

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380001

研究課題名(和文)ダイズの開花・伸育性に関する遺伝子の発現ネットワークと環境応答の解明

研究課題名(英文) Study on a network of genes related to flowering and growth habit and its responses to environments in soybean

研究代表者

阿部 純 (ABE, Jun)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00192998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズは幅広い緯度の下で栽培される適応性の高い作物である。この広域適応性を支えるのが開花様式の遺伝的多様性である。本研究課題では、ダイズの開花を決定する感光性に関わる遺伝子の多様性とそれらの発現ネットワークを研究した。高緯度地域におけるダイズ栽培を可能にする感光性の消失機構には、光受容体フィトクロームAの欠損と開花誘導に関わる転写因子E1の欠損に加えて、それらとは異なる複数の新規遺伝子の関与が示された。光中断実験から、一日の特定時間帯の光シグナルをフィトクロームAが感受してE1の発現を誘導し、下流で働くフオリゲン遺伝子の発現を抑制することによって、開花を抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Soybean is cultivated across a wide range of latitudes. Its wide adaptability is supported by a genetic diversity in the control of flowering. The purposes of this project were to reveal the genetic diversity at four flowering loci, E1 to E4 and to determine the genetic network of flowering genes and the responses to environments. There were three mechanisms in the control of photoperiod-insensitivity; dysfunction of phytochrome A genes, E3 and E4, dysfunction of E1, a possible transcriptional factor for FLOWERING LOCUS T (FT) orthologs, and an involvement of a novel gene(s). Two homologs of E1 inhibited flowering via down-regulation of FT, as in E1. Further, a light signal in a specific period of day induced the gene expression of E1 under the control of E3 and E4 to inhibit the induction of FT expressions, which consequently inhibited the floral induction. A pathway independent of FT may also be involved in the induction of flowering in soybean.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：ダイズ 開花 感光性 遺伝子発現 遺伝的多様性 熟期遺伝子 FLOWERING LOCUS T

### 1. 研究開始当初の背景

植物の開花制御に関する研究は、主にモデル植物であるシロイヌナズナやイネの研究により、フロリゲンとなる物質 (FLOWERING LOCUS T (FT) タンパク質) が明らかになるなど、この 10 年間で大きな進歩を遂げた。しかし、ダイズの場合、世界の主要な作物であるにもかかわらず、開花の分子遺伝学的機構に関する理解は非常に限られている。ダイズは赤道直下から北緯 50 度を超える高緯度地域まで栽培される適応性の高い作物である。開花は、ダイズのような子実作物の生産性や適応性を規定する重要な要素であり、その分子生物学的な制御機構の理解が望まれる。

ダイズでは、これまでに開花に関与する 9 個の主働遺伝子が報告され、その 4 個 (*E1*, *E3*, *E4* および *E7*) が、長日下で開花する能力の品種間差異に関与することが報告されてきた。われわれは、北海道の極早生ダイズ品種を用いた遺伝実験から、補光により人為的に作出した 20 時間日長条件下においても開花が抑制されない開花の長日不感受性が、*E1*, *E3* および *E4* 座の劣性遺伝子の組み合わせにより支配されていることを明らかにした (Abe et al. 2003; Liu and Abe 2010)。これらのうち、*E3* と *E4* はフィトクローム A を支配する遺伝子であり、*E1* はダイズの FT オーソログである *FT2a* および *FT5a* の発現を抑制する転写因子と考えられている (Liu et al. 2008; Watanabe et al. 2011; Xia et al. 2012)。*E1* の発現は、*E3* および *E4* の制御下にあり、長日で誘導され *FT2a* および *FT5a* の発現を抑制し、開花を抑えるが、短日では発現が誘導されずに *FT2a* および *FT5a* が発現し、開花がもたらされる。これらダイズの開花に関する主要な遺伝子が同定されたことにより、ダイズにおいても開花誘導の分子機構が、遺伝子間の発現ネットワークやその環境との関わり合いを通じて理解しうることが可

能になった。

### 2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、ダイズにおける開花や伸育性に関する分子遺伝学的機構とその遺伝的多様性を明らかにすることにある。本課題では、1) 高緯度地域に適応したダイズ品種が有する開花に関する非感光性の遺伝的多様性を明らかにすること、2) 感光性にかかわる *E1* ならびに *E1* 様遺伝子の機能を明らかにすること、3) 異なる温度が開花遺伝子の発現に及ぼす効果を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 非感光性に関与する遺伝的多様性

世界各地で栽培される非感光性 53 系統について、4 遺伝子座の多様性を対立遺伝子特異的 DNA 標識ならびにシークエンス解析により解析した。また、これら遺伝子座の変異が、開花後の感光性にどのような影響を与えるか、準同質遺伝子系統を用いて伸育性に関わる *Dt1* (*TFL1b*) 遺伝子の発現様式を解析した。新規の非感光性を有する中国ダイズ品種 J02 の非感光性の機構を、*E1* から *E4* 座が同じ遺伝子型からなる感光性系統 (ハロソイ-e3) との検定交雑後代において解析した。

#### (2) *E1* 過剰発現個体における開花遺伝子の発現様式の解析

*E1* 遺伝子を含むゲノム領域を形質転換した T2 個体の後代を 12 時間日長で栽培し、それらの開花様式を調査した。また出芽後 20 日目の葉で発現する開花遺伝子の発現様式をリアルタイム PCR 法により解析した。

#### (3) ウイルス誘導遺伝子サイレンシング (VIGS) を用いた *E1* 様遺伝子 (*E1L*) の機能解析

ダイズゲノムには、*E1* に二つのホモログ (*E1L-C1* および *E1L-G*) が存在する。これら

の機能を明らかにするために、両遺伝子の相同性の高いDNA領域を組み込んだリング小球形潜在ウイルス (ALSV-E1L) を作出し、VIGSを利用してE1Lの機能を解析した。材料にはE1遺伝子を欠損したトヨムスメを用いた。ALSV-E1L感染個体と、目的DNA断片を含まないウイルスを感染させた個体ならびに未感染個体を18時間日長条件下で栽培し、E1LのVIGSが開花遺伝子の発現ならびに開花へ及ぼす効果を解析した。

#### (4) 光中断がE1の発現に及ぼす効果

ダイズにおける光中断の分子機構を明らかにするために、8時間明期の短日条件下で生育する個体に、暗期の異なる時間帯に2時間の光中断を与え、E1ならびにFT2aやFT5aの発現様式を解析した。

#### (5) 開花遺伝子のネットワークと低温下での開花反応

ハロソイの非感光性系統 (H-e3e4) およびJ02を、18時間日長の下、25と18の異なる温度下で栽培し、開花遺伝子の発現様式を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 非感光性に関する遺伝子の多様性

解析した非感光性系統の全てにおいてE2座は劣性遺伝子 (e2) で固定していた。他の遺伝子座では、既知の優性および劣性遺伝子に加えて、新たに2個 (E3) ならびに4個 (E4) の機能欠損遺伝子が観察された。全体で15の遺伝子型組み合わせが観察され、遺伝子の機能性を基に、フィトクロームA遺伝子 (E3およびE4) の機能欠損型、E1遺伝子の機能欠損型および新規遺伝子型に分類された。新規非感光性を有する系統J02と、E1~E4遺伝子座について同じ遺伝子型 (e1-as/e3/E4) を持つハロソイ-e3との交雑後代におけるQTL解析から、新規非感光性に関する複数のQTLを見出すことができた。e3

およびe4に関する準同質遺伝子系統を用いて、Dt1の発現様式を解析した所、E3およびE4は長日下でDt1の発現を維持し、また結実を遅らせるなど、開花のみならず開花後の生長にも大きな影響を与えた。

#### (2) E1過剰発現個体における開花遺伝子の発現様式の解析

野生型個体では出芽後25日目より開花が始まったが、形質転換T2後代では、野生型と同時に開花した個体、約10日開花が遅延した個体、出芽後90日に至っても開花が誘導されなかった個体が分離した。開花が著しく抑制された個体ではE1が過剰発現し、FT2aやFT5aの発現が観察されなかった。一方、開花が10日ほど遅延した個体の中には、FT2aやFT5aの発現が抑制されていた個体や野生型と同程度の発現を示した個体が存在した。これらの個体では、FTの下流で機能すると考えられているFRUITFUL遺伝子 (FUL) のダイズオーソログの一部が高発現しており、ダイズの開花誘導にはFT2aやFT5aとは独立に機能する系が存在することが示唆された。

#### (3) VIGSを用いたE1様遺伝子の機能解析

E1LのVIGSにより、開花が対照個体に比べて約10日早生化した。したがって、E1Lも、E1同様に、長日下でダイズの開花を抑制することが明らかとなった。E1LのVIGSにより、FT2aやFT5aの発現がやや増加したが、両者の発現に比べてFULオーソログの発現が顕著に増加した。観察されたFULの発現誘導が、E1LのVIGSによる直接的結果なのか、または、FT2aやFT5aを介した間接的結果なのか、今後の検討が必要である。

#### (4) 光中断がE1の発現に及ぼす効果

ダイズの光中断に対する反応を、E1およびE1Lの発現様式に着目して検討した。E1およびE1Lは、18時間の日長下では光点灯初

期と消灯前に二つの発現ピークを持つ。16時間暗期の異なる時間帯に2時間の光中断を与えたところ、暗期中期に与えた光中断のみが *E1* および *E1L* の発現を誘起し、その結果 *FT2a* および *FT5a* の発現を抑制して開花の遅延を引き起こした。一方、他の時間帯に与えた光中断は、*E1* および *E1L* の発現に影響を与えなかった。このような光中断の効果はフィトクロームAの機能欠損系統では認められず、光中断に対する反応にはフィトクロームAが関与していた。ダイズの光中断は、暗期の適切な時期に与えられた光照射がフィトクロームAを介して *E1* の発現を誘導し、*FT2a* や *FT5a* の発現を抑制することによって開花を抑制することが初めて明らかとなった。

#### (5) 開花遺伝子のネットワークと低温下での開花反応

長日冷涼(18℃)条件下で栽培した非感光性系統ハロソイ-*e3e4*およびJ02では、25℃で生育した個体とは対照的に、*FT2a* や *FT5a* の発現が認められなかった。一方、*FUL* 遺伝子の中には、冷涼な環境下でも生育に伴い発現上昇する遺伝子が存在した。

(6) 以上の結果から、ダイズの開花、特に感光性については、*E1*、*E3* および *E4* ならびに *FT2a* および *FT5a* が大きな役割を果たしており、特定の時間帯に与えられた光シグナルが、*E3* および *E4* の制御を介して *E1* の発現を誘導し、*FT2a* および *FT5a* の発現を抑制して開花を制御する。これに加えて、本研究結果から、*FT2a* および *FT5a* には依存しない *FUL* 遺伝子が関与する開花誘導系の存在も示唆された。今後は、*FT2a* および *FT5a* と *FUL* 遺伝子の相互関係を明確にすることにより、ダイズの感光性や感温性の分子的機構がよりよく理解されるものと期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

- 1) Tsubokura Y, Watanabe S, Xia Z, Kanamori H, Yamagata H, Kaga A, Katayose Y, Abe J, Ishimoto M, Harada K. (2013) Natural variation in the genes responsible for maturity loci, *E1*, *E2*, *E3* and *E4* in soybean. *Annals of Botany*, 113: 429-441. 査読あり
- 2) Xu M, Z. Xu, B. Liu, F. Kong, Y. Tsubokura, S. Watanabe, Z. Xia, K. Harada, A. Kanazawa, T. Yamada and J. Abe (2013) Genetic variation in four maturity genes affects photoperiod insensitivity and PHYA-regulated post-flowering responses of soybean. *BMC Plant Biology*, 11: 152. 査読あり
- 3) Tsubokura Y, H. Matsumura, M. Xu, B. Liu, H. Kanamori, Y. Katayose, R. Takahashi, K. Harada and J. Abe (2013) Genetic variation in soybean at the maturity locus *E4* is involved in adaptation to long days at high latitudes. *Agronomy*, 3: 117-134. 査読あり
- 4) Hashiguchi M., J. Abe, T. Aoki, T. Anai, A. Suzuki and R. Akashi (2012) The National BioResource project (NBRP) *Lotus* and *Glycine* in Japan. *Breeding Science*, 61: 531-543. 査読あり
- 5) Watanabe S., K. Harada and J. Abe (2012) Genetic and molecular bases of photoperiod responses of flowering in soybean. *Breeding Science*, 61: 453-461. 査読あり

[学会発表](計 5件)

- 1) 竹島亮馬, 趙晨, 徐美蘭, 劉宝輝, 渡邊

啓史, 山田哲也, 阿部純. ダイズの開花抑制遺伝子 E1 に制御される開花関連遺伝子の解析と開花との関連性. 日本育種学会第 125 回講演会、2014 年 3 月 21-22 日、東北大学、仙台市

2) 徐美蘭、山岸紀子、竹島亮馬、河西めぐみ、金澤章、吉川信幸、阿部純. VIGS を用いた E1 様遺伝子の機能解析. 日本育種学会第 124 回講演会、2013 年 10 月 12-13 日、鹿児島大学、鹿児島市

3) 竹島亮馬, 趙晨, 徐美蘭, 劉宝輝, 渡邊啓史, 山田哲也, 阿部純. 中国早生ダイズの非感光性に関する QTL 解析. 日本育種学会第 123 回講演会、2013 年 3 月 27-28 日、東京農業大学、東京都

4) Xu M, , Z. Xu, S. Watanabe, Y. Tsubokura, K. Harada, X. Yuan, Z. Xia, B. Liu, F. Kong, T. Yamada and J. Abe (2012) Novel variation of photoperiod-insensitivity in soybean as revealed by genotyping of four major maturity locus with DNA markers. 10<sup>th</sup>, International Congress on Plant Molecular Biology, 2012, October 21-26, Jeju Island, Republic of Korea

5) 徐美蘭、徐沢恒、坪倉康隆、渡辺啓史、夏正俊、孔凡江、劉宝輝、原田久也、山田哲也、阿部純. DNA 多型を利用したダイズ早生品種の感光性遺伝子型の分類と開花および開花後の感光性の変異. 日本育種学会第 122 回講演会、2012 年 9 月 14-15 日、京都産業大学、京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

阿部 純 (ABE, Jun)  
北海道大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：00192998

### (2)研究分担者

山田 哲也 (YAMADA, Testuya)  
北海道大学・大学院農学研究院・講師  
研究者番号：70374618