

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07598

研究課題名(和文) 果樹類の花成タンパク質ネットワーク

研究課題名(英文) Network of flowering proteins in fruit trees

研究代表者

古藤田 信博 (Kotoda, Nobuhiro)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：50355426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：桃栗三年柿八年と言われるように果樹等木本植物は種を蒔いてから花が咲き実がつくまでに4年から10年ほどの幼若期間を要する。そのため花芽分化は、果樹生産にとって重要なイベントとなっている。私たちはこれまで、リンゴの開花促進遺伝子であるフラウリングローカスT (FT) や開花抑制遺伝子であるティーエフエルワン (TFL1) の解析から、FTタンパク質と結合するタンパク質を10数個発見した。また、FTタンパク質のみならずアペタラワン (AP1) タンパク質も、他のタンパク質と結合してその機能を発揮していることを示唆する結果を得た。さらに、カンキツのFT (CuFT) タンパク質と結合する因子の確認に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花成誘導遺伝子であるFTとの相互作用因子はシロイヌナズナやトマトなどの草本生植物では2000年代初めに報告があったが、果樹等の木本植物では私たちのグループがリンゴで最初に報告をした。今回は、リンゴと同じく主要な果樹であるカンキツにおいて、機能未知のタンパク質がFTと相互作用(結合)することを確認した。FTの機能を直接解明する方法の他に、FTと相互作用する因子を解析することによって、花成の本質を明らかにする方法がある。果樹類の花成は草本植物のように単純ではない可能性があり、このようアプローチから、果樹類の花成メカニズムを明らかにし、将来的には果樹類の花成制御法開発の基礎となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：As it is said that Momo-kuri 3 years and kaki 8 years, it takes about 4 to 10 years of juvenile period to produce flowers after sowing seeds of fruit trees. Therefore, flower bud differentiation is an important event for fruit tree production. We have discovered ten or more proteins that bind to the FT protein, based on the analysis of the flowering promoting gene of apple, FLOWING LOCUS T (FT), and the flowering suppression gene, TFL1. In addition, not only the FT protein but also the APETALA1 (AP1) protein, which is putatively related to floral organ formation, binds to other protein and the result suggested its function. Furthermore, we succeeded in identifying the factor that binds to the citrus FT (CuFT) protein.

研究分野：園芸科学

キーワード：カンキツ FT 相互作用因子 酵母ツーハイブリッド 花成誘導 花成抑制 AP1 花芽形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

果樹類の花芽形成過程を理解することは、育種期間の短縮や果実の生産を制御する上で非常に重要である。近年、シロイヌナズナ等モデル植物における花芽形成(花成)ネットワークの基礎的研究から、FLOWERING LOCUS T (FT)が、植物体中で移動可能な花成誘導物質であることが明らかにされた。FT の他にも構造が似ている *TSF*、*TFL1*、*ATC*、*BFT*、*MFT* の5つのファミリーが存在している。この *TFL1/FT* ファミリーは、花成誘導/抑制、栄養成長維持、種子休眠など植物の基本的な発達過程になんらかの関与をしていることが報告されている。*TFL1/FT* ファミリーのうち初めて単離・同定の報告がなされたのがキンギョソウの *CENTRORADIALIS* (*CEN*)である。その後シロイヌナズナ *tfl1* 変異体の原因遺伝子 *TFL1* が、続いてトマトの *CEN/TFL1* オルソログである *SELF-PRUNING* (*SP*)が単離された。その後シロイヌナズナ *FT* の単離が報告されている。

イスラエルの Lifschitz らのグループは、*SP* と直接結合する *SP-Interacting Protein* (*SIP*)の存在について最初に報告した(Pnueli et al. 2001)。その後、シロイヌナズナ *FT* と相互作用する *FD* (*bZIP* 型転写因子)やイネの *FT* オルソログ *Hd3a* と相互作用する *GF14c* (14-3-3 タンパク質)が報告されている (Abe et al. 2005, Purwestri et al. 2009)。一方、当研究グループではリンゴ組換え体作出によりリンゴ *TFL1/FT* 遺伝子の花成制御への関与を明らかにし (Kotoda et al. 2006, 2010)、さらにリンゴ *FT* と直接相互作用する新規のタンパク質 14 種類を報告している (Mimida et al. 2011)。

当研究グループは、果樹等木本植物の花成制御機構を明らかにするため、比較的早い段階(1990年代後半)から *TFL1/FT* ファミリー遺伝子に注目し、それらの機能解明に取り組んできた。特にリンゴ *MdTFL1* (シロイヌナズナ *TFL1* のリンゴオルソログ)の発現を抑制したリンゴ組換え体が、温室への順化後 8 ヶ月で早期開花(対照の非組換え体は 7 年を経て初開花)したこと (Kotoda et al. 2006) や、リンゴ *MdFT1* (シロイヌナズナ *FT* のリンゴオルソログ) およびポプラ *FT* 遺伝子 (*PnFT3*) の過剰発現リンゴ組換え体が、再分化後 5~8 ヶ月で組織培養中に開花したこと (図 1; Kotoda et al. 2010) から、果樹等木本植物においても *TFL1/FT* ファミリー遺伝子が幼若性の維持や花成誘導に強く関わっていることを明らかにした。そのため当研究グループでは、*FT* 自体に関する研究に加え、果樹類の *FT* がどのようなタンパク質と相互作用して機能を発揮しているのか明らかにすることを目的に酵母ツーハイブリッド法を利用して、リンゴの *MdFT1* および *MdFT2* に結合し *FT* と複合体を形成して花成誘導等の機能を発揮する可能性のある因子の単離を開始した。

私たちは、リンゴ *MdFT* に対する酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングによって *AtVOZ1*、*TCP2*、*TCP4* の3つの転写因子が *FT* と結合することを 2011 年に初めて報告し、その後これらの遺伝子が開花と関連のあることが他の国内外の研究グループによって報告されはじめている (Niwa et al. 2013; Taoka et al. 2013; Celesnik et al. 2013; Ho Ho and Weigel 2014)。上記転写因子以外にも、*ATP/GTP* 結合タンパク質、膜貫通タンパク質、リン酸転移酵素などと結合している可能性が示唆された (Mimida et al. 2011)。これらのタンパク質はこれまで報告のない新規の *FT* 結合タンパク質である可能性が高い。一方、これまでのリンゴ *TFL1/FT* と結合するタンパク質の探索において、*FD* や 14-3-3 タンパク質、トマトで同定された *SIP* 様タンパク質は得られていないことから、果樹類 *FT* との相互作用因子を探索することで新たな *FT* 結合タンパク質が見つかる可能性がある。このような予備的知見から、果樹等木本植物はシロイヌナズナやトマトなどのモデル植物とは異なる *FT* タンパク質ネットワークを構築している可能性が考えられる。

また、カンキツ *FT* オルソログには *CuFT1*、*CuFT2*、*CuFT3* の3種類が存在し、それぞれ機能が分化している可能性(花成誘導は *CuFT3* が関与している)を示す結果が報告されていることから、これらの *FT* と相互作用するタンパク質を同定することで *FT* の新たな機能が明らかになる可能性がある。果樹類の *FT* が果肉に発現していることは謎であるが、このようは疑問に対する回答も得られるかもしれない。また、*MdTFL1* 発現抑制や *MdFT1* 過剰発現リンゴ組換え体は休眠性(低温要求性)が低下していることが指摘されており (Kotoda et al. 2006, 2010)、*FT* と休眠性との関連についても何らかの知見が得られる可能性がある。

2. 研究の目的

当研究グループは、転写因子であるリンゴの *MdVOZ1*、*MdTCP2*、*MdTCP4* が *MdFT1* および *MdFT2* に結合することを初めて報告し、これらのタンパク質をコードする遺伝子の機能について報告した (Mimida et al. 2011)。そのため、まず最初に上記3種に加え得られた 11 種類の *FT* 結合因子についてリンゴの cDNA 全長を単離し、酵母ツーハイブリッドによる *FT* との結合について再現性を確認する。本研究では果樹類における花成タンパク質ネットワークの普遍性と特



図 1. リンゴ *MdFT1* を過剰発現し、培養中で早期開花したリンゴ組換え体
Kotoda et al. (2010)

異性を明らかにするため、リンゴ(バラ科;本科にはリンゴ属の他、ナシ属、サクラ属等が含まれる)に加え、主要果樹であるカンキツ類(ミカン科)からインフォマティクスを利用して対応する遺伝子配列を抽出し、カンキツ FT と相互作用する因子を同定する。カンキツ FT には CuFT1、CuFT2、CuFT3 の3種が存在し、それらが機能分化している可能性が高い(図2)。そのためカンキツFTと相互作用する因子も酵母ツーハイブリッドによって新規のFT結合タンパク質の単離・同定を目指す。FTとの結合が確認された果樹類の結合因子については形質転換技術を用い、その機能の推定を行う。また得られたFT結合タンパク質が、FT以外のTFL1/FTファミリー(TFL1、BFT、MFT、CEN)(図2)と結合するかどうか明らかにする。

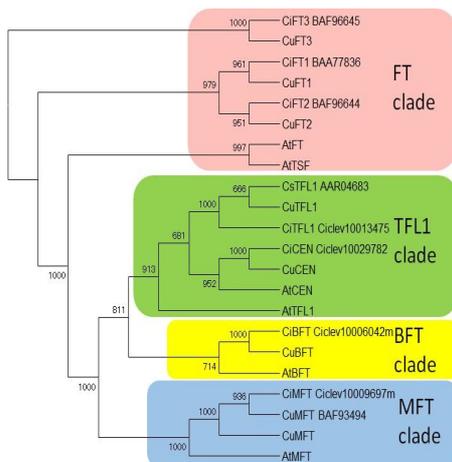


図2. シロイヌナズナおよびカンキツの TFL1/FT ファミリーの系統樹解析
野田孝幸ら 園芸学会で発表(2015)

3. 研究の方法

研究は3年間で設定し、2つのテーマに分けて行うこととした。リンゴ FT 等と相互作用するタンパク質の機能解明では、酵母ツーハイブリッドによるスクリーニングの結果得られたリンゴ FT 結合因子群を中心に、その結合能の再現性や組換え植物を活用した結合因子の機能解明を行う。カンキツ FT と相互作用する新規タンパク質の探索と同定では、機能分化したと考えられるカンキツ FT が3種類あることから、これらの FT と結合する因子を新たにスクリーニングし、新規の結合タンパク質を単離・同定することを目指している。これにより、あらたな FT タンパク質ネットワークが明らかにされることを期待している。さらに、FT 結合タンパク質が、FT 以外の TFL1/FT ファミリー(TFL1、BFT、MFT、CEN)と相互作用するかどうかについても明らかにする。研究体制は研究代表者の古藤田信博および大学院生、学部学生である(図3)。



図3. 研究体制

4. 研究成果

常緑木本植物であるウンシュウミカンには開花・結実するまでの長い幼若期間がある。ウンシュウミカンは我が国において最も盛んに栽培されている果樹作物であり、花芽形成のメカニズムを解明することは産業上の観点からも重要な課題である。ウンシュウミカンにおいて秋から冬にかけての低温によって花成が引き起こされ、それに伴って花成誘導遺伝子である *citrus FLOWERIG LOCUS T (CiFT3)* の発現が高まる。シロイヌナズナにおいて FT の mRNA は葉で発現し、FT タンパク質が維管束を通過して茎頂に移行し FD 転写因子と結合することで花成を誘導することが示されている。シロイヌナズナの *BROTHER OF FT (BFT)* は TFL1/FT gene family のメンバーであり、その配列は TFL1 よりも FT と相同性が高いが、花成が遅延する機能は TFL1 と類似している。TFL1、BFT および *CENTRORADIALIS (CEN)* は花成を遅延するが、それぞれの発現場所が異なるためその機能も異なっていると考えられている。シロイヌナズナの BFT は乾燥、塩といった非生物的なストレスによって発現が高まり、特に塩ストレス下では BFT と FT が競合し BFT が FD と相互作用することによって花成が遅延すると考えられている。リンゴにおける *MadCEN* は花成を遅延させるだけでなく、幼若実生の根などで発現していることから分裂組

織の発達に關与しており、シロイヌナズナの *CEN* や *MdTFL1* と異なる発現を示しその機能も異なると考えられている。このように植物種によって *TFL1/FT* ファミリーの機能に多様性が認められるため、カンキツにおけるこれらの遺伝子ファミリーの機能を解明することは重要な課題である。そこで本研究では、まず *CuBFT*, *CuCEN* および *CuTFL1* について組織別発現解析並びにシュートにおける時期別発現解析を行った。次に、それぞれの遺伝子についてシロイヌナズナ形質転換体を作成し機能解析を行った。

シロイヌナズナの *BFT*, *CEN* および *TFL1* の遺伝子配列を用いてクレメンティンにおける相同遺伝子を検索した。この配列をもとにプライマーを設計し、ウンシュウミカンより遺伝子単離を行った。系統解析には Clustal X を使用し、NJ プロット法により系統樹を構築した。供試材料として佐賀県果樹試験場でサンプリングしたウンシュウミカン‘大津4号’の種子(根(実生), 葉(実生), 茎(実生), 葉, シュート, 花蕾II(5月), 幼果II(6月), さじょうおよび外果皮を用い *CuBFT*, *CuCEN* および *CuTFL1* について定量 PCR を行った。また、毎月サンプリングを行った‘大津4号’および‘青島’のシュートを用いた時期別発現解析を行った。次に 35SΩ::*CuBFT*, 35SΩ::*CuCEN* および 35SΩ::*CuTFL1* の形質転換ベクターを構築し、シロイヌナズナ(Columbia)をアグロバクテリウム菌 EHA101 を使用したフローラルディップ法により形質転換した。植物は 24°C の長日条件で栽培した。花成の度合いの指標として開花時期、ロゼット葉、茎葉、花序の数および背丈を計測した。

組織別発現解析の結果、*CuBFT* は特に実生の根、成木の茎、花蕾II、さじょうで発現していた。*CuCEN* は実生の根、茎、成木の茎で高い発現を示した。*CuTFL1* は実生における全ての組織と花蕾IIで発現していた。シュート(茎)における時期別発現解析の結果、*CuBFT* は4月から発現しており5月をピークに発現が減少している。*CuCEN* は4月と5月の発現は高いものの6月に急激に低くなった。*CuTFL1*

は5月に最も高い発現を示し、その後低い発現レベルが続いたが12月にわずかなピークを示した。また *CuBFT* (図4) および *CuCEN* のシロイヌナズナ形質転換体の花成時期は WT に比べて大幅に遅延した。*CuTFL1* の形質転換体の花成時期は WT と比較しわずかに遅れた。リンゴやポプラにおいては *TFL1* が花成を抑制していると考えられているが、ウンシュウミカンにおいては *BFT* もしくは *CEN* が花成抑制や幼若性の維持に強く関わっている可能性が考えられる。

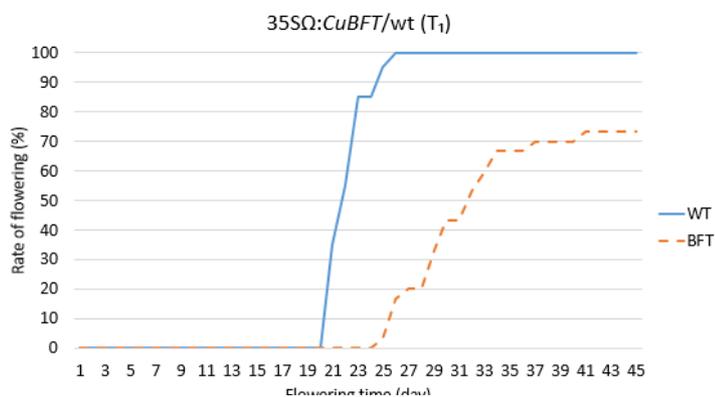


図4 Flowering time of transgenic Arabidopsis with *CuBFT*. Plants in the first generation (T_1) were grown under long-day conditions.

カンキツにおける *CuFT* と相互作用する因子の探索は、以前リンゴでスクリーニングした因子のカンキツ相同遺伝子を単離することで行った。リンゴで単離された新規相互作用因子14個(No.1-14)のうち、No.6, 8, 10, 11, 13の5つの遺伝子について、ウンシュウミカンから相同遺伝子を単離し、*CuFT1* および *CuFT2* との相互作用を酵母ツーハイブリッド法で確認した。その結果、結合強度には違いがあるものの、すべての遺伝子について相互作用が認められた(未発表)。図5に、*CuFT1* と *FTint11* (*FTinteracting* No.6)との酵母ツーハイブリッド法による Gal アッセイの結果を示す。*CuFT1* と相互作用した5つの因子はいずれも機能について詳しく調べられていないため、植物形質転換用発現ベクターにそれぞれの遺伝子を導入し、組換えシロイヌナズナを作成した。今後は、これらの遺伝子の機能解明を行っていく予定である。

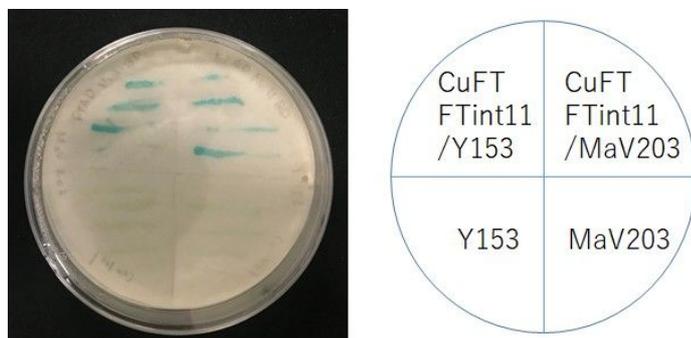


図5 酵母ツーハイブリッド法による *CuFT1* と *FTint11* との結合ガラクトシダーゼによるアッセイ(上: 形質転換酵母)

5 . 主な発表論文等

[論文発表]

- 1) Nobuhiro Kotoda*, Satoshi Matsuo, Ichiro Honda, Kanako Yano, Tokuro Shimizu. Gibberellin 2-oxidase genes from Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) caused late flowering and dwarfism in transgenic *Arabidopsis*
The Horticulture J. 85(2): 183-193 (2017)

[学会発表]

- 1) Hasan, N. and N. Kotoda. Phenotypic analysis of transgenic Arabidopsis with GA oxidase like gene CuGA16 isolated from Satsuma mandarin ‘Aoshima’ 平成 30 年度園芸学会秋季大会 (2018)
- 2) N. Kotoda and T. Noda Molecular basis of flowering ISHS 13th International Symposium (招待講演) (国際学会) (2017)
- 3) 野田孝幸・納富麻子・古藤田信博 ウンシュウミカン由来花成抑制遺伝子 CuBFT, CuCEN および CuTFL1 の機能解析 平成 28 年度園芸学会秋季大会 (2016)

[雑誌論文](計 1 件)

[学会発表](計 3 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：
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：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：