

令和元年7月1日現在

機関番号：85301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14763

研究課題名（和文）植物の連続光障害の克服に向けた分子遺伝学的研究

研究課題名（英文）Molecular genetic studies to overcome continuous light injury in plants.

研究代表者

後藤 弘爾（Goto, Koji）

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・その他部局等・専門研究員

研究者番号：00251489

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：一般的なトマトは、1日24時間の連続光照射により生理障害を発症するが、連続光障害耐性を示す品種を発見した。まず、連続光障害の表現型を整理し、耐容性品種と感受性品種間で定量的に大きな差を示すものを指標表現型とした。次に、耐容性品種と感受性品種とを交配して得られたF2世代の中から、指標表現型を利用して耐容性個体を20個選抜した。これを用い、次世代シーケンサーを用いた一塩基多型検出により、連続光耐容性に関与する遺伝子座のマッピングを行った。マッピングと遺伝子内の配列変異に基づいて、72遺伝子に絞り込んだ。さらに、通常栽培と連続光栽培における遺伝子発現の変化をRNA-seq法により比較解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食料やエネルギー源として植物や農作物の生産効率の向上は極めて重要な課題である。連続光障害耐性品種を用いて行った実験では、栄養成長期において、16時間明期8時間暗期の明暗条件と比べて、24時間明期の連続光条件では、2倍以上の新鮮重量が得られた。つまり、1.5倍の光照射時間の増加に対し、2倍の成長促進が得られたことになる。この様に、連続光栽培は投入するエネルギーコスト以上に、植物の成長を促進する栽培法である。

本研究によって得られた成果を利用して、交配育種によって連続光障害耐性を持つ栽培トマト品種を作製すれば、人工光型植物工場等に適した品種として生産性の向上に活用できる。

研究成果の概要（英文）：We discovered a tomato cultivar that shows tolerance to continuous light injury, although the usual tomato shows physiological disorder by continuous light irradiation for 24 hours a day. First, we examined the phenotypes of continuous light injury, and chose the indicator phenotypes those showing a large quantitative difference between tolerant and sensitive cultivars. Next, 20 tolerant individuals were selected using the indicator phenotype from the F2 generation obtained by crossing a tolerant cultivar with a sensitive one. This was used to map loci involved in continuous light tolerance by single nucleotide polymorphism detection using a next-generation sequencer. Based on mapping and sequence variation within the gene of tolerant and of sensitive cultivars, we narrowed down to 72 genes. In addition, the change of gene expression in normal LD-conditions and continuous light conditions was analyzed by the RNA-seq method.

研究分野：植物発生遺伝学

キーワード：植物の連続光障害 トマトゲノム 概日リズム 光障害

1. 研究開始当初の背景

人工光の光強度(光合成有効光量子束密度、PPFD)は、太陽光の数十分の1から1/100程度であり、トマトなど光要求性の高い植物を人工光で栽培するには、1日あたりの総光エネルギー量(PPFD x 時間)を高くすることが必要とされる。人工光源のPPFDを高めるには相当な技術革新が必要とされるので、現在の技術で可能なアプローチとしては、1日あたりの光照射時間を長くすることが最も有効である。従って、暗期のない24時間連続光栽培が総光エネルギー量を高める究極の方法といえることができる。しかしながら、1日24時間連続して光が照射されるという環境は、極地の一部を除いては地球上には本来存在しない環境であり、地理的にもまた進化上も、植物にとって適応する必要の無かった環境といえることができる。

文献調査を行ったところ、連続光下で植物を栽培した場合、植物種によってその生育状況は大きく異なることが分かった。トマトをはじめとするナス科植物の多くは、葉が壊死するなどの「連続光障害」と呼ばれる生理障害を生じ、生育不良からやがて枯死する¹。一方、代表的モデル植物であるアラビドプシスには、連続光障害が殆どみられないので、これまで連続光障害は研究対象にならなかったと考えられる。

本研究を開始するに当たり、いくつかのトマト品種を用いてスクリーニングを行った結果、実験用トマトFB4013が連続光障害耐性を示し、その他は連続光障害を発症した。特にAilsa Craig品種は感受性が強かった。また、文献²に基づき、実験した結果、連続光障害耐性のトマト近縁野生種を見いだした。FB4013の育種歴を調べたところ、近縁野生種との交配履歴があることから、FB4013の連続光障害耐性は、近縁野生種の遺伝子由来であると推定された。

以上および予備的な遺伝学的実験結果から、連続光障害耐性のFB4013と感受性のAilsa Craigを利用した遺伝学的研究によって、連続光障害耐性に関する責任遺伝子を特定するという本研究を開始した。

2. 研究の目的

(1) 連続光障害の表現型の整理と遺伝的指標の確立。

植物を連続光下で栽培したときに生じる生理障害(連続光障害)の表現型を整理し、直接遺伝的支配を受けている一次的表現型と、その遺伝子発現を受け、或いは他の遺伝的、生理的な影響を受けて生じる二次的表現型とを区別する必要がある。一次的表現型を見つけることができれば、さらに連続光障害耐性品種と感受性品種とを用いた遺伝子マッピングに利用できるようにその測定方法を確立する。

(2) 連続光障害耐性遺伝子座のマッピング。

我々がこれまでに見つけた、連続光障害耐性品種と感受性品種とを交配して得られたF2(雑種第2世代)系統をスクリーニングし、(1)で得られた指標を用いて、連続光障害耐性に関わる遺伝子座を物理的にマッピングする。最終的には、責任遺伝子のクローニングを目指す。

(3) 連続光障害発症時のトランスクリプトーム解析。

連続光障害耐容性品種と感受性品種とを用いて、明暗栽培時 (LD) と連続光栽培時 (LL) の本葉における比較トランスクリプトーム解析を行う。連続光に対する応答過程や障害発生過程で起きる遺伝子発現変動を明らかにし、連続光障害発生時の分子機構解明につなげる。また、(2)と合わせ、連続光障害耐容性に関わる責任遺伝子の解明につなげる。

3. 研究の方法

(1) 連続光障害の表現型の整理と遺伝的指標の確立。

①連続光障害の誘導条件。

発芽後の2週間を16時間明期/8時間暗期のLD条件で栽培する。その後、24時間明期の連続光、LL条件へ移行する。また対照区はそのままLD条件で栽培を続ける。光条件は、高演色性蛍光灯(東芝ライテック社製AA葉たばこ用真天然昼光色蛍光灯)を用い、PPFD値60-80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とし、生育温度は $23\pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度は成行き(40-60%Rh)とする。

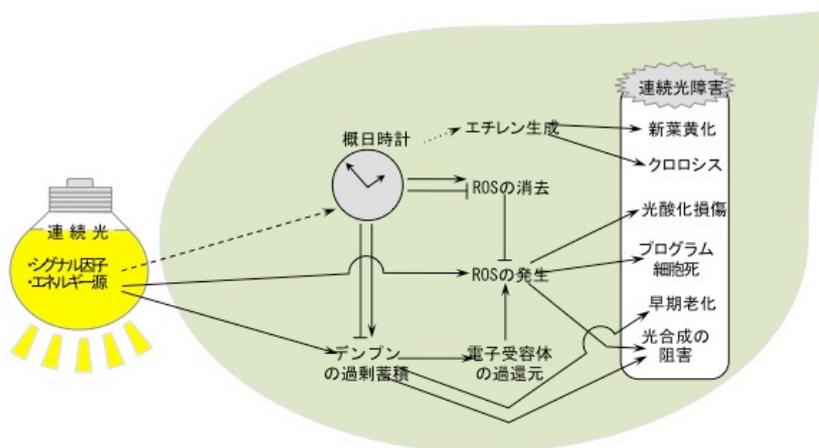
②連続光障害の表現型の計測。

光合成速度の変化をみるため、Imaging PAMを用いて光化学系II(PSII)の最大量子収率(Fv/Fm)および電子伝達速度(ΦPS2)の測定を行った。 H_2O_2 の含有量、脂質の過酸化レベル、抗酸化色素の含有量等の定量を行った。また、定性的な分析として葉内のデンプン蓄積量、クロロシスやネクロシスの発生を観察した。

(2) 連続光障害耐容性遺伝子座のマッピング。

連続光障害耐容性品種と感受性品種とを交配して得られたF2系統を、連続光障害が誘導される条件で栽培した。LL条件に移行後6週間栽培した時点で、連続光障害の有無を判断した。耐容性個体と判断できたものについて、LL条件に移行後3週間栽培した時点でサンプリングした、第5葉先端小葉からDNAを抽出した。

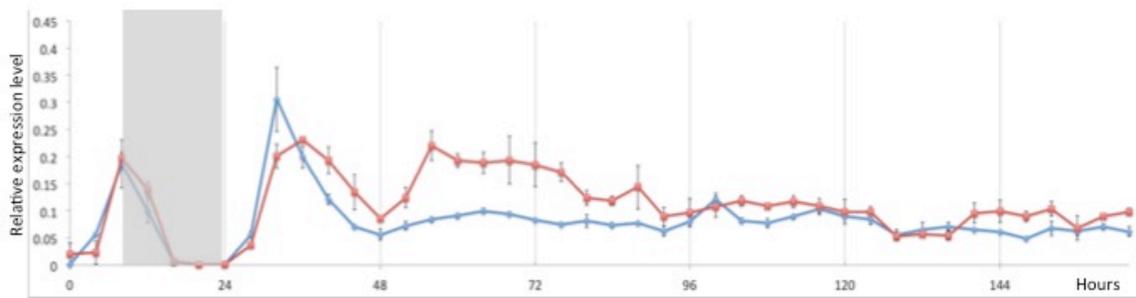
以上の様にして得た連続光耐容性F2系統、20個体と親株2系統のゲノムDNAを用いて、次世代シーケンサー(NGS)による一塩基多型(SNP)を解析した。これにより、連続光障害耐容性の責任遺伝子座の染色体上へのマッピングを行った。



(図1) 連続光障害の誘発機構を示す概念図 (Velez-Ramirez *et al.* 2011を改変)

(3) 連続光障害発症時のトランスクリプトーム解析。

連続光障害耐容性品種をLD条件で栽培したもの(a)、LL条件で栽培したもの(b)、感受性品種をLD条件で栽培したもの(c)、LL条件で栽培したもの(d)の



(図2) LL条件に移したときの時計遺伝子 (SIGIGANTEA1) の発現の変化
0h-24hに明暗周期を与えた後、LLに移行し、4時間毎に遺伝子発現量を測定した。青は連続光障害耐容性品種、赤は感受性品種を示す。

計4条件について、それぞれ生物学的繰り返しを3回行い、それぞれについてトータルRNAを抽出した。その後、常法に従いcDNAを合成、NGSを用いたRNA-seq解析を行った。

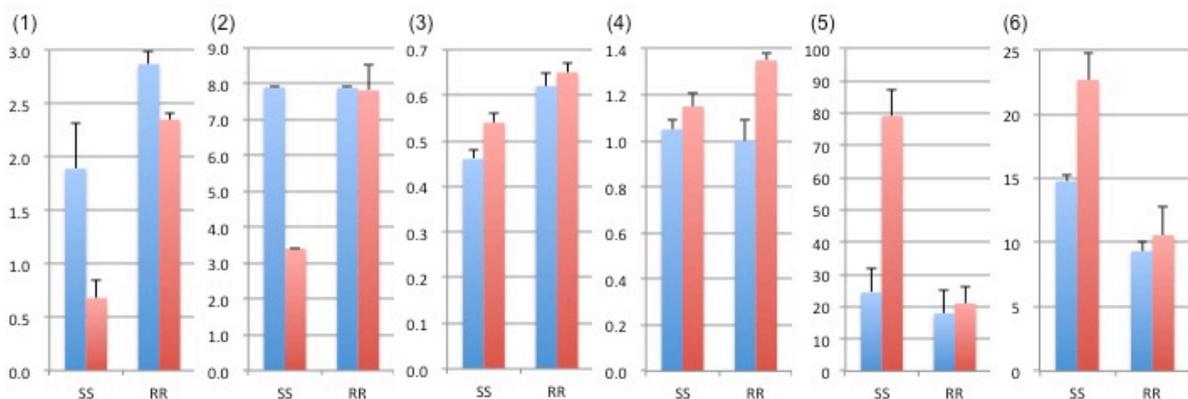
4. 研究成果

(1) 連続光障害の表現型の整理と遺伝的指標の確立。

連続光障害の誘発機構に対する定まった説はまだ無いが、連続光は(図1)³に示すように、エネルギー源であると共にシグナル因子としても働いている。その結果、概日時計の攪乱、デンプンの過剰蓄積による光合成装置のダメージ、活性酸素種(ROS)の過剰蓄積等が起こり、結果として、ネクロシスやクロロシス、光合成阻害、光酸化損傷、早期老化等が発生すると考えられる。

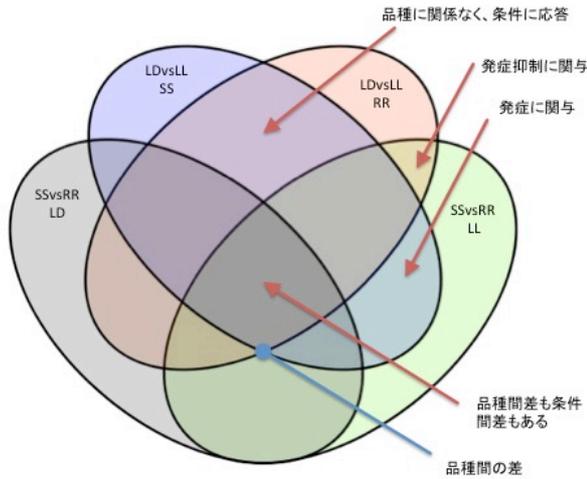
そこで、アラビドプシスで特定されている時計遺伝子のホモログ遺伝子を36遺伝子トマトからクローニングし、SD(8時間明期/16時間暗期)条件からLL条件に移行したときの遺伝子発現の変化を4時間毎に測定した(図2)。殆どの遺伝子は、LL移行後24時間はSD条件下と同じ日周変動を示し、その後概日リズムが失われた。しかし、連続光障害耐容性品種と感受性品種間で発現パターンに顕著な差がみられる遺伝子は存在しなかった。

連続光障害の表現型として、クロロフィル(aおよびb)含量、光化学系II(PSII)の最大量子収率(Fv/Fm)、カルテノイド含量、アントシアニン含量、過酸化水素含量、脂質の過酸化レベル、カタ



(図3) 連続光障害の定量的指標

(1) Chlorophyll a+b、(2) Fv/Fm、(3) Carotenoid、(4) Anthocyanin、(5) H₂O₂、(6) Ascorbate peroxidaseの測定値。青はLD条件、赤はLL条件での値を示す。



(図4)ベン図による遺伝子発現の分析

LD:明暗栽培, LL:連続光栽培, SS:感受性品種, RR:耐容性品種、
 SS vs RR, LD: LD条件でSSでの発現(c)とRRでの発現(a)とに2倍以上差のある遺伝子群、
 SS vs RR, LL: LL条件でSSでの発現(d)とRRでの発現(b)とに2倍以上差のある遺伝子群、
 LD vs LL, SS: SSで、LD条件での発現(c)とLL条件での発現(d)とに2倍以上差のある遺伝子群、
 LD vs LL, RR: RRで、LD条件での発現(a)とLL条件での発現(b)とに2倍以上差のある遺伝子群。

ラーゼ活性、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性、スーパーオキシドディスムターゼ活性を測定した(図3)。その内、クロロフィル (a および b) 含量、光化学系II (PS II) の最大量子収率(Fv/Fm)過酸化水素含量、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は、LD 条件では連続光障害耐容性品種と感受性品種間で殆ど差は無いが、LL 条件下では大きな変化がみられた。

(2) 連続光障害耐容性遺伝子座のマッピング。

F2 プールの中からスクリーニングによって選抜した、連続光障害耐容性個体を用いて、親株間のSNP を利用した遺伝子マッピングを行った。その結果、第6染色体下腕に連続光障害耐容性に関与する遺伝子座をマッピングすることができた。

ITAG (The International Tomato Annotation Group) による遺伝子モデル (Version 2.4) ⁴に従うと、この領域には数百近い遺伝子が座乗している。そこで、この遺伝子モデルに基づいた CDS を調べ、連続光障害耐容性品種と感受性品種の間で、アミノ酸配列が変化するものを抽出した結果、72 遺伝子が該当した。今後、ナレッジベースを利用したり、実験による解析を経て、これらの遺伝子をさらに絞り込むことによって、連続光障害耐容性に関与する責任遺伝子を明らかにする計画である。

(3) 連続光障害発症時のトランスクリプトーム解析。

RNA-seq によって得られたリードに対し ITAG version 2.4 の遺伝子モデルを適用し、常法に従って遺伝子発現解析を行った。有意に発現していると統計的に示唆される遺伝子について、(図4)に示すようなベン図による分析を行った。その結果、(表1)に示すような遺伝子数に絞り込むことができた。

絞り込んだ遺伝子について、遺伝子オントロジー (GO) 解析およびパスウェー解析を行ったが、例えば、ストレス応答経路など、特徴的な偏りを検出することはできなかつた。また、遺伝子マッピングにより抽出された72 遺伝子と重複する遺伝子も検出されなかつた。これは、遺伝子発現変化とし

(表1) RNA-seqによる遺伝子発現解析の結果

SSのLLで発現が高く、RRでは発現変化しない遺伝子	305	
RRでは変化せず、SSでLLで発現が上昇する遺伝子	240	SSでは変化せず、RRでLLで発現が上昇する遺伝子 300
RRでは変化せず、SSでLLで発現が減少する遺伝子	266	SSでは変化せず、RRでLLで発現が減少する遺伝子 112
SSでLLで上昇かつ、RRでもLLで上昇するが、SS>RRの遺伝子	76	RRでLLで上昇、SSでもLLで上昇するが、SS<RRの遺伝子 55
SSでLLで上昇するが、RRでLLで減少する遺伝子	18	
SSでLLで減少かつ、RRでLLで減少する遺伝子	74	RRでLLで減少かつ、SSでもLLで減少するが、SS>RRの遺伝子 33
SSでLLで減少かつ、RRでLLで上昇する遺伝子	52	

て検出できる遺伝子群が、必ずしも連続光障害耐容性の一次的表現型を担う責任遺伝子とは限らず、その遺伝子の影響下にある作用遺伝子である可能性を示唆している。

RNA-seq によって得られた情報量は大きく、今後さらに別の角度からの解析を実施することによって、連続光照射によってもたらされる遺伝子発現カスケードを明らかにしていきたいと考えている。

<引用文献>

- 1 Sysoeva, M. I., Markovskaya, E. F. & Shibaeva, T. G. in *Plant Stress* (2010).
- 2 Ramaley, F. Growth of Plants under Continuous Light. *Science* **73**, 566-567,(1931).
- 3 Velez-Ramirez, A. I., van Ieperen, W., Vreugdenhil, D. & Millenaar, F. F. Plants under continuous light. *Trends Plant Sci* **16**, 310-318,(2011).
- 4 The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**, 635-641,(2012).

5. 主な発表論文等

[学会発表] 12 件、うち、国内学会 7 件(記載省略)、国際学会 5 件

①C. Moriya, M. Yamada and K. Goto.

「Functional analyses of a tuberigen homologue in tomato.」 The 13th Solanaceae Conference SolGenomics: From Advances to Applications, September 12-16, 2016 (U.C. Davis. California USA).

②C. Moriya, M. Yamada and K. Goto.

「Functional analysis of Tomato florigen paralog genes: To understand the flowering habit of tomato.」 CSHA Meeting: Latest Advances in Plant Development & Environmental Response, November 29 – December 2, 2016 (Awaji Yumebutai Conference Center, Japan).

③Goto, K., and Moriya, C.

「Functional analysis of tomato flowering genes.」 Workshop on molecular Mechanisms Controlling Flower Development. September 3-7, 2017. Padua, Italy.

④C. Moriya and K. Goto.

「Functional Analysis of Tomato Flowering Genes of FT-clade.」 Taiwan-Japan Plant Biology 2017. November 3-6, 2017, Academia Sinica, Taipei, Taiwan.

⑤Goto, K., and Moriya, C.

「Structural and functional analysis of tomato flowering genes belong to FT clade.」 The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction. June 11-16, 2018. Gifu-city, Japan.

[産業財産権]

特許登録 特許第 6244574 号 連続光障害を発生する植物培養方法および植物栽培装置
発明者 後藤弘爾 田村勝徳 平成 29 年 11 月 24 日 登録