

「アブラナ科葉菜類の春化による開花調節機構の解明」

神戸大学大学院農学研究科

藤本 龍

1 研究の背景と目的

ハクサイ、コマツナ等のアブラナ科葉菜類が花を咲かせる為には、一定期間の低温に曝される必要があり、これを春化 (バーナリゼーション) とよぶ。アブラナ科葉菜類では、開花が誘導され花芽をつけると商品価値が損なわれることから、晩抽性 (花が咲きにくい) 品種の育成が望まれている。よって、アブラナ科葉菜類において、春化による開花調節機構を理解することは、晩抽性の品種育成において非常に重要な課題である。

モデル植物のシロイヌナズナでは、春化による開花調節機構の基礎研究が盛んに行われており、植物の形質に関わる様々な研究分野の中でもトップレベルの知見が得られている。特に特徴的なのは、春化の鍵遺伝子である *FLC* (*FLOWERLING LOCUS C*) の転写調節には、Non-coding RNA とクロマチンの構造変化 (ヒストンの化学修飾) が関与していることである。つまり、シロイヌナズナでは、春化前は開花抑制遺伝子である *FLC* のクロマチン構造が活性型で発現していることから、開花が抑制されているが、春化によりクロマチン構造が不活性型に変化すると *FLC* の転写が抑制され、開花が誘導される。一方、アブラナ科葉菜類では、同じく *FLC* が鍵遺伝子であると考えられるが、シロイヌナズナの *FLC* が 1 コピーであるのに対して、ハクサイでは *FLC* が 4 コピー存在し、その調節機構はより複雑であり、春化による開花調節機構の理解が遅れている。

そこで、本研究では、ハクサイやコマツナ等の *Brassica rapa* L. を用いて、春化による開花調節機構を解明することを目的とする。さらに、その知見を元に、育種の現場に分子育種を導入することを目指す。

2 研究方法・研究内容

(1) *B. rapa* の春化处理後の開花日数の測定

*B. rapa* 9 系統について、播種後、通常条件下 (16h 明期、8h 暗期、21°C) で 2 週間生育させた後、春化处理 (4 週間、4°C) を行い、その後、通常条件下に戻し、開花日数 (花芽が目視できたとき) を計測した。

(2) *FRIGIDA* (*FR*) と開花の関係性

シロイヌナズナでは、自然界に存在する早咲き系統は、自然突然変異による *FRI* の機能喪失に起因しているものが多い。また、*FRI* は開花抑制遺伝子 *FLC* の発現を活性化することが知られている。*B. rapa* では、*FRI* が 2 コピー (*FRIa*、*FRIb*) 存在することが、リファレンスゲノムの情報から分かっているが、シロイヌナズナと同様の機能を有しているかは明らかとなっていない。そこで、*B. rapa* の *FRI* の機能について調べた。

- *B. rapa* 33 系統の *FRIa* と *FRIb* の全長配列を決定した。
- *FRI* の発現量の系統間差を qPCR で調べた。
- (1) で調べた開花日数と *FRI* の発現量との関係性を調べた。
- ハクサイの *FRIb* をシロイヌナズナ (*FRI* は機能喪失) に導入し、相補実験を行った。

(3) *FLC* と開花の関係性

- ◆ ハクサイの *FLC* をシロイヌナズナ (*FRI* の機能喪失により *FLC* は機能していない) に導入し、相補実験を行った。
- ◆ 春化处理前の *FLC* と (1) で調べた開花日数との関係性を調べた。

- ◆ 4、6、8 週間の春化处理による *FLC* の発現低下率の系統間差を調べた。
- ◆ *B. rapa* の RJKB-T24 系統について、春化处理前と 4 週間春化处理後のサンプルを用いて RNA-sequencing (RNA-seq) を行い、春化处理により発現レベルが変化する遺伝子或は Non-coding RNA を同定した。

### 3 研究成果

#### (1) *B. rapa* の春化处理後の開花日数の測定

*B. rapa* 9 系統について、4 週間低温処理をした後、通常条件で育成し、開花日数を測定した。開花が遅い系統の中には 100 日以上経っても開花しないものが見られたため、開花日数スコアを用いて開花の早さを評価した (図 1)。その結果、Osome や BRA2209 の開花が遅かったのに対し、‘Yellow sarson’ や Homei は開花が早かった (図 1)。本研究から、系統によっては 4 週間の春化处理は開花を誘導するのに十分でないことが明らかとなり、つまり、開花が遅かった系統は春化要求量が高いと考えられた。

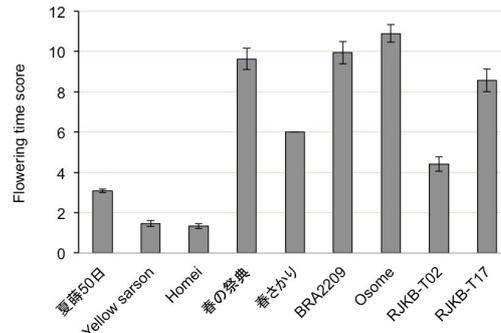


図1. 4週間春化处理後の開花の早さ

縦軸の数値は各系統における開花日数スコアの期待値を表す。  
 スコア1、46～50日；スコア2、51～55日；スコア3、56～60日；スコア4、61～65日；  
 スコア5、66～70日；スコア6、71～75日；スコア7、76～80日；スコア8、81～85日；  
 スコア9、86～90日；スコア10、91～95日；スコア11、96～100日；スコア12、100日以上。

#### (2) *FRIGIDA (FRI)* と開花の関係性

33 系統の *FRIa* と *FRIb* の全長アミノ酸配列を決定したところ、*FRIa* の 33 系統間のアミノ酸配列の相同性は 97.8%～100%、*FRIb* の 33 系統間のアミノ酸配列の相同性は 95.8%～100% と非常に高かった。また、明らかに機能喪失を起こすような変異は見られなかった。(1) で用いた 9 系統について、春化处理前の *BrFRIa*、*BrFRIb*、*BrFRIa/b* の発現量を qPCR により調べたところ、発現量に系統間差が見られた。そして、これらの発現量と開花日数スコアの関連性を調べたところ、有意な相関関係は見られなかった。

*BrFRIb* をシロイヌナズナで過剰発現させた形質転換体では、開花遅延が見られた (図 2A)。さらに、*BrFRIb* の導入により、シロイヌナズナの内生の *AtFLC* の発現誘導が見られた (図 2B)。*AtFLC* の発現誘導が開花遅延の原因であると考えられる。そして、この形質転換体の種子に春化处理を施すと、*AtFLC* の発現抑制が起こり、開花遅延が見られなくなった (図 2B、C)。これらの結果から、*BrFRIb* はシロイヌナズナの *AtFRI* と同様の機能を有することが明らかとなった。

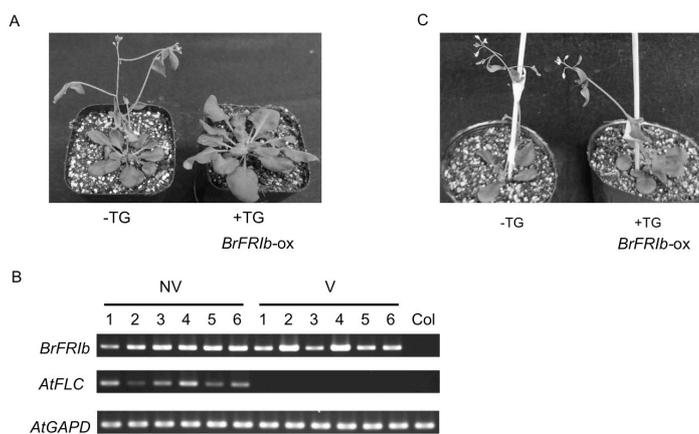


図2. *BrFRIb* 過剰発現体における機能解析  
 (A) 春化处理なしでの *BrFRIb* 過剰発現体の  $T_2$  植物の開花日数  
 +TG: 遺伝子導入個体、-TG: 非遺伝子導入個体  
 (B) 春化处理前後における *BrFRIb*、*AtFLC* の RT-PCR 解析  
*AtGAPD* をコントロールとして用いた。NV: 春化处理前、V: 4週間春化处理後  
 (C) 4週間春化处理後の *BrFRIb* 過剰発現体の  $T_2$  植物の開花日数

(3) *FLC* と開花の関係性

まず、*BrFLC1*、*BrFLC2*、*BrFLC3* をそれぞれ単独で過剰発現させたシロイヌナズナの形質転換体を作製したところ、形質転換体では開花遅延が見られたことから、3 つの *BrFLC* パラログは全て、シロイヌナズナの *AtFLC* と同様、開花抑制因子として働いていることが明らかとなった。また *BrFLC5* はエキソンが二つ欠失していることから、機能していないと考えられた。

(1) で用いた 9 系統について、春化処理前の *BrFLC1/2/3* の発現量を qPCR により調べたところ、発現量に系統間差が見られた (図 3)。そして、これらの発現量と開花日数スコアの間連性を調べたところ、有意な相関関係が見られた ( $r = 0.73, p < 0.05$ )。このことから、春化処理前の *BrFLC1/2/3* の発現量は、春化要求量と関連性がある可能性が示唆された (図 3)。

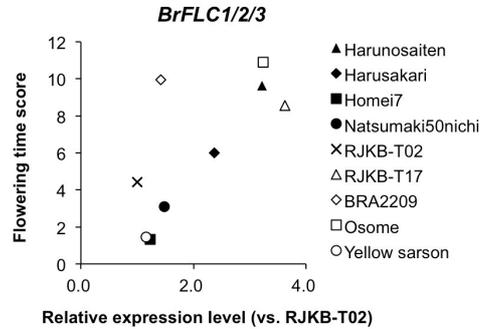


図3. *BrFLCs* の発現レベルと4週間春化処理後の開花の早さの関係  
縦軸は開花日数スコア、横軸はRJKB-T02の発現レベルに対する比を示す。

*B. rapa* の 5 系統について、4 週間春化処理後の *BrFLC1/2/3* の発現レベルを測定した。5 系統全てで 4 週間の低温処理に反応して *BrFLC1/2/3* の発現レベルの低下が起こった (図 4)。春化処理により *BrFLC1/2/3* の発現レベルは、春化処理前に比べて、15.8%~47.8% となり、BRA2209 において、発現レベルの低下の割合が最も小さかった (図 4B)。また、春化処理前の *BrFLC1/2/3* の発現レベルに対する 4 週間の春化処理後の発現レベルの比は、春化処理前の *BrFLC1/2/3* の発現レベルが低い RJKB-T02、Homei がそれぞれ 28.2%、15.8% で、春化処置前の *BrFLC1/2/3* の発現レベルが高い‘春の祭典’、RJKB-T17 がそれぞれ 22.4%、39.1% となり、低温処理前の *BrFLC1/2/3* の発現レベルと春化処理による *BrFLC1/2/3* の発現レベル低下率には関係性が見られなかった (図 4)。4 週間の低温処理後の *BrFLC1/2/3* の発現レベルは開花日数スコアの大きい BRA2209、‘春の祭典’、RJKB-T17 で高く、開花日数スコアの小さい RJKB-T02 と Homei で低かった (図 4A)。

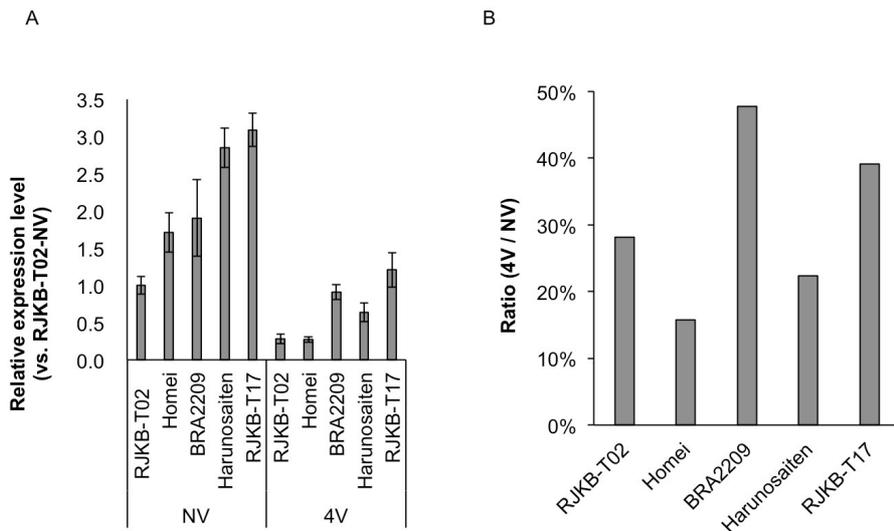


図4. 春化処理前と4週間春化処理後の*BrFLCs*の発現レベル比較  
(A) 春化処理前と4週間春化処理後の*BrFLCs*の発現レベル  
縦軸は春化処理前のRJKB-T02における発現レベルに対する比を示す。  
NV: 春化処理前、4V: 4週間春化処理後  
(B) 春化処理前に対する4週間春化処理後の発現レベルの比

次に、4系統について、さらに長い6、8週間の低温処理後の *BrFLC1/2/3* の発現レベルを測定した。*BrFLC1/2/3* の発現レベルは春化处理期間の長さに従って低下していた(図5A)。*BrFLC1/2/3* の発現レベルの低下率は、開花日数スコアの大きかった BRA2209 が最も低かった(図5B)。

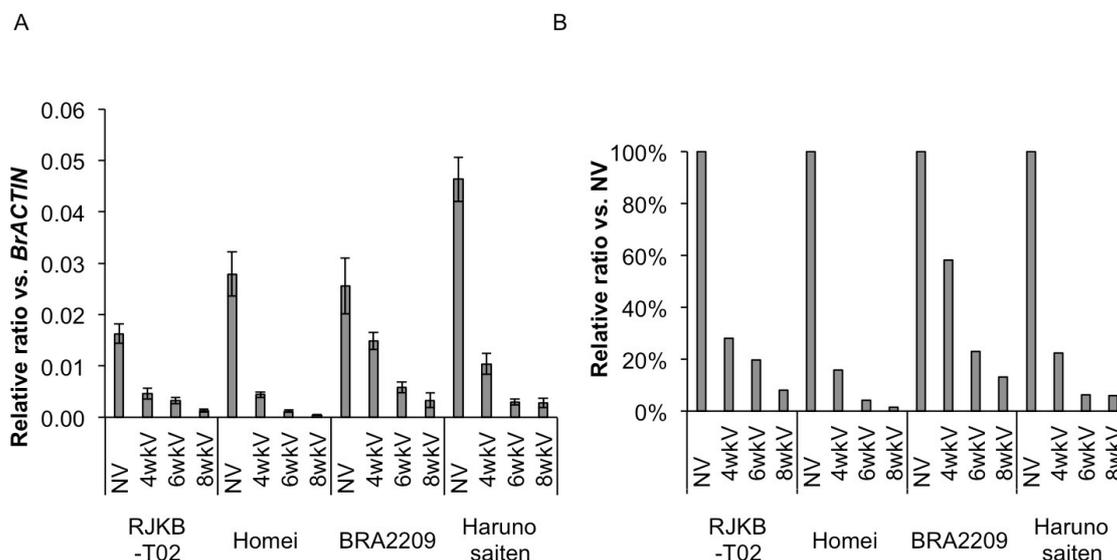


図5 春化处理前と4, 6, 8週間春化处理後の*BrFLCs*の発現レベル比較

(A) 春化处理前と4, 6, 8週間春化处理後の*BrFLCs*の発現レベル

縦軸は春化处理前の発現レベルに対する比を示す。

NV: 春化处理前、4wkV: 4週間春化处理後、6wkV: 6週間春化处理後、8wkV: 8週間春化处理後

(B) 春化处理前に対する4, 6, 8週間春化处理後の発現レベルの比

春化处理によって発現誘導される **Non-coding RNA** を網羅的に調査するため、RJKB-T24における春化处理前と4週間春化处理後のRNA-seqを行った。全遺伝子41,020個中、発現が変動していた遺伝子数は8,588個であった。発現レベルが増加した遺伝子数は4,027個、発現レベルが減少した遺伝子数は4,561個であった。シロイヌナズナにおける春化関連遺伝子のオーソログの発現が変化しているか調べたところ、発現レベルが増加した遺伝子には、*SOC1* や *VIN3* 等が含まれており、発現レベルが減少した遺伝子には、*FLC1*、*FLC2*、*FLC3*、*MAF1* 等が含まれていた。さらに、発現変動する **Non-coding RNA** が多数見出された。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

晩抽性はアブラナ科葉菜類において、重要な育種課題であることから、本研究によって得られた知見は、今後のアブラナ科葉菜類の晩抽性品種育成において有益な情報を提供できると考えられる。また、本研究結果を足がかりとして、晩抽性品種の育成に分子育種を導入できるよう、さらに研究を進展させることで、品種育成にかかる労力の軽減へと繋げていきたいと考えている。分子育種の導入は産業の発展への波及効果が期待できる。

また、本研究において、春化要求性の高い系統が見出され、この系統は、春化に対して開花抑制遺伝子である *FLC* の発現量の低下率が小さいことから、今後の晩抽性品種育成において重要な研究材料となり、さらには品種育成の育種素材としても利用価値があると考えられる。この系統を育種素材として利用することで晩抽性品種の育成へと発展する可能性も期待できる。