

令和 5 年 4 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06698

研究課題名(和文) 落葉性木本植物における維管束を介した短日情報の根への伝達と冬季環境耐性の獲得機構

研究課題名(英文) Mechanisms for transmission of short-day information to root via vascular system and acquisition of tolerance to winter environment in deciduous woody plant

研究代表者

佐藤 忍 (Sato, Shinobu)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70196236

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)：落葉性樹木ポプラにおいて芽の休眠は秋の短日によってアブシジン酸を介して誘導されるが、根の休眠は芽とは異なり、アブシジン酸に加え、葉から根へ篩管を介して輸送されるmicroRNAによっても制御される。短日下のポプラの葉で発現量が増加し、篩管液に含まれるmicroRNAを解析し、それらの欠損変異体において根の伸長量の変化を解析した。また長日や短日における根のRNA-seqを実施し、37271遺伝子の発現動態を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

落葉樹は冬季環境に適応するために秋に休眠に入る。芽の休眠は秋の短日によって誘導されることが知られるが、根の成長や機能がどのように制御されているかは分かっていなかった。本研究により、葉が受けた短日の情報が根に伝わる仕組みと根の機能制御の一端が解明された。

研究成果の概要(英文)：In poplar, a deciduous tree, bud dormancy is induced by short-day (SD) via abscisic acid in autumn, but the root dormancy was controlled by some microRNAs synthesized in leaves under SD transported through sieve tube in addition to abscisic acid. We focused on certain microRNAs and created their defective mutants and analyzed the root elongation. Moreover, RNA-seq was performed in poplar roots under LD and SD, and expression kinetics of 37271 genes were analyzed.

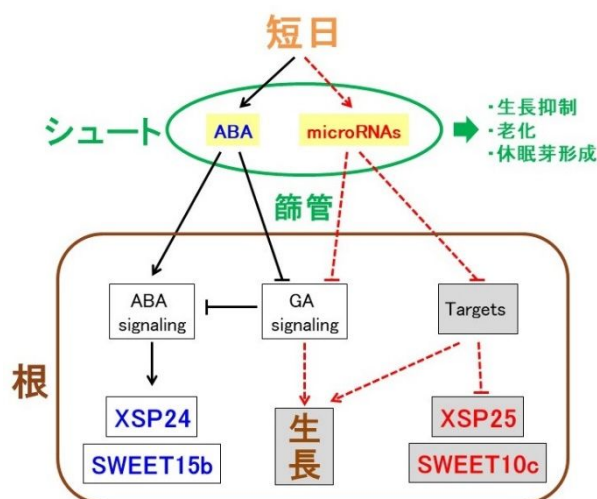
研究分野：植物生理学

キーワード：落葉樹 短日 microRNA 篩管 根 成長 導管液 休眠

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

ポプラでは冬期に導管液中の Ca や K、ショ糖、ヘキソース、導管液タンパク質が増加するが、短日条件下の根で XSP25、XSP24、ショ糖排出輸送体の発現が誘導された。しかし短日において休眠芽形成を誘導するアブシジン酸は XSPs と SWEETs の一部しか誘導しなかった。そこで短日情報を葉から根へ伝達する新たな因子の候補を探索したところ、短日の葉で発現し、カボチャ等の既存の篩管液 microRNA データベースに含まれる microRNA が複数同定された。本研究では、葉から根への短日情報の伝達を担う microRNA とその標的遺伝子の機能を明らかにすることで、冬季環境への全身的な適応機構の一端を解明する。



### 短日を受けたシュートによる根の成長や導管液物質に関わる遺伝子の発現制御モデル

### 2. 研究の目的

落葉性木本植物ポプラにおいて、冬季の導管液に含まれるタンパク質や糖質に関わる遺伝子の根における発現は秋季の短日で誘導されるが、それらのうち一部は ABA 投与で誘導されないことから、シュートから根への短日情報の伝達が篩管を通る ABA 以外の因子によってもなされている可能性が示唆された。そこで、その候補として microRNA を想定し、短日の葉で強く発現する microRNA を解析したところ、カボチャ等の既存の篩管液 microRNA データベースに含まれる microRNA が複数同定された。本研究では、当該 microRNA 欠損ポプラを作出し、標的遺伝子の発現や根の生長の変化を解析するとともに、それらの標的遺伝子の欠損変異体や過剰発現体を作成し、根の生長および導管液物質の組成、冬季環境に対する耐性等を解析することにより、葉から根への短日情報の新たな伝達因子の存在と機能を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、ポプラの葉において短日で増加した microRNA が実際に短日下で合成され篩管中を移動している事を明らかにする。GeneChip™ Array を用いて根において短日で発現が変化する遺伝子を同定し、シロイヌナズナにおける標的遺伝子と照合して標的遺伝子を絞り込む。CRISPR/Cas9 法を用いて microRNA 欠損ポプラを作出し、標的遺伝子の発現や根の生長の変化を解析する。標的遺伝子の欠損変異体や過剰発現体を作成し、根の生長および導管液物質の組成、冬季環境に対する耐性等を解析することで、葉が受けた短日の情報がどのようにシグナルに転換されて根に伝わり、冬季環境への全身的な適応をもたらすか明らかにする。具体的には、

1、ポプラ (*Populus trichocarpa*) をポット内で無菌栽培 (挿し木による継代) し、人工気象室内で長日 (LD) 短日 10 週間 (SD) 短日+低温 [4 ] 4 週間 (LT) 長日 (LD) の人工的な四季の変化を模した環境を与え、対象の microRNAs の葉における転写量の変動を解析する。

2、屋外で栽培している 6 月下旬 (長日) と 9 月下旬 (短日) のポプラの枝および無菌ポット栽培している長日および短日で処理したポプラのシュートを切り取り、明条件下でカロースによる篩管閉鎖を防ぐために EDTA を加えた溶液 (RNase 阻害剤を含む) に切り口を漬け、茎の切り口から放出される篩管液物質を回収し、対象の microRNAs を small RNA 用の RT-PCR で増幅することで、対象の microRNAs の中からどの microRNA が実際に短日下のポプラで篩管液中を移動するか明らかにする。

3、長日条件と短日条件に置いた個体からサンプリングした根から調整した RNA を GeneChip™ Array を用いて解析し、根において短日で発現に増・減のある遺伝子を同定する。

4、2で同定した microRNAs のプロモーターの下流に -グルクローニダーゼ遺伝子を挿入したコンストラクトを導入したポプラを作出し、microRNA の組織特異的発現を解析し、篩管へのローディングの過程を推定する。

5、3で同定した短日で発現が減少する遺伝子とシロイヌナズナで microRNA の標的となっている遺伝子と比較し、ポプラの根で microRNA の標的となっている遺伝子の候補を選定する。

6、CRISPR/Cas9 法を用いて、2で同定された microRNA のノックアウトポプラを作出して野生型ポプラとの相互接ぎ木を行い、標的遺伝子の発現を解析するとともに根の成長や導管液物質関連遺伝子の発現および冬季環境に対する耐性等を解析する。

7、標的遺伝子の発現を改変した組換えポプラを作出し、根の成長や導管液物質関連遺伝子の発現および冬季環境に対する耐性等を解析する。

#### 4．研究成果

落葉性樹木ポプラは秋～冬に休眠が誘導される際、短日によって根の緩やかな成長停止や冬季に増加する導管液有機物質に関する遺伝子の根における発現が誘導され、これらの変化は短日を受容した地上部で合成されたシグナル分子が篩管を介して根へ輸送されることにより起こると考えられた。また、シュートの休眠誘導に働く ABA の投与は導管液有機物に関わる遺伝子の一部しか誘導しなかったため、ABA 以外の短日シグナルの候補として miRNA が挙げられた。これまでの研究で、短日条件下の *P. trichocarpa* の葉で発現量が増加し、カボチャ等の篩管液の microRNA データベースに含まれる microRNA が複数同定されていた。

そこで、長日および短日に置いたポプラの篩管中を流れる microRNA の変化を解析するため、ポプラのシュートの切り口を EDTA や RNase 阻害剤を含む溶液に挿して篩管液を回収し、microRNA の定量を試みた。その結果、短日のポプラ葉で発現上昇する microRNA 7 種のうち、LD/SD の篩管液中で、3 種について篩管液中の存在を確認した。

次に、ハイブリッドアスペン T89 系統 (*P. tremula* × *tremuloides*) を用いて、それら microRNA 遺伝子の欠損変異体をゲノム編集により作出し、人工的年間環境サイクル下で栽培し、短日下における根の伸長及び microRNA のターゲット遺伝子と導管液有機物に関わる遺伝子の発現解析を行った。その結果、複数の microRNA の変異体において、根の伸長量は有意に変化しており、根での遺伝子発現は、ターゲット遺伝子で増加の傾向が、導管液有機物に関わる遺伝子では増加または減少の傾向が見られた。

その中でも、ジベレリンシグナリングに関わる遺伝子を標的にする microRNA では、変異体の根の伸長量は短日移行直後に有意に増加した。また、根における休眠に関連する遺伝子の発現解析において、アブシジン酸・ジベレリンシグナルを介して根の細胞分裂及び細胞壁構成を制御して伸長量を抑制している可能性が示された。

一方、microRNA の標的遺伝子や根に対する影響を網羅的に調べる目的で、RNA-seq 解析用に長日および短日に置いたポプラの根から RNA を抽出し、長日 2W、短日 2/6W のポプラ根で RNA-seq を実施したところ、37271 個の遺伝子の発現動態が得られ、これらのうち、発現量が大きく、いずれか 2 つのタイムコース間で発現量が 20 倍以上変動する遺伝子が 85 個確認され、ある種の細胞タンパク質やペルオキシダーゼなどは長日で発現上昇し、低温耐性やストレス、ABA 応答性の遺伝子などは短日で発現上昇していた。

今後、篩管液中の microRNA を定量し、長日・短日下における変化を解析するとともに、microRNA のターゲット遺伝子の環境サイクル下における動態と microRNA との関係、根の成長や根で発現する成長関連遺伝子および導管液物質に関わる遺伝子との関係を解析していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣岡慎也、小野公代、松澤杜太郎、古川純、小野道之、佐藤忍
2. 発表標題 ポプラの短日による休眠移行におけるmicroRNAの根への長距離輸送と機能
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣岡慎也、小野公代、松澤杜太郎、古川純、小野道之、佐藤忍
2. 発表標題 短日によるポプラ根の休眠誘導におけるmicroRNAの機能
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松澤 杜太郎, 廣岡 慎也, 小野公代, 古川 純, 小野道之, 佐藤忍
2. 発表標題 ポプラの休眠におけるmicroRNAの長距離輸送と作用
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------