

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：14603

研究種目：特別推進研究

研究期間：2013～2013

課題番号：24000017

研究課題名 (和文) フロリゲン (花成ホルモン) の分子機能解明と植物改良への展開

研究課題名 (英文) Molecular Mechanism of Florigen Function and Application of Florigen to Crop Improvement

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

交付決定額 (研究期間全体)：(直接経費) 342,000,000 円、(間接経費) 102,600,000 円

研究成果の概要 (和文)：開花ホルモン (フロリゲン) の分子機能を解明するために、フロリゲンの総合的な解析を進めた。そして、イネフロリゲン Hd3a の茎頂メリステムへの蓄積、フロリゲン複合体の構造の詳細、フロリゲンと拮抗する花成リプレッサー RCN の複合体形成とその構造、茎頂メリステムにおける転写物やゲノムメチル化の変化、ジャガイモ形成におけるフロリゲン複合体形成による制御、などを明らかにした。また、フロリゲン改変による、バイオマス増加や収量向上の可能性について検討した。

研究成果の概要 (英文)：Comprehensive analyses of florigen, a flowering hormone, were performed to elucidate the molecular function of florigen. Accumulation of rice florigen Hd3a at shoot apical meristem (SAM), details of the structure of florigen activation complex (FAC), complex formation and its structure of rice antiflorigen RCN, transcriptome and methylome of SAM, potato tuberization control by FAC, were revealed. The potential for improvement of biomass and crop yield by manipulation of florigen was examined.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物分子生物・生理学

キーワード：花成、フロリゲン、イネ、相転換、FT、Hd3a

1. 研究開始当初の背景

花成ホルモン・フロリゲンは、植物の花芽分化を開始させるスイッチとして 75 年前にその存在が提唱され、その分子実体は 2007 年になって我々のグループがイネで、ドイツのグループがシロイヌナズナで同時に明らかにした。フロリゲンは Hd3a/FT 遺伝子がコードする分子量約 22 kD の球状タンパク質であり、花成に適した日長条件下において葉で Hd3a/FT 遺伝子の転写が活性化され、合成されたタンパク質が維管束を通り、茎の先端に位置する幹細胞集団 (茎頂メリステム) へと輸送される。茎頂メリステムに到達すると、フロリゲンは花芽形成の誘導に必要な遺伝子の転写を促進し、花芽分化を開始させる。さらに我々はフロリゲンが茎頂細胞の核内で「フロリゲン活性化複合体 (FAC)」と呼ばれる転写複合体を形成することを明らかにし、その結晶構造も解明した。フロリゲンは花成以外の器官誘導能を持つことを明らか

にしつつあり、最近スペインの研究グループとの共同研究によってイネのフロリゲンがジャガイモにおいてイモの形成を促進することを報告した。またイネにおいて、短日条件下でフロリゲン遺伝子を活性化する遺伝子制御機構を我々は 2003 年に明らかにしている。フロリゲンの重要な特徴の一つは、初めて発見されたタンパク質による植物ホルモンである点にある。これまで低分子化合物のホルモンやペプチドホルモンのみが報告されていた。タンパク質が葉から維管束を通り茎頂まで長距離輸送され、器官の間の長距離コミュニケーションと発生制御を担っており、フロリゲンの分子機能には未知のメカニズムが多数存在していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究においては、フロリゲンの分子機能の解明、及びフロリゲンの植物改良への展開、の 2 点に集中して研究を行う。これに

よって、世界に先駆けてフロリゲンの機能と応用可能性に関する新しい重要な知見を得ることを目的としている。また、タンパク質の構造解析、イメージング技術、ジーンターゲット技術など、これまでの植物科学研究においてあまり取り入れられなかった新しい研究方法を用いることで、新規なメカニズムを明らかにすることを目指している。

フロリゲンの分子機能の解明について、以下の課題(1)から(3)に取り組む。まず、課題(1)フロリゲンによる花成誘導の分子機構の解明に関しては、以下の6つの小課題に取り組む。①フロリゲンの茎頂メリステムへの到達時期の解析、②フロリゲン活性化複合体(FAC)による花成遺伝子活性化の分子機構、③標的DNAを含んだFACの構造解析、④茎頂メリステムにおける花成遺伝子の発現の視覚化、⑤フロリゲン長距離輸送の変異体の探索と解析、⑥花成リプレッサー-TFL1/RCNの構造と機能の解析、を行う。また、(2)フロリゲンによる茎頂メリステムの相転換の解析に関して以下の3小課題に取り組む。①次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析、②次世代シーケンサーを用いた網羅的DNAメチル化解析、③質量分析計によるタンパク質の網羅的解析、を行う。そして(3)フロリゲンの花成以外の器官誘導機能の解析について、以下の2つの小課題に取り組む。①ジャガイモにおける塊茎誘導の分子機構、②イネにおける茎の分枝促進機能の解析、を行う。

フロリゲンの植物改良への展開については、必要な植物の作成と栽培実験など3-4年の実験が必要となることから最終的な答えは4年度以降に出すことを目標とし以下の3課題に取り組む。(1)フロリゲン機能の制御によるイネ収量の向上の試み、(2)フロリゲン機能の抑制によるイネバイオマス増産の試み、(3)フロリゲン機能の制御によるジャガイモ増産の試み、に取り組む。

3. 研究の方法

課題(1)①Hd3aプロモーターの制御下でHd3a-GFPを発現するイネを用い、実体顕微鏡下でメリステムを単離して共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

課題(1)②イネ培養細胞プロトプラストにHd3aおよびOsFD1発現ベクターを導入し、共免疫沈降法でFACを含むタンパク質複合体を精製し、質量分析法によりFAC相互作用因子を網羅的に同定した。また、Hd3a-GFP発現イネの葉を用いて共免疫沈降と質量分析を行い、Hd3a相互作用タンパク質を同定した。イネ培養細胞プロトプラストにHd3aおよびOsFD1発現ベクターを導入し、ChIP法により

OsMADS15プロモーター上でのFAC結合領域の同定を行なった。

課題(1)③標的DNAを含んだFACの構造解析：全長のOsFD1と標的DNAを含んだ完全なFACの構造決定を行った。

課題(1)④相同性組み換えによるゲノム編集により、OsMADS15遺伝子末端に*mOrange*あるいは*Luciferase*レポーター遺伝子を連結した可視化改変体イネ、Hd3a遺伝子末端に*sGFP*遺伝子を連結したノックイン改変体イネを作出し、その茎頂メリステムを(1)①と同じ方法で観察した。

課題(1)⑤14-3-3結合部位、アニオン結合ポケット、およびFTに長距離移動欠損をひきおこすと報告されているVSR変異などを導入したHd3aをGFPと融合させ、維管束特異的*rolC*プロモーターで発現させる形質転換イネを作出した。また、FTの長距離移動に関わるFTIP1のイネホモログを同定し、Y2Hによる相互作用解析や、半定量的RT-PCR法による組織特異的発現解析を行った。

課題(1)⑥イネ花成リプレッサー-RCN、フロリゲン受容体14-3-3、および転写因子OsFD1発現ベクターをイネ培養細胞プロトプラストに導入し、BiFC法による相互作用解析を行った。また、同位体標識した組み換えRCNおよびHd3aタンパク質を用いて、14-3-3に対する競合的な結合をNMR滴定実験によって解析した。半定量的RT-PCR、*promoter-GUS*および*promoter-GFP*形質転換イネによるRCNの組織特異的発現や長距離移動の解析を行った。RCNの過剰発現体を作成し、出穂時期や穂形態の観察を行った。

花成リプレッサー-RCNと14-3-3タンパク質及びOsFD1で構成される花成リプレッサー複合体の結晶構造解析、結合アッセイを行った。

課題(2)①野生型及びHd3aRNAiイネのメリステムを用いてRNA-seqを実施した。

課題(2)②野生型イネのメリステムを用いて実施したメチローム解析の結果をCircosプログラム等で解析した。

課題(2)③野生型イネのメリステムからタンパク質を抽出して質量分析を実施した。

課題(3)①ジャガイモのFT、FD、14-3-3ホモログをクローニングし、半定量的RT-PCR法による組織および時期特異的発現解析やY2Hによる相互作用解析を行った。変異StSP6Aを発現させる形質転換ジャガイモを作製し、塊茎形成誘導を調べた。

課題(3)②ストリゴラクトンの合成と情報伝達の変異体においてHd3aを発現させ、両者の相互作用を調査した。

植物改良課題(1)Hd3aの過剰発現イネ及び発現抑制イネを材料に、収量に直結する穂構造を詳細に調査した。

(2)上述の材料を用いてバイオマスに直結

する葉数の推移を調査した。

(3) 35S プロモーターや維管束特異的 rolC および AtSUC2 プロモーターを用いて Hd3a や StSP6A を発現させる形質転換ジャガイモを作製し、塊茎形成誘導を調べた。

4. 研究成果

課題(1) ①Hd3a は花成開始と同時に茎頂メリステムに蓄積し、その後も蓄積し続けることが分かった。

課題(1) ②転写制御に関わると予想される Hd3a 相互作用候補因子をプロトプラストから5つ、葉から1つ同定した。その中の一つはプロトプラストを用いた一過的発現解析から、FAC の活性を増強できることが分かった。また、ChIP 法により *OsMADS15* プロモーター上の上流 2kb 付近の領域に特異的 FAC 結合を検出した。

課題(1) ③ *OsFD1* と標的 DNA 複合体の構造決定に成功し、結合様式の詳細が判明した。

課題(1) ④作出した *OsMADS15::mOrange* イネを用いて茎頂メリステムを観察した結果、*OsMADS15* は花成直後にメリステムで発現を開始することが分かった。

課題(1) ⑤Y2H により Hd3a と特異的に相互作用するイネ FTIP1 の機能的ホモログを3つ同定した。発現解析から、そのうちの2つは、維管束師部や茎頂での発現が観察された。

課題(1) ⑥BiFC 相互作用解析から、花成リプレッサー RCN1 および RCN3 が、Hd3a と同様に 14-3-3 や *OsFD1* と FAC 様の複合体 FRC を形成できることを明らかにした。NMR 滴定実験から、Hd3a と RCN は同程度の結合強度で受容体 14-3-3 と競合的に結合することが分かった。また、RCN1 と RCN3 の発現解析から、RCN1 と RCN3 は茎の維管束で発現し、茎頂に運ばれてフロリゲン活性を抑制することを明らかにした。RCN を含む花成リプレッサー複合体 (FRC) の立体構造の解明に成功し、Hd3a と RCN は受容体上で同一部位に結合している事を明らかにした。また、標的 DNA 配列を使ったゲルシフトアッセイから FRC も FAC 同様に DNA 上で安定な複合体を形成出来ることを明らかにした。

課題(2) ①花成誘導遺伝子としてオーキシン関連遺伝子等を同定した。花成抑制遺伝子としてトランスポゾン遺伝子などを同定した。

課題(2) ②メリステムにおいて CHH 配列のシトシンが選択的に高メチル化を受けることを発見した。

課題(2) ③メリステムにおいてフロリゲン受容体としても機能する 14-3-3 が大量に蓄積していることが分かった。

課題(3) ①ジャガイモの FT, FD および 14-3-3 ホモログの Y2H 解析から、それらが FAC 様の複合体を形成できることが示された。また、

ジャガイモ FT ホモログ StSP6A を発現させる形質転換ジャガイモは塊茎形成が促進され、その促進能は 14-3-3 との相互作用に依存することが示された。

課題(3) ②フロリゲンとストリゴラクトンは独立に分枝を制御することが分かった。

植物改良課題(1) Hd3a の過剰発現は一次枝こう数の減少を通して種子数を減少させるが、発現抑制は顕著な表現型を示さなかった。植物改良課題(2) Hd3a の発現抑制は到穂日数を2週間遅延させるにも関わらず葉数増加は1枚にとどまった。この原因は生育後期の葉間期延長にあった。

植物改良課題(3) Hd3a 形質転換イモはいずれも強力な塊茎形成能を示したが、形質転換株が安定して生育せず長期の解析が困難であった。StSP6A 発現イモでも塊茎形成の促進がみられ、形質転換株も安定に維持できた。

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 4 件)

- ① 辻 寛之、中村 洋之、田岡 健一郎、島本 功 (2013) Functional diversification of FD transcription factors in rice, components of florigen activation complexes. *Plant Cell Physiol.* 査読有、54: 385-397. doi: 10.1093/pcp/pct005.
- ② 辻 寛之、田岡 健一郎、島本 功 (2013) Florigen in rice: complex gene network for florigen transcription, florigen activation complex, and multiple functions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 査読有、16:228-235 doi: 10.1016/j.pbi.2013.01.005.
- ③ 田岡 健一郎、大木 出、辻 寛之、児嶋 長次郎、島本 功 (2013) Structure and function of florigen and the receptor complex. *Trends Plant Sci.* 査読有、18: 287-294 doi: 10.1016/j.tplants.2013.02.002.
- ④ 辻 寛之、田岡健一郎、島本 功 (2013) 花成ホルモン“フロリゲン”の構造と機能。領域融合レビュー 査読有、2: e004 DOI: 10.7875/leading.author.2.e004

[学会発表] (計 38 件)

- ① 田岡 健一郎、張 禎日、齋藤 亜美、清水 かな恵、島本 功、ジャガイモ塊茎形成におけるチューベリゲン複合体の機能解析、日本植物生理学会年会、2014年3月18日～2014年3月20日、富山大学(富山県富山市)
- ② 鈴木 美穂、田岡 健一郎、石川 理恵、

島本 功、イネにおける TFL1 ホモログ RCN の機能解析、日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 日～2014 年 3 月 20 日、富山大学（富山県富山市）

- ③ 辻 寛之、The flowering hormone florigen: its structure, receptor complex, and beyond. Plant and Animal Genome (PAG) XXII, 2014 年 1 月 12 日, San Diego, USA
- ④ 辻 寛之、Molecular mechanism of florigen function and application of florigen to crop improvement. Productivity Improvement of Plants: From Model to Crop Plants (CREST 国際シンポジウム)、2014 年 1 月 10 日、東大寺文化センター（奈良県奈良市）
- ⑤ 辻 寛之、Molecular mechanism of florigen function and beyond. 8th Joint Korea-Japan Plant Biotech Workshop on New Biotechnology-based Plant Breeding Techniques (植物分子細胞生物学会 国際シンポジウム)、2013 年 9 月 9 日、北海道大学百年記念会館

[図書] (計 1 件)

- ① 辻 寛之、島本 功、Springer、Flowering in rice. In Genetics and Genomics of Rice, 2013、pp269-278.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[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

田岡 健一郎 (TAOKA, Ken-ichiro)
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：00467698

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

児島 長次郎 (KOJIMA, Chojiro)
大阪大学・たんぱく質研究所・准教授
研究者番号：50333563

(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

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・特任助教
研究者番号：80418574

玉置 祥二郎 (TAMAKI, Shojiro)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・博士研究員
研究者番号：50457149