

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07609

研究課題名(和文) フロリゲン複合体が誘導するジャガイモ塊茎分化初期過程の解明

研究課題名(英文) Analysis of tuberization by florigen activation complex

研究代表者

田岡 健一郎 (TAOKA, KEN-ICHIRO)

横浜市立大学・木原生物学研究所・特任助教

研究者番号：00467698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：日長変化によるジャガイモの塊茎形成誘導の分子機構を明らかにするために研究を行った。本研究であらたに調査した品種W553-4は優れた日長応答性を示した。W553-4は形質転換が困難であるが可能であることもわかった。以上より、W553-4は今後の国内での日長応答性解析のモデル品種となりうることがわかった。培養細胞を用いた実験から、塊茎抑制因子であるTFL1による、促進因子SP6Aの競合的阻害の可能性が明らかになった。また、フロリゲン複合体抑制化合物の投与実験から、この化合物がSP6Aによる塊茎誘導も阻害できる化合物であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義として、国内で入手可能な、ジャガイモ塊茎形成の日長応答性に優れた品種を見出した。花成誘導と同様に、TFL1がSP6Aを競合的に阻害して適切な塊茎形成が誘導される可能性を見出したことから、花成と塊茎誘導の分子機構の類似性が示唆された。さらに、フロリゲン阻害化合物が塊茎形成も阻害できることを見出したことから、塊茎形成過程を薬理的に解析できるツールを得た。社会的意義としては、フロリゲン阻害化合物を用いて、遺伝子組み換えによらずに塊茎形成時期や収量をコントロールできる可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism for day-length dependent tuberization of potato was analyzed. Here we used a potato cultivar, andigena W553-4, because Sayaka, which we used in the previous study, showed a moderate response to photoperiod for tuberization. W553-4 showed an ideal strict response, although it has a drawback that the transformation efficiency was low. A protoplast assay showed that TFL1 and a chemical inhibitor can inhibit SP6A activity.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：フロリゲン ジャガイモ 塊茎形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の栄養成長から有性生殖成長への成長相転換である花芽形成(花成)は日長変化の刺激によって合成される花成ホルモン(フロリゲン) FT タンパク質の長距離移動によって行われる。花成による有性生殖は植物の唯一の繁殖戦略ではなく、たとえばジャガイモは花から種子を作るだけでなく、地下で塊茎(イモ)を形成し栄養生殖によっても繁殖する。そして、ジャガイモの塊茎形成も、日長変化によって発現誘導される FT タンパク質 (SP6A) によって誘導される

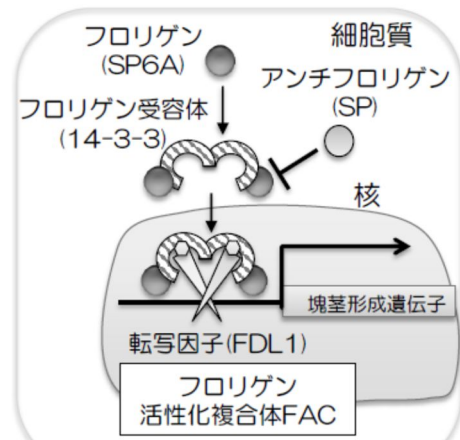


図1—SP6Aと14-3-3とStFDL1によるFAC形成と塊茎誘導

ことが明らかになっている (Navarro *et al.*, 2011)。申請者は、イネを用いて、長距離移動したフロリゲンが受容体 14-3-3 タンパク質や転写因子 OsFD1 と三者複合体 FAC を形成して DNA に結合し、花芽形成遺伝子の転写を活性化して花成誘導することをタンパク質構造及び機能の両面から明らかにした (Taoka *et al.*, Nature 2011)。そして、アンチフロリゲンとして機能する花成抑制因子 TFL1 が長距離移動して、フロリゲンと複合体形成に関して競合的に働いて花成を抑制していることを示唆するデータを多数得ている (投稿準備中)。さらに、SP6A が、受容体 14-3-3 タンパク質や塊茎特異的転写因子 StFDL1 と三者複合体を形成してジャガイモ塊茎形成を促進し、ジャガイモ TFL1 (SP) は塊茎形成を抑制することを明らかにしている (図 1、Teo *et al.* 2017)。しかし、地下茎先端のどの細胞で SP6A・SP 両者の活性が受容・統合されて、地下茎から塊茎への分化プログラムが進行するのかが不明である。そこで本申請では、塊茎分化進行過程での SP6A や SP、FDL1 の局在変化やそれらの相互作用変化を明らかにし、塊茎分化初期マーカー *StGA2ox1* 遺伝子の発現変化と合わせて、塊茎分化の初期発生過程を分子細胞生物学的に理解し、高収量や栽培期間の短縮などの優良形質を持ったジャガイモ育種の分子基盤を確立することを目的とする。

2. 研究の目的

1) ジャガイモの塊茎制御に関わるフロリゲン複合体の構成要素の地下茎先端での局在申請者が確立した試験管内地下茎誘導系と透明化技術 TOMEI (Hasegawa *et al.*, 2016) を用いて、塊茎分化進行にともなう地下茎先端部での SP6A や SP、FDL1 の GFP 融合タンパク質の局在変化や、BiFC 法によるそれらの相互作用変化を明らかにする。さらに、塊茎分化初期マーカー *StGA2ox1* 遺伝子の promoter-GUS 形質転換植物による発現パターンを組み合わせることで、塊茎分化シグナルがどの細胞で受容されて、その後どの細胞が細胞分裂と細胞伸張をひきおこし、協調的な塊茎への細胞分化が進行していくのかを明らかにする。

2) フロリゲン複合体の多機能性を担う転写因子の生化学的解析

フロリゲン機能の特異性を担うと考えられる塊茎誘導型転写因子 FDL1 について、DNA 結合特異性を SELEX 法や EMSA 法で解析し、花成誘導型転写因子 FD のそれと比較すること

で、フロリゲン複合体の多機能性の分子基盤を生化学的に明らかにする。

3) アンチフロリゲンによるジャガイモの塊茎抑制

SP6A が葉から長距離移動して塊茎誘導し (Navarro *et al.*, 2011)、アンチフロリゲン SP が抑制的に働く (投稿準備中) ことは明らかにされているが、SP が長距離移動して塊茎抑制するかは不明である。SP の発現は明確な日長変化は示さないが、地下茎だけでなく若い植物の葉や茎でも観察されることから (投稿準備中)、植物の生育などを地下茎に伝えて塊茎形成を制御している可能性が考えられる。そこで、接木実験により、SP による抑制効果や GFP 融合 SP タンパク質が接木面を超えて地下茎に伝わるのかを調べる。

3. 研究の方法

次の3つの課題を遂行し、ジャガイモ塊茎初期発生過程を明らかにする。

1. ジャガイモの塊茎制御に関わるフロリゲン複合体の構成要素の地下茎先端での局在

2. フロリゲン複合体の多機能性を担う転写因子の生化学的解析

3. アンチフロリゲンによるジャガイモの塊茎抑制

<平成29年度の計画>

1. ジャガイモの塊茎制御に関わるフロリゲン複合体の構成要素の地下茎先端での局在

SP6A や SP 遺伝子に GFP を、StFDL1 遺伝子に RFP を融合したキメラ遺伝子を作製し、ジャガイモ形質転換体を作製する。蛍光タンパク質局在観察時に予想される困難として、GFP 融合による分子量増加によって GFP 融合タンパク質の維管束から地下茎先端細胞への積み下ろし過程がうまく観察されない可能性が考えられる。その解決策として、BiFC 法で用いられるように GFP を2分割し、細胞間移動する SP6A や SP には83アミノ酸の GFP 小断片 Vc を融合し分子量の増加を抑え、細胞間移行を損なわないよう工夫したキメラ遺伝子も作成する。そして、これまでのFDに関する知見から細胞自律的に働くと考えられる転写因子 FDL1 遺伝子には173アミノ酸の GFP 大断片 Vn を融合し、両者を形質転換することで、両者の相互作用を検出できるようにする。次年度以降に、確立された形質転換体を用いて、蛍光タンパク質の局在観察や BiFC 法による相互作用細胞の観察を行う。SP6A や SP の Vc 融合タンパク質と Vn-StFDL1 融合タンパク質の植物細胞での BiFC 相互作用は確認済みである (Teo *et al.*, *Plant and Cell Physiology*, in revision)。また、SP6A シグナルの標的遺伝子とされる StGA2ox1 遺伝子の promoter-GUS レポーター植物も作製する。

2. フロリゲン複合体の多機能性を担う転写因子の生化学的解析

フロリゲンによる塊茎誘導機能の特異性を担う転写因子 StFDL1 について、組み換えタンパク質発現系を、多くの可溶性タンパク質の発現・精製に成功している pCold-GST (Hayashi and Kojima, 2008)を用いて確立させる。比較のため花成にかかわるFDについても準備する。また、細胞内での DNA 結合特異性を評価するために、酵母1ハイブリッド (Y1H) や、プロトプラストでのトランジェントアッセイのための発現ベクターを準備する。

3. アンチフロリゲンによるジャガイモの塊茎抑制

35S プロモーターで過剰発現する SP6A や SP の GFP 融合遺伝子形質転換体はすでにあるため、それらを野生型植物と接木し、塊茎形成への効果を経時的に観察する。また、台木から地下茎先端へのタンパク質移動を蛍光イメージングで観察する。さらに、接木を要さない長距離移動能評価系として、薬剤処理による局所的発現誘導系としてエタノール発現誘導系のベクター (Roslan et al., 2001) に SP6A や SP の GFP 融合遺伝子を導入し、形質転換体を作製する。

<平成30年度以降の計画>

1. ジャガイモの塊茎制御に関わるフロリゲン複合体の構成要素の地下茎先端での局在得られた形質転換体について、申請者が確立した試験管内塊茎誘導系を用いて、地下茎先端部での塊茎形成過程における SP6A-GFP や SP-GFP や StFDL1-RFP の蛍光観察を共焦点顕微鏡を用いて行なう。平行して StGA2ox1 - GUS 植物の GUS 染色解析も行う。また、共焦点顕微鏡を用いた蛍光観察による BiFC 相互作用解析もおこない、はじめに SP6A が受容される細胞を同定し、さらに、その後に起こる地下茎細胞の分裂・伸長パターンを詳細に観察する。

2. フロリゲン複合体の多機能性を担う転写因子の生化学的解析

得られた組み換え FDL1 タンパク質を用いて、SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 法により、in vitro での DNA 結合特異性を調べる。対照として花成にかかわる FD も調べることで特異性を明らかにする。SP6A の直接の標的遺伝子であると強く示唆されている StGA2ox1 プロモーターへの FDL1 の結合を Y1H 法や EMSA 法やプロトプラストでのトランジェントアッセイで検証する。

3. アンチフロリゲンによるジャガイモの塊茎抑制

接木実験や局所的誘導実験により、抑制因子 SP の長距離輸送による塊茎抑制効果を検証する。さらに、SP 遺伝子の詳細な発現解析を行い、植物の生育度や光条件に応じた SP 遺伝子発現制御の可能性を検証する。

4. 研究成果

日長変化によるジャガイモの塊茎形成誘導の分子機構を明らかにするために研究を行った。当初ジャガイモ品種「さやか」の形質転換体を用いた実験を計画していたが、この品種は日長応答性が厳密ではないため、その後の詳細な解析が困難であることが予想された。そこで、本研究では、あらたに、野生種に近く、国内で入手可能な品種 *andigena* W553-4 を用いることにした。W553-4 は誘導条件である短日では3週間目に塊茎が誘導されるが、非誘導条件である長日では、ストロンは形成されるものの少なくとも10週目まで塊茎がまったく形成されず、優れた日長依存性を示した(図3)。そして、W553-4 よりゲノム DNA を調製し、レポーターコンストラクトを作成した(図4)。しかし、W553-4 は、予想外に形質転換が困難であったため、形質転換体の候補は得たものの、詳細な発現解析にはいたらなかった。新規に構築した培養細胞を用いたレポーター実験から、塊茎抑制因子である TFL1 による、促

進因子 SP6A の競合的な阻害の可能性が明らかになった (図5)。また、別の研究からフロリゲン複合体抑制化合物の候補を得ていた。投与

実験から、この化合物が SP6A 過剰発現による塊茎誘導も阻害できる化合物であることが示唆された (図6)。さらに、この化合物は、先のレポーターアッセイ系において、SP6A の複合体形成を阻害できることがわかった (図6)。以上から、この阻害剤を用いることで塊茎形成の初期過程を薬理的に解析できる可能性が示唆され

た。また、このフロリゲン阻害化合物を用いて、遺伝子組み換えによらずに塊茎形成時期や収量をコントロールできる可能性が見出された。

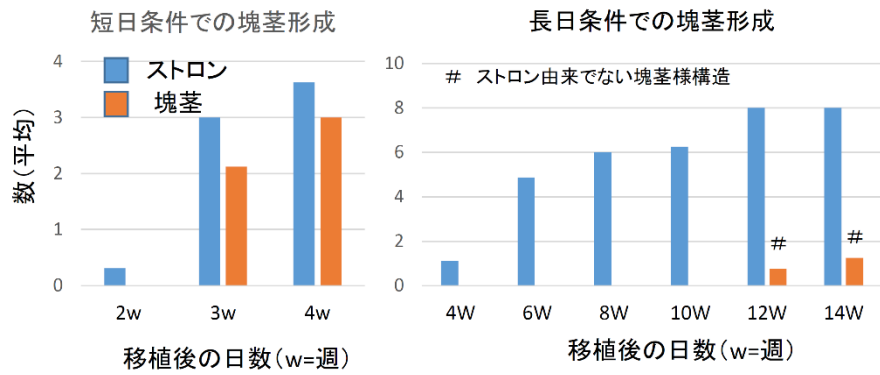
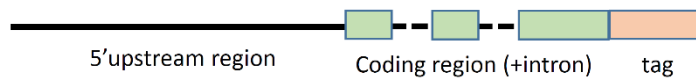


図3 W553-4の塊茎形成の日長応答性



Gene	Feature	5'upstream region (kb)	Coding region	tag
StSP6A	Tuberigen	3.3	1.4	GUS, Neongreen
StSP	Anti-tuberigen	3	2.1	GUS, Neongreen
StFDL1	Tuberization FD	3.9	1	GUS, Neongreen
StFD	Flowering FD?	9	1	GUS, Neongreen
StGA2ox1	Direct target of SP6A?	14	1.7	GUS, Neongreen, tagRFP

図4 Andigena W553-4ゲノム由来のレポーター遺伝子

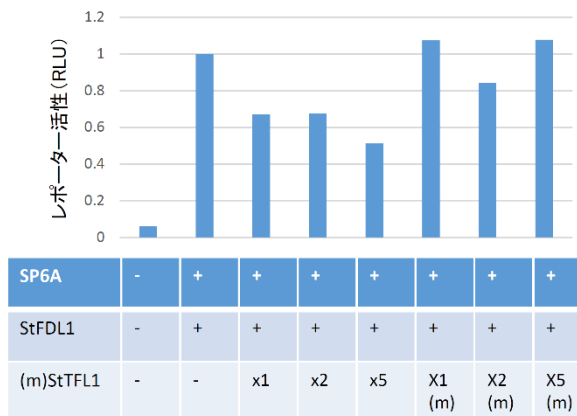


図5 StTFL1による、SP6A-StFDL1相互作用の競合的阻害。m=相互作用できない変異StTFL1



阻害剤 なし あり

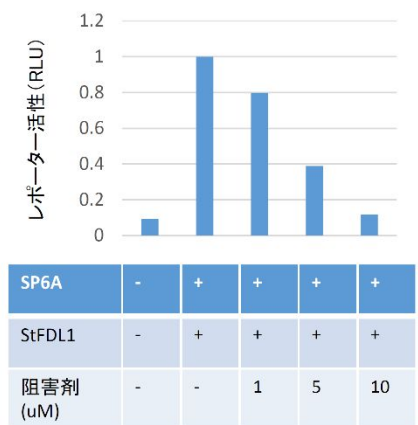


図6 フロリゲン阻害剤はSP6Aを阻害できる。(左) SP6A過剰発現体の試験管内塊茎形成アッセイ。矢印=塊茎。阻害剤は地上部の塊茎形成は阻害しないことに注意。(右) SP6A-StFDL1相互作用のレポーターアッセイ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kaneko-Suzuki M, Kurihara-Ishikawa R, Okushita-Terakawa C, Kojima C, Nagano-Fujiwara M, Ohki I, Tsuji H, Shimamoto K, Taoka KI.	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 Cell Physiol.	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田岡健一郎, 島谷 善平, 小川 真奈, 齋藤 洋美, 池田 洋一, 赤司 裕子, 山口 公志, 寺田 理枝, 川崎 努, 辻 寛之
2. 発表標題 高感度な発光レポーターNanoLucの植物細胞での利用
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Ken-ichiro Taoka, Miho Suzuki, Hiroyuki Tsuji, Chojiro Kojima, Ko Shimamoto
2. 発表標題 Hd3a and RCN in rice antagonize in inflorescence development through competition for complex formation with 14-3-3 and FD
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia conference on Plant Cell & Development Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋賢多, 齋藤亜美, 張禎日, 島本功, 辻寛之, 田岡健一郎
2. 発表標題 ジャガイモ塊茎誘導におけるTFL1ホモログのアンチチューベリゲン活性の役割
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田岡健一郎, 河原郁美, 島谷善平, 寺田理枝, 辻寛之, 児嶋長次郎
2. 発表標題 フロリゲン複合体形成を制御する化合物による花成調節
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田岡健一郎, 河原郁美, 島谷善平, 寺田理枝, 辻寛之, 児嶋長次郎
2. 発表標題 フロリゲン活性化複合体阻害化合物による花成調節
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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