

形質転換植物デザイン研究拠点

成果報告会

令和7年度

日時：令和8年 3月6日(金)

場所：筑波大学総合研究A棟 110室(公開講義室)

主催



つくば機能植物イノベーション研究センター
Tsukuba-Plant Innovation Research Center



筑波大学つくば機能植物イノベーション研究センター
形質転換植物デザイン研究拠点

筑波大学つくば機能植物イノベーション研究センター
形質転換植物デザイン研究拠点

令和7年度 成果報告会

日時：令和8年3月6日

場所：筑波大学総合研究A棟 110室（公開講義室）

13:00-13:05	開会あいさつ 福田 直也【T-PIRCセンター長】
セッション1	座長 壽崎 拓哉
13:05-13:25	農業管理の転換がコーヒー根圏-果実間微生物動態に及ぼす影響 市橋 泰範【理化学研究所 環境資源科学研究センター】
13:25-13:45	窒素固定クレードにおける根粒共生の鍵転写因子の機能解析 壽崎 拓哉【筑波大学 つくば機能植物イノベーション研究センター】
13:45-14:05	根粒における空間的な遺伝子発現パターンの網羅的理解 伊藤 義晃【株式会社生物技研・解析部】
14:05-14:20	休憩
セッション2	座長 野中 聡子
14:20-14:40	高速型キメラミオシンXIの異種発現がトマトの 原形質流動と植物成長に与える影響 小原 惇【早稲田大学大学院・先進理工学研究科】 (富永 基樹【早稲田大学・教育・総合科学学術院】)
14:40-15:00	配偶子融合因子遺伝子のゲノム編集による種なしメロンの作出 井川 智子【千葉大学大学院・園芸学研究院】
15:00-15:20	トマト近縁野生種由来のSIKLP遺伝子の過剰発現による 果実サイズ制御機構の解明 池田 裕樹【宇都宮大学農学部】
15:20-15:40	シダ植物スギナにおける形質転換法の確立 加藤 大貴【愛媛大学・大学院理工学研究科】
15:40-15:55	休憩
セッション3	座長 福田 直也
15:55-16:15	人工キメラ酵素 Lac-CBD 導入形質転換ポプラの易酵素糖化性評価 小口 太一【筑波大学 つくば機能植物イノベーション研究センター】
16:15-16:35	トマトを利用した「非典型的」ストリゴラクトンの機能解析 瀬戸 義哉【明治大学農学部】
16:35-16:55	Possible roles of Micro-Tom genes for circadian clock, photoperiodic regulations, and ascorbate biosynthesis in tolerance to continuous light 溝口 剛【国際基督教大学】
16:55-17:00	閉会のあいさつ 柴 博史【T-PIRC副センター長】

農業管理の転換がコーヒー根圏-果実間微生物動態に及ぼす影響

Le Thi Mai Cham¹†、藤原 風輝²†、Nguyen Thanh Tai¹、Dinh Anh Hoa¹、
柴 博史^{3,4}、坪 充⁵、渡邊 和男^{3,4}、市橋 泰範²

¹Division of Microbial Technology, Biotechnology Center of Ho Chi Minh City、²理化学研究所環境資源科学研究センター、³筑波大学生命環境系、⁴筑波大学つくば機能植物イノベーション研究センター、⁵鳥取大学乾燥地研究センター

†本研究に同等に貢献

コーヒー (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner, Robusta 種) は世界的に重要な換金作物であり、近年では化学肥料や農薬に依存した慣行農業から、有機農業や再生型農業への転換が進みつつある。こうした農業管理の変化は、土壤環境のみならず、植物体に関連する微生物群集を通じて作物の生育や品質にも影響を及ぼすと考えられるが、地下部の根圏と地上部の果実という異なる植物内のコンパートメント間における微生物動態については、依然として理解が十分ではない。

本研究では、慣行栽培 (InOr)、有機移行期 (TranOr)、および有機栽培 (Or) という異なる土壤管理条件下で栽培された Robusta コーヒーを対象に、根圏土壌および果実の細菌群集構造を 16S rRNA 遺伝子シーケンスにより解析した。さらに、相対的存在量解析、機能予測、ならびにソーストラッキング解析 (FEAST) を組み合わせることで、農業管理が微生物群集の組成および由来に及ぼす影響を統合的に評価した。

その結果、農業管理形態の違いにより、根圏および果実の微生物群集構造と機能的ポテンシャルが大きく変化することが明らかとなった。特に、微生物群集構造の変化は、慣行栽培から有機移行期への移行よりも、有機移行期から完全有機栽培への移行段階において最も顕著であり、農業管理の転換が根圏および果実の両方の微生物動態を大きく再編成することが明らかとなった。慣行栽培圃場では *Nitrosomonadaceae* や *Cupriavidus* に代表される硝化細菌やストレス耐性菌が多く検出された一方、有機栽培圃場では *Ktedonobacteria*、*Pantoea*、*Actinomycetospora* など、有機物分解に関与すると考えられる分類群が優占していた。また根圏は果実に比べて一貫して高い微生物多様性を示したが、微生物群集の差異は果実においてより顕著に現れた。

さらに根圏と果実微生物叢の関係性を詳細に解析した結果、いずれの栽培形態においても、根圏と果実の間で約 30% の細菌分類群が共通して存在していた (図 a)。これらの共有分類群には、*Lactobacillus plantarum* や *Leuconostoc mesenteroides* といった乳酸菌、ならびに *Kozakia baliensis* や *Gluconobacter* などの酢酸菌が含まれており、コーヒー果実の発酵や品質形成に関与する微生物が、根圏を起源として果実へ移行している可能性が示唆された。またソーストラッキング解析の結果、果実微生物群集の 75% 以上が根圏由来であることが示された (図 b)。一方、有機栽培条件下では根圏

からの寄与率が有意に低下し、未知由来の割合が増加した（図c）。これは、農業管理の違いが、微生物の単なる組成変化にとどまらず、果実微生物叢の形成プロセスや選択圧そのものを変化させることを示している。

本研究は、根圏を果実微生物叢の主要なリザーバーとして位置づけるとともに、有機農業への移行が植物内のコンパートメントを越えた微生物ダイナミクスを大きく再構築することを示した。これらの知見は、土壌管理と微生物生態系を基盤としたコーヒー品質制御および持続可能な農業体系の設計に向けた重要な科学的基盤を提供するものである。

2025年度においても、ベトナム現地研究者を中心に日本人研究者も現地に赴き、複数圃場において追加のサンプリングを実施した。今後、2026年度には複数地域から収集したサンプルを対象に、地域差を考慮した包括的な解析を進める予定である。さらに、本研究の過程で、果実発酵を通じて品質向上が確認された現場事例を見出したことから、今後は微生物群集と発酵プロセス、ならびに品質特性との関係を解明する研究へと展開していく計画である。

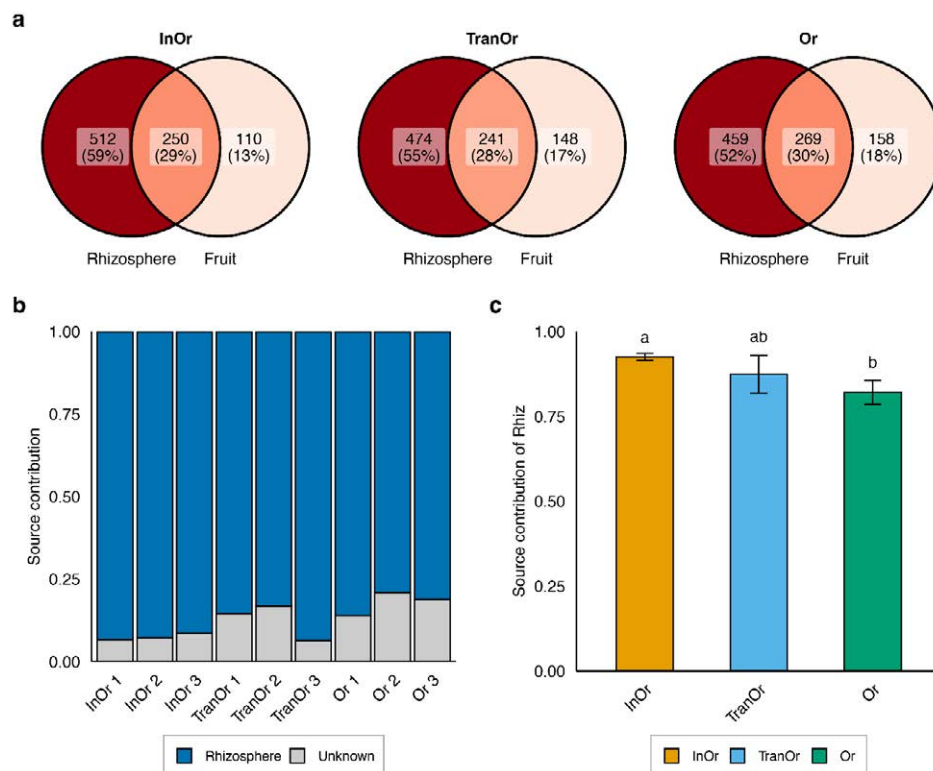


図 異なる農業管理条件下における根圏および果実微生物叢の重なりと由来解析：(a) 慣行栽培 (InOr)、有機移行期 (TranOr)、および有機栽培 (Or) 条件下における根圏および果実微生物叢のベン図。各数値は、それぞれのコンパートメントに特異的または共通して検出された細菌分類群数を示し、括弧内の値は各管理条件における全分類群数に対する割合を示す。(b) FEAST 解析によって推定された果実微生物叢の由来割合。青色は根圏由来、灰色は未知由来を示す。(c) 各農業管理条件下における果実微生物叢に対する根圏由来の平均寄与率。エラーバーは標準誤差を示す。異なるアルファベットは、Tukey の HSD 検定により有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

窒素固定クレードにおける根粒共生の鍵転写因子の機能解析

野田 桃菜¹、伊藤 百代²、宮田 佳奈³、壽崎 拓哉^{2,4}

¹筑波大学生物学学位プログラム、²筑波大学生命環境系、³東洋大学生命科学部生物資源学科、

⁴筑波大学つくば機能植物イノベーション研究センター

根粒共生は、被子植物の一部が窒素固定細菌と形成する共生関係であり、植物は光合成産物を供給する代わりに、細菌から大気中から固定された窒素栄養を得る。根粒共生の基盤となる分子機構は、これまで主にマメ目に属する植物で研究されてきたが、根粒共生の制御機構が、マメ目、バラ目、ブナ目、ウリ目を含む単系統群である窒素固定クレード（図1）全体にどの程度広く保存されているのかは、明らかになっていない。根粒共生には転写因子 NODULE INCEPTION (NIN) が必須であり、特にマメ目では、*NIN* 遺伝子の喪失が根粒共生能力の消失と強く相関することが知られている。しかし、窒素固定クレード全体において、この関係が成り立つのかは明らかになっていない。本研究では、窒素固定クレードの一群であるブナ目に着目し、根粒共生能をもつ種ともしない種の双方における NIN の存在、制御機構、機能を包括的に解析した。

系統解析の結果、調査したすべてのブナ目植物において、根粒共生を行わない系統を含め *NIN* オルソログが保持されていることが明らかとなった。これは、根粒共生を失ったマメ目植物が *NIN* 自体を失っていることと対照的であり、ブナ目では根粒共生能の消失後も *NIN* 遺伝子が保存されてきたことを示唆している。また、多くの種で、*NIN* の遺伝子発現誘導に必要な CYCLOPS 転写因子の結合配列に相当する配列がプロモーター領域に保存されており、特にブナ科や一部のカバノキ科の非根粒共生種でも確認された。一方で、クルミ科などではこの配列が失われており、同じ非根粒共生種の中でも調節配列の保存状態には系統差が存在することが示された。さらに、マメ科で知られる CE 領域と完全に相同な配列は検出されなかったものの、サイトカイニン応答因子や AP2 型転写因子の結合配列を含む保存領域が同定され、ブナ目においても *NIN* 遺伝子の発現を制御しうる CE 様要素が存在する可能性が示唆された。

NIN は本来、硝酸応答に関与する NIN-LIKE PROTEIN (NLP) 転写因子ファミリーに属するが、マメ科 *NIN* では硝酸応答ドメインが大きく変異し、硝酸応答性を失っていることが知られている。アミノ酸配列の比較から、ブナ目 *NIN* はマメ科 *NIN* ほど硝酸応答ドメインが変異しておらず、硝酸応答性を保

持っている可能性が示された。しかし、機能解析の結果、ブナ目 NIN は硝酸存在下でも硝酸応答遺伝子を活性化せず、根粒共生関連遺伝子のみを活性化することが明らかとなった。すなわち、配列上は NLP 様の特徴を残しながらも、機能的にはマメ科 NIN と同様に硝酸非依存的に働くことが示された。

さらに、機能的保存性を検証するため、ブナ目の根粒共生種であるモクマオウおよび非根粒共生種であるセイヨウハシバミ（ヘーゼルナッツ）由来の NIN を、モデルマメ科植物ミヤコグサに導入した。その結果、これらの NIN はいずれも根粒共生関連遺伝子の発現を誘導し、*nin* 変異体における根粒形成不全を完全に相補した。形成された根粒では感染糸の形成や根粒内への共生菌の侵入が確認され、窒素固定活性を有することが示唆された。このことから、非根粒共生のブナ目植物の NIN であっても、根粒共生制御に必要な分子機能を完全に保持していることが明らかとなった。

これらの結果は、ブナ目における根粒共生能力の喪失が、*NIN* 遺伝子そのものの欠失や機能喪失によるものではないことを示している。また、根粒共生を行わない植物においても NIN が強く保存されている事実は、NIN が根粒共生以外の未解明な生理機能を担っている可能性を示唆している。総合すると、本研究は、NIN が窒素固定クレード全体で深く保存された根粒共生制御因子であること、そしてブナ目における根粒共生喪失が NIN 以外の要因によるものであることを明確に示した。これは、根粒共生の進化を「NIN の獲得と喪失」という単純な枠組みで理解することの限界を示すものであり、NIN を中心としつつも、より広範な遺伝子ネットワークとその進化的変化に目を向ける必要性を浮き彫りにしている（論文投稿中）。

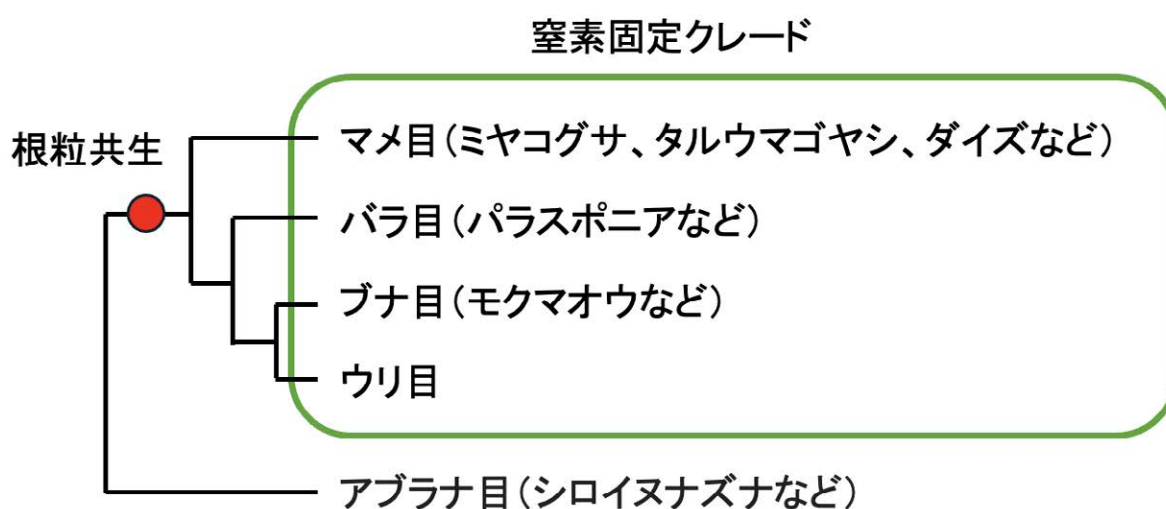


図. 窒素固定クレード

根粒における空間的な遺伝子発現パターンの網羅的理解

伊藤 義晃¹、伊藤 百代²、半田 佳宏¹、壽崎 拓哉^{2,3}

¹株式会社生物技研 解析部、²筑波大学・生命環境系、

³筑波大学・つくば機能植物イノベーション研究センター

マメ科植物は窒素固定細菌の根粒菌と根粒共生と呼ばれる共生関係を築いている。共生器官の根粒の内部には根粒菌が共生する感染細胞の他に非感染細胞、栄養の通り道である維管束など性質や機能が特徴化した複数種の細胞群や組織が存在する。これまでの研究により、根粒共生過程において発現する宿主植物、根粒菌双方の遺伝子が多数同定されており、それらの機能解明により根粒共生のメカニズムの理解が進んでいる。その一方で、根や根粒全体のバルクサンプルを用いた従来のトランスクリプトーム解析では特に空間的な遺伝子発現パターンの情報が欠如しており、上述の特徴的な根粒細胞や組織における詳細な遺伝子発現パターンの理解には至っていない。

本研究は細胞や組織の性質や機能の区分化が明瞭な根粒を用いて空間トランスクリプトームの解析手法を確立し、根粒形成関連遺伝子の発現パターンの詳細を明らかにすることを目的とする。筑波大グループがミヤコグサの野生型や変異体の根粒切片を作成し、生物技研グループはライブラリ作製およびシーケンス(Stereo-seq)、データ解析を担当する。根粒内には二者（植物および根粒菌）の mRNA が共存している点に着目し、植物の遺伝子発現パターンだけでなく、根粒菌の遺伝子発現パターンも解析することを計画している。

筑波大グループが作成したミヤコグサの野生型根粒の FFPE 切片を生物技研グループで脱パラフィンした。その後、カルコフロールホワイトで細胞壁を染色し、Leica DM6B (接眼レンズ x10、対物レンズ x10)で1センチ四方の画像を取得した。取得した画像はLASX (Leica)を用い、画像連結した(図1)。連結画像を画像診断プログラム StereoMap へ取り込み、Tools 機能を用いて ImageQC のスコアを確認し、70 (根粒菌感染 5 日目)と 83 (根粒菌感染 11 日目)で、空間トランスクリプトームのための画像品質に問題ないことを確認した。Stereo-seq Transcriptomics FFPE Set (MGI Tech Co., Ltd.)を用いて、DNB patterned chip 上で細胞の透過化処理、ハイブリダイゼーションと逆転写反応等を実施し、cDNA を合成した。chip 上から回収された cDNA は PCR 増幅とバーコード配列を付加して、ライブラリを作製した。

その品質は、バイオアナライザー(Agilent Technologies)を使用して確認し、正常なライブラリー分布を示していた。今後、DNBSEQ-T7RS Stereo-seq Visualization Reagent Kit と DNBSEQ-T7 (MGI Tech Co., Ltd.)を使用してシーケンシングする予定である。データ解析は、SAW (Stereo-seq Analysis Workflow ver. 8.2.0)で実施する予定である。

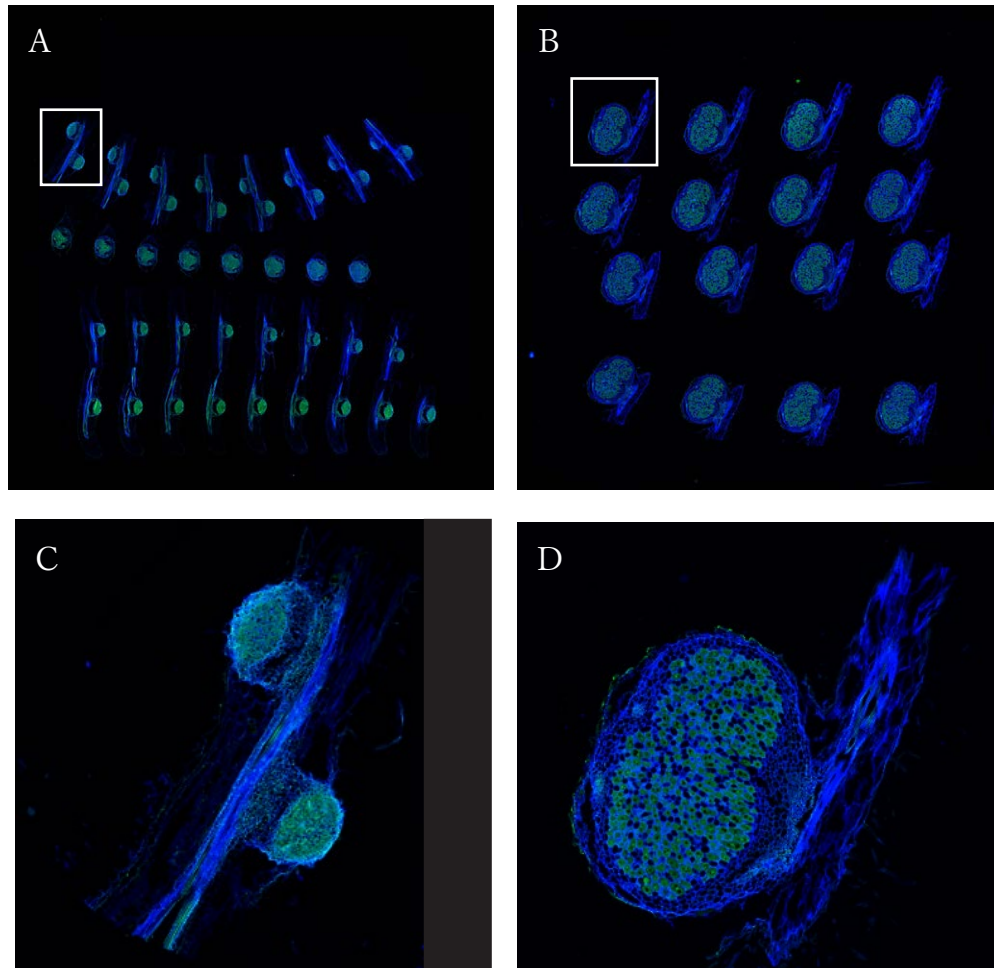


図 1. DNB patterned chip 上の根粒の蛍光写真

(A) 根粒菌感染 5 日目(1 cm x 1 cm)、(B) 根粒菌感染 11 日目(1 cm x 1 cm)、(C) (A)の白枠内の拡大図、(D) (B)の白枠内の拡大図。緑：自家蛍光(根粒菌)、青：カルコフロールホワイト(細胞壁)

高速型キメラミオシン XI の異種発現がトマトの

原形質流動と植物成長に与える影響

小原 惇¹、原口 武士²、伊藤 光二²、野中 聡子^{3,4}、富永 基樹^{1,5}

¹早稲田大学 先進理工学研究科、²千葉大学 理学院、

³筑波大学 T-PIRC、⁴筑波大学 生命環境系、⁵早稲田大学 教育・総合科学学術院

藻類から被子植物に至る様々な植物の細胞内では、原形質流動と呼ばれる活発な輸送がみられる。原形質流動は、細胞小器官に結合したモータータンパク質ミオシン XI がアクチン繊維上を滑り運動することによって発生している。我々は以前、生物界最速の原形質流動を発生するシャジクモミオシン XI を利用した人工的な高速型キメラミオシン XI を開発し、その発現によってシロイヌナズナやカメラリナといった植物の成長促進やサイズの大型化に成功した (Tominaga et al. 2013, Duan et al. 2020)。原形質流動は植物細胞内の基本的な輸送システムであることから、「ミオシン XI の高速化」技術は、様々な植物に適用可能なバイオマス増産技術になり得る。そこで本研究では、本高速化技術によるバイオマス増産研究を、ナス科のモデルであり農作物として重要なトマトへ展開する。高速型ミオシン XI 遺伝子を発現するトマト (Micro-Tom) を作出し、実験室レベルにおいて植物の成長や果実の収量性に関する評価を行うことを目的とする。

本課題に先立ち、カメラリナではシロイヌナズナ由来の高速型ミオシン XI 遺伝子の異種発現が植物の成長促進や種子の増産に有効であることが示されている (Duan et al. 2020)。本研究では、トマトにおいても同様のアプローチを行い、本高速化技術の適用を試みた。シロイヌナズナミオシン XI-2 の native プロモーター下流に GFP および高速型キメラミオシン XI 遺伝子を連結した発現コンストラクトを使用し、Micro-Tom 野生株への形質転換を行った。作出した組み換え体について、倍数性および分離比の確認を行い、最終的に 5 つの候補ライン (2 倍体、1 コピー想定) を得た。候補ラインでは、高速型キメラミオシン XI の運動を示す GFP の蛍光シグナルが観察され、導入遺伝子の発現が確認された。

続いて、候補ラインから T₂ ホモ系統を作出し、高速型キメラミオシン XI の発現がトマトの原形質流動に与える影響を評価した。暗所で 5 日間生育させた幼苗の胚軸組織について、明視野観察により原形質流動速度を定量したところ、組み換え体における流動速度の上昇が確認された。さらに、同条件下では、流動速度の上昇に伴って胚軸長も増加する傾向がみられ、本高速化技術がトマトにおいても植物の成長促進に寄与することが示唆された。

次に、作出した T₂ ホモ系統を明所条件で栽培し、植物サイズや果実の収量性に関する表現型を解析した。生育 30 日時点では、組み換え体で植物丈が増加する傾向がみられた一方、開花数、総花数、花序数に関しては明確な差は認められなかった。植物丈は生育 60 日時点でも増加が確認され、組み換え体における植物サイズの大型化が明らかになった。開花数および果実数については、生育 30 日から 80 日時点まで継続的な観察を行った (図 1)。その結果、興味深いことに、ある系統では開花数に顕著な増加はみられないにもかかわらず、果実数が野生株の倍近くに増加し、着果率の向上が示唆された。この系統では、果実サイズに有意な変化はみられず、果実数の増加に伴い果実の総重量も増大した。

以上の結果から、高速型キメラミオシン XI の発現がトマトの原形質流動を高速化し、植物サイズの増大、さらには着果率の向上に寄与する可能性が示された。現在、複数系統での再現性確認に向けて T₂ ホモ系統のライン数拡充に取り組んでおり、果実数増加を示す追加ラインが得られつつある。今後は、再現性の検証を進めるとともに、着果過程における作用メカニズムを解析し、本高速化技術のトマトにおける有効性を明らかにしていく。

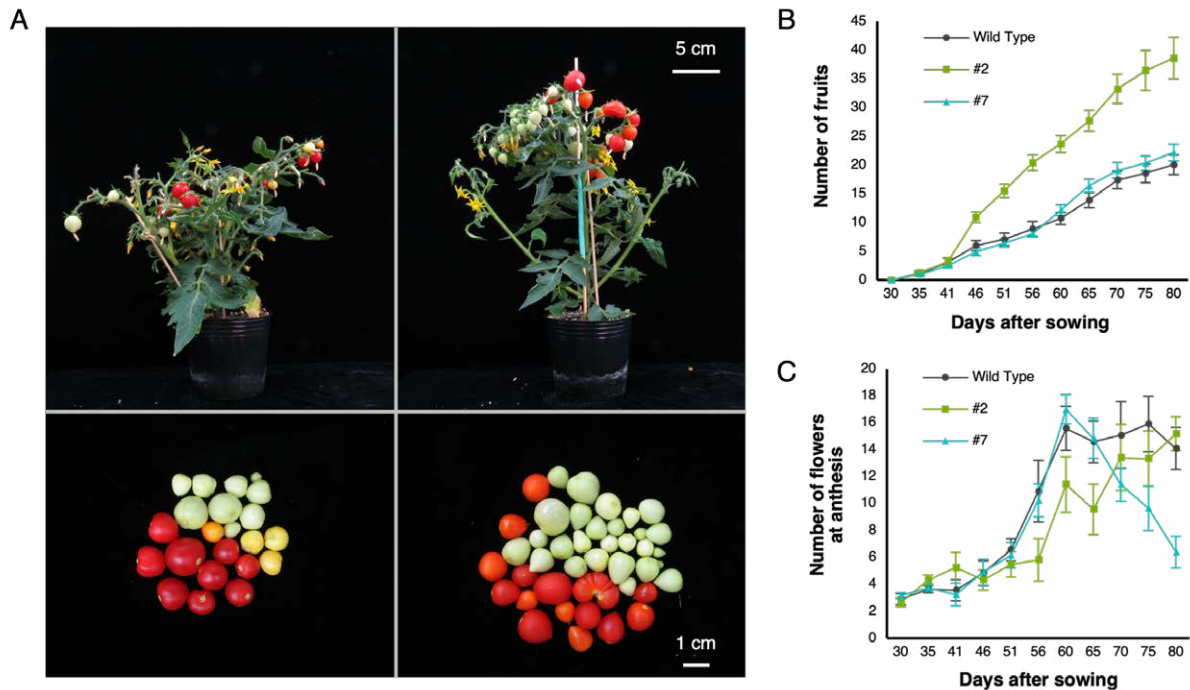


図 1. 高速型キメラミオシン XI 発現トマト (#2) における果実数の増加

(A) 生育 80 日時点の植物および果実の外観。 (B) 果実数の推移。 (C) 開花数の推移 (n=12)。

<引用文献>

Tominaga M., Kimura A., Yokota E., Haraguchi T., Shimmen T., Yamamoto K., Nakano A., and Ito K. (2013) *Dev. Cell* 27, 345-352

Duan Z., Ito K., and Tominaga M. (2020) *Plant Biotech.* 37, 253-259

配偶子融合因子遺伝子のゲノム編集による種なしメロンの作出

小山 翔平¹、Chin Dong Poh²、野中 聡子、井川 智子³

¹千葉大学大学院園芸学研究科、²千葉大学環境健康フィールド科学センター、³筑波大学 T-PIRC、

⁴千葉大学大学院園芸学研究院

被子植物は有性生殖において2種類の受精（精細胞と卵細胞及び精細胞と中央細胞間の配偶子融合）による重複受精を行い、種子を形成する。GENERATIVE CELL SPECIFIC 1（GCS1）は精細胞に特異的局在する膜タンパク質で、重複受精において雌性配偶子との原形質膜融合に関与する受精必須因子である（Mori et al. 2006; vonBessor et al. 2006）。GCS1は植物だけでなく無脊椎動物や原生生物にも保存されており、現在はウィルスが宿主に感染するための融合因子である Class II タンパク質との立体構造アナログであることも判明している（Fedry et al. 2017; Valansi et al. 2017）。GCS1 タンパク質は膜貫通領域を1つ有し、長いN末端領域が細胞外に配向し、膜融合機能を担う。近年スイカ（*Citrullus lanatus*）で *CIGCSI* を標的としたゲノム編集が行われ、種なしスイカを作出した研究例が報告された（Chen et al. 2024）。実際は肥大した果実内に不稔種子が形成される表現型となるが、食感として気にならないレベルとなる。さらに GCS1 細胞内領域を標的としたゲノム編集体では、ほぼ種なしの表現型ながら、2-3粒の種子形成もみられ、食しやすい表現型の獲得と同時に種子での系統維持の可能性を示した。同じウリ科に属するメロン（*Cucumis melo* L.）も受粉刺激によって果実（果皮）が発達・肥大する特徴を持つため、本研究ではメロンの *GCSI* オーソログ（*CmGCSI*）を標的としたゲノム編集を行い、生殖因子の編集操作によって食し易いメロンの作出を最終目標とした。本研究では、マスクメロンの標準固定品種‘アールスフェボリット春系3号’を研究対象に用いる。アグロバクテリウム（*Agrobacterium tumefaciens*）により CRISPR/Cas9 遺伝子群を導入し、ゲノム編集体を獲得するスキームを計画した。

遺伝子導入法は Parsa らの報告を主な参考とした（Parsa et al. 2023）。まずアグロバクテリウムによる遺伝子導入効率を確認するため、選抜マーカー用に *NPTII* 遺伝子、視覚マーカー用に *CpYGFP* 遺伝子（Chin et al. 2018）を含むバイナリーベクターを用いて評価した。完熟種子を表面殺菌して暗所で5日間培養後、8つの外植片に切り分け、アグロバクテリウムの菌液に20分浸漬して接種した。3日間の共存培養後、サイトカイニンとしてBA、オーキシンとしてIAAまたは2,4-D、cefotaxime及びカナマイシンを含む1/2MS培地（3%ショ糖+0.8%寒天）で培養した。共存培養後2〜5週間ではほぼ全ての外植片からカルス形成が安定して観察された。実験のロットや外植片によってばらつきを示したものの、培養4週間頃には、平均約1割の外植片でCpYGFPシグナルを示す細胞塊が得られた（図1）。

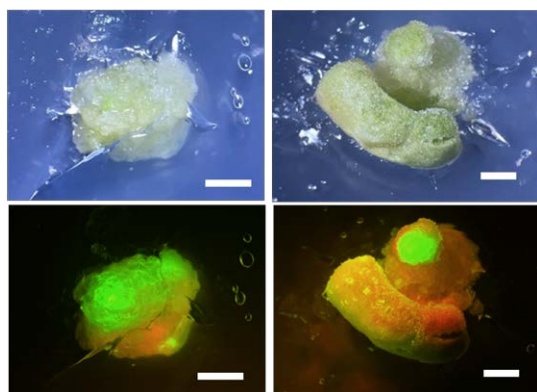


図1 CpYGFP シグナルを示す細胞塊

Bar = 2 mm

本方法で組換え細胞塊が得られることを確認したため、続いて *CmGCSI* を標的としたガイド RNA と *Cas9* 遺伝子及び *CpYGFP* 遺伝子を組み込んだバイナリーベクターを構築し、上記と同様の方法で導入した。その結果、*CpYGFP* シグナルを示す細胞塊が複数系統得られた。しかし、培養を続けても *CpYGFP* 発現細胞塊からはシュート分化が起きなかった。共存培養後から 6~8 週間目までに *CpYGFP* シグナルを示さないシュートの発生は起きたが、これらについて導入遺伝子の存在をゲノミック PCR で解析した結果、

エスケープの非形質転換体であることが確認された。今後、*CpYGFP* 発現を示す細胞塊での *CmGCSI* 変異について確認する。

現在までの実験において、組換え体カルスは複数系統得ることができるもののシュートの再分化に至らない、という課題を残している。エスケープのシュート分化は起きたことから、春系 3 号においては、脱分化した細胞の再分化能が急速に失われる可能性を示した。植物細胞の再分化能へのメチル化の影響が知られていることから、今後、脱分化細胞からの再分化におけるメチル化阻害剤の効果を検証する。また、当研究グループでは胚発生や形態形成に関与する転写因子を利用した、組換え細胞の自発的な脱分化・再分化誘導系の構築に成功している (Sato et al. 2024)。この系も追加利用し、最終的な組換え体獲得率を向上させ、*CmGCSI* ゲノム編集体の獲得を試みる。

【引用文献】

- Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, Kuroiwa T. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 64-67, doi.org/10.1038/ncb1345
- von Besser K, Frank AC, Johnson MA, Preuss D. *Development*, 2006, 133: 4761-4769. doi.org/10.1242/dev.02683
- Fédry J, Liu Y, Péhau-Arnaudet G, Pei J, Li W, Tortorici MA, Traincard F, Meola A, Bricogne G, Grishin NV, Snell WJ, Félix AR, Krey T. *Cell*, 2017, 168: 904-915. e910. doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.024
- Valansi C, Moi D, Leikina E, Matveev E, Graña M, Chernomordik LV, Romero H, Aguilar PS, Podbilewicz B. *J Cell Biol*, 2017, 21: 571-581. doi.org/10.1083/jcb.201610093
- Chen X, Li Y, Liu M, Ai G, Zhang X, Wang J, Tian S, Yuan L. 2024. *Nat Plants*, 2024, 10:1446–1452. doi.org/10.1038/s41477-024-01799-5
- Parsa HS, Sabet MS, Moieni A, Shojaeiyan A, Dogimont C, Boualem A, Bendahmane A. *Int J Mol Sci*, 2023, 24, 11189. doi.org/10.3390/ijms241311189
- Chin DP, Shiratori I, Shimizu A, Kato K, Mii M, Waga I. *Sci Rep*, 2018, 8:16556. doi.org/10.1038/s41598-018-34837-2
- Sato Y, Minamikawa MF, Pratama BB, Koyama S, Kojima M, Takebayashi Y, Sakakibara H, Igawa T. *Front Plant Sci*, 2024, 15:1308417. doi.org/10.3389/fpls.2024.1308417

トマト近縁野生種由来の *SIKLP* 遺伝子の過剰発現による

果実サイズ制御機構の解明

田部井 彩華¹、石黒 結唯^{1,2}・謝 肖男^{1,2}、野中 聡子³、池田 裕樹^{1,4}

¹宇都宮大学大学院地域創生科学研究科、²宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター

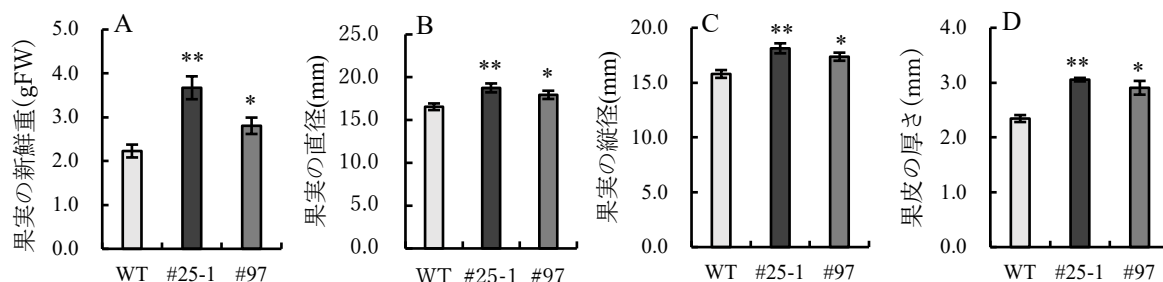
³筑波大学 T-PIRK、⁴宇都宮大学農学部

果実作物における果実サイズの向上は、園芸生産や育種における主要目標である。本研究グループではトマトを研究対象とし、現在市場に流通している栽培品種 (*Solanum lycopersicum*) よりも遺伝的多様性に富む近縁野生種 *Solanum pennellii* に着目し、*S. lycopersicum* ‘M82’ の第 12 染色体の約 0.18 Mbp の領域が、*S. pennellii* の染色体に置換された染色体断片置換系統 (IL12-1-1) を用いて研究を行ってきた。そして IL12-1-1 の第 12 染色体において、*S. pennellii* が導入されている領域に座乗する *SIKLP* 遺伝子が、果実サイズ増大に寄与している可能性を示している (Yada ら、2022)。そのため本研究では、*SIKLP* がトマトの果実サイズ増大に寄与することを逆遺伝学的に検証するとともに、*SIKLP* に起因する果実サイズ増大のメカニズムを解明することを目的とした。具体的には、*S. pennellii* 由来の *SIKLP* 遺伝子を *S. lycopersicum* ‘Micro-Tom’ において過剰発現させた形質転換体を作成して、その果実形質を評価した。また形質転換体の果実を用いて、果実発育に寄与する植物ホルモン濃度の測定を行うとともに、*SIKLP* のプロモーター領域の解析を行った。

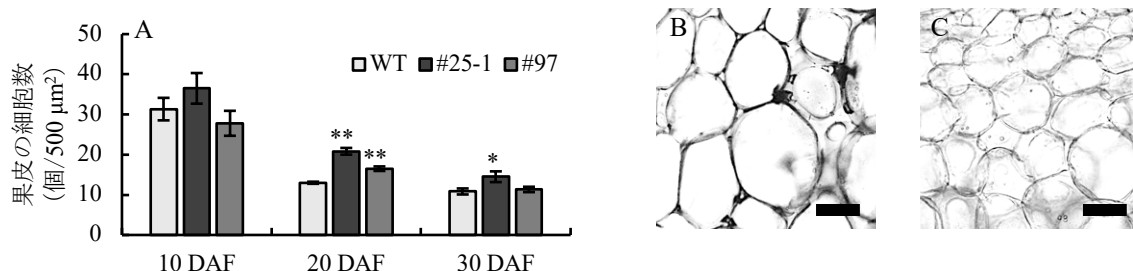
SIKLP を過剰発現させたトマトの形質転換体は、*S. pennellii* 由来の *SIKLP* 遺伝子を、CaMV35S プロモーターを有するバイナリーベクター (pBI-OX-GW) に導入し、アグロバクテリウム法により ‘Micro-Tom’ に形質転換した。なおアグロバクテリウムは、GV2260 を用いた。DNA マーカーで *SIKLP* 遺伝子が導入された T₀ 個体を選抜した後、自殖により T₁ 個体を作成した。その後、リアルタイム PCR で T₁ 個体の未成熟な果実 (開花後 15 日) の *SIKLP* 発現を確認し、高発現を示した 2 系統 (#25-1、#97) を、以後の実験に用いた。作出した形質転換体の果実形質については、成熟期の果実 (成熟果) における新鮮重、直径、縦径、果皮の厚さ、および開花後 10、20、30 日 (以後、DAF) の果実で赤道面の果皮細胞数を測定した。また果実発育に関する植物ホルモン (IAA、GA₁、GA₄、t-ZEA) の濃度を、超高速液体クロマトグラフ (Nexera X2、(株) 島津製作所) に接続したタンデム質量分析計 (LC-MS/MS; QTRAP 5500、AB Sciex) で測定し、同位体希釈による内部標準法により植物ホルモンを定量した。*SIKLP* のプロモーター領域の解析では、‘M82’ および IL12-1-1 のゲノム DNA の *SIKLP* の開始コドンから上流約 3.0 kbp の塩基配列について、サンガー法によるダイレクトシーケンスで決定した。得られた配列から、トマトの果実成熟に重要なシスエレメント (転写因子結合領域) を報告した先行研究に基づき、シスエレメントを探索した。

果実形質を調査した結果、形質転換体はいずれの項目においても WT よりも値が高かった (第 1

図)。また果皮の細胞数を測定した結果、形質転換体は 20 DAF で細胞数が増加しており（第 2 図）、この結果は IL12-1-1 における結果（Yada ら、2022）と一致していた。以上の結果から、*SIKLP* は果実発育初期に果皮の細胞分裂を促進し、果皮の厚さを増加させることで、果実サイズを増大させていることが明らかとなった。また植物ホルモン濃度を測定した結果、形質転換体は WT と比較して、10 DAF の果実で IAA と GA₄ 濃度が高い傾向が見られた。一方 GA₁ 濃度については、10、20 DAF とともに形質転換体と WT の間に明確な差は認められなかった。t-ZEA については、本条件では明確なピークを検出できなかった。*SIKLP* は、キネシンモータータンパク質をコードしている。シロイヌナズナでは、IAA や GA の処理により、キネシン関連遺伝子の発現が変動することが報告されている（Xing・Xue、2012）。トマトで同様の報告はないが、シロイヌナズナにおける知見より、トマトでも IAA や GA などが *SIKLP* 発現に影響する可能性が考えられる。一方、本研究において IAA と GA₄ の変化が 10 DAF で観察され、細胞数の差が 20 DAF 以降に顕在化したことから、植物ホルモン動態の変化が細胞数に影響した可能性も考えられた。そのため今後は植物ホルモンの外生処理や、植物ホルモンの合成・輸送に関わる遺伝子の発現解析により、*SIKLP* と植物ホルモン動態の因果関係を検証する必要がある。さらに‘M82’と IL12-1-1 (*S. pennellii*) の *SIKLP* のプロモーター領域からシスエレメントを探索した結果、トマトの転写因子である Solyc04g007000 と Solyc08g063040 が結合する領域が確認された。転写因子が結合する領域の塩基配列を、‘M82’と IL12-1-1 で比較したところ、Solyc08g063040 の結合領域では違いが見られなかったが、Solyc04g007000 の結合領域には、複数の一塩基多型 (SNP) や塩基の欠失が確認された。これらの結果から、IL12-1-1 では *SIKLP* のプロモーター領域にシスエレメントの変異が生じており、これにより *SIKLP* の発現が上昇し、果実サイズが増大したと考えられた。今後は当該プロモーター領域を標的としたゲノム編集により、本仮説の検証を進めていく。



第 1 図 WT と形質転換体 (#25-1、#97) の果実における (A) 新鮮重、(B) 直径、(C) 縦径、(D) 果皮の厚さ
*は 5%水準、**は 1%水準の t 検定で、WT と形質転換体間に有意差あり。



第 2 図 WT と形質転換体 (#25-1、#97) の果皮の細胞数
(A) 果実発育ステージ別の細胞数、(B) WT の果皮 (20 DAF)、(C) #25-1 の果皮 (20 DAF)。
*は 5%水準、**は 1%水準の t 検定で WT と形質転換体間に有意差あり。スケールバーは 100 μm。

シダ植物スギナにおける形質転換法の確立

加藤 大貴¹、内田 智尋¹、野中 聡子²

¹愛媛大学 大学院理工学研究科、²筑波大学 T-PIRC

シダ植物のスギナは生殖枝であるツクシが春の風物詩として親しまれ、食材や生薬として利用されている。一方で一度畑地に侵入を許すと根絶することが難しい雑草として農業被害をもたらし、春播きタマネギの収量を最大4割低下させるという報告もある^[1]。またスギナを含むトクサ属は石炭期に栄えた近縁種からの形態的变化の少なさから生きた化石とも呼ばれ、進化発生生物学にとっても重要な研究対象である。シダ植物ではリチャードミズワラビが実験モデルとしてよく用いられ、形質転換法も報告されているが^[2]、被子植物やコケ植物と比べるとシダ植物の発生についての遺伝子レベルでの研究は進んでいない。我々は近年、進化発生生物学的観点からスギナに着目し、新たな実験モデルとして利用するための手法開発に取り組んできた。その成果として、スギナ栄養茎断片からの無菌的なクローン増殖法と、オーキシン処理によるカルス誘導法を確立した（未発表データ）。本研究ではこれらの技術をベースにアグロバクテリウム法を用いた形質転換技術の開発に取り組んだ。

これまでの成果により表面滅菌したスギナ栄養茎をオーキシン含有培地で生育することで、節から発芽した茎からカルス様組織が誘導できることがわかっていた（Fig. 1A）。しかし、培養期間が長くなるにつれて成長率が低下し、褐変しやすくなる傾向が見られていた。そこでまず、形質転換に用いるスギナカルスの誘導期間の検討を行った。カルス誘導後7週間ごとに2回植え替えを行い、成長率を比較した。その結果、栄養茎から誘導した植え継ぎなしのカルスが最も生育が良かった（Fig. 1B, C）。

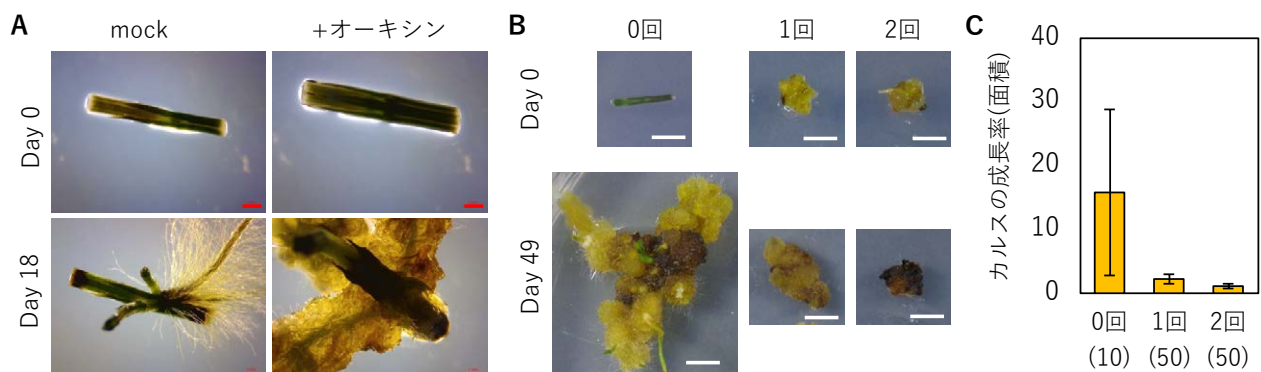


Fig. 1. カルス誘導期間の検討.

(A) 表面滅菌した栄養茎をmockまたはオーキシン含有培地で18日間生育した。Bars = 1 mm. (B) 栄養茎をオーキシン含有培地で生育し、49日ごとにカルス断片を植え継ぎした。Bars = 5 mm. (C) Bの写真から定量したカルス面積を用いて成長率を算出。括弧の中は測定に用いたサンプル数。Error bar = SD.

人工キメラ酵素 Lac-CBD 導入形質転換ポプラの易酵素糖化性評価

小口 太一^{1,2}、園木 和典³

¹筑波大学生命環境系、²筑波大学 T-PIRC、³弘前大学農学生命科学部

気候変動の緩和に向け、地球大気中の二酸化炭素循環の改善は喫緊の課題であり、再生可能な炭素固定資源の高度利用が求められている。植物は光合成により大気中の二酸化炭素を固定する能力を有しており、特に木本植物は固定した炭素を木質として長期間貯蔵可能である点で重要な役割を担う。さらに、木質バイオマスを化石資源の代替として利活用できれば、カーボンニュートラル社会の実現に資する持続的資源として大きな期待が寄せられている。一方で、木質バイオマスの主要構成成分であるリグニンは高い化学的安定性を有するため、セルロース画分の酵素糖化利用に際しては脱リグニンを目的とした前処理が不可欠である。この前処理工程に係るコストは、経済的、炭素収支的および環境負荷等の多くの面で大きな課題となっており、前処理依存からの脱却が求められている。一方で、リグニン含量の大幅な低減は植物の生育や力学的強度に深刻な影響を及ぼす可能性がある。本研究では、リグニンの部分的分解および構造変化を誘導することを目的とした、カワラタケ由来のリグニン分解酵素ラッカーゼ (Lac) と微生物由来のセルロース結合ドメイン (CBD) を融合したキメララッカーゼ (Lac-CBD) による新たな木質改変のアプローチを検討してきた。

先行研究では、モデル植物シロイヌナズナを用いて Lac-CBD による木質改変の有効性を検証した。Lac-CBD 導入形質転換シロイヌナズナは、非形質転換体と比較し、生育や草型には顕著な違いを示さないが、リグニン除去処理なしの花茎粉碎物の酵素糖化性において有意な向上が確認された (Iiyoshi *et al.*, 2017)。そこで本研究では、木本植物における Lac-CBD の効果の検証へと発展させた。

本研究では、形質転換が比較的容易な木本植物モデルであるポプラ (*Populus tremula* × *P. tremuloides*, T89 株) を植物材料とした。ポプラにアグロバクテリウム媒介法を用いて Lac-CBD 発現カセットを含む T-DNA を導入し、独立した 3 系統の形質転換体 (L1、L2、L3) を作出した。このうち L2 系統は導入遺伝子の発現が低かったことから、以降の解析には主に L1 および L3 の 2 系統を用いた。

まず、実験室条件 (25°C、16 時間明期/8 時間暗期) で生育した形質転換体を用いた評価を行った。生育及び草型は、Lac-CBD 導入形質転換ポプラと非形質転換体の間で顕著な違いを示さなかった。

約1か月栽培したのち、植物体の茎を採取し、脱リグニン処理を行わない条件下での酵素糖化性を比較したが、*Lac-CBD*導入形質転換ポプラと非形質転換体の間に明確な差は認められなかった。酵素糖化性に明確な違いが観察できなかった原因として、供試材料の二次木部の発達が不十分であった可能性が考えられた。

そこで二次木部形成がより発達した供試材料を得るため、特定網室での栽培試験を実施した。鉢上げ後の植物材料を、筑波大学つくば機能植物イノベーション研究センター遺伝子研究部門の特定網室で2023年3月から2024年11月の落葉期までの約8か月間試験栽培を行った。*Lac-CBD*導入形質転換ポプラは栽培期間を通じて非組換え体と比較して顕著な草型異常を示さなかったが、栽培終了時の樹高はL1系統のみ非組換え体と比較してやや低かった。また、力学的特性の評価においても、*Lac-CBD*導入形質転換ポプラに有意な強度低下は認められなかった。一方、植物体由来の茎を用いて酵素糖化性を評価した結果、*Lac-CBD*導入形質転換ポプラにおいて、非組換え体と比較して脱リグニン処理なしでの酵素糖化性が有意に向上していた。さらに、同材料を用いた細胞壁成分分析の結果、*Lac-CBD*導入形質転換ポプラでは、リグニン含量のわずかな減少と非結晶性セルロース成分の増加が観察された。

以上の結果から、*Lac-CBD*の発現はリグノセルロース構成に変化を与え、その変化が脱リグニン処理不要な易酵素糖化性の向上に寄与することが示唆された。本研究は、易酵素糖化性という機能を志向したポプラの分子レベルでの木質デザインの有効性を示すものである。現在、成熟木材を用いた検証を進めるため、*Lac-CBD*導入形質転換ポプラの特定網室環境下での複数年栽培に取り組んでいる。

(参考文献)

Iiyoshi, R., Oguchi, T., Furukawa, T., Iimura, Y., Ito, Y., Sonoki, T. (2017) Expression of a fungal laccase fused with a bacterial cellulose-binding module improves the enzymatic saccharification efficiency of lignocellulose biomass in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Transgenic Research **26**: 753-761

トマトを用いた非典型的ストリゴラクトンの機能解析

瀬戸 義哉¹、加藤 優佑¹、藤田 りさ¹、杉本 貢一²、江面 浩²

¹明治大学農学部、²筑波大学生命環境系

ストリゴラクトン (SL) は、植物の地上部枝分かれを制御するホルモン分子として機能するとともに、根から分泌されて、アーバスキュラー菌根菌との共生を促進するシグナル分子としても機能する。一方、アフリカなどの地域で甚大な農業被害をもたらしている根寄生雑草は、SL を認識することで発芽する、という独自の発芽システムを有している。

SL の植物ホルモン機能が発見されて以降、本分野の研究は急速に進展し、それまで未解明であった SL の生合成に関しても、その全容が明らかとなりつつある。特に、カギとなる生合成中間体であるカーラクトン (CL) の発見が、その下流の経路の解明にも大きく貢献してきた。CL は、それまで天然から見出されていた SL と比較して、B、C 環を有さないという構造上の特徴を有している (図 1)。CL の発見以降、同様に、B、C 環を持たないタイプの SL 類が続々と天然から見出されてきており、それまで良く知られていた A、B、C、D、4 つの環を有するタイプの SL を「典型的」な SL、それに対し、4 環構造を有さないタイプの SL 類を「非典型的」な SL と区別するようになった。このように、SL の化学構造は従来考えられていたよりも多様性に富むことが明らかになってきているものの、上記のような多様な生理作用において、こういったタイプの SL 分子が真の意味での活性型分子として機能しているのかは明らかになっていない。上記の CL は、植物内で、シトクロム 450 酵素である CYP711A によって、カーラクトン酸 (CLA) へと代謝される (図 1)。CL と CLA は、いずれも、典型的、非典型的な SL の両方の経路の共通の中間体でありホルモン活性を有さないが、CLA がメチルエステル化された分子である MeCLA は、部分的に植物ホルモンとしての活性を有することが明らかになっている。さらに、その化学構造から、非典型的な SL 生合成における起点となる分子と考えられる (図 1)。また、トマトにおいて、CLA は CYP722C による 18 位オキシ化と、続く SRF による立体特異的な環化反応により、典型的な SL の一種である orobanchol へと代謝されることも明らかになっている (図 1)。すなわち、トマトにおいては、CLA を起点に、異なる SL 類の生合成経路が二つに分岐すると考えられる。本研究では、特に、近年新たに見出されてきた非典型的な SL 分子の生理的な役割を明らかにするために、CLA

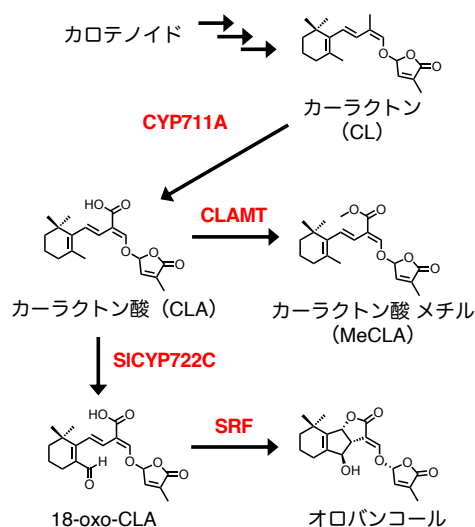


図1. トマトにおけるSL類生合成経路

のメチル化を触媒するカーラクトン酸メチル化酵素 (CLA methyltransferase; CLAMT) に着目し、トマトにおける本遺伝子の同定とその機能解析を行うことを目的とした。

我々は、シロイヌナズナにおいて、既に CLAMT 酵素遺伝子の同定に成功していることから (Mashiguchi, Seto, Onozuka et al, *PNAS*, 2022)、シロイヌナズナの CLAMT の配列をもとに、BLAST 検索を行ったところ、トマトにおいて、相同性の高い遺伝子を見出すことができた。そこで、本遺伝子を、トマトの *CLAMT* 候補遺伝子として、生化学機能解析を行うとともに、ゲノム編集により本遺伝子を欠損させたノックアウト株の作出を試みることにした。生化学機能解析の結果、候補遺伝子産物は予想通りに、CLA のメチル化反応を触媒することが明らかになった。さらに、本共同研究を通じて、トマトの *CLAMT* にフレームシフトを伴う欠損を有するラインをゲノム編集により作出した。それらの表現型を解析したところ、野生型と比べて枝分かれが過剰に増加することが明らかになった。また、興味深いことに、トマトの *clamt* 変異体においては、根においては、野生型とほぼ同レベルで、orobanchol などの SL 類を生合成していることも明らかになった。一方で、SL 受容体である D14 のトマトにおけるオルソログの欠損変異体の地上部において、CLA がメチル化され、さらに水酸化されたと思われる化合物が蓄積していることを確認した (OH-MeCLA)。かつ、この化合物は、*clamt* ノックアウト変異体では完全に消失していたことから、CLAMT を介して生合成される分子であること、さらに、本分子が枝分かれ制御経路において重要な役割を担っている可能性が示唆された。上記のとおり、トマトにおいて、CLA 以降、CYP722C と CLAMT を介する二つの経路に分岐するが、*CYP722C* のノックアウト変異体においては、枝分かれが増えないことが報告されている。上記の *clamt* 変異体で見られた表現型も考慮すると、トマトにおいては、CLAMT を介して地上部の枝分かれを制御するホルモン分子が合成され、CYP722C を介して地下部において根圏シグナルとして機能する SL 類が生合成されることが明らかになった。すなわち、少なくともトマトにおいては、多様な SL 化学種の中でも、ホルモン分子、根圏シグナルとして働く分子の間に明確な使い分けがあることが明らかになった。

続いて、SL 類の生合成は、リンなどの必須栄養素が不足した時に顕著に誘導されることが明らかになっているため、検出された SL 類の栄養欠乏応答性について調査した。過去の報告と同様に、上記の orobanchol などの地下部で生合成される SL 類に関しては、栄養を含まない水耕液に移行後に、その生合成が顕著に誘導されることが確認された。一方で、上記の地上部から検出された OH-MeCLA に関しては栄養欠乏条件によってその内生量に変化が見られなかった。また、SL 受容体である D14 のパラログである KAI2 は、リガンド未知の受容体であるが、本経路の下流で、SL の生合成が制御されることが報告されている。そこで、KAI2 経路のアゴニストをトマトに投与する実験を行ったところ、アゴニスト投与後に、根から分泌される SL 類の顕著な増加がみられた一方で、地上部腋芽における OH-MeCLA においては、アゴニストの投与の影響を受けないことが明らかになった。すなわち、リン欠乏や、KAI2 経路の活性化といった、SL の生合成を誘導することが知られている条件において、地上部において枝分かれの抑制に関与すると考えられる SL 類は量的な調節を受けない可能性が示唆された。

Possible roles of Micro-Tom genes for circadian clock, photoperiodic regulations, and ascorbate biosynthesis in tolerance to continuous light

Tsuyoshi Mizoguchi^{1,2,3}, Tohru Ariizumi⁴, Pierre Baldet³, Sacha Bourgeois^{2,3}, Kentaro Mori^{2,3}, Yves Gibon³,
Koichi Sugimoto^{4,5}, Noriyuki Kuya⁴, Naoya Fukuda⁴, Hiroshi Ezura^{4,6}

¹ International Christian Univ. Japan, ² Univ. Bordeaux France, ³ INRAE France, ⁴ Univ. Tsukuba Japan, ⁵ Nat. Agri. Food Res. Org. Japan, ⁶ Sanatech Life Sci. Co. Ltd Japan

Induction of leaf injuries such as leaf chlorosis and epinasty under continuous light in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants is one of the most curious phenotypes regarding plant growths controlled by light. So far, only the light harvesting chlorophyll a/b binding protein 13 (*CAB-13*) gene of the *LHCB* gene family has been proposed as a major factor responsible for the tolerance to continuous light in tomato (Velez-Ramirez *et al.*, 2014). They found that the sensitive and tolerant phenotypes of the cultivars they tested were associated with a difference with or without a 9-bp deletion in the 5'-UTR of *CAB-13* gene respectively. The leaf injury phenotype under continuous light was restored by temperature cycles, suggesting that circadian clock may play a key role in this process (Haque *et al.*, 2017). *GGP1* and *PLP* encode genes for GDP-L-Galactose phosphorylase and PAS/LOV photoreceptor in *S. lycopersicum*. *PLP* downregulates ascorbate synthesis via inhibiting the *GGP* activity (Bournonville *et al.*, 2023). Ascorbate level and gene expression of both *GGP1* and *PLP* are regulated by circadian clock. In *Arabidopsis thaliana*, *VTC2* is a homologous gene for *GGP1* and the loss-of-function mutant of *VTC2* grown under stress conditions exhibits the leaf injury phenotype like that in *S. lycopersicum* grown under constant light. In *A. thaliana*, more than 50 genes for the control of circadian rhythms have been identified. LATE ELONGATED HYPOCOTYL (*LHY*) and CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (*CCA1*) play key roles in the control of circadian clock function in *A. thaliana*. Double loss-of-function of *LHY* and *CCA1* (*lhy;cca1*) exhibited early flowering phenotype under short-day (e.g. 8h light/ 16h dark) whereas late flowering, dark green leaves, and dwarf phenotypes under continuous light. We found that gene expression of one of the *LHCB*

genes and protein level of the LHCB increased in *lhy;cca1* under continuous light. This result suggests that circadian clock genes have important roles both under light/dark cycles and continuous light conditions. We first found that *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom is tolerant to continuous light and has a deletion slightly different from the 9-bp deletion in the 5'-UTR of *CAB-13* gene. To understand molecular mechanisms underlying the phenotypes, we then cultivated tomato seedlings (*S. lycopersicum* cv. Micro-Tom) of mutants and wild type (WT) for genes with high similarity to the circadian clock genes of *A. thaliana*. More than 100 mutant lines in genes for 21 core clock proteins in Micro-Tom were selected using Blast, SGN database, and our Exome analysis datasets. Control plants showed neither leaf chlorosis nor epinasty phenotypes. On the other hand, some of the mutant lines showed the leaf injury (sensitive) and much more tolerant phenotypes compared to WT under continuous light. Next, we compared levels of ascorbate, starch, glucose, fructose, and sucrose, every 3h for 24h, in WT and *plp* mutant of Micro-Tom grown under 18h light/ 6h dark, 6h light/ 18h dark, and continuous light with high and low intensity of light conditions. Then we compared growth of WT (Micro-Tom), *ggp1* (Micro-Tom), *plp* (Micro-Tom), and WT (M82) using hydroponic culture with or without NaCl under continuous light. We will discuss the possible roles of genes for circadian clock, photoperiodic regulations, and ascorbate biosynthesis in the control of leaf chlorosis and epinasty under continuous light.