

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06016

研究課題名(和文) 開花・性・花寿命を変える菌因子の特定

研究課題名(英文) Flowering-time, sex, and floral longevity in a dioecious plant *Silene latifolia*

研究代表者

藤田 尚子 (Fujita, Naoko)

岡山大学・環境生命科学学域・特任助教

研究者番号：50646966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、花の重要形質「開花」「性」「花寿命」の人為的改変技術の開発を目指し、植物の遺伝的な性と開花期・花寿命の関係性に着目し、菌による外因的な性転換誘導を利用し、性表現の変化による開花期・花寿命の変動を検証した。その結果、開花期については性表現の変化に伴って変動することがわかった。また、性表現に関わらず、菌感染に花延命効果があることが見出された。これらの決定経路の関係性や、それに伴う発現機構について分子生物学的解析を行い、「開花」と「性」の制御因子AGL24と「花寿命」制御因子EIN3を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では環境的な性変化という未開拓分野において、微生物との相互ネットワークおよび鍵となる分子制御機構を追及した。同時に、外来因子(菌)による、性と連動した花の品質に大きく関わる開花性・寿命(保存性)の影響についても調査を行い、この機構解明によって、植物自身の内的な遺伝的・環境的因子に依存しない、外的影響による新しい品質保持機構に対しての知見が得られる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Sexual differences in flowering time and floral longevity examined in a dioecious plant with male heterogamete (i.e., XY-system) showed a significant correlation between sex and flowering time/ floral longevity. Effects of changes in sex-expression on the flowering time/ floral longevity were assessed by using a fungus causing sex-conversion, resulting in a shift in the flowering time along with sex-expression change. Floral longevity was extended by the fungal infection, regardless of sex-expressions. Analyses of their molecular mechanisms identified two key regulators, AGL24 acting as a hub gene in both flowering time and sex-expression and EIN3 which is targeted by the fungus to suppress ethylene signaling eventually extend floral longevity. Our findings offer an approach for manipulation of 'flowering time', 'sex' and 'floral longevity' which are important traits in horticultural and breeding technologies.

研究分野：園芸学、植物病理学

キーワード：開花性 花寿命 雌雄異株 ヒロハノマンテマ 黒穂菌 性的二型 性操作 植物微生物相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

花の性・開花・寿命は繁殖率・生存率を左右する重要形質であると同時に、花の品質にも大きく影響する。被子植物には性をもつ植物種が存在し、それらは全体の 5%以下と少数派だが、ホウレンソウ、アスパラ、キウリ、キウイフルーツ、ホップ、カキなどの主要農作物も含まれる。ナデシコ科 *Silene* 属ヒロハノマンテマ (*Silene latifolia*) は、性染色体をもつ雌雄異株として長年研究されている植物であり、光や温度、環境ホルモンなどの外的要因によって性表現は変化せず、遺伝的な性と花の性表現が安定的に一致する。他方、共生菌である黒穂菌 (*Microbotryum lychnidis-dioicae*) が感染すると、雌花がオス化する現象が知られており、遺伝的な性と性表現の不一致を人為的に誘導することができる。

花の「開花」と「寿命」は、多くの植物でオスとメスの間に有意な性が報告されており (*Am J Bot* 74: 40-46, 1987; 76: 74-85, 1989; *J Ecol* 86: 286-393, 1998) 「性」と連動する代表的な形質である。しかし、雌雄別の形態構造上の違い (例えば、雄花にはめしべがなく、雌花にはおしべがない) を切り分けて解析された例は少なく、花の「開花」と「寿命」の「性」との連動性には未解明な部分も多い。花の寿命については、両性花 (おしべとめしべの両方をつける) カーネーションにおいて、めしべ切除と花延命の関係が示されており (*J Exp Bot* 51: 2067-2073) 花寿命 (花持ち) とメス器官構造の直接的な関係が示唆されている。そこで本研究では、雌雄異株植物ヒロハノマンテマにおける遺伝的な性と、菌を利用した性表現変動による開花期と花寿命の表現型変動を調査し、その分子メカニズムを解析することで、原因因子の特定を目指した。これらの分子メカニズムは微生物-植物間の相互作用の解明という基礎的な枠だけでなく、性・寿命・開花といった重要な花品質に関わる新しい因子・経路の解明につながると期待できる。また、植物側の遺伝的要素だけではなく、外的な作用による花形質改変に重要な知見となるだろう。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 遺伝的な性と黒穂菌感染による外因的な性変化の関係性の解明と、(2) 菌感染の性表現変化に伴う重要花形質の改変の可能性探索を目的とした。「遺伝的な性」すなわち被子植物の雄蕊形成は、植物に共通する分子基盤に基づくと考えられており、ヒロハノマンテマにおいても植物に共通する MADS-box 遺伝子が報告されている (*Plant Cell* 6: 1775-1787, 1994; *Mol Biol Evol* 20: 1062-1069, 2003)。黒穂菌感染による外因的な性変化は、植物の遺伝的な性表現に酷似しており、黒穂菌は植物に共通する分子基盤に作用していることが推測される。本研究では、その原因分子を特定・単離することで、遺伝的な性と外因的な性における決定経路の関係性や、それに伴う性的二型性の発現機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 「性」と「開花」

ヒロハノマンテマの種子を MS 培地上に播種し、子葉ステージで健全区には水 (コントロール) 感染区には菌液を接種した。本葉が出た頃に土に移植し、人工気象器内 (23°C, LDs; 16h/8h) で栽培し、播種日から第一花開花までの日数を計測した。「遺伝的な性」の判別は、葉から抽出した DNA を鋳型に Y 染色体マーカー MS4 (*Genes Genet Syst* 77: 393-398, 2002) を用いて Y 染色体有無により雌雄判別した。「性表現」の判別は、第一花およびその後の花の表現型観察により、おしべとめしべの有無によって雌雄を判別した。健全区のおス・メス、感染区のおス・メス (合計 4 実験区) について開花までの日数を比較した。

「性」と「開花」の制御候補因子を得るため、花器官分化のごく初期の花芽メリステムを実体顕微鏡下で解剖・サンプリングし、RNA-seq 解析を行なった。「遺伝的な性」および「性表現」に連動して変動する候補因子を取得し、この候補因子について、シロイヌナズナにおける過剰発現、培養細胞を用いた植物-微生物相互作用アッセイ、*in situ* ハイブリダイゼーション法による植物組織内の発現解析、ヒロハノマンテマにおける VIGS (Virus-Induced Gene Silencing) を用いた候補遺伝子のノックダウンを行なった。

(2) 「性」と「花寿命」

上記で得られた植物の花を用いて、開花直前を 0 日とし、開花後から花弁が萎れるまでの日数を計測した。また、開花から萎れまでのエチレン生成量を経時的に計測し、花弁の萎れとエチレンの関係を調べた。さらに、エチレン作用阻害剤 1-MCP (1-メチルシクロプロペン) 処理を行い、ヒロハノマンテマの花持ちに対する 1-MCP の効果を検証した。

「花寿命」制御候補因子を得るため、開花直後と萎れる前日の花弁組織から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行なった。花寿命が延長された感染区の花弁で特異的に発現変動する候補因子を取得し、花寿命制御因子を特定した。

4. 研究成果

本研究に用いたヒロハノマンテマの「遺伝的な性」と「性表現」は全て一致したことから、ヒロハノマンテマにおける雄蕊形成は Y 染色体によって遺伝的に制御されていることが確認された。雌雄判別したオス (XY) とメス (XX) の開花期と花寿命を比較したところ、「開花」についてはメスの早咲き、「花寿命」についてはメスの長寿が示された。

(1) 「性」と「開花」の連動性

菌を利用して雌花にオス化を誘導したところ、性表現の変化に伴い、開花期も遅延 (オス化) した。感染雄花については性表現の変化はなく、開花期の変動もなかった。このことから、菌感染自体は開花性に影響せず、感染雌花 (オス化雌花) の開花遅延は、性表現に変化に起因すると考えられた。そこで、雄蕊原基形成前の花器官分化のごく初期の花芽メリステムの RNA-seq 解析を行い、性表現の変化に伴って発現変動する候補因子を探索した。得られた候補因子について、ヒロハノマンテマの培養細胞系を用いて菌接種時に発現変動する遺伝子を絞り込み、「開花」制御候補因子として MADS-box 遺伝子 *AGAMOUS-LIKE 24* (*AGL24*) を得た。*AGL24* を過剰発現させたシロイヌナズナ形質転換体は早咲きとなり、さらに花弁と雄蕊が抑制された花表現型を示したことから、*AGL24* は「開花」と「性」決定経路を繋ぐコア因子として機能すると考えられた。ヒロハノマンテマの培養細胞系を確立し、細胞懸濁液に菌を接種したところ、菌接種直後には *AGL24* の発現は上昇し、その後、菌の増殖に反比例して *AGL24* は発現低下した。*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、花器官と周辺組織の *AGL24* 発現を調べると、花芽器官直下の維管束に菌様の形状を縁取ったような *AGL24* 遺伝子発現が検出された。黒穂菌のゲノム配列 (BMC Genomics 16: 461, 2015) には *in situ* ハイブリダイゼーションに用いたプローブ配列との相同配列は無かったことから ($<1e-2$ for threshold of p-values in blastn) 得られたシグナルは植物側の *AGL24* 発現であることを確認した。*AGL24* の一時的な発現上昇はヒロハノマンテマの培養細胞懸濁液に菌を接種した際にも見られた傾向であり、花芽器官直下の維管束に局在する菌が *AGL24* を介して植物の「開花」および「性」決定経路にアクセスしていると考えられた。ALSV ウイルスベクターを用いた VIGS 系 (*Int J Mol* 20: 1031, 2019) により、ヒロハノマンテマで *AGL24* をノックダウンしたところ、雄花のメス化が観察されたことから、*AGL24* はおしべとめしべの二面的な発達に対して、いずれも抑制的に関与する可能性が考えられた。つまり *AGL24* を介した「開花」と「性」の制御は、遺伝子のような発現促進または抑制によるものではなく、発現促進から抑制へと変動する発現パターンが決定経路を形成していることが示された。

(2) 「性」と「花寿命」の非連動性

黒穂菌感染花の「花寿命」を計測したところ、遺伝的な性や性表現に関係なく、菌を接種していない健全花より花の寿命が延びた。老化ホルモンとして知られるエチレンは、カーネーションやスイートピー等に代表されるエチレン感受性植物において花弁老化が促進される。カーネーションと同じくナデシコ科植物であるヒロハノマンテマのエチレン感受性を調べるため、まず、エチレン処理を行なったところ、翌日には花弁の萎れが観察された。このことから、ヒロハノマンテマはエチレン感受性花卉であることが示された。次に、花寿命とエチレン生成量の関係を調べるため、開花後から一日ごとにエチレン生成量を測定したところ、健全花では萎れる前日にエチレン生成量のピークが観察されることがわかった。このピークは健全花のオスとメスで異なるタイミングで観察されたことから、「遺伝的な性」における花寿命の性差は、「性」に制御されるエチレン生成量増大のタイミングによるものであると考えられた。感染花においてはエチレン生成量のピークは観察されなかったことから、黒穂菌はエチレン作用阻害剤として機能している可能性を考えた。そこで、エチレン作用阻害剤である 1-MCP をヒロハノマンテマの花に処理し、感染花と同じように花延命が観察されるかどうか検証したところ、予想に反して処理花は早期に萎れた。1-MCP は果実の保存性向上に有効であることが報告されているが、ミカンなどの一部の果実については毒性を示すことがある。ヒロハノマンテマにおいても、1-MCP は毒性を示すことがわかった。また、感染花と 1-MCP 処理花では花寿命に大きな違いが認められたことから、感染花における花延命は 1-MCP とは異なる作用点にあると考えられた。

開花直後と萎れる前日の花弁をサンプリングし、RNA-seq 解析に供した。黒穂菌感染による花延命の原因因子を特定するため、健全花に対して感染花で特異的に発現変動する遺伝子を抽出したところ、エチレン情報伝達に重要な転写因子 *EIN3* が見出された。黒穂菌は *EIN3* の発現抑制を介して宿主植物の花寿命を延ばしていると考えられた。これは従来使われているエチレン作用阻害剤とは異なる作用点であり、新規な花延命剤の開発につながることを期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 藤田尚子	4. 巻 54
2. 論文標題 植物のしなやかな性表現と菌のしたたかな生存戦略	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 326-329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤田尚子、大谷颯汰、赤木剛士、久保康隆、牛島幸一郎
2. 発表標題 Silene属植物における黒穂菌感染による性表現操作と花寿命の関係
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大谷颯汰、藤田尚子、赤木剛士、久保康隆、牛島幸一郎
2. 発表標題 花卉の老化制御に関わる黒穂菌感染の作用機作
3. 学会等名 第84回日本植物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoko Fujita, Takashi Akagi
2. 発表標題 Fungal hacking of the plant sex-determination pathway via suppression of AGL24 in <i>Silene latifolia</i>
3. 学会等名 18th Japan Solanaceae Consortium Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田尚子、赤木剛士
2. 発表標題 ナデシコ科雌雄異株植物におけるAGL24を介した菌による性決定経路の乗っ取り
3. 学会等名 園芸学会令和5年度春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤田尚子、赤木剛士
2. 発表標題 AGL24を介した菌による性決定経路の乗っ取り
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	赤木 剛士 (Akagi Takashi) (50611919)	岡山大学・環境生命科学学域・准教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------