

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06864

研究課題名(和文) 頑健かつ柔軟な概日時計が可能とする限界日長適応

研究課題名(英文) Local adaptation of the critical day length for flowering based on robust and flexible circadian system

研究代表者

村中 智明 (Muranaka, Tomoaki)

京都大学・生態学研究センター・特定研究員

研究者番号：50761938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：動かない植物にとって、適切な季節に花を咲かせ、種子を残すことは最重要課題である。季節を読む機構として概日時計による日長測定を基盤とした光周性が知られている。季節変化は生息地により変化するため、概日時計は頑健な日周変動と柔軟な季節変動の両方に適応する必要がある。本研究では日本産のアオウキクサを用いて、日長応答の限界日長と概日時計の周期に負の相関があることを見出した。このことは、概日時計の柔軟な周期変化が限界日長の地域適応を可能とすることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Organisms on the earth detect variation in day-length and anticipate upcoming seasonal changes. The critical day-lengths of photoperiodic responses often show a latitudinal cline due to the local adaptation. In plants, it is well known that the photoperiodic flowering is based on the day-length measurement by the circadian clock. However, the modulation mechanisms of the critical day-length is unclear. Using a short-day duckweed, *Lemna aequinoctialis*, we found the significant correlation between critical day-lengths and circadian periods. This suggests that the local adaptation of critical day-lengths is likely to involve the modulation of circadian periods.

研究分野：植物時間生物学

キーワード：光周性 概日時計 地域適応 アオウキクサ 発光レポーター

1. 研究開始当初の背景

生物は時間を計る能力をもつ。このことを人類が認識したのは、農作物の中に日長を感知して花をつける種類が発見された時であった。この発見は、脳を持たない植物が、日長を正確に測定する時計を持つこと、日長変化を指標に季節変化を認識できることを明らかとした。

この日長測定の基盤となるのが、概日時計が生成する1日周期のリズムである。このリズムは昼夜サイクルに同調することで、外環境変動の間隔を測っている。このリズムは特定の時刻に発現ピークを示して発現する時計遺伝子群が協調的に働くことで生成され、定常条件においても自律的に持続する。

定常条件におけるリズムの周期は正確に24時間ではないため、「概日」リズムの名がある。概日リズムの周期は遺伝的に決まるが、24時間周期の昼夜サイクル下では、リズム周期が24時間に近いほど適応的であることが報告されている。しかしながら、野外に生育するシロイヌナズナには概日時計の周期に大きな多様性(22~29時間)が存在する。このことは、自然条件には、概日時計の周期を多様化させる要因が存在することを示唆している。地球には日周変動に加え、公転に起因する季節変動も存在する。そのため、「1日」という環境変動に適応した頑健な時計システムは、様々な地域における多様な1日に適応するために、柔軟に変化していると考えられる。

2. 研究の目的

ある環境で増殖した生命は、少し異なる環境に新天地を見出す。ある環境での効率よい増殖には、その環境に適応したシステムを頑健に維持する必要がある。一方で、新天地への適応には、柔軟な変化が必要となる。生命システムに要求される頑健性と柔軟性はいかに実現されるのか。本研究では植物の概日時計を題材にこの間に答える。

動かない植物にとって、適切な季節に花を咲かせ、種子を残すことは最重要課題である。季節を読む機構に日長応答がある。日長応答の基盤となる概日時計は頑健な日周変動と柔軟な季節変動、両方に適応する必要がある。この両立はいかにして成立するのか。概日時計と日長応答、双方の多様性を研究するのに最適な材料としてアオウキクサ(*Lemna aequinoctialis*)を選択し、迅速かつハイスループットな解析を行い頑健性と柔軟性の両立機構を解明する。

これまで様々な生物種において、概日時計周期における自然多型が報告されている。しかしながら、周期多様化の意義を解明した研究は全生物種を通して、未だなされていない。本研究ではアオウキクサというユニークな材料を用いて、なぜ概日時計は「概日」なのか、という明瞭な解答がなかった間に答えることを目指す。また、イネの栽培化に見られ

るように、限界日長の制御技術は大変有用である。イネでは花成経路を中心に分子遺伝学的な解析が進んでいるが、不明な部分も多い。概日時計の分子生理学的な解析から限界日長適応に迫ることで、先行研究とは異なる側面からその分子機構にアプローチすることを目指す。

3. 研究の方法

夏から冬の間を咲かせる一年草の短日植物では、北に生育する個体ほど花成誘導の限界日長が長い傾向がある。これは花成時期を早めることで、早い冬の訪れ前に種子を残すように地域適応した結果である。日長応答の基盤となる概日時計にも何らかの地域適応が生じている可能性があるが、日長応答適応と概日時計の多様性が関連付けて解析された例はほとんどない。これは概日時計と日長応答、その両方の多様性を大規模かつ詳細に解析できる研究材料がなかったためである。

本研究ではアオウキクサを材料とすることで、この問題を打開する。アオウキクサは日本各地の水田に生育する短日植物で、1週間の日長処理で花芽が誘導できるため、短期間で限界日長を決定できる。また、ジーンガンによる発光レポーターの一過的導入法により、概日時計の多様性に分子生物学的に迫ることが可能である。さらに、ウキクサ植物は栄養増殖によるクローナル繁殖を行うため、野外での生育時の遺伝情報を半永久的に保存可能である。また、個体サイズが成熟しても1cm程度と小型であるため個人研究の範囲で多検体解析が可能である。

4. 研究成果

(1) 限界日長と概日リズム周期との負の相関の発見

日本全国からアオウキクサを採取し、無菌処理後に、同一組成の栄養培地で培養した。その後、日長9時間から14時間の範囲で日を30分ごとずらした条件で1週間培養した。増殖した個体をエタノールにより透明化し、花芽をつけている葉状体の数を顕微鏡によりカウントした。その結果、30分の日長変化で花成率が大きく変化する日長条件がみられた。得られた花成率にシグモイド関数をフィッティングし、限界日長を決定したところ、北に生育する個体ほど限界日長が長い傾向がみられた(図1)。

さらに、収集したアオウキクサすべてについて、*AtCCA1:LUC* レポーターをジーンガンにより一過的に導入し、生物発光自動測定装置により20分毎に発光変動を測定し、連続明条件における概日リズムを測定した。FFT-NLLS法により概日リズムの周期を決定した結果、時計周期と限界日長に相関が見られた(図2)。このことは、限界日長適応に伴って概日時計の周期が変化することを示唆している。

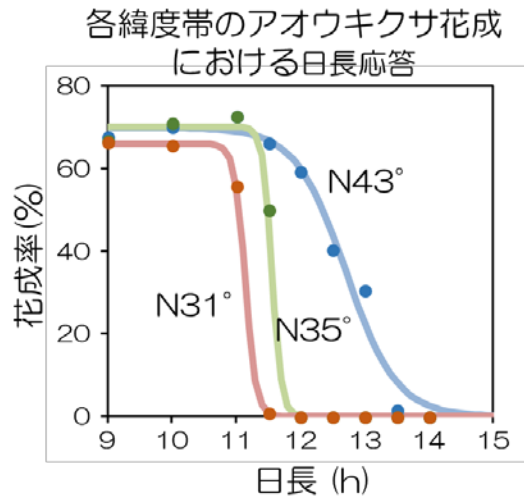


図1 各緯度で採取したアオウキクサの様々な日長における花成率。観測データを点で、線がフィッティングされたシグモイド関数。

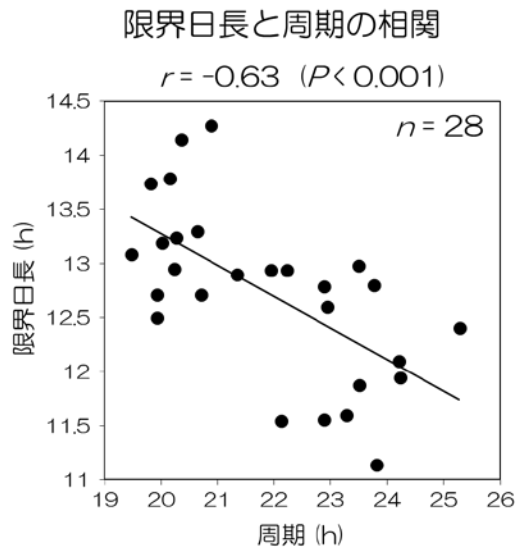


図2 全国から採取したアオウキクサ 28 系統について限界日長を概日リズム周期に対してプロットした。黒線は回帰直線。

(2) 新規発光レポーターの作成

すでにゲノムが公開されているウキクサ (*Spirodela polyrhiza*) のゲノム情報を用いて、ウキクサ植物の時計遺伝子プロモーターを同定、クローニングし、異なる位相でリズムを示す発光レポーターを作成した。その結果、朝発現型の *SpLHY*、昼発現型の *SpPRR5*、夕発現型の *SpGI*、夜発現型の *SpELF3* の 4 種類の発光レポーターの作成に成功した。これらのレポーターには発光の減衰がみられたものの、数日間の測定には使用可能であった。これらのレポーターを採取したアオウキクサ系統に導入して発光リズムを測定することで、概日周期の変化が、どの位相で生じているかを明らかとすることができ、概日時計の多様性解析が大いに進展すると考えている。

(3) 限界日長の複雑な地域適応

今回の解析によって、同一緯度・水田から採取したアオウキクサにおいても限界日長の多様性が認められた (図 3)。このことから、限界日長適応が単純な緯度依存性の現象ではなく、限界日長の決定は様々な環境要因が絡む複雑な現象であることが明らかとなった。今後は同一地点から複数の系統を採取し、温度以外の環境要因を加味しつつ限界日長適応を議論していく必要がある。

また、「1. 研究開始当初の背景」で述べたように、概日時計には自然多型が存在するが、植物の概日時計には明確に周期を規定する遺伝子は存在せず、時計の周期決定には様々な遺伝子が影響する。そのため、交配により周期が容易に変化する可能性があり、同一水田内に、幅広い時計周期多型が存在し得る。アオウキクサは種子で越冬するが、水田に水が張られてから 1~2 週間程度後には、発芽するアオウキクサが観察できる。これまでの野外調査から、日本の平均的サイズの水田で、毎年 1 万近くの種子が発芽していると推定している。これらの種子は水田内集団の交配で結実されたものであり、概日時計の性質に多様性が生じている可能性は高いと考えている。

上記を検証するために、同一水田から多数の系統を採取・解析することで自然多型の実像を取得するとともに、遺伝流動度の解析など、集団遺伝学的な解析を行っていく必要がある。また、採取したアオウキクサから F1 世代、F2 世代を作成し、解析を進め、時計周期の遺伝的安定性の評価を行うことも重要である。

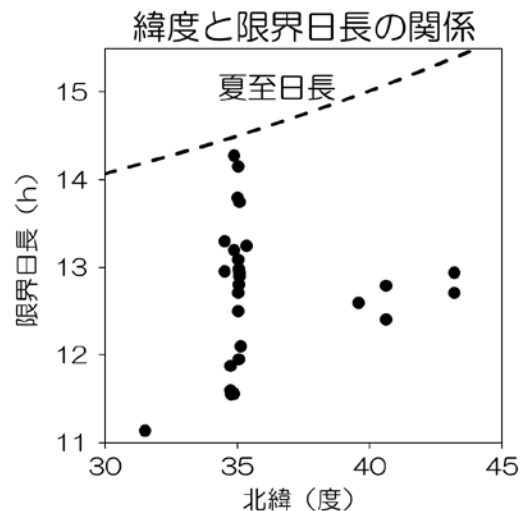


図3 全国から採取したアオウキクサ 28 系統について限界日長を採取地点の緯度の対してプロットした。点線は夏至の日長。

(4) アオウキクサのゲノム解読

2017 年度の先進ゲノム支援に採択され、アオウキクサのゲノム配列の *de novo* アセンブルを行った。すでに樹立していた純系のアオウ

キクサ (6回自家受粉) からゲノム DNA を回収した。その際、アセンブル効率を上昇させるために、核抽出により葉緑体ゲノムを取り除きマグネットビーズを用いた高分子量ゲノム DNA の抽出法を行った。アセンブルの結果、全長約 780 とこれまでの報告と矛盾しないサイズで、N50=2.38 Mbp と一般的な解析に十分な質のゲノム配列を得た (図 4)。本ゲノム情報をもとにトランスクリプトーム解析を行うことで、限界日長・リズム周期の決定機構に関わる遺伝子を効率的に探索できると考えている。また、プロモーター領域の配列も取得可能となったため、内在遺伝子の発光レポーターを作成することができる。当初計画では近縁種であるウキクサの配列を用いる予定であり、成果(2)で報告したように、すでにいくつかのレポーターは作成しているが、発光が減衰するなど改善の余地はある。また、ウキクがアオウキクサの近縁といっても属が異なるため、ウキクサに加えてアオウキクサ由来の発光レポーターを利用することで、実験の精度が大きく向上すると期待している。

また、現在解析途中ではあるが、アオウキクサのゲノムは倍数化しているようであり、将来的には2セットある遺伝子の挙動の違いなどの解析についても魅力的な材料となると考えている。

アオウキクサゲノム アセンブル結果

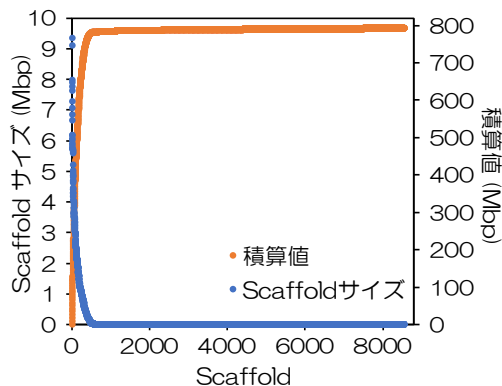


図 4 アオウキクサゲノムの de novo アセンブルの結果。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Muranaka Tomoaki Oyama Tokitaka, Monitoring circadian rhythms of individual cells in plants, *Journal of Plant Research*, 131:15-21, 2017 査読有
DOI:10.1007/s10265-017-1001-x

[学会発表] (計 3 件)

- ① 村中智明, 小山時隆、日本産短日性ウキ

クサにみられる概日リズム周期と花成限界日長の負の相関、第 24 回日本時間生物学会、2017

- ② Tomoaki Muranaka, Hiroshi Kudoh, Tokitaka Oyama, Correlation between the critical day-length and the period of circadian clock in Japanese short-day duckweeds, *Taiwan-Japan Plant Biology* 2017, 2017

- ③ 村中智明, 工藤洋, 小山時隆、日本産短日性アオウキクサにおける花成限界日長と概日リズム周期の相関、第 49 回種生物学シンポジウム、2017

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/tomoakimuranakajpn/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

村中 智明 (MURANAKA, Tomoaki)

京都大学・生態学研究センター・特定研究員

研究者番号：50761938

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者

なし ()