

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780030

研究課題名(和文) 多面的機能を持つ多年生植物フロリゲンの新規機能解明

研究課題名(英文) Investigation of novel florigen function of over-wintering buds in perennial plant

研究代表者

今村 智弘 (Imamura, Tomohiro)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・細胞工学研究部・研究員

研究者番号：20468705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、花成ホルモンFLOWERING LOCUS TのリンドウオルソログGtFTについて、越冬組織における新規機能の解明を試みた。RNA-Seqによる越冬組織の網羅的な発現から、GtFT発現と同様な発現パターンを示す遺伝子群を明らかにした。また、培養系での越冬組織の誘導を試みた結果、越冬組織の誘導に成功した。この誘導系を用いてGtFT-GFP発現形質転換体リンドウの越冬組織から相互作用因子の探索を行なった。その結果、花成でのFT相互作用因子とは、異なる新規なタンパク質を得ることができた。これらの解析より、越冬組織でのFTは、花成とは異なる機構で機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gentian is a perennial plant and known as ornamental flowers. To reveal the flowering mechanism of gentian, we obtained two FLOWERING LOCUS T (FT) orthologues (GtFT1 and GtFT2), and revealed that GtFTs promote flowering transition in gentian. In the process of GtFT analysis, we found that GtFT1 and GtFT2 are expressed in overwintering buds. Gentian produce overwintering buds, which have strong tolerance to cold, but the mechanisms regulating dormancy are unknown. Recently, FT involved in other aspects of plant development as well as flowering transition. To investigate the function of GtFT in overwintering buds, we searched for the interacted factor of GtFT in overwintering buds. Transgenic gentian plantlets expressing GtFT-sGFP were generated. We performed proteome analysis for this transformant and obtained new interacted factor of GtFT. This result implied that the GtFT mechanism of dormancy is different from in flowering transition.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：花卉 越冬 Flowering locus T

1. 研究開始当初の背景

多年生の宿根草であるリンドウは、越冬組織を形成し休眠することで越冬する。春の萌芽の後、栄養生長を経て花を咲かせ、その後地表部に越冬組織を形成し、越冬する一連の生活環をとる。本花卉の栽培には、近年の天候不順により、出荷が遅れる問題や、単一品種の出荷期間の拡大などの課題があり、その中心となる開花期調節技術の確立が求められている。申請者は、開花期調節技術の確立を目指し、リンドウの開花生理に関する研究を行なっており、これまでに2つのFTオルソログ (*GtFT1*、*GtFT2*) が、花成誘導を促進することを明らかにしている。この研究の過程で *GtFT* は花成の誘導促進とは別の機能を持つという興味深い知見を得た。*GtFT1* に関しては、「露地栽培およびクローン培養の越冬組織の萌芽時にその発現が上昇する。」「*GtFT1* 過剰発現体の越冬組織は、休眠することなく萌芽する。」ことが明らかとなっている。*GtFT2* に関しては、「越冬組織において11月~1月にかけて一過的に発現が上昇する。」「低温で *GtFT2* の発現が誘導される。」「*GtFT2* 過剰発現体では、ストレス応答遺伝子の発現が誘導される。」ことを明らかにしている。これらの結果より、リンドウの休眠過程において *GtFT1* と *GtFT2* が重要な働きをしていることが強く示唆される(図1)。これらの結果より、*GtFT1* および *GtFT2* は、リンドウ越冬組織において花成誘導とは別の機能を持つことが予想された。

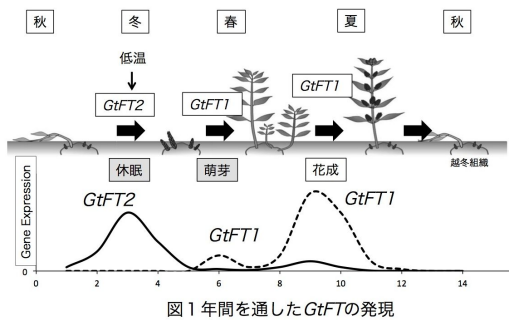


図1 年間を通じた *GtFT* の発現

2. 研究の目的

多年生植物は、シロイヌナズナやイネ等の一年生のモデル植物とは異なり、開花結実した後に越冬するという生活環を持っている。本課題では、越冬組織で機能するFTの新規機能の解明を目指す。越冬は、多年生植物において次年度の生存に関わる。越冬組織の確実な休眠は、越冬するために重要である。しかし、多年生植物における越冬組織の休眠は、時間の制約などにより十分な解析が行なわれていない。そのため、越冬組織の休眠制御メカニズムは、不明な点が多く残されている。これまでの解析により、1年を通じた *GtFT1* および *GtFT2* の発現解析から、花成ホルモンとして知られ

る *GtFT* が越冬組織で発現しており、越冬組織で休眠調節に参与している可能性を見いだしている。一般的に、FTは茎頂でFDと結合し、下流遺伝子である *AP1* や *LFY* に働きかけることで花成を誘導する。しかし、リンドウの越冬組織では、*GtFT* の発現変動が見られる一方で *AP1* や *LFY* の発現は認められない。これらの結果は、FTは器官や時期によってパートナーを替えることで、異なる機能を発揮する可能性を示している。以上より本研究では、*GtFT* の越冬組織における新たな機能を解明する。

本研究で予想される成果の波及効果として、*GtFT* が萌芽・休眠マーカーになる可能性がある。近年、リンドウの栽培現場では、越冬不良による次年度株の生育不良や脱落が問題となっている。休眠していない越冬組織は越冬できないため、休眠誘導処置を施す必要があるが、外見からは判断できない。本研究により、休眠過程における *GtFT* の機能が明らかになれば、これまで判別が不可能であった越冬組織の休眠状態を知ることができ、これを指標に休眠誘導処置を適切に施す事により、確実に越冬することができる。これにより、次年度のリンドウを安定に生産することが可能になる。

3. 研究の方法

越冬組織において *GtFT1* および *GtFT2* の休眠への関与が強く示唆されている(図1)。多年生植物のリンドウの越冬組織において、休眠過程で変動する *GtFT1* および *GtFT2* の機能解明を目的とする。具体的な研究内容は、休眠過程における *GtFT1*、*GtFT2* の相互作用因子の探索・同定、*GtFT1* および *GtFT2* が直接制御する下流遺伝子の探索を行なう。これらの解析から、越冬組織における *GtFT1*、*GtFT2* を介した新規休眠調節機構を解明する(図2)。

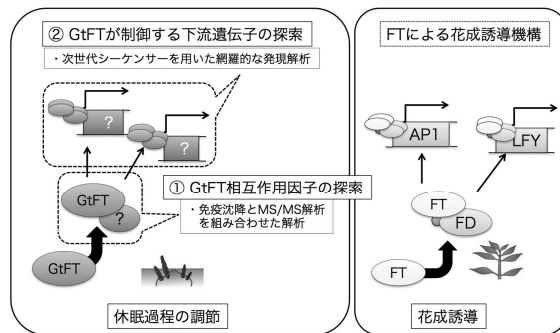


図2 *GtFT* の越冬組織における機能の解明

休眠過程における *GtFT* 相互作用因子の探索・同定

FTタンパク質は、複合体を形成して転写調節因子として機能することが報告されている。そこで越冬組織における各 *GtFT* タンパク質の相互作用因子を明らかにする。*GtFT* に GFP を融合したタンパク質を発現する形質転換リンドウ(図3)を用いて、免

疫沈降法と LC-MS/MS を組み合わせた方法で探索し相互作用因子の候補を得る。

解析に用いるサンプルとして、植物体から得られる越冬組織を用いた場合、年に1回しか形成されないため、解析が進まない可能性がある。そこで、培養容器内で栽培している培養リンドウから、培養越冬組織を誘導する技術を確立する。得られた培養越冬組織を上記の解析に供する。

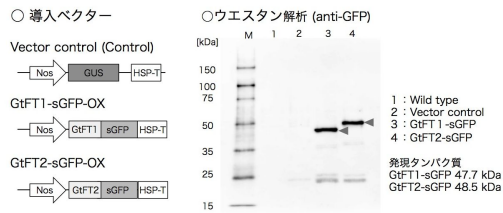


図3 GtFT-sGFP発現リンドウの作成

GtFT が制御する下流遺伝子の探索

GtFT タンパク質が制御している下流遺伝子を探索するため、各生育ステージ（形成期（8月）、自発休眠期（10月）、多発休眠期（1月）、萌芽直前（3月））の越冬組織から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、RNA-Seq による網羅的な発現解析を実施する。得られた遺伝子の発現データを発現変動パターンごとにクラスタリングを行なう。この解析により、GtFT タンパク質と同様な挙動を示す遺伝子を探索する。

4. 研究成果

リンドウ越冬組織での GtFT の機能を明らかにするために、越冬組織における GtFT の相互作用因子の探索を行なった。相互作用因子の探索に使用するサンプルは、植物体から形成される越冬組織を使用する予定であったが、植物体からの越冬組織の誘導は時間がかかり期間内では解析できなかつた。そこで、培養容器で栽培している培養リンドウから越冬組織の誘導系の確立を目指した。培養リンドウからの越冬組織の誘導は、高濃度ショ糖培地（通常の2倍濃度）で培養することで、高効率に越冬組織を誘導することに成功した（論文、図4）。この誘導系を用いて GtFTs-sGFP を発現する形質転換リンドウから、越冬組織を誘導し、得られた越冬組織を相互作用因子の探索に供した。



図4 培養リンドウの越冬組織誘導

GtFT-sGFP の越冬組織から、タンパク質を抽出し、GFP 抗体を用いて免疫沈降を実施した。免疫沈降によって得られたサンプルについて、LC-MS/MS 解析を行ない、GtFT タンパク質との相互作用因子を探索した。その結果、GtFT-sGFP 形質転換リンドウで特異的に検出されるタンパク質を複数得ることができた（表1）。得られた候補遺伝子を解析したところ、これまで花成で知られている相互作用因子（FD、14-3-3）とは、異なる新規な候補を得ることができた。この結果は、リンドウ越冬組織において、GtFT は、これまで花成で知られているものとは異なる機構で作用している可能性が示唆された。

表1 越冬組織におけるGtFT相互作用候補因子

GtFT1-sGFP			GtFT2-sGFP		
リンドウEST	スコア	備考	リンドウEST	スコア	備考
isotig25030	195	GtFT1	isotig07104	395	
isotig22817	131		isotig11180	181	
isotig15138	110		isotig18350	176	
isotig00573	81		isotig19256	145	
isotig04220	81		isotig15138	127	
isotig03157	74		isotig28752	91	
isotig34032	68		isotig14652	84	
isotig22103	57		isotig18543	79	
isotig05660	56		isotig27232	66	
isotig13668	50		isotig25030	64	GtFT2
isotig06196	33		isotig22865	63	

GtFT が制御する下流遺伝子を明らかにするために、各生育ステージ（形成期、自発休眠期、多発休眠期、萌芽直前）の越冬組織から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、RNA-Seq による網羅的な発現解析を実施した。各ステージ間での顕著な発現遺伝子数の変化は認められなかつた（表2）。

表2 RNA-Seq解析

	Sample	Total Number	Total Length(nt)	Mean Length(nt)	N50
Contig	OWB_Aug	123,715	44,099,640	356	685
	OWB_Oct	110,970	41,226,921	372	732
	OWB_Jan	130,744	45,843,161	351	656
	OWB_Mar	118,700	44,004,840	371	738
Unigene	OWB_Aug	75,990	56,228,546	740	1283
	OWB_Oct	71,790	50,992,276	710	1245
	OWB_Jan	86,740	69,870,962	806	1399
	OWB_Mar	78,652	58,207,132	740	1288
All		92,322	93,334,941	1011	1589

得られた配列情報と発現情報をもとに、階層クラスタ分析を行なった。その結果、越冬組織における遺伝子の発現パターンは8つのクラスターに分けられた（表3）。GtFT1 および GtFT2 は、それぞれクラスター1、クラスター3に属した（表3）。

表3 クラスタ解析

クラスター	8月	10月	1月	3月	遺伝子
1	—	—	—	—	GtFT1
2	—	—	—	—	
3	—	—	—	—	GtFT2
4	—	—	—	—	
5	—	—	—	—	
6	—	—	—	—	
7	—	—	—	—	
8	—	—	—	—	

クラスター1およびクラスター3に属する遺伝子数は、それぞれ10,011と30,274存在していた。これら遺伝子について解析を行なったところ、これまで花成のFTに直接制御されている遺伝子は存在していなかった。このことから、リンドウ越冬組織におけるGtFTの遺伝子制御機構は、花成とは異なる新規なものであることが示唆された。しかし、GtFTが直接制御している下流遺伝子の特定はできていない。今後、このデータをもとに解析を進め、GtFTの越冬組織における直接制御遺伝子を特定していく。

本課題の成果から、リンドウ越冬組織で機能するリンドウフロリゲン(GtFT)は、花成で知られている制御メカニズムとは、異なる機構で越冬組織の休眠を制御している可能性が示唆された。今後、本知見をもとに人為的な休眠制御技術の確立が期待され、多年生農作物の安定的な生産に貢献できると考えられる。

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2件)

Tomohiro Imamura, Atsumi Higuchi, Hideyuki Takahashi, Dehydrins are highly expressed in overwintering buds and enhance drought and freezing tolerance in *Gentiana triflora*. *Plant Science* 213: 55-66 (2013), (査読有)

Tomohiro Imamura, Atsumi Higuchi, Ken-Taro Sekine, Tetsuro Yamashita, Hideyuki Takahashi. High concentrations of sucrose induce overwintering bud formation in gentian plantlets cultured *in vitro*. *Plant Biotechnology* (in press) DOI: 10.5511/plantbiotechnology.13.1211a, (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

Tomohiro Imamura, Hideyuki Takahashi, Molecular characterization and functional analysis of dehydrin in overwintering buds of alpine plant *Gentiana*. *Plant and Microbe Adaptations to Cold (PMAC) 2012*, 北海道大学

今村智弘、樋口敦美、高橋秀行、リンドウの越冬に関わるDHN遺伝子の機能解析、第7回メタボロームシンポジウム、2012、慶應義塾大学

Tomohiro Imamura, Atsumi Higuchi, Hideyuki Takahashi, *GtDHN* enhances drought and cold tolerance in *Gentiana triflora*. 10th International Congress on Plant Molecular Biology (2012), International Convention Center Jeju, Korea

今村智弘、樋口敦美、高橋秀行、リンドウ

越冬組織の環境ストレスの関わるDHN遺伝子の機能解析、第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム、2013、北海道大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
(益財)岩手生物工学研究センター HP
<http://www.ibrc.or.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

今村 智弘 (TOMOHIRO IMAMURA)

公益財団法人 岩手生物工学研究センター
— 細胞工学研究部 研究員
研究者番号：20468705

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし