

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32615

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07452

研究課題名(和文) 光周期による花成制御機構の解明：長日性植物の短日性植物化

研究課題名(英文) Studies on photoperiodic regulation of flowering time: altering a long-day plant to a short-day plant

研究代表者

溝口 剛 (MIZOGUCHI, TSUYOSHI)

国際基督教大学・教養学部・教授

研究者番号：70281623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：*elf3;gi*では、FT発現量は長日条件下で低く、短日条件下では高くなった。*elf3;gi*におけるFT発現量について暗中断の影響を確認した。Ws及びCol背景の*elf3;gi*二重変異体候補の単離、変異体の解析を実施した。*elf3;gi*では、実験室内条件下と同様に、自然条件下の短日条件下の方が長日条件下よりも早咲きとなった。Brassica rapaのGIとELF3の相同性遺伝子の点突然変異体系統の種子を複数入手した。短日及び長日条件下で播種し、コントロール植物との花成時期を比較した。二重変異体の作出を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長日性のシロイヌナズナを基本型として、多種類の変異導入により、短日性を含めた自然界に存在するさまざまな光周期応答性の再現(再構成)を試みる第一歩となった。短日性を示すシロイヌナズナ変異体が実際に得られたことで、光周期応答性の分子基盤の解明につながる可能性がある。本研究により得られた研究成果により、今後は植物の開花・種子収穫季節を自在に制御する技術開発につながる可能性が考えられる。光周期応答性を改変した新規植物の分子育種により、地球上で今後さらに劣化の進行が危惧される栽培環境への適応可能性が拡大され、食糧生産性向上と地球環境保全の基礎基盤作りに活用されると考えられる。

研究成果の概要(英文)：FT expression was higher in short-day than long-day condition in *elf3;gi*. FT expression level under short-day condition was decreased by night-break. In addition to Ler background, *elf3;gi* mutant candidates in Ws and Col backgrounds were screened, identified and characterized. *elf3;gi* in Ler background exhibited an early flowering phenotype under short-day in natural field condition, in a similar way to that in laboratory condition. *elf3* and *gi* mutant seeds of Brassica rapa were obtained. These mutant seeds together with control were sown and flowering time of these plants were investigated. *elf3* and *gi* mutants in Brassica rapa were crossed to produce *elf3;gi* double mutants.

研究分野：Molecular Genetics

キーワード：photoperiodic response

## 1. 研究開始当初の背景

光周期への応答性は、主に長日性、短日性、中性の3タイプに大別される。個々の生物種が有する限界暗期よりも外界環境の連続暗期が短くなると花器官が形成されるのが長日性植物である。逆に、限界暗期よりも外界環境の連続暗期が長くなると花器官が形成されるのが短日性植物である。外界環境の連続暗期が長さとは関係なく、主に発芽から一定期間後に花器官が形成されるのが、中性植物である。光周期応答性と概日リズムの制御系の間には密接な関係があることがわかっている。研究開始当初には、主にシロイヌナズナやイネを用いた研究から、開花制御に関わる遺伝子群や概日リズム制御に関わる遺伝子群が単離されていた。長日性植物であるシロイヌナズナと短日性植物のイネを用いて、長日と短日条件下の双方で早咲きあるいは遅咲きとなる、中性の光周期性を示す突然変異体が単離され、その原因遺伝子が同定されていた。長日性植物であるシロイヌナズナと短日性植物のイネの比較から、植物の光周期応答性を説明するモデルが複数提案されていた。しかし、長日性植物であるシロイヌナズナを短日性にする突然変異や短日性植物のイネを長日性にする突然変異は同定されておらず、植物の光周期応答性に関する分子機構は未解明であった。

## 2. 研究の目的

長日性のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を基本型として、多種類の変異導入により、短日性を含めた自然界に存在するさまざまな光周期応答性の再現(再構成)を試み、その分子基盤を明らかにする。主に、既に単離済みのシロイヌナズナの短日性変異体を用いて、1) 分子遺伝学、2) 他生物での再現、3) メタボローム/トランスクリプトーム/野外栽培の気象データなどの大容量データ解析、4) 数理モデル解析などの多元的な解析により、植物の開花・種子収穫季節を自在に制御する技術開発を行う。光周期応答性を改変した新規植物の分子育種により、地球上で今後さらに劣化の進行が危惧される栽培環境への適応可能性を拡大し、食糧生産性向上と地球環境保全の基礎基盤作りを図る。

## 3. 研究の方法

### (課題1) 短日性変異体における光周性変換メカニズムの理解

(1) 野生型、「長日性の光周期応答性が短日性に変換された変異体 (*elf3;gi*, *elf3;cry2*, *lhy;cca1*, 短日性化新規変異体等)」、「光周期応答性を消失した変異体 (*gi*, *co*, *elf3*, *lhy-1* 等)」を短日、長日、恒明条件下で栽培した際に、全遺伝子の発現パターンにどのような相違点があるか、マイクロアレイ・qRT-PCR・次世代型シーケンサーを用いて解析することとした。また、メタボローム解析を行い、相違点について解析することとした。

(2) 短日性植物アサガオの *FT* 遺伝子発現ピークの位相は、ライトオフを認識してリセットされる。上記(1)の光周期条件と野生型及び変異体系統を用いて、*FT* 遺伝子と他の時計制御遺

伝子の発現について、ライトオフによるリセット効果の有無を検討することとした。*elf3:gi* 変異体において、*FT* 発現量の変動が短日性植物型となるか検討することとした。

(3) シロイヌナズナの様々なエコタイプにおいて、*elf3:gi* 二重変異体を単離し、短日性形質が現れるかを確認することとした。また、単離した *elf3:gi* 二重変異体の形質を増強または抑圧する新たな変異体の単離・解析を行うこととした。

#### (課題 2) 短日性変異体の野外環境における花成応答の解析

(1) 野外環境(学内の 5 観測 地点)において気象データ(気温、湿度、照度など)を自動計測するとともに、短日性変異体の花成応答を解析することとした。月の初めに播種し、12 回/年分の栽培データを取得することとした。短日性変異体 *elf3:gi* が自然条件下でも短日性を示すかを確認することとした。

#### (課題 3) 長日性植物の短日性植物化に関する数理モデル解析

(1) 課題 1 と課題 2 の実験データの集積を受け、長日性植物の短日性植物化に関する数理モデル解析を行うこととした。理論生物学的手法による解析により、各状態の間で発現量が変動する遺伝子・二次代謝産物蓄積パターンを見出すこととした。また、Web データベース上の登録データとの統合比較から、特異的な発現を示す遺伝子・二次代謝産物蓄積パターンを探索することとした。

(2) 課題 1 と課題 2 に関する 2 年分の実験データをもとに、長日性植物の短日性植物化に関する数理モデル解析を行うこととした。花成ホルモン・フロリゲン蓄積量、限界暗期長、概日時計 FRR、明暗周期によるリセットのされ方などを主な解析対象として、複数の数理モデルを構築することとした。

#### (課題 4) 他長日植物の短日性変異体の単離・解析

(1) シロイヌナズナ以外の長日植物として *Brassica rapa* などを選定し、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術により、*ELF3* 及び *GI* 相同性遺伝子の二重遺伝子破壊株の作成と解析を行うこととした。

(2) 短日性変異形質が観察されれば、課題 1、3 と同様に、トランスクリプトーム解析及びメタボローム解析、数理モデル解析を行うこととした。

## 4. 研究成果

### (課題 1)

(1) 野生型とは逆に、短日条件下の方が長日条件下よりも栄養成長時の葉枚数が少なくなり早咲きとなる、短日性変異体である *elf3:gi* では、*FT* 遺伝子の発現量は長日条件下で低く、短日

条件下では高くなることを確認した。

(2) 短日条件+暗期中の短時間赤色光照射(暗中断)のもとでは、短日性変異体である *elf3;gi* では、*FT* 遺伝子の発現量が低下することを確認した。

(3) *GI* 遺伝子の過剰発現体が恒明条件下で栽培した際に、個体サイズが小型化することを見出した。概日時計または花成関連遺伝子の突然変異との多重変異体を作出した。いくつかの変異が *GI-ox* の効果を有意に抑圧することを見出した。

(4) *Ws* 及び *Col* 背景の *elf3* 変異体を用いて、EMS による点突然変異導入系統の作出、*elf3;gi* 二重変異体候補の単離、変異体の解析を実施した。

(5) *Ler* 背景の *elf3;gi* 変異体を用いて、EMS による点突然変異導入系統の作出、*elf3;gi* 形質の抑圧・増強変異体候補の単離、変異体の解析を実施した。

#### (課題 2)

(1) 野生型とは逆に、短日性変異体である *elf3;gi* では、実験室内条件下と同様に、自然条件下の短日条件下の方が長日条件下よりも栄養成長時の葉枚数が少なくなり早咲きとなることを確認した。

#### (課題 3)

課題 3 については、当初計画した通りには研究が進まず、成果を得ることができなかった。

#### (課題 4)

(1) シロイヌナズナ以外の長日性植物として *Brassica rapa* に関する研究を進めた。John Innes Centre より、*GIGANTEA* と *ELF3* の相同性遺伝子の点突然変異体系統の種子をそれぞれ複数入手した。短日及び長日条件下で播種し、コントロール植物との花成時期を比較した。変異体種子の増殖を行い、二重変異体の作出を試みた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kentaro Mori, Martine Lemaire-Chamley, Joana Jorly, Fernando Carrari, Mariana Conte, Erika Asamizu, Tsuyoshi Mizoguchi, Hiroshi Ezura, Christophe Rothan	4. 巻 72
2. 論文標題 The conserved brassinosteroid-related transcription factor BIM1a negatively regulates fruit growth in tomato	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 1181, 1197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/eraa495	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 Ryosuke Hayama, Peizhen Yang, Federico Valverde, Tsuyoshi Mizoguchi, Ikuyo Furutani-Hayama, Richard D. Vierstra, and George Coupland	4. 巻 19;9(1)
2. 論文標題 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases are required for period maintenance of the circadian clock at high temperature in Arabidopsis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53229-8	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 Kelsey Coyne, Melissa Mullen Davis, Tsuyoshi Mizoguchi, Ryosuke Hayama	4. 巻 25
2. 論文標題 Temporal Restriction of Salt Inducibility in Expression of Salinity-Stress Related Gene by the Circadian Clock in Solanum lycopersicum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 195, 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.19.0703a	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 Hayama R, Mizoguchi T, Coupland G.	4. 巻 35
2. 論文標題 Differential effects of light-to-dark transitions on phase setting in circadian expression among clock-controlled genes in Pharbitis nil.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Signal. Behav.	6. 最初と最後の頁 225, 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2018.1473686.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Choi SW, Hoshikawa K, Fujita S, Thi DP, Mizoguchi T, Ezura H, Ito E.	4. 巻 なし (e-journal)
2. 論文標題 Evaluation of internal control genes for quantitative realtime PCR analyses for studying fruit development of dwarf tomato cultivar 'Micro-Tom'.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Biotech.	6. 最初と最後の頁 e1473686-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.18.0525a.	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 溝口剛
2. 発表標題 シロイヌナズナ (Columbia) の短日型光周性を有する変異体のスクリーニング
3. 学会等名 日本植物バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本絢、宮田佳奈、早山良輔、溝口剛
2. 発表標題 恒明条件でのジベレリン依存型花成制御におけるPTA7の役割
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Murayama Y, Kuroki K, Hara M, Miyata K, Hayama R, Ito E, Choi SW, Mizoguchi T.
2. 発表標題 Inversion of photoperiodic response by mutations of circadian clock genes in Arabidopsis thaliana.
3. 学会等名 International Symposium on Biological Material Science -Aiming at Future Interdisciplinary Collaborations
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakamoto A, Miyara K, Kobayashi M, Hayama R, Ito E, Choi SW, Misoguchi T.
2. 発表標題 Gibberellic acid and PTA7 may control flowering time and stem elongation via a common genetic pathway in Arabidopsis thaliana.
3. 学会等名 International Symposium on Biological Material Science -Aiming at Future Interdisciplinary Collaborations
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村山優子、黒木健、原美由紀、宮田佳奈、早間良輔、伊藤瑛海、崔勝媛、溝口剛
2. 発表標題 early flowering 3 (elf3);gigantea (gi) の短日性花成応答形質に関する解析
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本絢、宮田佳奈、小林桃佳、早間良輔、伊藤瑛海、崔勝媛、溝口剛
2. 発表標題 恒明条件におけるlhy;cca1変異形質を増強するpta7変異の解析
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤瑛海、崔勝媛、星川健、溝口剛、江面浩
2. 発表標題 マイクロトム果実形成と品質維持における液胞輸送の役割
3. 学会等名 第134回日本育種学会講演会、第60回シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hayama R, Mizoguchi T, Coupland G.
2. 発表標題 Differential effects of light-to-dark transitions on phase setting in circadian expression among clock-controlled genes in <i>Pharbitis nil</i> .
3. 学会等名 The 60th of Annual meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi Mizoguchi
2. 発表標題 Inversion of photoperiodic response by mutations of circadian clock genes in <i>Arabidopsis thaliana</i>
3. 学会等名 Tunisia-Japan Symposium on Science, Society and Technology (TJASST 2017) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryosuke Hayama, Liron Sarid-Krebs, Rene Richter, Virginia Fernandez, Tsuyoshi Mizoguchi, George Coupland
2. 発表標題 PSEUDO RESPONSE REGULATORS stabilize CONSTANS protein to promote flowering in response to day length
3. 学会等名 International Symposium on Plant Photobiology, 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryosuke Hayama, Liron Sarid-Krebs, Rene Richter, Virginia Fernandez, Tsuyoshi Mizoguchi, George Coupland
2. 発表標題 PSEUDO RESPONSE REGULATORS stabilize CONSTANS protein to promote flowering in response to day length
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists
4. 発表年 2018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
---------	---------