

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780004

研究課題名（和文）TCP型転写因子を介したイネのフロリゲン Hd3a の機能メカニズムの解析

研究課題名（英文）Functional analysis of TCP family transcription factors TCP8 and TCP14 that interact with rice florigen Hd3a.

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（和文）：フロリゲンは長距離移動性の花成誘導刺激としてその存在が提唱され、2007年にその分子実体がHd3a/FTタンパク質であることが明らかとなった。Hd3aは葉で発現した後、茎頂まで長距離移動し、花芽形成を開始させる。しかしHd3aが茎頂において花成を開始させる分子メカニズムはほとんど分かっていない。本研究ではHd3aと相互作用するタンパク質としてTCP型転写因子0sTCP8及び0sTCP14を見だし、その機能解析と相互作用の詳細な解析を行った。その結果、TCP型転写因子がHd3aとの相互作用を介して花成等へ影響する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Florigen was proposed about 70 years ago that produced in the leaves and moves up to shoot apex to induce flowering. In 2007 the molecular nature of florigen was revealed to be a family of FT/Hd3a protein. Hd3a protein itself does not possess any biochemically defined functional motifs thus Hd3a should interact with functional effectors to exert its function. Here, we found TCP transcription factors interact with Hd3a, and functional analysis of these proteins revealed their contribution to flowering.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物分子育種

1. 研究開始当初の背景

フロリゲンは植物の花芽形成時期を決定する分子として1930年代にその存在が提唱された。その後フロリゲンの正体を明らかにするための研究が数多く行われたが、その分子実体は謎のままであった。2007年に私たちはフロリゲンの実体が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、Hd3a自身がフォスファチジルエタノールアミンに結合するかどうかも含めて生化学的な機能については未知である。Hd3aの分子量は約22kD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/OsGI, CO/Hd1, 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。

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ると、Hd3a自身のプロモーターは葉の維管束篩部伴細胞だけで活性を持たず、またHd3a mRNAは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。

さらにHd3a相互作用因子の詳細な解析から、Hd3aの受容と機能のメカニズムが明らかになった。Hd3aは茎頂分裂組織の細胞に到達した後、細胞質で14-3-3タンパク質と相互作用する。Hd3a-14-3-3複合体は核へ移動し、核内で転写因子OsFD1とさらに高次の転写複合体を形成することが明らかとなった。このことから、14-3-3タンパク質はフロリゲンの細胞内受容体と考えることができ、Hd3a-14-3-3転写因子からなる3分子複合体がフロリゲン機能の実体であると言える。14-3-3はOsFD1以外の転写因子とも相互作用可能であり、従ってフロリゲンは14-3-3を介して複数の転写因子の機能を制御し花成を決定づけると考えられる。そこで、Hd3aと相互作用する転写因子のなかにOsFD1以外の花成促進因子が見つかると思った。

2. 研究の目的

Hd3aと相互作用する転写因子OsTCP8及びOsTCP14の詳細な相互作用メカニズムおよび花成における機能を明らかにする。

本研究のための予備的な実験として、イネTCP型転写因子のうちCINグループに属する転写因子をほぼすべてクローニングし、Hd3aとの相互作用を解析した。その結果、多数のOsTCPタンパク質の中からOsTCP8及びOsTCP14をHd3aとの相互作用因子として同定した。しかしOsTCP8及びOsTCP14には明瞭な14-3-3結合部位が見つからないため、14-3-3を介した相互作用があるのかが不明である。そこでまず14-3-3との相互作用能を失わせた変異型Hd3aとOsTCPとの相互作用を解析した。

また、OsTCP8及びOsTCP14の機能を解析

するために、OsTCP8及びOsTCP14の各々単独のRNAi植物及び両者の発現を同時に抑制するRNAi植物を作成し、花成時期に変化が見られるかどうかを調査することを目的とした。

3. 研究の方法

Hd3aに14-3-3との相互作用能を失わせるような変異としてF103Aを導入し、OsTCP8もしくはOsTCP14の発現ベクターと共に酵母へ形質転換してtwo-hybridアッセイを行った。また、OsTCP8及びOsTCP14が14-3-3と相互作用するかどうかを直接調査するためのtwo-hybridアッセイも同時に行った。

OsTCP8及びOsTCP14の3'-UTRを単独もしくは連結して植物用のRNAiベクターへ導入し、イネに形質転換した。形質転換イネのT0世代について各個体の遺伝型を決定し、採種したT1世代を栽培して試験に用いた。栽培条件は明期10時間、暗期14時間の短日条件とした。OsTCP8及びOsTCP14の発現を調査した。

OsTCP8、OsTCP14及び両者の発現がRNAiによって抑制されている個体を選別し、各々の開花までの日数を測定した。また、OsTCP8及びOsTCP14の発現を増強した植物を作成するために、トウモロコシのユビキチンプロモーターによってOsTCP8もしくはOsTCP14を発現するベクターを構築してイネに形質転換した。形質転換後再分化してきたイネについて、T0世代における開花時期を調査した。

4. 研究成果

先行研究の成果から、14-3-3タンパク質がフロリゲンHd3aの細胞内受容体として機能することが示されている。すなわち、Hd3aははじめ14-3-3タンパク質と相互作用し、Hd3a-14-3-3の形で核移行してbZIP型転写因子OsFD1と複合体形成することが示されている。そこでHd3aとTCPの相互作用も14-3-3タンパク質を介在しているかどうかを調べるために、14-3-3タンパク質との相互作用能を失った変異型Hd3a(Hd3a F103A)とOsTCP8及びOsTCP14の相互作用を調査した。その結果、14-3-3と相互作用できないHd3aはOsTCP8及びOsTCP14とも相互作用できないことが分かった。従って、Hd3a-OsTCPの相互作用も14-3-3を介していると考えられる。OsTCP8及びOsTCP14が14-3-3と相互作用するかどうかを直接調査するためのtwo-hybridアッセイを行ったところ、14-3-3によるバックグラウンドシグナルが非常に高くなり本実験では相互作用を検証することができなかった。Baitとprayを入れ替えてtwo-hybridアッセイを行った場合も同様であった。

OsTCP8及びOsTCP14が花成に与える影響を調

査するために、各々の発現をRNAiによって抑制する形質転換イネを作成した。形質転換当代から採種したT1 世代を栽培した。明期 10 時間、暗期 14 時間の短日条件下で栽培した。播種後 30 日目の時点で葉身をサンプリングし、RNAを抽出してRT-PCR法によって遺伝子発現を解析した。その結果、OsTCP8 及びOsTCP14 の発現が抑制された個体を特定できた。これらの個体の開花時期を調査したところ、OsTCP14 の発現抑制個体でわずかに花成が遅延する結果を得られた。このことを確認するために再度T1 種子を播種し、上記と同様の明期 10 時間、暗期 14 時間の短日条件下で栽培した。OsTCP8 及びOsTCP14 の発現が抑制された個体を特定し、それらの開花時期を調査したところ、やはりOsTCP14 の発現抑制個体でわずかに花成が遅延していた。

Hd3aの重要なターゲット遺伝子として、私たちはOsMADS14 及びOsMADS15 を特定している。Hd3a は茎頂の細胞へ到達したあと、Hd3a-14-3-3-OsFD1 からなる複合体を核内で形成する。この複合体はOsMADS15 のプロモーター上で転写活性可能を發揮し、OsMADS15 が強力に転写される。OsMADS15 はイネの茎頂において、花成の最初期に発現開始する遺伝子である。さらに、イネでは栄養器官である葉においても、Hd3aに依存してOsMADS15 が発現する。Hd3aを高発現させたイネではOsMADS15 の発現が増加し、Hd3aの発現をRNAiで抑制したイネではOsMADS15 の発現は抑制される。そこで、OsTCP8 及びOsTCP14 がOsFD1 同様にOsMADS15 の発現を調節して花成に関与する可能性を検討するために、OsTCP8 及びOsTCP14 のRNAiによる発現抑制イネにおいてOsMADS15 及びそのホモログのOsMADS14 の発現が変化しているかどうかを調査した。その結果、OsTCP8 及びOsTCP14 の発現抑制によっても葉におけるOsMADS15 及びOsMADS14 の発現にはほとんど変化がないことが明らかとなった。このことから、OsTCP8 及びOsTCP14 はOsFD1 とは異なりOsMADS14 及びOsMADS15 を介さない経路で花成に関与する可能性が考えられた。ただ、今回得られたRNAi植物ではOsTCP8 及びOsTCP14 のRNA量が1%-5%ほど残存していたため、OsMADS14 及びOsMADS15 の発現を変化させるためにはOsTCPの発現抑制が不十分であった可能性も考えられる。また、そもそも葉では茎頂と異なりOsMADS14 およびOsMADS15 がOsTCPとは無関係な発現制御を受けている可能性も考えられるので、今後は茎頂等を利用して遺伝子発現の詳細な調査を行う必要がある。

さらに、OsTCP8 及びOsTCP14 を過剰発現させるベクターも構築してイネに形質転換した。形質転換当代のイネについて花成の変化等

を確認していったが、コントロールと比較して優位な変化は見いだせなかった。この理由として、OsTCP8 及びOsTCP14 がmiRNAの制御下にあことが原因となった可能性が考えられる。すなわちTCP型転写因子の一部のグループがコードされるRNAはmicroRNAのひとつmiR319 によって分解へと導かれることが示されており、一般的にmicroRNAによってそのRNA産物が分解を受ける遺伝子は過剰発現しても効果が薄いことが知られている。OsTCP8 及びOsTCP14 はTCP型転写因子の中でもmiR319 のターゲット配列を保持していたため、過剰発現した分のRNAもmiR319 によって機能を發揮する限界以下まで分解を受けた可能性が考えられる。このことから、OsTCP8 及びOsTCP14 のmiR319 のターゲット配列について、コードするアミノ酸配列は変化させずに塩基配列のみをmiR319 が認識不能になるまで変化させた変異型遺伝子を作成してイネに発現させることで機能解析がより進むことが考えられる。

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 Tsuji, H., Taoka, K. -I. and Shimamoto, K. Regulation of flowering in rice: two florigen genes, a complex gene network, and natural variation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 51:58-67 (2011) 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

- ① 辻 寛之、玉置 祥二郎、田岡 健一郎、島本 功 イネのフロリゲンHd3aタンパク質と相互作用する転写因子OsFDの機能解析 第 52 回日本植物生理学会年会 2011. 3. 12 仙台市(地震の影響で中止となり講演要旨集発行をもって成立)
- ② 田岡健一郎、島田千尋、柳瀬朋子、大木出、辻寛之、児嶋長次郎、島本功 イネフロリゲンHd3aタンパク質複合体の機能解析第 52 回日本植物生理学会年会 2011. 3. 12 仙台市(地震の影響で中止となり講演要旨集発行をもって成立)
- ③ 内村昇平、辻寛之、Yekti Asih Purwestri、

柳瀬朋子、田岡健一郎、島本功 イネの
フロリゲンHd3aタンパク質と相互作用
する転写因子OsKANADI1 の機能解析 第
33 回 日本分子生物学会 2010. 12. 8
神戸市

- ④ 島田千尋、田岡健一郎、辻寛之、島本功
イネフロリゲンHd3aによる遺伝子発現
制御機構の解析 第 33 回 日本分子生
物学会 2010. 12. 8 神戸市
- ⑤ 辻 寛之 フロリゲンはどのようにし
て花を咲かせるのだろうか？ーバイオ
イメージングからそのメカニズムに迫
るー 視る生物学 5 2010. 11. 26 生駒市
- ⑥ Hiroyuki Tsuji, Ken-ichiro Taoka,
Izuru Ohki, Midori Yamaguchi, Chika
Nakashima, Yuka Ogaki, Chojiro Kojima
and Ko Shimamoto **Functional
analysis of rice homolog of FD, a bZip
transcription factor interacting
with florigen Hd3a.** China-Japan
Joint Workshop on Rice Morphogenesis
2010. 10. 8 Beijing
- ⑦ 辻 寛之、田岡 健一郎、大木 出、山口 緑、
大垣 友香、児嶋 長次郎、島本 功 イ
ネフロリゲンHd3aタンパク質と相互作
用する転写因子OsFD1 の機能解析 日本
育種学会第 118 回講演会 2010. 9. 25
秋田市

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