

# 論文の内容の要旨

## 論文題目 イネの花芽誘導におけるフィトクロム光受容体の 多様な作用機作

氏 名 大薄麻未

### 序論

最適な季節に繁殖活動を行うため、植物は日長に応じて開花時期を調節する。主要作物として研究がさかんなイネは、短日条件で開花を促進する。近年、概日時計と外部からの光刺激が相互作用して日長を認識するという説が、分子レベルで証明されている。実際に、イネをはじめとするいくつかの植物において、赤色光受容体フィトクロムは日長認識に必須であるとされている。例えば、イネ活性型フィトクロム欠損体 *photoperiod sensitivity (se5)* では長日条件でも短日条件同様に開花が促進される。これは、イネの花成誘導ホルモン・フロリゲンをコードする *Heading date 3a (Hd3a)* の発現変化が原因である。*Hd3a* の発現は、野生型において 13.5 時間以上の日長で発現が著しく抑制され、すなわち 13.5 時間の限界日長をもつが、*se5* 変異体では日長に関係なくその発現が脱抑制されている。

*Hd3a* が限界日長に応答するために、開花抑制因子 *Grain number, plant height and heading date 7 (Ghd7)* および開花促進因子 *Early heading date 1 (Ehd1)* が働くことが報告されている(図 1A)。*Ghd7* は、13.5 時間以上の長日条件において、フィトクロムシグナルによって強く誘導される。その結果、*Ghd7* により *Ehd1* およびその下流の *Hd3a* が 13.5 時間以上の長日条件で抑制され、限界日長応答を示す。*Ghd7* の日長応答は、朝方のフィトクロムシグナルが *Ghd7* を誘導できるかどうかによって決定する。長日条件では朝方のフィトクロムシグナルが *Ghd7* を誘導できるが、短日条件では誘導できない(図 1B)。また、短日条件では明暗サイクルによって *Ghd7* を誘導することができないが、夜中における人工的な赤色光の照射によって誘導することができる。

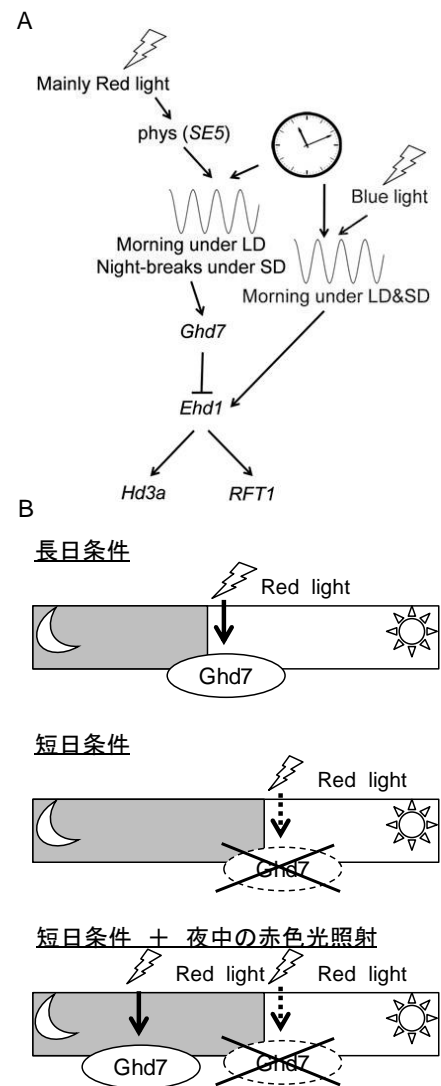


図 1. イネの限界日長応答  
A. 既知の限界日長応答経路 B. 異なる日長における、光刺激による *Ghd7* の誘導

イネはフィットクロム A-C(*PHYA-C*)の 3 つのフィットクロム遺伝子をもっている。各フィットクロム変異体および二重変異体の開花到達日数を観察すると、いくつかの変異体において開花が早まり、さらに早まる程度も異なる。これは、日長応答において各フィットクロムの機能は重複しておらず、それぞれ異なる機能を持つことを示唆している。各フィットクロムは *Ghd7* の転写誘導において異なる役割をもつのか、また、*Ghd7* の誘導以外に作用点を持つのか、さらなる解析が期待される。

本研究は、日長応答において重要な役割をもつフィットクロムの機能をさらに詳細に解析するため、各種フィットクロム変異体を用い、各フィットクロムの機能相違点、および新たなフィットクロムの作用点を明らかにすることを目的とした。

## 結果と考察

### 1. *Ghd7* の転写誘導におけるフィットクロムの役割

私は、イネの 3 つのフィットクロムがどのように限界日長応答に関わっているかを確かめるため、各フィットクロム変異体および二重変異体を様々な日長条件下で生育し、発現解析を行った(図 2)。栽培品種日本晴(WT)においては日長が長くなると *Ghd7* の発現量が緩やかに上昇した(図 2A)。これに対し、各フィットクロム変異体および二重変異体では、いくつかの異なる *Ghd7* 発現パターンを示した(図 2A)。このことは、各フィットクロムが *Ghd7* の誘導において異なる機能を持つことを示唆する。

私は、各フィットクロム変異体の比較から、*Ghd7* の誘導における各フィットクロムの相違点を検証した。まず、3 つのフィットクロム遺伝子のうち 1 つのみが機能しているフィットクロム二重変異体を解析した。*phyBphyC* 変異体(*PHYA* のみ機能型)では *Ghd7* が日長に応答して発現した(図 2A)。これに対し、*phyAphyC* 変異体(*PHYB* のみ機能型)および *phyAphyB* 変異体(*PHYC* のみ機能型)では、どの日長でも *Ghd7* が低発現であった(図 2A)。この結果から、*PHYA* のみが単独で *Ghd7* を誘導できることが分かる。しかし、*phyA* 変

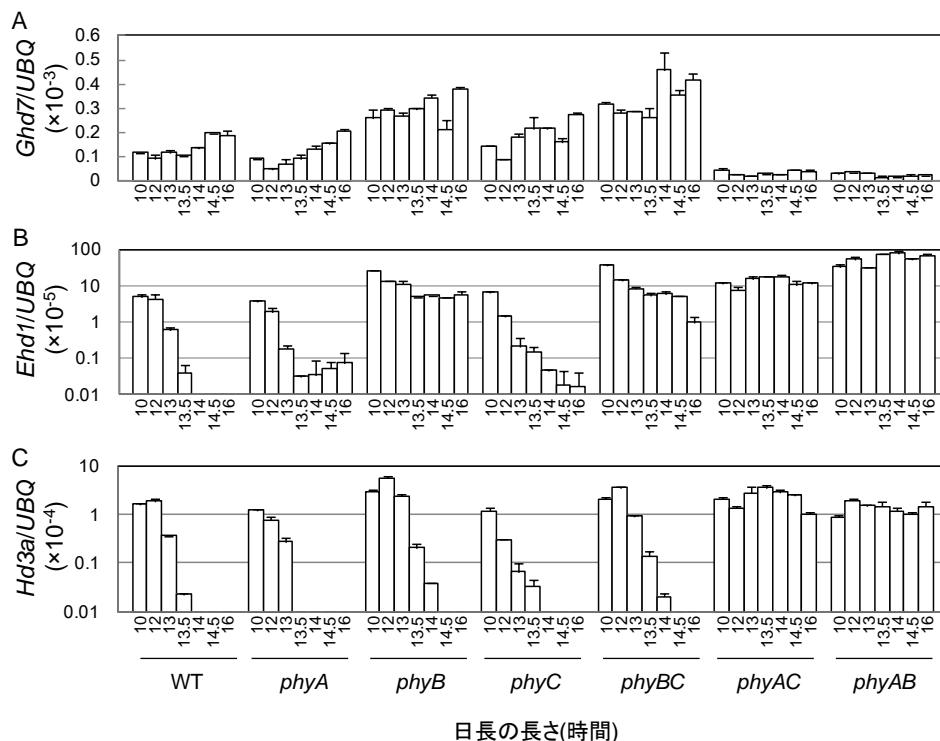
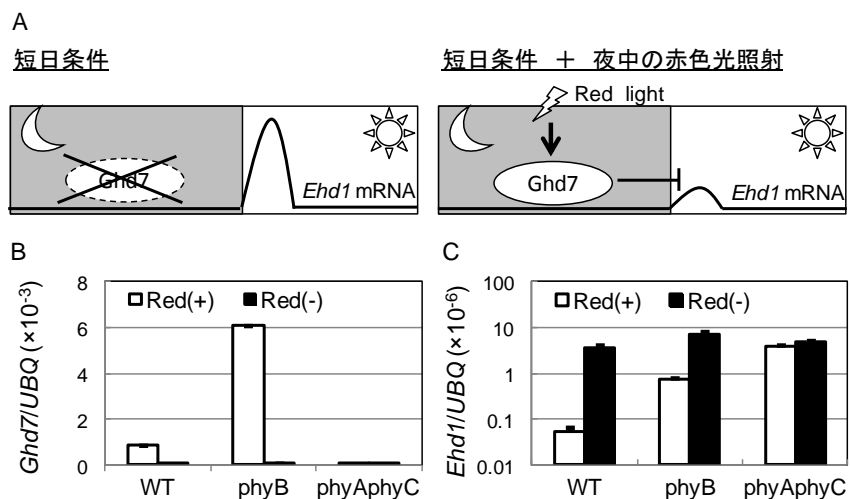


図 2. フィットクロム変異体を用いた様々な日長条件下における開花制御遺伝子の発現解析

長日条件下で生育した植物を 5 日間様々な日長条件下に移し、6 日目の夜明け 3 時間後における(A) *Ghd7*、(B) *Ehd1*、(C) *Hd3a* の発現量を定量的 RT-PCR で解析した。

異体(*PHYB*と*PHYC*が機能型)では*PHYA*が欠損しているにも関わらず、*Ghd7*を誘導した(図2A)。これは、*PHYB*および*PHYC*が同時に存在すると*Ghd7*を誘導できることを示唆する。シロイヌナズナでは、フィトクロムはホモダイマーまたはヘテロダイマーを形成して機能することが報告されている。シロイヌナズナとの比較から、*phyA/phyA*ホモダイマーまたは*phyB/phyC*ヘテロ



**図3. フィトクロム変異体における *Ghd7* の機能**

A. 短日条件の夜中の赤色光照射によって誘導された *Ghd7* は、青色光によって誘導される *Ehd1* を抑制する。B, C. 短日条件の夜中に赤色光を照射したときの、2 時間後の *Ghd7* (B) および 3 時間後の *Ehd1* (C) の発現量を解析した。

ダイマーが *Ghd7* を誘導すると推測される。これら 2 つのフィトクロムダイマーによる *Ghd7* の誘導は、日長応答に必須であると考えられる。

## 2. *Ehd1* の発現制御におけるフィトクロムの役割

次に、各フィトクロム変異体を様々な日長条件下で生育したときの *Ehd1* の発現量を解析した(図 2B)。WT においては、これまでの報告と同様に、13.5 時間の限界日長応答を示した。一方で、*phyB* 変異体、*phyBphyC* 変異体、*phyAphyC* 変異体、*phyAphyB* 変異体では、長日条件において *Ehd1* が脱抑制され、日長に対して応答しなかった。*ghd7* 欠損体では日長によらず *Ehd1* が脱抑制され、さらに、人工的に誘導された *Ghd7* は *Ehd1* を抑制するという報告から、*Ghd7* は *Ehd1* の主要な抑制因子と考えられている。*phyAphyC* 変異体および *phyAphyB* 変異体では *Ghd7* が誘導されないため(図 2A)、*Ehd1* が限界日長応答を示さないと考えられる(図 2B)。しかし、*phyB* 変異体および *phyBphyC* 変異体では *Ghd7* が発現し、日長に反応しているにも関わらず(図 2A)、*Ehd1* は脱抑制されていた(図 2B)。この結果から、私は、*phyB* 変異体および *phyBphyC* 変異体では長日条件下における *Ghd7* の機能が弱まっていると推測した。*phyB* 変異体における *Ghd7* の機能を検討するためには、*Ghd7* 以外の長日条件特異的な *Ehd1* 制御遺伝子の影響を排除する必要がある。しかし、短日条件においては *Ghd7* が低発現であるため、*Ghd7* の機能を検討することが難しい。短日条件の夜中に赤色光を照射すると *Ghd7* が誘導され、さらに翌朝の *Ehd1* の発現が抑制されることが報告されている(図 1B、図 3A)。この生理学的条件を利用し、短日条件下における夜中の赤色光照射によって誘導された *Ghd7* の機能が、*phyB* 変異体で変化するかを検討した(図 3B、C)。*Ghd7* の発現を誘導できない *phyAphyC* 変異体では、赤色光を照射しても *Ehd1* の発現量が変わらなかった(図 3B、C)。これに対し、*Ghd7* を誘導できる WT および *phyB* 変異体では赤色光を照射すると *Ehd1* が抑制された(図 3B、C)。これらの結果から、夜中の赤色光照射は *Ghd7* の誘導を介して *Ehd1* を抑制することが強く示唆された。しかしながら、WT と *phyB* 変異体を比較すると、*Ghd7* の発現量は *phyB* 変異体 > WT であるにも関わらず、*Ehd1* の発現量は *phyB* 変異体 > WT であった。これは、*phyB* 変異体では *Ghd7* の機能が弱いことを示唆する。長日条件では *phyB* が活性型である明期が長く、不活性型に遷移する暗期が短い。このため、長日条件では *Ghd7* が高発現であるだけでなく、*PHYB* によって

機能が促進されることにより、さらに強力に *Ehd1* を抑制すると推測される。

### 3. *Hd3a* の発現制御におけるフィトクロムの役割

最後に、各フィトクロム変異体を用いて、様々な日長条件下における *Hd3a* の発現量を解析した(図 2C)。WT ではこれまでの知見と同様に、

13.5 時間の限界日長応答を示した。*Ehd1* が脱抑制されていた *phyB* 変異体、*phyBphyC* 変異体、*phyAphyC* 変異体、*phyAphyB* 変異体のうち(図 2B)、*phyAphyC* 変異体と *phyAphyB* 変異体(共に *phyA* 欠損をもつ)ではどの日長でも *Hd3a* が高発現だった。一方で、*phyB* 変異体と *phyBphyC* 変異体(共に機能的 *PHYA* をもつ)では長日条件下で *Hd3a* が抑制された。これは、*Ehd1* が高発現であっても、長日条件下では *PHYA* が *Ehd1* の機能を抑制することを示唆する。*Ehd1* の機能は日長によって異なるのかを検討するため、*Ehd1* 過剰発現体(機能的 *PHYA* を持つ)を異なる日長条件で育てると、短日条件のみ開花が早まった(図 4A)。また *Ehd1* 過剰発現体において、*Ehd1* は日長に関わらず恒常的な発現を示したが、*Hd3a* は短日条件の夜明け前後のみ促進された(図 4B)。これは、*Ehd1* の機能が長日条件下では抑制されることを強く支持する。長日条件下における *Ehd1* は、発現が *Ghd7* によって抑制されるだけでなく、遺伝子産物機能も *PHYA* によって抑制されることで、さらに顕著に *Hd3a* を抑制すると考えられる。

### 結論

植物はどのようにして日長を認識し、応答するのか?これを明らかにするために、概日時計と光シグナルの相互作用を中心としたいくつかのモデルが提唱されてきた。本研究では、光受容体フィトクロムに着目し、全ての組み合わせの変異体を用い、赤色光の作用を詳細に解析した。その結果、以下の 3 つの作用点を解明した(図 5)。(1) *phyA/phyA* または *phyB/phyC* シグナルが *Ghd7* を誘導する。(2) *PHYB* は長日条件下で *Ghd7* の機能(*Ehd1* の発現を抑制)を強める。(3) *PHYA* は長日条件下で *Ehd1* の機能(*Hd3a* の発現を抑制)を抑制する。

これらの結果は、植物による日長応答は 1 つの単純なモデルで説明できるものではなく、いくつもの日長認識機構が備わっていることを提示している。*PHYB* による *Ghd7* の機能調節および *PHYA* による *Ehd1* の機能調節は、現時点で、概日時計との関与が明らかではない。本研究で明らかとなったこれら 2 つの作用点は、*Ghd7* の発現量のわずかな変化(図 2A)を *Ehd1* や *Hd3a* の顕著な変化(図 2B、C)に変換する仕組みであるだけでなく、光受容体が概日時計とは独立に日長依存的に働く可能性を含んでおり、新しい日長認識機構を示唆する。

