

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15861

研究課題名(和文)アオウキクサ属を用いた光周性花成の多様化プロセスの解明

研究課題名(英文)Diversification process of photoperiodic flowering in Lemna genus

研究代表者

村中 智明(Muranaka, Tomoaki)

鹿児島大学・農学部・特別研究員PD

研究者番号：50761938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物の生活史において開花・結実は最重要イベントである。そのため、花成時期は分類学・生態学の双方に重要な形質となる。花成時期の決定要因に概日時計を基盤とした日長計測による光周性がある。多くの分類群で、長日性(春咲き)・短日性(秋咲き)が見られるが、日長応答の多様化プロセスは不明である。本研究では、古くから光周性の解析に用いられてきたアオウキクサ属のイボウキクサ(長日)・アオウキクサ(短日)という近縁の2種を用いた。花成ホルモンであるFT遺伝子において長日誘導型と短日誘導型の2種類のホモログの使い分けと、短日誘導性FTの変異から光周性の多様化を理解できる見通しがあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

四季の移ろいの美しさは、折々に咲く花による部分が大きい。開花季の多様化には様々な要因が複雑に絡むが、日長計測による光周性もその1つである。多くの分類群で、長日性(春咲き)・短日性(秋咲き)の両方が見られるため、進化的に光周性の逆転が起きていると考えられるが、その分子機構は不明な点が多い。本研究では、イボウキクサ(長日)・アオウキクサ(短日)という近縁の2種を用いて、光周性逆転の謎に迫った。その結果、花成ホルモンであるFT遺伝子に長日誘導型と短日誘導型の2つが存在し、その使い分けが逆転に関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Flowering and fruiting are the most important events in the life history of plants. Flowering time is therefore an important trait for both taxonomy and ecology. Photoperiodism, which is based on photoperiod measurement via the circadian clock, is an important factor in determining flowering seasons. Long-day (spring-blooming) and short-day (autumn-blooming) plants are observed in various taxa, but its diversification process is still unknown. In this study, two closely related species of the genus Lemna, Lemna gibba (long-day) and Lemna aequinoctialis (short-day) were analyzed. These two species have been used for photoperiodic analysis for a long time. There were long-day-inducible and short-day-inducible FT genes. It was suggested that the proper use of these two genes is important for diversification of photoperiodic response.

研究分野：植物時間生物学

キーワード：光周性 概日時計 アオウキクサ属 花成 局所適応

1. 研究開始当初の背景

植物の生活史において開花・結実是最重要イベントである。そのため、花成時期は分類学・生態学の双方に重要な形質となる。花成時期の決定要因に概日時計を基盤とした日長計測による光周性がある。多くの分類群で、長日性(春咲き)・短日性(秋咲き)が見られるが、日長応答の多様化プロセスは不明である。概日時計の構成遺伝子は植物で広く保存されているが、光周性花成は様々な分類群で逆転する。調べられた限りでは、植物全体で時計遺伝子の挙動は保存されており、日長応答の変化は概日時計からの出力部分の変化により生じると考えられる。

アオウキクサ属 (*Lemna*) はサトイモ科の浮遊性水草であり、分裂によるクローン増殖で個体数を増やす。花をつけることが稀な種も多いが、室内で再現良く花成が誘導される種もある。とくに長日植物であるイボウキクサ(*L. gibba*)と、短日植物のアオウキクサ(*L. aquinoctialis*)が古くから光周性の解析に用いられてきた。両種とも日長条件が満たされない限り花をつけない絶対的光周性を示す。一方、7日の日長処理で花芽が視認できるほど迅速な応答を示す。イボウキクサ・アオウキクサの花成誘導に関しては種内多様性を含め、以下に示す多くの知見がある。

イボウキクサ: 長日性の純系系統に加え、光周性を示さず長日・短日でよく開花する中日性の純系系統が得られている。また、培地内のリン酸カリウム・硝酸カリウムの濃度を下げると長日条件でも花成が誘導されない。

アオウキクサ: 日本に広く分布する本州型アオウキクサの一年草型の生活史は、水田の季節限定的な湛水に適応し日本で進化したと考えられる。南西諸島の系統は短日処理のみでは開花せず、安息香酸の添加や貧栄養といったストレス処理を必要とする。北陸地方で単離された系統は冬に沈水して植物体のまま越冬を行う。また、本州型アオウキクサ内でも花成誘導日長が多様化しており、緯度依存的に限界日長が延長する。本州型・北陸型・南西型には、花成様式以外にも葉状態・根・種子の形態に遺伝的分化が認められるため、別種とする主張もある。

ウキクサ5属	種数	光周性	ゲノムサイズ	アオウキクサ(<i>Lemna</i>)属(6種を抜粋)
<i>Spirodela</i>	2種	中日性	160 Mb	
<i>Landoltia</i>	1種	長日?	380 Mb	
<i>Lemna</i>	13種	長日と短日	320-780 Mb	
<i>Wolffiella</i>	11種	情報乏しい	620-970 Mb	
<i>Wolffia</i>	10種	長日と短日	360-1880 Mb	

2. 研究の目的

日長応答の分子機構の理解が最も進んでいる長日植物がシロイヌナズナ、短日植物がイネと系統的に大きく離れており比較が困難であるため、日長応答の多様化プロセスを分子レベルで理解することは非常に困難である。本研究では長日・短日の両方を内包するアオウキクサ属(*Lemna*属)を材料に、系統の近い2種の比較から長日・短日の分化機構を解明する。

3. 研究の方法

野外調査

日本全国からアオウキクサ系統を収集し、花成多様性を把握し、その分子機構を明らかとする。また、水田での定期調査により、アオウキクサの開花フェノロジーを詳細に把握する。

比較トランスクリプトーム

アオウキクサとイボウキクサについて、長日・短日条件において1日間2時間ごとにサンプリングし RNA-seq 法により全遺伝子の発現を取得する。すでにアオウキクサを用いて RNA-seq を行っており、花成が誘導される短日条件では花成関連遺伝子のホモログが夜間に発現が上昇することを明らかとしている。これらの遺伝子ホモログの発現パターンをイボウキクサや異なる培養条件で調べ、比較解析を行う。

比較ゲノム

アオウキクサとイボウキクサについて、ゲノム配列をシntenニー解析し、類似するゲノム領域を補足する。公開されている多種のゲノム情報も加味し、進化上でのゲノム変化を推察する。

QTL-seq

掛け合わせを行い、F2 展開した個体の日長応答性について表現型を解析し、イボウキクサ日長応答、アオウキクサ一年草化、誘導日長の変化に関わる SNP を検出し、日長応答の多様化、ひいては種分化を駆動するゲノム領域を決定する。

4. 研究成果

野外調査

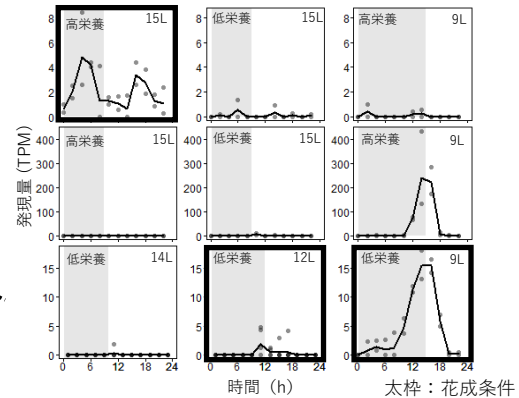
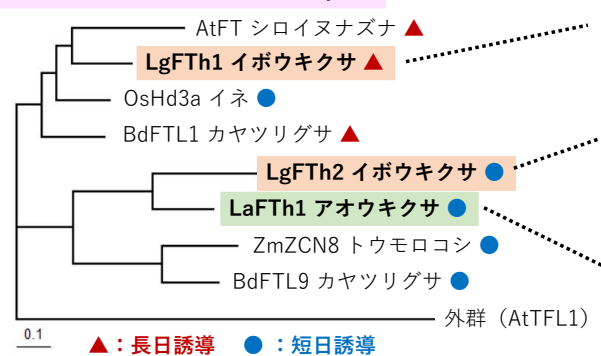
鹿児島県内において、湛水時期の異なる、早生品種のコシヒカリ水田、晩稲品種のヒノヒカリ水田に調査区を設定し週1回の頻度でアオウキクサの開花状況を調査した。その結果、コシヒカリ水田では、5月から稲が刈り取られる8月まで開花を続ける個体群が大多数であった。この個体群から単離した系統は、室内では短日性を示し、長日条件で開花しなかったため、野外で機能する未知の開花誘導経路があると考えられた。一方で、ヒノヒカリ水田では、開花せずに水路で越冬する個体群が多数派であった。こちらの系統は室内でも開花せず、南西型と考えられる。

北陸型を探索するために新潟で採集した系統を解析した結果、ゲノムサイズが半分程度の2倍体と思われる系統が発見された。この系統は枕水越冬を示さなかったため、報告されていた北陸型とは異なると考えられる。

比較トランスクリプトーム

短日植物であるアオウキクサについて、日長を15時間、12時間、9時間として2時間おきの日周トランスクリプトーム解析を行った。その結果、短日誘導性の *FT* 遺伝子ホモログを見出し、*LaFTh1* とした。*LaFTh1* は夜明け前に発現が誘導され、発現時刻の多様性が限界日長の多様性と関連することが示唆された。(Muranaka et al., 2022 *iScience*) 長日植物であるイボウキクサのトランスクリプトーム解析からは長日誘導性の *LgFTh1* を見出した。またアオウキクサの *LaFTh1* のオーソログとみられる短日誘導性の *LgFTh2* を見出した。*LgFTh2* は短日で誘導されるものの、花成誘導能力を持たないと推定される。中日性のイボウキクサでは *LgFTh2* が花成誘導能力を持つという作業仮説を立て、検証をすすめている。イボウキクサの長日性系統における長日条件での花成は高栄養状態(リン酸が3mM以上)でのみ誘導されたが、両日性系統の短日条件での花成は低栄養状態でも誘導された。このことから、長日誘導の花成は栄養条件での制御を受け、短日誘導の花成は栄養条件での制御を受けないと考えられ、異なる *FT* ホモログによる経路とする作業仮説と矛盾しない。これらの結果から、光周性逆転の分子機構について *FT* 遺伝子において長日誘導型と短日誘導型の2種類のホモログの使い分けと短日誘導性 *FT* の変異から理解できる見通しがたつた。

アミノ酸全長による系統樹 PhyML



比較ゲノム

イボウキクサのゲノムは別グループから染色体レベルのアセンブリが公開されたため、本研究で用いている G3 系統および、それを純系化した p8L 系統(長日性)と p7N 系統(中日性)のリシーケンスを行った。また、アオウキクサに関しては鹿児島県で開花フェノロジーが異なる3系統についてリシーケンスを行った。アオウキクサのドラフトゲノムをイボウキクサの全ゲノム配列と比較することで、染色体にアンカーできた。これまでに同定した *FT* ホモログに着目して比較ゲノム解析を進めている。

QTL-seq

イボウキクサ、アオウキクサの花は小さく、自家和合性を示すため、掛け合わせ実験がうまくいかなかった。イボウキクサに関しては、長日系統と中日系統の親系統があるため、その自家受粉種子の解析に切り替えた。しかしながら、開花誘導の効率が低いなどの問題があり、期間内に実施することはできなかった。

引用文献

T. Muranaka, S. Ito, H. Kudoh, T. Oyama (2022), Circadian-period variation underlies the local adaptation of photoperiodism in the short-day plant *Lemna aquinoctialis*, *iScience* 25(7), 104634

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 2件）

1. 著者名 Muranaka Tomoaki, Ito Shogo, Kudoh Hiroshi, Oyama Tokitaka	4. 巻 25
2. 論文標題 Circadian-period variation underlies the local adaptation of photoperiodism in the short-day plant <i>Lemna aequinoctialis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104634 ~ 104634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104634	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 Watanabe Emiri, Muranaka Tomoaki, Nakamura Shunji, Isoda Minako, Horikawa Yu, Aiso Tsuyoshi, Ito Shogo, Oyama Tokitaka	4. 巻 -
2. 論文標題 A non-cell-autonomous circadian rhythm of bioluminescence reporter activities in individual duckweed cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiad218	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 Yoshida Akiko, Taoka Ken-ichiro, Hosaka Aoi, Tanaka Keisuke, Kobayashi Hisato, Muranaka Tomoaki, Toyooka Kiminori, Oyama Tokitaka, Tsuji Hiroyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization of Frond and Flower Development and Identification of FT and FD Genes From Duckweed <i>Lemna aequinoctialis</i> Nd	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.697206	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 Taoka Ken ichiro, Kawahara Ikumi, Shinya Shoko, Harada Ken ichi, Yamashita Eiki, Shimatani Zenpei, Furuita Kyoko, Muranaka Tomoaki, Oyama Tokitaka, Terada Rie, Nakagawa Atsushi, Fujiwara Toshimichi, Tsuji Hiroyuki, Kojima Chojiro	4. 巻 112
2. 論文標題 Multifunctional chemical inhibitors of the florigen activation?complex discovered by structure based high throughput screening	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1337 ~ 1349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.16008	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 Watanabe Emiri, Isoda Minako, Muranaka Tomoaki, Ito Shogo, Oyama Tokitaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of uncoupled circadian rhythms in individual cells of Lemna minor using a dual-color bioluminescence monitoring system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab037	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13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 村中智明
2. 発表標題 ウキクサ植物：花成制御多様化の古くて新しいモデル
3. 学会等名 第70回日本生態学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村中智明, 伊藤照悟, 小山時隆
2. 発表標題 アオウキクサ属における 長日植物と短日植物の 比較トランスクリプトーム
3. 学会等名 第29回時間生物学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村中智明, 伊藤照悟, 工藤洋, 小山時隆
2. 発表標題 アオウキクサ属の長日・短日植物の比較トランスクリプトーム
3. 学会等名 第54回種生物学会シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村中智明, 伊藤照悟, 工藤洋, 小山時隆
2. 発表標題 短日性アオウキクサの花成限界日長が日本で多様化する理由とその分子機構
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoaki Muranaka, Hiroshi Kudoh, Tokitaka Oyama
2. 発表標題 Natural variation of the circadian period contributes to fine-tuning of photoperiodic flowering
3. 学会等名 85th Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Quantitative Biology Biological Time Keeping (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村中智明, 伊藤照悟, 工藤洋, 小山時隆
2. 発表標題 局所適応におけるクロノタイプ効果: アオウキクサの開花期多様化からの検証
3. 学会等名 日本進化学会第23回東京大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村中智明, 伊藤照悟, 工藤洋, 小山時隆
2. 発表標題 局所適応におけるクロノタイプ効果: 短日性アオウキクサの限界日長多様化からの検証
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村中智明
2. 発表標題 早稲・晩稲水田におけるアオウキクサ開花フェノロジー
3. 学会等名 第53回種生物学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村中智明, 工藤洋, 伊藤照悟, 小山時隆
2. 発表標題 クロノタイプ効果による適応形質の多様化: 短日植物における限界日長の局所適応
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村中智明
2. 発表標題 3つの日長条件における短日性ウキクサの日周トランスクリプトーム
3. 学会等名 第63回植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村中智明 小山時隆
2. 発表標題 Monitoring cellular circadian rhythms in an intact plant
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村中智明、本庄三恵、川越哲博、永野惇、工藤洋
2. 発表標題 冷たい世界で時を刻むものは何か
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村中智明、工藤洋、小山時隆
2. 発表標題 日本産アオウキクサの集団内・集団間における形質相関
3. 学会等名 第52回種生物学シンポジウム
4. 発表年 2020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