

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02194

研究課題名(和文)キクの光周性花成における暗期長認識機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of night-length recognition in photoperiodic flowering of chrysanthemum

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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：キクの光周性花成における暗期長の認識機構を明らかにするため、キクタニギクにおいて恒常的活性型フィトクロムB過剰発現体(BYH)を作出し、RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、野生型と比較してBYHにおいて概日時計遺伝子であるCsGI, CsPRR7の発現上昇が確認された。過剰発現体を作成し開花応答を調査した結果、これら遺伝子はともに花成抑制的に機能すること、CsGIに関してはアンチフロリゲンの光誘導相形成に関与することが明らかとなった。さらに、キクタニギクの概日時計遺伝子の発現は暗期開始時にリセットされたことから、キクに特徴的な概日時計機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、短日植物において恒常的活性型フィトクロム過剰発現体を用い、花成応答ならびに活性型フィトクロムの標的となる概日時計遺伝子を解析した初の報告となり、キクやアサガオといった質的な短日応答性を示す植物が持つ暗期優性型の日長認識機構を理解する上で重要な知見を得ることができた。今後は、キクの電照栽培におけるより効率的な電照法の開発や、ゲノム編集等により開花期を最適化した新品種の育成に貢献できるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of dark-time measurement in photoperiodic flowering of chrysanthemums, we generated over-expressor of constitutive active phytochrome B (BYH) in *C. seticuspe* and performed comprehensive gene expression analysis by RNA-seq. The results showed that the expression of circadian clock genes, CsGI and CsPRR7, was up-regulated in BYH compared to the wild type. Overexpression of CsGI and CsPRR7 in *C. seticuspe* resulted in late flowering phenotype, suggesting that these genes may act as floral suppressors, and CsGI was found to be involved in the formation of photo-sensitive phase of anti-florigen induction. In addition, the expression of circadian clock genes in *C. seticuspe* was mainly set at dusk, suggesting the existence of a unique circadian clock mechanism in chrysanthemums.

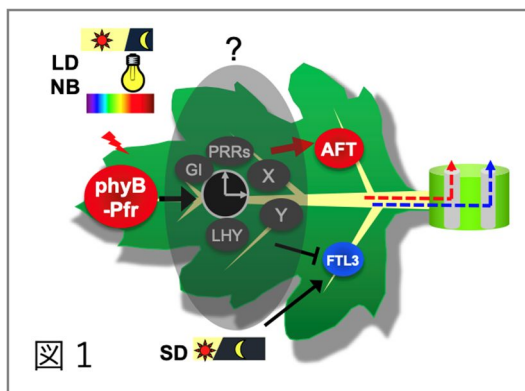
研究分野：園芸科学

キーワード：キク 光周性花成 絶対的短日植物 活性型フィトクロム 概日時計

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

キク (栽培キク、*Chrysanthemum morifolium*)は世界3大花きの1つとされ、日本においても切り花全体の約4割を占める最重要園芸品目である。キクは短日要求性の植物であり、真夜中に人工的に光を照射することにより花芽分化を抑制し、開花期を制御する「電照菊」栽培が広く普及している。一方で、キクがなぜ真夜中の光に敏感に反応し、厳密な開花制御が可能となっているのか、その分子メカニズムについては明らかになっていなかった。2013年に申請者らは二倍体野生キクのキクタニギク (*Chrysanthemum seticuspe*)をモデル系として用い、長日や電照条件などの花成抑制条件下の葉で積極的に合成される花成抑制物質「アンチフロリゲン:AFT」の存在を世界で初めて明らかにした (Higuchi et al., 2013)。AFTは長日や電照条件特異的に発現し、光照射に速やかに応答して誘導された。加えて、赤・遠赤色光受容体の一種であるフィトクロムB (PHYB)が暗期中断を感知する主要な光受容体として機能し、AFTの発現を誘導すること、さらには、キクは絶対的な暗期の長さを計測していることが明らかとなった。これらの結果から、キクは1)日没からの経過時間を体内時計により計測し、暗期開始から一定時間後に光に敏感な時間帯(光誘導相)を形成すること、2)光誘導相において phyB が受容する赤色光シグナルにより AFT の発現が誘導され、花成が抑制されること、を見出した。しかしながら、キクが日没を起点として絶対的な暗期の長さを計測する仕組み、および暗期長の認識に関与する概日時計因子と phyB シグナルの相互作用に関しては明らかとなっていなかった (図1)。



2. 研究の目的

本研究では、未だ解明されていないキクの光周性花成反応における暗期長の認識機構について、近年整備された高精度なゲノム解析ツールを駆使し、活性型フィトクロムの標的因子を明らかにすることにより、キクに特徴的な日没を起点とした暗期長の認識機構を明らかにする。得られた研究成果から、キクやアサガオ等の暗期優性型植物の概日時計機構とシロイヌナズナ等の明期優性型植物の概日時計機構の違いを明らかにし、植物の日長認識機構に関する新たな知見を得ると同時に、ゲノム編集等による園芸作物の高速育種や画期的栽培法の開発に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

キクタニギクにおいて作出した恒常的活性型 PHYB 過剰発現体 (BYH)と通常の PHYB 過剰発現体 (Bwt)、および野生型植物体を用いて RNA-seq による網羅的発現解析を実施し、BYH 特異的な発現変動を示す概日時計関連・時計制御下遺伝子をスクリーニングする。キクタニギクのゲノム配列および RNA-seq 解析の結果からキクの概日時計構成遺伝子を推定し、異なる明暗周期下での詳細な発現解析を実施することにより、日没を起点とした概日時計の同調メカニズムについて推定する。スクリーニングにより得られた候補遺伝子に関して、キクタニギクにおいて過剰発現体ならびに CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊株を作出し、花成反応の表現型を解析する。

4. 研究成果

キクタニギク PHYB の GAF ドメイン中に存在するチロシン (Y)をヒスチジン(H)に置換し過剰発現した結果、暗黒条件下でも部分的な光形態形成を示し、短日条件下において不開花となった。一方で、通常の PHYB 過剰発現体は短日条件下で極端な花成遅延がみられなかったことから、活性型フィトクロムシグナルがキクの花成抑制に必須であることが示唆された(図2)。この活性型 PHYB 過剰発現体 (BYH)と通常の PHYB 過剰発現体 (Bwt)を用い、カスタムアレイにより網羅的な遺伝子発現変動を解析した結果、BYH で発現上

昇が見られた概日時計関連遺伝子として CsGI, CsPRR7 に注目し、先行して機能解析に着手した。

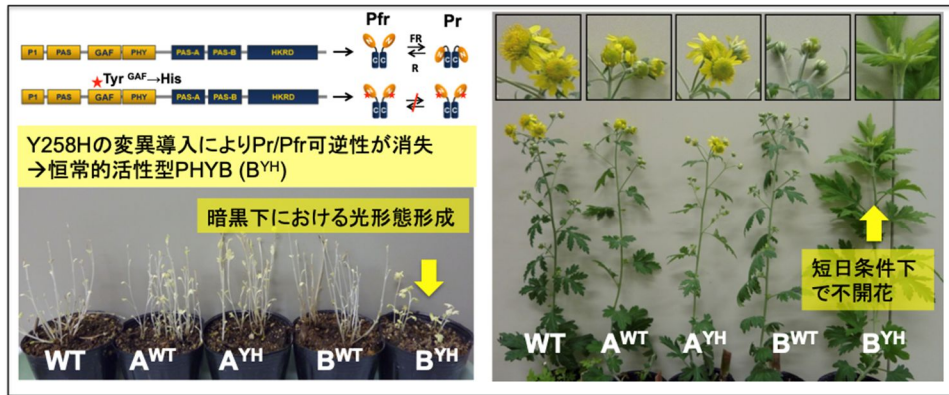


図2

1) キクタニギク概日時計遺伝子の単離と RNA-seq による網羅的発現解析

野生型植物、Bwt、BYH 形質転換体を用い、短日および暗期中断電照下において 24 時間、4 時間おきにサンプリングを行い、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を実施した (図 3)。得られたリードをキクタニギクゲノム (Hirakawa et al., 2019) 上の遺伝子モデルにマップすることで高精度かつ網羅率の高い遺伝子発現プロファイルの取得に成功した。加えて、シロイヌナズナの概日時計・花成関連遺伝子をクエリとしてキクタニギクゲノムの cds データベースに対し BLAST 検索を実施し、ほぼ全ての遺伝子に対するキクタニギク相同遺伝子を単離しリスト化した (Hirakawa et al., 2019)。この情報を基に概日時計関連の主要な遺伝子の発現プロファイル RNA-seq データから抽出し、発現のリズム性、ピーク時刻等からその機能を推測した (図 4)。

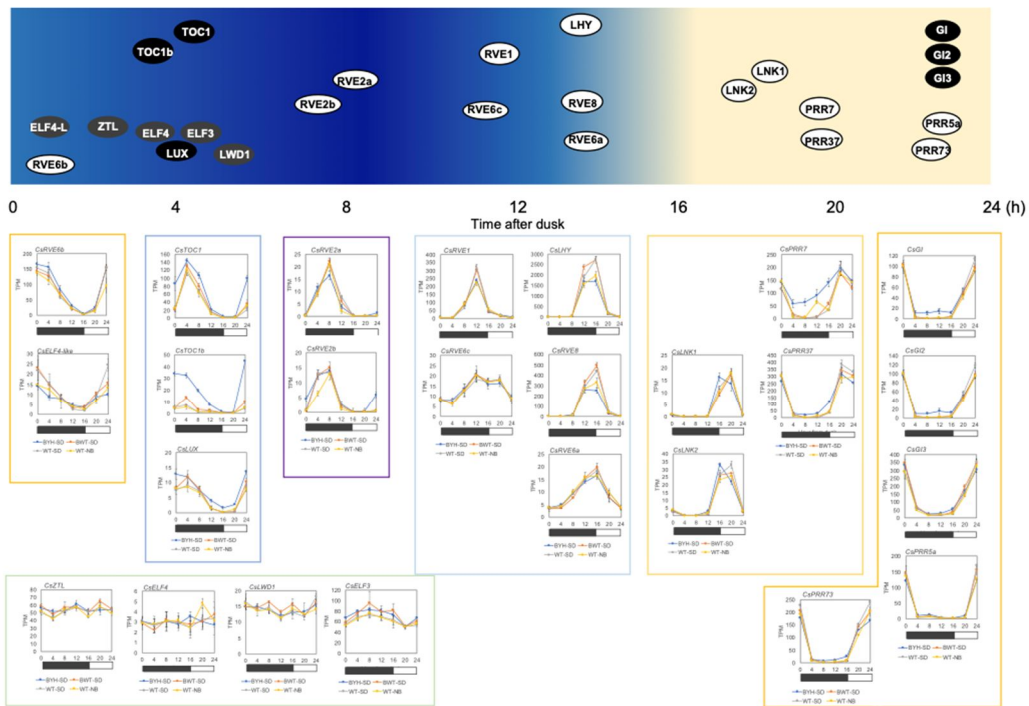


図4

2) キクタニギク概日時計遺伝子の発現解析による暗期長認識機構の推定

キクタニギクゲノム中に見つかった概日時計関連遺伝子 (Hirakawa et al., 2019)のうち、明暗周期下の RNA-seq データにおいて遺伝子発現の日周変動が明確な遺伝子に注目した。1 日のうちの発現ピーク時刻が異なる遺伝子を複数選定し、リアルタイム PCR により異なる明暗周期条件下での発現パターンを解析した。短日条件 (8L/16D)で栽培した野生型のキクタニギクを 4 グループに分け、それぞれ 8, 16, 24, 32 時間の明期を与えた後、連続暗期条件に移行し、明期および連続暗期下での *CsLHY*, *CsRVE8*, *CsPRR7*, *CsPRR37*, *CsGI*, *CsTOC1* の発現リズムを解析した。その結果、いずれの遺伝子も明期長が長くなるにつれ暗期開始後の最初の発現ピーク時刻が遅くなる傾向が観察され、発現リズムが暗期開始時刻に影響を受けていることが示唆された (図 5)。キクと同じ絶対的短日植物であるアサガオでは今回の結果と異なり、概日時計遺伝子の発現は明期開始時に同調される (Hayama et al., 2018)ことから、キクタニギク概日時計による日没を起点とした計時機構はアサガオと異なる可能性が示唆された。

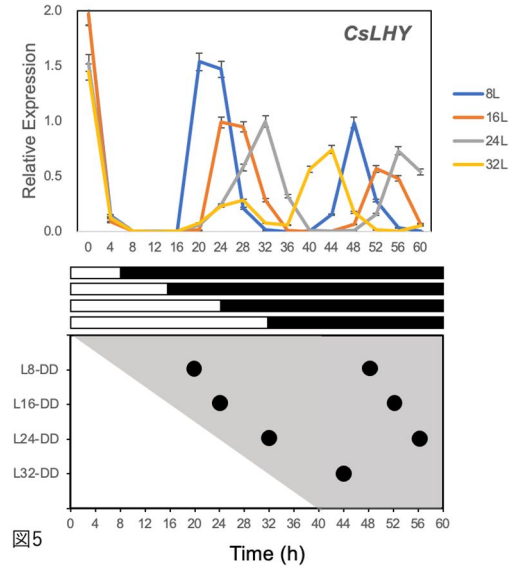


図5

3) 概日時計遺伝子 *CsGI*, *CsPRR7* の機能解析

BYH 過剰発現体で発現上昇がみられた概日時計関連遺伝子のうち、先行して *CsGI* と *CsPRR7* の機能解析を行った。*CsGI* 過剰発現体 (*CsGI*-HA)の開花反応を解析した結果、野生型と比較して全体的に花成抑制の傾向がみられ、花芽分化および開花により長い暗期を必要とする表現型を示した。また、*CsGI*-HA における *CsAFT* の光誘導相を解析した結果、野生型では赤色光による誘導効果が見られなくなる暗期後半の時間帯 (日没後 12-14 時間)においても発現誘導が観察されたことから、*CsGI* が *CsAFT* の光誘導相 (ゲート) の形成に関与することが示唆された (Oda et al., 2020)。加えて、*CsPRR7* の HA タグ付き過剰発現 (*PRR7*-HA) および *CsPRR7*-SRDX 形質転換体を作成し、開花反応を調査した結果、それぞれ野生型と比較して開花抑制、開花促進の表現型を示したことから、*CsPRR7* が開花抑制的に作用することが明らかになった。一方で、研究開始当初から一貫して *CsGI*, *CsPRR7* 遺伝子の CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊に取り組んだものの、キクタニギクにおけるターゲット遺伝子の切断効率が極めて低いことが判明し、遺伝子破壊株の作出には至っていない。これを改善するため、CRISPR/Cas9 ベクターの改変に取り組んだ。栽培ギクで使用実績のある pDeCas9-Kan ベクターの Cas9 発現カセットについて翻訳エンハンサー (*AtADH* 5'UTR)の挿入と HSP terminator への改変を行い (pDeCas9-mod)、Cas9 タンパク質の発現・翻訳量の改善を試みた。加えて、guide RNA の発現量を改善するため、キクタニギク内在性の U6 promoter を 4 種類単離し、gRNA 転写カセットに組み込んだ。これらの改変によりゲノム編集効率が改善されたかを同遺伝子をターゲットとして継続して検証中である。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hirakawa Hideki, Sumitomo Katsuhiko, Hisamatsu Tamotsu, Nagano Soichiro, Shirasawa Kenta, Higuchi Yohei, Kusaba Makoto, Koshioka Masaji, Nakano Yoshihiro, Yagi Masafumi, Yamaguchi Hiroyasu, Taniguchi Kenji, Nakano Michiharu, Isobe Sachiko N	4. 巻 0
2. 論文標題 De novo whole-genome assembly in Chrysanthemum seticospe, a model species of Chrysanthemums, and its application to genetic and gene discovery analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dnares/dsy048	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 -

1. 著者名 Nakano Yoshihiro, Takase Tomoaki, Takahashi Shigekazu, Sumitomo Katsuhiko, Higuchi Yohei, Hisamatsu Tamotsu	4. 巻 283
2. 論文標題 Chrysanthemum requires short-day repeats for anthesis: Gradual CsFTL3 induction through a feedback loop under short-day conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 247-255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plantsci.2019.01.023	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 -

1. 著者名 樋口洋平、中野善公、久松完	4. 巻 10
2. 論文標題 キクの光周性花成制御機構の解明と計画生産技術への応用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BSJ-review	6. 最初と最後の頁 158-168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24480/bsj-review.10c7.00167	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 -

1. 著者名 Nakano Yoshihiro, Takase Tomoyuki, Sumitomo Katsuhiko, Suzuki Shihori, Tsuda-Kawamura Kana, Hisamatsu Tamotsu	4. 巻 89
2. 論文標題 Delay of Flowering at High Temperature in Chrysanthemum: Duration of Darkness and Transitions in Lighting Determine Daily Peak Heat Sensitivity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 602 ~ 608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2503/hortj.UTD-192	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 -

1. 著者名 Oda Atsushi, Higuchi Yohei, Hisamatsu Tamotsu	4. 巻 293
2. 論文標題 Constitutive expression of CsGI alters critical night length for flowering by changing the photo-sensitive phase of anti-florigen production in chrysanthemum.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 110417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plantsci.2020.110417	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yohei Higuchi, Takeshi Fujita, Yoshihiro Nakano, Michio Shibata, Tamotsu Hisamatsu
2. 発表標題 Molecular link between phytochrome signaling and florigen/anti-florigen production in photoperiodic flowering of chrysanthemum
3. 学会等名 The 3rd Asian Horticultural Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋口洋平、久松完、中野善公、平川英樹、白澤健太、磯部祥子、住友克彦
2. 発表標題 キクタニギクの全ゲノムシーケンスを利用した花成関連遺伝子の網羅的探索
3. 学会等名 園芸学会平成30年度秋季大会 (鹿児島)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学 園芸学研究室 https://sites.google.com/view/ut-hortengei/home</p>

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
研究 分 担 者	久松 完 (Hisamatsu Tamotsu) (00355710)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花 き研究部門・ユニット長 (82111)	

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