

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 5月30日現在

機関番号： 14301
 研究種目： 特定領域研究
 研究期間： 2007～2012
 課題番号： 19060012
 研究課題名（和文） 茎頂メリステムの相転換を調節する統御系の分子基盤
 研究課題名（英文） Molecular basis of regulatory systems that control phase transition of shoot apical meristem
 研究代表者
 荒木 崇（ARAKI TAKASHI）
 京都大学・大学院生命科学研究所・教授
 研究者番号：00273433

研究成果の概要（和文）： フロリゲン（花成ホルモン）の実体がFTタンパク質であること、輸送される主要な形態は蛋白質であってmRNAではないことを明らかにした。FTタンパク質の長距離作用能と輸送能において重要なアミノ酸残基を見だし、輸送とその調節機構を解明するための糸口を得た。FTタンパク質のパートナーであるFD蛋白質のリン酸化を実証し、14-3-3タンパク質を介した複合体形成に必須であることを示した。フロリゲンの新たな役割として、側芽分化と側枝伸長の調節を見だし、BRC1タンパク質が側芽・側枝におけるフロリゲン複合体の活性調節因子であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： In this study, we showed that the major component of florigen is FT protein (not mRNA as previously reported). Amino acid residues essential for long-distance transport and action of FT protein to promote flowering were identified. This will enable us to elucidate the mechanism and machinery of FT transport. We also demonstrated phosphorylation of the C-terminal region of FD, an FT partner bZIP transcription factor, which is required for the FT/14-3-3/FD complex formation. A novel role of florigen in regulation of axillary shoot development and elongation was elucidated. We showed that BRC1 acts as a regulator of florigen activity in axillary buds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	19,800,000	0	19,800,000
2008年度	19,800,000	0	19,800,000
2009年度	19,800,000	0	19,800,000
2010年度	19,800,000	0	19,800,000
2011年度	19,800,000	0	19,800,000
2012年度	19,800,000	0	19,800,000
総計	118,800,000	0	118,800,000

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、発生・分化、シグナル伝達、茎頂メリステム、成長相転換、花成、長距離シグナル、蛋白質

1. 研究開始当初の背景

植物の発芽後の成長（後胚発生）をになう茎頂メリステムは、成長の過程でその特性を変化させ、それに伴って形成される器官が変化する。これは茎頂メリステムの相転換と呼ばれる。特に、花成と呼ばれる過程をへて、茎頂メリステムは栄養成長メリステムから生殖成長メリステムへと転換し、それまでの葉に代わって花芽を形成するようになる。多くの場合、生殖成長メリステムは受粉・結実の後にその活動を終える。茎頂メリステムの相転換は、茎頂メリステムから形成された器官（葉や花）によって生成されたシグナル分子が、茎頂メリステムに輸送され、茎頂メリステムの細胞に作用することで調節されていると考えられている。

研究代表者らのこれまでの研究成果（Abe *et al.* 2005, Wigge *et al.* 2005, Huang *et al.* 2005）などから、シロイヌナズナの FT タンパク質が、長く謎であった花成における長距離作用性シグナル分子（フロリゲンあるいは花成ホルモンと呼ばれる）の実体である可能性が大きな注目を集めるようになった（*Science* 誌が選ぶ 2005 年の十大科学成果のひとつに挙げられた）。しかし、mRNA あるいはタンパク質のいずれ（あるいは両方）が輸送される実体であるかについては、本特定領域研究申請時には、確実な結論が得られていなかった。さらに、研究開始直後の 2007 年 4 月には、mRNA の輸送を報告した論文（Huang *et al.* 2005）が、筆頭著者を除く残りの著者全員により取り下げられるという事態が出来た。そうした状況から、輸送される実体の検証が当座の最も重要な課題のひとつであった。

また、研究代表者らの研究（Abe *et al.* 2005, Wigge *et al.* 2005）により、茎頂メリステムにおけるフロリゲン（FT タンパク質）の作用機構の一端が明らかされたが、パートナーである bZIP 転写因子 FD との複合体形成の調節機構など、多くの未解明の問題が残されていた。さらに、輸送の分子機構の研究に関しては、輸送実体の確定を待ってようやく着手できる状態であった。

花成以外でも、例えば、茎頂メリステムの老化と活動停止において、結実シグナルのような長距離作用性シグナルの関与が以前から示唆されたが（Hensel *et al.* 1994 など）、こ

れまでほとんど研究されてこなかった。したがって、フロリゲンが茎頂メリステムにおける花成以外の生理過程にも関わるという可能性も含めて、これまで研究がされなかった生理過程における新規の長距離作用性シグナル分子の探索も重要な研究課題のひとつであると考えられた。

2. 研究の目的

上述の背景を踏まえて、本研究では、花成を中心とした茎頂メリステムの相転換と器官形成が成熟した器官が生成する長距離作用性シグナル分子を介して統合的に調節される過程の分子基盤を明らかにすることを目指した。

具体的には、(1) FT 遺伝子産物（mRNA・タンパク質）の生成と輸送を制御する分子機構の解明、(2) 茎頂メリステムにおける FT タンパク質の作用機序の解明、(3) これまで研究されなかった生理過程における新規の長距離作用性シグナル分子の探索と同定、の 3 つを目的とした。(1) に関しては、まず mRNA あるいはタンパク質のいずれ（あるいは両方）が輸送される実体であるかを確定すること、そのうえで適切な実験系を確立し、輸送過程とその制御機構を明らかにすることを目的とした。(2) に関しては、パートナーである bZIP 転写因子 FD との複合体形成において、FD タンパク質の C 末領域のリン酸化が重要であることが示唆されていたことから、FD タンパク質のリン酸化を実証し、リン酸化に関わるタンパク質キナーゼを同定することを目的とした。また、FT タンパク質と相互作用する新規のタンパク質の同定を通して、FT タンパク質の作用機序の理解に迫ることを目指した。(3) に関しては、(1)、(2) の進捗を見ながら、FT タンパク質が、茎頂メリステムにおける花成以外の生理過程に新規の長距離作用性シグナル分子として関わる可能性を検証することを当面の目的とした。

3. 研究の方法

(1) では、T7 タグや GFP などのタグ付きの FT タンパク質を種々のプロモーターの制御下で発現させる形質転換植物や人工合成した塩基配列改変 FT 遺伝子をもつ形質転換植物などを用いた解析により、生理作用上重要

な輸送形態についての検証をおこなった。温度処理による局所的な一過発現誘導系や、胚軸接木法を用いた花成促進効果の接木伝達性の検証系を利用した。さらに、生理作用上重要な輸送形態が FT タンパク質であることが確認された後は、1 アミノ酸置換変異型 FT タンパク質を熱ショックプロモーターの制御下で発現させる形質転換植物を用いて、輸送に重要なアミノ酸残基の探索をおこなった。シロイヌナズナに比べて大きく、篩管液の採取が容易なカボチャを用いた検証を共同研究により進めた。並行して、FT 遺伝子の発現制御に関わる新規因子の探索のために、以前の研究により得ていた FT 関連変異体 *crp-1D* の解析を進めた。

(2) では、BiFC 法を用いて、茎頂メリステムの細胞内における FT タンパク質と bZIP 転写因子 FD とのタンパク質間相互作用の可視化を試み、これを用いて両タンパク質の相互作用の制御様態の解析を進めた。また、茎頂抽出物による FD タンパク質のリン酸化活性の検証をゲル内リン酸化アッセイによりおこなった。得られた生化学的特性の情報と茎頂における発現の有無にもとづいてリン酸化に関わるタンパク質キナーゼを絞り込み、機能欠損変異体を取得して、検証を進めた。FT タンパク質と相互作用する新規のタンパク質の同定に関しては、約 2000 個存在する転写因子に着目し、国内外の 2 つの転写因子ライブラリの網羅的なスクリーニングをおこなった。

(3) では、フロリゲン遺伝子を欠損した *ft* および *tsf* 変異体の花成時期以外の表現型を精査することで、フロリゲンに関わる新規の生理現象を探索した。これまでの研究の過程で、気づきつつあった側枝の伸長過程に着目することにした。また、(2) で同定された転写因子の中に、側芽メリステムの発生の調節因子である *BRC1* があったことから、*BRC1* に注目して解析を進めた。

4. 研究成果

長らく不明であったフロリゲン（花成ホルモン）の実体が FT タンパク質であり、mRNA ではなくタンパク質として輸送されることが明らかになった。これは、大学生向けの生物学、植物学、植物生理学等の国内外の教科書のみならず、高校の生物の教科書や資料集にも記述されるようになった。研究代表者や

同じく計画研究班員の一人である島本功教授（奈良先端科学技術大学院大学）の本特定領域研究における大きな研究成果と言うことができる。

以下に、主要な研究成果を列挙する。

- (1) フロリゲンの輸送形態はタンパク質であることが明らかになった。mRNA が生理的に意味のある輸送形態である可能性は、① 茎頂で mRNA が検出されないこと、② 人工合成した塩基配列改変 FT 遺伝子 (mRNA の塩基配列と二次構造が本来のものとは全く異なる) が本来の FT 遺伝子と遜色ない機能を持つことなどから否定された (論文⑧と⑨)。
- (2) 成熟した葉の葉身で一過的に発現させた FT タンパク質は 8 時間後には花成を促進するのに十分な量が葉身から搬出され、少なくとも 12 時間後には茎頂で検出されるようになり、24 時間後には、*SOCI* 遺伝子のような標的遺伝子の転写を活性化することが明らかになった。これらの時間的な関係はこれまでの知見とよく一致する (論文作成中)。また、この系を用いることで、FT タンパク質の輸送に関わる因子の遺伝子候補の検証も進めている (論文作成中)。東京大学・阿部光知准教授 (公募研究班員) との共同研究。
- (3) FT タンパク質上で輸送に重要なアミノ酸残基と花成促進に重要なアミノ酸残基が異なることが明らかになった。前者に関しては、3 つのアミノ酸残基を同定した。カボチャの実験系を用いた共同研究 (米国カリフォルニア大学デイヴィス校 W. Lucas 研究室) から、これらのアミノ酸は、篩管を通して茎頂付近まで輸送され、篩管から積み下ろされた後に、細胞間移行により茎頂メリステム内を伝搬していく過程に重要である可能性が示唆された (論文①)。
- (4) 優性の *crp-1D* 変異体および機能欠損変異体である *crp-2* 変異体、*mab2* 変異体などの解析により、転写メディエータ複合体の CDK8 モジュールの MED12 および MED13 サブユニットが、FT 遺伝子およびその上流と下流の遺伝子の転写制御に関わる複数のステップを標的とする

新規の花成制御因子であることが明らかになった(論文⑤)。

奈良先端科学技術大学院大学・田坂昌生教授(計画研究班員)、東京大学・阿部光知准教授(公募研究班員)との共同研究による成果。

- (5) シロイヌナズナに存在する 13 種の 14-3-3 タンパク質アイソフォームのうち、5 種が茎頂で発現し、FT タンパク質(おなじくフロリゲンである TSF タンパク質) および FD タンパク質と相互作用することを明らかにした。また、これらが FT タンパク質および TSF タンパク質とは相反する機能を持つ TFL1 タンパク質とも相互作用することも明らかにした。機能的冗長性の存在から、解析が難しいが、機能欠損変異体と過剰発現体の解析から、花成促進あるいは花成抑制に関わるアイソフォームが明らかになりつつある。
- (6) FD タンパク質の C 末領域内の 282 番目のスレオニン(T282)がリン酸化されること、このリン酸化が、14-3-3 タンパク質を介した FT タンパク質との複合体形成に重要であることが明らかになった。カルシウム依存性や分子量、茎頂における発現、細胞内局在などの情報にもとづき、FD リン酸化に関わるタンパク質キナーゼの候補を数個の CPK に絞り込み、機能欠損変異体を取得して、検証を進めている。
- 名古屋大学・町田泰則教授(領域代表者・計画研究班員)との共同研究。
- (7) FT タンパク質と相互作用する転写因子を多数同定した。その中には、FD タンパク質が所属する bZIP のほかに、TCP や VOZ、Myb といったファミリーの転写因子が含まれていた。それらの転写因子には、FT タンパク質との相互作用に 14-3-3 タンパク質を必要とするものではないものがあった。14-3-3 タンパク質を必要しない相互作用因子には、側芽メリステムの発生の調節因子である BRC1 があった(論文②)。
- (8) フロリゲンは、側枝の伸長を促進するという、これまで知られていなかった新規の生理作用を持つことが明らかになった。2つのフロリゲン遺伝子(FT 遺伝子と TSF 遺伝子)は、花成促の場合と同様

に日長により使い分けられており、長日条件下では FT 遺伝子が、短日条件下では TSF 遺伝子が主に機能していることがわかった(論文③)。

東京大学・阿部光知准教授(公募研究班員)との共同研究による成果。

- (9) フロリゲンは、葉に由来する長距離作用シグナルとして、側芽メリステムにおいても花成を促進する作用を持つことが明らかになった。BRC1 は側芽メリステムに特異的なフロリゲン作用の抑制因子としてはたらくことで、側芽メリステムが直ちに加勢することを阻止し、高次の分枝の発達を可能にしているというモデルを提唱した(論文②)。

以上のほかに、本特定領域研究の研究と関連して、以下の共同研究による成果を得た。

- (1) 柑橘類の花成人為的調節における FT 相同遺伝子の利用に関して、共同研究による成果を得た(論文⑦)。
- (2) ヨーロッパで確立された現代バラの四季咲き性が、中国原産のコウシンバラ(*Rosa chinensis*)が持つ TFL1 相同遺伝子の機能欠損変異の導入によるものであることを明らかにした共同研究に参画した(論文⑥)。

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 16 件)

- ① Yoo, S.-C., Chen, C., Rojas, M., Daimon, Y., Ham, B.-K., Araki, T., and Lucas, W. Phloem long-distance delivery of FLOWERING LOCUS T (FT) to the apex. *Plant Journal*, 査読あり、Vol. 74, 2013、(印刷中)
DOI: 10.1111/tpj.12213
- ② Niwa, M., Daimon, Y., Kurotani, K., Higo, A., Pruneda-Paz, J.L., Breton, G., Mitsuda, N., Kay, S.A., Ohme-Takagi, M., Endo, M., and Araki, T. (2013) BRANCHED1 interacts with FLOWERING LOCUS T to repress the floral transition of the axillary meristems in Arabidopsis. *Plant Cell*, 査読あり、Vol. 25, No. 4, 2013、pp. 1228-1242.
DOI: 10.1105/tpc.112.109090
- ③ Hiraoka, K., Yamaguchi, A., Abe, M., and Araki, T. The florigen genes FT and TSF

- modulate lateral shoot outgrowth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, 査読あり、Vol. 54, No. 3, 2013, pp. 352-368.
DOI: 10.1093/pcp/pcs168
- ④ Machida, Y., Fukaki, H., and Araki, T. Plant meristems and organogenesis: the new era of plant developmental research. (Editorial) *Plant & Cell Physiology*, 査読なし、Vol. 54, No. 3, 2013, pp. 295-301.
DOI: 10.1093/pcp/pct034
- ⑤ Imura, Y., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Furutani, M., Tasaka, M., Abe, M., and Araki, T. CRYPTIC PRECOCIOUS/MED12 is a novel flowering regulator with multiple target steps in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology*, 査読あり、Vol. 53, No. 2, 2012, pp. 287-303.
DOI: 10.1093/pcp/pcs002
- ⑥ Iwata, H., Gaston, A., Remay, A., Thouroude, T., Jeauffre, J., Kawamura, K., Oyant, L.H., Araki, T., Denoyes, B., and Foucher, F. The *TFL1* homologue *KSN* is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. *Plant Journal*, 査読あり、Vol. 69, No. 1, 2012, pp. 116-125.
DOI: 10.1111/j.1365-3113.2011.04776.x
- ⑦ Nishikawa, F., Endo, T., Shimada, H., Fujii, H., Shimizu, T., Kobayashi, Y., Araki, T., and Omura, M. Transcriptional changes in *CiFT*-introduced transgenic trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Tree Physiology*, 査読あり、Vol. 30, No. 3, 2010, pp. 431-439.
DOI: 10.1093/treephys/tpp122
- ⑧ Notaguchi, M., Daimon, Y., Abe, M., and Araki, T. Adaptation of a seedling micro-grafting technique to the study of long-distance signaling in flowering of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 査読あり、Vol. 122, No. 2, 2009, pp. 201-214.
DOI: 10.1007/s10265-008-0209-1
- ⑨ Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A., Tomita, Y., Dohi, K., Mori, M., and Araki, T. Long-distance, graft-transmissible action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant & Cell Physiology*, 査読あり、Vol. 49, No. 11, 2008, pp. 1645-1658.
DOI: 10.1093/pcp/pcn154
- ⑩ Tsukaya, H., Tsujino, R., Ikeuchi, M., Isshiki, Y., Kono, M. Takeuchi, T., and Araki, T. Morphological variation in leaf shape in *Ainsliaea apiculata* with special reference to the endemic characters of populations on Yakushima Island, Japan. *Journal of Plant Research*, 査読あり、Vol. 120, No. 3, 2007, pp. 351-358.
DOI: 10.1007/s10265-007-0079-y
- [学会発表] (計 8 3 件)
- ① 荒木 崇、花成研究の動向と今後の展望 - モデル植物を中心に- (招待講演)、第 85 回日本生化学会年会 シンポジウム「フロリゲン研究の新展開：その分子構造と新規な機能」、2012.12.14-16、福岡市・福岡国際会議場, マリンメッセ福岡
- ② 荒木 崇ほか 5 名、Role of *LEAFY* in gametophyte development and function (招待講演)、International Marchantia Workshop 2012、2012. 11.15-17、熊本県阿蘇郡・ホテルグリーンピア南阿蘇
- ③ 荒木 崇、*Arabidopsis* FT florigen in floral transition and beyond (招待講演)、日本植物生理学会 2012 年度年会 シンポジウム「Open Questions on Rhythmic Response Systems in Plants」、2012. 3.16-18、京都市・京都産業大学
- ④ 酒井友希・荒木 崇、植物の成長相転換における制御因子の祖先的機能の探索 (招待講演)、日本植物生理学会 2012 年度年会 シンポジウム「モデル植物ゼニゴケで探る陸上植物の普遍原理と多様性」、2012. 3.16-18、京都市・京都産業大学
- ⑤ 荒木 崇、花成研究の動向と今後の展望 -モデル植物を中心に- (招待講演)、園芸学会平成 23 年度秋季年会 シンポジウム「植物の花成制御機構に関する最新の研究動向と園芸作物への活用方策」、2011.9.24-26、岡山市・岡山大学津島キャンパス
- ⑥ 酒井友希ほか 8 名、Functional analysis of *MpLFY*, the homolog of *LEAFY* in *Marchantia polymorpha* (招待講演)、18th International Botanical Congress (IBC2011), YM042 "Developmental genetics and cell biology of *Marchantia polymorpha*"、2011.7.23-30、Melbourne, Australia
- ⑦ 荒木 崇、Regulation of flowering by the FT florigen (招待講演)、The Eighth International Conference on "Plant Biology Frontiers: Cells and Signals"、2010.9.23-27、Wuyishan, Fujian, China
- ⑧ 荒木 崇、Long-distance and local signaling in the regulation of flowering in *Arabidopsis* (招待講演)、Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Plant Sensing, Response and Adaptation to the Environment"、2009.1.11-16、Big Sky,

Montana, USA

- ⑨ 荒木 崇、Long-distance and local signaling in the regulation of flowering in *Arabidopsis* (招待講演)、SigNet International Symposium 2008、2008.2.20-21、Korea University, Seoul, Korea
- ⑩ 荒木 崇、Long-distance signals of flowering in *Arabidopsis* (招待講演)、Plant Vascular Biology 2007、2007.5.7-11、Academia Sinica, Taipei, Taiwan

[図書] (計5件)

- ① 神谷勇治・小柴共一 (編)、講談社サイエンスティフィク、新しい植物ホルモンの科学 第2版、2010、pp.169-182.
- ② 塚谷裕一・荒木 崇 (編)、放送大学教育振興会、植物の科学、2009、270 pp.
- ③ 海老原史樹文・井澤 毅 (編)、シュプリンガー・フェアラーク東京、光周性の分子生物学、2009、pp.53-63.
- ④ 日本植物生理学会 (監修)、荒木 崇 (編集)、西村尚子 (著)、化学同人、花はなぜ咲くの? (植物まるかじり叢書3)、2008、pp.25-26, 60-61, 137-138, 143-149.
- ⑤ 植物の軸と情報 特定領域研究班 (編)、朝日新聞社、植物の生存戦略 - 「じっとしているという知恵」に学ぶ-、2007、pp.51-72.

[その他]

新聞報道:

- ① 2010年4月20日「花成のメカニズムを探る」京都新聞科学欄

アウトリーチ活動:

- ① 本特定領域研究における研究成果等をもとに、日本植物生理学会が一般向け読者向けに化学同人から刊行した「植物まるかじり叢書」の第3巻『花はなぜ咲くの?』(西村尚子・著)の企画と編集を担当し、コラム、読書案内等を執筆した(図書の④)。
- ② 本特定領域研究における研究成果等をもとに、日本植物生理学会が一般向け読者向けに講談社から刊行した『これでナットク!植物の謎』(ブルーバックスB1565)に回答者として協力した。
- ③ 本特定領域研究における研究成果等に関連して、高校の生物の教科書および資料集に写真・資料等を提供した(2社)。
- ④ 2007年9月および2008年3月に、植物生理学会の市民講座等で、本特定領域研究における研究成果とわれわれの生活とのかかわりについてわかりやすく講演した。
- ⑤ 2009年12月に、出身高校(長野県立松本深志高等学校)において、本特定領域研

究における研究とその成果の紹介を含む講演をおこなった。

- ⑥ 2007年度から、放送大学において主任講師として、「植物の科学」という科目を企画担当し、本特定領域研究における研究成果等をもとに植物科学の一般への普及に努めている(図書の②)。

研究室ホームページ:

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/plantdevbio/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 崇 (ARAKI TAKASHI)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号: 00273433

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

遠藤 求 (ENDO MOTOMU)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号: 80551499

山口 礼子 (YAMAGUCHI AYAKO)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号: 10624249