

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658026

研究課題名(和文) FLCの発現レベルからみたダイコンにおける脱春化の分子機構

研究課題名(英文) The molecular mechanism of devernalization in relation to FLC gene expression in Japanese radish

研究代表者

土井 元章(Doi, Motoaki)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40164090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ダイコンは、花成に低温を要求する種子春化型植物である。また、低温後の高温により脱春化することが知られている。本研究では、春化・脱春化の分子機構を花成関連遺伝子の発現挙動を調査することで明らかにした。‘早太り聖護院’では低温遭遇によってRsFLCの発現が低下し、その後RsFT、RsSOC1の発現が増大することで開花するようになった。また、9日の低温後に高温に遭遇すると脱春化され、その場合RsFLCの発現はやや回復した。‘早太り聖護院’や‘和歌山’では、RsFLCの発現挙動と春化・脱春化の様相には関連が認められたが、‘時なし’では18日の低温でRsFLCの発現が低下するだけでは春化されなかった。

研究成果の概要(英文)：Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) is a seed-vernalization-type plant requiring chilling for flowering. It is also known that exposure of seeds to high temperature has a devernalization effect. The purpose of this study is to clarify the molecular aspects of vernalization and devernalization of Japanese radish by investigating the expressions of some flowering-related genes. In 'Hayabutori-syogoinn', the expression level of RsFLC decreased with increased duration of chilling and thereafter the expression levels of RsFT and RsSOC1 increased prior to flowering. Exposure of vernalized seeds with 9 days' chilling to high temperature caused devernalization and the RsFLC level was restored a little. Close relations between vernalized or devernalized status and the expression level of RsFLC were observed in 'Hayabutori-syogoinn' and 'Wakayama', but in 'Tokinashi' the low expression levels of RsFLC after exposure to 18 days' chilling did not result in flowering.

研究分野：園芸科学

キーワード：園芸学 ダイコン 春化 脱春化 分子機構 RsFLC

1. 研究開始当初の背景

植物の春化現象の分子機構は、シロイヌナズナを用いた研究によって明らかにされてきた。そこでは、低温によって *FLOWERING LOCUS C (FLC)* 遺伝子座のヒストン H3 の K27 / K9 位がトリメチル化されて選択的にヘテロクロマチン化する (Schmitz ら, 2009; Sung ら, 2006) ことによって生じるエピジェネティックな変化が春化の本質であることが明らかとなっている。この *FLC* の発現抑制により、*FLOWERING LOCUS T (FT)* や *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1)* の転写抑制が外れ、花成が誘導される (Lee・Lee, 2010)。

春化は低温による後作用として花成が誘導されるという点において反応が冗長であると同時に、高温による脱春化、低温～中温による安定化の作用を受ける。ただし、シロイヌナズナではこれらの反応が明確でないこともあって、春化と脱春化や安定化との関係を明らかにした研究は少ない。一方、同じアブラナ科の種子春化型植物であるダイコン *Raphanus sativus* L. では、遭遇した低温の効果は高温によって打ち消されることが知られており、脱春化が明確に起こる。また、低温遭遇量が多くなると脱春化は起こらなくなり、春化状態が安定化する。すなわち、ダイコンは春化と脱春化との関係を分子レベルで解明する上で好適な植物である。

2. 研究の目的

本研究は、モデル植物であるシロイヌナズナの春化に関する分子機構の知見をダイコンに適用し、「脱春化は低温によって起こる *FLC* の発現抑制が高温によって回復する過程であり、安定化の段階に入ると最早 *FLC* の発現抑制が高温遭遇によって回復しない」との初期仮説をたて、春化と脱春化との関係、春化の安定化の状態を *FLOWERING LOCUS C (FLC)* ならびにその関連遺伝子である *FT*、*SOC1* 等の発現解析を通じて理解することを目的としている。本研究により、脱春化の分子機構解明への展望が開けるとともに、登熟春化や低温として有効な温度域や作用効率をマーカー遺伝子の発現量として一元的に捉えることができると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 植物材料および栽培

‘早太り聖護院’、‘時なし’、‘和歌山’の市販種子を供試した。種子を 20・24 時間かけて吸水させて催芽し、温度処理を行った。

18 日以内の低温処理を行う場合は、催芽後に 2・暗黒で必要な期間処理し、その後

ただちにロックウール粒状綿に播種した。18 日を越える低温処理を行う場合は、播種後に 2・12 時間日長下で低温処理した。高温処理は、播種後に与え、30・16 時間日長で処理した。低温処理あるいは高温処理後は 20・16 時間日長下で栽培した。

低温処理を与えない場合には播種時から、低温処理を与えた場合には低温処理終了時から、花茎の長さが 3 cm に達するまでの日数を抽だいまでの日数とし、抽だい率を求めた。また、根出葉数を調査した。

(2) 遺伝子発現解析

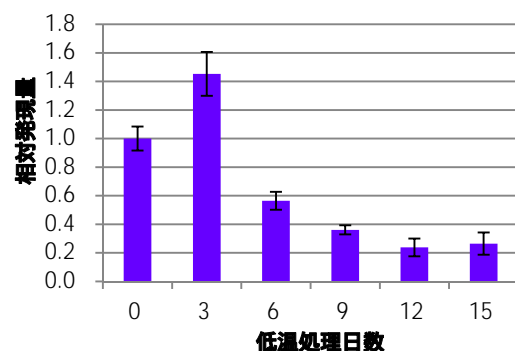
明期終了の 1 時間前である 18 時に子葉または本葉のサンプリングを行い、採取した試料を液体窒素で瞬間冷却して -80 で保存した。セパゾール RNA Super G (ナカライテスク) を用いて試料中の全 RNA を抽出した。RadishBase あるいは *Raphanus sativus* Genome DataBase からシロイヌナズナの *FLC*、*FT*、*SOC1* と相同性が高い配列を検索し、全長配列を得るためのプライマーを設計した。抽出した全 RNA を Rever Tra Ace (TOYOBO) によって逆転写し、これを鋳型として PCR によって目的遺伝子を増幅させた。DynaExpress TA PCR Cloning Kit (TaKaRa) を用いて TA クローニングした。大腸菌からプラスミド DNA を抽出した後、3100 Genetic Analyzer を用いてシーケンス解析した。各遺伝子のシーケンス解析結果に基づき遺伝子発現解析用プライマーを設計した。

温度処理終了後の各時点における子葉あるいは本葉の全 RNA を抽出し、逆転写後の cDNA をテンプレートとして、LightCycler480 (Roche Applied Science) を使用してリアルタイム PCR を行った。*RsActin* の発現量を内部標準として用いた。

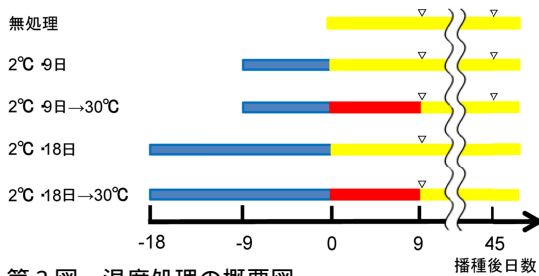
4. 研究成果

(1) ‘早太り聖護院’における春化・脱春化に伴う花成関連遺伝子の発現変化

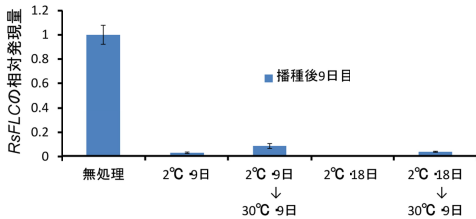
吸水種子に対して 0～15 日の低温処理を与え、20 で 5 日間栽培後の子葉の *RsFLC* レベルを比較した。抽だい率は 0 日および 3 日処理では 0%、6、9、12、15 日処理ではそれぞれの低温処理で 25、90、100、100% となった。*RsFLC* の発現レベルは、無処理を 1 とすると



第 1 図．催芽種子への 2 日の低温処理が‘早太り聖護院’の *RsFLC* の発現に与える影響。



第2図．温度処理の概要図．
青は2℃，黄は30℃，赤は30℃の期間
の時点で最下位葉を採種



第3図．‘早太り聖護院’に対する低温処理あるいはその後の高温処理が発現に及ぼす影響
播種後9日目の発現量を1とした．
バーは標準誤差 (n=3-6) ．

3日間の低温処理によりいったん増加した後、6日間の低温処理では0.5前後に低下し、12日間処理までさらに低下したが、それ以上低温を与えても低いままであった(第1図)。

これとは別の実験で、9日間あるいは18日間の低温処理の有無とその後の9日間の高温処理の有無を組み合わせた温度処理を与えた(第2図)．抽だい率は9日の低温処理によって84%となった．しかし、低温処理後に高温を与えると抽だい率は11%まで下がり、脱春化が起こった．低温処理を18日にのばすと100%抽だいし、その後高温を与えても脱春化しなかった．*RsFLC*の発現は、低温を与えなかった場合に比べ、9日の低温処理で著しく低下し、18日与えるとさらに低下した(第3図)．9日の低温処理後の高温処理は、*RsFLC*の発現レベルをやや回復させた．播種後9日目の*RsFT*および*RsSOC1*の発現は、18日の低温処理で、その後の高温処理の有無に関わらず増加していた(データ省略)．この時点での2・9日処理区の*RsFT*および*RsSOC1*の発現レベルは低かったが、播種後45日目には増加していた．9日の低温処理後に高温を与えると、*RsFT*の発現は増加せず、一方*RsSOC1*の発現は増加したが、無処理区でも増加しており、そのレベルは同程度であった．

播種後18日目からの2・9日の低温処理では、抽だいはみられなかった．18日間の低温処理を与えると、100%抽だいした．9日の低温処理直後において、*RsFLC*の発現は無処理区と同レベルであった(第4図a)．低温処理後9日目における発現量は低下したが、低温処理30日後には無処理区の半分程度まで回復していた．低温処理を18日にのばすと、低温処理直後において発現量は低下しており、その後も発現レベルは低く維持された．

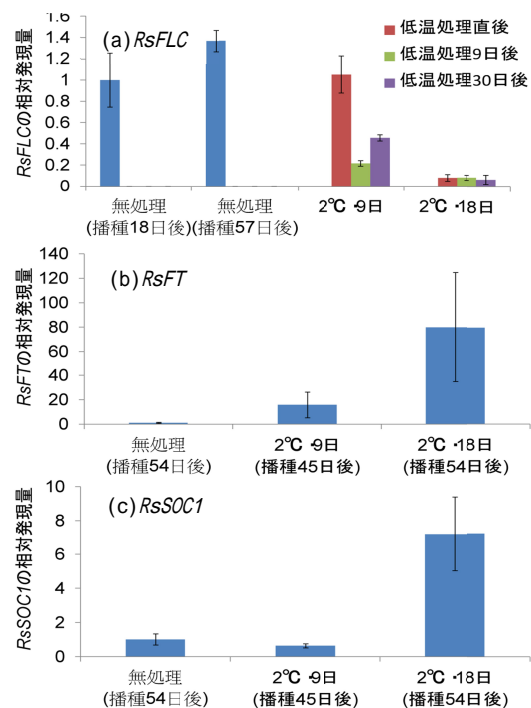
低温処理30日後における*RsFT*、*RsSOC1*は2・18日区で著しく高い発現を示した(第4図b, c)．

(2) 春化・脱春化の品種間差と*RsFLC*の発現
‘和歌山’、‘早太り聖護院’、‘時なし’を供試した：和歌山では2・9日処理で100%抽だいし、低温処理後に高温を与えてもすみやかに開花して、開花率は100%となった．‘和歌山’に対する9日の低温処理後の高温処理は、‘早太り聖護院’で認められたような*RsFLC*の発現の回復をもたらさず、2・9日の時点で春化状態がすでに安定化していたと考えられた．一方、‘時なし’では、9日および18日の低温を与えてもほとんど開花しなかった．しかし、低温や高温処理に対する*RsFLC*の発現は‘早太り聖護院’と同様の挙動を示した．

(3) ‘時なし’が春化する際の花成関連遺伝子の発現変化

‘時なし’では2・18日の低温処理では全く開花しなかったものの、2・36日の低温処理によって抽だい率が69%に達した．播種後27日目における本葉の*RsFLC*の発現は無処理区に比べて2・18日および36日区で大きく低下し、両区において同程度であった．しかし、*RsFT*および*RsSOC1*の発現は36日の低温処理で顕著に増加していた．

(4) ‘時なし’における構成的花成促進経路
‘時なし’を供試し、催芽種子に対する218日間の低温処理の有無の後、20で栽培し続ける区と41日目より30に移す区を設けた．抽だいした株は抽だい部分を取り除いて



第4図．‘早太り聖護院’に対する播種18日目からの低温処理が*RsFLC*、*RsFT*、*RsSOC1*の発現に及ぼす影響
播種後18日目の発現量を1とした．
バーは標準誤差 (n=3-6) ．

摘心し、腋芽の成育様相を観察した。これとは別に、9月下旬に播種して露地に置いたポット植えの株を準備した。播種後348日目まで開花調査を行った。

20区、20区においてそれぞれ81%、63%抽だいたしたが、両区とも抽だいまでの日数は270日以上を要した。これに対して20区、30区、20区、30区の抽だいた率はそれぞれ52%、100%であった。抽だいまでの日数は両区とも100日前後であった。すべての温度処理区において、摘心後の腋芽はロゼットを形成し、これらは一部再抽だいたしたが、再抽だいまでには摘心後180日前後を要した。9月下旬に播種し、露地栽培した場合、4月下旬に一斉に抽だいたした。また、花茎を摘心すると、発生した腋芽は速やかに再抽だいたした。

*RsFLC*は20区・27日目の発現と比較して、20区、20区、30区の抽だい個体の最上位本葉および第4位本葉のいずれにおいても低下していた。また、*RsFT*、*RsSOC1*については、両区で発現の増大がみられた。なお、100%抽だいたした露地区でも花成関連遺伝子は同様の挙動を示したが、その変化の度合いはより大きかった。

(5)考察

シロイヌナズナでは、花成に対して構成的花成促進経路、春化依存花成促進経路、光周期依存花成促進経路およびジベレリン依存花成促進経路の4つの経路がお互いに関連し合いながら花成を制御している(Kimら, 2009; Srikanth・Schmid, 2011)。このうち春化依存花成促進経路においては、春化過程の初期段階でMADSボックス型転写因子である*FLC*がキー遺伝子となって制御されることが知られている(Michaelsら, 1999)。*FLC*は、下流の*FT*や*SOC1*の発現を抑制し、花芽分化を抑制している(Helliwellら, 2006)。低温に遭遇することによって*FLC*遺伝子座のヒストンタンパク質のメチル化修飾を介して*FLC*の発現レベルが低下することで(De Lucia, 2008)、*FT*や*SOC1*の発現抑制が解除されて花芽形成遺伝子が働き、茎頂分裂組織は生殖成長へと移行する(Truckら, 2008)。本研究では同じアブラナ科のダイコンにおいて、3品種を用い、低温や高温遭遇に伴う春化・脱春化の様相とこれらの花成関連遺伝子の発現様相との関連を明らかにした。

標準的な秋蒔き品種である‘早太り聖護院’では、*RsFLC*の発現は低温処理期間が長くなるにつれて低下し、20区・長日下で抽だいが起こる前に*RsFT*、*RsSOC1*の発現が増大することが明らかになった。また、‘早太り聖護院’では、2区・9日間の低温処理により90%近くまで高まった抽だいた率は、30区・9日の処理で低下し、高温によって脱春化されることが確認された。この時、高温処理終了時点で*RsFLC*の発現は20区に置いたものに比べやや回復した。また、*RsFT*および*RsSOC1*の発現は低温処理後45日目においても無処理区

と同レベルに抑えられた。これは高温によって*RsFLC*の発現が一定レベルまで回復し、*RsFT*および*RsSOC1*の発現抑制が解除されなくなったためと考えられる。

18日まで低温期間を延ばすと、最早高温処理を与えても脱春化されなくなった。18日の低温処理終了時点ですでに、*RsFLC*の発現レベルは著しく低く、その後の高温処理を与えても*RsFLC*の発現は低く維持された。また、*RsFT*および*RsSOC1*の発現が低温処理終了後9日目の時点で2区・9日区よりも顕著に高くなった。すなわち春化が安定化した状態は、*RsFLC*の発現レベルが十分に低下して、*RsFT*や*RsSOC1*の発現抑制が解除された状態ととらえることができる。

ダイコンは播種後2日目において低温感応性が最大となり、その後低下するとされている(萩屋・田島, 1956)。「早太り聖護院」においてもこの傾向が認められ、播種後18日目からの9日の低温処理を与えてもほとんど抽だいたしなかった。この場合、9日の低温処理区では処理直後の*RsFLC*の発現レベルが無処理区と違いがなかったことに加え、その後一時的に低下した*RsFLC*レベルは再上昇した。Shindoら(2006)は、シロイヌナズナにおいて低温期間が短いほど、低温処理後一度低下した*FLC*の発現がその後上昇に転じる傾向があるという結果を得ている。すなわち、短期間の低温を与えた場合には低温処理終了以降、*RsFLC*の発現が低下した状態が長くは続かないものと考えられた。しかし、十分に低温遭遇すると*RsFLC*の発現は低温処理終了以降も低く維持されるものと考えられる。シロイヌナズナにおいては、低温期間が長くなるほど*FLC*遺伝子座におけるH3K27トリメチル化が*FLC*遺伝子座の全体に広がり、*FLC*の発現レベルが低くなることが報告されている(Shindoら, 2006; De Luciaら, 2008; Yangら, 2014)。ダイコンの低温遭遇過程における脱春化が起こる段階と春化が安定した段階の違いが*FLC*遺伝子座のヒストンのメチル化とどのように関係するかは興味深いところである。

次に、「早太り聖護院」に比べて春化に必要な低温量が小さい「和歌山」、より大きい「時なし」を用いて比較を行った。低温処理による*RsFLC*の発現低下は3品種とも急激に起こり、低温遭遇に伴う*RsFLC*の発現は類似の挙動を示すことが示された。ただし、「時なし」では18日の低温処理により*RsFLC*の発現レベルは低下していたものの、抽だいたがまったくみられなかった。一方、「和歌山」では、9日の低温処理で100%抽だいたし、低温後に高温を与えても脱春化は起こらなかった。また、低温後の高温処理による*RsFLC*の発現の回復がみられなかった。よって、「和歌山」においてはより短い低温によって高温に対して*RsFLC*の発現レベルが上昇しない状態が生じ、春化が安定化した状態となると考えられる。すなわち、「早太り聖護院」と「和

歌山'では、低温により低下した *RsFLC* の発現レベルの維持されやすさが異なるのではないかと考えられた。

'時なし'では、催芽種子に対する18日間の低温処理によっては、花成を誘導することはできなかった。しかし、低温や高温に対する *RsFLC* の挙動は'早太り聖護院'と全く同じ傾向を示した。'時なし'を開花させるには、低温を36日と長期間与えるか、あるいは20や30で長期間栽培することが必要であった。'時なし'では、18日と38日間の低温処理後における *RsFLC* の発現レベルは同程度であったにも関わらず、38日間低温を与えた場合のみ、*RsFT* および *RsSOC1* の発現が上昇した。このことから、'時なし'においては、低温あるいは高温に対する *RsFLC* の発現は'早太り聖護院'と同様の制御を受けているが、*RsFLC* が低下しても *RsFT* および *RsSOC1* の発現抑制を維持する何らかの要因を考える必要があるように思われる。

'時なし'を20あるいは30で長期間生育を継続すると抽だい・開花する。これは、構成的花成促進経路が働いたものと考えられ、花茎を摘除して発生させた腋芽の再抽だいが春化依存花成促進経路が働いた場合(露地栽培区)に比べてなかなか起こらないことから、全身的に花成能力を獲得する春化依存花成促進経路が働いている場合とは違った様相を呈する。また、抽だいたした個体においては、低温を与えていないにもかかわらず、*RsFLC* の発現は低下していた。シロイヌナズナにおいても *FLC* の発現低下を伴って構成的花成促進経路が働くことが知られている(Liuら, 2007; Baurle・Dean, 2006; Marquardt, 2014)。異なる温度で抽だいたした'時なし'の摘心後の腋芽の再抽だいたの様相と抽だいた時の *RsFT* の発現量から、春化依存的な花成では *RsFLC* の発現が低下し、*RsFT* および *RsSOC1* の発現が増大、花成は全身的に成立する一方、構成的な花成では *RsFLC* の発現は低下するが、*RsFT* の発現は比較的強く維持され、頂芽近傍に限定して生殖成長へ移行すると考えられた。

以上をまとめると、春化要求のあるダイコン品種では、低温遭遇によって *RsFLC* の発現が低下し、その後に *RsFT* および *RsSOC1* の発現が増加することで花芽分化するようになる。'早太り聖護院'では *RsFLC* の発現の挙動と春化・脱春化の様相には関連があり、春化状態が不安定な場合、高温によって *RsFLC* の発現レベルが回復し、その後 *RsFT* および *RsSOC1* の発現の増加が認められない。長期の低温遭遇により春化が安定化した場合には、*RsFLC* の発現は低いままで、低温処理後すみやかに *RsFT* および *RsSOC1* の発現が増加する。一方、'時なし'では長期の低温を与えることで春化するが、*RsFLC* の発現の低下だけでは春化は成立しないと考えられた。

引用文献

- Baurle, I. and C. Dean. 2008. PLoS One 3:e2733.
De Lucia, F. et al. 2008. PNAS. 105: 16831-16836.
萩屋 薫・田島良男. 1951. 園学雑. 20: 51-52.
Helliwell, C. et al. 2006. Plant J. 46: 183-192.
Kim, D. H. et al. 2013. Plant Cell 25: 454-469.
Kim, D., M. R. et al. 2009. Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 25: 277-299.
Lee, J. and I. Lee. 2010. J. Exp. Bot. 61: 2247-2254.
Liu, F. et al. 2007. Mol. Cell 28:398-407.
Marquardt, S. D. et al. 2014. Mol. Cell 54: 156-165.
Michaels, S. D. et al. 1999. Plant Cell 11: 949-956.
Schmitz, R. J. et al. 2009. Plant Physiol. 149:1196-204.
Searle, I. et al. 2006. Genes Dev. 20: 898-912.
Shindo, C. et al. 2006. Genes Dev. 20: 3079-3083.
Srikanth, A. and M. Schmid. 2011. Cell Mol. Life Sci. 68: 2013-2037.
Sung, S. et al. 2006a. Nat. Genet. 38:706-710
Turck, F. et al. 2008. Ann. Rev. Plant Biol. 59: 573-594.
Yang, H. et al. 2014. Curr. Boil. 24: 1793-1797.

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 0件)

[学会発表](計 1件)

田内康裕・大野 翔・細川宗孝・土井元章
2014. ダイコンの構成的花成促進経路の存在
について. 園学研. 14(別1): 498.

[図書](計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

土井 元章(DOI, Motoaki)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 40164090

(2)研究分担者

細川宗孝(HOSOKAWA, Munetaka)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 40301246