

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380058

研究課題名(和文)植物の光環境認識と低温応答のクロストーク機構

研究課題名(英文)Molecular genetic studies on flowering control by VOZ1 and VOZ2 in Arabidopsis

研究代表者

河内 孝之(Kohchi, Takayuki)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：40202056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：植物にとって重要な環境情報因子である光は単に明暗の識別だけでなく季節の変化や他の植物との競争を感知するためにも利用されている。我々はシロイヌナズナを用いてフィトクロム相互作用因子VOZ(Vascular plant one zinc finger protein)を単離し、その花成制御や低温応答における機能を解析した。細胞内局在の実験から核内に存在する転写因子VOZがフィトクロム下流における花成制御に関与することを示した。また、VOZは低温順化経路とは独立する経路を通して花成抑制因子FLCの発現を抑制し、最終的に花成の統合因子FTの機能を上昇させることを示した。

研究成果の概要(英文)：The phase transition of vegetative to reproductive growth in plants is regulated by various environmental factors including day length and light quality. Two Arabidopsis thaliana genes, VASCULAR PLANT ONE ZINC FINGER1 and VOZ2 mediated phyB-dependent flowering regulation. By mutant complementation assays, VOZ1 and VOZ2 expressed in vascular bundles functioned as transcriptional regulators in nucleus. Genetic and molecular researches suggested that VOZ1 and VOZ2 promote growth-phase transition to flowering by down-regulating FLC and its closely related homologs MAF1 to MAF5 by a pathway that is independent to vernalization pathway.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：シロイヌナズナ フィトクロム 転写制御 花成制御

1. 研究開始当初の背景

太陽の光エネルギーを化学エネルギーに変換し独立栄養を営む植物は地球生態系の唯一の一次生産者であり、人間社会においても食料、環境維持、エネルギーに利用されている。植物は光環境を高感度・高精度に識別するとともに、利用可能な土壌中の水分や温度といった変化を情報として適切に統合し、成長を最適化する。植物の光環境情報の識別と信号伝達機構を解明して植物の効率的な利用に結びつけることは、生物生産性向上のための分子育種や栽培システム提案の点からも大きな課題である。

植物がもつ光受容体のなかでもフィトクロムは赤色光・遠赤色光を中心に光吸収領域をもち、可逆的に構造変換する特徴から遺伝子発現の光スイッチとして機能する。フィトクロムは多重遺伝子族にコードされ、一生を通じて広く発現している。植物はフィトクロムを介して絶えず変化する地上の光環境(光量、光質、照射方向、日長など)を感知することにより種子の発芽から開花・結実に至る生活環の発生と成長を制御する。フィトクロムは光照射により、不活性型の Pr 型から活性をもつ Pfr 型へ構造変換し、細胞内局在も細胞質から核内へ移行する。構造変換と局在変化に伴ってフィトクロムが相互作用して活性化あるいは不活化(分解も含む)する制御因子を介して信号が伝達されると考えられる。このモデルのなかでも最も研究が進んでいる因子に bHLH 型転写因子である PIF (Phytochrome-interacting factor)があり、光による遺伝子発現誘導制御の分子機構の図式が確立されてきた。

自然界の環境においては光は単独で変化するわけではなく、温度を含む複雑な環境変動を伴う。この点に関して、近年、PIF を介するフィトクロム制御の機構に温度要素も組み込まれ得ることがわかってきた。また、短時間の变化で不容易に応答しない安定性も備えていることがわかってきた。つまり、植物は光環境を識別し、季節、時刻、周囲の植物の陰などで起こりうる環境変化を予め予測できる機構を備えているということの意味する。

我々はこれまでにフィトクロムと相互作用するタンパク質として VOZ (Vascular plant one zinc finger) を単離し、その生理的な機能を明らかにしてきた。VOZ は、シロイヌナズナでは VOZ1 および VOZ2 の 2 分子種が存在し、二重変異体 *voz1 voz2* では花成が遅延する。つまりフィトクロムの明暗感知加えて成長相制御という長期的な環境応答に関与することが示されていた。日長応答は温度環境の変動とも密接に関連する。そこで、本研究では、VOZ 遺伝子を手がかりに光質や日長による成長相制御と温度のクロストーク機構を

解析することを着想した。

2. 研究の目的

- (1) フィトクロムと相互作用するシロイヌナズナの VOZ1 および VOZ2 が光情報の細胞内信号への変換過程で作用する機構を明らかにする。
- (2) VOZ1 および VOZ2 の作用機構を成長時期および器官・組織における発現特異性の解析から明らかにする。またタンパク質の定量と機能的な細胞内局在を明らかにする。遺伝子やタンパク質の発現解析に基づき、発現時期やタンパク質の細胞内局在を改変した遺伝子を *voz1 voz2* 二重変異体に導入し、表現型相補を指標に機能解析を進める。
- (3) *voz1 voz2* 二重変異体では *FT* 遺伝子の発現低下を示し、花成が遅延する。*FT* の制御経路は *CO* で統合される日長依存経路と *FLC* で統合される自律的経路が知られている。*CO* は発現後のタンパク質の安定性制御が重要であるのに対して、*FLC* はクロマチン修飾により制御が大きな効果をもつことが知られている。そこで、*FLC* および *CO* の制御に注目し、VOZ の作用経路を明らかにする。
- (4) 光と低温のクロストークに注目し、*voz1 voz2* 変異体を温度処理したときの表現型の変化を調べる。低温経路では CBF と呼ばれる転写因子を介して下流の低温応答遺伝子群 *CORs* が制御されている。この経路の分子実体は比較的良好に解析されている。その知見を *voz1 voz2* 変異体解析に応用することで、低温経路との関わりを探る。

そして、上記の研究を通じて、植物が複合的に環境に応答し、個体として成長を最適化する戦力を理解する。これらは植物の生産性向上への応用の基盤構築にあたり、長期的には光質制御を利用して環境変動に対する予防的防御を活用した栽培システムを提案することを旨とする。

3. 研究の方法

VOZ 作用機構の解明

- (1) 細胞内局在の生化学的解析
シロイヌナズナを赤色光、遠赤色光、暗所といった異なる光条件で栽培し、細胞分画を行う。VOZ2 に対する特異的抗体を用いて、核および細胞質の VOZ2 タンパク質量を定量する。また、この解析に光受容体の突然変異体も用いて、どの光受容体の制御下にあるかを明らかにする。

- (2) 細胞内局在の可視化と挙動の解析
VOZ2-GFP融合タンパク質発現システムを利用して、蛍光を指標に細胞内局在を検出する。異なる光条件を与えたときの局在変動を注意深く解析する。
- (3) 細胞内局在の機能検証
核局在シグナル NLS および核外への搬出シグナル NLS を VOZ に融合し、核および細胞質へタンパク質を強制的に局在させるコンストラクトを作成する。これらの *voz1 voz2* 変異体へ導入し、機能相補を調べる。VOZ の局在とフィトクロムとの相互作用について考察する。
- (4) 時空間的発現の機能検証
VOZ1 および *VOZ2* は発芽後ほぼすべての時期に mRNA が検出され、特に維管束での発現が顕著であるが、その意義を実験的に検証する。すなわち、細胞特異的なプロモーターによって発現する *VOZ2* を *voz1 voz2* 変異体で発現させ、機能的な相補を指標に機能に重要な発現部位を検証する。
- (5) VOZ が構成する複合体解析
VOZ はフィトクロム相互作用因子として単離同定されたが、生体内で両者を含む複合体が構成されることは証明する必要がある。*phyB* との相互作用を確認するとともに複合体の検出を試みる。なかでも転写制御因子としての結合標的に関する実体を解析する。

成長相制御機構の解析

- (1) 光周性経路 CO タンパク質の蓄積
概日時計の下流で *G1FKF1* の制御下にある CO は光周性花成制御の重要な因子である。mRNA の解析では VOZ との関係が検出されていないことは既に明らかにしてきた。そこでタンパク質レベルにおける制御の有無を調べる。
- (2) 自立経路 *FLC* mRNA の発現解析
MADS ボックス転写因子をコードする *FLC* は自律的制御経路に位置し、*FT* の発現を負に制御する。*VOZ1* および *VOZ2* の *FLC* 経路における作用を *FLC* の発現解析および遺伝的解析により進める。
- (3) 長期低温処理と花成表現型の解析
FLC は低温処理によって発現が抑制される因子として知られている。*voz1 voz2* 変異体を長期の低温に曝露し、その花成への応答性を調べる。
- (4) *VOZ1* および *VOZ2* 下流因子の解析
VOZ の下流因子を網羅的に明らかにするため、変異体と野生型植物のマイクロアレイを用いた発現解析および

VOZ-GFP 発現システムと GFP 抗体を利用した ChIP 実験により VOZ 下流因子を明らかにする。

4. 研究成果

今回の研究によって得られた成果は、既に成果論文 1 および 3 として公表した。主な成果については以下の通りである。

- (1) *phyB* と相互作用する *VOZ1* および *VOZ2* は冗長的に花成制御に機能する
酵母ツーハイブリッドにより *phyB* 相互作用した *VOZ1* および *VOZ2* は NAC 転写因子のサブファミリーに属する転写因子であった。機能を解析するために T-DNA 挿入変異株を入手した。単一変異体では顕著な表現型が観察されなかったが二重変異体では長日依存的な花成遅延を示した。これは野生型遺伝子の導入によって相補された。
- (2) *VOZ1* および *VOZ2* は *phyB* の下流で機能する。
phyB との遺伝的な関係を調べるために *phyB voz1 voz2* の三重変異体を作成した。*phyB* は花成が早まる変異体であるが三重変異体は *voz1 voz2* 二重変異体と同様の花成遅延が観察された。すなわち、*phyB* による花成制御には *VOZ1* および *VOZ2* が必要であることを意味している。一方、*phyB* 変異体が示す葉の伸長といった光形態形成表現型は三重変異体でも影響がなく、花成と短期的な光形態形成の表現型は独立していることが示された。
- (3) *VOZ1* と *VOZ2* は維管束で機能する。
花成の統合因子 *FT* は維管束での機能が重要であることが示されている。そこで *VOZ1* および *VOZ2* の発現の時期と場所を解析した。*VOZ1* は維管束で、*VOZ2* は維管束および葉肉細胞で発現した。この発現の生物学的な意味を明らかにするため、*VOZ2* を葉肉細胞特異的な *rbcS* プロモーターおよび維管束特異的な *SUC2* プロモーターで発現させ変異表現型を相補するかを調べた結果、維管束の発現が花成制御機能には重要であることが明らかになった。
- (4) *VOZ1* と *VOZ2* は *FT* の発現を促進し *FLC* の発現を抑制する。
花成制御の鍵となる *FT*、*FLC*、*CO* の発現を解析した。*voz1 voz2* 変異体では、*FT* の発現が低下するとともに *FLC* の発現が上昇していた。*CO* の発現には顕著な変化がなかった。このことは、*VOZ* が *FLC* を介して *FT* の発現を制御していることを示唆している。

- (5) VOZ2 タンパク質は主として細胞質に存在するが、核に存在する VOZ2 が機能的に重要である。VOZ1 および VOZ2 が転写因子としての構造を持つため核内での機能が予想されることに反して、GFP を融合した VOZ2 タンパク質の局在を解析したところ主として細胞質に蛍光が観察された。細胞質および核どちらの局在が生物学的な意義があるかを調べるため、核局在シグナル NLS および核外搬出シグナル NES を付与した GFP-VOZ2 を *voz1 voz2* 二重変異体に導入した。その結果、核に局在させたときに変異を相補したことからわずかに存在する核の VOZ2 が機能的であることがわかった。また VOZ2 タンパク質の核内の存在は分画実験によっても証明した。
- (6) VOZ2 タンパク質は phyB と生体内で相互作用する。タバコの葉を利用した Bimolecular Fluorescence Complementation 実験により、VOZ2 と phyB の相互作用が検出された。この相互作用を確認するため、共免疫沈降実験を行ったところ、phyB と VOZ2 が検出された。
- (7) VOZ2 タンパク質は核内で光質依存的に分解する。VOZ2 の蓄積に対する光質の影響を調べた。VOZ2 は核内に局在させたときに顕著に分解されるのに対して、細胞質の VOZ2 は比較的安定であった。また、VOZ2 の分解は遠赤色光条件が最も顕著であった。この分解がプロテアソームの阻害剤を添加することで阻害されることから、ユビキチン依存的な積極的な分解制御系が存在することが示された。
- (8) *voz1 voz2* の花成遅延表現型は低温曝露で抑圧される。長期の低温処理は *FLC* を介して花成を促進する。phyB-VOZ の経路の標的として *FLC* が存在することから、低温により *FLC* 発現を抑制したときに *voz1 voz2* 表現型を抑圧することができるかを調べた。その結果、低温の曝露時間に応じて表現型が緩和された。また、この低温経路上に存在する野生型の *FRI* を導入した *voz1 voz2* 変異体においても同様の結果が得られた。このことは、VOZ1 および VOZ2 を介する信号伝達は低温経路とは独立に存在し、*FLC* を標的として統合されることを意味する。
- (9) VOZ1 および VOZ2 の制御下には *FLC* および *MAF* 遺伝子が存在する変異体の発現解析から VOZ1 および VOZ2 の下流に *FLC* が存在することが示

されたが、作成した *voz1 voz2 flc* 三重変異体では *voz1 voz2* 二重変異表現型を抑圧されなかった。*FLC* の相同遺伝子の *MAF1* から *MAF5* の遺伝子発現を解析したところ、いずれの発現も *voz1 voz2* 変異体で上昇していた。*MAF* 遺伝子群も *FLC* と同様に下流因子として機能することが予想された。

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)

Yasui, Y., Mukougawa, K., Uemoto, M., Yokofuji, A., Suzuri, R., Nishitani, A., and Kohchi, T., The phytochrome-interacting VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER1 and VOZ2 redundantly regulate flowering in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**, 3248-3263 (2012).

DOI:10.1105/tpc.112.101915

Nishihama, R and Kohchi, T., Evolutionary insights into photoregulation of the cell cycle in the green lineage. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**, 630-637 (2013)

DOI: 10.1016/j.pbi.2013.07.006

Yasui, Y. and Kohchi, T. VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER1 and VOZ2 repress the FLOWERING LOCUS C clade members to control flowering time in Arabidopsis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.

〔学会発表〕(計 8 件)

Yukiko Yasui, Mitsuhiro Uemoto, and Takayuki, Takayuki Kohchi, Light regulated phytochrome-interacting proteins VOZ1 and VOZ2 promote flowering in Arabidopsis. The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing, (東大寺文化センター) 2012年3月19日

安居佑季子、上本允大、佐藤雅彦、河内孝之、花成経路で機能するフィトクロム相互作用因子 VOZ のシグナル伝達解析、第 53 回日本植物生理学会年会(京都産業大学) 2012年3月17日

Yukiko Yasui, Mitsuhiro Uemoto, Keiko Mukougawa, Yusuke Nakai, Yoichi Nakahira, Masahik.H. Sato, Takayuki Kohchi, Functional analysis of phytochrome-interacting factor VOZ in flowering pathway, The 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology (奈良県新公会堂) 2012年7月31日
Yukiko Yasui, Mitsuhiro Uemoto, Akira Yokofuji, and Takayuki Kohchi The light regulated phytochrome-interacting VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER1 and VOZ2 redundantly promote flowering in Arabidopsis, The 10th International Congress on Plant Molecular Biology, (濟州国際会議場、韓国、濟州島) 2012年10月21-26日

安居 佑季子, 上本 允大, 河内 孝之、花成を促進する phyB 相互作用因子 VOZ は光質により制御される、第 17 回 日本光生物学協会年会 (大阪大学) 2012 年 8 月 16 日

安居佑季子、上本允大、横藤陽、河内孝之、花成促進に機能するフィトクロム相互作用因子 VASCULAR PLANT ONE ZINC FINGER (VOZ)の光質に依存したシグナル伝達の解析、第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山大学) 2013 年 3 月 23 日

安居佑季子、横藤陽、平野博之、河内孝之、フィトクロム相互作用因子 VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER (VOZ)による暗所における植物の生長制御の解析、第 55 回日本植物生理学会年会 (富山大学) 2014 年 3 月 18 日

横藤陽、安居佑季子、河内孝之、シロイヌナズナにおけるフィトクロム相互作用因子 VOZ を介した凍結体制の制御機構、第 55 回日本植物生理学会年会 (富山大学) 2014 年 3 月 20 日

〔図書〕
該当なし

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
ホームページ
<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/plantmb/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

河内 孝之 (KOHCHI, Takayuki)

京都大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：40202056

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
石崎 公庸 (ISHIZAKI, Kimitsune)
京都大学・生命科学研究科・助教 (23-24 年度)
神戸大学・理学研究科・准教授 (25 年度)
研究者番号：00452293