

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15818

研究課題名（和文）基部陸上植物ゼニゴケの生殖誘導を制御する光シグナルと概日時計の統合機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the integration mechanism of light and the circadian clock signals in the basal land plant *Marchantia polymorpha*

研究代表者

井上 佳祐 (Inoue, Keisuke)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：20805931

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では基部陸上植物である苔類ゼニゴケの日長認識機構を検証した。24時間以外の様々な日周条件でゼニゴケの成長相転換を観察し、ゼニゴケの成長相転換が概ね明期と暗期の長さの比によって決まることを明らかにした。また、時計遺伝子の破壊や、薬理的な解析によって内生のリズムを攪乱しても成長相転換に大きな影響が生じないことを確認した。さらに、明期の長さに対応して発現変動が生じる遺伝子をRNA-seqによって同定し、多数の植物ホルモン合成酵素遺伝子が含まれることを見出した。以上より、被子植物とは異なり基部陸上植物ゼニゴケは概日時計に大きく依存しない日長認識機構をもつことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日長を認識して応答を制御する「光周性」は概日時計と光シグナルの相互作用を介した外的符号モデルによって制御されることが知られていたが、光周性研究は被子植物に限定されていたため、幅広い植物種にも外的符号モデルが成り立つのかは未明であった。本研究ではゼニゴケの日長応答が概日時計に大きく依存せず、明期と暗期の長さの比によって決まることを明らかにし、基部陸上植物が被子植物とは異なる日長認識機構を持つこと明らかにした。これまでは限られた植物種の解析によって日長認識機構のモデルが提唱されてきたが、本研究の成果は植物が多様な日長認識機構をもつ可能性を示しており、研究分野に新たな視点をもたらすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the mechanism for day-length perception in the basal land plant, the liverwort *Marchantia polymorpha*. We observed growth phase transitions under various diel conditions other than 24 hours (so-called T-cycles and NH-cycles), and found that the growth phase transition in *M. polymorpha* is generally determined by the ratio of the length of the light and dark periods. In addition, we confirmed that disturbance of endogenous rhythms by disruption of clock genes via CRISPR/Cas9-mediated genome editing or pharmacological analysis did not significantly affect growth phase transitions. Furthermore, we identified a set of genes, whose expression is dramatically induced in response to the length of the light period and found that there are various kinds of phytohormone biosynthetic genes. These results suggest that, unlike angiosperms, the basal land plant *M. polymorpha* has a day-length perception mechanism that is largely independent of the circadian clock.

研究分野：植物生理学

キーワード：光 概日時計 光周性 成長相転換 基部陸上植物 ゼニゴケ

1. 研究開始当初の背景

生物は外部環境における明暗や温度の約 24 時間の周期に対応する自律的な生物時計をもち、生理応答を適切なタイミングで制御することで外部環境への適応力を高めている。植物では、季節応答の代表例として光周性花成が良く知られている。植物は花成の日長依存性によって、短日植物・長日植物・中日植物に大別される。また、短日植物および長日植物は、光周性に対する要求性が絶対的な植物（適した日長でのみ花成が生じる）と、光周性が花成の時期を量的に変化させる条件的な植物（適した日長で花成が促進される）の 2 種類が存在する。植物の光周性花成を制御する日長認識の分子機構は、シロイヌナズナ（条件的長日植物）、イネ（条件的短日植物）、キクタニギク（絶対的短日植物）などを用いた研究によって解析が進められており、外部環境からの光シグナルと概日時計の相互作用が重要であることが報告されている（Song et al., 2015; Higuchi et al., 2013）。しかし同時に、日長要求性が異なる植物では光シグナルと概日時計の相互作用の様式も異なることが示されており、日長認識の分子機構はそれぞれの植物種の日長要求性に応じて解析する必要があることが示唆された。

被子植物の日長認識機構は、概日時計によって制御される *GI* や *FKF1* および転写因子 *CO* と光シグナルの相互作用（外的符号）によって生じる *FT* の発現制御が中心的な役割を果たす（Itoh and Izawa, 2013）。基部陸上植物である苔類ゼニゴケは長日でのみ生殖器官を形成する絶対的長日植物であり、その生殖誘導は被子植物の日長認識の鍵遺伝子である *GI* 相同遺伝子および *FKF1* 相同遺伝子により制御される（Kubota et al., 2014）。一方で、ゼニゴケは *FT* オルソログを持たず、複数存在する *CO* 相同遺伝子も日長認識に関与しない。また、申請者たちは転写因子 *BNB* が日長依存的な生殖誘導のマスター制御因子であることを明らかにしており（Yamaoka et al., 2018）、ゼニゴケの日長認識機構の解明は、光シグナルと概日時計という共通の因子を利用して長日要求性を実現する分子機構を理解するだけでなく、陸上植物が進化の過程で *BNB* の発現制御機構をどのように *CO-FT* の発現制御に転用し、個々の植物種に適した日長認識機構を進化させたかを考察する上で重要な知見になると考えられた。さらに、申請者の研究グループはゼニゴケの日長応答がフィトクロムによる遠赤色光高照射反応（FR-HIR）であることを示しており（Inoue et al., 2019）、FR-HIR がどのようにゼニゴケの日長認識に関与しているのか興味を持たれるという状況であった。

2. 研究の目的

以上の研究開始当初の背景を踏まえて、本研究では、生殖誘導に絶対的な長日要求性を示す基部陸上植物ゼニゴケをモデルとして、陸上植物の日長認識機構の基本メカニズムを分子レベルで明らかにし、植物の季節応答モデルに進化的知見を与えることで陸上植物の日長認識機構の普遍性と多様性を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 様々な日周条件下での生理実験による日長認識モデルの検証

ゼニゴケ野生型株を非 24 時間の様々な日周条件下で培養し、成長相転換の有無を確認

することで、ゼニゴケがどのように光情報・日長情報を認識しているのかを検証する。

(2) 内生リズムの破壊が日長認識に与える影響の検証

時計遺伝子の破壊や、薬剤の投与によってゼニゴケの内生リズムを乱した際に、成長相転換にどのような影響があるのかを検証する。

(3) 日長に応答して発現変動する遺伝子の同定

ゼニゴケの FR 依存的な成長相転換に関与する転写因子 MpPIF の変異体 (*Mppif^{se}*) と野生型株を用いて、成長相転換が生じる日長でのみ MpPIF の下流遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1) 様々な日周条件下での生理実験による日長認識モデルの検証

明期と暗期の比率を保った様々な日長 (T-cycle) や、明期や暗期の長さを固定した様々な日長 (NH-cycle) でゼニゴケを培養し、日長応答である成長相転換の有無を観察したところ、ゼニゴケの成長相転換は概ね明期の長さや暗期の長さの比に依存することが明らかとなった。また、光シグナルに感受性の高い時間帯が周期的に現れる被子植物とは異なり、ゼニゴケの成長相転換の誘導に明瞭なリズムは観察されなかった。これらから、ゼニゴケの日長認識は内生リズムに大きく依存せず、明期でシグナルが蓄積し、蓄積したシグナルが暗期に減衰する砂時計的な日長認識機構をもつことが示唆された。また、1 日の長日処理で花成が促進されるシロイヌナズナとは異なり、ゼニゴケの成長相転換には約 10 日間の連続した長日シグナルが必要であることが明らかとなった。これは明期に蓄積するシグナルが経日的に積算される可能性や、閾値以上のシグナルに達した日数を記憶するようなメカニズムの存在を示唆している。

(2) 内生リズムの破壊が日長認識に与える影響の検証

まず、時計遺伝子である MpPRR のプロモーターを用いて、ゼニゴケの内生リズムをルシフェラーゼの発光でモニターできるレポーター株 (*proMpPRR:ELuc*) を作出した。このレポーター株を親株として、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によって時計遺伝子である MpTOC1 および MpPRR に変異を導入し、*proMpPRR:ELuc* のリズムが野生型よりも短周期になる変異体、および周期が消失する無周期の変異体を作成した。作出した内生リズム変異体の日長応答を観察したところ、短周期や無周期の変異体においても成長相転換の有無や、成長相転換にかかる日数は野生型と大差ないことが明らかとなった。さらに、シロイヌナズナで内生リズムを長周期化させる化合物 PHA767491 (Uehara et al. 2019) を処理して表現型を観察したところ、PHA767491 はゼニゴケの内生リズムを長周期化させたものの、成長相転換には大きな影響を与えなかった。これらの結果は、様々な日周条件下での生理実験の結果を支持しており、ゼニゴケの日長応答は概日時計がもたらす内生リズムに大きく依存しないことが示唆された。以上の (1) と (2) の結果をまとめて論文投稿の準備中である。

(3) 日長に応答して発現変動する遺伝子の同定

ゼニゴケの日長応答は内生リズムに大きく依存しないことから、光強度や照射時間に依存して応答が強くなる FR-HIR によって明期の長さを認識している可能性が考えられ

た。そこで、FR 依存的な成長相転換に關与する *Mppif^{se}* と野生型株を用いて、MpPIF 依存的な FR-HIR 誘導性の遺伝子群を同定した。その結果、FR-HIR 条件に移行して数日以内の早い時期に、いくつかの植物ホルモンの生合成に關与する遺伝子群が劇的に発現誘導されることが明らかとなった。これらの内の1つの植物ホルモンは、生合成阻害物質によって成長相転換が阻害されることを確認した。これらの結果から、植物ホルモンが明期に蓄積するシグナルである可能性が考えられ、成長相転換が生じる日長ではFR-HIRによって植物ホルモン生合成遺伝子の劇的な発現誘導が生じ、その結果として内生の植物ホルモン量が大きく変動することで最終的に成長相転換が生じると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Torii Kotaro, Inoue Keisuke, Bekki Keita, Haraguchi Kazuya, Kubo Minoru, Kondo Yuki, Suzuki Takamasa, Kubota Akane, Uemoto Kyohei, Shimizu Hanako, Saito Masato, Fukuda Hiroo, Araki Takashi, Endo Motomu | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 A guiding role of the Arabidopsis circadian clock in cell differentiation revealed by time-series single-cell RNA sequencing | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 111059 ~ 111059 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111059 | 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 Hernandez-Garcia Jorge, Sun Rui, Serrano-Mislata Antonio, Inoue Keisuke, Vargas-Chavez Carlos, Esteve-Bruna David, Arbona Vicent, Yamaoka Shohei, Nishihama Ryuichi, Kohchi Takayuki, Blazquez Miguel A. | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Coordination between growth and stress responses by DELLA in the liverwort Marchantia polymorpha | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Current Biology | 6. 最初と最後の頁 3678 ~ 3686.e11 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.06.010 | 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 Yamaoka Shohei, Inoue Keisuke, Araki Takashi | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 Regulation of gametangia and gametangiophore initiation in the liverwort Marchantia polymorpha | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Plant Reproduction | 6. 最初と最後の頁 297 ~ 306 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00497-021-00419-y | 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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 穴田 小恵、富田 由妃、井上 佳祐、山岡 尚平、荒木 崇 |
| 2. 発表標題 ゼニゴケにおける日長にตอบสนองした生殖成長移行のmiR529c-SPL2モジュールによる制御機構の解析 |
| 3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 井上 佳祐, 小谷 莞太, 真柴 誠, 穴田 小恵, 肥後 あすか, 山岡 尚平, 荒木 崇 |
| 2. 発表標題 苔類ゼニゴケにおける精細胞特異的なRNA制御機構 |
| 3. 学会等名 第10回植物RNA研究ネットワークシンポジウム「RNA から植物を考える」 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 樫木 亮介, 齊藤 美咲, 吉竹 良洋, 井上 佳祐, 河内 孝之, 荒木 崇, 山岡 尚平 |
| 2. 発表標題 ゼニゴケの生活環において多面的に機能する転写因子MplRLの発現解析 |
| 3. 学会等名 日本植物学会第86回大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 三枝 菜摘, 國本 完, 肥後 あすか, 神原 泉, 富田 由妃, 井上 佳祐, 山岡 尚平, 荒木 崇 |
| 2. 発表標題 ゼニゴケの生活環におけるMpMS1の機能解析 |
| 3. 学会等名 日本植物学会第86回大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 利光 珠実, 井上 佳祐, 山岡 尚平, 荒木 崇 |
| 2. 発表標題 ゼニゴケにおける無性芽器形成と有性生殖誘導の関係 |
| 3. 学会等名 日本植物学会第86回大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 金坂侑紀、井上佳祐、山岡尚平、荒木崇 |
| 2. 発表標題 Molecular mechanism for far-red light- and photoperiod-dependent growth phase transition in <i>Marchantia polymorpha</i> |
| 3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|-------|---|---------------------------------|----|
| 研究協力者 | 荒木 崇 (Araki Takashi) (00273433) | 京都大学・生命科学研究科・教授 (14301) | |
| 研究協力者 | 山岡 尚平 (Yamaoka Shohei) (00378770) | 京都大学・生命科学研究科・准教授 (14301) | |
| 研究協力者 | 金坂 侑紀 (Kanesaka Yuki) | | |
| 研究協力者 | 小谷 堯太 (Kotani Kanta) | | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|