

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H02532

研究課題名(和文) フロリゲン活性化複合体の分子機能解明

研究課題名(英文) Molecular Function of Florigen Activation Complex

研究代表者

辻 寛之(Tsuji, Hiroyuki)

横浜市立大学・木原生物学研究所・准教授

研究者番号：40437512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,500,000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)は花芽分化を開始させる強力な運命決定因子であり、その機能の本体はフロリゲン活性化複合体と呼ばれる転写複合体が担っている。フロリゲンは生化学的な機能をはっきり特定できない球状タンパク質である。本課題では、フロリゲン活性化複合体の直接の転写標的の全体像は未知であり、これを網羅的に同定して活性化の過程の可視化を試みた。これによって、フロリゲンが茎頂メリステム内で分布を変化させながら下流遺伝子の発現を活性化させることを見出し、さらにこの分布変化のメカニズムがフロリゲン活性化複合体の形成過程そのものに依存することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フロリゲンは植物の花芽分化を決定づける最重要因子である。しかしフロリゲンがどのような仕組みで花芽分化を開始させるのかはよくわかっていなかった。フロリゲンはフロリゲン活性化複合体を形成することで花芽分化を開始させるが、重要な問題はこのフロリゲン活性化複合体がいつどこで形成され、どのように分布を変えながら花芽分化を進めていくかという問いである。本研究では独自のライブイメージング技術を開発することによって、この過程を初めて明瞭に捉えることに成功した。植物の花がどのように形成されるのかの理解を深め、さらに花の後に訪れる収穫を最大化するための基礎的な理解を深めるものとなる。

研究成果の概要(英文)：Florigen (its molecular nature is the FT/Hd3a protein) is a strong determinant of the timing of flowering in plants. The major function of florigen is executed by forming a transcriptional complex called florigen activation complex. Florigen is a globular protein whose biochemical function cannot be clearly identified, and the overall picture of the direct transcriptional targets of the florigen activation complex is unknown. We attempted to visualize the process of florigen distribution in the shoot apical meristem and promotion of downstream gene expression. We found that florigen accumulates in different region of the SAM in different step of flowering. The mechanism of this change depends on the formation of the florigen activation complex.

研究分野：育種遺伝学

キーワード：フロリゲン メリステム イネ 花成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フロリゲン (正体は FT/Hd3a タンパク質) は花芽分化を開始させる強力な運命決定因子であり、その機能の本体はフロリゲン活性化複合体と呼ばれる転写複合体が担っている。フロリゲンは生化学的な機能をはっきり特定できない球状タンパク質であるため、その作用の分子メカニズムは謎に包まれていたが、申請者らは独自の方法論を開発して分子レベルの解析を丁寧に行うことで、フロリゲンの分子機能の研究において世界をリードしてきた。フロリゲンは葉で合成された後、実際に花のつく茎の先端 (茎頂メリステム) まで輸送されて機能する (辻、PNAS, 2015a)。茎頂の細胞に到達すると、まず細胞質で受容体 (14-3-3 タンパク質) と相互作用し、その後フロリゲン-受容体のサブコンプレックスが核移行して転写因子 FD とさらに相互作用することで「フロリゲン活性化複合体」と呼ばれる転写複合体を形成する (図1)。この複合体の形成はフロリゲンが機能を発揮するために必須であるため、フロリゲンの機能の本体はフロリゲン活性化複合体であると考えられている (田岡、辻、Nature 2011)。フロリゲン活性化複合体は AP1 ホモログを始めとする標的遺伝子のプロモーターに結合して直接その転写を活性化すると考えられており、標的遺伝子が様々に変わることで花芽分化を越えた様々な機能を発揮することも明らかにされつつある。

フロリゲン活性化複合体の機能に関する理解は 2011 年の同定から 4 年の間に深まりつつあるが、花芽形成の本質的な理解に関わる極めて重要な未解決問題が残されている。一つはフロリゲン活性化複合体における未同定の転写コファクターである。フロリゲンは転写活性化複合体の中心因子として機能するが、完全な複合体形成には少なくともフロリゲンと直接結合する未知の転写コファクターの存在が不可欠であることが複数の研究者によって示されている。その未知因子の同定により、フロリゲンの生化学的機能がはじめて理解できる。もう一つの重要な問題は、フロリゲン活性化複合体の直接の転写標的遺伝子である。私たちは世界的にも唯一のフロリゲンの明瞭なイメージング実験系を開発しており、また直接標的遺伝子の候補である OsMADS15 とフロリゲンとの同時イメージングの実験系を確立しつつあった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、フロリゲン活性化複合体を構成する未知因子を同定するためにフロリゲン活性化複合体を精製してその機能を解析すること、またフロリゲン活性化複合体が植物の茎頂メリステムにおいてどのように形成され、どのように分布を変えながら花芽分化を進めていくのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

フロリゲン活性化複合体の転写コファクター同定と機能解析

フロリゲン活性化複合体を構成するフロリゲン、受容体、転写因子 FD はいずれも転写活性化能を持たないため、複合体には未知の転写コファクターが相互作用して転写活性化能を付与していると考えられている (辻、Curr. Opin. Plant Biol. 2013、田岡、Trends Plant Sci. 2013)。この転写コファクターを複数の方法によって同定する。

イネ培養細胞におけるフロリゲン活性化複合体の機能的再構築系を活用した生化学スクリーニング: 申請者らは、イネの培養細胞にフロリゲンと転写因子 FD を発現させることで、細胞内に存在するフロリゲン受容体を取り込んだ機能的なフロリゲン活性化複合体を再構築する実験系を独自に開発した (田岡、辻、Nature 2011)。細胞内で再構築された複合体は、植物体における標的遺伝子と同じ遺伝子 OsMADS15 の転写を活性化する。ここで、Hd3a に付加しておいたエピトープタグで複合体全体を共免疫沈降し、得られたタンパク質を質量分析器で解析することによって、未知の転写コファクターを探索する。予備的な実験から共免疫沈降が可能であることを確認しており、複数の候補を既に得ている。本研究ではこのスクリーニングを大規模に実施する。

フロリゲン活性化複合体の直接制御遺伝子の同定とイメージング

花芽分化の全過程を通して、フロリゲンと標的遺伝子発現の同時イメージングを実施する。平成 28 年度の解析によって同定した標的遺伝子を可視化するレポーター植物を作成し、フロリゲンのイメージングで用いる植物と交配することで両者を同時にイメージングできる植物を作成する。標的遺伝子を赤色蛍光タンパク質、フロリゲンを緑色蛍光タンパク質で可視化することにより、両者の蛍光をメリステムで直接観察する。

4. 研究成果

フロリゲン活性化複合体の転写コファクター同定と機能解析

フロリゲン活性化複合体を培養細胞内で再構築して精製する実験系を開発した。60 以上の詳細な条件検討を実施し、様々な新規手法を組み合わせることで精製に成功した。この過程で下記の特徴が明らかとなった。1. フロリゲン活性化複合体を不安定化、分解するメカニズムが細胞質内に存在しており、安定した状態で複合体精製するためには核の単離が必須であることがわかった。2. フロリゲン活性化複合体はサブユニット間の結合が不安定であるため、2 分子蛍光補間法による安定化が効果的であること、3. 2 分子蛍光補間法によって再構築された蛍光タンパ

ク質による立体障害のためにフロリゲン活性化複合体の活性が抑圧されるが、これは 2 分子蛍光補間法の改良によって部分的に克服できること、を明らかにした。現在、フロリゲン活性化複合体の大規模精製に着手することができる体制となり、質量分析による co-activator の同定へと進みつつある。

フロリゲン活性化複合体の直接制御遺伝子の同定とイメージング

フロリゲン Hd3a と GFP の融合タンパク質 Hd3a-GFP を発現し、同時に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 mOrange をジーンターゲティングによって導入した二重形質転換イネを作出し、その茎頂メリステムを花成の全過程を通して観察した。その結果、フロリゲンが茎組織を經由して茎頂メリステムに到達し、茎頂メリステム内で分布を変化させながら OsMADS15 遺伝子を活性化させていくことを初めて明瞭に可視化することができた。

さらにフロリゲンの分布のメカニズムについて検討するために、フロリゲン活性化複合体を形成できない変異型 Hd3a のイメージングを行なった。その結果、変異型の Hd3a はメリステム内での分布が異常となることがわかった。したがって、フロリゲンが正常に分布するためにはフロリゲン活性化複合体の形成が必須であることが明らかとなった。

さらにフロリゲンの分布について理解を深めるために、フロリゲンの細胞間輸送をライブイメージングする技術の開発を進めた。その結果、Fluorescent recovery after Photobleaching (FRAP) をイネの茎頂メリステムで実施する技術を開発し、これによってフロリゲンの細胞間輸送の様子をライブイメージングするとともに、茎頂メリステムと他の組織の間での輸送速度の違いを明らかにすることができた。この輸送速度の制御がフロリゲンの分布に影響していると考えられる。さらに細胞内におけるフロリゲンの分布を明らかにするために超解像度イメージングを実施した。その結果、フロリゲンが核内でスペckル状に局在することを見出した。このスペckル状の局在は、近年注目を集める液-液相分離を介した遺伝子発現制御を想起させるものであり興味深い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagai, K., Mori, Y., Ishikawa, S., Furuta, T., Gamuyao, R., Niimi, Y., Hobo, T., Fukuda, M., Kojima, M., Takebayashi, Y., Fukushima, A., Himuro, Y., Kobayashi, M., Ackley, W., Hisano, H., Sato, K., Yoshida, A., Wu, J., Sakakibara, H., Sato, Y., Tsuji, H., Akagi, T., Ashikari, M.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Antagonistic regulation of the gibberellic acid response during stem growth in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-2501-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Behnam Babak, Bohorquez Chau Adriana, Castaneda Mendez Oscar Fernando, Tsuji Hiroyuki, Ishitani Manabu, Becerra Lopez Lavalle Luis Augusto	4. 巻 9
2. 論文標題 An optimized isolation protocol yields high quality RNA from cassava tissues (Manihot esculenta Crantz)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 814 ~ 825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1002/2211-5463.12561	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kaneko-Suzuki Miho, Kurihara-Ishikawa Rie, Okushita-Terakawa Chiaki, Kojima Chojiro, Nagano-Fujiwara Misa, Ohki Izuru, Tsuji Hiroyuki, Shimamoto Ko, Taoka Ken-Ichiro	4. 巻 59
2. 論文標題 TFL1-Like Proteins in Rice Antagonize Rice FT-Like Protein in Inflorescence Development by Competition for Complex Formation with 14-3-3 and FD	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 458 ~ 468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1093/pcp/pcy021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Naoko, Kazama Yusuke, Yamagishi Noriko, Watanabe Kyoko, Ando Saki, Tsuji Hiroyuki, Kawano Shigeyuki, Yoshikawa Nobuyuki, Komatsu Ken	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of the VIGS System in the Dioecious Plant <i>Silene latifolia</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1031 ~ 1031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3390/ijms20051031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko-Suzuki Miho, Kurihara-Ishikawa Rie, Okushita-Terakawa Chiaki, Kojima Chojiro, Nagano-Fujiwara Misa, Ohki Izuru, Tsuji Hiroyuki, Shimamoto Ko, Taoka Ken-ichiro	4. 巻 59
2. 論文標題 TFL1-Like Proteins in Rice Antagonize Rice FT-Like Protein in Inflorescence Development by Competition for Complex Formation with 14-3-3 and FD	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 458-468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuji H	4. 巻 67
2. 論文標題 Molecular function of florigen	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Breed Sci.	6. 最初と最後の頁 327-332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.17026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saijara N and Tsuji H	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Imaging florigen distribution in vivo	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Morphology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirayama Takashi, Saisho Daisuke, Matsuura Takakazu, Okada Satoshi, Takahagi Kotaro, Kanatani Asaka, Ito Jun, Tsuji Hiroyuki, Ikeda Yoko, Mochida Keiichi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Life-Course Monitoring of Endogenous Phytohormone Levels under Field Conditions Reveals Diversity of Physiological States among Barley Accessions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toda Yosuke, Okura Fumio, Ito Jun, Okada Satoshi, Kinoshita Toshinori, Tsuji Hiroyuki, Saisho Daisuke	4. 巻 3
2. 論文標題 Training instance segmentation neural network with synthetic datasets for crop seed phenotyping	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s42003-020-0905-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lucob Agustin Nonawin, Kawai Tsubasa, Takahashi Nosaka Misuzu, Kano Nakata Mana, Wainaina Cornelius M., Hasegawa Tomomi, Inari Ikeda Mayuko, Sato Moeko, Tsuji Hiroyuki, Yamauchi Akira, Inukai Yoshiaki	4. 巻 169
2. 論文標題 WEG1, which encodes a cell wall hydroxyproline rich glycoprotein, is essential for parental root elongation controlling lateral root formation in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiologia Plantarum	6. 最初と最後の頁 214 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/ppl.13063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoki Saya, Toh Shigeo, Nakamichi Norihito, Hayashi Yuki, Wang Yin, Suzuki Takamasa, Tsuji Hiroyuki, Kinoshita Toshinori	4. 巻 9
2. 論文標題 Regulation of stomatal opening and histone modification by photoperiod in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-019-46440-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Chie, Tanaka Wakana, Tsuji Hiroyuki, Hirano Hiro-Yuki	4. 巻 14
2. 論文標題 TILLERS ABSENT1, the WUSCHEL ortholog, is not involved in stem cell maintenance in the shoot apical meristem in rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1640565 ~ 1640565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1080/15592324.2019.1640565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tsuji H
2. 発表標題 DNA Methylation of the Transposable Elements Is Reconfigured at the Onset of the Reproductive Phase in the Rice Shoot Apical Meristem
3. 学会等名 Plant and Animal Genome XXVII (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuji H
2. 発表標題 Molecular Function of Florigen
3. 学会等名 16th International Symposium on Rice Functional Genomics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuji H
2. 発表標題 Developmental phenology of shoot apical meristem in rice
3. 学会等名 MBE Satellite Symposium "Genomics and Modeling" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuji H
2. 発表標題 Maintenance of Stem-ness and Cell Fate Determination in Plants and Animals
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuji H
2. 発表標題 Florigen-induced transposon silencing in the shoot apical meristem
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Conference on Plant Cell and Developmental Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 辻 寛之
2. 発表標題 フロリゲンの超解像度イメージング
3. 学会等名 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ2016 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 辻 寛之
2. 発表標題 フロリゲンが植物に環境の記憶を刻み込む過程のイメージング
3. 学会等名 日本植物学会第80回大会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

横浜市立大学・木原生物学研究所 辻研究室
<https://hiroyukitsuji.tumblr.com>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	田岡 健一郎 (Taoka Ken-ichiro) (00467698)	横浜市立大学・木原生物学研究所・特任助教 (22701)	
連携 研究者	中野 明彦 (Nakano Akihiko) (90142140)	理化学研究所・光量子工学研究センター・副センター長 (82401)	