

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06688

研究課題名(和文) DELLAタンパク質の二重の役割による花成制御機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of flowering regulation by DELLA protein

研究代表者

深澤 壽太郎 (Fukazawa, Jutarou)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・助教

研究者番号：90385550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：いつ花を咲かせるかは、植物において最も重要な決定事項の1つであり花成と呼ばれる。花成は主に4つの制御経路が知られており、最終的に花成統合遺伝子FT, SOC1, LFYに集約される。ジベレリン(GA)による花成制御は、「葉におけるFTの発現促進」と「茎頂におけるSOC1, LFYの発現促進」と離れた2箇所の組織で制御される。GA信号伝達の抑制因子DELLAと相互作用する転写因子GAF1を単離し、DELLAはコアクチベーターとして、もう一つの相互作用因子TPRはコリプレッサーとして機能することを示した。GAF1標的遺伝子として花成抑制遺伝子を同定し、GAによる花成制御機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジベレリン(GA)による花成促進経路は、これまでに葉でFT、茎頂でSOC1、LFYの発現が誘導されることが知られていたが、如何にしてこれらの遺伝子の発現が制御されるかは未解明であった。申請者は、GA信号伝達の研究においてGA信号伝達の抑制因子DELLAと相互作用するGAF1転写因子を同定し、GAによる標的遺伝子の発現制御機構を確立した。GAF1の過剰発現体では、花成が促進されることから、GAF1複合体のGA花成経路の関与が示唆された。本研究では、複数の花成抑制遺伝子をGAF1の標的遺伝子として同定し、GAF1複合体を介したGAによる花成制御の分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Flowering is the developmental transition from the vegetative to the reproductive phase. In *Arabidopsis thaliana*, the autonomous, photoperiod, vernalization, thermosensory, and gibberellin (GA) pathways promote flowering by activating the floral integrator genes FT, SOC1, and LFY. Although gibberellin (GA) promotes flowering by activating the floral integrator genes, the molecular mechanism remains unclear. DELLAs are negative regulators in GA signaling and act as coactivators of the transcription factor GAI ASSOCIATED FACTOR 1 (GAF1). GAs convert the GAF1 complex from a transcriptional activator to a repressor. Using RNA-seq analysis, we identified four flowering repressors. In response to GAs, GAF1 forms a transcriptional repressor complex and promotes the expression of FT and SOC1 through the repression of four flowering repressor genes.

研究分野：植物生理学

キーワード：ジベレリン 花成 DELLAタンパク質 信号伝達 転写制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

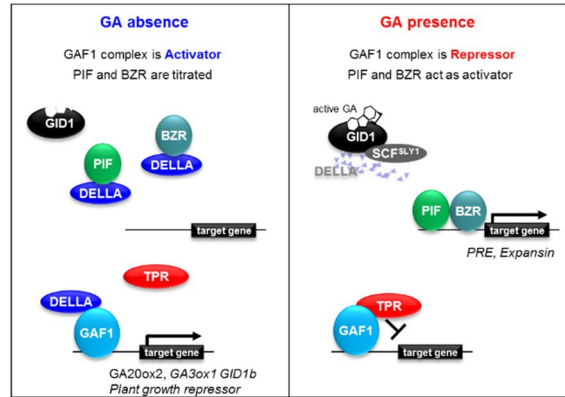
1. 研究開始当初の背景

いつ花を咲かせるかは、移動できない植物において最も重要な決定の1つである。栄養成長から生殖成長への移行は花成と呼ばれ、様々な外的、内的要因によって制御されている。これまでに、光周期経路、自律経路、春化経路、ジベレリン (GA) 経路が報告されている。それぞれの花成経路の信号は、花成統合遺伝子であるフロリゲン FT に集約される。ジベレリン (GA) による花成制御は、「葉における FT の発現促進」と「茎頂における花芽形成」と離れた2箇所の組織で制御される。GA 内生量は、GA 信号伝達経路を介した GA 生合成遺伝子の転写レベルのフィードバック制御によって厳密に調節されている。短日条件下では、花成直前に GA 量が増加し花成が促進されることが報告されている。GA 信号伝達において DELLA タンパク質は、主要な抑制因子としてはたらく。DELLA は、機能未知の核タンパク質であり下流の信号伝達を抑制する。DELLA が核内に蓄積すると植物の成長は抑制され、著しい矮化、花成遅延を誘引すると考えられている。GA 存在下では、DELLA はコビキチン化され分解されることで植物は成長する。GA 生合成と GA 信号伝達は密接に関係しており、GA 内生量は、フィードバック制御により恒常性が維持される。本研究者は、GA 信号伝達の抑制因子 DELLA と相互作用する転写因子 GAF1 を単離した。DELLA はコアクチベーターとして、もう1つの相互作用因子 TPR はコリプレッサーとして機能することを示した。GAF1 複合体は GA 依存的に転写活性化複合体から抑制複合体に機能転換することで標的遺伝子である GA 生合成遺伝子の発現を制御し、GA フィードバック制御の中心的な役割を担うことを明らかにした。一方で、GAF1 過剰発現体は花成が促進され、*gaf1 gaf2* 変異体は花成が著しく遅延するため、GAF1 は、GA フィードバック制御ばかりでなく、GA 花成経路にも関与すると考えられた。

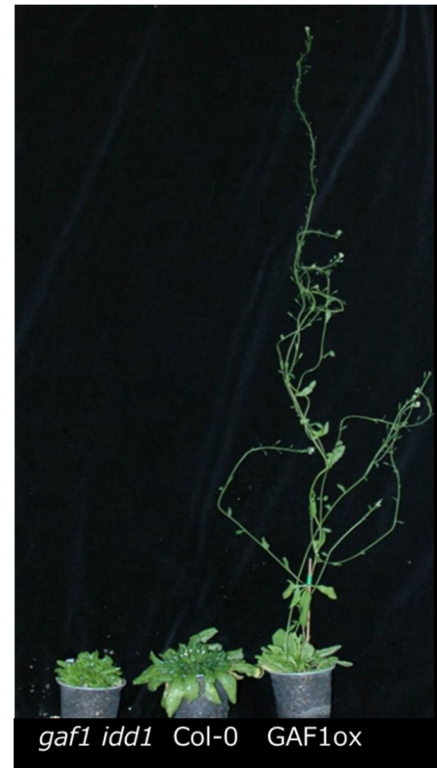
2. 研究の目的

栄養成長から生殖成長への転換である花成は、植物の成長戦略のなかで最も重要な決定事項の1つである。島本、荒木らにより花成ホルモン・フロリゲンの実体が FT・Hd3 であることが明らかにされた。FT・Hd3 は、多くの植物種で広く保存されており、FT がいつ発現するかが、花成を決定づける要因と成っている。花成には、4つの主要な経路が報告されており、1つが GA 経路である。GA 欠損変異体 *gal-3* では FT の発現量が減少し花成が遅延するが、GA 投与により FT の発現、花成遅延ともに回復する。短日条件下では *gal-3* は開花しないことから、GA 経路は同条件下で重要である。FT の発現は葉で観察されることから、GA による FT の発現促進も葉で行なわれると考えられる。一方、茎頂では GA 依存的に *SOCI*, *LFY* の発現が誘導され花成が誘導される。茎頂では、「GA 生合成の抑制」と「GA フィードバック制御による恒常性の維持」により GA 内生量は低く維持されているが、花成直前に GA 量の爆発的な増加することにより *SOCI*, *LFY* の発現が誘導される。しかし、花成前になぜ GA 量が増加し *SOCI*, *LFY* を誘導するかは明らかになっていない。GA による花成促進経路は、異なる2つの組織で段階的に制御されており、「葉における GA 依存的な FT の発現制御」と、「茎頂における GA 内生量増加による *SOCI*, *LFY* の発現制御」が実体と考えられた。GA 信号伝達において主要な抑制因子である DELLA は、GA 花成経路に関与することが知られていたが、GA 信号伝達と FT, *SOCI* の制御に関わるような因子の同定はなされていない。本研究では、GA による花成制御機構を明らかにする為、『GA がいかにして花成統合遺伝子である FT, *SOCI* の発現を誘導し花を咲かせるのか?』の解明を目的とする。

これまでに、DELLA 及び TOPLESS/TPR と相互作用する GAF1 転写因子を発見し、DELLA はコアクチベーターとして、TOPLESS/TPR はコリプレッサーとして機能することを明らかにした。GA は DELLA の分解を促進し、GAF1 複合体の構成を変化させることで標的遺伝子の発現の ON/OFF を制御することを明らかにした(右モデル図)(Fukazawa et al. *Plant Cell* 2014)。また、このモデルに合致する GAF1 標的遺伝子として GA 生合成遺伝子を同定し、DELLA-GAF1



複合体が GA フィードバック制御の根幹であることを明らかにした (Fukazawa et al. *Plant Physiol.* 2017)。GAF1 過剰発現体では、フロリゲンである *FT*、花芽形成遺伝子 *SOC1*, *LFY* の発現が顕著に増加しており、開花が促進される。対照的に *gaf1 idd1* 変異体では、これらの遺伝子の発現は減少しており GA 非感受性、著しい花成遅延、矮化等の表現型を示した(右写真)。GAF1 過剰発現体では GAF1 は転写抑制複合体として機能し標的遺伝子の発現を抑制する為、GAF1 の直接の標的遺伝子は *FT* ではなく、*FT* の発現を抑制する未知の花成抑制因子 GA induced Flowering Repressor (GFR) であると考えた。RNA-seq、ChIP-seq 解析により、複数の GAF1 標的遺伝子を同定した。同定した GAF1 標的遺伝子に見出された花成抑制遺伝子が花成抑制遺伝子 GFR としてはたらくと考えられる。本研究では、GA 内生量調節を介した GA 花成経路の解明に向けて、GA 花成経路の実体である DELLA-GAF1 複合体の標的遺伝子 GA induced Flowering Repressor (GFR) の同定 GFR 群による *FT*, *SOC1* の発現制御の解明を目指した。



3. 研究の方法

GAF1 過剰発現体では、花成統合遺伝子 *FT*, *SOC1* の発現量が顕著に増加しており、開花が促進される。対照的に *gaf1 idd1* 変異体では、花成統合遺伝子の発現は減少しており GA 非感受性、著しい花成遅延、矮化等の表現型を示した。GAF1 過剰発現体では GAF1 は転写抑制複合体として機能し標的遺伝子の発現を抑制する為、GAF1 の直接の標的遺伝子は花成統合遺伝子 *FT*, *SOC1* ではなく、これらの遺伝子の発現を抑制する未知の花成抑制因子 GA induced Flowering Repressor (GFR) の存在が予想された為、本研究では、花成に関与する新奇 GAF1 標的遺伝子 GFR の同定を目指した。

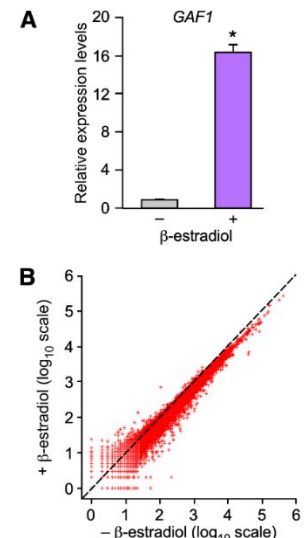
- (1) エストラジオールで GAF1 の発現が誘導できる形質転換体を作製し、エストラジオール処理により GAF1 誘導後に発現が変動する遺伝子を RNA-seq 解析により選抜し、GAF1 の標的候補遺伝子とした。
- (2) RNA-seq 解析より得られた GAF1 標的候補遺伝子の中から、花成に関与する遺伝子を選抜し、各遺伝子の発現量を野生型植物、GAF1 過剰発現体、*gaf1 idd1* 変異体間で比較し、発現量に変動が見られる遺伝子を GAF1 標的遺伝子として選抜した。

- (3) GAF1 過剰発現体、*gaf1 idd1* 変異体間で発現量に変動が認められた、GAF1 標的候補遺伝子の中から、GAF1 複合体により直接制御を受ける遺伝子を選抜するため、各 GAF1 標的候補遺伝子プロモーターにレポーター遺伝子を繋ぎ、トランジェント解析により DELLA-GAF1 複合体による制御の有無を検証した。
- (4) DELLA-GAF1 によって制御される遺伝子が GAF1 の直接の標的遺伝子を明らかにする為、ゲルシフト解析、ChIP 解析により GAF1 の各遺伝子プロモーターへの結合の有無を *in vitro*, *in vivo* で検証した。
- (5) 最終的に、4 つの花成抑制遺伝子を GAF1 の標的遺伝子として同定した。さらに、4 つの花成抑制遺伝子がいかにして *FT* や *SOC1* の発現を制御するかを、トランジェント解析、ゲルシフト解析等を用いて検討した。
- (6) 4 つの花成抑制遺伝子のうち、ELF3 に関しては、単独では花成統合遺伝子 *FT*, *SOC1* の発現制御が確認できず、ELF3 がいかにして花成制御に関わるかが未解明であったので、遺伝学的、分子生物学的な手法を用いてさらに解析を行なった。

4. 研究成果

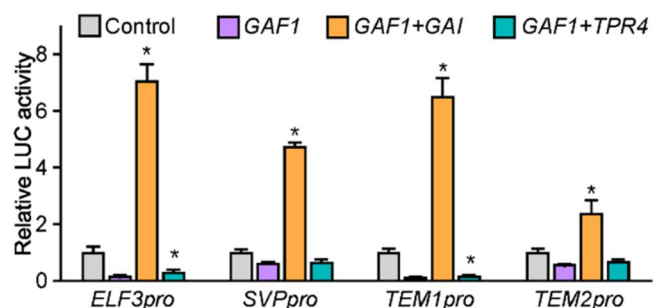
(1) 花成に関する GAF1 標的候補遺伝子の選抜

エストラジオール処理により GAF1 の発現が誘導できる形質転換体を作製し(右図 A)、GAF1 の誘導により発現量が変動する遺伝子を RNA-seq 解析により選抜した結果、数千の遺伝子に発現量の変動が認められた(右図 B)。この中から、GAF1 の新しい標的遺伝子を選抜する為、GAF1 過剰発現体、*gaf1 idd1* 変異体、野生型間での発現量の変動が見られる遺伝子を探索した。GAF1 の過剰発現体において既知の GAF1 標的遺伝子の発現量は低下するので、同様に GAF1 過剰発現体で、発現量が低下、もしくは *gaf1 idd1* 変異体で発現量が増加する遺伝子を指標に、花成関連遺伝子の中から、GAF1 の標的遺伝子の選抜を行なった。その結果、6 つの花成関連遺伝子が GAF1 の標的候補遺伝子として考えられた。



(2) GAF1 複合体により制御される標的遺伝子の同定

各 GAF1 候補遺伝子のプロモーターにレポーター遺伝子 LUC をつなぎレポーター遺伝子とし、植物培養細胞を用いたトランジェント解析により、DELLA-GAF1 複合体により制御されるかどうかを検証した。その結果 4 つの花成関連遺伝子を GAF1 標的遺伝子として同定した(右図)。さらに、各遺伝子のプロモーター領域を詳細に解析を行なった結果、いずれのプロモーター領域にも GAF1 結合領域が存在し、ゲルシフト解析により GAF1 が直接結合することを明らかにした。さらに、同定した各標的遺伝子プロモーターの GAF1 結合領域において、ChIP 解析を行なった結果、GAF1 の結合は、*in vivo* においても確認され、4 つの花成関連遺伝子が GAF1 の直接の標的遺伝子であることを明らかにした。



(3) GUS 形質転換体を用いた 4 つの花成関連遺伝子による組織特異的な発現解析

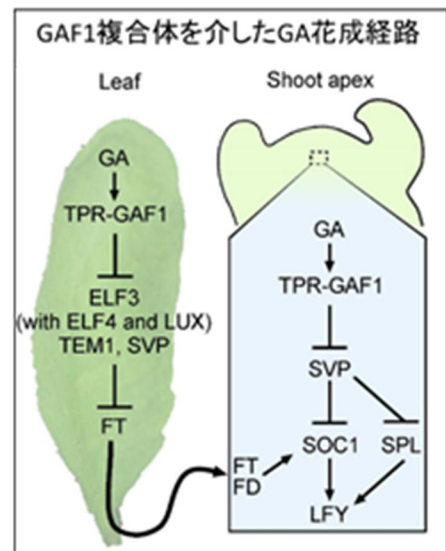
同定した 4 つの GAF1 標的遺伝子の組織特異的な発現パターンを解析するために各遺伝子プロモーターに GUS 遺伝子をつないだ形質転換体を作製し、組織特異的な発現、及び GA 応答性を解析した。その結果、4 つの花成に関連する GAF1 の標的遺伝子は、葉、又は茎頂での発現が確認され、GA 依存的に発現が抑制されることが明らかとなった。

(4) GAF1 標的遺伝子による花成制御機構

多くの花成の信号は、花成統合遺伝子 *FT* または、*SOC1* に統合される。本研究で同定した 4 つの花成抑制遺伝子 *TEM1*, *TEM2*, *ELF3*, *SVP* が花成統合遺伝子 *FT*, *SOC1* の転写を制御するかをトランジェント解析により検証した。その結果、*TEM1*, *TEM2* は、*FT* の発現を抑制し、*SVP* は *SOC1* の発現を抑制することが明らかとなった。一方で、*ELF3* は単独では *FT*, *SOC1* の発現抑制は観察されなかった。しかしながら、*elf3* 変異体では、*FT* の発現量が増加し花成も促進されることから、*ELF3* も *FT* の発現を制御する可能性が示唆された。*ELF3* は、*ELF4*, *LUX* と Evening Complex を形成し標的遺伝子の発現を制御することが報告されている。そこで、*ELF3* を含む Evening Complex が *FT* の発現を抑制するかを検証したところ、Evening Complex が、*FT* のプロモーターに直接結合し、*FT* の転写を抑制することが明らかとなった。

(5) GA による花成制御モデル

以上の結果から、GA による花成経路において DELLA-GAF1 複合体による花成制御モデルを提唱した。GA 存在下では、DELLA が分解され GAF1 は、TPR と転写抑制複合体を形成する。GA 存在下では、4 つの GAF1 標的遺伝子の発現が抑制される。葉では、*TEM1*, *TEM2*, *ELF3* の転写が抑制されることで、*FT* の発現が促進される。葉で合成された *FT* タンパク質は、茎頂へと移動し花成を促進する。一方、茎頂では、花成統合遺伝子 *SOC1* の発現が重要となるが、茎頂では、GAF1 の標的遺伝子の 1 つ *SVP* が、GA 依存的に発現量が低下することで、*SOC1* の発現が促進される。GA は、葉と茎頂で花成抑制遺伝子の発現を抑制することで、花成統合遺伝子 *FT*, *SOC1* の発現を誘導し花成を促進することが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukazawa Jutarou, Ohashi Yuki, Takahashi Ryuhei, Nakai Kanako, Takahashi Yohsuke	4. 巻 33
2. 論文標題 DELLA degradation by gibberellin promotes flowering via GAF1-TPR-dependent repression of floral repressors in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 2258 ~ 2272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koab102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukazawa Jutarou, Miyamoto Chika, Ando Hiroki, Mori Kazuya, Takahashi Yohsuke	4. 巻 107
2. 論文標題 DELLA-GAF1 complex is involved in tissue-specific expression and gibberellin feedback regulation of GA20ox1 in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 147 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-021-01195-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Takeshi, Fukazawa Jutarou	4. 巻 105
2. 論文標題 SCARECROW-LIKE3 regulates the transcription of gibberellin-related genes by acting as a transcriptional co-repressor of GAI-ASSOCIATED FACTOR1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 463 ~ 482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-020-01101-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深澤壽太郎、森和也、森亮太、安藤広記、菅野裕理、瀬尾光範、高橋陽介
2. 発表標題 ジャスモン酸によるMYC2を介したジベレリン内生量調節と成長抑制機構
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 深澤 壽太郎、森 和也、森 亮太、安藤 広記、菅野 裕理、瀬尾 光範、高橋 陽介
2. 発表標題 ジャスモン酸によるMYC2を介したジベレリン内生量調節と成長抑制機構の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤広記, 野澤彰, 小迫英尊, 澤崎達也, 高橋陽介, 深澤壽太郎
2. 発表標題 DELLA-GAF1 と MYC2 複合体による成長抑制制御機構の解析
3. 学会等名 中国四国植物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 端野桃子、西田有理花、菅野裕理、瀬尾光範、高橋陽介、深澤壽太郎
2. 発表標題 ELF3 によるジベレリン生合成の制御機構の解析
3. 学会等名 中国四国植物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深澤壽太郎、大橋由紀、中居可奈子、高橋竜平、高橋陽介
2. 発表標題 Molecular mechanism of flowering regulation by gibberellin in Arabidopsis
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤広記、深澤壽太郎、高橋陽介
2. 発表標題 ジャスモン酸による DELLA と MYC2 を介した成長抑制機構の解析
3. 学会等名 中国四国植物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷永悠季、深澤壽太郎、高橋陽介
2. 発表標題 DELLA による ABA 感受性制御の分子機構の解析
3. 学会等名 中国四国植物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤壽太郎、大橋由紀、中居可奈子、高橋竜平、高橋陽介
2. 発表標題 DELLA-GAF1複合体を介したジベレリン花成経路の制御
3. 学会等名 中国四国植物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤壽太郎
2. 発表標題 ジベレリンによる花成制御と内生量調節機構
3. 学会等名 日本農芸化学会中国四国支部 若手シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤壽太郎、大橋由紀、中居可奈子、高橋竜平、高橋陽介
2. 発表標題 ジベレリンによる花成制御の分子機構
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森和也、菅野裕理、瀬尾光範、深澤壽太郎、高橋陽介
2. 発表標題 ジャスモン酸によるジベレリンの生合成と不活性化の制御を介した植物の成長抑制
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤広記、深澤壽太郎、高橋陽介
2. 発表標題 ジャスモン酸による DELLA と MYC2 を介した成長抑制 機構の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤岳、勝部隆義、寺脇綾香、宮原一也、深澤壽太郎、高橋陽介
2. 発表標題 GRASタンパク質SCL3はGAF1のコリプレッサーとして機能することでジベレリン関連遺伝子の転写を制御する
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤 壽太郎、大橋 由紀、中居 可奈子、高橋 竜平、浜添 菜、西田 有理花、高橋 陽介
2. 発表標題 DELLA-GAF1複合体による花成制御機構の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会
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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	Rothamsted Research		