

平成 28 年 10 月 17 日現在

機関番号：81202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892029

研究課題名(和文) 越冬組織におけるFTを介した休眠調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the dormancy control mechanism through FT in overwintering organs

研究代表者

田崎 啓介 (Tasaki, Keisuke)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：80733419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：多年生植物の自発休眠期と他発休眠期の2つの成長相の転換機構の解明を目的として、リンドウ(*Gentiana triflora*)の越冬芽を用いて研究を行った。これまでに明らかにされている休眠期の相転換期に発現するGtFT2と、GtFT2との相互作用が予想される2種類の機能未知のタンパクについて相互作用解析を行った。さらに、これまでに未知であった休眠期および萌芽期における遺伝子の網羅的な発現情報を得るために、越冬芽サンプルを用いてRNA-seq解析を行った。これらのデータ解析により、自発休眠期から他発休眠期、および他発休眠期から萌芽期にかけて特徴的な発現を示す複数の遺伝子を見いだした。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the control mechanism of phase transition from endodormancy to ecodormancy in perennial plant, we investigated overwintering buds (OWBs) of *Gentiana triflora*. In our previous study, it was shown that GtFT2 is transcribed in turning point between two kinds of dormancy period. In addition, two protein of unknown function expecting the interaction with GtFT2 was found. In this study, we clarified the protein-protein interaction between GtFT2 and two proteins. Then, we selected several genes, which shows characteristic expression pattern during dormancy period in OWBs, by RNA-seq analysis.

研究分野：園芸学

キーワード：休眠

1. 研究開始当初の背景

多年生植物は、越冬器官を形成し休眠することで、生育に不適な環境下で生存できる。この休眠には2つの状態が存在する。1つは完全な休眠状態の自発休眠、もう1つは好適な環境条件を待つ状態の他発休眠であり、この2つの成長相の転換は適切な休眠打破の鍵となっている。しかしながら、自発休眠から他発休眠への相転換を制御する分子機構は殆ど明らかにされていない。

過去の研究から、花成、すなわち栄養成長から生殖成長への相転換では *FLOWERING LOCUS T* (FT) が誘導因子として働くことが明らかとなっている。他方、FT はジャガイモの塊茎形成 (Navarro et al., Nature, 2011) やポプラの越冬芽形成 (Bohlenius et al., Science, 2006) に関与する報告もあり、植物の各組織における相転換の誘導因子として理解され始めている。申請者のグループでは、リンドウ (*Gentiana triflora*) の越冬芽を用いた休眠研究から、*GtFT2* が自発休眠から他発休眠への相転換に関与する可能性を見出している。これまでに、1) 自発休眠後期に *GtFT2* の発現が上昇すること、2) *GtFT2* の過剰発現が自発休眠期を顕著に短縮すること、3) *GtFT2* の過剰発現では FT 抑制能を有する *GtFLC* の発現が減少し、*GtFT1* の発現が上昇することを明らかにしている。さらに、*GtFT1* を他発休眠期に過剰発現させると休眠打破が促進されることから、2種類の FT が休眠期の相転換を連続的に制御していると予想される (図1)。また、花成において FT は他の機能タンパク質と複合体を形成して作用するが、免疫沈降およびプロテオームを用いた先行研究から、4) *GtFT2* の相互作用因子として K homology domain protein (KH) および CCCH zinc finger protein (CCCH) が見出されている。

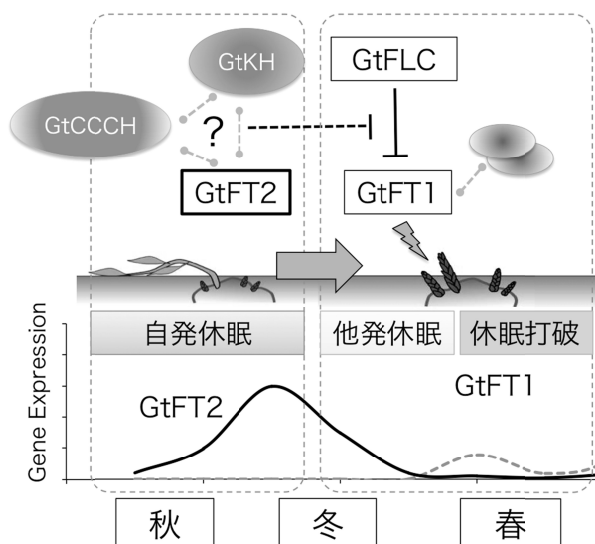


図1 自発休眠から多発休眠への相転換機構モデル

これらタンパク質は、構造的な特徴から遺伝

子の転写調節などに働くと予想されることから、*GtFT2* と協調して自発休眠から他発休眠への相転換を調節している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、*GtFT2* に着目し、*GtCCCH* および *GtKH* との相互作用、ならびにそれらタンパク質の下流において働いていると予想される制御因子を明らかにすることで、FT を介した休眠期の成長相転換モデルを構築することを目的としている。

本研究を通じて得られた成果は、FT の新規機能の解明と、植物の休眠研究の発展に貢献することができる。

3. 研究の方法

本研究では、リンドウの越冬芽における自発休眠から他発休眠へ相転換を誘導する因子として *GtFT2* に着目し、最初に *GtFT2* とともに相転換の誘導への関与が予想される *GtCCCH* および *GtKH* の相互作用の有無を解析する。3つのタンパク質は複合体を形成し、細胞核に局在して転写を促進していると予想されることから、本実験ではベンサミアーナタバコを用いた植物細胞内における結合能および局在を BiFC (bi-molecular fluorescent complementation) 法により解析する。また、偽陽性の可能性を排除するために、共免疫沈降法を用いてタンパク質間の結合を確認する。さらに、3つのタンパク質間の結合能を確実に調べるために、酵母ツーハイブリッド法を用いた結合能も確認する。上記の実験を踏まえて、*GtFT2*、*GtCCCH* および *GtKH* 間の相互作用の有無を明らかにする。

次に、*GtFT2* の上下流において休眠調節に働く制御因子の探索を行う。具体的には、自発休眠期から他発休眠期および萌芽期における網羅的な遺伝子発現情報を、次世代シーケンサーを用いて収集・解析する。得られたデータを用いて休眠制御への関与が予想される遺伝子の選抜を行う。

最後に、*GtFT2*、*GtCCCH* および *GtKH* 複合体と、下流制御因子の候補遺伝子について、休眠期における成長相転換における転写制御の関連性について解析を行う。そして、得られた結果を踏まえ、休眠期における *GtFT2* を介した新規休眠調節機構モデルを構築する。

4. 研究成果

平成 26 年度は、リンドウの越冬芽で発現する FT オルソログとの相互作用が予想された2種類の機能未知のタンパク質について解析を行った。これらタンパク質は BiFC 法、共免疫沈殿法、および酵母ツー

ハイブリッド法によるタンパク質間相互作用解析を行い、BiFC法の結果においては、*in vivo*においてGtKHはGtFT2と結合し、核に局在する可能性が示唆された。これらタンパク質の機能についてさらに詳細に調べるために、リンドウのノックダウン系統を作出した。現在はこれら系統を生育しており、今後、解析に用いる予定である。

次に、越冬芽において自発休眠期から他発休眠期、および萌芽期にかけて発現する遺伝子の網羅的な情報を得るために、次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析を行った。解析の材料を得るために、平成26年度秋期(10月)に越冬芽を形成した露地栽培のリンドウを用いて、自発休眠から他発休眠への移行を誘導するための低温処理を行い、さらにその後、萌芽を誘導するための加温処理を行った。そして、処理したリンドウの越冬芽の、経時的なサンプリングを行った。

平成26年度から平成27年度にかけて、越冬芽サンプルから抽出したRNAを用いて、MiseqおよびNextSeqによるシーケンシングを行った。Miseqではおよそ5806万リードが、NextSeqではおよそ8747万リードが得られた。リンドウはリファレンスゲノム情報がないことから、Trinity(v2.0.6)によるde novo assemblyを行い、およそ10万contigのリファレンスを作成した。さらにeXpress(v1.5.1)を用いて発現プロファイルを作成した。得られたcontig情報を、すでにクローニングされているGtFT2などの既知遺伝子配列と照らし合わせたところ、高い相同性を有していた。また、作成した遺伝子発現プロファイルをリアルタイムPCRによる発現解析の結果と比較したところ、発現のパターンは概ね一致する結果が得られた。

そこで、これらの発現プロファイルを用いて、自発休眠期から他発休眠期、そして萌芽期にかけて発現変動する遺伝子の探索を行った。自発休眠期から他発休眠期にかけて発現変動するcontigを調べたところ、特徴的な発現を示す、転写因子を含む4種類の機能未知の遺伝子を選抜した。また、他発休眠期から萌芽期にかけて変動するcontigを調べたところ、特徴的な発現変動を示す、種子休眠に関与する9遺伝子、アブシジン酸応答に関連する7遺伝子、ジベレリン応答に関連する5遺伝子、エチレン応答に関連する2遺伝子を選抜した。今後は、これら遺伝子について機能解析を行うとともにGtFT2との関連性を詳細に調べる予定である。

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[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：
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

田崎啓介(Tasaki Keisuke)
公益財団法人岩手生物工学研究センター
園芸資源研究部・研究員

研究者番号：80733419

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：