

*NaKRI* によるカリウムに応答した  
*FT* 遺伝子の発現制御機構の解析

根岸 克弥

## 目次

要旨	2
略語表	4
1. 序論	6
2. 材料と方法	14
3. 結果	
3.1. <i>NaKRI</i> による花成制御の分子機構の解析	20
3.2. <i>NaKRI</i> による栄養に応答した花成制御の解析	28
4. 考察	35
文献	41
謝辞	49
図表 (表 1、図 1~37)	50

## 要旨

植物は周囲の様々な環境を受容して、それらに応答して自らの発生や成長をコントロールしている。栄養成長相から生殖成長相への相転換を花成と呼び、適切な環境下で花成を行うことは繁殖の成功や種子の生産量といった植物の適応度に直結するため、花成時期の制御は極めて重要な発生制御の段階である。シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的な研究から、植物が複数の環境刺激を統合して花成時期を決定する分子機構が明らかにされている。植物が受容した環境刺激は、光周期経路や春化経路といった複数の花成制御経路を通して、葉の維管束篩部伴細胞で花成ホルモン（フロリゲン）をコードする遺伝子 *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) の発現制御に統合される。様々な植物種における生理実験や農業上の知見からは、光条件や温度に加えて、土壌中の栄養環境も植物の花成時期に影響することが知られている。植物の三大栄養素である窒素・リン・カリウムは、いずれも植物の発生や成長に重要である。そのうち窒素とリンについては、*FT* 遺伝子や、*FT* 遺伝子の転写を制御する複数の花成経路の因子の遺伝子発現に影響を与えることで、花成制御に関わることが明らかにされている。その中には、齢依存経路の因子である microRNA156 (miR156) およびその標的である転写因子 SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) も含まれる。これに対して、カリウムに応答した花成制御の分子機構の理解は遅れている。

本研究では、無機栄養、特にカリウムに応答した花成制御経路についての理解を深めるために、*SODIUM POTASSIUM ROOT DEFECTIVE1* (*NaKR1*) に注目して解析を行った。*NaKR1* 遺伝子は維管束篩部伴細胞で発現する重金属イオン結合タンパク質をコードする遺伝子で、近年 *FT* タンパク質の長距離移動を制御することが報告された。機能欠損変異体 *nakr1-1* は、地上部におけるナトリウムイオンやカリウムイオンの過剰蓄積に加え、長日条件下で顕著な遅咲き表現型を示す。はじめに、*NaKR1* が *FT* 遺伝子の発現制御経路に与える影響を解析した。*nakr1-1* 変異体では *FT* 遺伝子の発現量が顕著に減少しており、*nakr1-1* 変異体背景で維管束篩部伴細胞特異的に *FT* 遺伝子を発現させた形質転換体では花成時期が回復した。これらから、*NaKR1* は *FT* 遺伝子の転写制御においても重要な役割をもつことが示された。そこで次に、*FT* 遺伝子の転写制御に関わる複数の花成経路の因子と *NaKR1* の関係を解析した。光周期経路や春化経路に関わる因子の発現量は、野生型と *nakr1-1* 変異体の間で差が見られず、遺伝学的解析からも *NaKR1* はこれらの経路とは独立に花成を制御していることが明らかになった。一方で、*NaKR1* は miR156 の蓄積量の制御を介して *SPL3* 遺

伝子の発現の促進に関わることが明らかになった。しかし、日齢に応じた miR156 と *SPL3* 遺伝子の発現変化は *nakr1-1* 変異体でもみられたことから、NaKR1 は個体の年齢とは独立して miR156-SPL3 モジュールを介して *FT* 遺伝子の転写を制御すると考えられた。次に、*nakr1-1* 変異体で見られる無機栄養の攪乱が花成に影響していると予想して解析を行ったところ、*nakr1-1* 変異体の遅咲き表現型が培地中のカリウムイオン濃度の低下に応じて緩和することが観察され、NaKR1 がカリウムに応答した花成制御に関与していることが示唆された。*SPL3* 遺伝子を過剰発現させると *nakr1-1* 変異体背景でもカリウムに応答した花成時期の変化が確認されないことや、低濃度のカリウムイオン培地で育成した植物個体では miR156 の蓄積量の減少、*SPL3* および *FT* 遺伝子の発現量の上昇が見られたことから、カリウムに応答した花成制御は miR156-SPL3 モジュールを介した *FT* 遺伝子の発現制御によることが示唆された。本研究により、NaKR1 はこれまでに報告があったフロリゲンの輸送のみならず、合成 (*FT* 遺伝子の転写) をも制御する因子であることが示された。また、miR156-SPL3 モジュールがカリウムに応答した花成制御に関わることが明らかになったことで、土壌環境や栄養条件からのシグナルを統合する経路として miR156-SPL3 モジュールが重要な役割をもつというモデルが改めて支持された。

## 略語表

ACT2: ACTIN2

AP: APETALA

CO: CONSTANS

FE/APL: FE/ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT

FLC: FLOWERING LOCUS C

FT: FLOWERING LOCUS T

FTIP1: FT-INTERACTING PROTEIN 1

FUL: FRUITFULL

GFP: GREEN FLUORESCENT PROTEIN

gFT: genomic sequences of FT

GUS:  $\beta$ -glucuronidase

IPP2: ISOPENTENYL PYROPHOSPHATE: DIMETHYLALLYL PYROPHOSPHATE ISOMERASE2

LFY: LEAFY

miR156: microRNA156

miR172: microRNA172

MS: Murashige and Skoog

NaKR1: SODIUM POTASSIUM ROOT DEFECTIVE1

NF-Y: NUCLEAR FACTOR-Y

RT-PCR: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse transcription polymerase-chain-reaction)

RT-qPCR: 定量的 PCR (Quantitative reverse transcription polymerase-chain-reaction)

35S: カリフラワーモザイクウイルス 35S RNA プロモーター

SUC2: SUCROSE TRANSPORTER2

SULTR1;3: SULFATE TRANSPORTER1;3

SMZ: SCHLAFMÜTZE

SNZ: SCHNARCHZAPFEN

SOC1: SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1

SPL: SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE

SPL3r: miR156 耐性型 SPL3 (miR156-resistant SPL3)

TOE: TARGET OF EAT

T6P: トレハロース 6 リン酸 (Trehalose-6-phosphate)

TPS: TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE

TSF: TWIN SISTER OF FT

WT: 野生型 (Wild type)

ZT: Zeitgeber time

## 1. 序論

固着生活を営む植物は、種子から発芽した環境のもとで成長して次世代を残す必要がある。そのため植物は周囲の環境状態を感知し、その変化に応答して自身の発生や成長をコントロールすることで周囲の環境に適応する。土壌環境は、植物の発生に影響を与える重要な外的環境刺激のひとつである。植物の正常な発生・成長には 17 種類の元素が必要であり、そのうち空気中の二酸化炭素から取り込む炭素と酸素、および水分子から得る水素の 3 種類の元素を除いた残り 14 種類の元素は、すべて土壌中に水溶性イオンの形で存在しているものを根から吸収している (Marschner 2011)。土壌中に存在する元素の不足や、土壌中の pH により元素が不溶性になることによって、植物は十分量のイオンが吸収できず正常な発生が阻害される。また反対に、栄養素の過剰投与も、植物の正常な発生を阻害する要因となる (Marschner 2011)。土壌環境は作物生産にとっても重要であり、世界の土壌の約 30% は、イオンの吸収に問題が生じることが制限要因となって植物の成長が阻害される耕作不良土壌である (Kobayashi and Nishizawa 2012)。植物の生育に必要な栄養素のなかで、窒素、リン、カリウムはその必要量の多さから植物の 3 大栄養素と呼ばれ、肥料としてよく利用されている。なかでもカリウムは植物の細胞中にもっとも多量に含まれるイオンで、浸透圧調節、膜輸送、酵素活性、他の栄養素の輸送など、植物が生育するための様々な場面で重要な役割を果たしている (Clarkson and Hanson 1980, Wang and Wu 2013)。

### 花成ホルモン FT と FT の発現制御経路

栄養成長から生殖成長への相転換を花成と呼び、花成に伴い茎頂分裂組織で作られる側生器官は栄養器官である葉から生殖器官である花へと変化する。適切な時期に花成をおこなうことは、繁殖の成功や種子の生産量を介して植物の適応度に直結することから、花成は植物の発生制御の中でも重要なイベントのひとつである。長日条件下で花成が誘導される長日植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた変異体スクリーニングや分子遺伝学的な研究から、多くの花成に関する遺伝子座が同定され、花成の制御機構が明らかにされてきた (Koornneef et al. 1991, Srikanth and Schmid 2011)。現在では、花成制御経路として光周期経路、春化経路、自律経路、ジベレリン経路、そして齢依存経路の 5 つの経路の存在が明らかにされている (Srikanth and Schmid 2011, Yamaguchi and Abe 2012) (図 1)。これらの花成

経路からの情報は、花成統合遺伝子である *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) 遺伝子の発現制御に統合される。*FT* 遺伝子はフォスファチジルエタノールアミン結合タンパク質ファミリーに分類される 175 アミノ酸のタンパク質をコードした遺伝子で (Karadailsky et al. 1999、Kobayashi et al. 1999)、*FT* の発現は長日条件下で日周変動を示し、明期の終わり付近に子葉および本葉の維管束篩部伴細胞で発現が上昇する (Takada and Goto 2003)。葉の篩部伴細胞で生産された *FT* タンパク質は、篩管要素へ積み込まれたのちに篩管内を長距離移動して、茎頂分裂組織まで運ばれる (Corbesier et al. 2007、Notaguchi et al. 2008、Liu et al. 2012、Yoo et al. 2013、Zhu et al. 2016)。*FT* タンパク質は茎頂分裂組織において bZIP 型転写因子 *FD* タンパク質と相互作用をして、花芽分裂組織決定遺伝子である *APETALA1* (*API*) の発現を促進することで花成を誘導する (Abe et al. 2005、Wigge et al. 2005)。これらの報告より、*FT* タンパク質は、葉で受容した環境情報を茎頂に伝達して花成を誘導する花成ホルモン (フロリゲン) の主要な構成要素であるとみなされている。また、*FT* のホモログである *TWIN SISTER OF FT* (*TSF*) も、*FT* タンパク質と同様に篩部伴細胞でつくられた後に茎頂まで長距離移動して花成を誘導する因子であることが示唆されており、*TSF* タンパク質も *FT* タンパク質とともにフロリゲンとして機能すると考えられている (Yamaguchi et al. 2005、Jin et al. 2015)。

### 光周期経路 CO による *FT* の発現制御

*FT* の発現に統合される 5 つの経路のなかで、光周期経路の情報に応答して長日条件特異的な *FT* の発現リズムを構成する主要な制御因子が、B-box zinc-finger 型転写因子 *CONSTANS* (*CO*) である。*CO* の転写は光刺激と概日時計によって制御され、mRNA の蓄積に日周変動がみられる。さらに翻訳された *CO* タンパク質は光刺激によってその安定性が制御されている。これらの制御によって、*CO* タンパク質の蓄積は長日条件の明期の終わりに限定され、*FT* の特徴的な発現を生み出している (Andrés and Coupland 2012)。*CO* の転写レベルの制御とタンパク質の安定性の制御に加えて、*CO* が *FT* の転写を促進するためには、*FT* プロモーター上での複合体形成が重要である。*CO* タンパク質が *FT* プロモーター上で相互作用を行う因子として、*NUCLEAR FACTOR-Y* (*NF-Y*) グループの *NF-YB* や *NF-YC* が知られている。*CO* と *NF-Y* のタンパク質間相互作用によって、*FT* プロモーター上でクロマチンループ構造が形成され、この構造が *FT* の転写の促進に重要である (Kumimoto et al. 2008、



Kumimoto et al. 2010、Cao et al. 2014)。NF-Yに加えて、COとの相互作用を介した *FT* の転写制御に関わる因子として、篩部で特異的に発現する Myb 型転写因子 FE/ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT (FE/APL) が近年報告された (Abe et al. 2015、Shibuta and Abe 2017)。*FE* は長日条件における *FT* の転写の促進と、*FT* タンパク質の篩管要素への積み込みを制御する *FT-INTERACTING PROTEIN 1 (FTIPI)* の転写の促進を制御に関わる因子として報告され (Abe et al. 2015)、その後の報告で *FT* のプロモーター上に結合して CO 依存的に *FT* の転写を促進することが明らかにされた (Shibuta and Abe 2017)。*FE* は CO や NF-YB2 とタンパク質間相互作用を示すことから、*FE* も CO や NF-Y との複合体形成を介して *FT* プロモーター上のクロマチンループ構造の形成に関与している可能性が示唆されている (Shibuta and Abe 2017)。

#### 春化経路・自律経路 FLC による *FT* の発現制御

春化経路と自律経路の情報は、MADS box 型タンパク質をコードする *FLOWERING LOCUS C (FLC)* の発現制御に統合されて *FT* の発現を制御する。*FLC* は *FT* プロモーター上の CArG ボックスに結合して、*FT* の転写を抑制する抑制型の因子であり、*FLC* が高発現している変異体やアクセッションでは、長日条件下でも花成が促進されない。*FLC* の発現は、植物が長期間の低温処理 (春化处理) に曝されることで減少する。したがって、*FLC* の発現が上昇している変異体やアクセッションでは春化要求性が高く、春化处理をせず育成した際には遅咲きを示し、春化处理後に与えた長日条件下で花成が促進される。*FLC* は、葉における *FT* 依存的な花成経路のみでなく、茎頂分裂組織でも機能している。茎頂分裂組織においては、*FLC* は *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* や *FD* の発現を抑えることで花成を抑制している (Searle et al. 2006)。

#### 齢依存経路・ジベレリン経路 miR156-SPL による *FT* の発現制御

齢依存経路は、マイクロ RNA (miRNA) と *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* による花成制御経路に統合される。miRNA は 20 から 24 塩基の non-coding RNA で、標的となる遺伝子の mRNA の分解や翻訳阻害を行うことでその発現を制御する (Yamaguchi and Abe 2012)。miRNA による花成制御の研究からは、植物の齢依存的な花成制御経路としてマイクロ RNA156 (miR156) とマ

イクロ RNA172 (miR172) による花成制御が明らかにされた。花成に先立って植物の個体齢に伴い miR156 の発現は減少し、反対に miR172 の発現は上昇することや、*MIR156* 過剰発現体は遅咲き表現型を示し *MIR172* 過剰発現体は早咲きを示すことから、miR156 は幼齢期に花成を抑圧し、miR172 は反対に成熟期に花成を促進する機能を持つことが明らかになった (Aukerman and Sakai 2003、Wu and Poethig 2006、Jung et al. 2007、Wang et al. 2009)。miR156 の標的である *SPL* は、植物特有の SBP 型転写因子をコードしており、シロイヌナズナでは miR156 の標的配列をもつ *SPL* が 11 種類存在する (Xu et al. 2016b)。シロイヌナズナの *SPL* には 2 つのグループが存在し、*SPL3*、*SPL4*、*SPL5* を含むグループは主に花成時期の決定と相転換に関わる。一方で、*SPL9* や *SPL15* を含むグループは、花成の他に葉の発生や葉間期の制御も行う (Xu et al. 2016b)。*SPL* は機能的な冗長性が高く単独変異体では花成時期の異常は観察されないが、*SPL3*、*SPL4*、*SPL5* の 3 遺伝子をノックダウンした形質転換体や、*SPL9* グループの多重変異体では遅咲きを示す (Jung et al. 2016、Xu et al. 2016b)。また、miR156 の標的配列を欠損あるいは置換した *SPL3* や *SPL9* を過剰発現させると、顕著な早咲き表現型を示す (Wang et al. 2009、Wu et al. 2009、Yamaguchi et al. 2009)。これらの結果から、*SPL* には花成を促進する機能があることが明らかにされた。多くの *SPL* は茎頂で発現して、花芽メリステムを形成する転写因子 *API*、*LEAFY (LFY)*、*FRUITFULL (FUL)* の発現を誘導することで花成を促進する (Wang 2014、Teotia and Tang 2015)。*FT* の発現が見られる長日条件の葉で発現する *SPL* としては *SPL3* と *SPL9* が知られており、それぞれ異なる経路で *FT* の転写を制御している (Xu et al. 2016b)。維管束篩部伴細胞で発現する *SUCROSE TRANSPORTER2 (SUC2)* プロモーターで *SPL3* を発現させた形質転換体は早咲きを示すが、この花成促進能は *ft* 変異体背景で完全に抑圧されることから、*SPL3* は葉では *FT* を介して花成を促進することが示された (Wang et al. 2009)。その後の研究で、葉における *SPL3* は *FT* プロモーター上の GTAC モチーフに直接結合して、*FT* の転写を促進することで花成を誘導することが示された (Kim et al. 2012)。また、*SPL3* プロモーター上に *FD* や *SOC1* が結合すること、*ft* 変異体背景では *SPL3* の発現が減少することから、茎頂分裂組織においては葉とは反対に *FT* の下流で *SPL3* の発現が誘導されることが示唆されている (Jung et al. 2012)。*SPL9* は *SPL3* と異なり、直接 *FT* の発現を制御するという報告はない。*SPL9* は *MIR172* の転写を促進して、miR172 の標的である 6 種類の *APETALA2 (AP2)* 型転写因子、*TARGET OF*

*EAT1*(*TOE1*)、*TOE2*、*TOE3*、*SCHLAFMÜTZE*(*SMZ*)、*SCHNARCHZAPFEN*(*SNZ*)、*AP2*の発現量を制御している (Aukerman and Sakai 2003、Schmid et al. 2003、Wang et al. 2009、Yant et al. 2010)。これら AP2 型転写因子のうち *TOE1* や *TOE2*、*SMZ*、*SNZ* は、過剰発現体で *FT* の発現量が低下すること、*CO* の発現量は変化しないこと、*35S:CO* の早咲きを抑圧すること、が報告されており、*CO* の転写以降の過程で *FT* の発現制御に関わることが示唆されている (Mathieu et al. 2009、Yant et al. 2010、Zhang et al. 2015)。特に *TOE1* と *TOE2* に関しては、*CO* タンパク質との相互作用によって *CO* の機能を阻害して *FT* の転写を抑圧することが報告された (Zhang et al. 2015)。これらのことから、*SPL9* は *miR172* と AP2 型転写因子を介して、間接的に *FT* の発現を制御すると考えられている。

*SPL3* や *SPL9* は、齢依存経路による情報のほかに、ジベレリン経路からの情報も受けて花成を制御する。ジベレリンの受容体 *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* の変異体では葉における *SPL3* の発現量が減少することから、ジベレリン経路は *SPL3* の転写制御に関わることが示されている (Galvão et al. 2012)。一方、*SPL9* の発現量はジベレリン経路の変異によって顕著な変化は見られないが (Galvão et al. 2012)、ジベレリン存在下で分解される *DELLA* と呼ばれる転写抑制因子は *SPL9* と相互作用することで、ジベレリン非存在下で *SPL9* の機能を抑制して、葉における *FT* の発現制御に関わることが知られている (Yu et al. 2012)。

### 栄養環境による花成時期の変化と花成経路の応答

土壌中の栄養条件も花成時期に影響を与える環境刺激となることが知られており、栄養塩の欠乏に由来する貧栄養環境や、*NaCl* などの蓄積による塩ストレス環境は、上述した 5 つの花成制御経路に対して影響を与えることで花成に影響することが知られている (Vidal et al. 2014、Kazan and Lyons 2016) (図 2)。例えば、主要な窒素源である硝酸イオンの欠乏条件では、花成が促進される。このとき、窒素欠乏の刺激は、概日時計を介して光周期経路の *CO* や *FT* の転写を上昇させて花成を促進する (Yuan et al. 2016)。また、窒素欠乏条件では春化経路 *FLC* の発現量の低下や、齢依存経路 *miR156* の蓄積量、ジベレリン経路を介した *SMZ*、*SNZ* の発現に影響がみられることも報告されている (Pant et al. 2009、Kant et al. 2011、Gras et al. 2018)。糖 (炭素源) と窒素源のバランス (C/N バランス) も花成制御に関わることが知られており、*CO<sub>2</sub>* 濃度やトレハロース 6 リン酸 (T6P) を介したシグナル、C/N

バランスにも miR156-SPL 経路は応答して花成を制御する (佐藤と山口 2013、May et al. 2013、Wahl et al. 2013)。窒素とは反対に、リンの供給源であるリン酸の欠乏条件では、*FT*の発現が減少して花成が抑制される (Kant et al. 2011)。リン酸の欠乏に対しては、miR156 の蓄積量の上昇や *SPL3* の発現量の低下が見られる (Liu et al. 2016)。また、リン酸トランスポーター *PHOSPHATE TRANSPORTER1.1* の変異体では *FLC* の発現量の上昇や *FT* の減少および遅咲き表現型が報告されている (Kant et al. 2011)。

このように、三大栄養素のうち窒素やリンに応答した花成制御の分子機構については、複数の経路に影響がみられる知見が報告されているものの、カリウムの応答した花成制御機構については、その理解が遅れている。農業上の知見では、肥料として与えるカリウムの量が花成時期や収量に影響を与えることが複数の植物種で報告されている。また、シロイヌナズナを用いた実験では、篩部伴細胞で発現するカリウムイオントランスポーターの *AKT2/3* の機能欠損変異体において、花成時期の変化が見られることが報告されている (Deeken et al. 2002、Held et al. 2011)。これらの報告は、カリウムに対してもいずれかの花成経路が応答している可能性を示唆している。しかし一方で、カリウムイオンの取り込みに関わるトランスポーターやチャネルの変異体で花成時期の異常が見られる例は殆ど報告されていない。この要因としては、カリウムを取り込む経路および遺伝子の冗長性の高さが考えられる。カリウムは植物が最も多量に必要とするイオンであるため、土壤中の濃度や必要量に応じて複数のカリウム取り込み経路を持ち、さらにそれぞれの経路の遺伝子に冗長性がみられるため、多くの変異体や過剰発現体では他の経路へのフィードバック制御が働いて体内のカリウムの恒常性が維持される (Wang and Wu 2013)。そのため、カリウムイオンに応答した花成制御機構を明らかにするための、適切な実験材料が求められていた。

### **NaKR1 による栄養条件と花成時期の制御**

本研究では、無機栄養、特にカリウムに応答した花成制御経路についての理解を深めるために、*SODIUM POTASSIUM ROOT DEFECTIVE1* (*NaKR1*) に注目して解析を行った。*NaKR1* は、無機イオンの蓄積に異常が見られる変異体スクリーニングの中から単離された遺伝子であり、重金属イオン結合タンパク質をコードして、篩部伴細胞で特異的に発現している (Lahner et al. 2003、Zhang et al. 2008、Tian et al. 2010)。機能欠損変異体である *nakr1-1* は、ナトリウム・カリウム・ルビジウム

といった一価の陽イオンが地上部に過剰蓄積している (Tian et al. 2010)。*nakr1-1* ではイオンの蓄積異常の他に、糖転流の異常も観察されており、葉から根や茎頂部へのスクロースの輸送の異常や、葉でのデンプン粒の蓄積が報告されている (Tian et al. 2010、Zhu et al. 2016)。地上部のカリウムイオンや葉で合成された糖は、篩管要素を通過して他の器官に転流することから、*nakr1-1* では篩部を介した物質の輸送に異常が生じていると考えられている (Tian et al. 2010)。これらの異常に加えて、*nakr1-1* は長日条件下で顕著な遅咲き表現型を示すことが報告されている (Tian et al. 2010、Zhu et al. 2016)。*nakr1-1* の遅咲きは短日条件下では観察されず、またジベレリンや春化処理への応答には異常が見られない (Tian et al. 2010、Zhu et al. 2016)。さらに近年、*NaKR1* は篩管内における FT タンパク質の長距離移動も制御することが報告された (Zhu et al. 2016)。Zhu らは、*NaKR1* と FT がタンパク質間相互作用を示すことや、*nakr1-1* では葉の篩管要素への FT タンパク質の積み込みには異常が見られないものの、茎頂付近の篩管要素へ到達する FT タンパク質の量が減少していることを報告した (Zhu et al. 2016)。一方で、先行研究では *nakr1-1* での FT の発現量の低下も見られていたが、FT の転写制御における *NaKR1* の重要性については十分な解析や議論は行われていなかった (Zhu et al. 2016)。本研究では、*nakr1-1* でみられる栄養環境の攪乱が花成の異常を引き起こしたと考え、花成制御における環境刺激の統合点として重要な FT の転写制御と *NaKR1* の関わりについて詳細な解析を行った。

## 本研究の概要

本研究では、はじめに *NaKR1* がどのような分子機構で花成を制御しているかを明らかにするための解析を行った。発現解析と遺伝学的解析から、*NaKR1* は既に報告されている FT タンパク質の長距離移動に加えて、FT の転写を制御していることを確認した。これまで報告されている栄養による花成制御は複数の花成経路を介して FT の転写制御に影響していたことから、光周期経路の *CO*、春化経路の *FLC*、齢依存経路の *miR156-SPL* の 3 つの既知の経路に注目して、それぞれ *NaKR1* との関わりを調べた。その結果、*CO* や *FLC* を介した経路には *NaKR1* は影響していないことが示された。一方、*nakr1-1* では *miR156* の蓄積量の上昇および *SPL3* の発現量の減少が見られた。*SPL3* の発現を誘導すると *nakr1-1* 背景でも FT の発現が部分的に回復することや、*miR156* および *SPL3* の齢依存的な変動には *NaKR1* は影響しないこと

を示した。これらの結果から、*NaKR1* は個体齢の制御とは異なる方法で miR156-SPL3 を介して *FT* の発現制御を行うことを明らかにした。

続いて、*nakr1-1* で見られる遅咲き表現型に、栄養条件の攪乱が影響を与えているかを解析した。解析に先立ち、*nakr1-1* は生育環境の中で与える栄養によって花成時期に大きな違いが見られることを発見した。そこで、与える栄養を調節して花成時期を比較できる栽培系を確立して、栄養に応答した花成時期を評価する生理実験を行った。その結果、培地中のカリウムイオン濃度を調節して *nakr1-1* を育てると花成時期とカリウムイオン濃度に相関が見られ、低濃度のカリウム条件で *nakr1-1* の遅咲きが抑圧されることが明らかとなった。さらに、低濃度のカリウム条件で育成した *nakr1-1* では *FT* の発現の上昇が見られ、*nakr1-1* における *FT* の減少および遅咲きに、カリウムイオンの過剰蓄積が関係していることが示唆された。前半の解析で明らかにした *NaKR1* による miR156-SPL3 の制御が、カリウムイオンに応答したものであると仮説を立てて実験を行い、*SPL3* を過剰発現させた形質転換体ではカリウムに応答した花成時期の変化が見られなくなることを示した。また、低濃度のカリウム条件下で miR156 の蓄積量の減少と *SPL3* の発現量の上昇が野生型と *nakr1-1* で確認された。

本研究で得られた結果から、*NaKR1* は miR156-SPL3 経路を介して *FT* の発現を制御することが明らかとなった。さらに、*NaKR1* がカリウムに応答した花成制御に関与していることと、カリウムイオンに応答した花成制御に miR156-SPL3 経路が関与することが示された。三大栄養素である窒素やリン、また塩ストレスや乾燥ストレスも miR156-SPL 経路を介して花成を制御することが知られている。そのため、本研究の成果をこれまでの知見に加えることで、土壌中の環境刺激を統合して花成を制御する経路としての miR156-SPL 経路の重要性が改めて支持されることになった。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 供試植物

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)は Columbia (Col) 系統を野生型として使用した。本研究で使用した変異体及び形質転換体はすべて Col 背景である。本研究で使用した変異体及び形質転換体と、その出典を以下に示す。

<i>fca-9</i>	(Chou and Yang 1999、Page et al. 1999)
<i>flc-3</i>	(Michaels and Amasino 1999)
<i>ft-2</i>	(Imura et al. 2012)
<i>gFT:GUS</i>	(Notaguchi et al. 2008)
<i>nakr1-1</i>	(Tian et al. 2010)
<i>SULTR1;3:FT-T7; ft-1</i>	(Abe et al. 2015)
<i>tsf-1</i>	(Yamaguchi et al. 2005)
<i>35S:CO</i>	(遠藤求博士により作出)
<i>35S:SPL3r</i>	(本研究で作出)

多重変異体や変異体背景の形質転換体は上記の系統を交配して作出し、ゲノム DNA を用いた PCR や薬剤耐性、種子の GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) の蛍光観察によりホモ系統であることを確認した系統を用いた。

### 2.2. プラスミドコンストラクトと形質転換体の作出

*35S:CO*は遠藤求博士が作出した形質転換体を分与していただき使用した。*35S:CO*は、*CO*のオープンリーディングフレームが、*35S*プロモーターと NOS ターミネーターを含む pPZP211/*35S-nosT*ベクター (Nishimura et al. 2003) のマルチクロニングサイト上の XbaI と SacI サイト中にクローニングされていることを、形質転換体のシーケンスを読んで確認した。

*35S:SPL3r*のプラスミドコンストラクトは、はじめに miR156 の標的配列が存在する 3'UTR を含まない *SPL3*のコーディング領域 (Gandikota et al. 2007) を PCR で増幅して、EcoRV で切断した pRNTR/D-TOPO (Thermo Fisher Scientific) にクローニングした。その後、Gateway LR クロナーゼ (Invitrogen) を使用して、*35S*プロモーターと NOS ターミネーターを含む pFAST-G01 ベクター (Shimada et al. 2010) にクローニングした。作成したプラスミドはエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90 株) に導入し

て、花序浸し法 (Clough and Bent 1998) によってシロイヌナズナ野生型に形質転換を行った。アグロバクテリウムを感染させた植物から得られた  $T_1$  種子の蛍光観察を行い、GFP 蛍光が見られる種子を選抜した (Nishimura et al. 2003、Shimada et al. 2010)。選抜した個体を自殖させて得られた  $T_2$  種子の GFP 蛍光の分離比を観察して導入遺伝子が 1 座位にのみ挿入されたと考えられる系統を選抜した。後代の  $T_3$  種子の全種子で GFP 蛍光が観察された系統をホモ系統とみなし、その中から花成表現型が顕著で、かつ *SPL3* の発現量の上昇が RT-qPCR 法で確認できた系統を *35S:SPL3r* 系統として本研究で使用した。なお、GFP 蛍光の観察は蛍光実体顕微鏡下でおこなった。

### 2.3. 植物の栽培条件

植物の育成はバーミキュライト、ロックウール、または 1/2 Murashige and Skoog (MS) 培地を基にした寒天培地の 3 種類の条件で行った。

通常の花成時期測定用の植物体の育成には、バーミキュライト (ニツタイ株式会社) の小粒サイズと大粒サイズを 7:3 の割合で植物育成ポットの上下に敷き詰め、その上に給水させた圧縮ピートモス (Jiffy-7; Jiffy) をのせた鉢を用意した。種子を 2 日間、暗条件 4°C で低温処理および吸水を行った後に播種をした。無機栄養として 2 週間に 1 度の割合で、1000 倍に希釈したハイポネックス溶液 (ハイポネックス、N-P-K=6-10-5) を与えた。

ロックウール (グロダン/日東紡) を用いた植物の育成を行う時には、種子を播種する数日前からロックウールを水に浸して、毎日水を変えてすすいだ。水で洗浄したロックウール上に粉状にしたゴールデンピートバン (サカタのタネ) を少量撒き、暗条件 4°C で 2 日間吸水させた種子を播種した。無機栄養として、1000 倍に希釈したハイポネックス溶液か、1/2MS 溶液を数日おき与えた。

遺伝子発現解析用の植物体やカリウム濃度を調整した植物体の育成には、1/2MS 培地を基本にした寒天培地 (1%スクロース、0.8%寒天を含む) を用いた。遺伝子発現解析など短期間の植物体の育成には、深型シャーレ (直径 90 mm、高さ 20 mm) や 2 号角シャーレ (幅 140 mm x 100 mm、高さ 14.5 mm) を用いた。各シャーレには、それぞれ寒天培地を 30 ml と 60 ml ずつ加えた。次亜塩素酸ナトリウムを用いて滅菌した種子を寒天培地上に無菌的に播種した後 2~3 日間、暗条件 4°C で低温処理および種子の吸水をおこなってから、人工気象器内で育成を開始した。



寒天培地中で花成時期を測定する際には、花成がおこるまでの長期間にわたり乾燥やCO<sub>2</sub>濃度などのストレスを与えず安定して植物を育成するために、丸型培養瓶 CB-3 (胴径 91 mm、全高 89 mm) に 1/2MS 培地を 100 ml 加えた条件で育成を行った。湿度および CO<sub>2</sub> 濃度を実験条件間で揃えるために、瓶の上部 (蓋部分) に直径 1 cm の空気孔を開け、コンタミネーションを防ぐために孔径 0.45 μm の MilliSeal (メルクミリポア) を空気孔に貼った。植物は、1 瓶あたり 3 個体を育成した。種子の滅菌や低温処理、無菌的な播種の方法はシャーレの時と同様である。瓶と寒天培地を用いた栽培方法の模式図と植物を育成した様子を図 3 に示す。

植物の育成は人工気象器 (LH-80CCFL-6CT、LH300-RDSCT、LH350S、LH220S; 日本医科機器製作所) 内で、22°C、長日条件 (16 時間明期/8 時間暗期、80 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) または短日条件 (8 時間明期/16 時間暗期、100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) で育成した。

#### 2.4. 1/2MS 培地のカリウム濃度の調整方法

カリウムイオン濃度調整培地は、1/2MS 培地を改変して作成した。1/2MS 培地には通常約 10 mM のカリウムイオンが含まれている (9.4 mM KNO<sub>3</sub>、0.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、5 nM KI)。はじめに、KNO<sub>3</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、KI をそれぞれ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaI に置き換えてカリウムを含まない溶液を調整した。このとき 1/2MS 培地中に含まれる窒素濃度はアンモニウムイオン (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) と硝酸イオン (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) の合計がもとの 1/2MS 培地と同じ 30 mM になるようにした。その後、KCl を加えて目的のカリウムイオン濃度とした。通常 1/2MS 培地は pH 調整のために KOH を使用するが、カリウムイオン濃度を調整した培地では、KOH の代わりに塩基性の緩衝材として使用されるトリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) を加えて pH を調整した。作成した溶液を元に寒天培地 (1%スクロース、0.8%寒天を含む) を作成して、上記 3. に記したシャーレや培養瓶で植物を育成した。

#### 2.5. 花成表現型の評価

シロイヌナズナの花成表現型は植物個体が花を咲かせるまでにつけた葉数と相関を示すことが知られているため (Koornneef et al. 1991)、ロゼット葉と主茎の茎生葉の枚数によって花成表現型を評価した。

## 2.6. 春化处理

バーミキュライト上に種子を播種して、はじめに短日条件 22°C で 14 日間植物を育成した。その後、植物を短日条件 4°C で 4 週間 (28 日間) 育成することで春化处理を施した。春化处理後の植物は、長日条件 22°C で育成を行い、花成時期を調べた。春化处理を行わないコントロールの植物は、短日条件 22°C で 14 日間育成したのち、春化处理を行うことなくただちに長日条件 22°C に移して育成を継続した。

## 2.7. RNA 抽出と RT-qPCR による発現量の定量 (miR156 以外の遺伝子の定量)

miR156 を除く遺伝子発現解析のための RNA 抽出は、Plant RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて行った。抽出した RNA は RNase-free DNase I (QIAGEN) で処理をしたのち、1 µg を逆転写反応に用いた。逆転写反応は Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) を用いて 20 µl の反応系で行った。得られた cDNA 溶液を 10 倍希釈して、2 µl を解析に用いた。

RT-qPCR には CFX96 Real-Time PCR 検出システム (Bio-Rad) を使用し、miR156 を除く定量は SYBR Premix ExTaq II (TaKaEa) を用いて以下の反応条件で行った。

初期変性: 95°C 30 秒

変性: 95°C 5 秒、アニーリングと伸長: 60°C 30 秒 ; x 40 サイクル

定量のために、*ISOPENTENYL PYROPHOSPHATE: DIMETHYLALLYL PYROPHOSPHATE ISOMERASE2 (IPP2)* を内部標準として発現量を標準化した。*NF-Y* を除く各遺伝子の発現解析には、技術的反复 3 回と生物学的反复 3 回をそれぞれ行った。*NF-Y* の定量は、同一サンプル由来の cDNA を用いた技術的反复 3 回のみを行った。

RT-qPCR に用いたプライマー配列を表 1 に示す。

## 2.8. miR156 の定量のための RNA 抽出と RT-qPCR

miR156 を含む RNA を抽出するために、miRNeasy Mini kit (QIAGEN) と MaXtract High Density (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。逆転写反応は Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) を用いて 20 µl の反応系で行った。通常の逆転写では 25 µM の oligo-(dT)<sub>18</sub> プライマーを加えるが、miR156 の逆転写を行う際には、代わりに 12.5 µM の oligo-(dT)<sub>18</sub> プライマーと、0.25 µM の miR156-specific stem loop プライマー (5'-

GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGTGCTC-3') (Varkonyi-Gasic et al. 2007、Wahl et al. 2013) を加えて逆転写を行った。得られた cDNA 溶液を 10 倍希釈して、2  $\mu$ l を解析に用いた。

miR156 の定量のための RT-qPCR にも CFX96 Real-Time PCR 検出システムを使用し、SYBR Premix DimerEraser (TaKaRa)を用いて以下の反応条件で行った。

初期変性: 95°C 30 秒

変性: 95°C 5 秒、アニーリング: 57.6°C 30 秒、伸長 72°C: 30 秒； x 40 サイクル  
定量のために、*IPP2* を上記 6.の手法で発現量を測定して、内部標準として発現量を標準化した。

RT-qPCR に用いたプライマー配列を表 1 に示す。

## 2.9. RT-PCR による半定量的な発現解析

RT-PCR に用いる RNA の抽出と cDNA の合成は、上記 6.と同様の手法で行った。PCR には、2 $\mu$ l の鋳型 cDNA のほかに、2  $\mu$ l の 10x Ex Taq buffer、2  $\mu$ l の 2 mM dNTPs、1  $\mu$ l の 10  $\mu$ M プライマー、および 1  $\mu$ l の Ex Taq (TaKaRa) を含む 25  $\mu$ l の反応系で以下の反応条件で PCR を行った。

初期変性: 94°C 30 秒

変性: 94°C 30 秒、アニーリング: 60°C 30 秒、伸長:72°C 30 秒； x 35 サイクル  
伸長: 72°C 5 分

反応後の PCR 産物の溶液 20  $\mu$ l に対して 10x Loading Dye を 2  $\mu$ l 加えて、そのうち 10  $\mu$ l を、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイドにより染色して、紫外光照射下で DNA を検出した。内部標準として *ACTIN2* (*ACT2*) を用いた。

RT-PCR に用いたプライマー配列を表 1 に示す。

## 2.10. GUS 染色による遺伝子発現の空間的パターンの可視化

寒天培地で育成した植物体の地上部をサンプリングして、氷冷した 90%アセトンに 2 分間浸して固定した後、phosphate-buffered saline 溶液 (13.69 mM NaCl、0.27 mM KCl、0.81 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) で洗浄した。固定したサンプルは GUS 染色液 (phosphate-buffered saline 溶液中に 0.5 mg/mL X-Gluc、5 mM フェロシアン化カリウム、5 mM フェリシアン化カリウム、0.1% TritonX-100) に

浸して約 10 分程度の減圧処理を行った後、37°Cの暗所で 4 時間染色した。染色後 70%エタノールに浸して反応の停止と脱色処理を行った。脱色処理はエタノールに浸けた状態で 4°Cの暗所に数日間置くことで脱色を行った。脱色後のサンプルの観察は実体顕微鏡下で行った。

### 3. 結果

#### 3.1. NaKR1 による花成制御の分子機構の解析

序論で述べたように、本研究では無機栄養に応答した花成制御機構について解析を行うために *NaKR1* に注目して、地上部でナトリウムイオンやカリウムイオンの過剰蓄積が見られる機能欠損変異体 *nakr1-1* の解析を行った。この節では、*NaKR1* が既存の花成経路にどのような影響を与えているかを調べ、*NaKR1* による花成制御の分子機構の解明を試みた。

##### 3.1.1. *NaKR1* は *FT* の転写制御を介して花成制御をおこなう

近年、*NaKR1* は *FT* タンパク質の長距離移動に関与することで花成制御を行うことが報告された (Zhu et al. 2016)。一方 Zhu らの研究では、*nakr1-1* 変異体における *FT* の発現量の減少も報告されていたが、*NaKR1* の *FT* の発現制御への関与は検証されていなかった。そこで *NaKR1* が *FT* の発現制御を介して花成制御に関わる可能性を検証するために、はじめに、通常 *FT* が発現する長日条件下で、野生型と *nakr1-1* における *FT* の発現量を RT-qPCR 法を用いて比較した。1/2MS 培地を用いて育成した 10 日齢の植物体の地上部を、明期の開始から 4 時間おきにサンプリングを行い *FT* の発現を調べた。野生型では、*FT* の発現には明確な日周変動がみられ、明期の終わり (ZT16) にかけて *FT* の発現が上昇していた。一方で、*nakr1-1* では ZT16 付近での *FT* の発現量が野生型と比較して大きく低下していた (図 4)。また、*FT* のホモログである *TSF* についても野生型で発現のピークを示す ZT16 における発現量を野生型と *nakr1-1* で比較したところ、*nakr1-1* では野生型に比べて発現量の減少がみられた (図 5)。このことから、*NaKR1* は長日条件下における *FT* および *TSF* の発現誘導に関わっていることが示唆された。

*nakr1-1* 変異体における *FT* の発現パターンをより詳細に調べるために、*ft* 変異体の相補能を持つ約 8 kb の *FT* ゲノム領域において、*FT* 遺伝子のストップコドンの直前に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (*GUS*) 遺伝子を挿入した配列を導入した *gFT:GUS* 形質転換体を用いて、*nakr1-1* 変異体における *FT* 遺伝子の発現の有無を調べた。10 日齢と 18 日齢の *gFT:GUS* および *gFT:GUS; nakr1-1* の植物体の地上部をサンプリングして *GUS* 染色を行い、その染色の強さによって発現部位と発現量を評価した。野生型背景の *gFT:GUS* では、どちらの日齢においても、子葉および本葉の維管束で強い *GUS* の染色が確認できた (図 6A、C)。一方、*gFT:GUS; nakr1-1* では、10 日齢と 18 日齢

のどちらの日齢においても、*gFT:GUS* に比べて *GUS* の染色の程度が低下していた (図 6B、D)。18 日齢では、*nakr1-1* 背景では子葉における *GUS* の発現は野生型と同程度に確認できたのに対して、本葉における *GUS* の発現が対応する野生型の葉に比べていずれも低下していた (図 6C、D)。この結果から、*NaKR1* による *FT* の転写制御は子葉よりも本葉で強く影響することが示唆された。

*NaKR1* が *FT* と同一の経路で花成を制御しているかを調べるために、*ft-2* と *nakr1-1* を交配して *ft-2; nakr1-1* 二重変異体を作成して、長日条件と短日条件での花成表現型を野生型、*ft-2*、*nakr1-1* と比較した。また、*TSF* の変異体 *tsf-1* を含む三重変異体 (*ft-2; nakr1-1; tsf-1*) を作成して、同時に花成時期を調べ *ft-2; tsf-1* と比較した (図 7)。*ft-2* および *nakr1-1* は、長日条件下ではそれぞれ野生型に比べて顕著な遅咲き表現型を示した。そして、*ft-2; nakr1-1* 二重変異体は、長日条件で *nakr1-1* や *ft-2* と同程度の遅咲きを示した。また、*ft-2; nakr1-1; tsf-1* 三重変異体は、*ft-2; tsf-1* 二重変異体に比べて、わずかに遅咲きを示した (図 7A)。一方で、短日条件においては、いずれの変異体も野生型と同程度の花成時期を示した (図 7B)。これらの結果から、*NaKR1* は *FT* や *TSF* と同一の経路で機能して、長日条件での花成促進に関与していることが示唆された。

これまでの結果から、*NaKR1* は *FT* の発現誘導に重要であることと、*FT* と *NaKR1* が同一経路で花成を制御していることが示された。そのため次に、*NaKR1* による *FT* の転写制御が花成時期の決定に重要であるかどうかを調べた。維管束篩部伴細胞で発現する *SULFATE TRANSPORTER1;3 (SULTR1;3)* のプロモーター配列の下流で T7 タグを付加した *FT (FT-T7)* を発現する形質転換体 (*SULTR1;3:FT-T7; ft-1*、*SULTR1;3:FT-T7; ft-1; nakr1-1*) を用いて (Yoshimoto et al. 2003、Abe et al. 2015)、*nakr1-1* 背景で *FT* の発現を回復させた際の花成表現型を *nakr1-1* と比較した (図 8)。長日条件下で育成した際の花成時期を測定したところ、*nakr1-1* は顕著な遅咲きを示すが、*SULTR1;3:FT-T7; ft-1; nakr1-1* では遅咲きが抑圧され、親株の *SULTR1;3:FT-T7; ft-1* と同程度の花成時期を示した。この結果から、本実験系では *FT* の発現量を回復させることで *nakr1-1* の花成表現型が抑圧可能であることが明らかとなり、*NaKR1* は *FT* の転写制御を介して花成を促進していることが示唆された。

以上の結果から、*NaKR1* は既に報告されている *FT* タンパク質の長距離輸送の制御に加えて、*FT* の転写制御も介して花成を制御していることが明らかになった。

### 3.1.2. *NaKR1* は *CO* による花成制御に関与しない

これまでの解析から、*NaKR1* は *FT* の転写制御に関与していることが明らかとなった。*FT* の発現量は、複数の環境刺激に応答した花成制御経路の情報が統合されて制御されている(Andrés and Coupland 2012、Song et al. 2013)。そこで、*FT* の転写を制御することが知られている既知の花成制御経路に対する *NaKR1* の影響を調べることで、*NaKR1* による花成制御の分子機構を解析した。*nakr1-1* が長日条件下で特異的に遅咲きを示したことから、はじめに長日条件における花成促進に重要な光周期経路に注目して *NaKR1* の影響を検証した。

光周期経路では、光と概日時計によって発現と安定性が制御される *CO* タンパク質が篩部伴細胞で *FT* の転写を誘導している (Andrés and Coupland 2012、Song et al. 2013)。はじめに、*NaKR1* が *CO* の転写制御に影響しているかを調べるために、*nakr1-1* における *CO* の発現量を野生型と比較した (図 9)。1/2MS 培地を用いて育成した 10 日齢の植物体の地上部を、明期の開始から 4 時間おきにサンプリングを行い *CO* の発現を調べた。野生型では、*CO* の発現量が明期の後半 (ZT12~16) から暗期にかけて上昇する発現の日周変動がみられた。*nakr1-1* でも、*CO* の発現は野生型と同様の日周変動がみられ、発現量も野生型と *nakr1-1* で大きな違いは観察されなかった。この結果から、*NaKR1* は *CO* の転写制御には関与していないことが示唆された。

日長に応答した花成制御では、*CO* の転写制御に加えて *CO* タンパク質の安定性の制御も長日条件特異的な *FT* の発現誘導に重要である (Valverde et al. 2004、Andrés and Coupland 2012、Song et al. 2013)。*NaKR1* が *CO* の転写後制御に影響しているかを調べるために、カリフラワーモザイクウイルス 35S RNA プロモーター (35S) 制御下で *CO* を過剰発現させた形質転換植物体 (*35S:CO*、*35S:CO; nakr1-1*) を用いて、*nakr1-1* 背景で *CO* タンパク質を恒常的に蓄積させた際の花成表現型を観察した (図 10)。*nakr1-1* および *35S:CO*、*35S:CO; nakr1-1* を長日条件下で育成して花成時期を調べた結果、*35S:CO; nakr1-1* は *35S:CO* と同程度の顕著な早咲き表現型を示し、*nakr1-1* によって *35S:CO* の早咲きを抑圧する効果は見られなかった。これらの形質転換植物の長日条件における *CO* と *FT* の発現量を RT-qPCR 法で確認したところ、*CO* の過剰発現が確認され、さらに *35S:CO; nakr1-1* でも *35S:CO* と同程度の顕著な *FT* の過剰発現がみられた (図 11)。これらの結果から、*NaKR1* は *CO* の転写後の制御にも影響していないことが示唆された。

CO タンパク質は *FT* 遺伝子のプロモーター上に結合して転写を促進するために、複数の因子と相互作用をして複合体を形成する。CO と複合体を形成して *FT* の発現促進に関わる因子として *FE* や *NF-YB*、*NF-YC* が知られている (Kumimoto et al. 2008、Kumimoto et al. 2010、Cao et al. 2014、Abe et al. 2015、Shibuta and Abe, 2017)。そこで、これらの因子の発現制御を介して *NaKRI* が光周期経路に影響しているかどうかを調べるために、*FE*、*NF-YB2*、*NF-YB3*、*NF-YC3*、*NF-YC9* について、野生型と *nakr1-1* での発現量を RT-qPCR 法を用いて調べた。1/2MS 培地を用いて育成した 10 日齢の植物体の地上部を 4 時間おきにサンプリングして、各遺伝子についてその発現量と日周変動を確認したところ、*FE*、および今回調べた 4 種類の *NF-Y* (*NF-YB2*、*B3*、*C3*、*C9*) に関しては、いずれも野生型と *nakr1-1* の間で大きな発現量の変化や発現パターンの違いは見られなかった (図 12、13)。このことから、*NaKRI* は *FE* や *NF-Y* の転写制御に影響しないことが示唆された。

これら本研究の結果からは、*CO* の転写制御、タンパク質の安定性制御、相互作用因子の転写制御の、いずれの過程にも *NaKRI* の影響は確認されなかった。

### 3.1.3. *NaKRI* は *FLC* や春化経路とは独立に花成制御を行う

序論で示したように、春化経路と自律経路の情報を統合して *FT* の発現制御を行う因子である *FLC* の発現は、長期の低温 (春化) だけでなく、窒素やリンなどの複数の栄養刺激によっても制御を受ける (Searle et al. 2006、Kant et al. 2011)。そこで、*nakr1-1* で見られる栄養状態の攪乱による花成制御に *FLC* が関与している可能性を考え、*NaKRI* と *FLC* との関わりを検証した。

はじめに、*NaKRI* が *FLC* の発現に影響しているかどうかを明らかにするために、1/2MS 培地で育成した 10 日齢の植物体の地上部を ZT16 でサンプリングして *FLC* の発現量を解析した。この時、*FLC* の発現が上昇しているために春化要求性の高い変異体 *fca-9* を比較対象として用いて、野生型、*nakr1-1*、*fca-9* で *FLC* の発現量を比較した (図 14)。本研究で用いている野生型は春化要求性の低い Col であるため、野生型では *FLC* の発現は低く、春化要求性の高い *fca-9* では野生型に比べて顕著に *FLC* の発現量の増加が見られた。一方で、*nakr1-1* では *FLC* の発現量は野生型と同程度に低く、*FLC* の上昇は確認されなかった。このことから、*NaKRI* は *FLC* の発現制御に影響していないと考えられた。



*NaKR1* が春化経路に関与しているかをさらに調べるため、春化処理を行った際の花成時期の変化を、野生型、*ft-2*、*nakr1-1*、*fca-9*において観察することで、*nakr1-1* の春化処理への応答を調べた (図 15)。短日条件で 14 日間育成した後に 4 週間の低温処理を行った植物を長日条件で育成して、春化処理を行わずに長日条件で育成した植物の花成時期との差を比較することで、春化処理への応答を検証した。春化要求性の高い *fca-9* では、春化処理を行った個体では行わなかった個体と比べて顕著に花成の促進がみられた。一方、*ft-2* や *nakr1-1* では、春化処理を行うことで花成の促進は見られたものの、*fca-9* で見られたような大きな花成時期の変化は見られなかった。このことから *nakr1-1* の春化要求性は低いことが示され、この結果からも *NaKR1* は春化経路に影響していないことが支持された。

また、*NaKR1* が *FLC* を介して花成制御を行っているかを遺伝学的にも確かめるために、*FLC* の変異体である *flc-3* と *nakr1-1* を交配して二重変異体を作成して、その花成表現型を親系統と比較した (図 16)。長日条件下で、*nakr1-1* は遅咲きを示し、*flc-3* は反対に早咲きを示した。*flc-3; nakr1-1* は、*nakr1-1* よりもわずかに早咲きの表現型を示し、これは *flc-3* と *nakr1-1* の相加的な表現型であると考えられた。この結果から、*NaKR1* と *FLC* は独立に花成時期を制御していることが示唆された。

以上の 3 つの実験から、*NaKR1* は *FLC* を介した経路とは独立に花成を制御していることが示された。

#### 3.1.4. *NaKR1* は齢依存経路とは異なる方法で miR156-SPL3 を介して *FT* を制御する

*FT* の転写を制御する経路として、次に miR156-*SPL* 経路を介した齢依存経路に注目して解析を行った。miR156-*SPL* 経路は、齢依存的な花成促進経路であり、齢依存的に発現量の減少する miR156 によって発現量が制御される転写因子 *SPL* によって花成が促進される (Wang et al. 2009、Wu et al. 2009、Yamaguchi et al. 2009)。miR156 の制御を受ける *SPL* のうち、長日条件下の葉で強く発現するのは *SPL3* と *SPL9* の 2 種類であるため (Xu et al. 2016b)、これらの *SPL* による *FT* の発現制御に *NaKR1* が関与しているかを調べた。

*NaKR1* が *SPL3* や *SPL9* を介して花成制御を行っているかを調べるために、野生型と *nakr1-1* における *SPL3* と *SPL9* の発現量を RT-qPCR 法を用いて比較した (図

17)。1/2MS 培地上で育成した長日条件 10 日齢の植物体の地上部を、明期の開始から 4 時間おきにサンプリングを行い *SPL3* と *SPL9* の発現を調べたところ、野生型では *SPL3* と *SPL9* の発現はそれぞれ日周変動を示し、*SPL3* は ZT0 や ZT20 で、*SPL9* は ZT8 で、それぞれ発現の上昇が見られた。*nakr1-1* では、野生型で発現の上昇が見られる ZT0 や ZT20 での *SPL3* の発現が大きく減少していた (図 17A)。一方で、ZT8 での *SPL9* の発現の減少はわずかであった (図 17B)。この結果から、*NaKR1* は主に *SPL3* の発現制御に関与する一方で *SPL9* の制御には大きく影響しないことが考えられた。*SPL9* を介した経路と *NaKR1* の関わりをさらに調べるために、*SPL9* の下流で *FT* の発現制御を行う 4 種類の AP2 型転写因子 (*TOE1*、*TOE2*、*SMZ*、*SNZ*) について、野生型と *nakr1-1* で発現量の比較を行った (図 18)。*SPL9* の発現量を解析した時と同様の条件で AP2 型転写因子についても発現解析を行ったところ、野生型ではそれぞれ特徴的な日周変動が確認された。そして *nakr1-1* では、いずれの AP2 型転写因子も野生型とほぼ同様の発現量と日周変動を示した。この AP2 型転写因子の発現解析からも、*NaKR1* は *SPL9* の発現制御には大きく影響していないことが示唆された。

*SPL3* は、葉においては *FT* プロモーターに結合して *FT* の発現を促進している一方で、茎頂では *FT-FD* 複合体が *SPL3* の発現を正に制御している (Kim et al. 2012、Jung et al. 2012、Jung et al. 2016)。上記の *SPL3* の発現解析は、地上部全体をサンプリングしていたため、葉と茎頂の両方から RNA を抽出していた。*nakr1-1* では *FT* の発現量が減少しているため、地上部全体を用いた発現解析からは *SPL3* と *FT* の発現量の変動の上下関係を確定できなかった。そこで、1/2MS 培地上で育成した長日条件 10 日齢の植物の葉のみをサンプリングして *SPL3* の発現量を調べることにした。葉における発現解析を行う際に、野生型、*nakr1-1* と同時に、*FT* の発現を回復させた *SULTR1;3:FT-T7; ft-1; nakr1-1* を同時に発現量を調べることで、*nakr1-1* で見られた *SPL3* の減少のうち葉における *SPL3* の発現に *FT* の発現が影響しているかどうかを確認した (図 19)。*SPL3* の発現は、野生型に比べて *nakr1-1* で大きく減少していた。さらに、この減少は *SULTR1;3:FT-T7* によって *FT* を誘導しても回復しなかった。この結果から、*nakr1-1* の葉における *SPL3* の減少は *FT* の減少よりも上流で生じていると考えられた。

*SPL3* の転写産物は、miR156 による分解の制御を受ける (Wu and Poethig 2006、Wang et al. 2009)。*NaKR1* による *SPL3* の発現量の制御が miR156 を介して行われ

るかを明らかにするため、1/2MS 培地上で育成した長日条件 12 日齢の野生型と *nakr1-1* の地上部を、明期の開始から 4 時間おきにサンプリングして miR156 の蓄積量を調べた (図 20)。miR156 の定量は、逆転写の際に stem-loop primer を用いて miR156 特異的な逆転写反応を行った後に、RT-qPCR 法により行った (材料と方法を参照)。野生型では、miR156 の蓄積量は ZT0 や ZT20 で低く ZT4 で上昇していた。*nakr1-1* では、いくつかの時刻で野生型に比べて miR156 の蓄積量が上昇していた。特に *nakr1-1* で *SPL3* の発現量の減少が見られた ZT0 や ZT20 においては、野生型に比べて *nakr1-1* で miR156 の蓄積の上昇がみられた。一方で、*SPL9* の発現ピークを示す ZT8 では、野生型と *nakr1-1* の間に miR156 の蓄積量に変動は見られなかった。この結果から、*NaKR1* は miR156 の蓄積量の制御に関わっており、miR156 を介して *SPL3* を制御していることが示唆された。

*nakr1-1* の葉でみられた *SPL3* の減少が、*FT* の発現制御に影響しているかどうかを調べるために、*nakr1-1* 背景で *SPL3* の発現を回復させた形質転換体を作成して花成時期を調べることにした。*SPL3* の mRNA は 3'UTR 上に miR156 の標的配列を持ち分解されるため、*SPL3* の CDS のみをクローニングして miR156 の標的配列を持たない耐性型 *SPL3* (*SPL3r*) を 35S プロモーターの制御下で発現する形質転換体を作成した (*35S:SPL3r*, *35S:SPL3r; nakr1-1*)。長日条件 12 日齢の野生型、*nakr1-1*、*35S:SPL3r*、*35S:SPL3r; nakr1-1* を、*FT* の発現量が野生型で上昇する ZT16 でサンプリングして *FT* の発現量を RT-qPCR 法で解析した (図 21)。*35S:SPL3r; nakr1-1* における *FT* の発現量は、野生型や *35S:SPL3r* よりはやや低いものの、*nakr1-1* と比べると大きく *FT* の発現量の回復がみられた。また、これらの形質転換体の花成表現型を調べたところ、*35S:SPL3r; nakr1-1* では *nakr1-1* の遅咲き表現型が大きく抑圧されていた (図 22)。これらの結果から、*NaKR1* は少なくとも部分的には miR156-*SPL3* 経路を介して *FT* の発現を促進していることが示唆された。

これまでの結果から、*NaKR1* は miR156-*SPL3* 経路に影響を与えることが明らかになった。miR156-*SPL3* 経路は齢依存経路の制御を受けており、miR156 の蓄積は齢依存的に減少して、*SPL3* の発現は反対に齢依存的に上昇する (Wang et al. 2009、Wu et al. 2009)。*NaKR1* が齢依存経路に関与しているかを調べるために、miR156 の蓄積量と *SPL3* の発現量の個体齢による変化を RT-qPCR 法で定量して野生型と *nakr1-1* で比較した (図 23)。1/2MS 培地で育成した長日条件 8、12、16 日齢の植物体を ZT0 でサンプリングして miR156 の蓄積量を調べたところ、いずれの日齢で

も *nakr1-1* では野生型に比べて高い miR156 の蓄積がみられた。一方で、*nakr1-1* においても、野生型と同様に個体齢を追うごとに miR156 の蓄積量の減少がみられた (図 23A)。miR156 の結果と対応するように、*SPL3* の発現はいずれの日齢でも野生型に比べて *nakr1-1* で減少していたが、同様に齢依存的な *SPL3* の上昇は *nakr1-1* でも観察された (図 23B)。これらの結果から、*NaKR1* は齢依存経路とは異なる方法で miR156-*SPL3* 経路を制御していることが示唆された。また、短日条件 10、20、30 日齢の野生型と *nakr1-1* の ZT0 における *SPL3* の発現量を調べたところ、齢依存的な *SPL3* の上昇は *nakr1-1* でも確認され、特に 30 日齢では野生型と同程度まで *SPL3* の発現上昇がみられた (図 24)。このことは、短日条件では *nakr1-1* の花成に異常が見られないことと一致している (図 7B)。

これらの結果から、*NaKR1* は齢依存経路とは異なる方法で miR156-*SPL3* 経路の制御を介して *FT* を制御していることが示唆された。

### 3.2. *NaKR1* による栄養に応答した花成制御の解析

これまでの解析から、*NaKR1* は miR156-SPL3 経路を介した *FT* の転写制御に関わることが示された。また、*nakr1-1* では、花成時期の異常のほかにも、ナトリウムイオン・カリウムイオンの過剰蓄積や、糖転流の異常がみられる (Zhang et al. 2008、Tian et al. 2010、Zhu et al. 2016)。miR156-SPL 経路は、窒素やリンなどの栄養環境や塩ストレス、糖代謝などに応答して花成制御に関わることが知られている (Pant et al. 2009、Wahl et al. 2013、Cui et al. 2014、Lei et al. 2016)。そのため、*nakr1-1* でみられる栄養条件の攪乱が miR156-SPL3 経路の制御を介して花成制御に影響している可能性を考え、*NaKR1* と栄養に応答した花成制御の関わりについて解析を行った。

#### 3.2.1. 栄養条件の違いによる *nakr1-1* の花成時期の変化

これまで、花成時期を計測するための植物育成条件としては、バーミキュライト上に種子をまいて、栄養として 1000 倍希釈したハイポネックス溶液を与えていた。この条件では、*nakr1-1* は *ft-2* と同程度の遅咲きを示す (図 7)。しかし、バーミキュライト中に含まれる栄養塩が特定できないことと、ハイポネックス溶液では個々の栄養塩の濃度をコントロールできないため、1/2MS 培地の組成と同じ水溶液 (1/2MS 溶液) を与えて花成時期の計測を試みた。1/2MS 溶液を与えて花成時期を計測できるかを調べるために、はじめにバーミキュライトの代わりに、可溶性の栄養塩をほぼ含まないロックウール上に種子をまき、1000 倍希釈したハイポネックスまたは 1/2MS 溶液を与えて生育を調べた。ロックウール上で *nakr1-1* を育成すると、1/2MS 溶液を与えた *nakr1-1* はハイポネックスを与えた植物よりも早咲きを示すことが分かった (図 25)。これらの結果から、*nakr1-1* は土壤中の栄養に反応して花成時期が変動する可能性があると考えられた。

しかし、ロックウールと 1/2MS 溶液を用いた栽培方法でも、土壤中に残留する栄養塩の濃度をコントロールできないことや、富栄養によると考えられるコンタミネーションが起きることがあり、安定した長期間の栽培には適さなかった。そこで、無菌的かつ長期的に安定した条件で植物を育成するために、1/2MS 培地をベースに各栄養塩の濃度を調節した寒天培地を作成して植物を栽培する手法を確立して今後の実験を行うこととした (図 3、および材料と方法参照)。

### 3.2.2. *nakr1-1* においてカリウムイオンが FT の発現と花成に影響を与える

前節の結果から、*nakr1-1* は土壤中の栄養の変化によって花成時期が変化する可能性が示された。*nakr1-1* でみられる栄養条件の乱れが花成に影響しているとする、ナトリウム・カリウムイオンなどの栄養環境に応答して *nakr1-1* の花成時期が変化しているのではないかと考え、はじめに、カリウムと *NaKR1* の関わりについて解析を行った。

通常の 1/2MS 培地にカリウムイオンは 10 mM 含まれる (材料と方法参照)。そこで、カリウム濃度が 10 mM の培地をコントロールとして、カリウム濃度を 0.5 mM、1 mM、10 mM、30 mM、50 mM に変化させた培地を作成して、それぞれの育成条件における野生型と *nakr1-1* の花成表現型を調べた (図 26)。通常の 1/2MS 培地に相当する 10 mM のカリウム濃度条件では、野生型に比べて *nakr1-1* は顕著な遅咲きを示した。野生型では、カリウム濃度が高い 50 mM の条件の時に花成時期がやや遅延したが、カリウム濃度を減少させた時には花成時期の変化は見られなかった。一方で、興味深いことに、*nakr1-1* では培地中のカリウム濃度と花成時期の間に相関が見られ、カリウム濃度の低い 0.5 mM の条件では遅咲き表現型が抑圧された。また、高カリウム濃度の 50 mM の条件では *nakr1-1* でも花成の遅延が見られた。なお、0.5 mM より低いカリウム濃度条件 (0.1 mM) では子葉の展開以降の正常な発生が進まず植物が生育できず、花成は観察されなかった。また、50 mM より高いカリウム濃度の条件として 100 mM までカリウム濃度を上昇させて植物の生育を観察したが、高濃度のカリウム条件では本葉の形成に異常が見られ、花成が起こる前に発生が停止する個体や、茎頂部に花芽が見えるものの主軸の伸長が見られずそのまま発生が停止する個体が増え、正常な花成や結実を観察されなかった。100 mM のカリウム濃度培地で育成した植物体の写真を図 27 に示す。この結果から、*nakr1-1* は培地中のカリウムイオンに応答して花成時期が変化することが示された。特に低濃度のカリウム条件で遅咲き表現型が部分的に抑圧されたことから、*nakr1-1* で見られるカリウムイオンの過剰蓄積が花成遅延に影響している可能性が考えられた。

*nakr1-1* で見られた低カリウム条件での遅咲き表現型の抑圧が起こる花成制御機構を詳しく解析するために、はじめに FT の下流で発現する花芽形成遺伝子 *API* の発現がどの日齢で起きるかを調べることで花成の起こるタイミングを計測した。コントロールとなるカリウム濃度 10 mM と低濃度のカリウム濃度 0.5 mM の培地を

用いて長日条件で *nakr1-1* を育成して、*API* の発現がどの日齢で起きるかを調べた (図 28A)。20、24、28 日齢の植物の茎頂部を ZT16 でサンプリングして *API* の発現量を調べたところ、10 mM のカリウム条件では 28 日齢でも *API* の発現が見られず花成が起こっていないことが示された。一方で、0.5 mM のカリウム条件では 24 日齢の植物体から *API* の発現が見られ、28 日齢では 10 mM の条件に比べて顕著に *API* の発現が上昇していた。このことから、0.5 mM のカリウム濃度で育成した *nakr1-1* では、24 日齢付近で花成が起きていることが確かめられた。

低濃度のカリウム条件でみられる *nakr1-1* の花成の促進が *FT* の発現制御を介しているかどうかを明らかにするために、カリウム濃度 10 mM と 0.5 mM の培地で育成した *nakr1-1* における *FT* の発現が、日齢によってどのように変化しているかを RT-qPCR 法を用いて調べた (図 28B)。8 日齢から 4 日おきに 28 日齢までの *nakr1-1* の葉を ZT16 にサンプリングして *FT* の発現量の変化を調べたところ、0.5 mM のカリウム条件で育成した植物では、*API* の発現がみられた 24 日齢や、それに先立つ 20 日齢で *FT* の発現量の上昇がみられ、10 mM のカリウム条件で育成した植物体よりも *FT* の発現が誘導されていることが示唆された。この結果から、低濃度のカリウム培地で育成した *nakr1-1* で見られる花成の促進は、*FT* の発現誘導を介して起きていることが示唆された。

*nakr1-1* でカリウムに応答した *FT* の発現量の上昇が空間的にどのようなパターンで起きているかを明らかにするために、*gFT:GUS; nakr1-1* を 0.5 mM と 10 mM のカリウム条件で育成して、RT-qPCR の結果から 0.5 mM のカリウム条件で *FT* の発現上昇がみられた 24 日齢の植物体に GUS 染色を行って *FT* の発現パターンを可視化した (図 29)。コントロールのカリウム濃度 10 mM の培地で育成した植物では、子葉および第 1 本葉の維管束で強い GUS の染色が見られたが、それ以降の本葉での GUS の染色は弱かった (図 29A)。一方で、カリウム濃度 0.5 mM の培地で育成した植物では、子葉と第 1 本葉に加えて、それ以降の本葉の維管束においても強い GUS の染色が確認された (図 29B)。この結果から、*nakr1-1* では低濃度のカリウム培地で本葉における *FT* の発現が上昇することで花成が早く誘導されることが示唆された。

以上の結果から、*NaKRI* はカリウムに応答した *FT* の発現制御に関与していることが示唆された。

### 3.2.3. ナトリウムイオンは *nakr1-1* の花成時期の異常に大きく影響しない

*nakr1-1* ではナトリウムイオンの過剰蓄積も報告されている (Tian et al. 2010)、NaCl ストレスは花成を抑圧することが知られている (Cui et al. 2014)。そこで、*nakr1-1* におけるナトリウムイオンの過剰蓄積が遅咲き表現型に関係しているかを明らかにするため、1/2MS 培地に 50 mM の NaCl を加えた際に生じる花成時期の変化を野生型と *nakr1-1* で比較することで、塩ストレスに対する NaKR1 の関与を確かめた (図 30)。通常の 1/2MS 培地中におけるナトリウムイオンの供給源は  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  と  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  であり、その濃度はわずかに 0.06 mM 程度である。しかし、通常の 1/2MS 培地でも、*nakr1-1* は野生型に比べて顕著な遅咲きを示した。さらに、野生型では、50 mM の NaCl によってコントロールに比べて花成の遅延がみられたが、*nakr1-1* においても野生型と同様に NaCl に応答した花成の遅延が見られた。この結果から、ナトリウムイオンの過剰蓄積は *nakr1-1* の遅咲きの主要な要因ではないと考えられた。

### 3.2.4. *nakr1-1* では糖代謝を介した花成経路に異常はみられない

*nakr1-1* では篩部を介した糖転流に異常が生じており、茎頂部におけるスクロース濃度が減少することが報告されている (Tian et al. 2010、Zhu et al. 2016)。糖濃度と相関がみられるトレハロース 6 リン酸 (T6P) は、茎頂分裂組織において花成時期に影響することが知られており、糖濃度に応答して発現する T6P 合成酵素の *TPS1* の発現量が減少した植物は遅咲きを示す (Wahl et al. 2013)。そのため、*NaKR1* が茎頂部での T6P 経路を介した花成制御に影響している可能性が考えられた。そこでまず、T6P の蓄積に重要な *TPS1* の発現量を野生型と *nakr1-1* の茎頂部で比較した (図 31)。先行研究でスクロース濃度の差が大きく見られていた長日条件 12 日齢の植物の茎頂部をサンプリングして発現解析を行ったところ、野生型と *nakr1-1* の間で *TPS1* について大きな発現量の違いは見られなかった。このことから、*nakr1-1* で観察された茎頂部でのスクロース濃度の減少は、T6P 経路を介した花成制御には影響していないと考えられた。

T6P 経路は茎頂部では miR156 の蓄積量の制御を介して *SPL3* の発現および花成を制御する (Wahl et al. 2013)。糖代謝を介した T6P 経路と *NaKR1* の関わりを明らかにするため、茎頂部での miR156 の蓄積量を、野生型と *nakr1-1* で比較した (図 32)。長日条件 12 日齢の植物の茎頂部をサンプリングして miR156 の蓄積量を調べ



たところ、野生型と *nakr1-1* の間で miR156 の蓄積量に差は見られなかった。この結果からも、*NaKR1* は茎頂における T6P 経路には関与していないことが示唆された。

トレハロース 6 リン酸合成酵素 (TPS) グループは、T6P 合成酵素の活性のみを持つ *TPS1*~*4* を含むクラス 1 のほか、トレハロース 6 リン酸の合成と同時にトレハロース 6 リン酸を代謝する活性ももつ *TPS5*~*TPS11* を含むクラス 2 が存在する (Yang et al. 2012)。また、T6P は茎頂における花成制御のみでなく、葉でも *FT* の発現制御を介して花成時期に影響する (Wahl et al. 2013)。そのため、シロイヌナズナがもつ 11 種類の *TPS* の地上部での発現量を、RT-PCR を用いて半定量的に解析して、野生型と *nakr1-1* で比較した (図 33)。葉における T6P 経路による *FT* の発現制御は *SPL3* とは異なる経路を介していることが示唆されているため (Wahl et al. 2013)、*TPS* の発現解析は *FT* が誘導される ZT16 のサンプルを用いた。クラス 1 の 4 つの *TPS* のうち、*TPS2*、*3*、*4* は地上部で発現していないことが知られており、本実験でも野生型および *nakr1-1* の両方で発現が検出されなかった。*TPS1* については、茎頂部での発現解析と同様に地上部においても野生型と *nakr1-1* の間で発現量の差は見られなかった。また、クラス 2 の 7 種類の *TPS* (*TPS5*~*11*) は、いずれの *TPS* 遺伝子も野生型と *nakr1-1* で同程度の発現が検出され、*nakr1-1* における発現量の変化は確認されなかった。このことから、*NaKR1* は *TPS* 遺伝子の制御には関係がないことが示唆された。

これまでの *TPS* や miR156 の発現解析は、いずれも 1/2MS 培地上で育成した植物を用いて行われた。通常使用している 1/2MS 培地には 1% のスクロースが含まれている (材料と方法参照)。この外生のスクロースによって *nakr1-1* の糖転流の異常による花成時期の変化が見えにくくなっている可能性が考えられたので、スクロースを加えない 1/2MS 培地で野生型と *nakr1-1* を育成した際に、スクロースありの条件との花成時期の違いを調べた (図 34)。その結果、野生型と *nakr1-1* のどちらにおいても、外生のスクロースの有無による花成時期の変化は観察されなかった。

これらの結果から、*NaKR1* は茎頂部と葉の両方において T6P 経路を介した花成制御には影響していないことが示唆された。

### 3.2.5. miR156-SPL3 がカリウムイオンに応答して花成を制御する

これまでの解析から、*NaKR1* はカリウムイオンに応答した *FT* の発現制御に影響を与えていることが示唆された。また、3.1.の実験結果からは、*NaKR1* が miR156-

SPL3 経路を介して *FT* の発現制御を行っていることが明らかになっている。さらに、窒素やリン、塩ストレス、CO<sub>2</sub> 濃度といった様々な栄養刺激が、miR156 を介して花成時期の制御に関わることが報告されている (Hsieh et al. 2009、Pant et al. 2009、May et al. 2013、Wahl et al. 2013、Cui et al. 2014、Vidal et al. 2014、Lei et al. 2016)。そこで、NaKR1 によるカリウムに応答した花成制御は、miR156-SPL3 経路を介して *FT* の発現制御を行っているのではないかと考え、カリウムと NaKR1 および miR156-SPL3 の関係について解析を行った。

まず、野生型および *nakr1-1* で見られた培地中のカリウム濃度に応答した花成時期の変化に *SPL3* が関わっているかを明らかにするために、*35S:SPL3r* および *35S:SPL3r; nakr1-1* をカリウム濃度の異なる培地で育成した時の花成時期を比較した (図 26)。既に報告したように、高濃度のカリウム条件下では野生型と *nakr1-1* では花成の遅延がみられ、*nakr1-1* では低濃度のカリウム条件下で花成の促進が見られた。一方で、*35S:SPL3r* と *35S:SPL3r; nakr1-1* では、0.5 mM から 50 mM までのいずれのカリウム条件下でも常に同程度の早咲き表現型を示し、濃度に応答した花成時期の変化は観察されなかった。この結果から、カリウムに応答した花成には *SPL3* が関与していることが示唆された。

そこで次に、低濃度のカリウム条件である 0.5 mM と、コントロールとして 10 mM のカリウム条件で育成した *nakr1-1* の *SPL3* の発現量と miR156 の蓄積量をそれぞれ経時的に調べた (図 35)。植物は長日条件で育成して、8 日齢から 24 日齢までの葉をサンプリングして RT-qPCR 法で発現解析をおこなった。*SPL3* については、どちらのカリウム濃度で育成した際にも、齢依存的な *SPL3* の上昇が確認できた。しかし、16 日齢での *SPL3* の発現量を比較すると、0.5 mM のカリウム濃度で育成した個体でコントロールよりも発現が上昇しており、*SPL3* の発現上昇のタイミングが早まっていることが分かった (図 35A)。miR156 についても、*SPL3* と同様に齢依存的な蓄積量の変化はどちらのカリウム条件で育成した植物でも観察されたが、8 日齢や 12 日齢の植物における miR156 の蓄積量は、0.5 mM のカリウム濃度で育成した個体で、10 mM のカリウム濃度で育成した個体よりも低下していた (図 35B)。これらの結果から、*NaKR1* は miR156-SPL3 経路によるカリウムの応答に関与していることが示唆された。また、野生型においても花成が起こるタイミングの 8 日齢から 16 日齢までの植物体で同様に *SPL3* と miR156 の量を測定したところ、*nakr1-1* ほど顕著ではないものの、同様に低濃度のカリウムで育成した際に *SPL3* の上昇と miR156 の

減少が観察された (図 36)。この結果は、野生型では花成表現型に影響を与えるほど顕著ではないものの、やはり miR156-SPL3 経路がカリウムに応答して発現・蓄積が変動したのだと考えられる。

## 4. 考察

### 4.1. *NaKR1* による *FT* の転写制御と *FT* タンパク質の輸送制御

本研究の前半 (3.1.) では、はじめに *NaKR1* による花成制御に *FT* の転写制御が重要であることを明らかにした (図 4~8)。先行研究では、*NaKR1* は *FT* タンパク質の長距離移動の制御を行うことが報告されており (Zhu et al. 2016)、本研究の結果と合わせて、*NaKR1* は *FT* の転写制御と *FT* タンパク質の長距離移動の 2 つの過程を制御する因子であることが示された (図 37)。

葉の維管束篩部伴細胞で生産された *FT* タンパク質が茎頂分裂組織まで移動するためには、篩部伴細胞から篩管要素への積み込み、篩管内の長距離移動、篩部からの積み下ろし及び茎頂分裂組織までの細胞間移動、といった複数の過程に制御が存在することが示されている (Liu et al. 2012、Yoo et al. 2013、Zhu et al. 2016)。Zhu らの報告によれば、*NaKR1* はこのうち葉から茎頂への篩管内の長距離移動に関わっている。一方で本研究では、*SULTR1;3;FT-T7; ft-1; nakr1-1* で遅咲き表現型の抑圧が見られた結果 (図 8) から、*FT* タンパク質の長距離移動に異常は確認できず、*FT* の発現量の減少が *nakr1-1* の遅咲き表現型の主要な要因であることが示された。この違いは、*FT* を誘導するプロモーターの違いと、発現させた *FT* に付加したタグの違いによるものであると考えられる。Zhu らは、維管束篩部伴細胞で発現するプロモーターとして *SUC2* を用いて、*nakr1-1* 背景で *FT*、*FT-9myc*、*FT-GFP* の発現を誘導した際の花成表現型を解析している (Zhu et al. 2016)。この実験では、*FT-GFP* を誘導した時には *nakr1-1* 背景では輸送の阻害に由来すると考えられる顕著な花成時期の遅れが観察されているが、*FT-9myc* やタグを付加していない *FT* を誘導した形質転換体では、*nakr1-1* による花成遅延の効果は小さい (Zhu et al. 2016)。複数の研究で、*FT* と *FT-GFP* の長距離移動能は異なり、*GFP* タグを付加すると本来の *FT* の移動能が阻害されることが示唆されていることから (Corbesier et al. 2007、Notaguchi et al. 2008)、サイズの大きい *FT-GFP* を用いたことで *nakr1-1* による輸送の異常の効果が観察できたと考えられる。一方で、本研究で用いた *T7* タグは分子サイズの大きい *GFP* タグに比べて、*FT* の移動能への影響が小さいことが示唆されている (Notaguchi et al. 2008)。この理由から、本研究では *NaKR1* における *FT* タンパク質の輸送の制御よりも、*FT* の転写制御の重要性を示すことができたと考えられる。

*NaKR1* のように、*FT* の転写と *FT* タンパク質の長距離移動の両方を制御する因子として、*FE* が報告されている (Abe et al. 2015、Shibuta and Abe 2017)。*FE* は、

CO との相互作用を介して *FT* の発現制御を行う一方で、伴細胞から篩管要素への積み込みを制御する *FTIP1* や *NaKR1* の発現制御も行うことで *FT* タンパク質の輸送にも関与している (Abe et al. 2015、Shibuta and Abe 2017)。*FT* の発現量と篩部伴細胞内における *FT* タンパク質の蓄積量の間には何らかのフィードバック制御が存在することが示唆されている。これまでに、*FT* を過剰発現させた形質転換体では内生の *FT* 遺伝子の発現量が減少することや、*FT* タンパク質の輸送が阻害された変異体で *FT* の発現量の減少が見られることが報告されており、*FT* タンパク質の蓄積が *FT* の発現に対して抑制的にはたらく負のフィードバック制御が存在すると考えられている (Corbesier et al. 2007、Liu et al. 2012)。このような *FT* の転写制御と *FT* タンパク質の輸送の間を調節する分子機構はまだ解明されていない。本研究から *NaKR1* が *FT* の転写と *FT* タンパク質の輸送の両過程を制御することが示されたため、*NaKR1* や *FE* によってフロリゲンの生産と輸送の調節を行っている可能性が考えられる。

#### 4.2. *NaKR1* による光周期経路への影響

本研究では、*nakr1-1* の花成遅延は長日条件下のみ特異的に観察され、また *NaKR1* は *FT* の発現制御を介して花成を制御していることが示された (図 4~8)。このことから、*NaKR1* は長日条件下での花成制御で重要な役割をもつことが示唆された。さらに本研究では、*NaKR1* による *FT* の制御が、miR156-SPL3 経路を介して行われることを明らかにした。茎頂分裂組織では、*FT*-*FD* が *SPL3* のプロモーターに結合して発現を誘導することや、*FD* と *SPL3* のタンパク質相互作用が *API* の誘導に重要なことが示されており、*SPL3* が齢依存経路と光周期花成経路を統合する役割を持つと考えられている (Jung et al. 2012、Jung et al. 2016)。本研究の成果は、葉においても *SPL3* が光周期経路に影響を与えることを示唆している。ただし、葉における *SPL3* による *FT* の発現制御は、*SPL3* が *FT* プロモーター上に結合することは報告されているものの (Kim et al. 2012)、その詳細な転写制御機構はまだ明らかにされていない。そのため、*NaKR1* による *SPL3* を介した *FT* の発現制御と光周期経路の関わりを理解するためには、*SPL3* による *FT* の転写制御についてさらなる解析が必要である。

また一方で、*35S:SPL3r; nakr1-1* では野生型や *35S:SPL3r* ほど十分な *FT* の発現量の回復は見られなかった (図 21)。さらに、*nakr1-1* は *FT* の発現量が極めて大きく減少して *ft-2* と同程度の顕著な遅咲きを示すが (図 4、7)、*spl3 spl4 spl5* 三重変

異体で見られる花成遅延は *ft* 変異体ほど顕著ではない (Jung et al. 2016、Xu et al. 2016b)。これらの結果から、*NaKRI* は *SPL3* 以外の経路にも影響して *FT* の発現を制御していると考えられる。日長情報に応答した花成を制御するのは光周期経路であり、光周期経路の情報は主に *CO* による *FT* の発現制御に統合される (Andés and Coupland 2012、Song et al. 2013)。そのため、*NaKRI* が *CO* による *FT* の転写制御経路に対して影響している可能性が高いと考えられる。しかし本研究で解析を行った限りでは、*CO* の発現制御や *CO* タンパク質の安定性の制御、また複合体を形成する *FE* や *NF-Y* の転写制御に対する *NaKRI* の関与は見られなかった (図 9~13)。また、*CO* の発現制御とは独立の過程で *FT* の転写制御を行う経路としては、T6P を介した経路による制御があることが報告されている (Wahl et al. 2013)。しかしながら、本研究では T6P 経路の制御に重要な *TPS* 遺伝子の発現に *NaKRI* の関与は見られなかった (図 33)。そのため、*NaKRI* による長日条件特異的な *FT* の発現制御機構については、さらなる解析が必要である。カリウム以外の栄養として、窒素やリンでは *miR156-SPL* 以外の複数の花成経路の因子に対して影響を与えることが知られているため、*NaKRI* による花成制御機構の解析を進めることは、カリウムに応答した花成制御機構のさらなる理解にも繋がることを期待できる。

*NaKRI* による光周期経路への影響を考える上で、*NaKRI* 自身の発現の日周応答性にも注目する必要がある。*NaKRI* 自身の発現に関しては、*NaKRI* は *CO* 依存的に長日条件特異的な発現を示すという先行研究 (Zhu et al. 2016) がある一方で、*NaKRI* の発現は *CO* 非依存的で発現に日周変動は見られないとする報告 (Shibuta and Abe 2017) も存在する。そのため、光条件依存的な *NaKRI* の発現制御や機能については、さらなる検証が必要である。*nakr1-1* の表現型から考えると、花成の異常は長日条件特異的に示す一方でカリウムイオンの過剰蓄積や根の伸長阻害といったその他の異常は短日条件でも観察されることから (Tian et al. 2010)、Zhu らの知見は花成制御以外の *NaKRI* の機能を考える際に疑問点が生じる可能性があり、より詳細に検討すべきだと考えられる。

#### 4.3. *NaKRI* による *miR156-SPL3* 経路の制御機構

本研究では、*nakr1-1* では *SPL3* の発現量が大きく減少していた一方で、*SPL9* の発現量の減少は *SPL3* に比べて小さかったため、*NaKRI* は主に *SPL3* の発現制御に影響していることが示された (図 17)。*NaKRI* による *SPL9* を介した経路への影響

が小さいことは、*nakr1-1* で *SPL9* の下流の AP2 型因子の発現量の変化が見られないことから支持される (図 18)。また、*nakr1-1* では長日条件下で miR156 の蓄積量の上昇が見られたことから (図 20、23)、*NaKR1* は miR156 を介して *SPL3* の発現を制御していることが示された。*SPL3* と *SPL9* はどちらも miR156 の制御を受けて mRNA の蓄積量が調節されているにも関わらず、*NaKR1* が *SPL3* の発現制御により大きな影響を与える要因としては、miR156 の蓄積量の日周変動が影響している可能性がある。野生型と *nakr1-1* の miR156 の蓄積量を比較したところ、*SPL3* の発現ピークを示す ZT0 や ZT20 では野生型に比べて *nakr1-1* で蓄積量の上昇が見られた一方で、*SPL9* の発現ピークを示す ZT8 では差は見られなかった (図 20)。この違いが、*NaKR1* による *SPL3* と *SPL9* の制御の違いに反映されている可能性がある。ただし、miR156 非依存的な *SPL3* と *SPL9* の転写制御機構についての知見は少なく、どのようにして各 *SPL* の日周変動の違いが生み出されているかは分かっていない。そのため、*NaKR1* が miR156 依存的な経路のみでなく、非依存的に *SPL3* の転写制御に関与する可能性も残されている。*NaKR1* による *SPL3* の転写制御機構については今後さらに解析を進めるべき課題である。

また、本研究で miR156 の蓄積量の日周変動を調べたところ、野生型の miR156 の蓄積は明期開始後の ZT4 に高く、暗期の間 (ZT16 から ZT0) に蓄積が減少している傾向が示された (図 17、20)。miR156 の蓄積量の日周変動に関する理解も不足していて、今回計測された miR156 のリズムの生物学的な意味付けや、その制御機構についての詳細は不明である。近年報告された知見では、複数の *MIR156* 遺伝子の転写を PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR (PIF) が制御していることが明らかになった (Xie et al. 2017)。PIF は *MIR156* の転写を抑制する機能を持ち、活性型の phytochrome B (phyB) によって PIF が分解されることで *MIR156* の転写が促進される。したがって、不活性型の phyB が増える暗期には PIF の蓄積が上昇して *MIR156* の転写は抑制され、反対に活性型の phyB が増える明期には PIF が分解されて *MIR156* の転写が促進される可能性があり、本研究で計測された miR156 の蓄積量の日周変動は PIF による制御を反映している可能性が考えられる。*nakr1-1* で見られる miR156 の蓄積量の上昇は、ZT0 や ZT20 で野生型との差が大きく見られたことから、暗期における *MIR156* の発現や miR156 の蓄積の制御に *NaKR1* が関わっている可能性がある。

#### 4.4. *NaKR1* はカリウムに応答した miR156-SPL3 経路を制御している

本研究の後半 (3.2.) では、*nakr1-1* で見られる栄養の乱れのなかでも、カリウムイオンの過剰蓄積が花成時期の異常に影響していることを示した (図 26、27)。また、*nakr1-1* では miR156→*SPL3*→*FT*→*API* の一連の花成経路が、カリウムイオン濃度に応答して蓄積量や発現量が増減していることを明らかにした (図 28、29)。*SPL3* を過剰発現させるとカリウムイオンに応答した花成時期の変化が野生型背景でも *nakr1-1* 背景でも見られなくなることから、カリウムに応答した花成制御は *SPL3* を介していることが示唆された (図 26)。*gFT:GUS; nakr1-1* を用いてカリウム濃度に応答した *FT* の発現の空間的パターンを調べた実験では、低濃度のカリウムによる *FT* の上昇は主に本葉で見られることが示された (図 29)。*SPL3* の発現パターンも、子葉や古い本葉で低く新しく形成された本葉で高いことが知られており (Xu et al. 2016b)、この結果からもカリウムに応答した *FT* の制御は *SPL3* を介していることが示唆された。したがって本研究では、*NaKR1* に依存したカリウムイオン濃度変動に応答して *FT* の転写が調節されること、そしてそれは miR156-SPL3 経路を介して行われると結論づけた。

近年、個体齢に応じた miR156 の減少が起こるメカニズムについてはいくつかの報告がされ、MYB 型の転写因子による *MIR156* の転写制御や、*MIR156* 上のヒストン修飾によるエピジェネティックな発現抑制が齢依存的な miR156 の減少に関わることが報告されている (Xu et al. 2016a, Guo et al. 2017)。一方で、*nakr1-1* で見られるカリウムイオンの過剰蓄積が、どのように *MIR156* の発現制御あるいは miR156 の蓄積量の制御に至るのかはまだ明らかにされていない。*MIR156* の発現量や miR156 の蓄積量は、今回明らかにしたカリウムの情報のみでなく、窒素やリンなどの栄養、塩ストレスや乾燥ストレス、日長条件、一過的な温度変化など、様々な環境刺激に応答することが知られている (Kim et al. 2012, May et al. 2013, Wahl et al. 2013, Cui et al. 2014, Stief et al. 2014, Xie et al. 2017)。しかしその制御機構について報告されている例は、上述した PIF による *MIR156* の転写制御が知られている程度で、他の刺激に miR156 がどのような分子機構を介して応答しているのかは不明な点が多い。今後 *NaKR1* がどのように miR156 の蓄積量を制御しているかを明らかにすることで、植物が栄養環境に適応するメカニズムの重要な理解に繋がることが期待できる。



#### 4.5. 栄養刺激の統合点としての miR156-SPL 経路の役割

シロイヌナズナは長日条件で *FT* の発現を介して花成が誘導される一方で、短日条件では、miR156-SPL 経路は日齢やジベレリンの刺激を受けた花成経路として、*FT* 非依存的に花成を誘導する (Yamaguchi et al. 2009、Hyun et al. 2016)。本研究で *nakr1-1* における *SPL3* の発現量を短日条件で測定したところ、10 日齢や 20 日齢では *SPL3* の発現量の減少がみられたものの、30 日齢まで成長した個体では *nakr1-1* でも野生型と同程度まで *SPL3* の発現が誘導された (図 24)。このことは、*nakr1-1* の花成時期の異常が長日条件特異的に見られることと一致している (図 7B)。一方で、*nakr1-1* のカリウムイオンの過剰蓄積は、短日条件で育成した植物でも見られる (Tian et al. 2010)。したがって *NaKR1* によるカリウムイオンの制御は、短日条件では *SPL3* や花成に影響を与えないことが示唆され、栄養に応答した花成制御は、日長や個体齢といった他の刺激と統合されていると考えられる。発生段階に応じた栄養刺激に対する応答性の違いについては、窒素や C/N バランスでの理解が進んでいる。窒素の主要な供給源である硝酸塩やアンモニウム塩に応答した miR156 の蓄積量の変動は、植物の発達段階によって異なる可能性が示されている (Pant et al. 2009、Vidal et al. 2014)。また C/N バランスに応答したライフサイクルの制御も発達段階によって異なる応答を示すことが明らかにされつつある。発芽直後の種子貯蔵物質のエネルギーに依存した従属栄養成長期から光合成と根からの栄養で成長する独立栄養生長期への相転換の過程では低炭素/高窒素条件で進行が促進される一方で、栄養成長相から生殖成長相への転換である花成に対しては低炭素/高窒素条件は抑制的にはたらく反対に高炭素/低窒素条件で花成が誘導される (佐藤と山口 2013、May et al. 2013、Vidal et al. 2014)。これらの報告から、miR156-SPL 経路は植物の個体齢や発達段階といった情報と栄養環境の両方の刺激を統合して花成やストレス応答などの植物の発生を制御する経路として重要な役割を果たしていると考えられる。本研究の成果は、窒素やリンに加えて、カリウムイオンに対しても同様に miR156-SPL 経路が応答して花成を制御する可能性を示唆するものである (図 37)。

農業分野では、3 大栄養素の窒素・リン・カリウムは肥料として広く使われており、これらの施肥管理が花成時期や収量に重要であることが知られてきた。これまでの先行研究に本研究の知見を加えると、いずれの 3 大栄養素に対しても miR156-SPL 経路が応答することが示唆され、この経路を介した花成制御機構の理解を深めることは持続可能な農業の構築の助けになることが期待できる。

## 文献

### 邦文

佐藤長緒、山口淳二 (2013) C/N バランス調節による植物の代謝・成長戦略  
化学と生物 51: 763-772.

### 英文

Abe, M., Kaya, H., Watanabe-Taneda, A., Shibuta, M., Yamaguchi, A., Sakamoto, T. et al. (2015) FE, a phloem-specific Myb-related protein, promotes flowering through transcriptional activation of *FLOWERING LOCUS T* and *FLOWERING LOCUS T INTERACTING PROTEIN 1*. *Plant J.* 83: 1059-1068.

Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y. et al. (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309: 1052-1056.

Andrés, F. and Coupland, G. (2012) The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat. Rev. Genet.* 13: 627-639.

Aukerman, M.J. and Sakai, H. (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes. *Plant Cell* 15: 2730-2741.

Bonke, M., Thitamadee, S., Mähömen, A.P., Hauser, M. and Helariutta, Y. (2003) APL regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis*. *Nature* 426: 181-186.

Cao, S., Kumimoto, R.W., Gnesutta, N., Calogero, A.M., Mantovani, R. and Holt, B.F. 3rd. (2014) A distal *CCAAT/NUCLEAR FACTOR Y* complex promotes chromatin looping at the *FLOWERING LOCUS T* promoter and regulates the timing of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 1009-1017.

Chou, M. and Yang, C. (1999) Late-flowering genes interact with early-flowering genes to regulate flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 40: 702-708.

Clarkson, D.T. and Hanson, J.B. (1980) The mineral nutrition of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 239-298.

Clough, S. and Bent, A. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.

Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I. et al. (2007)

FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316: 1030-1033.

Cui, L., Shan, J., Shi, M., Gao, J. and Lin, H. (2014) The *miR156-SPL9-DFR* pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *Plant J.* 80: 1108-1117.

Deeken, R., Geiger, D., Fromm, J., Koroleva, O., Ache, P., Langenfeld-Heysler, R. et al. (2002) Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. *Planta* 216: 334-344.

Galvão, V.C., Horrer, D., Küttner, F. and Schmid, M. (2012) Spatial control of flowering by DELLA protein in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 139: 4072-4082.

Gandikota, M., Birkenbihl, R.P., Höhmann, S., Cardon, G.H. Saedler, H. and Huijser, P. (2007) The miRNA156/157 recognition element in the 3'UTR of the Arabidopsis SBP box gene *SPL3* prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant J.* 49: 683-693.

Gras, D.E., Vidal, E.A., Undurraga, S.F., Riveras, E., Moreno, S., Dominguez-Figueroa, J. et al. (2018) SMZ/SNZ and gibberellin signaling are required for nitrate-elicited delay of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 69: 619-631.

Guo, C., Xu, Y., Shi, M., Lai, Y., Wu, X., Wang, H. et al. (2017) Repression of miR156 by miR159 regulates the timing of the juvenile-to-adult transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 29: 1293-1304.

Held, K., Pascaud, F., Eckert, C., Gajdanowicz, P., Hashimoto, K., Corratgé-Faillie, C. et al. (2011) Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex. *Cell Res.* 21: 1116-30.

Hepworth, J. and Dean, C. (2015) Flowering locus C's Lessons: conserved chromatin switches underpinning developmental timing and adaptation. *Plant Physiol.* 168: 1237-1245.

Hsieh, L., Lin, S., Shih, A.C., Chen, J., Lin, W., Tseng, C. et al. (2009) Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiol.* 151: 2120-2132.

- Hyun, Y., Richter, R., Vincent, C., Martinez-Gallegos, R., Porri, A. and Coupland, G. (2016) *Dev. Cell* 37: 1-13.
- Imura, Y., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Furutani, M., Tasaka, M., Abe, M. et al. (2012) CRYPTIC PRECOCIOUS/MED12 is a novel flowering regulator with multiple target steps in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 53: 287-303.
- Jin, S., Jung, H.S., Chung, K.S., Lee, J.H. and Ahn, J.H. (2015) FLOWERING LOCUS T has higher protein mobility than TWIN SISTER OF FT. *J. Exp. Bot.* 66: 6109-6017.
- Jung, J.H., Seo, Y.H., Seo, P.J., Reyes, J.L., Yun, J., Chua, N.H. et al. (2007) The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 2736-2748.
- Jung, J., Ju. Y., Seo, P.J., Lee, J. and Park, C. (2012) The SOC1-SPL module integrates photoperiod and gibberellic acid signals to control flowering time in Arabidopsis. *Plant J.* 69: 577-588.
- Jung, J., Lee, H., Ryu, J.Y. and Park, C. (2016) SPL3/4/5 integrate developmental aging and photoperiodic signals into the FT-FD module in Arabidopsis flowering. *Mol. Plant* 9: 1647-1659.
- Kant, S., Peng, M. and Rothstein, S.J. (2011) Genetic regulation by NLA and microRNA827 for maintaining nitrate-dependent phosphate homeostasis in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 7: e1002021.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T. et al. (1999) Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* 286: 1962-1965.
- Kazan, K. and Lyons, R. (2016) The link between flowering time and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 67: 47-60.
- Kim, J.J., Lee, J.H., Kim, W., Jung, H.S., Huijser, P. and Ahn, J.H. (2012) The microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 module regulates ambient temperature-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 159: 461-478.
- Kobayash, T. and Nishizawa, N.K. (2012) Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 131-152.

- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. and Araki, T. (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286: 1960-1962.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J. and van der Veen, J.H. (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 229: 57-66.
- Kumimoto, R.W., Adam, L., Hymus, G.J., Repetti, P.P., Reuber, T.L., Marion, C.M. et al. (2008) The nuclear factor  $\gamma$  subunits NF-YB2 and NF-YB3 play additive roles in the promotion of flowering by inductive long-day photoperiods in *Arabidopsis*. (2008) *Planta* 228: 709-723.
- Kumimoto, R.W., Zhang, Y., Siefers, N. and Holt, B.F. 3rd. (2010) NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperiod-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 63: 379-391.
- Lei, K., Lin, Y., Ren, J., Bai, L., Miao, Y., An, G. et al. (2016) Modulation of the phosphate-deficient responses by microRNA156 and its targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3 in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 57: 192-203.
- Lahner, B., Gong, J., Mahmoudian, M., Smith, E.L., Abid, K.B., Rogers, E.E. et al. (2003) Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* 21: 1215-1221.
- Liu, L., Liu, C., Hou, X., Xi, W., Shen, L., Tao, Z. et al. (2012) FTIP1 is an essential regulator required for florigen transport. *PLoS Biol.* 10: e1001313.
- Marschner, P. (2011) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, 3rd edn. Academic Press, San Diego.
- Mathieu, J., Yant, L.J., Murdter, F., Kuttner, F. and Schmid, M. (2009) Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biol.* 7: e1000148.
- May, P., Liao, W., Wu, Y., Shuai, B., McCombie, W.R., Zhang, M.Q. et al. (2013) The effects of carbon dioxide and temperature on microRNA expression in *Arabidopsis* development. *Nat. Commun.* 4: 2145.
- Michaels, S.D. and Amasino, R.M. (1999) *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11:

949-956.

Nishimura, T., Yokota, E., Wada, T., Shimmen, T. and Okada, K. (2003) An *Arabidopsis* *ACT2* dominant-negative mutation, which disturbs f-actin polymerization, reveals its distinctive function in root development. *Plant Cell Physiol.* 44: 1131-1140.

Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A. et al. (2008) Long-distance, graft-transmissible action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant Cell Physiol.* 49: 1645-1658.

Page, T., Macknight, R., Yang, C. and Dean, C. (1999) Genetic interactions of the *Arabidopsis* flowering time gene *FCA*, with genes regulating floral initiation. *Plant J.* 17: 231-239.

Pant, B.D., Musialak-Lange, M., Nuc, P., May, P., Buhtz, A., Kehr, J. et al. (2009) Identification of nutrient-responsive *Arabidopsis* and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiol.* 150: 1541-1555.

Schmid, M., Uhlenhaut N.H., Godard, F., Demar, M., Bressan, R., Weigel, D. et al. (2003) Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* 130: 6001-6012.

Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Krober, S. et al. (2006) The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20: 898-912.

Shibuta, M. and Abe, M. (2017) FE controls the transcription of downstream flowering regulators through two distinct mechanisms in leaf phloem companion cells. *Plant Cell Physiol.* 58: 2017-2025.

Shim, J.S., Kubota, A. and Imaizumi, T. (2017) Circadian clock and photoperiodic flowering in *Arabidopsis*: CONSTANS is a hub for signal integration. *Plant Physiol.* 173: 5-15.

Shimada, T.L., Shimada, T. and Hara-Nishimura, I. (2010) A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 61: 519-528.

- Song, Y.H., Ito, S. and Imaizumi, T. (2013) Flowering time regulation: photoperiod- and temperature-sensing in leaves. *Trends Plant Sci.* 18: 575-583.
- Srikanth, A. and Schmid, M. (2011) Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 2013-2037.
- Stief, A., Altmann, S., Hoffmann, K., Pant, B.D., Scheible, W. and Bäurle, I. (2014) *Arabidopsis miR156* regulates tolerance to recurring environmental stress through *SPL* transcription factors. *Plant Cell* 26: 1792-1807.
- Takada, S. and Goto, K. (2003) TERMINAL FLOWER2, an Arabidopsis homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, counteracts the activation of *FLOWERING LOCUS T* by CONSTANS in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. (2003) *Plant Cell* 15: 2856-2865.
- Teotia, S. and Tang, G. (2015) To bloom or not to bloom: role of microRNAs in plant flowering. *Mol. Plant* 8: 359-377.
- Tian, H., Baxter, I.R., Lahner, B., Reinders, A., Salt, D.E. and Ward, J.M. (2010) *Arabidopsis* NPCC6/NaKR1 is a phloem mobile metal binding protein necessary for phloem function and root meristem maintenance. *Plant Cell* 22: 3963-3979.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A. and Coupland, G. (2004) Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* 303: 1003-1006.
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E.F. and Hellens, R.P. (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 3: 12.
- Vidal, E.A., Moyano, T.C., Canales, J. and Gutiérrez, R.A. (2014) Nitrogen control of developmental phase transitions in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 65: 5611-5618.
- Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A. et al. (2013) Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 339: 704-707.
- Wang, J. (2014) Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway. *J. Exp. Bot.* 17: 4723-4730.
- Wang, J., Czech, B. and Weigel, D. (2009) miR156-regulated SPL transcription

factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 138: 738-749.

Wang, Y. and Wu, W. (2013) Potassium transport and signaling in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 451-476.

Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U. et al. (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309: 1056-1059.

Wu, G., Park, M.Y., Conway, S.R., Wang, J., Weigel, D. and Poethig, R.S. (2009) The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138: 750-759.

Wu, G. and Poethig, R.S. (2006) Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by *miR156* and its target *SPL3*. *Development* 133: 3539-3547.

Xie, Y., Liu, Y., Wang, H., Ma, X., Wang, B., Wu, G. et al. (2017) Phytochrome-interacting factors directly suppress *MIR156* expression to enhance shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 8: 348.

Xu, M., Hu, T., Smith, M.R. and Poethig, R.S. (2016a) Epigenetic regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 28: 28-41.

Xu, M., Hu, T., Zhao, J., Park, M., Earley, K.W., Wu, G. et al. (2016b) Developmental functions of miR156-regulated *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 12: e1006263.

Yamaguchi, A. and Abe, M. (2012) Regulation of reproductive development by non-coding RNA in *Arabidopsis*: to flower or not to flower. *J. Plant. Res.* 125: 693-704.

Yamaguchi, A., Kobayashi, Y., Goto, K., Abe, M. and Araki, T. (2005) *TWIN SISTER OF FT (TSF)* acts as a floral pathway integrator redundantly with *FT*. *Plant Cell Physiol.* 46: 1175-1189.

Yamaguchi, A., Wu, M., Yang, L., Wu, G. Poethig, R.S. and Wagner, D. (2009) The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor *SPL3* is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL*, and *APETALA1*. *Dev. Cell* 17: 268-278.



- Yang, H., Liu, Y., Wang, C. and Zeng, Q. (2012) Molecular evolution of trahalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and Rice. *Plos ONE* 7: e42438.
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T.T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H. et al. (2010) Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2. *Plant Cell* 22: 2156-2170.
- Yoo, S., Chen, C., Rojas, M., Daimon, Y., Ham, B., Araki, T. et al. (2013) Phloem long-distance delivery of FLOWERING LOCUS T (FT) to the apex. *Plant J.* 75: 456-468.
- Yoshimoto, N., Inoue, E., Saito, K., Yamaya, T. and Takahashi, H. (2003) Phloem-localizing sulfate transporter, Sultr1;3, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131: 1511-1517.
- Yu, S., Galvão, V.C., Zhang, Y., Horrer, D., Zhang, T., Hao, Y. et al. (2012) Gibberellin regulates the *Arabidopsis* floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE transcription factors. *Plant Cell* 24: 3320-3332.
- Yuan, S., Zhang, Z., Zheng, C., Zhao, Z., Wang, Y., Feng, L. et al. (2016) *Arabidopsis* cryptochrome 1 functions in nitrogen regulation of flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: 7661-7666.
- Zhang, B., Wang, L., Zeng, L., Zhang, C. and Ma, H. (2015) *Arabidopsis* TOE proteins convey a photoperiodic signal to antagonize CONSTANS and regulate flowering time. *Genes Dev.* 29: 975-987.
- Zhang, C., Barthelson, R.A., Lambert, G.M. and Galbraith, D.W. (2008) Global characterization of cell-specific gene expression through fluorescence-activated sorting of nuclei. *Plant Physiol.* 147: 30-40.
- Zhu, Y., Liu, L., Shen, L. and Yu, H. (2016) NaKR1 regulates long-distance movement of FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis*. *Nat. Plants* 2: 16075.

## 謝辞

本研究は京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻環境応答制御学講座分子代謝制御学分野において、荒木崇教授（京都大学大学院生命科学研究科）のもとで行われました。

本研究を行うにあたりご指導・ご協力頂いた、以下の方々に御礼申し上げます。

John M. Ward 教授（University of Minnesota, USA）には、*nakr1-1* の種子を提供して頂きました。阿部光知准教授（東京大学大学院理学系研究科）には、*NaKR1* に関する未発表の知見を共有して頂き、研究を行う上での多くの助言をして頂きました。

遠藤求准教授（京都大学大学院生命科学研究科）には、実験計画や手法、データの解釈といった、研究の基礎に関して多くの面でご指導をして頂きました。また、遠藤博士が作出した *35S:CO* を本研究で使用させて頂きました。丹羽優喜博士（名古屋大学大学院生命農学研究科、前京都大学大学院生命科学研究科・助教）には、研究の方向性や実験計画に関して、多数の具体的かつ適切な提案・指導をして頂きました。特に、栄養条件に応答した花成制御の解析に関する実験計画は、丹羽博士とのディスカッションを通して構築されました。富田由妃博士（京都大学大学院生命科学研究科）には、本研究で用いた一部の形質転換植物の作出・交配にご協力をして頂きました。そのほか、本研究が行われた分子代謝制御学分野の方々には、日々のディスカッションや実験のサポートなど、様々な面で支えて頂きました。

最後に、これまで支援してくれた両親（根岸良幸、故・幸江）に感謝致します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Katsuya Negishi, Motomu Endo, Mitsutomo Abe, Takashi Araki.

SODIUM POTASSIUM ROOT DEFECTIVE1 regulates *FLOWERING LOCUS T* expression via the microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 module in response to potassium conditions.

(2017) *Plant and Cell Physiology*. published online, DOI: 10.1093/pcp/pcx199.

表1. 発現解析に用いたプライマー

RT-qPCR用プライマー

遺伝子	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>AP1</i>	CATGGGTGGTCTGTATCAAGAAGAT	CATGCGGCGAAGCAGCCAAGGTT
<i>CO</i>	CTACAACGACAATGGTTCCATTAAC	CAGGGTCAGGTTGTTGCTC
<i>FE</i>	AGCGCAACGTAGCTTCTTCT	TGCAGATGTCTTTGCACCTCT
<i>FLC</i>	CCGAACCTCATGTTGAAGCTTGTGAG	CGGAGATTTGTCCAGCAGGTG
<i>FT</i>	CTAGCAACCCTCACCTCCGAGAATA	CTGCCAAGCTGTGAAACAATATAA
<i>IPP2</i>	GTATGAGTTGCTTCTCCAGCAAAG	GAGGATGGCTGCAACAAGTGT
<i>NF-YB2</i>	CTAGGGAGGCCACAGACTGGTG	CTGGTGAAGAACTGATGATGTTGG
<i>NF-YB3</i>	GGAAGGAGAGAAGACTACTACGGCAG	CCCATCGTAGTCACCATGCCAC
<i>NF-YC3</i>	CCGAACCCGTATATGGGTCAGCC	GACGGCTAGTTTATTAGGCCAAGC
<i>NF-YC9</i>	GGTTATGGGTAATCCCGGTGGTG	GGACGAGACTAGAACGAGTTTCTTGC
<i>SMZ</i>	CGTAGCTCCCAATATCGTGGC	GCGTAAGCAGTATCAAACCCG
<i>SNZ</i>	CACATCCATCTCTTCCAAAACAG	CACCCAACCTTAATATCCCCTTC
<i>SPL3</i>	CTTAGCTGGACACAACGAGAGAAGG	GAGAAACAGACAGAGACACAGAGGA
<i>SPL9</i>	CAAGGTTCAAGTTGGTGGAGGA	TGAAGAAGCTCGCCATGTATTG
<i>TOE1</i>	TGATGAGTAACTGGGGATGGC	GCATTGTCATTGGGAGGTTG
<i>TOE2</i>	CATCATCCTTCTCAGCCCTTC	GCCTTCCAACCTTATTCCAACC
<i>TPS1</i>	GAAACTCAAGACGTCCTTCACCAG	TCTAGCATTGGTGCAGTACGAC
<i>miR156</i>	GCGGCGGTGACAGAAGAGAGT	GTGCAGGGTCCGAGGT

RT-PCR用プライマー

遺伝子	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>ACT2</i>	ATGAAGATTAAGGTCGTGGCAC	GTTTTTATCCGAGTTTGAAGAGGC
<i>TPS1</i>	GATCGGTCTCTGGACTTTCATGCTT	CCAAAACACTTCTGCTGCTTCCG
<i>TPS2</i>	TCAACTACTTATGTGCAATATACGCAAT	GCATCTCGGATTCAGGAATAATGC
<i>TPS3</i>	AGTGAACCTCAATGACGCTTTCGATG	TCCCAAATATGACCAATTTCTGGTT
<i>TPS4</i>	GTAACGATGCAACCATAACATACCAGT	CCCACCAAATCGTTTTTGAACCTC
<i>TPS5</i>	GGTGCAGCCAGGTTCCATTAGG	CGTTGTTAGAAGCCTCTCTGCCAC
<i>TPS6</i>	CTAAAAGCCGAGAACTCTATCGGACT	TCATCGAAAGCATCCTTCTCGCTA
<i>TPS7</i>	TGGAAGAGGGAGGGAAAGTTTAAGC	AACCGTTTTCCCTTCCGG
<i>TPS8</i>	TCCAAGCAACGAGGTTGTCTCTGT	TCTCGGATTACTTTCTCCGCAGC
<i>TPS9</i>	ATTCGTCCGCTGAGGCGGA	AAAGATCTCAGGTGGCATTGGGA
<i>TPS10</i>	TGTTAGCGGGAGGGGAAAAGTT	CGGCTAAGAATTTCCCGGTGA
<i>TPS11</i>	AGCAAATGTTTTGACTCTTGCCC	TGCTATCAAATGCTCCACCACCTT

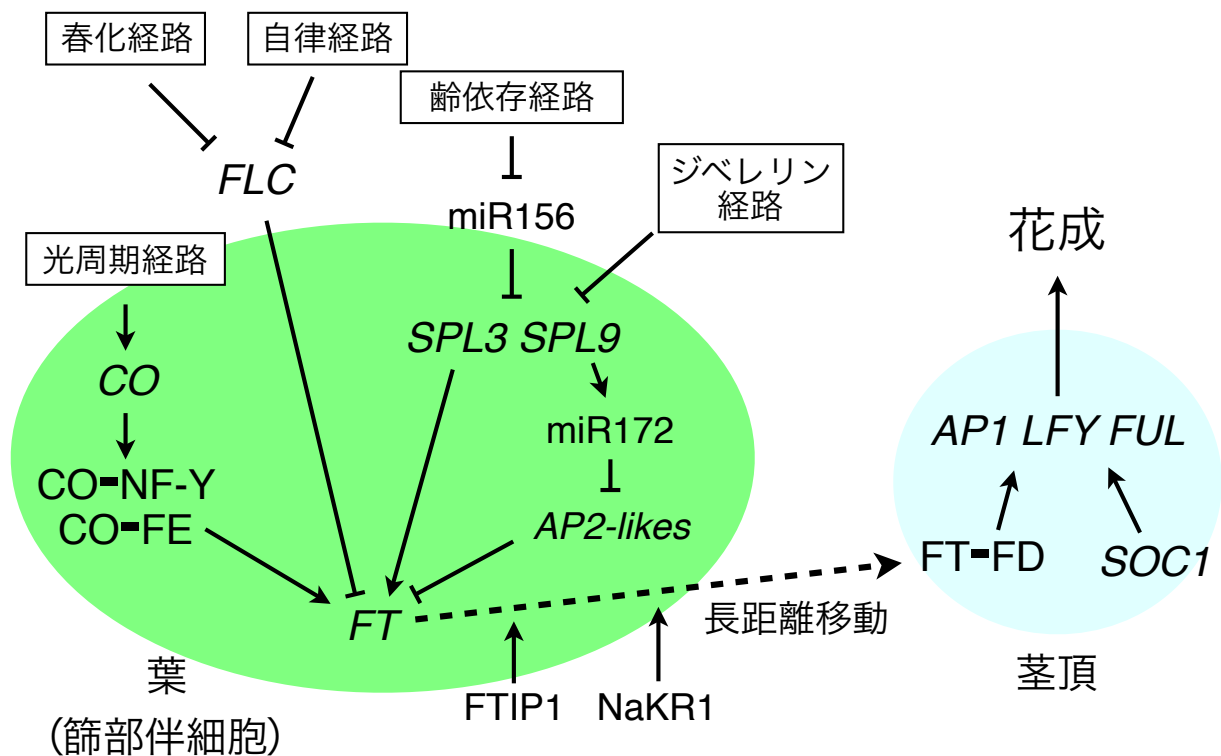
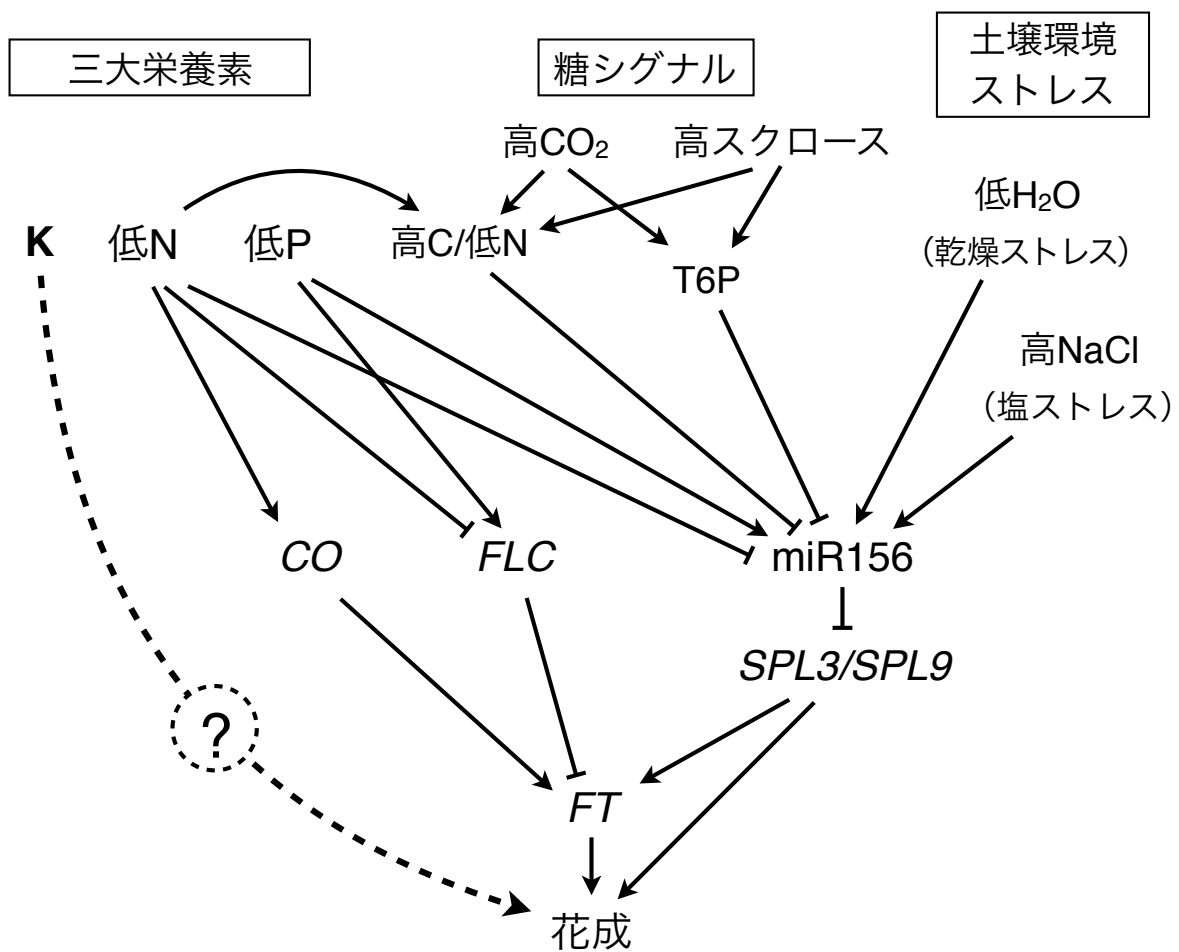


図1. *FT*の発現制御を行う5つの花成制御経路のモデル

枠で囲われた5つの経路は*FT*の発現制御に関わる花成制御経路（光周期経路、春化経路、自律経路、齢依存経路、ジベレリン経路）を示す。実線の矢印は促進、T字は抑制を示し、破線は*FT*タンパク質の長距離移動を示す。COとNF-Y、COとFE、*FT*とFDの間の太線はタンパク質間相互作用を示す。

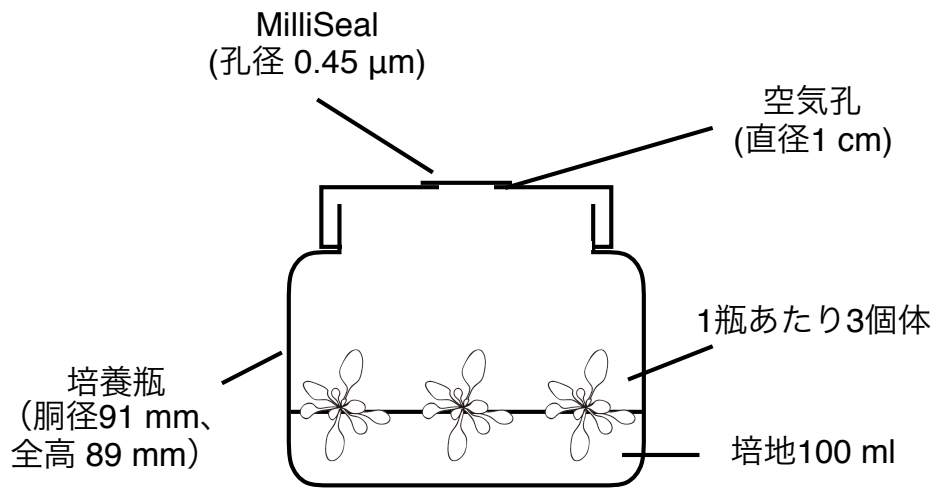


## 図2. 栄養・土壌環境による花成経路への影響

三大栄養素の窒素 (N) ・リン (P) ・カリウム (K) 、糖シグナルの二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) ・トレハロース6リン酸 (T6P) ・C/Nバランス、土壌環境ストレスとなる塩ストレス・乾燥ストレス、の各刺激に应答することが知られている花成経路を示した。実線の矢印は花成制御において遺伝子発現や蓄積量を促進する制御、T字は反対に抑制する制御を示す。

カリウム (K) に応答して花成時期の変化が見られることが示唆されているが、カリウムがどの経路制御経路を介して花成制御をおこなうかは分かっていない (破線) 。

A



B

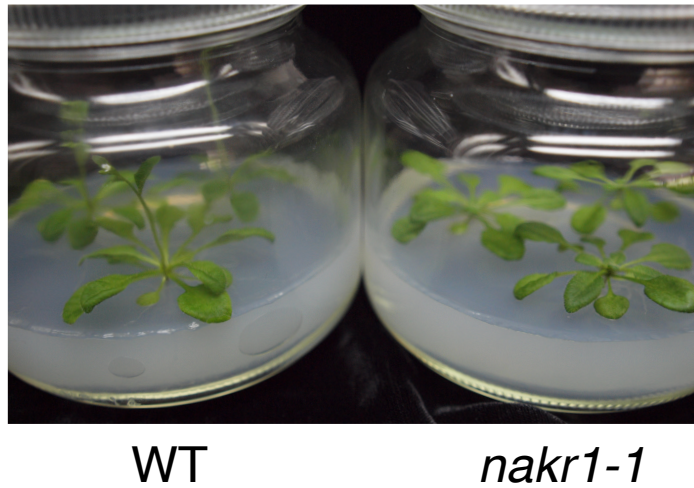
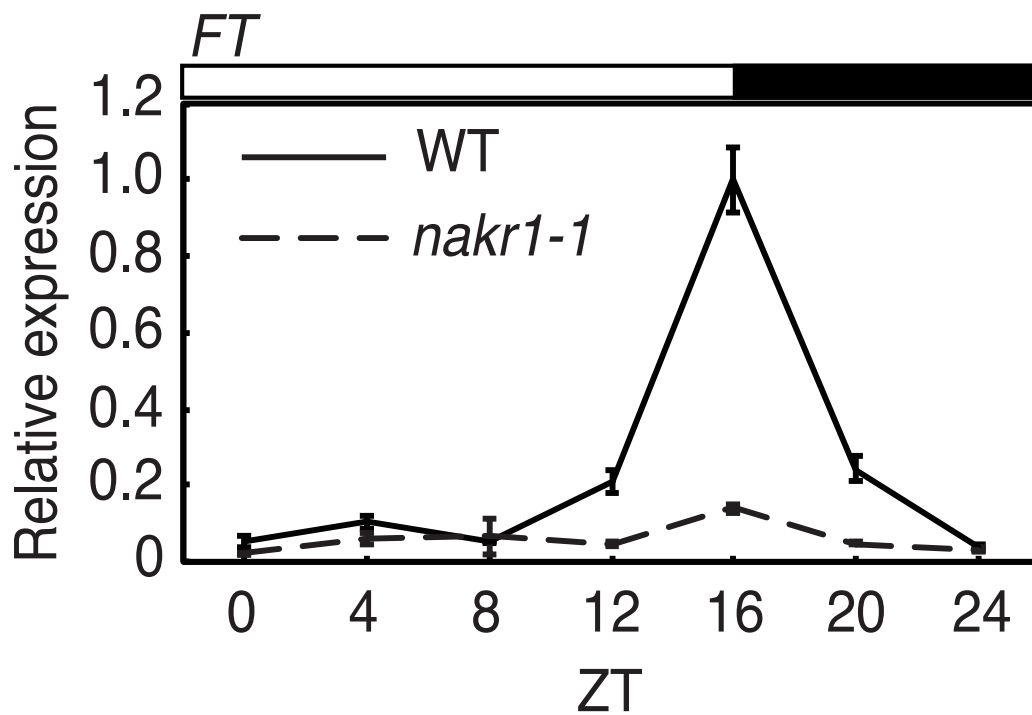


図3. 1/2MS寒天培地を用いた花成時期測定のための植物の栽培方法

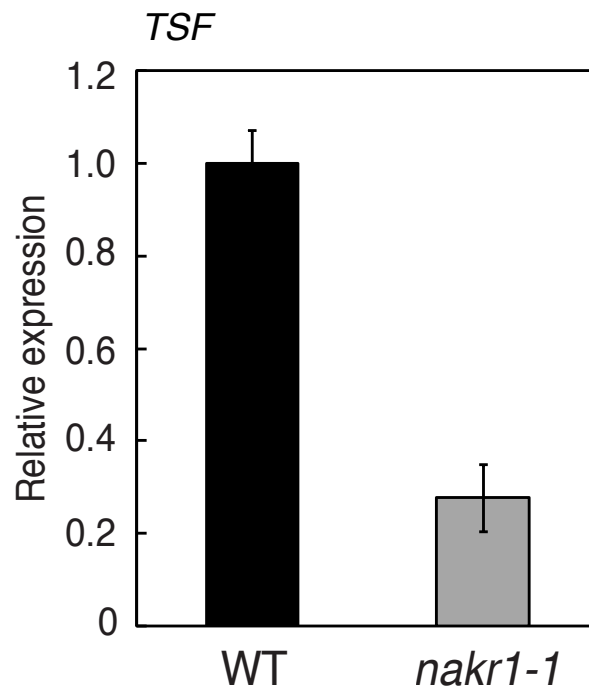
(A) 培養瓶を用いた長期間の植物育成方法の模式図。

(B) 同方法を用いて長日条件で育成した野生型 (WT) と *nakr1-1*。



**図4. 野生型 (WT) および *nakr1-1* の FT の発現量**

長日条件10日齢の植物体の地上部を4時間おきにサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法によりFTの発現解析を行った。内部標準としてIPP2を用いて相対発現量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。

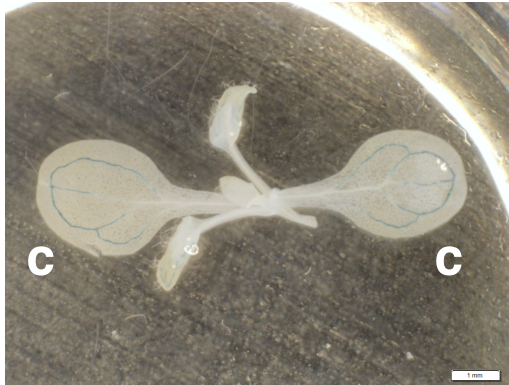


**図5. 野生型 (WT) および *nakr1-1* の *TSF* の発現量**

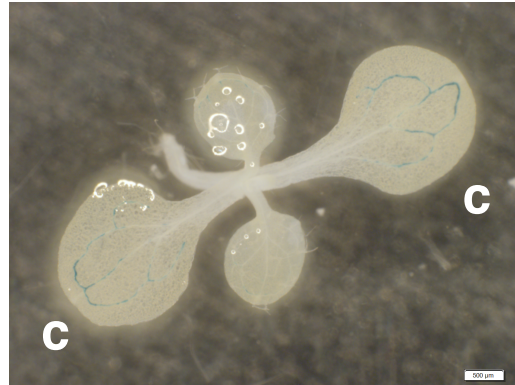
長日条件10日齢の植物体の地上部をZT16にサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法により *TSF* の発現解析を行った。内部標準として *IPP2* を用いて相対発現量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。



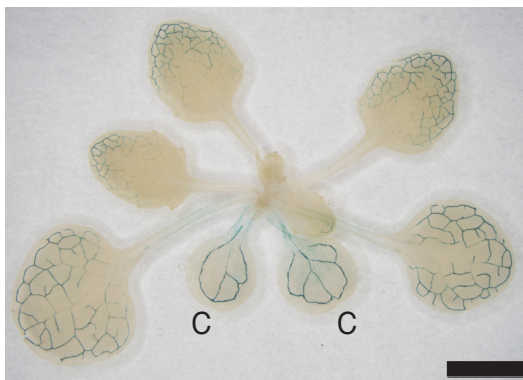
A

*gFT:GUS* 10 d

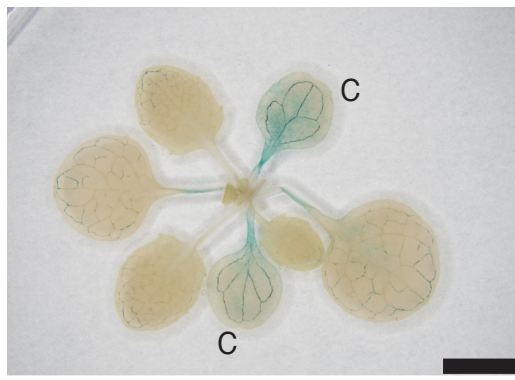
B

*gFT:GUS; nakr1-1* 10 d

C

*gFT:GUS* 18 d

D

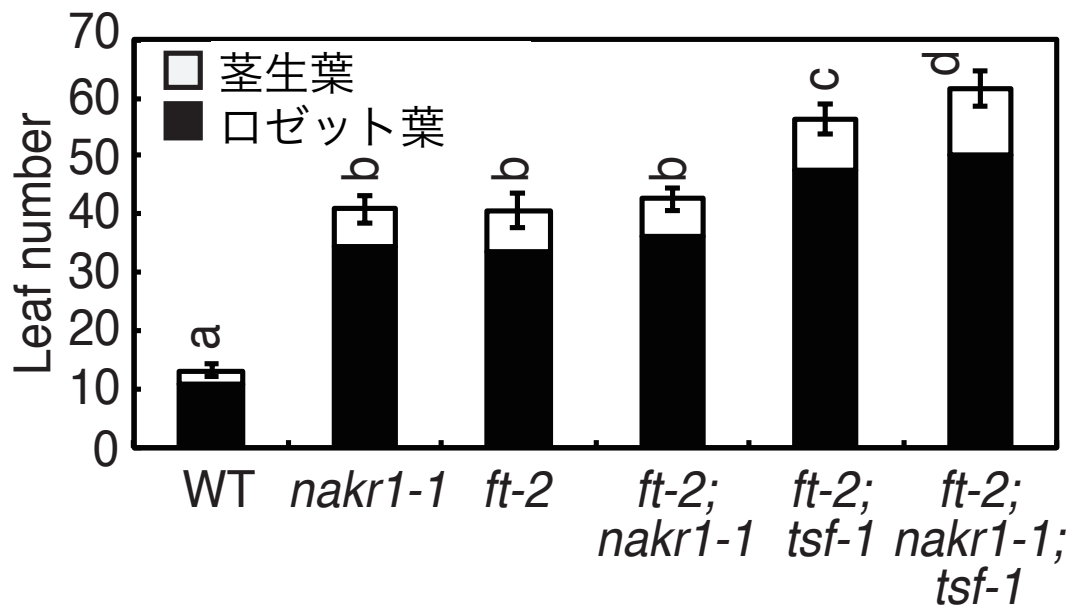
*gFT:GUS; nakr1-1* 18 d

### 図6. *gFT:GUS*、*gFT:GUS; nakr1-1*によるFTの発現パターン

*gFT:GUS*および*gFT:GUS; nakr1-1*をGUS染色し、FTの発現を調べた。

(A)と(C)は*gFT:GUS*、(B)と(D)は*gFT:GUS; nakr1-1*であり、(A)と(B)が10日齢、(C)と(D)が18日齢の植物体。cは子葉。

A



B

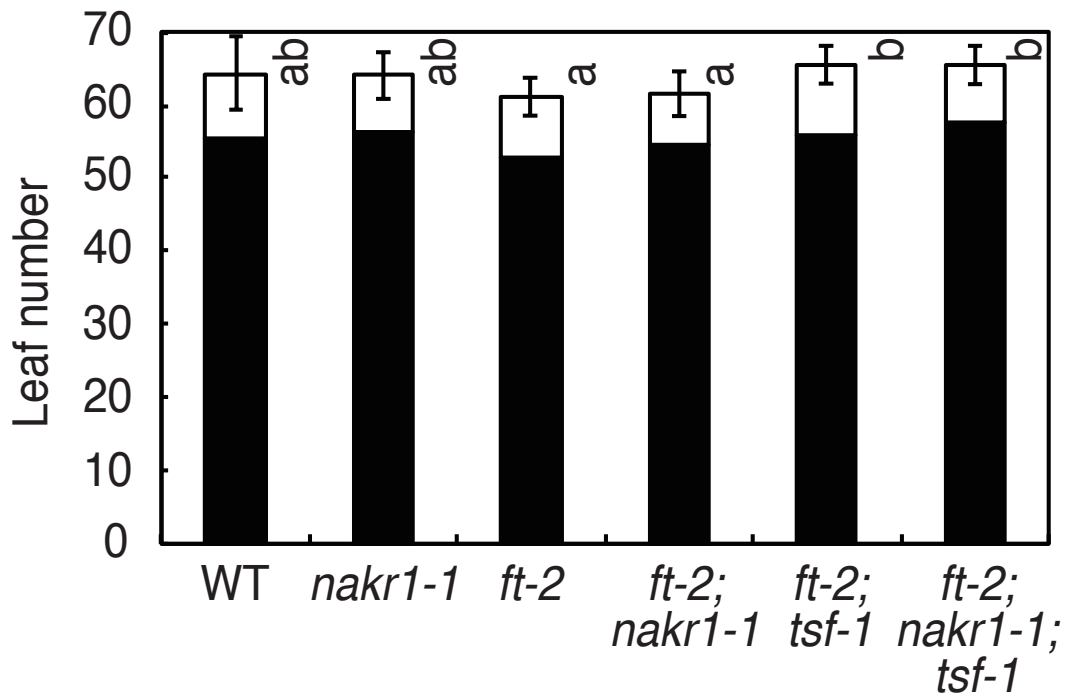


図7. 野生型 (WT) 、 *nakr1-1*、 *ft-2*、 *ft-2; nakr1-1*、 *ft-2; tsf-1*、 *ft-2; nakr1-1; tsf-1* の花成時期

長日条件(A)および短日条件(B)で育成した野生型(WT), *nakr1-1*, *ft-2*, *ft-2; nakr1-1*, *ft-2; tsf-1*, *ft-2; nakr1-1; tsf-1*の主軸に形成された葉の枚数の平均値を示す。葉は茎生葉 (白色) とロゼット葉 (黒色) に分けて計測した。異なる英字は総葉数において有意な差があったことを示す (Tukey-Kramer HSD法、 $P < 0.05$ )。エラーバーは総葉数における標準偏差を示す ( $n = 10 - 12$ )。

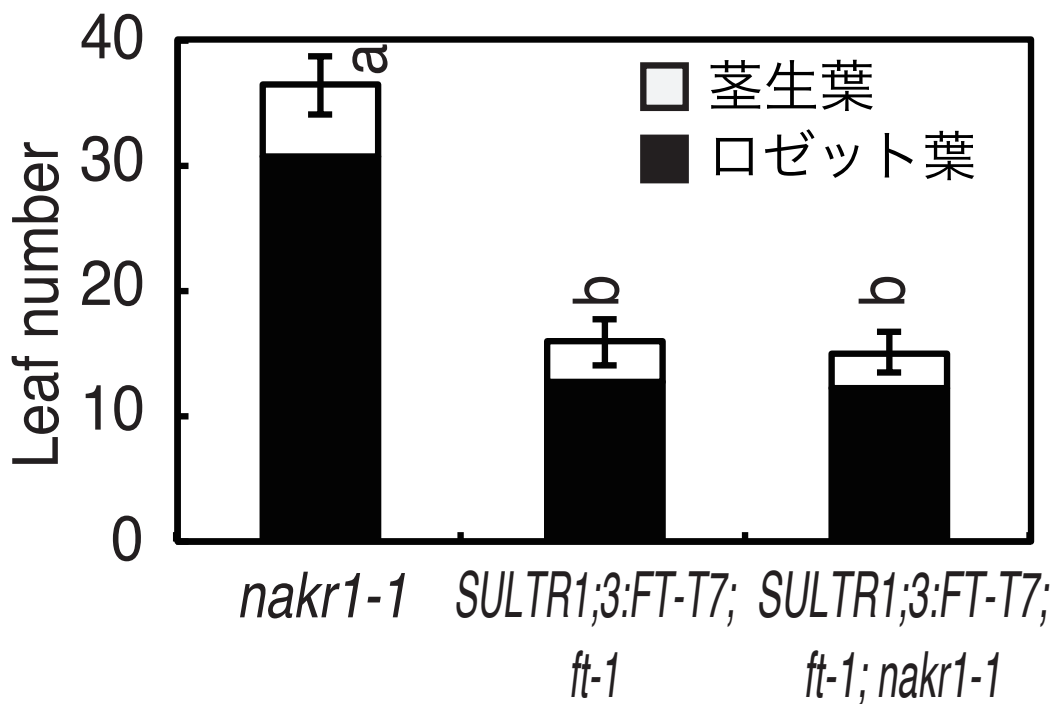


図8. *nakr1-1*、*SULTR1;3:FT-T7; ft-1*、*SULTR1;3:FT-T7; ft-1; nakr1-1*の花成時期長日条件で育成した*nakr1-1*、*SULTR1;3:FT-T7; ft-1*、*SULTR1;3:FT-T7; ft-1; nakr1-1*の主軸に形成された葉の枚数の平均値を示す。葉は茎生葉（白色）とロゼット葉（黒色）に分けて計測した。異なる英字は総葉数において有意な差があったことを示す（Tukey-Kramer HSD法、 $P < 0.05$ ）。エラーバーは総葉数における標準偏差を示す（ $n = 12$ ）。

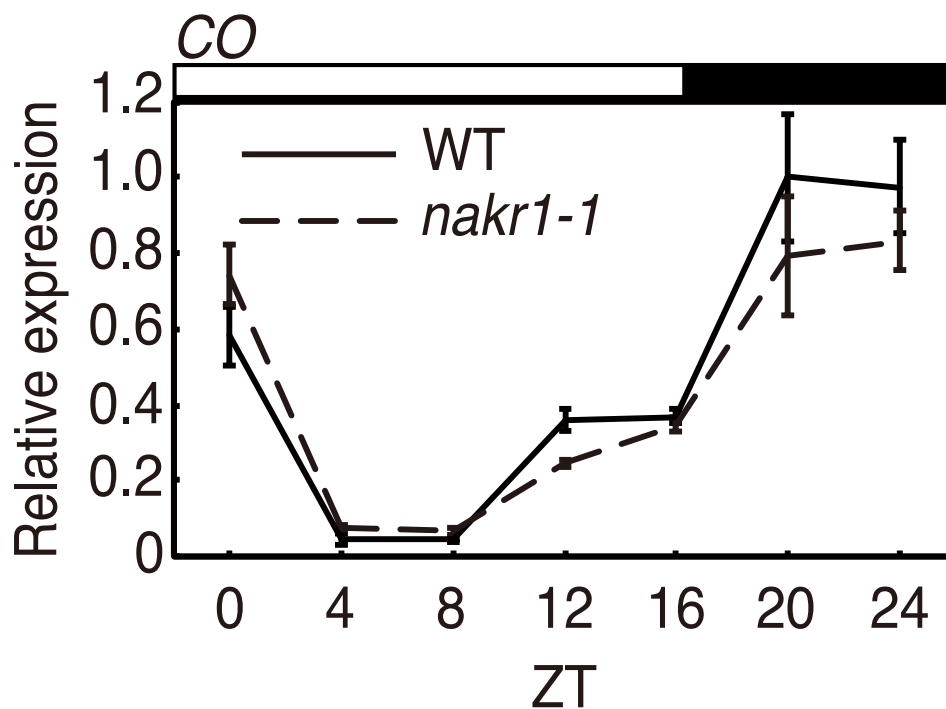
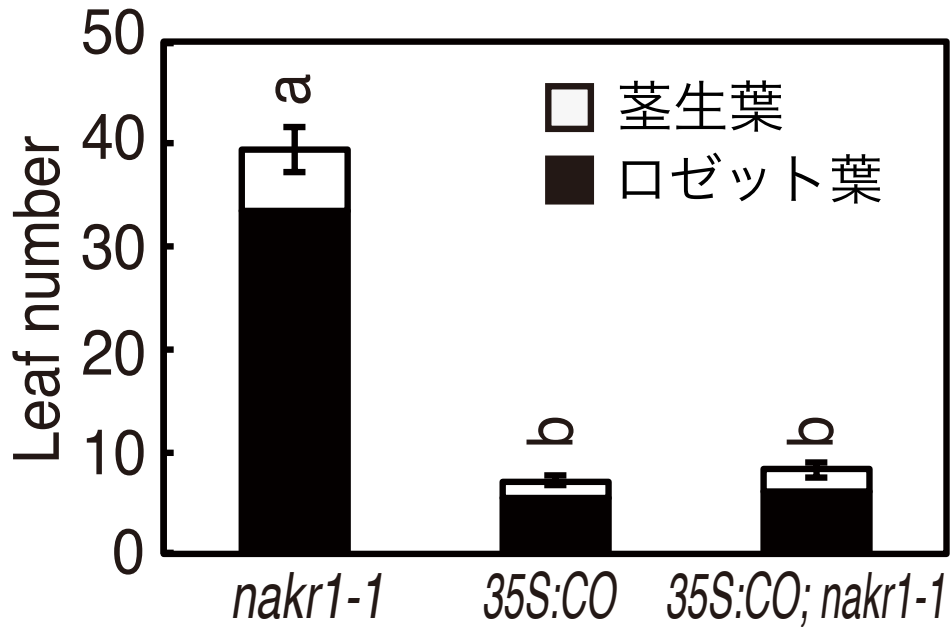


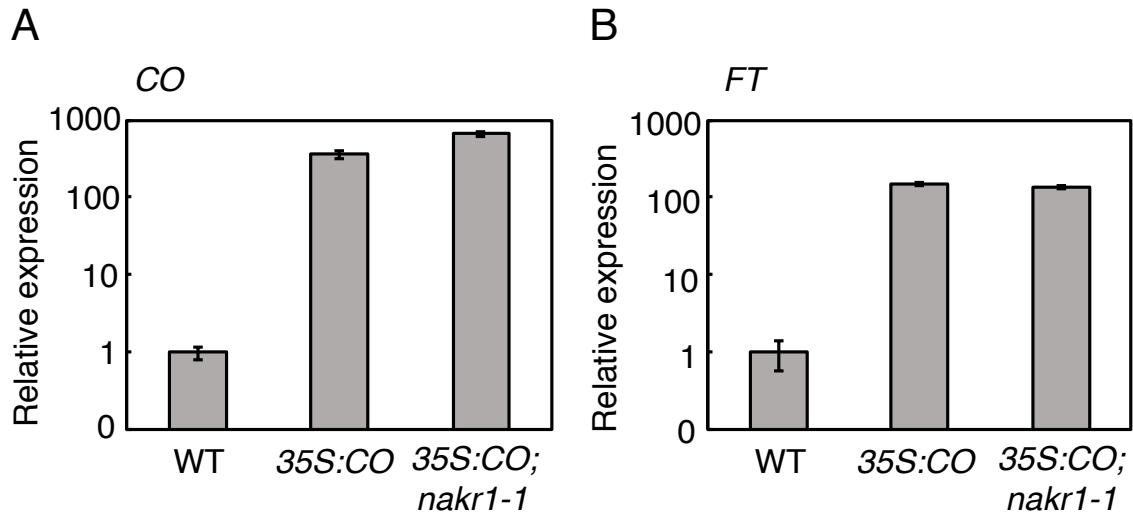
図9. 野生型 (WT) および *nakr1-1* の CO の発現量

長日条件10日齢の植物体の地上部を4時間おきにサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法によりCOの発現解析を行った。内部標準として *IPP2* を用いて相対発現量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。



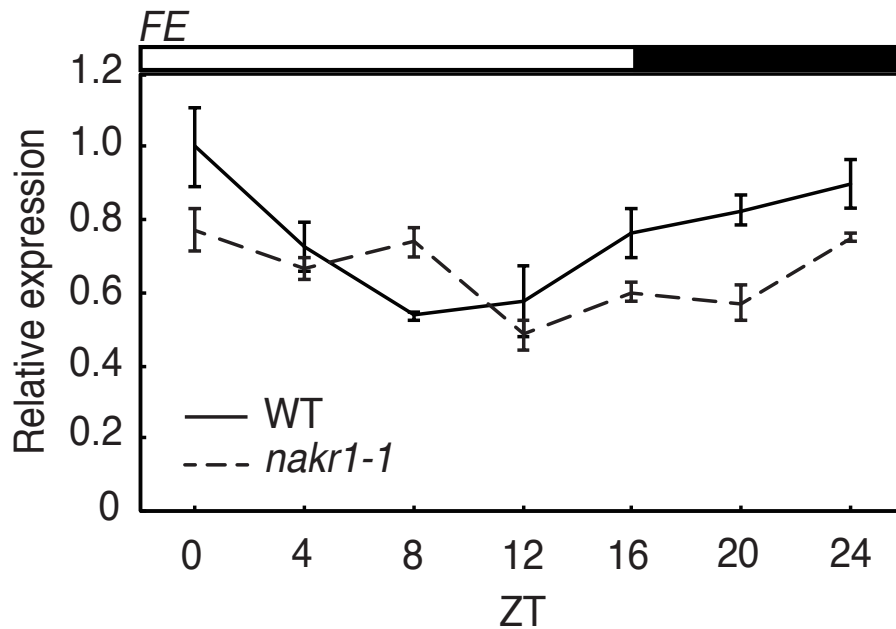
**図10. *nakr1-1*、*35S:CO*、*35S:CO; nakr1-1*の花成時期**

長日条件で育成した*nakr1-1*、*35S:CO*、*35S:CO; nakr1-1*の主軸に形成された葉の枚数の平均値を示す。葉は茎生葉（白色）とロゼット葉（黒色）に分けて計測した。異なる英字は総葉数において有意な差があったことを示す（Tukey-Kramer HSD法、 $P < 0.05$ ）。エラーバーは総葉数における標準偏差を示す（ $n = 12$ ）。



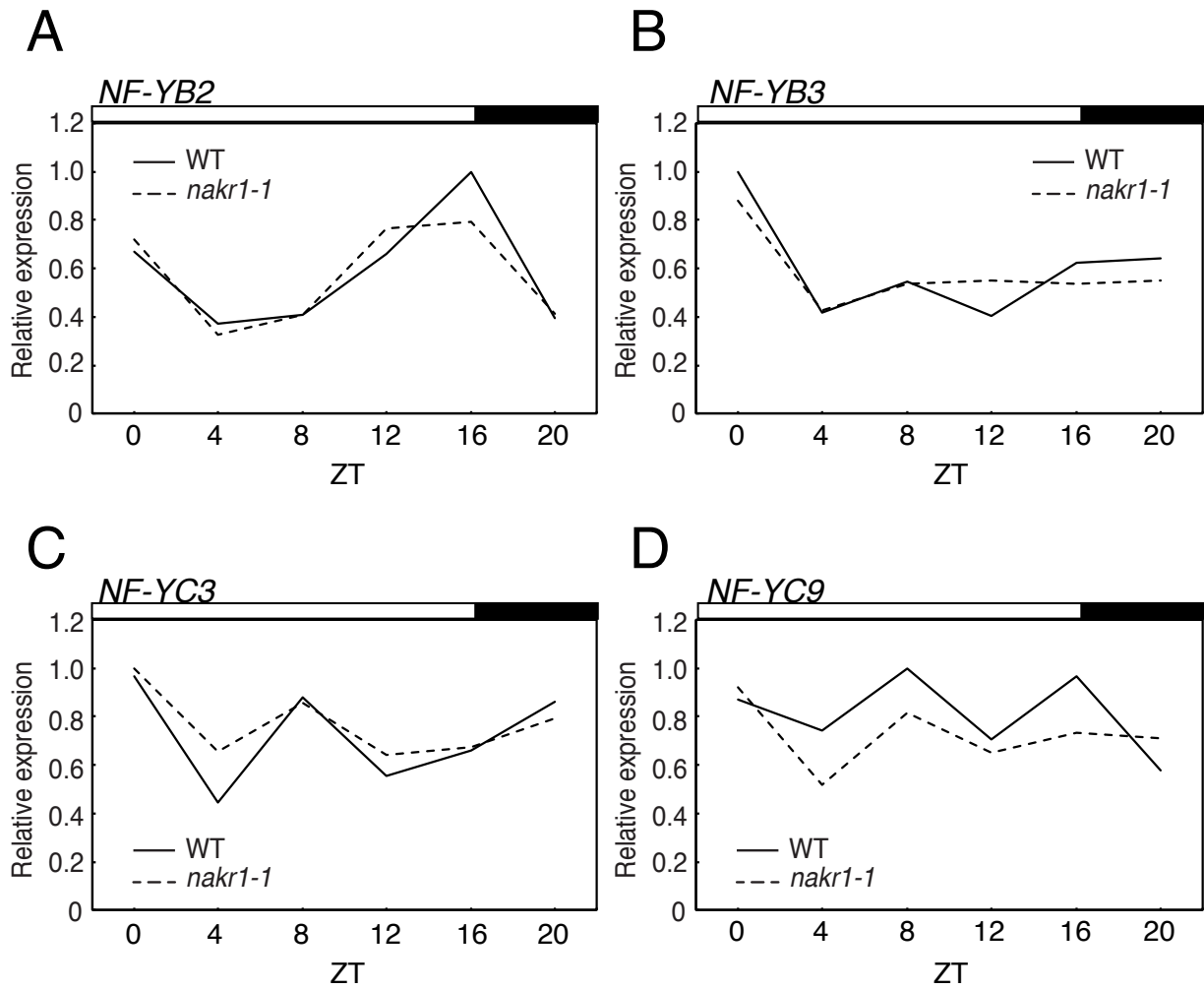
**図11. 野生型 (WT) 、35S:CO、35S:CO; *nakr1-1*のCO、FTの発現量**

長日条件10日齢の植物体の地上部をZT16にサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法によりCO(A)およびFT(B)の発現解析を行った。内部標準として*IPP2*を用いて相対発現量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。



**図12. 野生型(WT)および*nakr1-1*のFEの発現量**

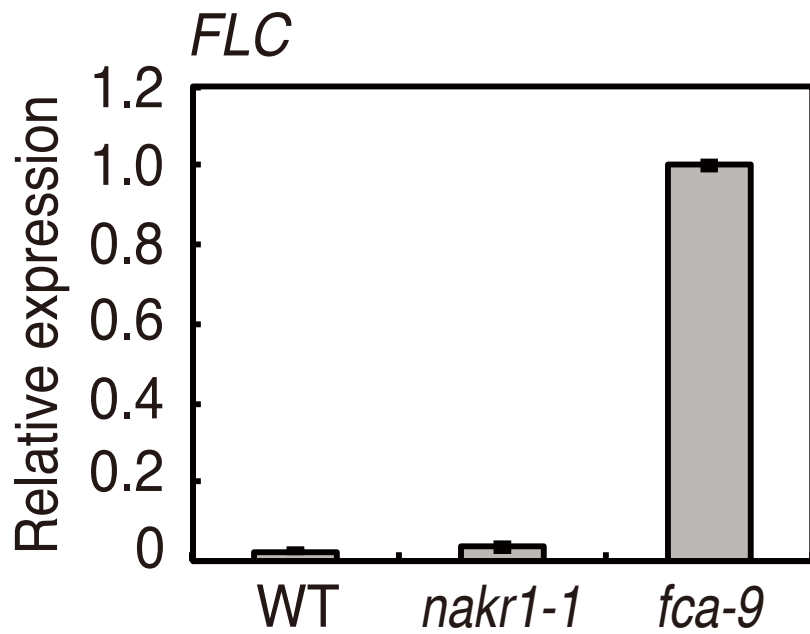
長日条件10日齢の植物体の地上部を4時間おきにサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法によりFEの発現解析を行った。内部標準としてIPP2を用いて相対発現量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。



**図13. 野生型(WT)および*nakr1-1*のNF-Yの発現量**

長日条件10日齢の植物体の地上部を4時間おきにサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法により*NF-YB2*、*NF-YB3*、*NF-YC3*、*NF-YC9*の発現解析を行った。内部標準として*IPP2*を用いて相対発現量を示した。





**図14. 野生型 (WT) 、*nakr1-1*、*fca-9*のFLCの発現量**

長日条件10日齢の植物体の地上部をZT16にサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法によりFLCの発現解析を行った。内部標準としてIPP2を用いて相対発現量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。

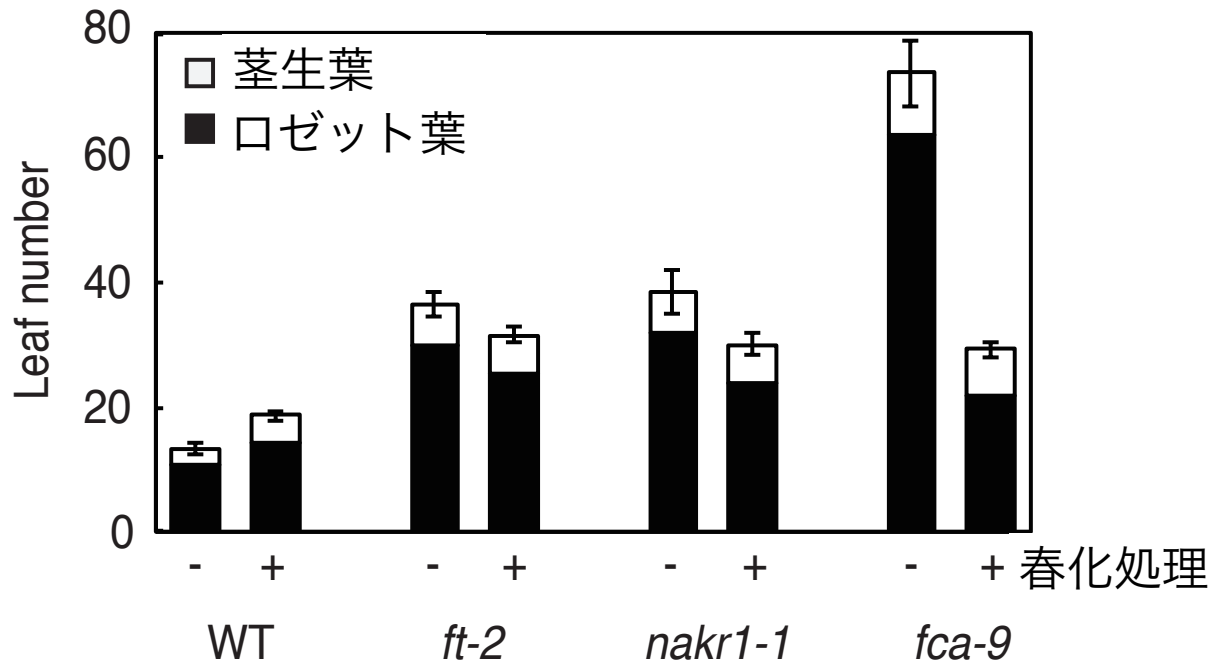


図15. 野生型 (WT) 、*ft-2*、*nakr1-1*、*fca-9*の春化处理への応答

野生型、*ft-2*、*nakr1-1*、*fca-9*の春化处理を行わずに育てた植物(-)と春化处理を行った条件の植物(+ )の主軸に形成された葉の枚数の平均値を示す。葉は茎生葉 (白色) とロゼット葉 (黒色) に分けて計測した。エラーバーは総葉数における標準偏差を示す (n = 12) 。

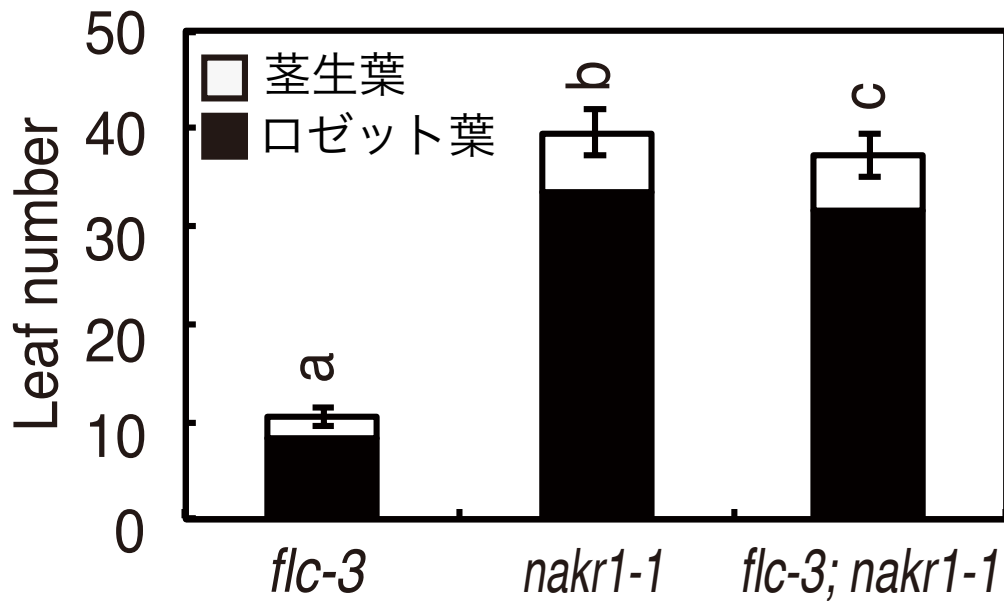
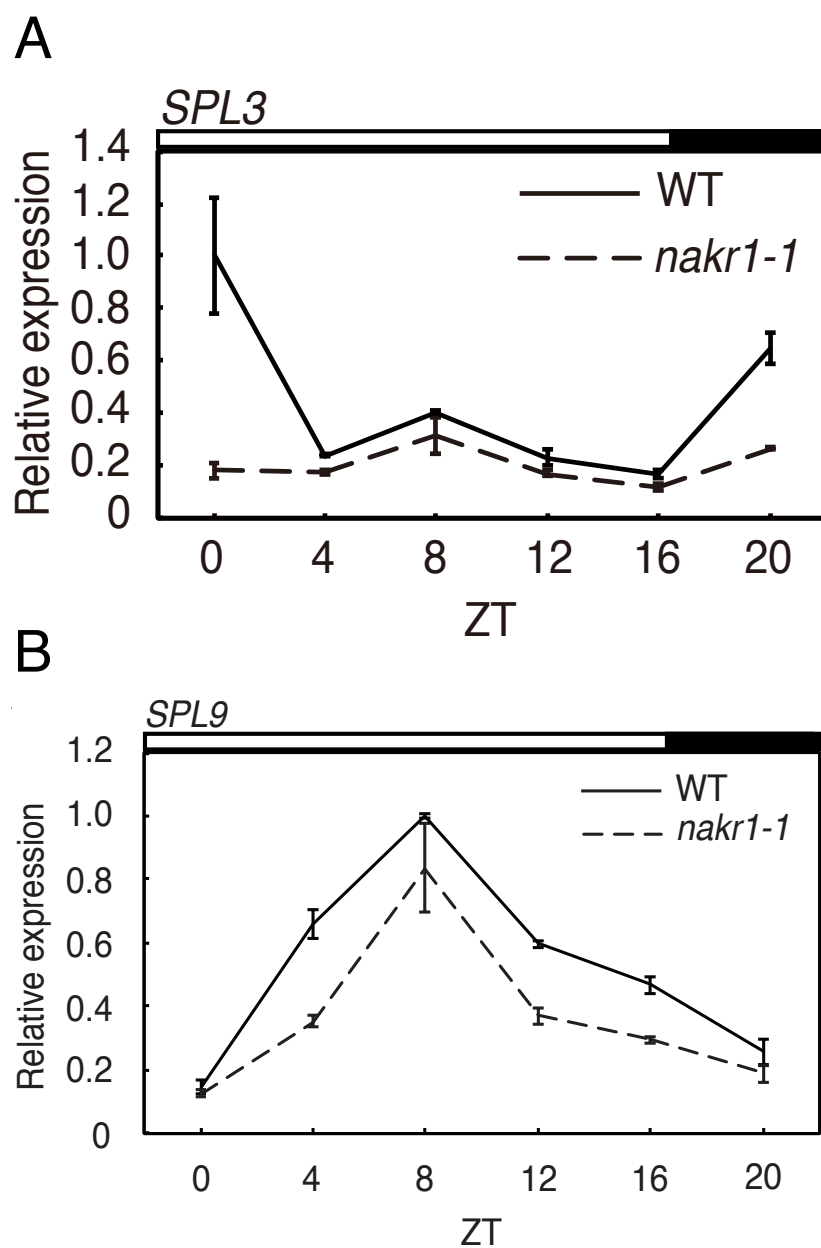


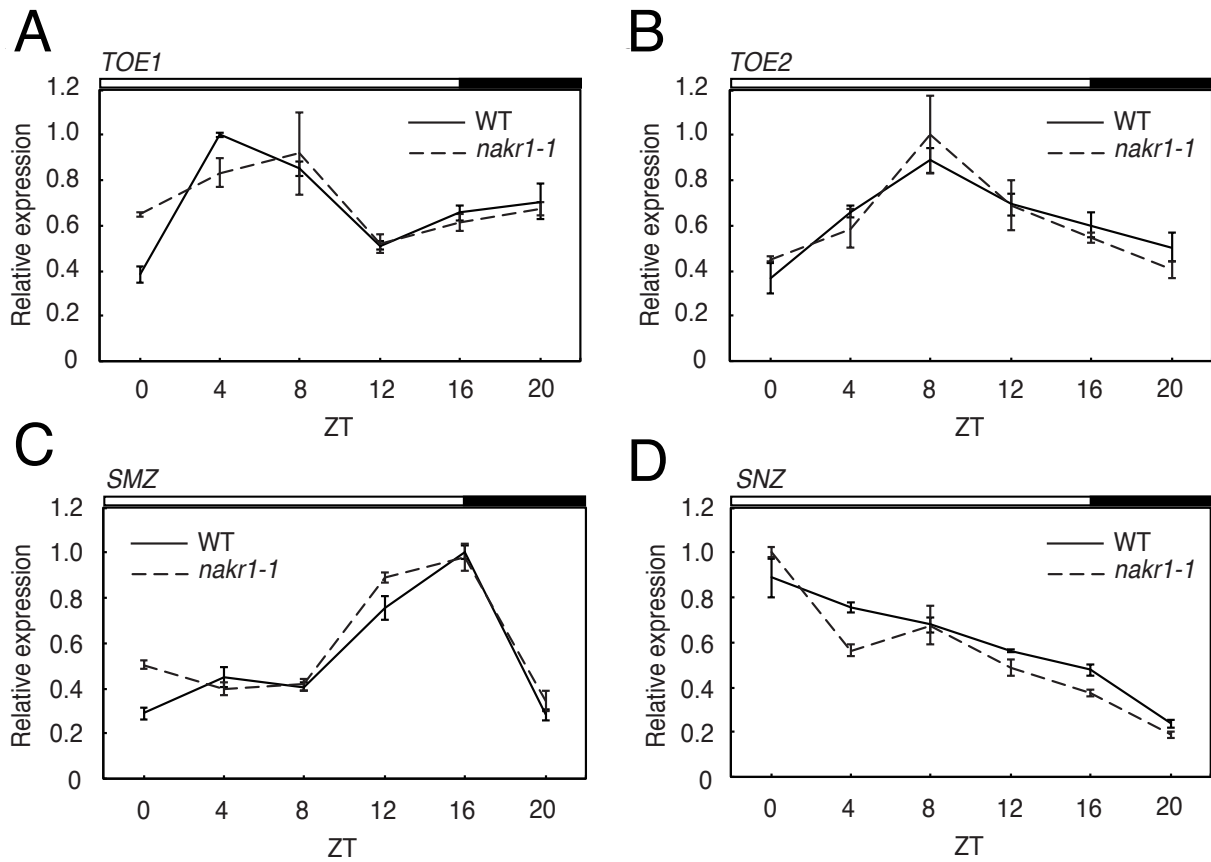
図16. *flc-3*、*nakr1-1*、*flc-3; nakr1-1*の花成時期

長日条件で育成した*flc-3*、*nakr1-1*、*flc-3; nakr1-1*の主軸に形成された葉の枚数の平均値を示す。葉は茎生葉（白色）とロゼット葉（黒色）に分けて計測した。異なる英字は総葉数において有意な差があったことを示す（Tukey-Kramer HSD法、 $P < 0.05$ ）。エラーバーは総葉数における標準偏差を示す（ $n = 10 - 12$ ）。



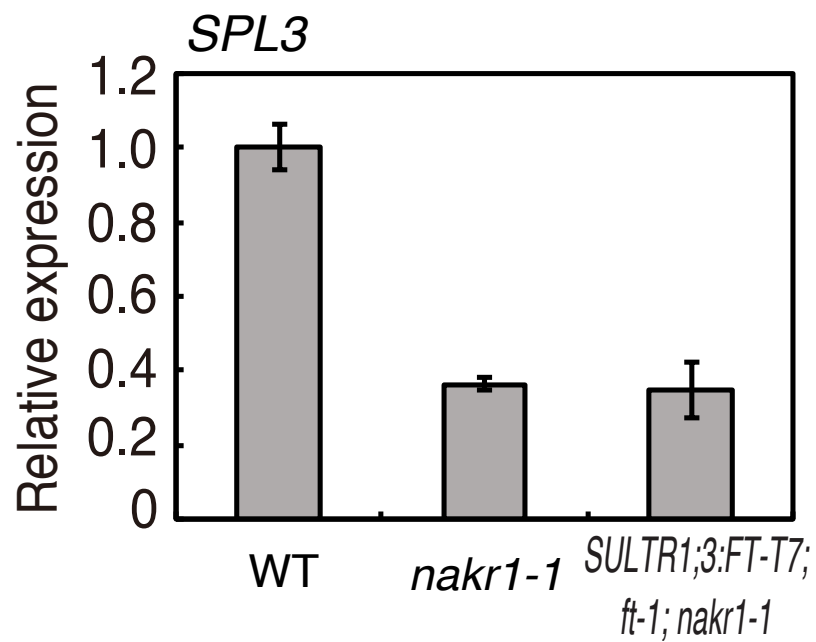
**図17. 野生型 (WT) および*nakr1-1*の*SPL3*と*SPL9*の発現量**

長日条件10日齢の植物体の地上部を4時間おきにサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法により*SPL3*(A)および*SPL9*(B)の発現解析を行った。内部標準として*IPP2*を用いて相対発現量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。



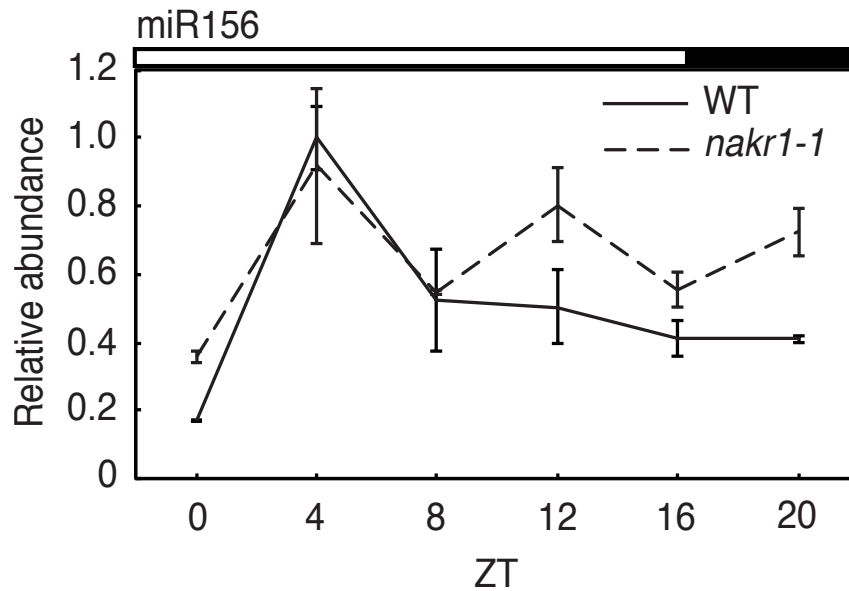
**図18. 野生型 (WT) および *nakr1-1* のAP2型転写因子の発現量**

長日条件10日齢の植物体の地上部を4時間おきにサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法により *TOE1*(A)、*TOE2*(B)、*SMZ*(C)、*SNZ*(D)の発現解析を行った。内部標準として *IPP2* を用いて相対発現量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。



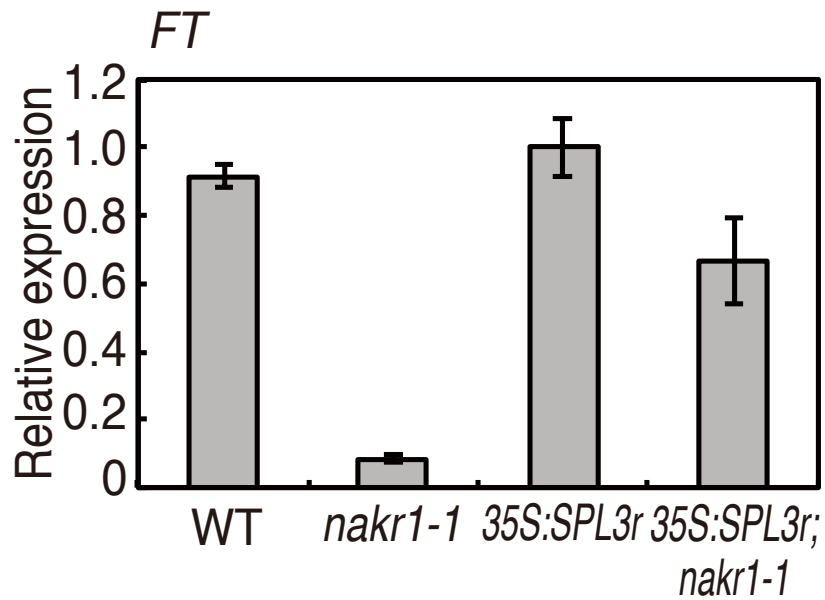
**図19. 野生型 (WT) 、 *nakr1-1*、 *SULTR1;3:FT-T7; ft-1; nakr1-1*の本葉における *FLC* の発現量**

長日条件10日齢の植物体の葉をZT0でサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法により *FLC* の発現解析を行った。内部標準として *IPP2* を用いて相対発現量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。



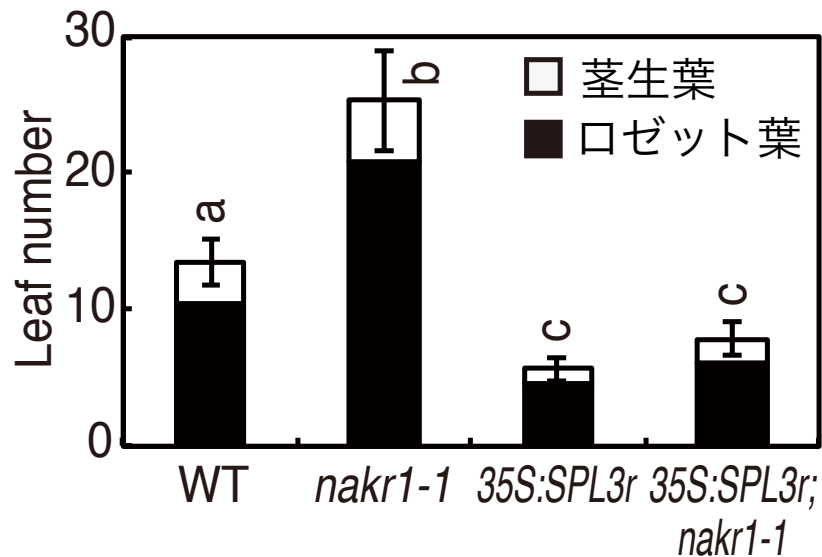
**図20. 野生型 (WT) および *nakr1-1* の miR156 の蓄積量**

長日条件12日齢の植物体の地上部を4時間おきにサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法によりmiR156の蓄積量の定量を行った。内部標準として *IPP2* を用いて相対量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。



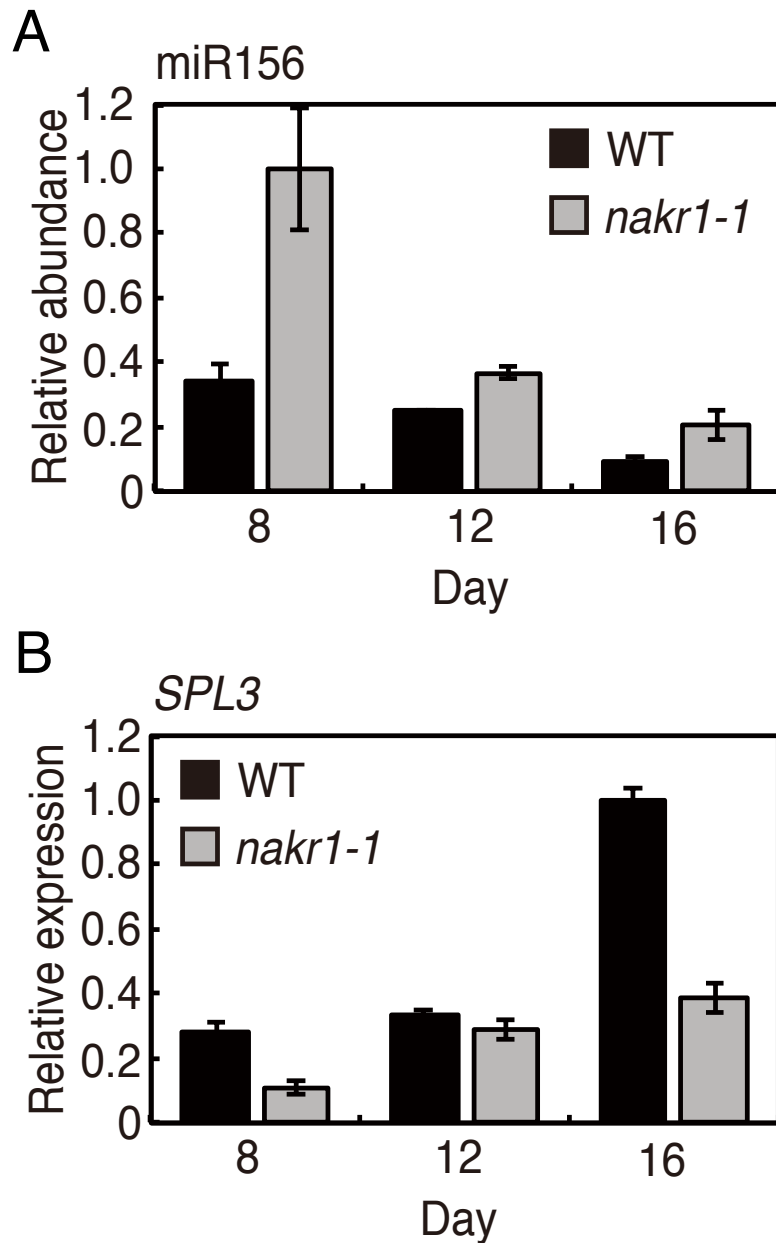
**図21. 野生型 (WT) 、*nakr1-1*、*35S:SPL3r*、*35S:SPL3r; nakr1-1*の*FT*の発現量**  
 長日条件12日齢の植物体の本葉をZT16でサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法により*FT*の発現解析を行った。内部標準として*IPP2*を用いて相対発現量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。





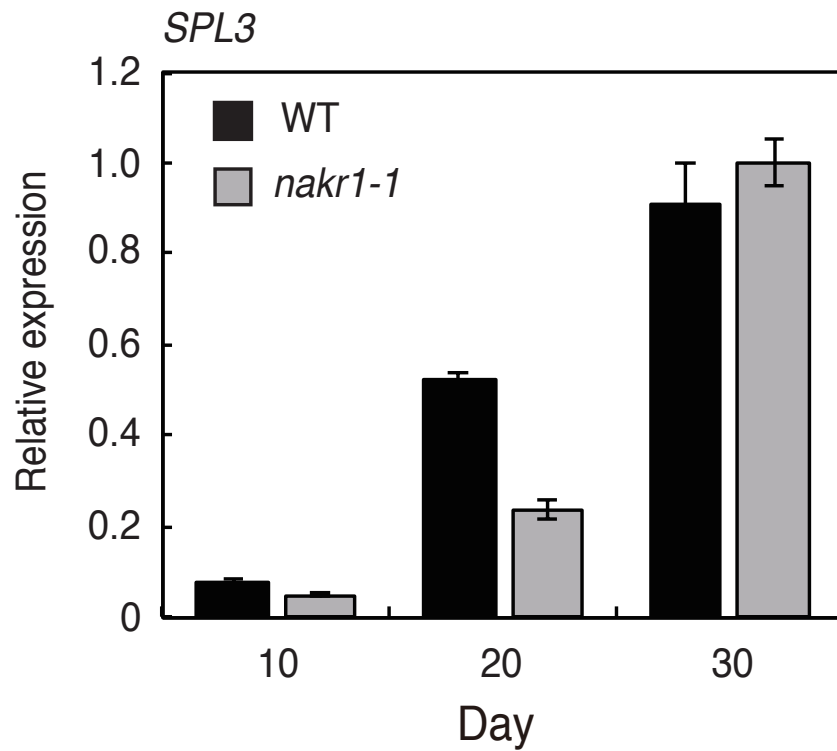
**図22. 野生型 (WT) 、 *nakr1-1*、 *35S:SPL3r*、 *35S:SPL3r; nakr1-1*の花成時期**

長日条件で育成した野生型(WT)、 *nakr1-1*、 *35S:SP3r*、 *35S:SPL3r; nakr1-1*の主軸に形成された葉の枚数の平均値を示す。葉は茎生葉 (白色) とロゼット葉 (黒色) に分けて計測した。異なる英字は総葉数において有意な差があったことを示す (Tukey-Kramer HSD法、  $P < 0.05$ ) 。エラーバーは総葉数における標準偏差を示す (n = 10 - 12) 。



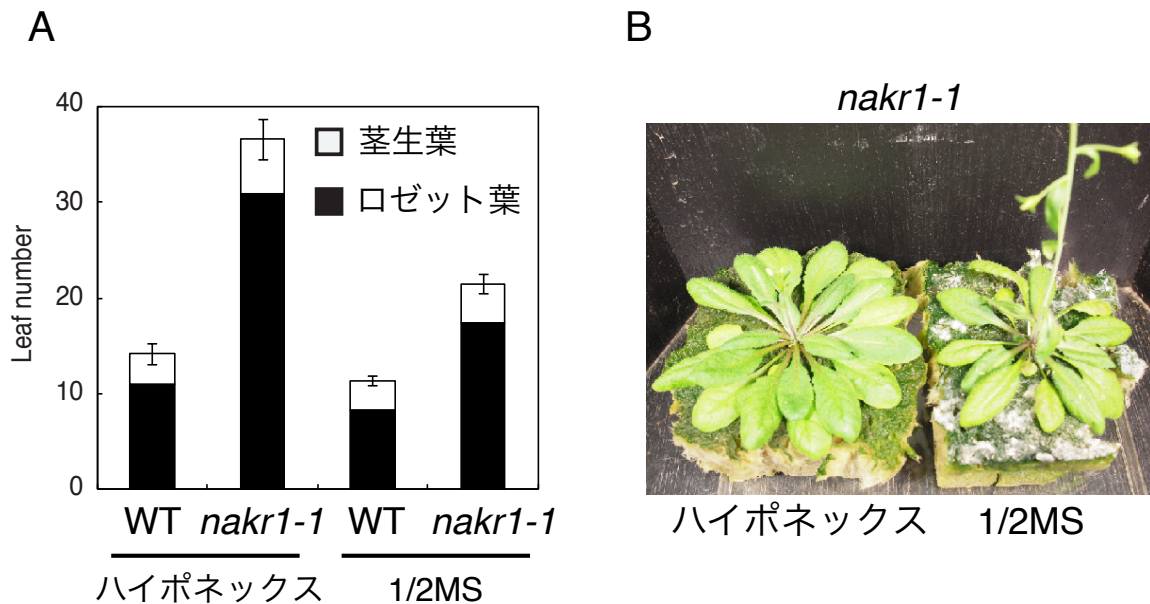
**図23. 野生型(WT)と*nakr1-1*の齢依存的なmiR156の蓄積量とSPL3の発現量**

(A) 長日条件8、12、16日齢の植物体の本葉をZT0でサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法によりmiR156の蓄積量 (A) とSPL3の発現量 (B)の定量を行った。内部標準として*IPP2*を用いて相対量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。



**図24. 野生型(WT)と *nakr1-1*の短日条件における *SPL3*の発現量**

短日条件10、20、30日齢の植物体の本葉をZT0でサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法により *SPL3*の発現解析を行った。内部標準として *IPP2*を用いて相対量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。



**図25. ロックウールで育成した野生型 (WT) 、 *nakr1-1* の花成時期**

(A) 長日条件で育成した野生型(WT)と*nakr1-1*の主軸に形成された葉の枚数の平均値を示す。植物体はロックウール上で育成して、溶液として1000倍希釈したハイポネックス溶液、あるいは1/2MS溶液を与えた。葉は茎生葉（白色）とロゼット葉（黒色）に分けて計測した。エラーバーは総葉数における標準偏差を示す（ $n = 6 - 12$ ）。

(B) 長日条件でハイポネックスを与えて育成した*nakr1-1*と1/2MS溶液を与えて育成した*nakr1-1*。

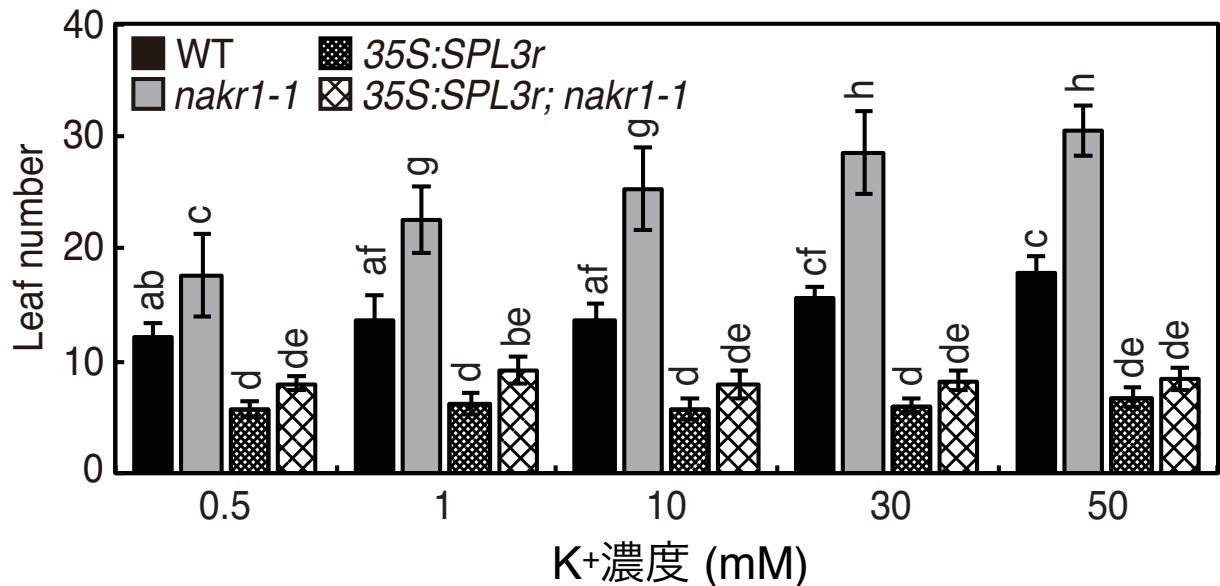


図26. 野生型 (WT)、*nakr1-1*、*35S:SPL3r*、*35S:SPL3r; nakr1-1*のカリウム濃度を変化させた1/2MS培地で育成した際の花成時期

カリウム濃度が0.5、1、10、30、50 mMの1/2MS培地において、長日条件で育成した野生型(WT)、*nakr1-1*、*35S:SP3r*、*35S:SPL3r; nakr1-1*の主軸に形成された葉の枚数の平均値を示す。異なる英字は総葉数において有意な差があったことを示す (Tukey-Kramer HSD法、 $P < 0.05$ )。エラーバーは総葉数における標準偏差を示す (n = 10 - 12)。

A

WT

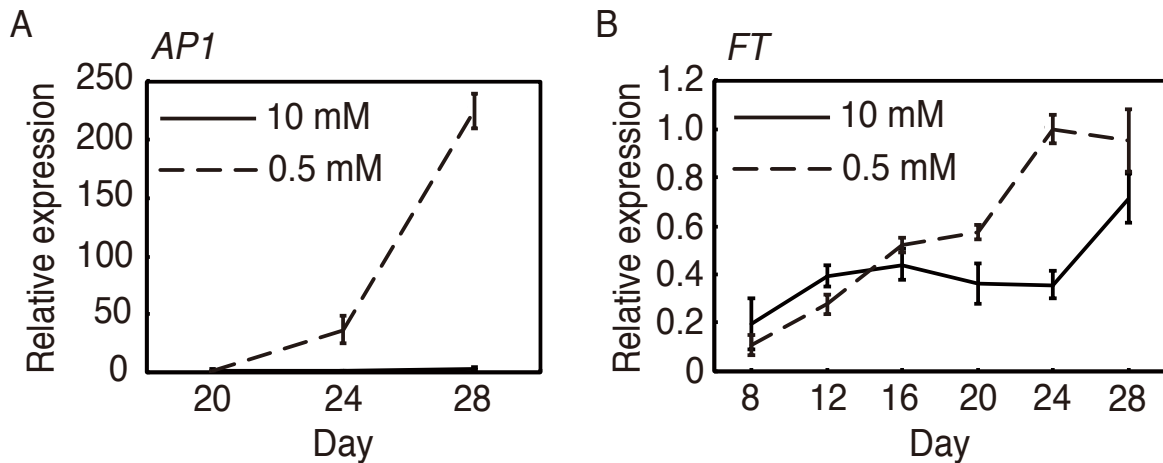


B

*nakr1-1*



図27. 100 mMのカリウム濃度培地で育成した野生型 (WT) と *nakr1-1* の表現型  
100 mMのカリウムイオンを含む1/2MS培地で育成した野生型(WT) (A)と *nakr1-1*(B)  
の7週齢の植物。



**図28. 0.5、10 mMのカリウム濃度の培地で育成した*nakr1-1*の*AP1*と*FT*の発現量**

(A) 10 mMまたは0.5 mMのカリウム濃度培地上で育成した長日条件20、24、28日齢の植物体の茎頂部をZT16でサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法により*AP1*の発現解析を行った。内部標準として*IPP2*を用いて相対量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。

(B) 10 mMまたは0.5 mMのカリウム濃度培地上で育成した長日条件8日齢から28日齢まで4日おきに植物体の本葉をZT16でサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法により*FT*の発現解析を行った。内部標準として*IPP2*を用いて相対量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。

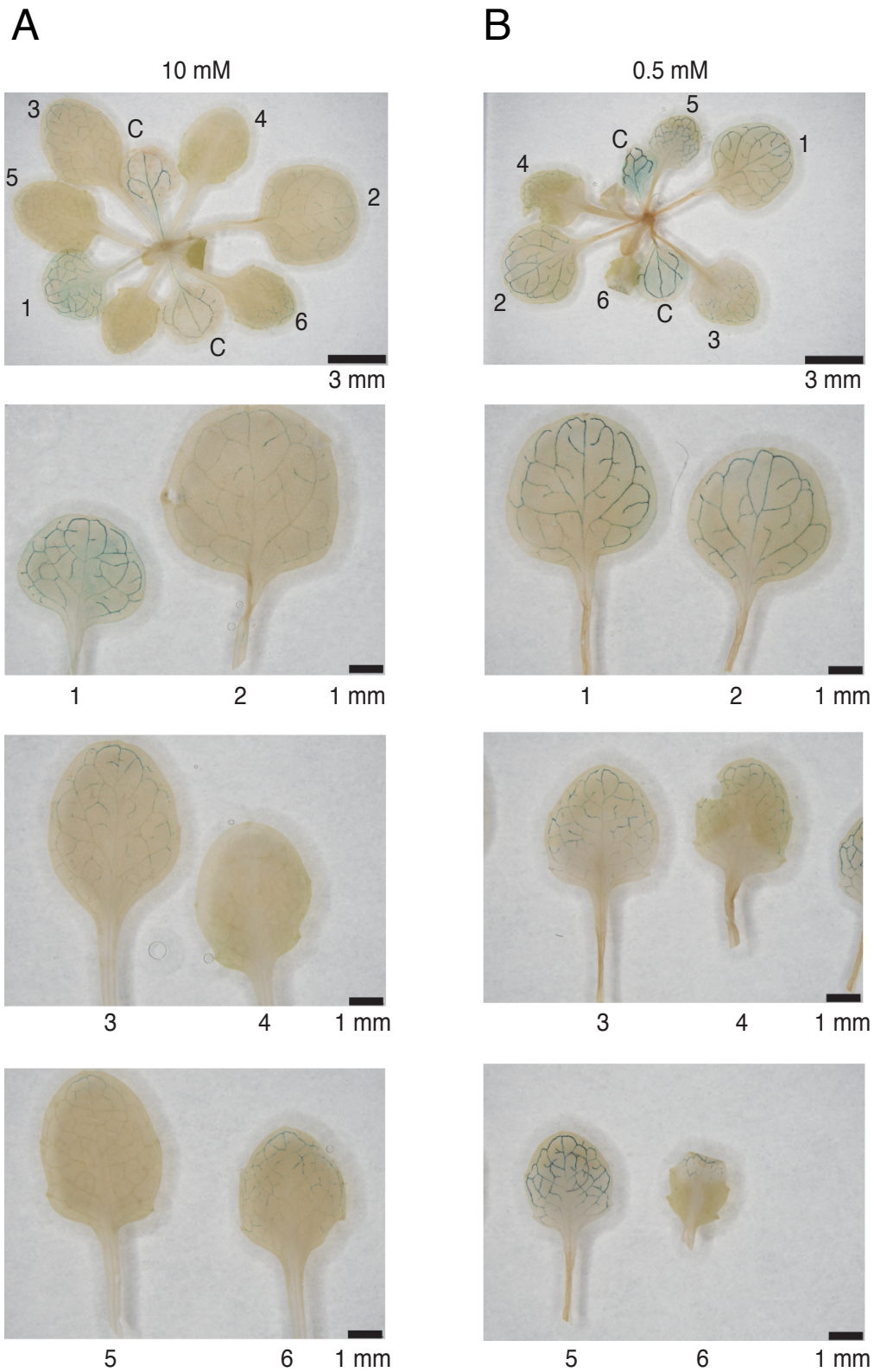
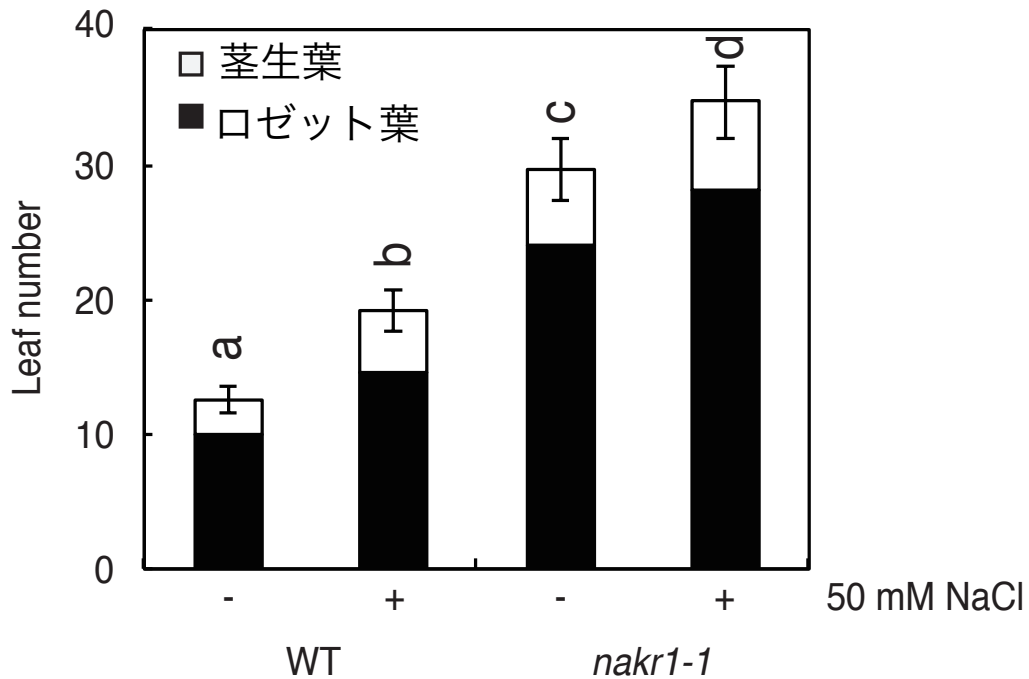


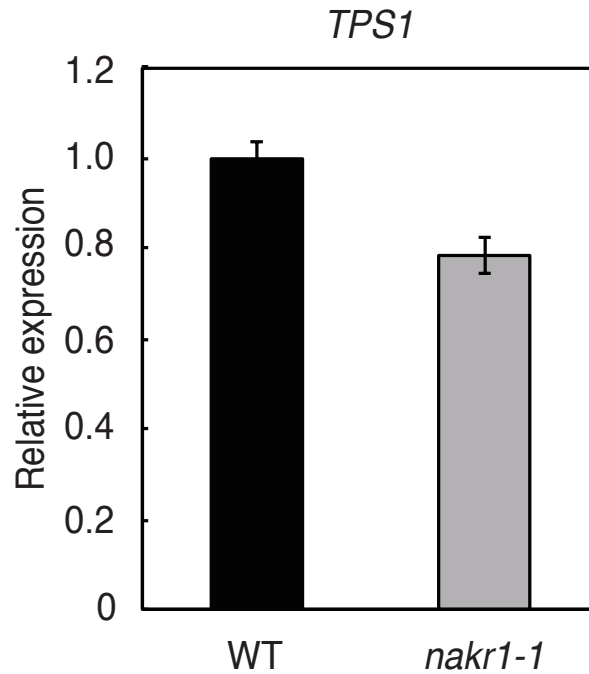
図29. 10、0.5 mMの1/2MS培地で育成した*gFT:GUS; nakr1-1*によるFTの発現パターン  
 カリウム濃度10 mM(A)あるいは0.5 mM(B)の1/2MS培地で育成した24日齢の  
*gFT:GUS; nakr1-1*をGUS染色し、FTの発現を調べた。Cは子葉。





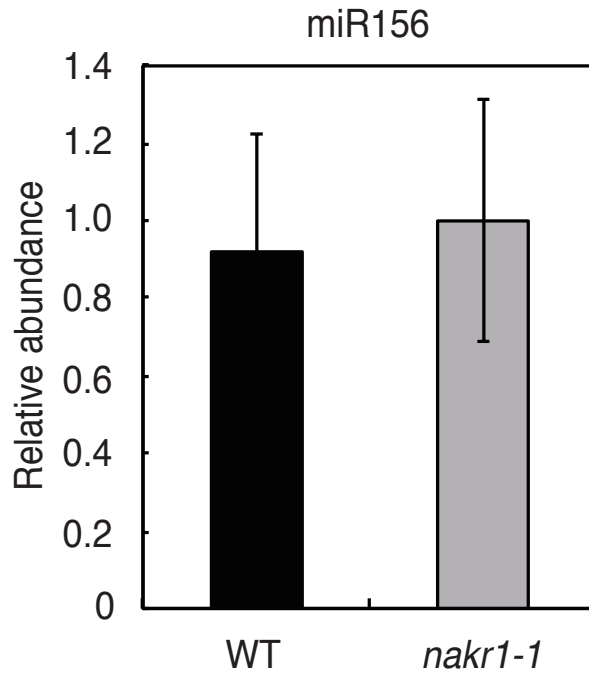
**図30. 野生型 (WT) と *nakr1-1* の 50 mM NaCl 存在下での花成時期**

長日条件において野生型(WT)と *nakr1-1* を 1/2MS 培地で育成した植物体(-)と、1/2MS 培地に 50 mM NaCl を加えた条件で育成した植物体(+)の主軸に形成された葉の枚数の平均値を示す。異なる英字は総葉数において有意な差があったことを示す (Tukey-Kramer HSD法、 $P < 0.05$ )。エラーバーは総葉数における標準偏差を示す。エラーバーは総葉数における標準偏差を示す (n = 10 - 12)。



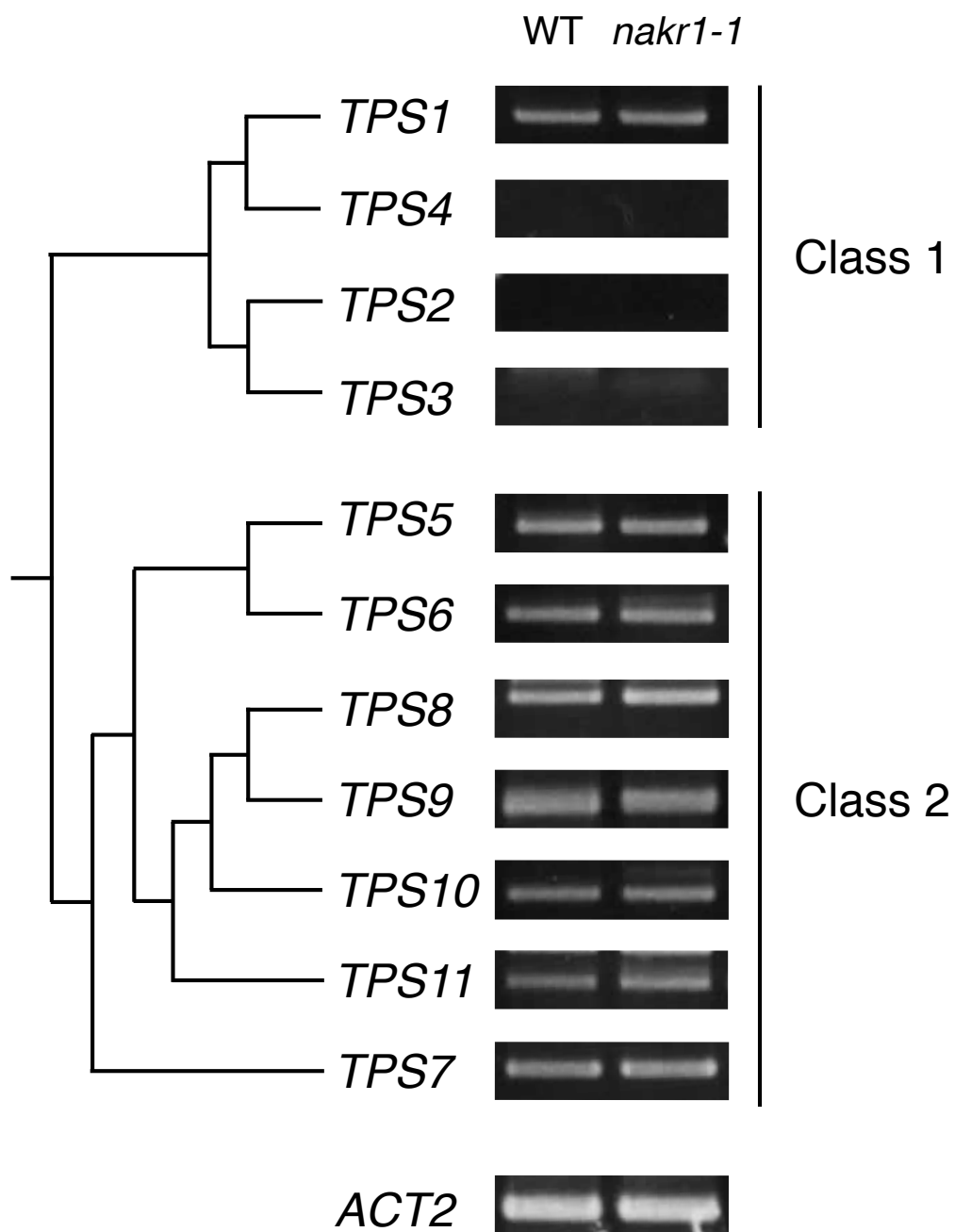
**図31. 野生型(WT)および*nakr1-1*の茎頂部におけるTPS1の発現量**

長日条件12日齢の植物体の茎頂部をZT0でサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法によりTPS1の発現解析を行った。内部標準としてIPP2を用いて相対量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。



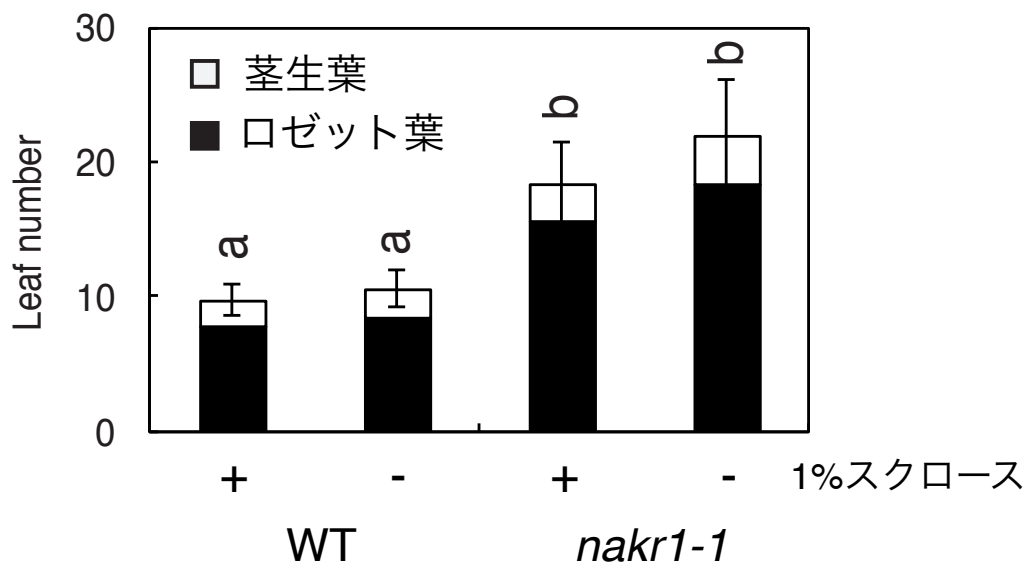
**図32. 野生型(WT)および*nakr1-1*の茎頂部におけるmiR156の蓄積量**

長日条件12日齢の植物体の茎頂部をZT0でサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法によりmiR156の蓄積量の定量を行った。内部標準として*IPP2*を用いて相対量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。



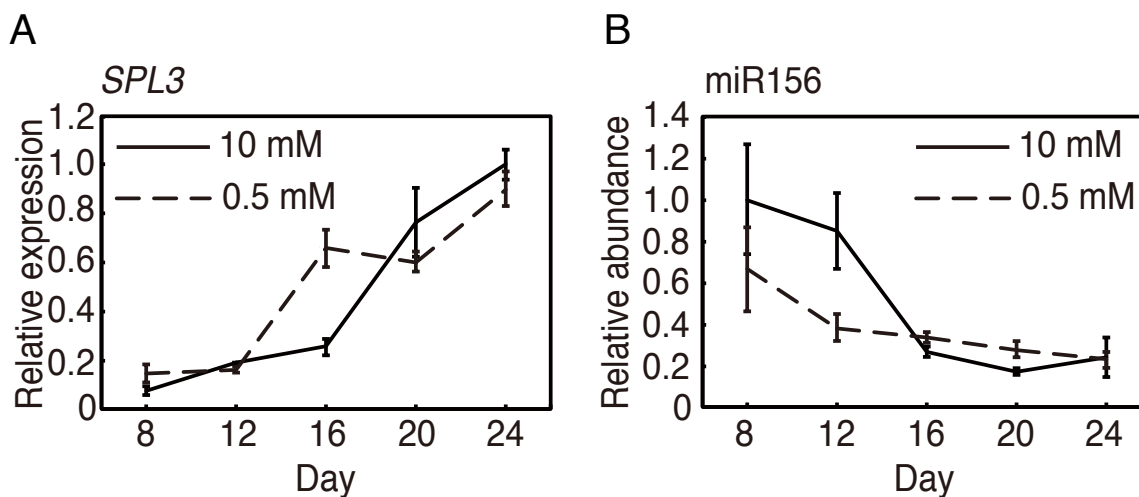
**図33. 野生型(WT)および*nakr1-1*のTPSの発現量**

長日条件10日齢の植物体の地上部をZT16でサンプリングした試料からRNAを抽出し、*TPS1*~*11*についてRT-PCR法により半定量的に発現解析を行った。系統樹はYang et al. 2012より引用して作成。内部標準としてアクチン (*ACT2*) を用いた。



**図34. 野生型 (WT) と *nakr1-1* のスクロース非存在下での花成時期**

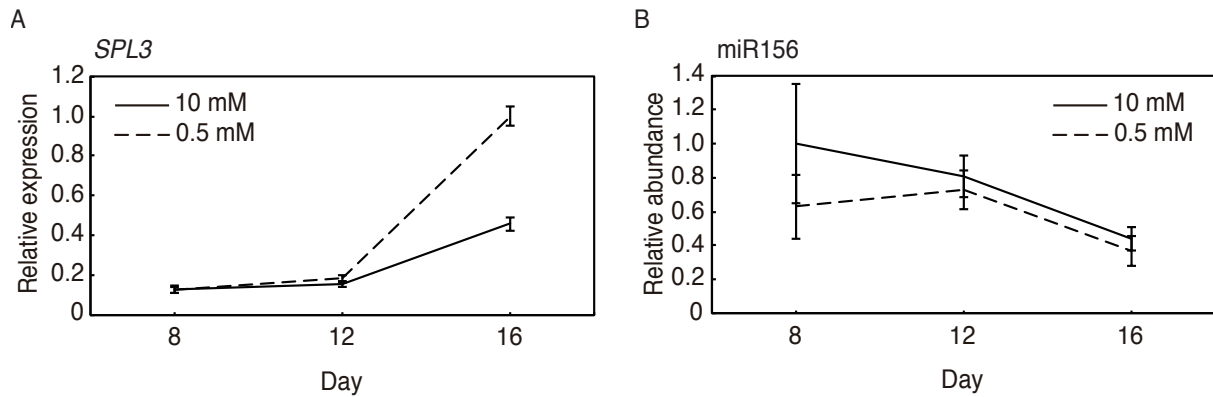
長日条件において野生型(WT)と *nakr1-1* を、1%スクロースを含む1/2MS培地で育成した植物(+)と、スクロースを含まない1/2MS培地で育成した植物(-)の主軸に形成された葉の枚数の平均値を示す。異なる英字は総葉数において有意な差があったことを示す (Tukey-Kramer HSD法、 $P < 0.05$ )。エラーバーは総葉数における標準偏差を示す (n = 8 - 14)。



**図35. 0.5、10 mMのカリウム濃度の培地で育成した*nakr1-1*の*SPL3*の発現量とmiR156の蓄積量**

(A) 10 mMまたは0.5 mMのカリウム濃度の1/2MS培地上で育成した長日条件8日齢から24日齢まで4日おきに植物体の本葉をZT0でサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法により*SPL3*の発現解析を行った。内部標準として*IPP2*を用いて相対量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。

(B) 10 mMまたは0.5 mMのカリウム濃度の1/2MS培地上で育成した長日条件8日齢から24日齢まで4日おきに植物体の本葉をZT0でサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法によりmiR156の定量を行った。内部標準として*IPP2*を用いて相対量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。



**図36. 0.5、10 mMのカリウム濃度の培地で育成した野生型 (WT) の*SPL3*の発現量と*miR156*の蓄積量**

(A) 10 mMまたは0.5 mMのカリウム濃度の1/2MS培地上で育成した長日条件8日齢から16日齢まで4日おきに植物体の本葉をZT0でサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法により*SPL3*の発現解析を行った。内部標準として*IPP2*を用いて相対量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。

(B) 10 mMまたは0.5 mMのカリウム濃度の1/2MS培地上で育成した長日条件8日齢から16日齢まで4日おきに植物体の本葉をZT0でサンプリングした試料からRNAを抽出し、RT-qPCR法により*miR156*の定量を行った。内部標準として*IPP2*を用いて相対量を示した。エラーバーは生物学的に独立な3回の実験の標準誤差を示す。

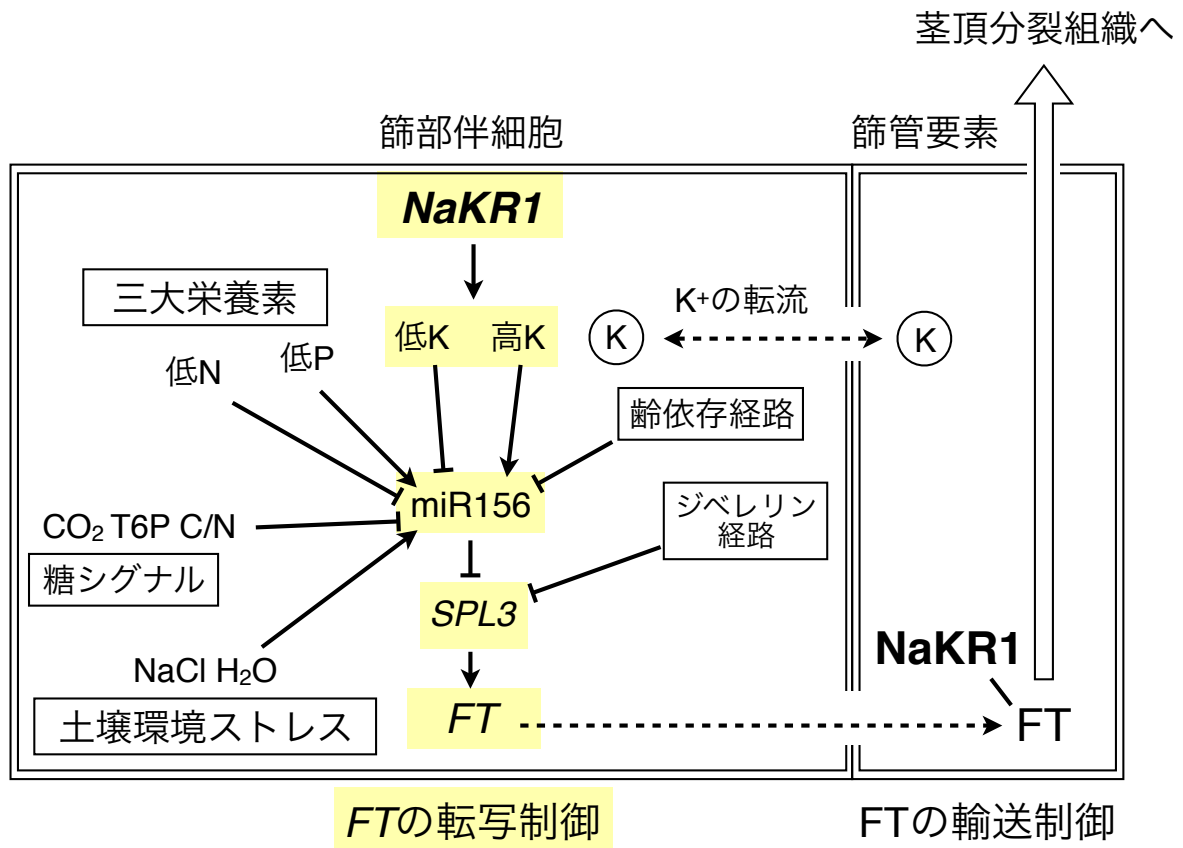


図37. *NaKR1*による*FT*の発現制御のモデル

本研究で明らかになった*NaKR1*が*FT*の転写を制御する機構を黄色のハイライトで示す。

実線の矢印は遺伝子発現や蓄積量を促進する制御、T字線は反対に抑制する制御を示す。破線の矢印は物質の移動を示し、白抜き線は篩管を介した長距離移動を示す。

*NaKR1*と*FT*の間の線はタンパク質間相互作用を示す。