

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14622

研究課題名(和文)イネの生育温度と開花シグナルの調節機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of mechanism of growth temperature and flowering signal in rice

研究代表者

横井 修司(Yokoi, Shuji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：80346311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：イネの生育気温を認識し花成を誘導するシグナル伝達経路は、Ehd1を介してHd3aやRFT1の転写を制御していることが示唆された。さらに今回解析した開花関連遺伝子は、短日処理後2日または3日目から発現量が変化することが示された。これらの結果から、イネは日長や気温の生育環境が大きく変化した場合、3日で生育環境を認識し花成シグナルの形成を始めることが示された。

研究成果の概要(英文)：It was suggested that the signal transduction pathway recognizing rice growth temperature and inducing flower formation controls transcription of Hd3a and RFT1 via Ehd1. Furthermore, it was shown that the expression level of the flowering related gene analyzed this time is changed from 2 days or 3 days after short day treatment. From these results, it was shown that the rice grows the flowering signal by recognizing the habitat environment in 3 days when the photoperiod and the growth environment of the air temperature change significantly.

研究分野：農学

キーワード：イネ 気温 地上部、地下部

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。植物は通常の生育に適した温度条件下では、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。イネの開花は短日条件になると生物時計からのシグナルを受け、葉において OsGI-Hd1-Hd3aの3つの因子が活性化されることで起こる現象である。この経路の最終産物は花成ホルモンであるフロリゲンと考えられているHd3aタンパク質として篩管を通過して茎頂に達し(Tamaki et al. 2007 *Science*)、そこで他のタンパク質と複合体を形成して花成を誘導する。この反応はイネの生育に適した温度で起こる反応であるが、申請者は、イネの花成誘導が低温下では通常通りに行われず、非常に遅くなることを見いだした。このことは、イネは花成誘導をする場合、日長を判断する以前に温度(水温と気温)を正確に把握し、温度条件が不相当である場合には日長のシグナルをキャンセルする機能があることを示唆している。申請者は、イネの花成ホルモンであるフロリゲンが温度の制御を強く受けていることを想定し、以下の事を明らかにしようと考えている。

1. 花成シグナルは温度によって葉における発現調節を受けているか?
2. 花成シグナルは温度によって篩管における移動調節を受けているか?
3. 花成シグナルは温度によって茎頂における複合体の形成調節を受けているか?

以上の研究から、イネは最初に温度を感受して生育環境を判断し、その後日長の変化を感受していることを世界に先駆けて明らかにすることを目的としている。

これまでのイネの花成誘導研究は、温度の条件が適温で一定で有り、寒冷地や高地の農業現場でしばしば生じる低温生育環境での花成誘導についての研究は皆無であった。本研究はイネの開花誘導は温度感受が基盤となって始まり、次の日長感受のステップへとつながっていることを明らかにする学術的な特色がある。また本研究の成果は、イネの開花誘導を温度制御によってコントロールできる可能性を秘めており、従来栽培不可能だった時期や場所でも作物栽培ができるようになることや、教科書を書き換える現象となり、生物学的にも農学的にも非常に意義のある研究である。

2. 研究の目的

イネのフロリゲンと考えられている Hd3a タンパク質は、短日条件で葉において合成さ

れ、篩管を通過して茎頂に運ばれ、茎頂で他のタンパク質と複合体を形成して開花(出穂)を引き起こすことが知られている。本研究では、上述のような短日条件下のイネの花成誘導が温度の制御を受けて大きく調節されている可能性を検証することを目的として研究を行う。この研究は、既知の光周性花成経路の基盤となるメカニズムの根底には、イネの葉と茎頂における温度感受が最も初期の反応で有り、必須である事を明らかにする世界で初めての研究である。この研究成果は、農業的にはイネの栽培時期や場所を温度管理によって従来とは異なる方法に変えることができ、生物学的にもインパクトの高い成果となる。

3. 研究の方法

イネの花成ホルモンである Hd3a タンパク質が温度制御によって調節されていることを明らかにするため、以下の実験を行う。

- (1) 生育温度を変えたイネ野生型を様々な日長処理し、開花の表現型調査と開花関連遺伝子の発現解析を行う
- (2) Hd3a:GFP を篩管特異的 *roIC* プロモーターで誘導する早咲き形質転換イネを温度処理・日長処理し、GFP 蛍光を利用して Hd3a タンパク質の葉での発現パターン、篩管内・茎頂での移動、細胞内局在を解析する

<平成 27 年度>

1, 生育温度による日長感受性の変化と遺伝子発現の解析

・材料

野生型品種: 農林 8 号

形質転換イネ: *roIC pro:Hd3a:GFP*

Hd3a pro:Hd3a:GFP

・方法

(1) 表現型の調査

野生型と形質転換体を長日条件下(14 時間日長)の高温区(25 明期/22 暗期)で幼穂形成期の 3 週間前まで生育させる。この後、低温区(25 明期/22 暗期)と高温区(25 明期/22 暗期)に移動させ、短日条件(10 時間日長)で生育させ、開花誘導を行う。開花の表現型(幼穂形成)を調査し、温度の処理が開花に与える影響を調査する。このとき、水温と気温を別々に制御し、気温と水温の影響を区別する。*roIC* プロモーターは篩管特異的に発現誘導するプロモーターであり、通常の高温区では開花が早まることが確認されている。日長処理により開花誘導されているにもかかわらず低温区で幼穂形成がなされているか、その時期が遅延するか否かを調査する。

(2) 遺伝子発現調査

上記(1)の発芽後から幼穂形成 3 週間前までの生育調査の間は 5 日間ごと、温度・日長処理後は 2 日ごとに葉とメリステムのサンプリングを行い、既知の開花関連遺伝子の遺伝子発現解析を行う。これにより、温度や日長

の処理によって遺伝子発現が変化する開花関連遺伝子を調査し、温度と日長による開花関連遺伝子ネットワークを解析する。

<平成 28 年度>

1. 生育温度によるフロリゲン Hd3a タンパク質の挙動の解析

・材料

イネ野生型：農林 8 号

形質転換イネ：*rolC pro:Hd3a:GFP*、*Hd3a pro:Hd3a:GFP* (共に農林 8 号背景)

イネ培養細胞：0c 細胞

・方法

(1) 温度処理と Hd3a タンパク質の葉・茎頂における挙動の解析

通常の生育温度で生育させた上記各系統をコントロールとし、温度処理・日長処理を施した各系統の葉・茎頂における Hd3a タンパク質の局在パターンを発芽後から幼穂形成時にかけて経時的に観察する。観察は共焦点蛍光顕微鏡によって観察する。また、遺伝子の発現量を Hd3a と GFP の両方の遺伝子を用いて測定し、内在の Hd3a と区別して解析する。これにより、温度処理による Hd3a タンパク質の局在変化、遺伝子発現制御が転写レベルなのか転写後レベルなのかも明らかにする。

(2) Hd3a タンパク質の複合体形成調節の解析

Hd3a タンパク質は葉で生産され、茎頂に運ばれ、茎頂で 14-3-3 タンパク質が複合体を形成し、OsFD プロモーターに結合、そのシグナルが下流に流れ、花芽形成に関わる転写因子である OsMADS14 あるいは OsMADS15 遺伝子を活性化して花芽を形成することが知られている。この複合体形成が温度依存的に行われるか否かをイネ培養細胞を用いた一過的発現解析系を用いて解析する。OsFD 遺伝子のプロモーターに luciferase 遺伝子を連結したコンストラクトを作製し、リポーターとする。CaMV35S プロモーターに Hd3a を連結したコンストラクトを作製し、これをエフェクターとして使用する。培養細胞に温度処理を行い、luciferase の発光を測定することで、温度処理による複合体の形成パターンを解析する。

(3) OsFD と Hd3a の結合強度の解析

14-3-3、OsFD、Hd3a と RCN (Hd3a の拮抗抑制因子と考えられている) の 4 つのタンパク質に His、Flag、Myc、GST タグを付加した状態で大腸菌にて産生させた組換えタンパク質を用意する。これらの組換えタンパク質をそれぞれに組み合わせ、温度処理したイネ細胞抽出液と混合し、それぞれのタンパク質のアフィニティを濃度依存結合実験とウェスタンブロットングで検出する。このことから、複合体形成と温度の関係を明らかにする。

2. 生育温度による日長感受性の変化と遺伝子発現の解析

・材料

野生型品種：農林 8 号

形質転換イネ：

rolC pro:Hd3a:GFP (農林 8 号背景)

Hd3a pro:Hd3a:GFP (農林 8 号背景)

・方法

H27 年度に行った(1)表現型の調査と(2)遺伝子発現調査の再現性を調査すると共に、自然日長下での調査を加え、自然日長下でも同様に温度の感受が基盤となって開花制御がスタートしているか否かを解析する。これは実際の農業現場での栽培に本研究の成果を応用することを前提として行う。

4. 研究成果

<H27 年度の成果>

日本型水稻品種である日本晴を 35 日間長日条件下(明期 16 時間、20 /15)で生育させ、その後短日処理の高気温区(明期 12 時間 25 /20)と低気温区(明期 12 時間 20 /15)でそれぞれ栽培した。いずれの生育条件も水温は全て 25 一定に制御し、イネの生長点が水中に浸るよう水位を維持した。幼穂形成後は温室に移動し、出穂日を調査した。また短日処理開始前日から処理後 8 日目までの 10 日間、および短日処理開始から 10 日目と 20 日目の合計 12 点で各日明期開始時から 8 時間おきに葉を採取し、開花関連遺伝子の発現解析を行った。高気温区と低気温区の出穂日を比較した結果、低気温区に比べて高気温区は 13 日程早く出穂した。また、幼穂形成日(幼穂長が 1.5 mm に到達した日)を調査した結果、高気温区では短日処理後 14 日、低気温区では 27 日程度で幼穂形成日に到達した。次にイネの花成シグナルとして知られる *Hd3a* と *RFT1* の発現量を高気温区と低気温区で比較した結果、高気温区では処理後 2 日目から *Hd3a* と *RFT1* の発現量が増加し、8 日目にピークに達した。低気温区では *Hd3a* と *RFT1* の発現量が 4 日目から増加し始めたが、8 日目や 20 日目においても高気温区のピーク時に比べて低い発現量であった。また、既知の開花関連遺伝子は日長依存的に発現量が変化した遺伝子と気温依存的に発現量が変化した遺伝子が見られた。水温と気温を独立に制御するシステムを利用することによって、短日下のイネの花成シグナル形成における気温の影響を形態的、分子生物学的に評価することができた。本実験の生育環境下で栽培したイネにおいては、気温が 5 異なることによって幼穂形成日が 10 日以上異なることが明らかとなった。既知の開花関連遺伝子の発現解析の結果から、イネの花成シグナルである *Hd3a* や *RFT1* の発現量は気温依存的であり、それらの遺伝子の転写を上流で制御する *Ehd1* の発現量も気温依存的に変化した。これらの結果から、イネの生育気温を認識し花成を誘導するシグナル伝達経路は、*Ehd1* を介して *Hd3a* や *RFT1* の転写を制御していることが示唆された。さらに今回解

析した開花関連遺伝子は、短日処理後2日または3日目から発現量が変化することが示された。これらの結果から、イネは日長や気温の生育環境が大きく変化した場合、3日で生育環境を認識し花成シグナルの形成を始めることが示された。

< H28年度の成果 >

水温と気温を独立に制御するシステムを利用することによって、短日下のイネの花成シグナル形成における気温の影響を形態的、分子生物学的に評価した。既知の開花関連遺伝子の発現解析から、イネのフロリゲンをコードする Hd3a や RFT1 の発現量は温度依存的に変化し、その上流の Ehd1 の発現量も同様に変化することを見出している。さらなる発現解析の結果から、Ehd1 と同様に Hd3a や RFT1 の転写を調節する Hd1 の発現量は温度によって変化しないが、Ehd1 の転写を調節する Ehd2 の発現量は温度依存的に変化することが示された。また、独立した実験系において、ehd2 変異体は長日条件下において温度依存的に異なる表現型を示すことを見出している。これらの結果から、Ehd2-Ehd1-Hd3a/RFT1 のシグナル伝達経路がイネの温度依存的な花成シグナル形成に重要であることが示唆された。しかしながら、Hd3a や RFT1 のタンパク質が温度依存的にどのような挙動を示すのかは不明瞭である。また、Ehd1 や Ehd2 が温度依存的にどのように機能しているかを明らかにするためにさらなる実験が必要である。Hd3a のタンパク質の挙動を確認するために、それらのタンパク質と蛍光タンパク質を結合したコンストラクトを導入した形質転換体を作成するための形質転換を行った。現在までの所、選抜培地上で抗生物質耐性のカルスが複数えられている。

また、日本晴を背景とする ehd2 変異体は所持しているが、日本晴背景の ehd1 変異体は報告されていないため、CRISPR/Cas9 システムを利用した ehd1 機能欠損系統の作出を試みている。現在はコンストラクトを作製した段階であり、今後イネのカルスに形質転換を行う予定である。

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. Zaki HEM and Yokoi S (2016) A comparative *in vitro* study of salt tolerance in cultivated tomato and related wild species. *Plant Biotechnology* 33: 361-372
DOI:10.5511/plantbiotechnology.16.1006a (査読有)
2. Kitashiba H, Taguchi K, Kaneko I, Inaba K, Yokoi S, Takahata Y and Nishio T. (2016) Identification of loci

associated with embryo yield in microspore culture of *Brassica rapa* by segregation distortion analysis.

Plant Cell Reports 35: 2197-2204 DOI 10.1007/s00299-016-2029-4 (査読有)

3. Koumoto T, Saito N, Aoki N, Iwasaki T, Kawai S, Yokoi S and Shimono H (2016) Effects of salt and low light intensity during the vegetative stage on susceptibility of rice to male sterility induced by chilling stress during the reproductive stage. *Plant Production Science* 19: 497-507
DOI: 10.1080/1343943X.2016.1190283 (査読有)
4. Shimono H, Abe A, Aoki N, Koumoto T, Sato M, Yokoi S, Kuroda E, Endo T, Saeki K-I and Nagano K (2016) Combining mapping of physiological quantitative trait loci and transcriptome for cold tolerance for counteracting male sterility induced by low temperatures during reproductive stage in rice. *Physiologia Plantarum* 157:175-192
DOI:10.1111/ppl.12410 (査読有)
5. Takahashi Y, Yokoi S and Takahata Y (2016) Genetic divergence of turnip (*Brassica rapa* L. em. Metzg. Subsp. *rapa*) inferred from simple sequence repeats in chloroplast and nuclear genomes and morphology. *Genetic Resources and Crop Evolution* 63: 869-879 DOI 10.1007/s10722-015-0290-y (査読有)

[学会発表](計9件)

1. 小澤 傑・畠山 勝徳・高畑 義人・横井 修司 (2016) 長日条件下のダイズ栽培品種 Peking では、*miR172* の生合成が抑制される **第130回日本育種学会** 鳥取大学 2016年9月24日~25日
2. 吉津 祐貴・岡田 益巳・小野寺 大樹・高畑 義人・横井 修司 (2016) 気温が短日下のイネの花成シグナル形成に及ぼす影響 **第129回日本育種学会** 横浜市立大学 2016年3月21日~22日
3. 小澤 傑・高畑 義人・横井 修司 (2016) ダイズの Juvenile - Adult 相転換は日長感応性によって制御されている **第129回日本育種学会** 横浜市立大学 2016年3月21日~22日
4. 横井 修司 (2015) 植物の相転移と記憶メカニズム解明 **第15回けいはんな地区植物科学懇談会**・サントリーグローバルイノベーションセンター1階ホール 10月30日
5. 野々上 慈徳・高木 宏樹・八重樫 弘樹・

- 菊池 秀子・夏目 俊・宇津志 博恵・小笠原 由美子・吉津 祐貴・**横井 修司**・寺内 良平・阿部 陽(2015)東北地方北部のイネ栽培品種に重要な出穂期関連遺伝子の同定 **第128回日本育種学会** 新潟大学 2015年9月11日~12日
6. 吉津 祐貴・高畑 義人・**横井 修司**(2015)イネにおける *Ehd2* を介した生育温度依存的な開花シグナルの解析 **第128回日本育種学会** 新潟大学 2015年9月11日~12日
7. 後藤 及美・高畑 義人・**横井 修司**(2015)シロイヌナズナ塩ストレス関連変異体を用いた開花経路とストレス経路の相互関係の解析 **第128回日本育種学会** 新潟大学 2015年9月11日~12日
8. 鳥影 玲子・河本 健正・下野 裕之・高畑 義人・**横井 修司**(2015)イネにおける *miRNA528* の障害型冷害への機能の解析 **第128回日本育種学会** 新潟大学 2015年9月11日~12日
9. **横井 修司**(2015)植物の相転移メカニズムの解明を目指す研究 大阪府立大学生命環境科学研究科 **平成27年度応用生命科学専攻ランチョンセミナー** 大阪府立大学B11棟第4講義室 4月17日

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称:植物の次世代における開花制御法および開花時期を制御した種苗

発明者:**横井修司**、下野裕之、河本健正

権利者:**横井修司**、下野裕之、河本健正

種類:特許権

番号:2016-182094

出願年月日:2016年10月20日

国内外の別:国内

名称:植物の次世代におけるストレス抵抗性強化法およびストレス抵抗性を強化された種苗

発明者:下野裕之、**横井修司**、河本健正

権利者:下野裕之、**横井修司**、河本健正

種類:特許権

番号:2015-181370

出願年月日:2015年10月22日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

横井 修司(Shuji YOKOI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号:80346311