

イネ開花促進遺伝子 *Hd3a* の機能解析

玉置 祥二郎

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物分子遺伝学講座

(島本 功 教授)

目次

序論	-----4
材料および方法	-----14
1.材料および生育条件	-----14
2.方法	-----15
結果	-----19
1. <i>Hd3a</i> の器官組織別発現解析	-----19
2.一過的発現解析	-----20
3.組織化学染色	-----22
4. <i>Hd3a:GFP</i> タンパク質の機能解析	-----24
考察	-----30
1.器官組織別発現解析	-----30
2.一過的発現解析	-----32
3. <i>Hd3a:GFP</i> タンパク質の機能解析	-----34
4. <i>Hd3a</i> タンパク質はフロリゲンである可能性が高い	-----35
5.フロリゲン <i>Hd3a</i> タンパク質の植物における機能	-----36
まとめ	-----41

謝 辞	-----42
-----	---------

参考文献	-----43
------	---------

表	-----50
---	---------

図	-----53
---	---------

序論

植物において花をつけ自らの子孫を残すことは最も重要なイベントの一つである。発芽後の植物の地上部器官はすべて茎の先端にある茎頂分裂組織において作られている。植物が花をつけるということは、茎頂分裂組織において栄養器官である葉を作り続けている栄養生長の状態から、生殖器官である花芽をつくり始める生殖生長への移行が起きた結果である。

茎頂分裂組織において葉を作る栄養成長から花芽を作る生殖成長への移行（以後本文では花成とする）は環境要因によりコントロールされている。植物の生長に影響を及ぼすことが明らかとなっている環境要因には様々なものがあるが、そのうちの一つに日長または光周期がありそれらは植物が季節を判断し花成のタイミングを決めるのに重要な役割を果たしている（Corbesier and Coupland, 2005; Corbesier and Coupland, 2006; Imaizumi and Kay, 2006; Simpson and Dean, 2002; Zeevaart, 2006）。植物の花成が日長により制御されることは1923年にはじめて Garner と Allard により報告された。彼らは、植物が周囲の日長条件を正確に知覚して花成の誘導の有無を決定していることを、タバコの変異株 Maryland Mammoth を用いた解析から明らかにした。一般的にタバコの野生株は夏の間に花をつけることが知られていたが、この Maryland Mammoth 変異株は、夏の間には花をつけず生長し冬の自然日長条件下に花をつける。彼らは、夏に人工的な短日条件をつくりそこでこの Maryland Mammoth を育成し、Maryland Mammoth が夏においても短日条件におくと花をつけることを確認した。この結果から、

彼らは Maryland Mammoth が花を咲かせる時期を決める要因は日長であると結論づけ、植物が日長を認識できることを確認した。その後、多くの植物生理学者が植物の日長応答に関する研究を行い、植物が示す日長への花成反応を基に多くの植物を短日、長日、中性植物へと大別した。短日植物は、夜（暗期）の長さがある一定の長さを超えると花成が促進される植物で、イネ、キク、アサガオ、先ほど出てきた Maryland Mammoth が短日植物に分類される。一方長日植物は、昼（明期）の長さがある一定の長さを超えると花成が促進される植物で、シロイヌナズナやドクムギ、ハウレンソウなどが長日植物に分類される。中性植物は、日の長さ（明期、暗期の長さ）にほぼ関係なく決まった時期に花を咲かせる植物のことで、トマト、インゲンマメなどが中性植物に分類される。

さらに 1934 年には Knott がハウレンソウを用いて、植物が日長を知覚する部位が葉であることを示した。長日植物であるハウレンソウの葉のみを長日条件下に置いたところ、そのハウレンソウは速やかに花成が誘導された。一方、茎頂分裂組織のみを長日条件に置いたところそのハウレンソウの花成は促進されなかった。このことは、植物が花成を誘導する日長条件であるかどうかを判断するのは葉であることと、適当な日長条件で花成が促進されるためには葉で受け取った日長の情報が何らかの形で茎頂へと伝わっていることを示している。

1936 年にロシアの科学者 Chailakhyan は、短日植物であるキクを用いて、Knott と同様の結果を得た。彼は花成を誘導する日長条件下に置かれた植物の葉で作られ、茎頂分裂組織において花芽の形成を誘導す

る基質もしくは刺激を、植物に対して普遍的に作用し唯一で特殊なものであるとし、フロリゲンと名づけた。

日長への花成応答およびフロリゲンの実体を明らかにするために、日長により花成が制御される植物を用いて様々な生理学的な実験が行われた。特に接木実験は花成を誘導する日長条件下に置かれた植物の葉が花成誘導のシグナルを作っていることを明確に証明する実験である。1985年に Zeevaart らは短日植物であるシソの葉を用いて接木実験を行い、花成誘導のシグナルが葉で作られることを強く示唆する結果を得た。彼らは短日条件に置かれたシソの葉を長日条件に置かれたシソの台木に接ぎ、台木において花成が誘導されることを示し、フロリゲンが葉で作られることを示した。この実験の結果はまたフロリゲンが接木処理をした組織を超えることが可能であることも示している。タバコには先ほど例に挙げた Maryland Mammoth とは異なり長日条件により花成が誘導される品種 *Nicotiana sylvestris* が存在する。この品種に短日植物に分類される Maryland Mammoth を接ぎ、長日条件においたところ Maryland Mammoth の花成が誘導された。このことは、長日植物と短日植物と異なる日長応答性を示す植物において花成を誘導する物質が同一であることを示している。

1968年 King らおよび 1973年 King および Zeevaart により植物体におけるフロリゲンの動きのパターンとその速度が調べられ、その結果光合成同化産物が示すそれと非常に似通っていることが明らかとなった。このことは花成誘導のシグナルが篩管を通じて移動している可能性が高いことを示している。

現在までに植物生理学者により行われた生理学的な解析の結果からフロリゲンが持つ特徴および性質を以下に示すと 植物の花成が誘導される日長条件下の葉において作られる。植物の花成を誘導することが可能である。接木間を移動できる。長日植物と短日植物において共通である。篩管を通じて移動していると考えられる。茎頂分裂組織にシグナルとして伝わるができる。となる (Corbesier and Coupland, 2005; Corbesier and Coupland, 2006; Zeevaart, 2006, 瀧本, 1998) (表 1、図 1)。

このようにその特徴および性質が示され、長年その存在が強く示唆されていたにも関わらず生理学的および生化学的な解析からはフロリゲンの実体を明らかにすることはできなかった。近年、長日植物のモデル植物であるシロイヌナズナおよび短日植物のモデル植物であるイネを用いた分子遺伝学的な研究の急速な発展により日長により植物の花成が誘導される分子機構が明らかにされてきた。シロイヌナズナにおいて花成を調節する主な反応経路としては、日長（光周性）、春化、ジベレリン、自律経路の四つが知られている。そのうちシロイヌナズナの光周性花成経路において機能する遺伝子としては主に *GIGANTEA* (*GI*)、*CONSTANS* (*CO*)、*FLOWERING LOCUS T* (*FT*) が報告されており、このなかで日長（光周性）による花成の制御過程で重要になるのは *CO* と *FT* である。*GI* は核局在タンパク質をコードしており、植物の光周性反応と密接に関係する概日時計を構成もしくはその近傍に位置する遺伝子として知られている (Fowler et al., 1999; Park et al., 1999)。*CO* は、N 末端側に B-box タイプの Zn finger を C 末端

側に CCT と呼ばれる領域を持つタンパク質をコードしており、*CO* 遺伝子の下流に位置する遺伝子の発現を制御する転写因子として機能していると考えられている (Putterill et al., 1995; Robson et al., 2001) 。
CO 遺伝子はシロイヌナズナの維管束で特に強い発現を示すが、茎頂でもわずかに発現している事が確認されている (Takada and Goto, 2003; An et al., 2004) 。花成において *CO* タンパク質の機能が植物のどこで必要とされるかを明らかにするために、*co* 変異体に組織特異的な活性を持つプロモーターを用いて *CO* 遺伝子を発現させたところ、*CO* タンパク質の機能が必要とされるのは茎頂ではなく維管束篩部であることが示唆される結果が得られた (An et al., 2004) 。*FT* 遺伝子は *CO* 遺伝子により発現が正に制御されている遺伝子である。この *FT* の発現制御には *CO* 以外の新たなタンパク質の合成を必要としないことから、*CO* による *FT* の転写制御は直接的な関係であると考えられている (Kobayashi et al., 1999) 。2006 年には *HAP* と呼ばれるタイプの DNA 結合能力を持つ転写因子と *CO* が CCT ドメインを介してタンパク質間相互作用し長日条件下の *FT* の転写を促進していることが明らかとなった (Wenkel et al., 2006) 。*FT* 遺伝子がコードしているタンパク質は、分子量が 20kDa と非常に小さくホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質 (PEBP) とよく似ていることは明らかとなっているが、その詳しい生化学的機能は不明である。(Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Suarez-Lopez et al., 2001; Yanovsky and Kay, 2002) 。この *FT* 遺伝子はシロイヌナズナの花成が促進される長日条件下においてのみ *CO* によって発現が誘導され、花成が抑制される短

日条件ではその発現がほとんど検出されない。*FT* 遺伝子の欠損変異体はシロイヌナズナの花成誘導条件である長日条件においても花成が遅延し、逆に過剰発現体は早咲き表現型を示すことが明らかとなっている (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999)。また、*FT* 遺伝子の花成の促進へ及ぼす効果は、その発現量に依存的である (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999)。*FT* 遺伝子のシロイヌナズナにおける発現部位は、花成に影響しているにもかかわらず葉の維管束のみに限られており、茎頂分裂組織では検出されなかった (Takada and Goto, 2003)。変異体が遅咲き、過剰発現体が早咲き表現型を示すにも関わらず、その発現が茎頂分裂組織で認められず、葉の維管束でのみ発現する *FT* 遺伝子がどのように花成を制御しているのかは最近まで不明であった。2005 年に、この *FT* 遺伝子の過剰発現体を示す早咲き表現型を抑圧する変異体のスクリーニングおよび酵母を用いた *FT* タンパク質とタンパク質間相互作用する遺伝子の探索が行われた結果、*FD* 遺伝子が単離された (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005)。*FD* 遺伝子は、1991 年にすでに花成に影響を及ぼす遺伝子座として報告されていたが、*fd* 変異体を示す遅咲きの表現型が比較的軽微であるためこれまであまり解析されてこなかった (Koornneef et al., 1991)。この遺伝子の発現部位は、茎頂分裂組織に限られており、生育ステージが経つにつれて日長の区別無く発現量が上昇してくる。*FD* 遺伝子は bZIP 型の転写因子をコードしており、細胞内では核に局在していることが明らかとなっている。酵母を用いたタンパク質間相互作用の結果および蛍光タンパク質を用いた解析手法の一つである BiFC

analysisを用いた細胞内での *FT* および *FD* の相互作用解析の結果から、これら二つの遺伝子は核においてタンパク質レベルで相互作用し下流のターゲット遺伝子である *AP1* や *SOC1* などの発現を誘導することで花成を誘導していると考えられている (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005; Searle et al., 2006)。

FD タンパク質が *FT* タンパク質と相互作用する事で花成が促進されることが明らかとなったが、それぞれの遺伝子の発現部位には空間的な隔たりが存在する。シロイヌナズナの花成の誘導条件である長日条件下の葉の維管束で発現する *FT* 遺伝子が、茎頂分裂組織において *FD* タンパク質とタンパク質間相互作用して花成を誘導するためには、*FT* 遺伝子の産物が発現部位である葉の維管束から茎頂分裂組織へと移動していなければならないことを示している。ところで、興味深いことに *FT* 遺伝子の産物が葉から茎頂へと移動し花成を誘導しているのではないかという仮定は、本文前半で示した植物において花成を誘導するフロリゲンがもつ特徴および性質と一致する。このことは、長年謎とされてきたフロリゲンの実体を *FT* 遺伝子がコードしている可能性が高いことを強く示唆している。*FT* 遺伝子がフロリゲンであることを示すには、*FT* 遺伝子の産物が茎頂分裂組織まで移動していることを示す必要がある。この *FT* 遺伝子産物の移動に関しては、シロイヌナズナ以外の植物を用いた解析でいくつか結果が示されている。2006 年に *Brassica napus* の篩管液の Proteome 解析の結果から、篩管液中のタンパク質の中に *Brassica napus* の *FT* の相同遺伝子のタンパク質が含まれることが示された (Giavalisco et al., 2006)。このことは *FT*

タンパク質が篩管液に含まれて篩管を移動している可能性が高い事を示している。また同年にトマトを用いて、*FT* の相同遺伝子の mRNA は接木間を移動しないことが示された。トマトにおいて *FT* 遺伝子と高い相同性を示す *SFT* 遺伝子の欠失変異体はシロイヌナズナの *ft* 変異体同様開花遅延の表現型を示し、35S プロモーターによる恒常的な発現は早咲きの表現型を示す。この欠失変異体に *FT* を過剰発現させた形質転換体を接木させたところ、欠失変異体の遅咲き表現型が回復した (Lifschitz et al., 2006)。このとき接木間の *FT* mRNA の移動の有無を確認したところ *FT* mRNA の接木間の移動は確認されなかった。

これまでに示した *FT* 遺伝子とその相同性遺伝子における解析の結果、日長に応じた発現誘導、植物体において葉でのみ発現していること、茎頂分裂組織において機能することなど、植物において *FT* 様遺伝子群が長年謎とされてきたフロリゲンの実体をコードしている可能性が高いことを示している (Corbesier and Coupland, 2005; Corbesier and Coupland, 2006; Zeevaart, 2006)。しかし、*FT* 様遺伝子群がフロリゲンであるという決定的な証拠を示すまでにはいたっていない。なぜならば、現時点において茎頂分裂組織以外の組織で発現させた *FT* 様遺伝子の mRNA もしくはタンパク質が、*FT* タンパク質が実際機能していると思われる茎頂分裂組織において検出された結果が報告されていないからである。

イネはシロイヌナズナとは逆に短日条件で花成が促進されることが知られている。イネの花成時期の品種間差を決定する QTL (quantitative trait loci ; 量的形質遺伝子座) 解析の結果イネの日長による花成制御

に關与すると思われる多数の候補遺伝子座が示された。これらの一つからマップベースクローニングにより同定されたものが *Hd1* 遺伝子である (Yano et al., 2000)。この *Hd1* 遺伝子はシロイヌナズナにおける *CO* 遺伝子とアミノ酸レベルで高い相同性を示す。また 2003 年には同じく QTL 解析から *Hd3a* 遺伝子が同定され、その機能が解析された (Kojima et al., 2002)。*Hd3a* の発現はイネの花成が誘導される短日条件でのみ発現が誘導される (Hayama et al., 2003; Kojima et al., 2002)。またこの遺伝子はシロイヌナズナの *FT* とアミノ酸レベルで非常に高い相同性を示し、その過剰発現体は早咲き表現型を示す (図 2B)。このことは、*Hd3a* 遺伝子が短日植物であるイネの短日条件における花成の促進に機能していることを示している。またイネにおいて *FT* を、シロイヌナズナにおいて *Hd3a* をそれぞれ過剰発現させたところ、どちらの植物体も早咲きの表現型を示した (Kojima et al., 2002)。この結果は、これらの遺伝子の機能が両植物間で高く保存されていることを示しており、短日、長日両植物において花成を誘導する物質が共通であることを示している。さらに同年には早間らによりイネを用いて短日植物と長日植物が示す日長応答性の違いがどのように制御されているのかその分子メカニズムが明らかにされた。長日条件下でシロイヌナズナは *CO* が *FT* の発現を正に制御しているが、イネにおいては *CO* の相同遺伝子 *Hd1* が、イネにおける *FT* 相同遺伝子である *Hd3a* の発現を負に制御しており、このことがイネが長日条件下で花成が抑制される原因であることが示された (Hayama et al., 2003; Yano et al., 2000) (図 2A)。また短日植物の光周性応答の現象として知られている光中

断処理による開花遅延の表現型の分子メカニズムも明らかにされ、暗期の中央における光照射により *Hd3a* の発現が転写のレベルで抑制されることが原因であることも明らかとなっている (Ishikawa et al., 2005)。このようにイネにおいても転写レベルで *Hd3a* の解析が進み、*Hd3a* がイネの花成の分子スイッチであることが示されたが *Hd3a* の植物体における器官組織別の詳細な発現解析や、タンパク質レベルでの解析は報告されておらず、*Hd3a* がどのようにイネの花成を促進しているかは明らかとなっていない。先に述べたように長日植物であるシロイヌナズナの *FT* 遺伝子の解析の結果や他の植物の *FT* 様遺伝子の解析の結果からも、植物において *FT* 様遺伝子がフロリゲンの実体をコードしている可能性が高くなってきており、イネにおいても *FT* 様遺伝子である *Hd3a* 遺伝子のより詳細な機能解析を行うことが重要となってきた。そこで本研究ではイネにおける *Hd3a* の発現調節からタンパク質の挙動を含めた機能解析を行うことで、*Hd3a* 遺伝子が長年謎とされてきたフロリゲンの実体をコードしているかどうかを検証した。

材料および方法

1. 材料および生育条件

1-1 植物材料

イネ (*Oryza sativa* L.) 農林 8 号 (N-8) を野生型として使用した。
Hd3a プロモーター (以下 *Hd3a* と表記): *Hd3a::GFP*、*Hd3a::GUS*、*rolC*
プロモーター (以下 *rolC* と表記): *Hd3a::GFP*、*rolC::GFP*、*rolC::Kaede*、
RPP16 プロモーター (以下 *RPP16* と表記): *Hd3a::GFP*、*RPP16::GFP*、
RPP16::Kaede コンストラクトを導入した形質転換体を解析に用いた。
これらのコンストラクトの作製に用いたプライマーを表 2 に示した。
形質転換体については、農林 8 号に図 3 のコンストラクトをそれぞれ
アグロバクテリウム感染法により導入することで得た (Hiei et al.,
1994)。

1-2. 生育条件

今回用いた植物体は実験の目的に応じて、湿度 70 %、明期 30 8
時間、暗期 25 16 時間の短日条件および湿度 70 %、明期 30 16
時間、暗期 25 8 時間に設定した人工気象機で生育した。光は白色
蛍光灯 (400 to 700 nm, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) を用いた。 T_0 世代の開花は SD
条件処理開始日から開花日までの日数を計測した。開花日は第 1 穎果
が止葉の葉耳から観察された日とした。また光中断の処理には
Ishikawa らが行った光中断の実験と同様の方法を用いた (Ishikawa et al.,

2005)。

1-3. 培養細胞

イネ Oc 細胞は 100 ml 三角フラスコに 20 ml の R2S 液体培地を入れ、培養室のロータリーシェーカー（Innova2300；サイエンティフィック・サープラス）を用いて振とう培養し、一週間毎に培地を交換し継代した。R2S の組成は、2002 年玉置の修士論文によった(玉置, 2002)。

2. 方法

2-1. RNA の抽出

植物体からの RNA 抽出には GTC 法（玉置, 2002）および RNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）、RNAeasy（TaKaRa）を用いた。イネの葉身、葉鞘、基部、根、茎頂分裂組織をそれぞれ、指定の時間ごとに採取し 2ml の凍結チューブに保存した。採取したサンプルをマルチビーズショッカーを用いて粉末上に粉碎し、以下それぞれの RNA 抽出の手法に準じて RNA を抽出した。

cDNA へのゲノム DNA の混入を防ぐために、DNaseI Amplification Grade（Invitrogen）を用いて DNA を消化した。

2-2. RT-PCR

DNaseI処理したトータルRNA 1 µgを用いて Super ScriptTM II RNase H⁻ Reverse Transcriptase（Invitrogen）と Oligo dTプライマー（dT21）

を用いた。

2-3. 発現解析

逆転写反応によって得られた cDNA をテンプレートに PCR を行った。
用いたプライマーセットは表 2 に示した。

2-4. リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現解析

解析した遺伝子の発現量を正確に定量比較するためにリアルタイム PCR に用いるプライマーにより増幅された各断片を連結し一つの断片に作製した (*Ubq*, *Hd3a*, *GFP*)。この断片を検量線のテンプレートとなるプラスミドに TA クローニングによりサブクローニングし、得られたプラスミドをシークエンスし、塩基配列をチェックした。このベクターを含んだ溶液を 100 pg / μ l に調整し、それを基に希釈系列を作製し、リアルタイム PCR に検量線作製のために用いた。リアルタイム PCR に用いたプライマーセットは表 3 に示した。

リアルタイム PCR の反応は ABI PRISM 7700 (Applied Biosystem Japan) を用いて行った。PCR 増幅産物の定量は SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem Japan) を用いて行った。使用方法はキットに付属のプロトコールに準じた。逆転写反応により得られた cDNA をテンプレートに解析を行った。

2-5. 一過的発現解析

イネ Oc 細胞を用いて一過的発現解析を行った。用いたコンストラ

クトを図 4 に示す。プロトプラストの回収およびエレクトロポレーション処理、処理後の解析に関しては玉置の修士論文（2002）および神田の修士論文（2004）に記してあるものに準じた（玉置，2002；神田，2004）。コンストラクトの詳細に関しては玉置の修士論文（2002）および神田の修士論文（2004）に記してあるものに準じた（玉置，2002；神田，2004）。

2-6. 組織化学染色

Hd3a::GUS コンストラクトを導入した植物体を用いて行った。手法は Moritoh et al.（2005）に記載された方法に準じたパラフィン切片作製のため、染色後脱水および置換処理を行いパラプラスチックに包埋し ULTRACUT UCT ウルトラミクロトーム（Laica）で 10 μm の切片を作製し、明視野顕微鏡を用いて観察した（Moritoh et al., 2005）。

2-7. 蛍光観察

2-7-1. 観察試料の準備

蛍光顕微鏡で観察する試料は、すべて生きた試料を適切な濃度のアガロースゲルに包埋し、ビブラトームを用いて 50 μm の厚さの切片を作製した。作製した切片を乾燥しないように蒸留水を加えプレパラートを作製し観察に用いた。

2-7-2 蛍光顕微鏡

蛍光タンパク質（*GFP* および *Kaede*）を含んだコンストラクトを導入した形質転換体の蛍光タンパク質の観察のために共焦点レーザー顕微鏡 LSM510META を用いた。用いたレンズは、対物レンズ x10、x20、x40、x63w を用いた。488 nm アルゴンレーザーで励起し、505 nm-550 nm の波長領域を蛍光タンパク質が発する蛍光として取得した。また、白黒画像の取得も同時に行った。

2-8. 植物体からのタンパク質抽出

植物体の葉身 300 mg を液体窒素で満たした乳鉢で十分に粉碎し、1 ml の TE 溶液に移し、十分に懸濁した後、PMSF を 2.5 μ l 加え、その後 5000 rpm、4 、15 分で遠心し上清を可溶性画分とした。タンパク質の濃度を測定したのち、ストラタクリーンにより濃縮した。

濃縮処理後、回収した可溶性画分を SDS-PAGE で分離し PVDF メンブレンにブロッティングしてウエスタン解析を行った。1 次抗体には 500 倍に希釈した抗 *GFP* 抗体（Roche）を、二次抗体には 5000 倍に希釈した抗マウス抗体を用いた。ECLPlus（GE）を反応させたのち、LAS1000（FUJI）により感光させ画像を取得した。

結果

1. *Hd3a* の器官組織別発現解析

Hd3a は 10 日間短日処理された地上部で発現している(Kojima et al., 2002)ことや、短日条件下の葉身で発現している(Ishikawa et al., 2005)ことが示されているが、イネの植物体における器官組織別の詳細な発現部位の解析は行われていない。そこで、*Hd3a* の詳細な組織別の発現解析を行った。植物体は農林 8 号を用い播種後 30 日間長日条件で育成した後、短日条件で 10 日間処理し明期開始時を ZT0 として ZT0-4 の間にサンプリングを行った(図 5A)。サンプリングを行った器官組織は、葉身、葉鞘、基部、茎頂分裂組織、根である。これらのサンプルから RNA を抽出し *Hd3a* mRNA をリアルタイム RT-PCR を用いて検出した。その結果、*Hd3a* mRNA は葉身で高い発現量を示し、葉鞘においても発現が検出された。その他の部位特に茎頂分裂組織ではほとんど検出されなかった(図 5B, C)。今回得られたこの結果は *Hd3a* mRNA の発現部位が長日条件下のシロイヌナズナの *FT* mRNA の発現パターンの報告と同じく葉特異的であり(Wigge et al., 2005)、*Hd3a* は *FT* と機能だけでなく植物体における発現部位もまた高く保存されている可能性が高いことを示している。このことは短日植物、長日植物の違いだけでなく、単子葉植物、双子葉植物という違いを超えて、*FT* 様遺伝子の発現部位やその機能がイネとシロイヌナズナの間で高く保存されていることを示している。

Hd3a の過剰発現体が早咲き表現型を示すことや、光中断による

Hd3a の転写抑制が開花の遅延を引き起こすことから、野生型の葉においてのみ発現する *Hd3a* の発現がイネの開花に影響を与えている要素の一つである可能性が非常に高い(Ishikawa et al., 2005; Kojima et al., 2002)。このことは、葉身でのみ発現する *Hd3a* の転写もしくは翻訳産物が何らかの形で茎頂分裂組織へとシグナルとして伝わって花成を誘導して可能性があることを示している。今回の解析ではイネ *Hd3a* mRNA の蓄積がピークとなる明期開始時から 4 時間にわたってサンプリングしたにもかかわらず、葉以外では *Hd3a* mRNA が検出されなかった(図 5)。

2. 一過的発現解析

より詳細な発現部位の解析のために *Hd3a::GUS* コンストラクトを導入した形質転換体の作出を目指した。そこで、まず今回の解析に用いる *Hd3a* のプロモーター領域が、内在 *Hd3a* 遺伝子と同様の制御を受けるかどうかを確認するために、イネ Oc 細胞を利用した一過的発現解析を行った。*Hd3a* はシロイヌナズナ花成促進遺伝子 *FT* のイネにおける相同遺伝子であり、*Hd1* は *CO* のイネにおける相同遺伝子である(Kojima et al., 2002; Yano et al., 2000)。イネにおいては、*OsGI* の過剰発現体において *Hd1* mRNA の発現量上昇および *Hd3a* mRNA の発現量低下が見られ、短日条件においても花成の遅延が観察されている(Hayama et al., 2003)。このことは、シロイヌナズナにおいて観察される *GI* 過剰発現体とは逆の表現型である(Fowler et al., 1999)。シロイヌナズナにおいて *GI* 過剰発現体が早咲き表現型を示す主な原

因は *CO* mRNA の発現量が増加することが原因であることが明らかにされているが、*OsGI* 過剰発現体において *Hd1* の発現量が上昇していることから、イネにおいては *Hd1* が *Hd3a* の発現を負に制御している可能性が考えられる。実際、*Hd1* の機能欠質株は自然日長条件下において花成が促進されることから、*Hd1* が花成において抑制的に働く機能を持つことが考えられる (Yano et al., 2000)。以上のように、過剰発現体および欠失変異体の解析の結果から遺伝学的に *Hd1* による *Hd3a* の発現制御の機構があることが示されているので、イネのプロトプラストを用いて一過的発現解析を行うことで、*Hd1* の転写翻訳産物による *Hd3a* のプロモーターを介した転写制御の観察およびその制御は正負どちらになるかを明らかにできると考えた。

実験には、*Hd3a* プロモーターの下流に *GUS* を連結したコンストラクト (以下 *Hd3a::GUS-t* と記す) および、*35S* プロモーターの下流に同じく *GUS* を連結したコンストラクト (以下 *35S::GUS* と記す) をレポーターとして用い、イネ *Ubq* プロモーターの下流に *Hd1* cDNA を連結したコンストラクト (以下 *Ubq::Hd1* と記す) およびピアラホス耐性遺伝子 (*Bar.*) をつなげたコンストラクト (以下 *Ubq::Bar* と記す) をエフェクターとして用いた。これらのコンストラクトをイネ *Oc* 細胞由来のプロトプラストにエレクトロポレーション法により導入し、一過的発現解析を行った。なお内在のコントロールとして全ての処理区に *Ubq::Luc* コンストラクトを同時に処理した。

レポーターに *35S::GUS* を用いた場合 *Ubq::Hd1*、*Ubq::Bar* どちらをエフェクターに用いた処理区においても、*GUS* 活性に有意差は見られ

なかった(図 6A)。一方レポーターに *Hd3a::GUS-t* を用いた場合は、エフェクターに *Ubq::Bar* を用いた処理区にくらべ *Ubq::Hd1* をエフェクターに用いた処理区で、*GUS* 活性が約 1/3 程度低下していた(図 6B)。今回の解析の結果得られた結果は、*Hd1* cDNA のプロトプラスト内における転写産物もしくは翻訳産物が何らかの形で *Hd3a* プロモーターに特異的に作用し、その活性を低下させたために生じた可能性が高いことを示している。レポーターに 35S プロモーターを用いた場合は、有意な差が観察されなかったことから、*Hd1* による *Hd3a* の特異的な制御の存在が示唆される。またこのプロトプラストを用いて示された結果は、*OsGI* 過剰発現体で観察される *Hd3a* mRNA の発現量の低下が、*Hd1* の発現量が上昇することにより、*Hd3a* の転写量が抑制されたことが原因である可能性が高いことを示している (Hayama et al., 2003)。

3. 組織化学染色

Hd3a の発現部位を確認するために一過的発現解析で用いたものと同じの *Hd3a* プロモーターを用い、その下流に *GUS* 遺伝子をつなげた形質転換用コンストラクト(以下 *Hd3a::GUS* と記す)を作製し、それを導入した形質転換体植物を作製し以後の解析に用いた。

まず、導入した *Hd3a::GUS* の *GUS* 遺伝子が *Hd3a* プロモーターの制御下にあるかを確認するために、短日、長日、光中断のそれぞれの条件下での形質転換体の内在の *Hd3a* mRNA の発現の日周変動および *GUS* 遺伝子の発現の日周変動を確認した。その結果、*Hd3a* プロモ-

ターの下流に連結された *GUS* 遺伝子はどの日長条件下においても内在の *Hd3a* mRNA の発現パターンとほぼ同様の発現パターンを示した (図 7, 8)。特に内在の *Hd3a* mRNA の発現は連続短日条件下で育成した後、暗期に一度の光中断の処理をした翌日の明期開始時においてその発現の抑制が観察されるが、今回解析に用いた *Hd3a::GUS* の *GUS* 遺伝子の発現においても同様の結果が得られた (Ishikawa et al., 2005)。

Hd3a::GUS 形質転換体の短日条件下における開花日を評価したところ、野生型とほぼ同じ日数を開花までに要した (data not shown)。これらの植物体を用いて X-Gluc による組織化学染色を行った。その結果 *GUS* 遺伝子は維管束で発現している結果が得られた (図 9)。この結果はシロイヌナズナの *FT* 遺伝子のプロモーター解析の結果と同じである (Takada and Goto, 2003)。一方茎頂分裂組織およびその周辺においては、*Hd3a* mRNA の結果と同様組織化学染色によって *GUS* 遺伝子の発現を確認することができなかった (図 9)。この結果もまたシロイヌナズナの *FT* 遺伝子のプロモーター解析の結果と同じである (Takada and Goto, 2003)。これらのことから、*Hd3a* mRNA の発現は葉特異的である可能性が高い事が強く示唆される (図 5B, C)。イネの葉身の維管束において *GUS* 遺伝子が発現している領域をさらに詳しく観察すると *GUS* 遺伝子が篩部組織に特異的に発現していると思われる結果が示された。この組織は篩管と密に連絡していると言われていることから *Hd3a* の転写産物もしくは翻訳産物もまた篩管を通じて茎頂分裂組織を始めさまざまなところに運ばれている可能性は高いと考えられる。

4. *Hd3a:GFP* タンパク質の機能解析

4-1 *Hd3a::Hd3a:GFP* 形質転換体の解析

Hd3a タンパク質の植物内での機能を確認するために *Hd3a* タンパク質の C 末端に *GFP* タンパク質をつなげたキメラタンパク質を、*Hd3a* プロモーターの下流につなげたコンストラクト(以下 *Hd3a::Hd3a:GFP* と記す)を作製した。このコンストラクトを導入した形質転換体を作製し以後の解析に用いた。すでに 2003 年の松尾により *Hd3a* タンパク質の N 末端に *GFP* タンパク質をつなげたコンストラクトを植物体を導入した場合その機能が観察されないことが示されており、本解析では *Hd3a:GFP* のみを解析に用いた(松尾, 2003)。

まず、先ほどの *GUS* 実験と同様に *Hd3a:GFP* が *Hd3a* プロモーターの制御下にあるかどうかを確認するために短日条件における *Hd3a:GFP* の発現の日週変動および内在の *Hd3a* mRNA の発現を確認した。その結果 *Hd3a:GFP* および *Hd3a* どちらの mRNA とともにほぼ同様の発現パターンが得られた(図 10)。

この形質転換体の短日条件における開花日を評価したところ、同様に育成した WT に比べて約 10 日ほど早咲きを示した(図 11)。このことは、導入したコンストラクトが機能的であることを示している。しかし、以前報告された *35S::Hd3a* が示す開花の表現型よりも開花日が遅くなっている(Kojima et al., 2002)が、これは、*35S* プロモーターと *Hd3a* プロモーターのプロモーター活性の違いおよび今回の解析では *Hd3a* の C 末端側に *GFP* タンパク質を融合させたためだと思われる。また形質転換体のすべての系統において矮性の表現型を示したが、

これは *FT* の過剰発現体および *Hd3a* の過剰発現体において観察された結果と同じであると考えられる (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Kojima et al., 2002)。

いくつかの系統によっては節間の伸長、分げつ数の増加といった表現型を示した。分げつ数が増加し植物体の草型が野生型と比べて変化する表現型は、トマトの *SFT* の過剰発現体においても観察されていることから (Lifschitz and Eshed, 2006; Lifschitz et al., 2006) *FT* 様遺伝子群の植物体における機能は開花の促進だけでないことを示唆している (Teper-Bamnolker and Samach, 2005)。また観察された穂においては、一次枝梗のみが観察され二次枝梗はほぼすべての形質転換体の系統で観察されなかった(図 11A)。この表現型は、*FT* の過剰発現体が terminal flower の表現型を示すことと同様の結果であると考えられる (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999)。

次にこの形質転換体を用いて *Hd3a:GFP* タンパク質の植物内での局在を解析した。まず茎頂分裂組織に *Hd3a:GFP* タンパク質が局在するかどうかを確認するために、茎頂分裂組織を含んだ縦断切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で *Hd3a:GFP* タンパク質の蛍光を観察した。その結果、*Hd3a:GFP* タンパク質は茎頂分裂組織において観察された(図 12)。また *Hd3a:GFP* タンパク質は茎頂分裂組織だけでなく、その直下に位置する節および節間と呼ばれる組織においても観察された(図 12A-D)。次に植物組織内における *Hd3a:GFP* タンパク質の細胞内局在を観察したところ、茎頂分裂組織周辺においては主に核に局在しており、維管束組織においては、細胞質と核に局在している結果が観察さ

れた（図 13）。2003 年の松尾の報告にも *Hd3a::GFP* タンパク質の細胞内局在が細胞質と核であることがイネプロトプラストを用いた解析の結果から報告されている。

さらに *Hd3a::GFP* タンパク質の局在を茎頂分裂組織近傍の維管束から観察すると *Hd3a::GFP* タンパク質の蛍光は茎頂分裂組織近傍の維管束から茎頂分裂組織へと向かって途切れることなく連続した形で観察された（図 12G, H）。このことは *Hd3a::GFP* タンパク質が茎頂分裂組織近傍の維管束から積み下ろされた後、なんらかの制御を受けながら茎頂分裂組織へと向かって運ばれている可能性が高い事を示している。この茎頂分裂組織への移行に関してはどのような経路で通って移行しているのか、移行のために必要となる *Hd3a* タンパク質と相互作用する因子の探索といった未知の部分が数多く残っており今後の課題である。

4-2 維管束特異的プロモーターを用いた形質転換体の解析

Hd3a が維管束で発現していることが *Hd3a::GUS* 植物体の解析の結果示されたので、*rolC* および *RPP16* といった維管束特異的なプロモーターの下流に *Hd3a::GFP*、*GFP*、*Kaede* といった蛍光タンパク質をつなげたコンストラクトを導入した形質転換体を用いてさらに解析を行った。*rolC* プロモーターは維管束特異的な活性を持つことがすでに明らかとなっているが、イネにおいても同様に特異的な活性を示すかを確認した（Guivarc'H et al., 1996; An et al., 2004）。また *RPP16* プロモーターはイネを用いた解析結果がすでに報告されているが、茎頂分裂組

組織における報告は無いため、今回の解析を行う前にそのプロモーター活性を確認した (Asano et al., 2002)。Kaede タンパク質は、近年使用が報告され始めた光変換の性質を持つタンパク質であるが、その分子量は生体内で四量体を形成するため非常に大きくその分子量は 116kDa となる (Ando et al., 2002; Arimura et al., 2004)。この Kaede タンパク質をそれぞれ、*rolC* および *RPP16* プロモーターの下流につなげたコンストラクトを作製し、それを導入した形質転換体 (以下 *rolC::Kaede*、*RPP16::Kaede* と記す) を用いて解析を行った。維管束組織における蛍光を観察したところどちらの植物体も Kaede タンパク質の蛍光が観察された (図 17I-J, 18I-J)。一方、茎頂分裂組織において蛍光を観察したところ、Kaede タンパク質の蛍光は観察されなかった (図 17G, H, 18G, H)。このことは今回解析に用いた両プロモーターが茎頂分裂組織では活性を持っていないことを示している。次に、これら両プロモーターの下流に *Hd3a::GFP* および *GFP* をつなげたコンストラクトを作製し (以下 *rolC::Hd3a::GFP*、*rolC::GFP*、*RPP16::Hd3a::GFP*、*RPP16::GFP* と記す)、これらのコンストラクトを導入した形質転換体を作製し以後の解析に用いた。

まず、これらの形質転換体の短日条件における開花日を計測したところ、*Hd3a::GFP* を導入した植物体においてのみ早咲きの表現型が観察された (図 14, 15)。このことは、これらの形質転換体においても *Hd3a::GFP* が *Hd3a::Hd3a::GFP* 形質転換体同様、機能的であることを示している。また *GFP* のみを導入した植物体においては出穂日に影響は無かった (図 14, 15)。

次にこれらの形質転換体において *Hd3a::GFP* タンパク質をウエスタン解析で検出した。*rolC::Hd3a::GFP* および *rolC::GFP*、野生型の葉身からそれぞれタンパク質を抽出して抗 GFP 抗体を用いて検出したところ、*rolC::Hd3a::GFP* の抽出液を泳動したレーンでは *Hd3a::GFP* の推測される分子量である 47kDa 付近に、*rolC::GFP* の抽出液を流したレーンでは *GFP* の推測される分子量である 26kDa 付近にシグナルが検出され、WT からの抽出液を流したレーンではシグナルは検出されなかった (図 16)。 *rolC::Hd3a::GFP* 形質転換体の葉身の横断切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、大維管束の篩部周辺において *Hd3a::GFP* タンパク質の蛍光が観察された。これらのことから、*rolC::Hd3a::GFP* において観察される GFP 蛍光は *Hd3a::GFP* タンパク質によるものだと考えられる (図 17A, B)。さらにこの結果から *RPP16::Hd3a::GFP*、*Hd3a::Hd3a::GFP* においても同様のことが言えると考えられ、実際 *RPP16::Hd3a::GFP* においては葉身横断切片の維管束において *Hd3a::GFP* タンパク質の蛍光が観察されている (図 18A, B)。

rolC::Hd3a::GFP および *RPP16::Hd3a::GFP* の植物体の茎頂分裂組織を含む形で縦断切片を作製し、これらの切片における *Hd3a::GFP* タンパク質の局在を観察した。その結果、*rolC::Hd3a::GFP* および *RPP16::Hd3a::GFP* とともに茎頂分裂組織において *Hd3a::GFP* タンパク質の蛍光が観察された (図 17C-F, 18C-F)。この結果から、異なる 3 種類の維管束特異的なプロモーターを用いて行った解析で *Hd3a::GFP* タンパク質の蛍光が茎頂分裂組織において観察されたこととなり、*Hd3a::GFP* タンパク質が発現部位である維管束から茎頂分裂組織へと移動してい

る可能性が高いことが示された。

また *rolC::Hd3a:GFP* および *RPP16::Hd3a:GFP* 形質転換体においてもまた *Hd3a::Hd3a:GFP* 同様、節間の伸長および分げつ数の増加といった表現型が観察された (図 15)。これらの結果からも異なる 3 種類のプロモーターを用いて同様の結果が得られたことから、*Hd3a:GFP* を導入した影響による可能性が高いことを示していると考えられる。

考察

本研究は、イネの開花遺伝子である *Hd3a* の発現調節から転写された mRNA および *Hd3a* タンパク質の植物体における挙動を解析することで、どのように *Hd3a* がイネの花成を誘導しているのかを明らかにすることを目的とした。

今回の一連の研究を通じて得られた結果から *Hd3a* 遺伝子がコードしているタンパク質こそが長年にわたり謎とされてきたフロリゲンの実体である可能性が非常に高いことが示された。

1. 器官組織別発現解析

イネにおいて *Hd3a* mRNA の発現する器官組織を詳細に解析するために、組織別の発現解析をリアルタイム PCR と *Hd3a::GUS* コンストラクトを導入した形質転換体を用いて解析を行った。解析の結果 *Hd3a* mRNA は葉のみで検出され、茎頂分裂組織においてはほとんど検出されなかった（図 5B, C）。プロモーター活性もまた茎頂分裂組織およびその周辺ではまったく観察されなかったことから、*Hd3a* mRNA が茎頂分裂組織において存在している可能性は非常に低いと思われる（図 5B, C, 9C）。この結果と同じ結果がシロイヌナズナにおいても示されており、両植物において *FT* 様遺伝子の機能だけでなく発現部位も高く保存されている可能性が高いことを示している（Wigge et al., 2005）。2005 年に Ishikawa らは短日条件に置かれたイネが光中断処理により *Hd3a* の転写が抑制され、それにより花成が遅延する現象を報告した。この

結果と今回の器官組織別発現解析の結果を照らし合わせると、光中断処理による *Hd3a* の発現抑制が原因である花成遅延の現象は、葉における *Hd3a* の発現が光中断により抑制された結果引き起こされていることを示している。このことは、Knott により示された植物が葉において日長条件を知覚することで花成を制御している結果と一致する。さらにイネにおいても他の植物同様、葉での *Hd3a* の発現がシグナルとして茎頂分裂組織へと伝わり花成を引き起こしていることを示している。これまで提唱されてきたフロリゲンの概念と一致するものであり、イネにおいてもまた *FT* 様遺伝子群がフロリゲンである可能性が高いことを示している (Chailakhyan, 1936)。イネにおける *FT* 様遺伝子群は、現在までに 11 個イネのゲノム中に存在していることが明らかとなっており、そのうち解析が行われているものは、*Hd3a*、*RFT*、*FTL* の三種類のみである (Izawa et al., 2002; Kojima et al., 2002; Ishikawa et al., 2005; Tamaki et al., 2007)。この三種類の *FT* 様遺伝子のうち小宮らは *Hd3a* および *RFT* を RNAi 法で発現を抑制した発現抑制個体を用いて解析を行った。短日条件において *Hd3a* RNAi 個体は開花が遅延し、*Hd3a* および *RFT* の両方を RNAi で発現を抑制した形質転換体では、短日条件で 300 日以上経過しても開花しなかった (小宮, 私信)。このことは、イネにおいて短日条件で花成が誘導されるためには *Hd3a* および *RFT* が必須であることを示している。これらのことから、イネにおいて *FT* 様遺伝子群がフロリゲンの役割を果たしている可能性が高いことを示している。シロイヌナズナにおいて *FT* 遺伝子は茎頂分裂組織において *FD* 遺伝子とタンパク質相互作用し *AP1* 遺伝子の発

現を誘導していることから *Hd3a* 遺伝子も同様な機構でイネの花成を促進している可能性は高いと考えられる。今回の解析の結果は *Hd3a* mRNA が茎頂分裂組織へと運ばれて花成促進に貢献している可能性は非常に低いことを示唆している。

2. 一過的発現解析

イネ Oc 細胞由来のプロトプラストを用いて一過的発現解析を行い *Hd1* による *Hd3a* の転写制御の解析を行った。その結果、*Hd1* を同時に処理した場合のみ、*Hd3a* プロモーターの転写活性が抑制された (図 6B)。このことは、*Hd1* タンパク質が細胞内で *Hd3a* プロモーターの転写活性を何らかの形で抑制する機能を持つことを示している。

CO 遺伝子は転写因子として *FT* 遺伝子の発現を制御していると考えられているが、イネにおける *Hd1* もまた転写因子として働いていると考えられる。実際、*Hd1* タンパク質の細胞内の局在を N 末端 C 末端それぞれに *GFP* タンパク質をつなげたコンストラクトを作製し、イネプロトプラスト内での局在を確認したところ *GFP:Hd1*、*Hd1:GFP* ともに蛍光が核で観察されることから、*Hd1* もまた核に局在し転写因子の一部として機能していると考えられる (data not shown)。今回の解析の結果から *Hd1* の転写活性抑制能は *Hd3a* プロモーターに対してのみ特異的に観察されたことから、今回用いた *Hd3a* のプロモーター領域に *Hd1* タンパク質が特異的に認識し作用するシス配列が含まれていると思われる。しかし今回の解析の結果からは *Hd1* の認識配列は不明のままであり、今後明らかにすべき課題だと思われる。

イネにおいて短日条件下で *Hd3a* が発現するためには *Hd1* の機能が必要であることはすでに示されている (Ishikawa et al., 2005)。*Hd3a::GUS* および *Hd3a::Hd3a:GFP* は短日条件下で *Hd3a::GUS* は短日、長日、光中断処理下においても内在の *Hd3a* mRNA とほぼ同じ発現パターンを示した (図 7, 8, 10)。この結果は、今回の解析で用いたプロモーター領域に、植物体において *Hd3a* の発現が日長条件に応答して正しく制御されるために必要な制御領域が含まれていることを示している。しかし、今回の一過的発現解析では *Hd3a* プロモーターに対する *Hd1* の短日条件下の植物体で観察されるような正の制御効果は観察されなかった。短日条件においても花成の遅延と *Hd1* の発現量の増加が観察される *OsGI* 過剰発現体や野生型に *Hd1* を過剰発現させた植物体の解析の結果と一致する (Hayama et al., 2003; 青木, 2007)。この結果は、*Hd1* による *Hd3a* の発現抑制の機構は細胞内における *Hd1* の発現量もしくはタンパク質の量の増加により引きこされる比較的単純な機構によるものである可能性が高いことを示唆している。一方 *Hd1* による *Hd3a* の発現の正の制御は *PhyB* 光受容体の関与といったより複雑な機構に依存していると思われるが、不明な点が多く今後明らかにすべき課題だと思われる (青木, 2007)。

3. *Hd3a : GFP* タンパク質の機能解析

Hd3a タンパク質の植物における挙動を明らかにするために、*Hd3a:GFP* を 3 種類の異なる維管束特異的な活性を持つプロモーターを用いて *Hd3a:GFP* を植物内で発現させ解析を行った。

茎頂分裂組織において *Hd3a:GFP* タンパク質の蛍光がどのプロモーターを用いた場合でも観察されたことは、*Hd3a:GFP* タンパク質が 3 種類のプロモーターが活性を持つ維管束で発現した後、何らかの方法で茎頂分裂組織へと移行していることを強く示唆している(図 12 , 17, 18)。先に行った *Hd3a* mRNA の発現解析などで *Hd3a* mRNA が植物組織間を移動する可能性が低いと思われることから、イネにおいては *Hd3a:GFP* タンパク質が茎頂分裂組織近傍の維管束から茎頂分裂組織へと移行している可能性が高いと考えられる。このことは、茎頂分裂組織近傍の維管束から茎頂分裂組織まで *Hd3a:GFP* タンパク質の蛍光が途切れることなく連続した形で観察されたことから推測される(図 12G, H , 17E, F , 18E, F)。

今回の解析の結果から *Hd3a* は、短日条件下において葉身維管束組織特異的に発現し、翻訳されタンパク質として維管束内を移動し、茎頂分裂組織近傍の維管束で積み下ろされた後、茎頂分裂組織へと移動し、花成を促進していると推測される。このことは、花成の誘導条件に置かれた植物の葉特異的に作られ、篩部を通じて運ばれ茎頂分裂組織において花成を誘導するフロリゲンの特徴および性質とほとんど一致しており、イネにおいて *Hd3a* タンパク質がこれまでに謎とされてきたフロリゲンの実体である可能性が高いことを強く示唆している (Tamaki et al., 2007)。

4 . *Hd3a* タンパク質はフロリゲンである可能性が高い

Hd3a の機能解析を通じて今回明らかになったことを示すと、

Hd3a は短日条件下で特異的に発現が上昇し、その発現は葉特異的である (Tamaki et al., 2007)。 *Hd3a* を組織特異的に発現させると早咲きの表現型を示す (Kojima et al., 2002; Tamaki et al., 2007)。

接木に関するデータはない。ただ、同時期に発表されたシロイヌナズナの *FT* タンパク質に関する解析の報告から *FT* タンパク質は接木間を移動可能であることが示されている (Corbesier et al., 2007)。

Hd3a と *FT* タンパク質は非常に相同性が高く、機能もまた保存されている (Kojima et al., 2002)。 *Hd3a* は維管束篩部周辺で発現している (Tamaki et al., 2007)。 茎頂分裂組織において *Hd3a:GFP* タンパク質が観察される (Tamaki et al., 2007) (表 4)。これらの結果は、イネにおいて *Hd3a* タンパク質がフロリゲンである可能性が高い事を強く示唆している (Chailakhyan, 1936; Lang, 1965; Zeevaart, 1976)。

以上のことをまとめたモデルを図 19 に示す。イネにおけるフロリゲン *Hd3a* は、短日条件下に置かれたイネの葉身維管束組織で特異的に発現していると思われる。この維管束組織で発現した *Hd3a* mRNA は、タンパク質へと翻訳される。翻訳後 *Hd3a* タンパク質は篩管の光合成同化産物が運ばれるのと同じ流れに乗り茎頂分裂組織近傍まで運ばれた後、維管束組織から積み下ろされる。その後茎頂分裂組織へとなんらかの制御を受けながら運ばれ、茎頂分裂組織において茎頂分裂組織を花芽分裂組織へと相転換させ、花成を促進していると思われる。

5. フロリゲン *Hd3a* タンパク質の植物における機能

まず、*Hd3a* タンパク質の植物における機能の普遍性について考察

する。これまでの解析の結果から *Hd3a* タンパク質は、イネにおいてフロリゲンとして機能している可能性が高いことが示された。この *Hd3a* タンパク質はすでに、長日植物であり双子葉植物であるシロイヌナズナの *FT* タンパク質とアミノ酸レベルで高い相同性を示すことが明らかとなっている。この *Hd3a* をシロイヌナズナにおいて発現させた植物体は *FT* 過剰発現体同様早咲き表現型を示すことがすでに明らかとなっている (Kojima et al., 2002)。この結果からも植物において *FT* / *Hd3a* の機能の普遍性の高さが伺えるが、さらにその普遍性を考察するためにいくつかの例を紹介する。トマトは、開花が日長により影響を受けないことが明らかとなっている中性植物であるがこの植物においても *FT* 遺伝子を導入することで早咲きの表現型を示すことが明らかとなっている (Lifschitz et al., 2006)。また、ヤナギ科に属する樹木であるポプラにおいても *FT* を導入することにより早咲きの表現型を示すことが報告されている (Bohlenius et al., 2006)。短日植物であるキクを用いた解析で、*rolC::Hd3a:GFP* を導入した形質転換体は、早咲き表現型を示した。この早咲きの表現型は、キクの花成が抑制される限界日長以上の長日条件下で育成しても観察された(浅尾ら, 2007)。このことは、キクが花成抑制条件下に置かれていても、*Hd3a:GFP* が植物内で発現していることによって花成のプログラムが進行することを示している。これらの結果から示唆されることは、少なくとも *FT* / *Hd3a* を植物体に導入することにより短日、長日、中性植物の区別なく花成を誘導することが可能であることと、イネ科、アブラナ科、ナス科、キク科、ヤナギ科の 5 つの科において花成の誘導が可能である

ことを示している。さらに、キクの解析においては、長日条件におかれていても *rolC::Hd3a:GFP* の導入により花成誘導が観察された結果が得られた。このことは *FT/Hd3a* 遺伝子が発現することが植物の成長相の転換に対して必要な条件を満たすことを示していると考えられる。

つぎに *Hd3a* タンパク質の移動の可能性であるが、*Brassica napus* の篩管液に *FT* 相同遺伝子のタンパク質が含まれていたことから維管束篩部内を *FT* タンパク質が移動できる可能性が高いことが示されている (Giavalisco et al., 2006)。このことからイネにおいても葉で発現翻訳された *Hd3a* タンパク質は比較的容易に篩部内を移動できるのではないかとと思われる。次に篩部から積み下ろされた *Hd3a* がどのように茎頂分裂組織へと運ばれるかであるが、これに関しては不明な点が非常に多い。イネの篩管液中に含まれるタンパク質が目的地選択的に長距離移行する場合、ほかの篩管液タンパク質との相互作用を介した制御機構の存在が示唆されていることから、*Hd3a* タンパク質の場合も特異的に相互作用し茎頂分裂組織へと選択的に輸送されていると考えられる (Aoki et al., 2005)。しかし現在のところ *Hd3a* タンパク質が篩管液中に含まれるタンパク質と相互作用しているといった解析結果の報告はなく、どのような機構で篩管を移動しているのかは不明である。*Hd3a* タンパク質がどのような分子メカニズムにより輸送されるかについては、維管束を移動するために必要となる相互作用タンパク質の探索や、*Hd3a* タンパク質のアミノ酸配列に変異を入れる処理を行うことにより輸送のために必要なアミノ酸配列を特定するといった手法

によって明らかにしていく必要があると思われる。

今回の解析の結果から *Hd3a:GFP* タンパク質が茎頂分裂組織に局在していることが示された。*Hd3a::Hd3a:GFP* 形質転換体を用いた解析の結果から、茎頂分裂組織において *Hd3a:GFP* タンパク質の蛍光が観察されるか否かと茎頂分裂組織の状態に関連があると推測できるような結果も得られた (図 20)。このことは、*Hd3a:GFP* タンパク質が茎頂分裂組織へと到達しているかいないかが茎頂分裂組織の状態を決める要因である可能性があることを示している。しかし *Hd3a:GFP* タンパク質が単純に茎頂分裂組織に到達したかどうかだけで、茎頂分裂組織において相転換が確実に起きるかといえばそうではない。例えば *Hd3a* の過剰発現体や、*FT* の過剰発現体は早咲き表現型を示すものの、芽生え直後や再生直後に花器官ができるといった過激な表現型は報告されていない (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Kojima et al., 2002)。 *FT* を茎頂分裂組織特異的なプロモーターで発現させた場合も、長日条件下での葉の枚数が WT と変わらないことも報告されている (An et al., 2004)。これらのことは単に導入した遺伝子の発現量により左右されている可能性も考えられるが、栄養生長初期の茎頂分裂組織において *Hd3a* / *FT* が機能の制限を受けている可能性も考えられる。

FT / *Hd3a* の機能を制限する二つのステップを説明するためにはどのようなことが考えられるであろうか。まず、茎頂分裂組織への移行の制限であるが、その可能性の一つに茎頂分裂組織において特異的に発現する *TFL1* の存在が考えられる。*TFL1* はアミノ酸レベルでは *FT*

と非常に高い相同性を示すが、その機能は *FT* とは真逆で花成を抑制する機能を持つ (Bradley et al., 1997)。イネでも *TFL1* と同様の機能を持つ遺伝子 *RCN1*、*RCN2* が同定されて解析されている (Nakagawa et al., 2002)。 *TFL1* と *FT* のタンパク質の構造解析の結果から、これらのタンパク質の構造は非常に類似しており、機能としては拮抗関係にあるのではないかと推測されている (Ahn et al., 2006)。最近 *TFL1* が茎頂分裂組織の細胞質において局在していることがあきらかとなった (Conti and Bradley, 2007)。このことから、維管束から積み下ろされた *FT* / *Hd3a* が茎頂分裂組織へと移行する際に、必要となるタンパク質との相互作用において、細胞内における *TFL1* との拮抗状態が生じ、それが原因で細胞間移行を制限している可能性も考えられる。

つぎに茎頂分裂組織における機能の制限であるが、シロイヌナズナの *FT* と茎頂分裂組織で機能する *FD* は茎頂分裂組織においてその発現量が生長とともに上昇してくることが示されている (Wigge et al., 2005)。このことは、茎頂分裂組織において *FT* / *Hd3a* のパートナーとなるタンパク質が常に存在しているのではないことを示しており、茎頂分裂組織で *FT* を発現させた場合も、過激な表現型を示さない表原型が観察されるのもこのためである可能性も考えられる (Ahn et al., 2006)。2006 年にはイネ科属するトウモロコシ (*Zea mays*) の開花が遅延する変異体 *dlf* の解析の結果、*dlf* 遺伝子がシロイヌナズナの *FD* と同じ b-ZIP 型の転写因子をコードしていること、その発現部位は茎頂分裂組織に限られており、また野生型における *dlf* 遺伝子の発現量も栄養生長から生殖生長へと転換する直前に上昇してくることが明らか

となった (Muszynski et al., 2006)。この現象と同様のことがイネにおいて起きている可能性があるが、ゲノム解析の結果イネに置ける *FD* 遺伝子存在は予測されているだけで詳細な解析は無く、今後解析すべき課題の一つであると思われる。もう一つの可能性としては、茎頂分裂組織における *FT* と *FD* のタンパク質間相互作用を *TFL1* が阻害している可能性である。実際酵母を用いたタンパク質間相互作用解析では、*TFL1* と *FD* が相互作用している結果が示されている。このことは、*FT* と *TFL1* が相互作用するタンパク質パートナー *FD* を取り合う関係にある可能性があることを示している。しかし、*TFL1* と *FD* の酵母を用いた相互作用解析では、相互作用が観察されないとの報告もあり、不明な点が多く残っている (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005)。

イネにおいて *Hd3a::GFP* を維管束特異的に発現させた場合に観察される表現型は花成の促進だけではない。その他観察される表現型としては分げつ数の増加、節間の伸長といった表現型もまた観察された (図 15)。シロイヌナズナにおいても *35S::FT* 過剰発現体では、花成の促進だけでなく、葉のサイズが小さくなったり、カールしたりする表現型が観察され、この表現型の原因は、葉において *SEP3* および *FUL* 遺伝子の発現が上昇していることが原因であることが報告されている (Teper-Bamnolker and Samach, 2005)。またトマトにおいても *SFT* 過剰発現体において側枝や花序の形成のパターンの規則性が失われるといった報告や、ポプラにおいても *FT* の発現により若幼期に影響を与える結果が報告されている (Bohlenius et al., 2006; Lifschitz et al., 2006; Lifschitz and Eshed, 2006)。

これらの結果は、*FT* / *Hd3a* の機能が花成の促進といった茎頂分裂組織の相転換だけでなく他の成長イベントにも影響を与えている可能性が高いことを示している。このことは、フロリゲンが花成の促進だけでなくその他の形態形成にも影響を与えることも可能であるホルモンであることを示唆している。

まとめ

今回の一連の解析を通じてイネにおける開花遺伝子 *Hd3a* はイネの花成が誘導される条件である短日条件下の葉身において発現、翻訳され、タンパク質として茎頂分裂組織まで移行し、花成を誘導している可能性が高いことが示された。この解析の結果はイネ開花遺伝子 *Hd3a* タンパク質が長年謎とされてきたフロリゲンである可能性が高いことを示している（図 19）。今回の解析の結果、*Hd3a* タンパク質がフロリゲンである可能性が高いことが示されたが、考察の後半に上げたようにその機能、性質については花成の促進だけでなく多岐にわたると思われる不明な点が多い。しかし、今回 *Hd3a::Hd3a:GFP* 形質転換体を用いた解析から、茎頂分裂組織における *Hd3a:GFP* タンパク質が非常に明瞭に観察されることから、*Hd3a:GFP* タンパク質のイネに置ける空間的な局在およびその制御を解析するにあたってイネを用いることが非常に有効であることが示された。今後もイネを用いることでいまだ不明な点が多いフロリゲンの機能および性質について明らかにしていきたい。

謝辞

まず、本研究を遂行するに当たり、数々の御指導、御鞭撻を賜りました指導教官の島本 功教授に謹んで感謝申し上げます。また、研究に対する数々のご助言、励ましの言葉を頂きました、川崎努准教授、辻寛之助教、並びに講座の方々に深く感謝申し上げます。また、本研究に関して適切な御指導を賜りました東京大学経塚淳子准教授をはじめ横浜市立大学木原生物学研究所一色正之准教授に深く感謝申し上げます。また、*Hd3a* プロモーターの塩基配列情報を快く提供していただいた農業生物資源研究所矢野昌裕博士に深く感謝申し上げます。また *RPP16* プロモーターを提供していただいた農業生物資源研究所門脇光一博士、*rolC* プロモーターを提供していただいた東京大学内宮博文教授に深く感謝申し上げます。また形質転換体を作製していただいた当研究室の小橋佐和子さん、延原美香さん、玉置優子さん、樹咲子さん、許斐友紀子さんに深く感謝申し上げます。平成 16 年から日本学術振興会特別研究員に採用され、研究奨励金を御支給していただいた日本学術振興会に深く感謝申し上げます。本研究を進めるにあたり直接御指導を賜りました Wong Hann Ling 助教、岩手大学横井修司准教授、農業生物資源研究所井澤毅博士に心から感謝申し上げます。また、本研究に協力していただいた本学修士課程卒業生松尾祥一さんに心から感謝申し上げます。

最後に本大学で研究を行うにあたり、常に私を励ました物心両面で支えていただいた、両親および兄に感謝いたします。

参考文献

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., and Araki, T. (2005).** FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**, 1052-1056.
- Ahn, J.H., Miller, D., Winter, V.J., Banfield, M.J., Lee, J.H., Yoo, S.Y., Henz, S.R., Brady, R.L., and Weigel, D. (2006) .** A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators *FT* and *TFL1*. *EMBO J.* **25**, 605-614.
- An, H., Roussot, C., Suarez-Lopez, P., Corbesier, L., Vincent, C., Pineiro, M., Hepworth, S., Mouradov, A., Justin, S., Turnbull, C., and Coupland, G. (2004) .** CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development* **131**, 3615-3626.
- Ando, R., Hama, H., Yamamoto-Hino, M., Mizuno, H., and Miyawaki, A. (2002) .** An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 12651-12656.
- Aoki, K., Suzui, N., Fujimaki, S., Dohmae, N., Yonekura-Sakakibara, K., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yamaya, T., and Sakakibara, H. (2005) .** Destination-selective long-distance movement of phloem proteins. *Plant Cell* **17**, 1801-1814.
- Arimura, S., Yamamoto, J., Aida, G.P., Nakazono, M., and Tsutsumi, N. (2004) .** Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 7805-7808.
- Asano, T., Kusano, H., Okuda, T., Kubo, N., Shimada, H., and Kadowaki, K. (2002) .** *Rpp16* and *Rpp17*, from a common origin, have different protein characteristics but both genes are predominantly expressed in rice phloem tissues. *Plant Cell Physiol.* **43**, 668-674.
- Bohlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A.M.,**

- Jansson, S., Strauss, S.H., and Nilsson, O.** (2006) . *CO/FT* regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* **312**, 1040-1043.
- Bradley, D., Ratcliffe, O., Vincent, C., Carpenter, R., and Coen, E.** (1997) . Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* **275**, 80-83.
- Chailakhyan, M.K.** (1936) . New facts in support of the hormonal theory of plant development. *C. R. Acad. Sci. URSS* 79-83.
- Conti, L., and Bradley, D.** (2007) . *TERMINAL FLOWER1* is a mobile signal controlling *Arabidopsis* architecture. *Plant Cell* **19**, 767-778.
- Corbesier, L., and Coupland, G.** (2005) . Photoperiodic flowering of *Arabidopsis*: integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. *Plant Cell Environ.* **28**, 54-66.
- Corbesier, L., and Coupland, G.** (2006) . The quest for florigen: a review of recent progress. *J. Exp. Bot.* **57**, 3395-3403.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., and Coupland, G.** (2007) . *FT* protein movement contributes to long-distance signaling in floral Induction of *Arabidopsis*. *Science* **316**, 1030-1033.
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., Coupland, G., and Putterill, J.** (1999) . *GIGANTEA*: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J.* **18**, 4679-4688.
- Giavalisco, P., Kapitza, K., Kolasa, A., Buhtz, A., and Kehr, J.** (2006) . Towards the proteome of *Brassica napus* phloem sap. *Proteomics* **6**, 896-909.

Garner W.W. and Allard H.A. (1923) Further studies on photoperiodism, the response of plants to relative length of day and night. J. Agric. Res. **23**, 871–920.

Guivarc'H, A., Spena, A., Noin, M., Besnard, C., and Chriqui, D.
(1996) . The pleiotropic effects induced by the *rolC* gene in transgenic plants are caused by expression restricted to protophloem and companion cells. Transgenic Res. **5**, 3-11.

Hayama, R., Yokoi, S., Tamaki, S., Yano, M., and Shimamoto, K.
(2003) . Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. Nature **422**, 719-722.

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., and Kumashiro, T. (1994) . Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J. **6**, 271-282.

Imaizumi, T., and Kay, S.A. (2006) . Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. Trends Plant Sci. **11**, 550-558.

Ishikawa, R., Tamaki, S., Yokoi, S., Inagaki, N., Shinomura, T., Takano, M., and Shimamoto, K. (2005). Suppression of the floral activator *Hd3a* is the principal cause of the night break effect in rice. Plant Cell **17**, 3326-3336.

Izawa, T., Oikawa, T., Sugiyama, N., Tanisaka, T., Yano, M., and Shimamoto, K. (2002) . Phytochrome mediates the external light signal to repress *FT* orthologs in photoperiodic flowering of rice. Genes Dev. **16**, 2006-2020.

Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J., and Weigel, D. (1999) . Activation tagging of the floral inducer *FT*. Science **286**, 1962-1965.

King R.W., Evans L.T. and Wardlaw I.F. (1968) Translocation of the floral stimulus in *Pharbitis nil* in relation to that of assimilates. Z. Pflanzenphysiol. **59**, 377–388.

- King R.W. and Zeevaart J.A.D.** (1973) Floral stimulus movement in *Perilla* and flower inhibition caused by noninduced leaves. *Plant Physiol.* **51**, 727–738.
- Knott J.E.** (1934) Effect of a localized photoperiod on spinach. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* **31**, 152–154.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., and Araki, T.** (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **286**, 1960-1962.
- Kojima, S., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Monna, L., Sasaki, T., Araki, T., and Yano, M.** (2002) . *Hd3a*, a rice ortholog of the *Arabidopsis FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1096-1105.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J., and van der Veen, J.H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 57-66.
- Lang, A.** (1965). Physiology of flower initiation. In *Encyclopedia of Plant Physiology* Vol. XV. W. Ruhland, ed., (Berlin: Springer) pp. 1380-1536.
- Lifschitz, E., Eviatar, T., Rozman, A., Shalit, A., Goldshmidt, A., Amsellem, Z., Alvarez, J.P., and Eshed, Y.** (2006) . The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 6398-6403.
- Lifschitz, E., and Eshed, Y.** (2006). Universal florigenic signals triggered by *FT* homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *J. Exp. Bot.* **57**, 3405-3414.
- Moritoh, S., Miki, D., Akiyama, M., Kawahara, M., Izawa, T., Maki, H., and Shimamoto, K.** (2005) . RNAi-mediated silencing of *OsGEN-L* (*OsGEN*-like) , a new member of the *RAD2/XPG* nuclease family, causes male sterility by defect of microspore development in rice. *Plant Cell Physiol.* **46**, 699-715.

- Muszynski, M.G., Dam, T., Li, B., Shirbroun, D.M., Hou, Z., Bruggemann, E., Archibald, R., Ananiev, E.V., and Danilevskaya, O.N.** (2006) . *delayed flowering1* encodes a basic leucine zipper protein that mediates floral inductive signals at the shoot apex in maize. *Plant Physiol.* **142**, 1523-1536.
- Nakagawa, M., Shimamoto, K., and Kyoizuka, J.** (2002). Overexpression of *RCN1* and *RCN2*, rice *TERMINAL FLOWER 1/CENTRORADIALIS* homologs, confers delay of phase transition and altered panicle morphology in rice. *Plant J.* **29**, 743-750.
- Park, D.H., Somers, D.E., Kim, Y.S., Choy, Y.H., Lim, H.K., Soh, M.S., Kim, H.J., Kay, S.A., and Nam, H.G.** (1999) . Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis GIGANTEA* gene. *Science* **285**, 1579-1582.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., and Coupland, G.** (1995) . The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* **80**, 847-857.
- Robson, F., Costa, M.M., Hepworth, S.R., Vizir, I., Pineiro, M., Reeves, P.H., Putterill, J., and Coupland, G.** (2001) . Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant J.* **28**, 619-631.
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Krober, S., Amasino, R.A., and Coupland, G.** (2006) . The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **20**, 898-912.
- Simpson, G.G., and Dean, C.** (2002) . *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science* **296**, 285-289.
- Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., and Coupland, G.** (2001) . *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* **410**, 1116-1120.

- Takada, S., and Goto, K.** (2003). 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.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H.L., Yokoi, S., and Shimamoto, K.** (2007) . *Hd3a* protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* **316**, 1033-1036.
- Teper-Bamnolker, P., and Samach, A.** (2005) . The flowering integrator *FT* regulates *SEPALLATA3* and *FRUITFULL* accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* **17**, 2661-2675.
- Wenkel, S., Turck, F., Singer, K., Gissot, L., Le Gourrierc, J., Samach, A., and Coupland, G.** (2006) . *CONSTANS* and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 2971-2984.
- Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U., and Weigel, D.** (2005) . Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* **309**, 1056-1059.
- Yano, M., Katayose, Y., Ashikari, M., Yamanouchi, U., Monna, L., Fuse, T., Baba, T., Yamamoto, K., Umehara, Y., Nagamura, Y., and Sasaki, T.** (2000) . *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* **12**, 2473-2484.
- Yanovsky, M.J., and Kay, S.A.** (2002) . Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* **419**, 308-312.
- Zeevaart, J.A.D.** (1976) . Physiology of flower formation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **27**, 321-348.
- Zeevaart, J.A.D.** (2006) . Florigen coming of age after 70 years. *Plant Cell* **18**, 1783-1789.

青木真由美 (2007). *Hd3a* の発現制御に関わる *Hd1* の機能解析. 奈良先端科学技術大学院大学修士論文

浅尾浩史、玉置祥二郎、横井修司、前田茂一、仲照史、島本功 (2007). イネ由来開花時期制御遺伝子のキクへの導入. 園芸学研究 6 別冊 1:215

神田寛之 (2005). イネの RNAi における *Dicer* と *RdRP* の機能解析. 奈良先端科学技術大学院大学修士論文

松尾祥一 (2005). イネ花成因子 *Hd3a* の機能と細胞内局在の解析. 奈良先端科学技術大学院大学修士論文

瀧本敦 (1998). 花を咲かせるものは何か. 中央公論社, 東京, 218p.

玉置祥二郎 (2003). イネ *FT* 様遺伝子群の発現調節機構の解析. 奈良先端科学技術大学院大学修士論文

表1. フロリゲンの定義

- ① 植物の花成が誘導される日長条件下の葉において作られる。
- ② 植物の花成を誘導する。
- ③ 接木間を移動できる。
- ④ 長日植物と短日植物において共通である。
- ⑤ 師管を通じて移動する。
- ⑥ 茎頂分裂組織にシグナルとして運ばれる。

Corbesier and Coupland, 2005; Corbesier and
Coupland, 2006; Zeevaart, 2006, 瀧本, 1998 を参
考にして作製

表2. 形質転換体用コンストラクト作成のためのプライマーリスト

Primer	sequence
rolC promoter-F	<u>AAGCTT</u> AAAGTTGGCCCG
rolC promoter-R	GGTACCAACAAAGTAGGAAACAGGT
RPP16 promoter-F	<u>AAGCTT</u> CCAAACCCACCACGGCT
RPP16 promoter-R	<u>GGTACCT</u> CCCCAGCATCCCCCGGCGCC
Hd3a for Hd3a:FP-F	<u>GGTACCCTT</u> CAGGGTTTTTTTGC
Hd3a for Hd3a:FP-R	<u>TCTAGAG</u> GGGGTAGACCCTCCTGCCGC
GFP for Hd3a:GFP-F	<u>TCTAGAG</u> TGAGCAAGGGCGAGGAGCT
GFP for Hd3a:GFP-R	<u>ACTAGTTT</u> ACTTGTACAGCTCGTCC
GFP full length-F	<u>GGTACCAT</u> TGGTGAGCAAGGGCGA
GFP full length-R	<u>ACTAGTTT</u> ACTTGTACAGCTCGTCC
Kaede for Kaede-F	<u>GGTACCAT</u> TGGTGAGTCTGATTAAACC
Kaede for Kaede-R	<u>ACTAGTTT</u> ACTTGACGTTGTCTGGG

※ FR Fluorescence protein(GFP & Kaede)

下線部 : 制限酵素サイト

表3. リアルタイムRT-PCR用のプライマーリスト

Primer	sequence	length
ubq-F	AACCAGCTGAGGCCCAAGA	77 bp
ubq-R	ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA	
Hd3a(FT-L2)-F	GCTCACTATCATCATCCAGCATG	118 bp
Hd3a(FT-L2)-R	CCTTGCTCAGCTATTTAATTGCATAA	
GFP-F	TACGGGGTGCAGTGCTTC	73 bp
GFP-R	CGGGCAYGGCGGACT	

表4. フロリゲンの定義および
今回の解析で明らかになったこと

- ① 植物の花成が誘導される日長条件下の葉において作られる。
→*Hd3a* mRNAは短日条件の葉身でのみ発現する
- ② 植物の花成を誘導する。
→*Hd3a* 過剰発現体は早咲き表現型を示す
- ③ 接木間を移動できる。
→*Hd3a* の相同遺伝子*FT* のタンパク質は接木間を移動できる
- ④ 長日植物と短日植物において共通である。
→短日植物のイネの*Hd3a* と 長日植物のシロイヌナズナの*FT* はアミノ酸レベルで高い相同性を示し、機能もまた保存されている
- ⑤ 師管を通じて移動する。
→*Hd3a* は維管束の師管周辺で発現している
- ⑥ 茎頂分裂組織にシグナルとして運ばれる。
→*Hd3a* タンパク質が茎頂分裂組織で観察された

Corbesier and Coupland, 2005; Corbesier and Coupland, 2006; Zeevaart, 2006, 瀧本, 1998 を参考にして作製

結論

Hd3a タンパク質がイネにおけるフロリゲンである可能性が高い

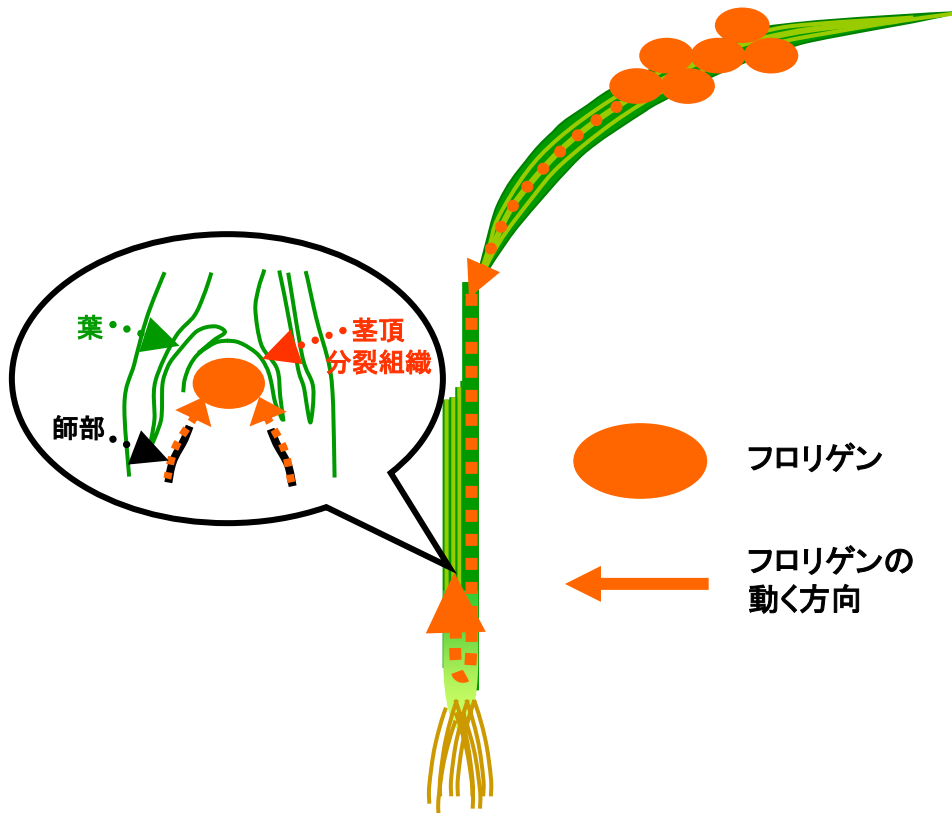


図1. フロリゲンのモデル

植物においてフロリゲンはその植物が花成誘導される日長条件下において葉で作られ、その後茎頂分裂組織へと伝わり花成を誘導する。

シロイヌナズナ
長日植物



B

FT 1: MSIN...I RDPLI VSRVVGDVLD P FNRSI T LKVTYTGQREVTNGLDLRPSQVQNKPRVEI GG: 58
 Hd3a 1: MAGSGRDRDPLVVGGRVVGDVLD A FV RSTNLKVTYTGSKT V SNGCELKPSMVTHQPRVEV GG: 60

FT 59: EDL RNFYTLVMVDPDV P SPSN PHLREYLHWLVTDI PATTGTTFGNEI VCYENPSPTAGI H:118
 Hd3a 61: NDMRT FYTLVMVDPDA P SPSD PNLREYLHWLVTDI PGTTAASFGEV M CYESPRPTMGI H:120

FT 119: RVVFI LFRQLGRQTVYAPGWRQNFNTREFAEI YNLGL PVAAVFY NCQRESGCGGRRLL :175
 Hd3a 121: RL V FVL FQQLGRQTVYAPGWRQNFNTKDFAEL YNLGL SPVAAVFY NCQREAGSGGRRVYP:179

(A) 長日植物シロイヌナズナと短日植物イネにおける光周性花成経路のモデル図 シロイヌナズナは長日条件で花成統合遺伝子 *FT* の発現が誘導され花成が促進され、イネでは短日条件で *Hd3a* の発現が *Hd1* により誘導され長日条件では *Hd1* により抑制される。

(B) *FT* と *Hd3a* のアミノ酸の相同性を比較したもの *FT* と *Hd3a* は非常に高い相同性を示す。

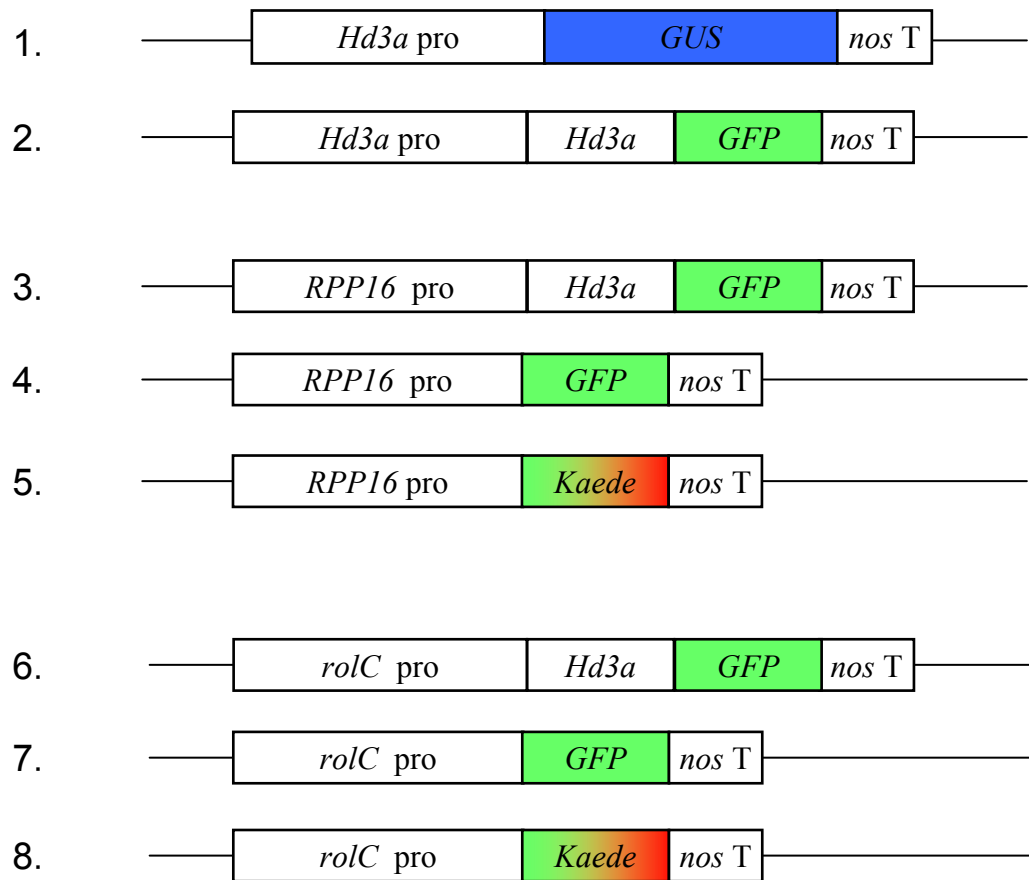
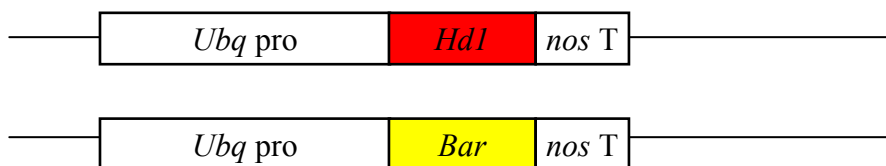


図3. 本解析に使用した形質転換体作製のためのコンストラクトの模式図
Hd3a::GUS は pBI101 をそれ以外は p2K1⁺をもとに作成した。

レポーターコンストラクト



エフェクターコンストラクト

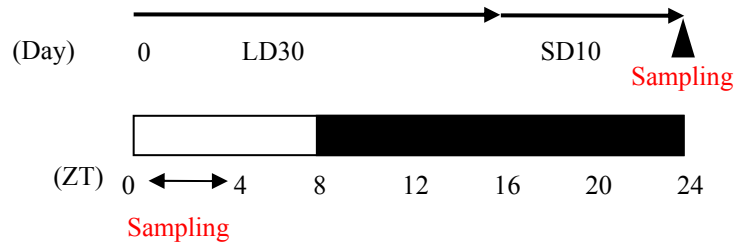


インターナルコントロールコンストラクト

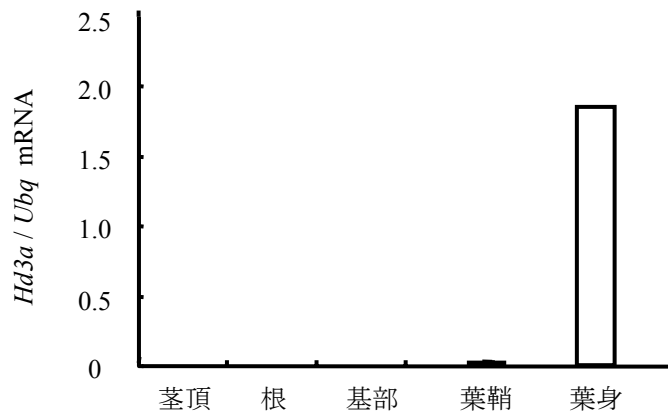


図4. 本解析に使用した一過的発現解析のためのコンストラクトの模式図
エフェクターコンストラクトは pIG221 をそれ以外は pUC19 をもとに作成した。

A



B



C

Hd3a mRNA expression (*Hd3a* / *Ubq*)

	meristem	root	stem	Leaf sheath	Leaf blade
Exp1	0.000110	0.001198	0.000572	0.020595	1.847840
Exp2	0.000032	0.000464	0.000392	0.022141	1.530193

図5. WTにおける *Hd3a* mRNAの組織別発現解析

(A) 今回の解析に用いた植物体の生育条件およびサンプリング時間。明期開始時をZT=0としてZT0-4の間にサンプリングを行った。(B) *Hd3a* mRNAの各組織における発現量を real - time RT - PCR を用いて検出を行った結果をグラフで示した。(C) *Hd3a* mRNAの各組織における 発現量をreal-time RT-PCRを用いて検出を行った結果を表で示したもの。再現性をとるため実験を2回繰り返した。

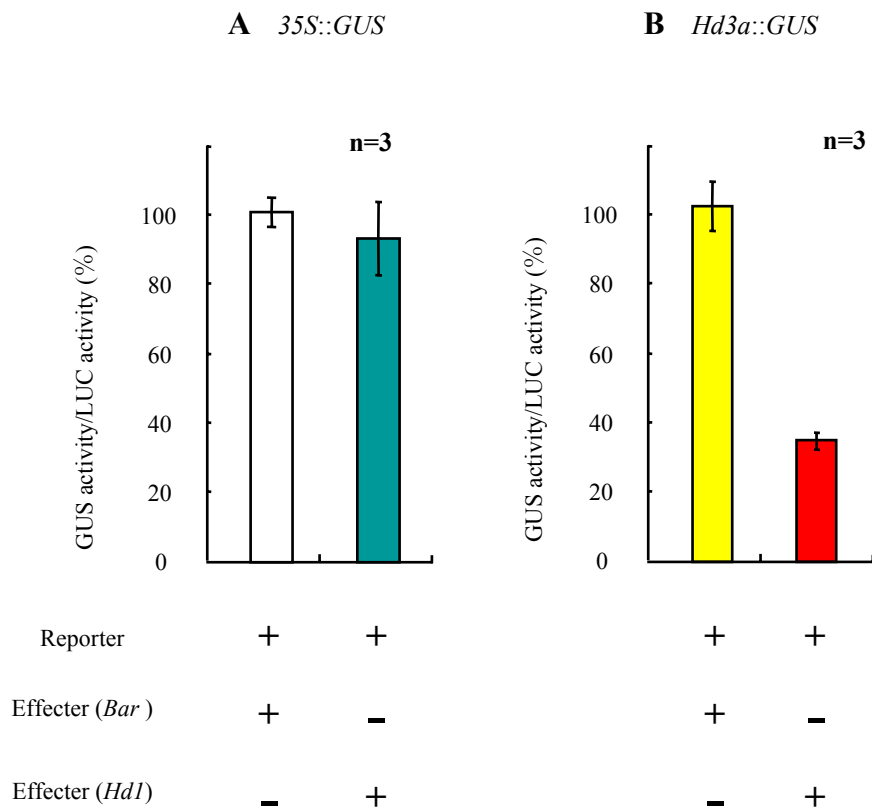


図6. イネプロトプラストを用いた一過的発現解析

(A) レポーター遺伝子に *35S* プロモーターを用いた解析の結果。
 (B) レポーター遺伝子に *Hd3a* プロモーターを用いた解析の結果。
 解析には各処理区とも独立して3回実験を行いその結果の平均および標準偏差を示した。各処理区において用いたエフェクターコンストラクトを+で示している。なお、内在コントロールとしてすべての処理区に *Ubq::Luc* を用いた。

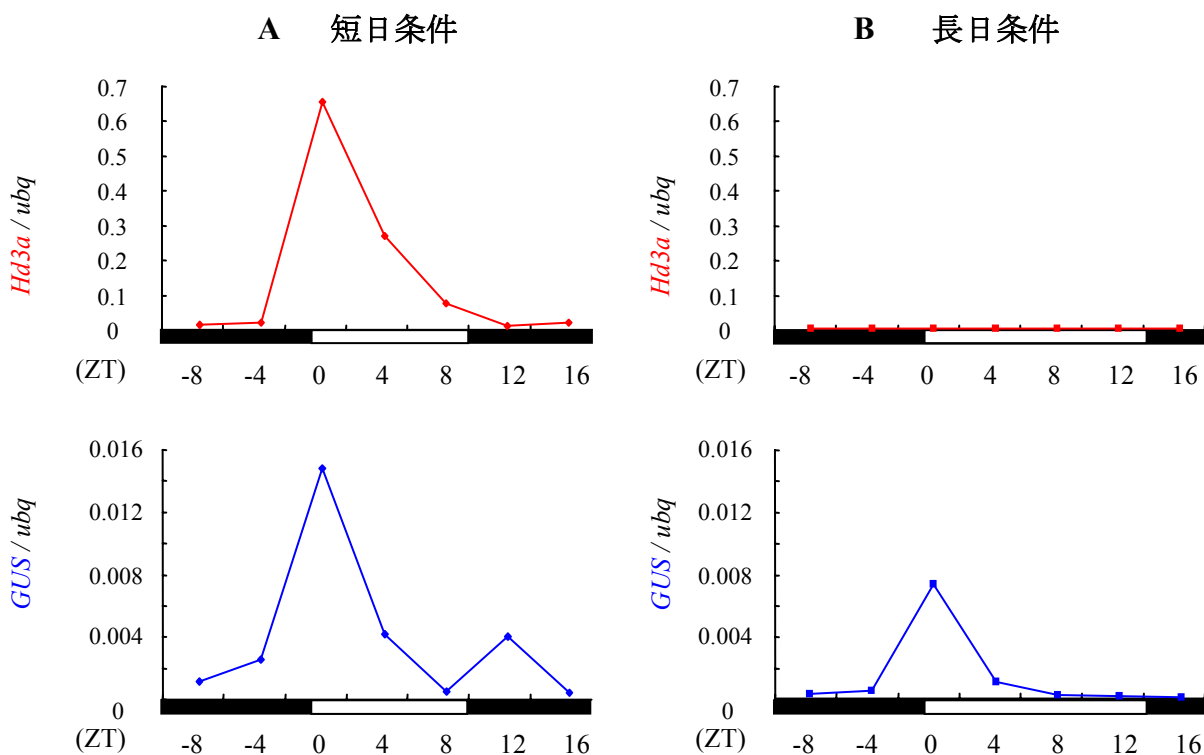


図7. *Hd3a::GUS* 植物体の播種後35日における短日・長日両条件下での *Hd3a* および *GUS* mRNAの発現
 (A) 短日条件下における*Hd3a* および *GUS* mRNAの24時間の発現パターン(B) 長日条件下における *Hd3a* および *GUS* mRNAの24時間の発現パターン。明期開始時をZT=0としている。

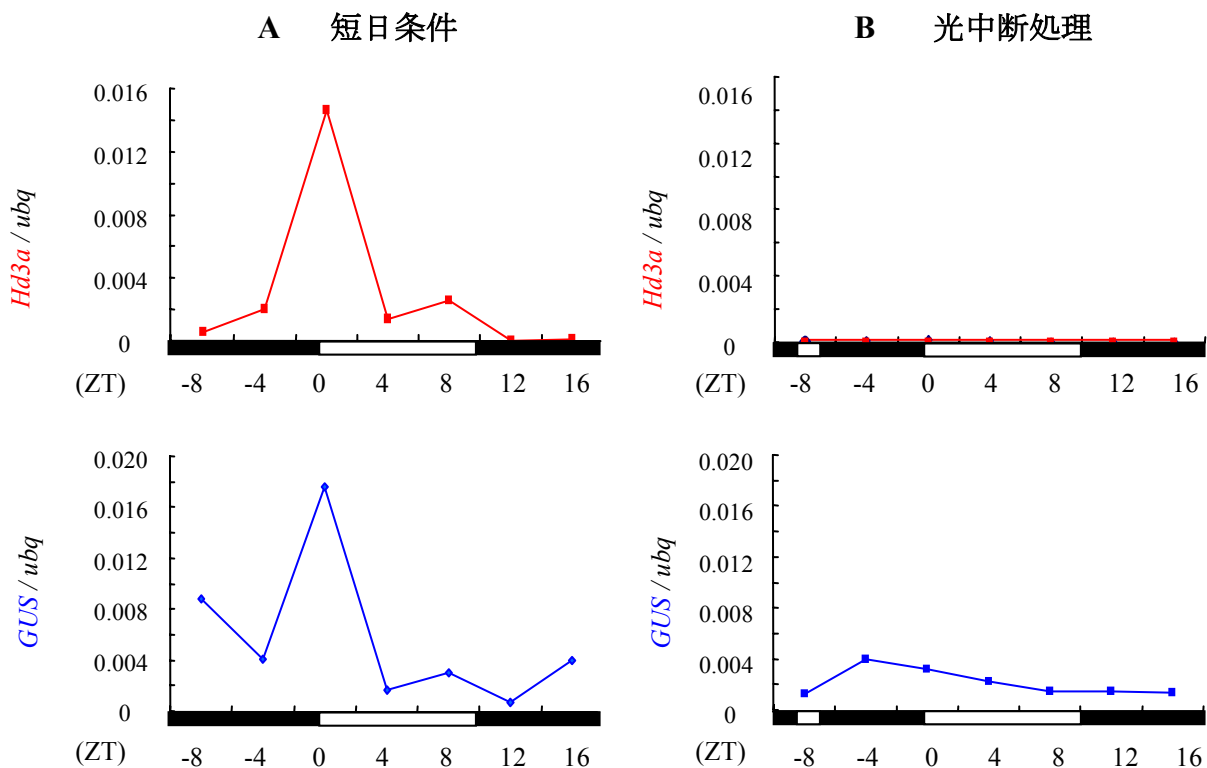
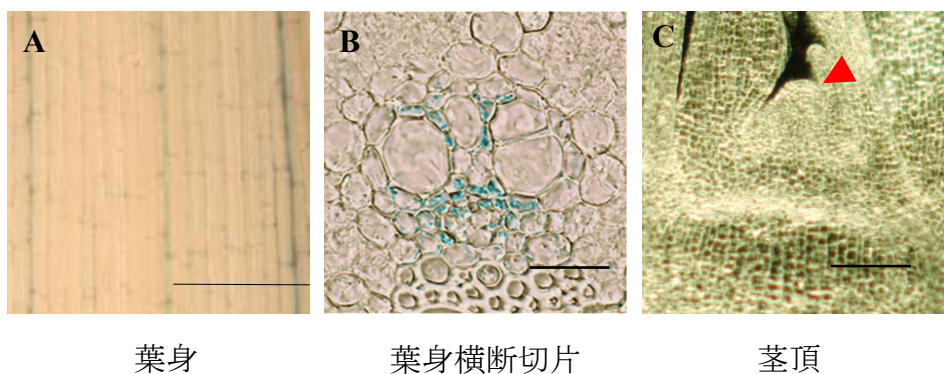


図8. *Hd3a::GUS* 植物体の播種後35日における短日・光中断処理両条件下での *Hd3a* および *GUS* mRNAの発現 (A)は短日条件下における *Hd3a* および *GUS* mRNAの24時間の発現パターンを (B)は光中断処理後における *Hd3a* および *GUS* mRNAの24時間の発現パターンを示している。明期開始時をZT=0としている。光中断処理においてはZT-8に一時間の光中断処理を行った。



arrow head : 茎頂分裂組織

図9. *Hd3a::GUS* 植物体の短日条件下播種後35日における *Hd3a::GUS* の組織化学染色処理の結果 (A) 組織化学染色処理後の葉身 (B) 組織化学染色処理後の葉身横断切片 (C) 組織化学染色処理後の茎頂分裂組織を含んだ縦断切片 各写真の右下のBarは (A) 1 mm、(B) 20 mm、(C) 50 μ m

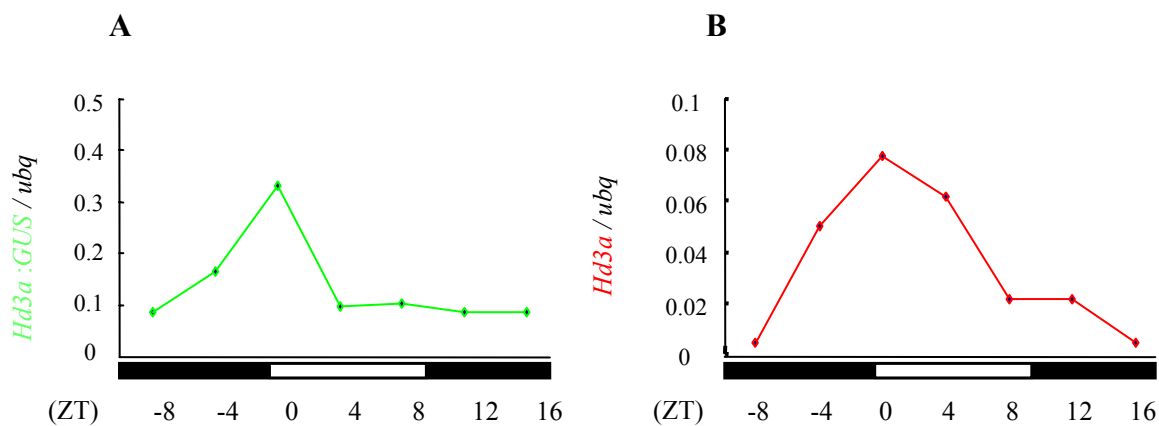


図10. *Hd3a::Hd3a:GFP* 植物体の短日条件下における*Hd3a* および *Hd3a:GFP* mRNAの発現 (A) 短日条件下における *Hd3a* mRNAの24時間の発現パターン (B) *Hd3a:GFP* mRNAの24時間の発現パターン。明期開始時をZT=0としている。

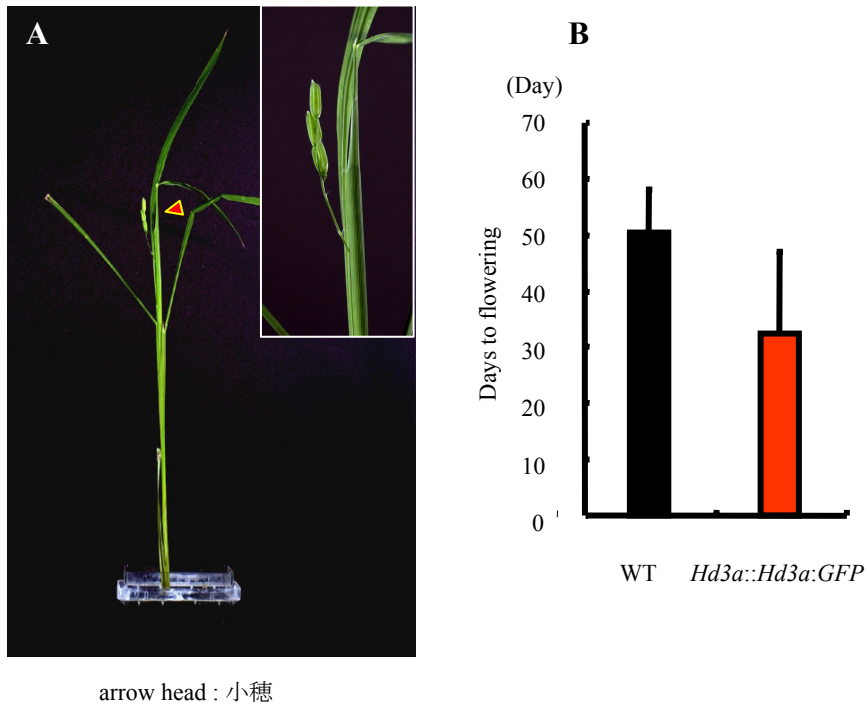


図11. *Hd3a::Hd3a:GFP* 植物体の短日条件下における開花表現型
 (A) 短日条件下における *Hd3a::Hd3a:GFP* の植物体。白い四角で囲った写真は、小穂の拡大写真。(B) 短日条件下におけるWT および *Hd3a::Hd3a:GFP* の開花日を示した。データーはすべてT₀世代のデーターを用いた。

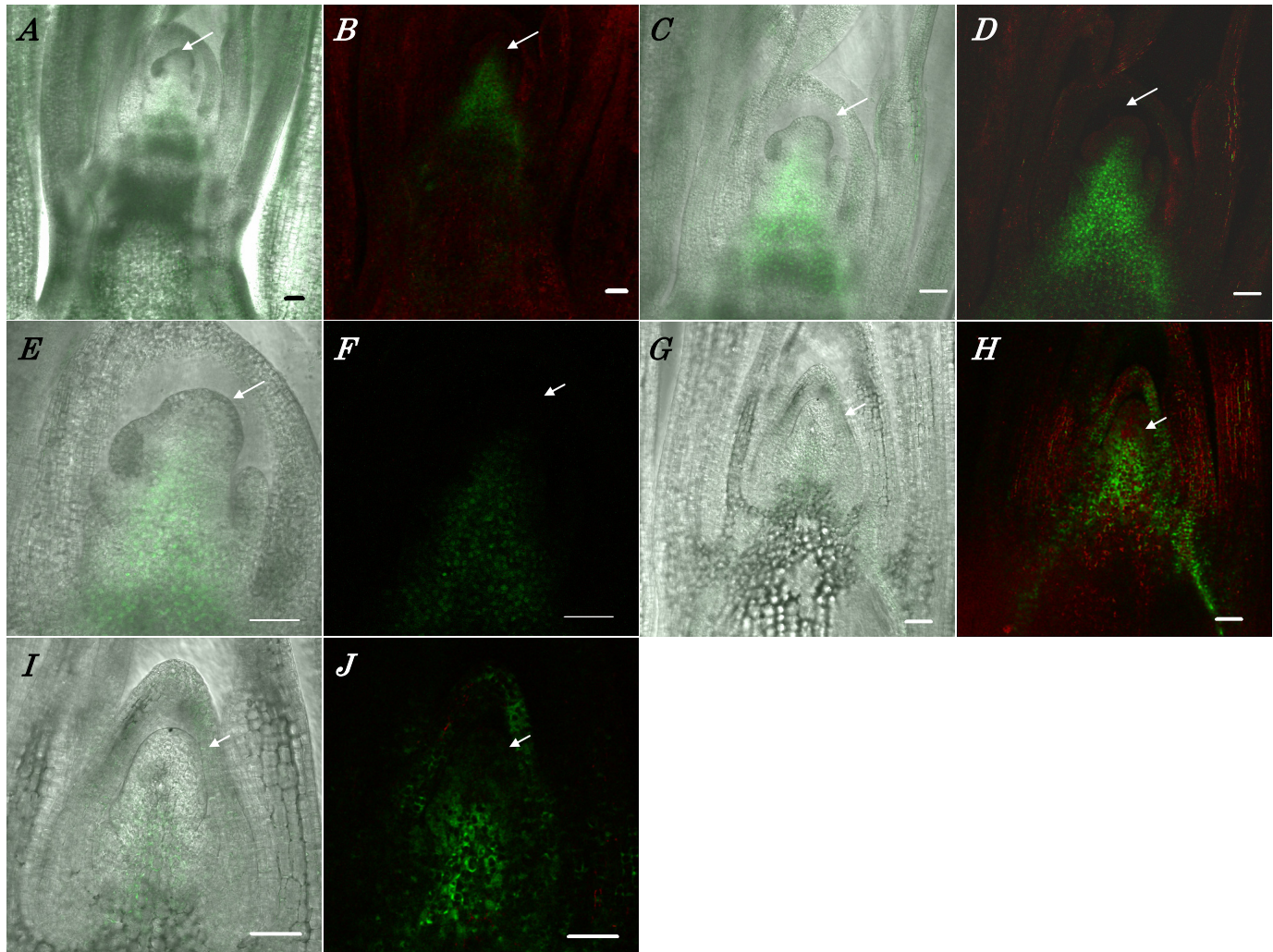
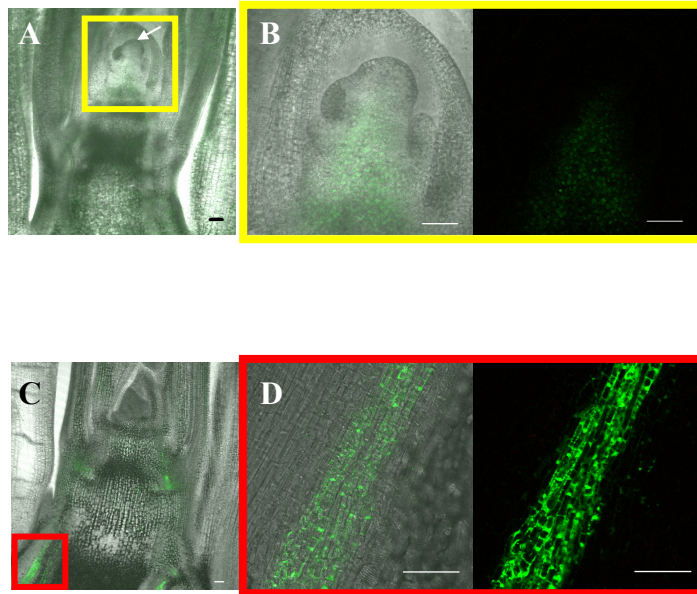


図12. *Hd3a::Hd3a:GFP* 植物体における茎頂分裂組織

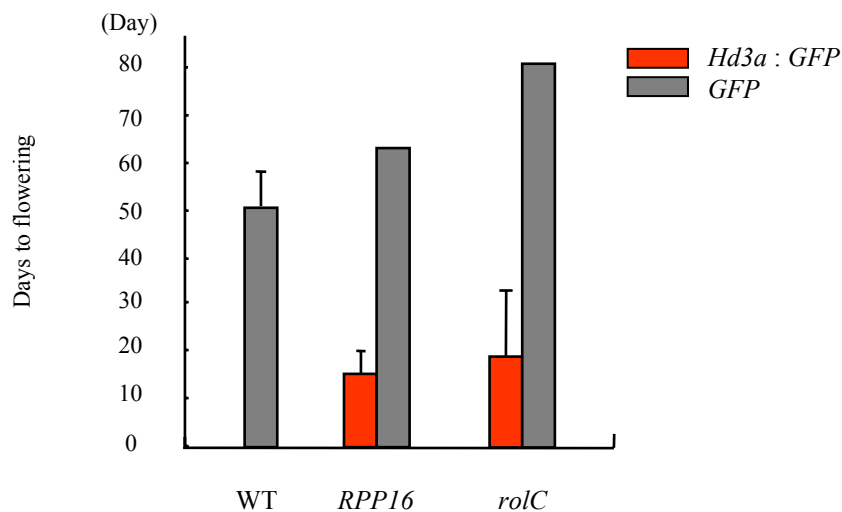
Hd3a::Hd3a:GFP 植物体の茎頂分裂組織を含む縦断切片を蛍光顕微鏡を用いて観察した。(A)、(C)、(E)、(G)、(I) 明視野+GFP (B)、(D)、(F)、(H)、(J) 分光処理画像。GFP 蛍光は緑で、自家蛍光は赤で示している。矢印は茎頂分裂組織を示している。Bar = 50 μ m



arrow : SAM
Bar = 50 μ m

図13. *Hd3a::Hd3a:GFP* 植物体の茎頂分裂組織および維管束組織における*Hd3a:GFP* タンパク質の局在

(A)、(B) 茎頂分裂組織における*Hd3a:GFP* タンパク質の局在 (B) (A)において黄線で囲んだ部分の高倍率画像(C)、(D) 維管束組織における*Hd3a:GFP* タンパク質の局在 (D) (C)において赤線で囲んだ領域の高倍率画像 Bar = 50 μ m



genotype	Days to flowering (days $\pm$ S.E..)	
WT	50.4 $\pm$ 7.6	(n = 5)
<i>RPP16::Hd3a:GFP</i>	14.6 $\pm$ 4.6	(n = 5)
<i>RPP16::GFP</i>	62	(n = 2)
<i>rolC::Hd3a:GFP</i>	19.5 $\pm$ 13.6	(n = 11)
<i>rolC::GFP</i>	82	(n = 2)

図14. *RPP16::Hd3a:GFP*、*RPP16::GFP*、*rolC::Hd3a:GFP*、*rolC::GFP* 植物体の短日条件下における開花表現型

各形質転換体T₀世代を短日条件下で育成し、出穂日を調べた。それぞれの個体における導入遺伝子の有無はRT-PCRにより確認した。

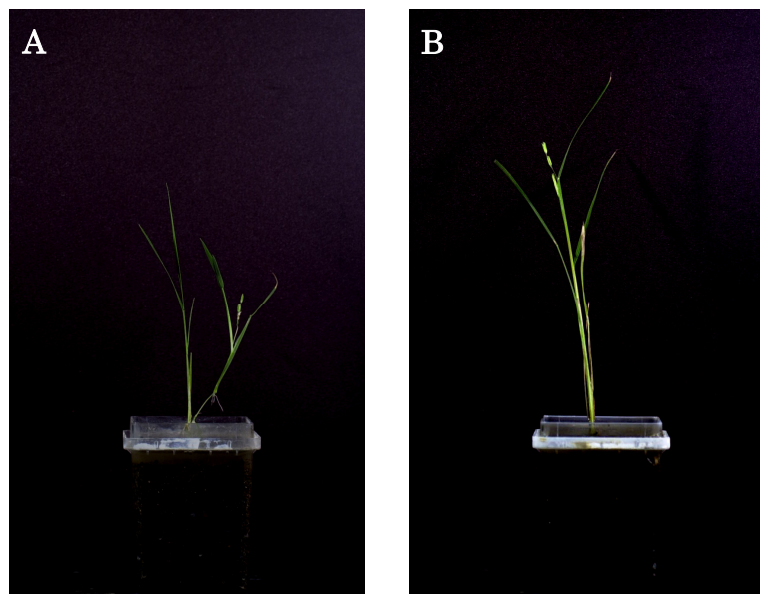


図15. *rolC::Hd3a:GFP*、*RPP16::Hd3a:GFP* 植物体の短日条件下における開花表現型

(A) *rolC::Hd3a:GFP* 形質転換体 (B) *RPP16::Hd3a:GFP* 形質転換体

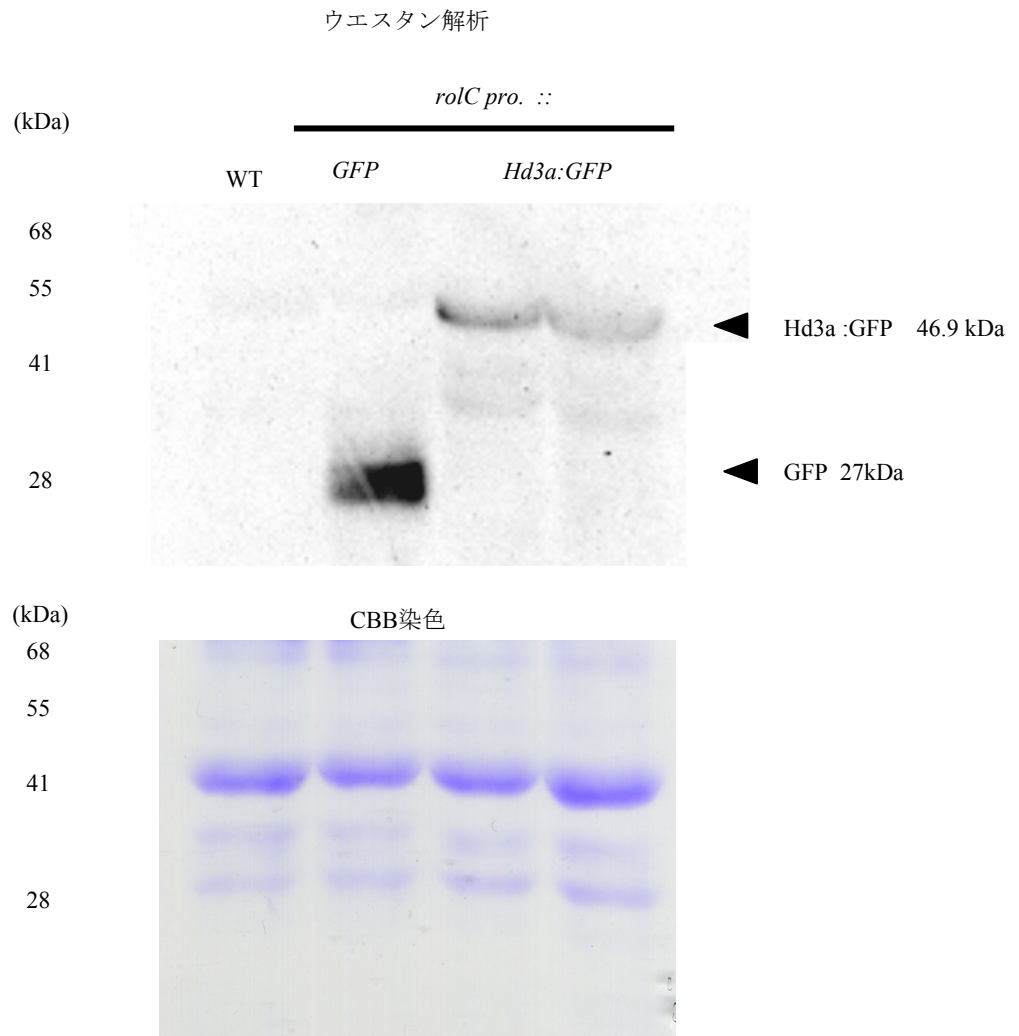


図16. *rolC::Hd3a:GFP* 形質転換体における*Hd3a:GFP* タンパク質の発現 *rolC::Hd3a:GFP*、*rolC::GFP* 形質転換体およびWTの可溶性画分を抽出し、GFP抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。*rolC::Hd3a:GFP*、*rolC::GFP* 形質転換体の可溶性画分を流したレーンでそれぞれ *Hd3a:GFP* タンパク質および *GFP* タンパク質の推定分子量のサイズにバンドが検出された。

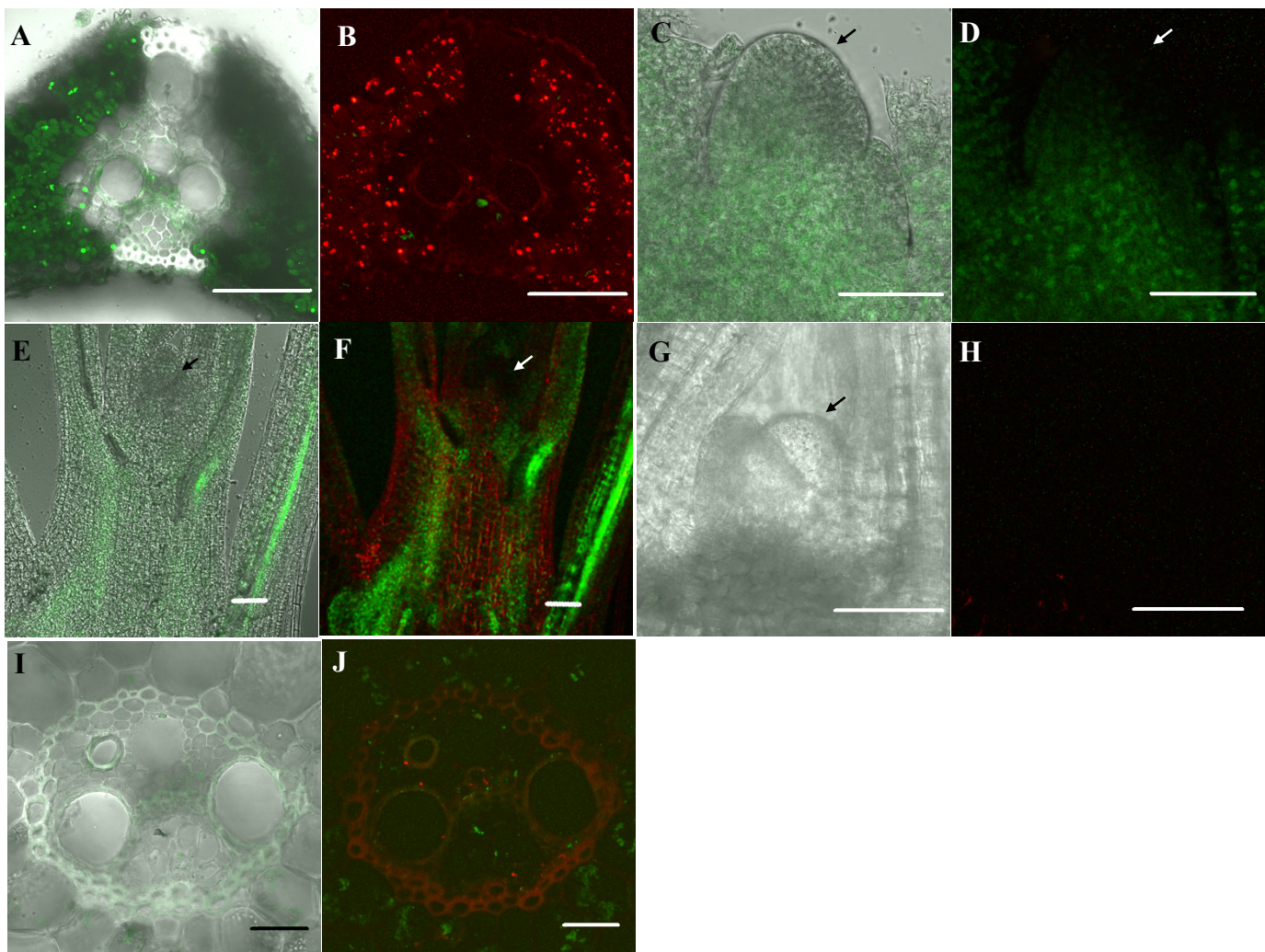


図17. *rolC::Hd3a:GFP* および *rolC::Kaede* 植物体における *Hd3a:GFP* タンパク質および *Kaede* タンパク質の局在

(A)-(F) *rolC::Hd3a:GFP* (G)、(H)、(I)、(J) *rolC::Kaede* (A)、(B) は葉身横断切片 (C)、(D) 茎頂分裂組織含む縦断切片 (E)、(F) 茎頂分裂組織 (G)、(H) 茎頂分裂組織 (I)、(J) 基部横断切片 矢印は茎頂分裂組織を示している。(A)、(C)、(E)、(G)、(I) は明視野+GFP画像。(B)、(D)、(F)、(H)、(J) は、分光処理画像。GFP蛍光は緑で、自家蛍光は赤で示している。

Bar = 50 μ m

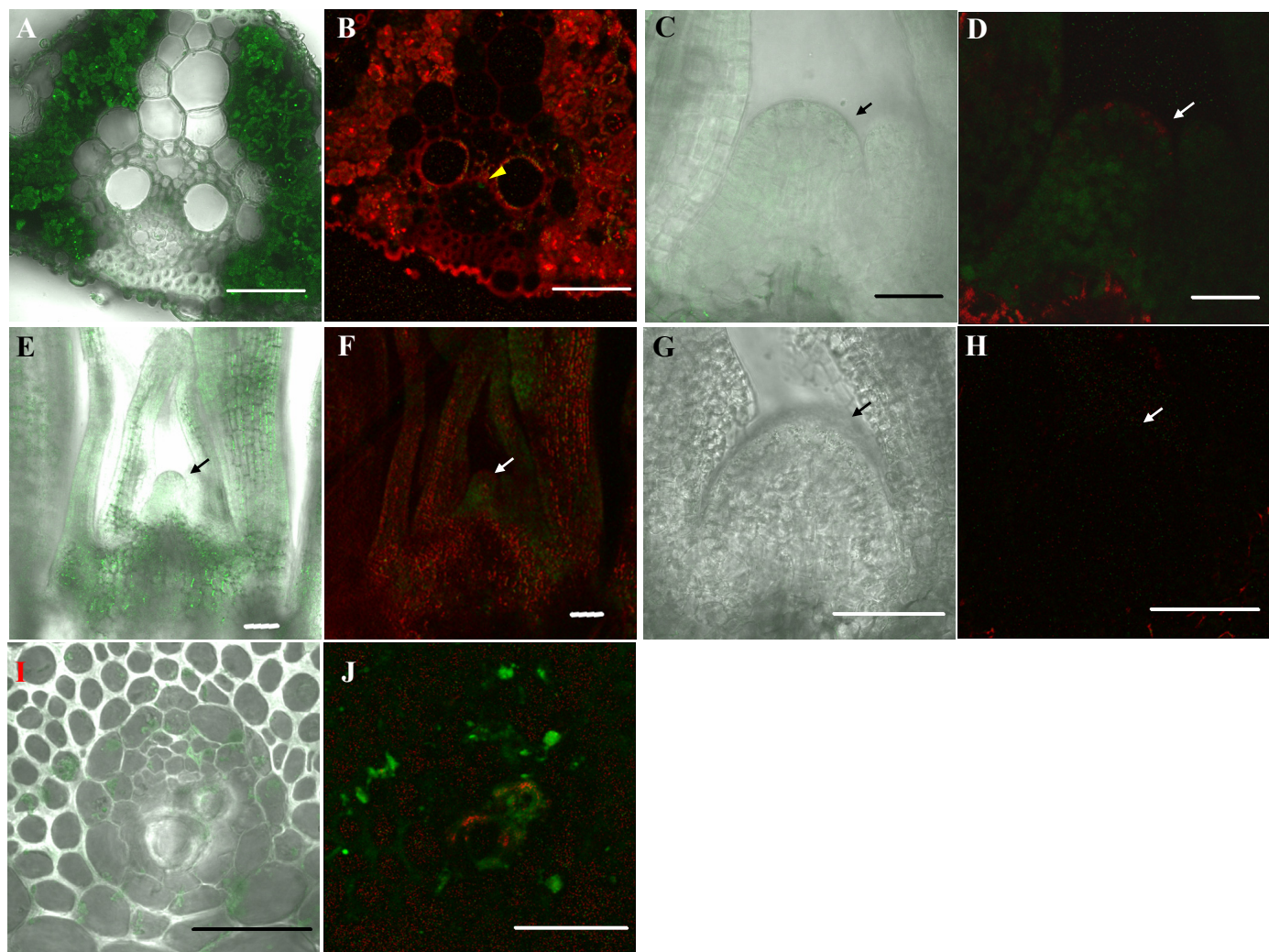


図18. *RPP16::Hd3a:GFP* および *RPP16::Kaede* 植物体における *Hd3a:GFP* タンパク質および *Kaede* タンパク質の局在

(A)-(F) *RPP16::Hd3a:GFP* (G)、(H)、(I)、(J) *RPP16::Kaede* (A)、(B) は葉身横断切片 (C)、(D) 茎頂分裂組織含む縦断切片 (E)、(F) 茎頂分裂組織 (G)、(H) 茎頂分裂組織 (I)、(J) 基部横断切片 矢印は茎頂分裂組織を示している。(A)、(C)、(E)、(G)、(I) は明視野+GFP画像。(B)、(D)、(F)、(H)、(J) は、分光処理画像。GFP蛍光は緑で、自家蛍光は赤で示している。 Bar = 50 μ m

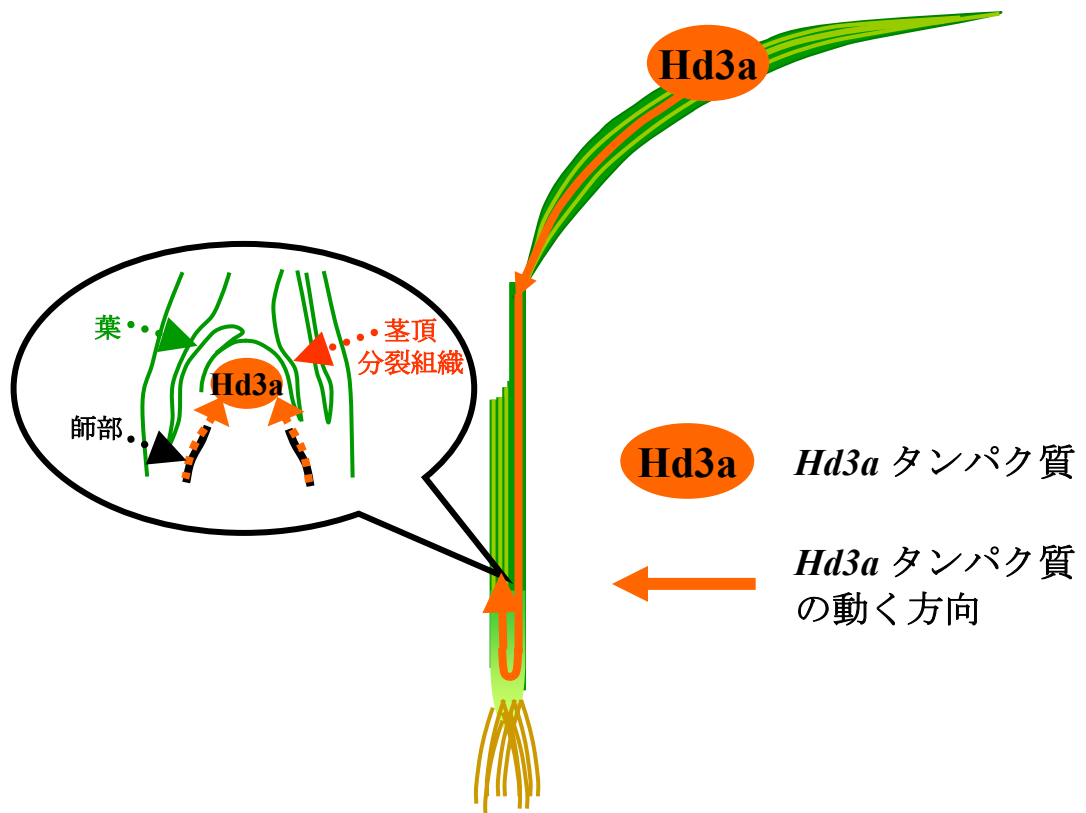


図19. イネにおけるフロリゲン*Hd3a* タンパク質移動のモデル
Hd3a 遺伝子は短日条件下において光周性花成経路により葉身の維管束組織特異的に発現し、タンパク質へと翻訳される。*Hd3a* タンパク質はその後、維管束組織を通じて茎頂分裂組織へと運ばれ花成を促進する。

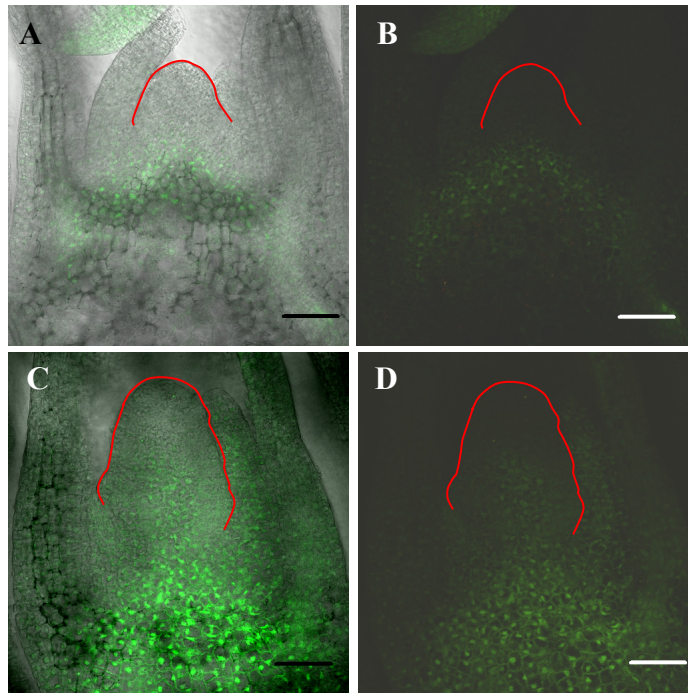


図20. *Hd3a::Hd3a:GFP* 植物体における茎頂分裂組織

(A)、(B) の茎頂分裂組織は、栄養成長期の茎頂分裂期だと思われる。
 (C)、(D) の茎頂分裂組織は、すでに生殖成長期に移行したものだと思われる。
 (A)、(C)、(E)、(G)、(I) は明視野+GFP画像。(B)、(D)、(F)、(H)、(J) は、分光処理画像。GFP蛍光は緑で、自家蛍光は赤で示している。
 赤線で囲った領域は茎頂分裂組織を示している。 Bar = 50 μ m