

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号： 14603
 研究種目： 特定領域研究
 研究期間： 2007～2012
 課題番号： 19060013
 研究課題名（和文） 短日植物イネの開花統御機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of flowering in the short-day plant rice.

研究代表者

島本 功 (SHIMAMOTO KO)
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授
 研究者番号：10263427

研究成果の概要（和文）：フロリゲンは植物の花芽分化の決定因子として1937年に存在が提唱されたが、その正体は長い間謎のままであった。我々は2007年にフロリゲンの分子実体が Hd3a/FT タンパク質であることを明らかにし、さらにフロリゲンの細胞内受容体、及びフロリゲンの活性本体となるタンパク質複合体「フロリゲン活性化複合体」を同定した。さらにフロリゲンは花だけでなくジャガイモ形成を開始させるなど驚くべき多機能性を持つことも明らかにした。またフロリゲンの発現制御に関する研究も並行して展開し、イネの花成は2つのフロリゲン分子 Hd3a と RFT1 に完全に依存していることを示した。

研究成果の概要（英文）：Florigen is a mobile flowering signal produced in leaves and moves to the shoot apex. The molecular nature of florigen is revealed in 2007, as the protein product encoded by the *Heading date 3a/FLOWERING LOCUS T* genes in plants. Our molecular genetic analyses revealed the 14-3-3 proteins as the intracellular receptors of rice Hd3a florigen, and florigen activation complex, comprised of Hd3a, 14-3-3 and the transcription factor FD promotes flowering.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	16,500,000	0	16,500,000
2008年度	16,500,000	0	16,500,000
2009年度	16,500,000	0	16,500,000
2010年度	16,500,000	0	16,500,000
2011年度	16,500,000	0	16,500,000
2012年度	1,502,902	0	1,502,902
総計	84,002,902	0	84,002,902

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード： 植物 シグナル伝達 蛋白質 生理学 イネ フロリゲン

1. 研究開始当初の背景

フロリゲンは植物の花芽分化を決定的に制御する因子として、1937年にロシアの植物生理学者チャイラヒアンによってその存在が予言された。フロリゲンは花芽形成（花成）を促進する日長になると葉で合成さ

れ、茎頂メリステムまで移動して花芽分化を開始させる分子とされている。提唱以来フロリゲンの正体を明らかにする研究が世界中で展開されたが決定的な分子の単離には至らず、長い間フロリゲンの正体は謎のままであった。

花成の情報伝達経路はモデル植物シロイヌナズナを材料に研究が進んでおり、多数の制御因子が明らかにされてきた。**FLOWERING LOCUS T (FT)**はその中の一つであり、強力な花成促進因子として機能している。分子遺伝学的な解析から、**FT** 遺伝子は葉で発現するにも関わらず、**FT** が機能を完全に発揮するためには、茎頂メリステムで特異的に発現する転写因子 **FD** との相互作用が必要であることが示唆されており、このことから **FT** が移動性の花成促進機能を担う可能性が指摘されていた。しかし **FT** や **FT** ホモログタンパク質の長距離移動能や分子機能といった多くの重要な問題が未解決であった。

2. 研究の目的

本研究では、短日植物イネを材料に開花、花成を統御する情報伝達機構を詳細に解析することを目的としている。この解析を通して、フロリゲンの分子実体を明らかにし、その分子機能を解明することを目指した。具体的には **FT** のイネホモログ **Hd3a** 及び **RFT1** について、以下の解析を行う (1) **GFP** 融合遺伝子を発現するイネを用いた **Hd3a/RFT1** タンパク質の長距離移動能の解析、(2) **Hd3a** 相互作用タンパク質の同定と **Hd3a** 複合体の機能解析、(3) フロリゲンの多機能性の分子基盤、及び (4) 異なる日長に対する **Hd3a/RFT1** の発現制御機構、及び自然変異の解析。

3. 研究の方法

(1) **Hd3a/RFT1** タンパク質の長距離移動能の解析: **Hd3a** 遺伝子の発現部位を調査するため、自身のプロモーターに **GUS** を連結した融合遺伝子を発現するイネを作成した。同時に、同プロモーターの制御下で **Hd3a-GFP** 融合タンパク質を発現する形質転換イネを作成した。**RFT1** についても同様の形質転換イネを作成した。これらの形質転換イネを用いて、**GUS** 活性染色によるプロモーター活性の組織特異性、及び **GFP** を指標にした融合タンパク質の蓄積部位の同定を行った。

(2) **Hd3a** 相互作用タンパク質の同定と機能解析: **Hd3a** と相互作用するタンパク質を同定するために、酵母 two-hybrid スクリーニングを行った。得られた結合タンパク質について、**Hd3a** との結合部位を同定するために点変異や欠失変異を導入した。またイネ **FD** ホモログをクローニングして **Hd3a** との相互作用を調査した。植物細胞内における **Hd3a** と相互作用タンパク質の複合体形成を明らかにするため、二分子蛍光補間法 (bimolecular fluorescent complementation, BiFC) による解析を行った。

(3) フロリゲン多機能性の分子基盤: ジャ

ガイモ形成は古くから花成同様に光周性制御と長距離シグナルの関与が指摘されてきた。そこでジャガイモ形成におけるフロリゲンの機能を明らかにするため、スペインの Salome Prat 教授と共同で **Hd3a** を維管束で発現するジャガイモを作成し、その表現型を調査した。またイネにおける **Hd3a** の多機能性を明らかにするために、維管束で **Hd3a-GFP** を発現するイネの表現型を詳細に観察した。

(4) **Hd3a/RFT1** の発現制御及び自然変異の解析: **Hd3a** と **RFT1** の発現パターンを短日条件下及び長日条件下において調査した。同様の調査は光周性花成に異常を示す変異体背景においても実施した。また、各日長における機能分化を明らかにするため、**Hd3a**、**RFT1** 及び両方の発現を **RNAi** によって抑制したイネを作成し、異なる日長で栽培した場合の到穂日数を調査した。**Hd3a** の発現制御と出穂性の自然変異について明らかにするため、世界中のイネ品種のコアコレクションを材料にして短日条件下における到穂日数、花成関連遺伝子の発現量、花成関連遺伝子の **SNP** を調査した。

4. 研究成果

(1) イネ **Hd3a** 遺伝子はシロイヌナズナ **FT** 遺伝子のホモログであり、花成促進機能を持つ **QTL** として見出された遺伝子である。**Hd3a** は花成促進能を持っており、**Hd3a** の発現を **RNAi** で特異的に抑制すると短日条件下における花成が遅延し、**Hd3a** を高発現させると花成が促進される。**Hd3a** による花成促進メカニズムを詳細に調査するために、まず **Hd3a** の発現部位を詳細に調査した。その結果、**Hd3a** 遺伝子のプロモーター活性は葉の維管束節部に特異的であり、これを反映して **Hd3a** の mRNA も葉に蓄積していた。次いで **Hd3a** タンパク質の局在を **Hd3a-GFP** 発現イネを用いて解析したところ、**Hd3a** タンパク質は自身の発現部位である葉に加えて、転写も **RNA** もほとんど存在しない茎頂にも蓄積していることが明らかとなった。この結果は **Hd3a** タンパク質が葉で発現した後に茎頂メリステムまで長距離移動することを示している。**Hd3a** が花成促進機能を持つことを総合すると、移動性の花成促進因子フロリゲンの分子実体が **Hd3a** タンパク質であることが強く示唆された。

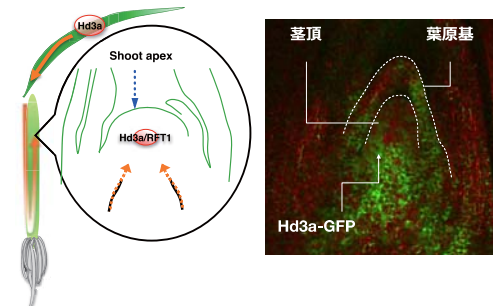


図1 Hd3aは移動性の花成ホルモン「フロリゲン」である。

(2) Hd3a 相互作用タンパク質をスクリーニングした結果、多数の相互作用因子が得られた。これらのタンパク質と Hd3a の相互作用に関して詳細な生化学的解析を行った結果、Hd3a は相互作用因子のひとつ 14-3-3 タンパク質と直接結合し、さらに 14-3-3 が転写因子の OsFD1 と結合することで機能的な複合体「フロリゲン活性化複合体 (florigen activation complex, FAC)」を形成することが明らかとなった (図 2 左)。Hd3a に変異を導入して複合体形成能を失わせる解析から、FAC の形成は Hd3a の転写活性化能及び花成促進機能に必須であることが明らかとなった。植物細胞内における FAC の形成過程について解析を行った結果、Hd3a ははじめ細胞質で 14-3-3 タンパク質と相互作用し、さらに Hd3a-14-3-3 サブコンプレックスは OsFD1 が核に存在すると核移行することが明らかとなった。この時核内で FAC が形成されているかを調査するため、BiFC と蛍光寿命測定法を組み合わせた 3 タンパク質の相互作用解析を行った結果、FAC が形成されていることを強く示唆する結果を得られた (図 2 右)。これらの結果から、14-3-3 タンパク質はフロリゲン Hd3a の細胞内受容体として機能しており、FAC がフロリゲン活性を担う複合体であると考えられる。

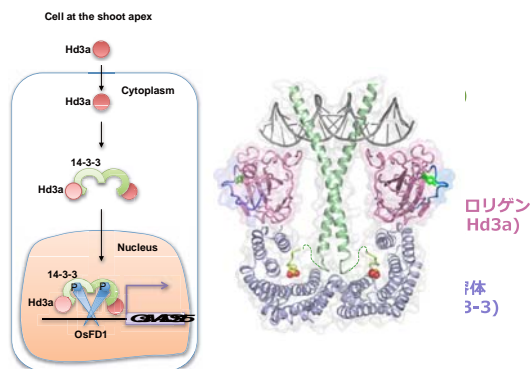


図2 フロリゲン受容のメカニズムとフロリゲン活性化複合体

(3) ジャガイモ形成は通常短日条件下で促進され、長日条件下では遅延する。ジャガイモにおいてイネ Hd3a を発現させたところ、本来ジャガイモが形成されないような長日条件下においてもジャガイモが形成されることが明らかとなった。形質転換ジャガイモを用いた接木実験の結果から、Hd3a は地上部から長距離移動して地下茎へ到達し、ジャガイモ形成を開始させることが明らかとなっ

た。並行して共同研究者によって行われたジャガイモ内在 FT の機能解析とそうとうすると、Hd3a/FT タンパク質はフロリゲンとして花を咲かせるだけでなく、移動性のジャガイモ形成シグナルとしても機能することが明らかとなった。イネにおける Hd3a の多機能性についても調査した結果、Hd3a は葉から腋芽へ移動して分枝を促進するシグナルとして機能していることが明らかとなった。



(4) Hd3a とそのパラログ遺伝子 RFT1 の機能を RNAi によって調査したところ、Hd3a RNAi イネは短日で花成が遅延し、RFT1 RNAi イネは長日で花成が遅延することが明らかとなった。RFT1 の発現部位と局在部位を詳細に調査した結果、Hd3a と同様にプロモーター活性は葉に特異的であるが、GFP 融合タンパク質は茎頂にも局在していたことから、RFT1 も葉から茎頂へ長距離移動して花成促進するフロリゲンであることが強く示唆された。これらの結果から、イネには2つのフロリゲン Hd3a と RFT1 が存在しており、Hd3a は短日の、RFT1 は長日のフロリゲンとして機能分化していることが明らかとなった。さらに、Hd3a 及び RFT1 の発現を制御する遺伝子ネットワークを解析したところ、Hd3a が短日特異的に活性化するメカニズムには C2H2 Znフィンガー転写因子 Hd1 及び B-type response regulator である Ehd1 による転写活性化が重要な役割を果たしており、一方で RFT1 の長日条件下における発現には OsMADS50 と Ehd1 を介した転写活性化が寄与していることが明らかとなった。Hd3a と RFT1 の発現を同時に抑制したところ、花成がまったく起きなくなったことから、イネの花成はフロリゲンに完全に依存していることが明らかとなった。イネ花成の自然変異とフロリゲン遺伝子の発現ネットワークの関連を調査したところ、コアコレクションに収録されたイネ品種の短日条件下における到穂日数の早晩はフロリゲン Hd3a の発現量の大小とよく相関することが明らかとなった。Hd3a の発現量の自然変異を生み出すメカニズムを明らかにするため、Hd3a の上流制御因子について SNP 解析及び発現解析を実施した。その結果、Hd3a の発現量は Hd1 の機能及び Ehd1 の発現量によく相関していることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Furuita, K., Hayashi, K., Yanase, T., Yamaguchi, M., Nakashima, C., Purwestri, Y.A., Tamaki, S., Ogaki, Y., Shimada, C., Nakagawa, A., Kojima, C. and Shimamoto, K. (2011) 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. Nature 476: 332-335.

2. Navarro, C., Abelenda, JA., Cruz-Oró, E., Cuéllar, CA., Tamaki, S., Silva, J., Shimamoto, K. and Prat, S. (2011) Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. Nature 478: 119-122.

3. Takahashi, Y., Teshima, K.M., Yokoi, S., Innan, H. and Shimamoto, K. (2009) Variations in Hd1 proteins, Hd3a promoters, and Ehd1 expression levels contribute to diversity of flowering time in cultivated rice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 4555-4560.

4. Komiya, R., Yokoi, S. and Shimamoto, K. (2009) A gene network for long-day flowering activates RFT1 encoding a mobile flowering signal in rice. Development 136: 3443-3450.

5. Purwestri, Y.A., Ogaki, Y., Tamaki, S., Tsuji, H. and Shimamoto, K. (2009) The 14-3-3 protein GF14c acts as a negative regulator of flowering in rice by interacting with the florigen Hd3a. Plant Cell Physiol. 50: 429-438.

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

7. Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H.L., Yokoi, S. and Shimamoto, K. (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. Science 316: 1033-1036.

[学会発表] (計 183 件)

1. Shimamoto, K., Structure and function of florigen., 10th International Congress on Plant Molecular Biology, October 21st, 2012, Jeju, Korea.

2. 島本 功, 花を咲かせるホルモン、フロリゲン、科学技術への顕著な貢献 2011 受賞講演

会 2012 年 5 月 23 日、文部科学省第 2 講堂 東京都

3. Tsuji, H., 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen, 7th International Asian Crop Science Association Conference, September 30, 2011, Bogor, Indonesia.

4. Shimamoto, K., Structure and function of rice Hd3a florigen, 7th Kristineberg Symposium, June 30th 2010, The Royal Swedish Academy of Sciences, Sweden.

5. Shimamoto, K., Hd3a is a rice florigen., 5th Rice Functional Genomics, October 15th, 2007, Tsukuba, Japan.

[図書] (計 2 件)

島本 功、東京化学同人、植物科学の挑戦 (21 世紀の分子生物学)。2011 年、231-243 頁

辻寛之、島本 功 農文協、花成ホルモン (フロリゲン) (農業技術大系) 2012 年 32 巻 2-9 頁

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1.

名称: フロリゲン活性化複合体及びその結晶
発明者: 島本 功、辻寛之、田岡健一郎、児嶋長次郎、大木出

権利者: 島本 功、辻寛之、田岡健一郎、児嶋長次郎、大木出

種類: PCT 出願

番号: PCT/JP2011/56426

出願年月日: 2011 年 3 月 1 7 日

国内外の別: 国外

2.

名称: フロリゲン活性化複合体及びその結晶
発明者: 島本 功、辻寛之、田岡健一郎、児嶋長次郎、大木出

権利者: 島本 功、辻寛之、田岡健一郎、児嶋長次郎、大木出

種類: 出願

番号: 特願 2010-61562

出願年月日: 2011 年 3 月 1 7 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/simamoto/simamoto.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島本 功 (SHIMAMOTO KO)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・教授
研究者番号：10263427

(2) 研究分担者

寺田 理枝 (TERADA RIE)
名城大学・農学部・教授
研究者番号：30137799

大木 出 (OHKI IZURU)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教
研究者番号：80418574

(3) 連携研究者

辻 寛之 (TSUJI HIROYUKI)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教
研究者番号：40437512