

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06687

研究課題名（和文）乾燥地植物における花成因子COおよびFTを介した根系発達促進機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of root system architecture via CO/FT network in arid land plants

研究代表者

明石 欣也（Akashi, Kinya）

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：20314544

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：乾燥ストレスは、世界の植物一次生産性を律速する最大要因である。一方、地球上には乾燥ストレスに対して卓越した耐性を有する植物が見いだされている。本研究では、アフリカ・カラハリ砂漠に自生する野生種スイカにおいて、転写調節因子CLCOL1が下流遺伝子制御因子CLFT1を制御し、乾燥ストレス下で根系発達を正に制御することで、水分獲得能を強化し悪環境への耐性を行う様式について、一連の分子データを取得した。またこの一連の制御モデルが、他の乾燥耐性植物であるトウダイグサ科のジャトロファや、乾燥地作物のコムギ、また野生種スイカを祖先種とする栽培種スイカ等においても普遍性を持ち得る示唆を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水分欠乏下の植物は、高温・過剰照射光・過酸化など複合的な物理化学的ストレスを受けやすい。地球上の植物種の大部分を占める中生植物は、乾燥ストレスへの暴露により組織成長が顕著に抑制される。本研究が明らかにした野生種スイカのCLCOL-CLFT1系で見いだされた花成・根圏発達の統合的制御機構は、乾燥耐性植物のストレス耐性を担う形態形成制御が、その生活環と密接に関連することを示しており、また根系発達と一次代謝との相関性や、乾燥耐性を有する他の植物群における上記機構の普遍性など、学術的意義がある。また将来のストレス耐性の作物育種を進める育種戦略を策定する際にも重要であり社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Drought stress is the largest rate-limiting factor for plant primary productivity worldwide. On the other hand, plants with outstanding tolerance to drought stress have been found on Earth. In this study, we obtained a series of molecular data on how the transcriptional factor CLCOL1 regulates the downstream gene regulator CLFT1 to positively regulate root system development under drought stress in wild watermelon in the Kalahari Desert, Africa, thereby enhancing water acquisition capacity and tolerance to adverse environments. The results also suggest that this regulatory model may be universally applicable to other drought-tolerant plants such as Jatropha, wheat, and cultivated watermelon, the latter is an evolutionary descendent of the wild watermelon.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：乾燥ストレス 植物 根系

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 乾燥ストレス下の植物の形態

乾燥ストレスは地球上の植物生産性を律速する主要因の一つである。一般に乾燥ストレスに暴露された植物では、花成が早まり生活環が短くなる傾向があり、また植物体の地上部と地下部のバイオマス比率(Shoot/Root (S/R比))が小さくなり、地下部を相対的に発達させる傾向がある。しかし乾燥ストレスが植物の体作りを変化させるこれらの適応を担う分子レベルでの仕組みについては、未解明の点が多い。

#### (2) 乾燥地植物の根系応答と関連遺伝子

世界の乾燥地には、乾燥ストレスに応答して根系発達を促進させ、土壌深部からの水分獲得によりストレスに耐える乾燥耐性植物が知られる。この深根性に関連した制御遺伝子を探索するため、カラハリ砂漠に自生する野生種スイカと日本の栽培種スイカを用い、比較トランスクリプトーム解析を行った。その結果、乾燥ストレス下で根の生長が促進されている野生種スイカの根において、シロイヌナズナの時計遺伝子 *CONSTANS* (*CO*) 転写因子の相同遺伝子である *CLCOL1* が、乾燥ストレスにより誘導されることが示された。毛状根スイカ形質転換系を用いた解析により、*CLCOL1* 遺伝子は根端分裂組織で発現しており、この発現を抑制させた野生種スイカ毛状根では根の生長抑制が見られる一方、この遺伝子を過剰発現させた野生種スイカでは根の伸長が促進された。さらに、*CLCOL1* 遺伝子を誘導プロモーターにより発現させた根端細胞において、シロイヌナズナにおける花成遺伝子 *Flowering locus-T* (*FT*) 相同遺伝子である *CLFT4* が特異的に誘導されることが示された。花成遺伝子 *FT* はフロリゲン(花成ホルモン)として知られ、*CO* により誘導され日長に応答した花成形成において重要な役割を果たすことが、シロイヌナズナやイネなどの先行研究により明らかとなっている。また *FT* 相同遺伝子は、日長に応答したジャガイモ塊茎形成のシグナルとしても機能することが示されている。従って上記の野生種スイカ *CLCOL1* および *CLFT4* に関する実験結果から、乾燥ストレスという外的環境に応答して、被子植物に普遍的な形態形成メカニズムの一つである *CO-FT* 情報伝達系を応用して、植物が自らの体作りを変化させて環境適応を図る情報伝達の仕組みを、乾燥耐性植物が進化の過程で独自に発達させている仮説が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究は、被子植物に普遍的な形態形成プログラムの一つである *CO-FT* 花成制御システムが、どのように野生種スイカの根系を発達させ乾燥ストレス耐性を強化するのかについて理解を深めるため、関連遺伝子の探索及び機能解析、一次代謝との関連、植物間の普遍性などについて解析を進め、乾燥地植物における乾燥誘導型の根系発達メカニズムの仕組みを分子レベルで解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 栽培および形態モニタリング実験系の構築

乾燥地植物の根系を解析する栽培実験系として、人工気象環境において、野生種スイカについては焼成ケイ素顆粒を担体として根をモニターする栽培実験系を構築し、灌水をコントロールすることで乾燥ストレスを付与する実験系を構築した。一部の実験では、人工気象器内の植物に対し高温に暴露させ、乾燥ストレスおよび高温ストレスの複合ストレス下の挙動について解析した。プロソピスなど他の一部の乾燥耐性植物については、ピンボード根系分析栽培実験系を構築し、根系形態を2次元マッピング化すると共に、根系形態を SmartRoot ソフトウェアにより定量化する実験系を構築し解析に用いた。

#### (2) 遺伝子発現および遺伝子機能解析

野生種スイカにおける花芽誘導や根系発達等の形態形成に関連する遺伝子群の発現挙動は、定量的 RT-PCR 解析またはマイクロアレー解析等により解析した。当該関連因子の野生種スイカにおける機能解析では、野生種スイカの毛状根形質転換実験系を用い、遺伝子発現抑制実験及び過剰発現実験を行い、根系発達や花芽形成、さらに一時代謝に及ぼす影響などを解析し、これら遺伝子群の発現が植物形態形成と環境応答にどのような影響を及ぼすのかを解析した。一部の実験では、DEX 誘導型プロモーターにより誘導型の過剰発現体を作成し解析に用いた。また、根系制御遺伝子候補については、その遺伝子プロモーター領域と GUS レポーター遺伝子を連結した配列を野生種スイカの毛状根に導入した形質添加スイカを作成し、当該遺伝子発現の組織特

異性などを調査した。一部の根系発達因子については、シロイヌナズナへの遺伝子導入個体を作成しその表現型を解析した。

### (3) ストレス下の一次代謝の解析

ストレス下における植物体の一次代謝変動は、LCMS や HPLC、比色法や酵素カップリング法により解析した。炭素および窒素の蓄積様式は、CN コーダにより解析した。得られた定量値の統計解析においては、マイクロソフト・エクセル・ソフトウェアのほか、R 統計言語において自作スクリプトを作成して解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 根系発達関連遺伝子の解析

乾燥ストレスに対して強い耐性を示すアフリカ・カラハリ砂漠原産の野生種スイカにおいて、前年までに見出されていた CLCOL1 根系促進因子に加え、その根系組織においてストレスにより発現誘導されるが、乾燥ストレスへの耐性が低い栽培種スイカでは誘導されない遺伝子として、新たに CLZFB2 転写調節遺伝子が見出された。この CLZFB2 遺伝子のプロモーター配列と GUS レポーター遺伝子を連結した配列を野生種スイカの毛状根に導入した形質転換スイカを作成し、同遺伝子発現の組織特異性を解析したところ、同遺伝子が根端分裂細胞に特異的に発現する傾向が示唆された。また、CLZFB2 遺伝子を DEX 誘導型プロモーターに連結して毛状根野生種スイカに形質転換し、浸透圧ストレスに対する根系発達応答を解析したところ、CLZFB2 を誘導した野生種スイカでは、浸透圧ストレスに応答した根系発達が顕著に抑制されることが示された。このことから、CLZFB2 は乾燥に応答して誘導されるが、根系発達には阻害的に作用し負のフィードバック制御因子として機能することが示唆された。これらの結果は、野生種スイカにおける乾燥への応答には、その根系発達を正および負に制御する因子群の情報伝達ネットワークが関与することを示唆しており、野生植物の環境応答の多様性を分子レベルで示しているものと考えられる。

### (2) ストレス下の根系発達と一次代謝の関連

野生種スイカの根において、根の伸長促進に正に作用すると示唆される CLCOL1 遺伝子を過剰発現させた毛状根スイカにおけるトランスクリプトームを解析したところ、従来より見いだされていた転写因子群に加え、アミノ酸代謝に関与する因子の発現量が変化することが示され、乾燥地植物の根における環境応答にアミノ酸代謝変動が関わる可能性が示唆された。これまでの野生種スイカのアミノ酸代謝は、地上部における挙動について知られ、特にアルギニン生合成経路のシトルリンを成葉で高蓄積することが判明していたが、地下部における挙動については不明であった。そこで、乾燥ストレス下の地上部において光合成タンパク質等を分解して窒素転流担体であるシトルリンに変換し、これを地下部へ転流し再分解して成長に必要なアミノ酸を再合成するという、新たな生理現象が存在し、これに上述の転写因子群が関与する形態形成機構とリンクするという仮説が考えられた。そこで、焼成ケイ素顆粒を担体として根をモニターする栽培実験系において野生種スイカに乾燥ストレスを付与し、その根の伸長促進とアミノ酸代謝の関係について解析した。その結果、乾燥ストレス付与に伴い地上部では、第4葉期という若い段階にもかかわらず開花が顕著に促進され、CO-FT 情報伝達系による開花促進機構の作用が示唆された。一方窒素代謝については、ストレス暴露に伴い地上部において老化の促進に伴いシトルリン蓄積が誘導されるのに対し、地下部においては蓄積誘導が確認されず、植物体の部位に依存して異なる窒素代謝制御が行われていることが示唆された。これらの結果は、乾燥耐性植物のストレス耐性を担う形態形成制御が、その一次代謝と密接に相関することを示唆するものであり興味深い。

### (3) 根系発達を担う一次代謝制御の分子機構

上記の実験から、乾燥地植物で見いだされるストレス応答型の根系発達機構は、その根系成長を支える栄養源の供給および代謝とリンクしていることが想定された。そこで野生種スイカにおける根系発達と一次代謝との関係をさらに解析したところ、根系成長の栄養源となる有機窒素は、非タンパク質性アミノ酸であるシトルリンが窒素担体として地上部から転流されることで供給され、この窒素代謝には根系でのグローバルな転写調節が関与すること、そして CLCOL1 がその転写調節に関与することが示唆された。さらに、シトルリン類縁化合物の投与実験から、スイカの地上部では地下部の窒素栄養の要求量増大を反映してシトルリンの生合成が活性化されること、またこの活性化には地下部のみならず地上部の転写調節が大きく関与することが示唆された。さらに、野生種コムギやプロソピスなど、いくつかの乾燥耐性植物においても、上述の分子生理応答と類似した挙動が見られることを見出した。これらの結果は、乾燥耐性植物の乾燥ストレス耐性を担う根系成長が、その一次代謝および組織間連絡と密接に関連していることを示し、またこの機構に転写調節因子の進化が関与することを示唆するものであり、学術的な新奇性が高く興味深い。

#### (4) FT 関連遺伝子による根系発達制御の植物間普遍性

上記の一連の分子制御が植物種間でどの程度普遍的に存在しているのかを検討する過程で、乾燥耐性を有するトウダイグサ科の木本植物でありバイオ燃料植物としても知られるジャトロファにおいて、CLFT1 相同遺伝子である JcFT が、ストレスや概日リズムなど多様な環境に応答して発現量を変化させること、またそれらの発現プロファイルがその形態発達の環境応答と相関を示すことが明らかとなった。このことは、野生種スイカの CLCOL-CLFT1 系で見いだされた花成—根圏発達の統合的制御機構が、乾燥耐性を有する他の植物群に存在する可能性を示唆しており、収斂的な分子進化の可能性が考えられた。さらにジャトロファにおいて、FT 遺伝子ファミリー内において JcFT と拮抗的に作用すると想定されるファミリー遺伝子群が、JcFT とは対照的な遺伝子発現環境応答を示すことが明らかとなった。これらの結果は、乾燥地植物における FT が関与する環境に応答した形態形成制御機構において、促進因子と抑制因子の協働による精密制御が行われている可能性を示唆しており興味深い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Osman, S.O.M., Saad, A.S. I., Tadano, S., Takeda, Y., Yamasaki, Y., Tahir, I.S.A., Tsujimoto, H., Akashi, K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Probing differential metabolome responses among wheat genotypes to heat stress using Fourier transform infrared-based chemical fingerprinting.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Agriculture	6. 最初と最後の頁 2842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23052842	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Malambane, G., Batlang, U., Ramolekwa, K., Tsujimoto, H., Akashi, K.	4. 巻 2
2. 論文標題 Growth chamber and field evaluation of physiological factors of two watermelon genotypes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Stress	6. 最初と最後の頁 100017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stress.2021.100017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Salma O. M. Osman, Abu Sefyan I. Saad, Shota Tadano, Yoshiki Takeda, Takafumi Konaka, Yuji Yamasaki, Izzat S. A. Tahir, Hisashi Tsujimoto and Kinya Akashi
2. 発表標題 Profiling Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> L.) Biochemical Responses to Heat Stress by Fourier Transform Infrared Spectroscopy.
3. 学会等名 International Wheat Congress（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹田佳生、Salma O.M. Osman, 只野翔大、山崎友渡、Abu Sefyan I. Saad, Izzat S.A. Tahir, 辻本壽、明石欣也
2. 発表標題 FTIRケモメトリックスによるコムギ高温応答の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kinya Akashi
2. 発表標題 Effect of homocitrulline application on the physiology and metabolism of the citrulline-accumulating watermelon plant.
3. 学会等名 The 5th Alumni-Symposium: Traditional knowledge and medicinal plants in the "Omics" era. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山藤歩乃佳、明石欣也
2. 発表標題 ホモシトルリンに対するスイカ植物の生理および代謝応答
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山藤歩乃佳、明石欣也
2. 発表標題 シトルリン類縁体に対するスイカ幼苗の生理および代謝応答の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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			
ボツワナ	BUAN	University of Botswana	Department of Agricultural Research	
スーダン	Agricultural Research Cooperation			