

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850020

研究課題名(和文) 越冬器官の形成・分化に関わる開花関連遺伝子の新規機能の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of flowering-related gene in over-wintering buds of gentian

## 研究代表者

今村 智弘 (Imamura, Tomohiro)

東京理科大学・基礎工学部・研究員

研究者番号：20468705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、多年生植物リンドウから単離された開花関連遺伝子GtFT1およびGtSOC1L、GtFLCについて、花芽とは異なる越冬器官における新規機能についての解析を行なった。GtFT1タンパク質の地下組織の移行に関して、複数の実験を実施したが、タンパク質が移行している結果を得ることができなかった。一方、リンドウ越冬組織における詳細な発現解析から、GtSOC1Lが越冬組織の越冬芽で強い発現を示すことを見出した。さらにGtSOC1L過剰発現体で越冬組織を過剰に形成することも見出した。本研究よりGtSOC1Lがリンドウの越冬組織の形成において重要な働きを示すことが示唆された。

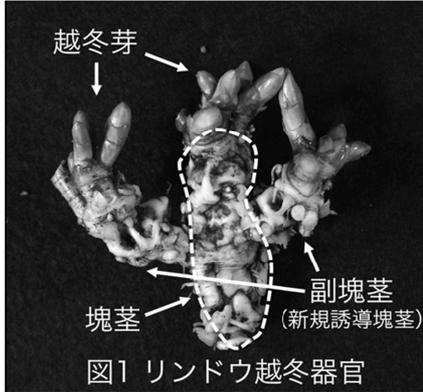
研究成果の概要(英文)：Gentian is a perennial plant and known as ornamental flowers. To reveal the mechanism of overwintering buds formation, we first evaluated the movement of GtFT1 protein from aerial- to underground- organ in gentian. However, we could not find the GtFT1 protein movement. Next, we performed expression analysis of overwintering buds. GtSOC1L was highly expressed in overwintering buds, whereas GtFLC was broadly expressed in overwintering buds. Moreover, Transgenic gentian plantlets expressing GtSOC1L showed excessive formation of overwintering buds compared to wild type. These results implied that the GtSOC1L play important role in the formation of overwintering buds in gentian.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：休眠 越冬 多年生植物 リンドウ

1. 研究開始当初の背景

多年生の宿根草であるリンドウは、越冬器官である塊茎と越冬芽を形成することで冬期に生存できる(図1)。即ち、越冬器官の形成は、翌春の生存を決定付けるものであり、開花と同様に重要な性質だが、植物の越冬器官形成に関する知見は僅かであり、その詳細な分子機構は不明なままである。



これまで、申請者はリンドウの開花メカニズムの解明を目指し、開花関連遺伝子の機能解析を行なった(実績1)。この研究過程から、FLOWERING LOCUS T、CONSTANS、SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO、FLOWERING LOCUS C のリンドウオルソログである *GtFT1*、*GtCO*、*GtSOC1L*、*GtFLC* が、越冬器官形成に関与する興味深い知見を得ている。具体的には、*GtFT1* と *GtCO* は、花成誘導期に顕著な発現上昇が観察される一方で、「花成終了後の塊茎形成時に地上部で再び発現が上昇する」「塊茎での *GtFT1* 遺伝子発現は見られない

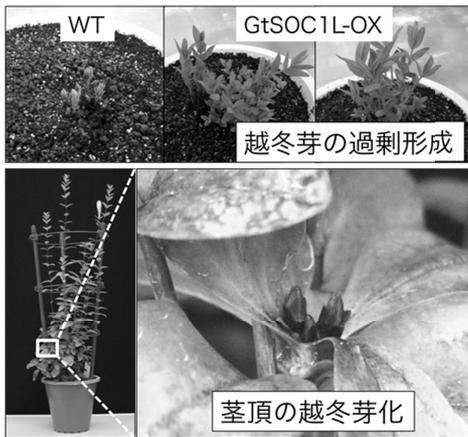


図2 *GtSOC1L*過剰発現体

がタンパク質は存在する」結果を得ている。近年、ジャガイモにおいて *FT* と *CO* が塊茎形成を誘導することが報告されており (Navarro et al, 2011 Nature)、*GtFT1* と *GtCO* も同様にリンドウの塊茎形成に関わる可能性が高い。

また *GtSOC1L* と *GtFLC* は、花成とは明確な関与は認められなかったが、「越冬芽形成期に発現が上昇する」「過剰発現体は、越冬芽数が顕著に増加する(図2)」結果が得られた。また、通常、越冬芽は地表または地

下部に形成されるが、「過剰発現体の茎頂で、越冬芽への転換が観察される(図2)」ことから、*GtSOC1L* と *GtFLC* が越冬芽形成を誘導する可能性が高い。また、先行研究から、*GtCO*、*GtSOC1L*、*GtFLC* が、*GtFT1* の発現を調節することが分かっている。越冬芽は塊茎形成後に発生するため、一連の器官形成過程における形成器官の転換が、これら遺伝子の発現制御によって調節されていることが予想される。

2. 研究の目的

本課題では、リンドウを多年生花卉のモデルとし、越冬器官形成における *GtFT1* および *GtSOC1L*、*GtFLC* の役割を明らかにする。塊茎形成の解析では、形成期における *GtFT1* の地下部への移行を証明し、さらに地下部における *GtFT1* の相互作用因子および下流制御因子を探索する。越冬芽形成の解析では、形成過程における *GtSOC1L* と *GtFLC* の作用箇所を特定し、越冬芽における *GtSOC1L* と *GtFLC* の相互作用因子および下流制御因子を探索する。これらの解析で得られた情報を統合して、開花関連遺伝子による越冬器官形成機構を解明する。

本課題により、越冬器官形成における開花関連遺伝子の働きを、塊茎と越冬芽それぞれの器官で明らかにすることで、開花関連遺伝子の新規機能の解明することができる。本課題で得られた知見は、植物の越冬器官形成に関する研究の発展に貢献できる。

3. 研究の方法

本課題では、リンドウの越冬器官の形成過程における、開花関連遺伝子の機能解明を目的とする(図3)。

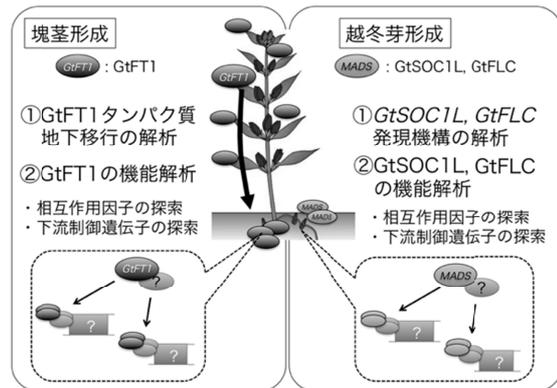


図3 越冬器官形成機構の解明

具体的な研究内容は、*GtFT1* と *GtCO* が関与する塊茎形成について、*GtFT1* タンパク質の地下部への移行の調査、塊茎における相互作用因子および下流制御因子の探索と同定を実施する。*GtSOC1L* と *GtFLC* が関与する越冬芽形成について、作用箇所の特定、相互作用因子および下流制御因子を同定する。これらの解析から、開花関連遺伝子を介した越冬器官の形成機構を明らかにする。方法の詳細を以下に示す。

#### GtFT1が関与する塊茎形成機構の解明

タグを融合した GtFT1 過剰発現リンドウを作製し、接ぎ木実験によって GtFT1 が地下部へ移行するか評価する。接ぎ木がうまく行かない場合、GtFT1 タンパク質を発現するウイルスベクターを地上部に接種し、ウイルスベクター由来 GtFT1 の地下部への移行を評価する。

#### GtSOC1LとGtFLCが関与する越冬芽形成機構の解明

越冬芽形成過程における GtSOC1L と GtFLC の発現時期および詳細な部位を特定する。過剰発現体の越冬芽について RNA-Seq を実施し、発現量が変動している遺伝子を探索する。GtSOC1L と GtFLC の相互作用因子および下流制御因子を探索するため、タグ融合タンパク質を発現する形質転換リンドウを作製する。

#### 4. 研究成果

##### GtFT1が関与する塊茎形成機構の解明

継時的な発現解析により、GtFT1 は花成時に一過的に発現が誘導したのちに、越冬組織が形成時される時期に再び発現が誘導することを見出している。越冬組織形成期に誘導する GtFT1 の越冬組織形成への関与を明らかにするために、GtFT1 タンパク質の越冬組織への移行を検証した。

GtFT1 タンパク質の移行を評価するために、GtFT1 に FLAG タグを融合したタンパク質を発現する形質転換リンドウを作成した。この形質転換体は GtFT1 過剰発現体と同様に培養組織で花芽を形成することを確認した。組織培養個体でのリンドウの接木実験が報告されていることから、この形質転換体を穂木として、非形質転換体を台木とした接木実験を試みた。しかしながら、本研究では組織培養個体での接木に成功することができなかった。また、別の手法としてウイルスベクターを用いた解析も行ったが、GtFT1 タンパク質の移行を評価することができなかった。そこで GtFT1 過剰発現リンドウについて越冬組織の形態を観察した。その結果、GtFT1 過剰発現リンドウの越冬組織は、コントロールに比べ越冬芽数が減少していた。この結果から GtFT1 は、越冬組織の形成を抑制している可能性が示唆された。これより、越冬組織形成時期に発現が誘導される GtFT1 は、越冬組織形成の誘導には関与しておらず、別の働きをしていることが予想された。

##### GtSOC1LとGtFLCが関与する越冬芽形成機構の解明

越冬芽形成過程で発現が誘導する MADS-box 転写因子 GtSOC1L と GtFLC について、越冬組織での機能を解明するために、まず越冬組織でのこれら遺伝子の部毎の発現解析を行なった。その結果、GtFLC は、越冬組織である越冬芽および塊茎、副塊茎において幅広い発現を示した。一方、GtSOC1L は、越冬組織の越冬芽で高い発現を示し、その他の組

織では低い発現を示した(図4)。

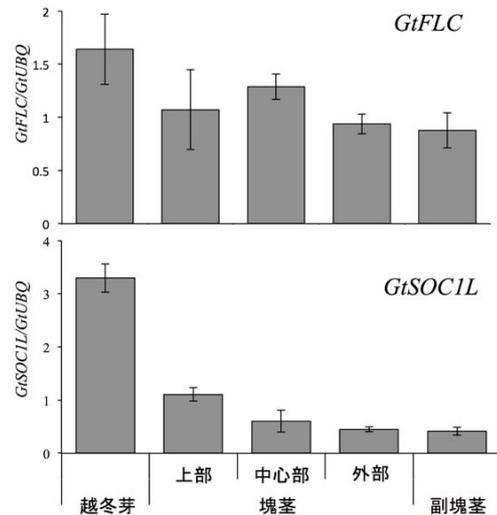


図4 越冬組織における発現解析

それぞれの過剰発現リンドウを作成し、越冬組織の形態を観察したところ、GtFLC 過剰発現体では、コントロールと同じ形質を示したが、GtSOC1L 過剰発現リンドウでは、GtSOC1L の発現量に比例して越冬芽の本数が増加していた(図5)。さらに GtSOC1L タンパク質の細胞内局在を観察したところ核に局在することが明らかとなった。以上の結果より、GtSOC1L が、越冬組織の転写を調節することにより越冬芽の形成を促進していることが示唆された。今後、さらなる解析により越冬芽形成のより詳細な機構を明らかにする。

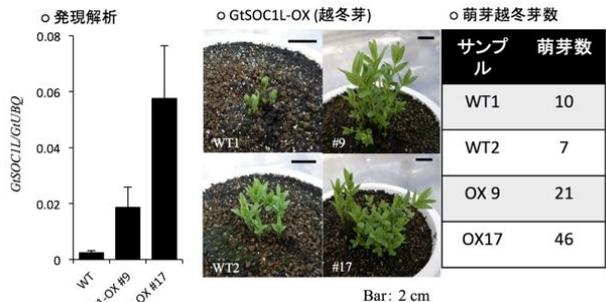


図5 GtSOC1L過剰発現体の解析

#### 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)

Imamura T, Sekine KT, Yamashita T, Kusano H, and Shimada H. (2016) Production of recombinant thanatin in watery rice seeds that lack an accumulation of storage starch and proteins. J. Biotechnol. 219, 28-33, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.12.006 (査読あり)

Imamura T, Fugita K, Tasaki K, Higuchi A, and Takahashi H (2015) Characterization of spermidine synthase and spermine synthase - the polyamine-synthetic enzymes that induce early flowering in *Gentiana triflora*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 463, 781-786, DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.013 ( 査読あり )

Takahashi H, Imamura T, Konno N, Takeda T, Konishi T, Nishihara M, and Uchimiya H (2014) A novel function of gentio-oligosaccharides: modulation of bud dormancy in the herbaceous perennial *Gentiana* by gentiobiose The Plant Cell 26, 3949-3963, DOI: 10.1105/tpc.114.131631. ( 査読あり )

Imamura T, Higuchi H, Sekine KT, Yamashita T, and Takahashi H. (2014) High concentrations of sucrose induce overwintering bud formation in gentian plantlets cultured *in vitro*. Plant Biotechnol. 31:97-104, DOI: 10.5511/plantbiotechnology.13.1211a( 査読あり )

〔学会発表〕(計 2 件)

今村智弘、樋口敦美、高橋秀行：リンドウの光周性花成経路に関わる *GtCO* 遺伝子の探索と機構解析 第 32 回日本植物細胞分子生物学会 (盛岡) 2014 年 8 月

今村智弘、藤田晃平、樋口敦美、高橋秀行：リンドウ光周期花成に関わる *CONSTANS* 遺伝子の機能解析 RNA 科学総合研究センター公開シンポジウム(東京)2014 年 11 月

〔図書〕(計 1 件)

Nishihara M, Mishiba K, Imamura T, Takahashi H, and Nakatsuka T. Molecular Breeding of Japanese Gentians -Applications of Genetic Transformation, Metabolome Analyses, and Genetic Markers, in: Jan J. Rybczynski, Michael R. Davey, and Anna Mikula (Eds.), The Gentianaceae - Volume 2: Biotechnology and Application, 239-265, Springer

〔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

岩手生物工学研究センター HP

<http://www.ibrc.or.jp/>

東京理科大学 基礎工学部 生物工学科  
島田研究室 HP

[http://www.rs.tus.ac.jp/shimada\\_lab/](http://www.rs.tus.ac.jp/shimada_lab/)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今村 智弘 (TOMOHIRO IMAMURA)

東京理科大学 基礎工学部 生物工学科  
研究員

研究者番号 : 20468705

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし