

論文内容の要旨

申請者氏名 Teo Chin Jit

多くの植物は1日の明暗サイクル(光周期)の季節変化を感受して1年の決まった時期に花芽形成を行なう光周性花成を示すことが知られている。光周性花成を誘導するホルモン(フロリゲン)の分子実体はFTタンパク質であり、受容体14-3-3と転写因子FDからなる複合体(Florigen Activation Complex, FAC)を形成して花成誘導する。近年、FTタンパク質が花成以外にも、様々な発生・成長制御を行うことが明らかになってきた。ジャガイモでは、FTホモログであるStSP6Aタンパク質が塊茎誘導ホルモン(チューベリゲン)として機能し、短日条件下で地下茎(ストロン)先端に塊茎を誘導する。しかし、SP6Aがどのようにして塊茎形成を誘導するのかは不明である。そこで本研究では、StSP6AがFAC様の複合体を形成することで塊茎形成が誘導されると考え、FAC様複合体の構成要素候補を単離し、それらの相互作用能および塊茎形成における機能を解析することで、FTタンパク質の多機能性を担う分子基盤の一端を明らかにすることを目的とした。

まず、形質転換が容易であるジャガイモ栽培品種「さやか」の日長応答性を調べた。鉢植えした植物は長日条件では短日条件より2週間遅れて塊茎形成し、試験管培養した植物も短日条件依存的に塊茎形成を示したことから、「さやか」を用いて日長応答解析が可能であると判断し実験に用いた。野生種ジャガイモのゲノム情報を基にFACの構成要素の単離をおこない、FTホモログ*StSP6A*と、3つのFDホモログ(*StFD*, *StFDL1*, *StFDL2*)、11の14-3-3アイソフォーム(*St14a-k*)を同定した。半定量的RT-PCR解析から、*StSP6A*は短日条件下で、*StFDL1/2*はストロンで強く発現すること、11個の14-3-3は構成的に発現していることがわかった。次に、Y2H相互作用解析を行なったところ、*StSP6A*と14-3-3及び14-3-3と*StFDL1/2*の相互作用が、花成誘導FACの場合と同様に、FTファミリーに保存されたアミノ酸残基(R60/P92/F99/R128)とFDファミリーに保存されたS/TAPモチーフがそれぞれ依存されていることがわかった。*StSP6A*と14-3-3(*St14a*, *St14f*)の結合は*in vitro* pull down解析でも確認された。次に、*StSP6A*の過剰発現体の塊茎形成時期を調べた。長日条件で移植後4週間目では、コントロール形質転換体では25%が塊茎形成したのと対照的に、*StSP6A*過剰発現体では95%が塊茎形成した。14-3-3結合欠損変異を導入した*StSP6A*の過剰発現体では、導入変異数が増えるにつれ塊茎形成促進能が減少した。同様の結果は、試験管培養した植物でも観察された。さらに、FDホモログのRNAi植物体の塊茎形成時期を調べた。トマト花成に関わる*SPGB*のオーソログと考えられる*StFD*のRNAi植物体は非形質転換体と同じく移植後6週間目で塊茎形成したのに対して、同じ時期の*StFDL1/2*のRNAi植物体はまったく塊茎が見られなかった。

本研究から、FTタンパクによるジャガイモ塊茎誘導においても、FAC形成が重要であることが明らかになった。また、FAC中の転写因子がFTタンパク質の多機能性を担う鍵因子であることが示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Teo Chin Jit

植物が日長変化を感知することで季節性の花成を行なう現象として光周性花成は古くから知られ、繁殖効率の最大化に寄与する重要な生殖制御機構である。葉で感受した日長変化刺激を茎頂に伝え、栄養成長から生殖成長に転換させる花成ホルモン（フロリゲン）が FT タンパク質であることは近年になって明らかになった。さらに、最近の分子遺伝学的な解析により、FT タンパク質は花成以外にも様々な発生・成長過程を制御する多機能性のホルモンであるという知見が蓄積している。ジャガイモにおいては、イネフロリゲン *Hd3a* やジャガイモ FT ホモログ *StSP6A* が塊茎誘導に働くことが先行研究により明らかにされている。このように、FT とそのホモログ遺伝子の遺伝学的な機能に関する興味深い知見は蓄積しているのに対して、FT タンパク質の生化学的な機能に関する知見は限られており、今後の研究の発展が期待される植物科学分野のひとつとなっている。

本論文では、先行しているイネ花成研究の知見から、ジャガイモ *StSP6A* がフロリゲン活性化複合体 FAC を形成することで塊茎形成が誘導されると仮説を立てた。そして、*StSP6A* が形成する FAC の構成要素候補を単離し、それらの相互作用能および塊茎形成における機能を調べた。実験に用いるジャガイモ栽培品種さやかの日長応答性を確認した後、FT ホモログ *StSP6A* と、3つの FD ホモログ (*StFD*, *StFDL1*, *StFDL2*)、11の 14-3-3 アイソフォームを同定した。先行研究より *StSP6A* が塊茎誘導に働くことは明らかにされている。Teo さんは、Y2H 相互作用解析や *in vitro* pull down 解析を行ない、*StSP6A* と 14-3-3 及び 14-3-3 と *StFDL1/2* の相互作用が、花成誘導 FAC の場合と同様に、FT ファミリーに保存されたアミノ酸残基 (R60/P92/F99/R128) と FD ファミリーに保存された S/TAP モチーフに、それぞれ依存していることを明らかにした。次に、形質転換ジャガイモを多数作製し、*StSP6A* と 14-3-3 の相互作用の塊茎誘導における役割を調べた。*StSP6A* 過剰発現体では塊茎形成が促進されるのに対して、14-3-3 結合欠損変異を導入した *StSP6A* の過剰発現体では塊茎形成促進能が有意に減少することを明らかにした。また、FD ホモログの RNAi 植物体を作製し、その塊茎形成時期を調べたところ、トマト花成に関わる FD のオーソログと考えられる *StFD* の RNAi 植物体は野生型と同じ時期に塊茎形成が観察されたのに対して、同時期の *StFDL1/2* の RNAi 植物体では塊茎形成が見られないことを明らかにした。本論文では、FT タンパク質によるジャガイモ塊茎誘導においても、FAC 形成が重要であることを明らかにし、FAC 中の転写因子が置き換わることで FT タンパク質の多機能性が発揮される可能性を議論している。

以上のように、本論文は FT タンパク質によるジャガイモ塊茎形成の分子機構を分子生物学の手法を用いて研究したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。