

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15518

研究課題名（和文）キャベツの強力な花成抑制機構を突破するダイコンの花成誘導因子の特定と採種への応用

研究課題名（英文）Identification of floral inducing factors of radish that breaks through the strong floral repression of cabbage and its application to seed production

研究代表者

元木 航 (Motoki, Ko)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：00867814

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：“花の咲かない野菜種子”生産体系の開発に向けて、ダイコンの接ぎ木花成誘導能力に関わる因子の特定と、接ぎ木により採種した種子の農業形質の評価を行った。花成ホルモンであるFTタンパク質の定量解析を通して、接ぎ木によるキャベツの花成誘導においてFTが量的効果をもち、接ぎ木したキャベツにFTが十分量蓄積することが花成誘導の必要条件であることを明らかにした。さらに、穂木におけるFT蓄積量に影響する台木の要因を特定した。また栽培試験の結果、接ぎ木による採種法は得られたキャベツ種子の主要な農業形質に対して影響を与えず、従来法と同様にキャベツの育種に利用できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では接ぎ木による花成誘導の成否に関わる台木の要因の特定と、接ぎ木により採種した種子の形質評価を通して、接ぎ木を利用した“花の咲かない野菜種子”生産体系の実現可能性を示すことができた。今回明らかにした台木のFT供給能力に関わる要因に着目することで、より強力な花成誘導能力をもつ台木を作出し、接ぎ木による種子生産を効率化できる可能性がある。本研究で開発した花成誘導法は、従来の低温処理による花成誘導法で要した時間を半分に短縮可能であり、アブラナ科作物の育種や採種にも有用だと考えられる。また本研究で得た知見は、アブラナ科以外の作物種における接ぎ木花成誘導法の開発にも資するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In order to develop a "non-flowering vegetable seed" production system, factors involved in the ability of grafted radish to induce flowering were identified and agronomic traits of cabbage seeds obtained by grafting were evaluated. Through quantitative analysis of FT protein, a flowering hormone, it was found that FT has a quantitative effect on the floral induction in cabbage by grafting, and that accumulation of sufficient amounts of FT in the grafted cabbage is necessary for the success of floral induction. In addition, the rootstock factors that affect the amount of FT accumulated in the grafted scion were identified. The results of cultivation experiments showed that the grafting method had no effect on the major agronomic traits of the resulting cabbage seeds, suggesting that it can be used for cabbage breeding in the same way as the conventional method.

研究分野：園芸科学

キーワード：キャベツ ダイコン 晩抽性育種 接ぎ木 フロリゲン・FLOWERING LOCUS T 早期開花技術 採種 ア
ブラナ科

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

申請者らが保有するキャベツ‘不抽苔’ (*Brassica oleracea* var. *capitata*) は、花成が強力に抑制された難開花性の変異体であり、数ヶ月におよぶ冬の低温に遭遇してもほとんど開花しない。キャベツのような葉菜類において春の開花に伴う茎の伸長は周年生産を妨げる大きな原因であり、‘不抽苔’のもつ難開花性はこれを解決する魅力的な形質である。しかし、‘不抽苔’は低温遭遇ではほとんど開花せず採種が困難であるため、その利用のためには低温処理に代わる新たな花成誘導法が必要であった。

申請者らは様々な方法を試みる中で、花成誘導したダイコン (*Raphanus sativus* L.) への接ぎ木により、‘不抽苔’を強制的に開花させ種子を得られることを見出した。しかし、その開花は不安定であったことから、実用的な利用のためには、接ぎ木による花成誘導の成否に関わる要因を明らかにし、より安定した花成誘導法を確立する必要があると考えた。別のキャベツ品種を穂木に用いた接ぎ木実験の結果から、キャベツと同じ *B. oleracea* 種の早抽性系統であるカイランに接ぎ木した場合にはキャベツは花成誘導されないこと、またダイコンの種内でも接ぎ木したキャベツの開花率には大きな差がみられることが明らかになった (Motoki et al., 2019)。したがって、これらの植物を比較することにより、接ぎ木による花成誘導の成否に関わる台木側の要因を明らかにし、安定した花成誘導法を開発できると考えた。

また複数の植物で採種時の環境が種子の発芽後の形質に影響すると報告されている (Chen・Penfield, 2018; 今村ら, 2009)。そのため、接ぎ木による花成誘導によって低温遭遇なしで得られた種子は、通常の低温遭遇を経る採種法で得られた種子とは異なる性質をもつ可能性がある。接ぎ木による採種法を実際の育種や種子生産に用いる上で、この点を明らかにし、得られる種子の形質を予測可能にする必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに見出してきた花成誘導能力の異なるダイコン品種を用いて、‘不抽苔’の花成抑制を打破するために必要なダイコンの花成誘導因子の特定と、接ぎ木による採種法と通常の採種法とで得た種子の農業形質の比較を行うことを目的とする。本研究で得られる成果は、強力な花成誘導能力をもつ台木の育種と、採種した種子の形質予測を可能にする。これにより、‘不抽苔’の難開花性を利用した“花の咲かない野菜種子”生産体系の開発に挑戦することを最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) 接ぎ木による花成誘導の成否に関わるダイコンの花成誘導因子の特定

接ぎ木による花成誘導は、花成誘導された植物の葉で合成される花成ホルモン FLOWERING LOCUS T (FT) タンパク質の移行により引き起こされることが複数の植物種で明らかにされてきた (Lifschitz et al., 2006; Lin et al., 2007; Notaguchi et al., 2008)。先行研究において、接ぎ木によるキャベツの花成誘導メカニズムを推定するために、主要な花成関連遺伝子の発現解析を行った結果、接ぎ木により花成誘導されたキャベツでは、低温遭遇時に見られる FLOWERING LOCUS C 遺伝子の発現低下および FT 遺伝子の発現上昇は観察されなかった (Motoki et al., 2019)。このことから、従来の接ぎ木による花成誘導モデルと同様に、台木から供給される FT に依存して花成誘導が起こっていることが示唆された。供試したダイコン系統間で FT のアミノ酸配列に多型はなかったことから、台木から穂木に供給される FT の量的な違いがキャベツの開花反応の違いをもたらしているという仮説を立てた。

この仮説の検証のためには、接ぎ木したキャベツに移行し蓄積した FT の量と開花反応との関係をまず明らかにすることが重要と考えた。そこで、キャベツおよびダイコンの FT を定量的に検出するためのペプチド抗体を開発した。ダイコンの FT における異なる 3 箇所のペプチド配列を抗原としてウサギポリクローナル抗体を作製した。大腸菌で発現させた組み換えタンパク質のウエスタンブロット解析、およびダイコンの葉から抽出したタンパク質の免疫沈降-質量分析によって、各抗体の特異性を確認した。

開発した抗 FT 抗体を用いて、複数種の *B. oleracea* およびダイコン台木に接ぎ木したキャベツにおける FT 蓄積濃度とその開花反応との関係を調査した。本実験には早抽性のキャベツを 2 系統、早抽性のダイコン固定系統を 3 系統およびそれらの交雑 F₁ を 2 系統供試した。さらに穂木への FT の蓄積量に影響する台木の要因を明らかにするため、ダイコン系統間で違いがみられた FT 発現量および葉面積に着目した実験を行った。台木への種子春化处理、日長処理および摘葉処理によって、台木の FT 発現量および葉面積を人為的に変化させて接ぎ木実験を行い、穂木の

開花反応および FT 蓄積量を調査した。

(2) ダイコンへの接ぎ木により低温遭遇なしで形成したキャベツ種子の特性調査

通常の開花性をもつキャベツ‘渡辺成功 1 号’を供試した。事前の栽培において、‘渡辺成功 1 号’の個体間で形態的なばらつきが観察されたことから、遺伝的背景の違いによる影響を避けるためにクローン系統を用いて実験を行った。栄養繁殖により単離した 2 クローン系統について、低温処理およびダイコン台木への接ぎ木によって花成誘導し、CO₂ 処理によってそれぞれ自殖種子を得た。これらの種子に由来する実生について 2 年間に渡って露地圃場で夏まき栽培を行い、主要な農業形質（植物体サイズ、結球重および開花期）を比較した。

(3) 新たに作出したダイコン系統を用いた接ぎ木による‘不抽苔’の採種

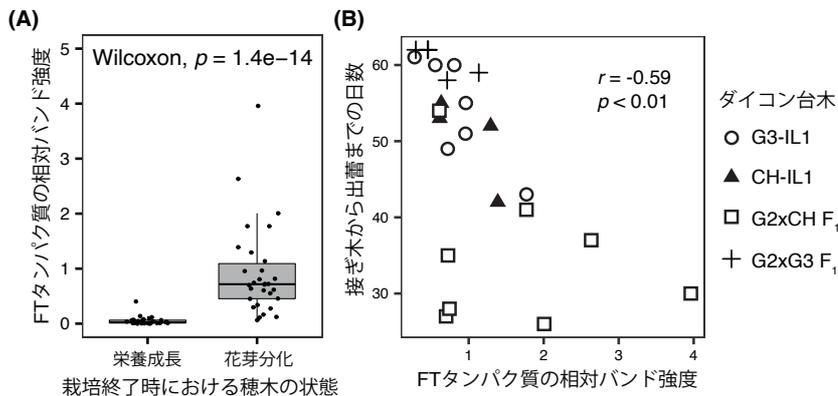
上記の実験を通して見出した花成誘導能力の高いダイコン台木を用いて、接ぎ木による‘不抽苔’の花成誘導を実施した。22°C16 時間日長の育成室において、抽台したダイコン系統 G2-IL×CH-IL F₁ の花茎に‘不抽苔’を接ぎ木した。開花後は CO₂ 処理によって自殖を行った。

4. 研究成果

(1) 接ぎ木による花成誘導の成否に関わるダイコンの花成誘導因子の特定

作出した 3 つのペプチド抗体のうちの 1 つで、ダイコンおよびキャベツの FT を検出できるものが得られた。その特異性を確認した結果、FT についてはダイコンおよびキャベツの両種において強く検出すること、また FT のパラログである TWIN SISTER OF FT (TSF) については、ダイコンでは弱く、キャベツでは強く検出することを確認した。ダイコンの葉から抽出したタンパク質の希釈系列を用いたウエスタンブロット解析により、本抗体はダイコンの葉に蓄積する生理学的な濃度の FT を定量的に検出できることを確認した。またこの抗体を用いて、ダイコンに接ぎ木したキャベツ穂木から FT を検出することが可能であった。

開発した抗 FT 抗体を用いて、複数種のキャベツおよびダイコン台木に接ぎ木したキャベツにおける FT 蓄積濃度とその開花反応との関係を調査した。先行研究と同様に、ダイコン台木でのみ接ぎ木したキャベツの花芽分化が誘導され、ダイコン系統間でも接ぎ木したキャベツの開花反応には差がみられた。接ぎ木 35 日目のキャベツ穂木に蓄積した FT の量は、穂木の花芽分化の有無による有意差がみられ、さらに穂木が出蕾するまでの日数とは負の相関関係を示した（第 1 図）。キャベツ台木に接ぎ木したキャベツからは FT は検出されなかった。キャベツの FT は花成促進作用をもつという先行研究（Itabashi et al., 2019）もふまえると、本実験で観察された台木の種類に依存するキャベツの開花反応の違いは、穂木に蓄積した FT の量的な違いで説明できると考えられた。さらに穂木への FT の蓄積量に影響する台木の要因を明らかにするため、ダイコン系統間で違いがみられた FT 発現量および葉面積に着目した。台木への種子春化处理、日長処理および摘葉処理によって、台木の FT 発現量および葉面積を人為的に変化させて接ぎ木実験を行い、これらの要因がともに接ぎ木した穂木における FT 蓄積量の変動に寄与していることを明らかにした。



第 1 図 花成誘導された台木に接ぎ木したキャベツ穂木における FT タンパク質の蓄積量とその開花反応との関係 (A) 栽培終了時（接ぎ木後 63 日目）における穂木の花芽分化の有無と接ぎ木後 35 日目の穂木における FT 蓄積量との関係。グラフ内の数値はウィルコクソンの順位と検定の結果を示す。(B) 接ぎ木から出蕾までの日数と接ぎ木後 35 日目の穂木における FT 蓄積量との関係。グラフ内の数値はピアソンの相関係数を示す。

(2) ダイコンへの接ぎ木により低温遭遇なしで形成したキャベツ種子の特性調査

2年間に渡る圃場での栽培試験の結果、植物体サイズ、結球重および開花期に関して、2年間を通して系統による違いがみられた形質があった一方で、採種法による違いが両年ともに見られた形質はなかった。このことから接ぎ木による採種法はキャベツの主要な農業形質に対して影響を与えないことが明らかとなり、従来法と同様にキャベツの育種に利用できると考えられた。

(3) 新たに作出したダイコン系統を用いた接ぎ木による‘不抽苔’の採種

花成誘導能力の高いダイコン系統として見出された G2-IL×CH-IL F₁ への接ぎ木を行った結果、以前よりも高い割合で‘不抽苔’を開花させ、自殖後代を得ることができた。また圃場での栽培により、得られた自殖後代では難開花性が維持されていることも確認した。一方で接ぎ木により花成誘導した‘不抽苔’では、他のキャベツ品種を接ぎ木により花成誘導した場合と比較して奇形花や種子形成異常の発生が多く、得られた種子数が少なくなった。これには‘不抽苔’の難開花性に関わる因子が関与する可能性が考えられた。

(4) 得られた成果の位置づけとインパクト、今後の展望

本研究では接ぎ木によるキャベツの花成誘導において FT が量的効果を持ち、接ぎ木したキャベツに FT が十分量蓄積することが花成誘導の必要条件であることを明らかにした。圃場での栽培試験および‘不抽苔’の採種実験も合わせて、“花の咲かない野菜種子”生産体系の実現可能性を示すことができたと考えている。しかし、その実用化のためには採種量を増やすことが課題として明らかになった。今回見出した FT 供給能力に関わる台木の要因に着目し、より強力な花成誘導能力をもつ台木を作出することが、課題解決の一つの方策になると考えている。穂木への FT 蓄積量に影響する台木の要因として見いだされた FT 発現量および葉面積には、供試したダイコンの中だけでも系統間差がみられた。このことは多様なダイコン遺伝資源を用いて両要因に着目した選抜を行うことにより、より強力な接ぎ木花成誘導能力をもつ台木を育成できる可能性を示している。現在、ダイコンが FT を高発現するために必要な遺伝的要因の特定に向けた実験を進めている。

キャベツおよび同じ *B. oleracea* 種のブロッコリーやカリフラワー、および近縁種のナタネ (*Brassica napus*) の晩抽性系統では、幼若性と強い低温要求性により、採種に時間がかかることが育種上の課題となっている。本研究を通して開発した花成誘導法は、キャベツを播種から最短で2ヶ月で開花させることができ、従来の低温処理法で要した時間を半分に短縮可能である。したがって本手法は、‘不抽苔’の採種だけでなく、晩抽性のアブラナ科作物の世代促進にも有効であり、今後、育種現場での利用が進むことが予想される。また本研究で明らかにした接ぎ木花成誘導の成否に関わる台木の要因に関する知見は、アブラナ科以外の作物種における接ぎ木花成誘導の開発にも資するものと考えられる。

<引用文献>

- ① Motoki, K., Y. Kinoshita and M. Hosokawa. 2019. Non-vernalization flowering and seed set of cabbage induced by grafting onto radish rootstocks. *Front. Plant Sci.* 9: 1967. DOI: 10.3389/fpls.2018.01967.
- ② Chen, M., M. Penfield. 2018. Feedback regulation of COOLAIR expression controls seed dormancy and flowering time. *Science*. 360: 1014-1017. DOI: 10.1126/science.aar7361
- ③ 今村 仁・須藤 憲一・池田 広. 2009. トルコギキョウ種子の登熟期における低温遭遇に対する抽だい反応. *園学研*. 8: 41-46. DOI: 10.2503/hrj.8.41
- ④ Lifschitz, E., T. Eviatar, A. Rozman, A. Shalit, A. Goldshmidt, Z. Amsellem, J. P. Alvarez and Y. Eshed. 2006. The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 6398-6403. DOI: 10.1073/pnas.060162010
- ⑤ Lin, M. K., H. Belanger, Y. J. Lee, E. Varkonyi-Gasic, K. I. Taoka, E. Miura, B. Xoconostle-Cázares, K. Gendler, R. A. Jorgensen, B. Phinney, T. J. Lough and W. J. Lucas. 2007. FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. *Plant Cell* 19: 1488-1506. DOI: 10.1105/tpc.107.051920
- ⑥ Notaguchi, M., M. Abe, T. Kimura, Y. Daimon, T. Kobayashi, A. Yamaguchi, Y. Tomita, K. Dohi, M. Mori and T. Araki. 2008. Long-distance, graft-transmissible action of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant Cell Physiol.* 49: 1645-1658. DOI: 10.1093/pcp/pcn154
- ⑦ Itabashi E., D.J. Shea, N. Fukino, R. Fujimoto, K. Okazaki, T. Kakizaki, T. Ohara. 2019. Comparison of cold responses for orthologs of cabbage vernalization related genes. *Hort. J.* 88: 462-470. DOI: 10.2503/hortj.UTD-059

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuo Hiroki, Okada Moeko, Yamamori Koichi, Sato Moeko, Yanagi Erina, Motoki Ko, Masuda Kanae	4. 巻 -
2. 論文標題 Discovery of new interests by young scientists-sexuality and crossing in plants-(Japan Society of Breeding)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Breeding Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbr.24.w01	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Kinoshita Yu, Motoki Ko, Hosokawa Munetaka	4. 巻 90
2. 論文標題 Characterization of a Non-flowering Cabbage Mutant Discovered 42 Years Ago	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 374 ~ 381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2503/hortj.utd-277	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Kinoshita Yu, Motoki Ko, Hosokawa Munetaka	4. 巻 136
2. 論文標題 Upregulation of tandem duplicated BoFLC1 genes is associated with the non-flowering trait in Brassica oleracea var. capitata	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Theoretical and Applied Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00122-023-04311-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Motoki Ko, Kinoshita Yu, Nakano Ryohei, Hosokawa Munetaka, Nakazaki Tetsuya	4. 巻 92
2. 論文標題 Investigation of the Field Performance of Progenies Obtained by a Non-vernalization-grafting Floral Induction Method in Terms of Application to Cabbage Breeding and Seed Production	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 66 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2503/hortj.qh-018	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Motoki Ko, Kinoshita Yu, Nakano Ryohei, Hosokawa Munetaka, Nakazaki Tetsuya	4. 巻 63
2. 論文標題 Quantitative Analysis of Florigen for the Variability of Floral Induction in Cabbage/Radish Inter-generic Grafting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1230 ~ 1241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac098	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 元木 航, 木下有羽, 中野龍平, 細川宗孝, 中崎鉄也
2. 発表標題 育種・採種のツールとして利用可能な " 花成誘導台木 " の開発
3. 学会等名 超分野植物科学研究会・第一回研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 元木 航
2. 発表標題 アブラナ科作物の育種・採種ツールとして利用可能な " 花成誘導台木 " の開発
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下 有羽, 元木 航, 細川 宗孝
2. 発表標題 キャベツ変異体 ' 不抽苔 ' の非開花性に関する遺伝様式の調査
3. 学会等名 園芸学会令和 4 年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 元木 航・木下有羽・中野龍平・細川宗孝・中崎鉄也
2. 発表標題 ダイコンのFTタンパクを検出するペプチド抗体の開発
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 元木 航
2. 発表標題 ダイコンのフロリゲンを利用したアブラナ科作物の早期開花技術の開発
3. 学会等名 第18回けいはんな地区植物科学懇話会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 元木 航
2. 発表標題 ダイコンのフロリゲンを利用したキャベツの早期開花技術の開発
3. 学会等名 第44回 岩手育種談話会・第27回植物生命科学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 元木 航・木下有羽・中野龍平・細川宗孝・中崎鉄也
2. 発表標題 FTタンパク質の定量解析によるキャベツの接ぎ木花成誘導条件の解明
3. 学会等名 園芸学会 令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------