

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21306

研究課題名（和文）ハスの「節」における環境情報統合とシグナル物質生産・分配機構の解明

研究課題名（英文）Integration of environmental cues and synthesis/distribution of signaling molecules in lotus node

研究代表者

樋口 洋平（Higuchi, Yohei）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：00746844

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,600,000円

研究成果の概要（和文）：ハスの開花や地下貯蔵器官の形成機構を明らかにするため、ハス地下茎の“節”部に注目し、網羅的遺伝子発現解析と節部の内部構造の解析を行った。連続開花性品種‘MAYR’と難開花性品種‘OURS’を用い、無菌培養ハス、および野外で栽培したハスの地下組織（節、節間）における網羅的発現解析を実施した。その結果、先行研究で注目していたフロリゲン/アンチフロリゲンおよびチューベリゲン候補遺伝子であるNnFT2、NnBFT1、NnFT3に加え、新たにNnFD2とNnMFTが根茎肥大と連動して発現変動することを見出した。また、組織学的解析から節内部の維管束組織の3次元構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、フロリゲンやチューベリゲン等の植物の成長相転換に関わるシグナル因子の発現が、植物体地下部の節で制御されていることを詳細に解析した初の報告となる。一般的に植物は光周期等の外環境の変化を葉で感知し、葉の維管束組織でシグナル物質が合成され、その後成長点へと分配されると考えられてきたが、今後は節内部の維管束組織に注目し、マーカー遺伝子の発現解析等を実施する必要がある。本研究で得られた知見を利用することで、さまざまな植物・作物の開花制御機構の理解が進むとともに、節などに注目した植物体の局所温度管理により画期的な栽培技術の開発に繋がる可能性が期待される。

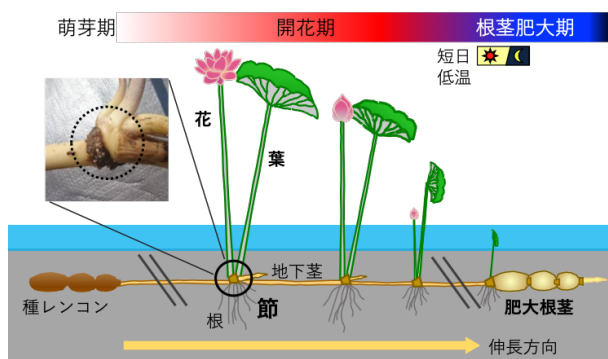
研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanisms of flowering and the formation of underground storage organs in lotus, we focused on the "node" of the lotus rhizome and analyzed the internal structure and whole transcriptome in the node. We conducted transcriptome analysis by RNA-seq in underground tissues (nodes and internodes) of in vitro cultured and field-grown lotus cultivars 'MAYR', a continuous flowering cultivar, and 'OURS', a rarely flowering cultivar, respectively. In addition to previously identified florigen/anti-florigen and tuberigen candidate genes NnFT2, NnBFT1, and NnFT3, we found that NnFD2 and NnMFT were newly found to fluctuate in expression in conjunction with rhizome enlargement conditions. In addition, histological analysis revealed the three-dimensional structure of vascular bundle tissue inside the node.

研究分野：園芸学

キーワード：ハス 節 開花 貯蔵器官肥大 フロリゲン チューベリゲン 維管束組織

1. 研究開始当初の背景

ハス (*Nelumbo nucifera*) は多年生の水生植物であり、観賞用 (花ハス) や食用 (レンコン) を目的として広く栽培されている。ハスの開花特性は極めて多様であり、品種ごとに初夏から初秋にかけてさまざまな開花期を示す一方で、秋から冬にかけての越冬期には地下部に栄養貯蔵器官として肥大根茎 (レンコン) を形成する。ハスの花芽形成・発達には明確な光周期応答性がみられず、広い栽培スペースや高温、高日射条件により促進される。一方で、根茎の肥大については明確な光周期応答性を示し、短日条件で誘導されるとともに、赤色光受容体を介したシグナルによって抑制されることが報告されているが、詳細なメカニズムについては明らかになっていない。近年、複数のモデル植物を使った研究から、植物の開花や地下貯蔵器官の肥大、休眠芽の形成といった成長相の転換は、季節的な光周期や温度の変化を感知し、葉で合成されたシグナル因子 (フロリゲン・チューベリゲン=FT/TFL1 ファミリータンパク質) が茎の先端まで長距離移動することにより制御されることが明らかになっていた。これまでに、ハスの FT/TFL1 ファミリー遺伝子を全ゲノム配列中から網羅的に探索し、詳細な発現解析を行った結果、花成ホルモン (フロリゲン) 候補遺伝子として *NnFT2* を、根茎肥大ホルモン (チューベリゲン) 候補遺伝子として *NnFT3* を、それぞれ同定した。予備的な発現解析の結果から、これら遺伝子の発現は光周期受容器官である葉ではなく、地下部の“節” (せつ) 部において開花または根茎肥大と連動し、明確な発現変動を示していた。節の内部構造を簡易的に観察した結果、維管束組織が高度に発達した構造が確認されたことから、ハスにおいては“節”が成長相転換を制御する中枢的な役割を果たし、シグナル伝達物質の合成と選択的分配を制御しているのではないかとこの着想に至った。



2. 研究の目的

本研究では、これまでほとんど解析されていないハスの節部の内部構造、およびそこでの網羅的遺伝子発現プロファイルを明らかにすることにより、環境情報統合およびシグナル物質生産・分配の中枢器官としての節の役割を明らかにし、地下茎や匍匐茎の節を基本単位として栄養繁殖するクローナル植物の生存戦略の理解に加えて植物の節がもつ機能に対する新たな概念を提示することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 組織学的観察による節の内部構造解析

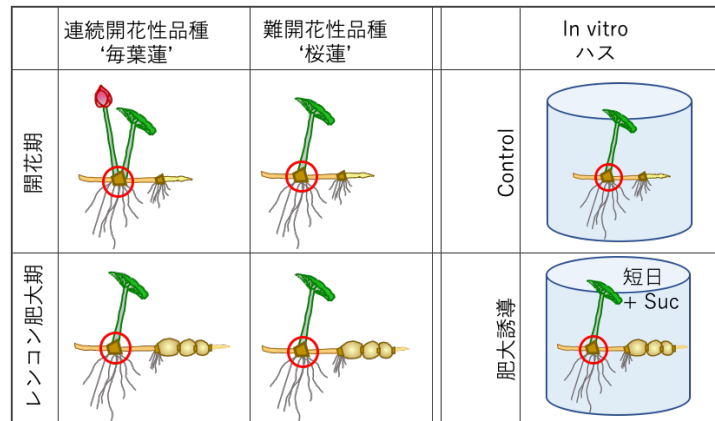
節内部の詳細な構造を明らかにするため、開花期またはレンコン肥大期の節部・節間部の連続切片を作製し、木部/節部特異的な染色や *in situ* hybridization をおこない、節内部

の維管束組織の3次元構造を解析した。

2) ハスの「節」における網羅的遺伝子発現解析

本研究では、これまでほとんど実施例のないハスの節における遺伝子発現を RNA-seq により網羅的に解析した。具体的には、野外で栽培した開花特性が対照的な2つの品種（連続開花性品種‘MAYR’と難開花性品種‘OURS’）、を用い、自然日長下 (ND)における開花期（8月）と根茎肥大期（9~10月）、および根茎肥大抑制条件として電照処理区 (NB)における「節」および「節間」をそれぞれサンプリング

し、RNA-seq による網羅的発現解析を複数年にわたり実施した。加えて、*in vitro* ハス培養物に対し、短日処理や高濃度 sucrose 処理によりレンコン肥大を人為的に誘導した場合の節における遺伝子発現を網羅的に解析した。



○ 節における遺伝子発現をRNA-seqで比較

4. 研究成果

1) 組織学的観察による節の内部構造解析

実生由来の植物体個体を用いてサフランニン・ファストグリーンによる二重染色を行い節内部の構造を観察した結果、維管束組織が大きく肥大した構造が観察された。さらに、節部を透明化処理し、内部の維管束構造を蛍光観察により非破壊的に観察した結果、維管束組織の複雑な構造が明らかとなった。

2) ハスの「節」における網羅的遺伝子発現解析

2.1 自然環境下における季節的・光周期依存的遺伝子発現変動

複数年にわたる RNA-seq 解析により、予備実験でフロリゲン候補として注目していた *NnFT2* は開花期である8月の‘MAYR’で高い発現を示し、難開花性品種の‘OURS’では低いレベルを維持していた。また、8月と比較してレンコン肥大期である9~10月には自然日長下では発現が低下していた一方で、人為的に電照した NB 処理区では高い発現を維持していた。これらの結果から、*NnFT2* の発現は開花促進的な条件や品種において常に発現が上昇していることから、フロリゲンとして機能する可能性が高いと考えられた。一方で *NnFT3* は8月と比較して9~10月に発現が高く、また NB 処理により発現が低下していたことから、短日刺激に応答して発現上昇が引き起こされることが示唆された。さらに FT の相互作用因子である FD 相同遺伝子の発現パターンを調べた結果、肥大が始まる自然条件下の8月から9月にかけては、*NnFD2* の発現が上昇しており、8月のサンプルにおいても‘MAYR’よりも根茎肥大が早期に始まる‘OURS’でより高い発現を示した。また NB 処理によって発現が低下したことから、短日刺激により発現が誘導されることが示された。これらのことから *NnFT3* および *NnFD2* が短日刺激に応答し、根茎肥大誘導に寄与する因子である可能性が考えられた。一方で、花成抑制因子と考えられる *NnBFT1* は *NnFT3* と同様に、NB 処理によ

り発現が低下したことから、短日刺激によって発現が誘導されていることが示された。これらの結果を考え合わせると、NnBFT1 は特に花成に寄与する FD の相互作用を特異的に阻害することで花成を抑制し、結果的に根茎肥大誘導を促進している可能性が考えられた。

上記の遺伝子に加え、複数年にわたる RNA-seq 解析の結果から、MOTHER OF FT AND TFL1 (MFT)サブクレードに属する遺伝子 *NnMFT* の発現が根茎肥大期の節と節間で上昇することを見出した。MFT の栄養貯蔵器官形成に対する機能はまだ報告されていないが、今後注目していく必要がある。

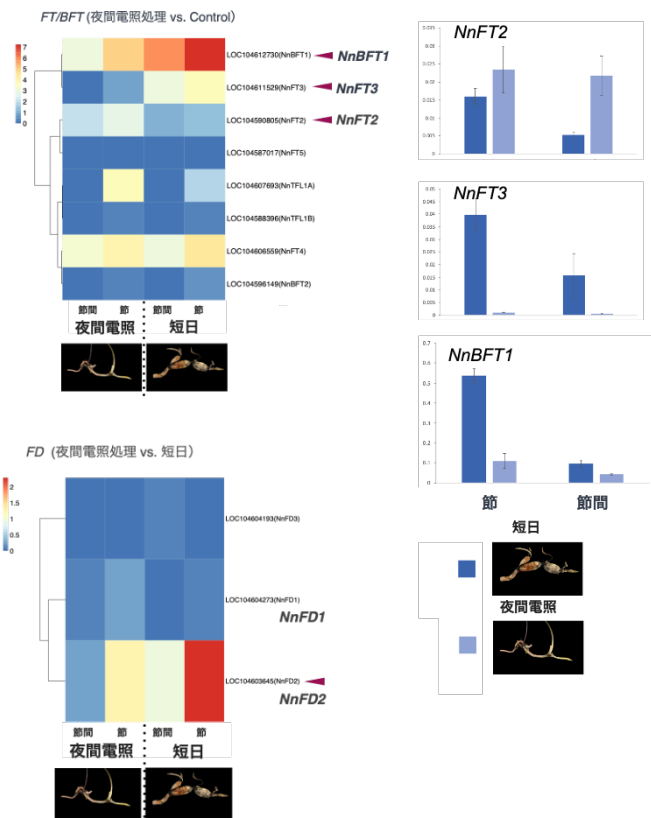


図1. 光周期依存的なFT/TFL1およびFD遺伝子の発現変動
ND: 自然日長下, NB: 電照条件下

2.2 無菌培養個体における高濃度スクロース処理依存的な遺伝子発現変動

ハス無菌培養物の高濃度スクロース処理による根茎肥大誘導個体では、*NnBFT1* および *NnFT3* の発現が抑制されていたことから、根茎肥大成長への成長相転換後、肥大が進行する過程でこれらの因子に対して負のフィードバックが起こっている可能性が示唆された。FT-FD の標的候補遺伝子である MADS-box 遺伝子についても発現を調査し、NB 処理により発現低下が確認された遺伝子を根茎肥大に関与する候補遺伝子として抽出した。一方で NB 処理によって発現が上昇した遺伝子のうち、A クラス遺伝子である *APETALAI* (*API*) のホモログであり、ハスの花芽分裂組決定遺伝子として機能すると考えられる *NnAPI* や E クラス遺伝子である *SEPALLATA* (*SEP*) のホモログである *NnSEPIa* の発現が培養物における高濃度スクロース処理によって低下していた。このことから肥大成長への転換後に花芽分化を誘導する遺伝子に負のフィードバックがかかることで、根茎肥大メリステムのアイデンティティを維持している可能性が考えられた。また、高濃度スクロース処理個体では複数のデンプン合成酵素の発現上昇が確認され、デンプン合成を促進することで肥大を誘導していることが考えられた。

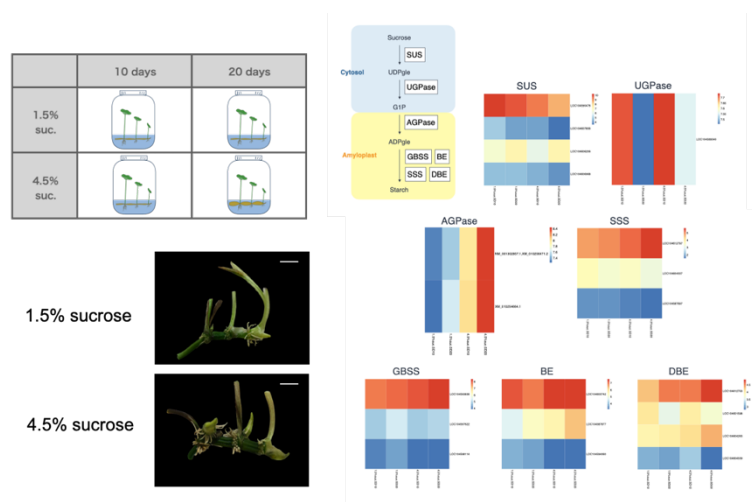


図2. 高濃度スクロース処理によるデンプン合成関連遺伝子の発現変動
SD10: 短日にて10日間培養, SD20: 短日にて20日間培養

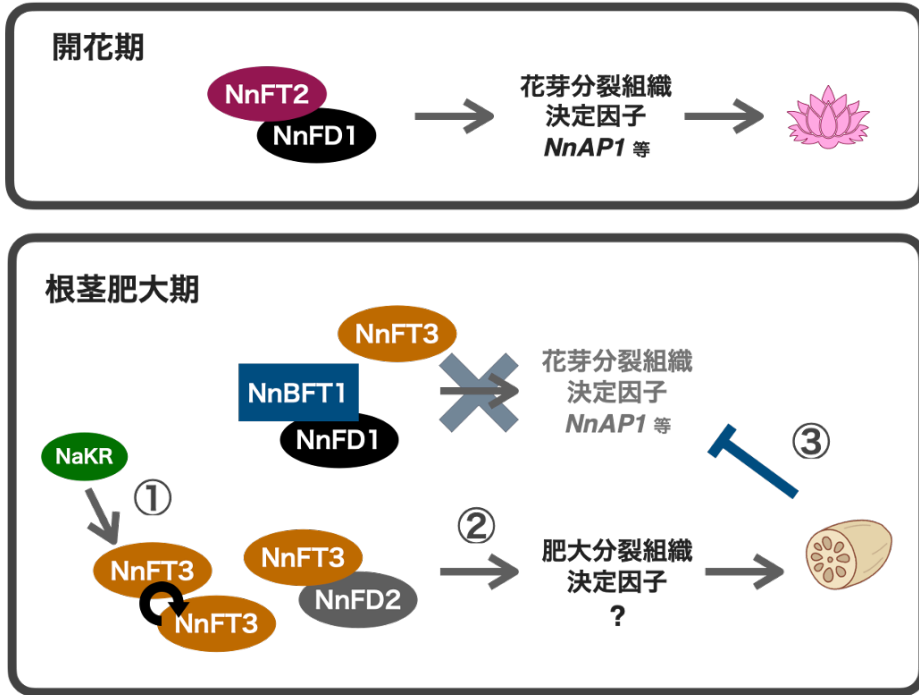


図3.ハスの開花と根茎肥大制御機構の分子モデル

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 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Misaki Inoue, Motoyuki Ishimori, Mayura B Takada, Yohei Higuchi
2. 発表標題 A comprehensive transcriptome-based characterization of genes involved in floral organ formation, thermogenesis, and growth phase transition in <i>Nelumbo nucifera</i> .
3. 学会等名 IV Asian Horticultural Congress (国際学会)
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
---------	---------