

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2015
課題番号：26660006
研究課題名(和文) フロリゲン長距離移動のライブイメージング

研究課題名(英文) Live imaging of florigen

研究代表者

辻 寛之(Tsuji, Hiroyuki)

横浜市立大学・木原生物学研究所・准教授

研究者番号：40437512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：フロリゲンは花芽分化を誘導する強力な運命決定因子であり、その正体はHd3a/FTと呼ばれる球状タンパク質である。フロリゲンは葉で合成された後、茎の先端に位置する幹細胞領域・茎頂メリステムへと輸送されて機能する。この長距離輸送の過程、とくにメリステムに到達する様子は、長距離移動性の発生制御因子を介した成長相制御の最終段階であり極めて興味深い。本研究では、独自に開発したフロリゲンの生体イメージング系を駆使して、生きたままの茎頂メリステムを固定せずにライブイメージングすることを試みた。その結果、フロリゲンが様々な分布を変えながらメリステムの成長相転換を進める様子を初めて観察することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Florigen is a systemic signal that induces flowering in plants, and its molecular nature is a protein product encoded by FT/Hd3a gene. FT/Hd3a is expressed in leaf phloem tissue, and transported into the shoot apical meristem where it initiates floral transition. The important question in this process is how this protein transported through such a long distance, and especially how it reaches the shoot apical meristem. We tried to address these questions by live imaging of shoot apical meristem of the transgenic rice plants expressing Hd3a-GFP from its own promoter. Detailed observation of the shoot apical meristem revealed that Hd3a is continuously transported from the beginning of the floral transition to the later stage of panicle development of plants. Our observation will help further understanding of how plants initiates reproductive development by florigen.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：フロリゲン メリステム イメージング イネ

1. 研究開始当初の背景

フロリゲンは花芽分化のタイミングを決定づける植物ホルモンであり、その正体は FT/Hd3a と呼ばれる遺伝子にコードされたタンパク質である。フロリゲンは葉で合成されたのちに花芽の分化する茎の先端に輸送されて機能する長距離輸送性の発生制御因子であり、その合成、輸送、情報伝達の制御に注目が集まっている。特にタンパク質が丸ごと植物ホルモンとして働き、しかも長距離を輸送されて機能する制御過程は極めて興味深い研究対象の一つであり、このプロセスの理解に基づいて制御することができれば新しい花成制御の方法論を提供するものとなる。

フロリゲンの輸送を理解するための重要なステップはその分布の正確な可視化であるが、これまでフロリゲンのイメージングは困難であり、唯一明瞭にイメージングされたのは私たちが開発したイネを用いた Hd3a-GFP を用いた実験系のみであった。この実験系をさらに深化させ、最新の顕微鏡技術と組み合わせることができれば、これまで観察が困難であった花成の全プロセスに及ぶフロリゲンのイメージングが可能となることが期待されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的はフロリゲンがメリステムに到達する過程をライブイメージングすることである。固定せずに生きたメリステムを観察することによって、アーティファクトの影響を最小限に抑えた真のフロリゲンの分布を明らかにすることを目指した。また、フロリゲンが様々に分布を変えながらメリステムにおける花芽分化を進行させる仕組みを理解するために、花芽分化の全行程を通じたフロリゲンのライブイメージングを行うことを目的とした。

3. 研究の方法

フロリゲンのライブイメージングを行うために、本研究では二つのアプローチをとった。一つは熱ショック誘導系を活用したフロリゲン Hd3a と緑色蛍光タンパク質 GFP の融合タンパク質の融合タンパク質を発言誘導する実験系である。もう一つは Hd3a-GFP 発現イネを用いて徹底的なイメージングを行う方法である。

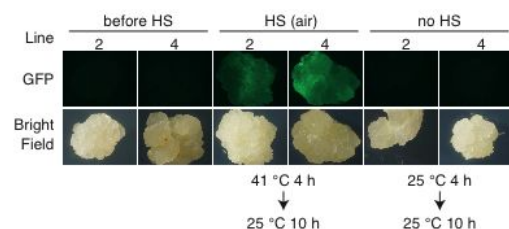
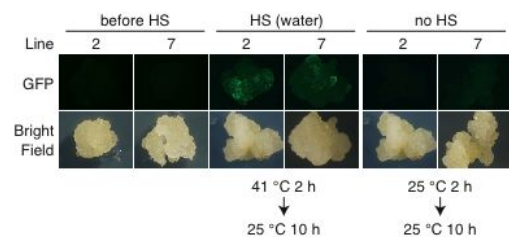
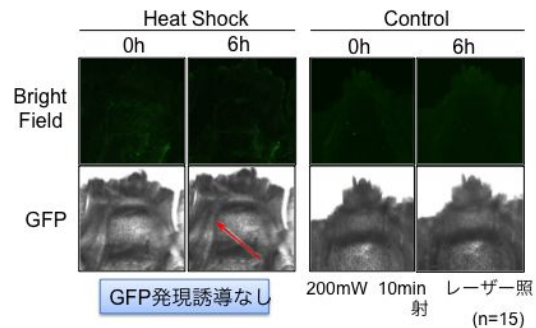
Hd3a-GFP の熱ショック誘導系を作出するため、イネ HSP プロモーターの制御下で Hd3a-GFP を発現する形質転換イネを多数作出した。この中から熱ショックによって GFP 蛍光をイメージング可能な植物を選定するために、以下の3ステップの実験を行った。まず、熱ショック後に Hd3a-GFP の転写量が増加する系統を定量リアルタイム RT-PCR によって探索した。ついで、ウェスタンブロッティングによって熱ショック後にタンパク質の蓄積量が増強される系統を選抜した。こ

れらのスクリーニングを通過したイネをもちいて、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行い、熱ショック後に局所的な GFP 傾向を観察できる系統を探索した。さらに、GFP よりも約3倍の輝度を有する蛍光タンパク質 Clover と Hd3a の融合タンパク質を熱ショックによって発現させることができるベクターを構築し、イネに形質転換した。

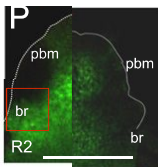
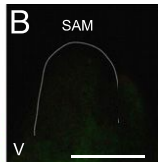
Hd3a プロモーターの制御下で Hd3a-GFP を発現する形質転換イネ (pHd3a:Hd3a-GFP) を用いて、傾聴メリステムの成長相転換過程を全て観察した。葉を分化する栄養成長期、花芽分化の最初期である茎頂の縦身長、プラクトと一次枝こうの形成期、二次枝こうの形成期、花芽分化期である。

4. 研究成果

Hd3a-GFP の熱ショック誘導イネを作出し、熱ショックによる誘導を調査したところ、転写レベル、タンパク質レベルの誘導は観察されたが、顕微鏡観察レベルで Hd3a-GFP を確認できる系統は得られなかった。これらの系統においても、カルスにおける蛍光は観察されたことから、植物体に細分化後に傾向が弱くなっている可能性が考えられる。そこで、GFP よりも蛍光強度が3倍近く強い蛍光タンパク質の Clover を Hd3a と融合させたタンパク質を発現するイネを作出し、これの形質を評価している。



pHd3a:Hd3a-GFP 形質転換イネの茎頂を花芽分化の時系列に沿って観察した。その結果、Hd3a が茎頂に到達した直後に花芽分化の最初の形態的な変化であるメリステムの縦身長が開始され、Hd3a-GFP はこの時メリステム全体に満遍なく分布することがわかった。メリステムが一次枝こうを分化している時には、Hd3a-GFP は一次枝こうの原基には侵入しておらず、一次枝こうの先端が花に分化するタイミングでここに到達することがわかった。二次枝こうの形成過程でも同様の分布の変化を見ることができた。



これらの観察から、Hd3a は穂の分化の過程を通してメリステムに輸送され続けることが明らかとなった。

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 2 件)

Tamaki, S., Tsujii, H. (*Corresponding Author), Matsumoto, A., Fujita, A., Shimatani, Z., Terada, R., Sakamoto, T., Kurata, T., Shimamoto, K. (2015) FT-like proteins induce transposon silencing in the shoot apex during floral induction in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112; E901-911

*Tsujii, H. (*Corresponding Author), Tachibana, C., Tamaki, S., Taoka, K., Kyojuka, J., Shimamoto, K. (2015) Hd3a promotes lateral branching in rice. *Plant J.*, 82: 256-266

[学会発表](計 3 件)

Tsujii, H. “Florigen-induced transposon silencing in the shoot apical meristem of rice”, Plant and Animal Genome XXIV, 2016 年 1 月 12 日, Town and Country Hotel, San Diego, USA, 国際学会 招待講演

辻 寛之「フロリゲン量の測り方」, 遺伝学研究所研究集会「イネ分子遺伝学の周縁」, 2015 年 10 月 10 日, 国立遺伝学研究所(静岡県三島市), 招待講演

Tsujii, H. “Florigen-induced transposon silencing in the shoot apical meristem of rice”, 26th International Conference on Arabidopsis Research, 2015 年 7 月 9 日, Palais des Congres, Paris, France, 国際学会 招待講演(プレナリーセッション)

辻 寛之「花成ホルモン・フロリゲンの機能に関する遺伝育種学的研究」平成 26 年度日本育種学会奨励賞受賞講演(日本育種学会第 126 回講演会), 2015 年 3 月 21 日, 玉川大学(東京都町田市)

[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

<http://hiroyukitsuji.tumblr.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
辻 寛之 (Hiroyuki TSUJI)
横浜市立大学・木原生物学研究所・准教授

研究者番号: 40437512

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()