

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05983

研究課題名（和文）イネの青色光応答性変化による開花期制御基盤の構築

研究課題名（英文）Elucidation and control of blue light responsive flowering pathway in rice

研究代表者

伊藤 博紀（Hironori, Itoh）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究部門・上級研究員

研究者番号：00466012

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、イネの青色光応答性の開花期制御メカニズムを明らかにし、人為制御に必要な基盤の構築を目指した。まず、青色光応答性の分子基盤の構築では、青色光信号伝達系からその下流で機能する複数の転写因子の相互作用を解析し、促進因子Ehd1遺伝子の発現制御基盤を明らかとした。Ehd1の青色光応答性のシス配列と相互作用する転写因子は新規遺伝子であった。次に、この青色光応答性に関する遺伝子のゲノム編集システムや過剰発現システムを作出し、朝方のEhd1の発現誘導との関係と出穂との関係を明らかとした。今後は、構築した基盤の遺伝子変異集積と適切な制御環境を組み合わせることで開花期制御の高度化を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の開花期制御は、環境に応答した生存戦略の多様性を成す花芽形成の分子機構である。イネをモデルとした本成果は、植物における青色光応答性の開花期制御の分子メカニズムにおける植物普遍的な部分とイネ（科）特異的な部分を合わせて明らかにした点で重要であると考えられる。また、近年、作物の品種改良の加速化や人工環境をもちいた作物の安定生産などにおいて、LEDを使用した人工環境下での作物栽培は注目を集めている。人工的に制御された環境で人為的に植物の成長速度や収量を制御する栽培手法の構築にも通じる本研究は、世代促進技術の構築や植物工場の光環境制御による効率的な栽培技術等の基盤情報として社会的にも重要である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the mechanism of floral promotion pathway by blue light in rice plants for genetic and environmental control of flowering time by using the floral promotion pathway. I found a transcription factor that interacts with the blue light responsive cis element in the Ehd1 promoter. Next, we generated and analyzed genome-edited lines and overexpression lines of these blue light responsive pathway genes and clarified its relationship to induction of Ehd1 expression in the morning and its relationship to flowering-time phenotype. In the future, I plan to advance flowering time control by combining the gene mutations in the blue light responsive pathway with an appropriate artificial environment.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：光周性花成反応 青色光 出穂期制御 環境応答 イネ

### 1. 研究開始当初の背景

多くの植物は、季節によって生じる日の長さ(日長)を検知し、最適な時期に花芽形成を誘導する光周性花成反応を示す。主要穀類であるイネ(水稻)では、花芽形成時期の違いは、農業上、作期や収量に直結する栽培地域における出穂期(出穂する時期)に影響を与えることが知られており、調節に関わる様々な遺伝子が単離、同定された結果、光周性反応に関与する遺伝子の自然変異を利用しているということが明らかになっていった。一方で、イネの光周性反応の研究から、自然環境下での出穂期制御において、日長に関わらず促進的に機能することが明らかとなっていた *Ehd1* 遺伝子が、朝方の青色光で誘導されるということが明らかとなっていた。しかしながら、この青色光依存的な *Ehd1* の転写誘導に関与する光受容体分子は研究代表者による研究から明らかとなっていたが、下流で機能する遺伝子は明らかとなっておらず、具体的な分子機構の解明は成されていない状況であった。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では、イネの開花期制御における青色光依存的な *Ehd1* 遺伝子の転写誘導の分子機構の詳細を解明し、既知の遺伝変異との関連を明らかにするとともに、組換え体作出技術を利用して、青色光応答性の遺伝的な改変による開花期制御の基盤構築を目指す。

### 3. 研究の方法

青色光受容体の下流で機能する転写因子を選定し、*Ehd1* の転写制御の実験的な再構成を行う。具体的には、*Ehd1* の青色光応答性と高い相関を示す転写因子を選定し、*in vivo* の一過的発現系を構築し、転写因子が *Ehd1* の直接転写活性化ができるかを明らかにする。

選定した転写因子の機能性の検証と新たな遺伝子変異の作出のために、CRISPER/Cas9 によるゲノム編集システムを作出し、*Ehd1* 遺伝子の発現および出穂期に与える表現型を解析する。

光受容体の過剰発現体や抑制因子のゲノム編集システムを作出し、短日条件下での青色光誘導の増強および出穂表現型への影響を解析する。

青色光依存的な *Ehd1* の発現制御の分子機構に関わる遺伝子と自然変異との関連を明らかにする。ゲノム編集による新規遺伝子変異導入を利用し、これまでに明らかとなっている光周性花成反応との関係について遺伝学的な解析を行う。

### 4. 研究成果

*Ehd1* 遺伝子の青色光応答性の転写誘導には、青色光受容体 *CRY* 遺伝子と概日時計関連遺伝子 *OsGI* 遺伝子が必須であることを明らかとしてきたが、下流の転写因子は明らかとなっていなかった。そこで、*Ehd1* 遺伝子の青色光依存的な誘導が起こる時間帯において、*OsGI* の制御下にある遺伝子を網羅的に探索し(90 遺伝子)、その中から転写因子を選抜した。これらの転写因子の中で、受容体 *CRY* の下流で青色光シグナルを下流に伝達する因子 *COP1* 遺伝子産物と相互作用する 2 種の転写因子を同定した。これらの転写因子は、BBX 型転写因子をコードしており、1 つは、CCT ドメインを C 末端に持ち、もう 1 つは、CCT ドメインを持たないタイプであった。

これらの転写因子が *Ehd1* 遺伝子の転写制御に関わることを明らかとするために、イネ幼苗の葉鞘由来のプロトプラストを用いた一過的発現系による遺伝子機能解析法を確立し、転写因子の機能評価を行った。この場合、転写活性化能力は、*Ehd1* 遺伝子のプロモーターに融合したレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)の遺伝子産物の単位時間あたりの酵素活性で評価される。図 1A に示したように、2 つの転写因子が共存することで、*Ehd1* プロモーターの強く転写活性が誘導されることを明らかとした。この転写活性化は、片方の転写因子の Zn-finger ドメインの変異導入やもう片方の CCT ドメインの変異導入により著しく低下し、

*Ehd1* プロモーター上の青色光応答性のシス配列に変異を導入したプロモーターでも誘導が低下されることを明らかにした(図 1B)。最終的に、2 種の転写因子は、プロトプラスト内でヘテロダイマーを形成することを BiFC アッセイにより示した。CCT ドメインを持たないタイプの BBX 型転写因子は、内生タンパク質レベルが、暗所では減少し、青色光に応答して安定化されることをウェスタン解析により明らかにした。以上より、単離した転写因子が、*Ehd1* プロモーターの青色光応答性のシス配列を介して転写を活性化すること、さらに、青色光シグナルの下流で活性が制御されることが検証され、受容体から転写因子のネットワークが示された。今回単離した CCT ドメインを持たない BBX 型

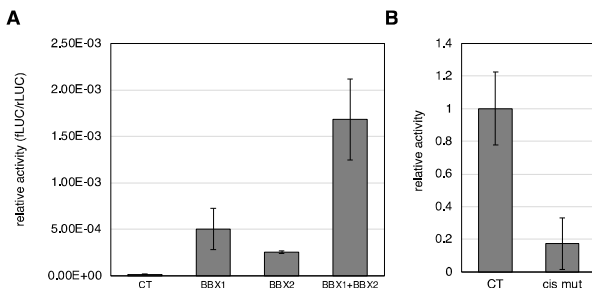


図 1 青色光依存的な *Ehd1* の転写制御に関わる BBX 転写因子の解析  
A) プロトプラストを用いた遺伝子機能解析 CT: コントロール、BBX1: エフェクターに CCT ドメインを持たない BBX 型転写因子、BBX2: エフェクターに CCT ドメインを持つ BBX 転写因子のみ、BBX1+BBX2: 2 種の転写因子を同時に導入。縦軸は、レポーター(ルシフェラーゼ)の相対活性値。B) 青色光応答性シス配列との関係 転写活性可能な、*Ehd1* プロモーター上の青色光依存的なシス配列の 1 つに変異を入れたレポーター(cis mut)。

転写因子は、これまでに収穫期制御への関与が報告されていない転写因子であった。近年、異なる BBX 転写因子間の相互作用が開花制御に機能することはシロイヌナズナでも報告されており（引用文献、引用文献）本成果は、イネの開花制御における青色光応答機構が、植物普遍的な経路にイネ特異的な因子を登場させることで開花期制御の光環境応答性を獲得したことを表すものである。

次に、新規に単離した BBX 型転写因子に関してゲノム編集システムを作出した。日本晴背景および NIL (Hd1) 系統において変異導入した。それぞれ、独立の変異であるが、2 系統について、ホモ個体を系統化し、収穫期に加えて草高や穂の長さに関して表現型を調査した。その結果、短日条件下での朝の *Ehd1* 遺伝子への影響が見出されるものの、短日条件および長日条件下での収穫期表現型に大きな影響を示さなかった。先の一過的発現系での機能評価に一致して、ゲノム編集システムの解析結果は、異なる転写因子との組み合わせによる遺伝子間相互作用が必要であることを示唆するものであると考えられた。

青色光受容体 CRY1 の発色団結合領域に点変異を有する機能亢進型ドミナント変異遺伝子の過剰発現体を解析した結果、収穫期表現型に劇的な変化を見出すことはできなかった。一方で、CRY1 過剰発現体の解析から予想された植物体の矮化と濃緑色な葉色を示したことから、イネ植物体内でドミナント変異は機能していると結論した。また、抑制因子として同定されていた転写因子のゲノム編集システムを日本晴背景で作出し、その表現型を調査したが、有意な収穫促進効果を観察することはできなかった。つまり、今回は、光受容体の増強と抑制因子の欠損により、青色光依存的な促進能力の増強を誘導することはできなかった。開花期は肥料や乾燥状態など、光以外の環境要因からの影響も受けるため、開花を誘導することが示されているストレス条件との組み合わせと青色光の促進能との関連を解析していく予定である。青色光信号伝達系は、シロイヌナズナで明らかにされた仕組みがイネにおいても機能していたが、受容体の過剰発現や抑制因子の機能欠損により、通常の栽培条件では大きな変化が見えなかったことは、シグナル伝達下流で、青色光シグナルを調節する機構が存在し、過剰な応答が引き起こされないようにするブレーキ因子がまだ存在することを意味するのかもしれない。これについては、今後も研究を継続し、関与遺伝子を増やす必要がある。

これまでの研究から、複数の BBX 型転写因子が、植物のフロリゲン転写制御に関与することが示されてきた。イネでは、*Hd1* や *DTH2* が明らかとなっている。実際に、コシヒカリを背景とした CSSL 実験系統群からの解析でも、*Hd1* 変異の効果や、*DTH2* を含む領域の収穫期遅延効果が示されている。そこで、複数の品種を青色光条件と赤色光条件の短日条件下で栽培し、収穫期を比較したところ、*Hd1* 欠損の有無に関わらず、青色光はイネの収穫期を短縮させ、青色光が有する普遍的な開花促進効果が明らかにされた。そこで、*DTH2* に対してゲノム編集を行い、遺伝子機能欠損変異を導入したところ、単独変異により短日条件下での収穫期を遅延させることを明らかとした（図 2）。新規に単離した BBX 型転写因子の遺伝子変異は、*DTH2* 変異の示す収穫遅延に対して相加的に作用することから、収穫促進を引き起こす青色光応答性は、*DTH2* をはじめとする転写因子と新規な BBX 型転写因子が核内で相互作用してフロリゲンの転写誘導を促進し、収穫期を早めると考えられた。光受容体活性のドミナント変異や抑制因子の変異に加えて、促進遺伝子の発現期間を延長、あるいは、タンパク質の半減期を伸ばすといった人為的突然変異を作出できれば、青色光応答性の分子基盤を介して人為的な収穫促進を誘導できることが、今後、期待できる状況となった。

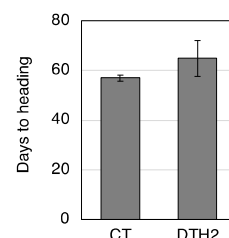


図2 *DTH2*ゲノム変種系統の収穫表現型  
CTは日本晴。DTH2は系統化した*DTH2*遺伝子機能欠損系統。短日条件（10L/14D）での到着日数を計測した。

ゲノム配列が明らかとなったことで、イネのゲノム上には、30 個の BBX 遺伝子が存在することが明らかとなっている（引用文献）。また、各遺伝子は、進化的な解析から、種を超えて保存されていることも明らかとなっている。従って、イネを用いた青色光誘導的な開花期制御技術は、人為的な開花誘導システムとして、他の作物に横断的に導入することで、品種育成期間の短縮や植物工場などにおける成長制御としての栽培技術など、広く利用できると考えられた。

#### < 引用文献 >

Prateek Tripathi, Marcela Carvallo, Elizabeth E. Hamilton, and Steve Kay. Arabidopsis B-BOX32 Interacts with CONSTANS-LIKE3 to Regulate Flowering. Proc. Natl. Acad. Sci. 2017; 114(1): 172-177.

Yin Liu, Guang Lin, Chunmei Yin, and Yuda Fng. B-box Transcription Factor 28 Regulates Flowering by Interacting with CONSTANS. Scientific Reports. 2020; 10: Article number: 17789.

Jianyan Huang, Xiaobo Zhao, Xiaoyu Weng, Lei Wang and Wibo Xie. The Rice B-Box Zinc Finger Gene Family: Genomic Identification, Characterization, Expression Profiling and Diurnal Analysis. PLOS ONE 2012; 7(10): e48242.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Hironori Itoh   |
| 2. 発表標題<br>Application of agri-photonics for regulation of plant-light interactions in crops |
| 3. 学会等名<br>OPTICS&PHOTONICS International Congress2020 (招待講演)                                |
| 4. 発表年<br>2020年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|