

「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。

これまでの研究から、花成における最重要遺伝子のひとつであるFTが、花成シグナル「フロリゲン」の実体の少なくとも一部である可能性が出てきた。今年度展開したさまざまな解析からこの可能性をサポートする結果を得ており、残りの研究期間でさらに検証を進める。また、FTの発現を抑制する*TFL2*遺伝子を単離し、これがFTの発現を抑制する機構を解析している。これまでに、FT遺伝子の活性化と抑制を受けるシス領域を明らかにした。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、細胞間移行を決定に必要な10アミノ酸を特定した。

シロイヌナズナのMADSボックス転写因子である*AGL24*と*SVP*は花成に対して、促進(*AGL24*)と抑制(*SVP*)という相反する機能を持つ。この機構を明らかにすることを目的として解析を行い、*AGL24*は花成統合に働く*SOCI*遺伝子の発現を促進し、*SVP*は抑制することを見出した。さらに、この逆の制御は*AGL24*と*SVP*が異なる因子と複合体を形成することによることを明らかにした。

花序形成はイネを主な研究対象としている。これまでに新たな分裂組織の形成に必須である*LAX*遺伝子を単離しており、*LAX*が機能する遺伝子ネットワークの全貌の理解および*LAX*の分子機能の解析を進めている。これまでに、*LAX*の下流で働く遺伝子には転写因子の割合が多く、*LAX*が腋芽形成の転写ネットワークの上位で機能していることが示唆された。*LAX*の直接標的遺伝子の候補も得ており、残りの研究期間において*LAX*が下流の遺伝子を制御する機構を詳細に解明する。

また、網羅的解析により、イネ花序成長の各時期に特異的に発現する遺伝子群358を同定した。これらのなかでも、花序形成の非常に初期に発現を開始する約20の遺伝子はイネ穂

の形態を決定において非常に重要な機能を担っていると予想される。

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。

今年度も、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。これまでに、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API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が、一方で、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。昨年度から進めている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継続し、FT遺伝子機能の細胞非自律性を支持する知見を蓄積した。今年度は新たに、機能を保持したGFP融合蛋白質を用いて、FT、FDが茎頂の細胞では核内に共在しうることを見いだした。

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。この可能性の検証と2005年5月中の投稿を目指して準備を進めているFD遺伝子の論文完成とが最終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タンパク質のもつ細胞間移行のメカニズムを明らかにするため、細胞間移行するのに必要十分な領域として同定した、21アミノ酸にすべてについてアラニンスキャンニングを行った。その結果21残基の内、さらに10アミノ残基が細胞間移行に重要であることが分かった。しかし予想に反して、タンパク質機能を保持し細胞間移行能を失った変異タンパク質(Δ mTFL1)は得られなかった。そこで立体構造などを考慮しアラニン以外への置換を行い、現在 Δ mTFL1の候補となるタンパク質の作製に成功しつつある。

本来 Δ mTFL1を用いて行う予定であった、細胞間移行に関する細胞因子の突然変異体を得るべく、*tfl1*突然変異体のサプレッサーのスクリーニングを行った。候補をいくつか得たので、遺伝子の同定に向け、現在マッピングを進めている。

花成におけるTFL2遺伝子の機能解析

TFL2の機能として、ヘテロクロマチン遺伝子の発現制御に関しては遺伝学的にも、細胞生物学的にも関与していないとの結論を得た。そこで、TFL2による遺伝子発現調節機構を明らかにするため、FT遺伝子の発現調節にターゲットを絞り、解析を進めた。その結果発現の活性化と抑制を受けるシス領域が明らかとなった。現在一過性の発現解析の系を用い

てさらに詳細な解析を進めている。

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に働くMADSボックス転写因子*AGL24*ならびに*SVP*の作用機構を明らかにすることを目的とし、両遺伝子が転写制御を行う遺伝子の同定を行った。また、両遺伝子が花成促進と抑制という逆の機能を示す分子機構を明らかにするために、両者の機能特異性を決定するドメインの同定を行った。

まず、*AGL24*あるいは*SVP*の変異体および過剰発現植物体を用いたマイクロアレイ解析ならびにリアルタイムPCR解析を行った結果、花成統合に働く*SOCI*遺伝子が、*AGL24*によって発現促進され、*SVP*によって発現抑制されていることが明らかとなった。また、両遺伝子の各ドメインを相互に入れ換えたドメインキメラ遺伝子を作成し、それらを過剰発現するシロイヌナズナ形質転換体の作出と解析を行った。その結果、*AGL24*のIドメインを持つ遺伝子は*AGL24*の機能を示し、*SVP*のIKドメインを持つ遺伝子は*SVP*の機能を示すことが明らかとなった。これらの結果から、*AGL24*と*SVP*は主にIドメインの特異性によって異なる因子と複合体を形成し、その結果、*SOCI*の発現を逆に制御して、花成促進あるいは抑制という逆の機能を持つことが示唆された。

イネ穂の分枝決定遺伝子メカニズムの解明

花序形成はイネを主な研究対象としている。これまでに新たな分裂組織の形成に必須である*LAX*遺伝子を単離しており、転写調節因子である*LAX*が機能する遺伝子ネットワークの全貌の理解および*LAX*の分子機能の解析を進めている。まず、*LAX*の下流で働く遺伝子に関する情報を得るために、*LAX*の転写誘導系を用いてマイクロアレイ解析を行った。誘導処理2時間後から数十の遺伝子発現が上昇した。これらのうち25%以上が転写因子であることから、*LAX*が腋芽形成の転写ネットワークの上位で機能する転写活性化因子であることが示唆された。研究期間中に*LAX*の直接標的遺伝子を特定し、*LAX*が下流の遺伝子を制御する転写調節様式を解明する。

また、網羅的解析により、イネ花序成長の各時期に特異的に発現する遺伝子群358を同定した。これらのなかでも、花序形成の非常に初期に発現を開始する約20遺伝子はイネ穂の形態を決定において非常に重要な機能を担っていると期待される。これらのうちDOF転写因子をコードするクローンは、*LAX*と同じ発現パターンを示し、*LAX*により発現が誘導され、*lax*変異体では発現が消失することから、*LAX*の下流因子であることが明らかになった。

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んでいる。平成15年度までに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*遺伝子を、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ンニア (*Torenia hybrida*) に形質転換した。今年度は昨年度までに作出した形質転換体の評価を行ったが、今のところ商業的に有用な形質は見出されていない。

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・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

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

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

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・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

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

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

- Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Ohnishi K, Takamura I, **Kyozuka L.** Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol.* **46**: 79-86(2005)
- Gallavotti A, Zhou Q, **Kyozuka J.** Meeley R, Ritter MK, Doebley JF, Pe ME,

Schmidt RJ. The role of barren stalk 1 in the architecture of maize. *Nature* **432**: 630-635 (2004)

- Takeda, S., Tadele, Z., Hofmann, I., Angelis, K. J., Kaya, H., Araki, T., Mengiste, T., Mittelsten Scheid, O., Probst, A. V., Shibahara, K., Scheel, D. and Paszkowski, J. *BRUI*, a novel link between responses to DNA damage and epigenetic gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **18**: 782-793. (2004)
- Hattan, J., Kanamoto, H., Takemura, M., Yokota, A., and Kohchi, T. Molecular characterization of the cytoplasmic interacting protein of the receptor kinase IRK expressed in the inflorescence and root apices of *Arabidopsis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **68**: 2598-2606 (2004)
- Muramoto, T., Kami, C., Kataoka, H., Iwata, N., Linley, P. J., Mukougawa, K., Yokota, A., and Kohchi, T. The tomato photomorphogenetic mutant, *aurea*, is deficient in phytochromobilin synthase for phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* in press (2005)

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：8件）