意し、それぞれ概日時

✉ fukuda@omu.ac.jp

計の異なる位相に一つ一つパルス入力を与え、それぞれに対する位相シフト量を測定する必要があった<sup>1,5,7</sup>。しかし、得られた PRC は個体差によるノイズを含むことが多く、実験で得られるデータ数がそもそも不十分であり PRC が正確に求まらないことも多かった。このため、少ないデータ数から PRC をうまく推定する解析手法の研究も行われてきた<sup>6</sup>。このように、測定が容易でなかったため、入力の種類や強度の違いによる PRC の比較など PRC の詳細を解析した研究は思ったより少なかった。

本稿では、「細胞集団における位相応答」の特性を利用した効率的な PRC の同定法を紹介する。本手法は細胞集団の同期状態と位相応答の関係性に基づいているため、実験には植物シロイヌナズナを用いているが、細胞間の同期状態が変化する系であれば他の生物種でも応用できると期待できる。本稿では、細胞間の結合について考慮しないが、パルスの刺激に対して位相応答は瞬時的に作用すると考えるので、結合の有無や様式の違いに依らず同様の議論が成り立つと考えられる。

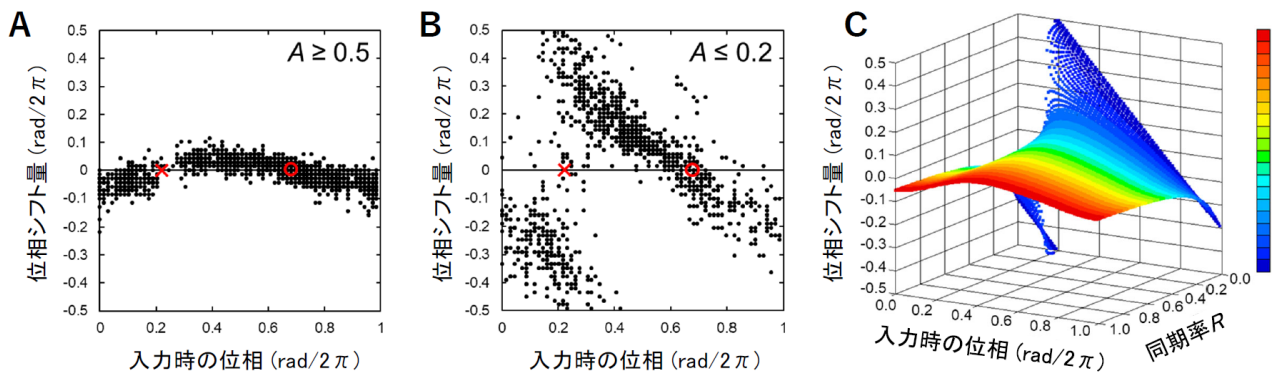


図1 概日リズムの振幅に対する PRC の変化。

(A,B) 遺伝子組換えシロイヌナズナ *CCA1::LUC* を用いて連続明条件下の概日リズムを計測し、2 時間幅の暗期パルスを与えたときの PRC。A は概日リズムの振幅が高い時における PRC ( $A \geq 0.5$ )、B は振幅が低い時における PRC ( $A \leq 0.2$ ) である。○印と×印はそれぞれ PRC における安定点と不安定点を示している。

(C) 振動子集団の数理モデルを用いた PRC の解析解。R は振動子集団の同期率を表す。文献<sup>13</sup>を改変。

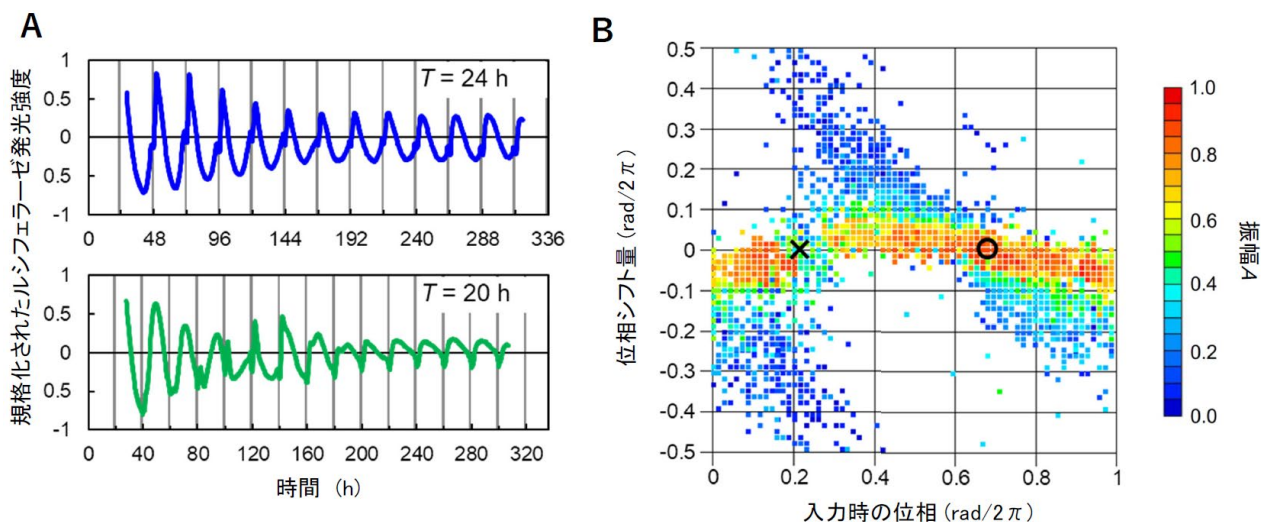


図2 周期的パルス入力による PRC の同定。

(A) 遺伝子組換えシロイヌナズナ *CCA1::LUC* を用いて連続明条件下の概日リズムを計測し、2 時間幅の暗期パルスを周期的に複数回与えた場合の概日リズム。24 時間の周期で与えた場合 (上図) と 20 時間の周期で与えた場合 (下図)。

(B) 周期的パルス入力により得られた PRC。パルス入力の周期を 12 種類 (16 時間から 32 時間まで) 用い、周期毎に約 40 個体のサンプルを用いた。入力時の概日リズムの振幅 A で色分けして PRC を表示した。文献<sup>13</sup>を改変。

## 2. 細胞リズムと個体リズムの PRC

個体などの細胞集団における概日リズム（以降、個体リズムと呼ぶ）は、個々の細胞の概日リズム（以降、細胞リズムと呼ぶ）の総和として理解できる<sup>8-12</sup>。このため、細胞集団が同期していれば個体リズムの振幅は大きくなるが、同期していなければ振幅は小さくなる。直感的にも振幅によって応答性が変わると思われるが<sup>1</sup>、果たして PRC はどのように変化するであろうか？ 以降、個体レベルの PRC と細胞レベルの PRC を区別して議論するので、それぞれ「iPRC」と「cPRC」と記すことにする。なお、単に「PRC」と記した場合は、両方に当てはまることを意味する。

図 1 は、シロイヌナズナにパルス入力（2 時間幅の暗期パルス）を与えた時の iPRC である<sup>13</sup>。概日リズムの振幅が大きい場合、1 型の iPRC が観察される（図 1A）。一方で、概日リズムの振幅が小さい場合、0 型の iPRC が観察される（図 1B）。興味深いことに、iPRC を特徴付ける安定点（○印）と不安定点（×印）の位置は、両者で同じである。しかし、不安定点（×印）の近傍で、位相シフト量に大きな違いが生じている（図 1B）。

この iPRC の個体リズムの振幅に対する依存性は、理論的に求めることができる<sup>13</sup>。前提として、集団を構成する細胞が同期している状態では、個々のリズムが同じ位相で重なり合うことで個体リズムの振幅は大きくなる。一方で、脱同期状態では個々のリズムが打ち消しあうことにより個体リズムの振幅は小さくなる。そのため、個体リズムの振幅は、細胞集団の同期率を反映していると考えられる。同期率は、各細胞 ( $j = 1, 2, \dots, N$ ) の位相  $\phi_j$  を単位円上にプロットした点集団の分布を考えることで上手く数値化できる。同期率として、秩序パラメータと呼ばれる点集団の重心ベクトルの長さ  $R (= (1/N) |\sum_{j=1}^N \exp(i\phi_j)|)$  を用いることが多い<sup>3</sup>。図 1C は理論で求めた解析解のグラフである。完全な同期状態 ( $R = 1$ ) では、全ての細胞が同じ応答をするので iPRC は cPRC と同じになる。また、高～中程度の同期状態でも ( $R \geq 0.5$ )、iPRC は cPRC とほとんど同じである。しかし、同期状態が 0.4 を下回ると、不安定点（×印）を中心にして iPRC は上下に引き裂かれ、振れ幅が大きくなる。そして、十分に低い同期状態となると ( $R \leq 0.2$ )、傾き -1 の iPRC に到達する。傾き -1 の iPRC は、入力時の位相がどこであっても必ず安定点（○印）の位相にジャンプすることを意味する。つまり、どのタイミングで刺激を受けても必ず安定点の位相に個体リズムがリセットされる。

iPRC の 1 型から 0 型への遷移は、理論的には以下のように理解することができる。上述の通り、すべての細胞が同期状態のとき ( $R = 1$ )、iPRC は cPRC と等しい。したがって、cPRC が 1 型の PRC であるとき、iPRC も 1 型となる。一方、細胞の位相が一律に分布し完全な脱同期状態にあるとき ( $R = 0$ )、個体リズムの応答は“すべての位相”に対する細胞リズムの応答を平均したリズムとして現れる。このため、個体リズムは刺激を与えるタイミングによらず常に同じ位相にリセットされることから、iPRC は 0 型となる。この際、個々の細胞は cPRC の安定点の位相に引き寄せられることから、その総合である個体リズムは cPRC の安定点の位相にリセットされる。これらの中間の状態では、細胞集団内で同期した細胞と脱同期状態の細胞が混ざり合った状態となるため、それらの割合が変化するに応じて iPRC が 1 型から 0 型へと遷移する。したがって、よく同期した高振幅での iPRC ( $\equiv$  cPRC) を得ることができれば、それを元に低振幅での iPRC は理論を用いて解析的に求めることができる<sup>13</sup>。

なお、振幅と PRC の型の間に関係があることは、Winfree の指摘以来多くの時間生物学者が認識している。PRC の振幅依存性に関する伝統的な考え方は、振幅の低下にともない相対的な刺激の強さが大きくなり、リミットサイクルの特異点を越えることで PRC が 1 型から 0 型へ遷移する<sup>1,8,14</sup>。この変化において、安定点の位相は常に一定であり、特に不安定点の近傍で位相応答量の変化が大きい。このように、細胞集団の iPRC の変化は、伝統的なリミットサイクルを用いたモデルにおける PRC の変化と非常に類似している。

## 3. 周期的パルス入力による PRC 同定法

上述のように、iPRC は 3 次元空間 ( $\phi, \Delta\phi, R$  空間) における曲面で表される。したがって、“曲面”を描くためには“曲線”を描くよりもさらに多くのデータ点が必要であり、実験の効率化が求められる。

図 2 は、同じ個体にパルス入力を周期的に複数回与えた場合の実験結果である。概日リズムは振幅を徐々に変化させながら、各パルスに対して位相応答する（図 2A）。パルス毎に入力時の位相と振幅、そして入力後の位相シフト量を算出すると、パルス入力の回数分のデータを得ることができる。一度に複数のデータ点を得ることができるので、1 個体から 1 つの位相シフト量を計測する一般的な PRC 計測方法<sup>5</sup>と比較すると、iPRC の同定効率が 10 倍ほど向上する。

この手法は複数のパルスを用いることから、multiple pulses-PRC 法 (MP-PRC 法) と呼ぶ。なお、これまでも連続パルスを用いて PRC を計測する方法があったが、リズムの振幅の変化については考慮されていなかった<sup>15</sup>。

MP-PRC 法では、刺激前後のリズムのピークの位置から位相と位相応答を求める。位相は刺激前のピークから刺激までの時間から求め、位相応答は刺激を跨いだピークからピークまでの間の時間と自然周期の差から求めることができる。リズムのトラフも用いられれば、ピークからでは位相を求めづらいピーク前後の刺激に対する計算も補うことができる。さらに、入力時の位相と振幅をさまざま変化させるためには、パルス入力の周期を例えば 16 時間から 32 時間まで変化させるとよい。周期が変わることで同期に至るまでの位相や振幅(同期率)が複雑に変化する(図 2A 下段)。刺激により波形が変わってしまうなど、ピークやトラフが読み取りづらい場合は刺激の周期を長めに取ると良い。

図 2B は、MP-PRC 法によって得られた iPRC である。パルス入力の周期を 12 種類 (16 時間から 32 時間まで) 用い、周期毎に約 40 個体のサンプルを用いた。合計約 500 個のデータ点を入力時の振幅でソートすることで、理論で求めた解析解 (図 1C) と同等の iPRC が得られている。

よく同期した高振幅での iPRC (≒cPRC) を得ることができれば、それを元に低振幅での iPRC は解析的に推定することができる。しかし、3 次元的な iPRC を「実測」したい場合は、MP-PRC 法は有力な方法となる。例えば、iPRC に対するノイズの大きさ (低振幅の不安定点付近では特にノイズが大きい) は解析モデルだけでは推定できず、また、高振幅状態で iPRC を正しく計測できているかを確認するには振幅による iPRC の変化を確認するのが確実であるため、MP-PRC 法による実測が役立つ。

#### 4. シンギュラリティ応答による PRC 推定法

個体リズムから「細胞レベルの cPRC」をたった 1 度のパルス入力で推定できる手法を紹介する。細胞集団が脱同期し、個体リズムの振幅がゼロ (もしくは微小) となった状態を「シンギュラリティ」と呼ぶ<sup>8,10,14</sup>。シンギュラリティにパルス入力を与えた場合、個々の細胞リズムは「cPRC」に従って安定点の位相に向かって位相シフトするので、それらを総合した個体リズムには cPRC を反映した変化が見られると期待できる。

シロイヌナズナでは、恒常条件で概日リズムが減衰するので、容易にシンギュラリティとなった個体を得ることができる。図 3A はシンギュラリティにおける個体リズムの変化である<sup>16</sup>。個体ごとのリズムは時間とともに減衰し、刺激直前では振幅が小さくバラバラの位相を示している。一方で、入力後のリズムは、2 時間の暗期パルスという比較的弱い刺激に対しても、ほとんどの個体と同じ位相と振幅にリセットされている (図 3B、C)。これをシンギュラリティ応答 (singularity response (SR)) と呼ぶ。SR では同じ刺激に対しては常に同じ応答を示すため、入力後の位相 ( $\Theta'$ ) と振幅 ( $R'$ ) を特徴量として得ることで、これらの特徴量から cPRC を推定することができる。定性的には、 $\Theta'$  が cPRC の安定点の位相、 $R'$  が cPRC の振れ幅に対応していると理解できる。ただし、cPRC の波形はパルス入力の継続時間 ( $\Delta t$ ) によって変化する。

cPRC の推定には、次の細胞集団の位相振動子モデルを用いる。

$$\frac{d\phi_j}{dt} = \omega_j + a \sin(\phi_j - \alpha) E(t) \quad (1)$$

ここで、 $\phi_j$  と  $\omega_j$  はそれぞれ細胞  $j$  ( $j = 1, 2, \dots, N$ ) の位相と自然振動数、 $E(t)$  は外力であり、入力時は  $E(t) = 1$  である。 $a \sin(\phi_j - \alpha)$  は位相感受性と呼ばれる。係数  $a$  と  $\alpha$  は入力の強さや種類によって変わるが、 $a$  と  $\alpha$  が決まれば、cPRC の形が決まる。また、このモデル式では振動子の数を 1000 個ほど用いることで、集団の脱同期状態の平均リズムによって SR を再現できる。つまり、 $(a, \alpha)$  と  $(\Theta', R')$  の関係は式(1)の数値シミュレーションにより得ることができる。したがって、SR で得られた  $(\Theta', R')$  から  $(a, \alpha)$  を求め、 $(a, \alpha)$  から cPRC を求めることができる。この SR を用いた PRC 推定法を singularity response-PRC 法 (SR-PRC 法) と呼ぶ。

図 3D は 2 時間幅の暗期パルスに対する高振幅状態での iPRC (≒cPRC) と SR-PRC 法によって推定された cPRC を示す。推定された cPRC が実測された cPRC の振幅や安定点の位相をよく再現できていることがわかる。また、SR-PRC 法は、概日リズムが大きく変性する時計変異株の PRC の推定にも利用可能である。シロイヌナズナの野生株は暗期パルスに対して 1 型の PRC を示すが (図 3D)、変異株 *prr7* では 0 型の PRC を示す (図 3E)。SR-PRC 法はこれらの PRC の違いを正しく推定できている。この他、SR-PRC 法は高温刺激パルス、低温刺激パルス、青色光パルスなどに対する PRC も推定することができる<sup>16</sup>。

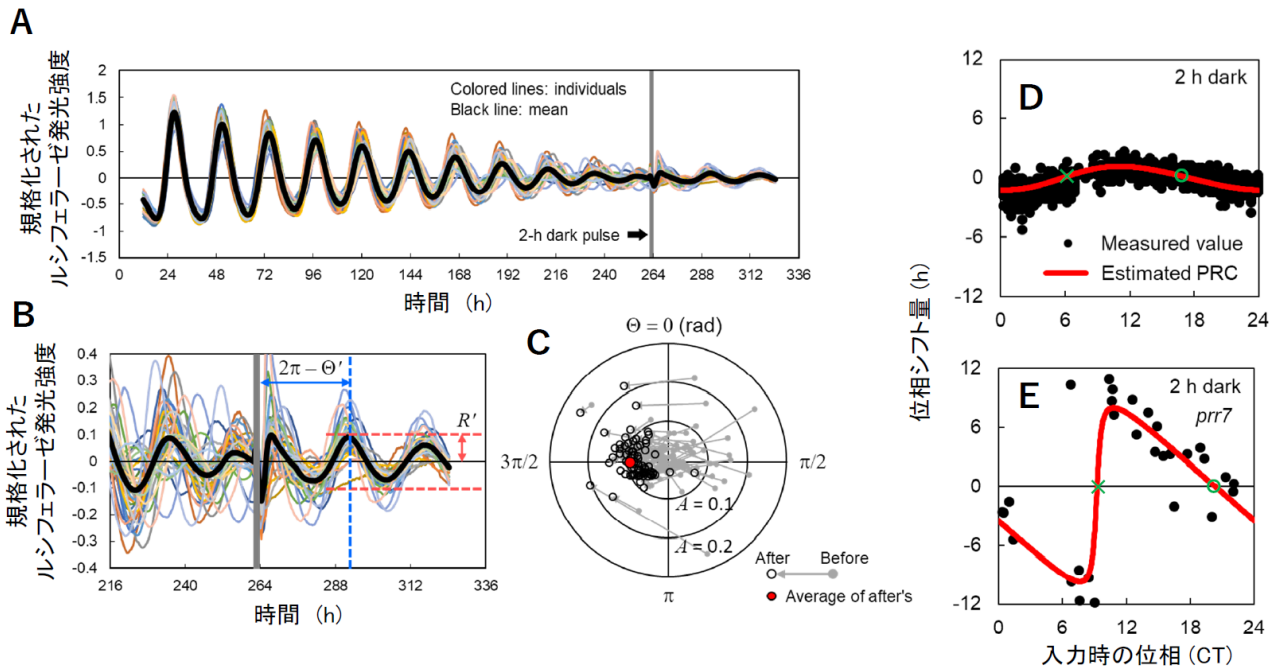


図3 シンギュラリティ応答による PRC の推定。  
 (A) 遺伝子組換えシロイヌナズナ *CCA1::LUC* を用いて連続明条件下の概日リズムを計測し、 $t = 262$  h に 2 時間幅の暗期パルスを与えた。  
 (B) シンギュラリティ応答の拡大図。カラー線と黒色線はそれぞれ各個体の概日リズムと平均値。  
 (C) 入力の前後における位相と振幅の関係。  
 (D) 2 時間幅の暗期パルスに対する野生株の PRC。赤色の曲線は SR-PRC 法で推定した PRC。  
 (E) 2 時間幅の暗期パルスに対する時計変異株 (*prr7*) の PRC。赤色の曲線は SR-PRC 法で推定した PRC。○印と×印はそれぞれ PRC における安定点と不安定点を示している。文献<sup>16</sup>を改変。

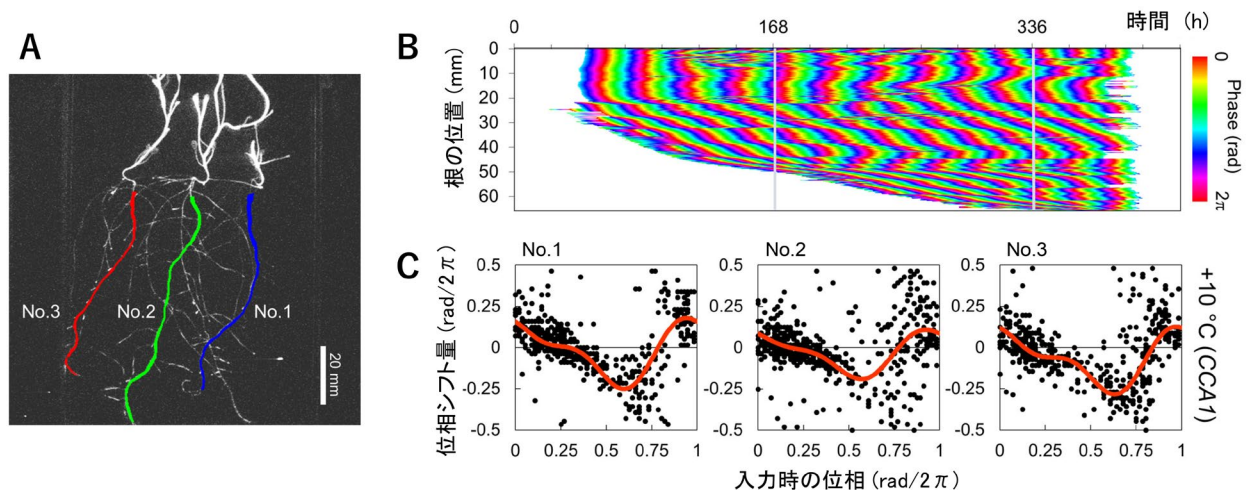


図4 時空間パターン（ストライプ波）を用いた PRC の同定。  
 (A) 遺伝子組換えシロイヌナズナ *CCA1::LUC* を垂直に立てた培地を用いて連続暗条件下で栽培し、ルシフェラーゼ発光を撮影した時の様子。3つの個体の主根の位置を青緑赤色で示した。  
 (B) 個体 No.1 の主根における概日リズムの位相の時空プロット。温度パルス（30 分間 10°C 上昇（22°C→32°C））を  $t = 168$  h と 336 h に与えた。  
 (C) 温度パルスに対する各個体の PRC。赤色の曲線はデータ点に対するフィッティング曲線。  
 文献<sup>23</sup>を改変。

SR-PRC 法は、cPRC をたった 1 度のパルス入力で推定できる手法であり、非常に効率的な PRC 同定法である。この手法では一つ一つの個体から PRC のパラメータ（位相と振幅）を求めることができるため、

複数の個体から一つの PRC を求める従来手法と比べて、定量的な評価や統計的な比較も容易である。利用時における注意点として、元々の細胞リズムの振幅が小さい場合は実際の同期率より個体リズムの振幅が



小さくなるなど、振幅と同期率の関係が実験により異なるため、少なくとも1つのPRCを実測することで、理論と実験の値の差を補正する必要がある<sup>16</sup>。また、精度を上げるためには十分な脱同期状態(シンギュラリティ)を生じさせる必要がある。もちろん、サンプル数を十分に増やせば平均することで正確さを上げることができるが(図3C)、各サンプルを十分かつ効率的に脱同期することができれば実験効率が向上する。さらに、この手法は式(1)のようなシンプルなモデルを仮定しているため、PRC自体が高調波成分を含むなど複雑な波形の場合は、SR-PRC法では推定ができないので注意が必要である。

## 5. 時空間パターンを用いたPRC同定法

一度に多くの位相応答データを得る方法として、細胞集団のイメージングはとても有効である<sup>7,17,18</sup>。もし、入力時に細胞集団の位相が十分に脱同期していたとすれば、一回の観察だけでPRCを得ることができる。ただし、細胞集団を脱同期させるには工夫が必要である。

細胞集団を脱同期させる方法として、空間的に光などの環境を制御することにより細胞ごとに異なる刺激を与え、異なる位相にリセットする方法がある。あるいは、恒常条件下に生物において自発的な脱同期をじっくり待つ方法もある(例えば図3A)。後者の方法は、植物の根においては実は非常に相性が良い。根は恒常条件下でも細胞増殖と成長を続けるが、成長点近傍の伸張・分化領域の細胞群にだけ組織特異的な概日時計の位相リセットが生じる<sup>19-22</sup>。この位相リセットにより、新たに生まれた細胞群と既にある細胞群とで位相のズレが生じ、これが蓄積して全体として脱同期を示す。この脱同期は、時計遺伝子の発現量をルシフェラーゼ発光でイメージングすると縞状の位相波(ストライプ波)として観察される。

また、植物の根は厚みの薄い培地では2次元的に広がり、ほとんど動くことがない。このため、撮影だけでなくデータ解析も容易に行える。図4Aは3つのシロイヌナズナを連続暗条件で栽培し、時計遺伝子*CCA1*の発現をルシフェラーゼ発光で観察したものである<sup>23</sup>。根同士が複雑に交差しているが、動画を再生し成長の様子を見れば主根や側根を分離できる。図4Bは主根における概日リズムの位相を示している。例えば $t = 168$  hを見ると、根の先端部で位相が縞状に密に変化していることが分かる。このように、連続暗条件で栽培しただけで十分に脱同期した細胞集団を得ることができる。

図4Bでは、 $t = 168$  hと336 hに温度を30分間10°C上昇させるパルス入力を与えた。入力の前後における位相変化から位相シフト量を算出しPRCを求めた。図4Cは、3つの個体(No. 1, 2, 3)におけるPRCを示している。それぞれ各個体から得たPRCであるが、全ての位相での位相応答がきちんと計測できている。また、3つのPRCはおおよそ同じ波形を描いており、高い再現性が認められる。1回だけの計測で、同時に3個体分のPRCを得ることができており、大変効率のよいPRC同定法である。

時空間パターンを用いたPRC測定法(Pattern-PRC法)は、1個体だけを用いた1回の実験でPRCを“実測”できるという強みがある。このため、PRCの個体差や、個体内部のPRCの応答ノイズも定量化でき、概日時計のノイズな振る舞いを解明するための基礎データを与えてくれる。

## 6. おわりに

個体(細胞集団)レベルの位相応答は細胞集団の同期率 $R$ に大きく依存する。そのため、同期率 $R$ やそれを反映した振幅 $A$ でデータをソートしていないと、iPRCが乱雑に広がってノイズに見えてしまう。同期率 $R$ や振幅 $A$ でデータをソートすることは、iPRCの正確さを向上させるために必須と言える。あるいは、高振幅状態で計測することを意識することで高振幅状態のiPRC(≒cPRC)を求めることが重要である。

細胞レベルと個体レベルのPRCの関係をまとめると次の通りとなる。

- ① 高い振幅に対する位相応答データだけを用いることでcPRCを求めることができる。
- ② cPRCが分かれば、iPRCは理論的に推定できる。

この知見により、3次元空間( $\phi, \Delta\phi, R$ 空間)における曲面として表されるiPRCを、少ない実験量で効率よく求めることができる。

例えば、効率を重視するのであれば、SR-PRC法によりcPRCを推定し、それを元にiPRCを理論的に推定すればよい(②)。これにより、1個体に1回のパルス入力を与えるだけで3次元的なiPRC曲面を得ることができる。一方で、応答ノイズも含めてPRCを実測したいのであれば、Pattern-PRC法を用いるのがよい。しかし、時空間パターンが生じにくい場合やイメージングできない場合は、MP-PRC法を用いる。ここで重要なのは、高振幅でのiPRCはcPRCであることを意識しながら、位相応答のデータを振幅 $A$

でソートすることで見かけ上のノイズをしっかりと落としておくことである (①)。

冒頭に述べたように、PRC は概日時計の状態を予測し制御する上で重要である。様々な入力に対する PRC が得られると、複雑な環境における概日時計の振る舞いを精度よく予測でき、入力をデザインすることで概日時計を様々な状態に制御することができる<sup>4</sup>。本稿で紹介した効率的な PRC 同定法が、さまざまな生物種で概日時計の状態予測や制御の研究にも役に立てば幸いである。

## 参考文献

1. Johnson, C. H. Forty years of PRCs – What have we learned? *Chronobiol. Int.* **16**, 711-743 (1999).  
PRC の例は歴史的なものを含めて Johnson C. H. ラボから公開されているので参照されたい (<https://as.vanderbilt.edu/johnsonlab/prcatlas/>)。
2. Winfree, A. T. 著 (鈴木善次, 鈴木良次訳). 生物時計. pp. 55-67, 東京化学同人 (1992).
3. Fukuda, H., Murase, H., & Tokuda, I. T. Controlling circadian rhythms by dark-pulse perturbations in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* **3**, 1533 (2013).
4. Masuda, K., Yamada, T., Kagawa, Y., & Fukuda, H. Time lag between light and heat diurnal cycles modulates *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATION 1* rhythm and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* **11**, 614360 (2021).
5. Fukuda, H., Uchida, Y., & Nakamichi, N. Effect of dark pulse under continuous red light on the *Arabidopsis thaliana* circadian rhythm. *Environ. Control. Biol.* **46**, 123–128 (2008).
6. Ohara, T., Fukuda, H., & Tokuda, I. T. Phase response of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock to light pulses of different wavelengths. *J. Biol. Rhythms* **30**, 95-103 (2015).
7. Manella, G., Aizik, D., Aviram, R., Golik, M., & Asher, G. Circa-SCOPE: high-throughput live single-cell imaging method for analysis of circadian clock resetting. *Nat. Commun.* **12**, 5903 (2021).
8. Winfree, A. T. The Geometry of biological time. pp. 530, Springer-Verlag New York (1980).
9. Millar, A. J., Carre, I. A., Strayer, C. A., Chua, N. H., & Kay, S. A. Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* **267**, 1161-1163 (1995).
10. Ukai, H. et al. Melanopsin-dependent photoperturbation reveals desynchronization underlying the singularity of mammalian circadian clocks. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1327-1334 (2007).
11. Endo, M., Shimizu, H., Nohales, M. A., Araki, T., & Kay, S. A. Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature* **515**, 419-422 (2014).
12. Takahashi, N., Hirata, Y., Aihara, K., & Mas, P. A hierarchical multi-oscillator network orchestrates the *Arabidopsis* circadian system. *Cell* **163**, 148-159 (2015).
13. Masuda, K., Kitaoka, R., Ukai, K., Tokuda, I. T., & Fukuda, H. Multicellularity enriches the entrainment of *Arabidopsis* circadian clock. *Sci. Adv.* **3**, e1700808 (2017).
14. Koinuma, S., Kori, H., Tokuda, I. T., Yagita, K., & Shigeyoshi, Y. Transition of phase response properties and singularity in the circadian limit cycle of cultured cells. *PLoS ONE* **12**, e0181223 (2017).
15. 石田 直理雄, 本間 研一(編). 時間生物学事典. pp. 44-45, 朝倉書店 (2008).
16. Masuda, K., Tokuda, I. T., Nakamichi, N., & Fukuda, H. The singularity response reveals entrainment properties of the plant circadian clock. *Nat. Commun.* **12**, 864 (2021).
17. Wenden, B., Toner, D. L. K., Hodge, S. K., Grima, R., & Millar, A. J. Spontaneous spatiotemporal waves of gene expression from biological clocks in the leaf. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 6757-6762 (2012).
18. Muranaka, T., & Oyama, T. Heterogeneity of cellular circadian clocks in intact plants and its correction under light-dark cycles. *Sci. Adv.* **2**, e1600500 (2016).
19. Fukuda, H., Ukai, K., & Oyama, T. Self-arrangement of cellular circadian rhythms through phase resetting in plant roots. *Phys. Rev. E* **86**, 041917 (2012).

20. Ukai, K. et al. Traveling waves of circadian gene expression in lettuce. *Environ. Control. Biol.* **50**, 237-246 (2012).
21. Voß, U. et al. The circadian clock rephases during lateral root organ initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Commun.* **6**, 7641 (2015).
22. Greenwood, M., Domijan, M., Gould, P. D., Hall, A. J. W., & Locke, J. C. W. Coordinated circadian timing through the integration of local inputs in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.* **17**, e3000407 (2019).
23. Masuda, K., & Fukuda, H. Unstable phase response curves shown by spatiotemporal patterns in the plant root circadian clock. *J. Biol. Rhythms* **36**, 432-441 (2021).

