

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06343

研究課題名(和文)光環境攪乱による作物の極早生機構の解明とスマートアグリへの応用

研究課題名(英文)Elucidation of the extremely early-ripening mechanism of crops by disturbance of light signals and its application to smart agriculture

研究代表者

杉本 学 (Sugimoto, Manabu)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：20216336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光灯+赤色光連続照射で早生化する大麦では花成促進遺伝子FT1発現ピークより早く発現ピークとなる花成制御遺伝子はVRN1、蛍光灯+赤色光+遠赤色光連続照射で極早生化する大麦ではPpdH1が最も発現量が多いことから、Ppd-H1が極早生化に関与する可能性を得た。PpdH1プロモーター領域をGUS遺伝子上流に融合した遺伝子を導入したシロイヌナズナ形質転換体は蛍光灯+赤色光連続照射や蛍光灯+赤色光+遠赤色光連続照射でGUS発現誘導が起こらず、遠赤色光により誘導されるアクチベーター等の因子がPpdH1を活性化し花成形成を促進する可能性のあることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大麦を発芽後から赤色光や遠赤色光を連続照射により花成制御遺伝子の発現パターンが異なることを明らかにした成果は、光環境と遺伝子のコントロールにより計画的に作物の収穫時期を調整するための情報を提供するものである。また、人工光環境の使用で大麦栽培が通常1年に2回行えるところが4-5回行えることになるため、交配による品種改良に必要な時間の大幅な短縮や食料増産に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：PpdH1 showed the expression peaks earlier than that of FT1 in barley causing extremely early-ripening under continuous irradiation with fluorescent light, red LED, and far-red LED, whereas VRN1 showed the expression peaks earlier than that of the flowering promoting gene FT1 in barley causing early-ripening under continuous irradiation with fluorescent light and red LED in the flowering control genes, suggesting that PpdH1 is a key gene in extremely ripening. Arabidopsis thaliana transformants containing a gene in which the PpdH1 promoter region was fused upstream of the GUS gene did not induce GUS expression under continuous irradiation with fluorescent light + red LED or continuous irradiation with fluorescent light + red LED + far red LED. It was suggested that factors such as activators induced by far red light may activate PpdH1 and promote flowering.

研究分野：境界農業、宇宙植物科学

キーワード：遠赤色光 極早生 花成促進遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 大麦やイネなどの作物種子を宇宙空間で保管・栽培したときに発生する問題を明らかにすることを目的として、国際宇宙ステーション (ISS) の船内や船外を利用した実験を進めてきた。その結果、矮性植物や収穫までの日数が短い植物の開発が必要であるとの結論に至った。大麦では白色蛍光灯や赤色 LED を 24 時間連続照射で栽培すると矮性化や栄養成長期から生殖成長期への転換が早まることが報告されている。そこで、光環境の変化により大麦の矮化や生育期間の短縮が可能になれば宇宙環境に適した大麦栽培が即座に実行できるとの発想で、大麦 6 品種を蛍光灯、蛍光灯に赤色 LED (赤色光) を補光して 24 時間連続照射で栽培した。蛍光灯連続照射で発芽後 50 日以内に止め葉が出現する大麦が 3 品種だけだったが、赤色光補光により 6 品種全てが発芽後 50 日以内に止め葉が出現したが、30、40、50 日以内に止め葉が出現したのはそれぞれ 3、2、1 品種であり、品種間に差があった。そこで、遠赤外 LED (遠赤色光) を補光して 24 時間連続照射で栽培したところ、6 品種全てが発芽後 30 日以内に止め葉が出現することを発見した (図 1)。

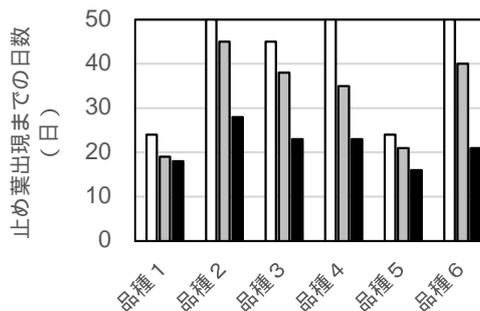


図 1. 蛍光灯、赤色光、遠赤色光補光連続照射における大麦の止め葉展開までの日数。  
 , 蛍光灯; , 赤色光; , 遠赤色光

(2) 赤色光と遠赤色光の受容体であるフィトクロムが花成の抑制や促進に働く起点となる。イネではフィトクロム C (phyC) 変異株とフィトクロム A, C (phyA, phyC) の二重変異株でそれぞれ早生と極早生の形質が出現し<sup>1)</sup>、大麦では phyC 変異株で早生の形質が出現することから<sup>2)</sup>、フィトクロム変異による農業形質の改変や育種への活用が試みられている。そこで、花成促進遺伝子 *FT1* と *phyA*, *B*, *C* の発現を調べたところ、赤色光と遠赤色光連続照射においてそれぞれ止め葉出現の約 15 日前に *FT1* 発現量がピークとなった。また、遠赤色光補光連続照射では *FT1* 発現上昇時期が赤色光補光連続照射よりも早かった (図 2)。一方、*phyA*, *B*, *C* は *FT1* 発現量がピークとなる時期よりも前では発現量が非常に少なかった。イネでは栄養成長期に光周期依存的制御経路とは異なる経路でフィトクロムが開花誘導促進遺伝子 *Ehd2* の発現を抑制し開花に至らないことから<sup>3)</sup>、大麦では赤色光や遠赤色光補光連続照射によりフィトクロム遺伝子の発現が抑制されたため *Ehd2* などの開花誘導促進遺伝子が発現し出穂促進が起こり、早生や極早生となったと推測した。

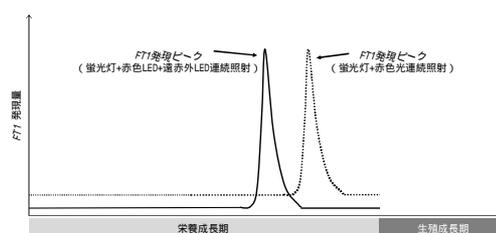


図 2. 蛍光灯+赤色光、蛍光灯+赤色光+遠赤色光照射による *FT1* 発現ピーク

### 2. 研究の目的

大麦では赤色光や遠赤色光補光連続照射で *phyA*, *B*, *C* 発現は抑制されているが、遠赤色光補光連続照射では *FT1* 発現上昇時期が赤色光補光連続照射よりも早い。しかし、この差がどのような機序で起こるかは不明である。本研究では、赤色光や遠赤色光補光連続照射による大麦早生化や極早生化の分子メカニズムを明らかにする目的で、大麦の花成抑制や促進に関与する因子の変動を検討した。また、*FT1* 発現上昇時期より前に発現量が増加する因子のプロモーター領域について、赤色光や遠赤色光補光連続照射による応答について検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 発芽 3 日後 23℃ で培養土に移植し、蛍光灯 ( $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )、蛍光灯+赤色 LED ( $660\text{nm}$ ,  $55 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )、蛍光灯+赤色 LED+遠赤外 LED ( $730\text{nm}$ ,  $12 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) 照射、日長 24 時間の条件下で栽培した。移植から 5 日ごとに葉を採取し  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。葉から抽出した全 RNA から mRNA を精製した後に 1st strand cDNA を合成し、Real Time PCR の鋳型として用いた。大麦の日長と春化に関与する遺伝子 (*FT1*, *VRN1*, *VRN2*, *Ehd2*, *CO1*, *CO2*, *PpdH1*)<sup>4)</sup> とイネの開花誘導促進遺伝子 *Ehd2*<sup>3)</sup> 発現量の経時変化は各遺伝子増幅用プライマー (5' - TGCTCGTGCTCTCCAGCAGCTG - 3' and 5' - TCGCGCTGGCAGTTGAAGTAGAC - 3' for *FT1*, 5' - AACTGAAGGCCAAGGTTGAGA - 3' and 5' - TGCATAAGTTGGTTCTTCCTGG - 3' for *VRN1*, 5' - AAGAGCCACCATCGTGCCATT - 3' and 5' - TCTGGACTCGTAGCGGATTTG - 3' for *VRN2*, 5' -

ACCACTCTTCCTTCCTTTCTCCG-3' and 5'-TCAAGATATGTCAGGGGTTGGAA-3' for *Ehd2*, 5'-AGACACCACTTCACTTCAGCTCC-3' and 5'-CCTTGTTCATAACGTGTGGTCTT-3' for *CO1*, 5'-CCGGACAACACCAGACCAATAT-3' and 5'-TCCATGGAGCTGAAGTGCCTGG-3' for *CO2*, 5'-ACCACTCTTCCTTCCTTTCTCCG-3' and 5'-TCAAGATATGTCAGGGGTTGGAA-3' for *PpdH1*)を用いた Real Time PCR により解析した。内部標準に大麦 *-tubulin* 遺伝子を用いて各遺伝子発現量を標準化した。

(2) *PpdH1* のプロモーター領域と考えられる開始コドンから上流 350bp をプライマー (5'-TCAAGCTTCTGCTAATAGTATGTGTCC-3' と 5'-CTGGATCCAAGAGGAAACATGTTGGG-3')を用いた PCR により得た。*PpdH1* プロモーター領域: -グルコニダーゼ遺伝子 (*GUS*): NOS ターミネーターからなる遺伝子カセットを構築し、植物形質転換用バイナリーベクター-pRI910 (Takara Bio) のマルチクローニングサイトに導入したプラスミド pHvPPDH1-Pro/*GUS* を作製した。アグロバクテリウム法により大麦未熟胚に遺伝子を導入してカナマイシン含有選択培地を用いたカルス誘導により、遺伝子導入カルスをスクリーニングした。また、同様にシロイヌナズナに遺伝子を導入しカナマイシン含有選択培地を用いて遺伝子導入体をスクリーニングした。カナマイシン耐性植物体は蛍光灯+蛍光灯+赤色光、蛍光灯+赤色光+遠赤色光照射し、*GUS* 染色法により *GUS* 遺伝子の発現誘導を確認した。

#### 4. 研究成果

(1) 蛍光灯+赤色光照射では、*FT1* 発現量が 30 日目に 11,887 となり最も多くなった。*CO1* 発現量は 30 日目に 3,500 となり最も多く、発現量ピーク日が *FT1* と同じであった。*VRN2*, *PpdH1*, *Ehd2*, *CO2* は 30 日目まで発現量変化はほとんどなかった。*VRN1* 発現量は 20 日目から上昇し 25 日目で発現量が 2,798、25 日目で 2,948 となった (図 3A)。

蛍光灯+赤色光+遠赤色光照射では、*FT1* 発現量が 20 日目に 11,216 となり最も多くなった。*VRN1* 発現量は 20 日目に 11,216 となり最も多く、発現量ピーク日が *FT1* と同じであった。*VRN2*, *Ehd2* は 20 日目まで発現量変化はほとんどなかった。*PpdH1*, *CO1*, *CO2* 発現量は 15 日目にそれぞれ 7,349、3,066、2,159 となり最も多くなり、*FT1* 発現量ピークより 5 日前にピークとなった (図 3B)。

以上の結果から、蛍光灯+赤色光照射と蛍光灯+赤色光+遠赤色光照射では花形成関連遺伝子の発現誘導が異なること、極早生となる蛍光灯+赤色光+遠赤色光照射では *FT1* 発現量ピークより早いのは *PpdH1*, *CO1*, *CO2* であり、そのうち *PpdH1* が最も発現量が多いことから、*PpdH1* が極早生化に関与する可能性が示された。

(2) プラスミド pHvPPDH1-Pro/*GUS* をアグロバクテリウム法により大麦未熟胚に遺伝子を導入してカナマイシン含有選択培地を用いたカルス誘導を行った結果、カナマイシン耐性植物体を得ることができなかった。そこでシロイヌナズナに遺伝子を導入して得た種子 (T0) をカナマイシン含有選択培地でスクリーニングし、プロモーター領域と *GUS* 遺伝子が導入された植物体種子 (T1) を得た。T1 種子から発芽した形質転換体を蛍光灯+赤色光連続照射、蛍光灯+赤色光+遠赤色光連続照射で栽培し *GUS* 染色を行った結果、*GUS* 染色される形質転換体はなかった。

以上の結果から、*PpdH1* は遠赤色光によりプロモーターが直接活性化されるのではなく、遠赤色光により誘導されるアクチベーター等の因子が *PpdH1* を活性化し花形成を促進する可能性のあることが示唆された。

#### < 引用文献 >

1. Takano, M., Inagaki, N., Xie, X., Yuzurihara, N., Hihara, F., Ishizuka, T., Yano,

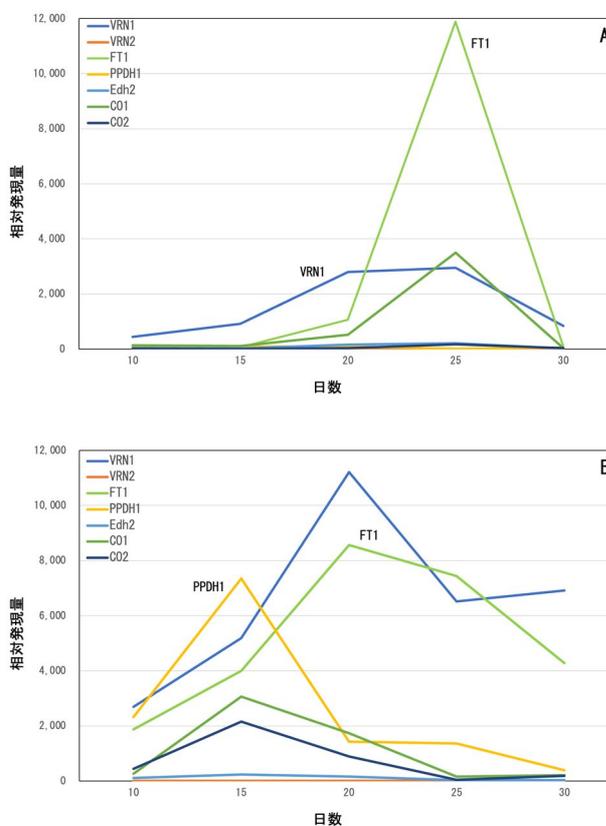


図 3 . 蛍光灯+赤色光照射 (A) と 蛍光灯+赤色光+遠赤色光照射 (B) による大麦花成制御遺伝子発現量の変化

- M., Hishimura, M., Miyao, A., Hirochika, H., Shinomura, T. Distinct and cooperative functions of phytochromes A, B, and C in the control of deetiolation and flowering in rice. *Plant Cell* 17: 3311-3325, 2005.
2. Nishida, H., Ishihara, D., Ishii, M., Kaneko, T., Kawahigashi, H., Akashi, Y., Saishio, D., Tanaka, K., Handa, H., Kakeda, K. Kato, K. Phytochrome C is a key factor controlling long-day flowering in barley. *Plant Physiol.* 163: 804-814, 2013.
  3. Yoshitake, Y., Yokoo, T., Saito, H., Tsukiyama, T., Quan, X., Zikihara, K., Katsura, H., Tokutomim S., Aboshi, T., Mori, N. Inoue, H., Nishida, H., Kohchi, T., Teraishi, M., Okumoto, Y., Tanisaka, T. The effects of phytochrome-mediated light signals on the developmental acquisition of photoperiod sensitivity in rice. *Sci. Rep.* 5: 7709, 2015.
  4. Andres, F., Goupland, G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Rev.* 13: 627-639, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 杉本 学
2. 発表標題 光環境攪乱による作物の極早生化と花成制御関連遺伝子の発現
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第35回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sugimoto, M
2. 発表標題 Change to super early-ripening barley and expression of flowering-control genes by disturbance of lighting condition.
3. 学会等名 44th Scientific Assembly of the Committee on Space Research (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------