

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780031

研究課題名(和文)キクの概日リズムが支配する花成・休眠の分子基盤の解明

研究課題名(英文)The molecular basis of flowering and dormancy governed by circadian clock in chrysanthemum

研究代表者

小田 篤(Atsushi, Oda)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所花き研究領域・主任研究員

研究者番号：00375437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：短日植物のキクタニギクから概日リズム関連因子としてCsLHYとCsGIを単離し、解析した。CsLHYにリプレッションドメインのSRDXを付加して過剰発現する形質転換体は日長に関わらず花成が起こる中性植物の性質を示した。一方、CsGIを過剰発現する形質転換体は野生型と比較して限界日長が短縮していた。両形質転換体では概日リズム遺伝子の発現の大きな変化は見られなかったが、フロリゲンをコードするCsFTL3とアンチフロリゲンをコードするCsAFTの発現に影響が見られた。以上のことから、CsLHYとCsGIがCsFTL3とCsAFTの発現制御に関わることでキクの光周性花成を制御していることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：CsLHY and CsGI genes were isolated and analyzed in chrysanthemum, a short-day plant. CsLHY was fused to a gene encoding short transcriptional repressor domain (SRDX) and overexpressed in chrysanthemum. CsLHY-SRDX-ox flowered under long day condition. The critical day length was shortened in CsGI-ox. The changes of circadian clock genes expression were not observed in CsLHY-SRDX-ox and CsGI-ox. CsFTL3 and CsAFT encode florigen and antiflorigen, respectively. The expression level of CsFTL3 and CsAFT were affected in CsLHY-SRDX-ox and CsGI-ox. Here I revealed the possible involvement of CsLHY and CsGI in the photoperiodic flowering through the regulation of CsFTL3 and CsAFT in chrysanthemum.

研究分野：花き園芸

キーワード：キク 短日植物 概日リズム 花成

1. 研究開始当初の背景

概日リズムは生物が持つ約 24 時間周期の体内リズムである。植物において、概日リズムは花成ホルモン（フロリゲン）をコードする *FT/Hd3a* の発現を制御している事が知られていた。キクは我が国で最も多く生産されている花きであり、短日植物である性質を利用して開花を制御し計画生産が行われているが、光周性花成の分子基盤は詳細に明らかにされていなかった。研究開始当初までに私はキクにおける花成誘導に花成ホルモンをコードする *CsFTL3* が本質的な役割を果たしていることを明らかにしていた。一方で、概日リズムによる *CsFTL3* の発現制御機構については明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

キクはイネと同じ短日植物に分類されるが、絶対的短日植物の性質を持つ点と遺伝子配列情報の比較から、キク特有の概日リズムが支配する花成ホルモンの生産制御機構が存在する可能性があると考えられた。そこで、本研究ではキクにおいて概日リズム関連遺伝子の形質転換体を作成し、表現型の調査、花成関連遺伝子群の発現解析によって、概日リズムによる花成制御機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

モデル植物において概日リズムの中心振動体を構成する *LHY/CCA1* および、下流の遺伝子発現の制御に関わる *GI* と相同性を示す遺伝子をキクタニギク発現遺伝子配列情報から抽出し、全長配列のクローニングを行った。これら遺伝子の全長を過剰発現するコンストラクトを作成し、形質転換体を得た。得られた形質転換体の各種日長条件下における花成反応と花成関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法によって解析した。

4. 研究成果

(1) *CsLHY* の全長の C 末側に Strong transcription repression domain (SRDX) を付加し過剰発現する形質転換体を作成した。*CsLHY-SRDX* 過剰発現体は短日条件下において野生型より遅咲き、長日条件下においては野生型に比べて早咲きとなった(図1)。すなわち、キクは本来短日植物であるが、*CsLHY-SRDX* 過剰発現体は中性植物の形質を示した。キクにおいてフロリゲンをコードする *CsFTL3* の発現は短日条件下において、野生型に比べて *CsLHY-SRDX* 過剰発現体で低下していた(図2)。また、アンチフロリゲンをコードする *CsAFT* の発現は長日条件下において *CsLHY-SRDX* 過剰発現体で低下していた(図2)。

一方で、恒明条件下における概日リズム関連遺伝子 *CsTOC1*、*CsGI* および、*CsCAB2* の発現のリズムと振幅は *CsLHY-SRDX* 過剰発現体において部分的に維持されていた。このことから、*CsLHY-SRDX* 過剰発現体では概日リズムが

完全に破壊されていないが、*CsFTL3* と *CsAFT* の発現が抑制されることによって花成反応が変化したと考えられた。

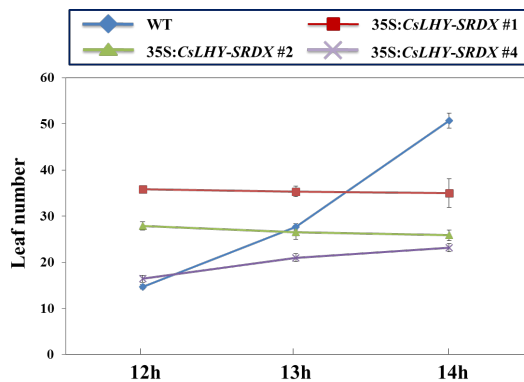


図1 野生型および *CsLHY-SRDX* 過剰発現体の異なる日長条件下における花芽分化節位

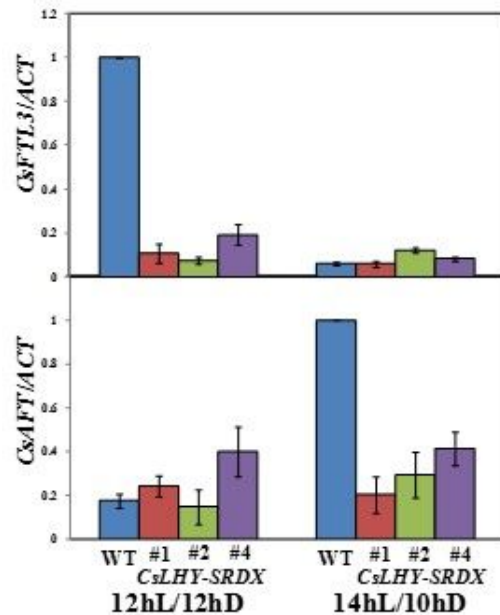


図2 野生型および *CsLHY-SRDX* 過剰発現体の異なる日長条件下の葉における *CsFTL3* および、*CsAFT* の発現

(2) *CsGI* の過剰発現体の表現型の解析を行った。研究に用いているキクタニギクは約 12 時間の限界日長をもつ短日植物であるが、*CsGI* 過剰発現体は限界日長が約 10 時間に短縮していた(図3)。野生型が開花し、*CsGI* 過剰発現体が栄養成長を続ける 12 時間日長条件下において *CsGI* 過剰発現体における *CsLHY* と *CsTOC1* の発現に変化は見られなかったが、*CsFTL3* の発現はやや低く、*CsAFT* の発現は顕著に高かった(図4)。

8 時間明期、16 時間明期の短日条件下で栽培

した野生型において、暗期開始後 10 時間後の暗期中断は花成を抑制するが、暗期開始後 12 時間後以降の暗期中断は効果がない(図 5)。一方で *CsGI* 過剰発現体では、暗期開始後 10 時間後から 14 時間後の暗期中断が花成を抑制した(図 5)。野生型では暗期開始後 8 時間後と、10 時間後に赤色光を与えることによって葉における *CsAFT* の発現が誘導されるが、*CsGI* 過剰発現体では暗期開始後、8 時間後から 14 時間後にかけて赤色光を与えることによって葉における *CsAFT* の発現が誘導された(図 6)。以上のことから、*CsGI* 過剰発現体においては *CsAFT* の発現を誘導する門(ゲート)が野生型に比較して暗期の後半にも開くことによって暗期後半の暗期中断が花成を遅延させていることが考えられた。

一方で、明暗周期下と恒明条件における概日リズム関連遺伝子 *CsLHY*、*CsTOC1* および、*CsCAB2* の発現のリズムと振幅は *CsGI* 過剰発現体において維持されていた。以上のことから、キクタニギクにおいて *CsGI* が概日リズムの変化を介さずに *CsFTL3* と *CsAFT* の発現を制御し、限界日長の決定に関わっている可能性があると考えられる。

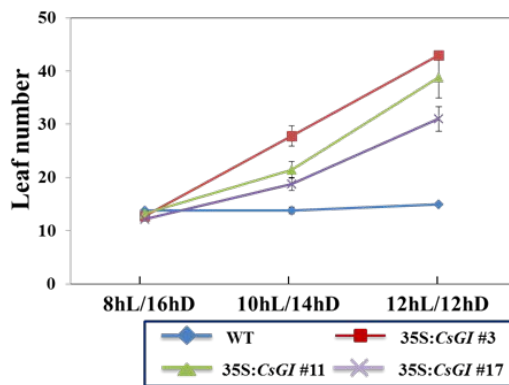


図 3 野生型および *CsGI* 過剰発現体の異なる日長条件下における花芽分化節位

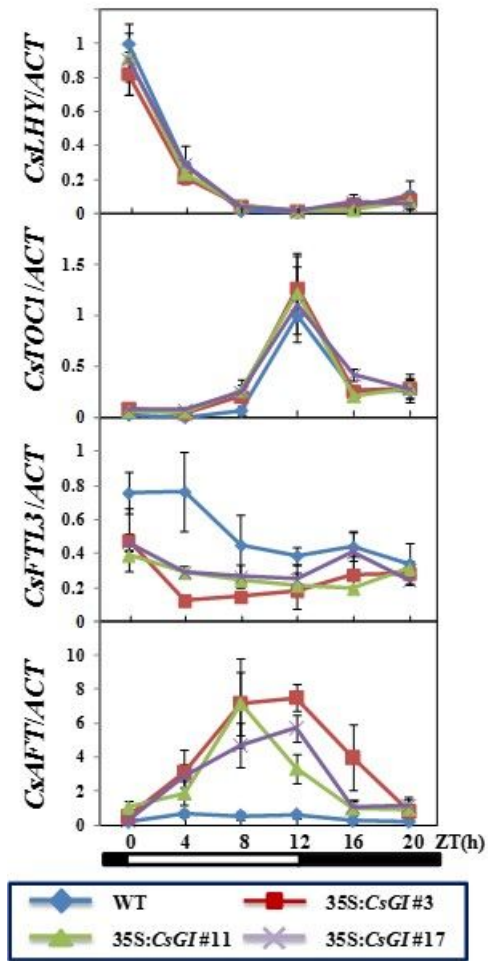


図 4 野生型および *CsGI* 過剰発現体の 12 時間の日長条件下の葉における *CsGI*、*CsTOC1*、*CsFTL3* および *CsAFT* の発現

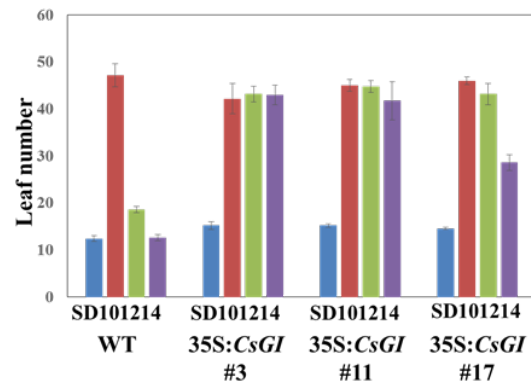


図 5 暗期中断の時間帯が与える野生型および *CsGI* 過剰発現体の花芽分化節位

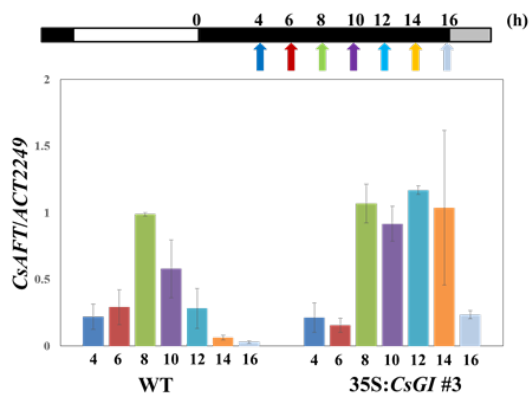


図6 野生型および *CsGI* 過剰発現体における異なる時間帯の赤色光照射が与える *CsAFT* の発現誘導効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

小田篤 (2014) 花成ホルモンと花成抑制ホルモンが決定するキクの花成 植物の生長調節 49:34-40
<http://www.jscrp.jp/book/49-01.html>
 査読あり

Yohei Higuchi, Takako Narumi, Atsushi Oda, Yoshihiro Nakano, Katsuhiko Sumitomo, Seiichi Fukai, Tamotsu Hisamatsu (2013) The gated induction system of a systemic floral inhibitor, antiflorigen, determines obligate short-day flowering in chrysanthemums. PNAS 110: 17137-17142
 doi:10.1073/pnas.1307617110 査読あり

〔学会発表〕(計 4件)

小田篤、樋口洋平、久松完 キクタニギク *CsGI* 過剰発現体の花成抑制形質の解析 園芸学会平成 25 年度春季大会 2014 年 3 月 30 日 つくば

樋口洋平、鳴海貴子、小田篤、中野善公、住友克彦、深井誠一、久松完 キクの開花調節の鍵因子 - アンチフロリゲン - 園芸学会平成 25 年度秋季大会 2013 年 9 月 21 日 盛岡

小田篤、樋口洋平、久松完 *CsLHY* キメラリプレッサーの導入により花成における日長反応性の低下したキク形質転換体の解析 日本植物生理学会 2013 年 3 月 23 日 岡山

樋口洋平、住友克彦、小田篤、久松完 キク花成の光中断におけるフィトクロム B 遺伝子機能解析 日本植物生理学会 2013 年 3 月 21 日 岡山

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naro.affrc.go.jp/flower/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 篤 (ODA ATSUSHI)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所・花き研究領域・主任
 研究員

研究者番号：00375437