

論文内容の要旨

申請者氏名 金子美穂

植物は適切な時期になると、葉を作り続ける栄養成長から、花芽形成を行う生殖成長へと成長相を転換する。この転換は花成と呼ばれる。花成時期の決定は、植物の繁殖成功のための重要な過程の一つである。光周性花成は、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であり、FT（イネHd3a）タンパク質が花成誘導ホルモン（フロリゲン）として機能する。FTは受容体14-3-3と転写因子FDからなる複合体（Florigen Activation Complex, FAC）を形成して花成を誘導する。一方、FTとタンパク質構造が類似しているシロイヌナズナTFL1は花成に抑制的に働く。イネのTFL1ホモログはRCN（RICE CENTRORADIALIS）であり、アイソフォームが4遺伝子存在している。生殖成長においてRCNがフロリゲンに対して拮抗的に働く可能性が考えられているが、その分子機構は不明である。そこで本研究では、RCNの時期組織特異的な発現、花成や花序形態の制御における遺伝学的な役割、RCNと14-3-3との相互作用を解析することで、生殖成長制御の分子機構の一端を明らかにすることを目的とした。

最初に、RCN 4遺伝子の時期組織特異的な発現をRT-PCRにより調べた。その結果、短日条件下で育てた植物の栄養成長期から生殖成長期まで、根と茎ですべてのRCNの発現が検出されたが、茎頂分裂組織での発現は検出されなかった。花成非誘導条件である長日条件下で育てた場合も同様に根と茎での発現が観察された。次に、組織特異的な発現を詳細に観察するために、RCN遺伝子の5'上流域とコード領域にGUS遺伝子を融合したキメラ遺伝子をイネに形質転換し、GUS染色パターンを観察した。その結果、すべてのRCN遺伝子について、根や茎の維管束の篩部に強いGUSシグナルが検出されたが、茎頂分裂組織では検出されなかった。次に、同じRCN遺伝子断片をGFP遺伝子に融合させたキメラ遺伝子をイネに形質転換しGFP蛍光を観察した。その結果、RCN-GFP融合タンパク質の蛍光は茎の維管束と茎頂分裂組織で観察された。また、維管束の篩部特異的なプロモーターである*roLC*で発現させたRCN3-GFPの蛍光も維管束と茎頂分裂組織で観察された。RCN3-GFPを過剰発現させた形質転換イネでは、出穂が1ヶ月遅れ、えい花数が増加したが、RCN3の14-3-3相互作用部位に置換変異を導入した過剰発現体では野生型に近い表現型となった。RCN3-GFPの蛍光は、茎頂では主に核に観察されたが、14-3-3相互作用部位に置換変異を導入したRCN3-GFPでは、細胞質にも観察された。最後に、RCNのRNAiノックダウン解析を行った。RCN3のRNAi植物では表現型の異常は観察されなかったが、RCN1, RCN2, RCN3の3重RNAi植物では、出穂時期には影響せず、えい花数の減少が観察された。

本研究から、イネ RCN タンパクが維管束で発現して茎頂分裂組織へと輸送され、14-3-3との相互作用依存的に花序形態を制御していることが明らかになった。また、RCNが14-3-3との相互作用により花成抑制複合体（Floral Repressor Complex, FRC）を形成し生殖成長を制御している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 金子美穂

光周性花成は、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古くから知られており、その適切な制御は繁殖成功度に影響するため植物にとって重要である。葉で感受した日長変化刺激は、花成ホルモン（フロリゲン）が茎頂に伝え、栄養成長から生殖成長に転換させる。FT タンパク質（イネ Hd3a タンパク質）はフロリゲンとして機能し、葉から茎頂へ輸送され、そこで 14-3-3 タンパク質や転写因子 FD と FAC 複合体を形成し、花芽形成遺伝子を活性化する。一方で、FT タンパク質に類似する TFL1 タンパク質は、転写因子 FD と相互作用し花成を抑制することが明らかにされているが、その詳細な分子機構は不明である。このように、花成誘導の分子機構に関する知見は蓄積しているのに対して、花成抑制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、イネの TFL1 ホモログ RCN がフロリゲンと競合して FAC に類似する抑制複合体 FRC を形成することで、フロリゲン活性が適切に制御され、最適な花成時期の決定や花序形態が形成されると仮説を立てた。そして、RCN がフロリゲン Hd3a に拮抗する可能性を検証した。まず RT-PCR によりイネに 4 つ存在する *RCN* 遺伝子の発現時期・組織特異性を調べ、*RCN* RNA の蓄積は茎や根で高く、その蓄積に明確な日長応答性がないことを明らかにした。さらに、*GUS* を融合した *RCN* 遺伝子を作製し、*RCN* プロモーターの活性は維管束篩部で高いことを明らかにした。対照的に、茎頂分裂組織での *RCN* RNA の蓄積や *RCN* プロモーターの活性は検出限界以下であった。そこで申請者は *GFP* を融合した *RCN* 遺伝子を作製し、*RCN* プロモーターの制御下で発現させた RCN-GFP タンパク質が茎頂分裂組織に蓄積することを明らかにした。作製した *RCN3* 過剰発現イネが花成遅延と花芽数の増加を引き起こしたことから、RCN はフロリゲンによる花序メリステムから花メリステムへの分化を遅らせていると考えた。さらに、14-3-3 との結合が損なわれる R62K/R130K の置換変異を導入した *RCN3* では花成も花芽数も野生型に近くなることを観察し、RCN によるフロリゲン抑制には 14-3-3 タンパク質との相互作用が重要であることを明らかにした。*RCN3* のノックダウン植物は野生型に近い表現型を示すが、*RCN1*、*RCN2*、*RCN3* の 3 重ノックダウン植物は、花成時期は変化しないが、えい花数が減少することを観察した。従って、イネにおいて *RCN* は花成時期の決定には重要ではないが、花成後の花序形態形成の制御に冗長的に働いている。本論文では、RCN が 14-3-3 との相互作用を介して成長相転換後の花序形態形成を制御していることを明らかにし、フロリゲンと RCN が 14-3-3 との結合を競合することにより、バランスが適切に調節されている可能性を議論している。

以上のように、本論文はイネ RCN タンパク質による生殖成長制御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。