

博士論文

シロイヌナズナにおける春化と脱春化の分子機構の解明

丸岡 孝資

奈良先端科学技術大学院大学

先端科学技術研究科

バイオサイエンスプログラム

主指導教員：伊藤 寿朗 教授

花発生分子遺伝学研究室（バイオサイエンス領域）

令和 4 年 3 月 9 日提出

目次

第1章 春化におけるヒストン脱メチル化酵素 JUMONJI 30/32 の働き

要旨	4
1. 序論	6
1-1. シロイヌナズナの花成促進経路	6
1-2. <i>FRIGIDA</i> は <i>FLOWERING LOCUS C</i> の発現を促進し、花成への春化要求性を高める	7
1-3. ヒストン修飾を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御	8
1-4. <i>FRIGIDA</i> super-complex はエピジェネティックに <i>FLC</i> の発現を促進する	8
1-5. 春化の過程で、複数の温度感受性タンパク質がエピジェネティックな制御因子と相互作用することで <i>FLC</i> が発現抑制される	10
1-6. 春化へのヒストン脱メチル化酵素の関与は十分に解析されていない	14
1-7. 低温馴化と春化の関係性は不明である	16
1-8. 本研究の目的	17
2. 材料と方法	18
2-1. 植物材料	18
2-2. 寒天培地での生育条件	18
2-3. 土の上での生育条件	18
2-4. シロイヌナズナのジェノタイピング	18
2-5. シロイヌナズナの交配	19
2-6. RNA 抽出・qRT-PCR	19
2-7. クロマチン免疫染色 (ChIP アッセイ)	19
3. 結果	23
3-1. <i>jumonji 30 jumonji 32</i> 二重変異体は、野生型よりも春化が起こりやすい	23
3-2. <i>JMJ30</i> と <i>JMJ32</i> は <i>FLC</i> 座において H3K27me3 の蓄積量が増加するタイミングを遅らせ、春化に対して抑制的に働く	25
3-3. 春化の初期段階で <i>JMJ30</i> は <i>FLC</i> に先立って発現抑制される	28
3-4. <i>c-repeat binding factor</i> 変異体の種子では低温処理による <i>JMJ30</i> の発現の抑制がおこらない	30
3-5. <i>late elongated hypocotyl/ circadian clock associated 1</i> 二重変異体の種子では低温処理による <i>JMJ30</i> の発現抑制がおこらない	32
3-6. 春化の過程で <i>JMJ30</i> 座における H3K27me3 の蓄積量は増加しない	35
3-7. CBF や LHY、CCA1 による <i>JMJ30</i> の発現制御には組織特異性がある	37

4. 考察	39
4-1. JMJ30/32 は <i>FLC</i> 座において H3K27me3 の蓄積量が増加するタイミングを遅らせることで、春化に対して抑制的に働く	39
4-2. 春化の初期段階で <i>JMJ30</i> の発現は著しく抑制され、ヒストン脱メチル化活性の低下をもたらす	39
4-3. <i>JMJ30</i> の温度応答性の制御機構	40
4-4. 春化における JMJ30 の寄与度	41

第2章 変異体スクリーニングによる脱春化応答に関わる因子の探索

1. 序論	43
1-1. 農業分野において、高温により脱春化を誘導できることが見出された	43
1-2. 脱春化の分子レベルでの解析は始まったばかりである	43
1-3. 脱春化と既知の経路との関係は不明である	45
1-4. 本研究の目的	46
2. 材料と方法	47
2-1. 植物材料	47
2-2. ルシフェラーゼアッセイ	47
2-3. 変異体ライブラリの作製	47
2-4. 変異体スクリーニングの方法	47
3. 結果	48
3-1. JMJ30 と JMJ32 は脱春化の鍵因子ではない	48
3-1. 6日の高温処理は <i>FLC</i> の発現回復を誘導するのに十分であるが、3日の処理は十分ではない	50
3-2. 変異体スクリーニングによる脱春化亢進変異体の単離	52
4. 考察	56
4-1. 脱春化の生理学的意義	56
4-2. 表現型から予想される#439の変異型タンパク質の機能	56
4-3. 予想される脱春化の分子機構	57
結論	60
謝辞	61
参考文献	62

先端科学技術研究科 博士論文要旨

所属研究室 (主指導教員)	花発生分子遺伝学研究室 (伊藤 寿朗 教授)		
学籍番号	1921038	提出	令和 3 年 12 月 7 日
氏名	丸岡 孝資		
題目	シロイヌナズナにおける春化と脱春化の分子機構の解明		
<p>植物は季節の移り変わりを感知し、適切な時期に花成を誘導する。花成とは植物が栄養成長相から生殖成長相へ相転換することである。モデル植物シロイヌナズナでは冬の長期の低温を経て春に花成が促進される。これを春化と呼ぶ。一方、冬の終わりに短期間の高温で処理すると、春化の効果が失われ、花成が遅延する。これを脱春化と呼ぶ。</p> <p>シロイヌナズナの春化と脱春化は花成抑制のマスター制御遺伝子 <i>FLOWERING LOCUS C (FLC)</i> 座のエピジェネティックな発現制御を介して起こる。春化が誘導されるときには、<i>FLC</i> 座において抑制的ヒストン修飾である ヒストン H3 のヒストンテールの 27 番目のリシン残基のトリメチル化修飾 (H3K27me3) の蓄積量が増加し、エピジェネティックに <i>FLC</i> の発現が抑制される。一方、脱春化が誘導される時には、<i>FLC</i> 座の H3K27me3 蓄積量が減少し、<i>FLC</i> の発現が上昇する。ヒストンメチル化酵素 Polycomb Repressive Complex2 (PRC2) は春化の過程で活性化され、<i>FLC</i> 座に H3K27me3 を導入する。しかし、春化の初期段階あるいは脱春化における H3K27me3 の制御についてはほとんどわかっていない。本研究は、ヒストン脱メチル化酵素 JUMONJI 30/32 に着目して春化と脱春化を解析することで、H3K27me3 の制御に関する新しい知見を得ることを目指した。</p> <p>まず <i>jmj30 jmj32</i> 二重変異体の春化応答を観察した。<i>jmj30 jmj32</i> では春化が起こりやすくなっていることを見出した。このとき <i>jmj30 jmj32</i> では、H3K27me3 の蓄積量が増加する時点、<i>FLC</i> の発現が抑制される時点が早まっていた。以上の結果から、JMJ30 と JMJ32 は <i>FLC</i> 座において H3K27me3 の蓄積量が増加するタイミングを遅らせることで、春化に対して抑制的に働くことが示唆された。</p> <p>次に、春化における JMJ30 と JMJ32 の働きを詳しく調べるために、春化の時系列に沿った遺伝子発現解析を行った。春化なし条件の遺伝子発現レベルと比較して、<i>FLC</i> の発現は 2 週間以上の低温処理により 10-20% に抑制されたのに対し、JMJ30 の発現は低温 3 日の処理により 20% に抑制された。さらに、低温 2 週で JMJ30 の発現は最も抑制されて 10% となり、低温 4 週でもほぼ同レベルで発現抑制状態が維持されていた。一方、JMJ32 の発現は春化の過程を通して、ほとんど変動しなかった。これらの結果から、春化の初期段階で JMJ30 は <i>FLC</i> に先立って著しく発現抑制されることが示された。また、内在性の JMJ30 発現量は JMJ32 よりも 10 倍以上高いことを合わせると、春化の初期段階における JMJ30 の発現抑制は植物体におけるヒストン脱メチル化活性の低下をもたらすことが示唆された。さらに、</p>			

JMJ30 の発現抑制に働く上流の転写因子の単離を試みた。低温で誘導され、JM30 のプロモーター領域への結合性が期待される転写因子をデータベースから探索したところ、C-REPEAT BINDING FACTORS (CBFs) と LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)、CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) が見出された。cbfs および lhy cca1 変異体の種子では低温による JM30 の発現抑制が十分に起こらなかったことから、春化の初期段階で CBFs および LHY、CCA1 は JM30 に直接結合して発現を抑制することが示唆された。その後、低温により PRC2 が活性化され、FLC 座における H3K27me3 の蓄積量が十分に増加することで、春化が誘導されると考えられる。

続けて、JM30/32 が脱春化に関与する可能性を検討した。しかし、春化処理した *jmj30* *jmj32* を高温で処理したところ、野生型と同様に FLC の発現が再び促進されて、花成が遅延し、脱春化が誘導された。つまり、JM30 と JM32 は脱春化の鍵因子ではないことが示唆された。そこで変異体スクリーニングを行い、脱春化において H3K27me3 の除去を行う因子を単離したいと考えた。

まず FLC の発現量を非侵襲および定量的に測定するために、ルシフェラーゼによるレポーターライン、FLC::LUC を作成した。高温処理の条件検討を行い、春化後の植物に対して 6 日間の高温処理で FLC の発現が促進されるが、3 日間の処理は FLC の発現を促進されないことを確認した。

次に、脱春化を制御する新規遺伝子を探索するためのスクリーニングを行なった。FLC::LUC に対してメタンサルホン酸エチル (EMS) で変異を誘発し、M2 の変異体ライブラリを作成し、3 日間の高温処理で FLC の発現が促進される脱春化亢進変異体を単離することにした。15173 系統の M2 個体をスクリーニングし、最終的に 1 系統の変異体を単離した。この変異体は春化応答に異常は見られず、脱春化応答のみが亢進されていた。変異体を親株である FLC::LUC と交配して得た F1 個体の表現型を観察することで変異の優劣性検定を行ったところ、脱春化亢進の変異が半優性であることが示唆された。今後、遺伝学的解析を進めることで、脱春化亢進の原因遺伝子を同定し、脱春化で働く FLC 座の H3K27me3 の除去機構を明らかにしたい。

本研究は、春化と脱春化におけるヒストン脱メチル化酵素 JM30 と JM32 の役割を明らかにしたもので、将来的には、人為的に春化と脱春化を誘導する技術の開発に繋がると期待される。

第1章 春化におけるヒストン脱メチル化酵素 JUMONJI30/32 の

働き

1. 序論

1-1. シロイヌナズナの花成促進経路

花成とは、植物が葉を形成する栄養成長相から、花を形成する生殖成長相へ相転換することである。花成は、植物が種子を作って次世代を残すことにつながるため、花成時期を適切に調節することは植物にとって極めて重要である。モデル植物シロイヌナズナは、外的環境あるいは内的なシグナルを感受し、花成を制御する分子機構を進化させてきた (Simpson & Dean, 2002)。そこには、光周性経路、春化経路、自律的促進経路、ジベレリン依存経路のほか、高温受容性経路や加齢経路など、独立した複数の経路が働いている (図1)。光周性経路は昼と夜の長さに対する応答、春化経路は冬の長期間の低温に対する応答である。各経路からのシグナルは統合され、FLOWERING LOCUS T (FT)、SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1)、APETALA 1 (AP1)、LEAFY (LFY)といった転写因子の発現が促進されることで、最終的に花成が引き起こされる (Mandel et al., 1992; Weigel et al., 1992; Kobayashi et al., 1999; Lee et al., 2000; He & Amashino, 2005)。

一方、これらの転写因子の上流では花成抑制遺伝子 *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*)が働いている。*FLC*はMADS-BOX型の転写因子をコードし、FT、SOC1の発現を抑制するマスター制御因子である (Michaels & Amasino, 1999; Lee et al., 2000)。*FLC*の発現はFRIGIDA (FRI)経路と高温受容性経路により促進され、自律的促進経路と春化経路により抑制される (Koornneef et al., 1998; Johanson et al., 2000; Gan et al., 2014)。

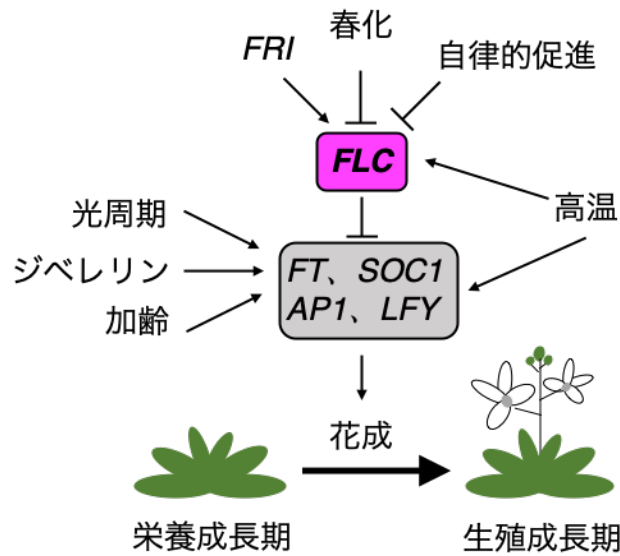


図 1. シロイヌナズナの花成促進経路

光周性経路、春化経路、自律的促進経路、ジベレリン依存経路のほか、高温受容性経路、加齢経路からのシグナルが統合され、最終的に *FT*、*SOC1*、*API*、*LFY* といった転写因子をコードする遺伝子の発現が誘導されて、花成が引き起こされる。その上流には、花成抑制のマスター制御遺伝子であり、自律的促進経路、春化依存経路、高温受容性経路からのシグナルを集約する *FLC* が機能している。

1-2. *FRIGIDA* は *FLOWERING LOCUS C* の発現を促進し、花成の春化要求性を高める

上記の複数の花成経路のうち、春化経路の依存度に応じて、シロイヌナズナのエコタイプは夏季一年生型あるいは、越冬一年生型の生活環をもつ。ここにはジンクフィンガー型の転写因子 *FRI* が関わっている (Johanson et al., 2000)。*FRI* は *FLC* の発現を促進するため、機能的な *FRI* を持つエコタイプは常温では栄養成長を続ける。しかし長期間の低温に晒されると、春化依存的に *FLC* の発現が抑制され、花成が誘導される。したがって、機能的な *FRI* をもつエコタイプは秋に発芽してロゼットを形成し、そのまま冬を越して春に開花・結実する越冬一年生型になる (Michaels & Amasino, 1999)。一方、実験で用いられる *Colombia* (*Col-0*) や *Landsberg* (*Ler*) は *FRI* が欠損しているため、花成に対する春

化依存性が低く、一生を通じて温暖な気候で過ごす夏季一年生型の生活環を持つ (Johanson et al., 2000)。しかし、越冬一年生型の San Feliu-2 (Sf-2) から機能的な *FRI* を Col-0 に導入することで、花成への春化依存性が高まり、春化の解析が可能となる。そこで本研究では主に、Col-0 *FRI*^{Sf-2} 背景を用いて実験を行った。

1-3. ヒストン修飾を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御

FLC の発現制御には、ヒストンの修飾状態の変化が伴う (Yang et al., 2016)。ヒストン修飾とはヒストンテールのアミノ酸残基にメチル化やアセチル化、リン酸化、ユビキチン化など様々な化学修飾が付加あるいは除去されることである。ヒストンはこうした修飾を受けることで、クロマチン構造を変化させ、遺伝子発現を制御する (Pirrotta, 1998; Cheung et al., 2000; Strahl & Allis, 2000; Jenuwein & Allis, 2001)。*FLC* 座においては、以下の 1-4 に述べる *FRI* 複合体によってヒストン H3 の 4 番目や 36 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K4me3、H3K36me3) などのヒストン修飾が増加すると *FLC* の発現が促進される一方、春化依存的にヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K27me3) のヒストン修飾が増加すると *FLC* の発現が抑制される (Xiao et al., 2016)。

1-4. FRIGIDA super-complex はエピジェネティックに *FLC* の発現を促進する

FRI は FRIGIDA LIKE 1 (FRL1)、SUPPRESSOR OF FRI 4 (SUF4)、FRIGIDA ESSENTIAL 1 (FES1)、*FLC* EXPRESSOR (FLX) と共に *FRI-C* と呼ばれる複合体を形成する (Michaels et al., 2004; Schmitz et al., 2005; Kim & Michaels, 2006; Choi et al., 2011) (図 2)。*FRI-C* の中で、SUF4 は DNA 結合タンパク質であり、*FRI-C* を *FLC* 座にリクルートする働きを持っている (Kim & Michaels, 2006; Choi et al., 2011)。また、*FRI* と FRL1 は足場タンパク質として働く。

さらに、*FRI-C* は以下に述べる複数のエピジェネティックな制御因子や転写活性化因子と協調的に働き、*FLC* の発現を促進する (Amashino, 2010) (図 2)。COMPASS-like は WDR5a、ASH2R、RBL、ARABIDOPSIS TRITHORAX1 (ATX1) を含む複合体であり、H3K4me3 のメチル化酵素である (Jiang et al., 2009, 2011; Ding et al., 2012)。EARLY FLOWERING IN SHORT DAYS (EFS/SDG8) は H3K36me3 のメチル化酵素 (Ko et al., 2010)、HISTONE

ACETYLTRANSFERASE OF THE MYST FAMILY 1 (HAM1)と HAM2 は H4K5ac のアセチル化酵素 (Deng et al., 2007; Han et al., 2007; Xiao et al., 2013)、Ubiquitin-conjugating enzyme 1 (UBC1)、UBC2 は HUB1 (HISTONE MONOUBIQUITINATION 1)と HUB2 と協調的に働くユビキチンリガーゼである (Gu et al., 2009)。SWR1c はヒストンバリエント H2A.Z の取り込みに関わり (Deal et al., 2007; Choi et al., 2011)、PAF1c は COMPASS-like を RNA ポリメラーゼ II にリクルートする働きをしている (He et al., 2004; Oh et al., 2008)。FRI-C は、足場タンパク質である FRI と FRL1 を介して、上記の複数の因子と相互作用して FRI super complex と呼ばれる複合体を形成し、*FLC* 座への結合性を高めている (Li et al., 2018)。そして、*FLC* 座において H3K4me3、H3K36me3、H4K5ac などの促進的ヒストン修飾の蓄積量が増加し、*FLC* の発現が促進される。

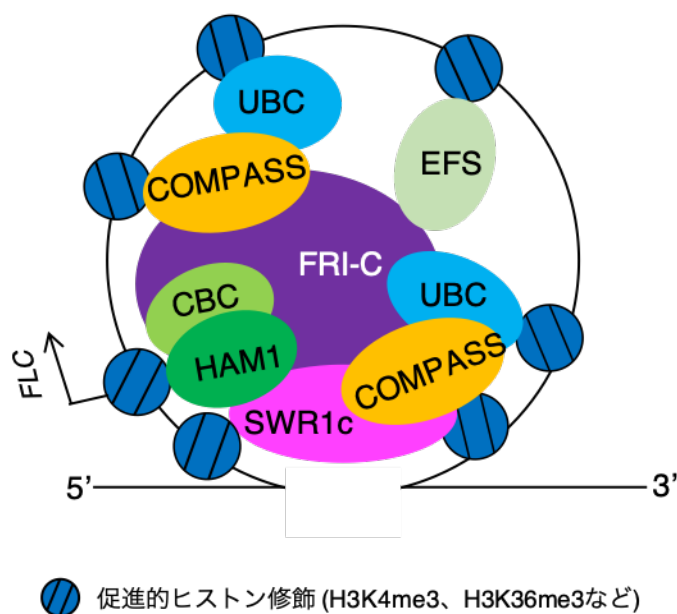


図 2. FRI super-complex による *FLC* の発現促進

FRI-C は DNA 結合タンパク質 SUF4 を介して *FLC* の転写開始部位に結合する。FRI-C は COMPASS-like や EFS、HAM1/2、UBC、SWR1c と結合し、FRI super complex を形成する。FRI super-complex は *FLC* 座に H3K4me3、H3K36me3、H4K5ac などの促進的ヒストン修飾を蓄積するとともに、*FLC* の 3'、5'末端と相互作用し、ループ構造を形成させる。

1-5. 春化の中で、複数の温度感受性タンパク質がエピジェネティックな制御因子と相互作用することで *FLC* が発現抑制される

シロイヌナズナは冬の長期間の低温に晒されると *FLC* の発現が抑制され、春化が誘導される。このとき、まず *FLC* 座から H3K4me3 や H3K36me3 などの促進的ヒストン修飾が減少していく (1-5-1)。さらに低温期間が長くなると、ポリコーム群タンパク質複合体 (PcG) 依存的に *FLC* 座において抑制的ヒストン修飾、H3K27me3 の蓄積量が増加し、エピジェネティックな発現抑制状態が確立される (1-5-2、1-5-3)。PcG は Polycomb Repressive Complex1 (PRC1) と PRC2 に分類され、PRC2 は H3K27me3 を導入し、PRC1 は H3K27me3 の結合した DNA 領域をヘテロクロマチン化することで発現抑制状態を確立する。このように春化の過程では複数の段階を経て *FLC* の発現が抑制される。そして、このそれぞれの段階で次に示す様々な温度感受性タンパク質、あるいは RNA とエピジェネティックな制御因子の相互作用が起きている (図 3)。

(1-5-1) まず *FLC* 座における H3K4me3 や H3K36me3 の蓄積量が減少する

COOLAIR は *FLC* の 3' 末端からアンチセンス方向に転写される noncoding-RNA である。シロイヌナズナが低温に晒されると数日以内に COOLAIR が転写される (Swiezewski et al., 2009; Helliwell et al., 2011)。さらに、COOLAIR により FRI タンパク質は安定化されて凝集し、*FLC* 座から乖離する (Zhu et al., 2021)。FRI は、super complex を構成する他のエピジェネティックな制御因子の *FLC* 座への結合性を高める働きをしている (Li et al., 2018)。このため、低温環境で FRI が乖離すると、SDG8 や COMPASS-like 複合体などのヒストン修飾酵素も *FLC* 座から失われ、H3K4me3 や H3K36me3 の蓄積が減少すると考えられている (Csorba et al., 2014; Zhu et al., 2021)。

(1-5-2) 長期間の低温に応答して *FLC* 座の第一エクソン周辺に H3K27me3 が導入される

ショウジョウバエの PRC2 は Enhancer of zeste (E (z)), Suppressor of zeste (Su (z)12)、Extra sex combs (Esc)、Nucleosome remodeling factor 55 (Nurf55) の 4 つのタンパク質から構成されている (Mozgova & Henning, 2015)。一方で、シロイヌナズナにおける PRC2 は、ショウジョウバエにおける PRC2 の 4 つのサブユニットのホモログから構成されている。シロイヌナズナでは、E (z) に 3 種類のホモログ、MEDEA (MEA)、CURLY LEAF (CLF)、SWINGER (SWN) がある (Goodrich et al., 1997; Grossniklaus et al., 1998; Chancicattana et al., 2004)。Su (z)12 には 3 種類のホモログ、FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2 (FIS2)、

VERNALIZATION2 (VRN2)、EMBRYONIC FLOWER 2 (EMF2)がある (Luo et al., 1999; Gendall et al., 2001; Yoshida et al., 2001)。Esc のホモログは FERTILIZATION- INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE)であり (Ohad et al., 1999)、Nurf55 のホモログは MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 (MSI1)である (Köhler et al., 2003)。このうち、SET ドメインを持つ E (z)のホモログ、MEA、CLF、SWN がヒストン H3K27 メチル化の触媒活性を示す。MEA は主に雌性配偶体と未熟な種子で発現し、成熟した種子や芽生えでは発現が見られない。一方で、CLF と SWN は主に成長点で発現している。

春化の過程では CLF あるいは SWN を含む PRC2 が働き、FLC 座に H3K27me3 を導入している。そして、長期の低温に応答して PRC2 が働くためには、Plant Homeo Domain (PHD) motif を持つタンパク質 VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3)と VERNALIZATION 5 (VRN5)の働きが必要である (Sung & Amashino, 2004; Greb et al., 2007)。VRN5 の発現は一定であるのに対し、VIN3 の発現は低温期間が長くなるにつれて徐々に増加していく。これは VIN3 の上流の転写活性化因子である NTL8 が、低温特異的にタンパク質レベルで徐々に増加するためである (Zhao et al., 2020)。VIN3 と VRN5 は協調的に働いて PRC2 と相互作用し、PHD-PRC2 と呼ばれる複合体を形成する (Wood et al., 2006; Greb et al., 2007; De Lucia et al., 2008)。この時、VIN3 と VRN5 は PRC2 のヒストンメチル化活性を高める働きをされると考えられている。

FLC の第一エクソンには 3 ヌクレオソームからなる nucleation region と定義された配列部位がある (Buzas et al., 2011)。VIVIPAROUS1/ABI3-LIKE 1 (VAL1)、VAL2 はこの nucleation region の一部にある Cold Memory Element (CME)に結合する (Qüesta et al., 2016; Yuan et al., 2016)。そして、VAL1/2 を介して PHD-PRC2 がリクルートされ、nucleation region における H3K27me3 の蓄積量が著しく増加する。

(1-5-3) 十分な低温経験後に常温で FLC 座全域へ H3K27me3 の蓄積が広がる

FLC 座における H3K27me3 の蓄積は、低温下では nucleation region に限られる。しかし、十分な低温経験後に常温に移されると、H3K27me3 が FLC 座全域に渡って広がっていく (Finnegan & Dennis, 2007; Angel et al., 2011)。この段階で働くエピジェネティックな制御因子には VRN5 と PRC2 (PHD-PRC2)に加えて PRC1 の構成因子である LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1) やクロマチンリモデリング因子 CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR 1 (CAF1)が知られる (Jiang & Berger, 2017; Yang et al., 2017)。

ショウジョウバエの PRC1 は Polycomb (Pc)、Polyhomeotic (Ph)、Posterior sex combs (Psc)、dRing の 4 つのタンパク質から構成されている (Mozgova &

Henning, 2015)。一方で、シロイヌナズナにおける PRC1 の構成因子は PSc と dRing 以外には保存されていないようである。シロイヌナズナの PRC1 は Psc のホモログ AtBMI1A/B/C (Chen et al., 2010)、dRing のホモログの AtRING1A/B (Molitor & Shen, 2013) と植物のみで見られる EMBRYONIC FLOWER1 (EMF1) と LHP1 から構成されている (Aubert et al., 2001; Turck et al., 2007)。

LHP1 は H3K27me3 を認識して *FLC* 座に結合し、MSI1 を介して PRC2 をリクルートする (Zhang et al., 2007; Derkacheva et al., 2013; Yang et al., 2017)。PRC2 は DNA 複製と連動しながら、隣のヌクレオソームに H3K27me3 を付加し、やがて *FLC* 座全域に渡って H3K27me3 の蓄積が広がる。同時に、DNA 複製の過程で、CAF1 が DNA ポリメラーゼ ϵ と相互作用し、ヒストンバリエント H3.1 を遺伝子座に取り込む。これにより *FLC* の安定的な発現抑制状態が確立されると考えられている。しかし、この制御が低温では起こらず、常温でのみ起こる分子機構は不明である。また、LHP1 以外の PRC1 構成因子の関与は不明である。

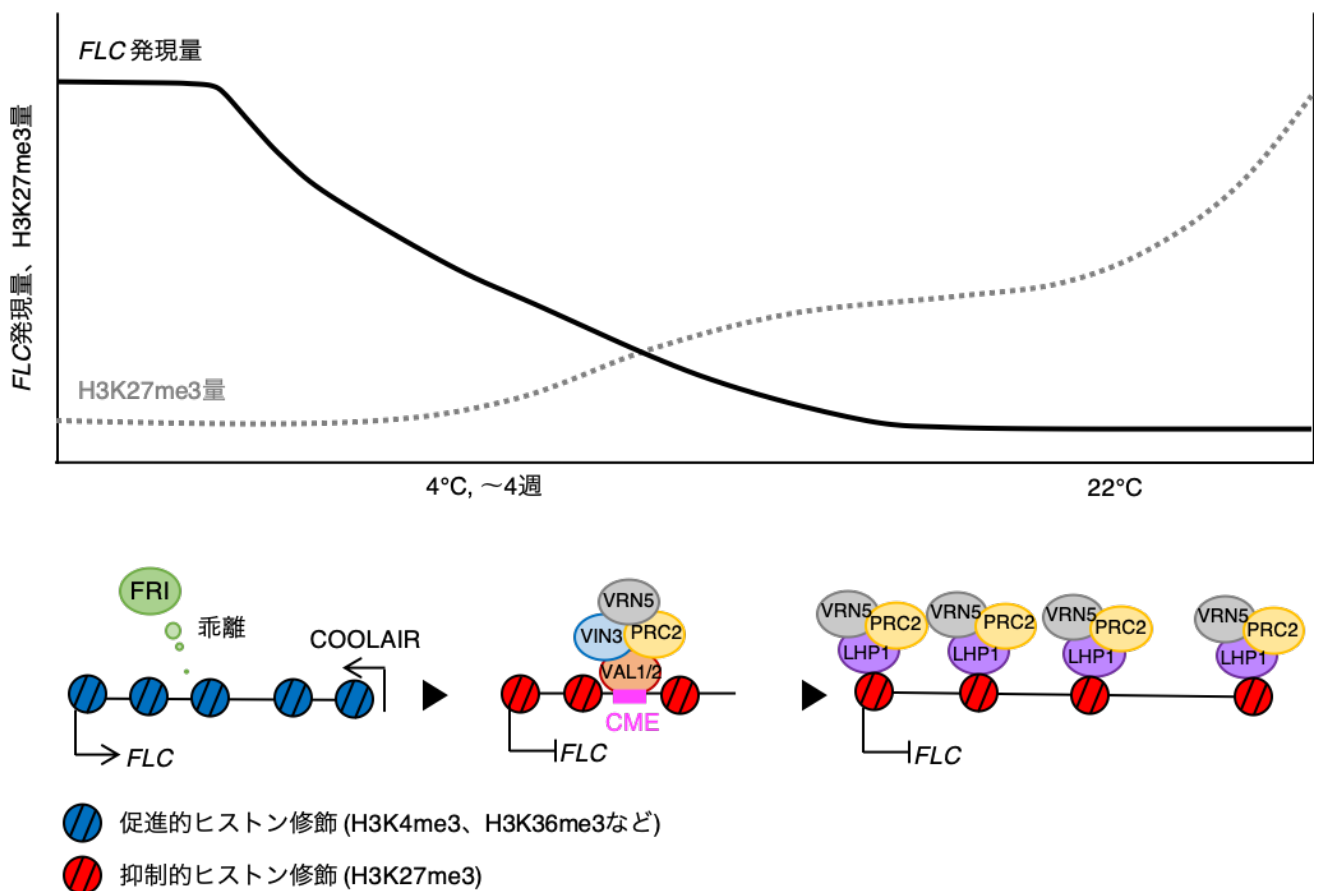


図3. 春化の過程で *FLC* 座で起こるエピジェネティック制御

植物が低温に晒されると数日以内に COOLAIR が転写される。COOLAIR により FRI が *FLC* 座から乖離する。さらに、低温 2-3 週で *FLC* 座の第一エクソンにある CME に結合した VAL1、VAL2 を介して VIN3、VRN5、PRC2 からなる PHD-PRC2 がリクルートされる。PHD-PRC2 は *FLC* 座の nucleation region に H3K27me3 を蓄積する。十分な低温経験後に、常温に移されると DNA 複製と連動しながら LHP1、VRN5、PRC2 が *FLC* 座全域に広がり、H3K27me3 を蓄積する。

1-6. 春化へのヒストン脱メチル化酵素の関与は十分に解析されていない

上記のように、様々なヒストンメチル化酵素とその制御因子が、春化の過程で働くことが明らかになってきた。一方で、幾つかのヒストン脱メチル化酵素が *FLC* 座から抑制的ヒストン修飾、H3K27me3 を除去することが知られているものの、これらの春化への関与は十分には理解されていない。

シロイヌナズナでヒストン脱メチル化活性をもつ主要なグループは JUMONJI タンパク質ファミリーである。JUMONJI タンパク質は酵素活性のある JUMONJI-C ドメインを有し、ヒストン脱メチル化を担う (Takeuchi et al., 2006)。シロイヌナズナではこれまでに 21 種類の JUMONJI タンパク質が同定されており、KDM5/JARID1、KDM4/JHDM3/JMJ2、KDM3/JHDM2、JMJD6、JUMONJI-C domain only group に分類される (Lu et al., 2008; Hong et al., 2009)。このうち、H3K27me3 を脱メチル化することが報告されているのは、KDM4/JHDM3/JMJ2 に属する JMJ11/EARLY FLOWERING 6 (ELF6)、JMJ12/RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6)、JMJ13 と JUMONJI-C domain only group に属する JMJ30、JMJ32 である (Crevillén et al., 2014; Lu et al., 2011; Zheng et al., 2019; Gan et al., 2014; Yan et al., 2018)。中でも ELF6 と JMJ30 は *FLC* 座に直接結合して H3K27me3 を除去し、*FLC* の発現を促進することが報告されている (Crevillén et al., 2014; Gan et al., 2014)。

ELF6

elf6 変異体は常温で早咲きの表現型を示す (Noh et al., 2004)。これは、野生型と比べて、*elf6* 変異体の *FLC* 座では H3K27me3 の蓄積量が増加しており、*FLC* の発現レベルが低いためである。また、ELF6 は *FLC* 座に直接結合することが確かめられている。こうしたことから、ELF6 は常温で *FLC* の発現をエピジェネティックに促進することで花成を抑制していると考えられている。

また、ELF6 は世代交代に伴う環境記憶の消去に関わる。*elf6* 変異体では親世代に獲得した長期の低温記憶、つまり *FLC* のエピジェネティックな発現抑制状態が次世代に引き継がれる (Crevillén et al., 2014)。このため、*elf6* 変異体では次世代は春化要求性を持たず、長期の低温を経験しなくても花成が促進される。一方で野生型では、胚発生時に ELF6 が活性化され、*FLC* 座から H3K27me3 を除去することで、*FLC* の発現を促進している。このように、常温あるいは胚発生時に ELF6 は *FLC* をエピジェネティックに発現促進し、花成を制御しているが、春化における ELF6 の働きは観察されていない (Yang et al., 2016)。

REF6

ref6 変異体は常温で遅咲きの表現型を示す (Noh et al., 2004)。これは、野生型と比べて、*ref6* 変異体では花成促進遺伝子である *SOC1* や *FRUITFUL (FUL)* の遺伝子座において、H3K27me3 の蓄積量が増加し、これらの遺伝子発現が抑制されるためである。また、REF6 は *SOC1* や *FUL* の遺伝子座に直接結合することが確かめられている (Hou et al., 2014; Hyun et al., 2016)。こうしたことから、REF6 は *SOC1* や *FUL* の発現をエピジェネティックに促進することで、花成を促進していると考えられている (Hou et al., 2014; Hyun et al., 2016)。近年では、ChIP-seq によって REF6 は C2H2-type Zn-finger (ZnF) ドメインを介して数千のゲノム領域に結合することが確かめられており (Cui et al., 2016; Li et al., 2016)、REF6 の花成以外の生理現象への関与が示唆されている。

一方で、野生型と比べて、*ref6* 変異体では *FLC* 座において、促進的ヒストン修飾、H3K4me3 や H3K36me3 の蓄積量が増加し、*FLC* の発現レベルが高まっていることが報告されている (Ko et al., 2010)。しかし、REF6 は *FLC* 座への結合性を持たず (Cui et al., 2016; Li et al., 2016; Yang et al., 2016)、H3K4me3 や H3K36me3 の脱メチル化活性は示さない (Lu et al., 2011)。おそらく、REF6 依存的に *FLC* に結合して H3K4me3 や H3K36me3 を除去する何らかの因子が *FLC* の発現を制御していると考えられている。

JMJ30

JMJ30 はホモログである *JMJ32* とともに高温受容経路を介した花成制御に関わる (Gan et al., 2014)。*jmj30 jmj32* 二重変異体は 29°C の高温環境で早咲きの表現型を示すが、22°C では目立った表現型を示さない。これは、常温で生育した野生型と *jmj30 jmj32* の *FLC* 座では H3K27me3 が同程度に蓄積しているが、高温で生育した野生型は H3K27me3 の蓄積が減少し *FLC* の発現が促進される一方、高温で生育した *jmj30 jmj32* は H3K27me3 の蓄積が変化せず、*FLC* の発現は抑制されたままであるため、花成が起りやすいことに起因している。さらに、*JMJ30* は高温環境下で mRNA レベルおよびタンパク質レベルで安定化されている。こうしたことから *JMJ30* は高温環境下で H3K27me3 を除去して *FLC* の発現を促進することで花成を遅延させていると考えられている (Gan et al., 2014)。

JMJ30 は花成制御のほか、温度補償性や発芽、高温馴化にも関わるということが報告されている。第一に、*JMJ30* は概日時計遺伝子 *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* と *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* との間でフィードバック制御を形成している (Jones et al., 2010; Liu et al., 2011)。*LHY* と *CCA1* は朝方に一過的に発現が誘導され、MYB 型の転写因子をコードする概日

時計遺伝子である。*jmj30*では24時間周期の概日リズムが早まり、しかもその影響は高温ほど強まったことから (Jones et al., 2019)、JMJ30は温度補償性の維持に必要であることが示唆されている。

第二に、JMJ30は乾燥ストレス環境下での成長停止に関わる (Wu et al., 2019)。植物は発芽した直後に乾燥ストレスに晒されると、アブシジン酸 (ABA)が合成され、ABAシグナル伝達に働くABA INSENSITIVE3 (ABI3)を介してJMJ30の発現を促進される。次いで、JMJ30は*SNF1-related protein kinase 2.8* (*SnRK2.8*)座からH3K27me3を除去することで*SnRK2.8*の発現を促進させる。さらに、*SnRK2.8*はキナーゼをコードし、リン酸化による下流遺伝子の転写制御を行う。*SnRK2.8*の下流遺伝子には、休眠や発芽抑制に関わる遺伝子群のほか、ABI3も含まれる。このため、フィードフォワードループが働いてABAシグナルが増幅され、成長停止が引き起こされる (Wu et al., 2019)。

第三に、JMJ30は高温馴化に必要である (Yamaguchi et al., 2021)。高温馴化とは、あらかじめ中程度の高温を経験しておくこと、本来生存不可能な高温ストレスに対して、植物が生存可能になるという現象である。JMJ30はヒートショックタンパク質*HEAT SHOCK PROTEIN22* (*HSP22*)と*HSP17.6C*の遺伝子座に直接結合してH3K27me3を除去することで、エピジェネティクに発現を促進する。これにより、ヒートショックタンパク質は準高温経験を記憶し、高温に対する耐性を強めることで高温馴化をもたらす (Yamaguchi et al., 2021)。

1-7. 低温馴化と春化の関係は不明である

植物にとって過酷な低温は細胞損傷を引き起こし、生存を脅かす要因となる。シロイヌナズナは、春化に応答して花成が促進されるまで1ヶ月程度、低温ストレスに対して低温馴化と呼ばれる耐性獲得機構を用いて対処する (Thomashow et al., 1999; Chinnusamy et al., 2007)。低温馴化には主に、転写因子であるC-REPEAT BINDING FACTORS (CBFs)を介した経路が関与することが知られている (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Liu et al., 1998)。CBFsは低温処理開始数時間での発現が著しく上昇し、低温耐性の獲得に必要な一群の遺伝子*COLD-REGULATED* (*COR*)の発現を誘導する (Gilmour et al., 1998; Liu et al., 1998; Medina et al., 1999; Vogel et al., 2005)。この時、CBFsは*COR*のプロモーターのCCGACを含むcold responsive element (CRT/DRE)に直接結合する (Stockinger et al., 1997; Gilmour et al., 1998; Liu et al., 1998)。

CBFsは温度低下の速さによって異なる2つの制御を受ける。CALMODULIN BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR3 (CAMTA3)とCAMTA5は異常気象

や夜間などの急激な温度低下時に活性化され、*CBFs* の発現を促進する (Kidokoro et al., 2017)。また、季節変化などで緩やかに温度が低下する時には、概日時計の構成因子である REVEILLE4 (REV4) と REV8 が直接的に、CCA1 と LHY が間接的に、*CBFs* の発現を促進する (Kidokoro et al., 2021)。しかし、*CBFs* あるいは、こうした上流の制御因子と春化との関連性は見出されておらず、低温馴化と春化は区別して理解されている (Helliwell et al., 2015; Friedrich et al., 2019)。

1-8. 本研究の目的

シロイヌナズナでは、長期の低温を経て、花成抑制のマスター制御遺伝子 *FLC* がエピジェネティックに発現抑制されることで春化が誘導される。これまでに春化に関する数多くの研究が行われたことによって、*FLC* 座において、様々な温度感受性タンパク質がエピジェネティックな制御因子と相互作用していることが明らかになってきた。しかし、これまで明らかになった制御だけでは十分に説明できない春化の側面も残されている。例えば、春化の過程で *FLC* 座における H3K27me3 の蓄積量が増加し始めるまで 2~3 週間の低温期間が必要である。つまり、春化の初期段階では *FLC* 座の H3K27me3 量は低レベルで維持されているが、その制御は不明である。そこで本研究では、ヒストン脱メチル化酵素 JMJ30 と JMJ32 に着目して春化を解析することで、H3K27me3 の制御について新しい知見をもたらすことを目的とした。また、解析を進める中で、*JMJ30* の発現が低温馴化のマスター制御因子 *CBFs* によって制御されることが明らかになった。低温馴化と春化は、どちらも低温に応答して誘導されるという共通性は持つものの、上流の制御機構の関連性は報告されていなかったが、本研究により 2 つの現象のつながりが示唆された。

2. 材料と方法

2-1. 植物材料

植物材料としては野生型シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)のエコタイプ Col-0 を用いた。Col-0 *FRF^{s2}* は Col-0 エコタイプと Sf-2 エコタイプの掛け合わせにより作製された (Lee et al., 1993)。*jmj30-2 jmj32-1* (Gan et al., 2014), *pJMJ30::JMJ30-GUS* (Gan et al., 2014)、*cbf123-2* (Zhao et al., 2016) 、*cbfs CBF3::CBF3-MYC* (Jia et al., 2016)、*lhy-11 cca1-1* (Niwa et al., 2007)は既知の変異体と形質転換体を用いた。

2-2. 寒天培地での生育条件

シロイヌナズナ種子は 70%エタノールで 5 分間殺菌し、99%エタノールを通した後、乾燥させて固形培地上に播種した。固形培地は 0.5%ゲランガム (和光純薬工業)を含む MS 培地のプレートを用いた。播種後、人工気象器 LH-4115 (日本医化器械製作所)を用いて長日条件、MLR-352 (PHC 株式会社)を用いて恒明条件で 22°Cで生育した。

2-3. 土の上での生育条件

土はバーミキュライト (ニッタイ)とメトロミックス (Sun Gro HORTICULTURE)を 2 対 1 の割合で混ぜたものを使用した。固形培地上で育てた植物体を移植し、恒明条件で 22°Cで生育した。一週間に一度水やりを行い、ハイポネックスの原液を約 1000 倍希釈したものを同時に加えた。

2-4. シロイヌナズナのジェノタイピング

2 週齢のシロイヌナズナの葉、約 1 cm²を 50 μL の DNA 抽出バッファー中でホモジナイザーを用いて破碎した。DNA 抽出バッファーは 10 mL の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) (ナカライテスク)、2 ml の EDTA (ナカライテスク)、1.46 g の NaCl (ナカライテスク)、0.1 g の SDS (ナカライテスク)、88 mL の水を混ぜて調整したものである。攪拌後、65°Cで 10 分間熱処理した。200 μL の水を加えて攪拌後、15,000 rpm で 2 分間遠心した。上清に含まれるゲノム DNA を鋳型として、設計したプライマー (表 1)と Emerald Amp PCR Master Mix (Takara)を用いて PCR を行なった。PCR プログラムは 95°Cで 5 分のプレヒートの後、98°Cで

10 秒、55°Cで30 秒、72°Cで1 分の反応を40 サイクル行い、その後72°Cで5 分の熱処理を行った。その後、1×TAE と Agar Powder (ナカライテスク)を混和したものに0.0005%の Gel Red を混和することで1%あるいは2%のアガロースゲルを作製し、135V、30 分で電気泳動を行なった。

2-5. シロイヌナズナの交配

花卉がわずかに見え始める蕾から実体顕微鏡下で萼、花卉、雄蕊を取り除き、雌蕊の柱頭に交配したい植物の成熟花粉を付着させることで、掛け合わせを行い、F1 個体を得た。

2-6. RNA 抽出・qRT-PCR

RNA は RNeasy plant mini kit (Qiagen)を用いて抽出した。100 mg 以下の植物体全体を乳棒と乳鉢を用いて凍結破碎した。得られた抽出液をエタノールと混合し、RNeasy シリカゲルメンブレンに通すことで total RNA をメンブレンに結合させた。メンブレンを数回洗浄した後に、RNase-Free DNase Set (Qiagen)を用いてゲノム DNA を除去し、RNA free water 30 μ L により精製 RNA を抽出した。抽出した total RNA のうち 500 ng を鋳型に PrimeScript RT Master Mix (Takara)を用いて逆転写することで cDNA ライブラリを作製した。設計したプライマー (表 2)と FastStart DNA Essential DNA Green Master mix (Roche)を用いて Light Cycler 480 (Roche)で相対的な mRNA 量を定量化した。

2-7. クロマチン免疫染色 (ChIP アッセイ)

ChIP アッセイは報告された手法に従って行なった (Yamaguchi et al., 2014)。実験には 0.3-0.6 g の春化なしおよび低温4 週の処理を行なった後、7 日間生育した植物体全体を用いた。3.7%のホルムアルデヒドに15 分浸すことでタンパク質と DNA を架橋反応させた後、グリシンに5 分浸すことで反応を停止させた。乳棒と乳鉢を用いてサンプルを凍結粉碎し、核抽出バッファーを用いて核からクロマチンを単離した。Ultrasonic Disruptors UD-201 (TOMY)を用いて超音波破碎した。プレ洗浄のために Protein A ビーズ (Thermo Fisher Scientific)のみを加えて抗体非特異的な結合産物を除去した後、anti-H3K27me3 抗体 ab6002 (Abcam)と Protein A ビーズを加えて4°Cで一晩反応させることで免疫沈降した。Protein A ビーズを Low salt buffer (0.1% SDS、1% Triton-X、2 mM EDTA、20 mM Tris-HCL pH8.1、150 mM NaCL)、High salt buffer (0.1% SDS、1% Triton-X、2 mM EDTA、20 mM Tris-HCL pH 8.1、500 mM NaCL)、LiCL buffer (0.25 M

LiCL、1% IGEPAL-CA630、1% deoxycholate、1 mM EDTA、10 mM Tris-HCL pH8.1)、0.5% TE で洗浄後、核破碎バッファーを加えて 65°Cで 30 分間インキュベートすることで、タンパク質-DNA 複合体を溶出した。さらに、65°Cで一晩インキュベートすることでタンパク質から DNA を脱架橋した。得られた DNA は QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)を用いて精製された。DNA 量は設計したプライマー (表 3)と FastStart DNA Essential DNA Green Master mix (Roche)を用いて Light Cycler 480 (Roche)で定量化された。このとき TA3 を内部標準として用いた。input DNA で標準化することで Input%を算出した。

表 1. ジェノタイピングで用いたプライマー

名前	配列 (5'-3')
<i>FRI (Fw)</i>	CAACGACCAAACACAACGAC
<i>FRI (Rv)</i>	CGCGAGACTGAACCTCACGG
<i>flc-3 (Fw)</i>	AAAATAGAAAGAAATAAAGCGAAAAGGA
<i>flc-3 (Rv)</i>	GTACTTATCGCCGAGGAGAAGC
<i>jmj30-2 (Fw)</i>	CAAACCTCTGCTGCAATCGATTTC
<i>jmj30-2 (Rv)</i>	GAAAATGTCACAAGCTCTTGCTTC
<i>jmj32-1 (Fw)</i>	GACTGAGAAAACCTGAACTCAGC
<i>jmj32-1 (Rv)</i>	GTCGTGTAAAGGACTGAAGGTTG
<i>cbf123-2 (LB)</i>	GGTCAAAGGACACACGTCAGACA
<i>cbf123-2 (RB)</i>	ATACCTCCATAAGGACACGTC
<i>cbf123-2 (BP)</i>	CAGAAACCCACTTACCGGAGTT

表 2. qRT-PCR で用いたプライマー

名前	配列 (5'-3')
<i>PP2A (Fw)</i>	TATCGGATGACGATTCTTCGTGCAG
<i>PP2A (Rv)</i>	GCTTGGTCGACTATCGGAATGAGAG
<i>FLC (Fw)</i>	CCGAACTCATGTTGAAGCTTGTTGAG
<i>FLC (Rv)</i>	CGGAGATTTGTCCAGCAGGTG
<i>EIF4A (Fw)</i>	TCTTGGTGAAGCGTGATGAG
<i>EIF4A (Rv)</i>	AATCAACCTTACGCCTGGTG

<i>JMJ30 (Fw)</i>	GAATCACTTGGACTACCTCAATGC
<i>JMJ30 (Rv)</i>	CATTGGAGACGATTTATTGGTCC
<i>JMJ32 (Fw)</i>	GTTTCATTGTACTGTCAAGGCTGG
<i>JMJ32 (Rv)</i>	CATACTTGATGTCAAACCTGCATGTC
<i>UBQ (Fw)</i>	GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG
<i>UBQ (Rv)</i>	AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT
<i>CCAI (Fw)</i>	TCTGTGTCTGACGAGGGTCTGAATT
<i>CCAI (Rv)</i>	ACTTTGCGGCAATACCTCTCT
<i>LHY (Fw)</i>	ACGAAACAGGTAAGTGGCGACATT
<i>LHY (Rv)</i>	TGGGAACATCTTGAACCGCGTT

表 3. ChIP-qPCR で用いたプライマー

名前	配列 (5'-3')
<i>FLC-P1 (Fw)</i>	ACTATGTAGGCACGACTTTGGTAAC
<i>FLC-P1 (Rv)</i>	TGCAGAAAGAACCTCCACTCTAC
<i>FLC-P2 (Fw)</i>	CGACAAGTCACCTTCTCCAAA
<i>FLC-P2 (Rv)</i>	AGGGGGAACAAATGAAAACC
<i>FLC-P3 (Fw)</i>	GTCGCTCTTCTCGTCGTCTC
<i>FLC-P3 (Rv)</i>	AGGGGGAACAAATGAAAACC
<i>FLC-P4 (Fw)</i>	TTCCTATCTTTGCTGTGGACCT
<i>FLC-P4 (Rv)</i>	GAATCGCAATCGATAACCAGA
<i>FLC-P5 (Fw)</i>	GTTTCCAGTGGCCTTTTCAA
<i>FLC-P5 (Rv)</i>	GACCAGGCTGGAGAGATGAC
<i>FLC-P6 (Fw)</i>	CTTTTTCATGGGCAGGATCA
<i>FLC-P6 (Rv)</i>	TGACATTTGATCCCACAAGC
<i>FLC-P7 (Fw)</i>	TTGTAAAGTCCGATGGAGACG
<i>FLC-P7 (Rv)</i>	ACTCGGCGAGAAAGTTTGTG
<i>TA3 (Fw)</i>	CTGCGTGGAAGTCTGTCAA
<i>TA3 (Rv)</i>	CTATGCCACAGGGCAGTTTT
<i>JMJ30-P1 (Fw)</i>	TTGGGAGCAACTTCACTCTGG
<i>JMJ30-P1 (Rv)</i>	GCGGCGAAATGGATTTTAGC
<i>JMJ30-P2 (Fw)</i>	ATCTGCCAGGTACACCAGTTG

<i>JMJ30-P2 (Rv)</i>	TACCAGCAACAGCATTGAGG
<i>JMJ30-P3 (Fw)</i>	AAGTTCCTTGAACGGATGCG
<i>JMJ30-P3 (Rv)</i>	AACAAAGGATGCTGGGCAAG
<i>JMJ30-P4 (Fw)</i>	CTGTGCTCGCTGTCTTTAATGC
<i>JMJ30-P4 (Rv)</i>	TCAATCCAGCGAGAAGATCAGG
<i>JMJ30-P5 (Fw)</i>	TGTACATCCCTCCCAAATGGTG
<i>JMJ30-P5 (Rv)</i>	TTCATTGCTCCACCAGAAGC
<i>JMJ30-P6 (Fw)</i>	AGGCGTAAATGTAACCGATGC
<i>JMJ30-P6 (Rv)</i>	AACCGCAGATTTTCCGCTTG

3. 結果

3-1. *jumonji 30 jumonji 32* は野生型よりも春化が起こりやすい

JMJ30 と MJ32 が春化に関与するかどうかを検証するために、*jmj30 jmj32* 二重変異体における春化応答を比較した (図 4. A)。野生型 (Col-0 *FRI^{sf-2}*) と *jmj30 jmj32* に対して春化処理なし、および春化処理として、低温で 2 週、4 週、6 週の処理を行い、花成の時期を観察した。この時、花成時期を定量的に評価するために、花茎が伸長し始めた時点のロゼット葉と茎成葉の枚数を計測した (図 4. B)。その結果、春化処理なしのとき、野生型と *jmj30 jmj32* はどちらも花成が誘導されず、花成時期に差は見られなかった。一方で、低温 2 週、4 週の処理を行ったとき、*jmj30 jmj32* では野生型よりも葉の枚数が 10 枚程度減少し、早咲きの表現型を示した。さらに、低温 6 週の処理を行ったとき、野生型と *jmj30 jmj32* はどちらも花成が誘導されていた。以上の結果から、*jmj30 jmj32* は野生型よりも春化が起こりやすく、MJ30 と MJ32 は春化に対して抑制的に働くと考えられた。

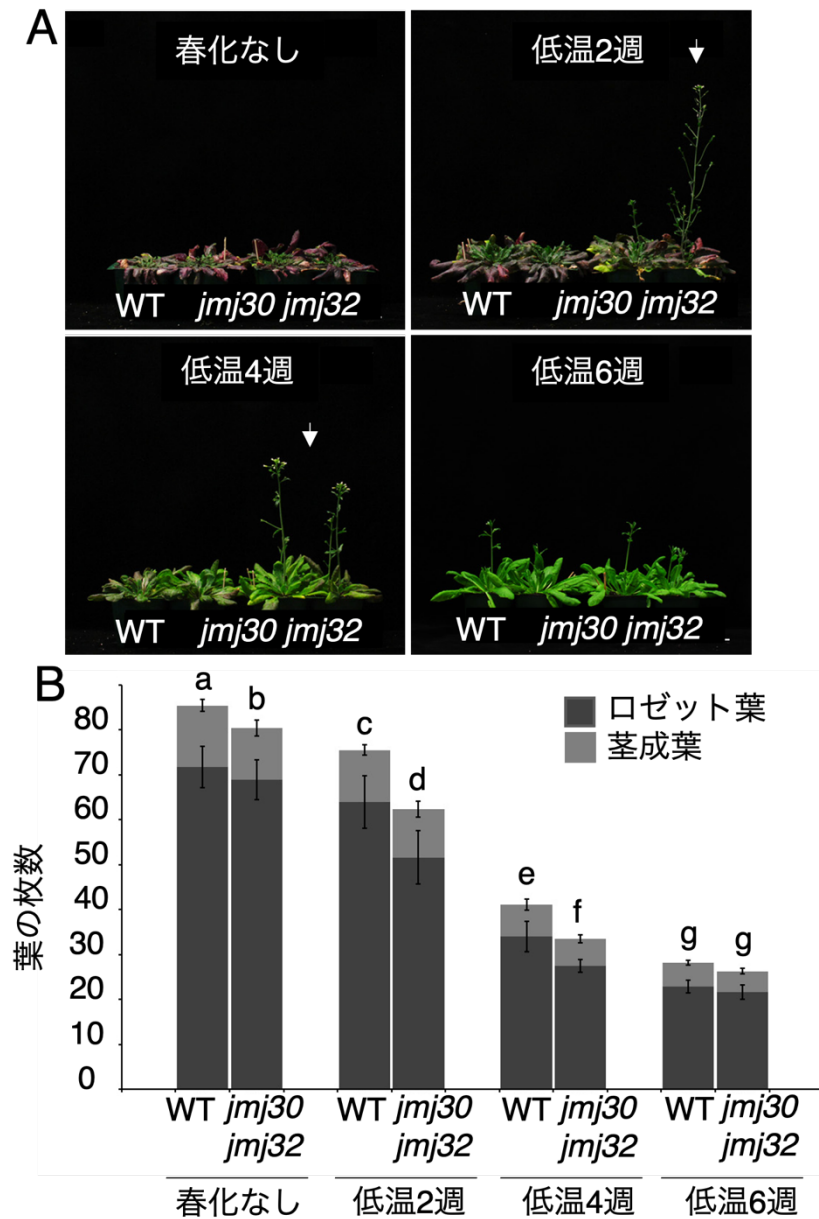


図 4. *jmj30 jmj32* 二重変異体は野生型よりも春化が起こりやすい

(A) 野生型 (*Col-0 FRI^{sf-2}*)と *jmj30 jmj32* を春化なし、および低温で 2 週、4 週、6 週の処理した後に花成が起きるまでの期間を比較した写真。

(B) 抽台 (bolting ボルティング) 時点のロゼット葉 (濃い灰色)と茎生葉 (灰色)の枚数。n=20。バーは SD を示す。One-way ANOVA の後、Turkey-Kramer test を用いて有意差検定を行なった。(a-g; $p < 0.05$)

3-2. JMJ30 と JMJ32 は *FLC* 座において H3K27me3 の蓄積量が増加するタイミングを遅らせ、春化に対して抑制的に働く

花成時期を比較した実験と同じ条件で、野生型と *jmj30 jmj32* の *FLC* の発現量を比較した (図 5. A)。その結果、春化処理なしのとき、野生型と *jmj30 jmj32* はどちらも *FLC* が同程度に高発現していた。次に、低温 2 週の処理をしたとき、野生型では春化処理なしの値と比べて *FLC* の発現量がほとんど変化しなかったのに対し、*jmj30 jmj32* では *FLC* の発現が春化処理なしの値と比べて 35% 抑制されていた。次に、低温 4 週の処理をしたとき、野生型と *jmj30 jmj32* の両方で *FLC* の発現が低下し、野生型と *jmj30 jmj32* の間で *FLC* の発現量の差は小さくなった。次に、低温 6 週の処理をしたとき、野生型と *jmj30 jmj32* の間で *FLC* の発現量にほとんど差は見られなかった。以上の結果から、*jmj30 jmj32* では春化の過程で、*FLC* の発現が抑制されるタイミングが早まっていることが示唆された。また、*FLC* の発現量の結果は、前節の春化の起こりやすさを示した花成時期の結果と一致していた。

次に、野生型と *jmj30 jmj32* で *FLC* 座における H3K27me3 の蓄積量を比較した。ChIP-qPCR を行い、*FLC* 座のプロモーター上流の P1 領域と転写開始コドン周辺の P2 領域における H3K27me3 の蓄積量を測定した (図 5. B)。P1 は H3K27me3 の蓄積がほぼおこらない領域であるのに対し、P2 は春化の過程で *FLC* 座において最初に H3K27me3 の蓄積量が増加する nucleation region の一部に該当する。その結果、P1 領域では、どの条件でも H3K27me3 の蓄積量に変化が見られなかった (図 5. C)。一方、P2 領域では、低温 3 週の処理をしたとき、*jmj30 jmj32* では野生型よりも H3K27me3 の蓄積量が有意に増加していた。また、低温 6 週の処理をしたとき、野生型と *jmj30 jmj32* はどちらも同程度に H3K27me3 の蓄積量が増加していた。以上の結果から、*jmj30 jmj32* では春化の過程で、*FLC* 座において H3K27me3 の蓄積量が増加するタイミングが早まっていることが示唆された。

最後に、*jmj30 jmj32* の花成の表現型が *FLC* 依存的なものであるかどうかを検証するために、遺伝学的相互作用を調べた (図 6. A)。春化処理なしの条件で葉の枚数を計測し、花成時期を測定した結果、まず、*flc* 単一変異体は野生型より葉の枚数が 60 枚程度減少し、早咲きの表現型を示した。次に、*flc jmj30 jmj32* 三重変異体は *flc* 単一変異体と同程度に葉の枚数が減少し、早咲きの表現型を示した。以上の結果から、JMJ30 と JMJ32 は *FLC* を介して花成を制御していると考えられた。以上の結果を合わせて、JMJ30 と JMJ32 は *FLC* 座において H3K27me3 の蓄積量が増加するタイミングを遅らせることで、春化に対して抑制的に働くことが示唆された (図 6. C)。

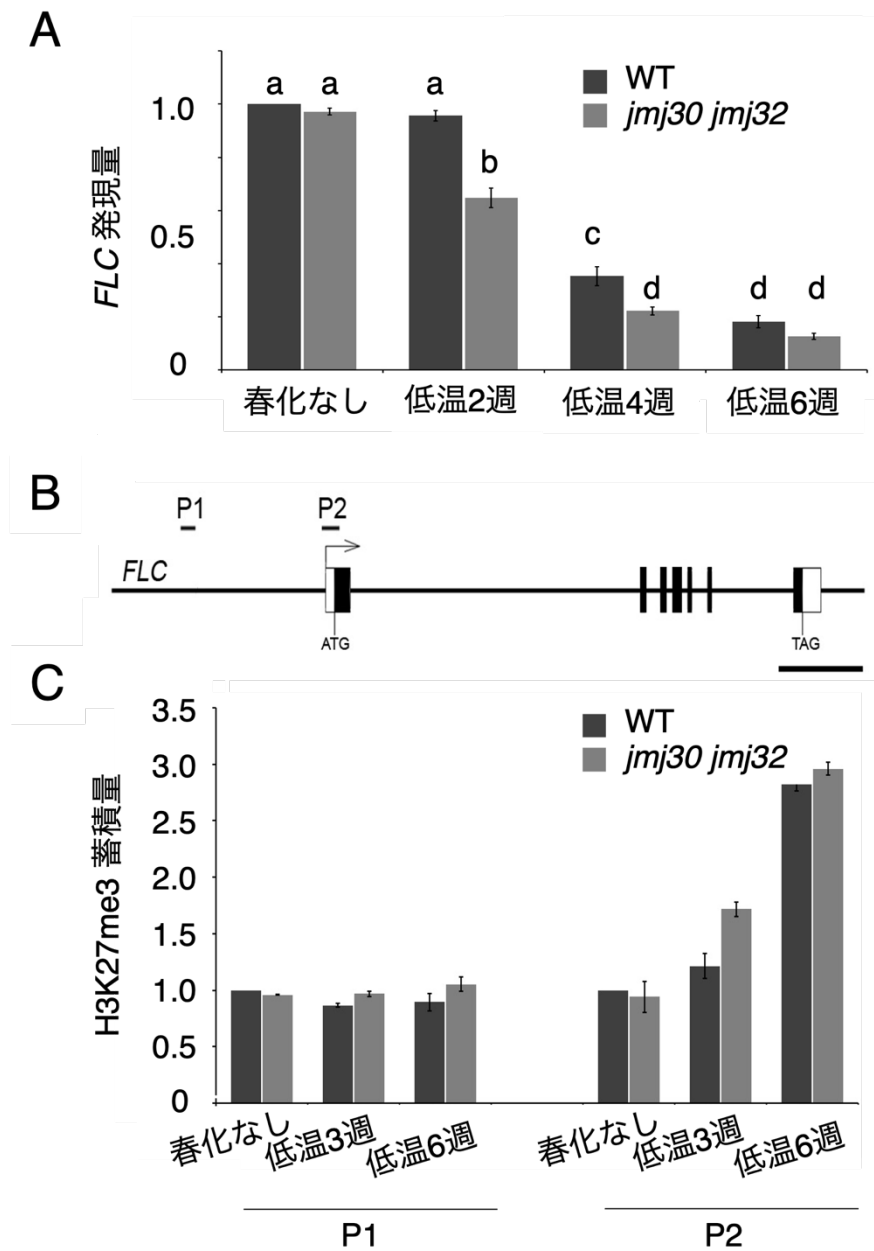


図 5. JMJ30 と JMJ32 は *FLC* 座において H3K27me3 の蓄積量が増加するタイミングを遅らせ、春化に対して抑制的に働く

(A)春化なし、低温 2 週、4 週、6 週で処理後、7 日間生育した芽生えにおける *FLC* の発現量。3 回の Biological replicate の結果を示す。バーは SD を示す。

One-way ANOVA の後、Turkey-Kramer test を用いて有意差検定を行なった。

(a-g; $p < 0.05$) (B) *FLC* 遺伝子の模式図とプライマーで増幅した領域。白は 5'、

3'-UTR 領域、黒はエキソンを表す。(C) *FLC* 座の P1 領域と P2 領域における

H3K27me3 蓄積量を定量したグラフ。3 回の Biological replicate の結果を示す。

バーは SD を示す。

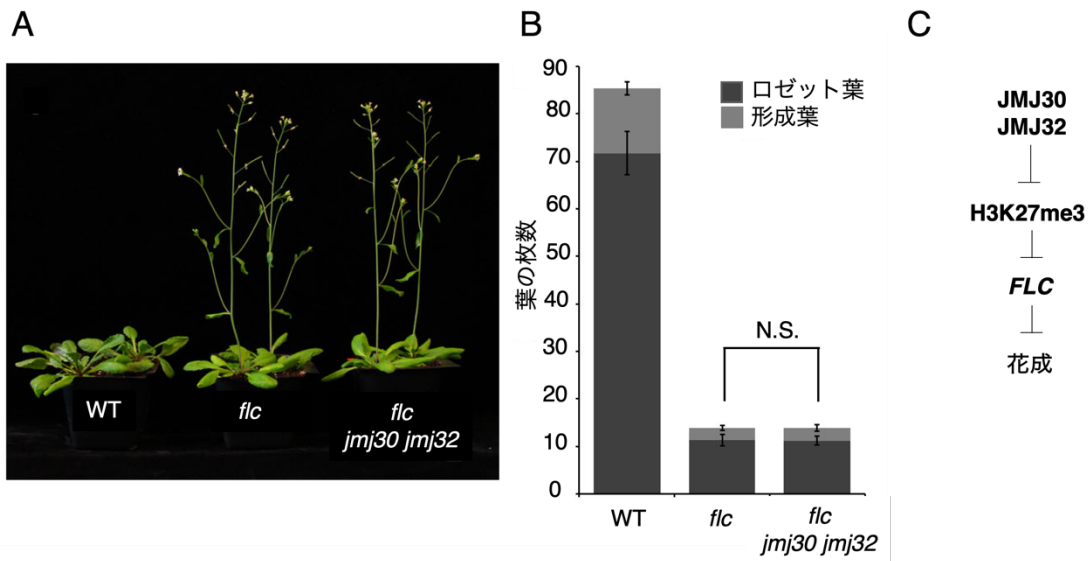


図 6. JMJ30 と JMJ32 は *FLC* を介して花成を抑制する

(A) 野生型 (Col-0 *FRI^{sf-2}*)、*flc* および *flc jmj30 jmj32* を常温で生育し、花成が起きるまでの期間を比較した写真。

(B) ボルティング時点のロゼット葉 (濃い灰色) と茎生葉 (灰色) の枚数。n=20。バーは SD を示す。One-way ANOVA の後、Turkey-Kramer test を用いて有意差検定を行なった。 ($p < 0.05$)

(C) JMJ30 と JMJ32 は、抑制型ヒストン修飾 H3K27me3 の蓄積量を減少させ、*FLC* の発現を促進させることで、花成を抑制する。

3-3. 春化の初期段階で *JMJ30* は *FLC* に先立って発現抑制される

春化における *JMJ30* と *JMJ32* の働きをさらに詳しく調べるために、春化の時系列に沿った遺伝子発現解析を行った。野生型の種子に対して春化処理なし、および春化処理として低温で6時間~6週間の処理を行った後、常温で3日間生育させた芽生えを用いて qRT-PCR を行った (図 7. A)。その結果、これまでの報告と合致して、*FLC* の発現量は春化処理なしの値と比べ、低温2週間以上の処理を行った芽生えでは 10-20%に抑制された (図 7. B)。これに対して、*JMJ30* の発現は低温3日の処理により春化処理なしの値の 22%に抑制された (図 7. C)。低温2週で *JMJ30* の発現は最も抑制されて 10%となり、低温4週でもほぼ同じレベルで発現抑制状態が維持されていたが、低温6週で *JMJ30* の発現量はやや増加していた。一方、*JMJ32* の発現量は春化の過程を通してほとんど変化しなかった (図 7. D)。以上の結果から、春化の初期段階で *JMJ30* の発現は *FLC* に先立って著しく抑制されることが示された。

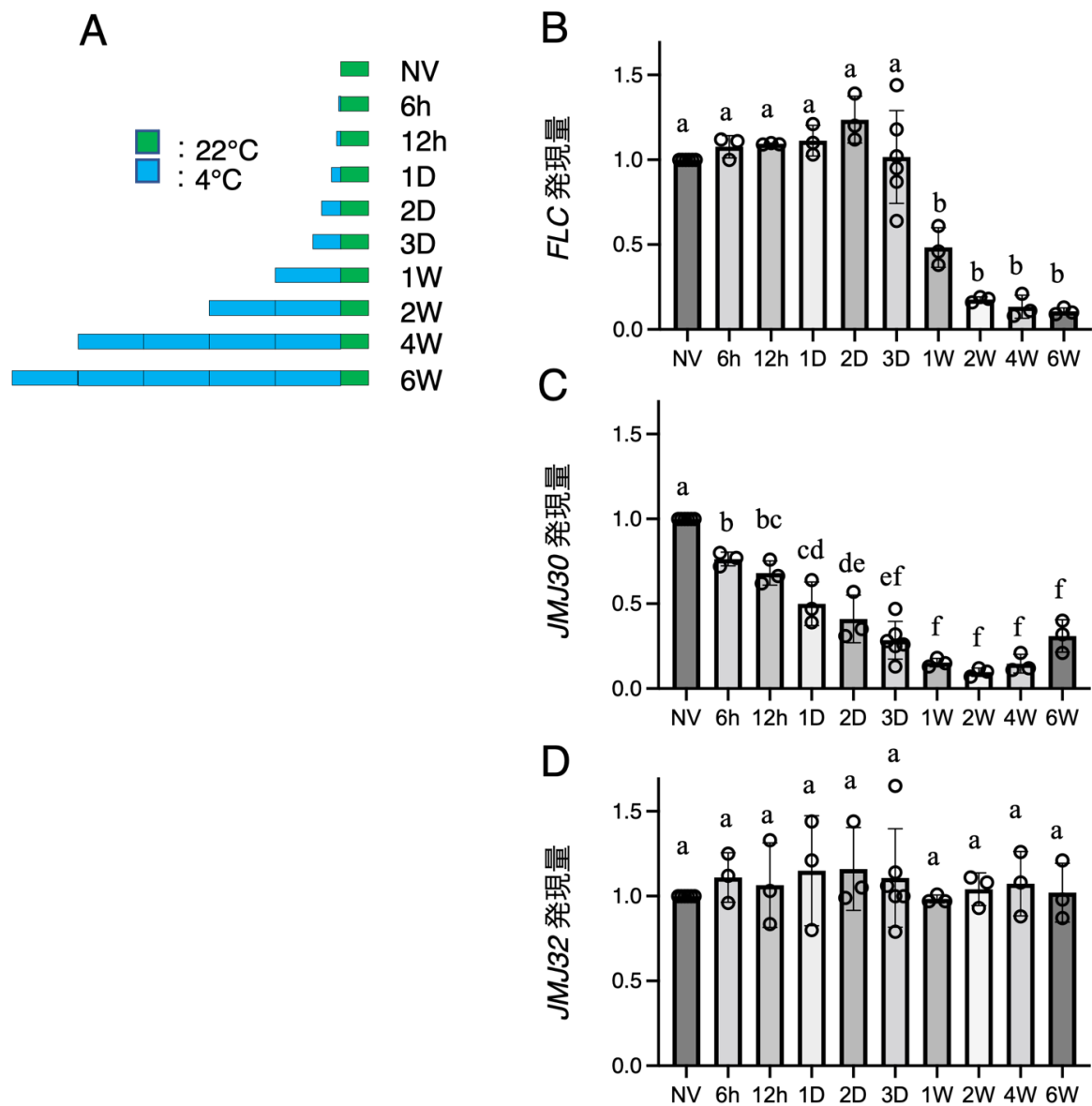


図 7. 春化の初期段階で *JMJ30* の発現は顕著に抑制される

(A) 実験条件の模式図。野生型 (*Col-0 FRI^{sf-2}*) の種子に対して春化処理なし (NV)、および、低温で6時間~6週間 (6h、12h、1D、2D、3D、1W、2W、4W、6W) の低温 (青色) で処理を行なった後、22°C で3日間生育した (緑色) 芽生えて遺伝子発現量を測定した。(B) *FLC* の遺伝子発現変化。(C) *JMJ30* の遺伝子発現変化。(D) *JMJ32* の遺伝子発現変化。*FLC* の値は *PP2A*、*JMJ30* と *JMJ32* の値は *EIF4* を内部標準として用い、NV の値を1としたときの相対発現量を示した。3回の Biological replicate の結果を示す。バーはSDを示す。One-way ANOVA の後、Turkey-Kramer test を用いて有意差検定を行なった。(a-f; $p < 0.05$)

3-4. *c-repeat binding factor* 変異体の種子では低温処理による *JMJ30* の発現の抑制がおこらない

春化の初期段階で *JMJ30* の発現が抑制される分子機構を明らかにするために、*JMJ30* 座への結合性が期待される転写因子を探索した。*JMJ30* 座において特徴的な塩基配列がないか探したところ、プロモーター領域の中に低温順化のマスター制御因子 CBF1、CBF2、CBF3 (以下、CBFs と呼ぶ)の結合配列である CRT 配列が見出された (図 8. A)。また、CBFs は春化の時系列に沿って発現が増加し、冗長的に働くことで植物の低温ストレス耐性を高めることが報告されている (Li et al., 2021)。以上のことから、春化の初期段階で CBFs が *JMJ30* 座のプロモーター領域に直接結合してその発現を抑制する可能性が示唆された。そこで、*cbf1 cbf2 cbf3* 三重変異体 (以下、*cbf123-2* と呼ぶ) を用いて、低温応答時の *JMJ30* の発現変化を調べた。野生型と *cbf123-2* の種子に対して、低温処理なし、あるいは低温で 72 時間の処理を行なった後、常温で 3 日あるいは 5 日生育させた芽生えを用いて qRT-PCR を行なった (図 8. B)。その結果、野生型では低温処理を行った時、低温処理なしの値と比べて *JMJ30* の発現量は約 30%に抑制されていた (図 8. C、E)。一方、*cbf123-2* では低温処理による *JMJ30* の発現抑制はほとんど見られなかった (図 8. C、E)。一方で、野生型と *cbf123-2* のどちらも *JMJ32* の発現は低温処理によらずほとんど変化しなかった。以上の結果から、種子において CBFs は低温依存的な *JMJ30* の発現抑制に必要であることが示唆された。

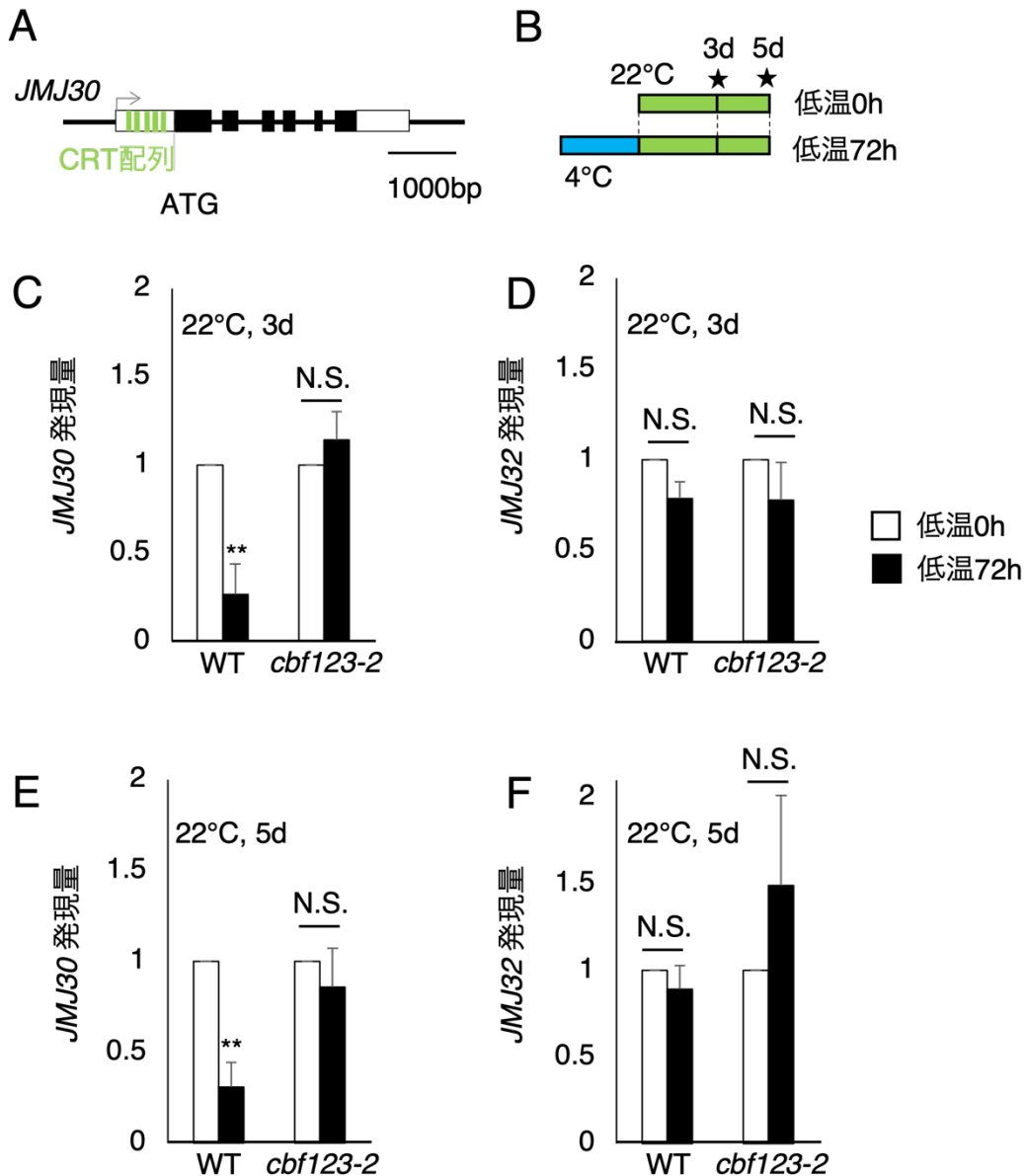


図 8. 72 時間の低温による *JMJ30* の発現抑制には、*CBFs* が必要である

(A) *JMJ30* 遺伝子の模式図。*JMJ30* 座のプロモーターには 5 つの CRT 配列がある。(B) 実験条件。野生型 (Col-0) および *cbf123-2* の種子に対して低温処理なしあるいは 72 時間の処理後、22°C で 3 日 (C, D) および 5 日 (E, F) 生育した芽生えで遺伝子発現量を測定した。(C) 処理後 3 日間生育した芽生えにおける *JMJ30* の発現量。(D) 同条件での *JMJ32* の発現量。(E) 処理後 5 日間生育した芽生えにおける *JMJ30* の発現量。(F) 同条件での *JMJ32* の発現量。EIF4 を内部標準として用い、野生型と *cbf123-2* それぞれ低温 0h の値を 1 とした時の相対発現量を示した。5 回の Biological replicate の結果を示す。バーは SD を示す。Student's T-test を用いて有意差を算出した。*: $p < 0.01$ 、N. S. 有意差なし

3-5. *late elongated hypocotyl circadian clock associated 1* 二重変異体の種子では低温処理による *JMJ30* の発現抑制がおこらない

概日時計の構成因子である *LHY* と *CCA1* は MYB 型の転写因子であり、*JMJ30* 座に直接結合して、その発現を抑制する (Lu et al., 2011)。また、*LHY* と *CCA1* の発現は温度応答性を持つことが報告されている (Mizuno et al., 2014)。このことから、低温環境下で *LHY* と *CCA1* の発現が増加し、*JMJ30* の発現が抑制される可能性が考えられた。

これを検証するために、22°C で 10 日間生育させた芽生えを 4°C で 72 時間処理し、*LHY* と *CCA1* の発現量を測定した (図 9. A)。その結果、低温処理を行った芽生えでは、低温処理なしの値と比べて、*LHY* の発現量が 1.2 倍に、*CCA1* の発現量が 2.8 倍に増加していた (図 9. B)。このことから、低温環境下では *LHY* の発現が促進されることが示唆された。

続けて、変異体を用いた解析を行った。*LHY* と *CCA1* は部分的に冗長性があるので (Mizoguchi et al., 2002)、*lhy cca1* 二重変異体を用いて、低温応答時の *JMJ30* の発現変化を解析した。野生型と *lhy-11 cca1-1* の種子に対して、低温 72 時間の処理を行った後、22°C で 5 日間生育させた芽生えにおける遺伝子発現量を測定した (図 10. A)。その結果、野生型では低温依存的に *JMJ30* の発現が抑制されたのに対し、*lhy-11 cca1-1* では *JMJ30* の発現抑制がほとんど見られなかった (図 10. B)。以上のことから、低温依存的な *JMJ30* の発現抑制には *LHY* と *CCA1* が必要であることが示唆された。

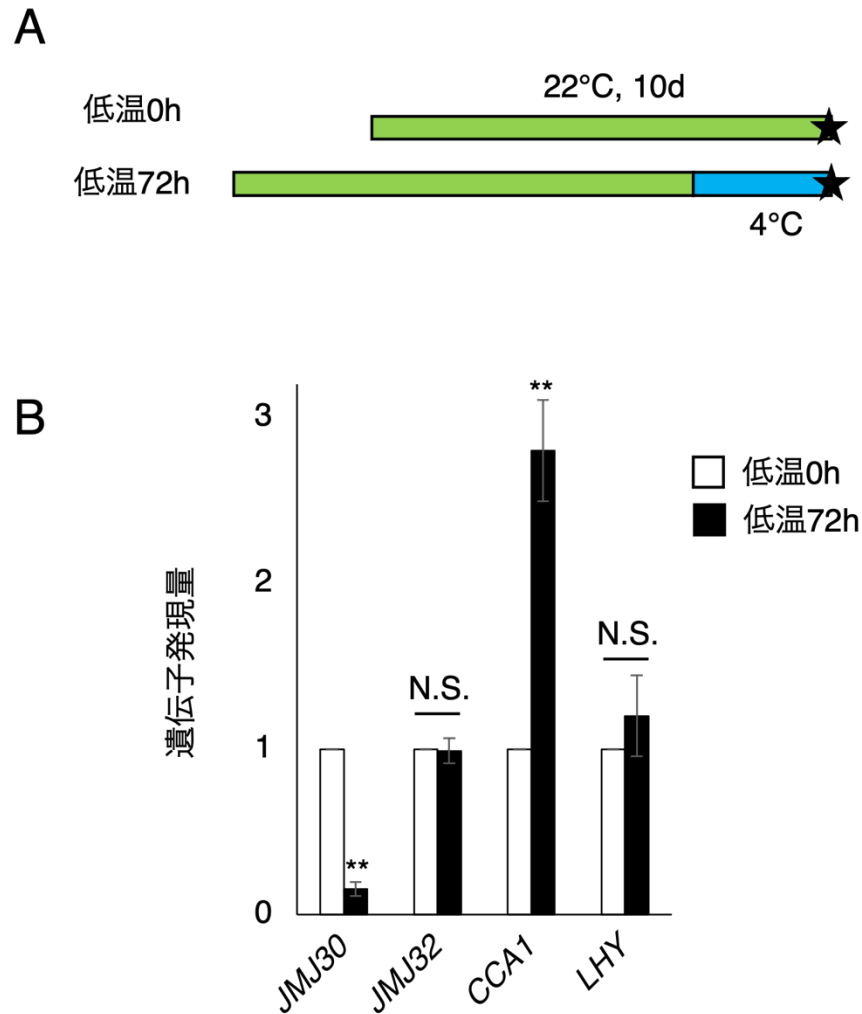


図 9. 10 日齢芽生えにおいて 72 時間の低温処理は *CCA1* の発現を促進する
 (A)実験条件。野生型 (Col-0) の 10 日齢芽生えに対して低温処理なしあるいは 72 時間の処理を行った後、遺伝子発現量を測定した。(B)各条件における *JMJ30*、*JMJ32*、*CCA1*、*LHY* の発現量。*JMJ30* と *JMJ32* の値は *EIF4*、*CCA1* と *LHY* は *UBQ* を内部標準として用い、低温 0h の値を 1 とした相対発現量を示した。3 回の Biological replicate の結果を示す。バーは SD を示す。Student's T-test を用いて有意差を算出した。**: $p < 0.01$ 、N. S.有意差なし

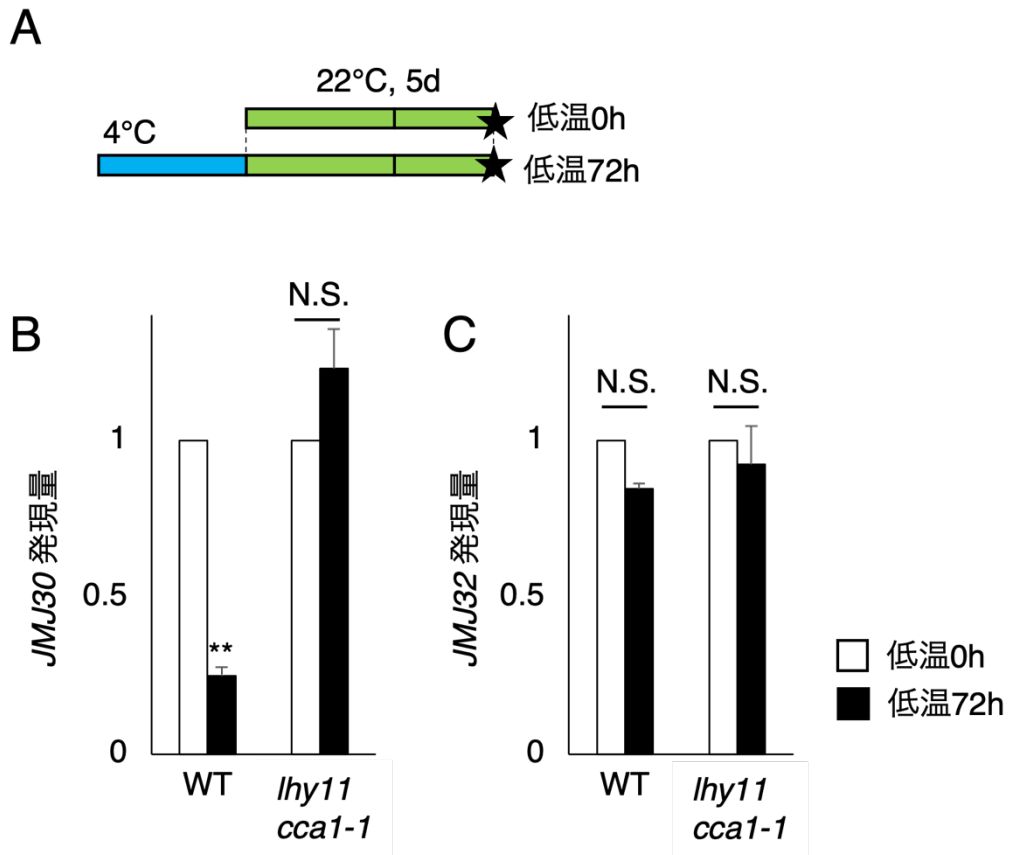


図 10. 72 時間の低温による *JMJ30* の発現抑制には、*CCA1*、*LHY* が必要である (A) 実験条件。野生型 (Col-0) と *lhy11 cca1-1* の種子に対して低温処理なしあるいは 72 時間の処理を行った後、22°C で 5 日間生育した芽生えで遺伝子発現量を測定した。(B) *JMJ30* の発現量。(C) *JMJ32* の発現量。EIF4 を内部標準として用い、野生型と *lhy11 cca1-1* それぞれ低温 0h の値を 1 とした時の相対発現量を示した。2 回の Biological replicate の結果を示す。バーは SD を示す。Student's T-test を用いて有意差を算出した。*: $p < 0.01$ 、N. S. 有意差なし

3-6. 春化過程で *JMJ30* 座における H3K27me3 の蓄積量は増加しない

長期の低温に応答して、PRC2 は *FLC* だけでなく、他の *FLC* ファミリーである *FLOWERING LOCUS M (FLM)*/*MADS AFFECTING FLOWERING 1 (MAF1)*、*MAF2*、*MAF3*、*MAF4*、*MAF5* の遺伝子座においても、H3K27me3 を導入することでエピジェネティックに発現を抑制している (Kim & Sung, 2013)。私は PRC2 が *JMJ30* 座においても H3K27me3 を導入し、エピジェネティックに発現を抑制するのではないかと考えた。そこで、春化処理なし、および春化処理として低温で 4 週間の処理をした後、7 日間生育した芽生えでクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を行い、H3K27me3 の蓄積量の変化を測定した (図 11)。なお、春化処理なしと比べて低温 4 週間の処理後 7 日間生育した芽生えでも *JMJ30* の発現抑制が見られた (図 11. B)。ChIP を行なった結果、先行研究の結果と一致して、低温 4 週の処理を行った時、*FLC* 座において H3K27me3 の蓄積量が有意に増加していた (図 10. C、E、Shirakawa et al., 2021)。一方、同じサンプルを用いて *JMJ30* 座の H3K27me3 を測定したところ、H3K27me3 の蓄積量の変化はほとんど検出されなかった (図 11. D、F)。以上の結果から、春化過程で起こる *JMJ30* の発現抑制には、H3K27me3 は関与していないと考えられた。

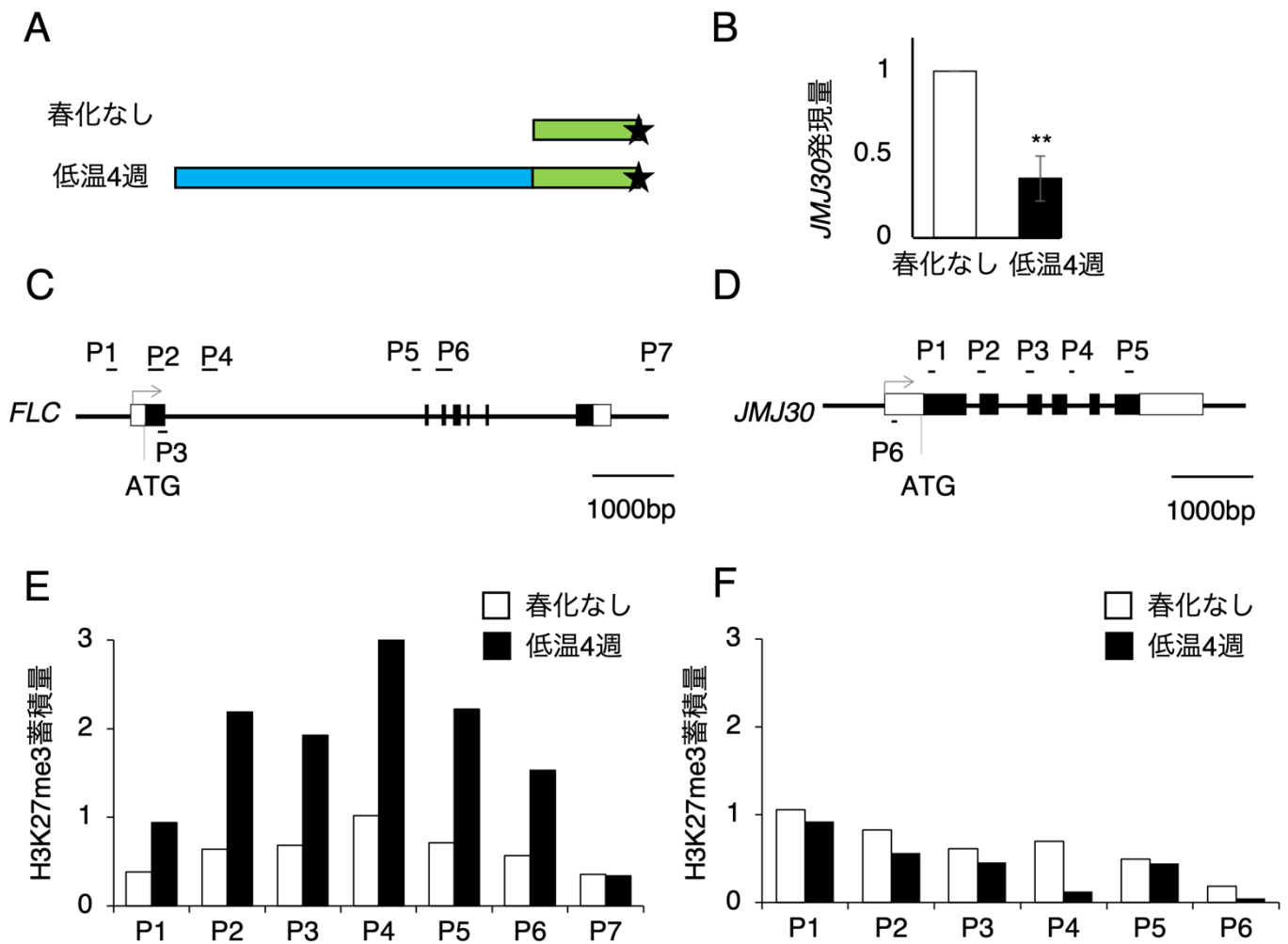


図 11. 低温による *JMJ30* の発現抑制に H3K27me3 は関与しない

(A) 実験条件。野生型 (Col-0 *FR1^{sf-2}*) を春化なし (NV) および低温 4 週 (V4W) の処理後、22°C で 7 日間生育した芽生えで qRT-PCR と ChIP-qPCR を行った。(B) 各条件の芽生えでの *JMJ30* 発現量。n=3。バーは SD を示す。(C) *FLC* 遺伝子の模式図とプライマーで増幅した領域。白は 5'、3'-UTR 領域、黒はエキソンを表す。バーで示した位置にプライマーを設計した。(D) *JMJ30* 遺伝子の模式図とプライマーで増幅した領域。白は 5'、3'-UTR 領域、黒はエキソンを表す。バーで示した位置にプライマーを設計した。(E) *FLC* 座における H3K27me3 蓄積量。Y 軸は、%インプット値を TA3 で補正した値。2 回の Biological replicate のうち代表的なものを示した。(F) *JMJ30* 座における H3K27me3 蓄積量。B と同じ条件の芽生えを用いて実験を行った。

3-7. CBF や LHY、CCA1 による *JMJ30* の発現制御には組織特異性がある

植物は、その発生段階や器官・組織に応じて異なる低温応答を示すことが知られている。そこで、種子の場合と同様に、芽生えにおいても CBF や LHY、CCA1 を介して *JMJ30* の発現が抑制されるかどうかを検証しようと考えた。そこで、野生型、*cbf123-2* および *lhy-11 cca1-1* の 10 日齢芽生えに対して、低温で 72 時間の処理を行い、遺伝子発現解析を行なった (図 12. A)。野生型の芽生えを低温処理したところ、低温処理なしの値と比べて *JMJ30* の発現が 20% に抑制された。また、*cbf123-2* と *lhy-11 cca1-1* を低温処理した時にも野生型と同程度に *JMJ30* の発現が抑制された (図 12. B、D)。以上の結果から、10 日齢芽生えでは CBFs と LHY と CCA1 は低温による *JMJ30* の発現抑制に関与しないと考えられた。つまり、低温による *JMJ30* の発現抑制は、種子と 10 日齢芽生えで異なる分子によって制御されていると示唆された。

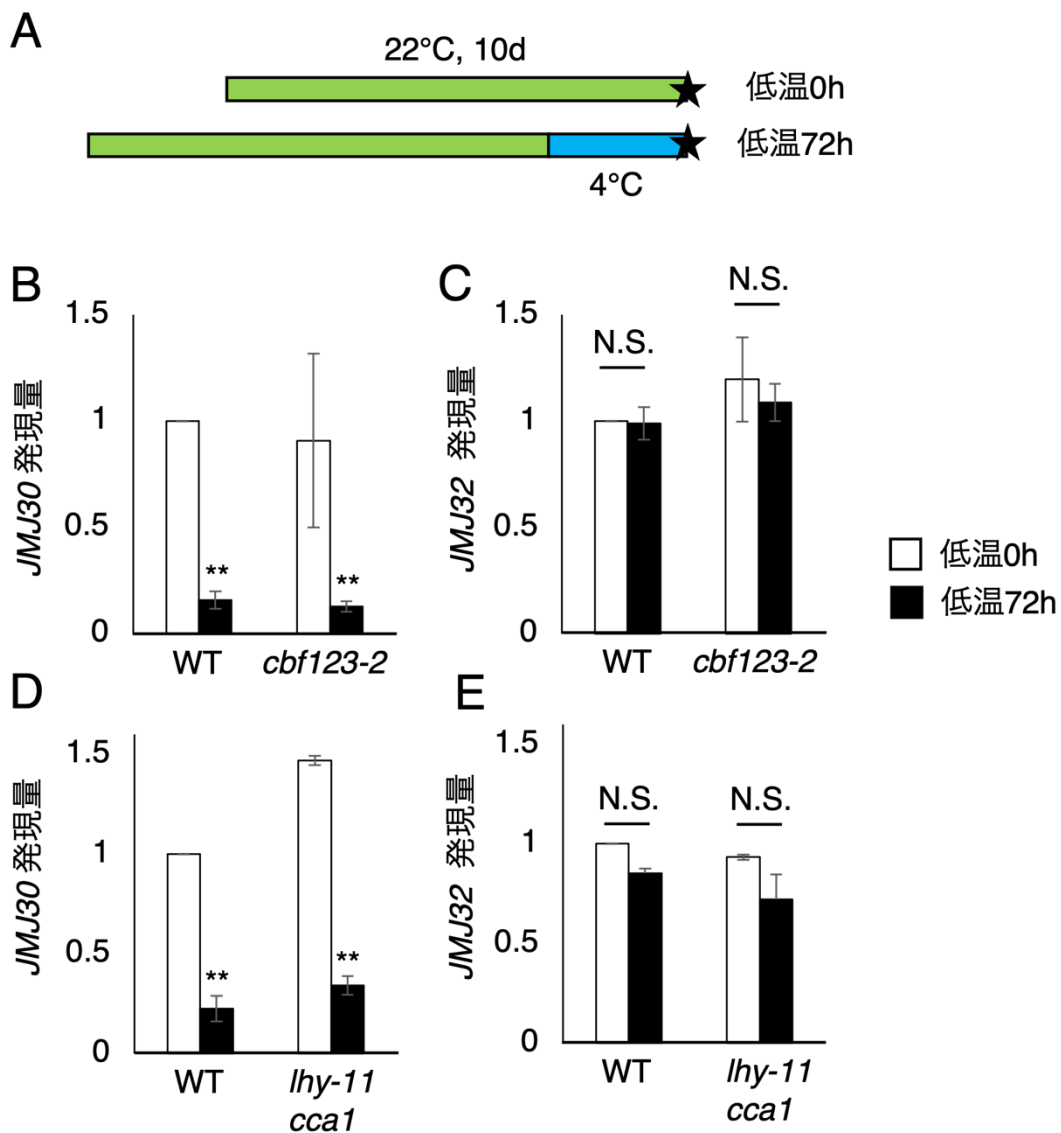


図 12. CBF や LHY、CCA1 による *JMJ30* の発現制御には組織特異性がある
 (A)実験条件。野生型 (Col-0)と *cbf123-2* あるいは *lhy-11 cca1* の 10 日齢芽生え
 に対して低温処理なしあるいは低温で 72 時間の処理を行った後、遺伝子発現
 量を測定した。(B)野生型と *cbf123-2* における *JMJ30* の発現量。(C)*JMJ32* の発
 現量。(D)野生型と *lhy-11 cca1* における *JMJ30* の発現量。(E)*JMJ32* の発現量。
EIF4 を内部標準として用い、野生型の低温 0h の値を 1 とした相対発現量。3
 回の Biological replicate の結果を示す。バーは SD を示す。Student's T-test を用
 いて有意差を算出した。**: $p < 0.01$ 、N. S.有意差なし

4. 考察

4-1. JMJ30 および JMJ32 は *FLC* 座において H3K27me3 の蓄積量が増加するタイミングを遅らせることで、春化に対して抑制的に働く

シロイヌナズナでは、ヒストン脱メチル化活性のある JUMONJI-C ドメインを持つ、21 種類の JMJ タンパク質が単離されている。このうち、H3K27me3 を除去することが報告されているのは、JMJ30、JMJ32、ELF6、REF6、JMJ13 の 5 つである。植物は時期・組織・遺伝子あるいは環境によって、異なるヒストン脱メチル化酵素を使い分けていると考えられている。そこで、これらのヒストン脱メチル化酵素の春化への関与を解析したところ、*jmj30 jmj32* 二重変異体では H3K27me3 の蓄積量が増加するとともに *FLC* の発現が抑制されるタイミングが早まり、春化が起りやすくなることを見出した (図 4-6)。一方で、*elf6 ref6 jmj13* では春化に異常が見られない (Yang et al., 2016)。以上の結果から、ヒストン脱メチル化酵素の中で、特に JMJ30 と JMJ32 が春化に対して抑制的な役割を果たすことが示唆された。さらに、*jmj30 jmj32* の表現型は低温 2~3 週で強まっていたことを合わせると (図 4、5)、JMJ30 と JMJ32 は春化の初期段階において *FLC* 座の H3K27me3 量を低レベルに維持する働きを持つと考えられる。そして、この JMJ30 と JMJ32 の働きにより、短い低温期間に応答して誤って春化が起こるのを妨げていると考えられる。

4-2. 春化の初期段階で *JMJ30* の発現は著しく抑制され、ヒストン脱メチル化活性の低下をもたらす

JMJ30 と JMJ32 は冗長的に働くが、その発現パターンは大きく異なる。*pJMJ30::JMJ30-GUS* と *pJMJ32::JMJ32-GUS* を常温で 7 日間生育して GUS 染色すると、*JMJ30-GUS* は *JMJ32-GUS* よりも顕著に濃く染まった (Gan et al., 2014)。したがって、JMJ30 タンパク質は JMJ32 よりも高蓄積していると考えられる。一方で、酵素活性を担うアミノ酸は JMJ30 と JMJ32 で保存されていたことを合わせると、ヒストン脱メチル化酵素としての寄与度は JMJ30 が JMJ32 よりも高いと考えられる。これを踏まえると、春化の初期段階における *JMJ30* の発現抑制は植物体内におけるヒストン脱メチル化活性の顕著な低下をもたらすと考えられる (図 7)。

一方で、春化の過程において *JMJ32* の発現量はほとんど変化しなかった (図 7)。また、乾燥条件や塩ストレス条件においても、*JMJ30* の発現は著しく誘導

されるのに対し、*JMJ32* の発現はほとんど変化しないことが報告されている (Qian et al., 2015)。しかし、春化を含む *JMJ30* の積極的な関与が示唆される生理現象において、*jmj30* 単一変異体では目立った表現型が観察されないが、*jmj30 jmj32* 二重変異体でははっきりとした表現型が観察される (Gan et al., 2014; Wu et al., 2019; Yamaguchi et al., 2021)。こうしたことから、*JMJ32* はヒストン脱メチル化活性に対する寄与度は低いものの、脱メチル化活性の恒常性を最低限維持する役割を持つと考えられる。したがって、*JMJ30* と *JMJ32* は冗長性を持ちつつも、異なった環境応答性を示すことで植物の環境変化への適応力を高めることに寄与していると考えられる。今後、*jmj30* あるいは *jmj32* 単一変異体における春化応答を解析する中で、*JMJ30* と *JMJ32* の役割の違いが明らかになっていくと期待される。

4-3. *JMJ30* の温度応答性の制御機構

JMJ30 は高温環境において mRNA レベルとタンパク質レベルで安定化することが報告されている (Gan et al., 2014)。しかし、この制御機構は明らかになっていない。本研究では、低温環境において *JMJ30* の発現が抑制されることを示した。そして、*JMJ30* の発現を抑制する転写因子を単離するために、同じく低温に対する応答機構として知られる低温馴化あるいは形態変化に関わる遺伝子群に着目した。

まず、*CBFs* は低温馴化のマスター制御遺伝子であり、春化の過程で発現が誘導されている (Jeon et al., 2021; Li et al., 2021)。また、*JMJ30* 座のプロモーター領域には *CBFs* の結合配列である CCGAC を含む cold responsive element (CRT/DRE) が複数見つかった。さらに、RNA-seq 解析より、*CBFs* 過剰発現体では *JMJ30* の発現が減少することが報告されていた (Park et al., 2015)。以上のことから、春化の初期段階で *CBFs* は *JMJ30* 座に直接結合して、*JMJ30* の発現を抑制する可能性が示唆された。そこで本研究では、*cbf* 三重変異体を用いて検証したところ、*CBFs* が低温依存的な *JMJ30* の発現抑制に必要であることが示唆された。

次に、*LHY* と *CCA1* は概日時計の中心振動子をコードする遺伝子であり、低温に依存して発現が誘導される (図 9)。*LHY* と *CCA1* は、*JMJ30* 座のプロモーター領域にある EEs 配列に直接結合して、*JMJ30* の発現を抑制する (Lu et al., 2011)。このことから、春化の初期段階で *LHY* と *CCA1* は *JMJ30* 座に直接結合して、*JMJ30* の発現を抑制する可能性が示唆されていた。そこで本研究では、

lhy cca1 二重変異体を用いて検証したところ、LHY と CCA1 が低温依存的な *JMJ30* の発現抑制に必要であることが示唆された。

これらの検証から、本研究では *cbf* 三重変異体と *lhy cca1* 二重変異体の両方で *JMJ30* の発現抑制がほぼ完全に起こらなかったことを明らかにした。この結果から、これらの因子群は、相加的に働くというよりも、どちらかが上流でどちらかが下流の関係があると考えられる。先行研究から、CCA1 と LHY は緩やかな温度低下に応答して、*CBFs* の発現を促進することで低温馴化を誘導することが報告されている (Kidokoro et al., 2021)。これを合わせると、低温環境下で LHY、CCA1 が *CBFs* の発現を促進し、*CBFs* が *JMJ30* の発現を抑制する可能性が示唆される。今後は *pCBFs::CBFs-MYC* のラインを用いて ChIP-qPCR 解析を行うことで、低温下で *CBFs* の *JMJ30* 座への結合性が増加するか検証し、*JMJ30* の温度応答の分子機構を明らかにしたい。

一方で、10 日齢芽生えでは *CBFs* と *LHY* と *CCA1* は低温による *JMJ30* の発現抑制に関与しないことが示唆された。一つの可能性として、*CBFs* は単独で転写抑制に働くのではなく、別の転写抑制因子のアダプター分子として働いていることが考えられる。そして常温での生育期間が続くと、この別の転写抑制因子が mRNA レベルあるいはタンパク質レベルで増加し、*CBFs* がなくても *JMJ30* 座に結合できるようになると考えられる。

4.4. 春化における *JMJ30* の寄与度

低温に晒されてから PRC2 が活性化され、*FLC* 座における H3K27me3 の蓄積量が増加し始めるまでには、2~3 週間の低温期間が必要である (図 13)。本研究により、*jmj30 jmj32* 二重変異体では、春化の過程で *FLC* 座の第一エキソン周辺において H3K27me3 の蓄積量が増加するタイミングが早まっていた (図 5. C)。この領域は春化の過程で、*FLC* 座において H3K27me3 の蓄積量が最初に増加する部位に該当する。以上のことから、春化の初期段階で *JMJ30* と *JMJ32* は *FLC* 座の H3K27me3 を低レベルに維持する働きをしていると考えられる。しかし、低温の期間が続くと *JMJ30* の発現は次第に抑制され、植物体内におけるヒストン脱メチル化活性が低下する。これにより、*FLC* 座における H3K27me3 の蓄積量の増加が始まり、春化が誘導されることが考えられる (図 13)。今後のさらなる解析によって、春化での H3K27me3 の制御における *JMJ30* の寄与度が明らかになると期待される。例えば、*JMJ30* プロモーター領域に任意のアミノ酸変異を加え、低温による *JMJ30* の発現抑制が起こらない系統を単離し、この系統の春化応答を観察する実験が考えられる。

また、低温依存的な *JMJ30* の発現抑制は CBFs、あるいは LHY、CCA1 が必要であることが示唆された。今後、*cbf123-2* および *lhy-11 cca1-1* 変異体の春化応答の観察を行うことで、その制御機構が明らかになると期待される。

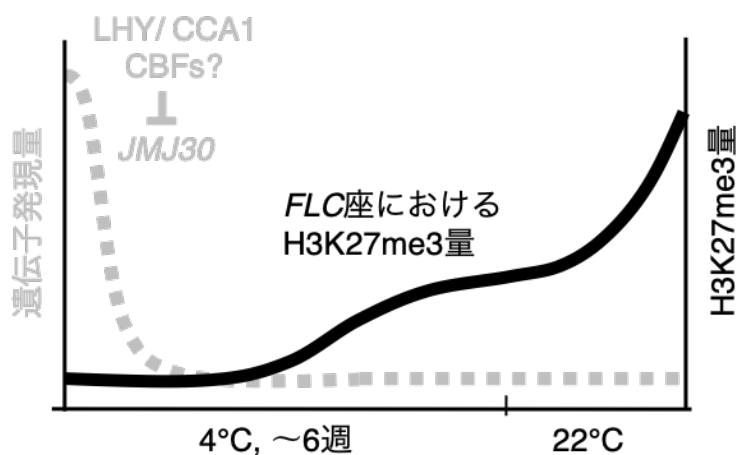


図 13. 本研究から予想される *JMJ30* の働き

低温に晒されると *JMJ30* の発現は次第に抑制され、植物体内におけるヒストン脱メチル化活性が低下する。これにより *FLC* 座における H3K27me3 の蓄積量の増加が始まり、春化が誘導される。また、*JMJ30* の発現は CBFs、あるいは LHY、CCA1 により抑制されると示唆された。

第2章 変異体スクリーニングによる脱春化応答に関わる因子の探索

1. 序論

1-1. 農業分野において、高温により脱春化を誘導できることが見出された

冬に十分に長い低温を経験した植物は、春化が誘導され、翌春に開花する。同種族の植物が春に一斉に花を咲かせると、他家受粉が促進され、遺伝的多様性を増やすことに繋がるため、繁殖する上で有利である。しかし、農業を営む者にとって、農作物が花を咲かせることは必ずしも良いことばかりではない。例えば、ダイコンやキャベツなどの根菜類は収穫前に花が咲くと、商品価値が著しく低下する。また、同じ時期に一斉に開花・結実すると、供給が需要を上回り価格が低下するほか、安定的な周年生産が阻まれる。こうした理由から、春化の可逆性には古くから関心が持たれてきた。

1945年、ライムギにおいて短期間の高温処理は、春化で誘導された花芽形成能を消失させ、脱春化を誘導できることが初めて見出された (Puvis & Gregory, 1945)。そこでは、低温処理期間が短いほど脱春化が起こりやすいこと、高温の影響は低温処理終了直後に受けやすく、常温の生育期間が長くなるにつれて脱春化は起こりにくくなること、が報告されている (Puvis & Gregory, 1945)。近年の農業現場では、トンネル・マルチ被覆を利用した高温処理により、根菜類が春の収穫前に抽台するのを防ぐ技術が用いられている。脱春化は、農作物の花成時期を人為的に調節し、周年生産を可能にする技術として有効である。

1-2. 脱春化の分子レベルでの解析は始まったばかりである

シロイヌナズナの脱春化には、春化と同様に、*FLC*のエピジェネティックな遺伝子発現制御が関与している (Périlleux et al., 2013; Bouché et al., 2015) (図14)。春化が誘導されるには、*FLC*座全域に渡ってH3K27me3が広がり、*FLC*の発現抑制状態が安定化することが必要である (Finnegan & Dennis, 2007; Angel et al., 2011)。これに対して、短期間の高温処理は、*FLC*座におけるH3K27me3の蓄積量を減少させ、*FLC*の発現抑制状態を解除することで、脱春化を引き起こす (Périlleux et al., 2013; Bouché et al., 2015)。高温の効果は、低温処理直後の植物で強く、常温での生育期間を経た植物では低下することから、脱春化は

FLC 座に H3K27me3 が広がっていく過程を阻害する反応であると考えられている。実際、この過程で働く PHD-PRC2 や LHP1 の変異体では、低温処理後に常温で生育するにつれて *FLC* 座における H3K27me3 の蓄積量が減少し、*FLC* の発現抑制状態が解除されることで脱春化と似たような現象が起こると報告されている (Yang et al., 2017)。しかし、高温による PRC2 の活性やタンパク質蓄積量への影響は不明である。脱春化の分子レベルでの解析はまだ始まったばかりで、春化後に高温下で *FLC* の発現抑制が解除される分子機構についてはほとんどわかっていない。

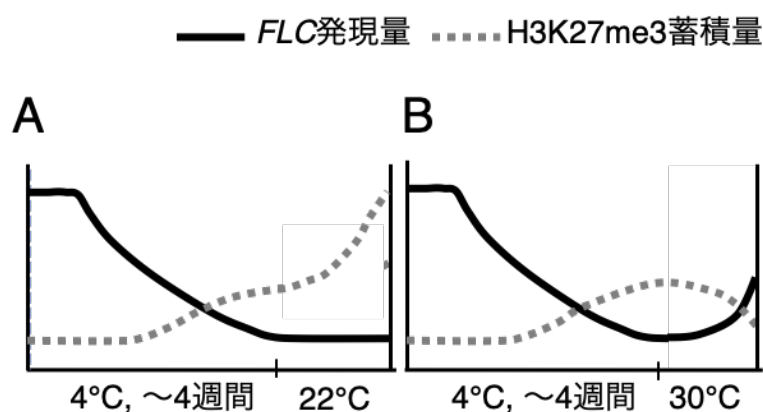


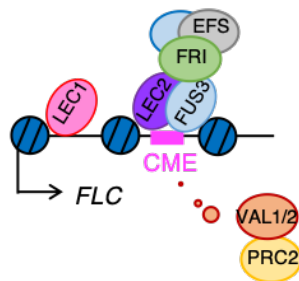
図 14. 温度に依存した *FLC* のエピジェネティック制御

(A) 十分な低温処理後、22°Cで生育すると H3K27me3 の蓄積量が増加し、*FLC* の発現が抑制される。

(B) 十分な低温処理後、30°Cで処理すると H3K27me3 の蓄積量が減少し、*FLC* の発現が上昇する。

1-3. 脱春化と既知の経路との関係は不明である

春化を通して確立された *FLC* の発現抑制状態は、世代交代に伴って解除される。この過程は、春化に対する抑制的な制御としてよく解析されている (図 15)。受粉後の胚発生初期に、まず種子特異的な転写因子をコードする *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)* の発現が誘導され、*FLC* のプロモーター領域に結合する (Tao et al., 2019)。これにより、*FLC* の第一エクソン周辺のクロマチン構造が弛緩する。次に、別の転写因子である *LEC2* と *FUSCA3 (FUS3)* が *FLC* の第一エクソンにある *CME* を認識して結合する。*LEC2*、*FUS3* を介して *FRI*、さらには *FRI super complex* が *FLC* 座にリクルートされ、*H3K4me3* や *H3K36me3* などの促進的ヒストン修飾の蓄積が増加する (Li et al., 2018; Tao et al., 2019)。一方で、*VAL1*、*VAL2* あるいは *PHD-PRC2* が *FLC* 座の *CME* から乖離し、*H3K27me3* の蓄積が減少することで、エピジェネティックな発現抑制状態が解除される (Tao et al., 2019)。ここにはヒストン脱メチル化酵素 *ELF6* の積極的な関与も示唆されている (Crevillén et al., 2014)。しかし、こうした因子の高温への応答性、さらには脱春化への関与は不明である。



● 促進的ヒストン修飾 (*H3K4me3*、*H3K36me3*など)

図 15. 世代交代に伴って起こる *FLC* の発現抑制状態の解除

胚発生初期に、*LEC1* が *FLC* のプロモーター領域に結合する。続けて、*LEC2*、*FUS3* が *CME* を認識して結合する。*LEC2*、*FUS3* を介して *FRI*、さらには *FRI super complex* が *FLC* 座にリクルートされ、*H3K4me3* や *H3K36me3* などの促進的ヒストン修飾の蓄積が増加する。一方で、*VAL1*、*VAL2* あるいは *PHD-PRC2* が *FLC* 座の *CME* から乖離し、*H3K27me3* の蓄積が減少することで、エピジェネティックな発現抑制状態が解除される。

1-4. 本研究の目的

シロイヌナズナは長期間の低温に晒されると、春化が誘導され、*FLC* 座の第一エクソン周辺に H3K27me3 が導入される。その後常温で生育すると、*FLC* 座全域に H3K27me3 が広がり、*FLC* の発現抑制状態が確立される。一方で、春化後に短期間の高温で処理すると、*FLC* 座から H3K27me3 の蓄積量が減少し、*FLC* の発現が再び上昇する。このように *FLC* 座における H3K27me3 の修飾状態は温度によって制御されるが、この制御機構については不明な点が多い。第一部では、春化の初期段階における JMJ30 が春化に対して抑制的な働きを持つことを報告した。そして、この結果から JMJ30 が脱春化にも関与する可能性が考えられた。しかし、*jmj30 jmj32* でも野生型と同様に、脱春化応答が観察され、JMJ30 は脱春化の鍵因子ではないことが示唆された。そこで本研究では、*FLC* ルシフェラーゼレポーターラインを用いた変異体スクリーニングを行い、脱春化を制御する因子を探索した。これにより、脱春化の分子機構を理解し、春化後の温度依存的な H3K27me3 の制御を明らかにすることを目指した。

2. 材料と方法

2-1. 植物材料

植物材料としては野生型シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)のエコタイプ Col-0 背景を用いた。*flc-3 FRI^{Sf-2}* は Col-0 エコタイプと Sf-2 エコタイプの掛け合わせにより作製された (Lee et al., 1993)。*FLC::LUC* は *FLC* 遺伝子の第 6 エキソンにコドンが一致するように *Luciferase* 遺伝子をつないで作製した DNA コンストラクト (*gFLC::luciferase*)を *flc-3 FRI^{Sf-2}* に導入して作製した (図 17. A)。

2-2. ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼレポーターを持つ植物の芽生えに対し、ルシフェリン溶液をスプレーした。ルシフェリン溶液は 1 mM L6882 SIGMA D-Luciferin sodium salt (GOLD TECHNOLOGY)を 0.01%の Triton X-100 に溶解したものである。スプレー後、10 分間静置して ImageQuant LAS 4000 ウェスタンパッケージ (GE ヘルスケア)でルシフェリンの発光を計測した。この時、10 分間のルシフェラーゼの発光の積算画像を得た。この発光を定量化するには付属ソフト ImageQuant TL Analysis Toolbox (GE ヘルスケア)を用いた。使用方法はプロトコールに準じた。各定量値からバックグラウンドの値を引いたものを統計処理した。この時、直径 0.5 cm 以下の生育不全の植物は解析から除外した。

2-3. 変異体ライブラリの作製

約 1500 粒の種子の入ったお茶パックを 0.2%および 0.25%のメタンスルホン酸エチル (EMS)溶液の入った 300 mL ビーカーに浸した。この EMS 溶液は 200 mL の水に 400 μ L および 500 μ L の EMS (Sigma 社)を加えることで作製した。ゆっくりスターラーを回しながらドラフト内、常温で 16 時間反応させた。反応後 3 時間は流水により洗浄した。土に蒔いて生育し、5-10 系統ごとに M2 種子を回収して変異体ライブラリとした。

2-4. 変異体スクリーニングの方法

ルシフェラーゼ活性を基に変異体スクリーニングを行った。スクリーニングは 2 ステップで行った。まず M2 世代で脱春化処理を行い、脱春化変異体の候補を単離した。変異体候補を自殖して M3 の種子を得た。次に M3 世代の同系

統の種子に対して春化処理と脱春化処理を行い、正常に春化が起こり、脱春化の表現型異常が再現する系統を単離した。

3. 結果

3-1. JMJ30 と JMJ32 は脱春化の鍵因子ではない

第一章では、JMJ30 と JMJ32 が *FLC* 座において H3K27me3 の蓄積量が増加するタイミングを遅らせることで、春化に対して抑制的に働くことを明らかにした。また、JMJ30 は高温環境下で mRNA レベルで発現が誘導され、タンパク質レベルで分解が抑制される (Gan et al., 2014)。以上から、JMJ30 と JMJ32 が脱春化にも関与する可能性が示唆された。また先行研究では、4 週間の低温処理により春化させた植物に対する 7 日間の高温処理は脱春化を誘導することが報告されていた (Périlleux et al., 2013)。そこで、野生型と *jmj30 jmj32* を同じ条件で処理し、脱春化応答を観察した (図 16. A)。

まず、葉の枚数を測定することで花成時期を比較した (図 16. B, C)。その結果、春化処理を行った時、第一部で示した結果と一致して、*jmj30 jmj32* は野生型よりも葉の枚数がわずかに減少し、早咲きの表現型を示した。一方で、春化処理の条件と比べて、春化後に高温で処理を加えた条件では、*jmj30 jmj32* は野生型と同様に、葉の枚数が増加し、花成時期が遅延することが観察された。

次に、野生型と *jmj30 jmj32* 二重変異体で、脱春化応答時の *FLC* の発現量の上昇率を比較した (図 16. D)。春化処理を行った芽生えと春化処理後に 30°C で 7 日の処理を加えた芽生えで、*FLC* の発現量を測定し、高温処理による *FLC* の発現量の上昇率を算出した。その結果、*jmj30 jmj32* 二重変異体でも野生型と同様に、1.8 倍程度 *FLC* の発現が上昇し、脱春化が誘導された。

以上の結果から、JMJ30 と JMJ32 は脱春化の鍵因子ではないことが示唆された。つまり、脱春化が誘導されるには他のヒストン脱メチル化酵素もしくは、全く新しい分子機構が必要であることが考えられた。

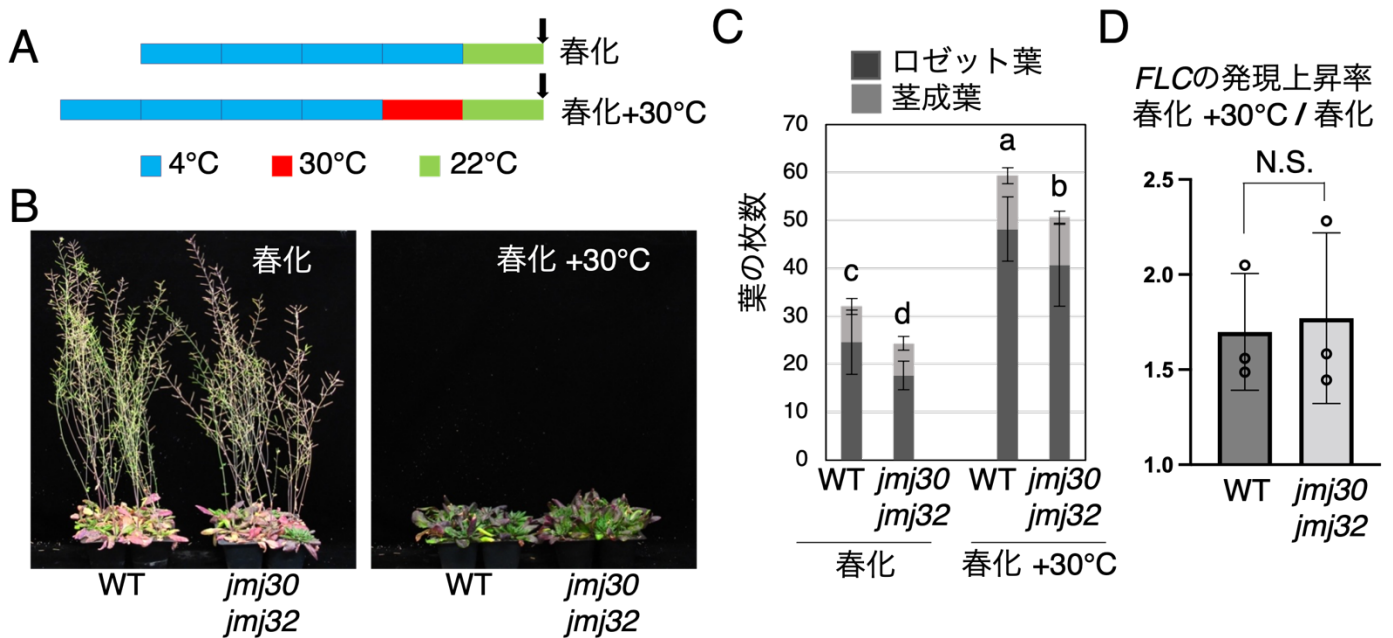


図 16. JMJ30 と JMJ32 は脱春化の鍵因子ではない

(A) 実験条件の模式図。低温で4週間の処理 (春化)、あるいは春化処理後に30°Cで7日の処理 (春化+30°C)を行った。(B) 野生型と *jmj30 jmj32* の種子に対して、Aの条件で処理した後に花成が起きるまでの期間を比較した写真。(C) 抽台 (bolting ボルティング) 時点のロゼット葉 (濃い灰色)と茎生葉 (灰色)の枚数。n=20。バーはSDを示す。One-way ANOVAの後、Turkey-Kramer testを用いて有意差検定を行なった。(a-d; $p < 0.05$) (D) 脱春化応答時の *FLC* の発現量の上昇率。春化処理を行った芽生えと春化処理後に30°Cで7日の処理を加えた芽生えで、*FLC* の発現量を測定し、高温処理による *FLC* の発現量の上昇率を計算した。3回の Biological replicateの結果を示す。バーはSDを示す。Student's T-testにより有意差を算出した。

3-2. 6日の高温処理は *FLC* の発現回復を誘導するのに十分であるが、3日の処理は十分ではない

脱春化応答は高温依存的に起こる反応であることから、高温に応答して何らかの因子の働きが変化し、*FLC* の発現抑制状態が解除されると考えられる。そこで、候補因子を単離し、脱春化の分子機構を解明するために、脱春化誘導条件を検討し、変異体スクリーニングを行なった。まず、*FLC* の発現を非侵襲および定量的に測定するためにルシフェラーゼによるレポーターライン、*FLC::LUC* を作製した (図 17. A)。次に、*FLC::LUC* の種子に対して春化処理なし、および春化処理として低温で4週間の処理を行った後の芽生えでルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、春化処理なしの芽生えでは強いルシフェラーゼ活性が見られたが、春化処理を行った芽生えでは活性がほとんど見られなかった (図 17. B)。また、ルシフェラーゼ活性を定量化すると、春化処理なしと比べて春化処理後の芽生えでは約3%まで低下していた (図 17. C)。これは長期間の低温により *FLC* の発現が著しく抑制されるとの報告と合致しており、構築した系を用いて *FLC* の発現量を定量的に測定できることを示している。

次に春化処理後に 30°C で3日あるいは6日の処理を加えた後の芽生えでルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、30°C、3日では春化処理のみのときと同様にルシフェラーゼ活性が見られなかったのに対し、30°C、6日の処理を加えた芽生えではルシフェラーゼ活性が部分的に回復していた (図 17. B)。定量化したところ、その回復度合いは春化処理なしの値と比べて25%、春化処理のみの値と比べて7.8倍であった (図 17. C)。以上の結果から、春化後の植物に対する6日の高温処理は、*FLC* の発現回復を誘導することが示された。

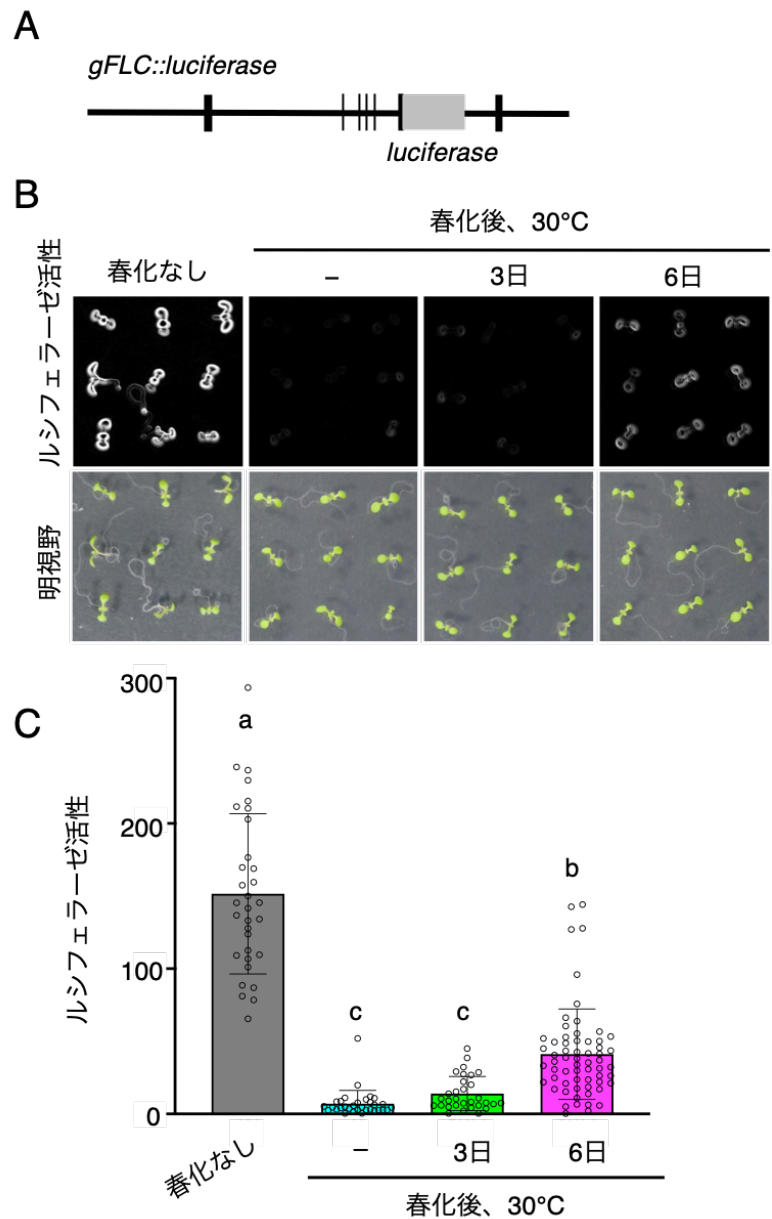


図 17. 6 日の高温処理は *FLC* の発現回復を誘導するのに十分であるが、3 日の処理は十分ではない

(A) *FLC::LUC* レポーターの模式図 (B) 各条件で処理した芽生えのルシフェラーゼ活性。5 回のバイオロジカルレプリケートのうち代表的なものを示す。*FLC::LUC* を春化なし、春化および春化後 30°C で 3 日または 6 日の高温処理を行った芽生えでルシフェラーゼ活性を測定した。5 回のバイオレプリケートのうち、代表的なものを示した。(C) B の各条件でそれぞれ 36 個体以上のルシフェラーゼ活性の結果を定量化した。One-way ANOVA の後、Turkey-Kramer test を用いて有意差検定を行なった。(a-c; $p < 0.05$)

3-3. 変異体スクリーニングによる脱春化亢進変異体の単離

脱春化が高温の日数に依存して誘導されたことを踏まえて、スクリーニングの方法を考えた。3-2の結果では、春化处理のみと比べて、春化处理後に30°C、6日の処理を加えた野生型の集団は、統計的にはFLCの発現回復が誘導されているものの、個体ごとの回復度合いにバラツキが大きく、FLCの発現がほとんど見られない個体も複数含まれていた(図17.C)。したがって、同条件でFLCの発現が低い脱春化がおこらない変異体を選抜する方法では、スクリーニング過程で偽陽性が多く含まれると考えられた。一方で、春化处理後に30°C、3日の処理を加えた野生型の集団は、春化处理のみの集団と同様に、全体としてFLC発現量が低い水準に留まり、個体間のバラツキも相対的に小さかった(図17.C)。そこで、同条件でFLCの発現が強く見られる脱春化亢進変異体を選抜する方法でスクリーニングを行うことにした。

まず、FLC::LUCを0.2%、0.25%のメタンスルホン酸エチル(EMS)でそれぞれ変異原処理し、合計して約3000系統のM1植物由来のM2の変異体ライブラリを作製した。次に、15,173系統のM2個体に対して、春化後に30°C、3日の処理を加え、ルシフェラーゼ活性に基づいてスクリーニングし、最終的に1系統、#439を脱春化亢進変異体として単離した(図18.D)。*#439*のM3個体は春化处理によりルシフェラーゼ活性が消失し、FLCの発現が抑制されていたことから、春化応答に異常が見られないことが示唆された。また、*#439*のM3個体は春化处理後に30°C、3日の処理を加えると、ルシフェラーゼ活性が上昇し、FLCの発現回復が誘導されていたことから、*#439*は脱春化亢進変異体であることが示唆された(図18.A-C)。また、*#439*は個体ごとの脱春化亢進の表現型の強さにバラツキが大きかった。

次に、変異の優劣性を調べるために、変異体のM3個体を親株であるFLC::LUCに戻し交配してF1植物を作製し、脱春化亢進の表現型を観察した。交配親とF1に対して、春化处理なし、春化处理および春化处理後に30°C、3日の処理を加えた芽生えでルシフェラーゼ活性を比較した(図19.A)。その結果、春化处理後の30°C、3日に処理を加えた条件において、F1では野生型よりも強く、*#439*よりも弱いルシフェラーゼ活性を示した。つまりF1では部分的に脱春化亢進の表現型が観察された。以上の結果は、*#439*の変異が半優性であることを示唆している。

さらに、F2個体に対しても同じ処理を行い、脱春化亢進の表現型を観察した。*#439*の変異が半優性であるとの予想と一致して、F2のルシフェラーゼ活性は、(1)野生型と同程度の個体、(2)*#439*と同程度の個体、(3)野生型と*#439*

の中間程度の個体が出現した(図 19. B)。#439 の変異が半優性であることを考慮して、原因遺伝子の同定を進める必要がある。

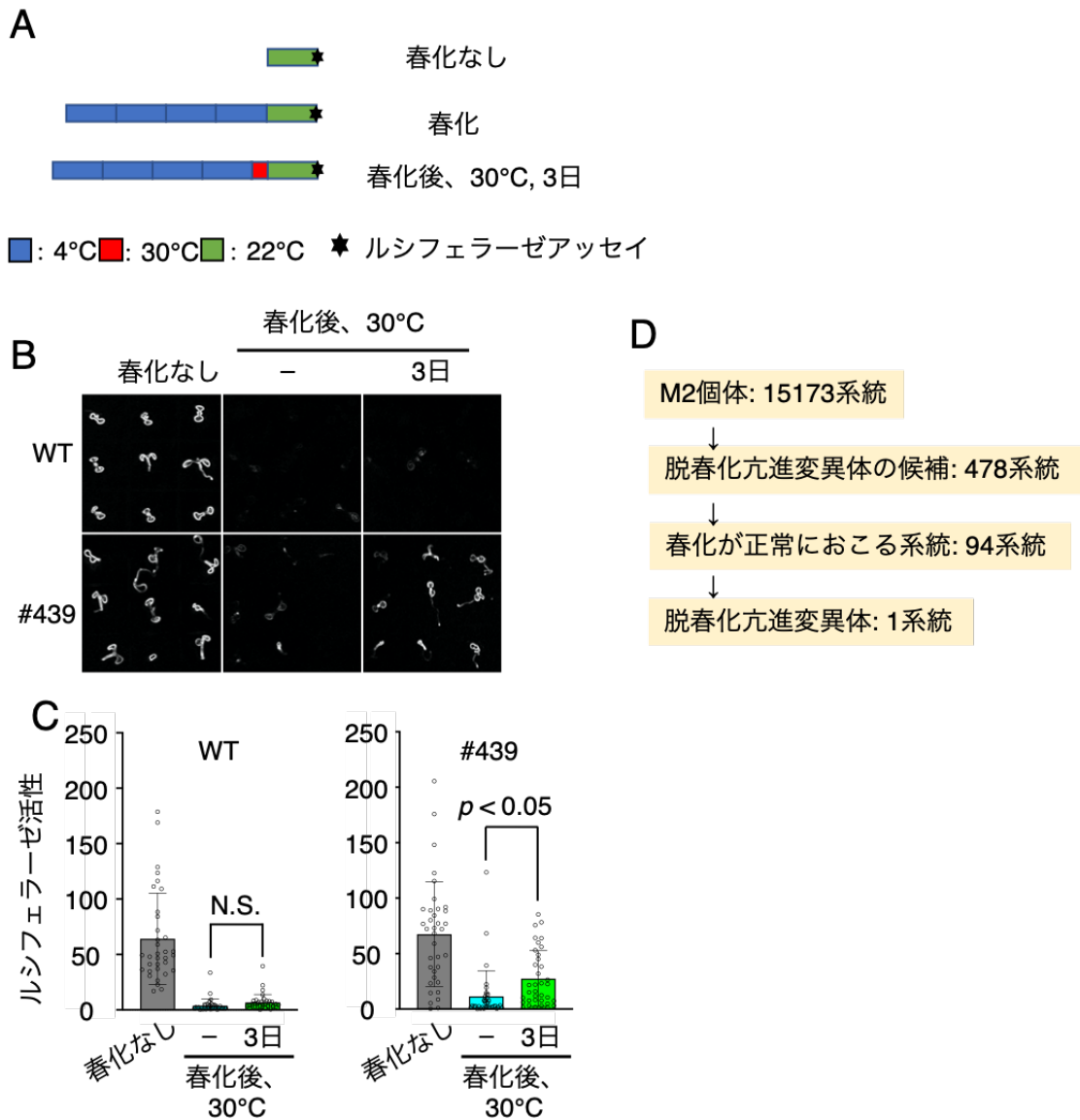


図 18. 脱春化亢進変異体の単離

(A) 実験条件 (B) 各条件で処理した芽生えのルシフェラーゼ活性。野生型と #439 における各条件でのルシフェラーゼ活性。3 回の Biological replicate のうち代表的なものを示した。(C) B の各条件でそれぞれ 36 個体以上のルシフェラーゼ活性の結果を定量化した。One-way ANOVA の後、Turkey-Kramer test を用いて有意差検定を行なった。(D)スクリーニングの流れ。

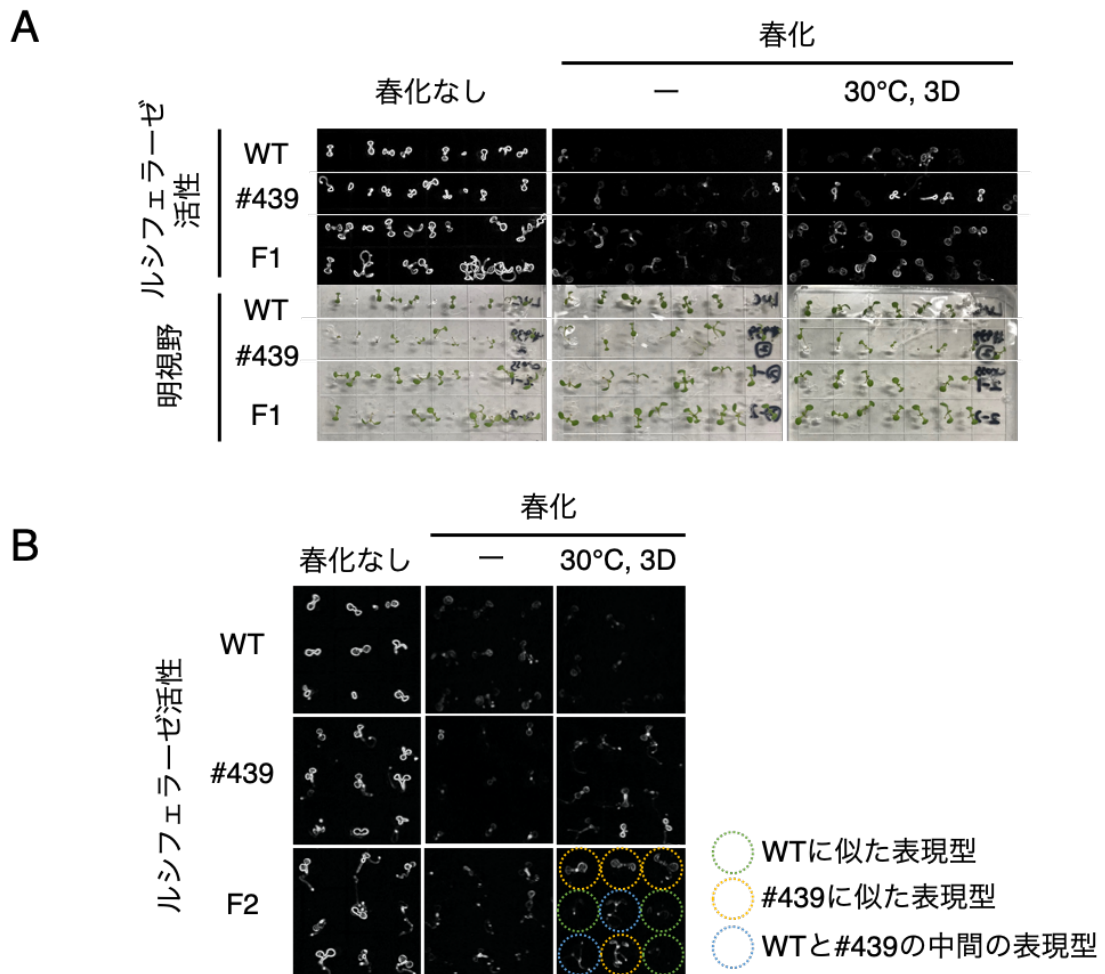


図 19. #439 がもつ変異は半優性である

(A) 各条件で処理した芽生えのルシフェラーゼ活性。野生型、#439、および F1 に対して春化なし、春化および春化後 30°C、3 日の処理を加えた芽生えでルシフェラーゼ活性を測定した。各条件 n > 8。実験は 1 回だけ行なった。(B) 各条件で処理した芽生えのルシフェラーゼ活性。野生型、#439、および F2 に対して春化なし、春化および春化後 30°C、3 日の処理を加えた芽生えでルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 考察

4-1. 脱春化の生理学的意義

農業上の利点から、古くから春化の可逆性に関心が持たれ、高温により脱春化を誘導できることが見出された (Puvis & Gregory, 1945)。そこでは、低温処理期間が短いほど脱春化が起りやすいこと、高温の影響は低温処理終了直後に受けやすく、常温の生育期間が長くなるにつれて脱春化は起りにくくなること、が記述されている (Puvis & Gregory, 1945)。近年の農業現場では、トンネル・マルチ被覆を利用した高温処理により、ダイコンやキャベツなどの根菜類が春の収穫前に抽台するのを防ぐ技術が用いられている。脱春化は、農作物の花成時期を人為的に調節し、周年生産を可能にする技術として有効である。一方で、自然界では、冬が終わりを迎える時期に突然 30°C に近い日が訪れ、脱春化が誘導される例は観測されていないが、おそらく脱春化応答を備えることで植物は不適な温度条件で花成が誘導されることを避けていると考えられる。

近年、高温との関係性は不明であるものの、春化に対して抑制的に働く制御が幾つか報告されている。例えば、秋口に気温が低下し、最低気温は十分に低い、最高気温が 15°C に達するうちは、*FLC* のエピジェネティックな発現抑制が誘導されない (Hepworth et al., 2018)。あるいは、多年草では春に開花した後、植物体の一部で *FLC* の発現抑制状態が解除されることで夏にかけて生殖成長から栄養成長への再転換が起こる (Aikawa et al., 2010)。これは、植物体の一部が脱春化されたと考えられる。こうした制御は、気温変動が激しい自然環境で、冬が過ぎ去って春を迎えたことを確実に捉えるために獲得したと考えられている。こうした制御に働く分子と高温との関係性が明らかになると、脱春化をより広い視点で見ることが可能となり、脱春化の生理学的意義を深く理解することにつながると考えられる。

4-2. 表現型から予想される#439の変異型タンパク質の機能

本研究では変異体スクリーニングを行い、脱春化亢進変異体#439の単離に成功した。#439では春化に異常が見られなかったことから、#439の原因遺伝子は、第一部で触れた CBF や JM30 のような H3K27me3 の導入の時点で働く因子との関連性は低いと考えられる。一方で、#439は脱春化亢進の表現型を示したことから、原因遺伝子は春化後の時点で *FLC* 座において働く因子との関連性

が高いと考えられる。春化後の *FLC* 座では、*FLC* の発現抑制状態を安定化しようとする維持機構と解除しようとする消去機構が拮抗している (Tao et al., 2017; Yang et al., 2017; Tao et al., 2019)。したがって、脱春化が誘導されるには、高温シグナル依存的に維持機構は不活化し、消去機構は活性化される必要がある。#439 ではこの経路が亢進していたことから、#439 で翻訳された変異型タンパク質は *FLC* の発現抑制状態の維持機構あるいは消去機構において、酵素活性や DNA 結合性を持つ部位で高温による構造変化が起りやすくなっていると考えられる。

脱春化亢進変異体#439 を *FLC::LUC* と交配させて得た F1 個体においても、脱春化亢進の表現型が観察されたが、#439 よりも表現型は弱かった。この結果から、#439 の脱春化亢進の変異は半優性であると考えられた。しかし F2 個体において、脱春化亢進の表現型の分離が曖昧で、野生型と変異型のヘテロと変異型ホモをルシフェラーゼ活性に基づいて厳密に区別することはできなかった。1つの可能性として、変異型ホモの表現型のバラツキが大きいことが原因ではないかと考えられる。今後は F3 世代の脱春化亢進の表現型の観察から遡って、F2 の表現型を厳密に評価し、変異をホモでもつ F2 個体を 100 系統程度集めてゲノムシーケンスを行うことで、原因遺伝子が同定され、変異型タンパク質の機能が明らかになっていくと期待される。

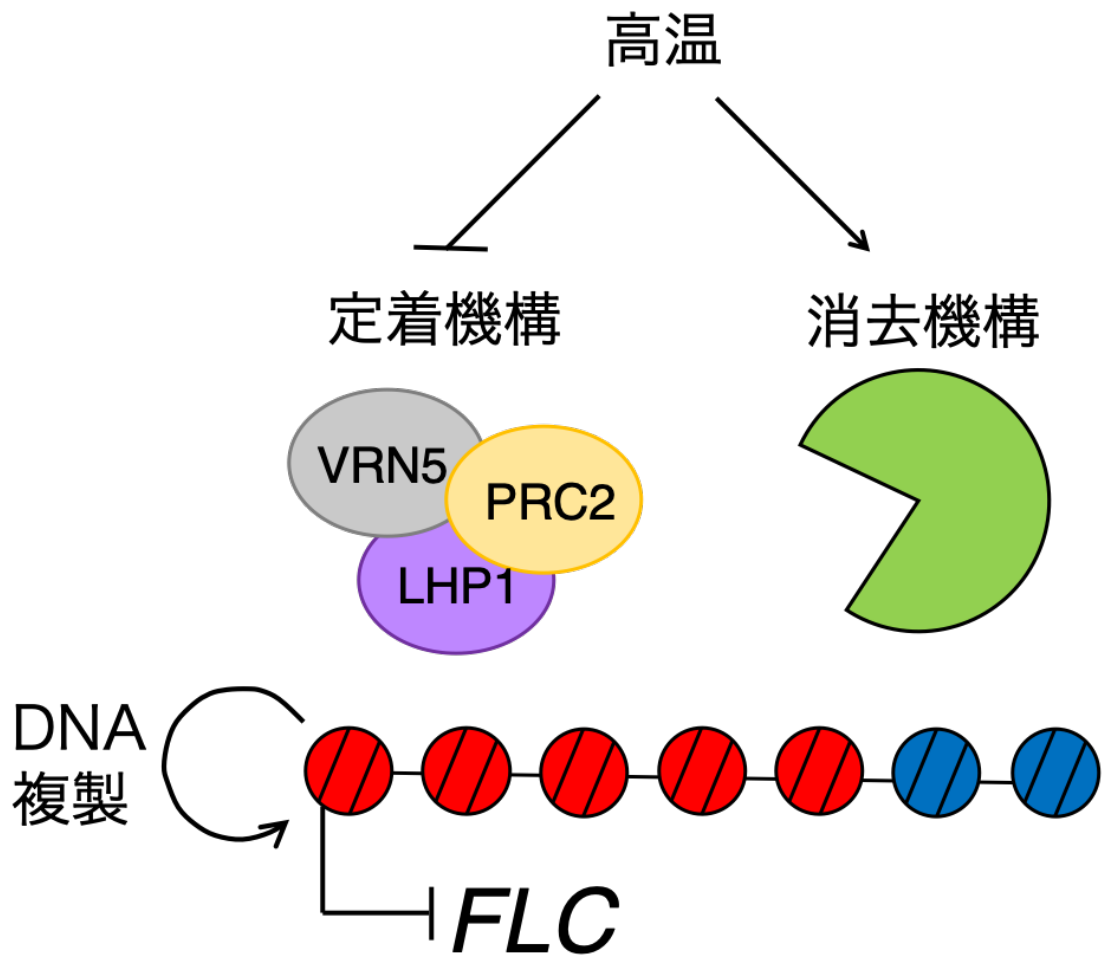
4-3. 予想される脱春化の分子機構

脱春化現象は 1945 年に初めて Nature 誌で報告された (Puvion & Gregory, 1945)。過去 30 年におよぶ分子遺伝学的的な解析により、春化の過程で起こる *FLC* のエピジェネティックな発現制御について数多くの発見がなされた。また近年では、春化に対する抑制的な制御も幾つか報告されている。しかし、こうした制御への高温の影響は解析されておらず、脱春化の分子レベルでの研究はまだ始まったばかりである。

所属研究室では、ケミカルスクリーニングのアプローチでも脱春化の分子機構の解明に迫ろうとしている (Shirakawa et al., 2021)。春化させた芽生えにおいて、新規化合物 DVR01 の処理は *FLC* の発現を促進し、花成を遅延させることで、脱春化と同様の現象を引き起こした。また、春化により増加した *FLC* 座の H3K27me3 蓄積量は、DVR01 の処理を行うことで著しく減少した。今後は、DVR01 と相互作用するタンパク質を IP-MS により同定することで、脱春化の分子機構に迫っていくことが期待されている。

最後に、これまでの知見を引用しながら、予想される脱春化の分子機構について考察する。*FLC* 座における H3K27me3 の蓄積は、低温下では第一エキソンとイントロンの境界周辺に限られる。しかし、十分な低温経験後に常温に移されると、H3K27me3 が *FLC* 座全域に渡って広がり、定着していく。これは常温下で、DNA 複製と連動しながら H3K27me3 の定着機構が働くためであると考えられている。もし定着に働く LHP1 や PHD-PRC2、CAF1 の機能が欠損している場合、DNA 複製とともに H3K27me3 が消失し *FLC* の発現が上昇することで、脱春化と同様の現象が起こる (Jiang & Berger, 2017; Yang et al., 2017)。また、シロイヌナズナの Lovvik 1 (Lov-1) は野生型であっても、春化後に常温で生育を続けると、やがて PRC2 の構成因子である CLF や SWN が *FLC* 座から乖離し、*FLC* の発現抑制状態が解除される (Qüesta et al., 2020)。多年草シロイヌナズナ *A. halleri* でも同様の制御が働き、*FLC* の発現抑制状態が解除されると考えられている (Aikawa et al., 2010; Nishio et al., 2020; Qüesta et al., 2020)。これまで、PRC2 を含む H3K27me3 の定着機構の働きに対して、高温が直接的な影響を与えるという報告はなされていない。しかし以上の事実から、おそらく高温環境では、定着機構が効率的に働くことができず、脱春化が誘導されるのではないかと考えられる (図 20)。今後、脱春化応答を詳しく解析することで、高温環境における PRC2 の挙動について新しい知見が得られると期待される。

また、世代交代に伴って *FLC* の発現が再び上昇する現象において、ヒストン脱メチル化酵素の積極的な関与、あるいは FRI super complex が *FLC* に再びリクルートされる制御が働き、*FLC* 座から H3K27me3 が消去されると報告されている (Crevillén et al., 2014; Tao et al., 2017; Tao et al., 2019)。高温環境においても同様の消去機構が活性化され、脱春化が誘導される可能性も考えられる。既知のヒストン脱メチル化酵素のうち、JMJ30 は高温環境で安定化され *FLC* 座から H3K27me3 を除去することが報告されていたので (Gan et al., 2014)、JMJ30 が脱春化に関与すると予想された。しかし、*jmj30 jmj32* においても脱春化は観察された。*ref6 elf6 jmj13* も含めた *jmj30 jmj32 ref6 elf6 jmj13* を用いた解析は行っていないこと、ヒストン脱メチル化酵素は冗長性が強いことを合わせると JMJ30 が脱春化に寄与している可能性は十分に反証できていない。しかしその一方で、他にも高温下で活性化されているヒストン脱メチル化機構があり、これが脱春化の過程で *FLC* 座に作用する消去機構として働く可能性も十分考えられる (図 20)。そこには FRI や、FRI を *FLC* 座にリクルートする LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1) や LEC2、FUSCA3 も含まれるかもしれない (Tao et al., 2019)。今後、*FLC* の発現促進に働くエピジェネティックな制御因子や転写因子に対する高温の影響が明らかになると、脱春化の分子機構の解明に近づくことができると期待される。





-  促進的ヒストン修飾 (H3K4me3、H3K36me3など)
-  抑制的ヒストン修飾 (H3K27me3)

図 20. 予想される脱春化の分子機構

春化後の *FLC* 座では PHD-PRC2、LHP1 を含む定着機構と何らかの消去機構が H3K27me3 に対して拮抗的に作用している。高温環境下では、定着機構が効率的に働けなくなるか、消去機構が活性化されるために、*FLC* 座における H3K27me3 の蓄積量が減少し、脱春化が誘導されると考えられる。

5. 結論

植物は一生を通じて、自らを取り巻く周りの環境の変化に対して、発生や形態を調和させることで、適切に応答している。ヒストン修飾を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御は、様々な環境応答に深く関わっており、本研究のテーマである春化と脱春化における花成制御はその代表例である。

本研究は、ヒストン脱メチル化酵素 JMJ30 と JMJ32 に着目して春化と脱春化を解析し、抑制的ヒストン修飾 H3K27me3 の導入、維持、あるいは消去の分子機構における新しい知見を得ることを目的とした。*jmj30 jmj32* 二重変異体を用いて表現型解析、生化学解析、遺伝学的解析を行い、春化の初期段階で JMJ30 と JMJ32 は *FLC* 座において H3K27me3 の蓄積量が増加するタイミングを調節し、春化の速度を制御することを初めて明らかにした。一方で、JMJ30 と JMJ32 は脱春化の鍵因子ではないことが示唆されたが、変異体スクリーニングを行い、脱春化亢進変異体を単離することに成功した。今後、本研究から得られた知見が春化の初期段階あるいは、脱春化における *FLC* の H3K27me3 の制御を解明するうえでのヒントになることが期待される。

シロイヌナズナでは全遺伝子のうち 25%が H3K27me3 によって制御されることが報告されており、これを踏まえると、ほかの環境応答も春化、脱春化における H3K27me3 の制御と多少なりとも共通した分子機構を持って起こっていると考えられ、本研究の波及性の高さが示唆される。とはいえ、まずはエピジェネティクス分野の農業における花成時期の制御への応用を期待したい。地球温暖化に伴う気候変動が予測される将来、光や温度といった物理的な制約に囚われずに、エピジェネティック制御に関わる分子を標的とした人為的な制御方法が確立され、農作物が安定的に周年生産される未来の実現が期待される。

謝辞

奈良先端科学技術大学院大学における5年間の研学生活を通して、関わってきたすべての人に感謝申し上げます。特に、本研究を行うにあたり、恵まれた研究環境を与えてくださるとともに、多くの貴重な御助言を受け賜りました伊藤寿朗教授と白川一助教に厚く御礼申し上げます。

アドバイザー教員である出村拓教授、西條雄介教授の鋭い指摘や御助言により、本研究を進展することができました。深く感謝申し上げます。

また、所属している花発生分子遺伝学研究室の後輩たちからも学ばせてもらうことも多くあり大変感謝しています。

最後になりますが支えてくれた家族と友人たちに心より感謝申し上げます。

参考文献

- Aikawa, S., Kobayashi, M. J., Satake, A., Shimizu, K. K., & Kudoh, H.** (2010). Robust control of the seasonal expression of the Arabidopsis *FLC* gene in a fluctuating environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **107**(25), 11632-11637.
- Amasino, R.** (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant Journal*, **61**(6), 1001-1013.
- Angel, A., Song, J., Dean, C., & Howard, M.** (2011). A Polycomb-based switch underlying quantitative epigenetic memory. *Nature*, **476**(7358), 105-108.
- Aubert, D., Chen, L., Moon, Y. H., Martin, D., Castle, L. A., Yang, C. H., & Sung, Z. R.** (2001). EMF1, a novel protein involved in the control of shoot architecture and flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **13**(8), 1865-1875.
- Buzas, D. M., Robertson, M., Finnegan, E. J., & Helliwell, C. A.** (2011). Transcription-dependence of histone H3 lysine 27 trimethylation at the Arabidopsis polycomb target gene *FLC*. *The Plant Journal*, **65**(6), 872-881.
- Bouché, F., Detry, N., & Périlleux, C.** (2015). Heat can erase epigenetic marks of vernalization in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, **10**, e990799.
- Chanvivattana, Y., Bishopp, A., Schubert, D., Stock, C., Moon, Y. H., Sung, Z. R., & Goodrich, J.** (2004). Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in Arabidopsis. *Development*, **131**(21), 5263-5276.
- Chen, D., Molitor, A., Liu, C., & Shen, W. H.** (2010). The Arabidopsis PRC1-like ring-finger proteins are necessary for repression of embryonic traits during vegetative growth. *Cell Research*, **20**(12), 1332-1344.
- Cheung, W. L., Briggs, S. D., & Allis, C. D.** (2000). Acetylation and chromosomal functions. *Cell Biology*, **12**(3), 326-333.

Choi, K., Kim, J., Hwang, H. J., Kim, S., Park, C., Kim, S. Y., & Lee, I. (2011). The FRIGIDA complex activates transcription of *FLC*, a strong flowering repressor in *Arabidopsis*, by recruiting chromatin modification factors. *The Plant Cell*, **23**(1), 289-303.

Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, **12**(10), 444-451.

Crevillén, P., Yang, H., Cui, X., Greeff, C., Trick, M., Qiu, Q., Cao, X., & Dean, C. (2014). Epigenetic reprogramming that prevents transgenerational inheritance of the vernalized state. *Nature*, **515**(7528), 587-590.

Csorba T., Questa J. I, Sun Q., & Dean, C. (2014). Antisense COOLAIR mediates the coordinated switching of chromatin states at *FLC* during vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **111**(45), 16160-16165.

Cui, X., Lu, F., Qiu, Q., Zhou, B., Gu, L., Zhang, S., Kang, Y., Cui, X., Ma, X., Yao, Q., Ma, J., Zhang, X., & Cao, X. (2016). REF6 recognizes a specific DNA sequence to demethylate H3K27me3 and regulate organ boundary formation in *Arabidopsis*. *Nature Genetics*, **48**(6), 694-699.

Ding, Y., Ndamukong, I., Xu, Z., Lapko, H., Fromm, M., & Avramova, Z. (2012). ATX1-generated H3K4me3 is required for efficient elongation of transcription, not initiation, at ATX1-regulated genes. *PLoS Genetics*, **8**(12), e1003111.

De Lucia, F., Crevillén, P., Jones, A. M., Greb, T., & Dean, C. (2008). A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of *FLC* during vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **105**(44), 16831-16836.

Deal, R. B., Topp, C. N., McKinney, E. C., & Meagher, R. B. (2007). Repression of Flowering in *Arabidopsis* Requires Activation of *FLOWERING LOCUS C* Expression by the Histone Variant H2A. *The Plant Cell*, **19**(1), 74-83.

Deng, W., Liu, C., Pei, Y., Deng, X., Niu, L., & Cao, X. (2007). Involvement of the histone acetyltransferase AtHAC1 in the regulation of flowering time via repression of *FLOWERING LOCUS C* in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **143**(4), 1660-1668.

Derkacheva, M., Steinbach, Y., Wildhaber, T., Mozgova, I., Mahrez, W., Nanni, P., Bischof, S., Gruissem, W., & Hennig, L. (2013). Arabidopsis MSI1 connects LHP1 to PRC2 complexes. *The EMBO Journal*, **32**(14), 2073-2085.

Finnegan, E. J., & Dennis, E. S. (2007). Vernalization-induced trimethylation of histone H3 lysine 27 at *FLC* is not maintained in mitotically quiescent cells. *Current Biology*, **17**(22), 1978-1983.

Friedrich, T., Faivre, L., Bäurle, I., & Schubert, D. (2019). Chromatin-based mechanisms of temperature memory in plants. *Plant, Cell & Environment*, **42**(3), 762-770.

Gan, E. S., Xu, Y., Wong, J. Y., Goh, J. G., Sun, B., Wee, W. Y., Huang, J., & Ito, T. (2014). Jumonji demethylases moderate precocious flowering at elevated temperature via regulation of *FLC* in Arabidopsis. *Nature Communications*, **5**(5098), 1-13.

Gendall, A. R., Levy, Y. Y., Wilson, A., & Dean, C. (2001). The VERNALIZATION 2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in Arabidopsis. *Cell*, **107**(4), 525-535.

Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Stockinger, E. J., Salazar, M. P., Houghton, J. M., & Thomashow, M. F. (1998). Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *The Plant Journal*, **16**(4), 433-442.

Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E. M., & Coupland, G. (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in Arabidopsis. *Nature*, **386**(6620), 44-51.

Greb, T., Mylne, J. S., Crevillén, P., Geraldo, N., An, H., Gendall, A. R., & Dean, C. (2007). The PHD finger protein VRN5 functions in the epigenetic silencing of *Arabidopsis FLC*. *Current Biology*, **17**(1), 73-78.

Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J. P., Hoepfner, M. A., & Gagliano, W. B. (1998). Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science*, **280**(5362), 446-450.

Gu, X., Jiang, D., Wang, Y., Bachmair, A., & He, Y. (2009). Repression of the floral transition via histone H2B monoubiquitination. *The Plant Journal*, **57**(3), 522-533.

Han, S. K., Song, J. D., Noh, Y. S., & Noh, B. (2007). Role of plant CBP/p300-like genes in the regulation of flowering time. *The Plant Journal*, **49**(1), 103-114.

He, Y., Doyle, M. R., & Amasino, R. M. (2004). PAF1-complex-mediated histone methylation of FLOWERING LOCUS C chromatin is required for the vernalization-responsive, winter-annual habit in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, **18**(22), 2774-2784.

He, Y., & Amasino, R. M. (2005). Role of chromatin modification in flowering-time control. *Trends in Plant Science*, **10**(1), 30-35.

Helliwell, C. A., Robertson, M., Finnegan, E. J., Buzas, D. M., & Dennis, E. S. (2011). Vernalization-repression of *Arabidopsis FLC* requires promoter sequences but not antisense transcripts. *PLoS One*, **6**(6), e21513.

Helliwell, C. A., Anderssen, R. S., Robertson, M., & Finnegan, E. J. (2015). How is *FLC* repression initiated by cold?. *Trends in Plant Science*, **20**(2), 76-82.

Hepworth, J., Antoniou-Kourouniotti, R. L., Bloomer, R. H., Selga, C., Berggren, K., Cox, D., Collier Harris, B. R., Irwin, J. A., Holm, S., Sall, T., Howard, M., & Dean, C. (2018). Absence of warmth permits epigenetic memory of winter in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, **9**(1), 1-8.

- Hong, E. H., Jeong, Y. M., Ryu, J. Y., Amasino, R. M., Noh, B., & Noh, Y. S.** (2009). Temporal and spatial expression patterns of nine Arabidopsis genes encoding Jumonji C-domain proteins. *Molecules and Cells*, **27**(4), 481-490.
- Hou, X., Zhou, J., Liu, C., Liu, L., Shen, L., & Yu, H.** (2014). Nuclear factor Y-mediated H3K27me3 demethylation of the SOC1 locus orchestrates flowering responses of Arabidopsis. *Nature Communications*, **5**(1), 1-14.
- Hyun, Y., Richter, R., Vincent, C., Martinez-Gallegos, R., Porri, A., & Coupland, G.** (2016). Multi-layered regulation of SPL15 and cooperation with SOC1 integrate endogenous flowering pathways at the Arabidopsis shoot meristem. *Developmental Cell*, **37**(3), 254-266.
- Jaglo-Ottosen, K. R., Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Schabenberger, O., & Thomashow, M. F.** (1998). Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, **280**(5360), 104-106.
- Jenuwein, T., & Allis, C. D.** (2001). Translating the Histone Code. *Science*, **293**(5532), 1074-1080.
- Jeon, M., Jeong, G., Hyun, Y., & Lee, I.** (2021). Vernalization-triggered expression of the antisense transcript COOLAIR is mediated by CBF genes. *bioRxiv*.
- Jia, Y., Ding, Y., Shi, Y., Zhang, X., Gong, Z., & Yang, S.** (2016). The cbfs triple mutants reveal the essential functions of CBF s in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in Arabidopsis. *New Phytologist*, **212**(2), 345-353.
- Jiang, D., Gu, X., & He, Y.** (2009). Establishment of the winter-annual growth habit via *FRIGIDA*-mediated histone methylation at *FLOWERING LOCUS C* in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **21**(6), 1733-1746.
- Jiang, D., Kong, N. C., Gu, X., Li, Z., & He, Y.** (2011). Arabidopsis COMPASS-like complexes mediate histone H3 lysine-4 trimethylation to control floral transition and plant development. *PLoS Genetics*, **7**(3), e1001330.

- Jiang, D., & Berger, F.** (2017). DNA replication–coupled histone modification maintains Polycomb gene silencing in plants. *Science*, **357**(6356), 1146-1149.
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R., & Dean, C.** (2000). Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science*, **290**(5490), 344-347.
- Jones, M. A., Covington, M. F., DiTacchio, L., Vollmers, C., Panda, S., & Harmer, S. L.** (2010). Jumonji domain protein JMJD5 functions in both the plant and human circadian systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **107**(50), 21623-21628.
- Jones, M. A., Morohashi, K., Grotewold, E., & Harmer, S. L.** (2019). Arabidopsis JMJD5/JMJ30 acts independently of LUX ARRHYTHMO within the plant circadian clock to enable temperature compensation. *Frontiers in Plant Science*, **10**, 57.
- Kidokoro S, Yoneda K, Takasaki H, Takahashi F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** (2017) Different Cold-Signaling Pathways Function in the Responses to Rapid and Gradual Decreases in Temperature. *The Plant Cell*, **29**(4):760-774.
- Kidokoro, S., Hayashi, K., Haraguchi, H., Ishikawa, T., Soma, F., Konoura, I., Toda, S., Mizoi, J., Suzuki, T., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2021). Posttranslational regulation of multiple clock-related transcription factors triggers cold-inducible gene expression in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **118**(10), e2021048118.
- Kim, S. Y., & Michaels, S. D.** (2006). SUPPRESSOR OF FRI 4 encodes a nuclear-localized protein that is required for delayed flowering in winter-annual Arabidopsis. *Development*, **133**(23), 4699-4707.
- Kim, D. H., & Sung, S.** (2013). Coordination of the vernalization response through a *VIN3* and *FLC* gene family regulatory network in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **25**(2), 454-469.

Ko, J. H., Mitina, I., Tamada, Y., Hyun, Y., Choi, Y., Amasino, R. M., Noh, B., & Noh, Y. S. (2010). Growth habit determination by the balance of histone methylation activities in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, **29**(18), 3208-3215.

Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., & Araki, T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, **286**(5446), 1960-1962.

Köhler, C., Hennig, L., Bouveret, R., Gheyselinck, J., Grossniklaus, U., & Gruissem, W. (2003). Arabidopsis MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. *The EMBO Journal*, **22**(18), 4804-4814.

Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A. J., & Soppe, W. (1998). Genetic control of flowering time in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology*, **49**(1), 345-370.

Lee, I., Bleecker, A., & Amasino, R. (1993). Analysis of naturally occurring late flowering in Arabidopsis thaliana. *Molecular and General Genetics*, **237**(1), 171-176.

Lee, H., Suh, S. S., Park, E., Cho, E., Ahn, J. H., Kim, S. G., Lee, J. S., Kwon, Y. M., & Lee, I. (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in Arabidopsis. *Genes & Development*, **14**(18), 2366-2376.

Li, C., Gu, L., Gao, L., Chen, C., Wei, C. Q., Qiu, Q., Chien, C. W., Wang, S., Jiang, L., Ai, L. F., Chen, C. Y., Yang, S., Nguyen, V., Qi, Y., Snyder, M. P., Burlingame, A. L., Kohalmi, S. E., Huang, S., Cao, X., Wang, Z. Y., Wu, K., Chen, X., & Cui, Y. (2016). Concerted genomic targeting of H3K27 demethylase REF6 and chromatin-remodeling ATPase BRM in Arabidopsis. *Nature Genetics*, **48**(6), 687-693.

Li, Z., Jiang, D., & He, Y. (2018). FRIGIDA establishes a local chromosomal environment for *FLOWERING LOCUS C* mRNA production. *Nature Plants*, **4**(10), 836-846.

Li, F., Hu, Q., Chen, F., & Jiang, J. F. (2021). Transcriptome analysis reveals Vernalization is independent of cold acclimation in *Arabidopsis*. *BMC Genomics*, **22**(1), 1-14.

Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **10**(8), 1391-1406.

Lu, F., Li, G., Cui, X., Liu, C., Wang, X. J., & Cao, X. (2008). Comparative analysis of JmjC domain-containing proteins reveals the potential histone demethylases in *Arabidopsis* and rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**(7), 886-896.

Lu, F., Cui, X., Zhang, S., Jenuwein, T., & Cao, X. (2011). *Arabidopsis* REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. *Nature Genetics*, **43**(7), 715.

Lu, S. X., Knowles, S. M., Webb, C. J., Celaya, R. B., Cha, C., Siu, J. P., & Tobin, E. M. (2011). The Jumonji C domain-containing protein JMJ30 regulates period length in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Physiology*, **155**(2), 906-915.

Luo, M., Bilodeau, P., Koltunow, A., Dennis, E. S., Peacock, W. J., & Chaudhury, A. M. (1999). Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **96**(1), 296-301.

Mandel, M. A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B., & Yanofsky, M. F. (1992). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APETALA1. *Nature*, **360**(6401), 273-277.

Medina, J., Bargues, M., Terol, J., Pérez-Alonso, M., & Salinas, J. (1999). The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology*, **119**(2), 463-470.

Michaels, S. D., & Amasino, R. M. (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant Cell*, **11**(5), 949-956.

Michaels, S. D., Bezerra, I. C., & Amasino, R. M. (2004). *FRIGIDA*-related genes are required for the winter-annual habit in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **101**(9), 3281-3285.

Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H. R., Carré, I. A., & Coupland, G. (2002). *LHY* and *CCA1* are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in Arabidopsis. *Developmental Cell*, **2**(5), 629-641.

Mizuno, T., Nomoto, Y., Oka, H., Kitayama, M., Takeuchi, A., Tsubouchi, M., & Yamashino, T. (2014). Ambient temperature signal feeds into the circadian clock transcriptional circuitry through the EC night-time repressor in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, **55**(5), 958-976.

Molitor, A., & Shen, W. H. (2013). The polycomb complex PRC1: composition and function in plants. *Journal of Genetics and Genomics*, **40**(5), 231-238.

Mozgova, I., & Hennig, L. (2015). The polycomb group protein regulatory network. *Annual Review of Plant Biology*, **66**, 269-296.

Nishio, H., Iwayama, K., & Kudoh, H. (2020). Duration of cold exposure defines the rate of reactivation of a perennial FLC orthologue via H3K27me3 accumulation. *Scientific Reports*, **10**(1), 1-9.

Niwa, Y., Ito, S., Nakamichi, N., Mizoguchi, T., Niinuma, K., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2007). Genetic linkages of the circadian clock-associated genes, *TOC1*, *CCA1* and *LHY*, in the photoperiodic control of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **48**(7), 925-937.

Noh, B., Lee, S. H., Kim, H. J., Yi, G., Shin, E. A., Lee, M., Jung, K. J., Doyle, M. R., Amasino, R. M., & Noh, Y. S. (2004). Divergent roles of a pair of homologous jumonji/zinc-finger-class transcription factor proteins in the regulation of Arabidopsis flowering time. *The Plant Cell*, **16**(10), 2601-2613.

Oh, S., Park, S., & van Nocker, S. (2008). Genic and global functions for Paf1C in chromatin modification and gene expression in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, **4**(8), e1000077.

Ohad, N., Yadegari, R., Margossian, L., Hannon, M., Michaeli, D., Harada, J. J., Goldberg, R. B., & Fischer, R. L. (1999). Mutations in FIE, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *The Plant Cell*, **11**(3), 407-415.

Park, S., Lee, C. M., Doherty, C. J., Gilmour, S. J., Kim, Y., & Thomashow, M. F. (2015). Regulation of the Arabidopsis CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network. *The Plant Journal*, **82**(2), 193-207.

Périlleux, C., Pielain, A., Jacquemin, G., Bouché, F., Detry, N., D'aloia, M., Thiry, L., Aljochim, P., Delansnay, M., Mathieu, A. S., Lutts, S., & Tocquin, P. (2013). A root chicory MADS box sequence and the Arabidopsis flowering repressor *FLC* share common features that suggest conserved function in vernalization and de-vernalization responses. *The Plant Journal*, **75**(3), 390-402.

Pirrotta, V. (1998). Polycomb-ing the Genome: PcG, trxG, and Chromatin Silencing. *Cell*, **93**(3), 333-336.

Purvis, O. N., & Gregory, F. G. (1945). Devernalization by high temperature. *Nature*, **155**(3926), 113-114.

Qian, S., Wang, Y., Ma, H., & Zhang, L. (2015). Expansion and functional divergence of Jumonji C-containing histone demethylases: significance of duplications in ancestral angiosperms and vertebrates. *Plant Physiology*, **168**(4), 1321-1337.

- Qüesta, J. I., Song, J., Geraldo, N., An, H., & Dean, C.** (2016). Arabidopsis transcriptional repressor VAL1 triggers Polycomb silencing at *FLC* during vernalization. *Science*, **353**(6298), 485-488.
- Qüesta, J. I., Antoniou-Kourounioti, R. L., Rosa, S., Li, P., Duncan, S., Whittaker, C., Howard, M., & Dean, C.** (2020). Noncoding SNPs influence a distinct phase of Polycomb silencing to destabilize long-term epigenetic memory at Arabidopsis *FLC*. *Genes & Development*, **34**(5-6), 446-461.
- Schmitz, R. J., Hong, L., Michaels, S., & Amasino, R. M.** (2005). *FRIGIDA-ESSENTIAL 1* interacts genetically with *FRIGIDA* and *FRIGIDA-LIKE 1* to promote the winter-annual habit of Arabidopsis thaliana. *Development*, **132**(24), 5471-5478.
- Shirakawa, M., Morisaki, Y., Gan, E. S., Sato, A., & Ito, T.** (2021). Identification of a devernalization inducer by chemical screening approaches in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, **12**, 634068.
- Simpson, G. G., & Dean, C.** (2002). Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time? *Science*, **296** (5566), 285-289.
- Stockinger, E. J., Gilmour, S. J., & Thomashow, M. F.** (1997). Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **94**(3), 1035-1040.
- Strahl, B. D., & Allis, C. D.** (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**(6765), 41-45.
- Swiezewski, S., Liu, F., Magusin, A., & Dean, C.** (2009). Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an Arabidopsis Polycomb target. *Nature*, **462**(7274), 799-802.
- Sung, S., & Amasino, R. M.** (2004). Vernalization in Arabidopsis thaliana is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature*, **427**(6970), 159-164.

- Takeuchi, T., Watanabe, Y., Takano-Shimizu, T., & Kondo, S.** (2006). Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development. *Developmental Dynamics*, **235**(9), 2449-2459.
- Tao, Z., Shen, L., Gu, X., Wang, Y., Yu, H., & He, Y.** (2017). Embryonic epigenetic reprogramming by a pioneer transcription factor in plants. *Nature*, **551**(7678), 124-128.
- Tao, Z., Hu, H., Luo, X., Jia, B., Du, J., & He, Y.** (2019). Embryonic resetting of the parental vernalized state by two B3 domain transcription factors in Arabidopsis. *Nature Plants*, **5**(4), 424-435.
- Thomashow, M. F.** (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, **50**, 571-599.
- Turck, F., Roudier, F., Farrona, S., Martin-Magniette, M. L., Guillaume, E., Buisine, N., Gagnot, S., Martienssen, R. A., Coupland, G., & Colot, V.** (2007). Arabidopsis TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genetics*, **3**(6), e86.
- Vogel, J. T., Zarka, D. G., Van Buskirk, H. A., Fowler, S. G., & Thomashow, M. F.** (2005). Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. *The Plant Journal*, **41**(2), 195-211.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D. R., Yanofsky, M. F., & Meyerowitz, E. M.** (1992). LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell*, **69**(5), 843-859.
- Wood, C. C., Robertson, M., Tanner, G., Peacock, W. J., Dennis, E. S., & Helliwell, C. A.** (2006). The Arabidopsis thaliana vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **103**(39), 14631-14636.
- Wu, J., Ichihashi, Y., Suzuki, T., Shibata, A., Shirasu, K., Yamaguchi, N., & Ito, T.** (2019). Abscisic acid-dependent histone demethylation during postgermination growth arrest in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, **42**(7), 2198-2214.

- Xiao, J., Zhang, H., Xing, L., Xu, S., Liu, H., Chong, K., & Xu, Y.** (2013). Requirement of histone acetyltransferases HAM1 and HAM2 for epigenetic modification of *FLC* in regulating flowering in Arabidopsis. *Journal of Plant Physiology*, **170**(4), 444-451.
- Xiao, J., Lee, U. S., & Wagner, D.** (2016). Tug of war: adding and removing histone lysine methylation in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology*, **34**, 41-53.
- Yamaguchi, N., Winter, C. M., Wu, M. F., Kwon, C. S., William, D. A., & Wagner, D.** (2014). PROTOCOLS: Chromatin immunoprecipitation from Arabidopsis tissues. *The Arabidopsis book*, **12**, e0170.
- Yamaguchi, N., Matsubara, S., Yoshimizu, K., Seki, M., Hamada, K., Kamitani, M., Kurita, Y., Nomura, Y., Nagashima, K., Inagaki, S., Suzuki, T., Gan, E. S., To, T., Kakutani, T., Nagano, A, J., Satake, A., & Ito, T.** (2021). H3K27me3 demethylases alter HSP22 and HSP17. 6C expression in response to recurring heat in Arabidopsis. *Nature Communications*, **12**(1), 1-16.
- Yan, W., Chen, D., Smaczniak, C., Engelhorn, J., Liu, H., Yang, W., Graf, A., Carles, C, C., Zhou, D, X., & Kaufmann, K.** (2018). Dynamic and spatial restriction of Polycomb activity by plant histone demethylases. *Nature Plants*, **4**(9), 681-689.
- Yang, H., Howard, M., & Dean, C.** (2016). Physical coupling of activation and derepression activities to maintain an active transcriptional state at *FLC*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **113**(33), 9369-9374.
- Yang, H., Berry, S., Olsson, T. S., Hartley, M., Howard, M., & Dean, C.** (2017). Distinct phases of Polycomb silencing to hold epigenetic memory of cold in Arabidopsis. *Science*, **357**(6356), 1142-1145.
- Yoshida, N., Yanai, Y., Chen, L., Kato, Y., Hiratsuka, J., Miwa, T., Sung, Z, Renee., & Takahashi, S.** (2001). EMBRYONIC FLOWER2, a novel polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **13**(11), 2471-2481.

Yuan, W., Luo, X., Li, Z., Yang, W., Wang, Y., Liu, R., Du, J., & He, Y. (2016). A *cis* cold memory element and a *trans* epigenome reader mediate Polycomb silencing of *FLC* by vernalization in *Arabidopsis*. *Nature Genetics*, **48**(12), 1527-1534.

Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y.V., Pellegrini, M., Goodrich, J., & Jacobsen, S. E. (2007). Whole-Genome Analysis of Histone H3 Lysine 27 Trimethylation in *Arabidopsis*. *PLOS Biology*, **5**(5), e129.

Zhao, C., Zhang, Z., Xie, S., Si, T., Li, Y., & Zhu, J. K. (2016). Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **171**(4), 2744-2759.

Zhao, Y., Antoniou-Kourounioti, R. L., Calder, G., Dean, C., & Howard, M. (2020). Temperature-dependent growth contributes to long-term cold sensing. *Nature*, **583**(7818), 825-829.

Zheng, S., Hu, H., Ren, H., Yang, Z., Qiu, Q., Qi, W., Liu, X., Chen, X., Cui, X., Li, S., Zhou, B., Sun, D., Cao, X., & Du, J. (2019). The *Arabidopsis* H3K27me3 demethylase JUMONJI 13 is a temperature and photoperiod dependent flowering repressor. *Nature Communications*, **10**(1), 1-11.

Zhu, P., Lister, C., & Dean, C. (2021). Cold-induced *Arabidopsis* FRIGIDA nuclear condensates for *FLC* repression. *Nature*, **599**(7883), 1-5.