

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440154

研究課題名(和文)新規光周性花成抑制因子の探索

研究課題名(英文) Screening of novel repressors of photoperiodic flowering

研究代表者

高瀬 智敬 (TAKASE, Tomoyuki)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：30392012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：fkf1サプレッサー変異体のスクリーニングを行い、EF1と名付けた花成抑制因子を単離した。ef1 fkf1二重変異体は日長に関わらず花成が促進したことから、EF1は光周期経路とは独立して花成を抑制することが示された。ef1変異体では一日を通してFT遺伝子の発現量が増加し、ef1 ft二重変異体は野生型に比べて花成が遅延したことから、EF1による花成の抑制には、FT遺伝子の発現抑制が重要であることが示唆された。FT遺伝子の発現は概日時計によっても制御されるが、ef1変異は概日リズムの周期に影響しなかった。

研究成果の概要(英文)：Two ef1 mutants, ef1-1 and ef1-2, that flowered earlier than the fkf1 mutant under long-day conditions were isolated by fkf1 suppressor screening. ef1 fkf1 double mutants showed accelerated flowering time compared to the control under both long-day and short-day conditions, indicating that the repression of flowering time by EF1 was independent of the photoperiodic pathway. FT expression of ef1-1 and ef1-2 was higher than that of wild-type throughout the day, and ef1 ft double mutants showed delayed flowering time compared to wild type. These results suggested that down-regulation of FT expression is important for repression of flowering time by EF1. ef1 mutation was not affect the period length of circadian rhythm, although circadian clock affects FT expression.

研究分野：植物生理学

キーワード：光周性 花芽形成 シロイヌナズナ 環境応答

### 1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナでは、フロリゲンである FT が葉で作られ、維管束を伝わり茎頂で花芽決定遺伝子の発現を活性化することで花成が誘導される。FT の発現は、CO によって制御されており、長日植物であるシロイヌナズナでは、CO の発現制御とタンパク質の安定化が日長認識に重要であると考えられている。

シロイヌナズナの FKF1 は青色光受容に関わる LOV ドメインを有する F-box タンパク質である。F-box タンパク質は Skp1, Cul1, Rbx1 等と複合体を形成することで、ユビキチンプロテアソーム系を介したタンパク質分解に関わる。FKF1 は花成を抑制する転写因子である CDF1 タンパク質の分解に関わることで、光周性花成を促進する働きがある。

FKF1 は GI と複合体を形成することで、CDF1 等の標的タンパク質の分解に関わるが、GI との複合体との形成は青色光の照射によって誘導される。また、FKF1、GI のどちらの発現も概日時計により制御されていることから、FKF1 を介した光周性花成経路は、外部の光環境と概日時計の影響を受けることが知られている。光シグナルと概日時計による制御は他の光周性花成制御因子でも見受けられ、光周性花成経路はこれら外的、及び内的な要因によって複雑に制御されていることが知られていた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は *fkf1* 変異体の花成遅延が回復した *fkf1* サプレッサー変異体を解析することで、新規の光周性花成を抑制する因子を単離し、光シグナルと概日時計によって複雑に制御された光周性花成制御経路の一端を明らかにすることである。主要な計画項目は、(1) 長日条件下で *fkf1* 変異体よりも花成が促進されたサプレッサー変異体のスクリーニングとその原因遺伝子の同定、(2) 同定した新規花成抑制因子の光周性花成制御機構の解明、(3) 同定した新規花成抑制因子が光シグナル経路、及び概日時計の制御機構に影響するかの検証、の三つである。

*fkf1* 変異体では光周性花成を促進する FT 遺伝子の発現は抑えられているが、本研究ではこの FT 遺伝子の発現を指標にすることで、光周性花成経路が促進されたサプレッサー変異体を選抜し、光周性花成を抑制する因子を複数単離することを目標とした。そしてそれぞれの因子の光シグナル経路や概日時計の経路に対する働きを調べた。

### 3. 研究の方法

#### (1) *fkf1* サプレッサー変異体のスクリーニング

長日条件下で花成が遅延する *fkf1* 変異体の種子 11,500 粒を EMS 処理することで突然変異を誘発した。自家受粉により得られた M<sub>2</sub> 植物を長日条件下で育成し、花成が促進されたサプレッサー変異体のスクリーニングを行

った。単離されたサプレッサー変異体を長日条件、及び短日条件下で育成し、花成時期を測定した。花成が野生型程度まで促進された変異体について、FT 発現量を real-time PCR により測定した。

#### (2) ポジショナルクローニングによる変異遺伝子の同定

Col 背景の *fkf1* 変異体と Ler を 4 回交配し、Ler 背景の *fkf1* (*fkf1*/Ler) を作製した。スクリーニングで得られた *fkf1* サプレッサー変異体と *fkf1*/Ler を交配し、ポジショナルクローニングによる変異遺伝子の同定を行った。ポジショナルクローニングには TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) で公開されている SSLP マーカーに加え、新たに設計した SSLP マーカー、dCAPS マーカーを使用した。

#### (3) 光周性花成制御遺伝子の発現解析

*fkf1* サプレッサー変異体を長日条件、及び短日条件下で 10 日間育成し、その後 4 時間毎にサンプリングをした。これらを用いて花成制御遺伝子の経時的な発現変動を real-time PCR により調べた。

#### (4) 概日リズムの測定

ルシフェラーゼレポーター植物体と *fkf1* サプレッサー変異体を交配し、ルシフェラーゼレポーターが導入されたサプレッサー変異体を取得した。これらサプレッサー変異体をルシフェリンを含む培地で 12 時間明期、12 時間暗期の明暗サイクル下で 5 日間育成し、その後連続明条件下で概日リズムを測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) *fkf1* サプレッサー変異体のスクリーニングと特徴づけ

*fkf1* 変異体の種子 11,500 粒を EMS 処理し、M<sub>2</sub> 植物を 16 時間明期、8 時間暗期の長日条件下で育成したところ、*fkf1* 変異体よりも明らかに花成が促進されたサプレッサー変異体をおよそ 50 ライン取得した。それらサプレッサー変異体の中で、顕著に花成が促進されたラインについて FT の発現量を real-time PCR で解析した (図 1)。

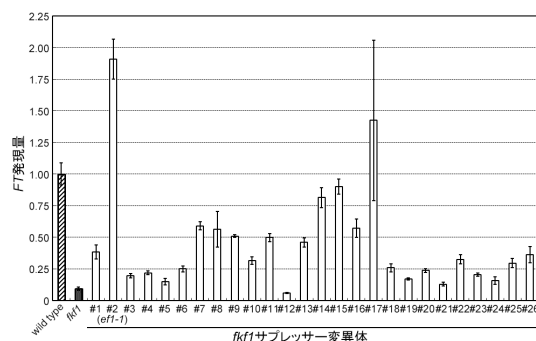


図 1 サプレッサー変異体の FT 発現量

多くのサプレッサー変異体で FT の発現量

が *fkf1* 変異体よりも増加しており、これらサプレッサーでは光周性花成経路が活性化していることが期待された。そこで、サプレッサー変異体の花成促進が光周期に依存しているか明らかにするために、長日、及び短日条件での花成時期を測定したところ、日長に関わらず花成が促進される変異体以外にも、長日条件でのみ花成が促進される変異体が見つかった。

シロイヌナズナでは概日時計の制御因子である TOC1 や ELF3 などが花成を抑制する働きがあることが報告されているが、これらの変異体では短日条件でも花成が促進され、日長による制御が見られない。しかし、光周性花成の制御には概日時計だけでなく光シグナル経路も重要な役割を果たしており、本研究では日長の認識に関わる因子に変異が生じていることが期待できる長日条件でのみ花成が促進されるサプレッサー変異体を複数単離することが出来た。

### (2) *fkf1* サプレッサー変異体のポジショナルクローニング

変異の原因遺伝子を単離するためにサプレッサー変異体のポジショナルクローニングを行ったところ、第一から第五染色体までの全ての染色体上にサプレッサーの花成促進の原因と考えられる変異が分布していた。単離した変異の原因遺伝子には *CLF* のように既知の花成抑制遺伝子も含まれていたが、後述する EF1 など、花成制御についての報告がない新規の花成抑制因子も単離することが出来た。

長日条件でのみ花成が促進したサプレッサー変異体の変異の原因遺伝子の単離を進めたところ、二つの変異体で *HY2* 遺伝子に変異が見つかった。*HY2* は光受容体フィトクロムの色素団合成酵素であり、フィトクロムは光周性花成を促進する CO タンパク質の安定性に関わっていることが知られている。

本研究では新規の光周性花成抑制因子の単離を目標としているが、長日条件で光シグナルと相互作用しながら光周性花成を抑制する因子である *HY2* が単離されたことから、今回のスクリーニングの有効性を示すことが出来た。長日条件でのみ花成が促進したサプレッサー変異体の一つでは、変異の原因遺伝子が第五染色体の上腕の領域に座乗しており、この領域には既知の光周性花成制御遺伝子は存在していない。これを含めた残りのサプレッサー変異体についても解析を進めることで、目標とした新規の光周性花成抑制因子の単離を進めていく予定である。

### (3) 新規花成抑制因子 EF1 の解析

#### *ef1* 変異体の花成時期

*ef1 fkf1* 二重変異体は、長日条件で著しく花成が促進されるサプレッサー変異体として単離された。この二重変異体では *FT* の発現量が野生型よりも増加していたことから、

長日、及び短日条件で花成時期を測定したところ、どちらの条件でも野生型よりも著しく花成が促進された(図2)。

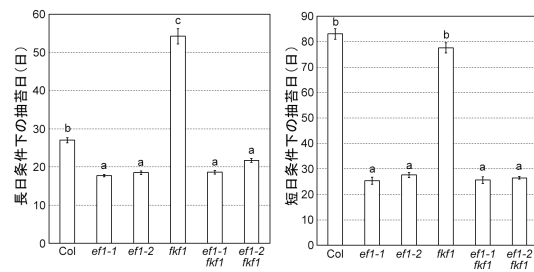


図2 *ef1* 変異体の花成時期

*ef1 fkf1* 二重変異体が日長に関わらず花成が促進されたことから、EF1 は光周性花成経路とは独立して *FT* の発現を抑制することが示唆された。また *fkf1* の変異を野生型に戻した *ef1* 変異体の花成時期が *ef1 fkf1* 二重変異体のそれと違いが見られなかったことから、EF1 は FKF1 と独立して花成を抑制することが示唆された。

#### EF1 遺伝子の同定

スクリーニングでは *ef1-1 fkf1*、*ef1-2 fkf1* と名付けた二つの *ef1 fkf1* 二重変異体のアレルが単離されており、それぞれについてポジショナルクローニングを行ったところ、どちらの *ef1 fkf1* 二重変異体も DNA 合成に関わる因子をコードする EF1 遺伝子に変異が生じていた。EF1 は新規の花成抑制因子であり、それぞれの変異体での EF1 遺伝子の cDNA 塩基配列を調べたところ、どちらも一部のアミノ酸配列が欠失した異常な EF1 タンパク質が作られることが示唆された。また、ABRC から入手した二つの *ef1* T-DNA 挿入変異体 (*ef1-3*、*ef1-4*) ではどちらも T-DNA 挿入のホモ接合体が致死となったことから、EF1 はシロイヌナズナの生存に必須であることが示された。

#### EF1 の作用点の解析 (図3)

EF1 の作用点を明らかにするために DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、*ef1* 変異体では *FT* 遺伝子の発現が増加していた。そこで、*ef1* 変異体での *FT* 遺伝子など花成制御遺伝子の経時的な発現変動を調べた(図3)。

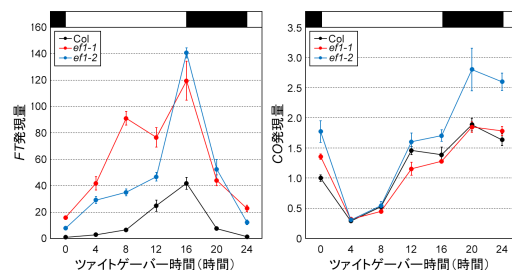


図3 *ef1* 変異体の *FT* と *CO* の発現変動

*ef1* 変異体では一日を通して *FT* 遺伝子の発現が野生型よりも増加していたが、*CO* 遺伝子

など *FT* 遺伝子の発現を制御するいくつかの遺伝子の発現パターンは野生型のそれと違いが見られなかった。*ef1* 変異体と *ft* 変異体の交配で得られた *ef1 ft* 二重変異体は野生型よりも著しく花成が遅延したが、*ft* 変異体よりはわずかに花成が促進していた。これらの結果から、*FT* 遺伝子の発現抑制が EF1 の花成抑制に重要であるが、*FT* 遺伝子以外の何らかの標的も存在することが示唆された。

*FT* 遺伝子の発現は、日長だけではなく概日時計も影響される。そこで EF1 が概日時計の制御に關与するか否かを明らかにするために、ルシフェラーゼレポーター植物体と *ef1* 変異体を交配し、発光リズム測定装置を用いて概日リズムを測定した。*ef1* 変異体の生物発光リズムの周期はコントロールのそれと違いは見られなかったことから、*ef1* 変異体における *FT* 遺伝子の発現の増加は、概日時計による影響ではないことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

高瀬 智敬、矢作 道枝、清末 知宏、シロイヌナズナ早咲き変異体 *ef1* の解析、第 80 回日本植物学会、2016 年 9 月 16 日～2016 年 9 月 19 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

高瀬 智敬、矢作 道枝、清末 知宏、シロイヌナズナ新規花成抑制因子 EF1 の機能解析、第 34 回日本植物細胞分子生物学会、2016 年 9 月 1 日～2016 年 9 月 3 日、信州大学繊維学部 (長野県上田市)

〔その他〕

ホームページ等

学習院大学理学部生命科学科清末研究室ホームページ

[http://www.gakushuin.ac.jp/univ/sci/bio/laboratory/detail\\_kiyosue/theme.html](http://www.gakushuin.ac.jp/univ/sci/bio/laboratory/detail_kiyosue/theme.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高瀬 智敬 (TAKASE, Tomoyuki)

学習院大学・理学部生命科学科・助教

研究者番号：30392012