

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687007

研究課題名(和文) イネ光周性花成抑制因子Ghd7依存的な限界日長によるEhd1転写制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of day-length dependent regulation of Ehd1 expression mediated by a floral repressor Ghd7 in rice

研究代表者

伊藤 博紀 (Itoh, Hironori)

独立行政法人農業生物資源研究所・植物生産生理機能研究ユニット・研究員

研究者番号：00466012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円、(間接経費) 5,700,000円

研究成果の概要(和文)：短日植物であるイネのフロリゲン遺伝子Hd3aの発現は限界日長反応を示す。本研究は、この限界日長反応に必須な促進因子Ehd1の転写制御の解明を目指した。抑制因子Ghd7はEhd1を抑制する。フィトクロム依存的なGhd7は、転写制御と活性制御を介して長日条件下の抑制に働くと考えられた。一方、Ehd1は青色光で誘導される。今回、青色光受容体を同定し、朝の発現に必須な時計因子OsGIとの相互作用モデルを示した。青色光シグナルはタンパク質分解経路を介して伝達されることから、Ghd7の日長依存的な抑制に加えて、青色光依存的な転写促進因子の活性制御がEhd1の急激な転写誘導に重要なことが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：In rice, florigen Hd3a expression is toggled by a 30 minutes difference of day-length reduction. Setting of critical day-length for Hd3a is conferred by precise control of Ehd1 expression. Ghd7 represses Ehd1 to repress Hd3a under long-days. Ghd7 activity is controlled by day-length dependent regulation at both transcriptional and post-transcriptional levels. Contrary, Ehd1 is induced only when blue-light signal coincides with a morning phase set by OsGI, a rice circadian clock component, independently of photoperiods. In here, we identified blue-light signaling pathway required for Ehd1 induction and proposed a model how blue-light signals interact with OsGI to induce Ehd1 expression in the morning. Because blue-light signal is transduced via an ubiquitin-mediated proteolysis, our results indicate that blue-light dependent stabilization of a transacting factor expressed by OsGI can achieve an acute induction of Ehd1 at the morning when Ghd7 repression is released.

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：光周性 限界日長 フロリゲン 転写制御

1. 研究開始当初の背景

フロリゲンは、光周性花成反応のトリガーである。葉で生産されたフロリゲンのメリステムへの求頂的な輸送や花序分裂組織での作用機構に加えて、植物の花芽形成の多様性を担う、フロリゲン遺伝子の日長依存的な転写制御機構の解明は、基礎・応用研究の両面から重要なテーマであると考えられている。

多くの植物は、より多くの種子(子孫)を残すために、季節変化によって生じる日の長さ(日長)の変化を認識して季節を予測し、最適な時期に花を咲かせる性質を持つ。長日植物のモデルであるシロイヌナズナおよびモデル作物で短日植物のイネを材料とした分子遺伝学的研究から、光周性花成反応の遺伝子ネットワークが明らかとなってきた。その結果、イネでは、シロイヌナズナにおける光周性花成反応の鍵遺伝子 *CO* のオルソログ *Hd1* に加えて、花成促進因子 *Ehd1* や花成抑制因子 *Ghd7* といったシロイヌナズナにはオルソログが存在しないイネならではの花成制御因子を登場させることで、短日条件下で花芽形成を促進する独自の機構を構築してきたことが明らかとなってきた。

しかしながら、長日植物と比較して、短日植物は花芽形成するかしないかの限界日長認識が厳密であることが古くから知られていたが、その具体的なメカニズムは明らかとなっていない。最近、イネのフロリゲン *Hd3a* 遺伝子とその上流で働く *Ehd1* の日長依存的な朝の発現が、13 時間と 13.5 時間を境に劇的に変化する限界日長反応を示すことを明らかにした。さらに、*Ehd1* の発現は、長日条件下でフィトクロム依存的に発現する *Ghd7* を介して抑制されること、日長非依存的に朝の青色光によって誘導されること、それぞれの光依存的な発現が概日時計によるゲート制御を受けること、そして、それらを組み合わせることで厳密な日長認識を可能にさせるというモデルを提唱した。そこで、本研究では、フロリゲンの転写制御における限界日長認識の分子メカニズムの一端を明らかにするために、イネ *Ehd1* の転写を制御する限界日長反応の分子機構を明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

限界日長付近では、*Ehd1* の発現が劇的に変化するのに対して、上流の抑制因子 *Ghd7* のゲート機構による遺伝子発現の変化は僅かである。そこで、*Ghd7* の活性制御機構が存在するかを明らかにする。

Ehd1 の促進には、概日時計因子 *OsGI* の働きが必須であることが明らかとなったが、青色光信号伝達系については、ほとんど明らかとなっていない。そこで、青色光受容体を同定し、青色光応答性と *OsGI* の具体的な相互作用を明らかにする。

転写制御機構の出口である *Ehd1* プロモーター上の作用点を明らかとし、限界日長を境

に *Ehd1* 遺伝子の劇的な発現変化を引き起こす、*Ghd7* 依存的抑制系と青色光依存的促進系の関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 抑制因子 *Ghd7* の抑制活性を制御するメカニズムの解析

限界日長付近における *Ghd7* および *Ehd1* の発現を解析するとともに、エピトープタグを融合する形質転換体を作成し、日長条件下で *Ghd7* タンパク質の安定性に違いが生じるかを解析する。

(2) 青色光依存的な *Ehd1* の転写誘導メカニズムの解明

Ehd1 の転写促進に必要な青色光受容体を明らかにする。最近のシロイヌナズナでの知見と統合し、青色光信号伝達系に係る因子の同定を進める。青色光受容に異常を示す変異体を用いて、青色光信号伝達系と概日時計因子 *OsGI* との関係を明らかにする。

(3) *Ehd1* プロモーター上の制御領域の同定と *Ghd7* 依存的抑制系との関係の解析

Ehd1 プロモーター：ルシフェラーゼ (*Ehd1p::LUC*) 形質転換体を作成し、*Ehd1* の転写制御に係るシス配列を同定する。その領域をプローブとして、DNA 結合因子を単離する。青色光による促進系と *Ghd7* を介した抑制系の *Ehd1* プロモーター上での関係を解析する。

4. 研究成果

(1) 抑制因子 *Ghd7* の抑制活性を制御するメカニズムの解析

Hd3a および *Ehd1* の発現は、13 時間から 13.5 時間の日長の変化で、急激に抑制される。この 30 分の日長変化の解像度を上げた時、*Ghd7* の緩やかな発現上昇変化に伴って、常に *Ehd1* の転写抑制も強まることがわかった。次に、*Ghd7* タンパク質量の変化を調べるために、*Ghd7* の ATG 上流にエピトープタグを融合したゲノム断片を作製し、*ghd7* 欠損変異体への導入を試みたが、完全に相補する系統を得ることができなかった。そこで、過剰発現体の中で *Ghd7* の蓄積が比較的低い系統を用いて、日長依存的な変化を解析したが、*Ghd7* タンパク質量に大きな違いを見出すことはできなかった。

一方で、*phyB* 変異体や *ose1f3-1* 変異体の解析から、転写制御以外の *Ghd7* の活性制御を示唆する結果が得られてきた。従って、*Ghd7* の日長による活性制御には、内生レベルでの *Ghd7* の発現量で生物学的意義を持つと考えられた。実際、*Ghd7* 過剰発現体では、イネの花成が日長に関係なく抑制されることから、長日条件下優先的な抑制を行うためには、ベースとなる発現量が重要であるという可能性を支持する。*Ghd7* の機能調節はイネの品種育成という観点からも注目すべき要素であり、自然変異や人為突然変異からの *Ghd7* 機能改変アレルの集積や、その解析結果

を基づいた NBT による形質転換体の作出から、Ghd7 の制御機構をさらに具体化することを検討している。

(2) 青色光依存的な *Ehd1* の転写誘導メカニズムの解明

① *Ehd1* の転写誘導に機能する青色光受容体の同定

青色光受容体として、LOV 型と CRY 型光受容体が存在する。これまで、LOV 型の *OsZTL* および *OsFKF1*、CRY 型の *OsCRY2* の解析を進めたが、*Ehd1* との強い関連を示す結果は得られていない。一方で、*CRY1a* 過剰発現体では、野生型と比較して *Ehd1* の青色光依存的な発現の上昇が観察された。そこで、最近報告されたイネの *cry1a-R cry1b-1* 系統を用いて、*Ehd1* の発現を解析した結果、*cry1a-R cry1b-1* 系統では、*Ehd1* の青色光依存的な発現がキャンセルされることを明らかにした (図 1)。この結果は、CRY1 が *Ehd1* の誘導に必須であることを示す結果である。

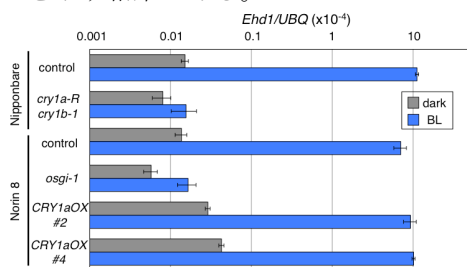


図 1. *cry1* 機能欠損系統での *Ehd1* の発現

植物は短日条件下で生育させた。播種後 14 日目の朝、青色光 (BL) 下と暗黒 (dark) におき、*Ehd1* の発現量を調べた。*cry1a-R cry1b-1* は、農業生物資源研究所高野誠博士より分譲頂いた。*CR1aOX*: 過剰発現系統。

② 青色光信号伝達系因子の解析

シロイヌナズナにおいて、CRY1 による光信号伝達系には光形態形成の抑制因子 *COP1* が存在することが明らかとなっている。イネの CRY1 も *COP1* と相互作用することが示されていたことから、*Ehd1* の転写制御に *COP1* が機能するのかを検討した。具体的には、イネの *COP1* オルソログの機能欠損変異体 *pps* 変異体を解析した。その結果、野生型と比較して、*pps* 変異体では、青色光処理の有無に関わらず、*Ehd1* の発現が顕著に上昇することを明らかにした (図 2)。つまり、*PPS/OsCOP1* は、*Ehd1* の転写抑制因子として機能することを示している。さらに、酵母の 3hybrid 系を用い、CRY1 と *COP1*、そして SPA1 の相互作用を検証したところ、青色光下で、CRY1 と *COP1* の相互作用が解消されることを確認した。SPA1 は、シロイヌナズナにおける青色光依存的な CRY1 との相互作用因子であり、青色光信号を受けて *COP1* 機能の不活性化に働くと考えられている。以上の結果は、進化的に保存された CRY1 依存的青色光信号伝達系が概日時計因子 *OsGI* と相互作用することで、イネの花成制御での役割を獲得したことを示唆している。

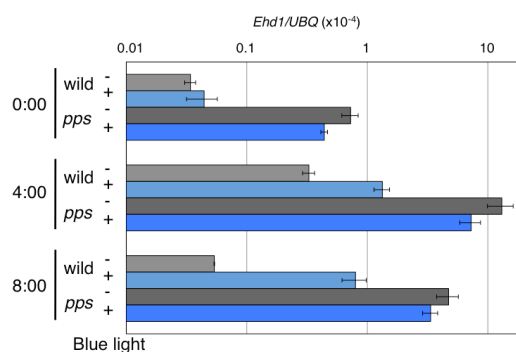
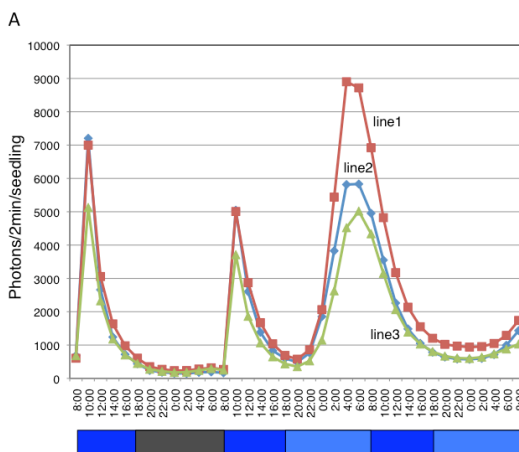


図 2. *PPS/OsCOP1* の *Ehd1* 遺伝子発現への影響

短日条件下で植物体を生育後、各時間に青色光を 2 時間照射または暗黒下におき、*Ehd1* の発現を調べた。Wild は T65。pps 変異体は、東京大学の長戸教授より分譲頂いた。相対発現量は対数標記である。

③ 青色光信号伝達系と概日時計因子 *OsGI* の相互作用による *Ehd1* 転写制御の具体化

これまでの解析から、*OsGI* は、*Ehd1* の転写制御において、朝に青色光応答性を高めるゲートを設定する機能を持つと考えられた。一方で、*pps* 変異体では、青色光処理の有無に関わらず *Ehd1* の発現が脱抑制されるが、発現パターンは日周変動性を維持することが示唆された。そこで、*OsGI* の役割を調べるために、*Ehd1p:LUC* 形質転換体を用いて、*OsCOP1* の機能を消失させる連続青色光下でのレポーター遺伝子の発現をモニターした。*Ehd1* の青色光依存的発現に一致して、LUC 活性は、明暗周期中では朝に一過的な発現を示した。しかしながら、連続青色光下では、主観的夜中から発現が始まり朝方をピークとする明確な概日リズムを示した (図 3A)。これは、先の青色光応答性の *Ehd1* のゲートとよく一致していた。このことから、*OsGI* によって誘導を受ける転写因子 (TF_X とする) が存在し、暗期では、PPS/*OsCOP1* の働きで分解されるため機能できないが、青色光によって PPS/*OsCOP1* の機能が阻害されることで、TF_X が安定化し *Ehd1* の発現を急激に誘導するモデルが考えられた (図 3B)。



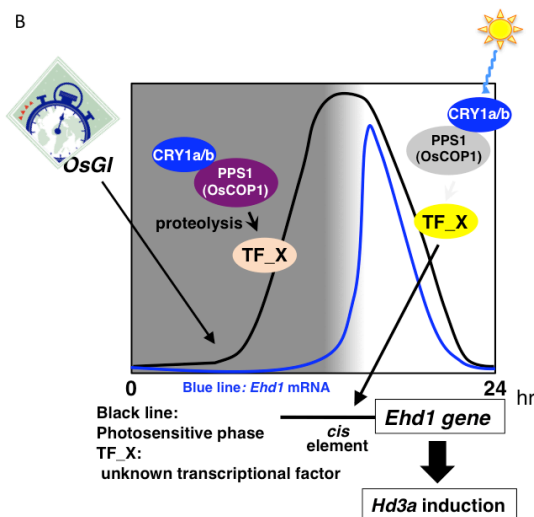


図 3. *Ehd1* の転写制御モデル

- A. 連続青色光照射下の *Ehd1p:LUC* レポーターの発現: *Ehd1p:LUC* 植物を短日条件下で生育後、明暗周期から連続青色光条件下で2時間毎に経時的に LUC の発光を計測した。幼苗 3 個体の結果。
- B. CRY1 青色光信号伝達系と *OsGI* の相互作用による朝の *Ehd1* の転写制御モデル

シロイヌナズナの COP1 は、夕方の CO タンパク質の安定性を制御することでフロリゲン遺伝子の転写制御に寄与する。しかしながら、今回明らかとした *Ehd1* の転写制御では、朝の転写制御に関わることから、イネとシロイヌナズナ間では、花成制御における COP1 の標的分子が異なる可能性が高い。

シロイヌナズナ *GI* の光周性花成反応での主な機能は *CO* 遺伝子の転写調節である。一方で、*OsGI* のイネ花成制御での機能は、*Ehd1* の転写制御である。従って、*GI* はそれぞれの植物種で日長認識に重要な役割を果たすが、具体的な働きは多様化していると考えられた。最近、*GI* 遺伝子と花成の関連は多くの植物で研究が進みつつあり、花成制御の中心的な因子であるという共通認識が生まれている。今後、植物生理学において、*GI* の機能解明は重要なテーマとなると期待できる。

(3) *Ehd1* プロモーター上の制御領域の同定と *Ghd7* 依存的な抑制との関係の解析

デリーションや塩基置換を持つ変異型 *Ehd1:LUC* 形質転換体を解析し、青色光応答性のシス配列が *Ehd1* の転写開始点から約 300bp 上流の約 70bp に存在することを明らかにした。このシス配列をプローブとして、酵母 1-hybrid スクリーニングを行い、GATA 型転写因子、AP2 型転写因子、Myb 型転写因子を単離した。現在、機能解析を進めている。

一方で、*Ghd7* の作用点を見出すことはできなかったが、*Ehd1p:LUC* 形質転換体は、青色光応答性を有するが、日長反応性を持たないことから、*Ghd7* が作用するシス配列は、今回用いたプロモーター外に存在することが強く示唆される。また、恒常的に *Ehd1* を誘導

する *pps* 変異体に対して光中断処理を行ったところ、光中断による抑制と *Ehd1* の促進が拮抗したことから、限界日長認識では、*Ghd7* の抑制が青色光の促進に先んじて起こることが重要であり、結果として、青色光受容後に *Ehd1* が急激に誘導されると考えられた。

今後、*Ehd1* の転写制御機構をさらに具体化のためには、*Ghd7* の発現制御に関わるシス配列を同定する必要がある。現在、ChIP-Seq の導入を検討している。*Ehd1* のプロモーター上での転写促進と転写抑制のスイッチング機構の解明は、植物の光環境適応機構の多様性を理解する上での 1 つモデルというだけでなく、遺伝子発現制御の観点からも新規な知見を提供するものと期待できる。

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 1 件)

1. Hironori Itoh, Takeshi Izawa (2013) The coincidence of critical day length recognition for florigen gene expression and floral transition under log-day conditions in rice. *Molecular Plant*, review, 6(3), 635-649.

[学会発表] (計 4 件)

1. 伊藤博紀, Gynheung An, 井澤毅 (2012) イネのフロリゲン Hd3a 遺伝子転写制御における OsELF3 の役割 第 53 回日本植物生理学会年会 2012. 3. 18. 京都産業大学
2. 伊藤博紀, 田中悠里 (特別研究員), Gynheung An, 井澤毅 (2013) OsELF3-1 遺伝子は、何故、イネの花成を制御できるようになったのか? 第 124 回育種学会 2013. 10. 13. 鹿児島大学
3. Hironori Itoh, Takeshi Izawa (2013) Molecular mechanisms of the critical day-length recognition triggering Hd3a expression in rice. The 6th Asia & Oceania Conference of Photobiology 2013. 11. 13. Sydney, Australia
4. Hironori Itoh, Takeshi Izawa (2013) Molecular mechanisms setting critical day length for florigen Hd3a expression in rice. SPP1530 Symposium, Genetic Variation of Flowering Time Genes and Application for Crop Improvement 2014. 3. 26. Bielefeld, Germany

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 博紀 (39)

独立行政法人 農業生物資源研究所

植物生産生理機能研究ユニット

研究員

研究者番号: 00466012