

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580003

研究課題名(和文)植物の開花とストレス経路を統合制御する因子の解析とその育種的利用

研究課題名(英文)Cross talk pathways between stress tolerance and promotion of flowering

研究代表者

横井 修司 (YOKOI, SHUJI)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：80346311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：イネとシロイヌナズナを用い、環境ストレスが植物生活環で最も重要な生存戦略である開花に及ぼす影響を解析し、植物が環境ストレスを回避して開花・結実することができるような育種へと応用することを目的として研究を行った。シロイヌナズナではストレスによる早期開花経路に2つの遺伝子が関与している可能性、イネでは開花を制御するEhd2が先行研究で示された光周性開花経路で機能するだけでなく、温度依存的開花シグナルに関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effect on flowering is most important strategies in plant life cycle. To improve the environmental stress tolerance of plants, I have been to use rice and Arabidopsis. According to my research, two genes may be involved in early flowering pathway by stress in Arabidopsis. I identified a novel allele of Ehd2 from Mutmap analysis and I found that Ehd2 might have a function for temperature-dependent flowering signal in rice.

研究分野：農学

キーワード：ストレス 開花 シグナル伝達 イネ シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

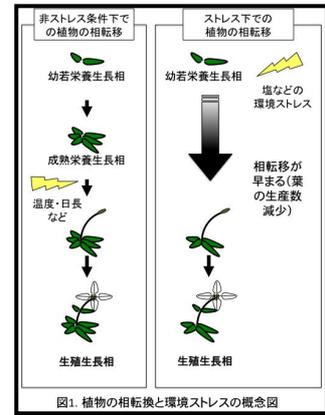
植物の開花という現象は、植物にとって子孫を残すという生物的に最も大事なイベントであると同時に、我々人間にとっても食糧として利用するために必須の重要形質である。植物は非ストレス条件下では、体内時計と外界からのシグナル(日長・温度など)を統合して季節(開花のために最適な時期)を判断して花を咲かせるための準備を開始する。この準備段階は、「相転移」と呼ばれ、個体の成長を維持するための時期(幼若栄養生長相:個体の生長維持の期間であり、外界シグナルに反応しない)から外界シグナルを受容できるようになる時期(成熟栄養生長相:環境条件が整えばいつでも次の相に移行できる)へと移行する。環境条件が整えば、植物は子孫を残すための時期(生殖生長相:種子をつけるための時期で不可逆的な相)へと移行し、種子を作る(図1左)。近年、アサガオが貧栄養条件下になると開花が早まること(Wada KC et al. 2010)や西洋ナタネが降雨量の少ない乾燥した年に栽培すると降雨量の多い年に栽培した時よりも開花が早くなること(Franks et al. 2007)など、枯死しない程度のストレスが植物に開花を早める効果があることが報告されてきている(図1右)。生理学的な研究はなされておるが、その分子メカニズムは世界的にも明らかにされておらず、分子育種を目的とした知見としては未知な部分が多い。このストレス経路と開花経路の交叉する因子群の分子メカニズムが明らかにされれば、環境ストレスと分子メカニズムの経路の統合という新規な生物学の基礎的な部分が明らかにされると共に環境ストレスを回避して十分な作物生

産を行うための育種戦略へと利用できる。

2. 研究の目的

本研究は、重要作物・モデル植物であるイネと研究の進んだモデル植物であるシ

ロイヌナズナを用い、生存限界に近い環境ストレスが植物生活環で最も重要な生存戦略である開花に及ぼす影響を分子レベルで解析し、その知見を植物が環境ストレスを回避して開花・結実することができるような育種へと応用することを目的とする。植物の非ストレス条件下での相転移の分子メカニズムは、シロイヌナズナやイネなどのモデル植物を用いて大変盛んに研究が行われており、特にシロイヌナズナでは4つの経路が既知の経路として開花に関与することが明らかになっている。本研究では、イネ・シロイヌナズナにおいて既知の開花経路に関わる遺伝子の機能欠失変異体やストレス耐性に变化のあることが既に知られている変異体を用い、これらの変異体に様々な日長処理(短日・長日・恒日など)や様々なストレス処理(乾燥、塩、浸透圧、低温、高温)を施し、開花・ストレス耐性の表現型解析と開花・ストレス関連遺伝子の発現解析を行う(図1参照)。表現型が変化することが明らかになれば、開花の経路とストレスの経路に統合因子が存在することが明らかとなり、それぞれの関連遺伝子の発現解析から、分子レベルでのシグナル伝達が分子遺伝学的に明らかになることが期待される。申請者はシロイヌナズナ開花関連遺伝子の一つである *GIGANTEA (GI)* の変異体 (*gi-3*) に塩処理を行い、ストレス耐性検定、開花



表現型の調査、関連遺伝子の発現解析など様々な解析を行った結果、元来開花制御に関連していると考えられていた *GI* がストレス経路にも関連し、相転移を抑制していることを世界で初めて発見した。これらの結果は、開花経路とストレス経路の一部が *GI* によって統合され、制御されていることを示しており、新規な統合経路を明らかにする一端であると考えている。申請者のこれまでの研究結果を元に、既知のストレス経路・開花経路の双方の変異体を多数用い、ストレス耐性・開花表現型を調査し、分子レベルでの網羅的な遺伝子発現解析を行うことで新規のストレス・開花統合経路の発見につなげていく。これらの知見は、ストレス耐性植物の作成、栽培時期・地域の拡大の可能性を秘めており、これらの可能性の実現を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、イネ・シロイヌナズナの開花およびストレス耐性経路に関わる遺伝子の機能欠失変異体を用い、これらの変異体に塩ストレス処理を施し、開花・ストレス耐性の表現型解析と開花・ストレス関連遺伝子の発現解析を行うことで開花経路とストレス耐性経路の統合経路を解明し、その知見を作物生産・育種へと応用することを目的に研究を行う。

#### (1) シロイヌナズナを用いた開花経路とストレス経路の統合因子の解析

##### ・材料

開花関連因子欠失変異体：*gi*, *co*, *ft*, *soc1*  
ストレス関連因子欠失変異体：*athb6*, *anac055*, *myc2*, *myb2*, *ots1*, *sos1*, *sos2*, *sos3* など

各変異体の野生型：*Col-0*, *Ler*, *Ws*

##### ・方法

日長処理での表現型の確認と遺伝子発現解析

上記遺伝子型の全ての系統を短日条件(8時間明期/16時間暗期)あるいは長日条件(16時間明期/8時間暗期)で処理し、各遺伝子型の日長処理のみでの表現型を確認する。また、これら日長処理中に経時的に葉・茎頂のサンプリングを行い、開花関連遺伝子・ストレス関連遺伝子の発現解析を行う。これにより非ストレス下での表現型と遺伝子発現のプロファイルを明らかにする。

ストレス処理での表現型の確認と遺伝子発現解析

ストレス処理として塩処理を行う。各系統に対して処理濃度・処理温度・処理期間を段階的にもうけた区を設定し、短日条件下あるいは長日条件下で各処理を行う。また、同様に経時的に葉と茎頂のサンプリングを行い、関連遺伝子の発現解析を行う。

#### (2) イネを用いた開花経路とストレス経路の統合因子の解析

##### ・材料

*Oryza sativa* L. 野生型(日本晴・台中65号)  
*Oryza sativa* L. 晩生変異体

##### ・方法

晩生変異体の開花の表現型を調査すると共に発達段階別に既知の開花関連遺伝子発現解析を行う。また、原因遺伝子の単離を行い、同定された遺伝子の機能解析も行う。

### 4. 研究成果

#### <シロイヌナズナを用いた実験>

*myb2*, *myc2*, *hb6* の3つの遺伝子型の全ての系統と野生型である *Col-0* のエコタイプを短日条件、あるいは長日条件で処理し、各遺伝子型の日長処理のみでの表現型を確認した。その結果、日長処理では全ての3つの遺伝子型では野生型と有意な差を確認することはできなかった。このことから、*MYB2*、*MYC2*、*HB6* は通常の条件下では開花に機能していないことが明らかとなった。また、これらの3

つの遺伝子型と野生型である Col-0 のエコタイプに弱い塩ストレスを処理し、ストレス応答と開花表現型を調査した。ストレス応答の表現型として開花までの葉数、根の伸長具合を調査した。myc2、hb6 の変異体では 100mM の塩処理を行ったときに開花までの葉数が若干減少したが、根の伸長度合いには差異は認められなかった。このことから、用いた全ての変異遺伝子型においては弱いストレス条件下では開花に機能を持たないことが明らかとなった。また、野生型において塩ストレスによる早期開花の現象の再現性を確認するため、Col-0 の野生型を様々な塩濃度 (0 ~ 240 mM) 様々な発育ステージ (1 ~ 19 日) で 24 時間処理し、その後に通常の生育条件に戻して開花の表現型を確認した。その結果、発芽後 9 日目での処理は塩濃度に比例して開花が遅れること、発芽後 12 日 ~ 19 日では 240 mM の塩濃度で開花が早くなることを見いだされた。1/2MS 培地を用い、塩処理の期間を 24h、塩濃度を NaCl 0, 30, 60, 120, 180 mM、塩処理を開始する生育段階を発芽後 9, 12 日目または 11, 14 日目とし、長日条件 (16h 22 / 8h 18 ) で栽培した。その後、開花期の評価として抽苔日と抽苔時葉数を計測した。2 遺伝子 (At1G13930、At4G35300) の各 2 アリルずつ 4 系統の耐塩性を評価するため、1/2MS 培地を用い、塩処理の期間を 24h、塩濃度を NaCl 0, 100, 200, 300, 400 mM、塩処理を開始する生育段階を発芽後 11, 14 日目とし、長日条件 (16h 22 / 8h 18 ) で栽培した。塩処理から一週間後に耐塩性の評価として生存率と根長を計測した。その結果、全系統において塩濃度依存的に開花が早くなる傾向が認められ、ストレスによる早期開花経路に 2 つの遺伝子が関与している可能性が示された。

#### < イネを用いた実験 >

イネの晩生変異体 (日本晴 late・台中 65 late) とそれぞれの野生型を用いて実験を行

った。晩生変異体は長日・短日・自然条件の用いた全ての日長において野生型よりも著しい晩生の表現型を示した。また、発達段階における遺伝子発現解析を行ったところ、晩生変異体は開花のスイッチ遺伝子である Hd3a 遺伝子の発現が認められず、日長条件によって開花を促進に切り替えるスイッチの機能が失われているとの結論を得た。更に解析を進め、イネの晩生変異体 (日本晴、台中 65 号、ひとめぼれ、あきたこまち背景) とそれぞれの野生型を用いて実験を行った。晩生変異体は長日・短日・自然条件の用いた全ての日長において野生型よりも晩生の表現型を示した。また、日本晴の変異体において原因遺伝子を次世代シーケンサー解析によって同定したところ、既知の Ehd2 遺伝子の変異体で有り、新しいアリルであることが明らかになった。日本晴晩生変異体 (以下 *nip-late*) は日長感受性を失い、野生型よりも開花が遅延する新規の表現型を示した。次にマッピングを行った結果、原因遺伝子は *Early heading date 2 (Ehd2)* 新規アリルであった。既報の *ehd2* 変異体は長日条件下において開花しないことが報告されていたが、本研究で用いた *nip-late* は、晩生の表現型を示したため、既報の変異体と異なる表現型を示した (Matsubara et al., 2008)。Ehd2 の変異体は他にも報告されており、いずれの変異体においても長日条件下で開花しない表現型を示した (Wu et al., 2008; Hu et al., 2013)。そこで先行研究の生育温度が本研究の生育温度よりも 3 ~ 4 高いことに着目し、長日中温区と長日高温区において開花期を調査した結果、*nip-late* は長日中温区では 120 日で開花したが、長日高温区では 200 日経過しても開花しない表現型を示した。これらのことから、Ehd2 は先行研究で示された光周性開花経路で機能するだけでなく、温度依存的開花シグナルに関与している可能性が本研究によって示唆された。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計2件)

Kitamoto N, Yui S, Nishikawa K, Takahata Y and Yokoi S (2014) A naturally occurring long insertion in the first intron in the *Brassica rapa* *FLC2* gene causes delayed bolting. *Euphytica* 196: 213-223

DOI:10.1007/s10681-013-1025-9

Yoshikawa T, Ozawa S, Sentoku N, Itoh J-I, Nagato Y and Yokoi S (2013) Change of shoot architecture during juvenile-to-adult phase transition in soybean. *Planta* 査読有 238: 229-237

DOI: 10.1007/s00425-013-1895-z

### [学会発表](計15件)

北本 尚子・由比 進・西川 和裕・高畑 義人・横井 修司、長日要求性素材つくな中間母本農2号(*Brassica rapa*)における極晩抽性と*BrSPA4*との関連性 第127回日本育種学会 玉川大学 2015年3月21日~22日

小澤 傑・高畑 義人・横井 修司、*ダイズ*における Juvenile-Adult 相転換期の多様性 第127回日本育種学会 玉川大学 2015年3月21日~22日

吉津 祐貴・横井 修司、イネ晩生変異体の解析から見てきた出穂と温度の関係 岩手大学 CRC ミニシンポジウム、

2015.2.2 岩手大学農学部1号会議室

横井 修司、植物の生長過程を見極める研究 相転移とは? 宮崎大学テニユアトラック推進機構セミナー『植物育種研究の新展開~野菜から作物まで~』

2014.9.25、宮崎大学木花キャンパス農学部

吉津 祐貴・高畑 義人・横井 修司、第9染色体に座乗するイネの新規出穂期関連

遺伝子の解析 第126回日本育種学会 南九州大学(都城)2014年9月26日~27日

小澤 傑・高畑 義人・横井 修司、*ダイズ*の Juvenile-Adult 相転換を制御する因子の解析 第32回日本植物細胞分子生物学会 アイーナ(盛岡) 2014年7月21日~22日

Yoshitsu Y, Takagi H, Natsume S, Yaegashi H, Abe A, Terauchi R and Yokoi S、Identification of a novel allele of Early heading date 2 that encodes flowering promotion gene in rice. *Plant Biology* 2014,2014.7.12-16、ポータルランド、アメリカ

吉津 祐貴・高木 宏樹・夏目 俊・八重樫 弘樹・寺内 良平・高畑 義人・\*横井 修司(2014) MutMap<sup>+</sup>法を用いたイネ開花促進遺伝子 *Ehd2* 新規アリルの同定 第125回日本育種学会 東北大学 2014年3月21日~22日

小澤 傑・吉川 貴徳・長戸 康郎・高畑 義人・横井 修司、*ダイズ*の juvenile-adult 相転換を制御する因子の解析 第7回東北育種研究集会 弘前大学 2013年11月2日

吉津 祐貴・高畑 義人・横井 修司、日長感受性を失ったイネ晩生変異体の開花機構の解析 第124回日本育種学会 鹿児島大学 2013年10月12~13日

吉川 貴徳・小澤 傑・佐山 貴司・笹間 博子・桧原 健一郎・伊藤 純一・石本 政男・横井 修司・長戸 康郎、*ダイズ*における juvenile-adult 相転換の解析 第123回日本育種学会 東京農業大学 2013年3月27~28日

Yokoi S, Furuyama Y, Takahashi M, Aoki W, Takahashi Y, Ebina S, Mimida N and Takahata Y, QTL analysis of bolting time in radish (*Raphanus sativus* L.)

based on SNP markers. 18th Crucifer Genetics Workshop (Brassica 2012), 2012.11.12-16、カタール、イタリア

Yokoi S. Genes controlling flowering time in *Arabidopsis*, *Brassica*, and *Raphanus*. Comparative Genomics and Breeding of Brassicaceae Crops, 2012.10.11 仙台国際会議場(宮城県)

横井 修司・古山 由香利・高橋 美帆・青木 渉・高橋 有・耳田 直純・高畑 義、ダイコンの農業形質の解析および抽苔に関与する QTL の検出 第 122 回 日本育種学会 京都産業大学 2012 年 9 月 14～15 日

島貫 源基・久保 隆洋・高畑 義人・\*横井 修司、シロイヌナズナ開花変異体 *gi-3* を用いた光周性花成経路と塩ストレス経路のクロストークの解析 第 7 回東北育種研究集会 秋田県立大学 2012 年 8 月 20 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横井 修司 (YOKOI, Shuji)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：80346311