

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850005

研究課題名(和文)ダイズの開花期を支配するE1遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of soybean E1 gene controlling flowering time

研究代表者

渡邊 啓史 (Watanabe, Satoshi)

佐賀大学・農学部・講師

研究者番号：40425541

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)：ダイズの遺伝資源が示す開花期の遺伝的多様性に対して、ダイズにおける開花抑制因子であるE1遺伝子および、花成の誘導に関わると考えられるフロリゲン遺伝子の発現量との関係について、フロリゲン遺伝子と開花期の間には高い負の相関が認められた一方で、E1遺伝子の発現量と開花期の間には高い相関が認められなかったことから、E1遺伝子の寄与はダイズ全体の開花期の多様性に及ぼす影響は小さいと考えられた。E1遺伝子の機能解析に利用可能なE1遺伝子の高発現系統としてアキセンゴクや球磨1号等を見出した。一過的発現解析の結果、E1タンパクがダイズフロリゲン遺伝子のプロモーター領域に直接作用する可能性は低いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The correlation among soybean florigen genes expression, flowering suppression E1 gene expression and the genetic diversity of flowering time observed in soybean genetic resources were analyzed. There was strong correlation between flowering phenotype and florigen gene expression level. On the other hand the correlation between E1 gene expression and flowering phenotype was lesser. This phenomenon suggests that the E1 gene has less influence for soybean genetic diversity for flowering. We identified, however, high E1 expression lines originating from soybean genetic resources, such as Akisengoku and Kuma-1. Transient assay expressing E1 and GUS reporter gene controlled under soybean FT2a promoter showed that there is probably no direct interaction between florigen promoter and E1 and the other factors might be included in the system of induction of the soybean florigen gene.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：ダイズ 開花期 遺伝子発現 タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

ダイズの個々の品種が持つ日長感応性の違いは、それぞれの品種の地域適応性に重要な役割を果たしている。これまでの研究において、ダイズの開花および成熟に関わる遺伝子、E1-E8 座が遺伝解析により同定されており、これらの開花期関連遺伝子座のうち、E1 (文献 1)、E2 (文献 2)、E3 (文献 3)、E4 (文献 4) 遺伝子について、その原因遺伝子が明らかとなっている。これらの遺伝子のうち、E1 遺伝子は、174 個のアミノ酸をコードする遺伝子であるが、この E1 遺伝子には明瞭な相同性を示すホモログ遺伝子がアラビドプシスやイネには存在しない。一方、マメ科植物を中心に、バラ科のみならずポプラやユーカリ等の木本類におよぶ範囲まで E1 遺伝子と類似性を示す遺伝子は存在する。しかしながら、ダイズを含めた他の植物種においても E1 遺伝子に類似した遺伝子の機能を明らかにした報告は未だなされていない。アミノ酸配列に基づくタンパク構造の予測と配列上の類似性から、E1 遺伝子は DNA およびタンパクと結合すると予測される B3 ドメインと類似した配列を持つと考えられるが、その機能上のメカニズムは不明である。

E1 遺伝子に作用機構を明らかにすることは、ダイズ育種における開花期、熟性を通じた収量性に関わる遺伝的なメカニズムを明らかにするだけでなく、本研究を介して得られた変異体等はダイズ育種における遺伝的な多様性の拡大に繋がることと期待される。

2. 研究の目的

本研究ではダイズコアコレクションを利用して、E1 遺伝子の発現量が増大した系統を探索する。このような視点から見出された系統群は E1 遺伝子の機能を解析する上で、有用な実験材料としても利用価値が高く、これらの系統群をマイクロアレイ等を用いて比較することで、E1 遺伝子の誘導に関わる因子を同定する。また、E1 遺伝子のタンパク質としての機能に注目し、E1 遺伝子が開花期を遅延させるメカニズムを明らかにするために、E1 タンパクが認識する DNA 配列および相互作用する因子を単離し、その機能をダイズの変異体ライブラリーやモデル植物を利用して立証することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

1) ダイズの遺伝的多様性を網羅する遺伝資源を利用して、E1 遺伝子を高発現させている系統を選抜し、マイクロアレイ等によって E1 遺伝子の発現誘導に関わる要因を同定する。

2) E1 タンパクに対する抗体を作成し、E1 遺伝子を高発現する遺伝資源および恒常的に発現させた形質転換体を用いた免疫沈降法によって、E1 タンパクが結合する DNA 領域および相互作用する未同定の因子を探索する。

3) 候補となる因子について、ダイズ変異体のスクリーニングによる機能の証明およびモデル植物を利用した相互作用の実証を行う。

4. 研究成果

1) ダイズ葉における E1 タンパクの蓄積量の評価

E1 遺伝子に対する抗体の作成と評価を行うために、大腸菌で発現させた組換え E1 タンパクを利用して、E1 タンパクに対するポリクローナル抗体の作成を行った。国産ダイズ品種「エンレイ」を用いて、作成した抗体による E1 タンパクの検出が可能かどうか検証を行った。E1 遺伝子の発現が認められる長日条件下で明期開始から 4 時間毎にサンプリングを行い、E1 遺伝子の発現とタンパクの発現を定量 PCR およびウエスタンブロットによって解析を行った。「エンレイ」を用いた場合、E1 遺伝子の発現は検出可能であったが、E1 タンパクの発現を検出することができなかった。そこで、E1 遺伝子を過剰発現させた形質転換体を用いて同様の解析を行ったところ、E1 遺伝子の発現をタンパク質レベルで検出することが可能であった。そのため今回作成した抗体は E1 タンパクの検出および E1 遺伝子と相互作用する因子の探索に十分に使用可能であると思われる。

2) ダイズコアコレクションを用いた開花期と E1 遺伝子の関連

ダイズコアコレクションを用いた E1 遺伝子の高発現系統を探索するために、「エンレイ」および「タマホマレ」の二品種を用いて、長日条件下での E1 遺伝子の発現時期をさらに詳細に検討を行った結果、E1 遺伝子の発現時期は明期開始後 1 時間で最も高く、明期開始後 5 時間後ではほぼ消失することが明らかとなった。このことはダイズの E1 遺伝子の発現時期が厳密な制御を受けていることを示している。そこでダイズコアコレクションとして選抜された 192 系統を同一の条件下で栽培し、E1 遺伝子の発現とダイズの花成ホルモンと考えられる FT 遺伝子の発現量を半定量 PCR 法によって解析した。各品種が示す開花期と FT 遺伝子との間には有意な負の相関が認められた一方、E1 遺伝子と開花期の相関は有意ではなかった。このことはコアコレクション内の系統には E1 遺伝子を介する花成制御経路とは異なる経路によって花成ホルモンの誘導を行っている系統が存在する可能性を示唆している。また、ダイズコアコレクションの中から、E1 遺伝子の発現量が高い系統を複数見出した。

3) 定量 PCR を用いた E1 遺伝子と開花特性の再評価

半定量 PCR による解析を再度、リアルタイム PCR を用いることで、より正確に評価を行った。コアコレクション 80 系統

の明期開始 1 時間、2 時間の葉から抽出した RNA を分析した結果、ダイズフロリゲン遺伝子と開花期との間には高い負の相関が認められた一方で、E1 遺伝子の発現量と開花期の間には高い相関が認められなかった。ダイズの開花期はダイズフロリゲン遺伝子の発現量を介していることが強く示唆されたが、その制御に及ぼす E1 遺伝子の寄与はダイズ全体の開花期の多様性に及ぼす影響は小さいと考えられた。しかしながら E1 遺伝子の機能を解析するうえで、E1 遺伝子の高発現系統は実験材料として有用であることが期待されることから、コアコレクション内の E1 遺伝子高発現系統の選抜を行ったところ、九州で栽培されている一般的な晩生品種「フクユタカ」と比較して、2 倍ないし 3 倍まで高い E1 遺伝子の発現量を示す品種「アキセンゴク」や「球磨 1 号」等を見出した。これらの品種はこれまでに育成した遺伝子組み換えによる E1 遺伝子高発現系統と比較すると、その発現量は低いものの、免疫沈降等の実験に利用できる可能性があるとして期待される。

4) E1 遺伝子のモデル植物の生育に及ぼす影響の評価

ダイズにおける開花抑制因子である E1 遺伝子が開花期にどのようなメカニズムで影響を及ぼすのか明らかにするために、シロイヌナズナを用いた形質転換体を利用して、ダイズ E1 遺伝子を過剰発現させた場合における表現型への影響を調査した。ダイズのゲノムからクローニングした E1 遺伝子のプロモーター領域を含む 4Kbp の遺伝子断片を導入した形質転換体および 35S プロモーターで過剰発現させた正常型の E1 遺伝子および機能欠損型の e1 対立遺伝子をそれぞれ導入したシロイヌナズナを作成した。それぞれのコンストラクトを導入した形質転換体において導入遺伝子の遺伝子発現は確認できたものの、ウエスタンブロットによる E1 タンパクの明瞭な蓄積を示す個体は認められなかった。またシロイヌナズナの成育へ及ぼす影響を野生型の表現型と比較したが有意な差は認められなかった。このことは E1 遺伝子を導入したシロイヌナズナにおいて、E1 タンパクが翻訳後の安定性が低く、ただちに分解されている可能性や、シロイヌナズナでは E1 と相互作用する遺伝子が存在しないことから、野生型との比較において表現型に差が認められなかった可能性、E1 の細胞内への蓄積が低く表現型に影響を及ぼさなかった可能性が考えられ、今後検証の必要があると思われる。

5) 一過的発現を利用した E1 遺伝子の FT 遺伝子プロモーターに対する抑制効果の検証

E1 遺伝子の細胞内局在をシロイヌナズ

ナのプロトプラストを用いて評価したところ、正常型の対立遺伝子を持つ E1 遺伝子は核に局在するのに対し、劣性の対立遺伝子を持つ e1 遺伝子では核内への局在が細胞質全体へと拡散することで表現型が変化している。自然変異で認められた劣性の対立遺伝子とは異なる変異を持つ 3 種類の劣性 e1 対立遺伝子について細胞内局在を解析したところ、既知の劣性対立遺伝子と同様の局在を示すものが認められた一方で、核に強く局在するものの、早咲きの性質を示す劣性の対立遺伝子も認められた。このことは E1 遺伝子の機能において、細胞内の局在だけでなく、異なるドメインに生じた変化もまた開花期を変化させる特性を持つと考えられた。細胞内局在を解析した E1 遺伝子を発現させるコンストラクトと、ダイズ FT2a プロモーター領域を含む 4Kbp 下に GUS レポーター遺伝子を配置したコンストラクトを別途作成し、タバコ葉（ニコチアナ・ベンサミアナ）を用いた一過的発現によって、E1 遺伝子が FT2a プロモーターに作用し、GUS レポーター遺伝子の発現抑制に機能するかどうかを GUS タンパクの基質を用いた蛍光法で評価を行った。タバコは短日植物であるために、短日条件下と長日条件を比較した場合、短日条件の方が FT2a のプロモーター活性が上昇することからタバコ細胞内で開花誘導に参与する因子がダイズ FT2a プロモーターに結合し、GUS 遺伝子の活性が増加したと考えられた。E1 遺伝子を共発現させ、正常型と劣性型の E1 対立遺伝子の違いによって GUS レポーター遺伝子の抑制の有無について評価を行ったところ、長日条件、短日条件のいずれにおいても正常型と劣性の対立遺伝子間にレポーター遺伝子の抑制には大きな差が認められなかった。このことは E1 タンパクが直接のターゲットとしている DNA 配列は FT2a プロモーターではない可能性や、ダイズの葉で認められる E1 遺伝子の核内に存在する E1 タンパクの量の違いが、タバコを用いた一過的発現解析では十分に再現できていない可能性等が考えられ、今後の検証が必要である。

<引用文献>

- 文献 1) Xia et al. (2012) Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus E1 that regulates photoperiodic flowering PNAS 2012 109 (32) E2155-E2164;
文献 2) Watanabe, S. et al. (2011) A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the GIGANTEA gene is involved in soybean maturity and flowering. Genetics 188: 395-407
文献 3) Watanabe, S. et al. (2009) Map-based cloning of the gene associated

with the soybean maturity locus E3.
Genetics 182: 1251-1262.

文献 4) Liu, B et al. (2008) Genetic
redundancy in soybean photoresponses
associated with duplication of the
phytochrome A gene. Genetics 180:
995-1007.

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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 啓史 (WATANABE, Satoshi)

佐賀大学農学部・講師

研究者番号：40425541

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

研究者番号：