

概日時計を介した花成時期の制御

廣畑 敦洋

奈良先端科学技術大学院大学
先端科学技術研究科 植物生理学研究室
(遠藤 求 教授)

令和5年3月17日 提出

バイオサイエンス領域 博士論文要旨

所属（主指導教員）	植物生理学研究室（遠藤 求）		
氏名	廣畑 敦洋	提出	令和4年12月8日
題目	概日時計を介した花成時期の制御		
<p>【背景・目的】</p> <p>植物の栄養成長から生殖成長への成長相転換である花成は、種の存続の観点からもっとも重要なイベントであり、その分子機構について多くの研究が行われてきた。花成時期の制御は開花時期の制御に直結するとともに、葉や茎といった栄養器官や果実の成長制御にもつながることから、農学の観点からも非常に重要である。シロイヌナズナを用いた過去の研究から、維管束の概日時計が花成ホルモン（フロリゲン）の産生を介して季節に応じた花成である光周性花成に関わっていることが明らかになっている。さらに、先行研究により、時計遺伝子 <i>TOC1</i> を維管束特異的に過剰発現させた2種類の形質転換植物では、維管束における概日リズムが失われており、光周性も失われていた。しかし、維管束の時計機能の阻害の程度に応じてある系統では常に早咲き、もう一つの系統では常に遅咲きを示し、光周性とは別の経路も概日時計制御であることが明らかになった。</p> <p>以上のことから、維管束の時計遺伝子の発現を制御することで、花成時期の予測や人為的な花成時期の操作ができると考えられた。そこで本研究では、概日時計を利用した花成時期操作の可能性、および、花成時期の予測を目的として、以下の研究を行ったについて検証した。</p> <p>【結果・考察】</p> <p>第1章 化合物投与による概日時計を介した花成時期操作</p> <p>花成時期操作の可能性を検証するため、概日リズムの減衰（先行研究）、および、フロリゲンをコードする <i>FT</i> 遺伝子の発現を指標としたケミカルスクリーニングを通じて、概日時計を介して花成時期を制御する新規化合物を探索した。その結果、花成時期を遅延させる化合物として、葉酸の生合成阻害剤であるスルファニルアミドを同定した。スルファニルアミドを投与することにより、<i>FT</i> 発現量が著しく低下し、花成時期が遅延した。スルファニルアミドに対する花成遅延効果は、<i>ft</i> 欠損変異体では見られなかったことから、スルファニルアミドは主に <i>FT</i> の転写制御を介して花成時期を調節することが示唆された。次に、スルファニルアミドによる <i>FT</i> 発現量抑制の機序を明らかにするため、スルファニルアミド投与によって発現量が増加する遺伝子を RNA-seq 解析により網羅的に探索した。その結果、スルファニ</p>			

ルアミド投与によって遺伝子発現が増加する候補因子の一つに、概日時計の中心振動体であり *FT* の直接の転写抑制因子として機能する *LUX* が含まれることを見いだした。スルファニルアミド投与下で発現が変動する遺伝子群と *LUX* の直接の標的遺伝子群に有意な重複がみられること、*lux* 欠損変異体はスルファニルアミド存在下で花成遅延の表現型が緩和することなどから、スルファニルアミドは少なくとも *LUX* の転写制御を介して *FT* の発現を抑制することが示唆された。最後に、シロイヌナズナと同じアブラナ科の食用野菜であるルッコラにスルファニルアミドを投与したところ、シロイヌナズナと同様に花成時期が遅延したことから、スルファニルアミドによる花成制御が少なくともアブラナ科の植物種においても適用可能であることが期待された。

以上の結果から、スルファニルアミドが時計遺伝子 *LUX* の発現制御を介して *FT* 発現量および花成時期を操作することを示した。この投与により、アブラナ科であるシロイヌナズナおよびルッコラの花成時期を非遺伝子組換えで操作できることを示した。

第2章 概日時計を介した花成時期の制御

第1章では化合物スクリーニングにより、スルファニルアミドが *LUX* を介して花成時期を制御することを示した。しかし、明らかにされた経路は *FT* 遺伝子の発現制御経路の一部にすぎず、他にも概日時計を介した花成時期の制御経路は存在することが示された。実際に、*LUX* 以外にも *FT* 遺伝子の発現制御に関わることが報告されている概日時計遺伝子は数多くあるものの、それらがどのような関係にあり、最終的な *FT* 発現制御にどの時計遺伝子が真に重要であるのかは不明のままであった。こうした状況を整理し、概日時計による花成制御メカニズムの全体像を明らかにするためには、特定の実験条件や特定の遺伝子発現ではなく、複数の実験条件で複数の遺伝子発現を調べることが重要だと考えられた。

これまで、概日リズムに関して遺伝子発現の再解析は 2007 年に発表された *Diurnal* と呼ばれるマイクロアレイのデータベースが主に利用されてきた。しかし、新規のマイクロアレイや RNA-seq データは追加されておらず、最新の知見を反映していないデータベースとなりつつある。

そこで本研究では、まず、2021 年までに公表された新規のマイクロアレイおよび未発表データを含む RNA-seq データを収集し、時系列データの統合プラットフォームを作成し、研究の基盤を整備することにした。新たに作成したデータベースでは、53 種類の時系列データを同時に比較できるようにし、遺伝子発現パターンの周期性判定などの解析も可能にした。

つぎに、このデータベースを利用し、*FT* 発現量をもっとも良く説明できる時計遺伝子の組み合わせを探索したところ、時計遺伝子 *CCA1* 発現量および *TOC1* 発

現量の比が見いだされた。過去の報告においても、*TOC1* は CO タンパク質の安定化を介して *FT* 発現を促進し、*CCA1* は *FT* 発現を直接抑制することが示されていることから、*CCA1* と *TOC1* の遺伝子発現量のバランスが *FT* 発現量および花成時期を制御すると仮説を立て、この可能性を検証した。

維管束特異的プロモーターで *TOC1* を過剰発現させ、*CCA1* と *TOC1* の遺伝子発現量比を人為的に変えた形質転換植物では、この比と花成時期との間に反比例の関係が見られ、*CCA1* と *TOC1* の遺伝子発現量のバランスが花成時期の決定要因であるとの仮説と矛盾しない結果を得た。この仮説に関しては、分子メカニズムに関してさらなる検証が必要である。

目次

略語一覧

第1章 化合物投与による概日時計を介した花成時期操作

序論	8
材料と方法	14
結果	18
考察	44

第2章 概日時計を介した花成時期の制御

序論	49
材料と方法	51
結果	52
考察	65

謝辞	69
----	----

参考文献	70
------	----

略語一覽

CCA1	CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1
cDNA	complementary DNA
CDF1	CYCLING DOF FACTOR 1
CO	CONSTANS
Col	Columbia
cps	count per second
cry	cryptochrome
Ct	threshold cycle
CT	circadian time
DHF	dihydrofolate
DHP	dihydropteroate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EC	Evening complex
ELF	EARLY FLOWERING
FKF	FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1
FLC	FLOWERING LOCUS C
FT	FLOWERING LOCUS T
FWA	FLOWERING WAGENINGEN
GI	GIGANTEA
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	guanosine triphosphate
IPP2	ISOPENTENYL PYROPHOSPHATE ISOMERASE 2
LUC	luciferase
LUX	LUX ARRHYTHMO
MS	Murashige and Skoog
-ox	overexpressions
pABA	p-aminobenzoate
phot	phototropin
phy	phytochrome
PRR	PSEUDO-RESPONSE REGULATOR
qPCR	quantitative polymerase-chain-reaction
RIN	RNA Integrity Number
RT-PCR	reverse transcription polymerase-chain-reaction

SPL SQUAMOSA PROMOTER-BINDING LIKE
SUC2 SUCROSE TRANSPORTER 2
Sultr1;3 Sulfate transporter1;3
SVP SHORT VEGETATIVE PHASE
TEM TEMPRANILLO
THF tetrahydrofolate
TOC1 TIMING OF CAB EXPRESSION 1
TSF TWIN SISTER OF FT
T6P trehalose-6-phosphate
w/v weight / volume
ZT zeitgeber time
12L/12D 12 h light / 12 h dark
16L/8D 16 h light / 8 h dark

第1章 化合物投与による概日時計を介した花成時期操作

序論

植物の栄養成長相から生殖成長相への成長相転換である花成を適切なタイミングで誘導することは、種の存続の観点から重要である。また、花成の制御は開花時期の制御に直結するだけでなく、開花前に発達する葉や茎などの栄養器官や開花後に結実する果実の成長制御にも影響を与えるため、農業の観点からも重要である。このため、数多くの研究により、花成のシグナル伝達経路は分子レベルで明らかにされてきた。さらに、食糧問題を目指して、花成時期を制御する方法についても数多くの研究が行われてきた。

こうした長年の研究から、花成は、齢やホルモンといった内的な要因と日長や温度などの外的な要因によって制御されていることが明らかになった。具体的には、ジベレリンに代表される植物ホルモンによる経路をはじめとして、主に *SVP* 遺伝子および *FLC* 遺伝子の発現に集約される温度、春化、自律経路、T6Pの量に集約される糖、*SPL* 遺伝子群および *miR172/156* の発現に集約される齢、COタンパク質の量に集約される概日時計・光周性花成経路が存在する [Bouché *et al.*, 2016]。これらの経路は、シュート頂メリステムにおいてメリステムの性質を決定する遺伝子群の発現を直接的に、あるいは、葉からシュート頂へと長距離輸送される *FT* 遺伝子・*TSF* 遺伝子の発現制御を介して間接的に発現制御することで花成時期を調節している。

なかでも、季節変化に伴う日長変化に応答して花成を制御する光周性花成経路は集中的に研究されてきた。光周性花成における最初のステップは日長や明暗の感受である。日長は温度などの他の環境刺激と比べてノイズが極めて低いという特性をもつため、植物が正しく季節を認識するための重要な環境情報として利用されている。日長および明暗の情報は、シロイヌナズナでは、5分子種あるフィトクロム (phytochrome; phy) や2分子種あるクリプトクロム (cryptochrome; cry)、FKF1、ZTL、LKP2などが光周性花成に重要な光受容分子であるとされている [Casal, 2000; Nagy *et al.*, 2002]。花成ホルモン (フロリゲン) である FT タンパク質をコードする *FT* 遺伝子とその直接の制御因子で CO タンパク質による制御モジュールは光周性の鍵であり、調べられたほとんどの植物種で保存されている [Kobayashi *et al.*, 1999]。一日の中で周期的に発現する *CO* mRNA による内的なリズムと、光受容体によって伝えられる外的な明暗リズムを照らし合わせることで、CO タンパク質の安定性または不安定性を制御し、これにより *FT* 遺伝子の発現を調節する外的符合モデルは、花成を制御する一般的なモデルとして提唱され受け入れられてきた (図1)。こうしたモデルの中で概日時計は *CO* mRNA の制御や CO タンパク質の安定性の制御など多層的な役割を担っている。

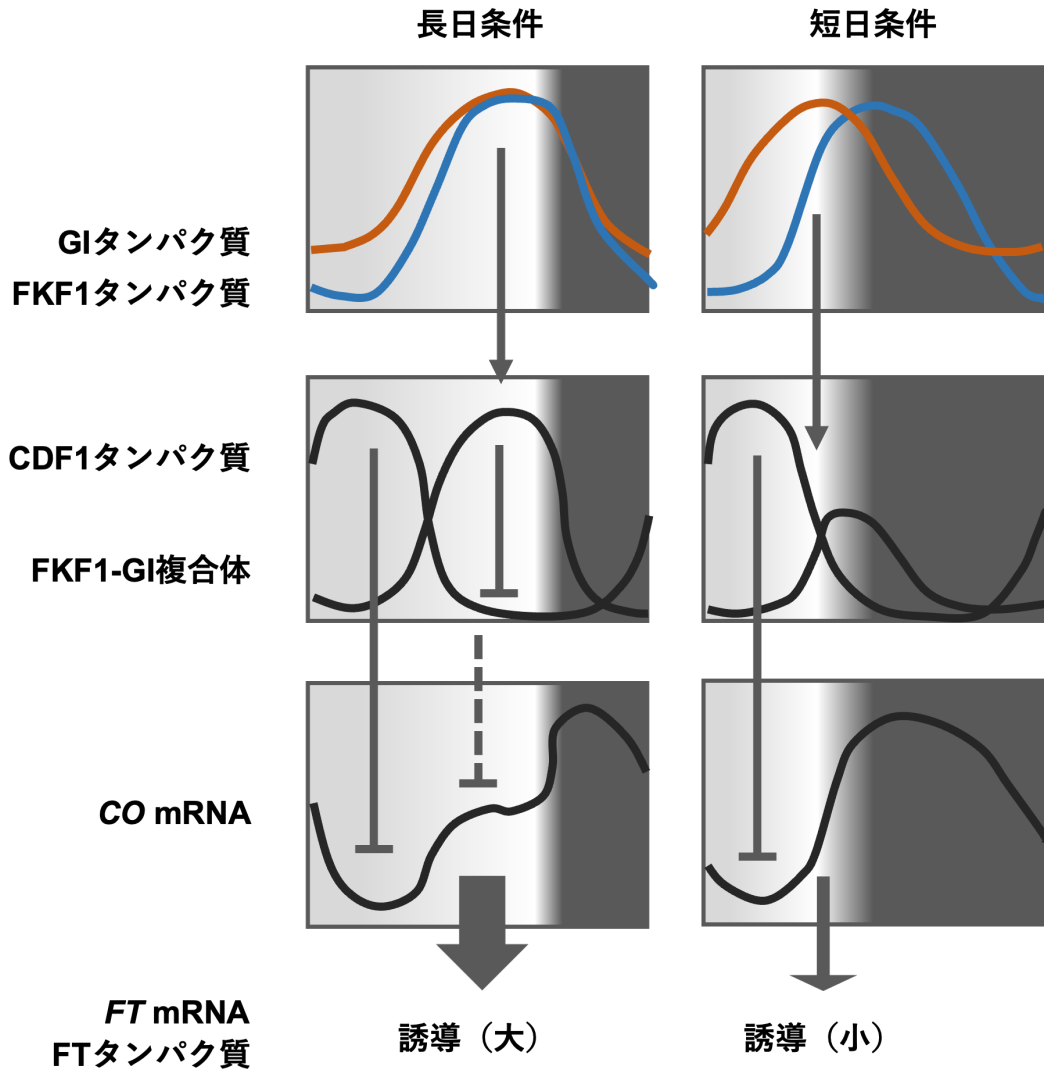


図 1 | シロイヌナズナにおける外的符合モデル

外的符合モデルの概略を示した (Sawa *et al.*, 2007 を編集)。概日時計の GI および光で誘導される FKF1 は、長日条件において複合体を形成し、CO 抑制因子である CDF1 タンパク質の抑制を介して CO を抑制する。

概日時計は地球の自転に伴う 24 時間周期の環境変動を予測し、それに適応するための仕組みである。植物を含むほとんどの生物種において、概日時計は転写と翻訳の複雑なフィードバックループによって形成されていることが知られている。モデル植物であるシロイヌナズナでは、約 20 種の時計遺伝子のうちほとんどが転写因子である。転写因子以外では、キナーゼや F-box タンパク質のように機能が明らかな時計遺伝子が存在する一方で、GI や ELF3 のように足場タンパク質としての機能が予想されているものの具体的な機能を予測できるような明確なドメインを持たない時計遺伝子も存在する。

これらの時計遺伝子の中で、夜間から早朝にかけて発現する *CCA1* と *LHY* および夕方から夜間にかけて発現する *TOC1* によって形成されるループは最初期に発見された転写ループであり、いくつかの修正はあったものの現在も概日時計の中心であると理解されている [Jose *et al.*, 2009, 図 2]。他にも、日中に発現ピークをもつ *PRR5*、*PRR7*、*PRR9* や、それらに遅れて夕方に発現ピークをもち、転写複合体 Evening Complex (EC) を形成する *ELF3*、*ELF4*、*LUX* などが知られている [Matsushika *et al.*, 2007; Nagel and Kay, 2012]。これらの時計遺伝子は、他の時計遺伝子のプロモーター領域に結合してその発現を制御する、転写因子としての働きが主である。ほかに、他の時計遺伝子のタンパク質のリン酸化を促進することで、核移行の促進や、タンパク質分解の抑制を行なっている [Fujiwara *et al.*, 2008; Kiba *et al.*, 2007]。

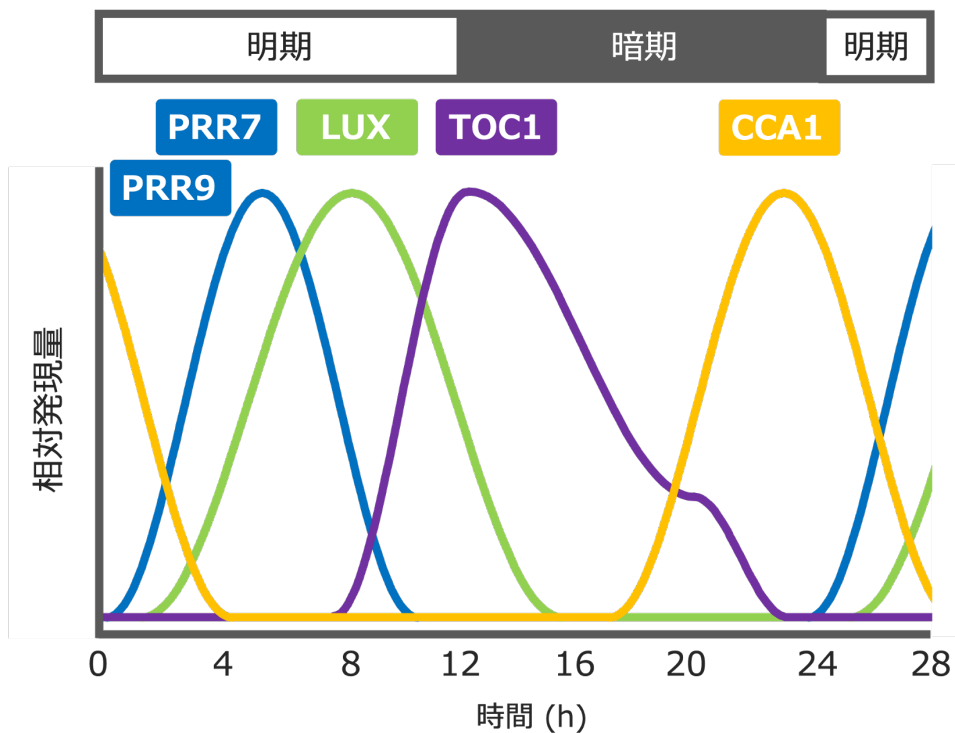
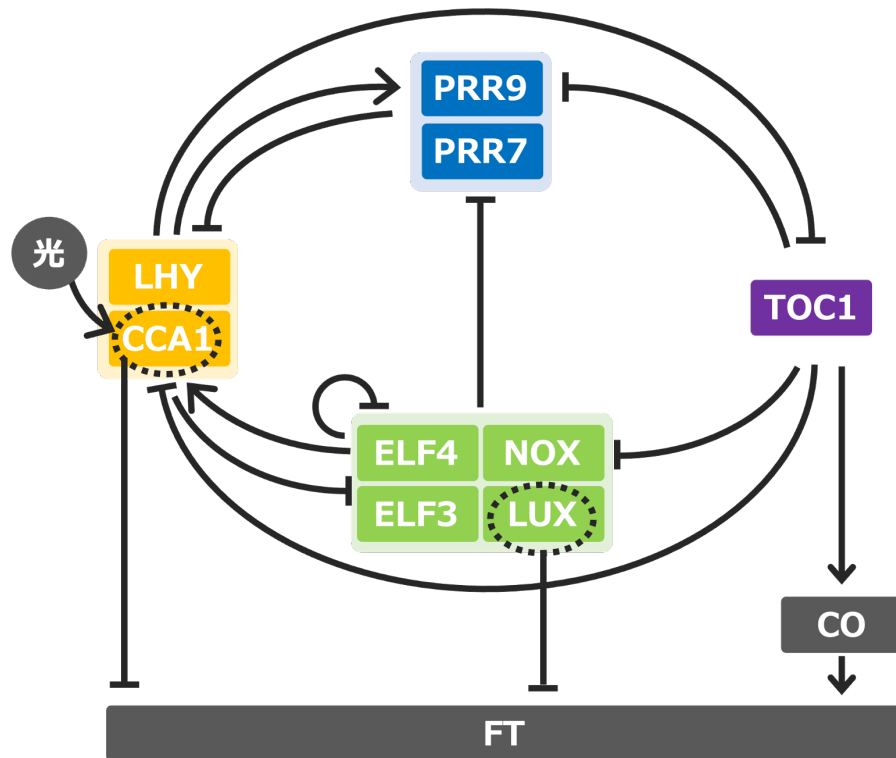


図 2 | シロイヌナズナにおける概日時計のモデル、および、概日リズム
 概日時計を構成する時計遺伝子のうち、主要なものを図示した。
 矢印は促進を、T バーは抑制を示す。(Bouché, Lobet *et al.*, 2016 を編集)

これまでの研究から、概日時計はさまざまな経路で *FT* 遺伝子の発現を制御していることが明らかとなっている。時計関連タンパク質 *GI* と *FKF1* は、*CO* 抑制因子である *CDF1* を午後にユビキチン依存的に分解している。*PRR9*、*PRR7*、*PRR5* は午後に *CDF1* を抑制することにより、*CO* の発現を促進し *FT* 遺伝子の発現を促進する [Nakamichi *et al.*, 2007, 図 1]。*TOC1* は、*CO* タンパク質の安定化を介して *FT* 遺伝子の発現を促進し [Hayama *et al.*, 2017]、*CCA1* は *FT* プロモーターに結合して *FT* 遺伝子の発現を抑制する [Fujiwara *et al.*, 2005]。また、*LUX* も *CCA1* と同様に、*FT* プロモーターに結合して *FT* 遺伝子の発現を抑制することが明らかとなっている [Ezer *et al.*, 2017]。*EC* は *GI* 発現を抑制し、*ELF3* は *GI* 分解を促進し、*ELF4* は *CO* プロモーターから *GI* を除去することでも花成が制御されている [Yu *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2013; Ezer *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2019]。

このように、時計遺伝子はさまざまな方法で *FT* 発現を制御していることから、時計遺伝子の発現を制御することで花成時期を制御できる可能性が考えられている。実際、*cca1 lhy* 二重変異体は短日条件下で野生型に比べて早咲きを示し [Fujiwara *et al.*, 2008]、*prp5 prp7 prp9* 三重変異体は日長に依存せず著しく遅咲きを示す [Nakamichi *et al.*, 2007]。また、*PRR3-ox* は長日条件下で遅咲きを示し [Murakami *et al.*, 2004]、*CCA1-ox* や *LHY-ox* は日長非依存的に遅咲きを示すことも報告されている [Lu *et al.*, 2012; Mizoguchi *et al.*, 2002]。さらに、トマトでは光シグナル経路に関わる遺伝子 *EID1* が栽培化の過程で変異したことで概日時計の位相が遅れ、花成が早まっていることが知られている [Müller *et al.*, 2016]。また、時計遺伝子の変異によりコムギやオオムギなどの栽培可能地域が拡大したことも明らかにされている [Nakamichi, 2015]。

日長制御は古典的ながら今も使われている方法であり、人為的に日長を調節することで花成の誘導や抑制を行う。こうした日長に対する応答性は短日植物で特に顕著であることが知られており、長日植物では応答が鈍い傾向にあるほか、栽培品種は選抜の過程で光周性を失い中性植物になったものも多く存在する。さらに、夜間補光などを行う場合には電気代のコスト負担の大きさも問題となる。他にも品種改良および品種選択もよく利用される花成時期の制御方法である。しかし、これらの品種を開発したり選択したりするためには多大な時間や金銭が必要となるだけでなく、植物種ごとに系統を作出する必要性から汎用性に欠けるといった問題点がある。近年では、遺伝子組換えやゲノム編集といった遺伝子工学的な技術の発展により、系統作出にかかる時間や手間は減りつつあるが可能となったが、これらの技術の社会的な受容はまだ十分ではない [Zhang *et al.*, 2018; Fawzy and Ray, 2017]。

このように、光周性花成経路を利用した人為的な花成時期の操作はすでに実現されている一方で、さまざまなコストや社会の受容などの課題も残されており、これらの問題点を克服した制御方法が必要とされていた。

当研究室のこれまでの研究から、維管束の概日時計が花成時期を制御していることが示されている [Shimizu *et al.*, 2015]。また、後述するように、プロモーター活性の異なる2種類の維管束特異的な *SUC2* プロモーターと *Sultr1;3* プロモーター [Truernit *et al.*, 1995; Yoshimoto *et al.*, 2003] の下で時計遺伝子 *TOC1* を過剰発現させた形質転換体が生じた結果、*SUC2::TOC1-GFP* と *Sultr1;3::TOC1-GFP* の花成時期は日長に依存せず、長日条件でも短日条件でもほぼ同じであり、光周性が失われた中性植物であった。興味深いことに、これら2種類の形質転換植物はどちらも中性植物であるにも関わらず花成のタイミングが異なっており、*SUC2::TOC1-GFP* では日長非依存的に常に早咲きを示し、*Sultr1;3::TOC1-GFP* では日長非依存的に常に遅咲きを示す。このことから、維管束の概日時計を標的としてその機能を人為的に制御することができれば、花成時期を自在に制御できるのではないかと考えられた。

こうした状況において、化合物による植物の生長制御は非遺伝子組換えで広範な植物種に適用できる制御方法として有望であると考えられた。農薬（植物成長調整剤）としては、落果防止や果実の肥大促進を目的としたものが実用化されている一方、花成時期を制御する化合物の実用化はそれほど進んでいない。花芽抑制を介した樹勢の維持を目的とした農薬は実用化されているものの、ミカンやキンカンなど一部の柑橘類に限られている。また、植物ホルモンであるジベレリンはジベレリン経路を介して花成を促進し、柑橘類において花成促進効果を持つものの、その効果は不安定である。

このように、化合物による花成制御は実用化が遅れているものの、従来の方法に比べて多くの利点があると考えられる。一般に農薬は対象作物が指定されているが、多くの植物種に適用可能である例は多く [Ionescu *et al.*, 2017]、また、化合物の投与タイミングを調節することで市況や気候に応じて臨機応変に花成時期を制御できる可能性や非遺伝子組換え植物として消費者の心理的抵抗を和らげることができる可能性も考えられている。さらに、花成に影響を与える新規化合物の発見は、新たな花成制御メカニズムの発見にもつながると考えられた。

以上のことから、本研究では花成時期の自在制御を目指し、概日時計を標的として花成を制御する化合物の探索とその作用機序の解明を目的とした。概日時計を介して制御したい *FT* 遺伝子の発現は、維管束における時計遺伝子によって制御されているが、本研究では、植物個体全体の時計遺伝子の発現量を化合物投与により操作することで、維管束での時計遺伝子および *FT* 遺伝子の発現を操作することを試みた。そこで、最終的な農業応用も踏まえて、植物の培地に直接化合物を投与する方法でケミカルスクリーニングを行なった。最終的に選りだした化合物スルファニルアミドについては *FT* 遺伝子や概日時計遺伝子の発現解析、花成表現型の解析、RNA-seq 解析を通じて花成制御効果の定量と作用機序の解明をおこなった。

材料と方法

シロイヌナズナの播種方法と生育条件

本研究ではシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型株として Col-0 を用い、形質転換体および変異体も Col-0 を背景とするものを使用した。また、ルッコラを用いた実験では *Eruca sativa* の種子 (サカタ) を購入して使用した。これらの種子は、スーパーミックス (FD-A、サカタ) とバーミキュライト (GL、ニッタイ) を 1:1 で混合した土に播種する、あるいは、以下に示す方法で寒天培地に播種した。

滅菌前の種子に 3 倍希釈したブリーチを加え、15 秒間振盪し、その後滅菌水で 3 回リンスした。滅菌した種子は、クリーンベンチ内で 2 倍に希釈した Murashige and Skoog 培地 (0.8% [w/v] agar、0.5% [w/v] sucrose を含む。以下、1/2MS 培地と略す) に無菌的に播種した。播種後の種子は 3 日間 4.0°C・暗黒下においた後、人工気象器 (バイオインキュベータ、バイオマルチインキュベータ、日本医化器械製作所) 内で、22.0°C、白色光 (60–100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 照射下で生育した。生育期間については、以下に示す条件を実験毎に用いた。

- (1) RT-PCR による遺伝子発現解析：22.0°C、白色光照射下、16L/8D 条件下、あるいは、12L/12D 条件下で 10 日間、あるいは、14 日間生育した。
- (2) RNA シークエンスによる遺伝子発現解析：22.0°C、白色光照射下、12L/12D 条件下で 14 日間生育した。
- (3) 葉数測定による花成時期測定：22.0°C、白色光照射下、16L/8D 条件下、あるいは、12L/12D 条件下で、抽苔するまで生育した。

化合物投与方法

スクリーニングで使用したライブラリには、機能既知の化合物ライブラリ (京都大学ドラッグディスカバリーセンター) を利用した。スルファニルアミド、ベナゼプリル塩酸塩、アデノシン、サリチル酸イソアミル、2-フェニルメチル-1H-ベンゾイミダゾール、アデニン、DHF、ヒドロキシウレアは滅菌水に溶解させ、ブトコナゾール硝酸塩は 0.13 M DMSO に溶解させた。植物を培地で育成した実験ではマイクロピペットで培地に投与液を加え、植物をポットで育成した実験ではポットに下に敷いたバットに投与液を加えた。化合物を投与するタイミングについては、以下に示す条件を実験ごとに用いた。

- (1) RT-PCR による遺伝子発現解析：8 日目、あるいは、5 日目または 26 日目
- (2) RNA シークエンスによる遺伝子発現解析：5 日目
- (3) 培地での花成時期測定：5 日目または 26 日目
- (4) 土植えでの花成時期測定：シロイヌナズナについては、12 mM スルファニルアミド 500 mL を 5、9、12、16、19、23、26、30、33、37、40、44、47 日目に投与した。

ルッコラについては、1.2 mM スルファニルアミド 500 mL を 5、9、12、16、19、23、26、30、33 日目に投与した。

時計遺伝子のプロモーター活性の継時的測定

培養 7 日目の *CCA1::LUC* の植物個体に、ルシフェリン溶液 (2.5% D-luciferin カリウム塩 (L8220、Biosynth)、0.005% Triton X-100) 20 μ L を投与し、培養 8 日目の植物個体全体を寒天培地ごとくり抜き (約 80 μ L)、96 穴マルチウェルプレート (96F マイクロウェルブラックポリスチレンプレート、型番 237105、ヌンク) のウェルに移した。透明なプレートシールで蓋をし、各ウェルの上部に注射針で直径約 1 mm の空気穴を開けた。試薬投与前の発光量データを利用して植物の成長速度を補正する目的で、このプレートを生物発光測定装置 (高感度生物発光測定装置 CL96 シリーズ、中立電機株式会社) に設置し、発光を 1 日間測定した。測定後、試薬 20 μ L を投与し、さらに発光を 5 日間以上測定した。各タイムポイントの生物発光強度を cps として得た。

RT-PCR

各サンプリング時刻において、植物をエッペンチューブにステンレスビーズ (2 粒、ステンレスビーズ 2 mm、0072037-000、TAITEC) とともに入れ、液体窒素で凍結させた。凍結させた試料を融解しないよう液体窒素で冷却しながら、キアゲンミキサミル (MM300、Retsch) を用いて周波数 27 Hz で 3 分間粉碎した。RNA 抽出キット (RNeasy Plant mini kit、QIAGEN) で試料から total RNA を抽出し、品質と濃度を Nano Drop 2000 (Thermo Scientific) で確認した。その RNA 1 μ g を鋳型として逆転写酵素 (Prime Script RT Reagent Kit With gDNA Eraser、TAKARA) で逆転写し、cDNA を合成した。最後に、得られた cDNA を超純水で 7 倍に希釈し、そのうちの 3 μ L を鋳型として、内部標準として *IPP2* を用いたリアルタイム qPCR (CFX、Bio-Rad) を行った。PCR の後、内部標準遺伝子と目的遺伝子の Ct 値から目的遺伝子の発現量を定量した。使用したプライマーは表 1 に示した。

表 1 | RT-PCR で用いたプライマー

RT-PCR において用いたプライマーの情報を以下に示した。

名称	プライマー配列 (5'-3')	参考文献
<i>IPP2-F</i>	GTATGAGTTGCTTCTCCAGCAAAG	Hazen <i>et al.</i> , 2005
<i>IPP2-R</i>	GAGGATGGCTGCAACAAGTGT	
<i>CCAI-F</i>	GAGGCTTTATGGTAGAGCATGGCA	Endo <i>et al.</i> , 2014
<i>CCAI-R</i>	TCAGCCTCTTTCTCTACCTTGGAGA	
<i>LUX-F</i>	ATCATGGAGCTGGTGGAAATGG	(本研究で作成)
<i>LUX-R</i>	TGCAATTTGGGACTTTGCGGT	
<i>FT-F</i>	CTAGCAACCCTCACCTCCGAGAATA	Shimizu <i>et al.</i> , 2015
<i>FT-R</i>	CTGCCAAGCTGTTCGAAACAATATAA	

RNA-seq 解析

培養 14 日目の ZT12 (明暗周期条件において明期開始から 12 時間後) の植物から、RT-PCR と同様の方法で、RNA を抽出した。RNA 分析キット (Agilent RNA6000 ピコキット、Agilent) を用いて RIN 値を定量することで、得られた RNA の品質と濃度を評価し、RNA-seq に使用できる高い品質の RNA であることを確かめた。次に、得られた RNA から、ライブラリ作製キット (NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina E7530、NEBNext Multiplex Oligos for Illumina Set4 E7730S、NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module E7490、NEB) でライブラリを作製し、中部大学の鈴木孝征博士に依頼して NextSeq 500 (Illumina) を用いて RNA-seq を行った。得られたリードデータは bowtie [Langmad *et al.*, 2009] の設定「--all --best --strata」を用いて TAIR10 のゲノムデータにマッピングし、発現量を標準化することで [McDermid *et al.*, 2019]、リファレンス ID ごとにコントロールおよびスルファニルアミド (5 μ M、50 μ M) 投与時の遺伝子発現量を得た。Python を用いて、リファレンス ID ごとの発現量データをスプライシングバリエーションごとに合算し、TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) のデータを利用して遺伝子名と紐付けた。その後、*FT* 発現の抑制に関わる候補遺伝子を明らかにするため、FLOR-ID (<http://www.phytosystems.ulg.ac.be/florid/>) [Bouché *et al.*, 2016] を利用して、スルファニルアミドによって発現量が変動した時計遺伝子および花成関連遺伝子を選抜した。

ウェスタン・ブロッティングによるタンパク質量測定

発芽後 14 日目の ZT12 の芽生えに対して、RT-qPCR と同様の方法で、植物を液体窒素で凍結し粉碎した。約 0.5 mL のサンプルを Extraction Buffer (50 mM sodium-phosphate pH 7.4、150 mM KCl、10% glycerol、5 mM EGTA、0.1% Triton、0.1% SDS、0.5% sodium deoxycholate、50 μ M MG-132、2 mM Na₃VO₄、2 mM NaF、Pierce Protease Inhibitor Tablet EDTA-free (Thermo Fisher Scientific)、1 mM DTT、PhosSTOP (Roche)) で懸濁し、4°C、14,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を 2x Sample Buffer (100 mM Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、20% グリセロール、10% 2-メルカプトエタノール、ブROMOFENOLブルー) と混合し、85°C で 5 分熱変性させた。DC protein assay (Bio-rad) を用いてタンパク質濃度を定量し、その 70 μ g を解析に使用した。抽出したタンパク質は 10% SDS-PAGE gel を用いて分離し、PVDF メンブレン (Immobilon-Pmembranes、Millipore) に転写した。GFP 抗体 (Invitrogen) により GFP タンパク質を検出した。検出には、SuperSignal West Pico Luminol/Enhanced Solution (Thermo Fisher Scientific) および Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE healthcare) を用いて化学発光させ、LAS4000 (Ge healthcare) で撮影した。撮影後の画像は Image Studio Lite (LI-COR) を用いて定量した。Actin もしくは HSP90 を内部標準とし、それらに対する GFP シグナルの相対値を算出した。

花成時期測定

抽苔後、ロゼット葉と茎生葉をそれぞれ数え、ロゼット葉と茎生葉の総葉数を花成時期の指標とした [Koornneef *et al.*, 1991]。ルッコラもシロイヌナズナと同じアブラナ科植物であり、ロゼットを形成した後に花成することから、シロイヌナズナと同様に総葉数を花成時期の指標とした。

結果

ケミカルスクリーニングによる化合物選抜の結果

本研究の先行研究において、花成時期に影響する化合物を選抜するケミカルスクリーニングが実施され、京都大学医学部ドラッグディスカバリーセンターが所蔵する約2,500種の機能既知薬ライブラリの中から最終的に30種の候補化合物が得られていた[小河、2018、修士論文]。これらの候補化合物は、3段階のスクリーニングによって選抜された。第1段階のスクリーニングでは、維管束特異的に発現する時計遺伝子 *ELF4* のプロモーターの下流にルシフェラーゼレポーターを繋いだ形質転換植物 *ELF4::LUC* に対して化合物投与が行われ、化合物投与時に時計遺伝子 *ELF4* の示す概日リズムを変化させる化合物の探索が行われた。第2段階では第1段階と同様のスクリーニングが再度行われ、第3段階では *FT* 遺伝子の発現量を変化させる化合物の探索が行われ、最終的に30種類の候補化合物が選抜されていた。

そこで本研究では、まず、先行研究のスクリーニング結果が再現するかを追試することとした。植物個体植物個体候補化合物の中には1gあたり100万円を超える化合物も含まれていたことから、入手が比較的容易であり、価格も妥当なものを選抜した。さらに、先行研究では花成が早まると想定される化合物と遅延すると想定される化合物の両方がえられていたが、一般的に植物は非生物学的ストレスにより花成時期が早まる[Xu *et al.*, 2014; Blanvillain *et al.*, 2011] ことを考慮し、ストレス応答による花成促進の可能性を排除するため、花成が遅延すると想定される化合物として、最終的にスルファニルアミド、ベナゼプリル塩酸塩、アデノシン、サリチル酸イソアミル、2-フェニルメチル-1H-ベンゾイミダゾール、アデニン、ブトコナゾール硝酸塩の7種類の候補化合物に着目し、解析をおこなった。

12L/12D条件で5日間生育した野生型に対して、さまざまな濃度でこれら7種類の化合物を投与し、14日目の *FT* 発現量を RT-PCR によって測定した(図3)。ブトコナゾール硝酸塩以外の6種類の化合物は水を溶媒とし、ブトコナゾールは DMSO を溶媒とした。スルファニルアミド、ベナゼプリル塩酸塩、2-フェニルメチル-1H-ベンゾイミダゾール、ブトコナゾールでは濃度依存的な *FT* 発現量の上昇あるいは低下が見られ、これらの化合物については花成に何らかの影響を及ぼしうる可能性が示された。一方で、化合物投与によるストレスによって *FT* 発現量が上昇する可能性も考えられることから、2-フェニルメチル-1H-ベンゾイミダゾールのように濃度依存的な *FT* 発現の上昇が見られた化合物は避け、濃度依存的な *FT* 発現量の低下が見られた3種類の化合物に着目した。なかでも、スルファニルアミドはもっとも強く *FT* 発現を低下させたことから、本研究ではスルファニルアミドに注目して解析を行うこととした。

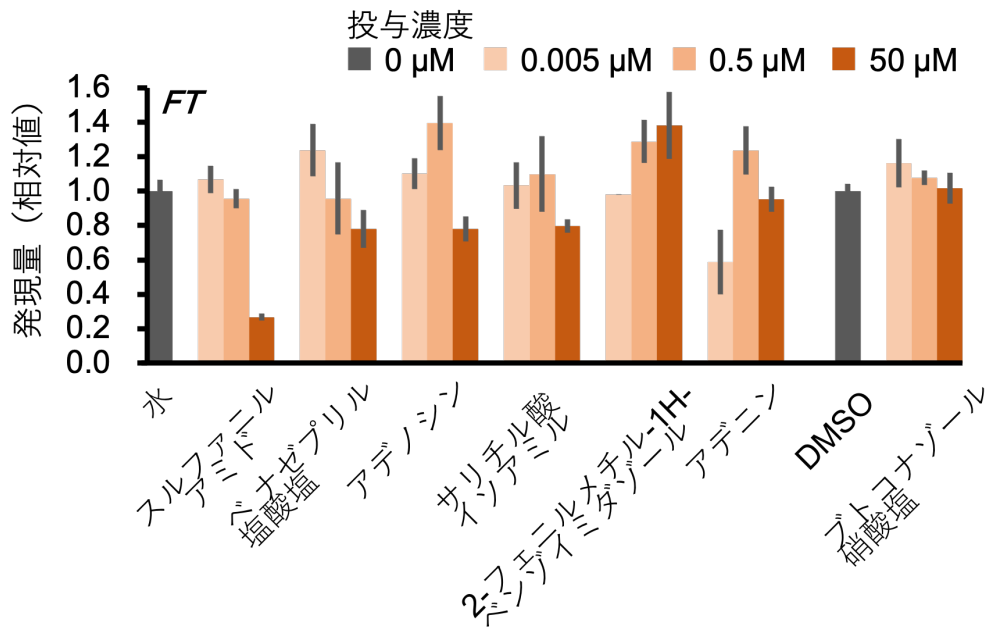


図 3 | 7 種類化合物の投与後の FT 発現量

12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型に 7 種類の化合物を投与した後、14 日目 ZT12 での FT 発現量を RT-PCR により測定した。(n = 3、エラーバーは標準誤差)

さらに、スルファニルアミドが *FT* の 1 日の発現パターンに与える影響を検証するため、14 日目において 4 時間おきの *FT* 発現量を測定したところ、コントロールでは明期の終わりに見られる *FT* の発現ピークが、スルファニルアミド投与によりほぼ消失することが確認された (図 4A)。さらに、50 μ M のスルファニルアミドの投与によって野生型では花成時期の有意な遅延が見られた一方で (図 4B)、*FT* の変異体 *ft-101* ではそうした花成時期の遅延は見られなかった (図 4C)。これらのことから、スルファニルアミドは *FT* 遺伝子の発現調節を介して花成を制御していることが示唆された。

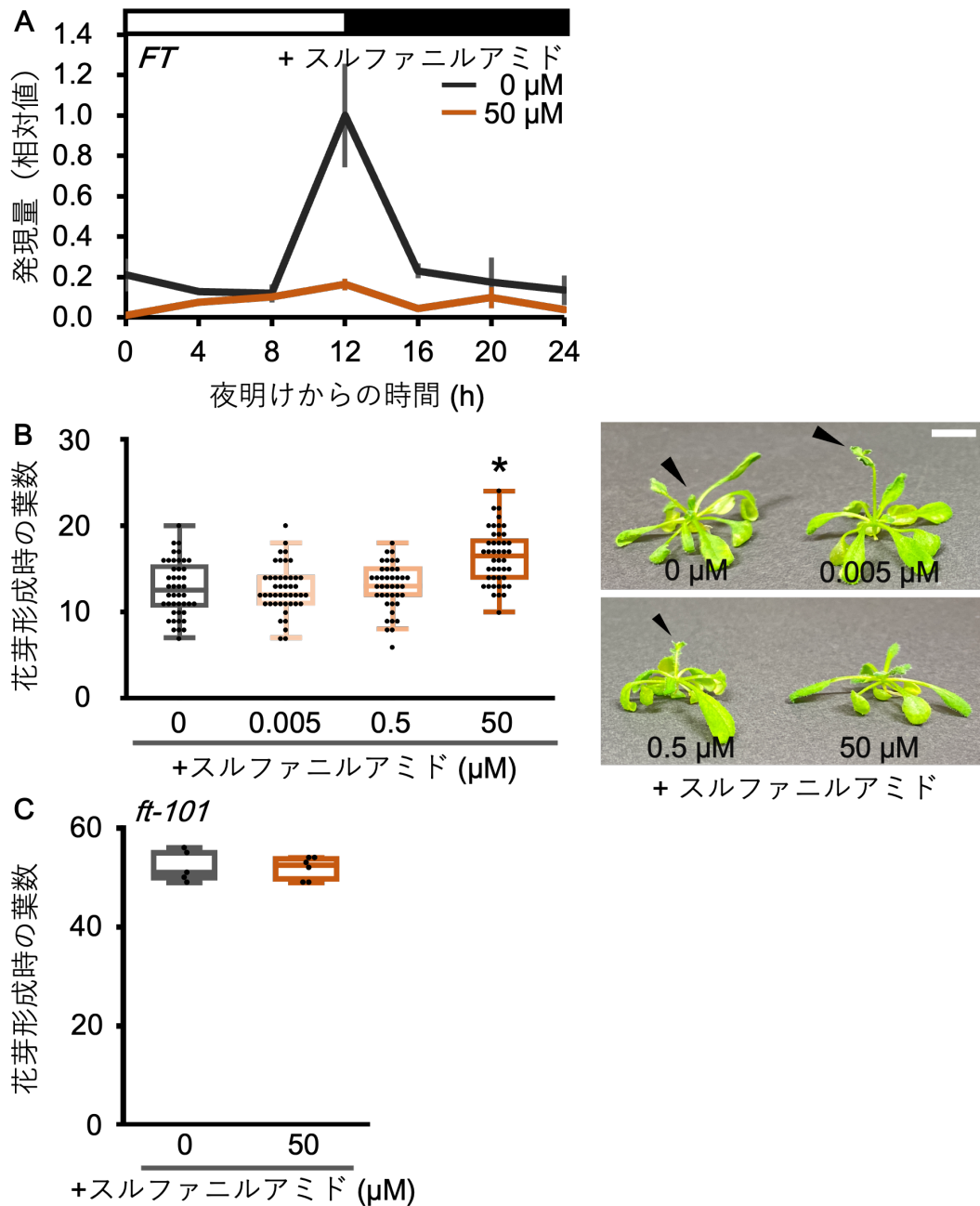


図 4 | スルファニルアミド投与後の FT 発現量および花成時期

(A)12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、14 日目の FT 発現量を RT-PCR により測定した。(n=3、エラーバーは標準誤差)

(B) 12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、花芽形成時の葉数を測定した。矢じりは蕾を示す。(n \geq 41、* $p < 0.05$ 、スルファニルアミド非投与群をコントロールとしたダネット検定、スケールバーは 1 cm)

(C)12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、花芽形成時の葉数を測定した。(n \geq 6、スチューデント t 検定)

(B,C) 箱ひげ図の箱の下端は第一、上端は第三四分位数を示す (以下同様)。

スルファニルアミドによる *FT* の発現抑制効果の持続性

これまでの解析により、スルファニルアミドの投与により 14 日目の *FT* 発現量は劇的に低下していたものの、総葉数は最大でも 3 枚程度増加するにとどまっております、花成遅延効果はそれほど顕著ではなかった。これは、過去の研究において、*FT* 発現量が野生型の約 1/3 程度になる *prp9prp5* 二重変異体での花成時期が、総葉数で約 5 枚増加する [Nakamichi *et al.*, 2007] ことと比べても、スルファニルアミドの花成時期遅延効果は低いものであった。

スルファニルアミドが属しているサルファ剤は化学的に安定であることが知られてはいるものの、スルファニルアミドの花成時期遅延効果が小さい原因は、取り込まれたスルファニルアミドの代謝や生体内での分解によって *FT* 発現が継続的に抑制されていないことにあると考えた。そこで、スルファニルアミド投与による *FT* 発現抑制効果の持続性を評価するために、12L/12D 条件下で育成した 5 日目の野生型に対してスルファニルアミドの投与を行い、その後 2、3 日ごとに *FT* 発現量を qPCR で測定した (図 5)。各測定日の *FT* 発現量は、野生型の *FT* 発現パターンが 12L/12D 条件下でピークを示す ZT12 において測定した。

スルファニルアミドを投与していないコントロールでは、*FT* 発現量は 1 週間目から 26 日目までの期間も一定程度認められたものの、26 日目以降は急上昇し 35 日目まで高い発現量が持続した。一方で、5 日目にスルファニルアミドの投与した植物では、約 3 週間後の 26 日目までは *FT* の発現がほぼ完全に抑制されていたものの、コントロールにおいて *FT* 発現が急上昇する 26 日目以降は発現が上昇し、33 日目から 35 日目までは野生型と同程度の発現量を示した。この結果から、花成の遅延効果が比較的小さかった原因は *FT* 発現を完全に抑制しきれていないことによると考えられた。そこで、より強力に *FT* 発現を抑制するため、5 日目に加えて 26 日目にもスルファニルアミドを投与した。その結果、少なくとも 44 日目まで *FT* の発現は強く抑制されたままであり、こうした *FT* 発現の抑制に対応して 2 回のスルファニルアミドを投与することで花成時期の遅延効果はさらに強まることが確認された (図 6)。

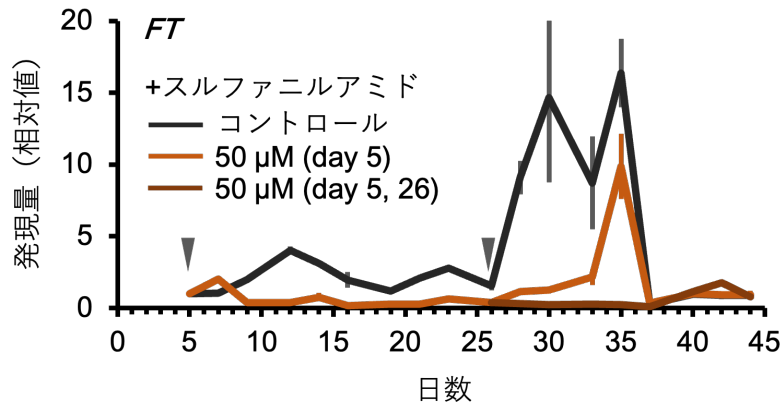


図 5 | スルファニルアミド投与後の FT 発現量の変化

12L/12D 条件下で生育した 5、26 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、5、7、9、12、14、16、19、21、23、26、28、30、33、35、37、40、42、44 日目の ZT12 での FT 発現量を RT-PCR により測定した。(n=3、エラーバーは標準誤差)

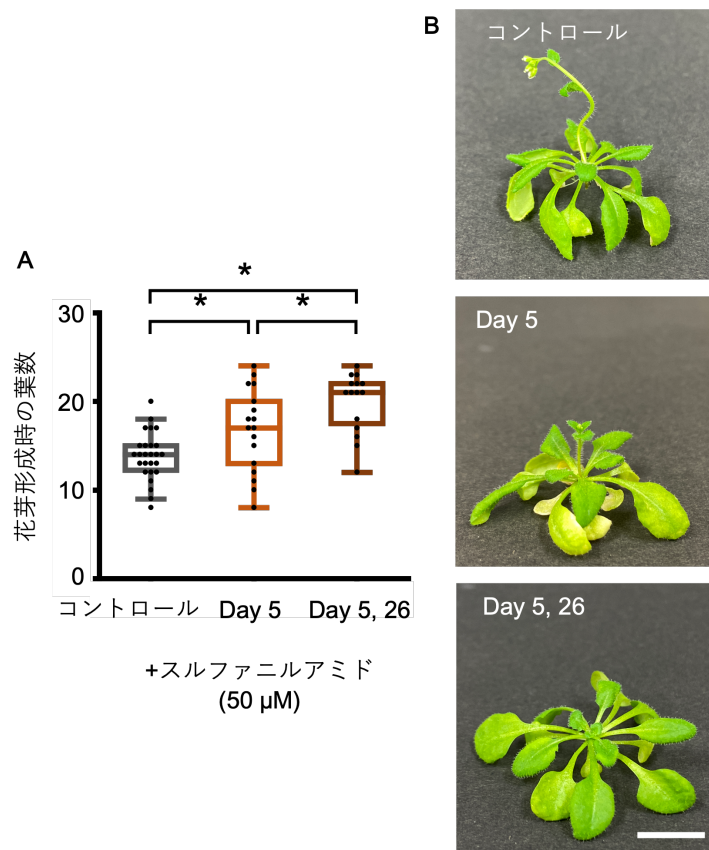


図 6 | スルファニルアミドを 2 回投与した後の花成時期

(A)12L/12D 条件下で生育した 5、26 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、花芽形成時の葉数を測定した。(n ≥ 15、*p<0.05、チューキー・クラマー検定)

(B)25 日目の植物。(スケールバーは 1 cm)

次に、2回のスルファニルアミド投与のうち、早い時期と遅い時期のどちらのFT発現抑制が重要なのかを明らかにするため、2回に分けた投与タイミングでのスルファニルアミド投与をさまざまに変化させて花成時期を計測した(図7)。図5の水投与実験においてFT発現の誘導が見られた26日目を、本実験でも2回目の投与日とし、5日目と26日目に水を投与したコントロールでは、図7左端に示すように花成時期は葉数では約13枚となった。このコントロールに対して、1回目の投与濃度及び1回目の投与濃度の合計が50 µMになるように投与濃度を設定した実験区(図7中央に示した5区)では、1回目の投与濃度が37.5 µMを超過した条件において有意な花成遅延が見られ、1回目の投与濃度が十分な37.5 µMを超えない条件においては26日目の投与濃度に関わらず花成時期の抑制は見られなかった。また、1回目及び2回目の投与日に50 µMの投与を行った条件(合計100 µM、図7右端、図6に同じ)では、さらに花成時期が遅れた。これらの結果から、5日目におけるFTの発現抑制が花成時期の決定により大きな影響を与えることが示唆された。また、これまでの実験において、寒天培地で栽培した植物にスルファニルアミドを投与したときに観察された花成時期の遅れは、植物個体を土植えて栽培した植物にスルファニルアミドで投与しても、再現良く観察された(図8)。

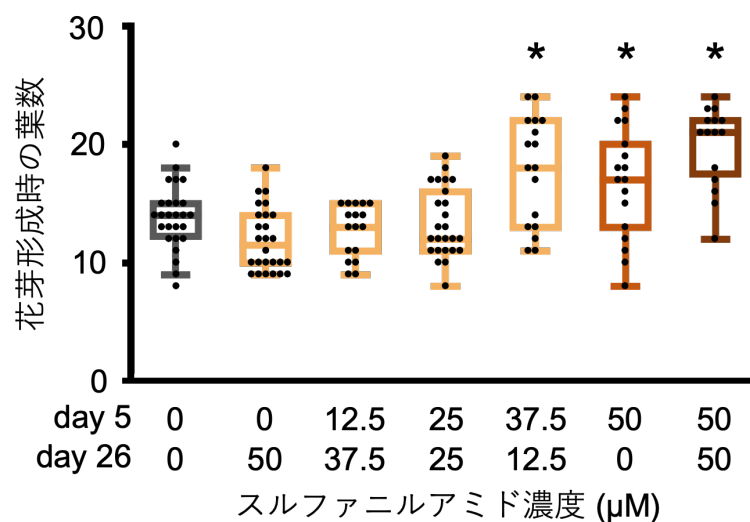


図7 | さまざまな濃度のスルファニルアミドを2回投与した後の花成時期

12L/12D 条件下で生育した5、26日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、花芽形成時の葉数を測定した。(n ≥ 15、*p < 0.05、スルファニルアミド非投与群をコントロールとしたダネット検定)

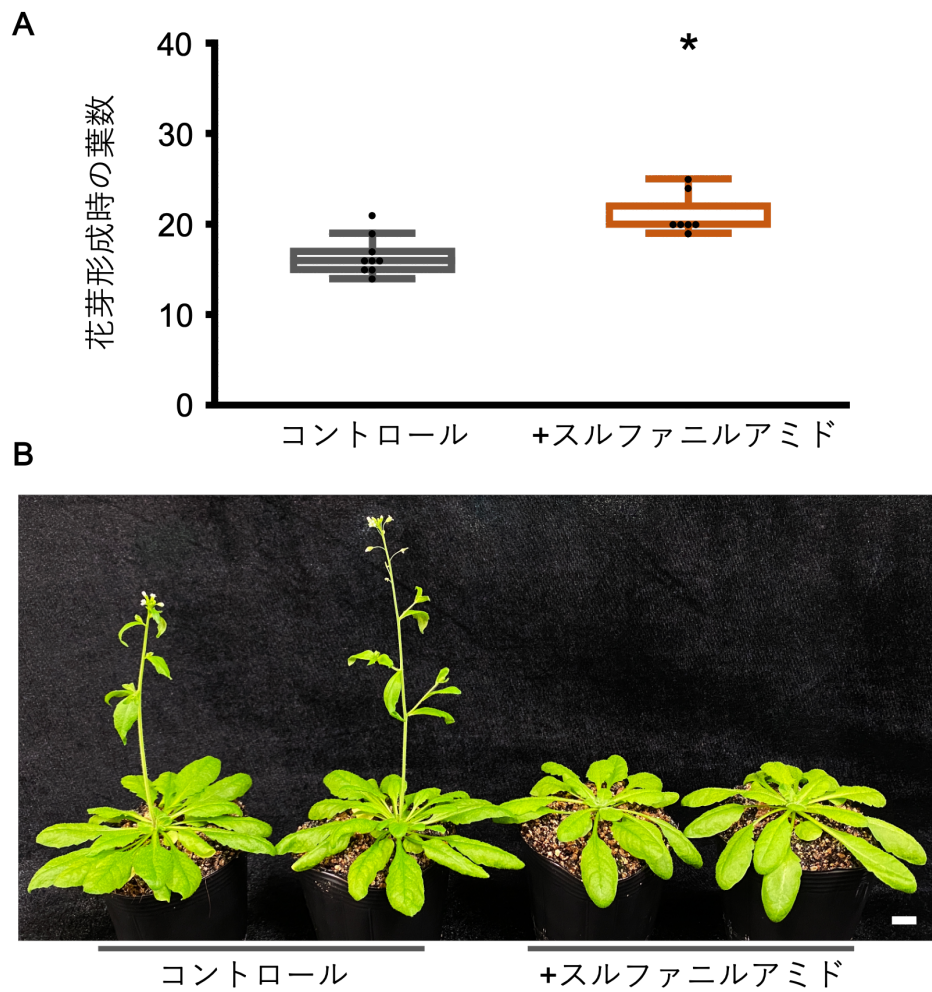


図 8 | 土植えでのスルファニルアミド投与後の花成時期

(A)12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、花芽形成時の葉数を測定した。(n = 8、*p < 0.05、スチューデント t 検定)

(B)48 日目の植物。(スケールバーは 1 cm)

スルファニルアミドが *FT* 発現と花成時期に与える効果

スルファニルアミドは、*p*-アミノ安息香酸が関わる酵素反応の競合阻害により、ジヒドロ葉酸 (DHF) の前駆体であるジヒドロプテロイン酸の生合成を阻害する [Goh and Koren 2008, 図 9]。過去の研究では、DHF あるいはテトラヒドロ葉酸 (THF) をいわゆる葉酸と呼称しているが、THF は冷凍保存が必要な不安定な化合物であるため、以下の実験では特に断りのない限り、DHF を葉酸とみなして実験を行った。

10 μ M 葉酸投与では花成時期にほとんど影響を与えなかったが、50 μ M スルファニルアミドと 10 μ M 葉酸の同時投与ではスルファニルアミドの花成抑制効果が見られなかった (図 10) ことから、スルファニルアミドが葉酸生合成経路で生成する DHF またはその代謝物の生成を阻害することにより花成遅延を起こしていることが示唆された。

また、スルファニルアミドは核酸の生合成を阻害する作用があることも知られている [Hanson and Gregory, 2011]。スルファニルアミドによる核酸生合成の阻害が花成遅延の原因であるかを評価するために、スルファニルアミドとは異なる作用機序を持つ核酸生合成阻害剤であるヒドロキシウレアを植物に投与した。シロイヌナズナで有効であることが既に示されている濃度 [Cools *et al.*, 2010] のヒドロキシウレアを投与しても、*FT* の発現や花成時期にはほとんど影響が見られず (図 11)、スルファニルアミドの投与による花成遅延は核酸生合成の阻害がではないと示唆された。

このようにスルファニルアミドには多面的な機能があり、スルファニルアミドによって制御される葉酸および核酸の生合成経路は植物の代謝に関与している。こうしたことから、スルファニルアミド投与による影響が種子に及んでいないことを確認するため、スルファニルアミドを投与した植物から得られた鞘の大きさと鞘あたりの種子数、得られた種子の発芽率を評価した。コントロールとスルファニルアミドを投与した植物の間に有意な差は認められず、少なくとも今回の実験条件においては種子形成には有意な差が見られず、花成に表現型が見られることが示された (図 12)。

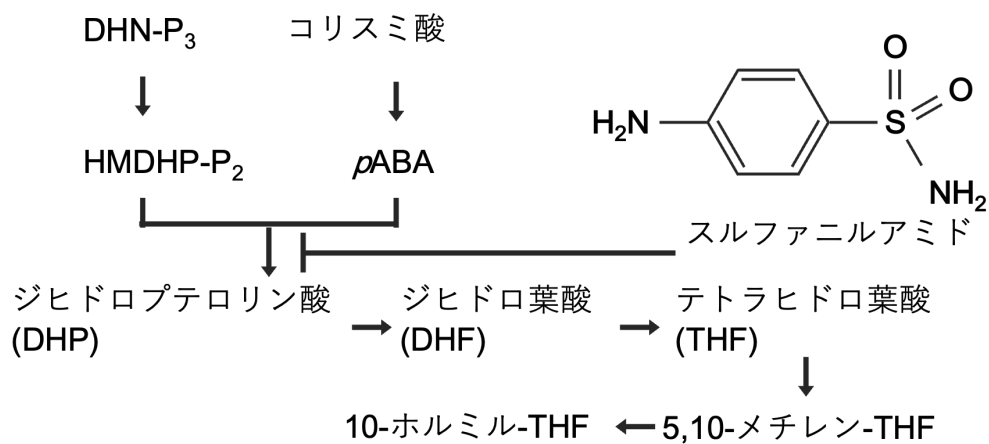


図 9 | 葉酸生合成経路とスルファニルアミドの作用点

葉酸生合成経路の概要 (Hanson and Gregory 2011 を編集)

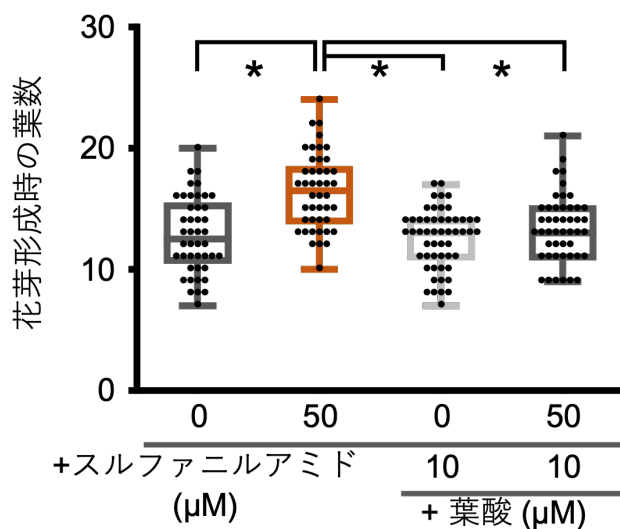


図 10 | スルファニルアミドおよび葉酸を投与した後の花成時期

12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型にスルファニルアミド、または、葉酸を投与した後、花芽形成時の葉数を測定した。(n ≧ 44、*p < 0.05、チューキー・クラマー検定)

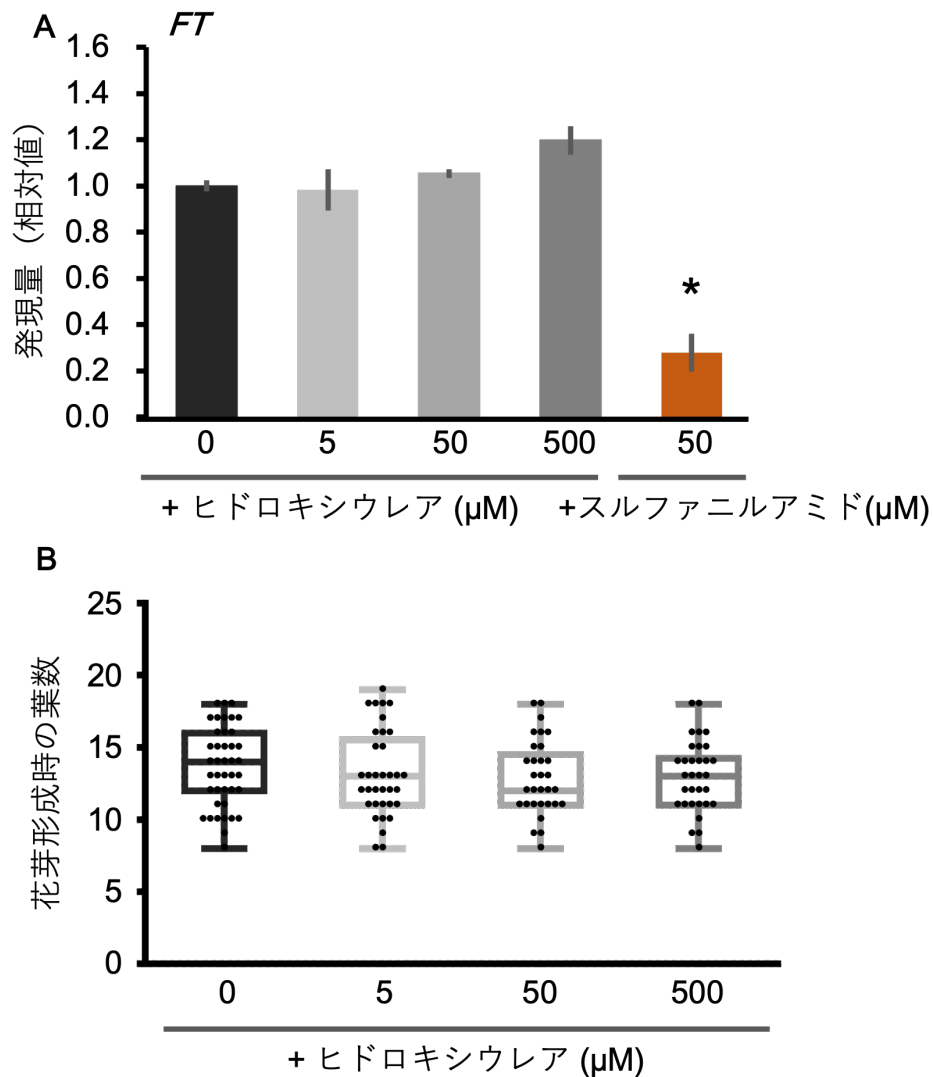


図 11 | ヒドロキシウレアを投与した後の *FT* 発現量および花成時期

(A)12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型にスルファニルアミド、あるいは、ヒドロキシウレアを投与した後、14 日目 ZT12 での *FT* 発現量を RT-PCR により測定した。(n=3、エラーバーは標準誤差)

(B)12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型にヒドロキシウレアを投与した後、花芽形成時の葉数を測定した。(n ≥ 31、* $p < 0.05$ 、スルファニルアミド非投与群をコントロールとしたダネット検定)

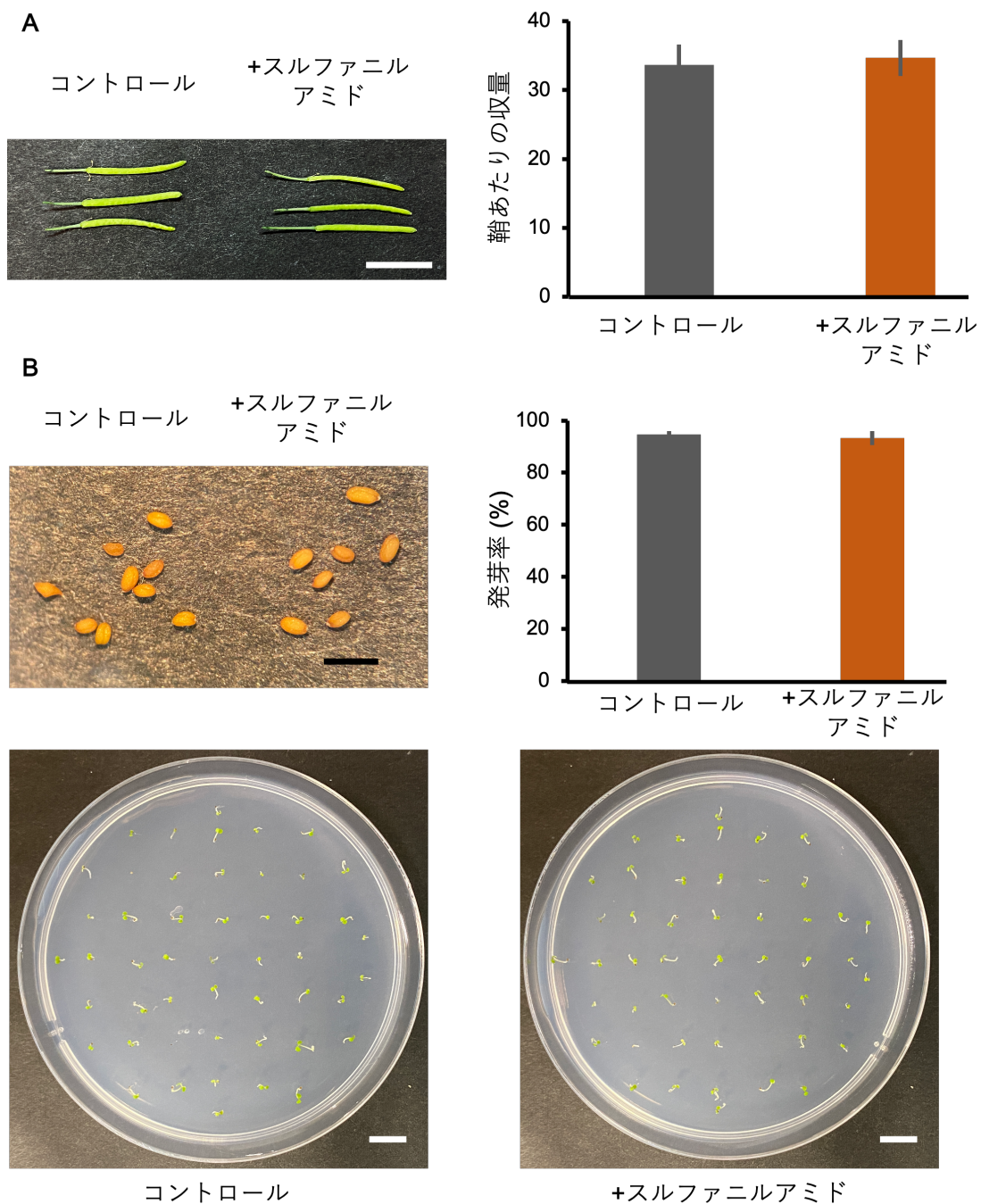


図 12 | スルファニルアミドが収量および発芽率に与える影響

(A)12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、得られた鞘、および、その種子収量。(n=3、エラーバーは標準誤差、スチューデント t 検定、スケールバーは 1 cm)

(B)12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、得られた種子、および、その発芽率、育成 4 日目の発芽した植物。(n=3、エラーバーは標準誤差、スチューデント t 検定、スケールバーは 1 cm)

花成調節経路は、概日時計が関与する光周性花成経路を含むいくつかの経路に集約され、*FT* の発現を調節している。スルファニルアミドが光周期経路を介して花成を制御しているかどうかを確かめるために、光周期経路が十分に働いている長日条件（16L/8D 条件）下で育成した植物と 12L/12D 条件で育成した植物に対してそれぞれスルファニルアミドを投与し、花成遅延の影響を調べた。16L/8D 条件でも 12L/12D 条件と同様に、スルファニルアミド投与は発育期の *FT* 発現を抑制したが、50 μ M スルファニルアミド投与の花成時期への影響は 12L/12D に比べて弱かった（図 4、図 5、図 13）。また、16L/8D または 12L/12D 条件で生育させた植物の *FT* 発現に対するスルファニルアミドの影響を比較したところ、16L/8D および 12L/12D 条件ともに、スルファニルアミドは夕方の方の *FT* 発現ピークを約 30%低下させ、スルファニルアミドの *FT* 発現量抑制効果の割合は、日長に非依存的であった（図 14）（two-way ANOVA、スルファニルアミド投与と日長との相互作用について $p = 0.19 > 0.05$ ）。以上の結果から、スルファニルアミドが光周性花成経路とは独立して花成を調節していることが示唆された。

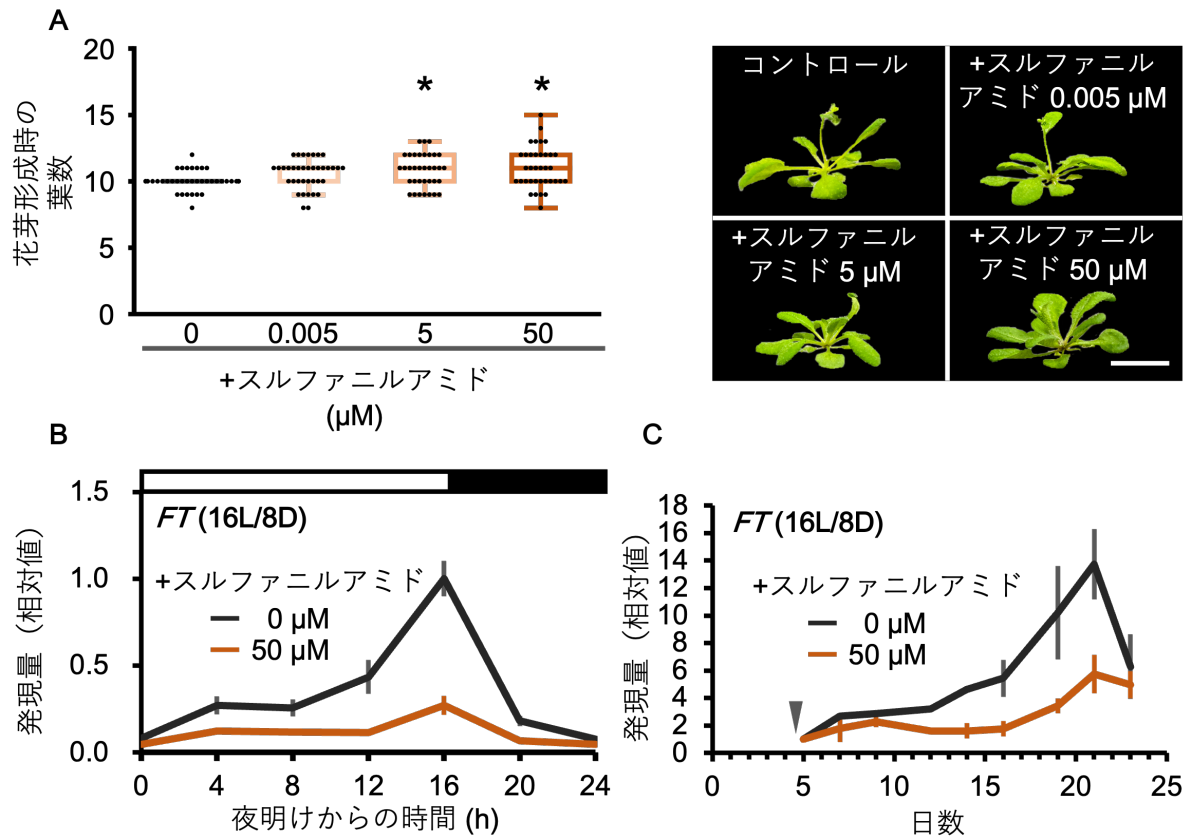


図 13 | スルファニルアミド投与後の花成時期、FT 発現量

(A)16L/8D 条件下で生育した 5 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、花芽形成時の葉数を測定した。(n ≧ 21、*p<0.05、スルファニルアミド非投与群をコントロールとしたダネット検定、スケールバーは 1 cm)

(B)16L/8D 条件下で生育した 5 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、14 日目の 4 時間おきの FT 発現量を RT-PCR により測定した。(n=3、エラーバーは標準誤差)

(C)16L/8D 条件下で生育した 5 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、5、7、9、12、14、16、19、21、23 日目の ZT16 での FT 発現量を RT-PCR により測定した。(n=3、エラーバーは標準誤差)

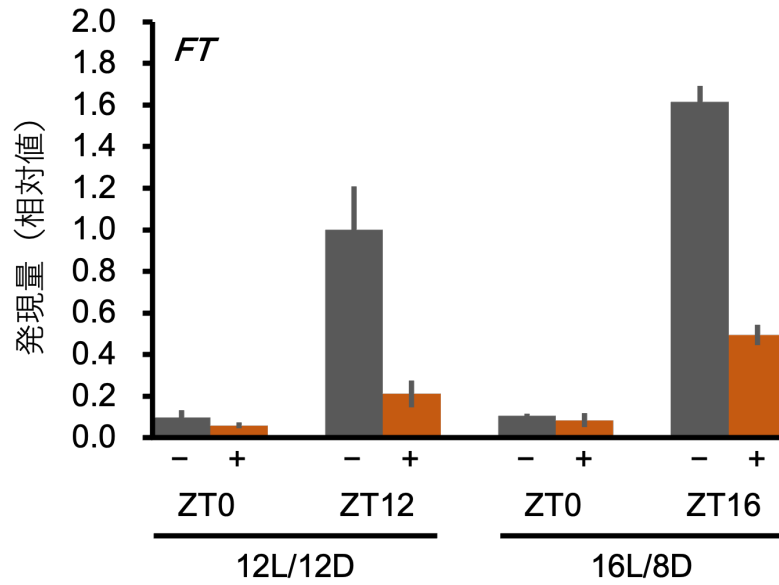


図 14 | スルファニルアミドを投与した後の *FT* 発現量

12L/12D、あるいは、16L/8D 条件下で生育した 5 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、14 日目の ZT12、あるいは、ZT16 での *FT* 発現量を RT-PCR により測定した。(n = 3、エラーバーは標準誤差)

時計遺伝子および花成関連遺伝子の発現解析

これまでの結果から、スルファニルアミドは *FT* 発現を抑制し、*FT* 発現誘導のタイミングを遅らせることで花成時期を遅らせることが示された。

次に、スルファニルアミドを投与した後に、*FT* 発現がどのように抑制されるかを明らかにするため、RNA-seq 解析を行い、スルファニルアミドによって発現量が 1.2 倍以上、あるいは、0.83 倍以下に変化する 1,796 遺伝子を同定した。Gene Ontology (GO) ターム・エンリッチメント解析の結果、有意に濃縮された遺伝子は刺激応答に関連する GO タームを持つ傾向があることが明らかとなった (表 2)。そこで、花成に関する機能と *FT* の発現量の変化の増減の方向性が一致している遺伝子に着目した。発現量が変わった 1,796 遺伝子のうち、23 遺伝子が FLOR-ID [Bouché *et al.*, 2016] を持っていた (図 15、表 3)。スルファニルアミド投与によって発現が抑制された花成促進遺伝子または促進された花成抑制遺伝子について、この遺伝子リストから抜粋したところ、7 つの候補遺伝子が得られた。次に、7 つの候補遺伝子のうち、スルファニルアミド投与においてもっとも大きな発現上昇を示した *LUX* に注目した (図 16A)。*LUX* は花成や胚軸伸長の制御に関わる転写因子であり [Lu *et al.*, 2012]、*LUX* は *FT* のプロモーター領域に結合してその発現を抑制している [Ezer *et al.*, 2017]。さらに、*lux-1* 変異体は早咲きであり [Helfer *et al.*, 2011]、この表現型は *LUX* をそのプロモーターの制御下で発現させるか (p*LUX*::*LUX*)、ダイズ (*Glycine max*) の *LUX* ホモログを過剰発現させることで補完することができる [Liew *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2020]。したがって、スルファニルアミドは *LUX* を介して部分的に *FT* を抑制していることが想定されたため、夕方の *LUX* の発現ピークがスルファニルアミド投与によって誘導されることを確認した (図 16B)。

表 2 | スルファニルアミド投与により発現が促進・抑制された遺伝子の GO エンリッチメント解析

スルファニルアミド投与で発現量が変化した遺伝子の上位 10 位の GO term を示した。p 値は PANTHER にて Benjamini-Hochberg 法により計算された FDR を用いた [Thomas *et al.*, 2003]。

p 値	アノテーション
5.41×10^{-68}	Response to stimulus
1.51×10^{-63}	Cellular process
4.50×10^{-57}	Response to stress
1.96×10^{-52}	Response to chemical
6.12×10^{-48}	Metabolic process
1.32×10^{-45}	Cellular metabolic process
5.11×10^{-44}	Response to abiotic stimulus
5.04×10^{-43}	Response to external stimulus
5.51×10^{-36}	Response to external biotic stimulus
4.96×10^{-36}	Response to other organism

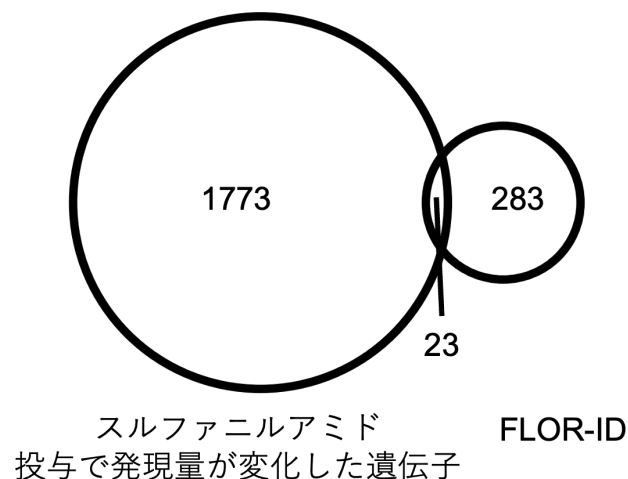


図 15 | スルファニルアミド投与で発現量が変化する遺伝子群と花成関連遺伝子群のオーバーラップ

スルファニルアミド投与で発現量が20%以上変化する遺伝子群と FLOR-ID [Bouché *et al.*, 2016] に登録されている花成関連遺伝子群のオーバーラップを示したベン図。

表 3 | スルファニルアミド投与時の発現量が有意に変化する花成関連遺伝子

スルファニルアミド投与によって発現量が 1.2 倍以上、あるいは 0.83 倍以下に変化した遺伝子のうち、FLOR-ID を持つ 23 遺伝子を、以下に示した。

AGI	遺伝子名	Fold Change	発現量変化	花成制御	候補遺伝子
AT2G30140	<i>UGT87A2</i>	3.25322807	Up-regulated	Positive	No
AT3G63010	<i>GID1B</i>	2.37374761	Up-regulated	Positive	No
AT2G17290	<i>CPK6</i>	1.90185116	Up-regulated	Positive	No
AT4G36920	<i>AP2</i>	1.73596384	Up-regulated	Negative	Yes
AT1G22770	<i>GI</i>	1.64657956	Up-regulated	Positive	No
AT1G32230	<i>RCD1</i>	1.61392339	Up-regulated	Negative	Yes
AT4G16280	<i>FCA</i>	1.57508538	Up-regulated	Positive	No
AT3G46640	<i>LUX</i>	1.5213511	Up-regulated	Negative	Yes
AT1G06040	<i>STO</i>	1.41436625	Up-regulated	Positive	No
AT2G43410	<i>FPA</i>	1.35093522	Up-regulated	Positive	No
AT4G23100	<i>CAD2</i>	1.3495178	Up-regulated	Positive	No
AT3G22380	<i>TIC</i>	1.34503806	Up-regulated	Positive	Yes
AT4G00830	<i>LIF2</i>	1.34323868	Up-regulated	Negative	Yes
AT5G51820	<i>PGM1</i>	0.79204606	Down-regulated	Positive	Yes
AT3G07650	<i>COL9</i>	0.74016134	Down-regulated	Negative	No
AT2G19520	<i>FVE</i>	0.73904967	Down-regulated	Positive	Yes
AT5G60100	<i>PRR3</i>	0.71866711	Down-regulated	Negative	No
AT1G57820	<i>VIM1</i>	0.68272035	Down-regulated	Negative	No
AT1G25560	<i>TEM1</i>	0.64856903	Down-regulated	Negative	No
AT2G20570	<i>GLK1</i>	0.62963536	Down-regulated	Negative	No
AT3G54560	<i>HTA11</i>	0.59686102	Down-regulated	Negative	No
AT5G47640	<i>NF-YB2</i>	0.53891764	Down-regulated	Positive	Yes
AT5G37260	<i>RVE2</i>	0.53762323	Down-regulated	Negative	No

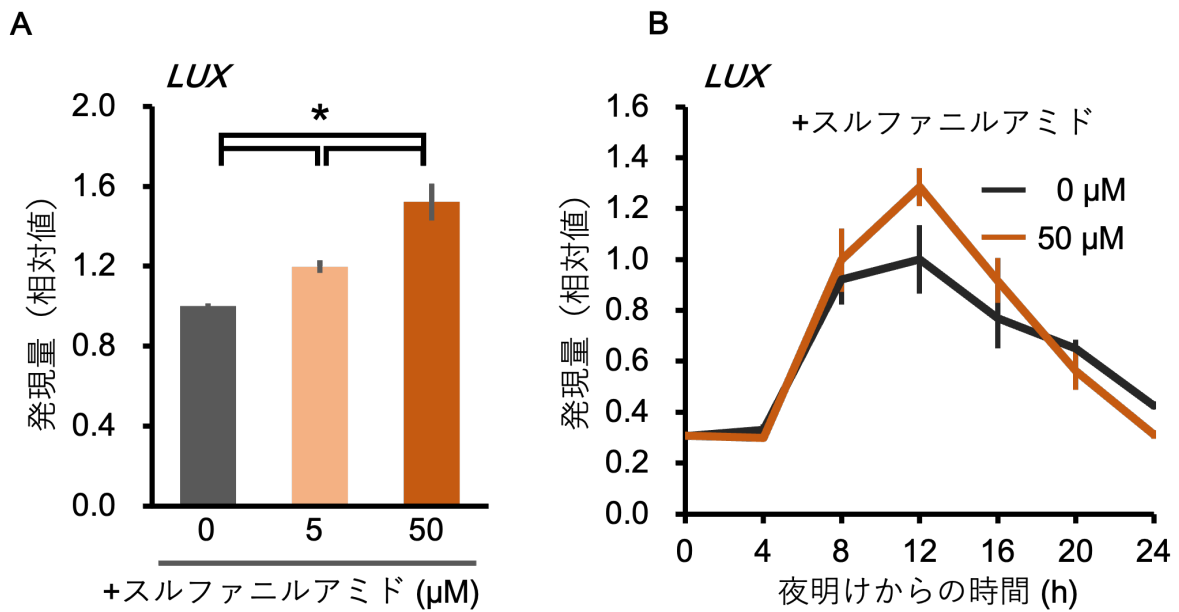


図 16 | スルファニルアミドを投与した後の *LUX* 発現量

(A) 12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、14 日目 ZT12 でサンプリングし、RNA-seq 解析で測定した。(n=2、エラーバーは標準誤差、* $p < 0.05$ 、チューキー・クラマー検定)

(B) 12L/12D 条件下で生育した 8 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、恒明条件下での 9 日目の 4 時間毎の *LUX* 発現量を RT-PCR で測定した。(n=3、エラーバーは標準誤差)

しかし、スルファニルアミド投与による時計遺伝子 *LUX* の発現促進効果は、mRNA レベルで1日のピークが1.2~1.5倍ほどと上昇量は小さく、1日の発現量の上昇量もまた小さいことから(図16)、*LUX* タンパク質量がそれほど大きくは変化していない可能性が考えられた。そこで、1日の中で *LUX* 発現量がトラフを示す ZT0 およびピークを示す ZT12 において *LUX* タンパク質量が変化するか検証するため、ウェスタン・ブロッティングにより *LUX* タンパク質を測定したところ、スルファニルアミド投与後では *LUX* タンパク質の定量にばらつきがあり、タンパク質量の大きな増加は見られなかったため、*LUX* は *FT* 発現に関与するものの、あくまで *FT* 発現制御の一端にすぎないと考えられた(図17)。*LUX* の発現は、もう一つの *FT* 直接制御因子である時計タンパク質 *CCA1* によって抑制されるため[Niwa *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2016]、スルファニルアミド投与による *CCA1* 発現を確認した(図18)。明け方にはスルファニルアミドによって *CCA1* の発現が抑制されたが、*FT* がもっとも強く誘導される夕方頃にはほとんど差が見られなかった。さらに、*CCA1* と *FT* の発現量の関係を知るために、*cca1-1* と野生型 Col-0 のヘテロ接合体の F₁ 世代における両遺伝子の発現量を測定した(図19)。F₁ 世代における *CCA1* の発現量は野生型に対して50%減少したが、*FT* の発現量にはほとんど影響がなかった。したがって、スルファニルアミドによる *FT* の抑制は、明け方の *CCA1* の発現低下だけでは説明できない可能性があり、スルファニルアミド投与の直接的な標的として *LUX* についてさらなる解析が必要であることが示唆された。

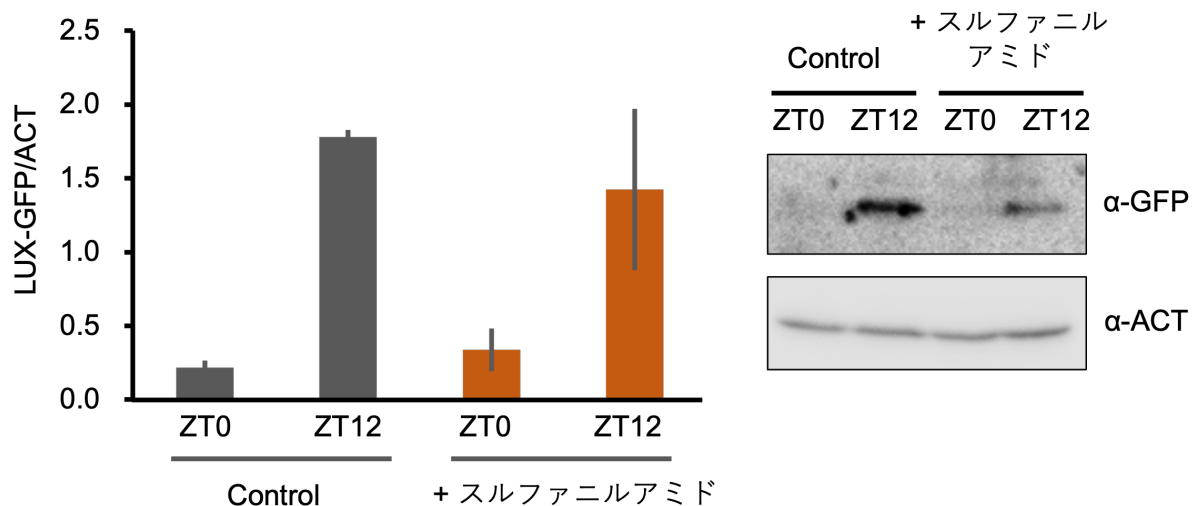


図17 | スルファニルアミドを投与した後の *LUX* タンパク質量

12L/12D 条件下で生育した5日目の *LUX::LUX-GFP* in *lux-4* にスルファニルアミドを投与した後、14日目 ZT0 および ZT12 での α -GFP をウェスタン・ブロッティングで測定した。各レーンには 70 μ g のタンパク質を投入した。(n = 5、エラーバーは標準誤差)

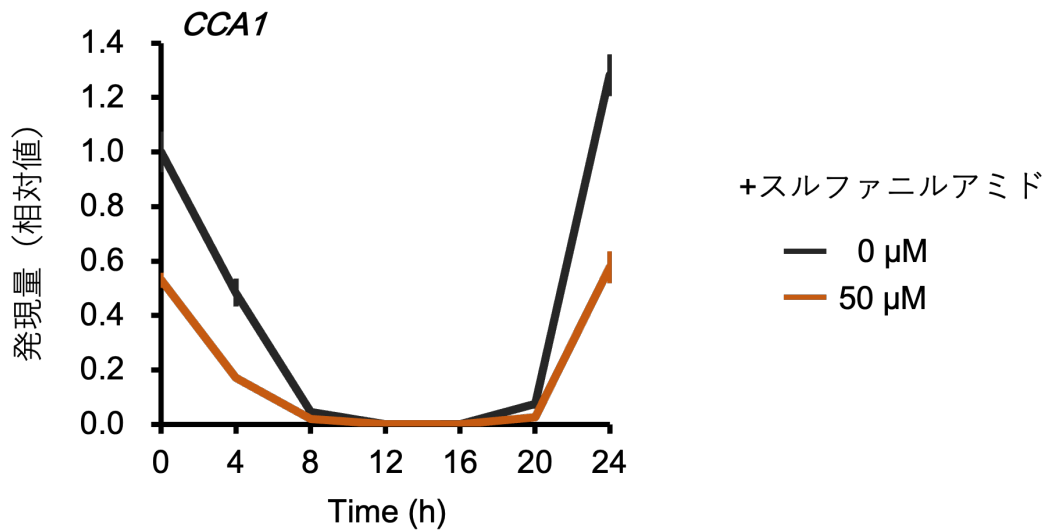


図 18 | スルファニルアミドを投与した後の *CCA1* 発現量

12L/12D 条件下で生育した 8 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、恒明条件下での 9 日目の 4 時間毎の *CCA1* 発現量を RT-PCR で測定した。(n = 3、エラーバーは標準誤差)

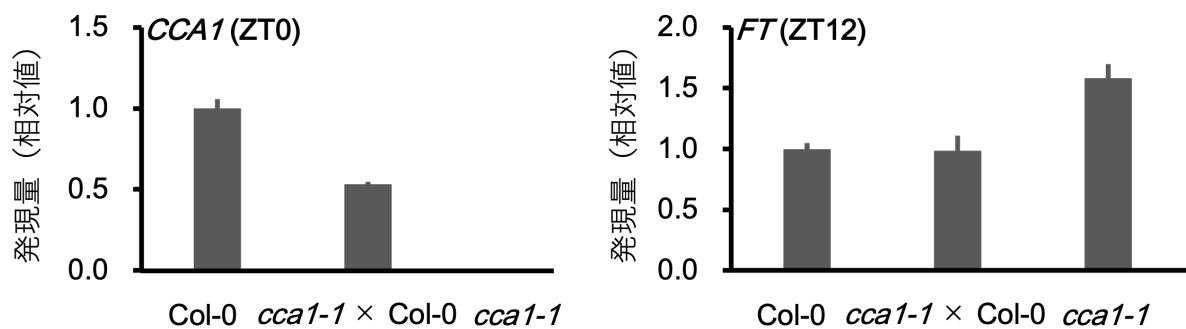


図 19 | *cca1* 変異体の *CCA1* 発現量および *FT* 発現量

12L/12D 条件下で生育した野生型、*cca1-1* × Col-0 F₁ 世代、*cca1-1* 変異体について、14 日目 ZT0 および ZT12 での *CCA1* 発現量および *FT* 発現量を RT-PCR により測定した。(n = 3、エラーバーは標準誤差)

そこで、野生型および *lux nox* 変異体 (CCAI::LUC 背景で、*LUX* およびそのホモログである *BROTHER OF LUX ARRHYTHMO* (*BOA*、別名 *NOX*) を amiRNA によってノックダウン [Nusinow *et al.*, 2011] した系統) における *FT* 発現抑制に対するスルファニルアミド投与の影響について調べた。*LUX* のホモログ *BOA* は RNA-seq による解析において、スルファニルアミド投与により発現量が 0.76 倍に低下しており、花成抑制遺伝子でありながら発現量が低下したことから、スルファニルアミドによる標的遺伝子の候補から棄却されていた。スルファニルアミド投与でも *lux nox* の *FT* 発現は抑制されたが、抑制の程度は野生型よりも弱く、スルファニルアミドによる *FT* 抑制は、*LUX* 発現の制御を介して部分的に説明できる可能性が示唆された (図 20)。続いて、*LUX* の関与を確認するために、*lux nox* の花成時期に対するスルファニルアミドの影響を調べた。野生型とは異なり、*lux nox* はスルファニルアミド投与に対してほとんど感受性がなく、花成時期の遅れは見られなかった (図 21)。*LUX* の重要性をさらに確認するために、スルファニルアミド投与で発現量が低下した 10 個の遺伝子と、以前の RNA-seq データセット [Zhang *et al.*, 2019] で明らかとなった 132 個の *LUX* 標的遺伝子とのオーバーラップを検証した (図 22)。2 つの遺伝子が両方のリストに属し ($p = 4.7 \times 10^{-4}$)、スルファニルアミドと *LUX* が部分的に同じシグナル伝達経路を共有していることが示唆された。これらの結果から、*LUX* はスルファニルアミドによる花成制御における標的遺伝子の一つであることが示唆された。

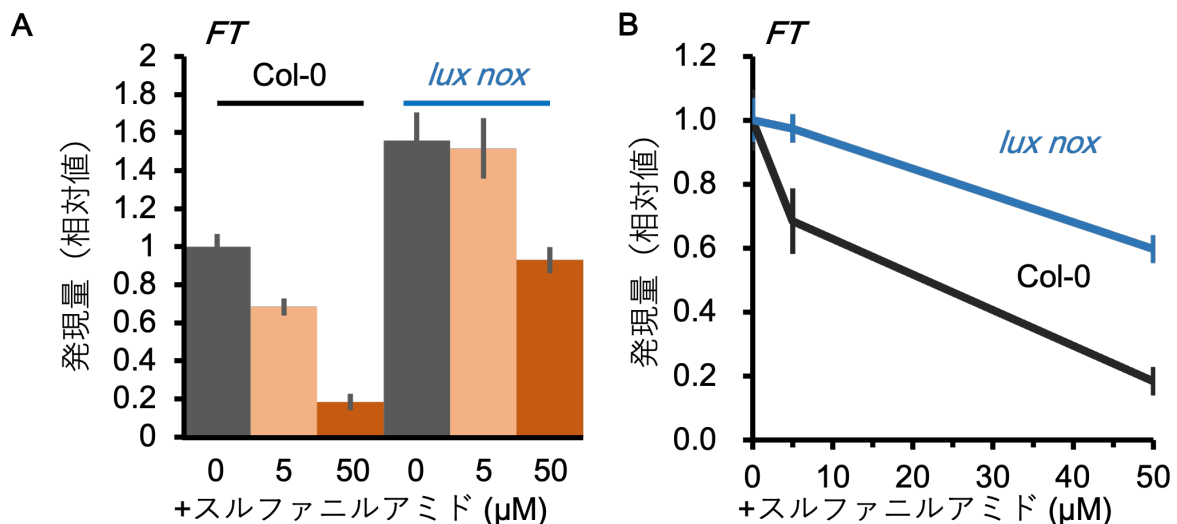


図 20 | スルファニルアミドを投与した後の *lux* 変異体の *FT* 発現量

(A) 12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型、あるいは、*lux* 変異体にスルファニルアミドを投与した後、14 日目 ZT12 での *FT* 発現量を RT-PCR により測定した。

($n=3$ 、エラーバーは標準誤差)

(B) グラフ(A)をもとに、スルファニルアミド 0 μM 投与時の発現量を 1 に補正した。

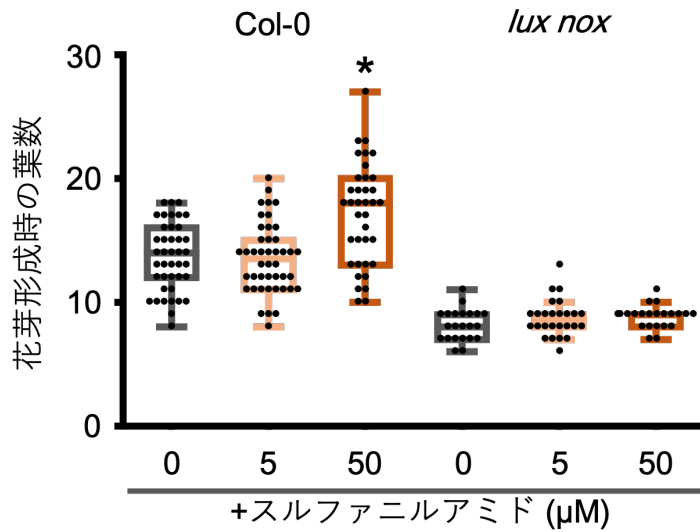
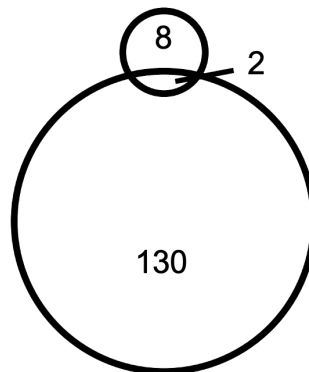


図 21 | スルファニルアミドを投与した後の *lux* 変異体の花成時期

12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型、あるいは、*lux* 変異体にスルファニルアミドを投与した後、花芽形成時の葉数を測定した。(n ≥ 22、**p* < 0.05、スルファニルアミド非投与群をコントロールとしたダネット検定)

スルファニルアミド処理で
発現量が低下する遺伝子



*lux-1*変異体
で発現量が
上昇した遺伝子

図 22 | スルファニルアミド投与で抑制される遺伝子群と *lux-1* 変異体で発現量が上昇する遺伝子群のオーバーラップ

スルファニルアミド投与で抑制される遺伝子群と *lux-1* 変異体 [Zhang *et al.*, 2019] で発現量が上昇する遺伝子群のオーバーラップを示したベン図 (超帰化分布検定、 $p = 4.7 \times 10^{-2} < 0.05$)。

また、スルファニルアミドを投与することで *FT* 発現の誘導が遅れることから、植物の幼若期に *FT* 発現を抑制する花成抑制遺伝子 *TEM* もまた、上記の候補遺伝子以外の候補遺伝子と考えられた。*TEM1*、*TEM2* は発達段階初期に強く発現し、*FT* の発現を抑制する [Castillejo *et al.*, 2008]。そこで、RNA-seq 解析の結果から花成抑制遺伝子 *TEM1* および *TEM2* の発現量を調査したところ、スルファニルアミド投与では両者ともに発現が抑制されていた (図 23)。また、*tem1 tem2* 変異体の *FT* 発現量は、スルファニルアミドに対して応答性を示した (図 24)。以上のことから、スルファニルアミドの標的候補遺伝子から *TEM* は除外された。

LUX が標的遺伝子の一つであることが示唆された一方で、別の時計遺伝子 *CCA1* や花成抑制遺伝子 *TEM* が標的遺伝子候補から外れた (図 17-19, 図 16-24) ことから、概日時計、しいては、光周性花成経路が、スルファニルアミドの作用機序に関わっている可能性を検証する必要性が考えられた。そこで、光周性花成経路に関わる花成関連遺伝子 *TEM1*、*TEM2*、*phyB*、*ELF3*、*ELF4* の変異体にスルファニルアミドを投与し、*FT* 発現量および花成時期を測定したところ、ほぼ全ての変異体がスルファニルアミドに応答して *FT* 発現量が低下し、花成時期が遅れた (図 25)。しかし中には逆に *elf3* 変異体では *FT* 発現量が上昇したことから、光周性花成経路だけではスルファニルアミドの作用機序を説明できず、他の経路にも関わっていることが示唆された。

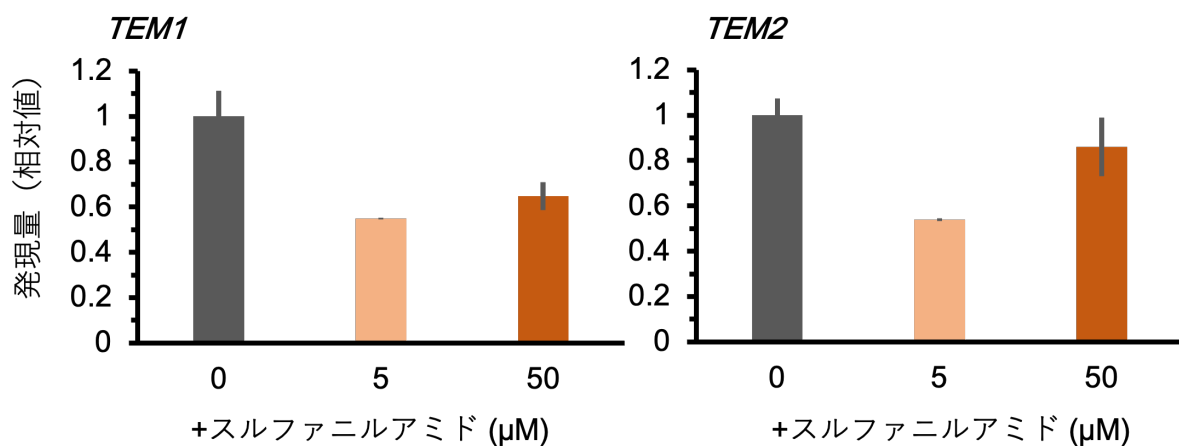


図 23 | スルファニルアミド投与後の *TEM1*、*TEM2* 発現量

12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型にスルファニルアミドを投与した後、14 日目 ZT12 でサンプリングし、RNA-seq 解析で測定した。(n = 2、エラーバーは標準誤差)

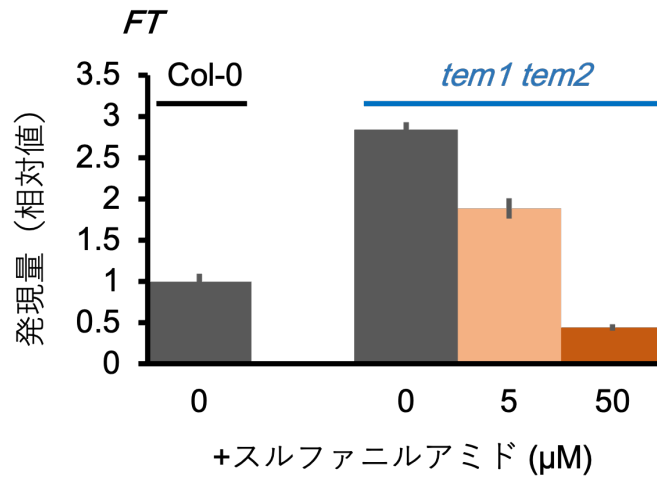


図 24 | スルファニルアミドを投与した後の *tem* 変異体の FT 発現量

12L/12D 条件下で生育した 5 日目の野生型、あるいは、*tem1 tem2* 変異体にスルファニルアミドを投与した後、14 日目 ZT12 での FT 発現量を RT-PCR により測定した。(n=3、エラーバーは標準誤差)

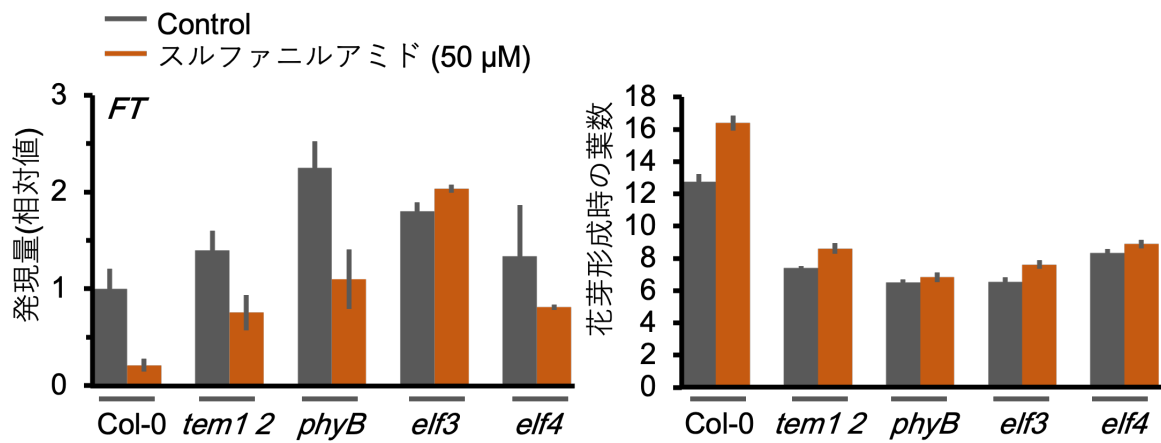


図 25 | 光周性花成に関わる代表的な遺伝子の変異体の FT 発現量および花成時期

12L/12D 条件下で生育した野生型、複数の光周性に関わる遺伝子の変異体について、14 日目 ZT12 での FT 発現量を RT-PCR により、花成時期を葉数により測定した。(n=3、エラーバーは標準誤差)

スルファニルアミドによるルッコラの花成時期遅延

最後に、スルファニルアミドの花成抑制効果が他の植物種でも有効かどうかを検証した。概日時計や花成制御メカニズムは植物に広く保存されており、ルッコラにおいてこれらの機能を詳細に調べた報告は存在しないものの、ルッコラはシロイヌナズナと同じアブラナ科に属することから、スルファニルアミドはシロイヌナズナと同様の機構で花成を調節している可能性は高い。ルッコラ (*Eruca sativa*) にスルファニルアミドを3、4日ごとに1.2 mMの濃度で投与すると、生育を阻害することなく予想通り花成が有意に遅れた ($p < 0.05$ 、図26)。スルファニルアミドの投与操作は35日目まで行ったところ、その後植物はコントロール、投与群の順に抽苔した。こうしたことから、スルファニルアミドはシロイヌナズナと同様に少なくともアブラナ科の農作物の花成時期を抑制することができる可能性が示唆された。

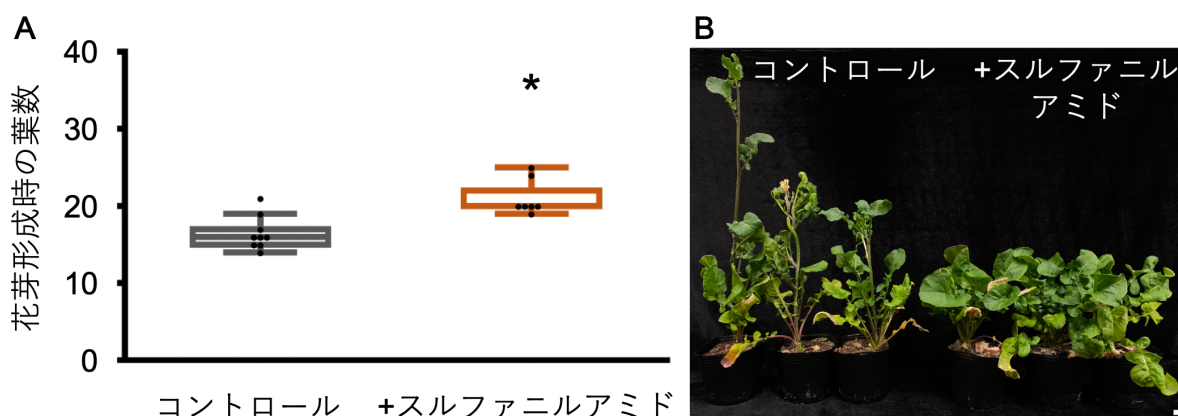


図26 | スルファニルアミド投与後のルッコラの花成時期

(A)12L/12D 条件下で生育したルッコラに、5日目から35日目まで1週間に2回ずつ1.2 mM スルファニルアミドを投与した後、花芽形成時の葉数を測定した。(n = 6、* $p < 0.05$ 、スチューデント t 検定)

(B)65日目の植物。(スケールバーは1 cm)

考察

スクリーニング結果の評価

前任者によって花成時期を変化させる候補化合物として 30 種類の化合物が選抜されていた。本研究では、ストレスによって誘導される早咲きによって結果が歪む可能性を考慮し、FT 発現量を低下させると考えられる化合物の中から、入手が比較的容易な 7 種類を選び、これを用いて再試験を行った。前任者が示していた結果は再現される傾向にはあったものの、はっきりしないものもあり、当初予定していたほどには明確な表現型を示す化合物は見つからなかった。

概日時計は転写・翻訳のフィードバックループによって制御されているが、実際には、全ての時計遺伝子が同様に応答するわけではない。例えば、スルファニルアミド投与後の時計遺伝子 *PRR7* の発現パターンは、ほとんど影響が見られなかった。本研究においては汎用性と明確な概日リズムを期待して *CCA1:LUC* をレポーターとして使用したが、前任者は *ELF4:LUC* を用いており、こうした違いが結果の違いを生んだ可能性がある。また、栽培環境の違いが化合物に対する応答性を変化させた可能性も考えられる。例えば、光化学系の阻害剤 DCMU は、弱光条件下でのみ概日時計の長周期化を引き起こす [Nakamichi, 2021]。

本研究では、遅咲きになると期待された候補化合物 7 種類の中からスルファニルアミドを見出したが、FT 発現量を上昇させ早咲きにする化合物や周期長を変えることで光周性花成を制御する化合物などについては未解析である。実際、名古屋大学の中道博士は概日リズムの周期長を短くすることで短日条件でも早咲き表現型を示す化合物を報告しており [Uehara *et al.*, 2019]、こうした化合物は他にも存在することが期待される。前任者のスクリーニングでは 30 種類の候補化合物が得られていることから、解析対象を広げることで新しい化合物を得られる可能性は十分に考えられる。

スルファニルアミドを介した花成の制御

スルファニルアミドは葉酸生合成経路の阻害剤であり (図 9)、本研究で観察された花成時期の遅延は主に葉酸生合成阻害によると考えられる。実際、葉酸とスルファニルアミドが同時に存在する条件では、スルファニルアミドによる遅咲き表現は打ち消されていた (図 10)。葉酸は一炭素代謝に不可欠な補酵素であり、葉酸の転位は核酸、タンパク質、脂質などの生体分子の生合成やエピジェネティックな制御に不可欠である。DHF 生合成を制御するスルファニルアミドに加え、葉酸生合成経路に関わる遺伝子が花成を制御している [Hanson *et al.*, 2011; Puthusseri *et al.*, 2018]。C₃ 植物では、グリシンデカルボキシラーゼ複合体/セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ経

路は、1 炭素単位の主要生産経路であり、テトラヒドロ葉酸 (THF) が関わるチミジル酸、プリンヌクレオチド、アミノ酸の生合成に必要である [Prabhu *et al.*, 1998]。

シロイヌナズナでは、ジヒドロ葉酸還元酵素-チミジル酸合成酵素 (DHFR-TS) の 2 つの機能により THF の生合成は触媒される。シロイヌナズナのゲノムには 3 つの DHFR-TS 酵素がコードされており、DHFR-TS3 は DHFR-TS1 と DHFR-TS2 の機能を抑制することで活性酸素レベルの上昇と花成時期の著しい遅延を引き起こすことから [Gorelova *et al.*, 2017]、THF の蓄積の抑制は花成時期の遅延をもたらすと考えられる。また、この結果とは逆に、THF 投与が異所的な *FLOWERING WAGENINGEN (FWA)* 発現誘導を介して花成を遅らせることも報告されている [Wang *et al.*, 2017]。本研究では、THF の前駆体である DHF の投与は花成にほとんど影響を与えず、どちらのモデルとも異なる結果であった (図 10)。DHF の作用機構は、DHFR-TS および THF を介した花成制御機構とは異なり、かつ、花成時期には影響しないことが考えられた。

スルファニルアミドの花成に対する作用機序を考えるうえで、スルファニルアミドの標的として知られている核酸やアミノ酸の生合成に関わるメチル化経路の可能性は低いと考えられる。Prabhu らは、本研究で用いた濃度と同じ濃度の 50 μ M スルファニルアミドに 96 時間植物をさらし 13 炭素核磁気共鳴法 (^{13}C NMR) により葉酸生合成経路内の THF に依存したグリシンデカルボキシラーゼ複合体 (GDC) からセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼへの変換量 (GDC/SHMT 経路) を観察したが、GDC/SHMT 経路にはほとんど影響が現れず (コントロールの GDC/SHMT 流量に対し約 90%)、スルファニルアミド投与は THF 代謝にほとんど影響を及ぼさないだろうことを報告している [Prabhu *et al.*, 1998]。本研究においても、ヒドロキシウレアの投与は花成時期に影響を与えず、ヒドロキシウレア投与時の花成時期は水投与時の花成時期と違いは見られなかった (図 11)。

また、本研究で観察されたスルファニルアミドの投与による花成時期の遅延効果は、植物の代謝を顕著に変化させた結果や、何らかのストレスによるものではないと考えられる。本研究では、シロイヌナズナに対して 50 μ M 以下の濃度のスルファニルアミドを異なる条件で投与したが、いずれの投与条件においてもシロイヌナズナの生育や健康に外見上の影響は見られていない。また、ルッコラに対しても 1.2 mM の濃度のスルファニルアミドを 2~4 日おきに計 13 回の投与を行ったが、ルッコラの生育や健康に外見上の影響は見られなかった。ただし、シロイヌナズナにおいて 50 μ M を超える濃度では、顕著な生育阻害や枯死が観察されている。こうした高濃度のスルファニルアミド存在下では、これまでに報告されてきたような葉酸生合成の過剰な抑制や代謝への影響を免れえず、生育阻害が生じたと考えられる。

一方で、葉酸 (ビタミン B9) が含まれるビタミン B 群には、過剰である場合や欠乏した場合に花成時期が変化するものがある [Hanson *et al.*, 2016]。たとえば、ニコチ

ンアミド（ビタミン B3）の過剰投与による花成促進 [Mombaerts *et al.*, 2019]、ピリドキシン塩酸塩（ビタミン B6）が欠乏した変異体での花成抑制 [Wagner *et al.*, 2006] が報告されている。今後、スルファニルアミド投与で植物体内の葉酸の変化量を測定するほか、スルファニルアミドと他のビタミン量を制御する化合物の同時投与が花成時期を制御できるかを試すことは有用だと考えられる。

スルファニルアミドの標的遺伝子としての時計遺伝子 *LUX*

本研究では、スルファニルアミド投与による *FT* 発現抑制効果および花成時期遅延効果は、*lux nox* 変異体ではかなり低く、スルファニルアミドの作用機構が *LUX* で部分的に説明できる可能性を示した。さらに、植物の幼若期に *FT* 発現を抑制する *TEM1*、*TEM2* がスルファニルアミドの標的候補遺伝子から外された。これに対し、*LUX* は植物の発達段階を通して発現している時計遺伝子であることから、スルファニルアミドによる花成遅延効果は、植物の発達段階に関係なく、複数回にわたる投与によって継続できると予想される。

しかし、*lux nox* 変異体においてもスルファニルアミドが *FT* の発現をある程度抑制することから、他の制御標的遺伝子の存在も示唆された。本研究では、スルファニルアミド投与によって発現が増加する花成抑制因子 *APETALA2* (*AP2*)、*RADICAL-INDUCED CELL DEATH1* (*RCD1*)、*LUX*、*LHP1-INTERACTING FACTOR2* (*LIF2*)、およびスルファニルアミド投与によって発現が抑制される花成誘導因子 *PHOSPHOGLUCOMUTASE1* (*PGM1*)、*FVE*、*NUCLEAR FACTOR-Y SUBUNIT B2* (*NF-YB2*) を候補遺伝子として検討した。*AP2* は花芽メリステムを決定する転写因子であり、葉における *FT* 誘導の下流で作用する [Würschum *et al.*, 2006]。*LIF2* と *FVE* は主にエピジェネティックな制御により *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) を制御している [Ausín *et al.*, 2004; Latrasse *et al.*, 2011]。*FLC* の発現はスルファニルアミド投与によって変化しなかったが、これらの候補のいずれかが *FT* の発現に影響を与える可能性がある。*NF-YB2* は長日条件下の花成を促進する *NF-Y/HAP* 転写因子複合体の構成因子であるが、*NF-YB* 遺伝子の単一変異体では花成表現型がほとんど見られない [Kumimoto *et al.*, 2008] ことから、*NF-YB2* 単独ではスルファニルアミド投与の花成への影響を完全に説明できないことが示唆された。*RCD1* は発生を制御する不活性型 ADP-リボシルトランスフェラーゼであり [Teotia *et al.*, 2009]、*PGM1* は糖経路の光合成炭素フローを制御するホスホグルコムターゼである [Matsoukas *et al.*, 2013]。これらの制御因子が花成時期にどのような影響を及ぼすかについては、さらなる解析が必要である。また、本 RNA-seq で同定された時計遺伝子 *LUX* 以外の主要な時計遺伝子である *CCA1* は FC0.77、*TOC1* は FC1.08 と発現量は大きく変化しなかったことから、概日時計全体のシステムによる *FT* 発現量への影響よりも、時計遺伝子 *LUX* が *FT* 発

現を抑制する影響が主であることが示唆された。さらに、*TEM* などの花成関連遺伝子もスルファニルアミドの標的候補遺伝子から除外されたが、*FLOR-ID* に登録されている主要な花成経路に加え、花成は外来・生物ストレスによって制御されている [Dezar *et al.*, 2011; Takeno, 2016]。たとえば、塩ストレスや乾燥ストレスは、*FT* の発現を制御することで花成に影響を与える [Ryu *et al.*, 2013; Takeno, 2016]。また、*Fusarium oxysporum* の感染などの生物ストレスも、*WRKY* 型転写因子を介して *FT* を誘導し、花成を促進する [Lyons *et al.*, 2015]。これらの遺伝子は *FLOR-ID* にすべて登録されているわけではないことから、より幅広いターゲットでの解析により、スルファニルアミドが *FT* の発現や花成を制御するメカニズムについての知見が得られると考えられる。

上記の遺伝子発現制御以外に、葉酸の化学種 *THF* はエピジェネティック制御に関わっている。*THF* 投与は *FLOWERING WAGENINGEN (FWA)* 発現のエピジェネティックな誘導を介して花成を遅らせる [Wang *et al.*, 2017]。*MET1* を介して *FWA* をシトシンのメチル化によりサイレンシングする経路が存在し、*THF* 投与時にはこのサイレンシングが弱まることにより花成遅延が生じる。このエピジェネティックな経路はスルファニルアミド投与時に影響を受けると考えられたが、本研究の *RNA-seq* 解析では *FWA* の発現量が非常に小さく、発現量変化もまた小さいために、スルファニルアミドの標的候補遺伝子とはならなかった。スルファニルアミドの作用機序が *LUX* の発現制御以外にエピジェネティック制御にも関与している可能性は存在するものの、本研究では完全に解明することはできなかった。

スルファニルアミドを農業へ応用する可能性

本研究では、スルファニルアミドがアブラナ科であるシロイヌナズナおよびルッコラの花成時期を遅延させることを示し (図 26)、少なくともこの科ではスルファニルアミドが花成を制御している可能性が示唆された。シロイヌナズナにおいてはスルファニルアミドが *LUX* を介して部分的に花成を制御していることを示したが、これまでの研究で、*LUX* は陸上植物の進化にわたってよく保存された時計遺伝子であることが明らかとなっている [Linde *et al.*, 2017]。*LUX* ホモログは、シロイヌナズナだけでなく、エンドウ (*Pisum sativum*)、オオムギ、コムギ、ダイズでも花成や光周期応答への関与が示唆されている [Mizuno *et al.*, 2012; Campoli *et al.*, 2013; Liew *et al.*, 2014]。*LUX* ホモログは、特にダイズにおいて光周期感受性と適応に重要な役割を果たしている [Bu *et al.*, 2021; Fang *et al.*, 2021]。*ELF3-ELF4-LUX* 複合体の機能喪失は、いくつかの品種の花成表現型と関連しており、*LUX* が作物の花成時期を調節するための潜在的な標的であることが示唆された。スルファニルアミドによる花成調節は、適用濃度や

投与回数に依存すると考えられるので、将来的には天候や市場の状況に応じて開花時期や収穫時期を変更するために、この方法が有用となる可能性がある。

第2章 概日時計を介した花成時期の制御

序論

前章では、ケミカルスクリーニングを行い、概日時計を介して花成時期を遅延させる化合物として、スルファニルアミドを同定した。また、シロイヌナズナ以外の植物種、ルッコラ、に対してもスルファニルアミドの投与により、非遺伝子組換えで花成時期を操作できることを示した。しかし、*lux* 変異体においてもスルファニルアミドに対する応答性は完全には消失していなかったことから、他の経路を介しても *FT* 遺伝子発現を制御していると考えられる。そのため、ケミカルスクリーニングによって、時計遺伝子を始めとした特定の因子を制御できたとしても、それ以外の経路による制御は残り、花成時期を任意に調節するためには背景にある制御メカニズムの全体の理解が欠かせない。

これまで、概日リズムの研究は、位相と周期、振幅の3種類のリズム特性に着目して行われてきた。たとえば、*cca1 lhy* 二重変異体では概日時計が短周期化し、花成時期が早まることが知られている [Green and Tobin, 1999; Strayer *et al.*, 2000]。しかし、一部の時計変異体では概日リズムに大きな影響が見られないにも関わらず、花成時期が大きく変化することが明らかとなっている [Park *et al.*, 2016]。これに対して、当研究室の過去の研究では、リズム特性とは別に時計遺伝子の発現量が花成時期を制御する可能性が示された。同じ維管束特異的プロモーターでありながら活性が異なる *SUC2* と *Sultr1;3* を用いて時計遺伝子 *TOC1* を過剰発現すると、プロモーターの違いによって花成時期は明らかに異なる傾向を示すことが明らかになった [小河、修士論文、2018]。これら2つのプロモーターはどちらも維管束の篩部伴細胞でのみ発現が認められており [Truernit *et al.*, 1995; Yoshimoto *et al.*, 2003]、主な違いはプロモーター活性の強弱にあることから、時計遺伝子の発現量から花成時期を予測できると考えられた。

しかし、第1章の序論で述べたように、時計遺伝子のうち *FT* 遺伝子の発現を制御する遺伝子は複数あることが知られており、時計遺伝子どうしのフィードバック等を含め、これらの経路は複雑であるため、概日時計のシステム全体として *FT* 発現を制御する仕組みはどのように説明されるかは不明なままであった。たとえば、これまでの研究では、*FT* 発現を制御する時計遺伝子・時計関連遺伝子として、*GI*、*FKF1*、*PRR9*、*PRR7*、*PRR5*、*TOC1*、*CCA1*、*LUX*、*ELF3*、*ELF4* が知られている。これら既知の遺伝子を含め、*FT* 発現を制御する時計遺伝子全てを網羅的に発現解析するためには、大規模な時系列データセットが必要であった。

これまで、時計遺伝子を含むシロイヌナズナの遺伝子発現パターンに関する大規模

な解析ツールとして、2007年に発表された Diurnal と呼ばれる時系列のマイクロアレイデータの検索サイトを利用して遺伝子発現の時系列データが盛んに利用されている [Mocker *et al.*, 2007]。Diurnal プロジェクトでは、11種類のマイクロアレイデータセットにおける 22,800 遺伝子の発現パターンを解析することが可能であり、現在までに 183 報以上のドライ解析でプラットフォームとして利用されている。しかし、2007年以降の RNA-seq や他のマイクロアレイデータのアップデートは進んでいないことや、PHP のバージョンが古くサイトに繋がらないことが問題となっていた。また、2023年に入って、サイトを管理していた Mockler 博士の不幸が報じられ、サイトの存続も危ぶまれている。さらに、こうした古いデータセットを用いた解析からは、恒明条件下で周期性を示し概日時計による制御を受けていると考えられる遺伝子は全体の約 30% であると 2000 年に報告されている [Harmer *et al.*, 2000]。しかし、2020 年には全体の 18% であるとの報告がなされており、違いが見られた [Yang *et al.*, 2020]。

このように、少数の時系列データセットを用いて行われてきたこれまでの解析だけでは、概日時計による花成制御の全体像を理解できず、最新のデータも組み込んだ統合的な解析が必要だと考えた。

そこで本章では、まず、Diurnal プロジェクトにならい、これまでに報告されている時系列データセットを更新したうえで、それらを統合して比較できる新しいデータセットの作成を試み、これを用いることで概日時計による花成制御メカニズムを明らかにすることを目指した。まず、2021年までに公表された時系列データを含むマイクロアレイ 39 条件・13 種類、RNA-seq 13 条件・7 種類（うち 6 条件 1 種類は当研究室の未発表データ）の合計 53 条件・20 種類の時系列データの統合プラットフォームを作成した。さらに、本プラットフォームの応用例として、概日リズムを刻む遺伝子の同定を行った。次に、これらの情報を用いて時計遺伝子の発現パターンから *FT* 遺伝子発現レベルを予測できるかを検証した。

材料と方法

既存のマイクロアレイデータおよび RNA-seq の再解析

4 時間以内の間隔で 1 日分以上の時系列データを持つデータセットを GEO (Gene Expression Omnibus) と ArrayExpress から収集し、SRP/ERP が付された RNA-seq データについてはウェブサイト RaNA-seq (<https://ranaseq.eu/login>) で統合した、マイクロアレイについては各サイトで公開されている補正済みデータを収集した。53 条件の時系列データのうち、RaNA-seq 上で収集したデータについては DESeq2 で正規化し (Method: DESeq2、Test: Wald、 p Value cutoff: 0.05、Fit Type: parametric)、TPM を得た (Expression Data フォルダ内 IDXXvsID38.xlsx)。マイクロアレイについては Time-series expression.xlsx の Conditions 内のリンク (C 列の GSE から始まるもの等) から Processed Data などのデータを取得した。(ただし、ID06 は公開されていないため、GenePix:Ratio of Means (635/532) の値を採用した)。

マイクロアレイと RNA-seq は異なる原理によるトランスクリプトーム解析であることからダイナミックレンジが大きく異なっており直接の比較はできない。そこで、統合的な解析の実現を目指し、遺伝子発現の相対的な順序で正規化する Quartile Normalization のなかでも Median を利用した R パッケージ MBQN (Median Based Quartile Normalization) により、プラットフォームを超えた正規化を行った。この方法はデータの分布の違いの影響を受けにくい方法であることがすでに報告されている [Brombacher et al., 2020]。統合にあたってはマイクロアレイと RNA-seq で検出された遺伝子セットが異なっていたことから、RNA-seq で検出された遺伝子を基本とし、全てのデータセット (ID06 と ID46 を除く) で検出された遺伝子 25,910 遺伝子を対象と (Integrate_raw.xlsx、マイクロアレイにしかない遺伝子は対象外とした)。周期性判定に関しては、12L/12D 条件の野生型のデータセットである ID01、ID02、ID14、ID45、ID46 を用い、解析は Metacycle を利用した [Gardiner et al., 2021]。解析コードは Rcode.R に、解析元のファイルと解析結果は Periodism_analysis にまとめた。

シロイヌナズナの播種方法と生育条件

播種方法と生育条件は第 1 章で示した条件と同じ条件を用いた。

RT-PCR

RT-PCR による遺伝子発現解析では第 1 章で示した方法と同じ方法を用いた。

花成時期

葉数測定による花成時期測定では第 1 章で示した方法と同じ方法を用いた。

結果

既存のマイクロアレイおよび RNA-seq の再解析

SRP/ERP が付されたマイクロアレイおよび RNA-seq データを閲覧できる Web サイト RaNA-seq において、概日時計に関する研究を目的としたデータセットを収集したところ、53 条件・20 プロジェクトの時系列データが得られた (表 4)。53 条件のマイクロアレイおよび RNA-seq データでは、検出された遺伝子数が異なるため、53 条件のうち 51 条件以上で検出された核コードの遺伝子を対象とし、この基準を満たさない遺伝子は解析から外した。最終的に 25,910 遺伝子の発現量を新規プラットフォームに採用することとした。次に、これら 53 条件のデータセットで検出された遺伝子発現量を正規化し互いに比較できるようにするため、R パッケージ MBQN を用いた正規化を行った。この方法では、分位数 (発現量の順序) を基準にするとともに、全遺伝子の発現の平均と中央値も参照して、正規化を行っており、それぞれのデータセットの遺伝子発現量をおおよそ揃えることができる (図 27)。

こうした補正によって、条件間の遺伝子発現量が揃うことを確認するため、概日時計を構成する主要な 16 種類の時計遺伝子あるいは明確に時計制御であることが知られている遺伝子 (*LHY*, *CCA1*, *RVE8*, *TOC1*, *PRR3*, *PRR5*, *PRR7*, *PRR9*, *ELF3*, *ELF4*, *LUX*, *PIF4*, *GI*, *FKF1*, *JMJ30*, *CAT3*) それぞれについて野生型 12L12D、葉のデータである ID01, 02, 04, 05, 08, 10, 14, 20, 26, 45, 49 のうち、Time0, 4, 8, 12, 16, 20 を持つ ID01, 02, 05, 08, 10, 14, 26, 45, 49 の全遺伝子の変動係数 (標準偏差を平均値で除した値) を算出したところ、ほぼ全ての時計遺伝子発現量の変動係数が MBQN による正規化によって小さくなっており (図 28)、発現量の補正効果が確認された。以上のことから、MBQN による正規化後のデータを用いて、以降の解析をおこなった。

表 4 | 新規プラットフォームに使用したデータセット

新規プラットフォーム作成に使用した 53 個のデータセットの概要を以下に示した。データソースは、GEO accession、Array Express、SRA、ENA から 1 つ選んで掲載した。各データセットの更なる詳細は、後述の Web サイトに掲載されている (<https://scientist.xsrv.jp>)。

日付	ソース	掲載雑誌	データセット ID	Ecotype	Genotype
2005/2/16	E-NASC-49	Boyes <i>et al.</i> , 2001	ID01_LD	Col-0	WT
2005/12/1	GSE3416	Bläsing <i>et al.</i> , 2005	ID02_LD	Col-0	WT
2005/12/1	GSE3424	-	ID03_LD_pgm	Col-0	phosphoglucosyl transferase mutant
2007/1/8	GSE5612	-	ID04_LDLL	Col-0	WT
2007/7/15	GSE8365	Convington and Harmer, 2007	ID05_LDLL	Col-0	CCR2::LUC
2007/9/18	E-TABM-331	Dodd <i>et al.</i>, 2007	ID06_LDLL	Col-0	WT
2008/1/18	E-MEXP-1304	Michael <i>et al.</i>, 2008a	ID07_DD(22/12C)DD	Col-0	WT
			ID08_LD_22/12C	Col-0	WT
			ID09_LL_22/12C	Col-0	WT
			ID10_LD(22/12C)LL	Col-0	WT
			ID11_LL(22/12C)LL	Col-0	WT
			ID12_Longday	Ler	WT
			ID13_Shortday	Ler	WT
			ID14_LD	Col-0	WT
2008/10/17	E-MEXP-1299	Michael <i>et al.</i>, 2008b	ID15_Shortday	Col-0	WT
			ID16_Shortday_Ler	Ler	WT
			ID17_LD_lux	Col-0	<i>lux-2</i>
			ID18_Shortday_phyB	Col-0	<i>phyB-9</i>
			ID19_Shortday_lhy	Ler	<i>lhy</i>
			ID20_LDLL	C24	WT
2009/12/10	GSE19271	Dalchau <i>et al.</i>, 2010	ID21_LDLL_Nicotinamide	C24	WT
			ID22_LDLL_toc1	C24	<i>toc1-1</i>
2010/12/10	E-MEXP-2526	Epinosa <i>et al.</i>, 2010	ID23_Longday	Col-0	WT
			ID24_Longday_4C	Col-0	WT
			ID25_LongdayLL	Col-0	WT
2012/12/20	GSE37278	Hsu and Harmer, 2012	ID26_LDLL	Col-0	WT
			ID27_LDLL_rev8	Col-0	<i>rve8-1</i>
2013/8/2	GSE43865	Rugnone <i>et al.</i>, 2013	ID28_Longday	Col-0	WT
			ID29_Longday_lnk1 lnk2	Col-0	<i>lnk1 lnk2</i>
2014/9/10	GSE50438	Endo <i>et al.</i> , 2014	ID30_Longday_Whole	Col-0	WT

			ID31_Longday_Meso phyll	Col-0	WT
			ID32_Longday_Vascu lature	Col-0	WT
			ID33_Shortday_Whol e	Col-0	WT
			ID34_Shortday_Meso phyll	Col-0	WT
			ID35_Shortday_Vascu lature	Col-0	WT
2015/6/1	E-MTAB-4218	Attaran et al., 2014	ID36_Longday + Coronatine	Col-0	WT
			ID37_Longday + Mock	Col-0	WT
2015/10/6	SRP064782	Takahashi et al., 2015	ID38_LDLL_Shootap ex	Col-0	WT
			ID39_Longday_Col	Col-0	WT
			ID40_Shortday_Col	Col-0	WT
			ID41_Longday_SUC- TG	Col-0	SUC2::TO C1-GFP
2017/11/9	-	Ogawa, unpublished	ID42_Shortday_SUC- TG	Col-0	SUC2::TO C1-GFP
			ID43_Longday_Sultr- TG	Col-0	Sultr1;3:: TOC1- GFP
			ID44_Shortday_Sultr- TG	Col-0	Sultr1;3:: TOC1- GFP
2018/12/6	GSE115583	Cortijo et al., 2019	ID45_LD	Col-0	WT
2019/8/11	SRP089899	Lin et al., 2021	ID46_LD	Col-0	WT
2020/1/14	GSE137732	Yang et al., 2020	ID47_LongdayLL	Col-0	WT
2020/4/2	E-MTAB-7933	Romanowski et al., 2020	ID48_Longday	Col-0	WT
			ID49_LDLL	Col-0	WT
			ID50_Longday_17C	Col-0	WT
2020/6/2	GSE124003	Chung et al., 2020	ID51_Longday_17/27 C	Col-0	WT
			ID52_Longday_pif7_ 17C	Col-0	<i>pif7-1</i>
			ID53_Longday_pif7_ 17/27C	Col-0	<i>pif7-1</i>



図 27 | MBQN による補正前後における、各データセットの遺伝子発現レベル
 MBQN による補正前(A)および補正後(B)の、各データセットにおける遺伝子発現レベルを示した。

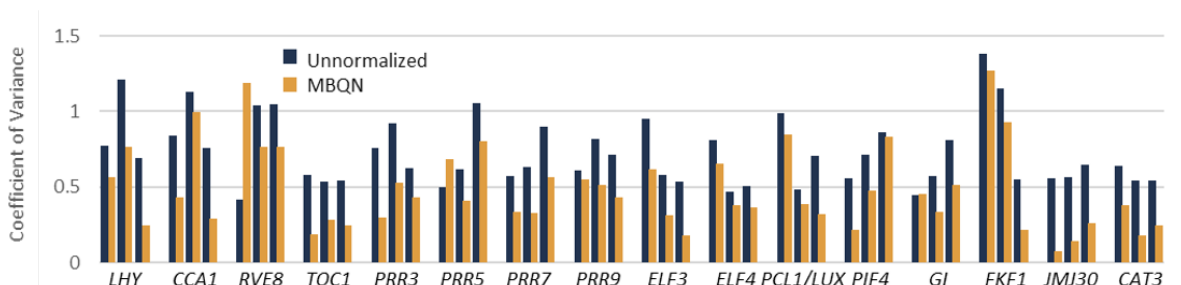


図 28 | MBQN による補正前後における、時計遺伝子の発現量のばらつき
 MBQN による補正前後の、時計遺伝子の発現量の変動係数を示した。

次に、解析対象とした 25,910 遺伝子について、恒明条件下で発現パターンに周期性を示す遺伝子を解析した。これまでも概日時計によって制御される遺伝子については繰り返し解析されてきたが、複数のトランスクリプトーム解析の結果を通じて安定して振動する遺伝子についての情報は無い。53 条件のうち、12L12D（恒明条件、明暗条件を問わず）の 2 日分の野生型データセットある ID04, 05, 08, 10, 20, 26, 38, 49 についてデータを平均し、これをもとに周期性を判定した。平均に際して、全てのデータが同じ間隔である方が周期性の判定精度が高まることから、Time0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 になるように ID04 と ID20 については線形補間し、該当する時刻の数値を採用した（そのため、ID04 と ID20 は Time0 を持たない）。さらに、発現データの欠落が見られる 1,479 遺伝子は解析の対象から外した。

全遺伝子のうち 9,200 遺伝子については、ボンフェローニ補正後の q-value が 0.05 より小さく ($\text{meta2d_BH.Q} < 0.05$)、これを Metacycle で検出した振動遺伝子とした。しかし、この中には、At1g17920 のように明らかに振幅が低く、周期性を持っているかどうか怪しい遺伝子も数多く含まれていた。そこで、より精緻に振動遺伝子を絞りこむために、ピアソンの積率相関係数を用いた。一周目と二周期目の相関係数が 1 周期上記の主要な時計遺伝子 16 種は全て一周目と二周期目の相関係数が 0.8 を超えていたことから ($\text{min } 0.85028, \text{max } 0.997934$)、相関係数 0.8 以上の遺伝子を取ることで、うまく周期性のある遺伝子を抽出できていそうだと判断した。しかし、この基準だけでは、At4g36570 のように、一周目と二周期目の形は似ているが明らかに発現量が異なっているような遺伝子も含まれてしまう。そこで両方の基準を満たす $q < 0.05$ かつ相関係数 > 0.8 の 4,396 遺伝子を振動遺伝子と定義した。主要な時計遺伝子および時計制御遺伝子 16 種は全てこの中に含まれていた（図 29）。これらのデータを Web サイト上で閲覧できるように、Arabidopsis diel gene expression viewer (<https://scientist.xsrv.jp>) を作成・公開した（図 30）。

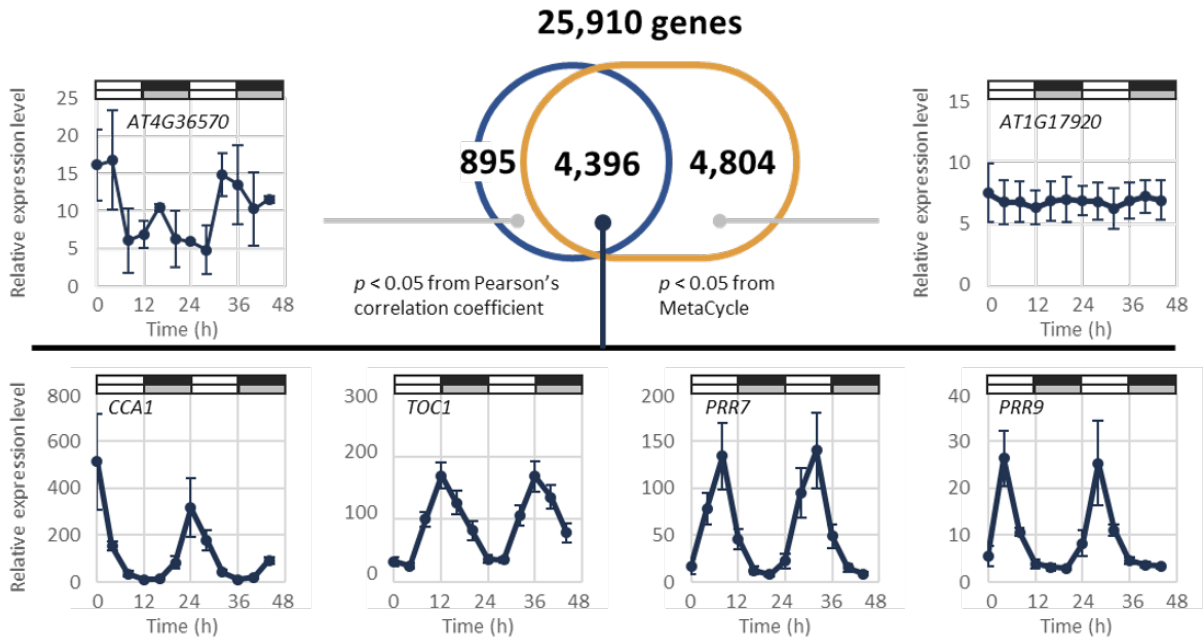
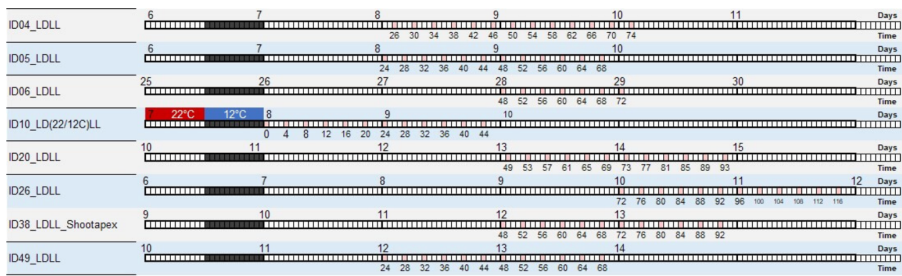


図 29 | 新規プラットフォームにて同定した時計制御遺伝子数

新規プラットフォームに採用されている 25,910 遺伝子のうち、自己相関などを含む相関係数が高い遺伝子、および、MetaCycle により周期性がある遺伝子のオーバーラップを示した。また、ベン図内の各領域に含まれる代表的な遺伝子の発現パターンを示した。

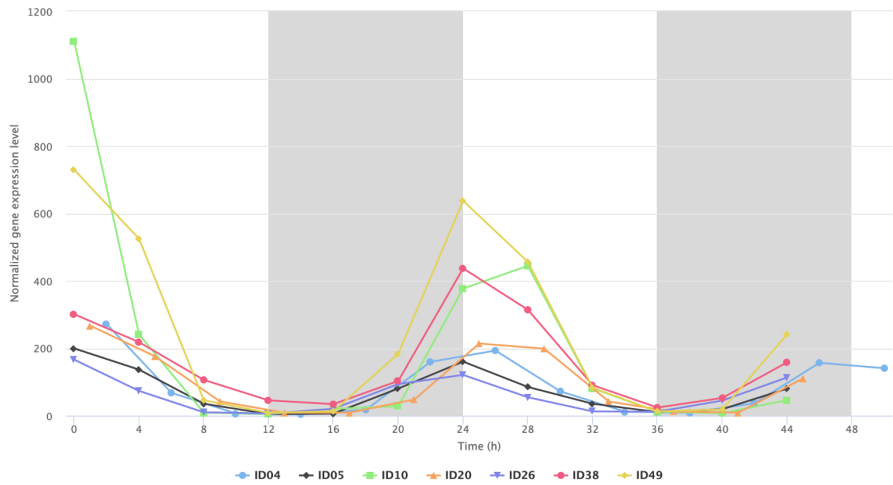
A

12L12D to LL



AT2G46830

12L12D entrain -> LL free running



Endo-lab@NAIST.

B

CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1); (AtCCA1)

All gene symbols

CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1); (AtCCA1)

Description

Encodes a transcriptional repressor that performs overlapping functions with LHY in a regulatory feedback loop that is closely associated with the circadian oscillator of Arabidopsis. Binds to the evening element in the promoter of TOC1 and represses TOC1 transcription. CCA1 and LHY colocalize in the nucleus and form heterodimers in vivo. CCA1 and LHY function synergistically in regulating circadian rhythms of Arabidopsis. CCA1 binds the GI promoter.

図 30 | Arabidopsis diel gene expression viewer の一例

Web サイト Arabidopsis diel gene expression viewer において閲覧できる遺伝子の一例として、時計遺伝子 *CCA1* の発現パターン例 (A)、および、遺伝子の概要 (B) を示した (<https://scientist.xsrv.jp>)。

概日時計はフリーラン時には24時間より周期が長くなる傾向があり、そのために、Metacycleに限らず一般的にフリーラン時の位相を同定することは困難である。そこで1時点だけのプロファイルが指し示す位相を予測できれば、こうした問題を解決でき、異なるタイミングで取ったデータをより高精度に平均化できると考えた。Ueda et al., 2004 で開発された、MolecularTimeTable はサイン波とのフィッティングにより位相推定を行っていたが、これを機械学習を用いて行うこととした。

まず、MBQN によって補正されたデータセットから、先の方法で示した振動遺伝子のみを解析対象とした。汎用性を高めるために、0 や NA が3つ以上含まれる振動遺伝子は解析対象から省いた結果、2,654 遺伝子が残った。また、明暗周期下でのサンプルについては概日時計のリセットが毎日かかっているため、位相を一意に決定できる。こうした Data01, 02, 14, 45 に対しては改めて MetaCycle により位相を算出し、4つのデータセットでほぼ同じ位相を示す遺伝子を「安定的な周期性遺伝子」として特徴量とした(993 遺伝子)。条件は、最大値と最小値の差が4時間以内、標準偏差が2h以内とし、小数点付きで推定された位相からもっとも近い整数(0-23bin)を位相と定義した。幸いにも推定された位相は多少のバラツキはあるもののほぼ全ての時刻に分散していたことから、この後の機械学習の教師データにおけるバイアスは考えなくても良いと判断した(図31A)。

MolecularTimetable におけるアイデアに見られるように、位相推定においては、ある遺伝子の絶対発現量というよりは他の遺伝子との相対的な発現量比や発現量のランクが重要だと予想される。そこで位相推定のための特徴量として、以下の8種類計2,274の特徴量を生成した。なお、発現量を常用対数変換することによって、分布が正規分布に近くなり、機械学習に適したデータセットになることが経験的に知られている(図31B、図31C)。

常用対数変換 (log)

→ 対数化することで発現量の分布を正規分布に近づける (log10_requirement.xlsx)

発現量ランク (rank)

bin ごとの平均発現量 (bin_log_mean)

bin ごとの平均ランク(bin_rank_mean)

bin ごとの平均発現量の差(bin_log_diff)

bin ごとのランクの差(bin_rank_diff)

bin ごとの平均発現量の比(bin_log_ratio)

bin ごとの平均発現量の比(bin_log_ratio)

野生型かつ特殊すぎる条件ではないデータセットである、ID1, 2, 14, 15, 3, 8, 12,

13, 15, 16, 23, 28, 30, 33, 37, 39, 40, 46, 48, 50, 51 のうち、2 割をテストデータとし、残り 8 割のデータは 4 分割してクロスバリデーションを行った (図 31D、train:225, test:109)。

Light GBM と勾配ブースティングに基づく機械学習フレームワークと Xgboost、Random forest のアンサンブル学習により、遺伝子発現プロファイルだけから、概日時計が指し示す時刻を推定したところ、97.49%の精度が得られ、概ね良さそうな結果を得ているが、推定精度については特徴量選択など、まだ改善の余地があるため、本研究ではここまでとした。

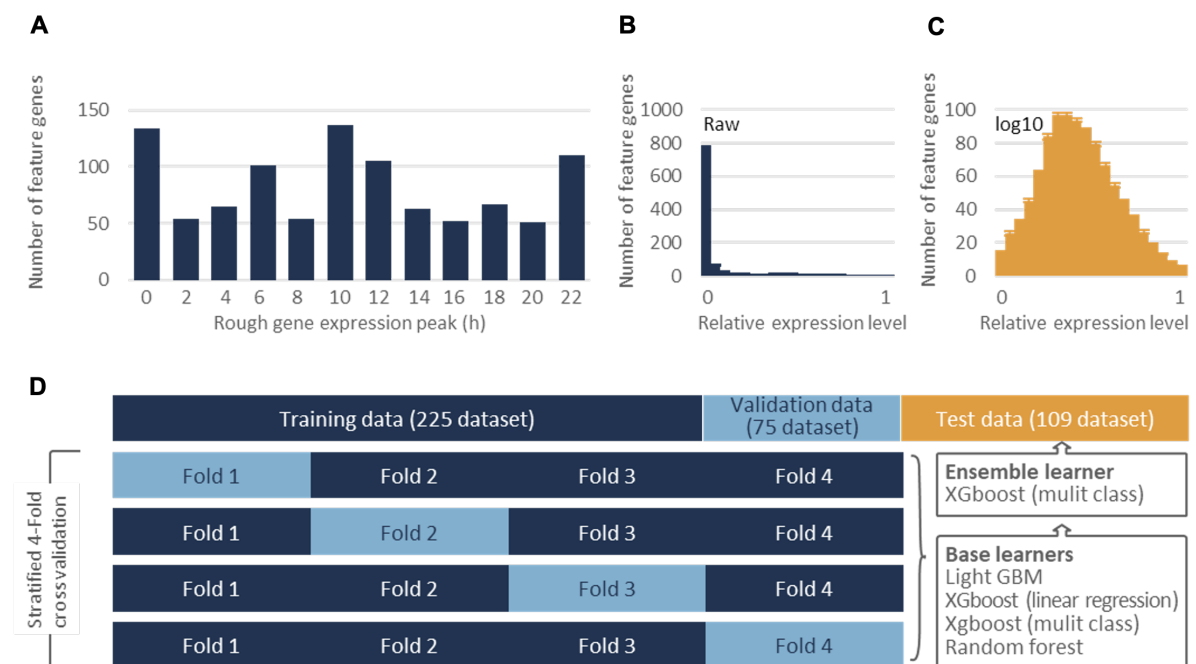


図 31 | 時計制御遺伝子の周期性に関する評価

(A)時計制御遺伝子の実時刻における発現ピークを示した。

(B,C)時計制御遺伝子の相対発現量の分布(B)、および、常用対数をとったときの分布(C)。

(D)時刻推定に利用した訓練データ、検証データ、教師データ数を示した。

FT発現量を予測する時計遺伝子の探索

次に、作成したデータベースを用いて時計遺伝子の発現パターンから FT 遺伝子発現レベルを予測できるかを検証した。まず、先行研究 [小河、修士論文、2018] において、*TOC1* 発現量を操作すると花成時期が変化したことから、時計遺伝子 *TOC1* の発現量が FT 遺伝子の発現量を説明できる可能性が考えられた。そこで、予備実験として、時計遺伝子 *TOC1* の発現量および FT 遺伝子の発現量が相関関係にあるか検証するため、先行研究と同様の *SUC2::TOC1-GFP*、*Sultr1;3::TOC1-GFP* を約 100 ライン新たに作出し、その T₁ 世代を用いて 12L/12D 条件下での 14 日目 ZT12 の *TOC1* 発現量および花成時期の測定を行った。ここで用いた植物の育成条件は、あらかじめ、野生型、*SUC2::TOC1-GFP*、*Sultr1;3::TOC1-GFP* が先行研究の結果と同様の花成時期を示すことが確認された (図 32)。しかし、約 100 ラインの *TOC1* 過剰発現体の *TOC1* 発現量は花成時期との明らかな相関を示さなかった (図 33)。このことから、FT 遺伝子の発現量もまた、花成時期と同様に、*TOC1* 発現量のみでは説明できないことが予想されたため、以下では FT 遺伝子の発現量を説明する時計遺伝子の探索を行った。FT 遺伝子の発現量は連続恒明条件下で発散することが知られているため、53 種類のデータセットのうち、実験条件に明暗サイクルを用い、4 時間おきのサンプルを含んでいる ID50-53、ID30-35、ID39-44 に注目した。これら 16 個の各時系列データのうち、初めのサイクルの 1 時点目 (ZT0) から 6 時点ぶんを、それぞれ ZT0、ZT4、ZT8、ZT12、ZT16、ZT20 として抽出した。これら 16 個のデータセットそれぞれにおいて 6 時点 (ZT0, 4, 8, 12, 16, 20) の FT 発現量の総和を被説明変数として算出し、以降では、LASSO 回帰により、時計遺伝子発現量からなる説明変数を探索することとした。図 32 より少なくとも時計遺伝子 *TOC1* の発現量は FT 発現量制御に関わることが示唆されたことから、ここでは時計遺伝子 *TOC1* および他の時計遺伝子の発現量を組み合わせたパラメータが説明変数になると予想した。パラメータサーチの手始めとして説明変数を 1 つに絞ることを考えると、説明変数は *TOC1* 遺伝子発現量および他の時計遺伝子発現量の積、あるいは、比が候補として考えられた。過去の研究から、FT プロモーター活性の制御は、時計遺伝子および時計制御遺伝子のタンパク質が結合することによることが知られているため、FT 発現量の制御もまた促進・抑制の 2 つの方向性を持ち、時計遺伝子発現量の積よりも比によって説明されるだろうと予想した。そこで、*TOC1* の 6 時点での各発現量、および、他の 19 種類の時計遺伝子の 6 時点での各発現量 (19 種類×6 時点=114 個の値) に対して、すべての組み合わせの比 (*TOC1* 発現量の値 6 個×他の時計遺伝子の発現量の値 114 個、それぞれを分子または分母とした比) を算出し、これらの比を説明変数とした (図 34)。Python3 において実行した LASSO 回帰において、16 個のデータセットを通じて、被説明変数と強く相関する説明変数を探索し、説明変数の係数の上位を表 5 にまとめた。LASSO 回帰により変数

を1つに絞ったところ、ZT20における *CCA1/TOC1* がもっとも *FT* 発現量を強く説明することが明らかとなった。また、*FT* 発現量を強く説明する時計遺伝子の組み合わせにおいて、上位3位までが、ZT20、ZT0、ZT4の発現量を用いた *CCA1/TOC1* であった。

そこで、図32において用いた *TOC1* 過剰発現体においても、*CCA1/TOC1* 発現量比が花成時期とどのような関係にあるかを調べた(図35)。ここでは *FT* 発現量と負の相関関係にある花成時期との比較を行なったため、横軸に *TOC1/CCA1* 発現量比をプロットしたところ、花成時期とおおよそ反比例の関係にあることがわかった。以上のことから、16個のマイクロアレイ・RNA-seqデータセット、および、約100ラインの *TOC1* 過剰発現体においては少なくとも *CCA1/TOC1* 発現量比から花成時期を説明できる可能性が示唆された。

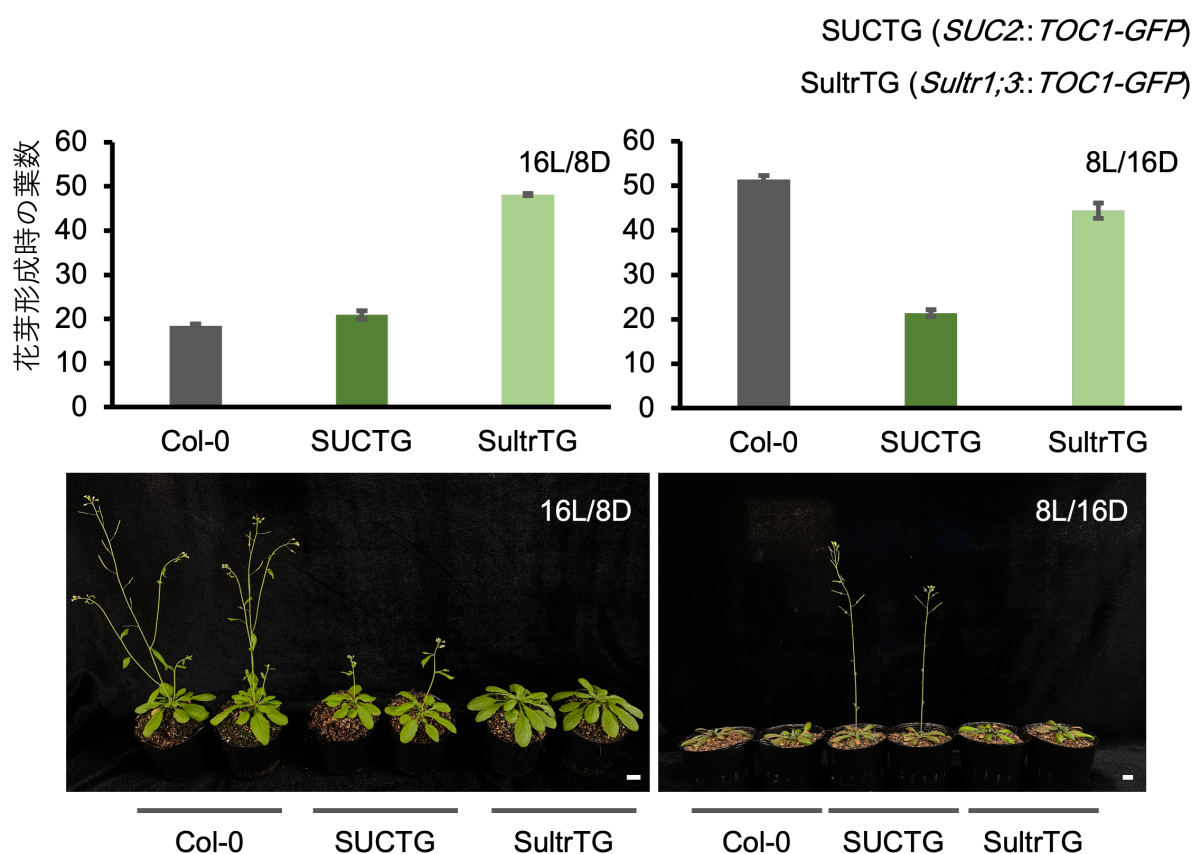


図32 | *SUC2::TOC1-GFP*、および、*Sultr1;3::TOC1-GFP* の花成時期

16L/8D条件下、あるいは、8L/16D条件下で生育した野生型、*SUC2::TOC1-GFP*、および、*Sultr1;3::TOC1-GFP*について、花成時期を花芽形成時の葉数により測定した。(n=8、エラーバーは標準誤差)

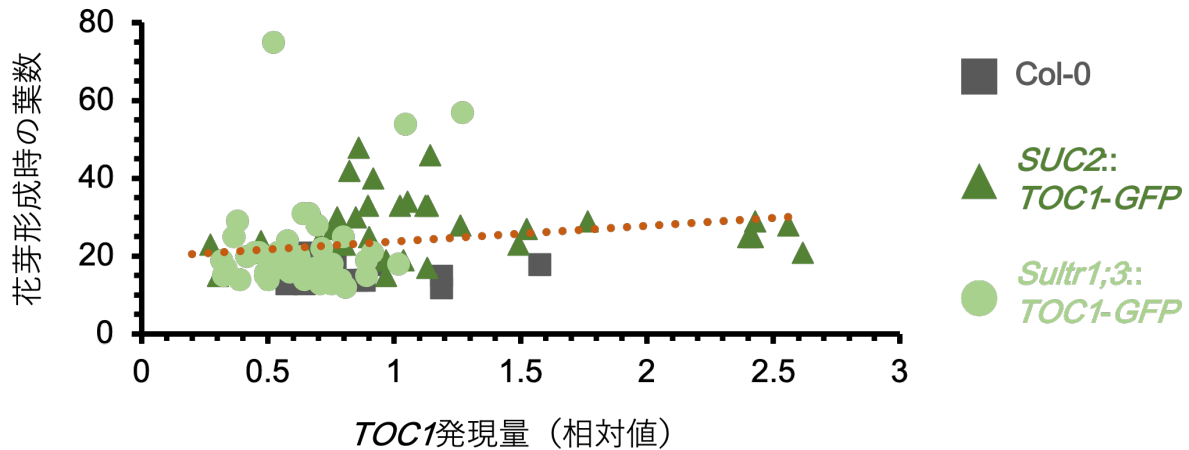


図 33 | *SUC2::TOC1-GFP*、*Sultr1;3::TOC1-GFP* の T₁ 世代における *TOC1* 発現量と花成時期の関係

12L/12D 条件下で生育した野生型、*SUC2::TOC1-GFP*、および、*Sultr1;3::TOC1-GFP* の T₁ 世代について、14 日目 ZT12 での *TOC1* 発現量を RT-PCR により、花成時期を花芽形成時の葉数により測定した。

被説明変数	説明変数 (<i>TOC1</i> 、および、その他の時計遺伝子の発現量比)
$\frac{FT}{ZT0} + \frac{FT}{ZT4} + \dots + \frac{FT}{ZT20}$	$= w_1 \frac{TOC1(ZT0)}{CCA1(ZT0)} + w_2 \frac{TOC1(ZT4)}{CCA1(ZT4)} + \dots + w_6 \frac{TOC1(ZT20)}{CCA1(ZT20)} + \dots$

図 34 | LASSO 回帰で用いた変数

FT 発現量を強く説明するパラメータを示す時計遺伝子を探索するために、使用した等式。16 個のデータセットそれぞれにおいて、被説明変数として、6 時点(ZT0, 4, 8, 12, 16, 20)の *FT* 発現量の総和を算出した。また、*TOC1* の 6 時点での各発現量、および、他の 19 種類の時計遺伝子の 6 時点での各発現量 (19 種類×6 時点=114 個の値) に対して、すべての組み合わせの比 (*TOC1* 発現量の値 6 個×他の時計遺伝子の発現量の値 114 個、それぞれを分子または分母とした比) を算出し、これらの比を説明変数とした。LASSO 回帰にて、16 個のデータセットを通じて、被説明変数と強く相関する説明変数を探索し、説明変数の係数の上位を表 5 にまとめた。

表 5 | FT 発現量を説明できる時計遺伝子発現量とその時刻

FT 発現量の総和を被説明変数、各時計遺伝子と *TOC1* の発現量の比を説明変数として、LASSO 回帰による解析を行い、説明変数の係数の上位 10 個の組み合わせを示した。

係数	時計遺伝子の組み合わせ
8.796651	<i>CCA1</i> (ZT20) / <i>TOC1</i> (ZT20)
4.661857	<i>CCA1</i> (ZT20) / <i>TOC1</i> (ZT4)
2.957844	<i>CCA1</i> (ZT0) / <i>TOC1</i> (ZT4)
1.863973	<i>TOC1</i> (ZT8) / <i>PRR7</i> (ZT0)
1.449728	<i>TOC1</i> (ZT12) / <i>PRR7</i> (ZT0)
1.142214	<i>TOC1</i> (ZT8) / <i>GI</i> (ZT12)
1.074880	<i>TOC1</i> (ZT0) / <i>LHY</i> (ZT8)
0.813570	<i>TOC1</i> (ZT8) / <i>ELF4</i> (ZT16)
0.795516	<i>TOC1</i> (ZT16) / <i>CCA1</i> (ZT20)
0.760046	<i>TOC1</i> (ZT8) / <i>PRR3</i> (ZT8)

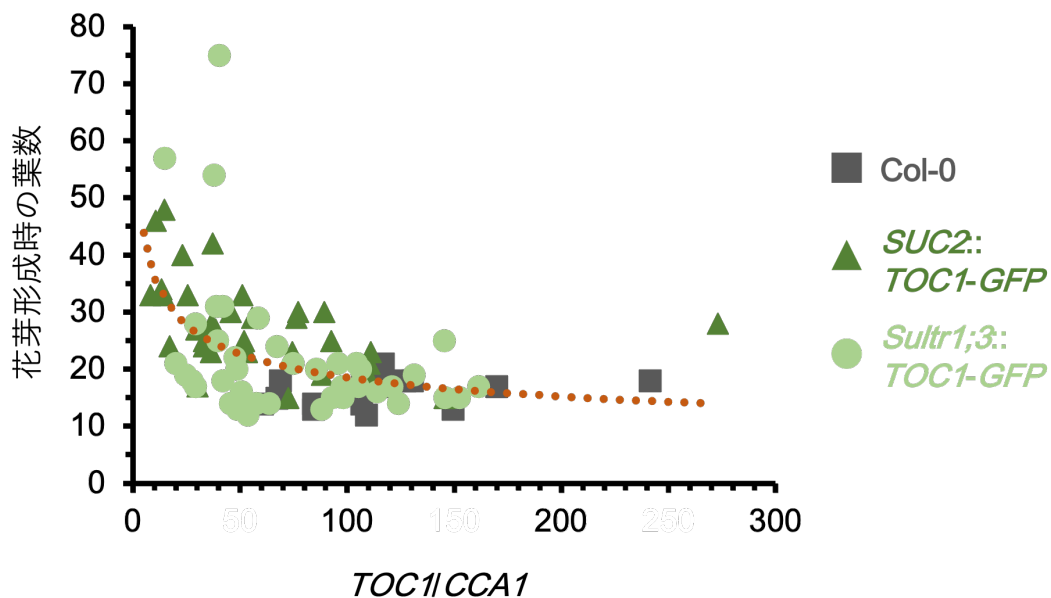


図 35 | *SUC2::TOC1-GFP*、*Sultr1;3::TOC1-GFP* の T₁ 世代における *TOC1/CCA1* 発現量比と花成時期の関係

12L/12D 条件下で生育した野生型、*SUC2::TOC1-GFP*、および、*Sultr1;3::TOC1-GFP* の T₁ 世代について、14 日目 ZT12 での *TOC1*、*CCA1* 発現量を RT-PCR により、花成時期を花芽形成時の葉数により測定した。

考察

遺伝子発現パターン解析のための新規プラットフォームの評価

第2章においては、概日時計に関する研究を目的として新たな時系列データのプラットフォームを作った。このプラットフォームで用いた 53 種類のデータセットは Diurnal で利用可能なデータセットを全て含んでいるだけでなく、2006 年~2021 年までのデータセットを追加することで、既存の Diurnal プロジェクトの完全な上位互換と位置付けられる。さらに、クオンタイル正規化の変法である MBQN を用いてデータを正規化したことで (図 27)、各データセット間での遺伝子発現量の中央値、最大・最小値はおおよそ同様の値となり、マイクロアレイと RNA-seq のデータを比較可能となった。一般にマイクロアレイよりも RNA-seq の方が高精度であるとされているが、本研究において複数データを適切に正規化し平均することで、遺伝子発現量の変動係数 (データ間のデータのばらつき) はより小さくなることが明らかになった。遺伝子発現量は正解データが明らかではないことから、複数のデータを適切に統合することで、より安定した結果につながると期待される (図 28)。こうした、アイデアでの概日時計制御遺伝子の探索はこれまでに行われておらず、本研究はその先鞭をつけた。

シロイヌナズナにおいて、どれくらいの遺伝子が概日時計によって制御されているかは不明なままであった。明暗周期条件下を含む Diurnal で用いられているデータセットのいずれかひとつ以上の条件で振動していると判定される遺伝子は 90%ほどであるが、これは光によって駆動されている遺伝子も含まれている。恒明条件下での発現パターンに周期性がある時計制御遺伝子は、約 26,000 遺伝子のうち、2000 年代初頭では約 3 割であると報告されている一方で、2020 年には 18%と報告されており、報告によって違いがある [Harmer *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2020]。これは、マイクロアレイと RNA-seq といった解析方法の違いだけでなく、データの取得条件や解析条件の違いによるところも大きいと考えられる。

本研究では、MetaCycle による解析で周期性ありと判定され、かつ、ピアソンの相関係数が高い 4,396 遺伝子を時計制御遺伝子とした (図 29)。これは、既知の 16 種類の時計遺伝子および時計制御遺伝子を全て含んでおり、高い精度で時計制御遺伝子を同定できたと考えられる。本研究では解析対象とした 25,910 遺伝子中 4,396 遺伝子が振動しており、その割合は 16.94%であった。これは、2020 年の報告での時計制御遺伝子数 [Yang *et al.*, 2020] に近く、たかだか全体の 15%~20%程度が概日時計による制御を受けていると考えられた。この割合は 1/3 とも 1/2 とも言われていた数と比べると大幅に少ない値である。一方で、マウスの肝臓では 10%ほどの遺伝子が概日時計制御であるとされており、これくらいの値が真実なのかもしれない。さらに、マウス

では肝臓で振動している遺伝子と視交叉上核（哺乳類における概日時計の中核）で振動している遺伝子はそれほど重複していないことも知られている。今回の解析では植物個体全体を用いているデータをもとにしており、これは、細胞数から考えると地上部の葉肉細胞の概日リズムを反映していると考えられる。実際、植物においても組織ごとに概日リズムの特性が異なっていることから [Endo *et al.*, 2014]。一方で、本研究では、データの制約もあり、維管束篩部伴細胞でのみ発現している *FT* 遺伝子の発現量を推定するために、植物個体全体のデータを用いて解析を行ったにもかかわらず、予想を支持するような結果も得られており、個別の遺伝子では多少の概日リズムの違いがあるものの、*FT* 発現量の予測という点については、組織ごとのデータの違いはそれほど大きい差ではない可能性も考えられた。いずれにせよ、組織レベルで同様の解析を行うことで、これらについては答えが出せると期待され、今後の課題である。

また、時計制御遺伝子の内訳として、日中や夜間にピークを持つ遺伝子に比べ、朝と夕方のように明暗の切り替わるタイミングで発現ピークを持つ遺伝子が多かった (図 31A)。従来の研究で概日時計は光受容の経路および温度受容の経路によって制御されていることが示されていたが、本研究においても、時計制御遺伝子は、明暗が切り替わる際に、光受容の経路や、温度変化を受容する経路によって大きく制御されていることが、改めて示唆された。

新規プラットフォームの応用可能性

この新規プラットフォームは、本研究において、周期性判定、フリーラン下での時刻推定、*CCAI* および *TOCI* 発現量と花成時期の関係を調査するにあたり実際に利用できた。フリーランにより周期長を変化されない場合の時刻に関しては (図 29)、更なる推定精度の向上が必要である。十分な実用性を確保することができれば、タイムポイントが1点しかなく、時系列データでないデータセットであっても、位相を推定することができる。このことは、第1章において行ったケミカルスクリーニングのような大規模解析に応用することで、時系列データでないデータセットであってもよりハイスループットの解析が可能となると期待される。

現時点では特定の時刻で発現する遺伝子を推定できている。Diurnal [Mockler *et al.*, 2007] に倣い、新規 53 個のデータセットを用いてそれらの遺伝子で共通するシス配列を探すことで、既知の Evening Element や CBS などのシス配列に加え、新たに特定の発現位相をもたらすシス配列を発見できる可能性がある。過去の研究では、シス配列の同定に機械学習を用いた例もあり、実際に、機械学習によってトマトの果実成熟を開始させるシス配列を同定することに成功している [Akagi *et al.*, 2022] ことから、本プラットフォームでも機械学習を試みる価値がある。

また、本研究では複数のデータセットに共通して振動する遺伝子に注目した解析を

行ったが、逆に特定の実験条件でのみ振動を示す遺伝子に注目することもできる。本プラットフォームに含まれている、特定の組織を単離した条件や、温度・光強度を変更した条件下でのデータセットを他のデータセットと比較することで、組織特異的に振動する遺伝子の解析や、温度・光に依存して振動する遺伝子の解析を行うことができる。

最後に、これらの周期性判定やフリーラン下での時刻推定は、今後 Web サイト Arabidopsis diel gene expression viewer 内でツールとして搭載することで、概日時計研究に有用になると考えられる。

FT 発現量を予測するパラメータとしての CCA1 発現量と TOC1 発現量の比

本研究では、CCA1 および TOC1 発現量と花成時期の関係を調査するにあたり、新規プラットフォームを利用した。LASSO 回帰では FT 発現量を強く説明するパラメータの上位 3 位までが時計遺伝子の比 CCA1/TOC1 であり、次点で 4~5 位まで時計遺伝子の比 TOC1/PRR7 であった (表 5)。花成時期の説明因子として上位 5 位までの全てに TOC1 が登場することは興味深い。

時計遺伝子 TOC1 が FT 発現を制御する経路については、TOC1 が CO タンパク質の安定化を介して FT 遺伝子の発現を制御する経路、および、TOC1 が別の時計遺伝子 CCA1 の発現を抑制することで CO タンパク質を介さずに直接 FT 遺伝子の発現を抑制する経路が知られており [Hayama *et al.*, 2017; Fujiwara *et al.*, 2005]、こうした経路が花成時期の制御において重要であることが改めて示唆された。また、時計遺伝子 PRR7 が FT 発現を制御する経路については、PRR5、PRR9 とともに、GI の発現抑制を介して CO を抑制することで、FT 遺伝子の発現を促進することが知られている [Nakamichi *et al.*, 2007]。これらの報告をまとめると、花成に対して、TOC1 および PRR7 はアクセルとして、CCA1 はブレーキとして働いており、今回の LASSO 回帰で示唆された上位 3 つの CCA1/TOC1 の組み合わせはアクセルとブレーキであり、本研究での仮説と矛盾しない結果であった。一方で、TOC1/PRR7 の組み合わせは両方ともにアクセルに相当し、この比がどのような意味を持ちうるのかは不明であるが、日長変化によって TOC1 の概日リズムの位相が変化するのに対して PRR7 の位相はほとんど変化しないことから、これが日長を反映している可能性が考えられる。CCA1 も PRR7 と同様、日長によって位相は変化しないことから、時計遺伝子の比はアクセルとブレーキの組み合わせだけでなく、日長の計測にも関わっている可能性もある。

LASSO 回帰での係数の大きさも考慮すると、今後、とくに CCA1 および TOC1 の組み合わせを詳細に検証する価値があると考えられる。ただし、今回のパラメータサーチにおいては、時計遺伝子 TOC1、および、その他の時計遺伝子 19 種類の比を単純に説明変数として利用している。図 35 において TOC1/CCA1 発現量比が花成時期に対

し反比例的であることから、LASSO 回帰により *CCA1/TOC1* 発現量比が説明変数として同定されたことは、結果的に正しかったと考えられる。図 32 より *TOC1* 発現量を含むパラメータを説明変数に利用することはもっともらしいものの、説明変数の取り方には、さらなる検証が必要である。例えば、説明変数に発現量の比ではなく積を説明変数に採用する場合や、それぞれの発現量を指数関数的に変化させた場合、説明変数を 1 つではなく 2 つに絞る場合（このとき、*FT* 発現量を説明するパラメータは、例えば 2 種類の時計遺伝子の発現量の和になる）なども検証し、本研究成果の妥当性を確認する必要がある。

各パラメータの時刻に関しては、上位 3 位までの発現量比の算出に用いられた *CCA1* 発現量および *TOC1* 発現量の ZT は、1 位から順に、ZT20/ZT20、ZT20/ZT4、ZT0/ZT4 であり、いずれも夜明け前後の発現量であった。夜明けの *TOC1* タンパク質により安定化され蓄積する CO タンパク質の量、および、同じ時間帯の *CCA1* タンパク質の量のバランスにより、*FT* 発現が制御される可能性が考えられる。しかし、以上の結果はマイクロアレイ/RNA-seq および RT-PCR の結果から予想されたものであり、将来的には CO および *CCA1* タンパク質をウェスタン・ブロッティングで測定するといった、タンパク質レベルでの解析が必要である。また、約 100 ラインの *TOC1* 過剰発現体において花成時期と反比例した ZT12 での *CCA1/TOC1* の発現量比は、マイクロアレイ/RNA-seq での LASSO 解析では係数が 0 となり棄却されたことから、昼間の CO および *CCA1* タンパク質に関しても、タンパク質レベルでの解析が必要だと考えられる。

謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域 植物生理学研究室（修士課程では京都大学 大学院生命科学研究科 統合生命科学専攻 分子代謝制御分野）で行われました。遠藤求教授（前・京大生命科学研究科准教授）には、研究の機会を与えていただき、ご指導いただきましたことを心より感謝いたします。修士課程の間、荒木崇教授には研究指導委託を認めていただきました。この場を借りて、お礼申し上げます。

本研究第 1 章で使用したケミカルライブラリは京都大学医学部ドラッグディスカバリーセンターより提供していただきました。RNA-seq 解析におけるシーケンシングの依頼は鈴木孝征准教授（中部大学応用生物学部）に引き受けていただき、木下新学術領域において中部大学鈴木孝征研究室において行っていただきました。ありがとうございました。

同研究室の久保田茜助教、高橋望助教、上本恭平さんには、実験上のご指導や助言をしていただきました。さらに、山中美和子さんには、実験補佐をしていただきました。ありがとうございました。

また、奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域植物生理学研究室の皆様には、多くの助言、ご協力とご支援をいただき、本研究を行うことができました。ありがとうございました。

最後に、今まで多くのご助言、激励、ご支援をいただいた全ての方々に深く感謝いたします。

参考文献

本学位論文の第一章は以下の学術論文の内容に基づく。

Atsuhiko Hirohata, Yuta Yamatsuta, Kaori Ogawa, Akane Kubota, Takamasa Suzuki, Hanako Shimizu, Yuki Kanesaka, Nozomu Takahashi, Motomu Endo
Sulfanilamide regulates flowering time through expression of the circadian clock gene *LUX*
Plant Cell Physiol. 63(5): 649–657. pcac027, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac027>

学位論文

清水華子 (2014) 「シロイヌナズナの概日時計の組織特異的な環境応答」
京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻分子代謝制御学分野 平成 25 年度
博士論文

小河香織 (2018) 「維管束の概日時計を介した光周性花成の理解と制御」
京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻分子代謝制御学分野 平成 29 年度
修士学位論文

廣畑敦洋 (2020) 「概日時計を介した花成時期の制御」
京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻分子代謝制御学分野 平成 31 年度
(令和元年) 修士学位論文

学術誌論文

Akagi, T., Masuda, K., Kuwada, E., Takeshita, K., Kawakatsu T. and Ariizumi, T. et al. (2022).
Genome-wide cis-decoding for expression design in tomato using cistrome data and
explainable deep learning. *Plant Cell* 34: 2174–2187.

Attaran, E., Major, I.T., Cruz, J.A., Rosa, B.A., Koo, A.J.K. and Chen, J. et al. (2014). Temporal
Dynamics of Growth and Photosynthesis Suppression in Response to Jasmonate Signaling.
Plant Physiol. 165: 1302–1314.

Ausín, I., Alonso-Blanco, C., Jarillo, J.A., Ruiz-García, L. and Martínez-Zapater, J.M. (2004).
Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nat Genet.* 36: 162–
166.

Blanvillain, R., Wei, S., Wei, P., Kim, J.H. and Ow, D.W. (2011). Stress tolerance to stress
escape in plants: role of the OXS2 zinc-finger transcription factor family. *EMBO J.* 30: 3812–
3822.

Bläsing, O.E., Gibon, Y., Günther, M., Höhne, M., Morcuende, R. and Osuna, D. (2005). Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of Diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 3257–3281.

Bouché, F., Lobet, G., Tocquin, P. and Périlleux, C. (2016). FLOR-ID: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 44: D1167–D1171.

Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E. and Davis, K.R. et al. (2001). Growth Stage–Based Phenotypic Analysis of *Arabidopsis*: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *Plant Cell* 13: 1499–1510.

Brombacher, E., Schad, A. and Kreutz, C. (2020). Tail-Robust Quantile Normalization. *Proteomics* 20: e2000068.

Bu, T., Lu, S., Wang, K., Dong, L., Li, S., Xie, Q. et al. (2021). A critical role of the soybean Evening Complex in the control of photoperiod sensitivity and adaptation. *PNAS* 118: e2010241118.

Campoli, C., Pankin, A., Drosse, B., Casao, C.M., Davis, S.J. and von Korff, M. (2013). *HvLUX1* is a candidate gene underlying the *early maturity 10* locus in barley: phylogeny, diversity, and interactions with the circadian clock and photoperiodic pathways. *New Phytol.* 199: 1045–1059.

Casal, J.J. (2000). Phytochromes, Cryptochromes, Phototropin: Photoreceptor Interactions in Plants. *Photochem. Photobiol.* 71: 1–11.

Castillejo C. and Pelaz S. (2008). The Balance between CONSTANS and TEMPRANILLO Activities Determines *FT* Expression to Trigger Flowering. *Curr Biol.*, 18, 1338–1343.

Chung, B.Y.W., Balcerowicz, M., Antonio, M.D., Jaeger, K.E., Geng, F. and Franaszek, K. (2020). An RNA thermoswitch regulates daytime growth in *Arabidopsis*. *Nat. Plants* 6: 522–532.

- Cools, T., Iantcheva, A., Maes, S., Van den Daele H. and Veylder, L.D. (2010). A replication stress-induced synchronization method for *Arabidopsis thaliana* root meristems. *Plant J.* 64: 705–714.
- Cortijo, S., Aydin, Z., Ahnert, S. and Locke, J.C. (2019). Widespread inter-individual gene expression variability in *Arabidopsis thaliana*. 15: e8591.
- Covington, M.F. and Harmer, S.L. (2007). The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 5: e222.
- Dalchau, N., Hubbard, K.E., Robertson, F.C., Hotta, C.T., Briggs, H.M. and Stan, G.B. et al. (2010). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107: 13171–13176.
- Dezar, C.A., Giacomelli, J.I., Manavella, P.A., Ré, D.A., Alves-Ferreira, M., Baldwin, I.T. et al. (2011). HAHB10, a sunflower HD-Zip II transcription factor, participates in the induction of flowering and in the control of phytohormone-mediated responses to biotic stress. *J. Exp. Bot.* 62: 1061–1076.
- Dodd, A.N., Gardner, M.J., Hotta, C.T., Hubbard, K.E., Dalchau, N. and Love, J. et al. (2007). The *Arabidopsis* circadian clock incorporates a cADPR-based feedback loop. *Science* 318: 1789–1792.
- Endo, M., Shimizu, H., Nohales, M.A., Araki, T. and Kay, S.A. (2014). Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature* 515: 419–422.
- Epinoza, C., Degenkolbe, T., Caldana, C., Zuther, E., Leisse, A. and Willmitzer, L. et al. (2010). Interaction with Diurnal and Circadian Regulation Results in Dynamic Metabolic and Transcriptional Changes during Cold Acclimation in *Arabidopsis*. *PLoS one* 5: e14101.
- Ezer, D., Jung, J.H., Lan, H., Biswas, S., Gregoire, L., Box, M.S. et al. (2017). The Evening Complex coordinates environmental and endogenous signals in *Arabidopsis*. *Nat Plants* 3: 17087.

Fang, X., Han, Y., Liu, M., Jiang, J., Li, X., Lian, Q. et al. (2021). Modulation of Evening Complex activity enables north-to-south adaptation of soybean. *Sci China Life Sci.* 64: 179–195.

Fawzy, G. and Ray, H. (2017). Genome editing of crops: A renewed opportunity for food security. *GM Crops & Food* 8: 1–12.

Fujiwara, S., Nakagawa, M., Kamada, H. and Mizoguchi, T. (2005). Circadian clock components in Arabidopsis III. LHY/CCA1/GI in regulating the floral integrator genes *LFY/SOCl/FT* to control flowering time and shoot architecture. *Plant Biotech.* 22: 327–331.

Fujiwara, S., Wang, L., Han, L., Suh, S.S., Salomé, P.A., McClung, C.R., and Somers, D.E. (2008) *J. Biol. Chem.* 283: 23073–23083.

Gardiner, L.J., Rusholme-Pilcher, R., Colmer, J., Rees, H., Crescente, J.M., Carrieri, A.P., Duncan, S., Pyzer-Knapp, E.O., Krishna, R. and Hall, A. (2021) Interpreting machine learning models to investigate circadian regulation and facilitate exploration of clock function. *PNAS* 118.

Goh, Y.I. and Koren, G. (2008). Folic acid in pregnancy and fetal outcomes. *J Obstet Gynaecol.* 28: 3–13.

Gorelova, V., De Lepeleire, J., Van Daele, J., Pluim, D., Meï, C. and Cuypers, A. et al. (2017). Dihydrofolate Reductase/Thymidylate Synthase fine-tunes the folate status and controls redox homeostasis in plants. *Plant Cell* 29: 2831–2853.

Green, R.M. and Tobin, E.M. (1999) Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 4176–4179.

Hanson, A.D. and Gregory, J.F., 3rd (2011). Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 62: 105–125.

Hanson, A.D., Beaudoin, G.A., McCarty, D.R. and Gregory, J.F. 3rd (2016). Does Abiotic Stress Cause Functional B Vitamin Deficiency in Plants? *Plant Physiol.* 172: 2082–2097.

- Harmar, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., and Kay, S.A. (2000). Orchestrated Transcription of Key Pathways in *Arabidopsis* by the Circadian Clock. *Science* 290: 2110–2113.
- Hayama, R., Sarid-Krebs, L., Richter, R., Fernández, V., Jang, S. and Coupland, G. (2017). PSEUDO RESPONSE REGULATORS stabilize CONSTANS protein to promote flowering in response. *EMBO J.* 36: 904–918.
- Hazen, S.P., Schultz, T.F., Pruneda-Paz, J.L., Borevitz, J.O., Ecker, J.R. and Kay, S.A. (2005). *LUX ARRHYTHMO* encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *PNAS* 102: 10387–10392.
- Helfer, A., Nusinow, D.A., Chow, B.Y., Gehrke, A.R., Bulyk, M.L. and Kay, S.A. (2011). *LUX ARRHYTHMO* encodes a nighttime repressor of circadian gene expression in the *Arabidopsis* core clock. *Curr. Biol.* 21: 126–133.
- Hsu, P.Y. and Harmer, S.L. (2012). Circadian phase has profound effects on differential expression analysis. *PLoS one* 7: e49853.
- Ionescu, I.A., Møller, B.L. and Sánchez-Pérez, R. (2017). Chemical control of flowering time. *J Exp Bot.* 68: 369–382.
- Jung, C. and Müller, A.E. (2009). Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends Plant Sci.* 14: 563–573.
- Kiba, T., Henriques, R., Sakakibara, H. and Chua, N.H. (2007). *Plant Cell* 19: 2516–2530.
- Kim, Y., Kim, J., Yeom, M., Kim, H., Kim, J. and Wang, L. et al. (2013). ELF4 Regulates GIGANTEA Chromatin Access through Subnuclear Sequestration. *Cell Report* 3: 671–677.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. and Araki, T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286: 1960–1962.

- Koornneef, M., Hanhart, C.J. and van der Veen, J.H. (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet.* 229: 57–66.
- Kumimoto, R.W., Adam, L., Hymus, G.J., Repetti, P.P., Reuber, T.L. and Marion, C.M. et al. (2008). The Nuclear Factor Y subunits NF-YB2 and NF-YB3 play additive roles in the promotion of flowering by inductive long-day photoperiods in *Arabidopsis*. *Planta* 228: 709–723.
- Langmad, B., Trapnell, C., Pop, M. and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10: R25.
- Latrasse, D., Germann, S., Houba-Hérin, N., Dubois, E., Bui-Prodhomme, D. and Hourcade, D. et al. (2011). Control of Flowering and Cell Fate by LIF2, an RNA Binding Partner of the Polycomb Complex Component LHP1. *PLoS one* 6: e16592.
- Liew, C.L., Hecht, V., Sussmilch, F.C. and Weller, J.L. (2014). The pea photoperiod response gene *STERILE NODES* is an ortholog of *LUX ARRHYTHMO*. *Plant Physiol.* 165: 648–657.
- Liew, L.C., Singh, M.B. and Bhalla, P.L. (2017). A novel role of the soybean clock gene *LUX ARRHYTHMO* in male reproductive development. *Sci Rep.* 7:10605.
- Lin, J., Yu, Z., Ye, C., Hong, L., Chu, Y. and Chen, Y. et al. (2021). Alternative polyadenylated mRNAs behave as asynchronous rhythmic transcription in *Arabidopsis*. *RNA Biol.* 18: 2594–2604.
- Linde, A.M., Eklund, D.M., Kubota, A., Pederson, E.R.A., Holm, K. and Gyllenstrand, N. et al. (2017). Early evolution of the land plant circadian clock. *New Phytol.* 216: 576–590.
- Lu, S.X., Webb, C.J., Knowles, S.M., Kim, S.H.J., Wang, Z. and Tobin, E.M. (2012). CCA1 and ELF3 Interact in the control of hypocotyl length and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 158: 1079–1088.
- Lyons, R., Rusu, A., Stiller, J., Powell, J., Manners, J.M. and Kazan, K. (2015). Investigating the association between flowering time and defense in the *Arabidopsis thaliana-Fusarium oxysporum* interaction. *PLoS one* 10: e0127699.

Prabhu, V., Chatson, K.B., Lui, H., Abrams, G.D. and King, J. (1998). Effects of sulfanilamide and methotrexate on ^{13}C fluxes through the glycine decarboxylase/serine hydroxymethyltransferase enzyme system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 116: 137–144.

Puthusseri, B., Divya, P., Lokesh, V., Kumar, G., Savanur, M.A. and Neelwarne, B. Novel Folate Binding Protein in *Arabidopsis* Expressed during Salicylic Acid-Induced Folate Accumulation. *J. Aric. Food Chem.* 66: 505–511.

Matsushika, A., Murakami, M., Ito, S., Nakamichi, N., Yamashino, T. and Mizuno, T. (2007). Characterization of circadian-associated pseudo-response regulators: I. Comparative studies on a series of transgenic lines misexpressing five distinctive PRR genes in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 527–534.

Matsoukas, I.G., Massiah, A.J. and Thomas, B. (2013). Starch metabolism and antiflorigenic signals modulate the juvenile-to-adult phase transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 36: 1802–1811.

McDermid, S.S., Montes, C., Cook, B.I., Puma, M.J. Kiang, N.Y. and Aleinov, I. (2019). The Sensitivity of Land–Atmosphere Coupling to Modern Agriculture in the Northern Midlatitudes. *J. Clim.* 32: 465–484.

Michael, T.P., Mockler, T.C., Breton, G., McEntee, C., Byer, A. and Trout, J.D. et al. (2008a). Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genet.* 4: e4.

Michael, T.P., Breton, G., Hazen, S.P., Priest, H., Mockler, T.C. and Kay, S.A. et al. (2008b). A Morning-Specific Phytohormone Gene Expression Program underlying Rhythmic Plant Growth. 6: e225.

Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M. and Song, H.R. et al. (2002). *LHY* and *CCA1* are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 2: 629–641.

Mizuno, N., Nitta, M., Sato, K. and Nasuda, S. (2012). A wheat homologue of *PHYTOCLOCK 1* is a candidate gene conferring the early heading phenotype to einkorn wheat. *Genes Genet Syst.* 87: 357–367.

Müller, N.A., Wijnen, C.L., Srinivasan, A., Ryngajllo, M., Ofner, I. and Lin, T. et al. (2016). Domestication selected for deceleration of the circadian clock in cultivated tomato. *Nat. Genet.*, 48: 89–93.

Murakami, M., Yamashino, T. and Mizuno, T. (2004). Characterization of Circadian-Associated APRR3 Pseudo-Response Regulator Belonging to the APRR1/TOC1 Quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45: 645–650.

Mockler, T.C., Michael, T. P., Priest, H. D., Shen, R., Sullivan, C. M. and Givan, S. A. et al. (2007). The Diurnal Project: Diurnal and Circadian Expression Profiling, Model-Based Pattern Matching, and Promoter Analysis. *Cold Spring Harb. Symposia Quantitative Biol.* 72, 353–363.

Mombaerts, L., Carignano, A., Robertson, F.C., Hearn, T.J., Junyang, J. and Hayden, D. (2019). Dynamical differential expression (DyDE) reveals the period control mechanisms of the *Arabidopsis* circadian oscillator. *PLoS Comput Biol.* 15: e1006674.

Nakamichi, N., Kita, M., Niinuma, K., Ito, S., Yamashino, T. and Mizoguchi, T. et al. (2007). *Arabidopsis* Clock-Associated Pseudo-Response Regulators PRR9, PRR7 and PRR5 Coordinately and Positively Regulate Flowering Time Through the Canonical CONSTANS-Dependent Photoperiodic Pathway. *Plant Cell Physiol.* 48: 822–832.

Nakamichi, N. (2015). Adaptation to the Local Environment by Modifications of the Photoperiod Response in Crops. *Plant Cell Physiol.* 56: 594–604.

Nakamichi, N. (2021). Chemical biology to dissect molecular mechanisms underlying plant circadian clocks. *New Phytol.* 235: 1336–1343.

Nagel, D.H. and Kay, S.A. (2012). Complexity in the Wiring and Regulation of Plant Circadian Networks. *Curr. Biol.* 22: R648–R657.

- Nagy, F. and Schäfer, E. (2002). Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.* 53: 329–355.
- Niwa Y, Ito S, Nakamichi N, Mizoguchi T, Niinuma K, Yamashino T, et al. (2007). Genetic linkages of the circadian clock-associated genes, *TOC1*, *CCA1* and *LHY*, in the photoperiodic control of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 48: 925–37.
- Nusinow, D., Helfer, A., Hamilton, E. et al. (2011). The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* 475: 398–402.
- Park, M.J., Kwon, Y.J., Gil, K.E. and Park, C.M. (2016). LATE ELONGATED HYPOCOTYL regulates photoperiodic flowering via the circadian clock in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 16: 114.
- Park, H.J., Baek, D., Cha, J.Y., Liao, X., Kang, S.H. and McClung, C.R. et al. (2019). HOS15 Interacts with the Histone Deacetylase HAD9 and the Evening Complex to Epigenetically Regulate the Floral Activator *GIGANTEA*. *Plant Cell* 31: 37–51.
- Prabhu, V., Chatson, K.B., Lui, H., Abrams, G.D. and King, J. (1998). Effects of sulfanilamide and methotrexate on ¹³C fluxes through the glycine decarboxylase/serine hydroxymethyltransferase enzyme system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 116: 137–144.
- Romanowski, A., Schlaen, R.G., Perez-Santangelo, S., Mancini, E. and Yanovsky, M.J. (2020). Global transcriptome analysis reveals circadian control of splicing events in *Arabidopsis thaliana*. 103: 889–902.
- Rugtone, M.L., Soverna, A.F., Sanchez, S.E., Schlaen, R.G., Hernando, C.E. and Seymour, D.K. et al. (2013). LNK genes integrate light and clock signaling networks at the core of the *Arabidopsis* oscillator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110: 12120–12125.
- Ryu, J.Y., Lee, H.J., Seo, P.J., Jung, J.H., Ahn, J.H. and Park, C.M. (2013). The *Arabidopsis* floral repressor BFT delays flowering by competing with FT for FD binding under high salinity. *Mol. Plant* 7: 377–387.

Sawa, M., Nusinow, D.A., Kay, S.A. and Imaizumi T. (2007) FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* 318: 261–265.

Shimizu, H., Katayama, K., Koto, T., Torii, K., Araki, T. and Endo, M. (2015). Decentralized circadian clocks process thermal and photoperiodic cues in specific tissues. *Nat Plants* 1: 15163.

Silva, C.S., Nayak, A., Lai, X., Hutin, S., Hugouvieux, V., Jung, J.H. et al. (2020). Molecular mechanisms of Evening Complex activity in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117: 6901–6909.

Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Mas, P. and Panda, S. et al. (2000). Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* 289: 768–771.

Takahashi, N., Hirata, Y., Aihara, K. and Mas, P. (2015). A hierarchical multi-oscillator network orchestrates the *Arabidopsis* circadian system. *Cell* 163: 148–159.

Takeno, K. (2016). Stress-induced flowering: the third category of flowering response. *J. Exp. Bot.* 67: 4925–4934.

Teotia, S. and Lamb, R.S. (2009). The Paralogous Genes *RADICAL-INDUCED CELL DEATH1* and *SIMILAR TO RCD ONE1* Have Partially Redundant Functions during *Arabidopsis* Development. *Plant Cell* 15: 2719–2729.

Thomas, P.D., Campbell, M.J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B. and Daverman, R. et al. (2003). PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res.* 13: 2129–2141.

Truernit, E. and Sauer, N. (1995). The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of β -glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* 196: 564–570.

Ueda., H.R., Chen, W., Minami, Y., Honma, S., Honma, K., Iino and M. et al. (2004). Molecular-timetable methods for detection of body time and rhythm disorders from single-time-point genome-wide expression profiles. *PNAS* 101: 11227–11232.

- Uehara, T.N., Mizutani, Y., Kuwata, K., Hirohata, T., Sato, A. and Mizoi, J. et al. (2019). Casein kinase 1 family regulates PRR5 and TOC1 in the *Arabidopsis* circadian clock. *PNAS* 116: 11528–11536.
- Wargner, S., Bernhardt, A., Leuendorf, J.E., Drewke, C., Lutovchenko, A. and Mujahed, N. et al. (2006). Analysis of the *Arabidopsis* *rsr4-1/pdx1-3* mutant reveals the critical function of the PDX1 protein family in metabolism, development, and vitamin B6 biosynthesis. *Plant Cell* 18: 1722–1735.
- Wang, L., Kong, D., Lv, Q., Niu, G., Han, T., Zhao, X. et al. (2017). Tetrahydrofolate modulates floral transition through epigenetic silencing. *Plant Physiol.* 174: 1274–1284.
- Würschum, T., Gross-Hardt, R. and Laux, T. (2006). APETALA2 regulates the stem cell niche in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Plant Cell* 18: 295–307.
- Xu, M.Y., Zhang, L., Li, W.W., Hu, X.L., Wang, M.B. and Fan, Y.L. et al. (2014). Stress-induced early flowering is mediated by miR169 in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 65: 89-101.
- Yang, Y., Li, Y., Sancar, A. and Oztas, O. (2020). The circadian clock shapes the *Arabidopsis* transcriptome by regulating alternative splicing and alternative polyadenylation. *J. Biol. Chem.* 295: 7608–7619.
- Yoshimoto, N., Inoue, E., Saito, K., Yamaya, T. and Takahashi, H. (2003). Phloem-Localizing Sulfate Transporter, Sultr1;3, Mediates Re-Distribution of Sulfur from Source to Sink Organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131: 1511–1517.
- Yu, J.W., Rubio, V., Lee, N.Y., Bai, S., Lee, S.Y. and Kim, S.S. (2008) COP1 and ELF3 Control Circadian Function and Photoperiodic Flowering by Regulating GI Stability. *Mol. Cell* 32: 617–630.
- Zhang, C., Gao, M., Seitz, N.C., Angel, W., Hallworth, A. Wiratan, L. et al. (2019). LUX ARRHYTHMO mediates crosstalk between the circadian clock and defense in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 10: 2543.

Zhang, Y., Massel, K., Godwin, I.D. and Gao, C. (2018). Applications and potential of genome editing in crop improvement. *Genome Biol.* 19: 210.