

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24年5月7日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570036

研究課題名（和文） シロイヌナズナの新規な花芽分化誘導促進因子の探索

研究課題名（英文） Isolation of new genes that are responsible for the floral induction in Arabidopsis thaliana.

研究代表者

米田 好文 (KOMEDA YOSHIBUMI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：10124215

研究成果の概要（和文）：

生殖成長を成功させるために植物は花芽分化誘導の時間的制御を行っている。そのような FLA1, FLA2 遺伝子を新規に見だし解析した。FLA1 遺伝子が TRP 経路を使って花芽分化誘導に関与することを示唆している。FLA2 遺伝子は、TUBBY LIKE PROTEIN4 (TLP4) とも呼ばれ、11(TLP1 to TLP11)のファミリーのうち8つの遺伝子で fls2/tlp4 と同じく花芽分化誘導遅延を示した。機能的な冗長性を示していることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

To ensure reproductive success, plants have to regulate the timing of the floral transition. Genes in which the insertions located have been renamed FLORAISON TARDIVE1 (FLA1) and FLA2. These fls1 and trp mutants grown on medium containing higher concentration of tryptophan did not display any late flowering phenotype suggesting that FLA1 affect the floral transition through a new tryptophan pathway.

Concerning FLA2, FLA2 is also known as TUBBY LIKE PROTEIN4 (TLP4) and is a member of an eleven genes family, TLP1 to TLP11. Mutants of eight of these genes displayed a similar late-flowering phenotype as fls2/tlp4. TLPs seem to regulate expression of the autonomous genes in a redundant way.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：自然科学

科研費の分科・細目：生物学、遺伝・ゲノム

キーワード：花芽分化誘導

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナ FT 遺伝子が、長らく植物生理学の分野で求められてきた花芽分化誘導

ホルモンすなわちフロリゲンの分子の実体だとの知見は、植物学分野以外の人にも大きな衝撃を与えた。本研究は、このような花

芽分化誘導の分子機構解明を目指した研究である。

シロイヌナズナの変異原処理により、花芽分化誘導が時間的に遅延ししかも一般的な増殖性には影響を与えない突然変異体が精力的に集められてきた。多数の研究者の努力によるこれら膨大なコレクションを用いて Koornneef(1991、Genetics)らの遺伝学的解析の結果、花芽分化誘導の4つの遺伝子経路とその統御過程が明らかになった。すなわち、光依存経路、自律的経路、ジベレリン依存経路、春化依存経路である。さらに、これらの遺伝子機能を統合する遺伝子群、統御過程遺伝子群の働きにより花芽分化誘導に至ることが示されてきた。

現在の研究は、2つの重要なプロセスに研究の主力が注がれている。まず、いわゆるフロリゲンに相当する遺伝子、*FT*産物の発現・機能解析とその移動である。これは、光依存経路で1930年代に提唱された花芽分化誘導シグナル=花成ホルモンの実体ではないかとの知見が集積しつつある。初期の提案(シグナルは植物の短日長日に非依存性)通り長日植物シロイヌナズナのみならず、短日植物イネにも相同機能を示す遺伝子が同定され確からしくなってきた。2番目の主題は、*FLC*遺伝子の発現量制御の解明である。この*FLC*遺伝子は、自律的経路・春化依存経路遺伝子群の機能により mRNA 量が調節され、遺伝子産物が統御過程遺伝子の抑制因子となっている。*FLC*発現制御にはクロマチンの状態が反映しエピジェネティックな制御を受けることが示され、植物のみならず動物系をも含んだクロマチンと遺伝子発現制御のモデルとして近年盛んに研究が展開されている分野である。

2. 研究の目的

シロイヌナズナの花芽分化誘導研究は飽和

感があるが、さらに発展させる2つの観点が重要だと考えるに至っている。まず、いくつかの MissingLink がありさらに花芽分化誘導に関する遺伝子群を発見することが重要である。第二に、クロストークの可能性の検討である。上記4経路については疑う余地がない。しかし、生物現象の常としてこの4つでわりきれない、すなわちこの4経路の相互作用、クロストークの存在を予見させる。たとえば、*FLC*遺伝子を経由した春化処理の寄与について、*FLC*遺伝子の発現上下のみでは説明できず光促進経路遺伝子の関与を予想させる現象も見出されてきた。本研究では、モデル植物にこだわって花芽分化誘導に関わる全ての因子を解明する目標に向かって花芽分化誘導研究をさらに発展させようと計画した。

3. 研究の方法

1. *FLA1-FLA3* 遺伝子の変異体を広くコレクションし、変異部位と花成遅延表現型の強弱の関連性を探る。
2. 生育条件の違いによる花芽分化誘導時期の差異を明瞭にする：*fla1*では培地組成による変化が既に観察された。窒素代謝との関連性から窒素源と量の変化、Caシグナルの影響を見るためにCa量の変化とCaキレート剤の培地への添加などを予定している。また日長条件も組み合わせて、時期の測定をおこなう。
3. ジベレリン添加実験；現段階では解析が不足しているジベレリン経路への寄与を検討する。予備実験では、ジベレリンにより *fla* 植物体形態が影響を受けた。近年、花成遺伝子として単離された物の中で、形態形成への関与も報告がなされるケースが出てきた。従って、*fla* 変異体でも同様の解析が必要と考える。
4. 春化処理の花成への影響を確認する：春化処理経路に関わる遺伝子発現が変化することから。
5. *FLA* 転写産物の検出：*FLA2*に関しては、RT-PCRでの検出が難しいことから、より高感度の方法を模索する(in situ hybridization)法でも抗体などを用いてシグナルを増大さ

せるなど)。変異体での表現型との対比として、35S::FLA1-FLA3 の作製も考えており、35S::FLA2 および pFLA2::35S::FLA2 ならば FLA2 転写産物の検出は可能ではないかと考える。

6. FLA1-3 のプロモーター領域と GUS fusion の作製：発現パターンの理解の為。

7. 遺伝子発現の解析；更に多くの花成遺伝子の発現を解析し、より FLA 遺伝子の具体的な経路での位置関係を記述する：重要な因子に関しては real-time PCR を用いて定量的な評価も行い厳密に解析していきたい。

8. Chip assay によるクロマチン動態の解析：fla2 変異体では、FLC 遺伝子の上昇を見いだした。FLC の発現量調節の一員としてクロマチン動態の変化の報告もあるため、fla2 変異体でも確認する。

9. Yeast-two-hybrid システムによる相互作用因子の探索：FLA1 タンパクの相互作用パートナー、FLA2 によるタンパク質分解のターゲットの候補を見つけ出すことを目的とする。それらは同時に新規の花成因子である可能性が高い。

10. サプレッサーの単離：FLA1-FLA3 は今の段階では既存の花成経路との位置関係が曖昧であり、直接的でない。既知の花成経路と FLA の間を結ぶ因子を fla1-fla3 表現型のサプレッサー単離により発見する。

11. FLA1-FLA3 翻訳産物の合成系の確立；タンパク質レベルでの酵素活性・タンパク質相互作用の解析の準備として、大腸菌における合成系を確立する。

4. 研究成果

生殖成長を成功させるために植物は花芽分化誘導の時間的制御を行っている。シロイヌナズナでは、4 つの遺伝的経路が広く認知されている。これらの経路は、環境要因と内在的発生分化プログラムを相互に関連づけて達成されている。本研究では、そのような過程の新たな遺伝子を同定しその花芽分化誘導に関わる機能を明らかにしようとした。

挿入変異体群の中に花芽分化誘導の時間的遅延を示すものを同定し、FLA1, FLA2 遺伝子と命名し解析した。これらの変異体の挿入遺伝子は、未記載の新規遺伝子である。

fla1 変異体は、長日条件で野生型より花芽分化誘導が遅延し、FLA1 遺伝子が日周期依存経路に属することを示唆している。

日周期依存経路の GI, CO 遺伝子の発現には影響なく、その下流 FT, LFY, AP1 遺伝子から発現低下していた。それは CO-非依存であることを示唆する。

AP2-ドメインを持った TOE1, TOE2, SMZ and SNZ 遺伝子でも fla1 変異体では発現低下していた。これらの遺伝子群は、CO-非依存的で SMZ 遺伝子では内在経路との相互作用も示唆されている。FLM 遺伝子もその二つの経路の統合に働くことが示唆されていた。

その FLM 遺伝子発現量が fla1 では低下していること、FLC 遺伝子発現は低下していないことを見出した。

遺伝子ドメインとしては、FLA1 はトリプトファン合成を司る酵素の活性部位を持つことが示唆される。そこで、合成酵素の 5 つの変異体 (trp1 to trp5) を解析すると、花芽分化誘導の時間的遅延を示すことを発見した。fla1 と 5 つの trp 変異体を高濃度トリプトファンで栽培するとその花芽分化誘導遅延が回復することも見いだした。

これは、FLA1 遺伝子が TRP 経路を使って花芽分化誘導に関与することを示唆している。FLA2 遺伝子の研究も進めた。FLA2 遺伝子は、TUBBY LIKE PROTEIN4 (TLP4) とも呼ばれる。11 (TLP1 to TLP11) のファミリーが存在。すべて tubby domain を持つ。動物にもあり発生過程に関わると示唆されるが詳細は不明。

fla2 変異体は LD と短日条件 (SD) で花芽分化誘導が遅延し、内在的経路の遺伝子と推定される。

11 のうち 8 つの遺伝子で fla2/tlp4 と同じく花芽分化誘導遅延を示した。

内在経路に属する遺伝子の発現は低下していなかった。FLM, FLC 遺伝子の発現上昇を示した。

二重変異体では、特に tlp1 tlp5 および tlp9 tlp11 で表現型の相加性がみられた。

TLP8 は Fbox のない例外だが遅延する。機能的な冗長性を示していることを示唆している。

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 2 件)

① LEAFY controls Arabidopsis pedicel and

orientation by affecting adaxial-abaxial cell fate. N. Yamaguchi, A. Yamaguchi, M. Abe, D. Wagner and Y. Komeda. *Plant Journal* 69: 844-856 (2012)

②Control of embryonic meristem initiation in *Arabidopsis* by PHD—finger protein complexes. S. Saiga, B. Moller, A. Watanabe-Taneda, M. Abe, D. Weijers and Y. Komeda. *Development* 139: 1391-1398 (2012)

〔学会発表〕(計2件)

①「シロイヌナズナ class IV HD-ZIP 遺伝子の多重変異による植物形態異常」鎌田直子、米田好文、高橋卓、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月16日 [1pC05]

②「シロイヌナズナ HD-ZIP class IV 遺伝子の多重変異体に見られる器官形態異常」鎌田直子、米田好文、高橋卓、日本植物学会第75回大会、2011年9月19日 [P-134]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 好文 (KOMEDA YOSHIBUMI)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：10124215

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし