

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	東 孝信
学位授与の日付	平成29年3月31日	
論文名	作物の概日時計システム特性とその制御が生育に与える影響	
論文審査委員	主査	青木 考
	副査	小泉 望
	副査	横井 修司
	副査	福田 弘和（工学研究科）

論文要旨

序章

概日時計は地球上のほとんど全ての生物が持つシステムであり、マウスやショウジョウバエ、シアノバクテリア、シロイヌナズナなど様々な生物種を対象に研究が行われている。概日時計は概念的に入力系・中心振動体・出力系の3つの構成要素から成り立っており、**CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1)**や**LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL)**、**TOC1 (TIMING OF CAB EXPRESSION 1)**は時計遺伝子と呼ばれ、中心振動体の構成遺伝子として機能し概日リズムを生み出している。

植物の概日時計の研究はモデル植物シロイヌナズナを用いて発展してきた。これに加えて、近年では作物の概日時計研究が盛んになってきている。これは、概日時計は植物の生長を調節することが知られており、概日時計制御が作物の生産の調節に貢献すると考えられるからである。しかし、概日時計制御を行うためには、これまで遺伝子組換え体を用いられてきており、このことは作物生産への応用を目指すうえでの障壁となっている。

遺伝子組換え体を用いずに概日時計を制御する手段として、外環境、特に光刺激による制御が有効であると考えられる。光刺激による概日時計制御を行うためには、作物固有の概日時計特性を明らかにする必要がある。さらに、生産調節のため

には、概日時計と作物生長の関係を明らかにする必要がある。しかしながら、作物における概日時計と生長との相互関係はこれまで全く探索されていない。

そこで本研究では、まず作物の概日リズム特性を明らかにするために、レタスとトマトにおいて周期変動する遺伝子の検出を行なった。また、これらの遺伝子に注目して、生長が抑制されるような条件での概日時計の応答、ならびに概日時計を擾乱させた場合の生長の変化について、概日時計と生長の双方向から解析することで、作物の概日時計と生長の関係を明らかにしようと試みた。

第1章 レタスにおける概日リズムの基本特性

概日時計によって生み出される概日リズムは、3つの基本特性を持つことが知られている。第1には、外部刺激のない条件下においても自律的な振動が継続する、リズムの自由継続。第2には、光や温度などの外部刺激に応答し自身のリズムを外部刺激に適合させる、リズムの同調。第3には、周囲の温度に依存せず概日リズムの周期がおおよそ一定となる、リズムの温度補償である。本章では、***AtCCA1::Luciferase*** レポーター遺伝子を導入した遺伝子組換えレタスを用いて、レタスにおける概日リズムの基本特性について解析を行った。

異なるレタス3品種について、3つの基本特性を全て確認できた。レタスの概日リズムの固有周期は品種によって最大2時間ほどの違いが生じ、シロイヌナズナとも異なることが示された。また、赤色光連続明期条件中に微弱な青色正弦波による光刺激を与えることで概日リズムの光刺激への同調を引き起こすことができることが示されたが、その同調能力には品種間差が存在していた。

第2章 レタスの周期変動遺伝子群の検出とその機能推定

概日時計は複数の遺伝子が互いにフィードバックループを形成することで周期的な遺伝子発現を実現しており、概日時計のシステム特性を理解するためには複数の周期変動する遺伝子群に着目する必要がある。本章では、概日時計の影響を受ける周期変動遺伝子群の検出およびその機能推定を目的とし、レタスを用いて2時間おきの時系列トランスクリプトームデータを取得した。概日リズムの基本特性である“自由継続”と“同調”を持つ遺伝子群を検出するために、連続明期条件(LL条件)および明暗周期条件(LD条件)それぞれで時系列データを取得した。

LL条件では1255遺伝子が、LD条件では423遺伝子がそれぞれの条件で周期変動を示していたが、どちらの条件でも周期変動する遺伝子群として215遺伝子が検出された。検出された215遺伝子の中には時計遺伝子である***CCA1***や***TOC1***、***LHY***と高い相同性を持つものも含まれており、これらはシロイヌナズナと非常に似た発現パターンを示していた。215遺伝子には、光刺激やストレスへの応答、光合成に関わる遺伝子が多く含まれていた。本章で検出された、概日リズムの基本特性の中で“自由継続”と“同調”という特性を有する215遺伝子は、レタスの概日時計の外部刺激への応答、ひいてはレタスの生長を調節するための分子マーカーとして活用できると期待された。

第3章 野外トマトにおける概日時計の安定性

植物の概日時計は、環境変動に対し概日リズムの振幅や周期、位相を調節することで環境への適応を図っていると考えられている。閉鎖環境と比較して施設園芸が行われる環境では、植物の受け取る刺激がより多様なものとなる。そこで本章では、施設園芸の代表的な作物であるトマトを対象とし、2時間おきの時系列トランスクリプトームデータを用いて施設内で栽培されたトマトの概日時計の安定性について定量的に評価した。

降雨によって相対湿度や照度が大きく変動した環境でも、1132 遺伝子が周期発現を示した。また、周期変動する遺伝子の 1 日目と 2 日目の発現量の決定係数 R^2 はどの時刻においても高い値 (> 0.65) が示され、1 日目と 2 日目の発現量に高い相関があった。すなわち、相対湿度や照度が大きく変動しても、概日時計の中心振動体を構成する遺伝子は周期的な発現を維持しており、概日時計の頑健性が示唆された。

第4章 生長が抑制される条件で栽培されたトマトにおける遺伝子発現の周期性

本章では、生長が抑制されるような条件での概日時計の応答を明らかにするために、病害を受けたトマトから 2 時間おきの時系列トランスクリプトームデータを取得し、非病害トマトと比較して周期変動する遺伝子群にどのような違いが生じたか明らかにした。

病害のために生長が抑制されるような条件で栽培されたトマトでも非病害トマトと同様に *SILHY* や *SITOC1* といった中心振動体を構成する遺伝子は周期的な発現を維持していることを明らかにした。一方で、病害トマトにおいては、非病害トマトと比較して周期変動する遺伝子の数が減少する、あるいは抗酸化活性に関わる一部の遺伝子が病害トマトにおいてのみ周期的な振る舞いを示すなどの変化が見られた。これらの結果から、概日時計の中心振動体を構成する遺伝子は比較的頑健な周期的発現パターンを示すのに対して、出力系に関わる遺伝子では病害の影響を受けやすいことが示唆された。

第5章 短い暗期刺激がレタスの周期変動遺伝子群と生育に与える影響

本章では、作物の概日時計を擾乱させた場合に生長はどのような影響を受けるのかを明らかにするため、短い暗期刺激によってレタスの概日時計が擾乱するような条件を設定し、周期変動する遺伝子の応答および生長について解析を行なった。

概日時計が擾乱するような環境として、レタスの概日リズムが外環境に同調できない条件を設定した。レタスの概日リズムが外環境に同調できる/できないという条件の設定には短い暗期刺激による制御を採用し、暗期刺激条件の決定には先行研究で報告されている位相応答曲線を用いた。

短い暗期刺激に同調できる条件では、第2章で報告した周期変動する 215 遺伝子の発現量は、周期性が擾乱されない LL 条件と同様に安定的であったのに対して、短い暗期刺激に同調できない条件では、周期変動する 215 遺伝子の発現量がばらつき、周期性が擾乱されていた。レタスの生長を見ると、同調できる条件と比較して同調できない条件で栽培された個体群では、生重量が 1%水準で有意に低下し、生

育のばらつきも大きくなる結果が得られた。また、生重量の低下は栽培期間の総光量に比例しないことも明らかとなった。この結果は、人為的な概日リズムの擾乱が、生重量の低下と生育のばらつきをもたらしたことを示唆している。

また、概日時計の擾乱がストレスとして作用しているかどうか定量的に評価するために、レタス内の過酸化水素量を測定した。その結果、過酸化水素の過剰な蓄積は確認されず、概日リズムの擾乱がレタス体内の過酸化水素量の過剰な蓄積に寄与していないことが示唆された。

総括

レタスとトマトにおいて周期変動する遺伝子群を検出し、概日時計システムの特性について明らかにした。病害により生長が抑制されるような条件では、出力系遺伝子の周期性は病害の影響を受けていたが、概日時計の中心振動体を構成する遺伝子は比較的頑健な発現パターンを示した。一方で、概日時計を人為的に擾乱させると、出力系遺伝子だけでなく中心振動体を構成する遺伝子の周期性も乱され、生重量の低下やばらつきの増大が引き起こされた。また、光刺激による概日時計の中心振動体制御の方法として、赤色光連続照射下での青色正弦波による光刺激および短い暗期刺激が有効であることが示された。これらの結果から、作物の概日時計制御は生産を調節するための手段として期待される。

審査結果の要旨

概日時計は地球上のほとんど全ての生物が持つ生物システムであり、様々な生物を対象に研究が行われている。概日時計は普遍的に入力系・振動体・出力系の3つの構成要素から成り立っている。植物においては *CCA1*, *LHY*, *TOC1*, *PRRs* が時計遺伝子と呼ばれ概日リズムを生み出している。遺伝子発現や気孔の開閉、葉の上下運動や花成、ひいては生長量等、植物における様々な生理現象が概日時計により調節されることが知られている。一方で植物種によって概日時計システム特性が異なることも示唆されており、植物の概日時計と作物生産性との関連を明らかにするためには、それぞれの作物種の概日時計の特性を明確にする必要がある。本研究では、作物の概日時計特性を明らかにするために、レタスとトマトにおいて周期変動性を示す遺伝子群の同定を行なった。これらの遺伝子群の発現周期性に基づいて、生育が擾乱を受けた時の概日時計の応答、ならびに概日リズムを擾乱させた時の生育量の変化を解析し、概日時計と生産性の関連を明確にする研究を実施した。

第1章では、生物の概日時計に見られる3つの基本特性、すなわちリズムの自由継続、リズムの同調、リズムの温度補償という特性が、食用作物であるレタスの概日時計にも保存されていることを明らかにした。一方、閉鎖系で生育されたレタス

の3つの品種間において、概日リズムの固有周期に違いがあること、青色や赤色の比といった光質にも周期長が依存すること、外環境への同調能力にも品種間差があることも明らかにした。

第2章では、リーフレタスを用いた2時間おきの時系列トランスクリプトームデータを解析することで、レタスの周期変動遺伝子群の検出を実施した。215 遺伝子を周期変動遺伝子群として決定し、以後の研究の基盤とした。

第3章では、閉鎖系で生育されたレタスに対して、温室で太陽光を用いて生育されたトマトで2時間おきの時系列トランスクリプトーム解析を実施した。比較的環境変動の大きい条件で生育されたトマトにおいても1,132 遺伝子が周期変動を示し、環境変動の大きい条件でも概日時計は安定した周期的発現を実現していることが示唆された。

第4章と第5章では、概日時計と作物の生育の相関に関する解析を実施した。第4章では病害により正常な生育が擾乱されたトマトから2時間おきの時系列トランスクリプトームデータを取得し、健康なトマトと比較して周期変動する遺伝子群にどのような違いが生じたか明らかにした。時計遺伝子である *TOC1* や *LHY* の周期的な発現は頑健性を保っていたが、病害トマトでは概日時計制御を受ける遺伝子群から周期性が消失していること、および病害応答遺伝子群に新たに周期性が現れることが明らかとなった。

第5章では、概日時計を人工的に擾乱させた植物の生育にみられる変化を解析した。概日リズムの人工的な制御法として、短い暗期刺激を用い、外環境リズムへ同期できる条件と同期できない条件を設定した。外環境のリズムに同期できる条件では、第2章で報告した215 遺伝子の周期変動発現パターンは安定であった。一方、外環境のリズムに同期できない条件では、215 遺伝子の発現パターンがばらつき周期性を維持できないことが示された。レタスの生重量をみると、同期できる条件に比べて同期できない条件で栽培された個体群では、生重量が有意に低下し、生育のばらつきも大きくなった。この現象の原因として、暗期刺激がストレスとして働くのではないかと考えた。ストレスを受けた状態のマーカーとして活性酸素種の1種である過酸化水素の発生を定量したが、被ストレス状態を示す発生量増大はなかった。周期性が乱れた遺伝子群には光合成関連のものが多く含まれることから、暗期刺激が何らかのやり方で光合成遺伝子群の周期性を乱し、光合成能の低下が生育不良につながると示唆された。

本研究ではレタスやトマトといった作物の概日時計特性を明らかにし、概日時計機能と作物生育との相関を明らかにした。特に植物概日時計を人工的に擾乱させる手法を新たに体系化し、それが作物の個々の個体の生育のみならず生育の集団的分布に大きな影響を与えることを明示した点は、植物生理学、植物環境工学的な観点から新規性の高い成果として評価できる。本研究で用いられた人工的概日時計制御手法は、より生産現場に近い条件での応用へ発展させることも期待される。したがって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。