

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840104

研究課題名(和文) 高等植物の維管束組織における概日時計機構と光周性花成メカニズムの解析

研究課題名(英文) The analysis of circadian clock and photoperiodic flowering pathway in the leaf vascular tissue

研究代表者

伊藤 照悟 (Ito, Shogo)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60632586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：概日時計機構により遺伝子発現制御されたCO-FT遺伝子の情報伝達系は日長の変化を感知し、最適な時期に花成を誘導することが知られている。CO遺伝子やFT遺伝子は葉の維管束組織の師部伴細胞に強い発現が見られる事が報告されている。COおよびFTが発現している組織の細胞のみから核を抽出・精製することで、その中に含まれるRNAを用いた組織特異的な遺伝子発現解析を行い、CO遺伝子の転写調節を担う新規因子の取得を試みた。

研究成果の概要(英文)：The circadian clock controlled photoperiodic flowering signal transduction pathways (so called CO-FT pathway) sense seasonal changes in day length and induce flowering at the most appropriate timing in Arabidopsis. Both CO and FT are mainly expressed in the companion cells of the young leaf phloem. Here, we first purified the nuclei and RNA from the specific cells in which CO and/or FT genes are expressed. Then purified tissue specific RNA was used for transcriptome analysis to obtain additional CO or FT transcriptional regulators in Arabidopsis.

研究分野：光合成生物の時間生物学

キーワード：光周性 花成 概日時計

1. 研究開始当初の背景

植物が栄養成長から生殖成長へと成長相を移行させることを花成と呼び、特に日長の変化によって花成が誘導される現象を光周性花成と呼ぶ。

植物が成長・発達していく過程で、花成時期の制御は非常に重要である。なぜならば植物が開花結実するタイミングは次世代へ残すことのできる種子の数を大きく左右するからである。モデル植物のシロイヌナズナは春に日長が長くなると花成を起こす長日植物である。植物は葉で日長の変化を計測していることが分かっており、光受容体からのシグナルと体内のリズムを制御している概日時計機構を利用して季節変化を感知している。

シロイヌナズナの概日時計機構と、その概日時計が制御する生理現象の中で光周性花成制御の研究は最も分子メカニズムの研究の盛んな分野の一つである。概日時計機構により遺伝子発現制御された転写因子 CONSTANS(CO)と、CO に転写が活性化され花成を導く花成誘導因子 FLOWERING LOCUS T(FT)の情報伝達系は日長の変化を感知し、最適な時期に花成を誘導することが知られている。CO 遺伝子や FT 遺伝子は葉の維管束組織の師部伴細胞に強い発現が見られる事が報告されている。CO の転写調節因子はこれまで幾つかの抑制因子が報告されていたが、転写活性化因子の報告は無かった。

申請者は近年 CO のプロモーターに直接結合する FBH と名付けた転写活性化因子を報告した。しかしながら、DNA ウイルス由来の CaMV35S プロモーターを用いて構成的かつほぼ全ての組織で FBH を強力に発現させた形質転換株において、CO の転写量(振幅)は増大したが、時空間的な発現パターンを変化させることは出来なかった。このことから、FBH 因子群が唯一の CO の転写活性化因子ではないことは明らかであり、維管束組織に特異的な未知の因子が FBH の機能を助け CO を発現させていることは明白であった。

これらの知見が「光周性花成機構の全貌解明には、維管束組織に着目した概日時計機構と CO-FT モジュールの詳細な解析が必須である」という考えに至った。

2. 研究の目的

植物が概日時計機構を利用し「どの様に季節変化を感知し、いかにして最適なタイミングで花成を誘導するのか？」を解明するという最終的な目的のもとで、高等植物シロイヌナズナを用いて維管束組織における時計関連遺伝子の動態と光周性花成の鍵調節因子 CO の転写制御に焦点を当て解析を行う。

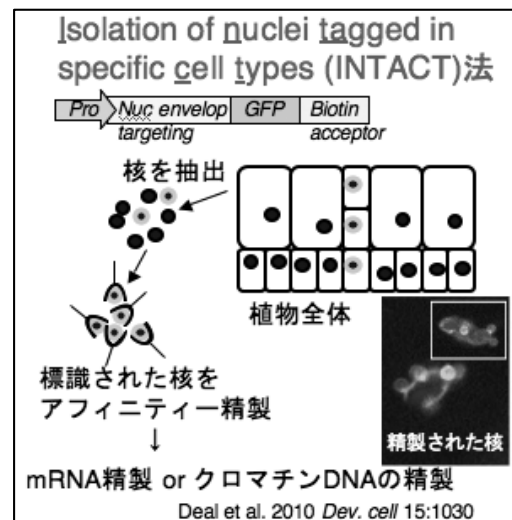
CO や FT の発現している維管束組織の細胞は植物全体の細胞数から考えるとわずか数%

の割合しか存在しない。

申請者は Isolation of nuclei tagged in specific cell types (INTACT)法(Deal and Henikoff *Dev. Cell* 15 1030-1040 2010)を用いることにより CO や FT 遺伝子が発現している細胞の核を特異的に精製することで、これまでの植物全体を用いた解析では、維管束組織の細胞数の少なさのために、見出す事ができていなかった重要な因子の機能を解明を目指した。

3. 研究の方法

CO, FT の 2 遺伝子(2 種ともに維管束師部メインに発現)が発現している細胞が花成制御を担っている維管束師部組織であると考えられるので、これら 2 種類の遺伝子発現のある細胞での発現解析で共通して発現の高い遺伝子は CO-FT シグナル伝達経路に重要な役割を果たしている可能性が高い。そこで、上記 2 つの遺伝子のプロモーターをクローニングし、遺伝子発現場所の確認をするとともに、これらプロモーターの制御下で NTF (nuclear targeting fusion protein)を発現させることで維管束組織の師部組織の細胞核を生成するための植物体をシロイヌナズナで作成した。この方法により、着目した細胞のみを特異的に精製・濃縮することにより他の多くの細胞からのノイズによって埋もれてしまったために、これまで検出できなかった 1 組織特異的な遺伝子の発現変動の検出を試みた。



上記植物を用いて特異的組織から精製した核から RNA をさらに抽出することによって、次世代シーケンサーによる発現解析を行った。これまでの解析で CO の上流プロモーター-DNA (1500bp) に結合する転写因子を酵母 One-Hybrid 法を用いてスクリーニングし、数十種類の候補遺伝子を発見していた。RNA-seq の結果と照らし合わせて絞り込むこ

とで、偽陽性を除いた真の *CO* プロモーター結合転写因子(抑制因子・活性化因子)を見出した。

これらの候補遺伝子を解析することで、*CO* の転写活性化因子 *FBH* の機能を助ける新規なタンパク質なども同様に見出すことが可能であると考えられ、光周性花成機構のより詳細なメカニズム解析を試みた。

4. 研究成果

光周性花成応答の Key 遺伝子 *CO*, *FT* が維管束組織特異的に発現していることに着目し、維管束組織特異的な概日時計機構、特異的な花成制御因子の存在を考慮に入れ、INTACT 法を用いることにした。そこで、*CO* の発現している組織、*FT* の発現している組織のみから細胞核を抽出・精製することを可能にする形質転換植物体を作成することに成功した。これらに加えて、維管束師部で発現するスクローストランスポーターをコードする *SUC2* 遺伝子のプロモーターも用いることにした。また花成を制御する遺伝子の変異体バックグラウンド (*gi-2*, *co-101*, *CDF1-ox*, *GI-ox* and *FBH1-ox*) においても組織特異的な遺伝子の発現変動を解析するために、掛け合わせによって INTACT 法を適応するための NTF タンパク質を発現する植物体をそれぞれ作出した。研究開始時には、RNA の部分分解が問題となったが、組織特異的な細胞から核を生成するときに出来るだけ分解を少なくするために生成過程の簡略化・迅速化を行うことに成功した。*CO* 遺伝子の発現が高く *FT* 遺伝子の発現ピークとなる、長日条件の明期 16 時間目のサンプルを用いて、組織特異的に発現している遺伝子群のリストを得ることができた。酵母 One-Hybrid 法を用いて *CO* の上流プロモーター DNA (1500bp) に結合する転写因子をスクリーニングした結果と、今回の候補遺伝子の中から *CO* 遺伝子の転写調節を担う因子を絞り込み、既知の *CO* 転写活性化因子 *FBH* 群と相互作用しながら協調的に *CO* の転写を活性化する新規因子群を同定することができた。新規因子群の多重変異体解析により遺伝学的に転写活性化因子の遺伝学的な相関を見出すことができた。現在論文を執筆中である。

ウキクサを用いた花成経路の研究では、シロイヌナズナで得られた知見から、ウキクサ植物における時計遺伝子ホモログ、花成制御遺伝子のホモログ遺伝子の形質転換体の作成を行い解析を進めた。既知の花成回路に加えて新たにストレス条件下における花成を促進する経路の存在が示唆され、今後の解析の基礎となる結果が得られている。

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 4 件)

Hannah A. Kinmonth-Schultz, Xinran Tong, Jae Lee, Young Hun Song, Shogo Ito, Soo-Hyung Kim, Takato Imaizumi. "Cool night-time temperatures induce the expression of *CONSTANS* and *FLOWERING LOCUS T* to regulate flowering in *Arabidopsis*" *New Phytologist*, doi: 10.1111/nph.13883, 2016, 査読有り

Takafumi Yamashino, Saori Yamawaki, Emi Hagui, Hanayo Ueoka-Nakanishi, Norihito Nakamichi, Shogo Ito, Takeshi Mizuno. "Clock-Controlled and *FLOWERING LOCUS T* (*FT*)-Dependent Photoperiodic Pathway in *Lotus japonicus* I: Verification of the Flowering-Associated Function of an *FT* Homolog" *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 77, No. 4, 747-753, 2013, 査読有り

Takafumi Yamashino, Yuji Nomoto, Severine Lorrain, Miki Miyachi, Shogo Ito, Norihito Nakamichi, Christian Fankhauser, Takeshi Mizuno. "Verification at the protein level of the PIF4-mediated external coincidence model for the temperature-adaptive photoperiodic control of plant growth in *Arabidopsis thaliana*" *Plant Signaling and Behavior*, Vol. 8, No. 3, e23390, 2013, 査読有り

Young Hun Song, Shogo Ito (joint first authorship), Takato Imaizumi. "Flowering time regulation: photoperiod- and temperature-sensing in leaves" *Trends in Plant Science*, Vol. 18, No. 10, 575-583, 2013, 査読有り

伊藤照悟 "光周期による花成ホルモン *FT* の発現メカニズム" *化学と生物* Vol. 51, No.12, 2013, 査読有り

[学会発表](計 8 件)

伊藤照悟, Golembeski Greg, Kwon Micheal, Breton Ghislan, 小山知嗣, 高木優, Kay Steve A., 今泉貴登, Identification of transcriptional Regulators Controlling *CONSTANS* Expression for Photoperiodic Flowering in *Arabidopsis*, 第

55 回日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 18 日-20 日, 富山大学 (富山県, 富山市)

Shogo Ito, Day-length sensing mechanisms regulating the timing of the floral transition in Arabidopsis leaf vasculature, Bristol-Kyoto Workshop on Plant Environmental Signaling, 2014 年 9 月 22 日-25 日, Bristol UK

伊藤照悟, 維管束組織の細胞時計と光周性花成応答, 京大植物縦横無尽の会 ワークショップ, 2014 年 11 月 14 日, 京都大学 (京都府, 京都市)

伊藤照悟, 内海陽子, 小山時隆, ウキクサ類におけるカルス誘導とアグロバクテリウム共培養による安定形質転換体作出の試み, 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月 16 日-18 日, 東京農業大学 (東京都, 東京)

Shogo Ito, Transient and Agro-mediated stable transformation method for circadian clock analysis in Lemna species, RNA and Clock 2015 "Epigenetic Landscape in Biological Rhythms", 2015 年 3 月 25 日-26 日, 淡路夢舞台 (兵庫県, 淡路市)

Shogo Ito, Yoko Utsumi, Tokitaka Oyama, Improvement of fast and efficient Agrobacterium mediated stable transformation methods for Lemna species, The Third International Conference on Duckweed Research and Applications, 2015 年 7 月 3 日—4 日, 京都大学 (京都府, 京都市)

伊藤照悟, 上野賢也, 内海陽子, 小山時隆, ウキクサ植物の発光レポーター安定形質転換体を用いた概日リズム解析, 第 22 回日本時間生物学会学術大会, 2015 年 11 月 21 日—22 日, 東京大学 (東京都, 東京)

伊藤照悟, 内海陽子, 小山時隆, 単子葉植物のコウキクサにおける *CaMV35S* ならびに *ZmUBQ* プロモーターの転写活性の LUCIFERASE レポーターを用いた時空間解析, 第 57 回日本植物生理学会年会, 2016 年 3 月 18 日—20 日, 岩手大学 (岩手県, 盛岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://cosmos.bot.kyoto-u.ac.jp/clock/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 照悟 (Ito, Shogo)
京都大学・理学研究科・助教
研究者番号 : 60632586