

「植物の機能と制御」

平成12年度採択研究代表者

経塚 淳子

(東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授)

## 「植物生殖成長のキープロセスを統御する分子機構の解明」

### 1. 研究実施の概要

子孫を残すことは生物にとっての至上命令である。植物では遺伝的プログラムに則り、栄養成長から生殖成長への成長相の転換（花成）が起こる。花成により形態形成プログラムには大幅な変更が加えられ、花序形成が開始する。われわれは植物生殖成長のキープロセスである花成と花序形成に的を絞り、シロイヌナズナとイネを用い、この2つのプロセスを制御する分子機構を明らかにすることをめざしている。

*FT*は花成制御の最終段階に位置する遺伝子であり、花成における最重要遺伝子のひとつである。これまでの、光周性花成誘導により葉で産生され、茎頂に輸送されて作用する長距離花成シグナルの実体の少なくとも一部が*FT*である可能性が出てきた。また、*FT*の発現を抑制する*TFL2*遺伝子を単離し、これが*CO*による*FT*の転写活性化を競合的に阻害することで、発現の抑制を行っていることを明らかにした。

さらに*FT*と類似のタンパク質でありながら*FT*とは相反する機能を持つ*TFL1*については、その機能に必須である細胞間移行に着目し、細胞間移行を決定する21アミノ酸を同定した。

成長相の転換時に花成促進に働く*MADS-box*遺伝子である*AGL24*の機能に関して、*AGL24*が花成経路の下流において他の*MADS-box*遺伝子と強調あるいは拮抗して機能することにより花成の制御に関わっていることを明らかにした。

花序形成に関しては、イネを主な研究対象とし、これまでに、新たな分裂組織の形成に必須である*LAX*遺伝子、および分裂組織に花芽としての運命を決定する*FZP*遺伝子を単離した。今年度はこれらが機能する遺伝子ネットワークの解析をめざし、相互作用する遺伝子候補の単離、下流で機能する遺伝子探索のための材料を育成した。

以上、平成15年度までに当初予定していた遺伝子単離を終了した。これらはいずれも花成、花序形成において中心的な役割を担っており、今後これらの作用機構についてさまざまな手法を用いた多面的な解析を開始した。さらに、これまでに得られた研究成果の産業への応用についても検討を開始することができた。

### 2. 研究実施内容

*FT*遺伝子の下流もしくは同位で機能する遺伝子の機能解析

花成を制御する諸経路からの情報を統合し、最終的なスイッチとして働くことが予想されるFT遺伝子の下流もしくは同位で機能する遺伝子を同定し、その機能を明らかにすることを目的として、今年度も研究をおこなった。

今年度は、FD遺伝子の機能解析とFT遺伝子機能の細胞非自律性を中心に研究を進めた。FD遺伝子の機能解析から、蛋白質間相互作用を介してFTとFD遺伝子の機能は相互に依存していること、FTとFDはLFYとともに花芽形成初期に働くAP1、CAL遺伝子の転写制御に関わることが明らかになった。このことは、FT遺伝子の作用場所が茎頂であることを強く示唆する。一方、後藤グループの研究、および後藤グループとの共同研究から、光周期に依存したFT遺伝子の発現はもっぱら葉の維管束（篩部）に限定されることが明らかになった。作用部位と発現部位が一致しないことから、FT遺伝子の組織・細胞限定的な機能回復実験や接ぎ木実験をおこない、FT遺伝子機能の細胞非自律性を検討した。これらの研究から、光周性花成誘導により葉で産生され、茎頂に輸送されて作用する長距離花成シグナルの実体の少なくとも一部がFTである可能性が出てきた。上の成果の論文発表とこの可能性の検証が来年度の最重要課題となる。

#### TFL1タンパク質の細胞間移行メカニズムの解明

TFL1タンパク質の細胞移行能の分子メカニズムを明らかにするため、細胞間移行に必要十分であることを明らかにした、21アミノ酸領域について解析を進めた。具体的にはこの領域にアラニンスキャン法により突然変異を導入し、そのタンパク質の細胞間移行と機能を調べた。その結果、TFL1タンパク質の機能を失っても細胞間移行するものがあること、また同じアミノ酸残基でもアラニン以外に置換すると移行能が失われることが明らかとなった。

TFL1のホモログであり、花成の鍵遺伝子FTも21アミノ酸領域を持っている。調べた結果FTもTFL1同様細胞間を移行することが明らかとなった。

#### 花成におけるTFL2遺伝子の機能解析

昨年度までにTFL2はFTを特異的に抑制することによって、花成を遅延することを明らかにした。FTは転写活性化因子COによる制御を受けていることが知られている。そこでFTの発現調節における活性化因子(CO)と抑制因子(TFL2)の作用機構について研究を行った。その結果TFL2はCOによるFTの転写活性化を競合的に阻害することで、発現の抑制を行っていることが明らかとなった。

#### 生長相の転換時に作用するMADSボックスタンパク質遺伝子群の機能解析

シロイヌナズナの花成促進に働くMADS-box転写因子AGL24の作用機構を明らかにすることを目的とし、AGL24とタンパク質間相互作用する因子の同定を行った。また、AGL24と進化系統学的に最も近いにも関わらず、花成抑制に働くSVP遺伝子についても同様に、タンパク質間相互作用について調べた。

まず、AGL24と相互作用する因子を単離するために、酵母two-hybrid法によるスクリー

ニングを行った。その結果、複数のMADS-box遺伝子が単離され、これらはSVPとも相互作用することがわかった。また、AGL24およびSVPとこれらMADS-boxタンパク質間の相互作用は、*in vitro*結合アッセイによっても確認された。これらの結果と各遺伝子の発現特異性から、AGL24は栄養生長期の茎頂分裂組織においてはSOC1と、花序分裂組織や初期の花分裂組織においてはAP1, CAL, FULと相互作用することが示唆された。AGL24とSVPはDNA結合に関与すると考えられているMADS-boxドメインのアミノ酸配列が89%という非常に高い相同性を示すことから、両者は同じ標的配列に結合し、複合体形成や転写活性化能などの違いによって、拮抗的な機能を果たしているのではないかと考えられた。

#### イネの花序形成に関わる遺伝子の機能解析

花序形成に関しては、イネを主な研究対象とし、これまでに、新たな分裂組織の形成に必須であるLAX遺伝子、および分裂組織に花芽としての運命を決定するFZP遺伝子を単離した。今年度はこれらに加えて、花序と花芽の成長の両方に関わるAPO1遺伝子を単離した。

LAXとFZPについては、これらの実際の機能を明らかにし、さらにこれらが働く遺伝子ネットワークの理解をめざし、相互作用する遺伝子の単離、下流で機能する遺伝子などを単離するための材料を作成した。

また、イネの花序の成長に関わる遺伝子の網羅的解析を開始し、イネ花序成長の各時期に特異的に発現する遺伝子群を同定し、これらの網羅的な機能解析を行っている。

#### 生殖成長に関わる遺伝子を用いた園芸植物の分子育種

生殖成長に関わる分子の園芸植物における機能を解明し、これをもとに有用な園芸植物の分子育種に取り組む。

平成15年度はイネの分枝の制御因子をコードするLAX PANICLE (LAX)、シロイヌナズナの花成促進因子をコードするFLOWERING LOCUS T (FT)、および藻類のフィトクロム発色団生合成酵素をコードするpcyA遺伝子の園芸植物における機能解析を実施した。おのおのの遺伝子は構成的に発現するかたちで園芸植物であるナス科のペチュニア (Petunia hybrida) およびゴマハノグサ科のトレニア (Torenia hybrida) に形質転換した。RT-PCRにより過剰発現株を選抜し、導入遺伝子の効果を解析する。現在までにpcyA過剰発現ペチュニアおよびトレニアを取得済みである。LAX遺伝子については形質転換体の選抜中である。

### 3. 研究実施体制

#### 経塚グループ

- ① 研究分担グループ長：経塚淳子（東京大学大学院・農学生命科学研究科、助教授）
- ② 研究項目：イネ穂の分枝決定遺伝子メカニズムの解明

#### 後藤グループ

- ① 研究分担グループ長：後藤弘爾（岡山県生物科学総合研究所・遺伝子工学研究部門、

室長)

- ② 研究項目：TFL1タンパク質の細胞間移行メカニズムの解明  
花成における *TFL2* 遺伝子の機能解析

荒木グループ

- ① 研究分担グループ長：荒木崇（京都大学・理学系研究科、助教授）
- ② 研究項目：*FT* 遺伝子の下流もしくは同位で機能する遺伝子の機能解析

長戸グループ

- ① 研究分担グループ長：長戸康郎（東京大学・農学生命科学研究科、教授）
- ② 研究項目：イネ穂形成過程の発生遺伝学的解析

河内グループ

- ① 研究分担グループ長：河内孝之（奈良先端大学、バイオサイエンス研究科、教授）
- ② 研究項目：生長相の転換時に作用するMADSボックスタンパク質遺伝子群の機能解析

田中グループ

- ① 研究分担グループ長：田中良和（サントリー株式会社）
- ② 研究項目：生殖成長に関わる遺伝子を用いた園芸植物の分子育種

#### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

##### (1) 論文（原著論文）発表

- Komatsu, K, Maekawa M, Ujiie S, Satake Y, Okamoto H, Furutani I, Shimamoto K and Kyojuka J.  
*LAX* and *SPA* - major regulators of shoot branching in rice.  
**Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 100: 11765-11770 (2003)
- Komatsu M, Shimamoto K and Kyojuka J. Two-step regulation and continuous transposition of the rice LINE-type retrotransposon *Karma*.  
**Plant Cell** 15:1934-1944 (2003)
- Komatsu M, Chujo A, Shimamoto K and Kyojuka J. *FRIZZY PANICLE* is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets.  
**Development** 130:3841-3850 (2003)
- Chujo Y, Chu, Kishino H, Shimamoto K, Kyojuka J.  
Partial conservation of *LFY* function between rice and Arabidopsis.  
**Plant Cell Physiol.** 44: 1311-1319 (2003)
- Takeda, S., Tadele, Z., Hofmann, I., J. Angelis, K., Kaya, H., Araki, T.,

Mengiste, T., Mittelsten Scheid, O., Probst, A. V., Shibahara, K., Scheel, D. and Paszkowski, J.

BRU1, a novel link between responses to DNA damage and epigenetic gene silencing in *Arabidopsis*.

**Genes and Development** 18 (7), 782-793. (2004)

- Kotake, T., Takada, S., Nakahigashi, K., Ohto, M., and Goto, K.  
Arabidopsis TERMINAL FLOWER 2 gene encodes a heterochromatin protein 1 homolog and represses both FLOWERING LOCUS T to regulate flowering time and several floral homeotic genes.

**Plant Cell Physiol** 44, 555-564. (2003)

- Takada, S., and Goto, K.  
TERMINAL FLOWER2, an Arabidopsis Homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, Counteracts the Activation of FLOWERING LOCUS T by CONSTANS in the Vascular Tissues of Leaves to Regulate Flowering Time.

**Plant Cell** 15, 2856-2865. (2003)

- Fujita, H., Takemura, M., Tani, E., Nemoto, K., Yokota, A. and Kohchi, T.  
An *Arabidopsis* MADS-box protein, AGL24, is specifically bound to and phosphorylated by meristematic receptor-like kinase (MRLK).

**Plant Cell Physiol** 14: 735-742 (2003)

- Hyodo, H., Yamakawa, S., Takeda, Y., Tsuduki, M., Yokota, A., Nishitani, K. and Kohchi, T.  
Active gene expression of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene, XTH9, in inflorescence apices is related to cell elongation in *Arabidopsis thaliana*.

**Plant Mol. Biol** 52: 473-482 (2003)

- Shikata, M., Takemura, M., Yokota, A. and Kohchi, T.  
*Arabidopsis* ZIM, a plant specific GATA factor can function as a transcriptional activator.

**Biosci. Biotechnol. Biochem** 64: 2495-2497 (2003)

- Kami, T., Mukougawa, K., Muramoto, T., Yokota, A., Shinomura, T., Lagarias, J. C. and Kohchi, T.  
Complementation of phytochrome chromophore-deficient *Arabidopsis* by expression of phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase.

**Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101: 1099-1104 (2004)

- Shikata, M., Matsuda, Y., Ando, K., Nishii, A., Takemura, M., Yokota, A., and Kohchi, T.  
Characterization of *Arabidopsis* ZIM, a member of a novel plant-specific

GATA factor gene family.

**J. Exp. Bot** 55: 631-639 (2004)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1 件 (CREST研究期間累積件数：1 0 件)