

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450502

研究課題名(和文) ジャガイモ塊茎形成におけるフロリゲン複合体の機能解析および育種への展開

研究課題名(英文) Functional analysis of florigen complex in potato tuber formation

研究代表者

田岡 健一郎 (TAOKA, KEN-ICHIRO)

横浜市立大学・木原生物学研究所・特任助教

研究者番号：00467698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ジャガイモフロリゲンSP6Aタンパク質による塊茎誘導が、フロリゲンによる花成誘導と同様の分子機構によってなされていることを明らかにした。花成は、フロリゲンが14-3-3との相互作用を介して転写因子FDと複合体を形成して花芽形成遺伝子の転写を活性化することで誘導される。塊茎誘導においても、SP6Aが14-3-3との相互作用を介してFDのホモログStFDL1と相互作用することが重要であることを、*in vitro*および *in vivo*の相互作用解析や形質転換ジャガイモの表現型解析によって明らかにした。また、花成に抑制的に働くTFL1のジャガイモホモログが塊茎抑制に働くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we revealed that potato tuber formation is regulated by a molecular mechanism similar to that of flowering regulation by florigen. In the regulation of photoperiodic flowering, FT, a florigen, induces flowering by making florigen activation complex (FAC) which is composed of FT, 14-3-3, and FD. StSP6A, a potato FT, has been shown to induce tuber formation (Navarro et al., 2011). To examine the molecular mechanism of tuber induction, we performed Y2H, BiFC, *in vitro* pull-down assay, and phenotypic analysis of transgenic potato plants. We revealed that StSP6A can make complex with potato 14-3-3 and StFDL1, a FD-like protein. Ectopic expression of StSP6A induced tuberization in a 14-3-3 dependent manner. Knock-down of StFDL1 significantly delayed tuberization. Considering them together, it was shown that StSP6A makes FAC-like complex termed Tuberigen Activation Complex (TAC) which is composed of StSP6A, 14-3-3, and StFDL1 to induce tuberization.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：フロリゲン ジャガイモ 塊茎形成 FT

1. 研究開始当初の背景

植物の花芽形成(花成)は一日の日の長さ(日長)の変化によって制御されており、それは日長変化の刺激によって合成される花成ホルモン、フロリゲンによって行われている。ジャガイモの塊茎(イモ)形成も、花成の場合と同様にフロリゲンによって誘導されている。このことは、花成と塊茎形成は共通した分子機構によって制御されていることを示している。申請者は、フロリゲンが受容体14-3-3タンパク質や転写因子OsFD1と3者複合体を形成してDNAに結合し、花芽形成遺伝子の転写を活性化して花成誘導することをタンパク質構造及び機能の両面から明らかにした(Taoka *et al.*, *Nature* 2011)。さらにその後の研究から、アンチフロリゲンTFL1/RCNが、フロリゲンと複合体形成に関して競合的に働いて花成を抑制していることを示唆するデータを得ている(田岡ら未発表)。一般に、フロリゲン発現を増強させると早咲きになるが、茎頂分裂組織が未分化能を維持できなくなるため花芽数は著しく減少する。逆に、アンチフロリゲン発現を増強すると遅咲きになるが花芽数は増加する。以上を踏まえ、申請者は次のような仮説を立てた。すなわち、「塊茎形成に関わるジャガイモフロリゲンは、14-3-3や転写因子と複合体を形成して塊茎形成遺伝子の発現を活性化して塊茎形成を促進し、アンチフロリゲンは拮抗的に働いてこれを抑制する。そして、両者のバランスにより塊茎の形成時期や収量が決定される」という仮説である。

2. 研究の目的

本申請研究ではこの仮説のもとに塊茎形成の分子機構を明らかにする。すなわち、ジャガイモのフロリゲンがどのようなタンパク質と複合体を形成し、どんな遺伝子の発現を制御して塊茎形成を誘導するのかを明らかにする。さらに、フロリゲンに対して拮抗的に働いて花芽形成を抑制するアンチフロリゲンの塊茎形成への役割も明らかにする。そ

して、本研究によって、塊茎形成の分子機構を解明し、さらに、早実性や多収性を強化するジャガイモ育種への基盤を構築する。

3. 研究の方法

塊茎形成を制御しているフロリゲン複合体の構成要素とその役割を明らかにする。さらに、アンチフロリゲンによる塊茎抑制能を明らかにする。そのために、(アンチ)フロリゲン複合体の構成要素の候補を同定し、それら遺伝子の発現パターンや、*in vitro* 及び *in vivo*での詳細な複合体形成能を解析する。また、それら候補についてジャガイモ形質転換体(過剰発現体とRNAiによる発現抑制体)を作製し塊茎形成能を調べることで、塊茎形成制御における候補遺伝子の役割を明らかにする。

4. 研究成果

ジャガイモの塊茎促進に関わるフロリゲン複合体の構成要素の候補の単離を行なった。野生ジャガイモphurejaゲノム配列情報を基に、イネ花成制御に働くフロリゲン複合体構成要素のホモログを網羅的に同定し、次いで、それらの中で、ジャガイモ塊茎分化前のストロン(地下茎)組織で強く発現する遺伝子をRT-PCR法により同定した。次にフロリゲン受容体である14-3-3の塊茎促進における役割を明らかにするために、フロリゲンおよび様々な14-3-3結合喪失変異を導入したフロリゲンを発現させる形質転換ジャガイモを作製し、14-3-3相互作用能が塊茎促進に重要であることを試験管植物および土植え植物で明らかにした(図1)。ジャガイモゲノムに見出されるすべての14-3-3アイソフォームについて、RT-PCRによる組織特異的発現解析を行なったところ、調べたほぼすべてが塊茎形成前のストロンで強く発現していた。そして、フロリゲンとの相互作用について14-3-3アイソフォーム特異性を、酵母ツーハイブリッド解析により調べたが、1つを除くすべてが強く相互作用していた。酵母ツーハイブリッド解析で

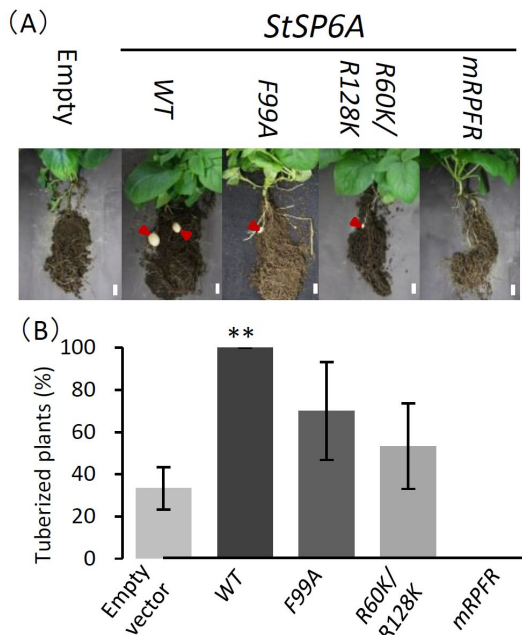


図1 (A) *StSP6A* 過剰発現ジャガイモの表現型。14-3-3結合部位に変異を導入すると塊茎形成が遅れた。(B) *StSP6A* 過剰発現体の塊茎形成率

特に強い相互作用を示したものについて、BiFC法やpull down法による相互作用解析を行った。そしてさらに、変異導入フロリゲンについても同様の解析を行い、両者の相互作用が特異的なものであることを確認した。次に、先に候補として同定したFDホモログについて、同様の14-3-3との相互作用解析(酵母ツーハイブリッド法、BiFC法、pull down法)を行ない、過剰発現体やRNAiによる発現抑制体を作製した。ジャガイモの塊茎形成制御に関わるフロリゲン複合体の構成要素候補のFDホモログ (*StFD*, *StFDL1a*, *StFDL1b*)やTFL1ホモログの過剰発現体やRNAi発現抑制体の表現型解析を行った。その結果、3種類のFDホモログの過剰発現体では、非形質転換対と比較して塊茎形成時期に違いは観察されなかった。発現解析では3つのFDの発現量はストロン分化の過程で大きく変化しないことから、FDは恒常的に十分量発現しており、その発現量の上昇が塊茎形成促進に必須ではないことが示唆された。RNAi発現抑制体の解析では、トマトの花成促進にかかわるSPGBのオーソログと考えられるジャガイモFDホモログ*StFD*のRNAi

は塊茎形成時期に影響しなかったのとは対照的に、*StFDL1a/b*のRNAiでは有意な塊茎形成遅延が観察された(図2)。これは、転写因子

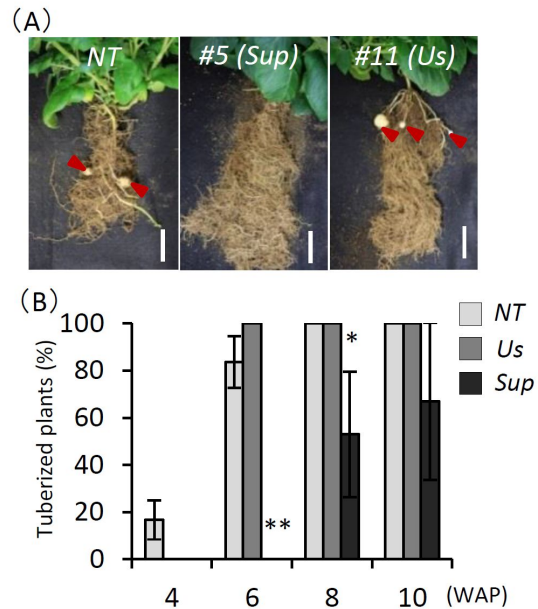


図2 (A) *StFDL1* RNAiジャガイモの表現型。NT=非形質転換体。Sup= *StFDL1* 発現抑制体。Us=非抑制体 (B) 土移植後(WAP)の塊茎形成率。抑制体では塊茎形成が遅れた。

の置換によってフロリゲン複合体の標的が変化するという作業仮説を支持する結果である(図3)。アンチフロリゲンであるTFL1のホモログについても、過剰発現体やRNAiによる発現抑制体の表現型解析を行った。4つのTFL1のうち、ストロンで強く発現する2つについてRNAi発現抑制体の表現型解析を行ったところ、非誘導条件である長日条件において有意な塊茎形成促進が観察された。そして、過剰発現体では、短日および長日どちらの条件においても、塊茎形成時期の遅延が観察された。14-3-3結合喪失変異を導入した過剰発現体では、塊茎形成時期の遅延は観察されなかった。この結果は、フロリゲン・アンチフロリゲンのバランスによる発生制御モデルを支持するものと考えている(図3)。これまでに得られていた*StSP6A*による塊茎誘導とその14-3-3相互作用依存性、*StFDL1*ノックダウンによる塊茎形成遅延、*StSP6A*と14-3-3と

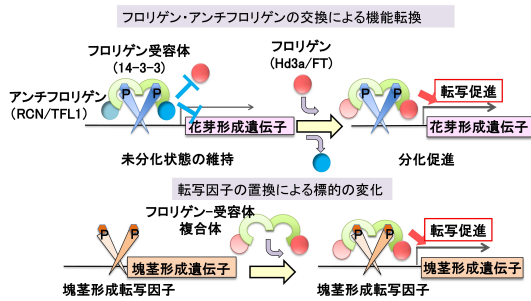


図3 フロリゲン・アンチフロリゲンの入れ替え・転写因子の置換による制御モデル

StFDL1の組織・時期特異的RNA発現やタンパク質の細胞内局在および相互作用の結果をあわせて、その成果を論文公表した (Teo et al., 2017)。

(引用文献)

Taoka K, Ohki I, Tsuji H, et al. Nature. 2011 Jul 31;476(7360):332-5. doi:10.1038/nature10272.

Teo CJ, Takahashi K, Shimizu K, Shimamoto K, Taoka K. Plant Cell Physiol. 2017 Feb 1;58(2):365-374. doi:10.1093/pcp/pcw197.

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)

Teo CJ, Takahashi K, Shimizu K, Shimamoto K, Taoka K. Potato Tuber Induction is Regulated by Interactions Between Components of a Tuberigen Complex. Plant Cell Physiol. 2017 Feb 1;58(2):365-374. 査読あり doi:10.1093/pcp/pcw197.

辻寛之、田岡健一郎 フロリゲン受容体の発見とその後 化学と生物 54 358 - 364 (2016) 査読なし doi:10.1271/kagakutoseibutsu.54.358

[学会発表](計 6件)

田岡健一郎、河原郁美、児嶋長次郎 フロリゲン複合体形成を制御する花成調節化合物の探索 チューベリゲンによるジャガイモ塊茎形成制御の分子機構 第1

28回日本育種学会 2016年09月1日 ~2016年09月3日 信州大学繊維学部 (長野県上田市)

田岡健一郎、張禎日、高橋賢多、齋藤亜美、清水かなえ、島本功 ジャガイモ塊茎形成制御の解析 第129回日本育種学会 2016年03月21日~2016年03月22日 横浜市立大学(神奈川県横浜市金沢区) 田岡健一郎、高橋賢多、齋藤亜美、張禎日、島本功 ジャガイモ塊茎形成制御におけるTFL1ホモログの役割 第57回日本植物生理学会年会 2016年03月18日~2016年03月20日 岩手大学上田キャンパス(岩手県盛岡市)

田岡健一郎、張禎日、高橋賢多、齋藤亜美、清水かなえ、島本功 チューベリゲンによるジャガイモ塊茎形成制御の分子機構 第128回日本育種学会 2015年09月11日~2015年09月12日 新潟大学(新潟県新潟市西区)

田岡健一郎、張禎日、高橋賢多、齋藤亜美、清水かなえ、島本功 チューベリゲンによるジャガイモ塊茎形成制御の分子機構 日本ナス科コンソシアム年会(JSOL2015) 2015年09月04日~2015年09月05日 明治大学生田校舎(神奈川県川崎市多摩区)

田岡健一郎、高橋賢多、齋藤亜美、張禎日、島本功 FAC様チューベリゲン複合体によるジャガイモ塊茎形成制御機構の解析 第56回日本植物生理学会年会 2015年03月16日~2015年03月18日 東京農業大学(東京都世田谷区)

[図書](計 1件)

Hiroyuki Tsuji, Ken-ichiro Taoka Elsevier The Enzymes vol. 35 284 (113-114) 2014 査読なし

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

田岡 健一郎 （TAOKA KEN-ICHIRO）

横浜市立大学・木原生物学研究所・特任助教

研究者番号：00467698