

令和元年6月19日現在

機関番号：82111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07356

研究課題名(和文) イネの厳格な限界日長応答を制御する概日時計と光シグナルの統合機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism integrating light and circadian clock signals, which control rice flowering time

研究代表者

小郷 裕子 (Ogo, Yuko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター・主任研究員

研究者番号：90572214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：イネは、わずか30分の日長の違いを認識できるほど正確で、ON/OFFが明確な、花芽形成ホルモン(フロリゲン) Hd3a / RFT1 遺伝子の転写制御をおこなう。これまでに、この正確な計時機構の遺伝子ネットワークが解析され、Ghd7 Ehd1 Hd3a/RFT1というイネ特異的なカスケードとHd1の相互作用が重要であることがわかってきた。本研究では、このカスケードの上流に位置するGhd7の転写制御について解析を行った。Ghd7の発現制御解析に関する形質転換体などを作製することにより、Ghd7の光と時計による制御機構の解析を行うと同時に、収量などの重要農業形質へも影響を及ぼすことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

短日植物のイネの厳格な日長応答は、長日植物のシロイヌナズナとは異なるものであり、その制御機構について多くの研究がなされてきた。しかしながら、その中で重要な働きを示すGhd7について、発現制御機構の解析は進んでいなかった。本研究では、高効率遺伝子組換え法などの様々な新しい手法を用いて、Ghd7がどのように光と概日時計により制御されているのかを解析した。また、Ghd7は、開花期だけでなく植物体の生育にも大きな影響を与えることを再確認した。今後、どのようにGhd7が重要農業形質に関わっているのかを調べる予定であり、農業現場への応用にも重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In rice, a short-day plant, floral transition in response to environmental conditions have been extensively studied. The molecular cascade Grain number, plant height, and heading date 7 (Ghd7) Early heading date 1 Heading date 3a/Rice FT-like 1 and its interaction with Heading date 1 plays an important role for floral transition of rice. These genes are intricately regulated by light and circadian clocks.

In this study, we analyzed the transcriptional regulation of Ghd7 by light and circadian clocks. We produced the transformant rice for analysis of transcriptional regulation of Ghd7. Using these transformant rice, the expression pattern of Ghd7 and the downstream genes were analyzed in various day length conditions. The transformant rice with reporter genes after Ghd7 locus were produced by the efficient agrobacterium-mediated gene targeting system. CHIP-seq analysis was performed by transformant rice with the phytochrome-GFP protein.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：イネ 出穂

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

短日植物のイネは、長日植物のシロイヌナズナと違い、厳格な限界日長認識を持ち、非常に正確で、ON/OFF が明確な、花芽形成ホルモン (フロリゲン) Heading date3a (Hd3a)/Rice FT-like 1 (RFT1) 遺伝子の転写制御をおこなう。これまでの研究で、イネやシロイヌナズナにおける開花期制御の複雑な分子ネットワークが明らかになってきた(図 1)。イネとシロイヌナズナでは、光周性による開花期制御に関わる遺伝子は共通なものが多くある。一方で、イネは、Grain number, plant height, and heading date 7 (Ghd7) Early heading date 1 (Ehd1) Hd3a/RFT1 というイネ特異的なカスケードを持ち、これが厳格な限界日長認識に大きく貢献していると考えられる。Hd3a/RFT1 は Ehd1 により誘導され、Ehd1 の発現は Ghd7 により抑制される (図 1)。Ghd7 の発現は、長日の朝に誘導される。長日条件では Ghd7 の発現量が高いので、Ehd1 と Hd3a/RFT1 の発現が抑制されており、出穂が遅れる。逆に、短日条件では Ghd7 の発現量は低いので、Ehd1 と Hd3a/RFT1 の転写抑制が解除されて出穂が早まる (図 1)。さらに、短日では Hd1 が Ehd1 の転写を活性化し、長日では Ghd7 と相互作用して出穂を遅らせる (Nemoto et al., 2016)。

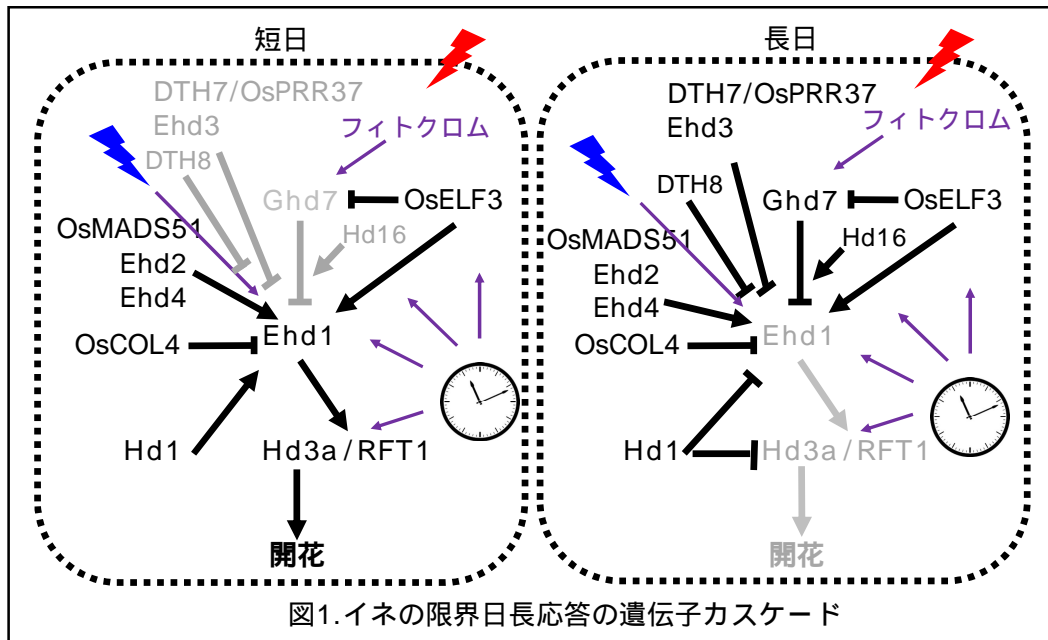


図1.イネの限界日長応答の遺伝子カスケード

Ghd7 の長日特異的な発現誘導には、フィトクロム光受容体による光信号伝達系と概日時計との相互作用が大きく貢献している (Itoh et al., 2010; Osugi et al., 2011)。Ghd7 はフィトクロムを介して赤色光により誘導される。その赤色光への感受性 (ゲート) は、長日条件では朝にゲートされており、朝に光が当たることにより Ghd7 の発現が誘導される。一方、短日条件だとゲート真夜中に移動し、光の当たる時間にゲートが開いていないので Ghd7 の発現は低い。このゲートの移動は、少なくとも部分的には概日時計により制御されている。このように、イネはイネ特異的なカスケードにおいて光シグナルと概日時計のシグナルを統合することにより、限界日長を認識して短日条件で出穂する。

近年、開花期制御に関する遺伝子のいくつかは、植物の発達やストレス応答にも関わっていることがわかってきた (Endo-Higashi and Izawa, 2011; Tuji et al., 2015; Weng et al. 2014)。その中でも、Ghd7 は早くからその多面的な機能が注目されており、穂の形態形成、草丈、環境応答制御にも関わっていることが報告されている (Xue et al., 2008; Weng et al. 2014)。また、当研究室の岡田らは、Ghd7 は適度に過剰発現させると、出穂期をほとんど変えることなく穂あたりの粒数を上げることを報告した (Okada et al., 2017)。これらの Ghd7 の多面的な機能は、フロリゲンの発現を変化させることによる出穂期等の変化によるものなのか、Ghd7 がフロリゲンとは別の遺伝子発現を制御することにより、穂の形や環境応答に関わっているのかはまだよくわかっていない。

2. 研究の目的

上述したように、Ghd7 はイネにおける正確な計時機構の遺伝子ネットワークの光シグナルと概日時計のインテグレーターであるとともに、収量などの重要農業形質にも影響を与える重要な遺伝子であるにもかかわらず、そのプロモーターの解析や詳細な時空間的発現解析は進んでいない。これまでに、Ghd7 のプロモーターにレポーター遺伝子を融合してイネに導入したが、内在性の遺伝子発現を再現できなかった。また、形質転換による相補実験も必ずしもうまくいかない。このことから、Ghd7 の発現制御にはクロマチンレベルの環境応答制御が想定される。本研究では、ゲノム編集などを用いて Ghd7 の光シグナル応答や概日時計制御に関わるエレメントを明らかにする。また、フィトクロムを用いて ChIP アッセイを行い、フィトクロムを含む転写制御因子の Ghd7 プロモーターへの認識機構を解析する。さらに、液体培養を用いた高効率な相同組換え法を用いて、ゲノム中の Ghd7 の下流にレポーター遺伝子を融合した形質転換イネを作

製する。これにより、Ghd7 の発現を時空間的に細胞レベルで解析し、穂や葉鞘での発現パターンを解析する。これらの実験によって、イネの厳格な限界日長応答に関する遺伝子ネットワークにおける光シグナルと概日時計の統合機構を明らかにするとともに、Ghd7 の収量や草丈といった重要農業形質に関わる多面的な機能について解析する。

3. 研究の方法

本研究は、以下の三つの実験計画を並行して進める。

(1) Ghd7 において、光と概日時計の制御に関する形質転換イネを作製し、表現型、Ghd7 発現パターン、Ghd7 の下流遺伝子の発現、赤色光への感受性、赤色光を感受するゲート時間の変化等を調べる。

(2) Ghd7 への光シグナルの作用点を解明するため、フィットクロムを用いて ChIP 解析を行う。そのために、まずフィットクロム変異体に、フィットクロムと GFP が融合したタンパク質が発現する形質転換イネを作製する。フィットクロムは直接 DNA に結合するという報告は無いため、ChIP 解析では詳細な固定条件等の検討を行う。

(3) Ghd7 の時空間的発現パターンとタンパクレベルの発現を解析するため、液体培養を用いた高効率相同組換え法 (Ozawa et al., 2012) を用いてイネゲノム中の Ghd7 locus の C 末端へ融合するようにレポーター遺伝子を導入する。

4. 研究成果

(1) Ghd7 のノックアウト形質転換イネを作製したところ、下流の Ehd1, Hd3a, RFT1 それぞれのピーク時の発現が上昇し、長日条件で出穂が早まった。しかしながら、短日条件ほどは早くならず光周性が完全にならなかった。このことから、Ghd7 の他にも DTH8 や OsPRR37 などが光周性に関わっており、長日での遅咲きを誘導していると考えられる。現在、Ghd7 の光と概日時計の制御に関する形質転換イネを作製しており、表現型、Ghd7 発現パターン、Ghd7 の下流遺伝子の発現、赤色光への感受性、赤色光を感受するゲート時間の変化等を解析中である。また、Ghd7 ノックアウト形質転換体は、出穂が早まるだけでなく、草丈が低く、生育が遅く、分けつが少なく、葉先が枯れやすいというフェノタイプが観察された。これまでも、Ghd7 が草丈や収量に関わるということが報告されてきたが、それを確認するとともに、新たに生育速度や、葉の健全性にも関わるということがわかった。

(2) ChIP-seq 実験のため、フィットクロムミュータントイネにフィットクロムの C 末端に GFP を融合したタンパク質が発現するコンストラクトを導入した。プロモーターは 35S プロモーターとフィットクロムのプロモーターを用いた。それぞれ十数ラインを作製し、抗 GFP 抗体と抗フィットクロム抗体により、全長のタンパク質を検出した。その結果、35S プロモーターを用いた形質転換体のうち、数ラインがタンパク質の蓄積が高かった。これらのラインはフィットクロムミュータントの早咲きのフェノタイプを部分的に相補していた。フィットクロムのプロモーターを用いた形質転換体では、全長タンパク質が十分に確認されなかった。全長タンパク質の蓄積が高かった 35S プロモーターを用いた数ラインについて、長日または短日において育成し、サンプリングを行った。ホルムアルデヒドで固定した後、抗 GFP 抗体により免疫沈降した。その後、次世代シーケンサーにより ChIP-seq 解析を行った。光応答に関わる遺伝子やジベレリンなどホルモン応答に関わる遺伝子の近傍にピークが見られた。しかしながら、固定の条件により、結果が大きく異なることがわかり、現在条件を検討中である。

(3) 液体培養を用いた高効率相同組換え法により、Ghd7 の C 末端にレポーター遺伝子が導入された形質転換体を作製した。レポーター遺伝子が Ghd7 の C 末端に正しく導入された形質転換体は、約 400 のカルスから 1 ラインのみ得られた。このラインについて、T2 ラインまで育成したところ、ホモラインのみ長日条件で早咲きになった。このことから、Ghd7 は C 末端にレポータータンパク質が融合すると機能が少なくとも部分的に失われることが示唆された。現在この形質転換体について、レポーターの発現が十分かどうか等を解析中である。

< 引用文献 >

Endo-Higashi and Izawa, 2011, Plant Cell Physiol: 52: 1083-1094, Itoh et al. 2010, Nat Genet 42: 635-638, Nemoto et al. 2016, Plant J. 86:221-33, Okada et al. 2017, Nature Plant 3: 17039, Osugi et al. 2011, Plant Physiol 157: 1128-1137, Ozawa et al. 2012 Plant Cell Physiol 53:755-761, Tsuji et al. 2015, Plant J 82: 256-266, Weng et al. 2014, Plant Physiol 164: 735-747, Xue et al., 2008, Nat Genet 40: 761-767

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕

なし

〔学会発表〕

なし

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

出願状況

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。