

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780001
 研究課題名 (和文)
 イネの環境シグナルの受容と相転移メカニズムの分子学的解析と育種への応用
 研究課題名 (英文)
 Analysis of molecular mechanisms of perception of signaling and floral transition in rice.
 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

研究成果の概要：植物の環境シグナル受容経路と相転移経路のシグナル伝達経路の相互関係を分子学的に明らかにすることを目的に研究を行った。極晩生イネ変異体を用いた研究から、変異体は14時間明期の長日条件下、10時間明期の短日条件下の両人工日長下では開花が認められないが、14時間明期をピークとした自然日長下では開花が認められるという新しい表現型を示すことが明らかとなった。また遺伝子発現解析から、Hd3a 遺伝子の発現が全ての条件下で認められないことも確認された。シロイヌナズナを用いた研究では、野生型に塩処理を行った場合に未処理の個体と比較して開花が早まること、開花経路で機能する *GIGANTEA* 遺伝子が機能欠失すると塩ストレスに感受性になることを明らかにした。以上のようにイネとシロイヌナズナにおいて、環境シグナルや環境ストレスから相転移への新しい相関関係を生理学的、分子学的に明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	0	2,500,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	240,000	3,540,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物分子育種

1. 研究開始当初の背景

植物が季節と時間をしり、花を咲かせ、種子をつけることは移動性の乏しい植物にとって重要な生殖戦略である。この生殖戦略には、気温・日長・湿度などの様々な環境要因

が関わっており、植物はその環境要因の変化を敏感に感じ取って絶妙なタイミングで花を咲かせて種子をつける。植物は、播種後に個体を成長させるための基本となる幼若成長相 (juvenile phase) を経て、植物種に固

有の環境条件が整うと成熟栄養成長相(adult phase)へと転移し、最終的に花を咲かせるプログラムを遂行する生殖成長期

(reproductive phase)と呼ばれる成長期へと転移する。この各々の移行は相転移(phase transition)と呼ばれる。この相転移の研究は、植物生殖戦略の分子メカニズムを明らかにする生物学的な発見と同時に、人為的な開花時期のコントロールを始めとした農作物や花卉類の栽培時期・地域の拡大のような農業の発展にもつながる研究である。

この環境の変化に対する植物の相転移の反応は、成熟栄養生長期から生殖成長期への開花のシグナル伝達の現象としてシロイヌナズナやイネなどのモデル植物を中心に世界的に研究が行われている。相転移の引き金となる現象はシロイヌナズナでは春化处理・日長・ジベレリン・自律的のような環境要因が、イネでは日長・自律的な環境要因が知られている。これらの環境要因の処理の元で開花時期の変化した突然変異体の解析から様々な因子が関わっていることが明らかになってきているが、特に日長の違いによる開花のシグナル伝達経路(光周性経路)は、長日植物のシロイヌナズナと短日植物のイネで遺伝的に明らかになっている。これらの研究を含んだ開花の分子メカニズムの解析は、世界的にも研究が盛んに行われており、多くの因子が単離・同定されてきている。しかし、これらの研究は成熟栄養成長期から生殖成長へと移行する段階の分子メカニズムを対象とした研究である。幼若栄養生長期における植物は、劣悪環境でない限り環境変動への反応性が非常に乏しく、環境が変化しても個体の成長期である栄養生長を続け、その後環境変化に应答できるようになる。この幼若栄養生長期に植物が環境に应答できるようになるためのメカニズムの研究は世界的にも皆無に等しい。

本研究では、植物、特にイネが何のシグナルを感受、あるいは生産し、幼若栄養成長期を終えて環境に应答できるようになるかを分子学的に明らかにすることを目的に研究を行う。また、低温や乾燥などの劣悪環境下でも、植物は緊急的に幼若栄養成長相から成熟栄養成長相へ相転移を行うことが知られており、それらの分子メカニズムも解析していく。

2. 研究の目的

(1) 栄養成長期を調節する因子の単離とシグナル伝達経路の解明

申請者は栄養成長期が長く、自然日長下では開花しない、あるいは開花が遅れるイネの突然変異体を得ている。これら突然変異体は

自然日長下で相転移に必要な調節が出来ない栄養成長の変異体であることがわかる。変異体の原因遺伝子の単離と変異体を用いた開花関連遺伝子の発現解析をすることで、栄養成長を調節する因子とシグナル伝達のネットワークを明らかにすることを目的とする。

(2) ストレス条件下での相転移のシグナル伝達経路の解析

シロイヌナズナの野生型に塩処理を行い、開花が促進されるか否か、相転移の表現型を調査すると同時に相転移関連因子の遺伝子発現解析を行う。また、開花経路に機能する *GIGANTEA* 遺伝子の変異体 (*gi-3*) にも同様の処理を行い、相転移シグナル伝達経路とストレス誘導による相転移のシグナル伝達経路の関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 晩生イネ変異体の解析

平成19年度は自然日長下では開花しないイネの突然変異体の表現型の解析と開花関連遺伝子の発現解析を中心に行った。

遅咲き変異体は日本晴バックグラウンドの変異体であり、岡山大学の前川教授から分譲を受けた。この変異体は、日本の自然日長下(≒長日条件)では開花が遅延する表現型を元に単離された。イネにおいて、開花関連遺伝子はこれまでの研究から短日条件、長日条件の両条件下において明らかになっている (Yano *et al.* 2000 *Plant Cell*; Hayama *et al.* 2002 *Plant Cell Physiol*; Hayama *et al.* 2003 *Nature*; Yokoi *et al.* 未発表データ)。これらの既知の開花関連遺伝子に遅咲き変異体の原因遺伝子が関与しているか否かを自然条件下と日長条件を人為的に制御して発達段階を追って発現解析を行った。遅咲き変異体の原因遺伝子がこれらのシグナル伝達経路に関与しているか否かを明らかにし、栄養成長期から生殖成長期への相転移以前の新規な経路と既知の相転移時の経路との相関関係を分子生物学的に考察した。

(2) シロイヌナズナにおけるストレス経路と開花経路の相関関係の解析

シロイヌナズナを長日条件下(16時間明期/8時間暗期)で生育させ、播種後25日目に塩ストレス処理(0mM~250mM)を3日間行い、その後に通常の培地に戻して開花までの葉数(ロゼット葉)を測定した。また塩処理後30分・1時間・2時間・5時間と経時的に葉をサンプリングし、ストレス特異的遺伝子の発現を調査した。

4. 研究成果

(1) 晩生イネ変異体の解析

日本晴野生型と遅咲き変異体を自然日長下、長日条件下（14時間明期・10時間暗期）、短日条件下（10時間明期・14時間暗期）の3つの条件下で生育させ、開花までの日数を調査した。その結果、野生型では長日条件下で100日前後、短日条件下では60日前後で開花するのに対して、遅咲き変異体では長日条件下、短日条件下の両条件下で230日以上経過しても開花する事はなかった（図1）。

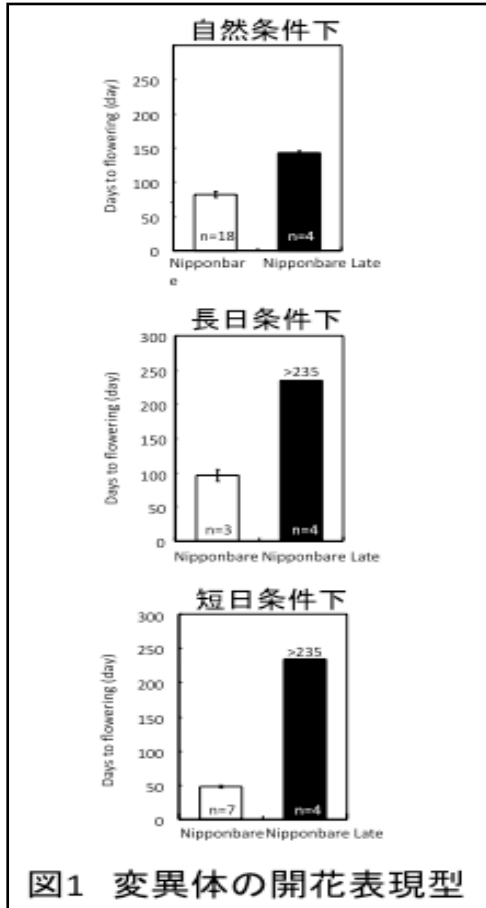


図1 変異体の開花表現型

しかし、自然日長下では150日程度で開花が認められた。この事から、遅咲き変異体は14時間以上の暗期が必要である事が明らかになった。また、遅咲き変異体では、これら3つの条件下での開花関連遺伝子の発現解析からHd3aの発現がすべての条件に置いて認められなかった事から、Hd3a自体に変異がある、あるいはその調節機構に変異がある可能性が認められた（図2）。野生型と変異体との間の葉の展開速度に差異は認められない事から、この変異体は新規な変異体である可能性が考えられた。

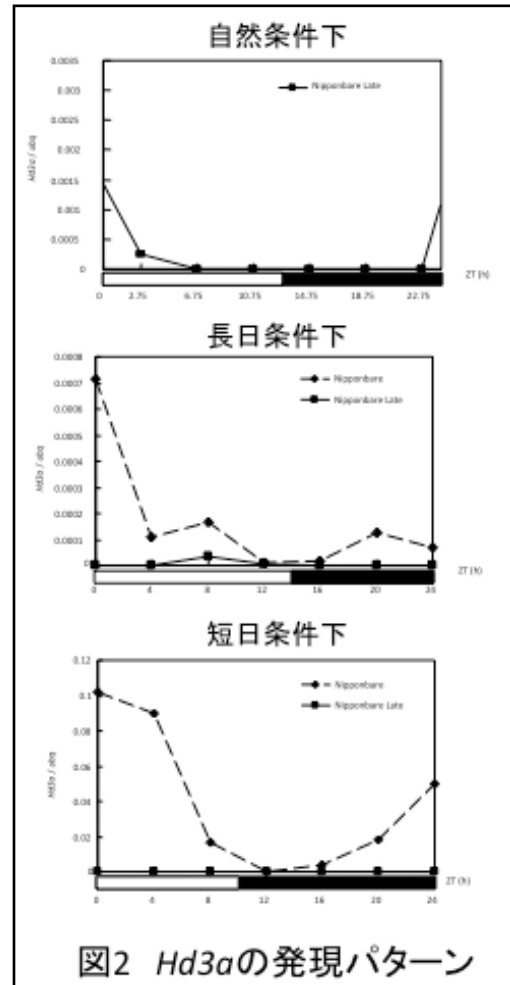


図2 Hd3aの発現パターン

(2) シロイヌナズナにおける解析

シロイヌナズナ野生型を長日条件（16時間明期/8時間暗期）においてMS培地上で生育させ、31日後に0mM・150mM・200mM・250mMの塩ストレス処理を3日間行い、その後塩を含まない培地に戻して開花までの葉数（ロゼット葉）を測定した。その結果、野生型では塩処理を施した場合にロゼット葉の枚数が減少し、開花が早まることを明らかにした（図3）。野生型とgi-3変異体に250mMの塩処理を行ったところ、gi-3変異体では野生型と比較して塩処理に感受性が高いことを見いだした（図4）。

また、塩処理後30分・1時間・2時間・5時間と経時的に葉をサンプリングし、ストレス特異的に発現上昇するrd29A遺伝子の発現を調査したところ、野生型では処理時間に応じて発現上昇が確認されたが、gi-3変異体においては野生型の数倍〜数十倍の高い発現が確認された（図5）。

これによりgi-3変異体では塩処理によるストレスシグナル経路が野生型よりも活性化されており、塩ストレスに対し

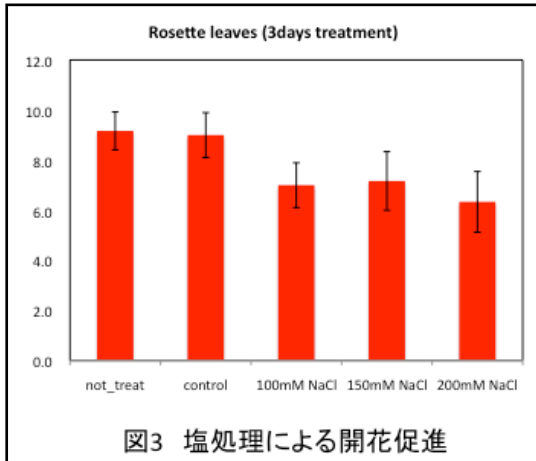


図3 塩処理による開花促進

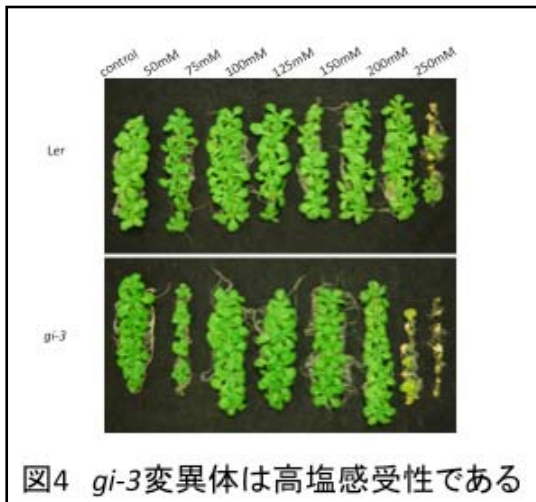


図4 gi-3変異体は高塩感受性である

て非常に感受性が高まっていることが予想された。同様に低温処理 (4°C) による *rd29A* の発現パターンを確認したが、野生型との差異は見られなかった。以上より、*GI* 遺伝子は塩ストレスに特異的に機能しており、開花経路とストレス経路のクロストークに機能している可能性が示唆された。

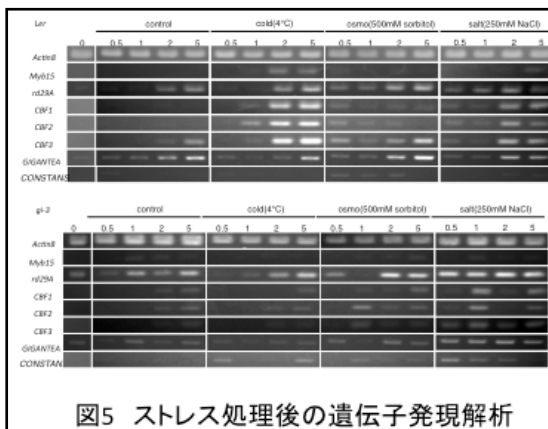


図5 ストレス処理後の遺伝子発現解析

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 3 件)

- ①. Abe M, Fujiwara M, Kurotani K-I, Yokoi S and Shimamoto K. Identification of dynamin as an interactor of rice GIGANTEA by tandem-affinity purification (TAP). *Plant Cell Physiology* 49: 420-432 (2008) 査読有り
- ②. Komiya R, Ikegami A, Tamaki S, Yokoi S and Shimamoto K. Hd3a and RFT are essential for flowering in rice. *Development* 135: 767-774 (2008) 査読有り
- ③. Tamaki S, Matsuo S, Wong LH, Yokoi S and Shimamoto K. Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* 316: 1033-1036 (2007) 査読有り

[学会発表] (計 30 件)

1. 高橋 有・横井 修司・河瀬 眞琴・高畑 義人 マイクロサテライトに基づく *Brassica rapa* の遺伝的類縁関係 第 115 回 日本育種学会 つくば国際会議場 (2009)
2. 土井 寿子・高橋 亮・日影 孝志・横井 修司・高畑 義人 リンドウ (*Gentiana triflora*, *G. scabra*) の未受精胚からの胚様体形成と植物体再生 第 115 回 日本育種学会 つくば国際会議場 (2009)
3. Zaki H, Yokoi S and Takahata Y. Isolation and characterization of the genes related to root shape in radish. IU-UGAS, IU-GSA, IU-COE joint symposium - The effect of climate change on biological systems in cold regions- Morioka, Japan (2008)
4. Hareyama S-I, Yokoi S, Goto A, Tsuwamoto R and Takahata Y (2008) Identification and characterization of genes expressed in acquisition of desiccation tolerance of microspore-derived embryos of *Brassica napus*. The 5th ISHS International Symposium on Brassicas Lillehammer, Norway
5. Sakai M, Yokoi S and Takahata Y (2008) Isolation of microspore embryogenesis specific genes in Rapeseed using embryo specific promoter. The 5th ISHS International Symposium on Brassicas Lillehammer, Norway

6. Akasaka-Kennedy Y, Yokoi S and Takahata Y (2008) Genetic variation of storage compounds of seeds in Rapeseed (*Brassica napus* L.) germplasm by near-infrared spectroscopy. The 5th ISHS International Symposium on Brassicas Lillehammer, Norway
7. Haitham Zaki・横井 修司・高畑 義人 Isolation and characterization of the genes related to root shape in radish. 第114回 日本育種学会 つくば国際会議場 (2008)
8. 土井 寿子・高橋 亮・日影 孝志・横井 修司・高畑 義人 ササリンドウ (*Gentiana scabra*) 薬培養および未受精胚珠培養からの植物体再生 第114回 日本育種学会 滋賀県立大学 (2008)
9. 酒井 穂絵・福岡 浩之・横井 修司・高畑 義人 P22a1:sGFP 導入ナタネを用いた小孢子胚発生初期発現遺伝子の単離 第114回 日本育種学会 滋賀県立大学 (2008)
10. 久保 隆洋・高畑 義人・横井 修司 シロイヌナズナ開花関連遺伝子変異体のストレス応答の解析 第114回 日本育種学会 滋賀県立大学 (2008)
11. 堀江 幸生・塚本 知玄・王 克晶・横井 修司・高畑 義人 ダイズとツルマメのRILにおけるサポニン含量および裂莢性の変異 第3回東北育種研究集会弘前大学 (2008)
12. 玉置 祥二郎・Cristina Navarro・横井 修司・辻 寛之・Salome Prat・島本 功 イネ花成ホルモンHd3aはジャガイモの塊茎形成を誘導する イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2008 九州大学 (2008)
13. 小宮 怜奈・横井 修司・Shinyoung Lee・Gynheung An・島本 功 長日条件におけるイネ開花促進機構の解明 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2008 九州大学 (2008)
14. 高橋 靖幸・横井 修司・島本 功 イネ品種における開花時期の多様性をもたらす分子機構の解析 第49回 日本植物生理学会 札幌コンベンションセンター (2008)
15. 玉置 祥二郎・Cristina Navarro・横井 修司・辻 寛之・Salome Prat・島本 功 イネ花成ホルモンHd3aはジャガイモの塊茎形成を誘導する 第49回 日本植物生理学会 札幌コンベンションセンター (2008)
16. 小宮玲奈・横井 修司・Shinyoung Lee・Gynheung An・島本 功 *RFT1* は長日条件下における開花促進遺伝子である 第49回 日本植物生理学会 札幌コンベンションセンター (2008)
17. 津和本 亮・横井 修司・高畑 義人 シロイヌナズナ胚特異的 PHD-finger protein (ESP)の欠損は初期胚の胚致死を引き起こす 第113回 日本育種学会 明治大学 (2008)
18. ケネディ庸子・横井 修司・高畑 義人 西洋ナタネにおける近赤外分析による油分含量およびタンパク質含量の非破壊解析 第113回 日本育種学会 明治大学 (2008)
19. 李 在民・菅原 悦子・横井 修司・高畑 義人 リンドウ花の揮発成分の品種間差異 第113回 日本育種学会 明治大学 (2008)
20. 玉田 深平・横井 修司・高畑 義人 *Brassica napus* とその両親種 (*B. rapa*, *B. oleracea*)間の交雑親和性差違の解析 第113回 日本育種学会 明治大学 (2008)
21. 高橋 有・横井 修司・高畑 義人 マイクロサテライトの変異に基づいたカブ (*Brassica rapa*) 品種間の遺伝的類縁関係 第113回 日本育種学会 明治大学 (2008)
22. 西田 真人・柿崎 裕子・横井 修司・高畑 義人 *Cuphea leptopoda* の中鎖脂肪酸合成関与遺伝子導入によるアブラナ科植物の脂肪酸組成の改変 第28回種子生理生化学研究会 大沢温泉山水閣 (2008)
23. 晴山 聖一・横井 修司・津和本 亮・高畑 義人小孢子培養を利用した植物の胚発生と種子形成に関与する因子の機能解析 日本植物学会東北支部 第20回秋田大会 秋田県立大学 (2007)
24. 久保 隆洋・岩渕 恵・高畑 義人・横井 修司イネ開花関連遺伝子の低温ストレスによる発現の変動 日本植物学会東北支部 第20回秋田大会 秋田県立大学 (2007)
25. 岩渕 恵・久保 隆洋・高畑 義人・横井 修司 イネ晩生変異体における開花関連遺伝子の発現解析 日本植物学会東北支部 第20回秋田大会 秋田県立大学 (2007)
26. 津和本 亮・横井 修司・高畑 義人 セイヨウナタネ雄性発生胚特異的遺伝子ESPの同定および機能解析 日本植物学会東北支部 第20回秋田大会 秋田県立大学 (2007)
27. ケネディ (赤坂) 庸子・横井 修司・高畑 義人 ダイアレル分析によるナタネ本葉からの不定胚形成能の遺伝解析 第112回 日本育種学会 山形大学 (2007)

28. 津和本 亮・横井 修司・高畑 義人
EMBRYO MAKER 遺伝子の異所発現は子葉からの不定胚傾城を誘導する 第 112 回 日本育種学会 山形大学 (2007)
29. 高橋 有・横井 修司・高畑 義人 日本のカブ (*Brassica rapa* var. *rapa*) 在来品種の遺伝的類縁関係 第 2 回 東北育種研究集会 秋田県立大学 (2007)
30. 高橋 優子・ケネディ (赤坂) 庸子・横井 修司・高畑 義人 セイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) における多胚現象の形態学的観察 第 2 回 東北育種研究集会 秋田県立大学 (2007)

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