

博士論文番号：1281012

イネ *TFL1* ホモログ *RCN* の花序形態形成制御における機能

金子 美穂

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物分子遺伝学研究室

(橋本 隆 教授)

目次

1. 序論

2. 材料および方法

2-1. 植物材料

2-2. 生育条件

2-3. 植物体からの RNA 抽出

2-4. 半定量的 RT-PCR

2-5. プラスミド作製

2-6. GUS 染色

2-7. GFP 蛍光観察

3. 結果

3-1. イネ植物体における *RCN* 遺伝子の発現解析

3-1-1. *RCN* の時期/組織特異的 RNA 発現解析

3-1-2. *RCN* 発現の日長依存性

3-2. GUS レポーター遺伝子を用いた *RCN* の組織特異的発現解析

3-3. *RCN* タンパク質の局在解析

3-3-1. 茎頂分裂組織における *RCN::GFP* タンパク質の局在

3-3-2. 茎頂分裂組織における *RCN::GFP* タンパク質の細胞内局在

3-3-3. *RCN3-GFP* タンパク質の長距離移動

3-4. *RCN3* 過剰発現体の表現型解析

3-5. *RCN* RNAi 植物体の表現型解析

4. 考察

4-1. RCN は移動性のメリステム成長相転換抑制因子である

4-1-1. RCN タンパク質の茎頂分裂組織への長距離移動

4-1-2. *RCN*によるメリステムの成長相転換抑制

(1) 栄養成長期から生殖成長期への花成抑制

(2) 花序メリステムから花メリステムへの転換制御

4-2. RCN と Hd3a の拮抗による成長ステージの制御

5. まとめ

6. 参考文献

1. 序論

高等植物では発芽後に、茎頂分裂組織が葉を盛んに作り続ける栄養成長期を開始する。そして、茎頂分裂組織は適切な時期に到達すると成長相を転換し、栄養成長期から生殖生長期へと移行する。この成長相転換は花成と呼ばれる。生殖成長期では、茎頂分裂組織は種子形成のための花芽形成を行う。花成時期の決定は、植物種の繁殖のためにもっとも重要な過程の一つである。

花成のタイミングは日長や気温、栄養条件といった環境条件や、植物の齢などの内的条件により決定される。このうち、植物が日長の変化（光周期）に反応して花成をおこなう現象は光周性花成とよばれる（Garner, and Allard 1920）。この光周性花成の応答によって、植物は次の 3 つに分類される。すなわち、1) それぞれの植物種に固有の限界日長より日長が短くなると花成が起こる短日植物、2) 限界日長より長くなると花成が起こる長日植物、3) 日長に影響されず適切な齢になると花成が起こる中性植物である。

光周性花成における日長変化は葉で感受される。一例をあげると、長日植物であるハウレンソウや短日植物であるキクの葉の部分のみを花成誘導条件下において生育させると、どちらも花成が誘導されるのに対して、茎頂のみを花成誘導条件下において生育させても花成は起こらない。この実験結果は、日長変化が葉で感受され、その情報が何らかの形で茎頂分裂組織へ伝達されて花成が誘導されていることを示している（Knott et al., 1934、Chailakhyan, M.K 1936）。このような知見から、「日長変化が葉で感受された後に花成誘導物質（花成ホルモン）が作られ、これが茎頂分裂組織に輸送されて花成が引き起こされる」という仮説が提唱され、この花成ホルモンはフロリゲンと名付けられた（図 1）（Chailakhyan, M.K 1936）。

フロリゲンの存在は接ぎ木実験や葉の暗処理実験などの様々な生理学的実験から支持されてきた。例えば、短日植物であるシソを短日条件で生育させ、その葉を花成非誘導条件である長日条件で生育したシソの台木に接ぎ木したところ、台木で花成が誘導された (Zeevaart, 1976)。これは、フロリゲンが葉から接ぎ木面を介し、茎頂分裂組織へ移動した後に花成を誘導したことを強く示唆している。さらに、日長応答性の異なる様々な植物を用いた接ぎ木実験から、フロリゲンは、すべての被子植物に共通して働くホルモンであることが示唆された (Zeevaart, 2006)。

1999年に長日植物であるシロイヌナズナの光周性花成にかかわる因子として *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) 遺伝子が単離・同定された (Kobayashi et al., 1999, Kardailsky et al., 1999)。*FT*は、長日条件において葉で発現が誘導され、短日条件ではほとんど発現しない。*ft* 変異体は長日条件で遅咲きとなり、*FT* 過剰発現植物は日長に関わりなく早咲きとなる (Kobayashi et al., 1999, Kardailsky et al., 1999)。維管束特異的な *AtSUC2* プロモーターで発現誘導した *FT*-GFP 融合タンパク質は維管束の師部と茎頂分裂組織の基部に観察され、接ぎ木すると接ぎ木面を通して輸送され、接ぎ穂の開花を促進できる (Corbesier et al., 2007)。これらの知見から、*FT*は葉の維管束で発現し、維管束師部を通して茎頂分裂組織へ長距離移動して、花成を促進することが明らかになった (Corbesier et al., 2007)。短日植物であるイネにおいても、出穂時期に関わる QTL の解析から *Hd3a* (*Heading data 3a*) 遺伝子が同定されている (Kojima et al., 2002)。*Hd3a* はシロイヌナズナの *FT* とアミノ酸レベルで 75% と高い相同性を示しており、*Hd3a* を過剰発現させたイネは早咲きとなる (Kojima et al., 2002)。*Hd3a* 遺伝子の発現は、花成誘導条件である短日条件下の葉の維管束師部で検出されるが茎頂分裂組織では検出されない (Kojima et

al., 2002、Hayama et al., 2003、Tamaki et al., 2007)。短日条件下において維管束師部特異的な発現を誘導できる *Hd3a* プロモーターや、維管束特異的に恒常的な発現を誘導できる *RPP16* プロモーターと *rolC* プロモーターで発現させた *Hd3a*-GFP 融合タンパク質は、茎頂分裂組織に局在が観察された (Tamaki et al., 2007)。これらの結果から、*Hd3a* タンパク質も *FT* タンパク質と同様に、葉の維管束師部で発現し、維管束を通して茎頂分裂組織へ長距離移動して、花成を促進していることが示された (Tamaki et al., 2007)。以上の *FT* と *Hd3a* に関する知見は「花成誘導条件下の葉で発現し、維管束を通して茎頂分裂組織へ移動して花成を誘導する物質」というフロリゲンの定義を満たしていることから、現在ではフロリゲンの分子実体はシロイヌナズナでは *FT*、イネでは *Hd3a* であると考えられている (Song et al., 2014)。花成におけるフロリゲン経路への依存度は植物によって異なっている。シロイヌナズナには、*FT* と後述する *FT* 類似遺伝子 *TSF* の2つのフロリゲン遺伝子しか存在しないが、両者の機能喪失だけでは花成は完全に抑制されない (Yamaguchi et al., 2005)。対照的に、イネでは、*Hd3a* と *Hd3a* 類似遺伝子 *RFT1* の両者の発現抑制により花成が完全に抑えられる (Komiya et al., 2008)。これは、フロリゲンによる花成制御研究にイネを用いる際の利点の一つになると考えられる。

フロリゲンは、すべての被子植物に共通して花成を誘導すると考えられているが、花成誘導によって形成される花序の形態は植物種によって大きく異なっている。たとえば、シロイヌナズナ *Columbia* 株では、花成が誘導されると茎頂分裂組織が花序メリステムへと転換し花茎が伸長する。そして、花茎の伸長とともに花序メリステムの周縁部に花メリステムが次々と形成され、そこから花器官が分化し、総状花序と呼ばれる花序形態を示す。一方、イネでは、花成が誘導されると茎頂分裂組織 (SAM) が花序メリステム (IM) へと転換し花茎

を伸長させる（図 2）。花序メリステムは周縁部に一次枝梗メリステム（PBM）を形成し、そこから一次枝梗が伸長する。一次枝梗メリステムは一次枝梗を伸長させながら周縁に二次枝梗メリステム（SBM）を形成させる。さらに、二次枝梗メリステムは二次枝梗を伸長させながら周縁に小穂メリステム（SM）を形成し、小穂メリステムが花メリステム（FM）へと転換して花器官が形成され、複総状花序（円錐花序）と呼ばれる花序形態となる（Tanaka et al., 2013）。小穂メリステムが形成されると、枝はそれ以上成長しない。そのため、花序の形や大きさの決定において、1) 茎頂分裂組織がいくつ枝梗メリステムを発生させるか、2) 枝梗メリステムが小穂づくりにプログラムを転換するタイミング、3) 枝梗メリステム自身が最終的に小穂メリステムに転換するタイミングという 3 点が重要となる（Kyoizuka 2008）。

フロリゲンは花成時期の決定だけでなく、花序形態の制御にも重要であることが示唆されている。シロイヌナズナ *FT* の強い過剰発現体では、花序の頂端に花がひとつだけ形成される *terminal flower* の表現型を示す（Kobayashi et al., 1999）。イネにおいても *Hd3a* を過剰発現させると花序の枝分かれが形成されず花芽がほとんどできなくなる（Kojima et al., 2002、田岡ら未発表）。これらは、正常な花序形態形成にはフロリゲンの活性が適切に抑制される必要があることを示唆している。そのような抑制因子の候補として、後述する *TFL1* 遺伝子が考えられる。シロイヌナズナの *tfl1* 変異体では、花芽が頂端に形成され花成が早まる（Bradley et al., 1997）。イネにおいても、後述する *TFL1* ホモログである *RCN* 遺伝子が花成に抑制的に機能しうることが報告されている（Nakagawa et al., 2002）。しかし、*RCN* 遺伝子の詳細な発現時期や発現部位、*RCN* タンパク質の局在は不明である。そこで、本研究ではイネを材料とし、*RCN* 遺伝子の発現や *RCN* タンパク質の局在解析、形質転換イネを用いた *RCN* 遺伝子の機能

解析から、フロリゲンの抑制因子による花成や花序形態形成の制御機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

TFL1/RCN とは対照的に、フロリゲン FT/Hd3a タンパク質が茎頂分裂組織において、どのようにして花成を促進しているかについては、FT/Hd3a タンパク質の複合体形成の観点から明らかにされてきている。シロイヌナズナにおいて、FTが花成を促進するには FD 遺伝子の機能が必要である (Abe et al., 2005、Wigge et al., 2005)。FD 遺伝子は、遅咲きの表現型を示す *fd* 変異体の原因遺伝子として同定された、bZIP 型転写因子をコードする遺伝子で、茎頂分裂組織で恒常的に発現している (Abe et al., 2005、Wigge et al., 2005)。そして、FT タンパク質と FD タンパク質が相互作用して、花メリステムのアイデンティティ決定遺伝子のひとつである *AP1* (*APETALA1*) などの発現を活性化させることで花成を促進していることが示されている (Abe et al., 2005、Wigge et al., 2005)。イネにおいては、真核生物に高度に保存されているアダプタータンパク質 14-3-3 を介して Hd3a がイネの FD ホモログ OsFD1 と相互作用し、三種のタンパク質からなるフロリゲン活性化複合体 (Florigen Activation Complex : FAC) を形成することが、酵母ツーハイブリッド解析、イネ培養細胞を用いた BiFC 解析、in vitro pull-down 解析、NMR 滴定、タンパク質結晶構造解析などから明らかにされている (Taoka et al., 2011)。さらに、BiFC 解析から、Hd3a はまず細胞質で 14-3-3 と相互作用し、形成された二者複合体が核でさらに OsFD1 と相互作用して三者複合体を形成して機能することが示唆されている (Taoka et al., 2011)。14-3-3 との相互作用能を喪失させた変異型 Hd3a 過剰発現植物は、イネの *AP1* ホモログである *OsMADS15* の転写活性化能や花成促進能を喪失する (Taoka et al., 2011)。以上のことから、葉で発現し茎頂分裂組織へ輸送された Hd3a は、茎頂分裂組織の細胞内において、まず細胞質で 14-3-3

と相互作用し、その後 Hd3a と 14-3-3 の複合体が核へ移行して OsFD1 とさらに相互作用し、形成された FAC が花芽分裂組織決定遺伝子を活性化することで花成を促進していることが示唆されている（図 3）。Hd3a の 14-3-3 相互作用部位は FT サブファミリータンパク質間で非常に高度に保存されていること（Taoka et al., 2011）、FAC 形成能をもつと予想される FD ホモログが植物に高度に保存されていること（Tsuji et al., 2013）から、FAC 形成による花成促進は開花する植物に共通して働いている機構であると考えられる。

FT 遺伝子はホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質（PEBP）に類似したタンパク質をコードしている。シロイヌナズナの PEBP 類似タンパク質はファミリーを形成しており、FT、TSF（TWIN SISTER OF FT）、TFL1（TERMINAL FLOWER 1）、BFT（BROTHER OF FT）、ATC（*Arabidopsis thaliana* CENTRORADIALIS）、MFT（MOTHER OF FT）の 6 つのメンバーで構成されている。そして分子系統樹を用いた解析から、FT subfamily（FT、TSF）、TFL1 subfamily（TFL1、BFT、ATC）、MFT subfamily（MFT）という 3 つの subfamily にグループ化されている（Chardon and Damerval, 2005）。FT subfamily に属する *FT* と *TSF* は冗長的に花成促進に働く（Yamaguchi et al., 2005）。MFT subfamily に属する *MFT* は種子発芽抑制に働いている（Xi et al., 2010）。さらに、先述した TFL1 subfamily に属する *TFL1* は花成の抑制や花序の無限成長性の維持に働いており（Bradley et al., 1997）、*BFT* は高塩濃度下での花成抑制に、*ATC* は短日条件での花成抑制に働いている（Huang et al., 2012, Ryu et al., 2014）。

TFL1 遺伝子は、早咲きおよび頂花形成の表現型を示すシロイヌナズナ *tfl1* 変異体から同定された（Bradley et al., 1997）。*TFL1* 遺伝子は茎と茎頂分裂組織の内部で発現しており、*TFL1* の過剰発現植物は遅咲きの表現型を示す

(Bardley et al., 1997、Hanazawa et al., 2005、Conti et al., 2007)。また、*TFL1* は花芽分裂組織決定遺伝子の *LFY* (*LEAFY*) や *API* の発現を抑制し、それらと遺伝学的なフィードバック制御ループを形成することで茎頂分裂組織の分化を制御している (Ratcliffe et al., 1999, Jaeger et al., 2013)。タバコの葉を用いた BiFC アッセイから、*TFL1* タンパク質は核と細胞質に局在しており、核で *FD* タンパク質と相互作用することが示唆されている (Hanano et al., 2011)。

TFL1 と *FT* は互いにタンパク質構造が高度に類似しているにもかかわらず、それらの過剰発現植物は正反対の表現型を示すことから、両者は花成に対して拮抗的な働きをすると考えられている (Hanazawa et al., 2005、Ahn et al., 2006)。*FT* と *TFL1* の拮抗的な機能分化には、*PEBP* の脂質結合に関わるアニオン結合ポケット領域近傍のアミノ酸の表面電荷と、ループを形成しているセグメント B 領域の 2 つの領域の違いが重要であることが示唆されている (Hanazawa et al., 2005、Ahn et al., 2006、Ho et al., 2014)。

様々な植物種において *TFL1* ホモログは花成抑制や花序の無限成長性の維持に働いていることが報告されているが、そのどちらの機能を分担するのか、もしくは両方の機能を発揮するのかは遺伝子によって異なっており、主に発現の部位とタイミングで決まっている。キンギョソウの *TFL1* ホモログである *CEN* (*CENTRORADIALIS*) は花序メリステムで発現し、*cen* 変異体は花成時期に影響しないが、有限花序になる (Bradley et al., 1996)。トマト *SP* (*SELF-PRUNING*) の機能が欠失した *sp* 変異体は花成時期に影響しないが、有限成長性が弱まる (Pnueli et al., 2001)。ダイズの *GmTFL1* はシロイヌナズナ *tfl1* 変異を相補でき、*Gmtfl1* 変異体は早咲きになり無限成長性が喪失した表現型を示す (Tian et al., 2010)。トウモロコシの *ZCN* (*Zea mays CENTRORADIALIS*) の過剰発現植物の解析から、*ZCN1*、*ZCN2*、*ZCN4*、

ZCN5 は花成と花序形成の両方の制御に関与しており、*ZCN3* と *ZCN6* は花成の制御にのみ関与していることが示唆されている (Danilevskaya et al., 2010)。エンドウマメの 2 つの *TFL1* ホモログのうち、*DET* (*DETERMINATE*) は生殖成長期の花序メリステムにおいて無限成長性を制御しており、*LF* (*LATE FLOWERING*) は栄養成長期の茎頂メリステムで発現し、花成の制御に関与している (Foucher et al., 2003)。また、イチゴやバラの *KSN* (*Koushin*) は、季節によって発現レベルを変化させることで四季咲き性をコントロールしており (Iwata et al., 2012)、多年草の *Arabis alpina* やホソムギ (*Lolium perenne* L.) の *TFL1* ホモログは、植物の齢に応じて発現強度を変化させることで、開花抑制や花序形成、多年生のライフサイクルを制御しているという報告がされている (Jensen et al., 2001、Wang et al., 2011)。

TFL1 サブファミリーには、*FT/Hd3a* のように細胞間移動するものも報告されている。シロイヌナズナの *TFL1* やキンギョソウの *CEN* では、mRNA は茎頂分裂組織の下部で発現しているが、翻訳されたタンパク質は茎頂分裂組織の上部へ拡散することが示されている (Bradley et al., 1996、Conti et al., 2007)。シロイヌナズナの *ATC* は維管束で発現し、茎頂分裂組織へ長距離移動した後、*AP1* の発現を抑制することで、非誘導条件である短日条件下での花成抑制に貢献していることが報告された (Huang et al., 2012)。また、キクの *TFL1* ホモログである *AFT* (*Anti-florigenic FT/TFL1 family protein*) は、葉で日長変化を感知して発現誘導された後、長距離移動して、非誘導条件である長日条件下での開花を抑制することが示唆された (Higuchi et al., 2013)。

イネにも *TFL1* ホモログである *RCN* (*RICE CENTRORADIALIS*) が 4 つ (*RCN1*、*RCN2*、*RCN3*、*RCN4*) 存在している (Nakagawa et al., 2002)。*RCN* についての先行研究から、*RCN* は花成と花序分化の制御に関与している

可能性が示唆された (Nakagawa et al., 2002、Zhang et al., 2005、Liu et al., 2013)。RCN1、RCN2、RCN3それぞれの過剰発現体は開花遅延を示し、えい花数が増加するという無限成長性が強調された表現型を示し (Nakagawa et al., 2002、Zhang et al., 2005)、RCNの四重 RNAi 植物体は、えい花数が減少するという無限成長性が抑制された表現型を示すことが報告されている (Liu et al., 2013)。

TFL1 サブファミリーにおいても、FT サブファミリータンパク質の 14-3-3 との相互作用に関わるアミノ酸残基は高度に保存されている (Taoka et al., 2011)。そして、シロイヌナズナやトマトの FT や TFL1 ホモログが 14-3-3 と酵母内で結合することも報告されている (Pnueli et al., 2001、Lifschitz et al., 2006)。また、FT も TFL1 も核内で FD と相互作用できる (Hanano et al., 2011)。RCN ファミリーにおいても、酵母ツーハイブリット解析やイネプロトプラストを用いた BiFC アッセイより、RCN は 14-3-3 と細胞質で相互作用し、OsFD1 と核で相互作用することが明らかになった (田岡ら未発表)。これらの結果から、RCN が 14-3-3 を介して Hd3a と競合的に OsFD1 と相互作用し、FAC 類似複合体 (Flowering repression complex : FRC) を形成し、花成や花序形成の制御をしているというモデルが考えられた (田岡ら、2012)。すなわち、栄養成長期には RCN が 14-3-3、OsFD1 と相互作用することでフロリゲン活性を抑制しているが、相転換後に Hd3a が茎頂分裂組織へ到達すると、14-3-3 を介した OsFD1 への結合を RCN と Hd3a が競合し、Hd3a を含む FAC が優勢になると花成が開始されるというモデルである。同様のモデルは花序の構造制御においても成立すると考えられる。すなわち、Hd3a を高発現するイネではえい花数が減少し (Kojima et al., 2002、Tamaki et al., 2007、Tamaki et al., 2015)、逆に RCN を高発現するイネではえい花数が増加することから (Nakagawa et al., 2002、

Zhang et al., 2005)、RCN と Hd3a の競合が花序の構造を制御している可能性が考えられた。本研究では、RT-PCR や GUS レポーターを用いた発現解析、蛍光タンパク質を用いた局在解析、さらに過剰発現や RNAi 植物体を用いた機能解析を行ない、RCN による花成と花序発達制御の分子機構の解明を目指した(図 4)。

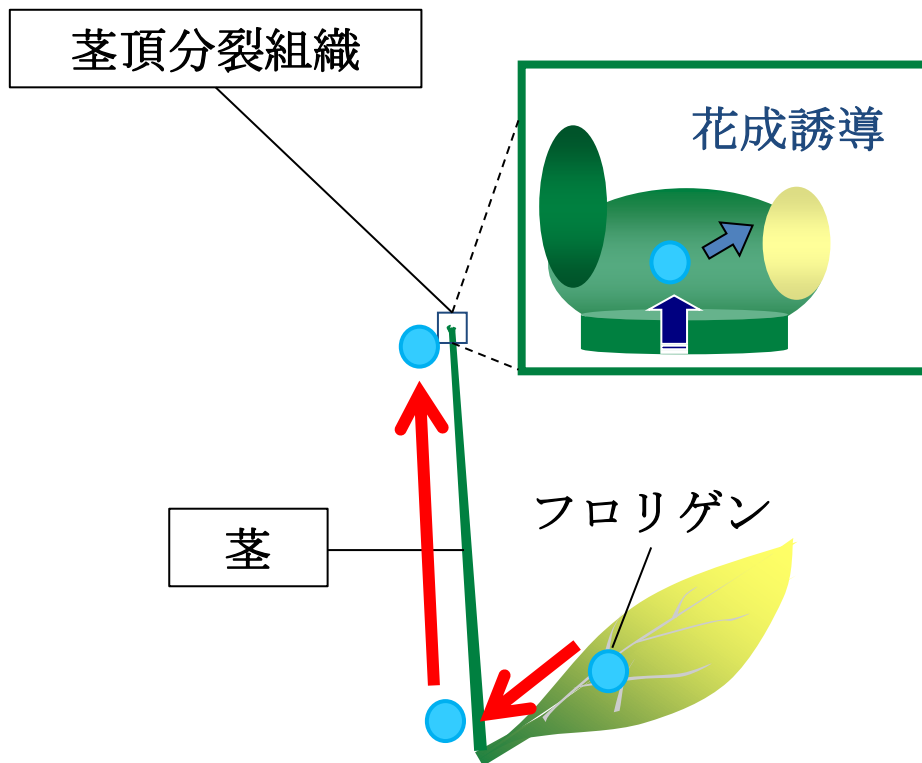
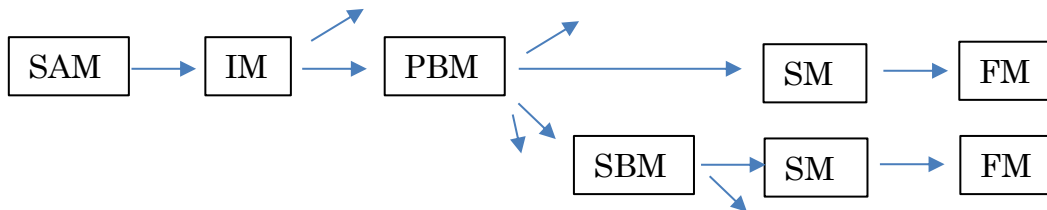


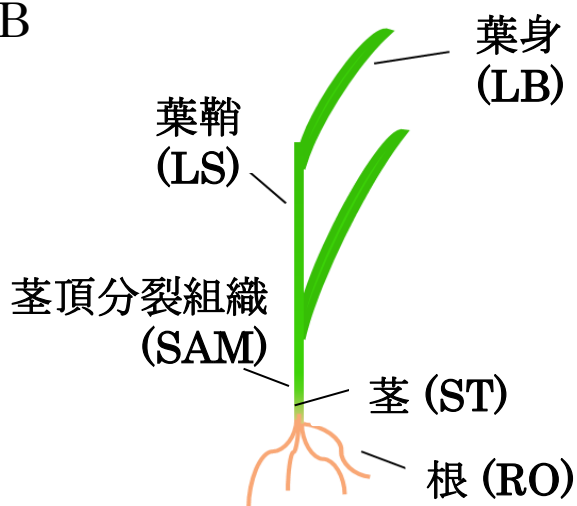
図1 フロリゲンの長距離輸送による花成誘導モデル図

日長変化は葉で感受された後に花成誘導物質（花成ホルモン：フロリゲン）が作られ、これが茎頂分裂組織に輸送されて花成が誘導される

A



B



C

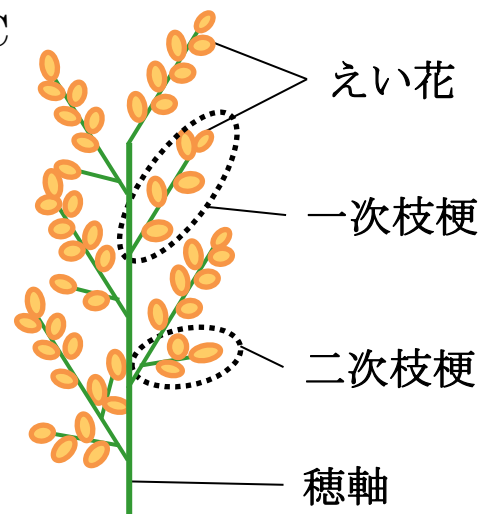


図2 イネの形態の模式図

(A) イネの花序形成過程におけるメリステムのアイデンティティ転換の模式図。SAM, 茎頂分裂組織; IM, 花序メリステム; PBM, 一次枝梗メリステム; SBM, 二次枝梗メリステム; SM, 小穂メリステム; FM, 花メリステム。
(B) 栄養成長期のイネの模式図。茎は葉鞘に隠れている。(C) イネの穂の模式図。

茎頂分裂組織内

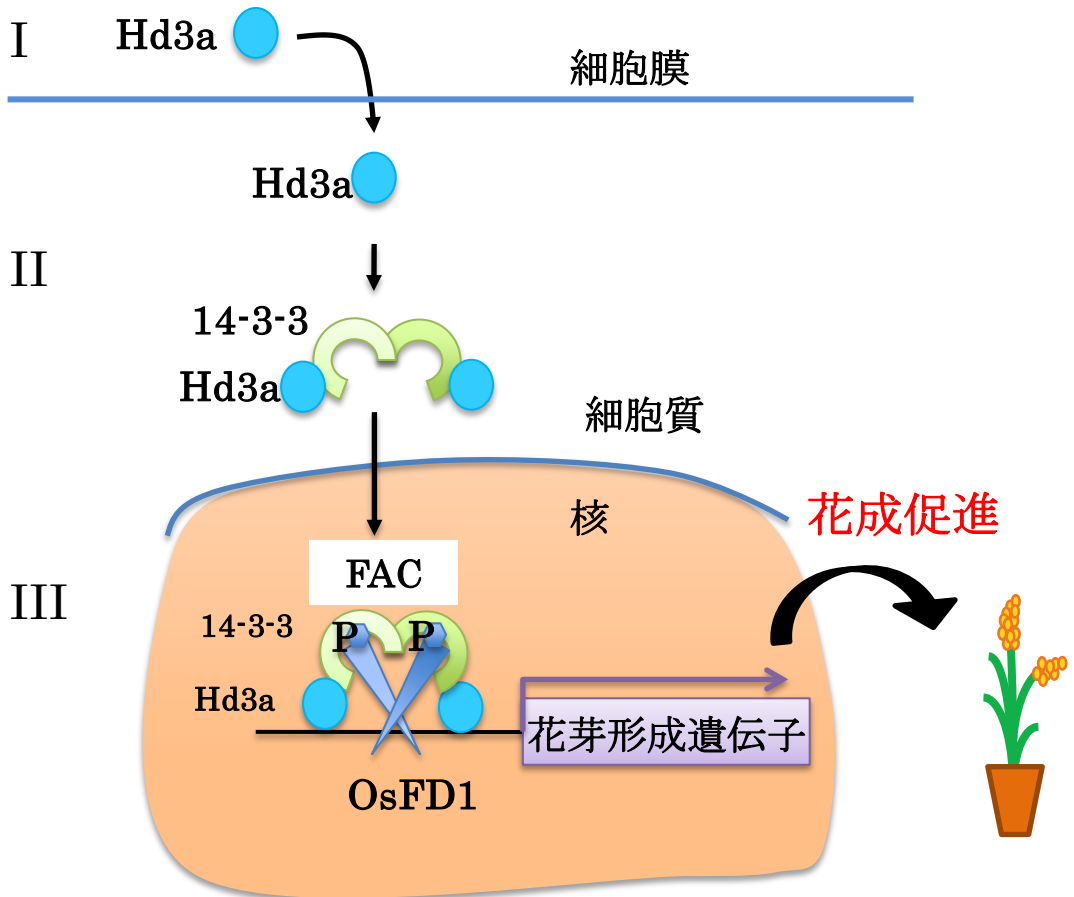


図3 フロリゲン活性化複合体 (FAC) の形成過程の模式図

(I) Hd3aが茎頂分裂組織に到達する。(II) Hd3aは細胞質で14-3-3と相互作用する。(III) Hd3aと14-3-3の複合体は核内でOsFD1と相互作用し、FACが形成され、花芽形成遺伝子を活性化することで花成が促進される。

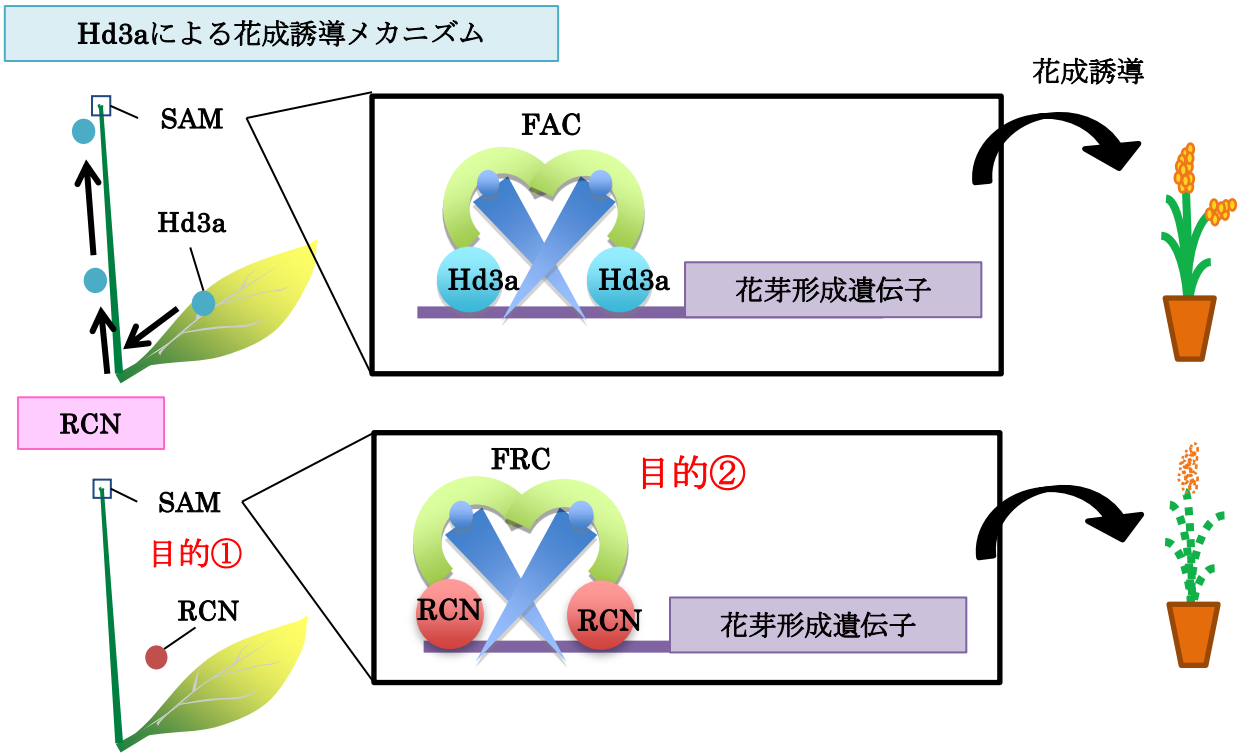


図4 本研究の目的

Hd3aは葉の維管束部で発現した後、茎頂分裂組織へ移動してFACを形成し花成を誘導する。一方で、RCNの組織特異的な発現時期、花成制御や花序形態制御におけるRCNの遺伝学的な機能の詳細、RCNの機能における14-3-3結合の重要性については明らかにされていない。そこで、次の2点を明らかにすることで花成や花序形成の制御機構を明らかにする。①RCNはイネにおいて、いつどこで発現し、どこに局在しているのか。②FRCは花成抑制や花序形成の制御に機能するのか。

2. 材料および方法

2-1. 植物材料

植物材料としてイネ (*Oriza sativa* L.) 農林 8 号 (N8) を使用した。形質転換植物体は、作成したプラスミド DNA をエレクトロポレーションで *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 株に形質転換し、胚盤由来カルスにアグロバクテリウムを感染させることにより作出した (Hiei et al., 1994)。

2-2. 生育条件

脱えいした種子を 20% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で 1 時間滅菌し、MS 培地に置床して終日明期、30°C 条件下で発芽させた。7~10 日後くみあい宇部培土 2 号で満たした 2.5cm × 2.5cm の育苗シートに移植し、人工気象器内で栽培した。移植した 7~10 日後、混合土で満たした 275ml クリアカップ (旭化成パック) に移植した。

再分化個体 (T₀ 植物) は、Magenta™ 容器 (SIGMA, 7.5cm × 7.5cm × 10 cm) 内で終日明期、30°C 条件下で栽培した。その後、くみあい宇部培土 2 号 (宇部興業) とバーミキュライト (ニッタイ) を 4 : 1 の割合で混合した土で満たした 275ml クリアカップに移植し、実験の目的に応じて日長条件を設定した人工気象室内で栽培した。短日条件の場合は、明期 10 時間、湿度 76%、温度 27.5°C。暗期 14 時間、湿度 70%、温度 25°C に設定した。長日条件の場合は、明期 14 時間、湿度 80%、温度 27.5°C。暗期 10 時間、湿度 75%、温度 25°C に設定した。

2-3. 植物体からの RNA 抽出

植物体から採取したイネ組織 (葉身、葉鞘、茎頂分裂組織を除いた茎、根、

茎頂分裂組織) (図 2B) を液体窒素により処理し、マルチビーズショッカー (安井機械) を使用して粉末状に破碎した。TRIzol® Reagent (Invitrogen) を添加し、説明書に従って全 RNA を抽出した。茎頂分裂組織は 50 μ l の TRIzol® Reagent に採取した後、ペッスルを使用して破碎し、説明書に従って全 RNA を抽出した。ゲノム DNA の混入を防ぐため、DNase I, Amplification Grade (Invitrogen) を用いて、混入したゲノム DNA の消化を行った。

2-4. 半定量的 RT-PCR

DNaseI 処理を行った全 RNA 1 μ g から oligo dT primer (dT21) と Super Script™ II Reverse Transcription (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。半定量的 RT-PCR は逆転写反応によって得られた cDNA 1 μ l をテンプレートに Ex-Taq (TaKaRa) あるいは KOD FX (TOYOBO) を用いて行った。使用したプライマーセットは表 1 に示した。

2-5. プラスミド作製

増幅酵素に KOD FX Neo (TOYOBO) を用いた PCR クローニングにより必要な領域のクローニングを行った。得られたクローンの塩基配列はシーケンシングにより確認した。得られた PCR 断片を pENTER/D-TOPO にクローニングした後、L/R Clonase (Invitrogen) を用いて、目的の destination vector に導入した。

Destination vector には pGWB ベクターシリーズ (Nakagawa et al., 2007) を必要に応じて改変して用いた。プロモーター GUS 解析には pGWB3 を用いた。過剰発現体解析に用いた pGWB5Ubq や pGWB5prolC は、pGWB5 ベクターの CaMV35S プロモーター部分を、制限酵素処理によりトウモロコシ *ubiquitin* プ

ロモーターあるいは *Agrobacterium rhizogenes* の rolC プロモーターに置換して作製した。RNAi 植物体の作製には *RCN* 遺伝子の 3'UTR 領域を p2KpANDA ベクター (Miki and Shimamoto. 2004) に導入して用いた (図 5)。

2-6. GUS 染色

イネから茎頂分裂組織を含む茎 (葉を 2、3 枚残したもの) と根を採集し、GUS 染色液に浸漬した。真空ポンプで約 15 分脱気したのち、37 度で 1 時間から一晩インキュベートした。GUS 染色液は、100mM NaPO₄ (pH7.0)、1% Triton X-100、5mM K₃(Fe(CN)₆)、5mM K₄(Fe(CN)₆)、0.5mM DMF X-gluc、10mM EDTA で調製した。その後、70%エタノール、酢酸エタノール、70%エタノールと順に浸漬して脱色を行い、包水クロール溶液に浸漬して透明化处理を行った。包水クロール溶液は包水クロール 8g、グリセロール 1ml、滅菌水 2ml で調製した。透明化处理を行ったサンプルを 4%の低融点アガロースで包埋し、サンプルの周囲を 5mm ほど残してブロック状に切り出した。これをビブラトーム VIB3000 plus (Leica) により、茎頂分裂組織と茎の観察時は 50 μ m、維管束観察時は 10 μ m の厚さにスライスして切片を作成した。作成した切片は滅菌水を滴下したスライドガラスにのせて余分なアガロースゲルを取り除いた後、カバーガラスをかけて実体顕微鏡 MVX10 (OLYMPUS) 下で根、茎と茎頂分裂組織の全体を、蛍光顕微鏡 BX50 (OLYMPUS) 下で茎頂分裂組織の維管束を観察した。

2-7. GFP 蛍光観察

イネから茎を切り出し、メスで茎頂を露出させた後、茎頂分裂組織を含む茎を約 60~70 μ m の厚さに切り出した。滅菌水を滴下したスライドガラスに切片

をのせカバーガラスをかけてプレパラートを作成し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 META (Carl Zeiss) を用いて蛍光タンパク質を観察した。対物レンズは、 $\times 10$ 、 $\times 20$ 、 $\times 40$ 、 $\times 63$ Water を使用した。488nm のアルゴンレーザーで励起し、波長情報の取得 (λ -Stack) を行った。511nm に蛍光強度のピークを持つ GFP 蛍光と、野生型から取得した自家蛍光の波長のスペクトルを基に、得られた λ -Stack 像をエミッションフィンガープリンティング法により分離した。分光処理画像は、GFP を緑色に、自家蛍光を赤色に標識した。

RCN3 過剰発現体および変異型 *RCN3* 過剰発現体を用いた茎頂分裂組織における、1 細胞内の核の蛍光輝度比率の解析には、画像解析ソフト Image J を使用した。各サンプルから任意に 10 細胞を選定した。1 細胞ごとに細胞全体と核について、蛍光輝度の総和と面積を測定した。得られた値を使い、1 細胞ごとの核の蛍光輝度の比率を求めた。まず細胞質の面積値と細胞質の蛍光輝度の総和値（「細胞全体の面積」-「核の面積」もしくは「蛍光輝度の総和値」-「蛍光輝度の総和値」）を得た。次に、核と細胞質それぞれについて、面積あたりの蛍光輝度の平均値（蛍光輝度の総和値/面積値）を算出した。その後、細胞質の蛍光輝度と比較したときの核の蛍光輝度の比率（核の蛍光輝度の平均値/細胞質の蛍光輝度の平均値）を求めた。

表1 *RCN*の発現解析に用いたプライマー

プライマー名	用途	配列
RCN1 GWF	半定量的RT-PCR	CACCATGTCTAGGTCTGTGGAGCCTCTTGTTGTA
RCN1 3'UTR R1	半定量的RT-PCR	AGATAAAAAGCCCTTTCTACCAGTTGGGTTTGTCC
RCN2 GWF	半定量的RT-PCR	CACCATGTCTGAGGGTGCTGGAGCTTCTCATTGTG
RCN2 3'UTR R2	半定量的RT-PCR	ACTACGTCTCACGTGTCTCACCTAGCTCTT
RCN3 GWF	半定量的RT-PCR	CACCATGTCTAGGTCTGTGGAGCCTCTTGTTGTT
RCN3 3'UTR R2	半定量的RT-PCR	GCACTGGTATTTATCATGACTCTCAATCTTCT
RCN4 GWF	半定量的RT-PCR	CACCATGTCTAGGGTGCTGGAGCCTCTCGTCGTC
RCN4 3'UTR R2	半定量的RT-PCR	AGTACGTCTCACGTGTCTCACCTAGCTCTT
Actin F	半定量的RT-PCR	CAATCGTGAGAAGATGACCC
Actin R	半定量的RT-PCR	GTCCATCAGGAAGCTCGTAGC
Ubq F	半定量的RT-PCR	AAGAAGCTGAAGCATCCAGC
Ubq R	半定量的RT-PCR	CCAGGACAAGATGATCTGCC
GFP-RBam	変異体ジェノタイピング	GGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
HPT 5	変異体ジェノタイピング	GAGCCTAGCCTATTGCATCTCC
HPT 3	変異体ジェノタイピング	GGCCTCCAGAAGAAGATGTTGG

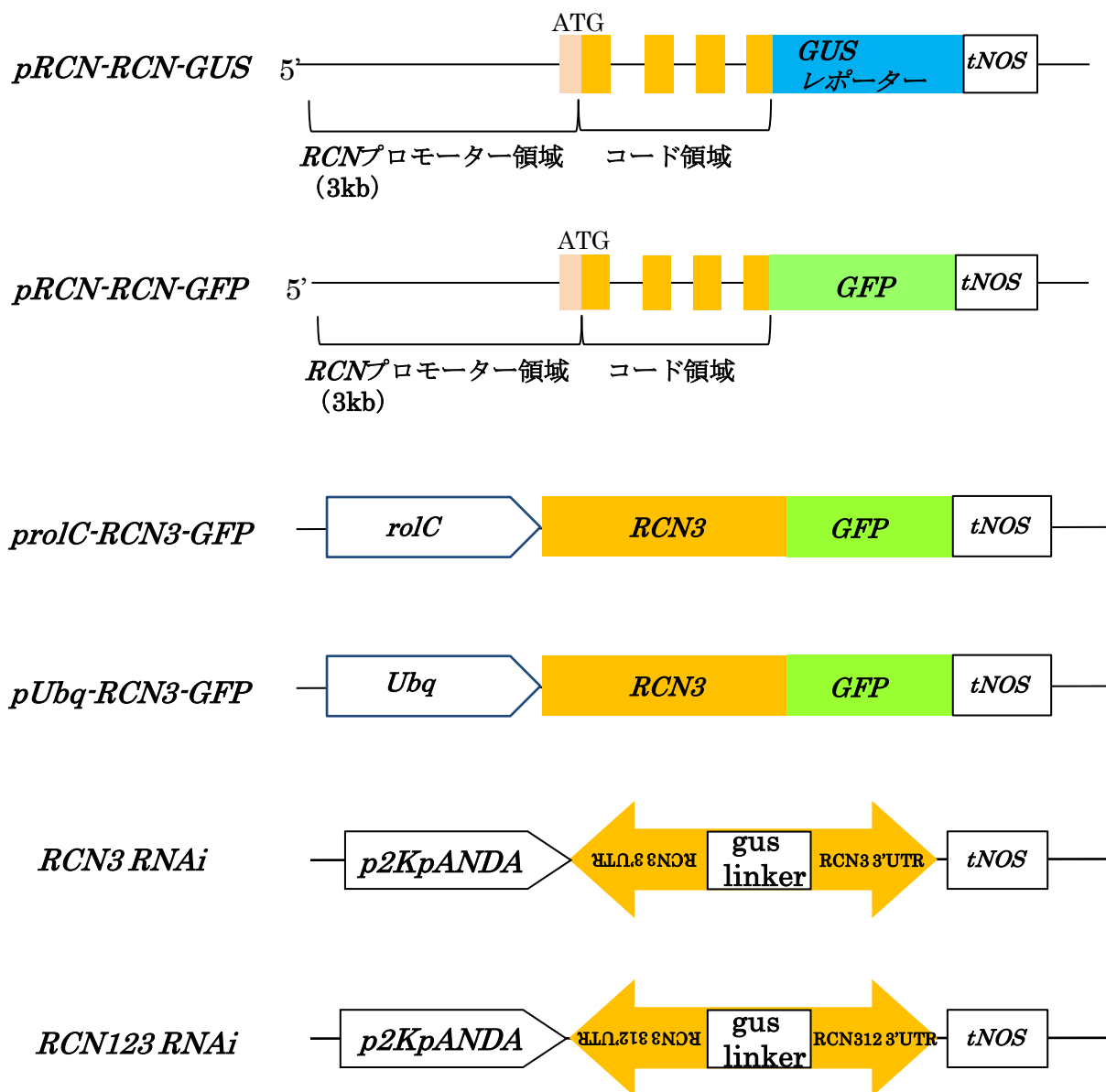


図5 プロモーター活性とタンパク質局在解析、表現型解析に使用した形質転換体作成のためのコンストラクトの模式図

3. 結果

3-1. イネにおける RCN の発現・局在解析

RCN1~4 の遺伝子の発現部位とタンパク質の局在解析を行った結果、RCNファミリーの発現・局在パターンは類似していた。さらに、RCN は茎で発現し、茎頂分裂組織へ移動して機能する移動性のタンパク質である可能性が強く示唆された。

3-1-1. *RCN*の時期/組織特異的 RNA 発現解析

*RCN*遺伝子のイネにおける発現時期と発現部位を明らかにするために半定量的 RT-PCR 解析を行った。花成が誘導される短日条件下でイネを生育させ、栄養成長期（播種後 26～28 日）、相転換期（播種後 30～31 日）、生殖成長期前期（播種後 40～42 日）、生殖成長期後期（播種後 49～50 日）の各ステージにおける葉身、葉鞘、茎、根の各器官における、*RCN*の発現量を解析した（図 6）。その結果、すべての *RCN*に共通して、調べたすべての成長ステージの茎と根において *RCN*の発現が確認されたが、その詳細な発現パターンは遺伝子ごとに異なっていた。*RCN1* は、すべての成長ステージの葉身と葉鞘を含めたイネの全身で発現が観察された。*RCN2* は茎と根のみで発現が観察された。*RCN3* の発現は、根においては他の *RCN* より弱く、茎においては栄養成長期で最も強く、その後成長が進むにつれて弱くなった。*RCN4* の発現は、栄養成長期では根と茎に限定されていたが、相転換期後には葉鞘でも観察された。

次に、茎頂における *RCN* 遺伝子の発現について半定量的 RT-PCR 解析を行った（図 7）。その結果、調べたすべてのステージで *RCN* 遺伝子の発現は観察されなかった。微弱な発現を検出するために、PCR 産物を鋳型に再度 PCR 反

応を行ったが、*RCN*mRNA に由来する増幅産物は検出されなかった (data not shown)。

3-1-2. *RCN*発現の日長依存性

次に、*RCN*の発現に光周性が関与しているのかを調べるために、花成非誘導条件下である長日条件で生育させた野生型イネを用いて *RCN* の半定量的 RT-PCR 解析を行った。短日条件下のイネにおいて *RCN*の発現がみられた葉身、葉鞘、茎、根を解析に用いた。イネを長日条件下で生育させた場合、短日条件下と比較すると出穂は約 30 日遅延することから (Komiya et al., 2009)、栄養成長期 (短日条件では播種後 26~28 日、長日条件では播種後 30 日)、相転換期 (短日条件では播種後 30~31 日、長日条件では播種後 50 日)、生殖成長期 (短日条件では播種後 40~42 日、長日条件では播種後 60 日) とした。図 6 と同様の発現解析をおこなったところ、短日条件の場合と同様に、調べたすべての成長ステージの茎と根において *RCN* の発現が確認された (図 8)。そして、各々の *RCN*の発現パターンや発現強度も短日条件の場合とほぼ類似していたが、いくつかの点で短日条件の場合との違いも観察された。*RCN1* は短日条件と同様に調べたすべての成長段階においてイネの全身で発現していた。*RCN2* は茎と根で発現していた。生殖成長期では長日条件における根での発現が弱くなっていた。*RCN3* は茎で最も強く発現しており、相転換期以降は根での発現は観察されなかった。*RCN4* は葉鞘、茎、根で発現しており、長日条件下では生殖成長期の根での発現が減少していた。

3-1-3. GUS レポーター遺伝子を用いた *RCN*の組織特異的発現解析

それぞれの *RCN*遺伝子について、5'上流域とコード領域を含むゲノム断片を

GUS 遺伝子コード領域に融合したキメラ遺伝子 (*pRCN:RCN-GUS*) を作製し (図 5)、それらの形質転換イネの T₁ もしくは T₂ 世代の植物体を用いて、栄養成長期 (播種後 25~26 日目) と生殖成長期 (播種後 35~36 日目) の茎頂を含む茎と根における GUS 染色の観察を行った (図 9-12)。その結果、すべての *RCN* について、調べたいずれの成長期においても茎の維管束で強い GUS 染色が観察された (図 9C-D、図 10 C-D、図 11 C-D、図 12 C-D)。次に、維管束における *RCN* の発現部位を細胞レベルで同定するために、茎の横断切片を作成し、GUS の発現部位を観察した。その結果、すべての *RCN* について、茎の上部、下部ともに、維管束の師部にのみ強い GUS 染色が観察された (図 9E-F、図 10E-F、図 11E-F、図 12E-F)。いずれの *RCN* についても、半定量的 RT-PCR 解析の結果と同様に、茎頂分裂組織での GUS 染色はまったく検出されなかった (図 9A-B、図 10A-B、図 11 A-B、図 12 A-B)。しかし、各々の *RCN* について、茎頂分裂組織周辺での GUS 染色の発現を詳細に観察したところ、*RCN* 遺伝子ごとに異なるパターンが観察された。すなわち、*RCN1* の観察では、栄養成長期と生殖成長期において、茎から茎頂分裂組織の直下まで続く GUS 染色が確認された。また、止め葉の原基でも GUS 染色が観察された (図 9A-B)。*RCN2* では栄養成長期と生殖成長期の茎頂の直下と葉原基の基部、さらに栄養成長期では葉原基の向軸側で GUS 染色が観察された (図 10A-B)。*RCN3* の場合、茎頂分裂組織付近では GUS 染色が観察されなかった (図 11A-B)。*RCN4* の観察では、栄養成長期の維管束環、生殖成長期の節間部に GUS 染色が確認されたが、維管束環での GUS 染色は *RCN1* の場合のようなドーム状ではなく、栄養成長期に茎頂分裂組織直下の一部に観察され、生殖成長期では検出されなかった (図 12A-B)。組織特異的発現解析から、*RCN3* のみ茎頂分裂組織付近での発現が見られないという興味深い結果を得た。

次に、根の GUS 染色を観察したところ、*RCN1*、*RCN2*、*RCN4*では、根全体の維管束において強い GUS 染色が観察された(図 13A-D、G-H)。特に、*RCN2*においては根端でも強い GUS 染色が観察された(図 13D)。一方、*RCN3*においては、根の基部でのみ GUS 染色が観察され(図 13E-F)、半定量的 RT-PCR 解析において *RCN3* の根での発現が他の *RCN* と比較して弱かったことと矛盾しない結果が得られた。

3-1-4. 茎頂分裂組織における RCN::GFP タンパク質の局在

RCN タンパク質の植物体内における局在を調べるために、先の GUS 発現解析と同様に、各々の *RCN* 遺伝子について 5'上流域とコード領域を含むゲノム断片を GFP 遺伝子のコード領域に融合したキメラ遺伝子 (*pRCN:RCN-GFP*) を作製した(図 5)。そして、それらの形質転換イネの T₂ 世代の植物体を用いて、栄養成長期(播種後 26~28 日)と生殖成長期前期(播種後 35~40 日)および生殖成長期後期(播種後 45~52 日)の茎頂分裂組織を含んだ茎の縦断切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡で RCN::GFP タンパク質の蛍光を観察した(図 14-17)。その結果、いずれの RCN についても、茎の維管束において RCN-GFP の蛍光が観察され(図 14H、15H、16H、17H)、半定量的 RT-PCR やプロモーター GUS 解析と矛盾しない結果が得られた。その一方で、半定量的 RT-PCR やプロモーター GUS 解析ではまったく発現が検出されなかった茎頂分裂組織においても、RCN-GFP の強い蛍光が観察された。すなわち、すべての RCN タンパク質について、栄養成長期の茎頂メリステム、生殖成長期前期の花序メリステム、生殖成長期後期の花メリステムにおいて RCN-GFP の蛍光が観察された(図 14E-G、15E-G、16E-G、17E-G)。そこで、さらに詳細にメリステム内での RCN-GFP の局在を解析したところ、栄養成長期と生殖成長期前期のメリステ

ムでは、すべての RCN-GFP の局在パターンは類似していたが、生殖成長期後期の花メリステムでは、RCN4 の局在に他とは異なる特徴が見られた。すなわち、栄養成長期の茎頂メリステムにおいて、いずれの RCN-GFP も茎頂分裂組織全体と茎頂分裂組織下部全体、さらに止め葉においてその蛍光が観察された（図 14E、15E、16E、17E）。そして、生殖成長期前期の花序メリステムにおいても、茎頂メリステムと同様に、茎頂分裂組織全体と茎頂分裂組織下部全体で RCN-GFP の蛍光が観察された（図 14F、15F、16F、17F）。それに対して、生殖成長期後期の花メリステムでは、RCN1-GFP、RCN2-GFP、RCN3-GFP は花メリステムにのみ局在が観察されたが（図 14G、15G、16G）、RCN4-GFP は花メリステムとその基部の両方に局在が観察された（図 17G）。

3-1-5. RCN3-GFP タンパク質の長距離移動

半定量的 RT-PCR 解析とプロモーターGUS 解析から *RCN* 遺伝子は主に茎の維管束で発現し茎頂分裂組織では発現しないことが示唆されたが、自身のプロモーターで発現させた RCN-GFP は茎の維管束だけでなく茎頂分裂組織にも局在が観察された。GFP は分子量 27kDa の小さな球状タンパク質であり、融合によって Hd3a などの細胞非自律的なタンパク質の原形質連絡を介した細胞間移行を大きく阻害しないのに対し（Tamaki et al., 2007, Corbesier et al., 2007）、GUS は分子量 68kDa であり細胞内で四量体を形成するため、発現した細胞外に移動することはないと考えられている。したがって、茎頂分裂組織で観察された RCN-GFP は茎の維管束から長距離移動して蓄積したものである可能性が考えられた。この可能性を検討するために、維管束特異的な発現を誘導する *rolC* プロモーター（Sugaya and Uchimiya., 1992）の制御下で RCN3-GFP を発現させる *prolC-RCN3-GFP* 形質転換イネを作出し、生殖成長期前期（播種後 35~40

日) の茎頂分裂組織と茎における *RCN3* の局在解析を行った。同様の手法を用いて、*Hd3a-GFP* の茎頂分裂組織への移動がすでに報告されている (Tamaki et al., 2007)。観察の結果、*RCN3-GFP* は茎の維管束と茎頂分裂組織全体で局在が観察された (図 18)。この結果から、*Hd3a* と同様に *RCN* も茎頂分裂組織への長距離移動能を持つことが示唆された。

3-2. *RCN3* 過剰発現イネと *RCNRNAi* イネの表現型解析

RCN3 過剰発現イネと *RCNRNAi* イネを用いた表現型解析において、*RCN3* は花メリステムへの分化を抑制することが明らかとなった。さらに *RCN1*、*RCN2*、*RCN3* は冗長的に機能する可能性が示唆された。

3-2-1. *RCN3* 過剰発現イネの表現型解析

RCN 遺伝子の花成や花序発達における機能を明らかにするために、*RCN3* 過剰発現イネ (*pUbq-RCN3-GFP*) の T_1 もしくは T_2 世代の植物体を用いて、短日 (花成誘導) 条件下における出穂日および主茎の花序形態の観察を行った。その結果、*RCN3* 過剰発現イネは野生型と比較して約 30 日出穂が遅延した (表 2)。主茎の花序形態を調べたところ、*RCN3* 過剰発現イネは野生型と比較して、二次枝こう数は約 2.5 倍、えい花数は約 1.6 倍有意に増加していたが、一次枝こう数は有意差がなかった (表 3、図 19A-D)。この結果から、*RCN3* は茎頂分裂組織において花成抑制と花メリステムへの分化抑制に働いている可能性が示唆された。

3-2-2. *RCNRNAi* 植物イネの表現型解析

RCN の機能を遺伝学的に調べるために、*RCN3 RNAi* イネを作製し、出穂日

および花序形態を調査した。RNAi により *RCN3* の発現が減少している系統を半定量的 RT-PCR で選抜し、T₁ もしくは T₂ 世代の植物を観察した。過剰発現イネの解析結果から、短日条件（花成誘導）条件下で生育した *RCN3* RNAi イネでは花成促進やえい花数の減少が期待されたが、出穂日、一次枝こう数、二次枝こう数、えい花数いずれも野生型と比較して有意差が見られなかった（表 4A、表 5、図 20）。さらに、長日（花成非誘導）条件下でも同様の解析を行ったが、短日条件の場合と同様に有意差は見られなかった（表 4B、図 21）。この結果と、すべての *RCN* が類似の発現・局在を示したこと（図 9-12、14-17）から、*RCN* が冗長的に機能している可能性が考えられた。そこで、*RCN1*、*RCN2*、*RCN3* の三重 RNAi イネ（*RCN123*RNAi イネ）を作出し、出穂日と花序形態の観察を行った。半定量的 RT-PCR を用いて、茎において *RCN1*、*RCN2*、*RCN3* の発現が減少している RNAi イネ 4 系統を選抜し（図 22）、それらの T₀ 世代のイネを用いて、短日（花成誘導）条件下における出穂日と花序形態の表現型を調べた。その結果、出穂日は野生型と比較して有意差はなかったが（表 4C）、一次枝こう数やえい花数が著しく減少していた（表 5、図 23D）。これらの解析から、4 つの *RCN* のうち、少なくとも *RCN1*、*RCN2*、*RCN3* の 3 つは冗長的に機能し、花メリステムの形成に関与していることが示唆された。

3-3. RCN と 14-3-3 の相互作用

イネにおける FRC の作用を検証するために、表現型解析と局在解析を行った結果、RCN の機能と茎頂分裂組織の核への蓄積には 14-3-3 との相互作用が重要であることが示唆された。

3-3-1. 変異型 *RCN3* 過剰発現イネの表現型解析

Hd3a と 14-3-3 との結合部位であるアミノ酸残基 (R64, F103, R132) は FT サブファミリーだけでなく RCN/TFL1 サブファミリーにも高度に保存されている (図 24)。そして、酵母 Two-hybrid 解析と BiFC 解析から、RCN においてそれらに対応するアミノ酸残基に置換変異 (R62K/R130K) を導入すると RCN と 14-3-3 の結合が失われることが示唆されている (田岡ら未発表)。そこで、14-3-3 との相互作用が RCN3 の機能に重要かどうかを検証するために、14-3-3 との結合能を喪失した RCN3 R62K/R130K を過剰発現させたイネ *pUbq-RCN3 R/R-GFP* 形質転換イネの T₁ もしくは T₂ 世代の植物体を用いて、短日 (花成誘導) 条件下における出穂日および主茎の花序形態の観察を行った。また、14-3-3 との結合能を喪失させる R62K/F101A/R130K の三重置換変異を導入した変異 *RCN3* 過剰発現イネ (*pUbq-RCN3 R/F/R-GFP* 形質転換イネ) も作出し、同様の解析を行った (表 2、表 3)。その結果、*pUbq-RCN3 R/R-GFP* 形質転換イネ および *pUbq-RCN3 R/F/R-GFP* 形質転換イネの出穂日は野生型と比較して有意差が見られなかった (表 2)。次に *pUbq-RCN3 R/R-GFP* 形質転換イネの主茎の花序形態を観察したところ、野生型と比較して、二次枝こう数は有意に増加していたが、一次枝こう数やえい花数には有意差がなかった (表 3、図 19E-F)。この結果から、RCN3 の花成抑制と花メリステムの分化抑制には 14-3-3 との相互作用が重要であることが示唆された。

3-3-2. 茎頂分裂組織における RCN::GFP タンパク質の細胞内局在

タバコを用いた一過的発現解析から、RCN のシロイヌナズナホモログである TFL1 タンパク質は、核と細胞質に局在し、転写因子 FD と相互作用することで核に蓄積することが示唆されている (Hanano et al., 2011)。また、イネプロトプラストを用いた RCN1 および RCN3 の局在解析においても、同様の結果が得

られている（寺川修士論文）。しかし、RCN が機能すると考えられる茎頂分裂組織における細胞内局在は明らかにされていない。そこで、高倍率の 64 倍水浸レンズを使用して、茎頂分裂組織における RCN-GFP の細胞内局在を観察した（図 25）。*pRCN-RCN-GFP* 植物体では、RCN-GFP 発現量が低いため蛍光輝度が不十分で、定量的な解析を行なうことができなかった（data not shown）。そこで、恒常的な発現を誘導するユビキチンプロモーターを用いた *RCN3* 過剰発現イネ（*pUbq-RCN3-GFP* 形質転換イネ）を用いて、茎頂分裂組織における RCN3-GFP タンパク質の詳細な細胞内局在観察を行ったところ、GFP シグナルは細胞質と核で検出されたが、特に核で強く検出された（図 26C）。核と細胞質における蛍光輝度を Image J を用いて定量したところ、核の平均蛍光輝度は細胞質の平均蛍光輝度の 2.6 倍程度強かった（図 26E）。

さらに、RCN3 タンパク質の細胞内局在に 14-3-3 との相互作用が関与しているのかを調べるために、14-3-3 との結合能を喪失した RCN3 R62K/R130K を過剰発現させたイネ（*pUbq-RCN3 R/R-GFP* 形質転換イネ）を用いて、茎頂分裂組織における RCN3 R62K/R130K-GFP の細胞内局在を調べた。その結果、GFP 蛍光は核と細胞質に局在したが、核での蛍光輝度は RCN3-GFP に比べて弱かった（図 26D）。先の場合と同様に核と細胞質での蛍光輝度比を定量したところ、核での平均蛍光輝度は細胞質のその 1.4 倍程度であり、RCN3-GFP に比べて有意に弱かった（図 26E）。以上から、RCN3 タンパク質は、茎頂分裂組織において核に蓄積し、その蓄積には 14-3-3 との相互作用が重要である可能性が示唆された。

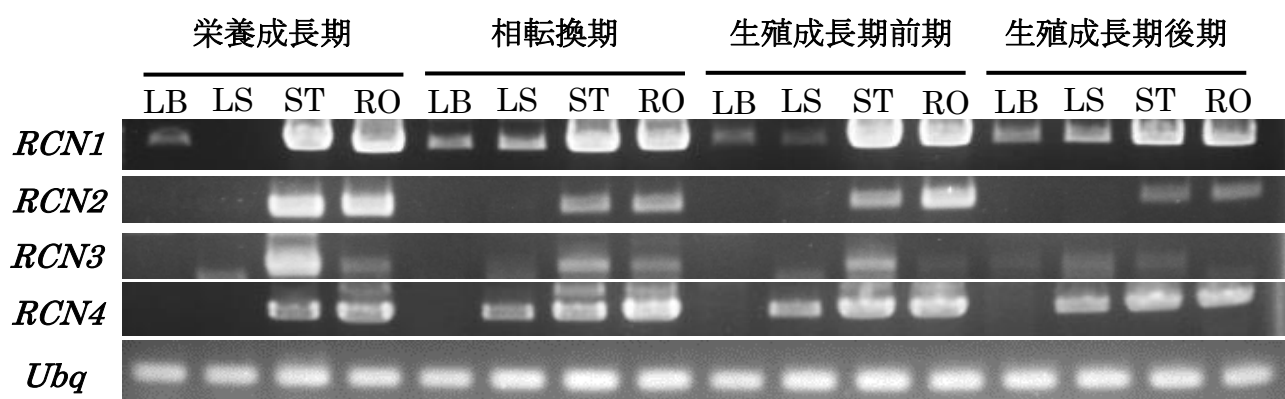


図6 短日条件（花成誘導条件）下で生育させたイネ植物体内における半定量的RT-PCRによる*RCN*の発現解析

短日条件下で生育した野生型イネを生育時期・組織ごとにサンプリングし、半定量的RT-PCRにより*RCN*の発現量を調べた。LBは葉身、LSは葉鞘、STは茎、ROは根を示す。検出に用いたRCR増幅サイクル：*RCN*: 40cycle、*Ubiquitin*: 35 cycle

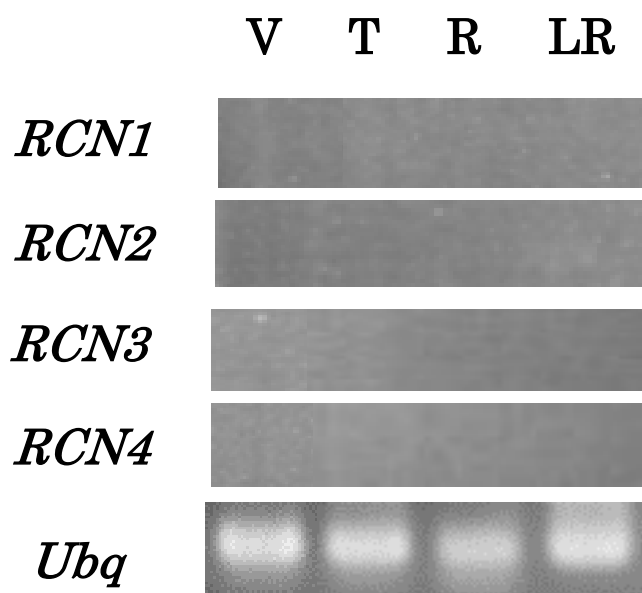


図7 短日条件（花成誘導条件）下で生育させたイネ植物体内における半定量的RT-PCRによる*RCN*の発現解析

短日条件下で生育した野生型イネの茎頂を生育時期ごとにサンプリングし、半定量的RT-PCRにより*RCN*の発現量を調べた。Vは栄養成長期、Tは相転換期、Rは生殖成長期前期、LRは生殖成長期後期を示す。検出に用いたRCR増幅サイクル: 40 cycle

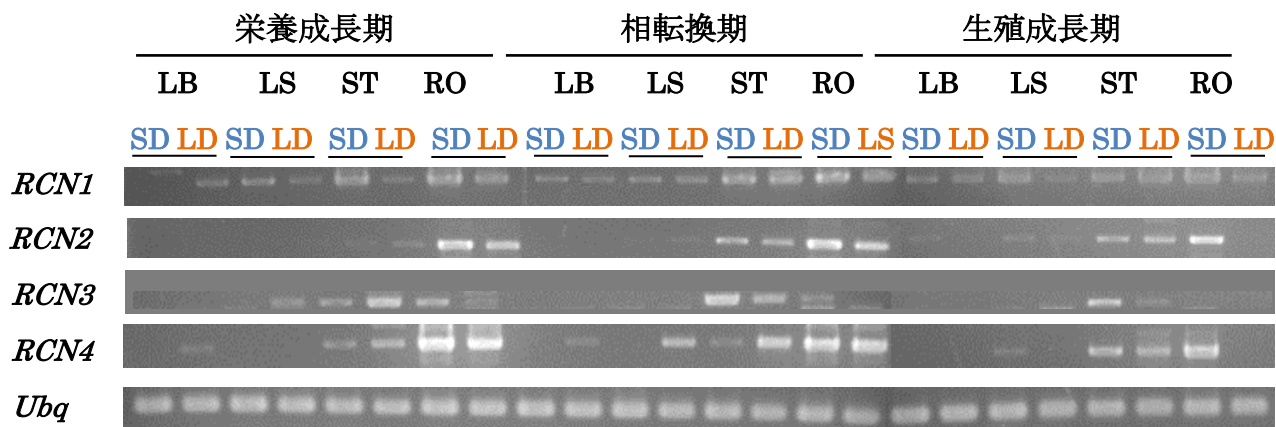


図8 長日条件（花成非誘導条件）下で生育させたイネにおける半定量的RT-PCRによる*RCN*の発現解析

長日条件下で生育した野生型イネを生育時期・組織ごとにサンプリングし、半定量的RT-PCRにより*RCN*の発現量を調べた。LBは葉身、LSは葉鞘、STは茎、ROは根を示す。SDは短日条件、LDは長日条件を示す。検出に用いたRCR増幅サイクル：35 cycle

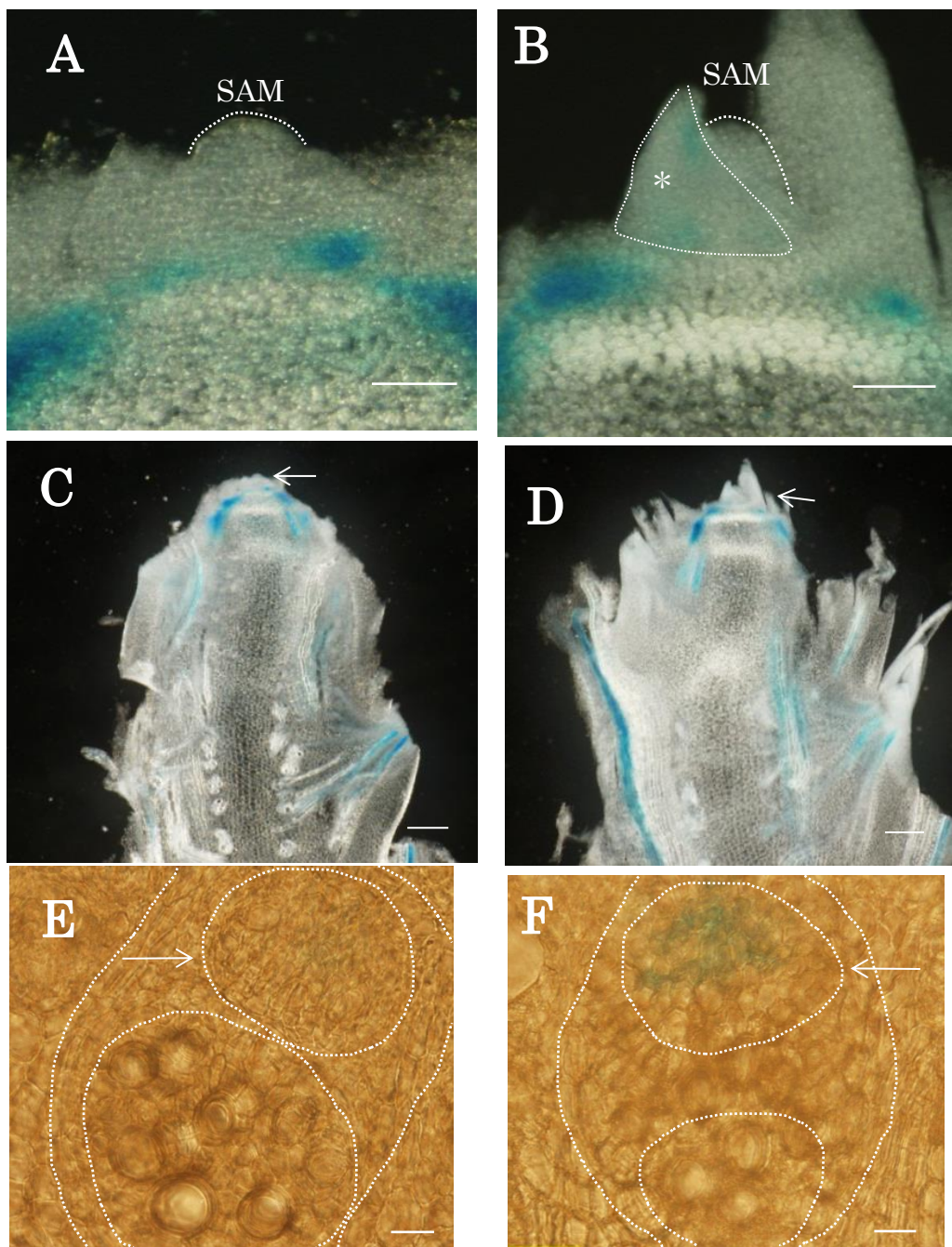


図9 栄養成長期および生殖成長期における*RCN1*プロモーターの活性

(A)-(D) *pRCN1-RCN1-GUS*植物体から茎頂を含む茎を切り出し、顕微鏡を用いて撮影した。栄養成長期は播種後25-26日、生殖成長期は播種後35-36日の植物体を用いた。(E)、(F)は*pRCN1-RCN1-GUS*植物体の茎の横断面の切片。(A)、(C)は栄養成長期、(B)、(D)は生殖成長期の植物体。(E)は茎上部、(F)は茎下部の維管束。(A)、(B)の点線とSAMは茎頂分裂組織を示す。(C)、(D)の矢印は茎頂を示し、(E)、(F)の矢印は維管束師部を示す。白線は50 μ m(A、B)、200 μ m(C、D)、20 μ m(E、F)を示す。*は茎頂分裂組織手前の葉原基に由来するシグナルを示す。

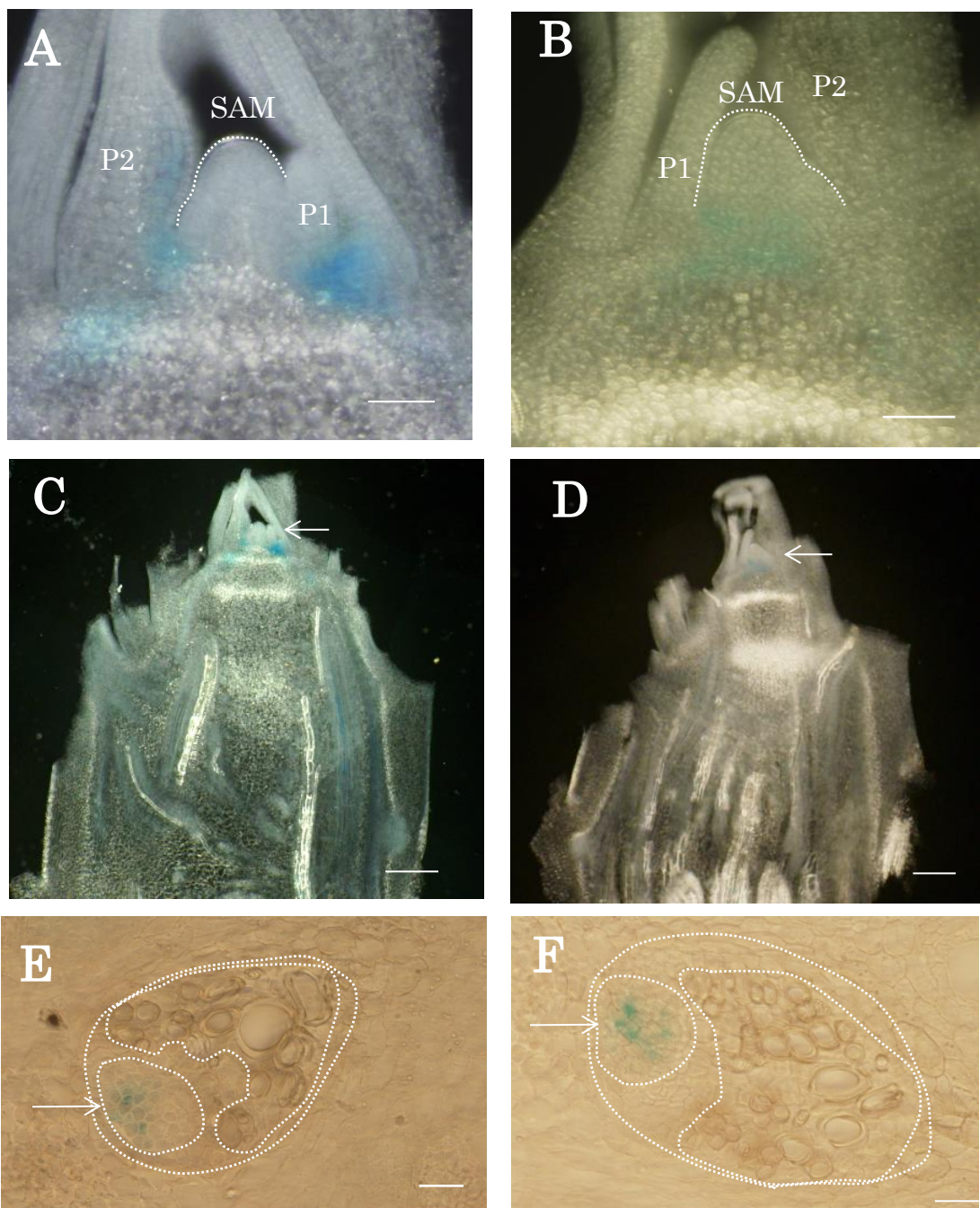


図10 栄養成長期および生殖成長期における*RCN2*プロモーターの活性

(A)-(D) *pRCN2-RCN2-GUS*植物体から茎頂を含む茎を切り出し、顕微鏡を用いて撮影した。栄養成長期は播種後25-26日、生殖成長期は播種後35-36日の植物体を用いた。(E)、(F)は*pRCN2-RCN2-GUS*植物体の茎の横断面の切片。(A)、(C)は栄養成長期、(B)、(D)は生殖成長期の植物体。(E)は茎上部、(F)は茎下部の維管束。(A)、(B)の点線とSAMは茎頂分裂組織を示す。(C)、(D)の矢印は茎頂を示し、(E)、(F)の矢印は維管束師部を示す。白線は50 μ m(A、B)、200 μ m(C、D)、20 μ m(E、F)を示す。P1は最も若い葉原基、P2は2番目に若い葉原基を示す。

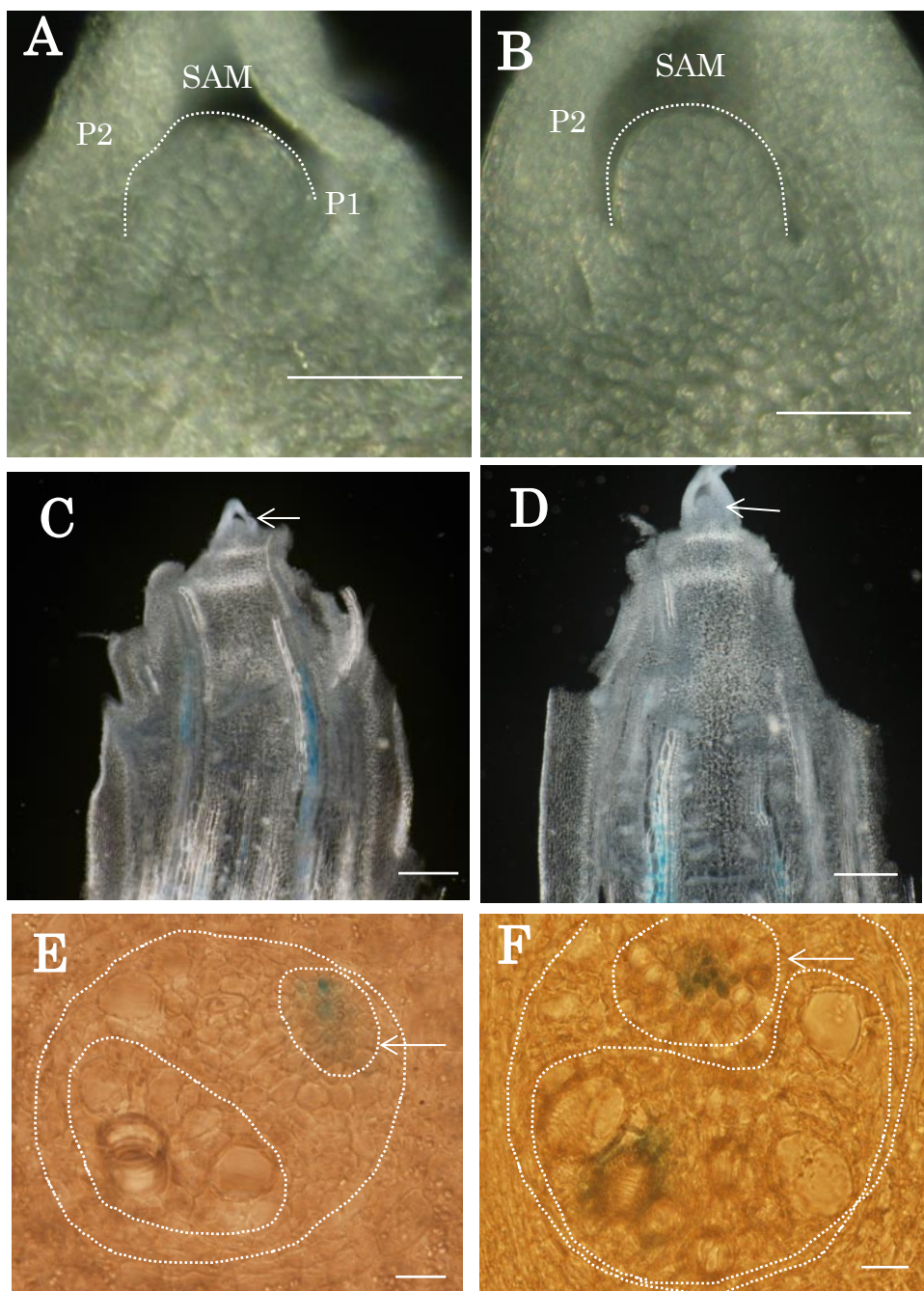


図11 栄養成長期および生殖成長期における*RCN3*プロモーターの活性

(A)-(D) *pRCN3-RCN3-GUS*植物体から茎頂を含む茎を切り出し、顕微鏡を用いて撮影した。栄養成長期は播種後25-26日、生殖成長期は播種後35-36日の植物体を用いた。(E)、(F)は *pRCN3-RCN3-GUS*植物体の茎の横断面の切片。(A)、(C)は栄養成長期、(B)、(D)は生殖成長期の植物体。(E)は茎上部、(F)は茎下部の維管束。(A)、(B)の点線とSAMは茎頂分裂組織を示す。(C)、(D)の矢印は茎頂を示し、(E)、(F)の矢印は維管束師部を示す。白線は50μm(A、B)、200μm(C、D)、20μm(E、F)を示す。P1は最も若い葉原基、P2は2番目に若い葉原基を示す。

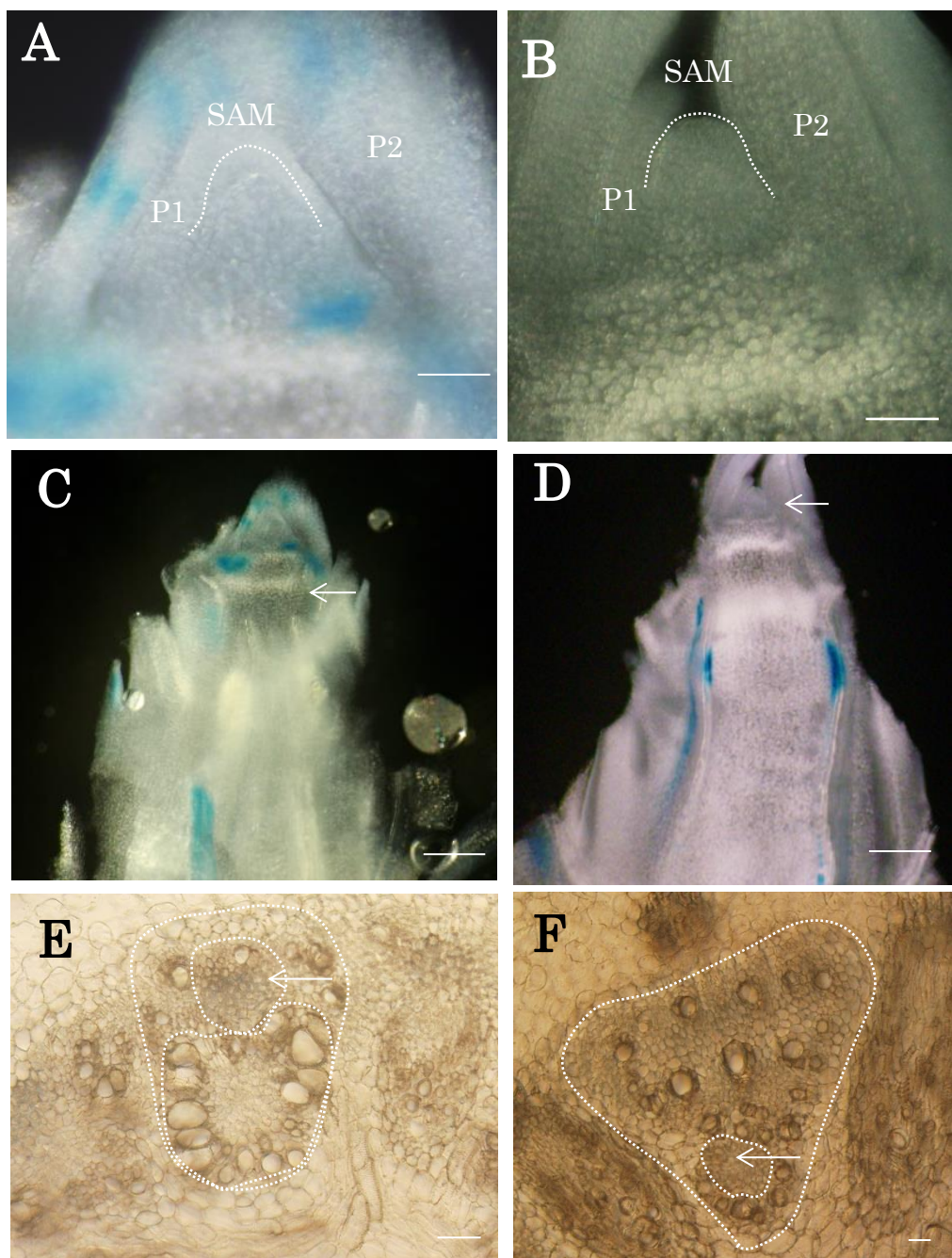


図12 栄養成長期および生殖成長期における*RCN4*プロモーターの活性

(A)-(D) *pRCN4-RCN4-GUS*植物体から茎頂を含む茎を切り出し、顕微鏡を用いて撮影した。栄養成長期は播種後25-26日、生殖成長期は播種後35-36日の植物体を用いた。(E)、(F)は*pRCN4-RCN4-GUS*植物体の茎の横断面の切片。(A)、(C)は栄養成長期、(B)、(D)は生殖成長期の植物体。(E)は茎上部、(F)は茎下部の維管束。(A)、(B)の点線とSAMは茎頂分裂組織を示す。(C)、(D)の矢印は茎頂を示し、(E)、(F)の矢印は維管束師部を示す。白線は50μm(A、B)、200μm(C、D)、20μm(E、F)を示す。P1は最も若い葉原基、P2は2番目に若い葉原基を示す。

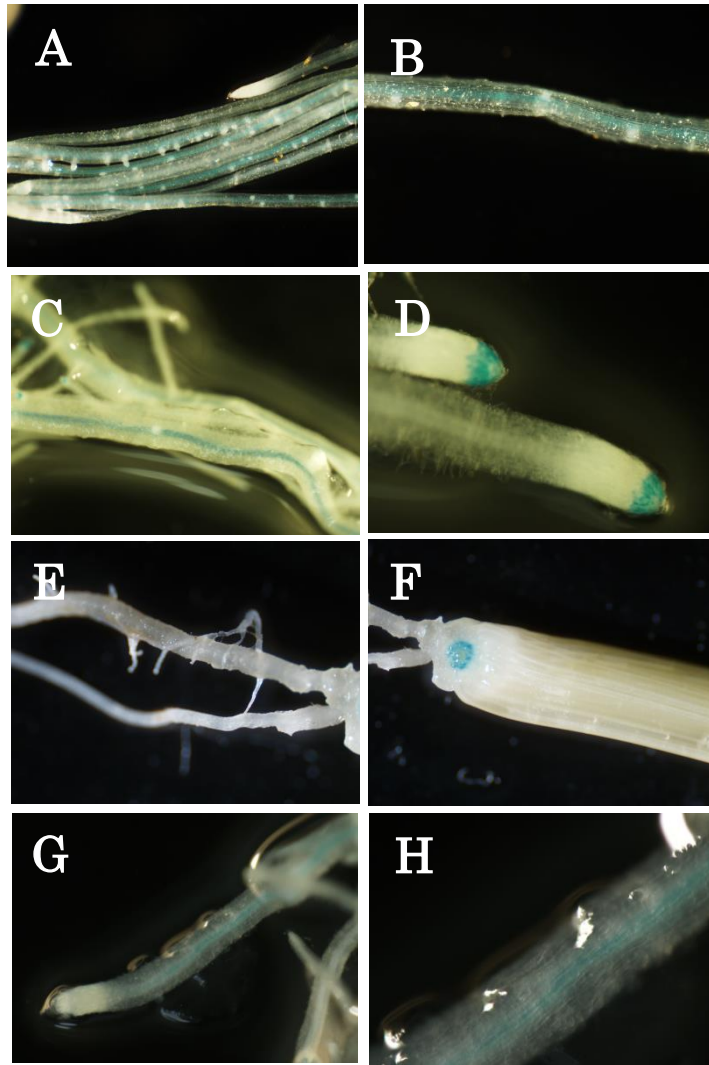


図13 根における*RCN*プロモーターの活性

(A)-(H) 播種後7日後の*pRCN-RCN-GUS*植物体の根のGUS染色像。(A)、(B) は*pRCN1-RCN1-GUS*植物体。(C)、(D)は *pRCN2-RCN2-GUS*植物体。(E)、(F) は*pRCN3-RCN3-GUS*植物体。(G)、(H)は*pRCN4-RCN4-GUS*植物体。

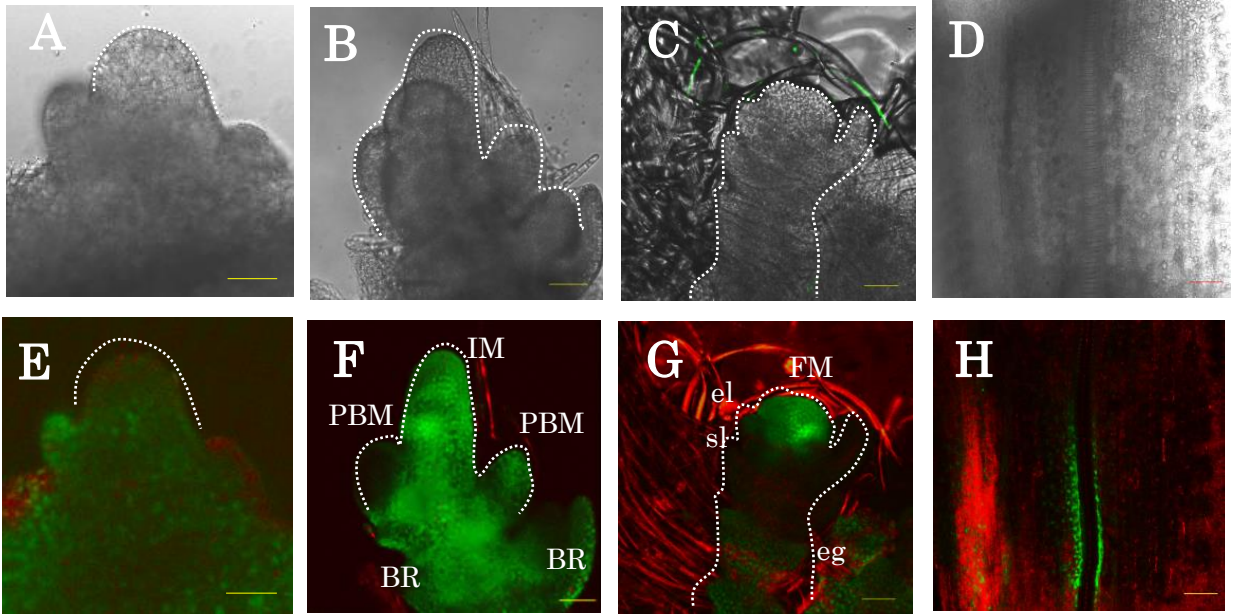


図14 茎と茎頂分裂組織におけるRCN1タンパク質の局在

(A)-(H) は *pRCN1-RCN1-GFP* 植物体の茎頂および茎のGFP蛍光像。(A)-(D)は明視野像。(E)-(H)は分光処理画像。(A)、(E)は栄養成長期の茎頂メリステム、(B)、(F)は生殖成長期の花序メリステム、(C)、(G)は生殖成長期の花メリステム、(D)、(H)は茎の維管束を示す。メリステムを点線で囲って表示した。黄線は50 μ m。IMは花序メリステム、PBMは一次枝こうメリステム、BRはブラクト、FMは花メリステム、leは外穎、slは護穎、egは副護穎を示す。

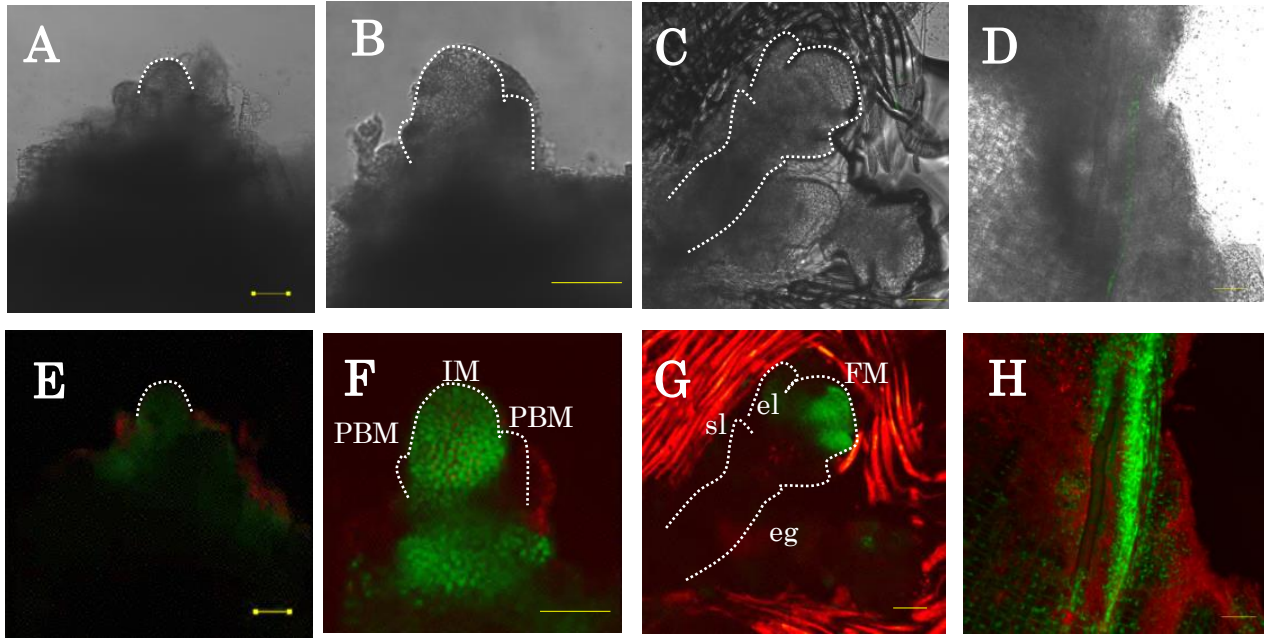


図15 茎と茎頂分裂組織におけるRCN2タンパク質の局在

(A)-(H) は *pRCN2-RCN2-GFP* 植物体の茎頂および茎のGFP蛍光像。(A)-(D) は明視野像。(E)-(H) は分光処理画像。(A)、(E)は栄養成長期の茎頂メリステム、(B)、(F)は生殖成長期の花序メリステム、(C)、(G)は生殖成長期の花メリステム、(D)、(H)は茎の維管束を示す。メリステムを点線で囲って表示した。黄線は50μm。IMは花序メリステム、PBMは一次枝こうメリステム、FMは花メリステム、leは外穎、slは護穎、egは副護穎を示す。

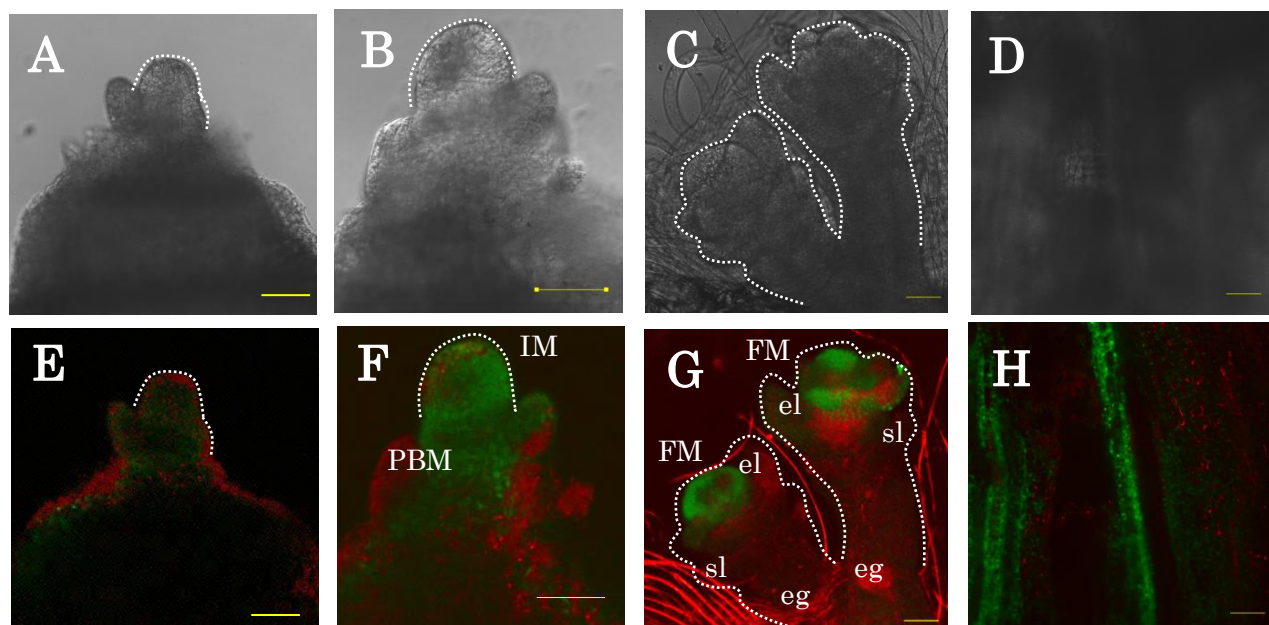


図16 茎と茎頂分裂組織におけるRCN3タンパク質の局在

(A)-(H) は *pRCN3-RCN3-GFP* 植物体の茎頂および茎のGFP蛍光像。(A)-(D) は明視野像。(E)-(H) は分光処理画像。(A)、(E) は栄養成長期の茎頂メリステム、(B)、(F) は生殖成長期の花序メリステム、(C)、(G) は生殖成長期の花メリステム、(D)、(H) は茎の維管束を示す。メリステムを点線で囲って表示した。黄線は50μm。IMは花序メリステム、PBMは一次枝こうメリステム、FMは花メリステム、elは外穎、slは護穎、egは副護穎を示す。

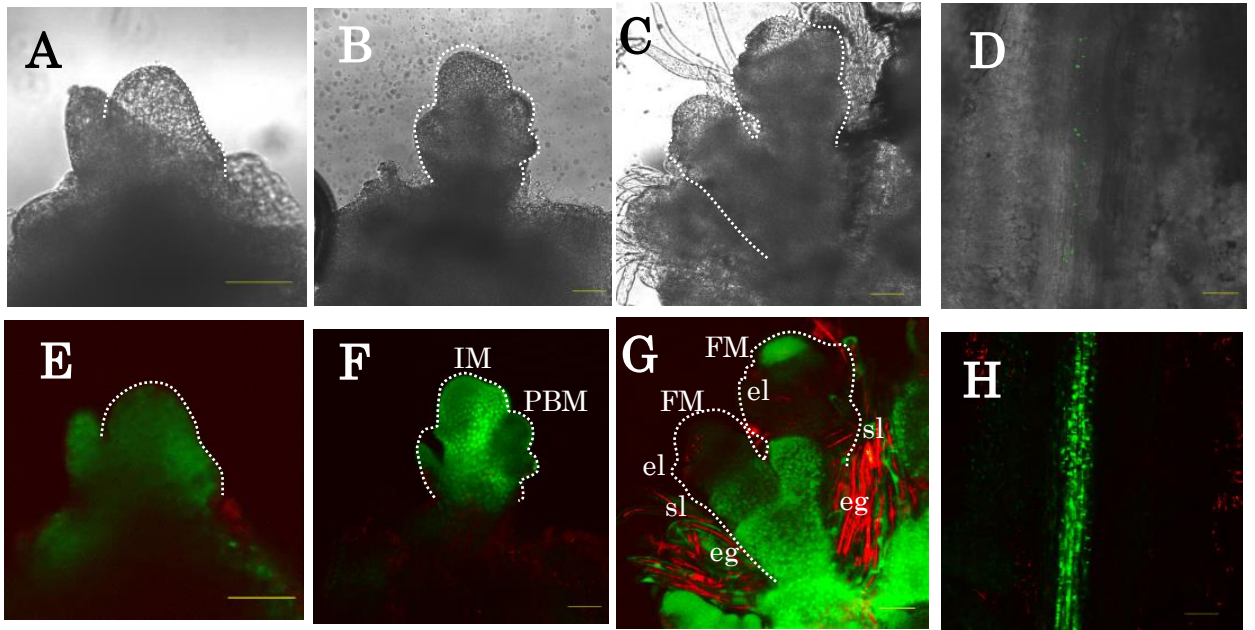


図17 茎と茎頂分裂組織におけるRCN4タンパク質の局在

(A)-(H) は *pRCN4-RCN4-GFP* 植物体の茎頂および茎のGFP蛍光像。(A)-(D)は明視野像。(E)-(H) は分光処理画像。(A)、(E) は栄養成長期の茎頂メリステム、(B)、(F) は生殖成長期の花序メリステム、(C)、(G) は生殖成長期の花メリステム、(D)、(H) は茎の維管束を示す。メリステムを点線で囲って表示した。黄線は50μm。IMは花序メリステム、PBMは一次枝こうメリステム、FMは花メリステム、leは外穎、slは護穎、egは副護穎を示す。

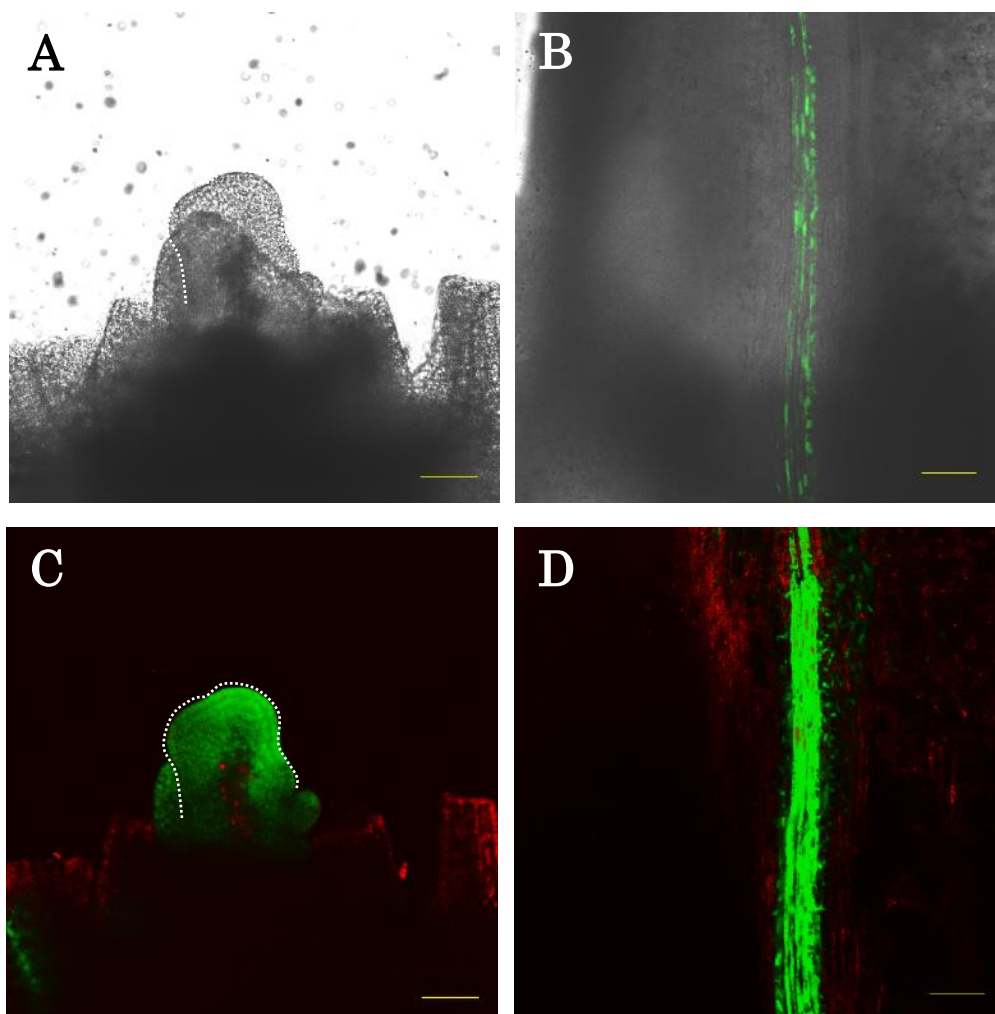


図18 維管束特異的プロモーター制御下で発現させたRCN3タンパク質の局在

(A)-(D)は *prolC-RCN3-GFP*植物体の茎頂および茎のGFP蛍光像。(A)、(B)は明視野を示す。(C)、(D)は分光処理画像を示す。メリステムを点線で囲って表示した。黄線は50μm。

表2 *RCN3*過剰発現体の出穂時期

遺伝子型	世代	出穂日	n
N8 (野生型)	-	60.4 ± 1.1	7
<i>pUbq-RCN3-GFP</i>	T ₁	94.8 ± 4.8*	15
<i>pUbq-RCN3-GFP</i> <i>R62K/F101A/R130K</i>	T ₁	59.7 ± 4.3	26
<i>pUbq-RCN3-GFP</i> <i>R62K/R130K</i>	T ₁	57.1 ± 3.4	27

*野生型と比較してp<0.05で有意差あり

表3 *RCN3*過剰発現体の花序の表現型

遺伝子型	世代	一次枝こう数	二次枝こう数	えい花数	n
N8 (野生型)	-	5.6±0.89	3.2±2.17	32.6±7.16	5
<i>pUbq-RCN3-GFP</i>	T ₂	6.47±1.07	7.94±4.71*	52.1±18.9*	17
<i>pUbq-RCN3-GFP</i> <i>R62K/R130K</i>	T ₁	6±1.22	6.28±3.02*	43.24±14.75	27

*野生型と比較してp<0.05で有意差あり

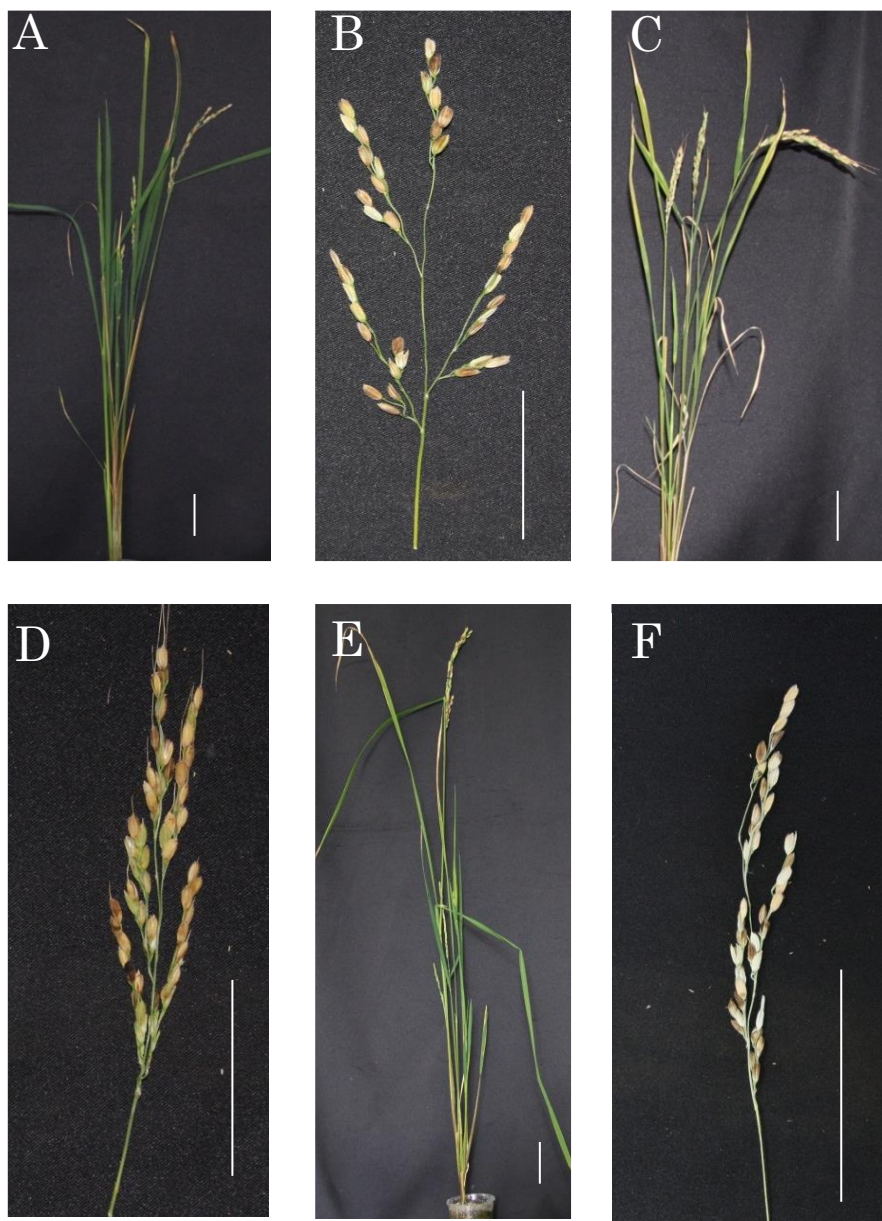


図19 *RCN3*過剰発現イネの表現型

(A)、(B) は野生型イネ (C)、(D)は *pUbq-RCN3-GFP*形質転換イネ。(E)、(F) は*pUbq-RCN3-GFP R62K/R130K*形質転換イネ。(A)、(C)、(E)は全体像、(B)、(D)、(F)は穂の表現型を示す。白線は5cm。

表4 RCN RNAi植物体の出穂時期

A *RCN3 RNAi*植物体の出穂時期

遺伝子型	世代	出穂日	n
N8 (野生型)	-	62.5±0.22	6
<i>RCN3 RNAi</i>	T ₁	66.5±0.81	22

B 花成非誘導条件下（長日）における*RCN3 RNAi*体の出穂時期

遺伝子型	世代	出穂日	n
N8 (野生型)	-	122.14 ± 3.63	7
<i>RCN3 RNAi</i>	T ₁	129 ± 2.75	14

C *RCN123 RNAi*植物体の出穂時期

遺伝子型	世代	出穂日	n
N8 (野生型)	カルスからの 再分化当代	50.75±5.61	4
<i>RCN123 RNAi</i>	T ₀	47±1.15	4

表5 *RCN3*および*RCN123 RNAi*植物体の花序の表現型

遺伝子型	世代	一次枝こう数	二次枝こう数	えい花数	n
N8 (野生型)	カルスからの 再分化当代	5 ± 1.15	3.75 ± 3.3	31 ± 13.44	4
<i>RCN3 RNAi</i>	T ₂	4.11 ± 0.6	1.78 ± 1.78	21.11 ± 5.6	9
<i>RCN123 RNAi</i>	T ₀	3 ± 0*	0.5 ± 0.577	13.75 ± 2.36*	4

*野生型と比較してp<0.05で有意差あり

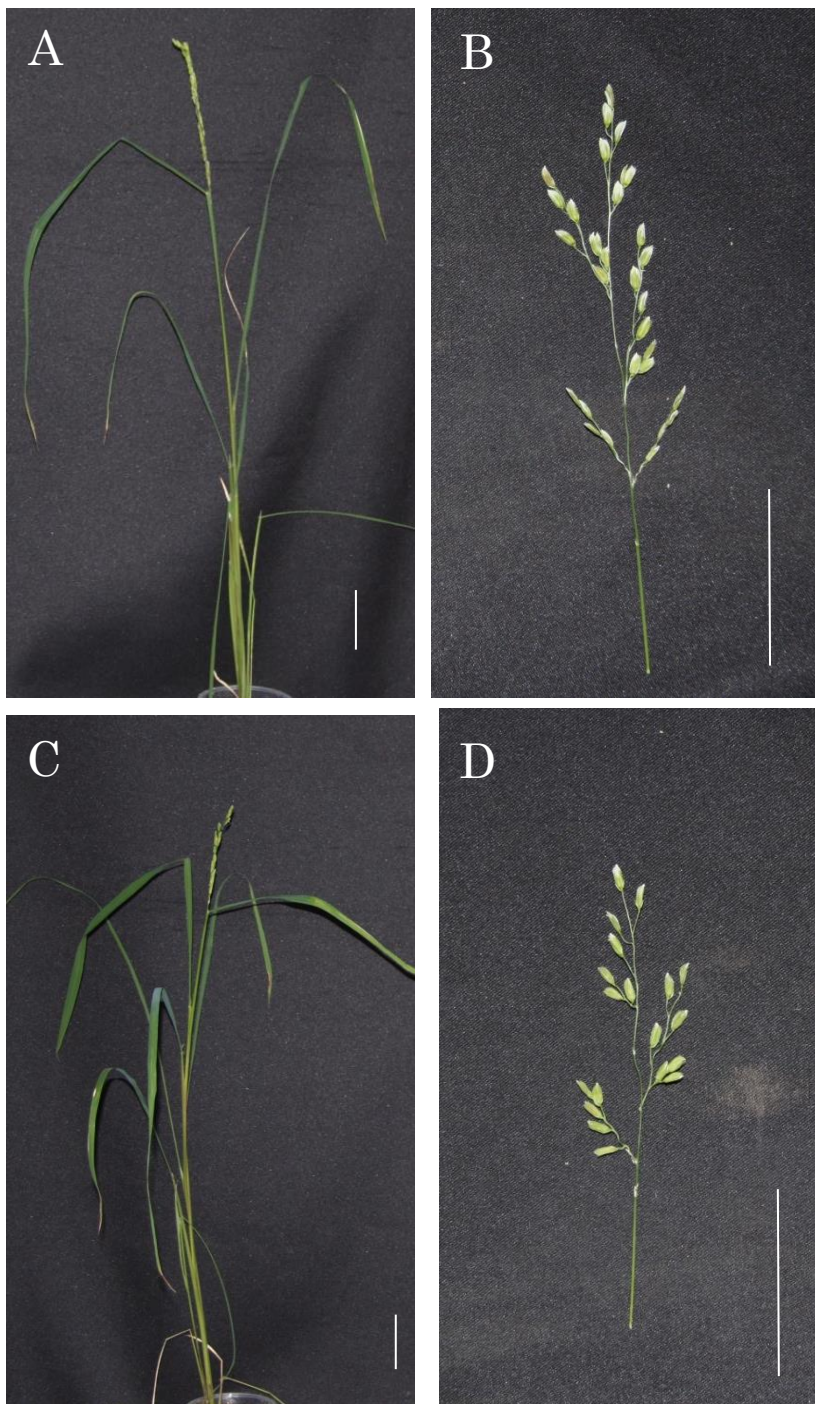


図20 *RCN3* RNAi植物体の表現型

(A)、(B) は野生型イネ。(C)、(D) は *RCN3* RNAi イネ。
(A)、(C) は全体、(B)、(D) は穂の表現型を示す。白線
は5cm。



図21 非花成誘導条件下（長日）で生育させた時の
RCN3 RNAi植物体の表現型

(A)、(B)は野生型イネ。(C)、(D)は*RCN3* RNAi植物。
(A)、(C) は全体、(B)、(D) は穂の表現型を示す。

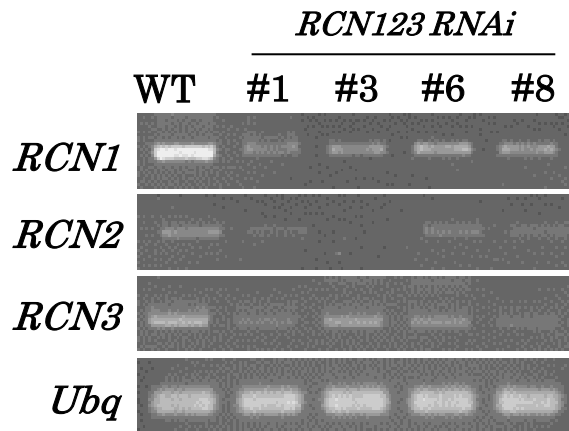


図22 *RCN123 RNAi*植物体における*RCN*の発現解析

野生型と*RCN123 RNAi*植物体の茎における*RCN1*、*RCN2*、および*RCN3*の発現量を半定量的RT-PCRにより調べた。検出に用いたPCR増幅サイクル：*RCN1*、*RCN3*：33cycle、*RCN2*、*Ubiquitin*：35cycle

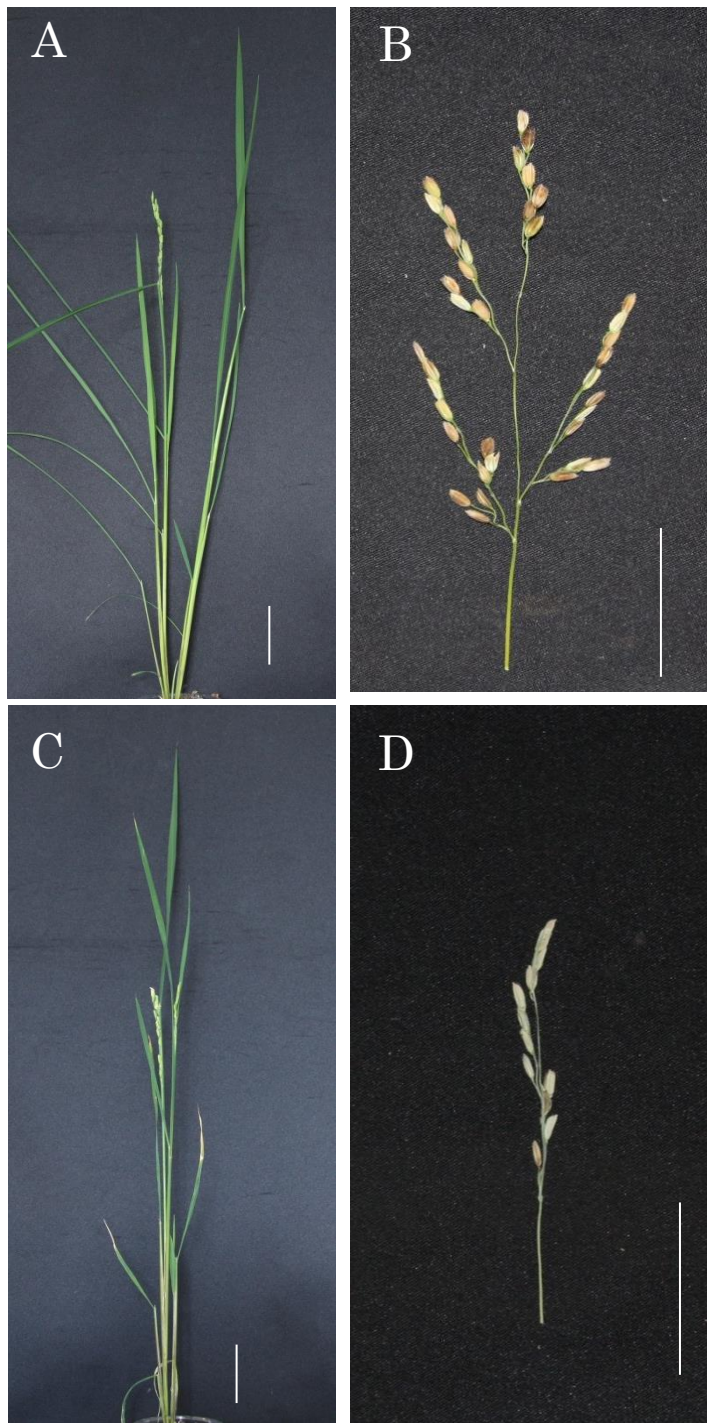


図23 *RCN1*、*RCN2*、*RCN3*の三重RNAi植物体の表現型

(A)、(B)は野生型イネ。(C)、(D)は *RCN1*、*RCN2*、*RCN3* の三重RNAi植物体。(A)、(C)は全体、(B)、(D)は穂の表現型を示す。白線は5cm。

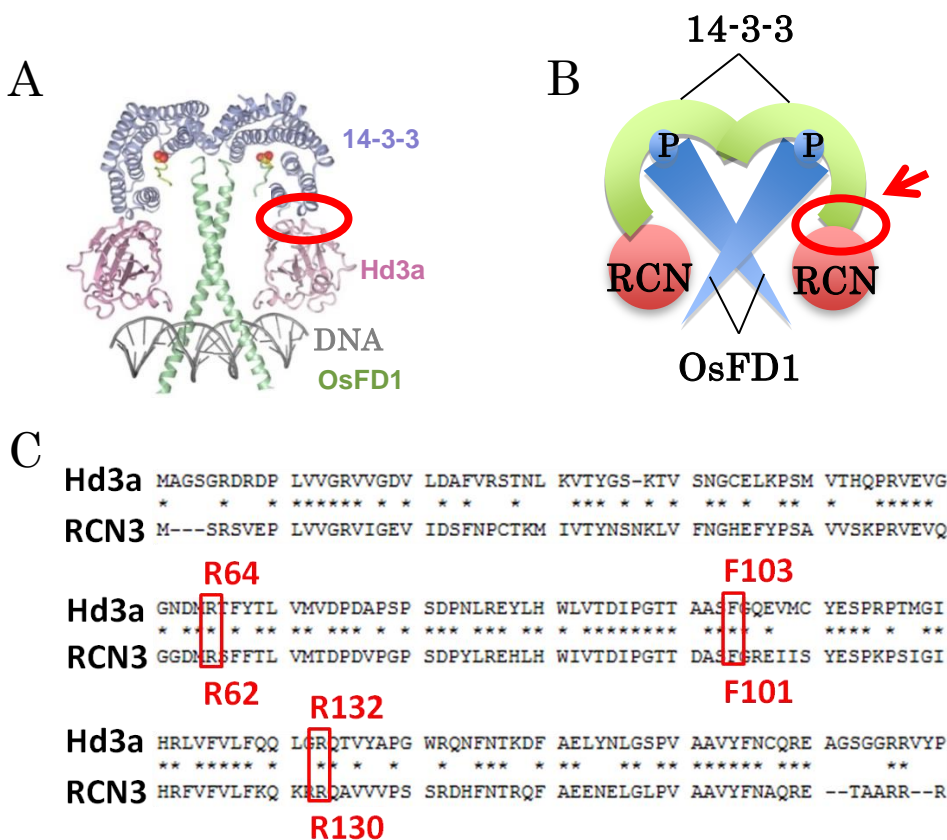


図24 Hd3a/RCNと14-3-3の相互作用部位

(A) 花成促進複合体 (FAC) の構造モデル。赤丸はHd3aと14-3-3の結合部位を示す。(B) 予想される開花抑制複合体 (Flowering Repression Complex, FRC) の模式図。赤い矢印はRCNと14-3-3の結合部位を示す。(C) RCN3とHd3aのアミノ酸配列アライメント。Hd3aと14-3-3との相互作用に重要なアミノ酸部位を赤で示す。対応するRCN3の部位 (赤字の部分) に変異を導入した変異型RCN3過剰発現体を作出した。

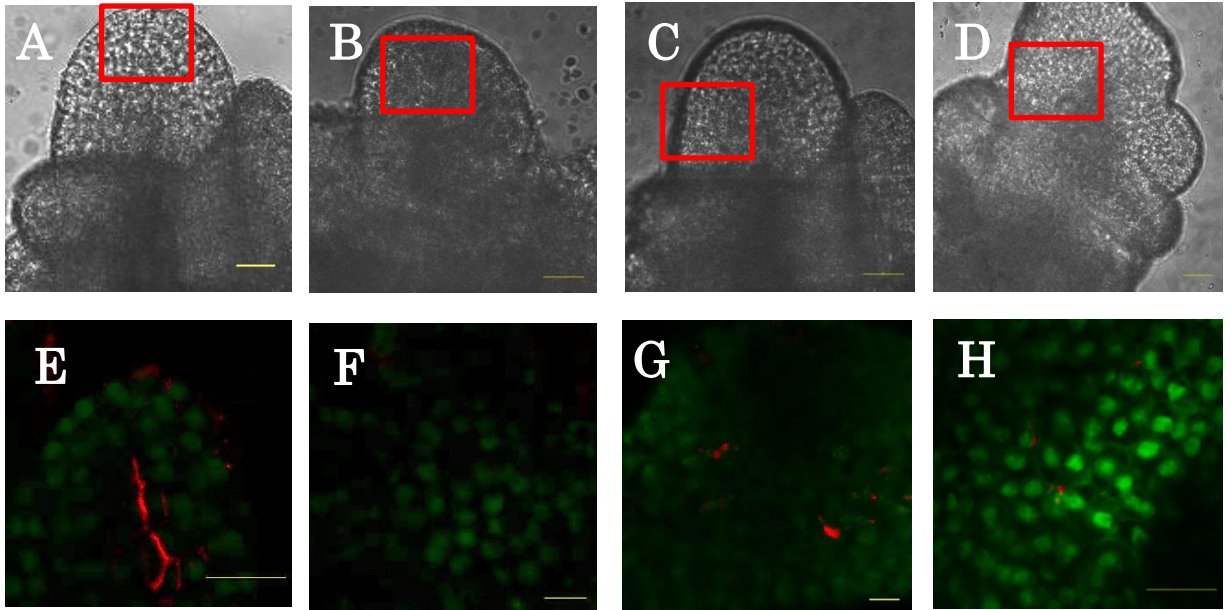
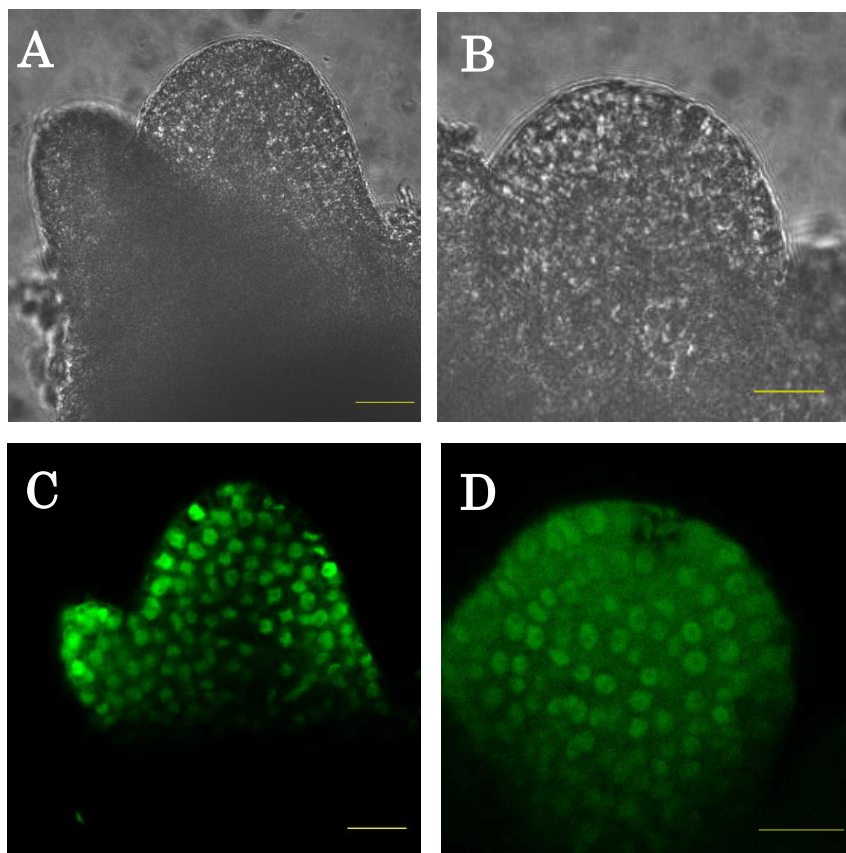


図25 茎頂細胞におけるRCNタンパク質の細胞内局在

(A)-(H) は *pRCN-RCN-GFP* 植物体の茎頂のGFP蛍光像。(A)、(E) は *pRCN1-RCN1-GFP* 植物体。(B)、(F) は *pRCN2-RCN2-GFP* 植物体。(C)、(G) は *pRCN3-RCN3-GFP* 植物体。(D)、(H) は *pRCN4-RCN4-GFP* 植物体。(A)-(D) は明視野像。(E)-(H) は分光処理画像。黄線は20 μ m。赤枠は(E)-(H)の分光処理画像に拡大して示した箇所。



E

	RCN3-GFP	RCN3 R/R-GFP
RCN3-GFPの相対輝度 (核/細胞質)	2.61 ± 0.58	$1.47 \pm 0.16^*$

* $P < 0.01$ で有意差あり

図26 過剰発現体の茎頂分裂組織におけるRCN3タンパク質の細胞内局在

(A)-(D) *RCN3*過剰発現体および変異型*RCN3*過剰発現体の茎頂のGFP蛍光像。(A)、(C) は*pUbq-RCN3-GFP*植物体、(B)、(D) は*pUbq-RCN3 R/R-GFP*植物体。(A)、(B) は明視野像を示す。(C)、(D) は分光処理画像を示す。黄線は20μm。(E) 茎頂分裂組織におけるRCN3タンパク質の核/細胞質の相対輝度

4. 考察

本研究では、RCN の詳細な遺伝子発現・タンパク質局在と形質転換イネを用いた表現型解析から、花成と花序発達における RCN の分子機能の解明を目的とした。RCN タンパク質は栄養成長期から生殖成長期において茎から茎頂分裂組織へ長距離移動した後、茎頂分裂組織で 14-3-3 と相互作用して花序形成を抑制していることが示唆された。

4-1. RCN は移動性のメリステム成長相転換抑制因子である

移動性の花成促進シグナルであるフロリゲンに対比する存在として、移動性の花成抑制シグナルの存在は提唱されてきた (Thomas B, Vince-Prue D., 1997)。そして、最近になってシロイヌナズナの ATC やキクの AFT が移動性の花成抑制因子として機能することが報告された (Huang et al., 2012、Higuchi et al., 2013)。本研究では新たにイネの TFL1 ホモログである RCN が移動性のメリステム成長相転換の抑制因子である可能性を示した。

4-1-1. RCN タンパク質の茎頂分裂組織への長距離移動

本研究の結果から、RCN が茎の維管束師部から茎頂分裂組織へ移動して機能する可能性が示された。半定量的 RT-PCR とプロモーターGUS 解析による *RCN* の発現部位の解析から、*RCN* ファミリーに属するすべての遺伝子のプロモーター活性は、茎の維管束師部で観察され、RNA の蓄積も茎で検出されたが、茎頂分裂組織ではいずれも全く観察されなかった (図 6-7、図 9-12)。一方で、RCN タンパク質の局在を *pRCN:RCN-GFP* 融合遺伝子を発現させるイネで解析したところ、すべての RCN タンパク質が栄養成長期および生殖成長期におい

て、発現部位である茎の維管束と茎頂分裂組織にも局在していることが明らかとなった（図 14-17）。このことは、RCN タンパク質が茎の維管束で合成された後に茎頂分裂組織まで移動することを強く示唆している。TFL1 ファミリーに属するタンパク質がメリステムの外側から内側へ移動することをイメージングで捉えたのは本研究が初めてである。*TFL1* ファミリー遺伝子が茎の維管束師部で発現するが、茎頂分裂組織では発現せず、タンパク質が茎頂分裂組織へ輸送されることはイネにおいて特徴的であると考えられる。シロイヌナズナやトウモロコシの *TFL1* ファミリー mRNA はイネ *RCN* と異なり、生殖成長期における茎頂分裂組織と維管束の両方に発現する（Bradley et al., 1997、Mimida et al., 2001、Yoo et al., 2010、Danilevskaya et al., 2010）。

RCN mRNA と RCN タンパク質の局在が異なることから、茎頂分裂組織で観察された RCN-GFP は茎の維管束から長距離移動して蓄積したものであると考えられてきたが、これをサポートする結果が既報および本研究から得られている。イネの師管液のプロテオーム解析から RCN3 に由来するペプチドが検出されていることから、RCN3 タンパク質は師管を通して長距離移動する可能性が示されている（Aki et al., 2008）。さらに本研究により、維管束特異的な *rolC* プロモーターで発現させた RCN3-GFP タンパク質が茎と茎頂分裂組織で観察されたことから（図 18C-D）、RCN3 タンパク質が茎から茎頂分裂組織への長距離移動能を持つことが強く示唆された。また、RCN1、RCN2、RCN4 においても、発現解析と局在解析の結果が RCN3 と本質的に類似していることから（図 9-12、図 14-17）、RCN ファミリーは茎の維管束師部から茎頂分裂組織への長距離移動能を持つと考えられる（図 27）。

RCN タンパク質の移動パターンは現在までに報告されている TFL1 ファミリータンパク質の移動パターンとは異なっていた。RCN は茎頂分裂組織外から茎

頂分裂組織内へ移動するが、シロイヌナズナ *TFL1* やキンギョソウ *CEN* は、花芽分裂組織決定遺伝子である *API* や *LFY* によるフィードバック制御を受けて茎頂分裂組織内で発現し、その内部をタンパク質が近距離移動して茎頂分裂組織の分化バランスの制御に働いている (Bradley et al., 1996、Conti et al., 2007、Jaeger et al., 2013)。RCN が茎から茎頂分裂組織へ移動して機能している生理的な意義は不明だが、維管束で植物の内的もしくは外的シグナルに応じ、生育に応じた発現制御を受けることで、茎頂分裂組織の分化バランスを制御しているのかもしれない。

4-1-2. *RCN*によるメリステムの成長相転換抑制

本項では、*RCN*によるメリステムの成長相転換抑制について、(1) 栄養成長期から生殖成長期への移行の抑制、及び (2) 花序メリステムから花メリステムへの転換抑制の 2 点に焦点を当てて考察する。

(1) 栄養成長期から生殖成長期への花成抑制

本研究における *RCN* 過剰発現イネや *RNAi* イネを用いた表現型解析から、*RCN* は過剰発現によって花成を抑制できることが分かったが、内在 *RCN* の機能は結論できなかった。これまで多数の植物で *TFL1* 遺伝子が花成を抑制することが報告されており、イネにおいても *RCN* が花成前の栄養成長期の茎頂分裂組織に蓄積していたことから (図 14E、15E、16E、17E)、*RCN* も花成を抑制する可能性が考えられた。実際、*RCN3* 過剰発現イネは約 30 日の出穂遅延を示した。この結果は、先行研究による *RCN1*、*RCN2*、*RCN3* それぞれの過剰発現がイネあるいはシロイヌナズナの花成遅延をひき起こすという報告と一致している (Nakagawa et al., 2002、Zhang et al., 2005)。しかしながら、*RCN1*、

RCN2、*RCN3* 三重 RNAi イネ (*RCN123 RNAi* イネ) の花成時期には野生型と比べて有意な違いが見られなかった。そのため、本研究において *RCN* の栄養成長期における機能を断定することはできなかった。しかしながら、*RCN3* と 14-3-3 との相互作用能を欠損させた変異型 *RCN3* 過剰発現イネの解析から、*RCN* が栄養成長期の茎頂分裂組織で FRC (Flowering Repression Complex) を形成し、花成を抑制することが示唆された。このことから、*RCN* は FRC を形成することで、茎頂分裂組織へ移動してきた *Hd3a* が、14-3-3 と相互作用するのを拮抗的に阻害し、FAC (Florigen Activation Complex) を形成しにくくさせることでフロリゲン活性をコントロールしている可能性が考えられる (図 28)。また、*RCN* の三重 RNAi イネでは、残った *RCN4* が茎頂分裂組織で冗長的に機能している可能性も考えられる。実際、*RCN4* も他の *RCN* 同様、栄養成長期の茎頂分裂組織に蓄積していた。今後、*RCN4* RNAi も加えた全 *RCN* の発現抑制イネによる解析が重要である。

イネにおいて花成のタイミングの決定は、フロリゲンの発現に依存している可能性も考えられる。イネではフロリゲン遺伝子の機能欠損は明瞭な花成遅延を引き起こす。イネの *FT* サブファミリーには *Hd3a* のほかに、その近縁に位置する *RFT1*、*OsFTL1* が存在し、これら 3 つの遺伝子は花成促進に機能することが示唆されている (Izawa et al., 2002、Komiyama et al., 2008)。このうち、*Hd3a* は花成誘導条件である短日条件で花成を誘導し (Tamaki et al., 2007)、*RFT1* は主に花成非誘導条件である長日条件下において開花を引き起こすフロリゲンとして機能している (Komiyama et al., 2008)。*Hd3a* 単独の RNAi でも花成の遅延を示すが、*Hd3a* および *RFT1* の二重 RNAi になると花成が起こらない (Komiyama et al., 2008)。以上からイネの花成時期は、主として *Hd3a* や *RFT1* の発現によって決定されていると考えられる。茎頂分裂組織に蓄積した *RCN* が

Hd3a 及び RFT1 にどのような影響を与えるかは興味深い問題であり、全ての *RCN* の発現抑制イネによる解析で明らかとされるだろう。

(2) 花序メリステムから花メリステムへの転換制御

本研究の結果と既報の結果を合わせて考えると、*RCN* はイネの花序メリステムから花メリステムへの転換に抑制的に働く因子であることが強く示唆された。本研究において、*RCN3* 過剰発現イネは枝こう数とえい花数の増加を示した一方で（表 2、表 3、図 19D）、*RCN123* RNAi イネは枝こう数とえい花数の著しい減少を示した（表 4C、図 23D）。先行研究によって示された *RCN1*、*RCN2*、*RCN3* それぞれの過剰発現イネにおいても、二次枝こう数が増加し（Nakagawa et al., 2002、Zhang et al., 2005）、*RCN* の四重 RNAi イネでは、えい花数が減少するという結果が報告されており（Liu et al., 2013）、本研究の結果と一致している。植物の花序形成は花序メリステムが分枝のメリステムを作る位置や期間によって制御されており、花序メリステムの活性の維持や消失が、植物の花序形態を決定している（Teo et al., 2013）。イネの花序メリステムは分枝メリステムを分化する。その分枝メリステムは複数の高次の分枝メリステムもしくは花メリステムを分化させた後、自身も花メリステムへ転換する。この転換が遅ければ遅いほど多くの花メリステムが形成される（Komatsu et al., 2003）。本研究では、*RCN* タンパク質が花序メリステム及び花メリステムに局在すること示しており、*RCN* が維管束から花序メリステムまで移動して花序の形態形成に機能していることを示唆することができた（図 29）。

RCN ファミリーによる花序メリステムから花メリステムへの転換抑制は冗長的であると考えられる。*RCN3* 単独の RNAi イネは野生型と比較して表現型に変化が見られなかったが、*RCN123* RNAi イネでは、えい花数の減少など花序

の表現型に顕著な違いが見られた。さらに、Liu らは、4 つの *RCN* すべての発現が著しく抑制された RNAi イネを 19 株作製し、それらのいずれにおいても、えい花数が減少したと報告している (Liu et al., 2013)。しかし、えい花数や花成時期の数値データは記述されていないため、本研究の *RCN123* RNAi イネと比較することができなかった。また、Liu et al., 2013 において使用されたものと同じトリガー領域を持つ RNAi トリガーコンストラクトを作製して RNAi イネの作製を試みたが、4 つの *RCN* すべての発現が抑制された RNAi イネは作製できなかった (data not shown)。したがって、冗長性の程度は結論できないが、少なくとも 3 つの *RCN* が冗長的に花序メリステムの分化を抑制しているといえる。

4-2. RCN と Hd3a の拮抗による成長ステージの制御

RCN は FAC (Florigen Activation Complex) の構成要素である 14-3-3 との相互作用部位を保存していることから (Taoka et al., 2011)、RCN は FAC 様複合体である FRC (Floral Repressor Complex) を形成することでメリステムの生長ステージ転換の抑制をしていることが考えられた。Hd3a は茎頂分裂組織の核内で 14-3-3、OsFD1 と花成促進複合体 FAC を形成し、花芽形成遺伝子を活性化することで花成を促進していることが強く示唆されている (Taoka et al., 2011)。さらに、シロイヌナズナ FT/TFL1 やトマト SFT/SP も 14-3-3 や FD ホモログと相互作用できることが示されている (Pnueli et al., 2001、Lifschitz et al., 2006、Hanano et al., 2011)。同様に、RCN も 14-3-3 が相互作用して、OsFD1 と開花抑制複合体 FRC を形成する可能性が示唆されている (田岡ら、未発表)。しかしながら、RCN の植物体内での機能に 14-3-3 が関与しているのかは不明で

あった。

本研究において *RCN3* 過剰発現イネを用いた茎頂分裂組織の RCN3-GFP タンパク質局在解析から、RCN が 14-3-3 との相互作用依存的に核に蓄積することが示唆された。このことは RCN が茎頂分裂組織の核内で FRC を作ることを支持する。RCN3-GFP タンパク質は明瞭な核局在を示すが（図 26C）、14-3-3 と結合できない RCN3-GFP タンパク質は核への集積が弱まり、細胞質にも局在していた（図 26D）。この結果から、RCN3 タンパク質は 14-3-3 と相互作用することで核に蓄積すると考えられる。この核局在のメカニズムは、プロトプラストを用いた実験から明らかにされつつある。イネプロトプラストによる BiFC アッセイでは、RCN3 は細胞質で 14-3-3 と相互作用し、その複合体がさらに核で OsFD1 と相互作用することで FRC を形成する可能性が示唆されている（田岡ら、未発表）。イネの茎頂分裂組織において OsFD1 は恒常的に発現していることもあわせて考えると（Tsuji et al., 2013）、RCN3 はイネの茎頂分裂組織において 14-3-3 との結合によって OsFD1 と相互作用し、FRC を形成しうることが示唆された。

さらに本研究では RCN の機能に 14-3-3 との相互作用が重要であることを示した。*RCN3* 過剰発現イネは花成遅延とえい花数の増加を示すが、14-3-3 の相互作用を欠損させた変異 *RCN3* 過剰発現イネでは、その表現型は失われた（表 2、表 3、図 19E-F）。14-3-3 の相互作用を欠損させた変異 *Hd3a* 過剰発現イネも、*Hd3a* 過剰発現イネが示す花成促進効果が失われる（Taoka et al., 2011）。これらの結果は、*Hd3a* や RCN の機能には 14-3-3 との相互作用が必須であることを示唆している。しかしながら、解析に用いた変異 *RCN3* 過剰発現イネでは、二次枝こう数は *RCN3* 過剰発現イネと同様に増加していた。このことは、用いた変異が不十分であった可能性を示している。すなわち、結晶構造解析から、

Hd3a と 14-3-3 は、両者の相互作用に必須のアミノ酸残基を含む比較的広い相互作用面によって相互作用していることが明らかにされている (Taoka et al., 2011)。RCN と 14-3-3 も同様の相互作用が想定されるため、RCN と 14-3-3 との相互作用を細胞内で完全に喪失させるには、本研究で用いた二重変異では不十分だったのかもしれない。

Hd3a と RCN の機能における 14-3-3 相互作用の重要性から、RCN と Hd3a が 14-3-3 との相互作用を介して OsFD1 との複合体形成を競合している可能性が考えられた。FT と TFL1 が競合的に FD に結合することで、下流標的遺伝子の発現を正または負に制御する可能性は、シロイヌナズナだけでなく、トマトやキクでも示唆されている (Abe et al., 2005、Wigge et al., 2005、Hanzawa et al., 2005、Ahn et al., 2006、Shalit et al., 2009、Higuchi et al., 2013、Ho et al., 2014)。これらの植物の FT と TFL1 ホモログにおいても、14-3-3 との相互作用領域は高度に保存されていることから、イネと同様に FT と TFL1 が 14-3-3 との相互作用で競合しつつ下流標的遺伝子の発現を正または負に制御しているものと考えられる。

そして RCN と Hd3a が競合するためには両者が茎頂分裂組織の同一領域に局在する必要があるが、本研究で初めて RCN の局在が明らかになり、両者の局在がおおむね一致することが示された。花成の促進因子とその抑制因子とが同じ細胞内に共存する意義は何だろうか。ひとつはトマトの花序形成に見られるように、FT と TFL1 の絶対量でなく相対的な量比によって生長相が決定されることが考えられる (Shalit et al., 2009)。仮説の一つとして、茎頂分裂組織内に RCN と Hd3a のタンパク質の量比が異なる領域が形成されることで、FRC/FAC のいずれかが形成され、それによって茎頂分裂組織のステージの転換のタイミングが適切に制御されているのかもしれない。RCN と Hd3a それぞれを異なる

蛍光タンパク質で標識した二重形質転換イネを作出し、茎頂分裂組織における両者の詳細な共局在解析を行なうことで、そのような領域の関係を明らかにできるだろう。

5. まとめ

本研究から、*RCN*ファミリーの役割は生殖成長期における花序メリステムから花メリステムの分化の抑制であることが示唆された。また *RCN3* 過剰発現イネの結果から、花成制御の可能性も考えられる。これらの発生過程における *RCN* の機能について以下のモデルが考えられた (図 30)。RCN は栄養成長期から生殖成長期にかけて茎の維管束師部で発現し翻訳され、師管を通過して茎頂分裂組織へ移動する。そこで、14-3-3 と相互作用して、OsFD1 と共に核内に FRC を形成する。相転換期以降になると Hd3a が葉で合成され、茎頂分裂組織へ移動する。Hd3a が茎頂分裂組織に輸送されると、RCN との間で 14-3-3 に関する競合がおこり、Hd3a 側に平衡が偏ると FRC が FAC へと転換することで花芽分裂組織決定遺伝子の発現が活性化され、花成がおこる。花成の時期は Hd3a の発現量によって決定される。RCN の花序における主な役割は、生殖成長期の茎頂分裂組織においてフロリゲン活性を適切に抑制することにより、花序メリステムから花メリステムへの過度の分化を抑制することであると考えられる。

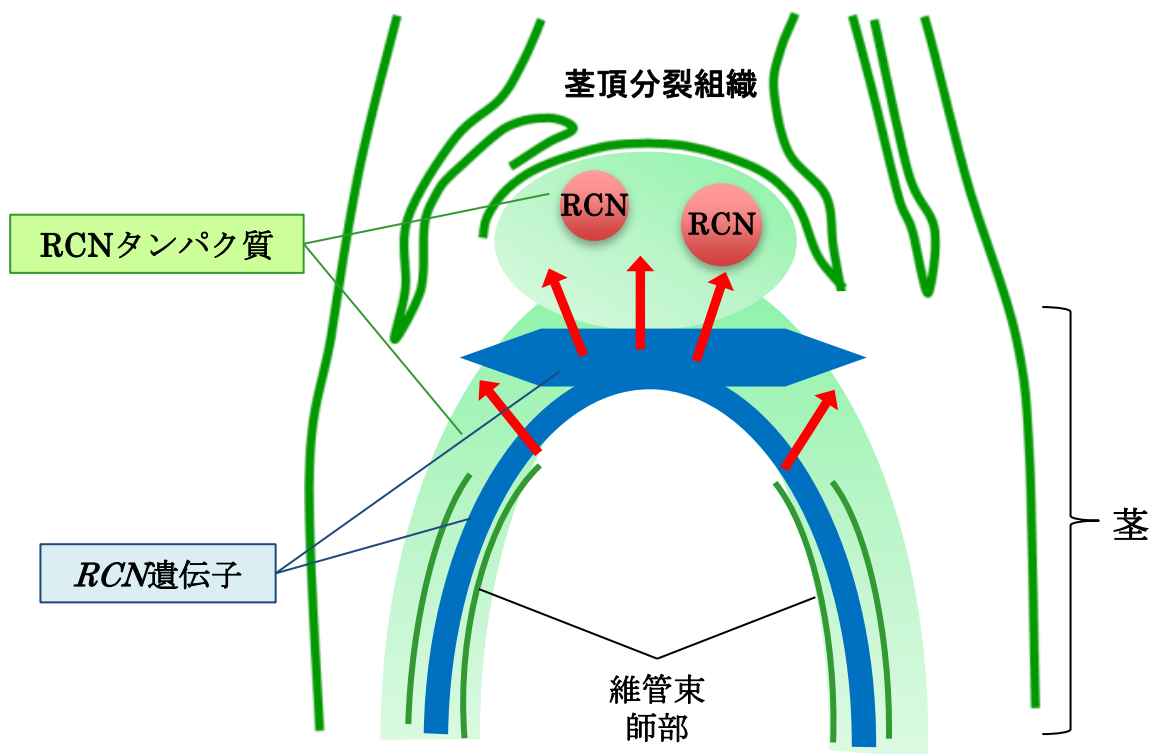
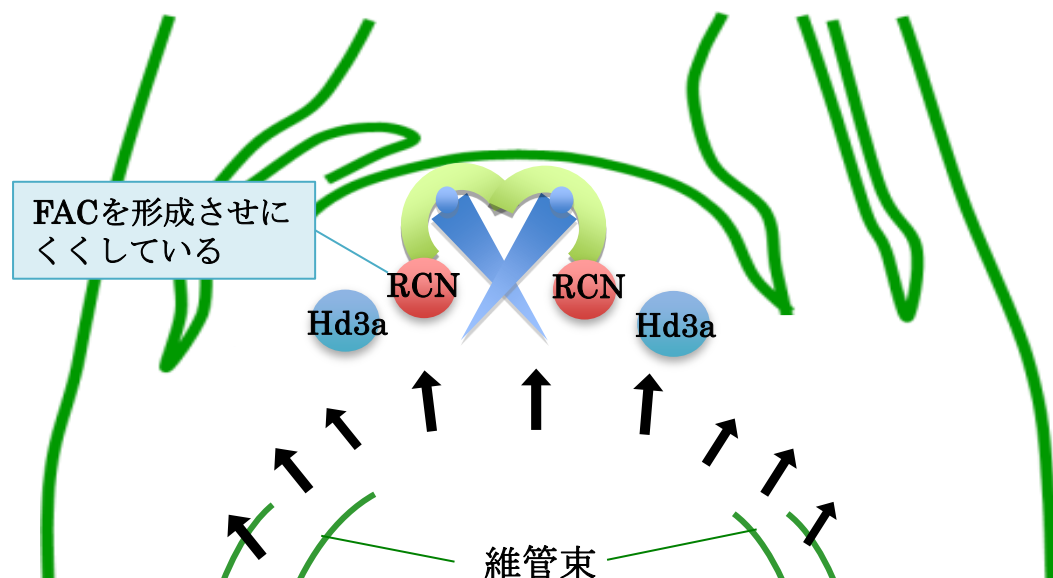


図27 RCNの移動能のまとめ

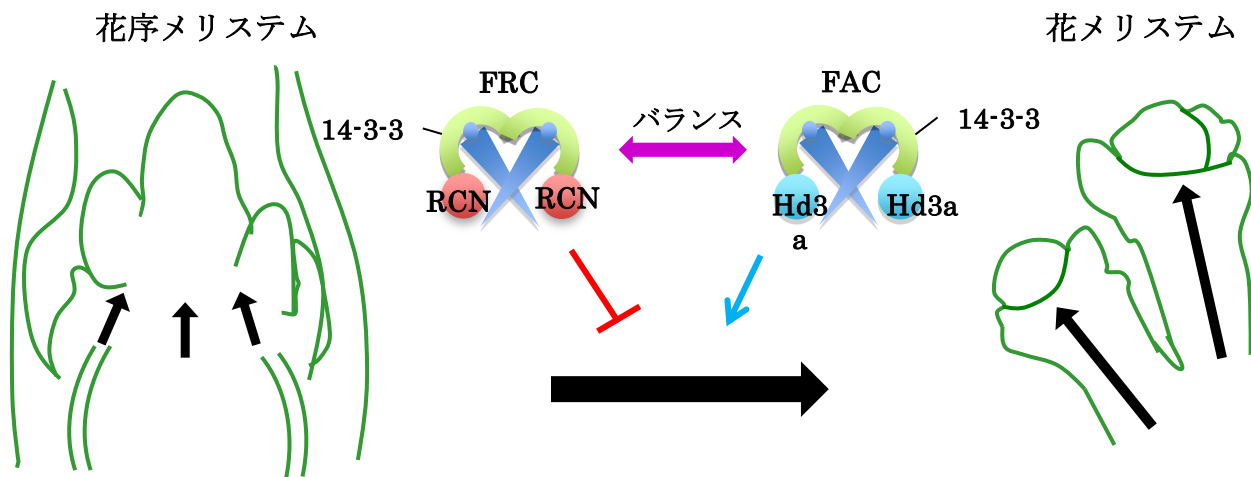
*RCN*は茎の維管束師部で発現し、翻訳された後、茎頂分裂組織へ移動して機能する。



	花成
<i>RCN3</i> 過剰発現イネ	遅延
変異型 <i>RCN3</i> 過剰発現イネ	変化なし
<i>RCN123 RNAi</i> イネ	変化なし

図28 栄養成長期におけるRCNの予想される機能

茎頂分裂組織へ移動してきたRCNは、FRCを形成してHd3aと14-3-3の相互作用を阻害してFACを形成させにくくすることで、フロリゲン活性をコントロールしている。矢印はRCNタンパク質やHd3aタンパク質の茎頂分裂組織への移動を表す。



	えい花数
<i>RCN3</i> 過剰発現イネ	増加
変異型 <i>RCN3</i> 過剰発現イネ	変化なし
<i>RCN123</i> RNAiイネ	減少

図29 生殖成長期におけるRCNの予想される機能

RCNは維管束から花序メリステムまで移動して花序の形態形成に機能しており、FRCとFACのバランスが花序メリステムから花メリステムへの分化を制御している。矢印はRCNタンパク質やHd3aタンパク質の茎頂分裂組織への移動を表す。

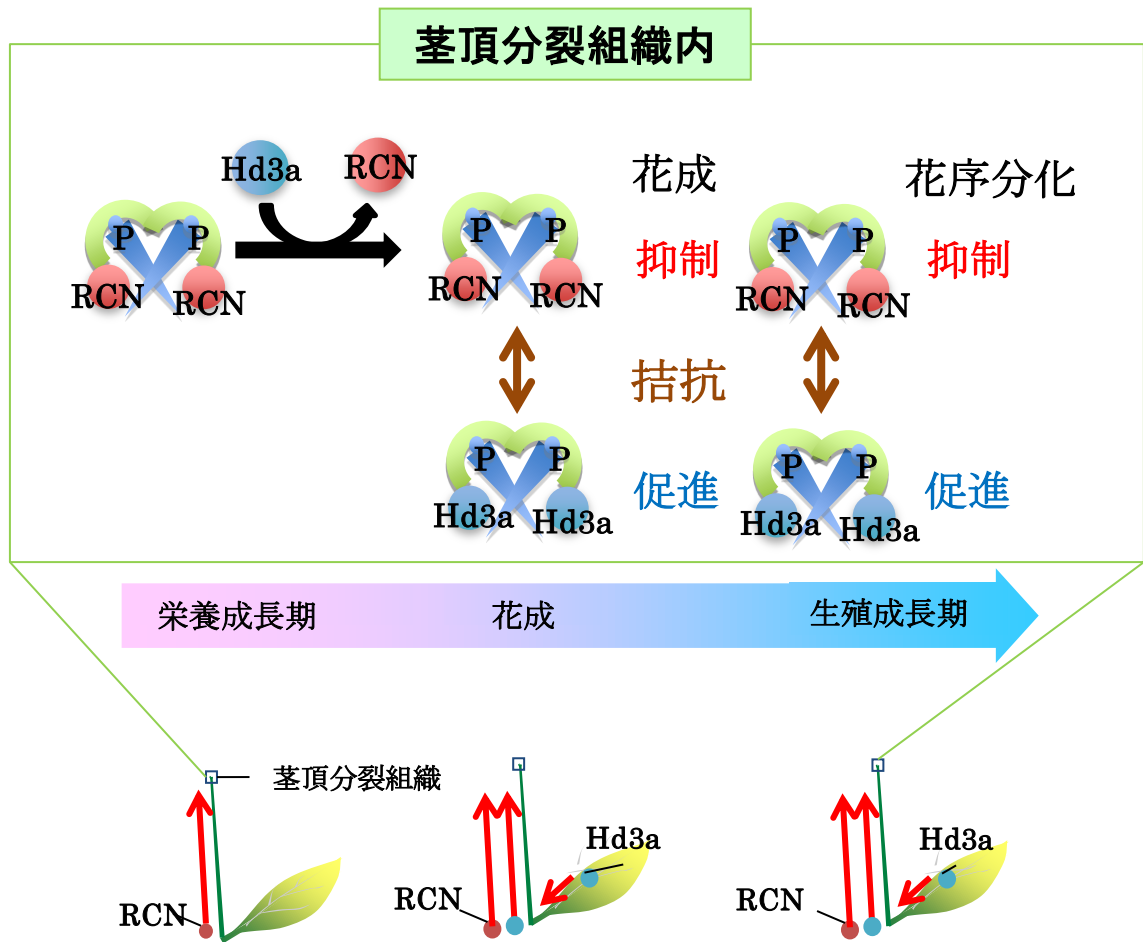


図30 RCNの機能モデル

栄養成長期には、RCNが茎から茎頂分裂組織へ移動してFRCを形成する。相転換期になるとHd3aが葉から茎頂分裂組織へ移動してFACを形成し、花成を促進する。生殖成長期の花序メリステムから花メリステムへの分化過程において、Hd3aとRCNが拮抗することで、その分化が正と負に制御されている。

6. 参考文献

- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, et al. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*. 2005 Aug 12;309(5737):1052-1056.
- Ahn JH, Miller D, Winter VJ, Banfield MJ, Lee JH, Yoo SY, et al. A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J*. 2006 Feb 8;25(3):605-14.
- Aki, T., Shigyo, M., Nakano, R., Yoneyama, T., Yanagisawa, S. Nano scale proteomics revealed the presence of regulatory proteins including three FT-like proteins in phloem and xylem saps from rice. *Plant Cell Physiol*. 2008. 49(5): 767–790
- Bradley, D., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Rothstein S., Coen, E.S. Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature*. 1996 376, 791-797
- Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, Coen E. Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science*. 1997 Jan 3;275(5296):80-83.
- Chardon F, Damerval C. Phylogenomic analysis of the PEBP gene family in cereals. *J Mol Evol*. 2005 Nov;61(5):579-90.
- Chialakhyan, M.K. New facts in support of the hormonal theory of plant development. *C. R. Acad. Sci. URSS* 1936 79-83.
- Conti, L., Bradley, D. TERMINAL FLOWER1 is a mobile signal controlling *Arabidopsis* architecture. *Plant Cell*. 2007 19(3):767-778.
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, et al. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*. 2007 May 18;316(5827):1030-1033.
- Danilevskaya ON, Meng X, Ananiev EV. Concerted modification of flowering time and inflorescence architecture by ectopic expression of TFL1-like genes in maize. *Plant Physiol*. 2010 May;153(1):238-251.

Foucher F, Morin J, Courtiade J, Cadioux S, Ellis N, Banfield MJ, et al. DETERMINATE and LATE FLOWERING are two TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS homologs that control two distinct phases of flowering initiation and development in pea. *Plant Cell*. 2003 Nov;15(11):2742-2754.

Hanano S, Goto K. Arabidopsis TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *Plant Cell*. 2011 Sep;23(9):3172-3184.

Hanzawa Y, Money T, Bradley D. A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 24;102(21):7748-7753.

Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, Yano M, Shimamoto K. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature*. 2003 Apr 17;422(6933):719-722.

Higuchi Y, Narumi T, Oda A, Nakano Y, Sumitomo K, Fukai S, et al. The gated induction system of a systemic floral inhibitor, antiflorigen, determines obligate short-day flowering in chrysanthemums. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 15;110(42):17137-17142.

Ho WW, Weigel D. Structural features determining flower-promoting activity of arabidopsis FLOWERING LOCUS T. *Plant Cell*. 2014 Feb; 26(2):552-564.

Huang NC, Jane WN, Chen J, Yu TS. Arabidopsis thaliana CENTRORADIALIS homologue (ATC) acts systemically to inhibit floral initiation in arabidopsis. *Plant J*. 2012 Oct;72(2):175-184.

Iwata H, Gaston A, Remay A, Thouroude T, Jeauffre J, Kawamura K, et al. The TFL1 homologue KSN is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. *Plant J*. 2012 Jan;69(1):116-125.

Izawa T, Oikawa T, Sugiyama N, Tanisaka T, Yano M and Shimamoto K., Phytochrome mediates the external light signal to repress FT ortholog in photoperiodic flowering of rice. *Genes Dev*. 2002 (16): 2006-2020

Jaeger KE, Pullen N, Lamzin S, Morris RJ, Wigge PA. Interlocking feedback loops govern the dynamic behavior of the floral transition in arabidopsis. *Plant Cell*. 2013 Mar;25(3):820-833.

Jensen CS, Salchert K, Nielsen KK. A TERMINAL FLOWER1-like gene from perennial ryegrass involved in floral transition and axillary meristem identity. *Plant Physiol*. 2001 Mar;125(3):1517-1528.

Kardailsky I, Shukla VK, Ahn JH, Dagenais N, Christensen SK, Nguyen JT, et al. Activation tagging of the floral inducer FT. *Science*. 1999 Dec 3;286(5446):1962-1965.

Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., Araki, M. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*. 1999 286, 1960-1962.

Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, et al. Hd3a, a rice ortholog of the arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant Cell Physiol*. 2002 Oct;43(10):1096-1105.

Komatsu M., Chujo A., Nagato Y., Shimamoto K., Kyojuka J., FRIZZY PANICLE is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets. *Development*. 2003 130(16):3841-3850

Komiya R, Ikegami A, Tamaki S, Yokoi S, Shimamoto K. Hd3a and RFT1 are essential for flowering in rice. *Development*. 2008 Feb;135(4):767-774.

Knott J.E. Effect of a localized photoperiod on spinach. *Proc. Am Soc. Hort. Sci*. 1934 31, 152-154.

Krieger U, Lippman ZB, Zamir D. The flowering gene SINGLE FLOWER TRUSS drives heterosis for yield in tomato. *Nat Genet*. 2010 May;42(5):459-463.

Kyojuka J. Genetic mechanisms controlling branching pattern in rice. *Plant Morph* 2008 19(1):29-37

Lifschitz E, Eshed Y. Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *J Exp Bot*. 2006;57(13):3405-3414.

Liu C, Teo ZW, Bi Y, Song S, Xi W, Yang X, et al. A conserved genetic pathway determines inflorescence architecture in arabidopsis and rice. *Dev Cell*. 2013 Mar 25;24(6):612-622.

Mimida N, Goto K, Kobayashi Y, Araki T, Ahn JH, Weigel D, et al. Functional divergence of the TFL1-like gene family in arabidopsis revealed by characterization of a novel homologue. *Genes Cells*. 2001 Apr;6(4):327-336.

Nakagawa M, Shimamoto K, Kyoizuka J. Overexpression of RCN1 and RCN2, rice TERMINAL FLOWER 1/CENTRORADIALIS homologs, confers delay of phase transition and altered panicle morphology in rice. *Plant J*. 2002 Mar;29(6):743-750.

Pnueli L, Carmel-Goren L, Hareven D, Gutfinger T, Alvarez J, Ganai M, et al. The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development*. 1998 Jun;125(11):1979-1989.

Randoux M, Jeauffre J, Thouroude T, Vasseur F, Hamama L, Juchaux M, et al. Gibberellins regulate the transcription of the continuous flowering regulator, RoKSN, a rose TFL1 homologue. *J Exp Bot*. 2012 Nov;63(18):6543-6554.

Ratcliffe OJ, Bradley DJ, Coen ES. Separation of shoot and floral identity in arabidopsis. *Development*. 1999 Mar;126(6):1109-1120.

Ryu JY., Lee HJ., Seo PJ., Jung JH., Ahm JH., Park CM. The Arabidopsis floral repressor BFT delays flowering by competing with FT for FD binding under high salinity. *Mol. Plant* 2014 2, 377-378.

Shalit, A., Rozman, A., Goldshmidt, A., Alvarez, J.P., Bowman, J.L., Eshed, Y. and Lifschitz, E. The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2009, 106, 8392–8397.

Song YH, Shim JS, Kinmonth-Schultz HA, Imaizumi T. Photoperiodic flowering: Time measurement mechanisms in leaves. *Annu Rev Plant Biol*. 2015, 66, 441-464.

Tamaki S, Matsuo S, Wong HL, Yokoi S, Shimamoto K. Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science*. 2007 May 18;316(5827):1033-1036.

Tamaki S, Tsuji H, Matsumoto A, Fujita A, Shimatani Z, Terada R, Sakamoto T, Kurata T and Shimamoto K. FT-like proteins induce transposon silencing in the shoot apex during floral induction in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Feb 24;112(8):E901-10.

Tanaka W, Pautler M, Jackson D, Hirano HY. Grass meristems II: inflorescence architecture, flower development and meristem fate. *Plant Cell Physiol*. 2013 Mar;54(3):313-324

Taoka K, Ohki I, Tsuji H, Furuita K, Hayashi K, Yanase T, et al. 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature*. 2011 Jul 31;476 (7360):332-335.

Teo ZW, Song S, Wang YQ, Liu J, Yu H. New insights into the regulation of inflorescence architecture. *Trends Plant Sci*. 2014 Mar;19(3):158-165.

Thomas B., Vince-Prue D., *Photoperiodism in Plants* (Academic London)

Tian Z, Wang X, Lee R, Li Y, Specht JE, Nelson RL, et al. Artificial selection for determinate growth habit in soybean. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 11;107(19):8563-8568.

Tsuji H, Nakamura H, Taoka K, Shimamoto K. Functional diversification of FD transcription factors in rice, components of florigen activation complexes. *Plant Cell Physiol*. 2013 Mar;54(3):385-397.

Wang, R., Albani, M.C., Vincent, C., Bergonzi, S., Luan, M., Bai, Y., Kiefer, C., Castillo, R., Coupland, G. Aa TFL1 confers an age-dependent response to vernalization in perennial *Arabis alpina*. *Plant Cell* 2011 23: 1307–1321.

Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU, et al. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*. 2005 Aug 12;309(5737):1056-1059.

Xi W, Yu H. MOTHER OF FT AND TFL1 regulates seed germination and fertility relevant to the brassinosteroid signaling pathway. *Plant Signal Behav*. 2010 Oct;5(10):1315-1317.

Yamaguchi A, Kobayashi Y, Goto K, Abe M, Araki T. TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. *Plant Cell Physiol.* 2005 Aug;46(8):1175-1189.

Yoo SJ, Chung KS, Jung SH, Yoo SY, Lee JS, Ahn JH. BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT) has TFL1-like activity and functions redundantly with TFL1 in inflorescence meristem development in arabidopsis. *Plant J.* 2010 Jul;63(2):241-253.

Zeevaart, J.A.D. Physiology of flower formation. *Annu. Rev. Plant physiol.* 1976 (27); 321-348.

Zeevaart, J.A.D. (2006). Florigen coming of age after 70 years. *Plant Cell* 2006 18 (8):1783-1789

Zhang, S.H., Hu, W.J., Wang, L.P., Lin, C.F., Cong, B., Sun, C.R., and Luo, D. TFL1/CEN-like genes control intercalary meristem activity and phase transition in rice. *Plant Sci.* 2005 (168): 1393–1408.

田岡健一郎、大木出、辻寛之、児島長次郎、島本功 花成ホルモン-フロリゲン-とその受容体の構造解析から見えてきたフロリゲン機能の分子基盤 化学と生物 Vol.50. No. 9, 2012 9, 654-659

石川理恵 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文 (2012)

寺川千晶 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文 (2013)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました本学バイオサイエンス研究科 植物分子遺伝学研究室 島本功教授、そして植物細胞機能研究室 橋本隆教授に深く感謝いたします。

本学バイオサイエンス研究科 植物成長制御研究室 梅田正明教授、植物発生シグナル研究室 中島敬二教授、熊本大学 国際先端科学技術研究機構 発生学研究室 相田光宏教授には、アドバイザーとして研究の遂行に当たり適切なご助言をいただきました。心からお礼申し上げます。

横浜市立大学木原生物学研究所 植物遺伝資源研究室 田岡健一郎特任助教には、研究の基礎から論文の作製まで多くのご指導をいただきました。先生のご指導の下で研究を行えたことで多くを学び、成長することができました。厚く感謝いたします。

横浜市立大学木原生物学研究所 植物遺伝資源研究室 辻寛之准教授には、研究と論文の作製にあたり多くのご指導と的確なご助言、激励の言葉をいただきました。心から深く感謝申し上げます。

Shanghai Center 河野洋二 Junior Group Leader には、多くの貴重なご助言および励ましの言葉をいただきました。心からお礼申し上げます。

玉置祥二郎博士、鷺田治彦博士からは、イメージング解析やイネの生育方法について多くのご支援とご指導をいただきました。深く感謝申し上げます。

技術補佐官の三林有紀さん、玉置優子さん、許斐友紀子さん、井上生史さん、成富純子さん、吉野みほ子さんには、本研究に厚いご支援をいただきました。心からお礼申し上げます。

本研究室の先輩、後輩の皆様、同期の Teo Chin Jit さんには研究面のみでなく、大学生活における精神的な支えとして非常にお世話になりましたこと、深く感謝いたします。

最後に、博士課程へ進学する機会をくださり、これまでの学生生活を全面的に支援し、常に応援してくださった家族に心から深く感謝いたします。