

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07598

研究課題名(和文)ダイズの開花後の茎頂相転換と種子発育におけるFTオーソログの役割と機能分化

研究課題名(英文) Soybean FLOWERING LOCUS T orthologs in the control of post-flowering growth phase transition and seed development

研究代表者

阿部 純 (Abe, Jun)

北海道大学・農学研究院・特任教授

研究者番号：00192998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズの開花後の生殖生長に及ぼす光周期ならびにダイズのFLOWERING LOCUS T遺伝子オルソログであるFT2aおよびFT5aの作用を検討した。開花後の茎頂分裂組織の栄養から生殖生長への相転換にはFT5aが関与した。FT5aは転写因子であるFD様タンパク質FDL06と特異的に結合し、花芽分裂組織決定遺伝子の発現を強く誘導して無限伸育性遺伝子Dt1の発現を抑制し、その結果節の分化を止めることが示唆された。また、長日条件で咲いた花の多くは落花するが、その落花現象は柱頭上での花粉の未発芽に起因しており、柱頭を覆う脂質からなるペリクルが花粉の発芽を抑制していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイズの収量は、主に総節数と咲いた花が莢へと成熟する割合によって決定される。主茎の総節数は、開花後の茎頂分裂組織の栄養から生殖生長への相転換の様式で決定されるが、本研究の結果、開花を誘導するフロリゲンとして知られるFLOWERING LOCUS T遺伝子のダイズオルソログFT5aが主茎の生長を規定する重要な働きをなすことが明らかになった。さらに、長日条件下で頻繁に生じる落花現象は、柱頭上での花粉の未発芽に起因しており、柱頭を覆う脂質からなるペリクルが花粉の発芽を抑制していると考えられた。これらの知見は、多収性とその安定性を旨とするダイズ育種に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Roles of photoperiods and FLOWERING LOCUS T orthologs, FT2a and FT5a, in the control of post-flowering reproductive growths in soybean were studied. The transition of growth phases from vegetative to reproductive at shoot apical meristem was conditioned mainly by FT5a, but not FT2a. FT5a specifically formed a protein complex with FDL06, a soybean ortholog of a transcription factor FD. The complex upregulated floral meristem identity genes, such as APETALA1 orthologs, and in turn repressed the growth habit gene Dt1 to terminate the stem growth. Most of flowers produced in long days are aborted in photoperiod-sensitive cultivars. This flower abortion was attributed to the ungermination of pollen grains on the stigma developed in long days, which was covered by pellicle, an outer layer of stigma, fulfilled by lipids. It was suggested that the structural or physiological nature of pellicle is an important determinant to trigger the germination of pollen grains.

研究分野：植物遺伝学

キーワード：ダイズ 生殖生長 FLOWERING LOCUS T 伸育性 落花現象 柱頭

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2007年、植物の開花を誘導する仮想的な植物ホルモンであったフロリゲンが、シロイヌナズナの *FLOWERING LOCUS T (FT)* およびそのオーソログであるイネの *HEADING DATE 3a* にコードされたフォスファチジルエタノールアミン結合タンパク質 (PEBP) ファミリーに属する球状のタンパク質であることが明らかにされた。その後、*FT* 遺伝子のオーソログは植物界に広く存在し、その開花誘導に関わる機能は植物種を超えて保存されていること、さらには、各々の植物種においては *FT* 遺伝子のホモログ間で機能的な分化が進み、それらの協調的または拮抗的な作用の結果として種固有の開花制御機構を発達させていることが明らかとなった。ダイズゲノムにも 11 個の *FT* オーソログが存在し、それらのうち *FT2a* および *FT5a* と名付けられた二つの遺伝子がダイズの開花を協調的に誘導している (Kong et al., 2010)。

一回繁殖型の植物種の場合、開花とともに生育相が栄養生長から生殖生長へと転換する。ダイズの場合、開花誘導後に主茎や分枝の茎頂分裂組織の分化が止まり、茎頂に花を産生する。茎頂分裂組織の分化の様相は伸育性で異なり、有限伸育性では開花誘導とともに茎頂分裂組織の分化が急速に停止するが、無限伸育性では開花後もしばらく持続し、有限伸育性に比べてより多くの節を産生する。この無限と有限伸育性の違いには *Dt1* 遺伝子が関与している。*Dt1* は、*FT* 同様に PEBP ファミリーに属するシロイヌナズナの *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* のオーソログ (*TFL1b*) であることが明らかにされている (Liu et al., 2010)。

申請者は、ダイズの開花に関する一連の研究を通して、開花誘導のみならず、開花後の茎頂の相転換や花から莢への分化が、光受容体であるフィトクローム A をコードする感光性遺伝子 *E3* および *E4* の制御下にあることを見出した (Xu et al., 2013)。すなわち、優性遺伝子 *E3* および *E4* を持つ感光性の無限伸育性系統 (*E3E4Dt1*) を開花誘導後に長日条件下で栽培すると、茎頂分裂組織は節の分化を持続し、また、咲いた花の多くが莢へとは分化せずに落花するが、*e3* または *e3* と *e4* を併せ持つ感光性が低下または消失した系統 (*e3E4Dt1* 型や *e3e4Dt1* 型) では長日条件下でも節の分化が止まり、莢の発育も進む。興味深いことに、感光性の無限伸育性系統で *FT2a* や *FT5a* を過剰発現させた形質転換個体では、低および非感光性系統と同様に、長日条件下でも莢の発育が進み、特に後者の場合は主茎の伸長が強く抑制された。

2. 研究の目的

これらの観察結果から、本研究課題では「ダイズの *FT* 遺伝子は、開花誘導のみならず開花後の生殖生長にも関与し、開花誘導には協調的に作用するが、開花後の生殖生長には異なった機能を有する」との作業仮説を立て、開花後の生殖生長における *FT2a* および *FT5a* の役割と、それらと相互作用する FD 様タンパク質を明らかにすることを目的として一連の研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 開花後の茎頂の相転換および莢の発育に及ぼす *FT2a* および *FT5a* の作用

無限伸育性品種ウイリアムス 82 (W82) と、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターを用いて *FT2a* および *FT5a* を過剰発現させた W82 の形質転換個体 (*FT2a-ox* および *FT5a-ox*)

ならびに無限伸育性品種ハロソイ (HA) とリンゴ小球形潜在ウイルス (ALSV) を用いて *FT5a* を過剰発現させた HA 個体 (*ALSV-FT5a-ox*) を実験に供試した。これらの系統の長日条件下における主茎節の分化様式ならびに莢の発育様式を観察した。

(2) 茎頂における遺伝子の発現様式

FT2a-ox および *FT5a-ox* 個体ならびにその対照として W82 (野生型) について、出芽後長日で生育した 8 日齢個体の茎頂で発現する花芽分裂組織決定遺伝子 *APETALA1* (*AP1a-AP1c*) および *LEAFY* (*LFY*) - ならびにシュート分裂組織決定遺伝子 *Dt1* - の発現を定量 PCR 法により解析した。また、半有限伸育性遺伝子 *Dt2* (*FUL3a*) ならびに *Dt2* と結合して *Dt1* の発現を抑制するシロイヌナズナの SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (*SOC1*) のオーソログ *SOC1a* の発現も併せて解析した。

(3) *FT2a* および *FT5a* とダイズ *FD* オーソログのタンパク質間相互作用の解析

FT および *TFL1* タンパク質は bZIP 転写因子である *FD* タンパク質と結合して下流の遺伝子発現を制御する。ダイズゲノムには 18 個の *FD* 様遺伝子 (*FDL*) が存在する。本研究課題では、酵母ツーハイブリッド法を用いて、*FDL06*、*FDL12*、*FDL13* および *FDL20* と *FT2a* および *FT5a* との相互作用を、またこれら 4 個の *FDL* と *FDL8*、*FDL15* および *FDL19* と *TFL1b* (*Dt1*) との相互作用を解析した。*FDL* 遺伝子のコード領域を *GAL4* DNA 結合ドメインと融合して bait コンストラクトとし、一方、*FT2a*、*FT5a* および *TFL1b* のコード領域を活性化ドメインと融合して prey コンストラクトとした。これらのコンストラクトを共形質転換させた Y2H 酵母系統を選択培地で培養し、タンパク質間の相互作用の有無を分析した。

(4) 柱頭上の花粉発芽および柱頭の組織化学解析

長日および短日で開花した花から柱頭を採取し、Ohnishi et al. (2010) の方法に従って柱頭上での花粉発芽率を調査した。また、開花当日光点灯後 7 時間目に採取し雌蕊での花粉管の伸長をアニリンブルーで染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。開花直前のがくを取り除いた花蕾の縦断切片を作成し、組織内の脂質、タンパク質およびフラボノイド類の分布を観察した。切片は、組織を FAA で固定してテクノビット 7100 に包埋し、回転式マイクロトームを用いて作成した。作成した切片は、スダンブラック B (脂質染色)、ポンソー S (タンパク質染色) および 2-アミノエチルジフェニルポリナート (フラボノイド染色) で染色した。

4. 研究成果

(1) 開花後の茎頂の相転換および莢の発育に及ぼす *FT2a* および *FT5a* の作用

無限伸育感光性品種ウイリアムス 82 は、出芽から 12 日間短日に置き、第一本葉の展開とともに長日に移すと、第四本葉の葉腋から開花が始まり (以下、短日による開花誘導と呼ぶ) 上位

節へと開花を続けながら、主茎は生長（節の分化）を続けた。*FT2a-ox* 個体では、短日による開花誘導がなくとも、第二または第三本葉の葉腋から開花が始まり、開花誘導したウイリアムス 82 と同じく、開花を続けながら主茎節の分化を続けた。それらとは対照的に、*FT5a* を過剰発現させた *FT5a-ox* 個体では、初生葉の葉腋に花芽を分化させた後、第二本葉の節位で節の分化が停止した。*ALSV-FT5a-ox* 個体では、より高位の節から開花が始まったが、第 5 葉節に複数の花房からなる花序を形成し、有限または半有限伸育型に典型的な形態を示した。これらの結果から、*FT2a* と *FT5a* は開花後の茎頂分裂組織の相転換に関して異なった作用を有し、*FT5a* のみが主茎の相転換に関与することが明らかになった。

短日により開花誘導されたウイリアムス 82 は、開花は続けたものの、咲いた花のほとんどが莢へとは発達せずに落花した。一方、*FT2a-ox* および *FT5a-ox* では、咲いた花の約 50% から 70% 近くが莢へと分化した。特に、*FT2a-ox* では、出芽後 12 日間短日を与えた場合、与えなかった場合に比べて着莢率が増加する傾向が認められた。

(2) 茎頂における遺伝子の発現様式

茎頂の相転換に関わる *Dt1* とその発現を抑制する花序分裂組織決定遺伝子 *API* および *LFY* の出芽後 8 日目の茎頂における発現様式をウイリアムス 82 と *FT2a-ox* および *FT5a-ox* の間で比較した。*FT2a-ox* では *API* オースログの発現がやや上昇したが、*Dt1* の発現はウイリアムス 82 と異ならなかった。一方、*FT5a-ox* では *API* オースログの発現が顕著に上昇し、*Dt1* の発現が強く抑制された。ウイリアムス 82 と *FT2a-ox* について出芽後 30 日目の茎頂での遺伝子発現を比較した。*FT2a-ox* では *API* の発現は 8 日目に比べて上昇し、一方 *Dt1* の発現はウイリアムス 82 より減少した。これらの結果から、*API* の発現上昇が *Dt1* の発現抑制と関連し、*FT5a-ox* で特異的に観察された主茎の伸長抑制は、*API* オースログの著しい発現上昇に起因すると考えられた。

(3) *FT2a* および *FT5a* とダイズ FD オースログのタンパク質間相互作用の解析

酵母ツーハイブリッド解析の結果、*FT2a* は *FDL12* と、*FT5a* は *FDL12* および *FDL06* と、それぞれ結合することが明らかになった。一方、*TFL1b* は、解析した 7 個の *FDL* のうち唯一 *FDL12* と結合した。*FT2a* および *FT5a* は *FDL19* と結合することが明らかにされている (Nan et al., 2014)。これらの結果を整理すると、*FDL06* は *FT5a* と単独で、*FDL19* は *FT2a* および *FT5a* の両者と、*FDL12* は *FT2a*、*FT5a* および *TFL1b* の三者と、それぞれ相互作用することが明らかになった。*FT5a-ox* の主茎の伸長抑制には、*API* オースログの急激な発現上昇とそれに伴う *Dt1* の発現抑制が関与することが示されたが、この急激な *API* オースログの発現誘導には *FT5a* と *FDL06* の複合体が関与することが示された。

(4) 柱頭上の花粉発芽および柱頭の組織化学解析

感光性系統の開花後の莢形成は日長条件に強く依存し、短日条件下では開花の初期に咲いた花の約 7 割が莢へと分化したが、長日条件下ではその多くが落下した。

ダイズの長日条件下における莢形成阻害の原因として、柱頭上での花粉発芽を観察した。その結果、長日条件で咲いた花の柱頭では、花粉が殆ど発芽していなかった。花粉管のカロース

を染色するアニリンブルー染色により花粉管の伸長を観察した結果、長日条件由来の柱頭では花粉管の伸長が認められなかった。しかし、人工発芽培地では長日条件由来の花粉も正常に発芽しており、柱頭上での花粉の未発芽は柱頭側に原因があることが示唆された。

一方、*FT2a-ox* では、特に生育初期に短日を与えた場合に、*FT5a-ox* では短日処理を与えなくとも、長日条件下でも比較的高い莢形成率を示した。アニリンブルー染色の結果、*FT* の過剰発現個体では花粉管が花柱内に伸長していることを確認することができた。

柱頭の縦断切片の組織化学解析の結果、長日条件由来の柱頭では、柱頭表面を覆うペリクルが脂質状の物質によって構成されていることが分かった。一方、短日条件由来の柱頭ではペリクルは観察されなかった。その原因として、短日条件下で発育した柱頭のペリクルは、薄い構造からなるかまたは固定の過程で崩壊する脆い構造を持つと推察された。

縦断切片のペリクルにはフラボノイドの蓄積は認められなかった。しかし、雌蕊を固定せずにフラボノイド染色した柱頭を実体顕微鏡で観察したところ、日長条件に関わらず柱頭にフラボノイドの存在を示す強い蛍光が観察された。固定された切片ではフラボノイド類が観察されなかったことから、固定の過程でフラボノイド類が流出した可能性がある。

本研究では、花粉発芽に及ぼすペリクルの役割を明らかにすることはできなかったが、短日条件下で産生される *FT2a* や *FT5a* などが、ペリクルの構造または機能を変更することによって、花粉の発芽を制御し、その後の受精、胚発生から莢の発育に影響を与えていると思われる。

<引用文献>

Kong F, Liu B, Xia Z, Sato S, Kim BM, Watanabe S, Yamada T, Tabata S, Kanazawa A, Harada K, Abe J. 2010. Two coordinately regulated homologs of *FLOWERING LOCUS T* are involved in the control of photoperiodic flowering in soybean. *Plant Physiol* 154, 1220-1231.

Liu B, Watanabe S, Uchiyama T, Kong F, Kanazawa A, Xia Z, Nagamatsu A, Arai M, Yamada T, Kitamura K, Masuta C, Harada K, Abe J. 2010. The soybean stem growth habit gene *Dt1* is an ortholog of *Arabidopsis TERMINAL FLOWER1*. *Plant Physiol* 153, 198-210.

Nan H, Cao D, Zhang D, Li Y, Lu S, Tang L, Yuan X, Liu B, Kong F. 2014. *GmFT2a* and *GmFT5a* redundantly and differentially regulate flowering through interaction with and upregulation of the bZIP transcription factor *GmFDL19* in soybean. *PLoS One* 9, e97669.

Ohnishi, S., Miyoshi, T., and Shirai, S. 2010. Low temperature stress at different flower developmental stages affects pollen development, pollination, and pod set in soybean. *Environmental and Experimental Botany* 69, 56-62.

Xu M, Xu Z, Liu B, Kong F, Tsubokura Y, Watanabe S, Xia Z, Harada K, Kanazawa A, Yamada T, Abe J. 2013. Genetic variation in four maturity genes affects photoperiod insensitivity and PHYA-regulated post-flowering responses of soybean. *BMC Plant Biol* 13, 91.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryoma Takeshima, Haiyang Nan, Kohei Harigai, Lidong Dong, Jianghui Zhu, Sijia Lu, Meilan Xu, Noriko Yamagishi, Nobuyuki Yoshikawa, Baohui Liu, Tetsuya Yamada, Fanjiang Kong, Jun Abe	4. 巻 70
2. 論文標題 Functional divergence between soybean FLOWERING LOCUS T orthologues, FT2a and FT5a, in post-flowering stem growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 3941-3953
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1093/jxb/erz199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 針谷 康平, 竹島 亮馬, 山田 哲也, 孔 凡江, 阿部 純
2. 発表標題 ダイズの長日下における莢形成を阻害する要因
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 針谷 康平, 竹島 亮馬, 山田 哲也, 孔 凡江, 阿部 純
2. 発表標題 ダイズのフロリゲン遺伝子FT2aの開花後の生殖生長への影響
3. 学会等名 日本育種学会・作物学会北海道談話会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平田万季, 針谷康平, 竹島亮馬, 松浦英幸, 藤野介延, 徐美蘭, 山田哲也, 阿部純
2. 発表標題 ダイズの柱頭上花粉発芽に関わるFTオルソログの機能
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----