

アサガオの開花時刻制御遺伝子の探索と機能解析

高井 大樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小野 道之 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

植物の中には一日のうち一定の時刻に開花する種が多数知られている。この開花時刻の決定には植物自身の遺伝的要因のほか、光周期や温度といった環境要因、植物の成長や加齢といった内的要因が複雑に絡んでいると考えられている。

植物が繁殖のために行う開花という現象は農業においては収量に直結する問題である。実際、イネ科植物においては熱ストレスを受けて花粉管や葯の発達阻害が発生し不稔となる障害が知られており(Callens, *et al.* 2023), 開花時刻をずらすことで高温障害を回避する研究が行われているが、開花の詳細なメカニズムは殆ど解明されていない。

本研究の材料であるアサガオ *Ipomoea nil* は、日本産のモデル系統においては光シグナルを受けて暗期の開始後 10-12 時間後、朝方に開花するという暗期の開始に依存的な開花を示し、この開花時刻制御は約 24 時間周期の概日リズムの影響を受けていることが知られている。また、小野研究室は開花時刻に関する変異体系統である Evening Blue (EB) を保有しており、EB は Violet や TKS といった日本産系統と異なり、明期の開始 12 時間前後、つまり夕方から夜に開花するという明期の開始に依存的な開花を示すことが先行研究で明らかになっている。

EB と Violet を用いて先行研究で行われた QTL (Quantitative Trait Locus) 解析により、アサガオの開花時刻を決定する QTL は第 3, 4 染色体にあることが判明しており、詳細な解析により得た開花時刻決定遺伝子の候補は *EVF1* (evening-flower 1) と命名されている。

本研究では、この *EVF1* をゲノム編集技術によりノックアウトし、その後 Violet と EB の *EVF1* をそれぞれ導入することで、*EVF1* の開花時刻制御における機能を解析する。

また、イネにおいて開花時刻を制御する遺伝子として近年同定された *DFOT1* (diurnal flower-opening time 1, Wang, *et al.* 2022) のホモログをアサガオにおいて探索し、先行研究で同定された QTL との関連を調査した。

【材料と方法】

(1) *EVF1* のノックアウト

EVF1 のノックアウトには CRISPR-Cas9 を用いた。先行研究で設計された gRNA では large deletion が期待できないこと、ベクター作成に難航したことから、オンラインツール CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いて gRNA を再設計し、TaKaRa DNA Ligation Kit <Mighty Mix> を用いてエントリーベクターにクローニングした。これらと *ZsGreen* を導入したエントリーベクターを用いて Overlap-Extension PCR により gRNA 発現カセットの全長フラグメントを作成し、Invitrogen™ LR Clonase™ II Plus enzyme mix を用いて LR 反応を実行しデスティネーションベクターにクローニングした。このノックアウトベクターは *Cas9*, 3 つの gRNA 発現カセット, 選択マーカー

として緑色蛍光タンパク質の一種である *ZsGreen* とカナマイシン耐性遺伝子 *NPTII* を含む。

(2) 組換え *EVF1* の導入

先行研究で作成された組換え *EVF1* 導入ベクターを用いて、アグロバクテリウム法を用いて Violet の EC (Embryogenic cell) を形質転換し、選択培養を行った。

(3) QTL-seq に向けた育成

先行研究で得られた第 4 染色体の QTL は極めて広く、この原因として内部に動原体を含み組換えが抑制された可能性がある。

より詳細な解析のために EB とメキシコ原産の系統である Mexico 及びギニア原産の Africa を用いた QTL-seq を行うことにし、解析に向けて交配を行った。

(4) *DFOT1* ホモログの探索

NCBI BLAST アルゴリズム及びアサガオのゲノムデータベースである Asagao genome project (<http://viewer.shigen.info/asagao/>), タンパク質立体構造予測を行う AlphaFold2 簡易版 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>) を用いて *DFOT1* の相同遺伝子を探索した。

【結果・考察】

詳細は発表会にて報告する。

【展望】

形質転換体の育成を継続し、*evf1* ノルセグリガントを得た後に、交配により組換え *EVF1* を導入し、開花時刻を計測する。

また、*DFOT1* ホモログのノックアウトを行い開花時刻を計測して機能解析を試みる。

以上のような実験から、植物に普遍的にみられる開花制御のメカニズムの解明を目指す。

【参考文献】

- Callens C, Fernandez-Gómez J, Tucker MR, Zhang D, Wilson ZA. Heat stress responses vary during floret development in European spring barley cultivars. *Front Plant Sci.* 2023;13:918730. doi:10.3389/fpls.2022.918730
- Wang M, Zhu X, Peng G, et al. Methylesterification of cell-wall pectin controls the diurnal flower-opening times in rice. *Mol Plant.* 2022;15(6):956-972. doi:10.1016/j.molp.2022.04.004

【謝辞】

本研究に際し、系統 Evening Blue を提供して頂いた故 米田芳秋先生 (静岡大学名誉教授) に感謝と哀悼の意を表すると共に、中村信雄先生 (函館白百合学園中学高等学校), 情報提供を頂いた遠藤真咲先生 (農研機構), 土屋亨先生 (三重大学准教授) に厚く御礼申し上げます。