

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14829

研究課題名(和文) アンチフロリゲンによる植物改良

研究課題名(英文) Crop improvement by synthetic strategy using anti-florigen genes

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、花芽分化の決定因子・フロリゲンとその抑制因子・アンチフロリゲンの分子機能を解析し、両者を人工的に改変してイネの種子数を増加させる技術を開発することである。アンチフロリゲンを恒常的に発現させたイネは種子数が増加するが、同時に花成が遅延するため実用的でない。本研究では「花成の前は発現がなく、花成直後から発現を開始するプロモーター」の制御下でアンチフロリゲンを発現させることで、花成を遅延させることなく種子数のみ増加させることを試みた。作成した形質転換イネの表現型を解析した結果、花成の遅延なく一次枝こうを増加させることには成功したが、一穂粒数の増加した系統を得ることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：Florigen and antiflorigen function in antagonistic manner for flowering and inflorescence development. Florigen promotes flowering and early termination of inflorescence branching that leads to the reduction of seed number, whereas anti-florigen have opposite phenotype. Overexpression of anti-florigen genes results in the increase in the number of seeds, whereas it causes delay in flowering which should be avoided in the breeding process. In this study we tried to overcome this problem by expressing anti-florigen genes under the control of the promoters that activated in the shoot apical meristem after the floral transition. We developed transgenic lines expressing synthetic anti-florigen genes under PAP2 promoter, and examined their phenotype. We found that several lines showed increase in the number of primary branches without delay in flowering. However total seed number was not increased in these lines, suggesting requirement for further improvement of our construct.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：フロリゲン アンチフロリゲン イネ 種子数

### 1. 研究開始当初の背景

花芽分化の決定因子・フロリゲン (正体は FT タンパク質) はフロリゲン受容体、転写因子 FD と共に「フロリゲン活性化複合体」を形成し下流遺伝子を転写活性化して花成を誘導する (田岡、辻 Nature 2011)。フロリゲンを増強すると早咲きになるが、花の数 (果実種子数) は減少してしまう (辻 PNAS 2015)。この理由はメリステムが枝を十分つくる前に花になるためである。

### 2. 研究の目的

興味深いことに、植物にはフロリゲンと極めて類似した構造を持ちながら一部が異なるために正反対の活性を示すタンパク質・アンチフロリゲン TFL1 が存在する。我々は、アンチフロリゲンがフロリゲンと同じ受容体を取り合い、フロリゲン活性化複合体をハイジャックすることで阻害機能を発揮することを明らかにしつつある (図 1、田岡、未発表)。アンチフロリゲンの発現を増強するとフロリゲンの場合と正反対の表現型を示し、果実・種子数が増加することは有用であるが、同時に花成が大きく遅延するため、正常な時期に果実・種子を収穫できなくなってしまい実用化が困難であった。

この問題を解決するために、花芽形成の前にはアンチフロリゲンを発現させず、花芽分化の直後からアンチフロリゲンを発現させることを着想した。この条件を満たすプロモーターはフロリゲンの制御下にあることを意味している。フロリゲンの下流でアンチフロリゲンを発現させることによって、花成を遅らせて種子数のみ増やす技術が期待できる。

### 3. 研究の方法

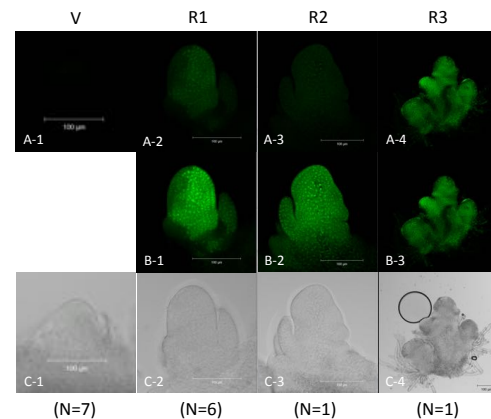
花成の前には活性が低い花成の直後から強発現するプロモーターの制御下で、アンチフロリゲン TFL1 もしくはフロリゲンを改変した人工アンチフロリゲンを発現する形質転換イネを作成する。利用するプロモーターは下記である。

**PAP2 プロモーター** : PAP2 はイネ小穂形成を促進する MADS-box 遺伝子であり、花成の前には発現がないが花成直後にメリステム全体で活性化することが報告されている。我々の行ったメリステムの RNA-seq においても、フロリゲン依存的に花成直後に活性化することを確認している。PAP2 の発現は花芽形成の過程を通して維持される。

### 4. 研究成果

まず、実際に PAP2 プロモーターが花成開始後にはたらくかを確認するために、PAP2 プロモーターの発現時期と発現部位を観察した。PAP2 プロモーターの下流に mClover 遺伝子レポーターとしてつなげたプラスミド DNA (pPAP2:mClover) を導入したイネ品種農林 8 号 (N8) の茎頂メリステムを栄養成

長期から生殖成長期にかけて観察した。その結果、本研究で使用するプロモーターは確かに生殖成長期以降に茎頂メリステムで特異的に発現することが確認できた。



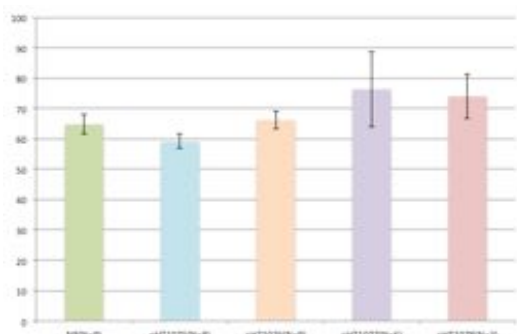
茎頂メリステムでの PAP2 プロモーターの機能観察

(A) 各ステージにおける pPAP2:mClover の発現の変化。(A-1) 栄養成長期 (A-2) メリステム伸長期 (A-3) 一次枝こう分化期 (A-4) 二次枝こう分化期  
(B) 各ステージにおける pPAP2:mClover の発現部位の変化。蛍光が明瞭に見えるよう画像を調整している。栄養成長期は十分な蛍光が見られなかったため省いてある。  
(B-1) メリステム伸長期 (B-2) 一次枝こう分化期 (B-3) 二次枝こう分化期  
(C) 各ステージの茎頂メリステムの明視野。(C-1) 栄養成長期 (C-2) メリステム伸長期 (C-3) 一次枝こう分化期 (C-4) 二次枝こう分化期

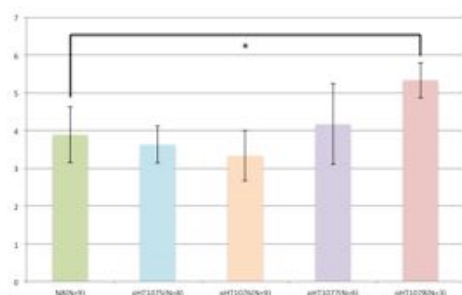
PAP2 プロモーターを人工アンチフロリゲンにつなげたプラスミド DNA を導入したイネ品種農林 8 号 (N8) 4 系統を作成し、形質評価した。4 系統の形質転換イネはそれぞれアンチフロリゲンが異なり、これらは人工的に作ったアンチフロリゲンである。Hd3a はイネのフロリゲン (Tamaki et al., 2007)、Hd3aY87H は Hd3a の Tyr87 を His に置換したアンチフロリゲンである (Hanzawa, 2005)。SRDX は転写因子とつなげることで、機能重複する転写因子より優先して標的遺伝子の発現を抑制するリプレッションドメインである (Hiratsu et al., 2003)。linker 配列は、SRDX と Hd3a または Hd3aY87H と直接つなげた場合リプレッサーとしてうまく働かない可能性を考慮し、両者をリンカーで連結している。これらを組み合わせた 4 系統の形質転換イネ、pHT1075 (pPAP2:Hd3a-SRDX)、pHT1076 (pPAP2:Hd3a-linker-SRDX)、pHT1077 (pPAP2:Hd3aY87H-SRDX)、pHT1078 (pPAP2:Hd3aY87H-linker-SRDX) を形質評価した。

農林 8 号 (N8) と比べて形質転換イネの出穂が遅れていないかを確認するため、播種から出穂までの日数を計測した。その結果、農林 8 号 (N8) と比べて出穂が有意に遅れた系統はなかった (図 5)。そこで収量に関する形質を調査した。一穂あたりの粒数が農林 8 号 (N8) より増加した系統はなかった (図 6)。一穂あたりの一次枝こう数は、農林 8 号 (N8) と比べて pHT1078 で増加していた (図 7)。一次枝こう 1 本あたりの側生器官数は、二次枝こう・穎花をどちらも含め

た数においても農林8号(N8)と比べて増加した系統はなかったが、二次枝こう数はpHT1076で増加していた(図8)。二次枝こう1本あたりの穎花数が農林8号(N8)と比べて増加した系統はなかった(図9、10)。これらの結果から、一穂あたりの粒数が農林8号(N8)と比べて増加した系統はなかったが、pHT1078は出穂を遅らせずに一穂あたりの一次枝こう数が増加しており、pHT1076は出穂を遅らせずに一次枝こう1本あたりの二次枝こう数が増加していた。



短日条件1回目における播種から出穂までの日数の比較  
N8:農林8号。横軸は系統名、縦軸は播種から出穂までの日数である。  
(平均値±標準偏差) \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$



短日条件における穂1本あたりの一次枝こう数の比較  
N8:農林8号。横軸は系統名、縦軸は穂1本あたりの一次枝こう数である。  
(平均値±標準偏差) \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$

再度短日条件下で実験を行った。到穂日数はpHT1077が農林8号(N8)より遅れた(図11)。そこで収量に関する形質を調査した。一穂あたりの粒数が農林8号(N8)より増加した系統はなかった(図12)。一穂あたりの一次枝こう数は、農林8号(N8)と比べてpHT1078で増加していた(図13)。一次枝こう1本あたりの側生器官数は、二次枝こう・穎花をどちらも含めた数、またそれぞれの数においても農林8号(N8)と比べて増加した系統はなかった(図14)。二次枝こう1本あたりの穎花数が農林8号(N8)と比べて増加した系統はなかった(図15、図16)。これらの結果から、農林8号(N8)と比べて一穂あたりの粒数が増加した系統はなかったが、pHT1078は出穂を遅らせずに一穂あたりの一次枝こう数が増加していた。

## 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 2件)

Kaneko-Suzuki, M., Ishikawa, R., Terakawa, C., Kojima, C., Fujiwara, M., Ohki, I., Tsuji, H., Shimamoto, K., Taoka, K. (2018) TFL1-like proteins in rice antagonize rice FT-like protein in inflorescence development by competition for complex formation with 14-3-3 and FD. *Plant Cell Physiol.* 59:458-468

Tsuji, H. (2017) Molecular function of florigen. *Breed. Sci.*, 67; 327-332.

[学会発表] (計 1件)

辻 寛之「フロリゲンの分子機能解明と植物改良への展開」龍谷大学・食と農の総合研究所岡田代表研究プロジェクト「農作物の新品種開発に向けた作物化過程解析研究ネットワークの構築」セミナー, 2018年2月5日, 龍谷大学・食と農の総合研究所, 招待講演

辻 寛之「フロリゲンの分子機能解明と植物改良への展開」植物科学シンポジウム2017「植物科学のバイオ農業への展開」, 2017年12月4日, 東京大学弥生講堂, 招待講演

[図書] (計 1件)

辻 寛之 (2017) 現代農業に革命の予感! 花を咲かせるフロリゲンとは? 化学 72: 41-48

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

## 6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )