食料廃棄の低減による温室効果の排出抑制を目的とする効率的な栽培制御技術の開発

所属：奈良先端科学技術大学院大学　先端科学技術研究科

助成対象者：遠藤　求

概要

排出される二酸化炭素の約 10%は食料廃棄が原因であり、そのうちの多くが生産および貯蔵の段階で起こっている。このことから、任意のタイミングで花成をコントロール技術が求められている。本研究では、化合物によって概日時計を制御することで任意のタイミングで花を咲かせることを目的に研究を行った。ケミカルスクリーニングの結果、葉酸生合成の阻害剤であるスルファニルアミドが同定された。スルファニルアミドは花成に重要な *FT* 遺伝子の発現を濃度依存的に抑制するにもかかわらず花成の遅延効果はわずかであった。トランスクリプトーム解析から、幼若期で *FT* 発現を抑制する TEM がスルファニルアミドの制御標的である可能性が示された。

abstract

Food waste accounts for about 10% of CO_2 emissions, much of which occurs during production and storage process. Therefore, a technique for controlling flowering at arbitrary timing is required. Here, we aim to control the circadian clock by chemical compounds that modulate timing of flowering. Chemical screening identified sulfanilamide, an inhibitor of folate biosynthesis. It suppressed the expression of *FT* gene, which is important for floral development, in a concentration-dependent manner, but flowering delay was not severe. Transcriptome analysis indicated that TEM, which suppresses *FT* expression in the young, may be a regulatory target for sulfanilamide.

研究内容

背景

食料廃棄は食糧問題としてだけでなく、廃棄に至るまでに投入された資源を全て無駄にし、廃棄にも環境負荷を伴うことで、温室効果ガスの排出を増大させている点で大きな問題である。生産された食料の 30～40%が廃棄され、これは全二酸化炭素排出量の 10%弱にあたる 33 億トンの二酸化炭素に相当する。こうした食料廃棄の約 54%が生産および貯蔵段階で起こっており、その中には過剰供給や気候変動による品質低下など、生産のタイミングに原因がある場合も少なくない。

農作物の生産のタイミングは基本的に花成のタイミングであり、これまで主に次の３つの方法によって制御されてきた。

（１）適切な品種の選択と品種改良（育種）

栽培地域に適した花成時期と好ましい形質を併せ持つような品種を利用する方法は、古典的ではあるが作付け後の管理が容易であることから花成を制御するための主要な方法となっている。しかし、農作物の種類ごとに開発を行う必要があり、

多くの人手と時間を必要とする。また花成時期を厳密に制御することは難しく、作付け後の生産調節はできない。

（２）栽培方法の工夫

日長や温度を適切に管理することによって花成のタイミングを調節する方法は、主にビニールハウスや植物工場など施設栽培で利用されている。長期にわたる実績があり、また農業試験場でも盛んに研究されているため、品種ごとのデータが大量に蓄積されている。比較的手軽な方法であるが、環境条件を調節するためのコストがかかること、露地栽培や大型の作物には不向きであること、適切な制御方法が知られていない作物も多く存在することから、汎用性が無い。

（３）遺伝子組換えおよびゲノム編集

花成制御に関わる遺伝子を標的とした遺伝子組換え（およびゲノム編集）植物は、制御標的が明確であるため劇的な効果を示し、副次的な影響もほとんどない。しかし、遺伝子組換えに対する消費者の心理的抵抗性はいまだ根強く、研究成果を消費者に届けるという観点からは問題が多い。さらに、遺伝子組換えやゲノム編集を効率よく行うことができる植物種も限定的である。

申請者らのこれまでの研究を含め、花成制御機構および関連因子の立体構造はかなり明らかになってきた[Taoka et al., 2011; Endo et al., 2014, Shimizu et al., 2015]。これらの仕組みは植物で高度に保存されていることから、その活性を化合物によって直接制御することで、これまでの方法の問題点を解決し、広範な作物種において生産調節を可能にする新たな方法を提供できると考えた（図１）。

研究目的

これまでの植物の生長調節は環境条件の制御や遺伝子組換えによる制御が開発の中心であり、各種規制を含めた実現可能性や消費者マインドをそれほど考慮してこなかった。新規化合物や既存の農薬を利用した植物の生長制御は最近になって報告されるようになってきたが[Park et al., 2015; Griffiths et al., 2016; Okada et al., 2017]、依然として遺伝子組換えや農薬の新規登録を前提としており、実際に利用可能にするためには高いハードルが存在する。これに対して本研究は、(1)すでに機能が明らかとなっている概日時計システムの機能を化合物で制御することで非遺伝子組換えによる制御を達成すること、(2)既存薬および機能既知薬など生体に対する影響が明らかとなっている既存薬を活用することで、農薬としての承認手続きの簡素化を狙うことで、より現実的な植物の生長制御方法を提案することを目的に研究をおこなった。

研究結果

本研究では、まず時計遺伝子 ELF4 ならびに CCA1、LHY の概日リズムの振幅を低下させ、かつ、花成時期を決定し植物ホルモンであるフロリゲンをコードする FT 遺伝子の発現を抑制する化合物のスクリーニングを行った。2,520 種の機能既知薬を植物について検討したところ、100 超の化合物が時計遺伝子の振幅を低下させる化合物であることが示された。そこで、これらのうち入手のしやすさ価格を考慮し約 30 の候補化合物に絞り込み、FT 遺伝子の発現量を qPCR によって確認した。そのほとんどについては再現性が無かったものの、＃2 と名付けられていた化合物については再現性および濃度依存的な応答が観察されたことから、本研究では以降、＃

2 の作用機序の解析を行った。

＃2 は葉酸の生合成阻害剤であるスルファニルアミドであった（図 1）。葉酸はビタミン B であり植物においては光合成や核酸の生合成への関与が報告されているものの、花成のタイミングを制御するという報告は存在しなかった（図 2）。そこでスルファニルアミドが花成のどのステップをどの様に阻害しているのかを確認するため、まずは、スルファニルアミドが概日リズムに与える影響およびその濃度依存性について検討を行った。

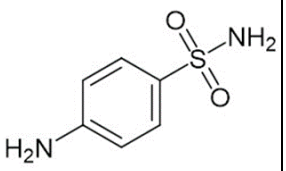

図 1　スルファニルアミドの構造式

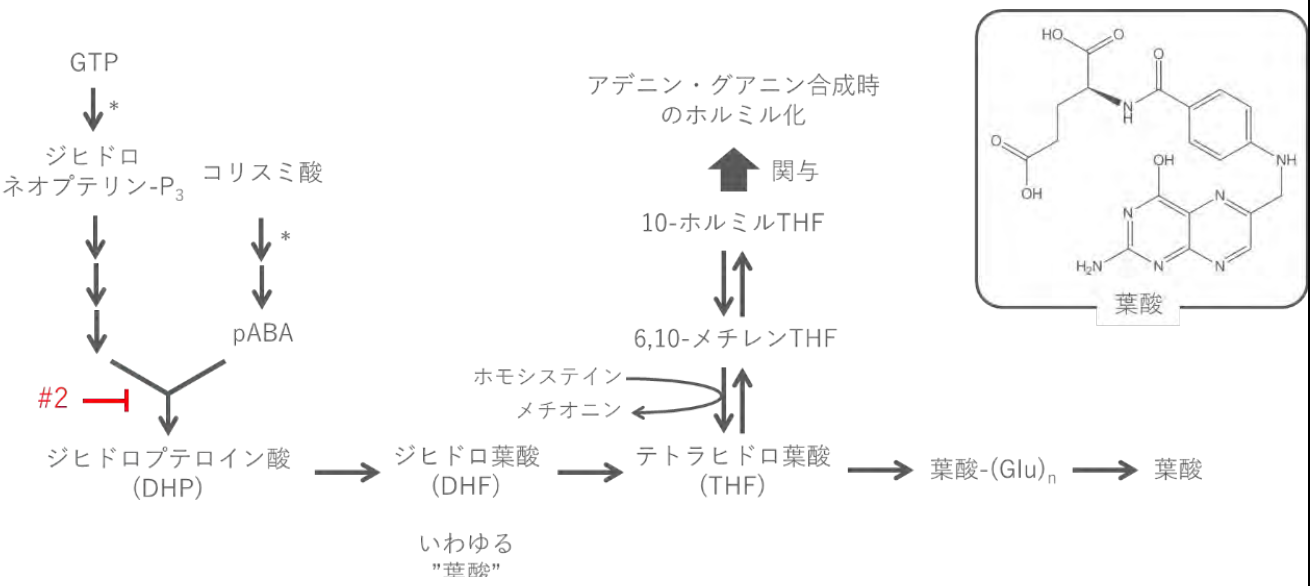

図 2　葉酸の生合成経路とスルファニルアミド（＃2）の作用点

さまざまな濃度のスルファニルアミドを植物に添加し、代表的な時計遺伝子である *CCA1* の発現リズムを連続明条件で計測した（図 3）その結果、スルファニルアミドは濃度依存的に概日リズムの振幅を低下させると共に長周期化を引き起こすことを明らかにした。これによりするスルファニルアミドはたしかに概日時計に作用する化合物であることが確認された。さらに、概日リズムの振幅低下と長周期化はいずれも花成時期を遅らせる方向に作用すると考えられることから、次に同じ条件における *FT* 遺伝子発現を qPCR によって計測した。

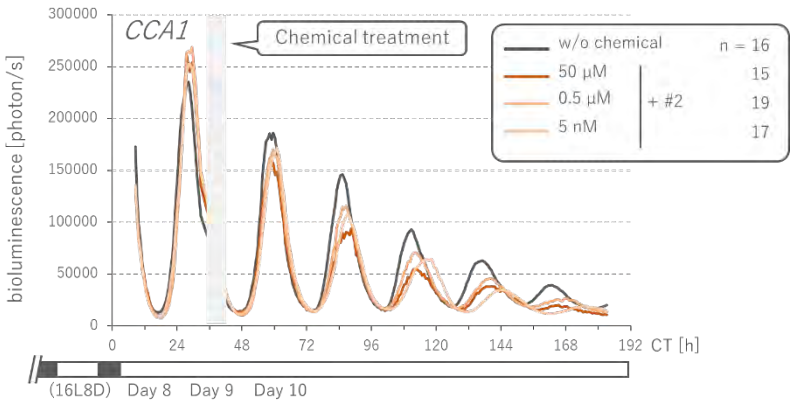

図 3　スルファニルアミドは概日リズムに影響を及ぼす

スルファニルアミドの概日リズムによる影響から予想された通り、十分に高い濃度ではスルファニルアミドは *FT* 遺伝子の発現をほぼ完璧に抑制していることが明らかとなった。最も濃度が低い 100 μM においても *FT* の発現量は約 1/10 にまで低下しており、スルファニルアミドが *FT* 発現を制御している可能性が強く示唆された。

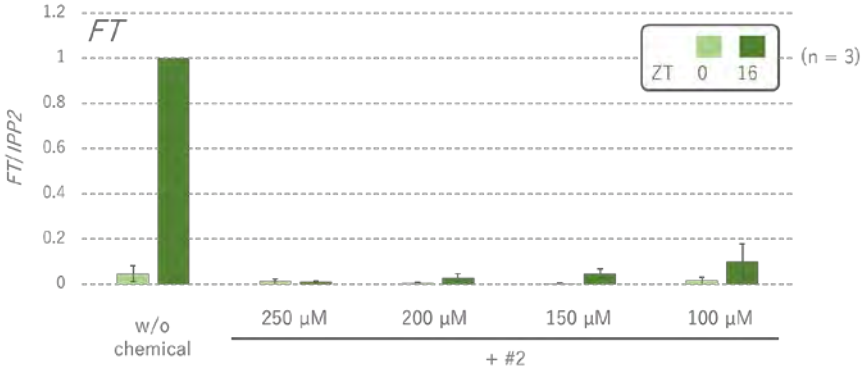

図 4　スルファニルアミドは *FT* 発現を抑制する

しかし、同時に高濃度のスルファニルアミドは植物の生育に深刻な悪影響をもたらすことも見出した（データ示さず）。100μM 以上の濃度で葉酸を投与すると特に若い芽生えに対しては致死的に作用し、植物の生育は完全に停止する。このことは葉酸が植物の生育に必須であることを意味していたため、ここで観察された *FT* の発現抑制効果と成長抑制効果を分離して評価する必要があった。そこで植物の生育に悪影響を与えずかつ FT 発現を十分に抑制するスルファニルアミド濃度を検討し、50μM 濃度を採用し、以降の研究を行うことにした。この濃度においても *FT* の発現量は十分に抑制されていることは確認済みである。

5nM, 0.5μM, 50μM とスルファニルアミド濃度を振って花成時期（葉の枚数で評価し多いほど遅咲きを示す）を計測したところ、予想外にも花成時期はほとんど変化せず、FT の遺伝子発現の抑制度合いからは想像できないほど、わずかな遅咲き表現型が観察されたのみであった（図 5)。生理的な濃度の限界と考えられる 50μM まではたしかに濃度依存的な花成抑制は観察されるものの、葉数の差は最大 2 枚程度であり、このことはほとんど花成が抑制されていないことを示すものであった。

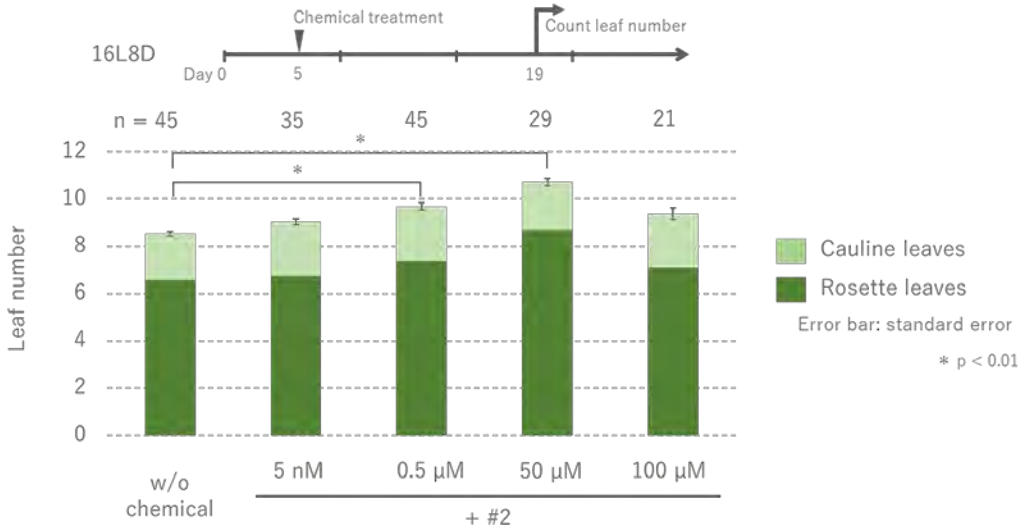

図 5　スルファニルアミドは *FT* の発現量変化からは予想できないほど花成を抑制しない

この原因を明らかにするため、申請者は次にスルファニルアミドを添加した後の FT 発現量のタイムコースを追った。その結果、図 6 に示すように、スルファニルアミド（＃2）の投与は最初の一週間ほどは非常によく *FT* 発現を抑制するものの、16 日目を過ぎたあたりから *FT* 発現量はスルファニルアミドを投与していても誘導さ

れていることが明らかとなった。こうした状況においても化合物を投与していない場合に比べると *FT* の発現は十分に抑制されているものの、図 5 の花成時期の結果からは、この程度の上昇でも十分に花成が誘導されるということが推測された。

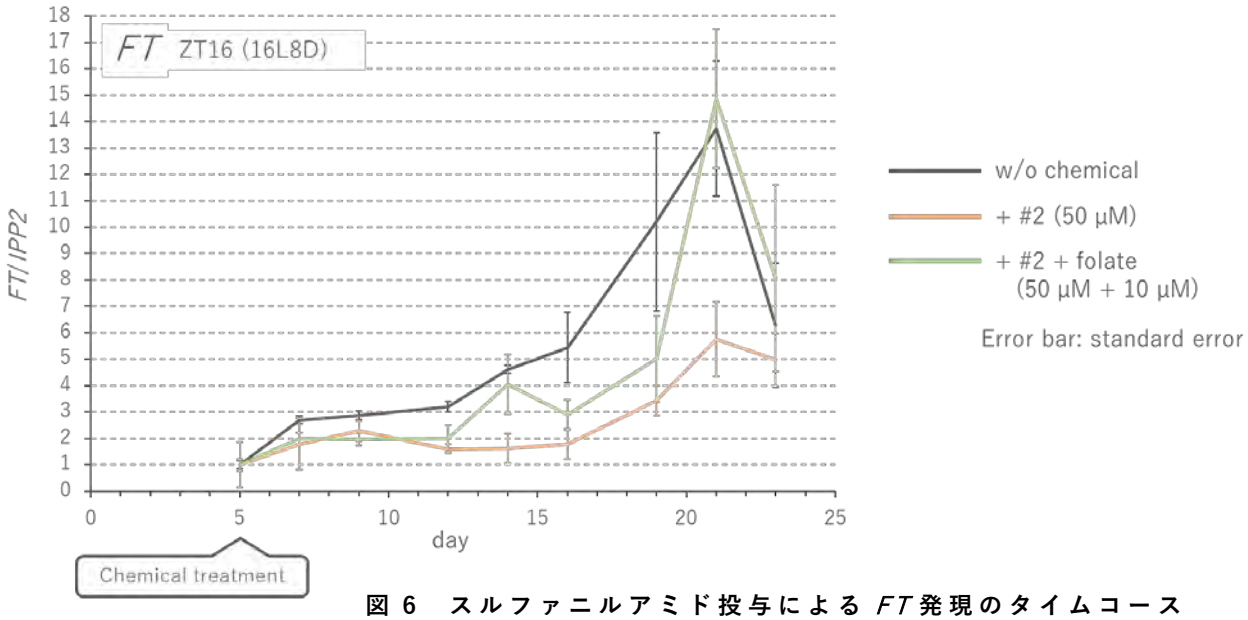

図 6　スルファニルアミド投与による *FT* 発現のタイムコース

また、スルファニルアミドは葉酸（folate）の生合成阻害剤であることから、両者を同時投与することで *FT* 発現が完全に回復したことからも、未知の葉酸を介した花成制御メカニズムの存在が示唆された。そこで、スルファニルアミドをさまざまな濃度で投与した群と投与なしの群において RNA-seq 解析を行い、スルファニルアミドの濃度依存的に発現が変化する遺伝子を網羅的に解析した。その結果、幼若期でのみ *FT* 遺伝子発現を抑制する *TEM* 遺伝子の発現がスルファニルアミドの濃度依存的に変化していることが見いだされた。

本助成に関わる成果物

［論文発表］

Endo M, Yoshida M, Sasaki Y, Negishi K, Horikawa K, Daimon Y, Kurotani KI, Notaguchi M, Abe M, *Araki T (2018) Reevaluation of florigen transport kinetics with separation of function mutations that uncouple flowering initiation and long-distance transport. ***Plant Cell Physiol.*** 59(8), 1621-1629.

［口頭発表］

概日時計を介した季節認識機構の制御
廣畑 敦洋，山蔦 祐太，荒木 崇，遠藤 求
第 26 回日本時間生物学会学術大会、金沢、2019 年 10 月 12 日

概日時計の調節による季節認識メカニズムの制御
廣畑 敦洋，山蔦 祐太，荒木 崇，遠藤 求
第 60 回日本植物生理学会年会、名古屋、2019 年 3 月 13 日