

平成22年 6月21日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770040
 研究課題名（和文） 青色光依存のかつOsGI依存的なフロリゲン遺伝子の転写制御機構の
 解明
 研究課題名（英文） Analysis of transcriptional regulation of florigen gene expression
 in rice
 研究代表者 伊藤 博紀（ITO HIRONORI）
 独立行政法人農業生物資源研究所・光環境応答研究ユニット・任期付研究員
 研究者番号：00466012

研究成果の概要（和文）：本研究はイネの開花時期を制御する開花促進因子 *Ehd1* の転写制御機構の解明を目指すことを目的とする。*Ehd1* の発現は青色光依存的に誘導される。この時、夜明け付近に与えた青色光により最も強く誘導されることを明らかにした。この現象は *osgi* 機能欠失変異体では観察されないことから、*OsGI* は概日時計を介して *Ehd1* の青色光反応性を朝に制御していると考えられた。これらの結果は、概日時計を介した1日の中の特定のタイミングでの開花制御遺伝子の発現制御が開花時期の決定において重要な役割を果たすことを強く示唆している。

研究成果の概要（英文）：Crop yields are strongly associated with flowering-time. Florigen triggers photoperiodic flowering in plants. In rice, a short-day plant, *Ehd1*, a B-type response regulator, up-regulates florigen *Hd3a* expression and mainly confers SD-dependent promotion of flowering. Previous studies indicate that the function of *OsGI*, a component of circadian clocks in rice, is necessary for the *Ehd1* induction in response to blue light. This study demonstrated that *Ehd1* was maximally induced by blue light given around subjective dawn. Since this induction was not occurred in *osgi*-deficient background, *OsGI* shapes a light sensitive phase around dawn to blue-light signals for *Ehd1* expression. These results strongly indicate that morning *Ehd1* expression is occurred when blue-light coincide with the morning phase set by *OsGI*-dependent circadian clocks.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：植物分子遺伝学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答、フロリゲン、青色光受容体、転写制御

1. 研究開始当初の背景

GIGANTEA (GI) は植物特異的なタンパク質をコードし、概日時計の構成因子として機能

することが遺伝学的に示されている。光周性花成経路において、GIを含む概日時計は、フロリゲン遺伝子の発現を誘導する転写因子、

すなわち、シロイヌナズナにおける CO、イネにおけるそのオルソログ Hd1 の遺伝子発現を、夜がピークとなるようにリズムカルに制御することが知られている。

これまでに GI の生化学的な機能を示す知見は報告されていなかったが、研究開始当初、シロイヌナズナの LOV ドメイン・F-box・Kelch repeat ドメインを持つタンパク質、FKF1 と ZTL の研究から、GI の概日時計および花成における生化学的な役割を示す報告が成された。FKF1 と ZTL は、それぞれ、CO の転写抑制因子 CDF1 と概日時計の主働因子 TOC1 のユビキチン依存的な分解に関与する F-box タンパク質である。また、この LOV ドメインは青色光受容体が持つ特徴的構造であり、実際に、青色光を受容する。この時、CDF1 および TOC1 の分解は、夕方特異的な青色光を受容した FKF1 と ZTL が GI と複合体を形成することによって引き起こされることが明らかにされた。このことは、GI が概日時計構成因子としてのマスターコントローラー的な機能を有するだけでなく、青色光受容体の相互作用因子として、特定のタンパク質の機能や下流の遺伝子発現を調節していることを示唆している。

一方で、短日植物のモデル植物であるイネのフロリゲン遺伝子 *Hd3a* の転写活性化機構に関する研究から、イネのフロリゲン遺伝子の転写は、Hd1 とシロイヌナズナには存在しないイネならではの開花促進因子 *Ehd1* の 2 つの独立した因子によって制御され、*Ehd1* の転写誘導は青色光を必要とすることが解ってきた。また、ヘム酸化酵素を欠損し、活性化型光受容体をほとんど持たない早咲き変異体 (*se5* 変異体) の早咲き抑制変異体の原因遺伝子が *OsGI* であることが明らかにされた。最近、*se5* 変異体を用いた解析から、(1) *Ehd1* の転写活性化が、朝方の青色光を受容して起こること、(2) この転写活性化が、*se5/osgi* 二重変異体では起こらないことを見出した。このことから、イネにおいて、*OsGI* は青色光を介した開花促進に機能することが考えられ、その下流の因子として *Ehd1* が存在することが示唆された。さらに、*OsZTL* の T-DNA 遺伝子破壊系統を同定し、系統化を進めてきた。これらの材料を用いれば、青色光依存的で *OsGI* の機能を必要とするイネの開花促進経路の分子機構を明らかにできると考えられた。

2. 研究の目的

青色光と *OsGI* 依存的な花成促進におけるフロリゲン遺伝子発現の促進因子は *Ehd1* であることが解ってきた。そこで、花成経路の全体像を明らかにするために、*Ehd1* 遺伝子の転写活性化に係る青色光受容体の同定を目指す。

また、*OsGI* の機能が *Ehd1* の転写活性化に対してどのように必要であるのかを明らかにする。

植物間で GI 依存的な花成促進経路を比較すると、シロイヌナズナは夕方、イネは朝方の青色光を必要とする違いがある。この違いを分子レベルで明らかにするために、*OsGI* 遺伝子産物が朝方に存在するのを検証する。

3. 研究の方法

(1) *Ehd1* の転写活性化に係る青色光受容体の同定

OsZTL に関しては、遺伝子破壊系統 (*oszt1-1*) を、*OsFKF1* に関して人為的に *OsFKF1* の機能を減退させた形質転換体を作製する。いずれかの変異体において、朝方に観察される *Ehd1* の遺伝子発現が減少し、出穂期が遅れるのかを解析する。

(2) 夕方から朝にかけての *OsGI* タンパク質の安定性の解析

OsGI タンパク質の挙動を調べるために、タグを融合した *OsGI* タンパク質をイネ植物体内に発現させ、明暗周期中の経時的な *OsGI* タンパク質の変化をモニターする。

(3) 青色光依存的な *Ehd1* の転写活性化に係る *OsGI* の作用機作の解明

Ehd1 の転写活性化は朝方に起こるのに対して、*OsGI* の転写産物のピークは夕方に存在する。夕方に発現する *OsGI* が *Ehd1* の朝方の遺伝子発現をどのような制御するのかを明らかにするために、光中断を利用した生理学的実験を行う。

4. 研究成果

研究の主な成果

(1) *Ehd1* の転写活性化に係る青色光受容体の同定

oszt1-1 遺伝子破壊系統と *OsFKF1* ドミナントネガティブ型過剰発現体を用いて、青色光依存的な朝方の *Ehd1* の発現を解析した。しかしながら、両変異体と野生型の間で、*Ehd1* 遺伝子の青色光依存的な発現に有為な差は観察されなかった。また、出穂期に対する有為な差も観察されなかった。このことから、*OsGI* はシロイヌナズナの *GI* とは異なるメカニズムで、青色光を介した *Ehd1* の転写誘導に機能することが強く示唆された。

(2) 夕方から朝にかけての *OsGI* タンパク質の安定性の解析

OsGI の内在性のプロモーターの制御下で、エピトープタグを融合した *OsGI* 遺伝子が発現するコンストラクトを作製し、*osgi* 変異体に対して導入した。この形質転換体では、*osgi* 変異体を示す短日条件下での遅咲き表現型が野生型とほぼ同様に復帰したことが

ら、導入した遺伝子は植物体内で正常に機能していると考えられた。この時、短日条件下で生育させた植物体において、OsGI タンパク質の挙動を解析した結果、夕方(図1. 17:30)にタンパク質が最も蓄積し、*Ehd1* の誘導が起こる朝方では検出限界近くまで減少することが明らかとなった(図1. 8:00, 10:00)。このことから、OsGI タンパク質そのものが直接的に *Ehd1* のプロモーター上で転写活性化に機能するというよりはむしろ、概日時計の機能を介して、未同定な下流因子の機能を調節することで、間接的に *Ehd1* の転写活性化に機能すると考えられた。

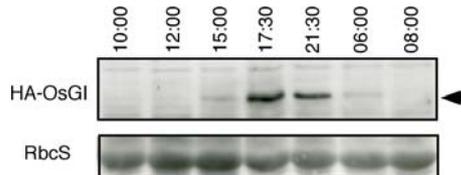


図1. 明暗周期における OsGI タンパク質レベルの経時的な変動
植物体は、短日条件下(8:00 夜明け/18:00 日没)で生育させた。抽出したタンパク質は SDS-PAGE にて分離し、ウェスタンブロッティングにて解析した。OsGI タンパク質(矢頭)は α -HA 抗体により検出した。RbcS はローディングコントロールとして示している。

(3) 青色光依存的な *Ehd1* の転写活性化に係る *OsGI* の作用機作の解明

明暗周期中において、*Ehd1* の青色光依存的な発現は朝方に起こるのに対して、OsGI のタンパク質の蓄積は夕方に起こることから(図2)、*OsGI* は概日時計の機能を介して *Ehd1* の転写を制御するののかに関して解析を行った。具体的には、活性型フィトクロムを欠損し、*Ehd1* を日長非依存的に誘導する *se5* 変異体を用いて、短日条件または長日条件で生育後、暗期に入ったタイミングから恒暗条件に移し、様々なタイミングで青色光を照射し、各タイミングにおける *Ehd1* 遺伝子発現の光に対する応答性を観察した(図2)。その結果、*Ehd1* の青色光依存的な発現は、与えた日長条件に関わらず、暗期に入ってから約 10-12 時間後の主観的朝方付近に与えられた青色光により最も強く誘導を受ける概日リズムを示すことを明らかとした。さらに、*OsGI* の機能を欠失する *se5/osgi* 二重変異体では、*Ehd1* の青色光依存的な誘導がいずれのタイミングでも起こらないことを明らかにした。

以上の結果から、*OsGI* を介した青色光依存的な *Ehd1* の転写制御機構は次のように考えられた(図3)。*se5* 変異体を用いた解析から、*OsGI* は概日時計因子としての機能を介して、朝方にピークとなるような *Ehd1* の青色光応答性の生み出すと考えられた(図3 上段)。フィトクロムが機能しない(*se5*) 背景では、

開花の抑制機構が働かないため、*Ehd1* は日長に関わらず *OsGI* の生み出す光応答性の制御を受けて朝に発現する(図3 中段)。一方、野生型では、フィトクロムを介した開花抑制系が機能することで、長日条件下での *Ehd1* の青色光の応答性は抑制され、その発現に日長依存性が生まれると考えられた(図3 下段)。

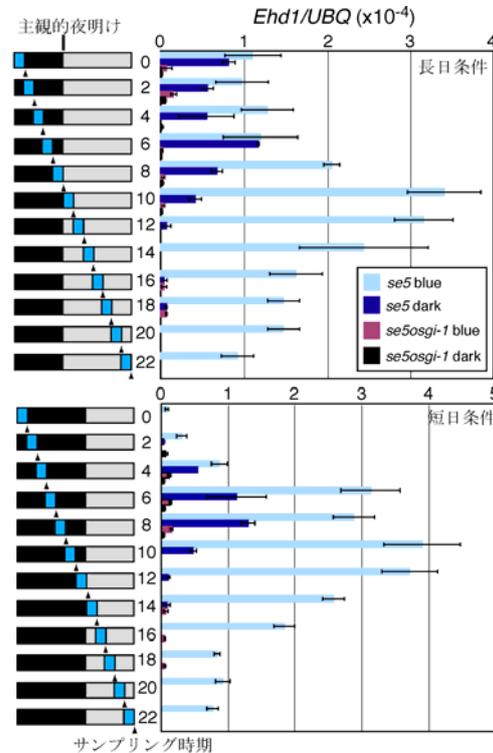


図2. 1日の中での *Ehd1* の青色光依存的な転写誘導

se5 変異体は、短日(10時間明期)または長日(14.5時間明期)条件下で生育後、暗期に入った時間を 0 として、恒暗条件に移した。2時間おきに 2 時間の青色光パルス照射し、各タイミングにおける *Ehd1* の発現レベルを real-time PCR 法を用いて定量した。Blue は青色光照射を dark はコントロールとして光を照射しなかったサンプルを示している。

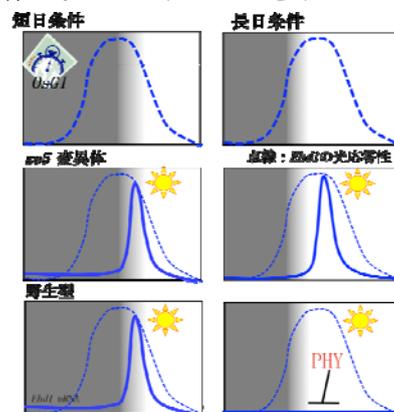


図3. 青色光依存的かつ *OsGI* 依存的な *Ehd1* の転写制御モデル

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

光周性花成反応は、植物の多様性を研究する1つの興味深い研究テーマである。これまで分子遺伝学的な研究から、短日植物のイネは、長日植物のシロイヌナズナと進化的に保存された因子に加えて、*Ehd1*のようなイネならではの光周性花成因子を登場させ、短日条件下で開花を誘導する独自の花成経路を構築してきたことが示唆されている。本研究は、その多様性の分子メカニズムの一端を明らかとしたと考えている。

生物の環境因子に対する応答は概日時計の位相の影響を強く受けることが多く報告されており、そのことは時計のゲート効果と呼ばれる。概日時計は、環境刺激を受容するゲートを設定することで、特定の時間にのみ環境刺激を受け、時間や季節を認識すると考えられている。*OsGI* はゲート効果を介して *Ehd1* の光応答性のタイミングの制御し、朝を認識して、開花を誘導させることが強く示唆された。同様の結果は、シロイヌナズナにおけるフロリゲン遺伝子発現の制御因子 *CO* の発現制御に関しても報告されている。しかしながら、*CO* の発現はゲート効果を介して夕方に開花を促進させることから、それぞれの発現を制御する分子メカニズムは異なると考えられ、この点が解明されれば、高等植物における時間認識の新しいモデルを提唱することができると考えられる。

今後の展望

Ehd1 の転写活性の全貌を解明するためには、青色光受容体を同定する必要がある。また、*OsGI* の機能に依存して発現する *Ehd1* の転写制御因子を同定することが必須である。

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1件)

1. Hironori Itoh, Yasunori Nonoue, Masahiro Yano, Takeshi Izawa (2010) A pair of floral regulators sets critical daylength for Hd3a florigen expression in rice. *Nature genetics* (in press)

[学会発表] (計3件)

1. Hironori Itoh, Takeshi Izawa (2009) Gating mechanism conferred by *OsGI* for both a floral promoter and a floral repressor make rice a short-day plant. KYESTONE SYMPOSIA, Plant Sensing, Response and Adaptation to the Environment 2009. 1. 13. Montana, USA.

2. 伊藤博紀、野々上慈徳、矢野昌裕、井澤毅 (2009) 光中断によるイネ開花抑制の分子機構の解析 第50回日本植物生理学会年会 2009. 3. 24. 名古屋大学
3. 伊藤博紀、野々上慈徳、矢野昌裕、井澤毅 (2009) イネにおける開花制御因子 *Ehd1* と *Ghd7* を介したフロリゲン *Hd3a* 遺伝子の限界日長による転写制御の解析 第51回日本植物生理学会年会 2010. 3. 21. 熊本大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 博紀 (ITO HIRONORI)
独立行政法人農業生物資源研究所
光環境応答研究ユニット
任期付研究員
研究者番号：00466012

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：