

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780003
 研究課題名 (和文) イネ出穂期促進遺伝子ファミリーによる栄養生長期形態制御の解析
 研究課題名 (英文) Functional analysis of rice flowering genes on the vegetative growth of rice.
 研究代表者
 辻 寛之 (TSUJI HIROYUKI)
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
 研究者番号：40437512

研究成果の概要：

フロリゲンは植物の開花を調節する基本分子として約 70 年前に提唱された。2007 年にその実体がイネでは Hd3a タンパク質であることが明らかとなった。Hd3a タンパク質はイネの出穂促進条件である短日条件下で葉身の維管束において合成され、維管束を經由して茎頂まで移動し、茎頂分裂組織の生長相転換を促す。本研究では、*Hd3a-GFP* 融合遺伝子を維管束で発現させたイネにおいて、フロリゲンの増加による極早生の表現型に加えて分げつの増加、半矮性、穂の分枝の減少など様々な形態異常を示すことを見いだした。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：育種学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：イネ フロリゲン

1. 研究開始当初の背景

フロリゲンは植物の開花時期を決定する因子としてその存在が 1930 年代に提唱されたが、分子実体は謎のままであった。2007 年に私たちはその実体が Hd3a タンパク質であることを明らかにした。Hd3a タンパク質は真確生物に広く保存されたフォスファ

チジルエタノールアミン結合タンパク質ファミリーに属するが、生化学的な機能については未知である。分子量は約 22 kD とそれほど大きくなく、またコンパクトな球状の立体構造を取ることが予想されている。Hd3a タンパク質は花成誘導条件の葉において、篩部伴細胞特異的に転写活性化され、その発現を

RNAi 法によって抑制すると花成が遅延する。光周性花成を制御する重要な 3 つの遺伝子 GI, CO, FT/Hd3a のうち、花成誘導条件において特異的に転写活性化する遺伝子は FT/Hd3a のみであり、またその発現組織が維管束に接することやコンパクトな立体構造から、移動性花成刺激（フロリゲン）の分子実体は FT/Hd3a ではないかと考えられるようになっていた。すなわち、生化学的機能がはっきりとは明らかにされていない巨大なタンパク質である GI がタンパク質複合体を形成して下流の CO 遺伝子の転写を活性化し、CO 遺伝子のステップにおいて植物の概日時計の情報と外的環境からのインプットである光の情報をタンパク質の安定化などの形で統合する。この統合過程において、植物の日長計測がなされるといえる。すなわちイネでは花成誘導条件である短日条件で CO(Hd1) の活性が高いレベルに決定される。これらの情報によって決定された CO 活性が Hd3a/FT 遺伝子の転写活性化を促進すると考えられる。これを受けて世界中でフロリゲンの実体の機能解明が始まっていた。本研究は上記のような背景のもとに開始された。

Hd3a 遺伝子に GFP 遺伝子を連結した融合遺伝子を Hd3a 自身のプロモーターで発現させたところ、Hd3a 自身のプロモーターは葉の維管束篩部伴細胞のみで活性を持ち、茎頂ではほとんど活性を持たず、また、Hd3a mRNA も葉では検出されるが茎頂ではほとんど検出できないにもかかわらず、Hd3a-GFP タンパク質に由来すると考えられる GFP 蛍光は茎頂において明瞭に観察することができた。この植物は早生となることから、長距離移動性の花成刺激の分子実体は Hd3a/FT タンパク質であると考えられるようになった。この研究の過程で、Hd3a を維管束特異的に発現させたイネでは開花の促進に加えて種々の表現型が観察されることが明らかとなった。これはフロリゲンが開花促進に加えて多機能性を保持している可能性が考えられる。花成はフロリゲンによって誘起されるが、その過程において葉の形態変化や色素組成の変化、また花成と連動した様々な形態変化が起きることが知られている。これらの変化がフロリゲンと関連したものであるかは、フロリゲンの分子実体が明らかとなるまでまったく研究は行われていなかった。

2. 研究の目的

フロリゲン Hd3a の機能を解析する過程で、Hd3a が開花だけでなく栄養生長期の形態形成も制御する事を見いだした。本研究ではフロリゲンが栄養生長期に果たす機能を明らかにすることが目的である。

Hd3a の発現は葉の維管束の篩部伴細胞で特異的に活性化する。Hd3a プロモーターの活性

はそれほど高くないため、この遺伝子を高発現させるためにより強く篩部伴細胞で発現するプロモーターを探索した。その結果、rice phloem protein16 promoter および rolC promoter がみいだされた。これらのプロモーターは既に維管束篩部伴細胞特異的に強いプロモーター活性を持つことが示されている。本研究では、これらのプロモーターを利用して Hd3a をその内生遺伝子と発現部位を変化させずに高発現させることで、Hd3a の機能を詳細に解析することを目的とした。本研究の遂行により、花成と連動した様々な形態変化が起きることが知られている。これらの変化がフロリゲンと関連したものであるかを考察する重要な知見が得られる。

3. 研究の方法

Hd3a 過剰発現イネを用いて詳細な表現型観察や分子遺伝学的な解析を行うことにより、Hd3a が栄養器官の形態形成を制御する分子メカニズムを明らかにすることを試みた。Hd3a を維管束において過剰発現するイネでは生育の過程を通して分枝の促進が確認された。これらの植物において分枝の促進がどのような原因によるものなのかを確認するために、形質転換イネの葉を切除し腋芽の形成位置及び形成部位を調査した。また、Hd3a が維管束から長距離移動して腋芽へ到達する可能性を検証するために、Hd3a-GFP 融合タンパク質を維管束で発現させたイネの腋芽の生切片をビブラトームにより調製して分光機能をもつ共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

4. 研究成果

Hd3a-GFP を維管束で発現させたイネでは開花の促進に加えて分げつの増加が見られた。分げつの増加は腋芽メリステムの増加を伴わず、従ってすでに完成した腋芽の伸長生長の開始が促された結果であると考えられた。すなわち、葉の腋部に一つ形成された腋芽において、野生型では通常休眠状態に入り伸長生長しないものが形質転換イネでは伸長生長を開始していると解釈された。本研究で用いた rice phloem protein16 promoter および rolC promoter は、維管束の篩部伴細胞でのみ特異的な活性を持っており、側芽メリステムにおいてはまったく活性を持っていない。にも関わらず、上記のプロモーターで Hd3a-GFP を過剰発現させたイネでは側芽において伸長生長が活性化するという表現型が観察された。すなわち Hd3a の合成部位と作用部位が異なっており、Hd3a タンパク質の合成部位から側芽までシグナルが長距離移動していることが考えられる。本研究では、このシグナルとして Hd3a タンパク質自身を想定した。なぜなら Hd3a はフロリゲンとし

て機能する際に葉の維管束篩部伴細胞で合成された後、茎頂まで長距離移動し、茎頂に到達後花成を誘導することが知られているからである。このこととのアナロジーを考えると、篩部伴細胞で合成されたフロリゲン Hd3a は茎頂だけでなく側芽へも長距離移動し、側芽の伸長生長を促進するというモデルが考えられる。このモデルを検証するために、rice phloem protein16 promoter および rolC promoter で Hd3a-GFP タンパク質を発現させた形質転換イネを栽培し、その側芽部分をビブラトームによって生切片として GFP 蛍光の有無を観察した。その結果、上記のプロモーターによって篩部伴細胞特異的に発現された Hd3a-GFP タンパク質を側芽メリステムにおいても確認することができた。GFP 蛍光と自家蛍光を区別するため、分光機能を持つ共焦点顕微鏡によって観察し、側芽における緑色蛍光が 511 nm 付近にピークを持つ GFP に特徴的なスペクトルを持つことが分かり、またこの蛍光は野生型植物ではまったく観察されなかった。次いで、維管束特異的なプロモーターだけでなく Hd3a 自身のプロモーターによって Hd3a-GFP を発現させた場合も Hd3a-GFP が側芽へ移動することができるかを調査した。Hd3a 自身のプロモーターによって Hd3a-GFP を発現するイネにおいても、それほど強くはないが分枝が増加する表現型が確認できた。ついでこの植物から側芽部分を切り出しビブラトームで生切片を調製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、Hd3a 自身のプロモーターによって Hd3a-GFP を発現するイネにおいても側芽で GFP 蛍光を確認することができた。Hd3a プロモーターも側芽ではまったく活性をもっていない。これらの結果から、Hd3a タンパク質は篩部伴細胞で発現が活性化した後、茎頂に加えて腋芽へも長距離移動し、腋芽へ到達後に休眠相から栄養生長相への相転換を促すと考えられる。Hd3a タンパク質はフロリゲンとして茎頂まで長距離移動し栄養生長相から生殖生長相への相転換を開始させることを考え合わせると、Hd3a タンパク質を長距離移動性の生長相転換因子として考えることができる。これまでにタンパク質が長距離移動して様々な形態形成の局面を制御する例は知られておらず、本研究からは生長制御における新規な概念を提示できる。

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 3 件)

①田岡健一郎、辻寛之、島本功 (2009) 花成ホルモン、フロリゲン--その構造解析から分子機構の理解へ 蛋白質核酸酵素 54:

1702-1707 査読無し

②Purwestri, Y. A., Ogaki, Y., Tamaki, S., Tsuji, H. and Shimamoto, K. (2009) The 14-3-3 protein GF14c acts as a negative regulator of flowering in rice by interacting with the florigen Hd3a. *Plant Cell Physiol.* 50: 429-438. 査読あり

③Tsuji, H., Tamaki, S., Komiya, R. and Shimamoto, K. (2008) Florigen and photoperiodic control of flowering in rice. *RICE* 1: 25-35. 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

①玉置 祥二郎, 辻寛之, 島本 功 Hd3a florigen distribution in the shoot apical meristem during flower development in rice. 第 32 回日本分子生物学会 2009 年 12 月 9 日 パシフィコ横浜 横浜市

②辻寛之、橘知夏、玉置祥二郎、島本功 イネのフロリゲン Hd3a による分枝の促進 第 50 回日本植物生理学会年会 2009 年 3 月 23 日 名古屋大学

③大垣 友香, 柳瀬 朋子, Yekti Asih Purwestri, 田岡 健一郎, Hann Ling Wong, 辻寛之, 島本 功イネのフロリゲン Hd3a と相互作用する 14-3-3 タンパク質の解析 第 31 回 日本分子生物学会年会 2008 年 12 月 9 日 神戸ポートアイランド 兵庫県

④Tsuji, H., Tachibana, C., Tamaki, S., and Shimamoto, K. The role of Hd3a, a mobile flowering signal, in the architecture of rice, The 6th International symposium on rice functional genomics, Nov. 9, 2008, Jeju, Korea.

⑤Yekti Asih Purwestri, Shojiro Tamaki, Yuka Ogaki, Hiroyuki Tsuji and Ko Shimamoto Identification of 14-3-3 protein as an Hd3a interactor in rice Keystone Symposia 2008 年 9 月 23 日 Colorado, USA

⑥橘 知夏、辻 寛之、玉置 祥二郎、島本
功 イネの移動性花成シグナル Hd3a は花
以外の形態形成にも関与する 第30回日本分
子生物学会年会・第80回日本生化学会大会
合同大会 2007年12月13日 パシフィコ横
浜 横浜市

⑦Hiroyuki Tsuji, Shojiro Tamaki, Shoichi
Matsuo, Chika Tachibana, Shuji Yokoi and
Ko Shimamoto The role of Hd3a, a mobile
flowering signal, in the architecture of
rice The fifth international symposium on
rice functional genomics 2007年10月15
日 エポカルつくば 茨城県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 寛之 (TSUJI HIROYUKI)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教
研究者番号：40437512