

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24688001

研究課題名(和文) フロリゲン活性化複合体の形成メカニズムの解明と開花調節への応用

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for formation of florigen activation complex and its application toward flowering control

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：フロリゲン(正体はFT/Hd3aタンパク質)は花芽形成の強力な運命決定因子であり、葉で合成された後に茎頂メリステムまで長距離輸送されて機能する。我々はこれまでフロリゲンの受容体、活性本体となる転写複合体「フロリゲン活性化複合体」を同定してきた。これらが茎頂メリステムでどう形成・分布し機能しているのかは極めて重要な問題であるが、詳細は不明であった。本研究では独自のイメージングの手法を駆使してこの問題を解決することを目的とした。研究の結果、茎頂メリステムにおけるフロリゲン自体及び複合体機能の分布を初めて明らかにし、またその過程でフロリゲン複合体による多機能性の分子基盤を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Florigen is a systemic floral signal that is generated in leaves and transported to the shoot apical meristem (SAM). The molecular nature of florigen is elucidated recently as the FT/Hd3a protein, and florigen receptor and functional transcriptional complex are identified. However, key questions regarding florigen complex remain to be answered. They include distribution of florigen and formation of the complex in the SAM. In this study these questions are answered through the unique technique of imaging SAM. The results indicated that florigen distributes throughout the course of inflorescence development to regulate its architecture. Molecular basis of multi-functionality of florigen is also revealed. The transcription factors (TFs) incorporated into the florigen complex determine the functional consequence of the resultant complex, and coincidence of florigen distribution and organ-specific expression of TFs determine the different functions in the different developmental contexts.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：フロリゲン メリステム イネ 花成

1. 研究開始当初の背景

フロリゲンは花芽形成の強力な運命決定因子であり、葉で合成された後に茎頂メリステムまで輸送されて機能する。フロリゲンの正体は長い間謎であったが、2007年にその正体がシロイヌナズナでは FT、イネでは Hd3a と呼ばれるタンパク質であることが明らかとなった。茎頂メリステム内の細胞に到達したフロリゲンは、細胞質で受容体である 14-3-3 タンパク質と相互作用した後、フロリゲン-受容体サブコンプレックスの状態に核移行して bZIP 型転写因子 OsFD1 とさらに相互作用し、転写複合体「フロリゲン活性化複合体」を形成する。フロリゲン活性化複合体はフロリゲンの活性本体であり、DNA 上で花芽形成遺伝子の転写を活性化することで花芽分化を誘導する。

上述のようにフロリゲンの機能メカニズムは明らかになりつつあるが、発生学的な文脈においてフロリゲンが花芽分化を誘導するメカニズムには未だ未解決の重要問題が多数残されている。フロリゲンはどのように茎頂メリステムに到達し、どのように分布を変えながら花芽分化を開始させるのか。フロリゲン活性化複合体はどこで形成され、どのように機能を発揮するのか。さらに近年、フロリゲンが花芽分化を超えた多様な機能を発揮することが明らかになりつつあるが、その分子基盤はどのようなものであろうか。これらの問題を解決するためには組織レベル、細胞レベルでフロリゲンを正確にイメージングする技術が必要となる。私達は独自のメリステム単離・観察技術を確認する中で世界唯一のフロリゲンイメージング系を開発することに成功した。本研究ではこれを駆使して上述の重要問題を解決し、花芽分化の制御に向けた基盤的知見を提供することを目指して実験を行った。

2. 研究の目的

(1) 茎頂メリステムにおけるフロリゲンの時空間的な分布変化を明らかにする。同時にフロリゲン活性化複合体の標的遺伝子である OsMADS15 の発現パターンをイメージングすることで、フロリゲンが分布を変えながら複合体の活性を制御する様子を可視化する。

(2) フロリゲン活性化複合体を構成しうる新規な転写因子として OsFD2 を同定し、OsFD2 がフロリゲン活性化複合体を形成す

るメカニズムを明らかにする。同時に、OsFD2 を含むフロリゲン活性化複合体の機能を明らかにする。

(3) フロリゲンが多様な機能を発揮する分子機構を明らかにするために、独自に見出したフロリゲンによる分枝促進を対象にしてフロリゲンの腋芽への長距離輸送とフロリゲン活性化複合体の関与を検討する。

3. 研究の方法

(1) フロリゲン Hd3a と GFP の融合遺伝子を Hd3a プロモーターによって発現する形質転換イネを作成し、その茎頂メリステムを観察する。観察時期は栄養生長期、生殖生長期への転換期、花序の形成過程とし、花芽分化の全過程におけるフロリゲンの分布を明らかにする。平行して、名城大学の寺田理枝教授と共同研究で、ジーンターゲットングを利用したフロリゲン下流遺伝子のレポーターイネを作成する。ここでは、フロリゲン活性化複合体の標的遺伝子 *OsMADS15* に蛍光タンパク質遺伝子 *mOrange* をノックイン・ジーンターゲットングによって挿入した植物を作成した。完成した植物の茎頂メリステムを花芽分化の全過程を通して観察した。

(2) OsFD2 がフロリゲン活性化複合体を形成するかどうかを検討するため、酵母 two-hybrid 法を用いて Hd3a 及び 14-3-3 との相互作用を検討した。また、植物細胞内における複合体の形成過程を観察するために、プロトプラストを用いた二分子蛍光補間法 (BiFC 法) による観察を行った。最後に、OsFD2 の機能を明らかにするために、OsFD2 及び複合体形成能を欠失させた変異型 OsFD2 を発現するイネを作出して表現型を観察した。

(3) Hd3a がイネの分枝を促進する可能性を検討するために、Hd3a の発現量を増加もしくは減少させたイネの表現型を観察した。また Hd3a が腋芽メリステムまで輸送される可能性を検討するために、維管束特異的に Hd3a-GFP を発現するイネの腋芽を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、フロリゲン活性化複合体が Hd3a による分枝促進を担っているかどうかを検討するために、フロリゲン活性化複合体を形成できない変異を導入した変異型 Hd3a を発現するイネの表現型を観察した。

4. 研究成果

(1) フロリゲン Hd3a が花成開始の数日後に茎頂メリステムで観察できることは既に報告されていたが、花成開始の前後やその後の花序形成過程にも観察できるかどうかは不明であった。そこで Hd3a-GFP を発現するイネを用いて茎頂メリステムの経時的な観察を行った(図1)。その結果、Hd3a-GFP は花成の誘導と同時にメリステムに蓄積を開始することが明らかとなった。さらに観察を継続した結果、Hd3a-GFP は花序の形成過程を通してメリステムに供給され続けることが明らかとなった(図1)。この結果は Hd3a が花成のみならず花序形成も制御することを示唆している。この可能性を検討するために、Hd3a の発現を RNAi によって抑制したイネ、及び Hd3a をその内在遺伝子の発現部位である維管束でより強く発現するイネを作成して穂の構造を評価した。その結果、Hd3a の RNAi は表現型を示さなかったものの、Hd3a の発現増強は穂の小型化を引き起こすことがわかった。この結果は、穂において Hd3a が枝メリステムから花メリステムへの転換を促進したことによると考えられる。

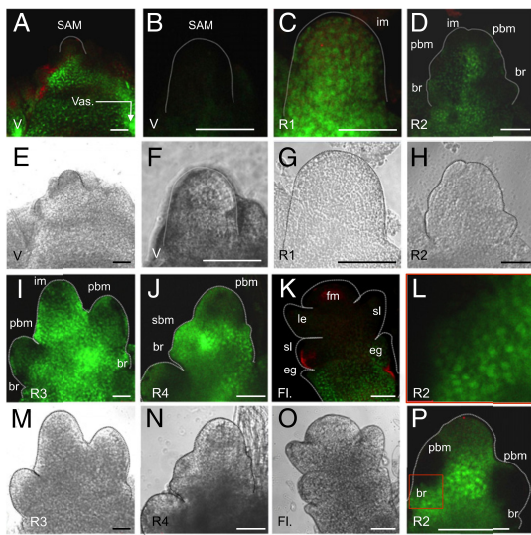


Fig. 1. Hd3a protein localization in the rice shoot apex during the transition from vegetative to reproductive stage. GFP fluorescence (A-D, I-L, and P) and bright-field images (E-H and M-O) of SAMs in *pHd3a:Hd3a-GFP* transgenic plants are shown. Development of the mature vegetative meristem (at 20–27 DAG) and different stages (R1–R4) of the inflorescence meristem (observed at 30–38 DAG and assigned to each stage by morphological characteristics) and FM (observed at >40–45 DAG) were analyzed. (A, B, E, and F) V, vegetative-stage plants at 27 DAG. At this time the plants display a meristem before the transition to reproductive development. Vas, stem vasculature. (C and G) R1, initial stage of floral transition with first bract formation. im, inflorescence meristem. (D, H, L, and P; L is an enlarged image of the area indicated by the red square in P) R2, early stage of primary branch meristem initiation. br, bract; pbm, primary branch meristem. (I and M) R3, late stage of primary panicle branch initiation. (J and N) R4, final stage of primary branch formation and initiation of secondary branch meristem (sbm). (K and O) Fl., floral organ development after R4. e.g., empty glume; fm, floret meristem; le, lemma; sl, sterile lemma. The red staining in the images indicates autofluorescence. (Scale bars, 50 μ m.)

次いでフロリゲン活性化複合体の標的遺伝子である OsMADS15 の発現パターンをイメージングした。このために、ジーンターゲ

ティングによって内在 OsMADS15 遺伝子座に mOrange をノックインしたレポーターイネを作成した。このイネの茎頂メリステムを花序形成の全過程を通して観察した結果、Hd3a の分布と OsMADS15 の発現は概ね一致することが明らかとなった。

さらにフロリゲン活性化複合体がいつどこで形成されるのかを明らかにするために、複合体の構成因子である 14-3-3 及び OsFD1 の発現領域を in situ hybridization によって調査した。その結果、14-3-3 及び OsFD1 は Hd3a が到達する前から既に茎頂メリステムで発現していることが分かった。これらの結果を総合すると、栄養生長期には 14-3-3 及び OsFD1 が茎頂メリステムで待ち構えており、Hd3a がここに到達するとフロリゲン活性化複合体が形成されて OsMADS15 遺伝子の発現が開始されることが明らかとなった。フロリゲン、受容体、FD、下流遺伝子が時空間的にオーバーラップして機能していることを示したのは本研究が初めてである。

(2) フロリゲン活性化複合体の重要な構成要素である FD に関する理解を深めるため、多数の被子植物から FD 様配列を収集して分子系統学的な解析を行った。その結果、FD は被子植物に広く保存されているがイネ科植物からは失われており、イネ科は独自に獲得した FD 様遺伝子を持つことが分かった。この中から OsFD1 のホモログ OsFD2 をクローニングして解析を行った。相互作用解析の結果、OsFD2 も OsFD1 と同様の結合様式でフロリゲン活性化複合体を形成することが分かった。一方でイメージング解析からは、FD2 を含むフロリゲン活性化複合体は FD1 を含む複合体とは異なるメカニズムで形成されることが示唆された。そのメカニズムは、OsFD2 がはじめ 14-3-3 によって細胞質にアンカリングされており、14-3-3 にフロリゲンが相互作用することで複合体全体の核移行が開始されるというものである。また形質転換イネを用いた機能解析の結果、OsFD2 は複合体形成に依存して葉の発生を制御することが示唆された。これらを総合して、フロリゲン活性化複合体は OsFD1 がリクルートされると花成を、OsFD2 がリクルートされると葉の発生を制御するように機能転換することが示唆された。

(3) Hd3a 過剰発現イネ及び発現抑制イネの解析及び Hd3a-GFP 発現イネの観察から、Hd3a が維管束から腋芽へ輸送されて腋芽の伸長促進を誘導することが明らかとなった。この分枝促進機能には Hd3a の輸送が必須であり、なおかつフロリゲン活性化複合体の形成能

も必須であった。興味深いことに、分子遺伝学的な実験からは、花成促進する複合体を担う OsFD1 の活性は分枝の促進機能には不要であることも示され、複合体は OsFD1 以外の転写因子をリクルートして分枝促進していることが示唆された。

これらの結果を総合し、フロリゲンが多様な機能を発揮するメカニズムとしてフロリゲン活性化複合体の転写因子部分が交換されるモデルを提案することができた。

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5件)

Tamaki, S., Tsuiji, H.(*Corresponding Author), Matsumoto, A., Fujita, A., Shimatani, Z., Terada, R., Sakamoto, T., Kurata, T., Shimamoto, K. (2015) FT-like proteins induce transposon silencing in the shoot apex during floral induction in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112 巻 E901-911 査読あり

*Tylewicz, S., Tsuiji, H., *Miskolczi, P. (*Co-first Authors), Petterle, A., Azeez, A., Jonsson, K., Shimamoto, K., Bhalerao, R.P. (2015) Dual role of tree florigen activation complex component FD in photoperiodic growth control and adaptive response pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112 巻 3140-3145. 査読あり

*Tsuiji, H. (*Corresponding Author), Tachibana, C., Tamaki, S., Taoka, K., Kyojuka, J., Shimamoto, K. (2015) Hd3a promotes lateral branching in rice. *Plant J.*, 82 巻 256-266 査読あり

Tsuiji H., Nakamura H, Taoka K, Shimamoto K. (2013) Functional diversification of FD transcription factors in rice, components of florigen activation complexes. *Plant Cell Physiol.* 54 巻 385-397. 査読あり

Tsuiji H., Taoka K, Shimamoto K. (2013) Florigen in rice: complex gene network for florigen transcription, florigen activation complex, and multiple functions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16 巻 228-235. 査読あり

[学会発表](計30件)

代表的な5件を下記に示す

辻 寛之 (2015)花成ホルモン・フロリゲンの機能に関する遺伝育種学的研究. 日本育種学

会第127回講演会 2015年3月21日 玉川大学(東京都町田市) **日本育種学会奨励賞受賞講演**

Tsuiji H (2014) Coordination of flowering and gene expression by rice Hd3a florigen. **12th International Conference on Rice Functional Genomics**. Oct. 17th, Tucson, AZ, USA. 国際学会 招待講演

Tsuiji H (2014) The flowering hormone florigen: its structure, receptor complex and beyond. **38th Naito Conference**, Oct. 9th, Sapporo. 国際学会 招待講演

Tsuiji H (2014) The flowering hormone florigen: its structure, receptor complex, and beyond. **Plant and Animal Genome (PAG) XXII** Jan. 14th, San Diego, CA, USA. 国際学会 招待講演

辻 寛之 (2013) フロリゲンの分子機能解明と植物改良への展開. **第52回ガンマワールドシンポジウム** 7月17日 三の丸ホテル 茨城県水戸市 招待講演

[図書](計1件)

Tsuiji H, Taoka K. (2014) Florigen signaling (in *The Enzymes*, editor: Yasunori Machida, Chentao Lin). Elsevier. pp116-146
[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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

辻 寛之 (Hiroyuki Tsuji)
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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：