

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25292015

研究課題名(和文) 冬生一年草の生活史成立鍵因子である種子春化遺伝子の解明研究

研究課題名(英文) A novel gene of seed vernalization that regulates life histories of winter annuals

研究代表者

吉岡 俊人 (Yoshioka, Toshihito)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：10240243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：冬生一年草は越年生と一越年生の生活史型に分化している。オオアレチノギク(越年生)とヒメムカシヨモギ(一越年生)の開花に対する種子低温要求性の比較から、種子春化が一越年生型生活史の成立を決定する形質であることが判明した。

ヒメムカシヨモギから種子春化候補遺伝子PSVの全鎖長を単離した。既知の開花関連遺伝子にはPSVの類似遺伝子は見出されなかった。これらの研究結果から、PSVは冬生一年草生活史の鍵となる新奇花成制御遺伝子である可能性が高い。

PSVを導入したシロイヌナズナ形質転換体を作成し、現在、T2種子を採取している。T3種子が得られ次第、種子春化検定を実施して、PSV遺伝子の機能を確定する。

研究成果の概要(英文)：Winter annuals have differentiated into two life history types; obligate and facultative. The aims of this study are to identify key traits for the differentiation and to decide responsible genes for the traits. Obligate annuals flower after overwintering with rosette forms. Whereas in facultative annuals, spring-germinating plants flower quickly without having the rosette stage. When non-germinating imbibed-seed of *Conyza canadensis*, a facultative annual, had been exposed to low temperature, an early flowering trait of the resultant plant was induced. This trait is called seed vernalization. Thus the seed vernalization is the key trait for the life history differentiation between two winter annuals.

We isolated a candidate gene of seed vernalization, PSV, in *C. canadensis*. The expression pattern of PSV coincided with that of seed vernalization. No PSV homolog was found in known flowering genes.

We conclude PSV should be the novel gene that regulates seed vernalization.

研究分野：植物生態生理学、植物保護科学

キーワード：冬生一年草 生活史進化 種子春化 遺伝子 形質転換 ヒメムカシヨモギ オオアレチノギク シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

冬生一年草は越年草と一越年草に分化している。一越年草の一年生型生活史は、長命から短命へと進化してきた植物が到達した究極的短生活史だと言える。一年生型と越年生型の生活史を併せ持つ一越年草は、顕著な生活史可塑性を獲得したことで代表的攪乱依存種となっている。しかし、一年生型生活史が進化した遺伝的プログラムは未知である。

また、冬生一年草の種子春化は、現象自体は以前から知られていたものの、近年解明が進んだ緑体春化に対して、その分子機構は不明のままである。

2. 研究の目的

一年生植物は生活史から夏生一年草と冬生一年草に分けられる。さらに冬生一年草は越年草と一越年草に分化している(図1上)。越年草と一越年草の生活史分化を成立させた形質とその遺伝子を解明することが本研究の最終的目的である。

さて、越年草、一越年草ともに秋発芽個体はロゼットで越冬し、緑体春化が誘導されて翌年に抽苔・開花する。ところが春発芽個体は、越年草では栄養生長を続けて越冬後の翌年に開花するが、一越年草では栄養生長相を経ることなく当年内に開花に至る(図1下)。そこで、本研究の具体的目標は、一越年草の種子が冬季の低温に遭遇することで、なぜ春発芽個体が速やかに開花するのかを知ることである。

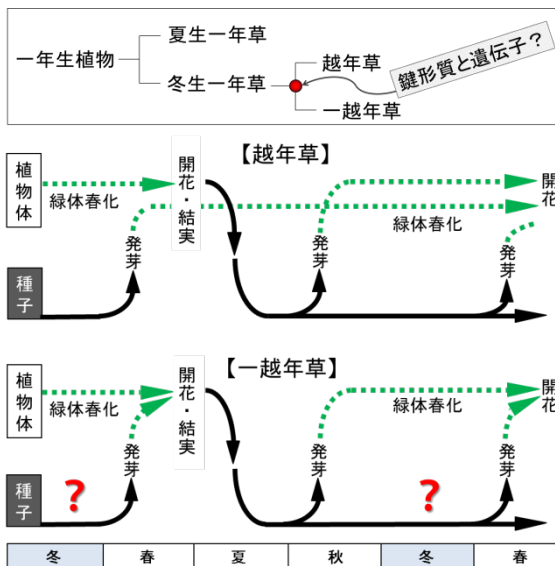


図1 越年草と一越年草の生活史パターン

3. 研究の方法

(1) 生活史分化の鍵となる形質を調べる上で適切な植物材料の選択するために、103種の冬生一年草の種子を埋土して越冬させ、翌年の春に掘り上げて発芽と発芽後の生長を調査した。その結果、低温で種子2次休眠が遭遇されて春発芽が起きない種が28、春

発芽しても速やかな開花が認められない種が17、春発芽個体が速やかに開花する種が21、種子の越冬の有無に関わらず速やかに開花する種が37となった。

は秋発芽のみの越年草、は春と秋に発芽する越年草のパターンであり、は春と秋に発芽する一越年草のパターンである。したがってととの2種を比較することで、生活史分化の鍵形質を明らかにできると考えられる。モデル植物のシロイヌナズナは系統によってまたはのパターンとなり、本実験に供試するには不適であった。そこで、越年草型パターンのおオアレチノギク(*Conyza sumatrensis*)と一越年草型パターンのおヒメムカシヨモギ(*C. canadensis*)のキク科同属近縁2種を実験材料とした。

(2) 冬生一年草種子を数の低温条件で置床すると発芽して、緑体春化が誘導されてしまう。そこで、種子をアブシジン酸溶液中に置き、未発芽の吸水状態に保ったまま低温遭遇させる実験系を確立した。ヒメムカシヨモギおよびおオアレチノギクの種子はアブシジン酸を洗い流せば正常に発芽するので、発芽個体の栄養生長相の長さを抽苔・開花時のロゼット葉数で評価することができる(図2)。本実験系によって未発芽種子段階の春化(真の種子春化)と発芽後種子段階の春化(緑体春化の一現象)を分離して検定することが可能になった。以後、未発芽種子段階の春化を種子春化(PRE-GERMINATION SEED VERNALIZATION, PSV)と定義する。



図2 種子の低温遭遇による花成誘導効果の検定系

(3) ヒメムカシヨモギ種子中で温度に応答して発現変動する遺伝子をマイクロビーズアレイ(TAKARA, Megasort®)によって網羅的に解析した。ここでクローニングされた遺伝子の3'末端を含む部分鎖長を5'RACE(Clontech, SMARTer® RACE)で伸長し、全鎖長の塩基配列を解読した。

(4) シロイヌナズナ100系統を調べたところ、WsはColやLerと異なって、種子の低温遭遇による花成誘導効果を検出できることが判明した。そこで、ヒメムカシヨモギから単離した遺伝子の機能を解析するために、

CMV35S プロモーターでドライブする遺伝子高発現コンストラクトを Gateway®ベクターシステムによって組込んだアグロバクテリウムを構築し、フローラル・ディップ法でシロイヌナズナ Ws に遺伝子導入した (図3)

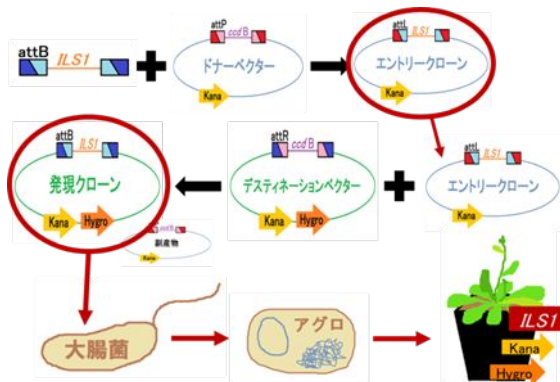


図3 Gateway®システムによるシロイヌナズナへのヒメムカシヨモギ遺伝子導入系

4. 研究成果

(1) 一越冬草のヒメムカシヨモギは種子を未発芽の状態低温(4℃)に15日間以上遭遇させると、発芽個体は栄養生長相を経ることなく生殖成長相へ移行した(図2)。また、低温非遭遇の場合には栄養生長を継続して生殖成長に至らなかった。一方、越冬草のオオアレチノギクは種子の低温遭遇の有無によらず栄養生長を継続した。

これは、ヒメムカシヨモギは種子春化の形質を有するが、オオアレチノギクは有していないことを意味する。つまり、越冬草と一越冬草の生活史分化の鍵となる形質は種子春化だと結論される。

(2) ヒメムカシヨモギ種子を10月に野外に埋土し、経時的に掘上げて回収後、風乾して冷凍保存した。その種子を温室中で播種し、発芽個体の栄養生長相の長さを開花時のロゼット葉数を指標に調べた。11月~4月に土壤中から回収した種子からの個体は栄養生長相を経ずに抽苔・開花した(図4)。5月~10月に回収した種子から発芽した植物体は、長期間の栄養生長(ロゼット葉数で60~70)を経た後に抽苔・開花した。

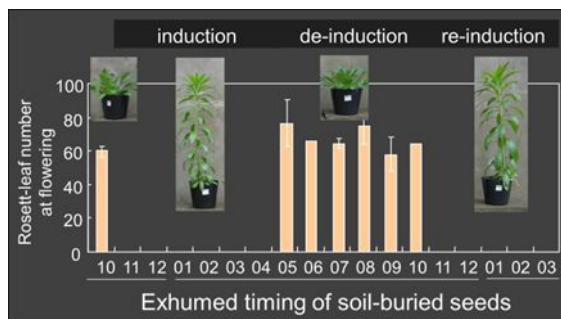


図4 野外に埋土したヒメムカシヨモギ種子の温度遭遇による花成誘導効果

この結果から、ヒメムカシヨモギ種子では

野外の土壤中において種子春化の低温による誘導、高温による解除、低温による再誘導が繰り返し生じることが明らかとなった。

(3) ヒメムカシヨモギでは種子春化の未誘導、誘導、解除、再誘導の実験系が成立することから、これらの移行時に発現が変動する遺伝子をマイクロビーズアレイによって網羅的に解析した。種子春化の未誘導から誘導時に発現上昇した遺伝子および発現低下した遺伝子、誘導から解除時に発現上昇した遺伝子および発現低下した遺伝子が、それぞれ16、29、31、19クローン得られた(図5)。それらの中で、未誘導から誘導時に発現が上昇または低下し、かつ誘導から解除時ではその逆の発現パターンになる遺伝子は1クローンであった。これを種子春化の候補遺伝子(PSV)とした。

ここで得られたPSVは3'末端を含む267bpの部分鎖長であったので、5'RACEで伸長し、全鎖長の塩基配列を読んだ。PSVは723bp(241aa)の翻訳領域からなり、グリシン・リッチ・ドメインの繰返しを有する特徴的遺伝子構造であった。

PSVをBlast検索したところ、緑体春化系はもとより開花関連遺伝子の中に類似する遺伝子は見出されなかった。したがって、PSVが種子春化関わるとすれば、新奇な花成遺伝子の発見となる。

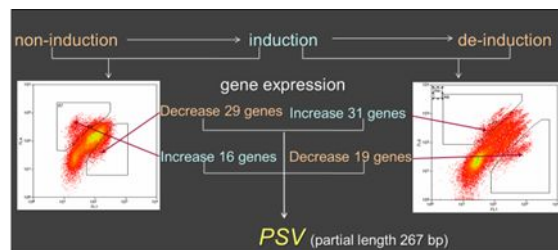


図5 ヒメムカシヨモギの種子春化の未誘導、誘導、解除時に発現変動する遺伝子のマイクロビーズアレイによる網羅的解析

(4) オオアレチノギクのPSV遺伝子をクローニングして塩基配列を解析した。当初は翻訳開始点後にナンセンス・コドンが生じると予想していたが、翻訳領域を通じてヒメムカシヨモギPSVと高度に一致する結果となった。

そこで、種子春化が未誘導、誘導、解除、再誘導状態にあるヒメムカシヨモギとオオアレチノギクの種子におけるPSV遺伝子発現をリアルタイムPCRによって定量解析したところ、ヒメムカシヨモギではPSV遺伝子発現パターンは種子春化のパターンとよく一致した。一方、オオアレチノギクではPSV発現量がほとんど変化しなかった(図6)。

以上の結果から、ヒメムカシヨモギとオオアレチノギクの種子春化の有無および誘導、解除、再誘導のパターンは、PSVの遺伝子発現調節によって制御されている可能性が高いものと考えられる。

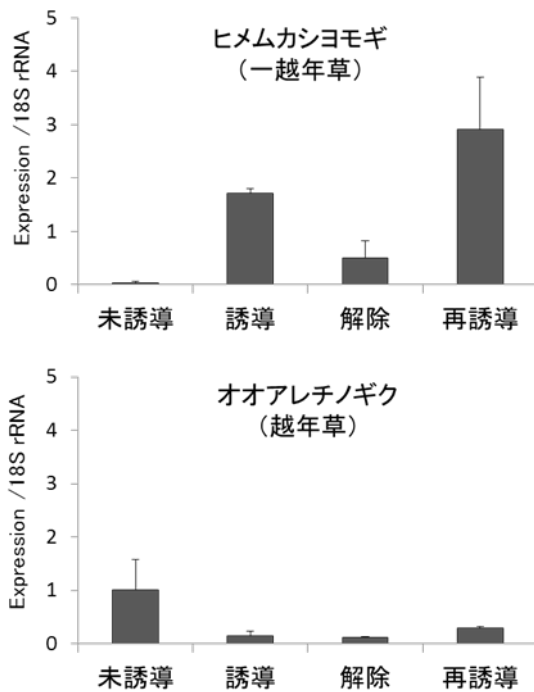


図6 種子春化の未誘導、誘導、解除、再誘導にともなうヒメムカシヨモギとオオアレチノギクの PSV 遺伝子発現変動パターン

(5) ヒメムカシヨモギ PSV をシロイヌナズナ Ws に導入した。このシロイヌナズナ形質転換体では PSV 遺伝子が 35S プロモーターでドライブされ、恒常的に高発現している。現在、形質転換体の T2 種子が得られている。T3 種子を採取でき次第、導入遺伝子が種子低温遭遇を代替するかどうかを検定し、PSV の種子春化機能を確定する予定である。

(6) PSV の種子春化機能を確定する別手段として、PSV の相同遺伝子がノックアウトあるいはノックダウンされたシロイヌナズナ変異型株の表現型を調べるアプローチを進めている。

Blast 検索されたシロイヌナズナの PSV ホモログはそのショートアイソフォーム遺伝子と相補的に機能すると考えられる遺伝子であった。また、シロイヌナズナ Ws のマイクロアレイ解析を行ったところ、種子春化の未誘導、誘導、解除、再誘導と一致したパターンの発現変動が最大であったのは、上記の 2 遺伝子であった。Blast 検索とマイクロアレイ解析の結果から、これらの遺伝子が PSV ホモログである可能性が高いと考えられる。

そこで、それら 2 遺伝子のそれぞれの T-DNA 挿入変異型株を交配して、2 重突然変異型株を取得しようとした。しかし、両遺伝子が同一染色体上の近距離に座しているために組換え価が低く、現在のところ 2 重突然変異型株を得られていない。

そのため当初計画を変更し、片方の遺伝子ノックアウト型株のもう一方の遺伝子を RNAi によってノックダウンさせて、種子春化の表現型を調べる予定である。

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)

[学会発表](計 4 件)

日下部智香, 青山のぞみ, 吉岡俊人, 雑草の重要特性である生活史可塑性を生じる種子春化遺伝子の探索, 第 5 回東海北陸雑草研究会 (2017).

Yoshihiro Kobayashi, Kohei Kiriya, Nozomi Aoyama, Satoko Takahashi, Katsuhiko Shiono, Toshihito Yoshioka. A novel gene of seed vernalization in *Conyza canadensis*, which regulates life histories of facultative winter annuals, 26th Asian-Pacific Weed Science Society, (2017).

小林義浩, 石田暁伸, 高橋智子, 吉岡俊人, 冬生一年草の生活史を決定する新規花成遺伝子の探索: ヒメムカシヨモギのマイクロアレイとシロイヌナズナのマイクロアレイの比較, 第 3 回東海北陸雑草研究会 (2015).

高橋智子, 桐山晃平, 塩野克宏, 吉岡俊人, 一・越年草の一年生型開花タイミングを制御する種子春化の機能解析と遺伝子単離 日本植物学会第 77 回大会 (2013).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 俊人 (YOSHIOKA, Toshihito)
福井県立大学・生物資源学部・教授
研究者番号: 10240243

(4) 研究協力者

桐山 晃平 (KIRIYAMA, Kohei)
小林 義浩 (KOBAYASHI, Yoshihiro)
日下部 智香 (KUSAKABE, Tomoka)