

シロイヌナズナ FT 蛋白質と相互作用する  
新奇因子の解析

丹羽 優喜

平成25年度  
学位申請論文

シロイヌナズナ FT 蛋白質と相互作用する  
新奇因子の解析

京都大学大学院 生命科学研究科 統合生命科学専攻

環境応答制御学講座 分子代謝制御学分野

丹羽 優喜

目次	
要旨	1
序論	3
材料と方法	10
結果	
第1章 FT と相互作用する新奇転写因子の探索	
1. 転写因子ライブラリを用いた酵母ツーハイブリッドスクリーニング	14
2. FT と新奇相互作用因子との相互作用における 14-3-3 の必要性	14
3. FT と TCP 転写因子群との相互作用の解析	15
第2章 側芽におけるフロリゲン FT の活性調節機構の解明	
1. BRC1 と FT との相互作用についての解析	16
2. FT の側芽における存在の有無	18
3. <i>brc1</i> 変異体の表現型解析	20
4. 側芽の相転換における <i>FT</i> と <i>TSF</i> 、 <i>TFL1</i> の役割と <i>BRC1</i> との関係	22
5. <i>FT</i> 下流遺伝子の側芽の相転換に対する役割と <i>BRC1</i> との関係	24
6. 茎頂で異所発現させた <i>BRC1</i> の効果	26
考察	
1. FT と相互作用する新奇転写因子	28
2. フロリゲン FT と側芽分裂組織の相転換	31
3. 汎用性シグナル因子としてのフロリゲン機能解明に向けて	35
謝辞	37
引用文献	38
図表	47

## 要旨

近年のモデル植物シロイヌナズナを用いた研究を中心として、葉で適切な日長に応答して産生され、茎頂分裂組織へと花成刺激を伝える長距離花成シグナル物質フロリゲンの本体が、*FLOWERING LOCUS T (FT)* 遺伝子にコードされる FT 蛋白質であることが明らかになった。FT 蛋白質は茎頂分裂組織において 14-3-3 蛋白質を介して転写因子 FD と相互作用し、下流遺伝子の発現を誘導することで花成を引き起こすと考えられている。しかしながら、FT 蛋白質および他の植物種における FT 相同蛋白質は花成を誘導するだけに留まらず、側芽の発生や塊茎形成、葉の形態などといった、多様な発生現象に関わることが示唆されている。

本研究では、これらの未解明の FT 蛋白質の部位特異的・現象特異的な作用メカニズムを明らかにすることを目的とし、FT 蛋白質と相互作用する新奇因子の探索を行った。FT 蛋白質の機能が下流遺伝子の転写制御であると考えられることから、転写因子を新奇相互作用因子として想定し、転写因子ライブラリを用いて網羅的なスクリーニングを行った。その結果、TCP (Tb1, CYC, PCF) 転写因子群に属する転写因子が候補として多く得られた。そのため、TCP 転写因子群の中から、側芽の発生に関わる BRANCHED1 (BRC1) 蛋白質に注目し、側芽の発生における BRC1 蛋白質と FT 蛋白質の役割を調べた。まず、FT 蛋白質と BRC1 蛋白質との相互作用を、酵母細胞内、試験管内、植物細胞内において示した。また、シロイヌナズナにおける FT 相同蛋白質であり、花成を促進する TWIN SISTER OF FT (TSF) と花成を抑制する TERMINAL FLOWER1 (TFL1) についても BRC1 との相互作用を調べた結果、TSF は相互作用を示したが、TFL1 は相互作用を示さないことが明らかになった。さらに、FD 蛋白質との場合とは異なり、BRC1 蛋白質と FT 蛋白質との相互作用には 14-3-3 蛋白質が介在しないことを示した。さらに、BRC1 蛋白質との結合に重要な FT 蛋白質のアミノ酸残基を特定し、14-3-3 蛋白質の結合部位とは異なる部位にあることを示した。次に、FT 蛋白質が側芽においても存在するかについて調べた結果、側芽において *FT* 遺伝子は発現していなかったが、葉で発現した FT 蛋白質が側芽へも移動することが示された。また、*brc1* 変異体を用いた解析により、*BRC1* 遺伝子は側芽の相転換を遅延させる働きがあることが示された。さらに、*ft* 変異体や既知の花成関連遺伝子の変異体の表現型解析と、*brc1* との二重変異体の作出による遺伝学的関係の解析などから、BRC1 蛋白質の相転換遅延効果は、FT および TSF 蛋白質の機能を阻害することにより発揮されているというモデルが立てられた。このモデルは、側芽において *BRC1* 遺伝子が *FT* 下流遺伝子の発現を抑制していることや、茎頂分裂組織において異所的に *BRC1* 遺伝子を発現させた場合に花

成が遅延することからも支持された。

以上の結果より、フロリゲン FT/TSF の活性が、側芽特異的な因子である BRC1 蛋白質によって調整されていることが明らかになった。本研究により、フロリゲン活性が部位特異的に調節されている初めての例が示され、受容部位によるフロリゲンに対する感度の違いや応答の違いを説明するモデルとなりうると考えられる。

## 序論

生物は外界の季節を感知し、それに対して適切な応答をすることで生存や繁殖の成功をはかっている。植物において最も重要な季節応答の1つは、適切な季節に花を咲かせ、種子を形成することである。植物はその頂端に分裂組織を維持し、その生涯に渡って新たな器官の発生を続けるが、栄養成長相の植物体と生殖成長相の植物体では大きく形態が異なることも多い。花を咲かせ、種子の量と質を最適化するため、植物体の様々な部位で発生プログラムの変更が協調的に行われていると考えられる。

### 花成と長距離花成シグナル、フロリゲン

花成とは種子植物における栄養成長から生殖成長への成長相の転換をさす。これはすなわち、茎頂分裂組織から作られる側生器官が、栄養器官である葉から、生殖器官である花へと変化することである。1920年代に、W. W. Garner と H. A. Allard は、日長が花成を制御する重要な外的要因であることを見出した。日長は、植物が花成に適切な季節を知るために重要な環境要因である。さらに、1932年にはJ. E. Knottが、日長を受容する部分が葉であることを明らかにした。1936年になり、M. Kh. Chailakhyan は、「日長誘導を受けた葉に葉において花成誘導を引き起こすホルモン様の物質がつくられ、これが茎頂へ輸送されて花成を引き起こす」という説を提唱した。1937年にはその物質をフロリゲン (florigen) と名付け、その後多くの接ぎ木実験によってフロリゲン説は支持された。しかしながら、長年の間、フロリゲンの実体は謎に包まれたままであった。

近年、モデル植物シロイヌナズナを用いた研究を中心に、フロリゲンの実体が明らかにされつつある。G. Rédei や M. Koornneef らは、シロイヌナズナを用いて、花成遅延表現型を示す突然変異体を大規模にスクリーニングし、花成促進に寄与する12の遺伝子座の存在が明らかになった (Rédei, 1962, Koornneef et al., 1991, Koornneef et al., 1998)。この中に含まれていた *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) 遺伝子は、フォスファチジルエタノールアミン結合蛋白質 (phosphatidylethanolamine binding protein, PEBP) / RKIP (Raf kinase inhibitor protein) ファミリーに属する175アミノ酸から成る比較的小さな蛋白質をコードしており (Kobayashi et al., 1999, Kardailsky et al., 1999)、長日条件下において、子葉及び本葉の周縁部の維管束節部で発現している (Takada and Goto, 2003)。さらに、FT蛋白質は、茎頂においてbZIP型転写因子であるFD蛋白質と相互作用し、花成を促進することが明らかになった (Abe et al., 2005, Wigge et al., 2005)。加えて、2007年から2008年にかけて、FT蛋白質が葉から茎頂へと輸送されていることを示す論文が複数のグループから発表された (Corbesier et al.,

2007、Jaeger and Wigge, 2007、Mathieu et al., 2007、Notaguchi et al., 2008)。また、イネとカボチャにおいても、FT ホモログ蛋白質が、葉から茎頂へと輸送されることが示された (Tamaki et al., 2007、Lin et al., 2007)。これらの報告により、現在では、FT 蛋白質がフロリゲンの主要な部分をなすと考えられている。

### フロリゲン FT および FT 相同蛋白質の機能

FT 蛋白質は、茎頂に移動した後、転写因子 FD と相互作用し、花芽分裂組織決定遺伝子である *APETALA1* (*AP1*) の発現を誘導している (Abe et al., 2005、Wigge et al., 2005)。イネにおける研究から、FT 相同蛋白質である Hd3a 蛋白質と FD 相同蛋白質である OsFD1 蛋白質は直接結合しておらず、14-3-3 蛋白質を介して相互作用していることが示されており、シロイヌナズナでも同様の結合様式であると考えられている (Taoka et al., 2011; 肥後, 2013)。さらに FD 蛋白質は FT 蛋白質の相同蛋白質である TWIN SISTER OF FT (*TSF*)、および TERMINAL FLOWER1 (*TFL1*) とも相互作用することが示されている (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005)。

*TSF* 遺伝子は *FT* 遺伝子と同様に維管束篩部伴細胞で発現するが、*FT* 遺伝子とは異なり、葉の基部側の主脈や胚軸で発現している (Takada and Goto, 2003; Yamaguchi et al., 2005)。維管束篩部伴細胞で発現した *TSF* 蛋白質は、FT 蛋白質と同様に茎頂へと移動し、花成を促進すると考えられている (Michaels et al., 2005; Yamaguchi et al., 2005)。ただし、*FT* 遺伝子が発現している長日条件下では花成促進に対して比較的小さい寄与のみを示し、*FT* 遺伝子の発現していない短日条件下や *ft* 変異体背景でその効果はより大きくなる (Michaels et al., 2005; Yamaguchi et al., 2005)。

*TFL1* 遺伝子は、花成前の茎頂分裂組織の内部で発現しており、*FT* や *TSF* 遺伝子とは逆に花成を抑制している (Shannon and Meeks-Wagner, 1991; Bradley et al., 1997)。また、花成後に花序分裂組織で発現しており、*LEAFY* (*LFY*) や *AP1* といった花芽分裂組織決定遺伝子の発現を抑制することで、花序分裂組織を維持している (Ratcliffe et al., 1998)。この *TFL1* 蛋白質の機能は、FD 蛋白質との相互作用を介して、下流遺伝子の転写を抑制することによると考えられる (Hanano and Goto, 2011)。

FT および *TFL1* 蛋白質の生化学的な機能の詳細は明らかにされていないが、ともに転写因子 FD と相互作用し、下流遺伝子の発現を制御していると考えられることから、転写のコアクチベーターおよびコSuppressor として機能していると予想される (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005; Ahn et al., 2006; Hanano and Goto, 2011)。既に FT と *TFL1* 蛋白質における機能の違いを決定しているアミノ酸残基が特定されている。Hanzawa ら (2005) は、PEBP ファミリー蛋白質に

において保存されているアニオン結合ポケットに注目し、このポケットを構成するアミノ酸のうち、FT と TFL1 蛋白質で異なるアミノ酸残基を入れ替え、置換型蛋白質の機能を解析した。その結果、FT 蛋白質の 85 番目のチロシン残基 (TFL1 では 88 番目のヒスチジン残基) が、FT 蛋白質の花成促進能を決定していることを明らかにした (Hanzawa et al., 2005)。Ahn ら (2006) は、4 つのエキソンからなる FT および TFL1 遺伝子に対し、エキソンシャッフリングを行い、4 番目のエキソンがそれぞれの機能に重要であることを見出した。さらに 4 番目のエキソンを 4 つの部分に分けて入れ換え、セグメント B と名付けたループ領域が FT 蛋白質の花成促進能に必要であることを示した (Ahn et al., 2006)。このループ領域の重要性は、サトウダイコン (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) において花成促進に働く BvFT2 蛋白質と、花成抑制に働く BvFT1 蛋白質の機能の違いを規定しているのが、このループ領域内に存在する 3 つのアミノ酸残基の置換であったことから支持されている (Pin et al., 2010)。

FT 相同蛋白質は花成時期の制御のみに留まらず、植物の発生に対して多様な機能を持っていることが報告されている。例えば、ジャガイモの FT 相同蛋白質は、塊茎形成を引き起こす因子として働くこと (Rodriguez-Falcon et al., 2006) や、トマトの FT 相同蛋白質は葉の形態に関わること (Shalit et al., 2009)、ポプラやドイツトウヒの FT 相同蛋白質は芽の休眠に関わること (Böhlenius et al., 2006、Rohde and Bhalerao et al., 2007、Ruttink et al., 2007、Gyllenstrand et al., 2007) などが報告されている。また、これらの植物種においても、FT 相同蛋白質が花成時期の制御に関わっていることが報告されているため、FT 相同蛋白質は、関わる現象に従って特異的な応答を引き起こしていると考えられる。また、一般に花成には、植物体の様々な部位での変化が伴う。シロイヌナズナにおいても、花成に伴い様々な変化が観察される。まず、栄養成長相ではほとんど伸長しなかった節間が伸長を開始する。伸長した花茎には数枚の葉 (茎生葉) が形成されるが、この茎生葉は、栄養成長相の葉 (ロゼット葉) とは形態が異なっている。さらに、葉腋において側芽が形成され、伸長を開始する。実験室でよく用いられる Ler などの、春化要求性のないシロイヌナズナの系統では、長日条件下で速やかに花成させた場合、側芽の形成は花成前には起こらない (Hempel and Feldman, 1994)。また、茎頂分裂組織は、花成前後においてその形態が、扁平な形状から、ドーム状の盛り上がった形状へと変化する (Hempel and Feldman, 1994)。この変化は、茎頂分裂組織における細胞分裂活性の上昇を反映していると考えられる (Jacquard et al., 2003)。同時に、細胞内の代謝も大きく変化していると考えられる。以上のような変化が起こる部位は、茎頂分裂組織だけに限定されないため、なんらかのシグナルによって各部位の変化が協調的に進行させられていると考えられるが、それを可能にするメカニズムは明らかになって

いない。これまでの解析により、葉で作られた FT 蛋白質が、茎頂に局所的に移動するだけでなく、植物のその他の部位にも移動している可能性が示唆されている (Corbesier et al., 2007, Jaeger and Wigge, 2007)。また、FT 過剰発現体では、葉の形態に野生型との違いが見られるという報告がある (Teper-Bamnolker and Samach, 2005)。したがって、葉で産生された FT 蛋白質は、植物体の様々な部位に輸送されて、花成に伴う様々な変化を協調的に引き起こしている可能性がある。さらに、花成後に形成されるシロイヌナズナの側芽分裂組織は、植物体内では茎頂分裂組織で花成を引き起こすフロリゲン FT が十分に産生されているにも関わらず、数枚以上の葉を形成してから花を形成することから、発生の初期には花成シグナルに対する応答能を欠いていると考えられる (Hempel and Feldman, 1994; Grbić and Blecker, 1996)。したがって、FT 蛋白質に対する感受性は部位によって異なっていることが示唆される。これらの例は、FT 蛋白質からのシグナルを受け取る部位によって、引き起こされる現象や、FT 蛋白質に対する感受性が異なっていることを示す。しかし、このような違いを生み出すメカニズムはこれまでに報告されていない。

このような FT 蛋白質の部位特異的・現象特異的な作用機構は、FT 蛋白質と相互作用する因子の多様性により説明される可能性があると考えられる。これまで、FD 蛋白質および 14-3-3 蛋白質の他には FT 蛋白質と相互作用して機能することが明確に示された因子は報告されていないが、Liu ら(2012)は、シロイヌナズナの花序および花芽を含む cDNA ライブラリから FT 蛋白質と相互作用する因子をスクリーニングし、bZIP 型転写因子や TCP 転写因子、ホメオボックス型転写因子を含む複数の相互作用因子候補を得ている (Liu et al., 2012)。また、Mimida ら (2011) はリンゴの FT 相同蛋白質である MdFT2 と相互作用する因子として MdTCP2 と MdTCP4、MdVOZ1 を得ている (Mimida et al., 2011)。トマトにおいては、FT 蛋白質と相同性を持つ SP 蛋白質が、FD 蛋白質と同じ bZIP 型の転写因子である SPGB や 14-3-3 蛋白質の他に、NIMA-like キナーゼ及び機能未知の蛋白質と相互作用することが報告されている (Pnueli et al., 2001)。したがって、FT 相同蛋白質は複数の因子と相互作用して機能することが予想される。さらに、このような因子の中には、部位特異的・現象特異的な機能に関わる因子が存在することも期待される。

### 側芽の発生制御メカニズム

シロイヌナズナにおいて花成に伴う変化の 1 つである側芽の発生については、その制御機構がよく研究されている。ここでは側芽の発生過程を便宜的に形成、発達、伸長の 3 段階に分けて論じる。この中でも側芽の伸長制御は古典的な生理学実験などを含め様々な植物種において研究されており、既に 1930 年代にオ

オーキシンの極性輸送により側枝の伸長が阻害されるというモデルが立てられていた (Thimann and Skoog, 1933; Thimann and Skoog, 1934; Snow, 1937)。オーキシンがどのようなメカニズムで側芽の伸長を抑制しているかについては未だに議論が続いており、サイトカイニンおよびストリゴラクトンが二次メッセンジャーとして側枝の伸長を制御するというモデルと、オーキシン極性輸送の運河モデルが提唱されている (Domagalska and Leyser, 2011; Müller and Leyser, 2011; Dun et al., 2006)。また、側芽の形成については、シロイヌナズナの変異体を用いた遺伝学的な解析から理解が進んでいる。例えば、*REVOLUTA* やその相同遺伝子を含む HD-ZIP 転写因子は、葉などの側生器官の背軸性を規定する因子であるが、この背軸性の決定が側芽の形成に必要であることがわかっている (Talbert et al., 1995; Emery et al., 2003)。また、始めはトマトにおいて見つかった *LATERAL SUPPRESSOR (LAS)* (Schumacher et al., 1999; Greb et al., 2003) や、Myb 様転写因子である *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEM1 (RAX)* (Keller et al., 2006; Müller et al., 2006) などは、側芽の形成領域において発現しており、側芽の形成に必要である。その一方で、側芽の発達に関わる因子はほとんど明らかになっていない。これは、側芽の形成や伸長のように変化や異常が容易に観察できる過程と違い、側芽の発達に関しては、それぞれの植物や節において側芽形成のタイミングが異なるため比較が難しく、経時的な観察も困難であるためだと考えられる。

これまでに、シロイヌナズナにおいて側芽の発達制御に関わることが示唆されている因子は *BRANCHED1 (BRC1)* 遺伝子およびその相同遺伝子である *BRC2* 遺伝子のみである (Aguilar-Martínez et al., 2007)。*BRC1* は、トウモロコシ (*Zea mays* ssp. *mays*) において見つかった *Teosinte branched1 (Tb1)* の相同遺伝子として単離され、機能解析が行われた。*Tb1* 遺伝子は、トウモロコシの祖先種であるテオシンテ (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) との草姿の違いに対する原因遺伝子として単離された (Doebley et al., 1995; Doebley et al., 1997)。テオシンテは植物体の基部から多くの側枝を形成し、一次花序および二次花序は雄性花序、三次花序が雌性花序となる。一方で、トウモロコシは基部からはほとんど枝分かれをせず、一次花序が雄性花序、二次花序が雌性花序となる。シロイヌナズナでは、*BRC1* 遺伝子は側芽原基が形成される前から葉腋で発現しており、側芽の形成後は葉原基を含む側芽全体で発現した後、側芽の発達が進むと徐々に分裂組織内部へと発現が限定される。その後、側枝が伸長を開始する頃には発現が見られなくなる (Aguilar-Martínez et al., 2007)。また、*brc1* 変異体では、子葉の葉腋にあたる部分に、低頻度ではあるが異所的な側芽の形成が見られ、同時期の野生型植物と比較して側芽の発達段階が進んでおり、伸長する側枝の数が増加していた (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007)。したがって、*BRC1* 遺伝子は、

側芽の形成・発達・伸長すべての段階に影響を与える側芽発生抑制因子であると考えられた。*BRC1* 遺伝子は、TCP (*Tb1*, *CYC*, *PCF*) 転写因子群に属する転写因子をコードしており、保存されたTCPドメインがDNA結合能を持つため、その機能は転写制御を介して発揮されると予想される (Kosugi and Ohashi, 1997)。*brc1* 変異体および *BRC1* 遺伝子の誘導系を用いた解析から、下流で発現が上昇する因子としてアブシジン酸 (ABA) 関連の遺伝子、発現が減少する遺伝子として細胞周期および蛋白質生合成系に関わる因子が報告されている (González-Grandío et al., 2013)。ただし、これらの下流遺伝子は様々な発達段階を含む側芽や、芽生えでの異所的な *BRC1* 遺伝子の誘導によって得られたものであり、実際に *BRC1* 遺伝子が側芽の発達のどの段階にどのような機構で関わっているかは不明である。また、Aguilar-Martínez ら (2007) は、野生型植物と *brc1* 変異体を生育日数で揃えて側芽の発達段階を比較しているため、形成から発達のどの段階が *brc1* 変異体で早まっているかについても明確ではない。また、シロイヌナズナにおいて *BRC1* 遺伝子と最も TCP ドメインの配列が似ている遺伝子として *BRC2* 遺伝子が存在する (Aguilar-Martínez et al., 2007)。*BRC2* 遺伝子は *BRC1* 遺伝子とは部分的に独立に側芽の伸長抑制に寄与しているが、*BRC1* 遺伝子に比べてその寄与は小さいと考えられている (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007; Finlayson et al., 2010; González-Grandío et al., 2013)。

## 本研究の概要

FT および FT 相同蛋白質は、植物体の様々な部位で起こる様々な変化に、どのように関わっているのだろうか。これらの問題を解決することで、花成に伴って、植物体全体での協調的な変化を引き起こす機構の理解が進むと期待される。また、FT 相同蛋白質が持つ、長距離作用シグナル物質としての、種を超えた多様な機能を理解することにもつながるであろう。そこで本研究では、FT 蛋白質と相互作用して機能する新奇因子の同定を目指した。

これまでの転写因子 FD を介した FT 蛋白質の機能解析から、FT 蛋白質の機能は転写制御を介しているものと考えられた。そこで、新たな相互作用因子についても転写因子を想定し、転写因子ライブラリを用いて探索を行うことにした。シロイヌナズナの転写因子に関して、国内外の2つの研究室が、ゲノム中に存在する転写因子を個別にクローニングしたライブラリを作成しており、既に酵母ワンハイブリッド法によるスクリーニングに供していた (Pruneda-Paz et al., 2009; Mitsuda et al., 2010)。そこで、これらのライブラリを使用し、FT 蛋白質と相互作用する転写因子を網羅的に探索した。

また、得られた候補の中に TCP 転写因子が多く含まれていることに着目し、TCP 転写因子に注目した解析を行った。その結果、側芽の発生に関わる *BRC1*

蛋白質が FT 蛋白質と相互作用することが明らかになったため、側芽の発生に着目した解析を行った。その結果として、BRC1 蛋白質が FT 蛋白質と相互作用することでその活性を抑制し、側芽分裂組織の相転換を遅延させているというモデルが立てられた。この結果は、フロリゲン FT 蛋白質の部位特異的な活性調節機構を明らかにした初めての例であり、フロリゲン FT およびその相同蛋白質による多様な発生現象の制御機構の解析への端緒となるものである。

## 材料と方法

### 供試植物と育成条件

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. accession Columbia (Col)をシロイヌナズナの野生型として用いた。本研究で使用した変異体及び形質転換体を以下に示す。

#### 変異体 (Col 背景)

<i>brc1-2</i>	ABRC より分与 (Aguilar-Martínez et al., 2007; Alonso et al., 2003)
<i>ft-2</i>	(Imura et al., 2012)
<i>brc1-2; ft-2</i>	本研究で作出
<i>ft-2; tsf-1</i>	富田由妃博士が作出
<i>brc1-2; ft-2; tsf-1</i>	本研究で作出
<i>fd-1</i>	(Abe et al., 2005)
<i>brc1-2; fd-1</i>	本研究で作出
<i>soc1-2</i>	(Lee et al., 2000)
<i>brc1-2; soc1-2</i>	本研究で作出

#### 形質転換体

<i>gFT:GUS</i> #1-5	(Notaguchi et al., 2008)
<i>HSP:FT-EGFP</i> (Col) KK3-5	黒谷賢一博士が <i>ft-1</i> 背景で作出したものを Col に導入
<i>pAP1:GUS</i> (POP40)	M. F. Yanofsky 博士より分与
<i>pAP1:GUS</i> (POP40); <i>brc1-2</i>	本研究で作出
<i>gBRC1; brc1-2</i>	本研究で作出
<i>pFD:GUS</i>	(Abe et al., 2005)
<i>pFD:BRC1</i>	本研究で作出

多重変異体や変異体背景の形質転換体は通常の交配により行い、gDNA を用いた PCR によりすべてホモ系統であることを確認した系統を使用した。

植物の育成は、滅菌した種子を 2 日間 4 °C にて低温処理をした後、長日条件 (LD : 明期 16 時間 / 暗期 8 時間、80  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、22 °C) または短日条件 (SD : 明期 8 時間 / 暗期 16 時間、100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、22 °C) で育成した。側芽の表現型の観察には、バーミキュライト (ニッタイ株式会社) の小粒サイズと大粒サイズを約 1 : 1 の割合で植物育成ポットの上下に敷き詰め、その上に給水させた圧縮ピートモス (Jiffy-7; Jiffy) を一掴み程度置いた鉢を用意した。その鉢に種子を播種し、人工気象器 (LH300-RDSC; 日本医科機器製作所) 内で育成した。発現解析には、1/2 MS 培地 (0.5 % ショ糖、0.8 % 寒天を含む) 上で、人工気象器 (LH220S、日本医科器械製作所) 内で育成した。

また、一過的発現系では、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana* Domin)

を用いた。ベンサミアナタバコはバーミキュライト（ニッタイ株式会社）の小粒サイズと大粒サイズを約1:1の割合で植物育成ポットの上に敷き詰め、その上に給水させた圧縮ピートモス（Jiffy-7; Jiffy）を一掴み程度置いた鉢を用意した。その鉢に種子を播種し、栽培棚にて恒明条件下（40  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ）、22°Cで育成した。

#### プラスミドコンストラクト

本研究で作出したプラスミドコンストラクトを表1に示す。またプラスミドコンストラクト作成に使用したプライマー配列を表2に示す。

#### 酵母ツーハイブリッド法

1つ目のスクリーニングの bait として、pDEST32 ベクターに *FT* 遺伝子の全長 CDS を挿入したものを用いた。2つ目のスクリーニングのベイトとして、pCUY ベクターに *FT* 遺伝子の全長 CDS を挿入したものを用いた（Suzuki et al., 2001）。第1章における TCP 蛋白質と FT 蛋白質の相互作用の解析には酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) YRG-2 系統を用いた。第2章における酵母ツーハイブリッド法には AH109 系統を用いた。酵母の形質転換は STRATAGENE 社の GAL4 Two-Hybrid Phagemid Vector Kits に付属の INSTRUCTION MANUAL に従った。形質転換体の選抜には、SD (-Leu/-Trp) 培地を用いた。相互作用能の検出には、SD (-Leu/-Trp/-His) 培地を用いた。第2章での BRC1 を含む解析では非特異的な増殖を抑えるため、0.5 mM の 3-AT を添加した。

#### BiFC (Bi-molecular Fluorescence Complementation; split YFP) 法

各 BiFC 用ベクターはアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90 株) に導入した。BiFC 法においてはアグロバクテリウムの懸濁液を1:1の割合で混合した。アグロインフィルトレーション法（大門と荒木, 2007）により、ベンサミアナタバコの展開した本葉にアグロバクテリウムを注入した。蛍光観察は、アグロバクテリウム注入後36時間後に行った。葉の裏側を上にしてスライドガラスにのせた。試料はリン酸緩衝液で封入した。蛍光観察には、共焦点レーザー顕微鏡 FV500 (OLYMPUS) を用いた。EYFP 蛍光の観察のため、波長 515 nm の励起光を照射し、530 nm-630 nm の波長を検出した。

#### In vitro pull-down 法

各 pull-down 用プラスミドを *E. coli* BL21 (DE3) に導入し、GST、GST-BRC1、T7-FT の発現を行った。pull-down アッセイには、GST および GST-BRC1 を含む大腸菌抽出液を Glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare) と共に静置し、

20  $\mu$ l の懸濁液 (50%[w/v]) を 10  $\mu$ l の T7-FT を含む大腸菌抽出液と 220  $\mu$ l の NETN buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP40) と混合し、4°C で 2 時間緩やかに混和した。ビーズは NETN buffer で 5 回完全に洗浄し、SDS-PAGE に供した。その後、ナイロンメンブレンにブロッティングを行い、T7-FT 蛋白質を検出した。検出は Image Quant LAS 4000mini (GE Healthcare)により、anti-T7 抗体 (Novagen) と ECL plus (GE Healthcare) を用いて行った。

### GUS ( $\beta$ -glucuronidase) 染色

植物体を氷冷した 90%アセトンを用いて 10 分間固定した後、GUS 染色液 (0.5 mg/mL X-Gluc, 50mM リン酸緩衝液, pH7.2, 5 mM フェロシアン化カリウム、5 mM フェリシアン化カリウム、0.2% TritonX-100) を添加し、10-15 分減圧した。試料は 37°C、暗所において 24 時間染色した。染色後、70%エタノールにより反応を停止させた。酢酸：エタノール 1：6 混合液によりクロロフィルを除去し、観察を行った。莖頂部の切片の観察の際には、エタノールで数日かけて脱水を行った後、Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, Germany) に包埋した。Technovit 7100 に包埋した試料を、ミクロトーム (RM2155, Leica, Germany) を用いて、厚さ 8  $\mu$ m の切片を調製して観察を行った。

### 単一葉熱処理と FT-EGFP 蛍光の検出

長日条件下において 22 日間育成した *HSP::FT-EGFP* 形質転換体を用いて熱ショック処理を行った。展開した第 6 葉を、約 38°C に加熱した銅板とスライドガラスの間に水とともに挟み、ZT=13~15 で 2 時間の熱処理を加えた。銅板の加熱は、シリコンラバーのヒーターを銅板の下に固定し、温度制御装置 (SHM-CONT2, 旭テクノグラス, 日本) を用いて行った。側芽での蛍光の検出は、熱処理後 24 時間で切片を作製し、蛍光蛋白質の検出を行った。切片は 5% 寒天(PBS)に組織を包埋し、ビブラトーム (スーパービブラトーム VIB-1500、盟和商事) を用いて、80  $\mu$ m の切片を調製した。蛍光観察には、共焦点レーザー顕微鏡 FV500 (OLYMPUS) を用いた。EGFP 蛍光の観察のため、波長 488 nm の励起光を照射し、500 nm-600 nm の波長を検出した。

### 側芽の発達段階の解析

植物体はそれぞれ①花芽が肉眼で観察できる (Before bolting)、②主軸が 1 cm 抽茎 (1 cm bolting)、③主軸が 5 cm 抽茎 (5 cm bolting) まで育てた。観察は、26G x 1/2" の注射針 (NN-2613S, Terumo, 日本) と柄付き針を用い、実体顕微鏡 (MZ16, Leica, Germany) 下において行った。側芽の発達段階は、Aguilar-Martínez

et al., (2007)における解析を参考に、以下の7つの段階に分けた。Reproductive, 萼原基を持つ花芽が見られる; Vegetative3, 側芽の葉原基に発達したトライコームが観察される; Vegetative2, 側芽の葉原基に発達中のトライコームが観察される; Vegetative1, 分裂組織よりも大きい葉原基が観察されるが、トライコームは観察されない; Leaf primordia, 最初の2つの葉原基が観察されるが、分裂組織よりも小さい; Meristem, 葉原基がない分裂組織が観察される; Empty, 分裂組織が観察されない。

#### リアルタイム RT-PCR による遺伝子の発現解析

側芽での遺伝子発現解析には、24日間短日条件で育成した植物を長日条件に移した後、13日、16日、19日でそれぞれサンプリングした。ロゼット葉腋をできるだけ多く含む試料として、主軸の花序と葉、背軸と根を取り除いた。茎頂での発現解析には、長日条件下で育成した7日目の植物体をサンプリングした。茎頂をできるだけ多く含む試料として、展開した葉と背軸、根を取り除いた。RNA抽出は TRIzol 試薬 (Invitrogen, USA) を用いて抽出した。逆転写反応は RNAase-free DNase I (Invitrogen, USA) で前処理をした全 RNA (0.5 µg) を用いた。逆転写反応は、Transcriptor (Roche Applied Science) を用いて全量 20 µL の反応系で行った。反応後、30倍に希釈した cDNA を 3 µL ずつ解析に用いた。定量的 RT-PCR は CFX96 system (Bio-Rad Laboratories) と SYBR green I を用いて行った。解析に使用したプライマーを表3に示す。定量的 RT-PCR の結果は、*ASCORBATE PEROXIDASE 3 (APX3)* [Hazen et al., 2005] と *REGULATORY PARTICLE TRIPLE-A 1A (RPT1a)* [Michael et al., 2008]、*THIOREDOXIN H-TYPE 3 (TRX3)* [Michael et al., 2008] の幾何平均で標準化し、9回 (生物学的反復3回×技術的反復3回) の平均として示した。内部標準として使用した遺伝子は、9つの候補遺伝子から Vandesompele ら (2002) の方法に従って決定した。

## 結果

### 第1章. FT と相互作用する新奇転写因子の探索

#### 1. 転写因子ライブラリを用いた酵母ツーハイブリッドスクリーニング

FT 蛋白質と相互作用する新奇転写因子を探索するため、酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングを行った。スクリーニングに転写因子ライブラリを用いることで、シロイヌナズナのゲノムに存在する転写因子との相互作用を網羅的に調べた。転写因子ライブラリは2つの研究室が独立に作成した2種類のライブラリを利用した。第一のスクリーニングとして、University of California at San Diego の Steve A. Kay 教授の研究室において作出されたライブラリを用いた (Pruneda-Paz et al., 2009)。シロイヌナズナゲノムには約 2000 種 (例えば、Iida ら[2005]によると 1968 種) の転写因子が含まれているとされているが、このライブラリには解析時において 1729 種の転写因子が含まれていた。スクリーニングは、BD-FT を bait としてレポーター遺伝子である  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を Agilent Integrated Systems robot (BioCell 1200) を用いて測定した。本研究では、シグナルの値が全体の平均よりも 2 倍以上高いものを候補とし表 4 に示した。その結果、64 種の転写因子が FT 相互作用因子候補として得られた。

次に、産業技術総合研究所の高木優教授の研究室で作成された転写因子ライブラリを用いて独立にスクリーニングを行った (Mitsuda et al., 2010)。このライブラリには解析時に 1503 種の転写因子が含まれていた。ヒスチジンアッセイにより得られた陽性コロニーからプラスミドを回収し、シーケンスを調べることで候補因子を特定した。特定された因子と bait である BD-FT をともに酵母に再導入し、結果の再現性を調べた。その結果、10 種の転写因子について、バックグラウンドの生育が低く、選択培地上で再現性よくコロニーの生育が見られた (表 5)。

#### 2. FT と新奇相互作用因子との相互作用における 14-3-3 の必要性

FT 蛋白質の既知の相互作用因子である FD 蛋白質は、FT 蛋白質とは直接結合せず、14-3-3 蛋白質を介して相互作用していることが示唆されている。14-3-3 蛋白質との相互作用に重要な FT 蛋白質上のアミノ酸が既に明らかになっており、これらのアミノ酸に変異を導入すると、FT 蛋白質は 14-3-3 および FD 蛋白質との相互作用能を失う (Pnueli et al., 2001; Taoka et al., 2011)。本研究で得られた候補因子に対しても、14-3-3 蛋白質を介在した結合を行っている可能性があると考えられた。そこで、14-3-3 蛋白質との相互作用能を失う変異型 FT を用い

て酵母ツーハイブリッド法を行い、第2のスクリーニングで得られた10種の転写因子を対象として相互作用の有無を調べた(図1)。その結果、HSFA7AとbZIP30は14-3-3蛋白質と相互作用できない変異型FT(P94LおよびG102D)とは相互作用能を持たないことがわかった。したがって、この2種の転写因子は14-3-3蛋白質を介してFT蛋白質と相互作用する可能性があると考えられた。その他の因子は少なくともどちらかの変異型FTとの相互作用を示しており、14-3-3蛋白質を介した結合をしている可能性は低いと考えられた。

### 3. FTとTCP転写因子群との相互作用の解析

FT蛋白質と相互作用する転写因子を探索した結果、候補因子の中にTCP転写因子が多く含まれていることがわかった(表4、表5)。TCP転写因子は花の非対称性や葉の形態、側芽の発生など、様々な発生現象に関わることが報告されている(Luo et al., 1996; Luo et al., 1999; Nath et al., 2003; Doebley et al., 1995)。そのため、FT蛋白質とこれらの形態形成との関係をつなぐ因子であることが推測された。しかし、これらの機能が明らかになっているTCP転写因子について、スクリーニングに用いたライブラリに含まれていないものが存在したため、個別に相互作用を検討することとした。相互作用を検討したTCP転写因子は、花の非対称性に関わるキンギョソウのCYCに最も近いTCP1(Cubas et al., 2001)、葉の形態に関わるTCP2、TCP3、TCP4(Palatnik et al., 2003; Koyama et al., 2007; Efroni et al., 2008)、側芽の発生に関わるTCP12(BRANCHED2 [BRC2])、TCP18(BRANCHED1 [BRC1]) (Aguilar-Martínez et al., 2007)、細胞分裂活性に関わるTCP20(Li et al., 2005)である。酵母ツーハイブリッド法により相互作用を調べた結果、TCP1、TCP3、TCP4、TCP18が相互作用を示した(図2)。TCP20はバックグラウンドが高く、酵母ツーハイブリッド法での評価は困難であった。さらに、植物細胞内での相互作用を検証するために、酵母ツーハイブリッド法で相互作用が見られたTCP転写因子に対して、BiFC法によりFT蛋白質との相互作用を調べた。BiFC蛍光はベンサミアタバコ(*Nicotiana benthamiana*)の葉における一過的発現系を用いて、表皮細胞で観察した。よりその結果、TCP1を除くTCP3およびTCP4、TCP18とFTとの組合せにおいてBiFC蛍光が見られた(図3)。また、TCP20蛋白質についてもBiFC法により相互作用を検証した結果、相互作用を示す蛍光が見られた。

## 第2章 側芽におけるフロリゲンFTの活性調節機構の解明

第1章で得られた候補の中で、TCP18(*BRC1*; 以下*BRC1*と表記)遺伝子は、

複数の内的・外的要因から発現制御を受け、側芽の発生を抑制することが報告されており、側芽発生の統合遺伝子として位置づけられている (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007; Finlayson et al., 2010; González-Grandío et al., 2013)。したがって、BRC1 蛋白質は FT 蛋白質との相互作用を介して、花成とそれに伴った植物の形態変化の 1 つである側芽の発生を結びつける因子としての働きを持つことが期待された。そこで、*BRC1* 遺伝子と側芽の発生に注目してその後の解析を進めた。

## 1. BRC1 と FT との相互作用についての解析

### 1-1. BRC1 蛋白質と FT 蛋白質、およびその相同蛋白質間の相互作用

第 1 章で明らかになったように、BRC1 蛋白質は FT 蛋白質と相互作用するが、BRC1 蛋白質と側枝の伸長に対して部分的に冗長的に働く TCP12 (BRC2; 以下 BRC2 と表記) 蛋白質は、酵母ツーハイブリッド法において FT 蛋白質との相互作用を示さなかった (図 2)。また、FT 蛋白質の相同蛋白質である TSF 蛋白質は FT 蛋白質と冗長的に花成を促進する一方で、TFL1 蛋白質は花成を抑制することが知られている。そこで、これらの相同蛋白質を含めて、BRC1 蛋白質および BRC2 蛋白質との相互作用能を調べた (図 4)。その結果、TSF 蛋白質は BRC1 蛋白質との相互作用を示したが、TFL1 蛋白質は示さなかった。また、BRC2 蛋白質は、これらの FT 相同蛋白質とは相互作用を示さなかった。したがって、BRC1 蛋白質は花成を促進する FT 蛋白質や TSF 蛋白質とは相互作用するが、抑制する TFL1 蛋白質とは相互作用しないと考えられる。また、BRC1 蛋白質と BRC2 蛋白質では FT 相同蛋白質に対する相互作用能に分化が見られることが示唆された。

### 1-2. FT と BRC1 との相互作用における 14-3-3 介在の有無

FT 蛋白質と既知の相互作用因子である FD 蛋白質との相互作用は 14-3-3 蛋白質によって媒介されている。BRC1 蛋白質と FT 蛋白質との相互作用にも 14-3-3 蛋白質が介在するかについて、変異型 FT を用いて調べた。用いた変異型 FT は、既知の *ft* および *ft1* 変異体において見られるアミノ酸置換を施した変異型 FT のうち、14-3-3 蛋白質との相互作用が失われる 3 種の変異型 FT (T66I、P94L、G102D) と 14-3-3 蛋白質との相互作用が保持される P75L の計 4 種である。酵母ツーハイブリッド法による解析の結果、BRC1 蛋白質はこれらのどの変異型 FT に対しても相互作用を示した (図 5A)。

一方、FD 蛋白質は典型的な 14-3-3 認識サイトとされる K-X-X(S/T)-X-P に相当するアミノ酸配列を持っており、この配列中のスレオニンがリン酸化されることで 14-3-3 蛋白質により認識されていることが示唆されている (Taoka et al.,

2011; Yaffe et al., 1997)。BRC1 のアミノ酸配列中にも、14-3-3 の認識部位になり得る配列 K-X-X-X-S-X-P に相当する配列が存在する (図 5 B)。そこで、この配列のうち最も重要と考えられるセリンをアラニンに置換したアミノ酸置換型 BRC1 (S390A) と FT との相互作用を調べた。その結果、S390A は野生型 BRC1 と変わらず FT 蛋白質と相互作用することが明らかになった(図 5 A)。

さらに、BRC1 蛋白質が FT 蛋白質と直接的に相互作用するかについて調べるために、大腸菌で発現させた GST-BRC1 および T7-FT 融合蛋白質を精製し、pull-down 法により両蛋白質の相互作用を調べた。その結果、コントロールである GST 蛋白質では T7-FT 蛋白質は検出されなかったが、GST-BRC1 蛋白質を用いた場合に T7-FT 蛋白質が検出され、BRC1 蛋白質と FT 蛋白質との相互作用が直接的であることが示唆された (図 6)。

以上の結果により、FT 蛋白質と BRC1 蛋白質との相互作用には 14-3-3 蛋白質が介在しておらず、直接的に相互作用していることが示唆された。

### 1-3. BRC1 における FT との相互作用に重要な領域

次に BRC1 蛋白質における FT 蛋白質との相互作用部位を明らかにするために、BRC1 蛋白質の部分配列を用いて FT 蛋白質との相互作用を調べた。BRC1 蛋白質は、N 末端側から見て 149 番目から 207 番目のアミノ酸残基から成る TCP ドメインを持つ。TCP ドメインはその一次配列から TCP ドメインに特有の塩基性-ヘリックス-ループ-ヘリックス (bHLH) 構造を取り、この領域が DNA に結合すると考えられている (Kosugi and Ohashi, 1997; Cubas, 2002)。また、BRC1 蛋白質を含む一部の TCP 転写因子は、TCP ドメインの他に保存された塩基性アミノ酸残基に富む R ドメインを持つ (Cubas, 2002)。その他の領域がどのような機能ドメインや構造から成っているかについては知見が得られていない。そのため本研究では、BRC1 蛋白質の N 末端側から削り込んだコンストラクト ( $\Delta$ N1-74、 $\Delta$ N1-138、 $\Delta$ N1-148、 $\Delta$ N1-207) および C 末端側から削り込んだコンストラクト ( $\Delta$ C408-433、 $\Delta$ C306-433、 $\Delta$ C287-433、 $\Delta$ C208-433、 $\Delta$ C149-433)、TCP ドメインのみのコンストラクトを用いて、FT 蛋白質との相互作用に必要な領域を探索した (図 7)。

N 末端側を削り込んだコンストラクトについては、開始メチオニンから 74 アミノ酸を失った BRC1 ( $\Delta$ N1-74) において FT 蛋白質との相互作用が見られなくなった。さらに多くのアミノ酸を失った BRC1 ( $\Delta$ N1-138、 $\Delta$ N1-148、 $\Delta$ N1-207) でも同様の結果だった。一方で、C 末端側を削り込んだコンストラクトでは、欠失を施しても FT 蛋白質との相互作用を示す BRC1 ( $\Delta$ C408-433、 $\Delta$ C306-433、 $\Delta$ C287-433) が存在した。R ドメインを含む領域を失っている  $\Delta$ C287-433 についても、FT 蛋白質との相互作用を示したため、R ドメインは

FT 蛋白質との相互作用に必要でないことが明らかになった。しかし、さらに TCP ドメインの直後または TCP ドメイン全体までアミノ酸を失うと FT 蛋白質との相互作用を示さなくなった ( $\Delta C208-433$ 、 $\Delta C149-433$ )。また、TCP ドメイン単独では FT 蛋白質との相互作用を示さなかった。以上の結果から、FT 蛋白質との相互作用に必要な十分な領域は特定できなかったが、N 末端側の領域が比較的重要であること、相互作用に必要な領域が TCP ドメインを含む広い範囲に渡っていることが明らかになった。

#### 1-4. FT における BRC1 との相互作用に必要なアミノ酸

次に、BRC1 蛋白質との結合に重要な FT 蛋白質側の領域の特定を試みた。1-2 項の結果により、BRC1 蛋白質は FD 蛋白質とは異なり、これまで明らかになっていない新たな結合様式で FT 蛋白質と相互作用していることが示唆された。そこで、アラニンスキャンにより BRC1 蛋白質との相互作用に必要なアミノ酸の特定を行った。BRC1 蛋白質は FT 相同蛋白質である TFL1 蛋白質との相互作用を示さなかったため、FT 蛋白質と TFL1 蛋白質で保存されていないアミノ酸が相互作用に重要であると考えられた。そのため、FT と TFL1 蛋白質とのアライメントを取った際に異なるアミノ酸をアラニンスキャンの対象とした (図 8)。

BRC1 蛋白質との相互作用を調べた 46 種のアミノ酸置換型 FT のうち、ポジティブコントロールとして用いた 14-3-3 (GRF3) 蛋白質との相互作用を示したのが 37 種であった。そのうち、BRC1 蛋白質との相互作用を欠失していたアミノ酸置換型 FT が 7 種存在した。逆に、BRC1 蛋白質との相互作用を示すが GRF3 蛋白質との相互作用を示さないアミノ酸置換型 FT は 1 種のみ (G57A) であった。FT 蛋白質はすでに Ahn ら (2006) により X 線結晶構造解析が成されており、蛋白質のほぼ全長にわたる PEBP ドメインにより球状の立体構造を取っていることが明らかになっている。本研究で明らかになった BRC1 蛋白質との相互作用に必要なアミノ酸残基の位置を FT 蛋白質の立体構造モデル上に示すと、1 つのアミノ酸残基 (V70) を除いて、球状の FT 蛋白質の外側に露出した領域に存在しており、大きく 2 つの領域に集中して存在していることがわかった (図 8C)。これらの領域は BRC1 蛋白質との相互作用に直接的に関わっている可能性が高いと考えられる。

#### 2. FT の側芽における存在の有無

*BRC1* 遺伝子は側芽で特異的に発現することが報告されているため、シロイヌナズナ植物体内での FT 蛋白質と BRC1 蛋白質との相互作用部位は側芽であると

予想される (Aguilar-Martínez et al., 2007)。本節では、側芽における FT 蛋白質の存在の有無について、FT 遺伝子が側芽で発現している、または葉で発現した FT 蛋白質が側芽へ移動するという 2 つの可能性を考え、それぞれについて検討した。

### 2-1. FT 遺伝子の側芽での発現解析

FT 遺伝子は子葉および本葉の周縁部の篩部伴細胞での発現が報告されているが、側芽での発現を調べた報告はない。そこで、*ft* 変異体の相補能を持つ約 8 kb の FT ゲノム領域において、FT 遺伝子のストップコドンに GUS 遺伝子で置き換えた配列を導入した *gFT:GUS* 形質転換体を用いて、FT 遺伝子の側芽での発現の有無を調べた (Notaguchi et al., 2008; Hiraoka et al., 2013)。この植物体に対して GUS 染色を行うと、これまでの報告と同様に子葉や本葉の周縁部の維管束で染色が見られた (図 9 A)。そこで、寒天包埋切片 (厚さ 80  $\mu\text{m}$ ) を作成し、側芽について観察を行った。茎生葉の周縁部で染色が見られるような切片においても、側芽での染色は見られなかった (図 9 B)。より詳細に組織を観察するために、樹脂切片 (厚さ 5  $\mu\text{m}$ ) を作成し、観察を行ったところ、茎生葉の側芽、ロゼット葉の側芽ともに FT 遺伝子の発現は見られなかった (図 9 C、D)。暗視野において同様に観察を行ったが、弱い染色も見られなかった (図 9 E、F)。以上の結果から、FT 遺伝子は側芽においては発現していないことが示された。

### 2-2. 葉で発現した FT の側芽への移動能

FT 蛋白質は長距離移動能を持ち、葉で発現した FT 蛋白質が茎頂分裂組織へと移動して花成を引き起こすことが知られている。そこで、葉で発現した FT 蛋白質が側芽へも移動する可能性があると考えた。この可能性を検証するため、*pHSP18.2:FT-EGFP* 形質転換体を用いた。*HSP18.2* プロモーターは、熱処理により遺伝子の発現を誘導する (Takahashi and Komeda, 1989)。これまでに本研究室において、銅板を熱し、その上で葉を水に浸しスライドガラスで挟み込むことによって、葉身特異的に遺伝子の発現を誘導する系が確立されている (Notaguchi et al., 2008; 図 10)。これらの形質転換体と誘導系を用いて、FT-EGFP 融合蛋白質を葉身特異的に発現させ、側芽で EGFP 蛍光の検出を行うことで、葉から側芽への FT 蛋白質の移動能の検証を行った。

まず、*pHSP18.2:FT-EGFP* 形質転換体に対して単一葉身熱処理を行い、FT-EGFP 蛋白質の発現が誘導されるかを確認した (図 10)。1 枚の葉身に対して 2 時間の熱処理後、24 時間後にその葉を観察したところ、表皮細胞において一様に EGFP 蛍光が観察された (図 10 A)。また、ハンドセクションを作成し観察したところ、内部の細胞層でも発現が確認され、維管束組織において

も強い蛍光が確認できた (図 1 0 B)。そこで、同様に 1 枚の葉身に対して 2 時間の熱処理を行い、24 時間後に熱処理を行った葉の基部についた側芽の寒天切片を作成し観察を行った。その結果、側芽内部の維管束組織においても EGFP 蛍光が検出されたため、FT 蛋白質は側芽内部へも移動することが明らかになった (図 1 1 A)。また、熱処理の終了直後に誘導を行った葉身を切り落とし、同様の観察を行ったが、蛍光は観察されなかったため、FT-EGFP 蛋白質は側芽において誘導されておらず、葉で発現したものが移動したことが確かめられた (図 1 1 B)。

### 3. *brc1* 変異体の表現型解析

2 節により葉で発現した FT 蛋白質は側芽にも移動することが明らかになり、BRC1 蛋白質と側芽において相互作用することが示唆された。この相互作用の意義を明らかにするために、*brc1-2* 変異体を Arabidopsis Biological Resource Center から取り寄せ、その表現型を解析した。*brc1* 変異体は既に、子葉の葉腋にあたる位置での異所的な側芽の形成や、側芽の発達亢進、側枝の伸長数の増加などの表現型が報告されていた (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007)。その中でも側芽の発達に注目することで、相転換を促進する機能を持つ *FT* 遺伝子との関わりについて調べた。

#### 3-1. *brc1-2* 変異体における側芽の発達段階

Aguilar-Martínez ら (2007) の報告で *brc1* 変異体では側芽の発達段階が野生型植物と比べて進んでいることが明らかになっていた。しかし、播種後 18 日という 1 つのタイムポイントのみでの観察であったため、時間経過による発達の進み方の違いについては不明であった。そこで、側芽の発達開始後から経時的な側芽の発達の様子を、野生型植物と *brc1-2* 変異体で比較した。シロイヌナズナの野生型植物を長日条件下で生育させた場合には、側芽の発達は花成に伴って開始されることから、①主軸の花芽が肉眼で確認できるようになった日、②主軸が抽臺し 1 cm に達した日、③主軸が抽臺し 5 cm に達した日の 3 つのタイムポイントで観察を行った (図 1 2)。

その結果、①のタイムポイントでは Aguilar-Martínez ら (2007) の報告にあった播種後 18 日目の結果とほぼ同様の結果となった (図 1 2 A)。野生型植物では上位の節に形成された数個の側芽が生殖成長相へと移行し花芽を形成していた。より下位の節についた側芽では花芽は観察されず、より上位の側芽が下位の側芽よりも発達が進んでいるという傾向が見られた。一方で *brc1-2* 変異体では、野生型植物と比較してより多くの側芽が生殖成長相へと移行していた。また、下位の節も一様に発達が進んでいる傾向が見られた。また、低い頻度ではある

が、子葉の葉腋にあたる部位に異所的な側芽の形成が見られることも確認された。②のタイムポイントでは、野生型植物、*brc1-2* 変異体ともに①と比較して側芽の発達の進行が見られた。しかし、生殖成長相に移行した側芽の割合は、野生型植物では形成された側芽の半分程度であったのに対して、*brc1-2* 変異体ではほぼすべての側芽が生殖成長相へと転換していた。さらに③のタイムポイントでは、野生型植物においてはわずかに側芽の発達段階が進んだのみで、下位の側芽は栄養成長相のまま留まっていた。*brc1-2* 変異体は 1 cm 抽臺時でほぼすべて生殖成長相に移行していたため、発達段階についてこれ以上の変化は見られなかった。しかし、その後の側枝の伸長の様子を観察すると、先行研究で報告があったように、*brc1-2* 変異体において伸長する側枝の数が増加していた (図 1 2B)。

### 3-2. *brc1-2* 変異体における側芽の相転換のタイミング

3-1 項で *brc1-2* 変異体において側芽の発達が進んでいることが確認され、さらに野生型植物では下位の側芽が比較的長期間にわたって栄養成長相を保っているのに対して、*brc1-2* 変異体ではほぼすべての側芽が短期間で生殖成長相に移行することが明らかになった。そこで、次に *brc1-2* 変異体の側芽の相転換のタイミングについて調べた。

シロイヌナズナにおいては、主軸および側枝は相転換を行うと、分裂組織から形成される側生器官が葉から花へと変化する。そのため、相転換のタイミングは分裂組織が形成した葉の枚数を指標として利用することが可能であると考えられる。そこで、野生型植物および *brc1-2* 変異体の側枝が形成した葉数を側枝の伸長後に計数し、比較した (図 1 3)。側枝に形成される葉数は側枝の形成された節の位置によって大きく異なったため、節ごとに分けて平均を求めた。また、ロゼット葉腋に形成された側枝には、主軸のロゼット葉にあたると思われる、節間がほとんど伸長していない葉が見られた。そのため、これらを側枝のロゼット葉として茎生葉と分けて計数した。野生型植物と比較すると、*brc1-2* 変異体では調べたすべての側枝について葉数の減少が見られた (図 1 3)。この結果は、*brc1-2* 変異体では側芽の相転換が早まっていることを示すものと考えられた。さらに、*BRC1* 遺伝子の開始コドンの上流約 4.6 kb と終止コドンの約 1.5 kb 下流を含むゲノム領域を *brc1-2* 変異体背景に導入すると、この側枝の葉数の減少は野生型並に回復したため、側枝の葉数の減少は *BRC1* 遺伝子の欠損によるものであることが確かめられた (図 1 4)。

そこで、側芽の相転換のタイミングを遺伝子発現レベルで確認するために、*pAP1:GUS* 形質転換体を利用した。*AP1* 遺伝子は花芽分裂組織決定遺伝子であり、相転換に伴って花芽原基において特異的に発現する (Hempel et al., 1997)。

*pAP1:GUS* を野生型 (Col) 背景および *brc1-2* 変異体背景に持つ植物体を、播種後 18 日目において GUS 染色し観察した。その結果、最も上位の側芽における *AP1* の発現は、野生型背景においては約半数の植物体でしか見られなかった (30 個体中 16 個体) のに対して、*brc1-2* 変異体背景ではほぼすべての個体で見られた (24 個体中 22 個体)。経時的な変化を調べるために、播種後 14 日目から 24 日目まで 2 日おきに GUS 染色し、染色される側芽の数を定量化した (図 1 5)。主軸の茎頂分裂組織では、すべての個体において 14 日目から 16 日目までに *AP1* の発現が観察された。側芽における染色は、どちらの遺伝的背景においても 16 日から 18 日目の間で見られ始めたが、染色された平均の数は *brc1-2* 変異体の方が有意に多かった (図 1 5 B)。この結果は、顕微鏡による側芽の発達段階の観察や、側枝の葉数の結果と一致し、*brc1-2* 変異体では側芽の相転換のタイミングが早まっていることが示された。

#### 4. 側芽の相転換における FT と TSF、TFL1 の役割と BRC1 との関係

3 節で示されたように、*brc1* 変異体では側芽の相転換が早まっていた。また、2 節で示したように、FT 蛋白質は側芽へも移動すると考えられる。本節では、*FT* および *TSF*、*TFL1* 遺伝子が側芽の相転換に関わるかについて検討し、*BRC1* 遺伝子との関係を遺伝学的に検討した。

##### 4-1. *ft* 変異体の側芽における表現型と *brc1* 変異との遺伝学的関係

FT 蛋白質は茎頂分裂組織において花成を促進することから、側芽分裂組織においても相転換に関わると考えられる。そこで、*brc1* 変異体の解析と同様に、*ft-2* 変異体に対しても側枝の葉数について定量化を行い、*brc1-2* 変異体との遺伝学的関係を調べた (図 1 6)。

その結果、*ft-2* 変異体では、側枝につく葉数が野生型植物と比較して増加していた (図 1 6 A)。この結果は、*ft* 変異体においては側芽の相転換が遅れていることを示唆する。同時に、側芽表現型における *FT* 遺伝子と *BRC1* 遺伝子の遺伝学的な関係を調べるため、二重変異体を作成し、その表現型を調べた。その結果、茎生葉に形成された側枝に関しては、*brc1-2;ft-2* 二重変異体は *ft-2* 単独変異体と同等の葉数を示した (図 1 6 A)。この結果は、茎生葉の側枝については、*brc1-2* 変異による相転換早化効果は機能的な *FT* 遺伝子を必要とすることを示す。一方で、ロゼット葉の側枝に関しては、*brc1-2;ft-2* 二重変異体は *ft-2* 単独変異体よりも葉数が少なくなった。ただし、*brc1-2* 変異体や野生型植物よりは多くの葉を形成した (図 1 6 A)。したがって、ロゼット葉に関しては、*brc1-2* 変異による相転換早化効果は *FT* 遺伝子のみには依存していないと考えられた。また、側

枝の伸長に関しては、*ft-2* 変異体のロゼット葉の側枝が伸長していないタイミングで、*brc1-2; ft-2* 二重変異体では複数の側枝の伸長が見られた (図 1 6 B)。したがって、側枝の伸長促進という *brc1* 変異の効果についても、*ft-2* 変異では抑圧できないと考えられる。

#### 4-2. *ft; tsf* 二重変異と *brc1* 変異との遺伝学的関係

*FT* 遺伝子には *FT* 遺伝子と同様に花成を促進する機能を持つ相同遺伝子である *TSF* 遺伝子が存在する。*FT* 遺伝子の発現していない短日条件下や *ft* 変異体背景では、*TSF* 遺伝子が花成促進に大きく寄与することが示されている。したがって、*brc1-2; ft-2* 二重変異体におけるロゼット葉腋の側芽の相転換の早化は *TSF* 遺伝子の働きによることが考えられた。そこで、*brc1-2; ft-2; tsf-1* 三重変異体を作成し、表現型を *brc1-2* 単独変異体、*ft-2; tsf-1* 二重変異体と比較した (図 1 7)。

これまでの変異体の場合とは異なり、*ft-2; tsf-1* 二重変異体および *brc1-2; ft-2; tsf-1* 三重変異体は、主軸の抽臺後 100 日を経過しても、ロゼット葉腋の側芽が花芽を形成せず、相転換するまでの葉数を計数することができなかつた。茎生葉腋の側枝については、*brc1-2; ft-2; tsf-1* 三重変異体は *ft-2; tsf-1* 二重変異体とほぼ同程度の葉数か、むしろ葉数が増加していた (図 1 7 A)。ロゼット葉の側芽を観察すると、*brc1-2; ft-2; tsf-1* 三重変異体の側芽は *ft-2; tsf-1* 二重変異体に比べて多くの葉を形成しており、発達が進んでいた (図 1 7 B, C)。しかし、花芽の形成や茎の伸長は見られず、相転換の早化という *brc1-2* 変異による効果が抑圧されており、その結果側枝の伸長も抑圧されていると考えられた。

#### 4-3. *tfl1* 変異と *brc1* 変異の遺伝学的関係

*TFL1* 蛋白質は *FT* 蛋白質と同様に 14-3-3 蛋白質を介して *FD* 蛋白質と結合し、花成を抑制すると考えられている (Bradley et al., 1997; Hanano and Goto, 2011)。*tfl1* 変異体は花成の早化が見られるだけでなく、抽臺後すぐに頂花を形成し、無限成長能を失ってしまうため、花序分裂組織を維持する機能も持つと考えられている。また、*TFL1* は側芽での発現も確認されており、*tfl1* 変異体では多くの側枝が単独の花に置き換わる表現型も見られるため、側芽分裂組織においても相転換および花序分裂組織の維持に関わると考えられる (Shannon and Meeks-Wagner, 1991; Alvarez et al., 1992)。

*tfl1* 変異と *brc1* 変異の遺伝学的関係を調べるため、*brc1-2; tfl1-17* 二重変異体を作成し、その表現型を調べた。長日条件下において育成した *tfl1-17* 変異体では多くの側枝が花へと変化してしまうため、側枝の葉数を指標にして比較することは困難であった。しかし、短日条件下において育成した場合には、*tfl1-17* 変

異体においても野生型で見られるような側枝が形成され、側枝には葉が形成された後に正常な花の形成が見られた。そこで、短日条件下において伸長した側枝についての葉数を定量化した (図 18)。

その結果、*tfl1-17* 変異体では、野生型植物と比較して側枝につく葉数の減少が見られた。また、短日条件下で育成した *brc1-2* 変異体においても側枝の葉数の減少が見られた。*brc1-2; tfl1-17* 二重変異体をこれらの単独変異体と比較すると、さらに葉数の減少が見られ、相加的な表現型を示すことがわかった。したがって、TFL1 蛋白質は FT 蛋白質とは異なり BRC1 蛋白質との相互作用を示さなかったことと併せて、TFL1 蛋白質は BRC1 蛋白質と独立に側芽の相転換を抑制していると考えられた。

## 5. FT 下流遺伝子の側芽の相転換に対する役割と *BRC1* との関係

FT および TSF、TFL1 蛋白質は茎頂分裂組織における機能と同様に、側芽においても相転換に関わっていると考えられた。そこで次に、側芽の相転換に対しても、茎頂分裂組織において既知の FT 下流遺伝子が関わっているかを調べた。

### 5-1. *FD* 遺伝子の側芽での発現と *fd* 変異体の表現型

*FD* 遺伝子は RNA *in situ* hybridization により、茎生葉腋に形成された側芽分裂組織においても発現していることが示唆されている (Abe et al., 2005)。本研究ではさらに、*pFD:GUS* 形質転換株を用いて *FD* 遺伝子のロゼット葉腋の側芽での発現を検証した (図 19)。その結果、ロゼット葉腋の側芽についても *FD* 遺伝子の発現が確認された。したがって、*FD* も側芽の相転換に関わっており、茎頂分裂組織と同様に FT 蛋白質との複合体を形成し機能する可能性が示唆された。

次に、*fd-1* 変異体および *brc1-2; fd-1* 二重変異体を用いて側枝の葉数を定量化した (図 20)。その結果、*fd-1* 変異体では、茎生葉腋の側枝の葉数は野生型と比較して増加していたが、ロゼット葉腋では野生型とほぼ同等の葉数であった。*brc1-2; fd-1* 二重変異体は、形成葉腋、ロゼット葉腋の側枝どちらにも、*fd-1* 単独変異体とほぼ同数の葉を形成した。

以上の結果を総合すると、*FD* 遺伝子も *FT* 遺伝子と同様に側芽の相転換に関わっており、*BRC1* 蛋白質の側芽相転換抑制機能は、*FD* 蛋白質を介した *FT* 蛋白質の機能を抑制している可能性が高いと考えられる。ロゼット葉腋の側枝の葉数が *fd* 変異体と野生型で違いがなかった原因は不明であるが、冗長的な遺伝子がロゼット葉腋の側枝で相対的に大きな役割を果たす可能性や、*FD* 蛋白質は *TFL1* 蛋白質による相転換抑制機能も媒介すると考えられるので、ロゼット葉腋の側芽では *TFL1* 蛋白質に対する効果がより強く表出した可能性も考えられる。

どちらにしても、*brc1-2; fd-1* 二重変異体では *brc1-2* 単独変異体のような葉数の顕著な減少が見られなかったため、*brc1* 変異による側芽の相転換早化効果は *FD* 遺伝子を介しているものと考えられる。

### 5-2. *FT* 下流遺伝子の発現に対する *brc1* 変異の効果

*BRC1* 蛋白質の側芽相転換抑制機能が *FT* 蛋白質を介しているとする、*FT* 下流遺伝子の発現に *BRC1* 蛋白質が影響を及ぼしていると考えられる。そこで、*brc1-2* 変異体の側芽において *FT* 下流遺伝子の発現を野生型植物と比較した。発現解析は、短日条件下で 24 日育成した植物体を長日条件下へと移行させ、*FT* 遺伝子の発現を誘導し行った。主軸の分裂組織における発現変動の影響を除くため、主軸が抽臺し始める移行後 13 日目から 16 日目、19 日目の植物体の主軸の花序（花茎、茎生葉、花芽を含む）および葉、地下部を取り除き、主にロゼット葉腋の側芽から成る試料から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により解析を行った。*FT* 遺伝子の直接的な下流遺伝子として *AP1*、*FUL*、*SOC1* 遺伝子の発現を調べた。加えて、*FT* 遺伝子とは独立の経路で働くと考えられている *LFY* 遺伝子の発現も調べた（図 2 1）。

その結果、移行後 13 日目で既に *FUL* 遺伝子と *LFY* 遺伝子は *brc1-2* 変異体において野生型植物よりも過剰に発現していた。その後の経過を調べると、*FT* 遺伝子の直接的な下流と考えられる *AP1*、*FUL*、*SOC1* 遺伝子は野生型植物では変化が見られなかったのに対して、*brc1-2* 変異体では徐々に発現が上昇した。*LFY* 遺伝子は、野生型植物での発現の上昇が見られた一方で、*brc1-2* 変異体では 13 日目以降の発現上昇は見られなかった。*LFY* 遺伝子は短日条件下においても発現が上昇していくことが報告されている (Blázquez et al., 1997)。また、*brc1-2* 変異体では側芽の形成および発達が早まっていると考えられる (Aguilar-Martínez et al., 2007)。したがって、移行後 13 日目における *LFY* 遺伝子の発現が *brc1-2* 変異体で高かったのは、側芽の発達の程度の差を表していると考えられる。一方で、13 日目で *AP1* や *SOC1* 遺伝子の発現が野生型植物と *brc1-2* 変異体で有意な差が見られなかったことから、どちらの遺伝的背景においても、このタイミングではほとんどの側芽は花成していないと考えられる。その後、*brc1-2* 変異体のみにおいて *FUL* 遺伝子を含めたこれらの *FT* 下流遺伝子が誘導されたことから、*brc1-2* 変異体でのみ急速な相転換が引き起こされたと考えられる。この結果は、*BRC1* 蛋白質が *FT* 蛋白質の機能を抑制しているという遺伝学的な解析から得られた結果と一致する。

### 5-3. *SOC1* と *BRC1* との遺伝学的関係

*SOC1* 遺伝子は、*FUL* 遺伝子や *SOC1* 相同遺伝子とともに側芽の発生に関わる

ことが報告されている (Melzer et al., 2008; Dorca-Fornell et al., 2011)。そこで、*SOC1* 遺伝子の側芽における機能と、*BRC1* 遺伝子との遺伝学的な関係を *soc1-2* 単独変異体および *brc1-2; soc1-2* 二重変異体を用いて調べた (図 2 2)。*soc1-2* 変異体は、野生型と比較して側枝の葉数が顕著に増加していたため、側芽の相転換は大きく遅れていると考えられた。しかしながら、*brc1-2; soc1-2* 変異体では、側枝の葉数は *soc1-2* 単独変異体と比較して顕著に減少しており、*brc1-2* 変異による側芽の相転換早化効果を完全には抑圧できていなかった。この結果は、*ft* や *fd* 変異とは対照的な結果である。以上のことから、*brc1* 変異による側芽の相転換早化効果は *SOC1* 遺伝子に完全には依存しないことが示された。*SOC1* 遺伝子は *FT* の下流遺伝子の 1 つと考えられているが、いくつかの経路が平行に機能しているため、*FT* 遺伝子の機能は *SOC1* 遺伝子に完全には依存していないと考えられている。*BRC1* 蛋白質が *FT* 蛋白質の機能を阻害していると考えると、*soc1* 変異によっては *brc1* 変異の効果が一部しか抑圧されないという結果と一致すると考えられる。

## 6. 茎頂で異所発現させた *BRC1* の効果

これまでの結果で、*BRC1* 蛋白質は側芽において *FT* 蛋白質の機能を抑制することで相転換を遅らせていること、この抑制される経路には茎頂分裂組織において既知の花成促進因子が含まれていることが示唆された。そこで、本来 *BRC1* 遺伝子が発現していない茎頂分裂組織において *BRC1* 遺伝子を発現させた場合にも、花成遅延効果が見られると予想された。既に Aguilar-Martínez ら (2007) により、*p35S:BRC1* 形質転換体が生産され、表現型の観察が行われていたが、花成時期に対する影響は報告されていない。*p35S:BRC1* 形質転換体では、植物体の著しい矮化や、葉序の乱れなどが観察されており、同時に育成した野生型植物との花成時期の比較が困難であった可能性が考えられる。

そこで本研究では、*FT* 蛋白質の機能部位に限定した *BRC1* 遺伝子の発現を行うため、*pFD:BRC1* 形質転換体を生産した。得られた 10 個体の T1 植物のうち、一遺伝子座に挿入されたと思われる系統が 6 系統存在した。そのうち 2 系統についてホモ系統が得られたため、解析に用いた。まず、実際に茎頂分裂組織において異所発現しているかを確認するために、長日条件下で 7 日間育成した個体から、茎頂分裂組織付近を切り出し、RNA を抽出した後、リアルタイム RT-PCR を行った。その結果、野生型では見られない *BRC1* 遺伝子の発現が形質転換体では見られており、異所発現が確認された (図 2 3)。

これらの形質転換体を野生型とともに長日条件下で育成し、その花成時期を、葉数を指標にして調べた。その結果、どちらの系統も野生型植物よりも有意に

遅咲きの表現型を示した (図 2 4)。また、*pFD:BRC1* 形質転換体は、芽生えの初期に本葉の展開の遅れが見られ、わずかな生育遅延が起こっていると考えられたが、*p35S:BRC1* で報告されていたような植物体の形態異常は見られなかった。生育遅延は播種後の日数で比較した場合には遅咲きの原因になり得るが、*pFD:BRC1* 形質転換体では葉数も増加していたため、茎頂分裂組織での FT の機能抑制を反映していると考えられる (図 2 4 B)。

## 考察

### 1. FT と相互作用する新奇転写因子

本研究の第1章では、転写因子ライブラリを用いたスクリーニングにより、FT 蛋白質の新奇相互作用因子を探索した。

本研究によって、FT 蛋白質と相互作用し得る転写因子が多く明らかになった。得られた候補の中には、先行研究において FT 蛋白質やその相同蛋白質を用いたスクリーニングにより得られている候補と重複するものが含まれていたため、これらの因子は FT 蛋白質と相互作用して機能する因子として有力であると考えられる。Liu ら (2012) は、シロイヌナズナの花序分裂組織および花芽を含む試料から cDNA ライブラリを作成し、FT 蛋白質をベイトとして酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングを行った。その結果、本研究で得られた候補と重複する因子として bZIP52、TCP8、TCP15、TCP22 を得ている (Liu et al., 2012)。また、Mimida ら (2011) は、リンゴ (*Malus domestica*) の FT 相同蛋白質である MdFT1 蛋白質を用いて酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングを行った結果、それぞれ VOZ1 および TCP2/TCP24、TCP3/TCP4 の相同蛋白質と考えられる MdVOZ1、MdTCP2、MdTCP4 を得ている (Mimida et al., 2011)。

また、本研究で行った転写因子ライブラリは、それぞれの転写因子を個別にクローニングしているため、発現量が少ないために cDNA ライブラリを用いたこれまでのスクリーニングでは得られなかったような候補が含まれていると考えられる。さらに、Liu ら (2012) の研究に代表されるように、これまでは FT 蛋白質の相互作用因子は茎頂分裂組織で発現している蛋白質に注目されてきた。本研究で得られた候補因子には、茎頂分裂組織では発現していない転写因子も含まれている可能性もある。実際に、シロイヌナズナのマイクロアレイデータベースである Arabidopsis eFP browser (Winter et al., 2007) において相互作用候補因子の発現パターンを調べてみると、発達中の種子で発現が高い因子 (AT3G11020、AT5G08630、AT4G37180 など) や、根の中心柱で発現が高い因子 (AT5G66300、AT1G05805、AT3G43430 など) など、これまで FT 蛋白質との関わりが指摘されてこなかった部位で発現している因子も多い。これらの因子が実際に植物体内で FT 蛋白質とともに働いているかについては不明であるが、本研究で得られた候補因子は、茎頂以外での FT 蛋白質の相互作用因子を探索する上でも重要な基礎となると考えられる。

FT 蛋白質は茎頂分裂組織において FD 蛋白質と複合体を形成し、*AP1* などの下流遺伝子の発現を誘導していると考えられている。イネにおける解析から、FT の相同蛋白質である Hd3a 蛋白質と OsFD1 蛋白質との相互作用は直接的ではなく、14-3-3 蛋白質を介していることがわかっている (Taoka et al., 2011)。シ

ロイヌナズナの FT 蛋白質と FD 蛋白質が 14-3-3 蛋白質を介して結合しているかについては直接的な証拠は未だ示されていないが、FT 蛋白質が 14-3-3 蛋白質と相互作用すること (Pnueli et al., 2005)、FD 蛋白質の機能に重要であることが示されているスレオニン残基が 14-3-3 蛋白質の結合配列と一致することなどから、おそらくイネの場合と同様の複合体を形成していると考えられる (Abe et al., 2005)。FT 蛋白質が 14-3-3 蛋白質を介して FD 蛋白質と相互作用することは、14-3-3 蛋白質が結合しうる様々な蛋白質と FT 蛋白質が結合する可能性を示唆している。

実際に、本研究の 2 つ目のスクリーニングによって得られた FT 相互作用因子候補のうち、2 種の転写因子が、14-3-3 蛋白質と結合できない変異型 FT 蛋白質との相互作用を失っていた。したがって、これらの因子は 14-3-3 蛋白質を介して FT 蛋白質と相互作用する可能性がある。その場合、これらの因子が FD 蛋白質の代わりに FT 蛋白質と相互作用していると考えられるため、FD 蛋白質に依存しない FT 蛋白質による下流遺伝子の転写制御メカニズムが存在している可能性がある。*fd* 変異が完全には *FT* 過剰発現体の早咲きを抑圧できないことなどから、FT 蛋白質には FD 蛋白質に依存しない花成促進経路が存在していると考えられる (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005)。また、*SOC1* 遺伝子は *FT* の直接の下流遺伝子と考えられているが、*fd* 変異体背景で FT 蛋白質を *HSP18.2* プロモーターにより誘導した場合でも、*SOC1* 遺伝子の明確な発現誘導が見られる (阿部、荒木; 本研究室における未発表データ)。したがって、少なくとも FT 蛋白質とともに *SOC1* 遺伝子の発現を誘導する FD 蛋白質以外の因子が存在することが示唆されている。今回得られた候補の中で、14-3-3 蛋白質依存的な FT 蛋白質の相互作用因子の中には、このような FD 蛋白質非依存的な FT 蛋白質の機能発揮に関わる因子が含まれている可能性があると考えられる。

一方で、2 つ目のスクリーニングで得られた残りの 8 種の転写因子は、14-3-3 蛋白質非依存的な FT 蛋白質との相互作用をしていると考えられる。これらの因子がどのように FT 蛋白質と相互作用しているかは不明であるが、14-3-3 蛋白質を介して結合している因子とは違い、FD 蛋白質と同時的に FT 蛋白質と相互作用している可能性もある。実際に、myb 様転写因子をコードする CCA1 と bZIP 型転写因子 HY5 が相互作用し、下流遺伝子を協調的に制御する例や、LOB ドメイン転写因子である LOB と bHLH048 が相互作用し、この相互作用によって LOB の DNA 結合能が低下するという報告もある (Andronis et al., 2008; Husbands et al., 2007)。FD 蛋白質とこれらの新奇相互作用因子についても、FT 蛋白質を介してより複雑な転写制御複合体を形成し、下流遺伝子の発現を制御している可能性があると考えられる。

本研究では、得られた候補因子に対して個別に解析を行うことはできなかつ

たが、T-DNA 挿入系統の表現型や発現パターンの解析などから、これらの因子の役割が明らかになることが期待される。また、同じファミリーから複数の因子が相互作用因子として得られたものも存在するため、これらの因子は FT 蛋白質との相互作用能が相同蛋白質間で保存されていると予想され、FT 蛋白質と相互作用して機能する可能性が高いと考えられる。これらの因子を優先的に解析することで、FT 蛋白質の機能発揮のメカニズムがより詳細に明らかになることが期待される。

スクリーニングにより複数候補が得られた TCP 転写因子に注目した解析を行った結果、BRC1 蛋白質が FT 蛋白質の新奇相互作用因子として得られた。BRC1 遺伝子は、トウモロコシ (*Zea mays*) において側枝の発生を抑制する遺伝子として同定された *Teosinte branched1 (Tb1)* の相同遺伝子として同定された (Doebley et al., 1997; Aguilar-Martínez et al., 2007)。シロイヌナズナにおいて BRC1 遺伝子は側芽で特異的に発現しており、その変異体の表現型から側芽の形成、発達、伸長を抑制する因子として機能していると考えられている (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007)。また、側枝の伸長を制御するオーキシンやサイトカイン、ストリゴラクトンなどの植物ホルモンの下流で機能していると考えられること、フィトクロムを介した光質による側枝の伸長制御にも関わっていることなどから、側芽発生の統合遺伝子としての役割が提唱されている (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson et al., 2010; González-Grandío et al., 2013)。また、シロイヌナズナには BRC1 の相同遺伝子として BRC2 遺伝子が存在する。brc2 変異体では brc1 変異体において見られるような顕著な側枝の伸長数の増加は見られないが、側枝間の競争を強める効果が示唆されている (Finlayson et al., 2010)。

BRC1 蛋白質は FT 蛋白質との相互作用を示したが、BRC2 蛋白質は FT 蛋白質との相互作用を示さなかった (図 4)。BRC1 蛋白質と BRC2 蛋白質間でアミノ酸のアライメントを取ると、TCP ドメインおよび R ドメインの配列は保存されているが、その他には保存されている領域がほとんど見いだせない (図 25)。BRC1 蛋白質の部分配列を用いた解析により明らかになったように、BRC1 蛋白質が FT 蛋白質と相互作用するために必要な領域は C 末端側を除くかなり広い範囲にわたっていた (図 7) が、重要と考えられる N 末端側の配列と TCP ドメインの後ろ側の配列が BRC2 蛋白質では BRC1 蛋白質と比べてかなり短くなっている (図 25)。これらの配列が変化することで、FT 蛋白質との相互作用能に対して違いが生まれたと考えられる。BRC1 相同遺伝子はトウモロコシだけでなく、イネやエンドウ、トマトにおいても同定されており、その側芽発生抑制機能が保存されていることが示されている (Takeda et al., 2003; Braun et al., 2012; Martín-Trillo et al., 2011)。これらの植物種において BRC1 相同蛋白質が FT 相同蛋白質との相互作用を保持しているか、BRC2 蛋白質のように失っているかにつ

いては興味深い課題である。

BRC1 蛋白質と BRC2 蛋白質の間で FT 蛋白質との相互作用能に違いが見られたのと同様に、FT 相同蛋白質間でも BRC1 蛋白質との相互作用能に違いが見られた。FT 蛋白質とともに冗長的に花成を促進させる TSF 蛋白質は BRC1 蛋白質との相互作用を示した (図 4)。一方で、花成抑制因子である TFL1 蛋白質は BRC1 蛋白質との相互作用を示さなかった (図 4)。実際に、FT 蛋白質と TFL1 蛋白質とのアミノ酸配列の違いに注目して解析を行った結果、BRC1 蛋白質との結合に必要な 7 つのアミノ酸残基が同定された。これらのアミノ酸残基は、FT 蛋白質の立体構造モデル上に示すと、大きく 2 つの領域にわかれて存在していることが示された (図 8C)。したがって、BRC1 蛋白質はこれらの 2 つの領域を介して FT 蛋白質と相互作用していると考えられる。BRC1 蛋白質上の FT 蛋白質との相互作用に必要な領域が広い範囲に及んでいたことや、相互作用に必要な十分な領域が特定できなかったことは、これらの 2 つの領域の両方が安定した結合に必要であることを示唆するのかもしれない。また、これら 7 つのアミノ酸は、そのすべてが FT 蛋白質と TSF 蛋白質の間で保存されているアミノ酸であったため、BRC1 蛋白質と TSF 蛋白質との相互作用は FT 蛋白質との相互作用と同様の様式に保存されているものと考えられる (図 26)。

## 2. フロリゲン FT と側芽分裂組織の相転換

本研究の第 2 章では、FT 蛋白質が側芽の相転換に関わっていること、BRC1 蛋白質がその機能を側芽特異的に抑制していることを示した。以下では、FT 蛋白質と側芽分裂組織の相転換について議論する。

### 2-1. FT 蛋白質の側芽への移動

これまでも既に、葉で発現した FT 蛋白質が、若い葉原基や胚軸を介して根の方向にも移動することが観察されていた (Corbesier et al., 2007; Jaeger and Wigge, 2007; Notaguchi et al., 2008)。しかし、シロイヌナズナにおいては、これらの部位への FT 蛋白質の移動能と、その部位での FT 蛋白質の機能を関連づける研究は行われていなかった。本研究では、相互作用因子の情報を基に側芽に注目した解析を行うことで、茎頂分裂組織以外における FT 蛋白質の役割を明らかにした。

FT 遺伝子は側芽では発現していなかったが、葉で発現した FT 蛋白質が側芽にも移動し得ることが示された (図 9、図 11)。FT 遺伝子は、葉の周縁部において、篩部伴細胞で特異的に発現している (Takada and Goto, ; Yamaguchi et al., 2005)。篩部伴細胞から篩管要素へと積み込まれた FT 蛋白質は、篩管を通過して

茎頂分裂組織を始めとする植物体の様々な部位に移動していると考えられる。若い葉原基や、根の方向にも移動が見られるといったこれまでの観察と併せて考えると、篩管内部においては特定の方向への FT 蛋白質の輸送が行われている可能性は低いと考えられる。しかし、移動先で FT 蛋白質が機能を持つならば、篩管から積み下ろされ、標的細胞へと細胞間移行を行う必要がある。例えば、茎頂分裂組織においては、FT 下流遺伝子と考えられる *AP1* 遺伝子の発現は分裂組織上部に位置する花芽分裂組織に限られるため、FT 蛋白質は分裂組織内部を移動していく必要がある。この過程に関しては、未だに有効な可視化系の確立がなされておらず、輸送の方法、経路や方向性、さらにはその制御の有無などの情報は全く得られていない。本研究で用いたレポーターである EGFP 融合蛋白質に関しても、*pSUC2:FT-GFP* により *ft* 変異体の遅咲き表現型が相補できるという報告がある (Corbesier et al., 2007) が、蛍光シグナルは茎頂分裂組織の下部での検出に留まっており、分裂組織内部の可視化には至っていない。本研究における側芽での FT-EGFP 蛍光の観察においても、側芽の維管束と思われる組織では強いシグナルが見られたが、分裂組織内部での明確なシグナルは得られなかった。したがって、実際に FT 蛋白質が *AP1* 遺伝子の発現部位まで到達し、そこで FD 蛋白質や BRC1 蛋白質と相互作用しながら機能の発揮を行っているかについては不明のままである。茎頂分裂組織においては、エピトープタグ (myc-FT) を用いた免疫染色による茎頂分裂組織内部での FT 蛋白質の動態の観察も行われているが、分裂組織内部の動態を観察するためには十分なシグナルを得られていると言えない状況である (Jaeger and Wigge, 2007)。FT 蛋白質の動態を細胞レベルで可視化する技術の開発は、茎頂分裂組織に限られない FT 蛋白質の機能を明らかにする上でも重要な課題であると考えられる。本研究室の根岸克弥氏により、GFP よりも分子量の小さい phiLOV 蛍光蛋白質を用いた FT 蛋白質輸送の可視化の試みなどが行われており、今後の研究の進展に期待したい。

## 2-2. 側芽相転換の制御

本研究による *brc1* 変異体の観察により、*BRC1* 遺伝子は側芽の相転換を抑制する機能を持つことが示された。これまでの *brc1* 変異体の解析では、*BRC1* 遺伝子は側芽の形成、発達、伸長を抑制する機能を持つとされていた (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson, 2007)。また、側枝の節数の減少も部分的にはあるが報告されていた (Finlayson et al., 2010)。本研究では、側芽の発達段階の経時的な観察、より多くの側枝について葉数の定量化、*AP1* 遺伝子やその他の FT 下流遺伝子の発現を野生型植物と *brc1* 変異体で比較することにより、*brc1* 変異体では側芽特異的に相転換が早まっていると結論づけた (図 1 2、図 1 3、図 1 5、図

21)。また、Aguilar-Martínez ら (2007) が報告していた、子葉での異所的な側芽の発生についても確認されたため、*BRC1* が側芽の形成を抑制していることも確認された (図 1 2)。したがって、*brc1* 変異体において側芽の発達が生型植物と比較して進んでいるという観察に関しては、相転換の早化が1つの要因となっていると考えられる。ただし、*ft; tsf* 二重変異体と *ft; tsf; brc1* 三重変異体との比較で明らかになったように、相転換を促進する *FT* および *TSF* 遺伝子の機能が欠失した状態であっても、*brc1* 変異体背景では、側芽の栄養成長相での発達が亢進されていた。したがって、*BRC1* は相転換以前にも側芽の発達を抑制する機能を持っており、これは *FT* 蛋白質や *TSF* 蛋白質に対する阻害効果とは独立した機能であると考えられる。側枝の伸長抑制効果についても同様に、生型植物においては、相転換した側芽がすべて伸長するわけではないのに対して、*brc1* 変異体ではすべての側芽が伸長しているように見えることから、*BRC1* は相転換の後に側枝の伸長を抑制する機能も持つことが示唆される。したがって、本研究で明らかになった *BRC1* の相転換抑制機能は *BRC1* の多面的な機能の一部を表していると考えられ、*BRC1* は側芽の発生を様々なタイミングで総合的に制御していると考えられる。

一方で、側芽にも移動することが示された *FT* 蛋白質は、側芽分裂組織の相転換に対しても促進的に働くと考えられる。*BRC1* 蛋白質と *FT* 蛋白質が相互作用することから、どちらかの蛋白質が相手の機能を抑制すると考えられた。*brc1; ft* 二重変異体および *brc1; ft; tsf* 三重変異体の解析において、*ft* (*ft; tsf*) 変異体背景では、*brc1* 変異による相転換の早化効果が見られなかったことから、*BRC1* 蛋白質が *FT* 蛋白質および *TSF* 蛋白質の機能を抑制しているというモデルが考えられた。また、茎頂分裂組織において *FT* 蛋白質と相互作用して花成を誘導する *FD* 蛋白質も側芽において発現していることが示唆されており、本研究でも確認された (Abe et al., 2005; 図 1 9)。*brc1* 変異による側芽の相転換の早化効果は、*fd* 変異体によっても抑圧されたため、*FD* 蛋白質は *FT* 蛋白質とともに側芽の相転換を促進していると考えられる。さらに、*FT* 下流遺伝子である *SOC1* 遺伝子についても、*soc1* 変異体の表現型から側芽の相転換に関わると考えられた (Melzer et al., 2008; Dorca-Fornell et al., 2011)。しかし、*soc1* 変異によつては *brc1* 変異の効果は部分的にしか抑圧されなかった (図 2 2)。*SOC1* 遺伝子は *FT* 遺伝子とは部分的に独立に機能していると考えられているため、これらの遺伝学的な解析からも、*BRC1* 蛋白質が *FT* 蛋白質の活性を抑制しているというモデルが支持された。また、*FD* プロモーターにより *BRC1* 遺伝子を茎頂分裂組織において異所的に発現させた場合に花成の遅延が見られたことから、*BRC1* 蛋白質は *FT* 蛋白質との相互作用を介して既知の花成促進経路を抑制することで、側芽分裂組織の相転換を遅延させていると考えられる。

BRC1 蛋白質が FT 蛋白質の機能を阻害する分子メカニズムの詳細は不明である。しかしながら、FT 蛋白質における BRC1 蛋白質との相互作用に重要なアミノ酸残基の位置から、BRC1 蛋白質は 14-3-3 蛋白質と FT 蛋白質との相互作用領域とは異なる領域を介して相互作用していると考えられるため、BRC1 蛋白質は FT/14-3-3/FD 複合体に結合し、その転写活性化能を阻害している可能性が考えられる (図 27)。花成抑制因子である TFL1 蛋白質は、FT 蛋白質に対して競合阻害的に働いて、TFL1/14-3-3/FD 複合体を形成し、この複合体が転写抑制因子として働くことで花成を抑制していると考えられている (Hanano and Goto, 2012)。FT 蛋白質と TFL1 蛋白質の機能の違いを規定している領域は、ドメイン交換によるキメラ蛋白質を用いた解析により明らかになっており、C 末端側に存在するループ領域が重要な役割を果たしていることが報告されている (Ahn et al., 2005)。この領域のアミノ酸は FT クレードと TFL1 クレードの蛋白質で大きく異なっているため、この領域に結合する蛋白質の有無もしくは違いによって、FT 蛋白質による転写活性化と TFL1 蛋白質による転写抑制という異なった機能が発揮されているというモデルが想定されている。本研究によって BRC1 蛋白質との相互作用に必要なことが示された FT 蛋白質のアミノ酸のうち、128 番目のロイシンと 134 番目のチロシンはこのループ内に存在している (図 26)。そのため、BRC1 蛋白質がこのループ領域に結合することで、FT 蛋白質に結合して転写活性化を担う因子の結合を阻害している可能性が存在する。FT 蛋白質がこのループ領域を介して相互作用する因子については明らかになっていないため、BRC1 蛋白質による阻害効果の詳細を明らかにするためには、FT の転写活性化能に関わる因子を同定することが必要であると考えられる。ただし、FT 蛋白質が BRC1 蛋白質と相互作用することで 14-3-3 または FD 蛋白質との相互作用能を失う可能性も排除されておらず、BRC1 蛋白質が FT/14-3-3/FD とともに複合体を形成するかについて検討する必要がある。さらに、側芽分裂組織の下部で BRC1 蛋白質が FT 蛋白質を捕捉し、それ以上の移動を抑制するという可能性も残されている。この可能性を検討するためには、*BRC1* 遺伝子を局所的に発現させる系の開発や、分裂組織内部での FT 蛋白質の動態の可視化が必要であると考えられる。

BRC1 蛋白質による FT 蛋白質の機能阻害効果は、側芽特異的なフロリゲン活性制御メカニズムが存在することを示すものである。春化要求性を失っているシロイヌナズナの野生型植物 (Col) を花成誘導条件である長日条件下で育成すると、側芽の形成は花成に伴って誘導され、その後側枝の伸長が見られる (Hempel and Feldman, 1994)。したがって、側芽の発生時には既に相転換を引き起こすのに十分な量の FT 蛋白質が植物体内で産生されていると考えられる。しかしながら、側芽分裂組織はその形成直後に相転換を行うわけではなく、栄養

成長相の分裂組織として葉を形成した後に花芽の形成を開始するため、発生の初期には花成刺激に対する応答能を持たないと考えられている (Hempel and Feldman, 1994; Grbić and Bleecker, 1996)。また、本研究の野生型植物の観察で明らかになったように、側枝につく葉数は、側枝の形成された節によって異なっており、下位の節についた側枝ほど多くの葉を形成する傾向が見られた (図 1 3)。これらの現象に対して、*BRC1* 蛋白質による *FT* 蛋白質の活性抑制機構がある程度の説明を与えるかもしれない。ただし、*brc1* 変異体においても、下位の節においては側枝が葉を形成した後に花を形成することや、下位の節についた側枝の方がより多くの葉を形成するといった勾配が保たれていることから、*BRC1* 遺伝子単独で側芽でのフロリゲン活性の違いを説明するのは難しいと考えられる (図 1 3)。しかしながら、*FT* 遺伝子が発現していない短日条件下で育成した *brc1* 変異体や *tfl1* 変異体、*brc1; tfl1* 変異体では、側枝の位置の違いによる葉数の差異が小さくなっているように見える (図 1 8)。したがって、これらの相転換促進因子および抑制因子の存在量の比や活性の調節によって、側枝間の相転換時期の違いが生み出されていることが推察される。

側芽特異的なフロリゲン活性調節機能は、ストレス条件下においてより重要性が増すかもしれない。例えば、他の植物の陰になるとフィトクロムが関わる経路を介して *FT* 遺伝子の発現が誘導され、花成が促進される (Devlin et al., 2003; Endo et al., 2005; Sessa et al., 2005; Wollenberg et al., 2008)。一方で、*BRC1* 遺伝子の発現も、植栽密度の増加や、*phyB* 変異体背景、遠赤色光に富む光条件下で増加することが報告されている (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson et al., 2010; González-Grandío et al., 2013)。ストレスによって誘導された *FT* 蛋白質は様々な部位において、相転換を始めとする発生現象を促進する機能を持つと考えられるが、側芽特異的にその活性を抑制する *BRC1* 蛋白質によって、茎頂分裂組織での発生を優先させ、ストレス条件下での繁殖の成功に寄与していると考えられる。

### 3. 汎用性シグナル因子としてのフロリゲン機能解明に向けて

本研究によって、*FT* 蛋白質と相互作用する新奇転写因子候補が数多く明らかになった。また、*BRC1* 遺伝子に注目した解析によって、フロリゲン *FT* の活性を側芽特異的に調節する機構が明らかになった。本研究では、側芽の相転換のタイミングに絞って解析を行ったが、Hiraoka ら (2013) は、*FT* および *TSF* 遺伝子が側枝の伸長にも関わっていることを示唆している (Hiraoka et al., 2013)。したがって、*BRC1* 蛋白質は側枝伸長に対しても、*FT* や *TSF* 蛋白質の機能を阻害することで制御を行っている可能性がある。

近年の研究により、*FT* およびその相同遺伝子が、花成以外の発生現象にも関与していることが明らかになっている。例えば、シロイヌナズナでは、*FT* 遺伝子が気孔の開閉に関わることが報告されている (Kinoshita et al., 2011)。トマトでは *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)* 遺伝子が仮軸成長や葉の成熟、複葉形成、茎の成長、離層形成に関わる (Shalit et al., 2009)。イネでは *Hd3a* および *RFT1* 遺伝子が花序の形態や分げつに関わる (Endo-Higashi and Izawa 2011; Tamaki et al., 2007)。ジャガイモでは *StSP3D* 遺伝子が塊茎形成に関わる (Navarro et al., 2011)。ポプラでは *PtFT1* 遺伝子の発現低下が側芽の休眠誘導に関わる (Böhlenius et al., 2006)。これらの現象は、植物体の様々な部位で起こり、生物種や部位に特異的な現象も多く含まれる。*FT* 相同蛋白質がこれらの現象に関わる際には、既知の *FT/14-3-3/FD* に相当する複合体だけでなく、他の転写因子などが関わっていることも推測される。また、本研究で明らかになったように、*BRC1* 蛋白質などの部位特異的な因子によってフロリゲンの活性が調節されることによって、部位によるフロリゲンに対する感度が異なっていることも予想される。本研究をきっかけとして、フロリゲン *FT* 蛋白質の部位特異的・現象特異的な機能発揮メカニズムの詳細が明らかになることを期待したい。

## 謝辞

本研究は京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻環境応答制御学講座分子代謝制御学分野で行われたものであります。荒木崇教授（京都大学生命科学研究科）には終始大変熱心にご指導いただきました。研究の機会を与えてくださり、数々のご助言をいただいたことを心より感謝いたします。また、河内孝之教授、佐藤文彦教授には、副指導教員として、有益なアドバイスを数多くいただきました。ここに感謝いたします。

遠藤求助教（京都大学生命科学研究科）、山口礼子助教（京都大学生命科学研究科）、阿部光知准教授（東京大学理学系研究科、前京都大学生命科学研究科・助教）には、実験を進めるにあたり材料を提供していただくとともに、多くの場面でご助言をいただきました。大門靖史助教（静岡大学グリーン科学技術研究所、前京都大学生命科学研究科・助教）には、実験材料を提供していただくとともに、多くの助言をいただきました。特に BiFC 法を用いた実験においてサポートしていただきましたことを心から感謝いたします。本研究室の富田由妃博士（京都大学生命科学）、黒谷賢一博士（名古屋大学生命農学研究科、前京都大学生命科学研究科）が作出された形質転換体を研究に用いさせていただきました。ありがとうございました。

研究に不可欠な実験材料を提供してくださった皆様にお礼申し上げます。University of California at San Diego の Steve A. Kay 教授（現 University of Southern California）、Ghislain Breton 博士（現 University of Texas）、José L. Pruneda-Paz 博士、産業技術総合研究所の高木優教授、光田展隆博士には、転写因子ライブラリを使用させて頂き、共同研究の機会を頂きました。M. F. Yanofsky 博士(University of California at San Diego)には、*POP40* の種子を分与して頂きました。ABRC (Ohio State University, USA) より、*brc1-2* 変異体の種子を分与していただきました。

多岐にわたり本研究を支えていただきました分子代謝制御学分野の皆様には深く感謝いたします。

最後に、これまで支援してくれた家族に感謝します。

## 引用文献

### 学位論文、修士論文

肥後あすか (2013) 「シロイヌナズナ 14-3-3 タンパク質の花成における役割の解析」  
京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻分子代謝制御学分野 平成 2  
4 年度修士論文

### 邦文総説等

大門靖史, 荒木崇 (2007) BiFC(Bimolecular Fluorescence Complimentation)法. 化  
学と生物 45: 13-18.

### 英文

- 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.
- Aguilar-Martínez, J.A., Poza-Carrión, C., and Cubas, P. (2007). *Arabidopsis* BRANCHED1  
acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell* 19: 458-472.
- 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.
- Alonso, J.M., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*.  
*Science* 301: 653-657.
- Alvarez, J., Guli, C., Yu, X., and Smyth, D. (1992). *terminal flower*: a gene affecting  
inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2: 103-116.
- Andronis C., Barak S., Knowles S.M., Sugano S., Tobin E.M. (2008). The clock protein CCA1  
and the bZIP transcription factor HY5 physically interact to regulate gene expression in  
*Arabidopsis*. *Mol Plant.* 1: 58-67.
- Blázquez, M.A., Soowal, L.N., Lee, I., Weigel, D. (1997). *LEAFY* expression and flower  
initiation in *Arabidopsis*. *Development.* 124: 3835-3844.
- Böhlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A.M., Jansson, S., Strauss, S.H.,  
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.
- Braun N., de Saint Germain A., Pillot J.P., Boutet-Mercey S., Dalmais M., Antoniadis I., Li X., Maia-Grondard A., Le Signor C., Bouteiller N., Luo D., Bendahmane A., Turnbull C., Rameau C. (2012). The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of Strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiol.* **158**: 225-238.
- 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.
- Cubas, P. (2002) Role of TCP genes in the evolution of morphological characters in angiosperms. *Developmental Genetics and Plant Evolution* 247-266.
- Cubas, P, Coen, E, Zapater, JM. (2001) Ancient asymmetries in the evolution of flowers. *Curr. Biol.* **11**: 1050-1052.
- Devlin, P.F., Yanovsky, M.J., and Kay, S.A. (2003). A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**: 1617-1629.
- Doebley, J., Stec, A., and Gustus, C. (1995). teosinte branched1 and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance. *Genetics* **141**: 333-346.
- Doebley, J., Stec, A., and Hubbard, L. (1997). The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**: 485-488.
- Domagalska M.A., Leyser O. (2011). Signal integration in the control of shoot branching. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **12**: 211-221.
- Dorca-Fornell, C., Gregis, V., Grandi, V., Coupland, G., Colombo, L., and Kater, M.M. (2011). The *Arabidopsis* *SOC1*-like genes *AGL42*, *AGL71* and *AGL72* promote flowering in the shoot apical and axillary meristems. *Plant J.* **67**: 1006-1017.
- Dun, E.A., Ferguson, B.J., and Beveridge, C.A. (2006). Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms? *Plant Physiol.* **142**: 812-819.
- Efroni, I, Blum, E, Goldshmidt, A, Eshed, Y. (2008) A protracted and dynamic maturation schedule underlies *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell* **20**: 2293-2306.
- Emery, J.F., Floyd, S.K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N.P., Izhaki, A., Baum, S.F., and Bowman, J.L. (2003). Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol* **13**, 1768-1774.

- Endo, M., Nakamura, S., Araki, T., Mochizuki, N., and Nagatani, A. (2005). Phytochrome B in the mesophyll delays flowering by suppressing *FLOWERING LOCUS T* expression in *Arabidopsis* vascular bundles. *Plant Cell* **17**: 1941-1952.
- Endo-Higashi N., Izawa T.. (2011). Flowering time genes *Heading date 1* and *Early heading date 1* together control panicle development in rice. *Plant Cell Physiol.* **52**: 1083-1094.
- Finlayson, S.A. (2007). *Arabidopsis* TEOSINTE BRANCHED1-LIKE 1 regulates axillary bud outgrowth and is homologous to monocot TEOSINTE BRANCHED1. *Plant Cell Physiol.* **48**: 667-677.
- Finlayson, S.A., Krishnareddy, S.R., Kebrom, T.H., and Casal, J.J. (2010). Phytochrome regulation of branching in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **152**: 1914-1927.
- González-Grandío E., Poza-Carrión C., Sorzano C.O., Cubas P. *BRANCHED1* Promotes Axillary Bud Dormancy in Response to Shade in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **25**: 834-850.
- Grić, B., and Bleecker, A.B. (1996). An altered body plan is conferred on *Arabidopsis* plants carrying dominant alleles of two genes. *Development* **122**: 2395-2403.
- Greb, T., Clarenz, O., Schafer, E., Muller, D., Herrero, R., Schmitz, G., and Theres, K. (2003). Molecular analysis of the *LATERAL SUPPRESSOR* gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes Dev* **17**: 1175-1187.
- Gyllenstrand, N., Clapham, D., Källman, T., Lagercrantz, U. (2007) A Norway spruce *FLOWERING LOCUS T* homolog is implicated in control of growth rhythm in conifers. *Plant Physiol.* **144**: 248-257.
- Hanano, S., and Goto, K. (2011). *Arabidopsis* TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *Plant Cell* **23**: 3172-3184.
- Hazen, S.P., Schultz, T.F., Prunedo-Paz, J.L., Borevitz, J.O., Ecker, J.R., and Kay, S.A. (2005). *LUX ARRHYTHMO* encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 10387-10392.
- Hempel, F., and Feldman, L. (1994). Bidirectional inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*: Acropetal initiation of flowers and basipetal initiation of paraclades. *Planta* **192**: 276-286.

- Hempel, F.D., Weigel, D., Mandel, M.A., Ditta, G., Zambryski, P.C., Feldman, L.J., and Yanofsky, M.F. (1997). Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development* **124**: 3845-3853.
- Hiraoka, K., Yamaguchi, A., Abe, M., and Araki, T. (2013) The florigen genes *FT* and *TSF* modulate lateral shoot outgrowth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **54**: 352-368.
- Husbands A., Bell E.M., Shuai B., Smith H.M., Springer P.S. (2007). LATERAL ORGAN BOUNDARIES defines a new family of DNA-binding transcription factors and can interact with specific bHLH proteins. *Nucleic Acids Res.* **35**: 6663-6671.
- Iida, K, Seki, M, Sakurai, T, Satou, M, Akiyama, K, Toyoda, T, Konagaya, A, Shinozaki, K. (2005). RARTF: database and tools for complete sets of *Arabidopsis* transcription factors. *DNA Res.* **12**: 247-56.
- Imura, Y., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Furutani, M., Tasaka, M., Abe, M., and Araki, T. (2012). CRYPTIC PRECOCIOUS/MED12 is a novel flowering regulator with multiple target steps in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **53**: 287-303.
- Jacqumard, A., Gadisseur, I., Bernier, G. (2003) Cell division and morphological changes in the shoot apex of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Ann. Bot. (Lond)* **91**: 571-576.
- Jaeger, K.E., and Wigge, P.A. (2007). FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **17**: 1050-1054.
- 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.
- Keller, T., Abbott, J., Moritz, T., and Doerner, P. (2006). *Arabidopsis* *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS1* controls a leaf axil stem cell niche and modulates vegetative development. *Plant Cell* **18**, 598-611.
- Kinoshita T., Ono N., Hayashi Y., Morimoto S., Nakamura S., Soda M., Kato Y., Ohnishi M., Nakano T., Inoue S, Shimazaki K. (2011). *FLOWERING LOCUS T* regulates stomatal opening. *Curr Biol.* **21**: 1232-1238.
- 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.

- Koyama, T, Furutani, M, Tasaka, M, Ohme-Takagi, M. (2007) TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 473-484.
- Koornneef, M, Alonso-Blanco, C, Peeters, A.J., Soppe, W. (1998) Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 345-370.
- Koornneef, M, Hanhart, C.J., van der Veen, J.H. (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **229**: 57-66.
- Kosugi, S., Ohashi, Y. (1997) PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell* **9**: 1607-1619.
- Lee, H., Suh, S.S., Park, E., Cho, E., Ahn, J.H., Kim, S.G., Lee, J.S., Kwon, Y.M., and Lee, I. (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **14**: 2366-2376.
- Li, C, Potuschak, T, Colón-Carmona, A, Gutiérrez, RA, Doerner, P. (2005) *Arabidopsis* TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A* **102**: 12978-12983.
- Lin, M.K., Belanger, H., Lee, Y.J., Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K., Miura, E., Xoconostle-Cázares, B., Gendler, K., Jorgensen, R.A., Phinney, B., Lough, T.J., and Lucas, W.J. (2007). FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. *Plant Cell* **19**: 1488-1506.
- Liu, L., Liu, C., Hou, X., Xi, W., Shen, L., Tao, Z., Wang, Y., and Yu, H. (2012). FTIP1 is an essential regulator required for florigen transport. *PLoS Biol.* **10**: e1001313.
- Luo, D, Carpenter, R, Copsey, L, Vincent, C, Clark, J, Coen, E. (1999) Control of organ asymmetry in flowers of *Antirrhinum*. *Cell* **99**: 367-376.
- Luo, D, Carpenter, R, Vincent, C, Copsey, L, Coen, E. (1996) Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. *Nature* **383**: 794-799.
- Martín-Trillo, M., Grandío, E.G., Serra, F., Marcel, F., Rodríguez-Buey, M.L., Schmitz, G., Theres, K., Bendahmane, A., Dopazo, H., and Cubas, P. (2011). Role of tomato *BRANCHED1*-like genes in the control of shoot branching. *Plant J.* **67**: 701-714.

- Mathieu, J., Warthmann, N., Küttner, F., and Schmid, M. (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **17**: 1055-1060.
- Melzer, S., Lens, F., Gennen, J., Vanneste, S., Rohde, A., and Beeckman, T. (2008). Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* **40**: 1489-1492.
- Michael, T.P., Mockler, T.C., Breton, G., McEntee, C., Byer, A., Trout, J.D., Hazen, S.P., Shen, R., Priest, H.D., Sullivan, C.M., Givan, S.A., Yanovsky, M., Hong, F., Kay, S.A., and Chory, J. (2008). Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genet.* **4**: e14.
- Michaels, S.D., Himelblau, E., Kim, S.Y., Schomburg, F.M., and Amasino, R.M. (2005). Integration of flowering signals in winter-annual *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **137**: 149-156.
- Mimida, N., Kidou, S., Iwanami, H., Moriya, S., Abe, K., Voogd, C., Varkonyi-Gasic, E., and Kotoda, N. (2011). Apple FLOWERING LOCUS T proteins interact with transcription factors implicated in cell growth and organ development. *Tree Physiol.* **31**: 555-566.
- Mitsuda, N., Ikeda, M., Takada, S., Takiguchi, Y., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Fujita, M., Shinozaki, K., Matsui, M., and Ohme-Takagi, M. (2010). Efficient yeast one-/two-hybrid screening using a library composed only of transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **51**: 2145-2151.
- Müller D., Leyser O. (2011). Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Ann Bot.* **107**: 1203-1212.
- Müller, D., Schmitz, G., and Theres, K. (2006). *Blind* homologous *R2R3 Myb* genes control the pattern of lateral meristem initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 586-597.
- Nath, U, Crawford, BC, Carpenter, R, Coen, E. (2003) Genetic control of surface curvature. *Science* **299**: 1404-1407.
- Navarro C., Abelenda J.A., Cruz-Oró E., Cuéllar C.A., Tamaki S., Silva J., Shimamoto K., Prat S. (2011). Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature.* **478**: 119-122.

- Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A., Tomita, Y., Dohi, K., Mori, M., and Araki, T. (2008). Long-distance, graft-transmissible action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1645-1658.
- Palatnik, JF, Allen, E, Wu, X, Schommer, C, Schwab, R, Carrington, JC, Weigel, D. (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**: 257-263.
- Pin P.A., Benlloch R., Bonnet D., Wremerth-Weich E., Kraft T., Gielen J.J., Nilsson O. (2010). An antagonistic pair of *FT* homologs mediates the control of flowering time in sugar beet. *Science.* **330**: 1397-1400.
- Pnueli, L., Gutfinger, T., Hareven, D., Ben-Naim, O., Ron, N., Adir, N., and Lifschitz, E. (2001). Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell* **13**: 2687-2702.
- Pruneda-Paz, J.L., Breton, G., Para, A., and Kay, S.A. (2009). A functional genomics approach reveals CHE as a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **323**: 1481-1485.
- Ratcliffe, O.J., Bradley, D.J., Coen, E.S. (1999) Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*. *Development* **126**: 1109-1120.
- Rédei, G.P. (1962) Supervital mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* **47**: 443-460.
- Rodríguez-Falcón, M., Bou, J., Prat, S. (2006) Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 151-180.
- Rohde, A., Bhalerao, R.P. (2007) Plant dormancy in the perennial context. *Trends Plant Sci.* **12**: 217-223.
- Ruttink, T., Arend, M., Morreel, K., Storme, V., Rombauts, S., Fromm, J., Bhalerao, R.P., Boerjan, W., Rohde, A. (2007) A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. *Plant Cell* **19**: 2370-2390.
- Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G., and Theres, K. (1999). The *Lateral suppressor (Ls)* gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 290-295.
- Sessa, G., Carabelli, M., Sassi, M., Ciolfi, A., Possenti, M., Mitterpergher, F., Becker, J., Morelli, G., and Ruberti, I. (2005). A dynamic balance between gene activation and

- repression regulates the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **19**: 2811-2815.
- Shalit A., Rozman A., Goldshmidt A., Alvarez J.P., Bowman J.L., Eshed Y., Lifschitz E.** (2009). The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**: 8392-8397.
- Shannon, S., and Meeks-Wagner, D.R.** (1991). A mutation in the *Arabidopsis* TFL1 gene affects inflorescence meristem development. *Plant Cell* **3**: 877-892.
- Snow, R.** (1937). On the nature of correlative inhibition. *New Phytologist* **36**: 283-300.
- Suzuki, T., Sakurai, K., Ueguchi, C., and Mizuno, T.** (2001). Two types of putative nuclear factors that physically interact with histidine-containing phosphotransfer (Hpt) domains, signaling mediators in His-to-Asp phosphorelay, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42**: 37-45.
- 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.
- Takahashi, T., and Komeda, Y.** (1989). Characterization of two genes encoding small heat-shock proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **219**: 365-372.
- Takeda, T., Suwa, Y., Suzuki, M., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Matsuoka, M., and Ueguchi, C.** (2003). The *OsTB1* gene negatively regulates lateral branching in rice. *Plant J.* **33**: 513-520.
- Talbert, P.B., Adler, H.T., and Parks, D.W.** (1995). The *REVOLUTA* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **2735**: 2723-2735.
- 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.
- Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Furuita, K., Hayashi, K., Yanase, T., Yamaguchi, M., Nakashima, C., Purwestri, Y.A., Tamaki, S., Ogaki, Y., Shimada, C., Nakagawa, A., Kojima, C., and Shimamoto, K.** (2011). 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature* **476**: 332-335.

- Teper-Bamnolker, P., and Samach, A. (2005). The flowering integrator FT regulates *SEPALLATA3* and *FRUITFULL* accumulation in Arabidopsis leaves. *Plant Cell* **17**: 2661-2675.
- Thimann, K.V., Skoog, F. (1933). Studies on the Growth Hormone of Plants: III. The Inhibiting Action of the Growth Substance on Bud Development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **19**: 714-716.
- Thimann, K.V., Skoog, F. (1934). On the inhibition of bud development and other function of growth substance in *Vicia Faba*. *Proceeding of the Royal Society of London Series B* **114**: 317-339.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**: RESEARCH0034.
- 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.
- Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G.V., Provart N.J. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One.* **8**; e718.
- Wollenberg, A.C., Strasser, B., Cerdán, P.D., and Amasino, R.M. (2008). Acceleration of flowering during shade avoidance in Arabidopsis alters the balance between *FLOWERING LOCUS C*-mediated repression and photoperiodic induction of flowering. *Plant Physiol.* **148**: 1681-1694.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., and Cantley, L.C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**: 961-971.
- Yamaguchi, A., Kobayashi, Y., Goto, K., Abe, M., and Araki, T. (2005). *TWIN SISTER OF FT (TSF)* acts as a floral pathway integrator redundantly with *FT*. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1175-1189.

表1. 実験に用いたプラスミドコンストラクト

Use	Construct	Plasmid name	Insert or PCR product	Primers	Template	Plasmid backbone	Cloning method	
Yeast two-hybrid	BD-FT	pMN001	FT CDS	5492/5493	BD::FT/pBD-GAL4.Cam (Abe et al., 2005)	pCUY (Suzuki et al., 2001)	In-Fusion	
	BD-TSF	pMN002	TSF CDS	4998/1353	BD::TSF/pBD-GAL4.Cam	pCUY (Suzuki et al., 2001)	SmaI/Sall	
	BD-TFL1	pMN003	TFL1 CDS	3969/3968	BD::TFL1/pBD-GAL4.Cam (Abe et al., 2005)	pCUY (Suzuki et al., 2001)	BamHI/PstI	
	BD-mutant FT	pMN011-pMN060	mutant FT	5492/5493	mutant FT /ProHSP18.2:FT-T7 (Notaguchi et al., 2008)	pCUY (Suzuki et al., 2001)	In-Fusion	
	AD-TCP1	pMN073	TCP1 CDS	1/2	cDNA	pAD-GAL4-2.1	EcoRI/XhoI	
	AD-TCP2	pMN074	TCP2 CDS	24/25	cDNA	pAD-GAL4-2.1	EcoRI/XhoI	
	AD-TCP3	pMN075	TCP3 CDS	49/50	cDNA	pAD-GAL4-2.1	NheI/XhoI	
	AD-TCP4	pMN076	TCP4 CDS	69/70	cDNA	pAD-GAL4-2.1	NheI/Sall	
	AD-TCP12	pMN077	TCP12 CDS	120/121	cDNA	pAD-GAL4-2.1	EcoRI/XhoI	
	AD-TCP18	pMN078	TCP18 CDS	166/167	cDNA	pAD-GAL4-2.1	BglII/XbaI	
	AD-TCP20	pMN079	TCP20 CDS	184/185	cDNA	pAD-GAL4-2.1	NheI/XhoI	
	AD-BRC1	pMN004	BRC1 CDS	4395/4396	pMN071	pGAD424	BglII/PstI	
	AD-BRC2	pMN005	BRC2 CDS	-	pMN072	pGAD424	Sall/EcoRI	
	AD-GRF3	pAH001	GRF3 CDS	4263/4264	cDNA	pGAD424	BamHI/PstI	
	AD-BRC1ΔN <sub>1-74</sub>	pMN006	BRC1ΔN <sub>1-74</sub>	5491/4396	pMN071	pGAD424	BglII/PstI	
	AD-BRC1ΔN <sub>1-138</sub>	pMN007	BRC1ΔN <sub>1-138</sub>	5490/4396	pMN071	pGAD424		
	AD-BRC1ΔC <sub>287-433</sub>	pMN008	BRC1ΔC <sub>287-433</sub>	4395/5489	pMN071	pGAD424		
	AD-BRC1ΔC <sub>306-433</sub>	pMN009	BRC1ΔC <sub>306-433</sub>	4395/5488	pMN071	pGAD424		
	AD-BRC1ΔC <sub>408-433</sub>	pMN010	BRC1ΔC <sub>408-433</sub>	4395/5487	pMN071	pGAD424		
	AD-BRC1 S390A	pMN061	BRC1 S390A	4395/4396	PCR1	pGAD424		
	AD-BRC1ΔC <sub>149-433</sub>	pMN062	BRC1-N	166/3593	pMN071	pAD-GAL4-2.1		BglII/XbaI
	AD-BRC1 <sub>CP</sub>	pMN063	BRC1-T	3594/3595	pMN071	pAD-GAL4-2.1		
	AD-BRC1ΔN <sub>1-207</sub>	pMN064	BRC1-C	3596/167	pMN071	pAD-GAL4-2.1		
	AD-BRC1ΔC <sub>208-433</sub>	pMN065	BRC1-N+T	166/3595	pMN071	pAD-GAL4-2.1		
	AD-BRC1ΔN <sub>1-148</sub>	pMN066	BRC1-T+C	3594/167	pMN071	pAD-GAL4-2.1		
	TCP1-YC	pMN080	EYFP <sub>466-717</sub> TCP1 CDS	220/241	EYFP CDS pMN073	pBI121	SpeI/XmaI NheI/XhoI	
TCP3-YN	pMN081	EYFP <sub>1-465</sub> TCP3 CDS	215/217	EYFP CDS pMN075	pBI121	SpeI/XmaI NheI/KpnI		
YC-TCP4	pMN082	EYFP <sub>466-717</sub> TCP4 CDS	220/218	EYFP CDS pMN076	pBI121	SpeI/XmaI NheI/Sall		
YN-TCP18	pMN067	EYFP <sub>1-465</sub> TCP18 CDS	215/217	EYFP CDS pMN071	pBI121	SpeI/XmaI NheI/XhoI		
TCP20-YN	pMN083	EYFP <sub>1-465</sub> TCP20 CDS	215/217	EYFP CDS pMN079	pBI121	SpeI/XmaI NheI/KpnI		
In vitro pull-down	GST-BRC1	pMN068	BRC1 CDS	4395/4096	pMN071	pET41a	BglII/SacI	
	T7-FT	pNK001	FT CDS	-	-	pET24d	-	
Inducible reporter	ProHSP:FT-EGFP	pKK001	EGFP CDS	926/1860	EGFP/pUC19	ProHSP18.2:FT-T7 (Notaguchi et al., 2008)	KpnI/SacI	
Ectopic expression	ProFD:BRC1	pMN069	BRC1 CDS	-	pMN071	ProFD:GUS/pBIN19 (Abe et al., 2005)	SacI	
Complementation	gBRC1	pMN070	BRC1 genomic sequence	2588/2255	genomic DNA	pPZP211/NP/nosT (Nishimura et al., 2003)	PstI/SacI	
Entry clones	BRC1 CDS	pMN071	BRC1 CDS	166/167	cDNA	pAD-GAL4-2.1	BglII/XbaI	
	BRC1 S390A	PCR1	-	4395/4394 4393/4396	pMN071	-	-	
	BRC2 CDS	pMN072	BRC2 CDS	142/121	cDNA	pAD-GAL4-2.1	EcoRI/XhoI	

表2. コンストラクトに用いたプライマー

Primer Name	Sequence (5' to 3')
1	gaattcATGTCGTCTTCCACCAATGA
2	ctcgagTTAGTTTACAAAAGAGTCTTGAATCC
24	gaattcATGATTGGAGATCTAATGAAGAATAACAAC
25	ctcgagTCAGTTCTTGCCTTACCCTTATG
49	gctagcATGGCACCAGATAACGACCATTTTC
50	ctcgagTTAATGGCGAGAATCGGATGAAGC
69	gctagcATGTCTGACGACCAATTCATC
70	gtcgacTCAATGGCGAGAAATAGAGGAAG
120	gaattcATGTTTCCTTCTTTTACTACTCACATTC
121	ctcgagTCAATTAGGGTTTTTAGTTAACACATTGCT
121	ctcgagTCAATTAGGGTTTTTAGTTAACACATTGCT
142	gaattcATGTTTCCTTCTTTTACTACTCAC
166	gaagatctATGAACAACAACATTTTCAG
166	gaagatctATGAACAACAACATTTTCAG
167	tcctctagaTCAATACATGTTTTGATAGTTGTG
167	tcctctagaTCAATACATGTTTTGATAGTTGTG
184	gctagcATGGATCCCAAGAACCTAAATC
185	ctcgagTTAACGACCTGAGCCTTG
215	actagtATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
217	cccgggGGCCATGATATAGACGTTGTG
218	cccgggCTTGTACAGCTCGTCCATG
220	cccgggGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGG
241	tcccccggtcaTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
480	CTAAAGTCTTCTTCTCCGCAGCCA
926	ggtaccATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
1353	gtcgacTACGTTCTTCTTCCCCACA
1860	gagctcTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGA
2250	ctcgagAAGTCTTCTTCTCCGCAGCC
2255	gagctcACAGTCAATGTCTTAGTATCAGATGCC
2588	ctgcagTATGAATAATAAGTTCTTCGTAATGTGGAG
2589	caccATGTCTATAAATAAGAGACCCTTATAGTAAG
2779	gagctccgATGTCTATAAATAAGAGACCCT
3593	tcctctagatcaTCTGCTGGGTTTCTTGCT
3594	gaagatctACGGACAGGCACAGCAAG
3595	tcctctagatcaCGCGATCTTATGATCTCAGG
3596	gaagatctACAACCCTTCTCACCATGGC
3968	ctgcagCTAGCGTTTTCGTGCAG
3969	ggatccgATGGAGAATATGGGAAGTAGAGTG
4096	tctgagctcATACATGTTTTGATAGTTGTGCATG
4263	ggatccatATGTCGACAAGGGAAGAGAAT
4264	ctgcagCTCGGCACCATCGGGCTTTGAT
4393	CAAACCGAACTCAgctTTCCAGTG
4394	CACTGGGAAgctGAGTTTCGGTTTG
4395	agatctctATGAACAACAACATTTTCAG
4396	ctgcagTCAATACATGTTTTGATAGTTGTG
4998	cccgggATGTCTTTAAGTCGTAGAGATCC
5487	ctgcagTCACATCATTCTTCCATTGTTCTACCCTTTG
5488	ctgcagTCAGGACAACCTTTAAAATGGGCGTTC
5489	ctgcagTCAGCTGAAGCAGCCATGGTGAGAAAG
5490	agatctctAAAATGAAAAAGCCAAGAAACCCAGCAG
5491	agatctctGACTGCGCCCTCTCACC
5492	atcgccgaattccgATGTCTATAAATAAGAGACCCT
5493	ttggctcgaggtcgaAAGTCTTCTTCTCCGCAGCC

表3. 定量的RT-PCRに用いたプライマー

Gene	Sequence (5' to 3')	
	Forward	Reverse
<i>API</i>	CATGGGTGGTCTGTATCAAGAAGAT	CATGCGGCGAAGCAGCCAAGGTT
<i>FUL</i>	CCACCGACTCTTGCATGGAGAGG	TGTGAAACGTCTCGGCCAACA
<i>SOC1</i>	AGCAGCTCAAGCAAAAGGAGAAAGC	GGTAACCCAATGAACAATTGCGTCTC
<i>LFY</i>	ACGCCGTCATTTGCTACTCT	CTTTCTCCGTCTCTGCTGCT
<i>BRC1</i>	ACGATCGTTTTGCAGTTTGCAACG	TGGTTTCGCGCCGAAGGAGT
<i>APX3</i>	CTCTCGATCTCTGTGAGGGCGTGAA	CTTTCTCCCGGGAACGAACACGATG
<i>RPT1a</i>	CTCTGCTACGGACCTCCTGGTACTG	ACCGTGCCATCTGAAACAGTTCACG
<i>TRX3</i>	TCATTGCACCCGTCTTTGCTGACTT	TCCTCAGCAACAGTGTTC AATTCGT

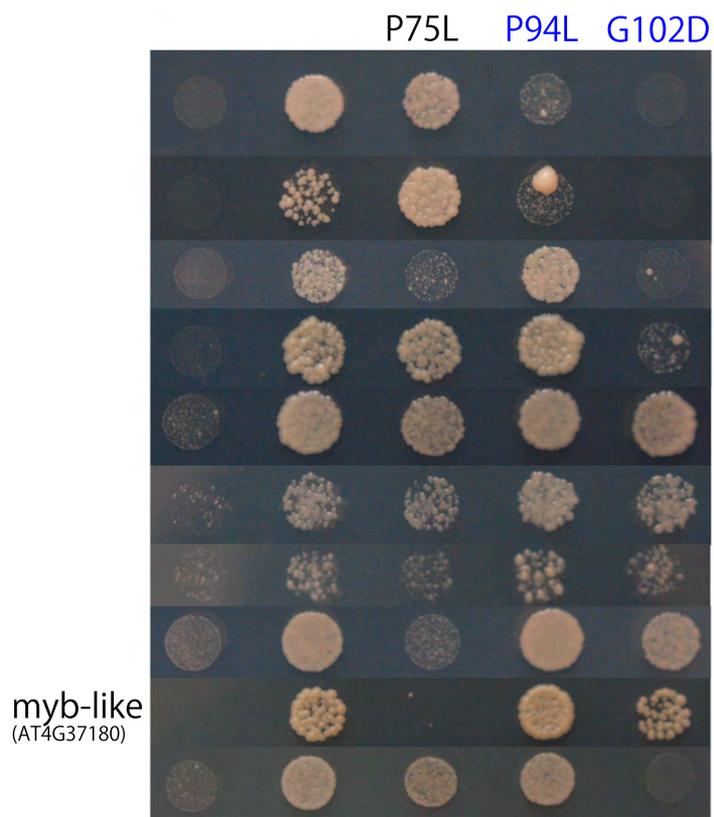
表4. Kay Lab.の転写因子ライブラリから得られたFT相互作用因子候補

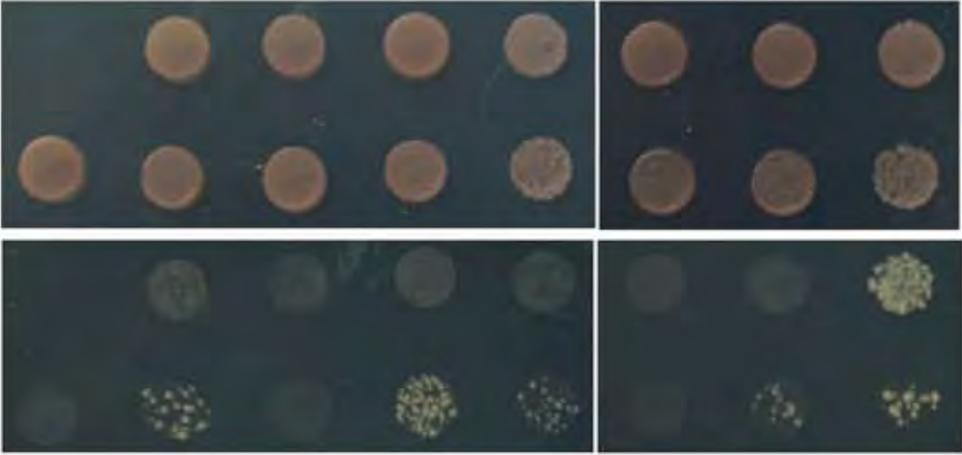
Locus	Family	Induction	Name	Description
AT4G36730	bZIP	10.38	GBF1	G-box binding factor 1 (GBF1)
AT2G47190	MYB	7.72	MYB2	myb family transcription factor (MYB2)
AT1G07360	C3H	7.25	MAC5A	MOS4-ASSOCIATED COMPLEX SUBUNIT 5A
AT1G64620	DOF (C2C2)	6.55	-	Dof-type zinc finger domain-containing protein
AT3G11020	ERF	6.07	DREB2B	DRE-binding protein (DREB2B)
AT4G28790	bHLH	5.26	-	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
AT1G19490	bZIP	4.97	-	bZIP transcription factor family protein
AT5G08630	DDT	4.87	-	DDT domain-containing protein
AT5G26210	Alfin	4.36	AL4	PHD finger family protein (ALFIN-LIKE4)
AT3G12680	C3H	4.29	HUA1	floral homeotic protein (HUA1), ENHANCER OF AG-4 1
AT4G35700	C2H2	4.19	DAZ3	DUO1-ACTIVATED ZINC FINGER 3
AT5G56900	C3H	3.97	-	CwI-like family protein / zinc finger (CCCH-type) family protein
AT5G63280	C2H2	3.92	-	zinc finger (C2H2 type) family protein
AT2G16770	bZIP	3.87	bZIP23	Basic-region leucine zipper (bZIP23) transcription factor involved in the adaptation to zinc deficiency.
AT5G24110	WRKY	3.55	WRKY30	member of WRKY Transcription Factor; Group III
AT4G39250	MYB-related	3.44	RSM2, ATRL1	myb family transcription factor
AT3G21150	BBX	3.39	BBX32, EIP6	B-BOX DOMAIN PROTEIN 32, EMF1-INTERACTING PROTEIN 1
AT1G61110	NAC	3.29	ANAC025	no apical meristem (NAM) family protein
AT4G31620	REM (B3)	3.25	-	transcriptional factor B3 family protein
AT3G60030	SBP	3.21	SPL12	squamosa promoter-binding protein-like 12 (SPL12)
AT5G14140	C2H2	3.09	-	zinc finger (C2H2 type) family protein
AT5G58890	MADS	2.98	AGL82	MADS-box family protein
AT5G51910	TCP	2.97	TCP19	TCP family transcription factor
AT5G66300	NAC	2.89	VND3, NAC105	no apical meristem (NAM) family protein
AT1G31050	bHLH	2.89	-	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT4G09450	MYB-related	2.85	-	Duplicated homeodomain-like superfamily protein, Myb-like DNA-binding domain, SHAKYF class
AT1G69690	TCP	2.81	TCP15	TCP family transcription factor
AT5G16770	MYB	2.81	MYB9	Member of the R2R3 factor gene family (MYB9)
AT1G72010	TCP	2.81	TCP22	TCP family transcription factor
AT1G58100	TCP	2.71	TCP8	TCP family transcription factor
AT1G54390	PHD	2.65	ING2	Inhibitor of Growth family of nuclear-localized Phd domain containing homeodomain proteins
AT1G05805	bHLH	2.62	-	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
AT2G01200	AUX/IAA	2.60	IAA32, MEE10	auxin-responsive AUX/IAA family protein (IAA32), MATERNAL EFFECT EMBRYO ARREST 10
AT1G08290	C2H2	2.56	WIP3	zinc finger (C2H2 type) protein (WIP3)
AT2G44940	ERF	2.56	-	encodes a member of the DREB subfamily A-4 of ERF/AP2 transcription factor family
AT2G30340	AS2/LOB	2.52	LBD13	lateral organ boundaries domain protein 13 (LBD13)
AT4G22950	MADS	2.46	AGL19	MADS-box protein (AGL19)
AT1G50420	GRAS	2.45	SCL3	scarecrow-like transcription factor 3 (SCL3)
AT5G06110	MYB	2.45	-	Myb-like DNA-binding domain
AT3G47500	C2C2-Dof	2.43	CDF3	CYCLING DOF FACTOR 3
AT3G43430	-	2.43	-	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
AT5G67110	bHLH	2.40	ALC	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein (ALCATRAZ)
AT1G15580	AUX/IAA	2.39	IAA5, AUX2-27	indoleacetic acid-induced protein 5 (IAA5) / auxin-induced protein (AUX2-27)
AT5G53980	HB	2.38	ATHB52	homeobox-leucine zipper family protein
AT4G26440	WRKY	2.35	WRKY34	WRKY family transcription factor
AT5G18270	NAC	2.33	ANAC087	no apical meristem (NAM) family protein
AT1G25580	NAC	2.30	SOG1	no apical meristem (NAM) family protein (SUPPRESSOR OF GAMMA RADIATION), ANAC008
AT1G02210	NAC	2.23	-	NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein
AT2G31230	AP2-EREBP	2.21	ERF15	member of the ERF (ethylene response factor) subfamily B-3 of ERF/AP2 transcription factor family
AT1G17460	MYB-related	2.21	TRFL3	myb family transcription factor (TRF-LIKE 3)
AT5G11050	MYB	2.20	MYB64	Member of R2R3-MYB transcription factor gene family (MYB64)
AT1G67260	TCP	2.18	TCP1	Encodes protein with TCP (TB1, CYC, PCF) domain
AT1G05230	HB	2.18	HMG2	homeobox-leucine zipper family protein (HOMEODOMAIN GLABROUS2) / lipid-binding START domain-containing protein
AT5G12840	NF-YA	2.14	HAP2A, EMB2220, NF-YA1	CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA) family protein
AT3G56400	WRKY	2.14	WRKY70	WRKY family transcription factor
AT1G13600	bZIP	2.11	ATBZIP58	member of WRKY Transcription Factor; Group III
AT4G36860	-	2.10	-	LIM domain-containing protein
AT1G03800	ERF	2.09	ERF10	a member of the ERF (ethylene response factor) subfamily B-1 of ERF/AP2 transcription factor family (ATERF-10)
AT3G20770	EIL	2.09	EIN3	ethylene-insensitive 3 (EIN3)
AT4G37260	MYB	2.09	MYB73	myb family transcription factor (MYB73)
AT4G16750	ERF	2.06	-	encodes a member of the DREB subfamily A-4 of ERF/AP2 transcription factor family
AT3G48590	CCAAT	2.02	HAP5A, NF-YC1	CCAAT-box binding transcription factor Hap5a, putative ((HAP5A))
AT1G19210	ERF	2.01	-	encodes a member of the DREB subfamily A-5 of ERF/AP2 transcription factor family.
AT5G14370	Orphans	2.00	-	CCT motif family protein

Inductionの値はシグナルの全体平均値との比を示す。

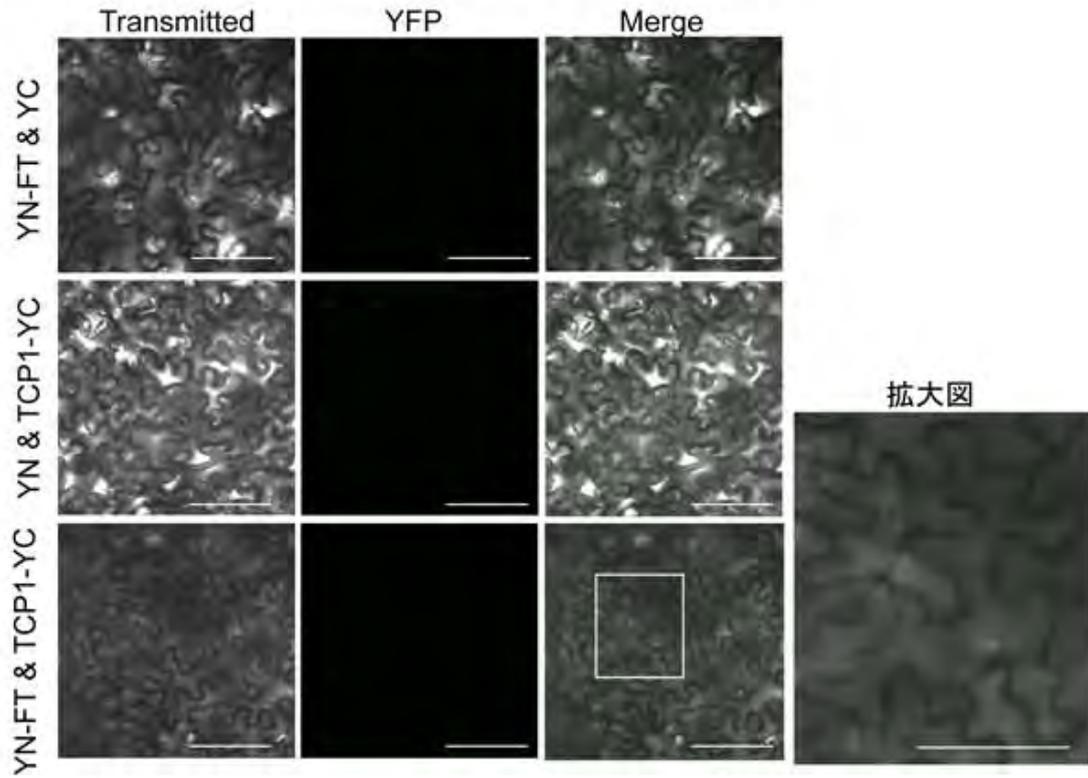
表5. 高木 Lab. の転写因子ライブラリから得られたFT相互作用因子候補

Locus	Family	Name	Description
AT3G51910	Hsf	HSFA7A	HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A7A
AT2G21230	bZIP	bZIP30	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor
AT2G31370	bZIP	bZIP59	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor
AT1G06850	bZIP	bZIP52	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor
AT1G67260	TCP	TCP1	TCP family transcription factor
AT1G53230	TCP	TCP3	TCP family transcription factor
AT3G45150	TCP	TCP16	TCP family transcription factor
AT4G18390	TCP	TCP24	TCP family transcription factor
AT4G37180	myb-like	-	myb family transcription factor
AT1G28520	VOZ	VOZ1	vascular plant one zinc finger protein

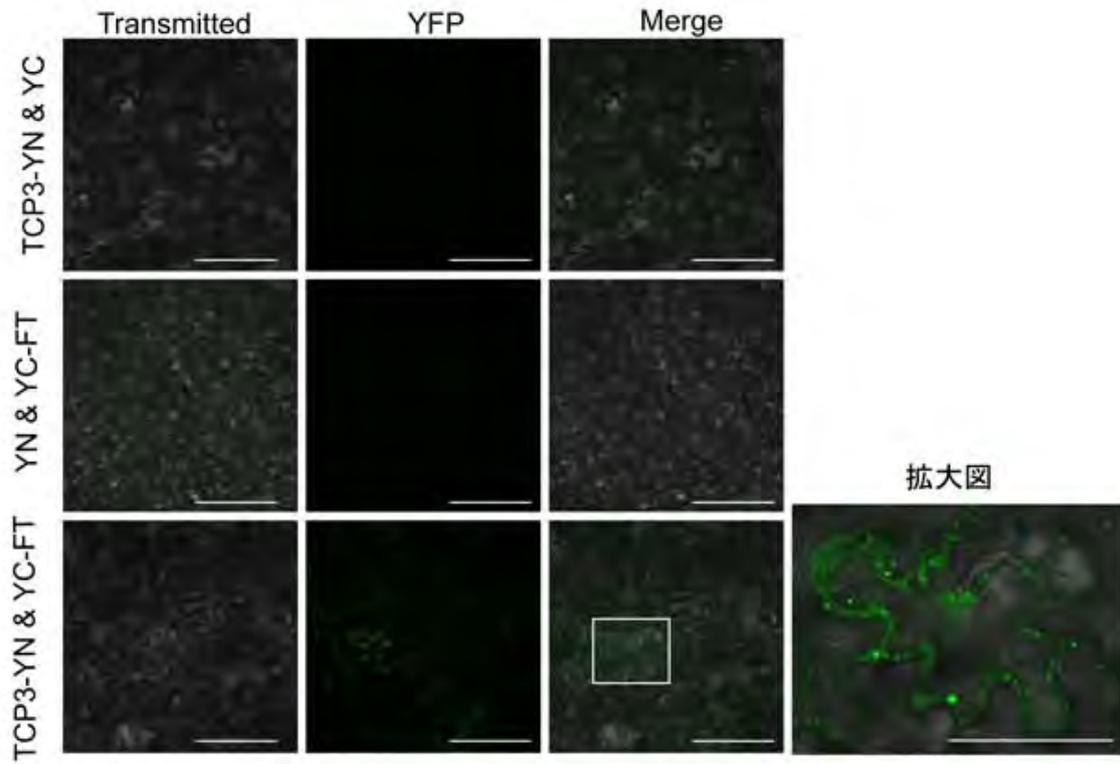




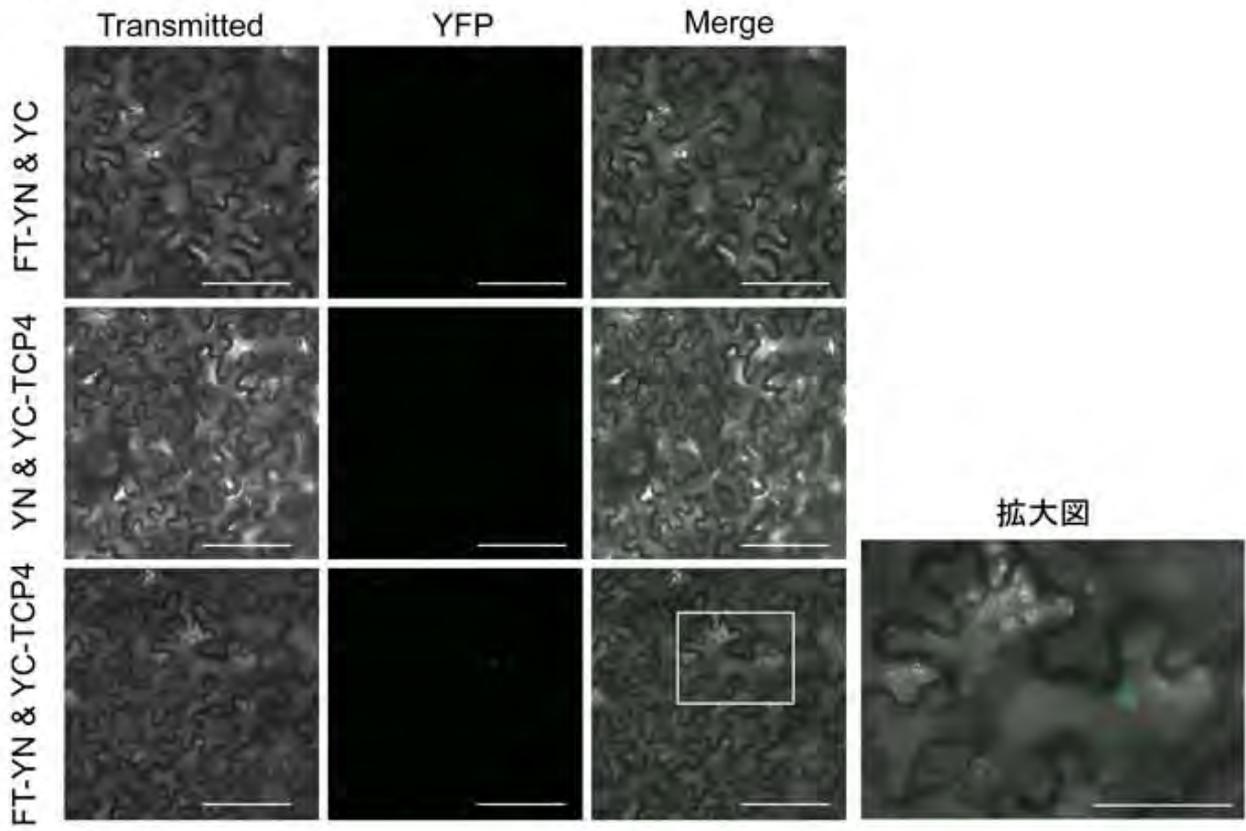
### TCP1



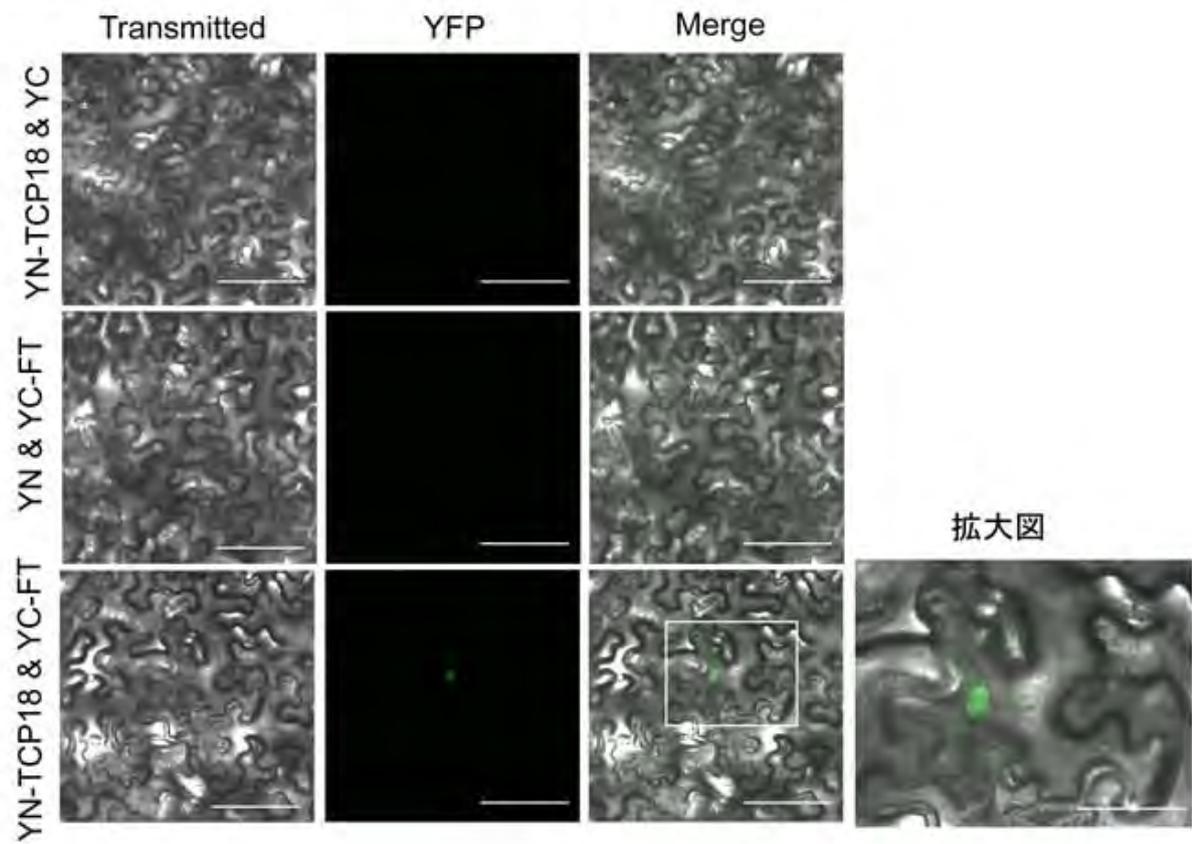
### TCP3



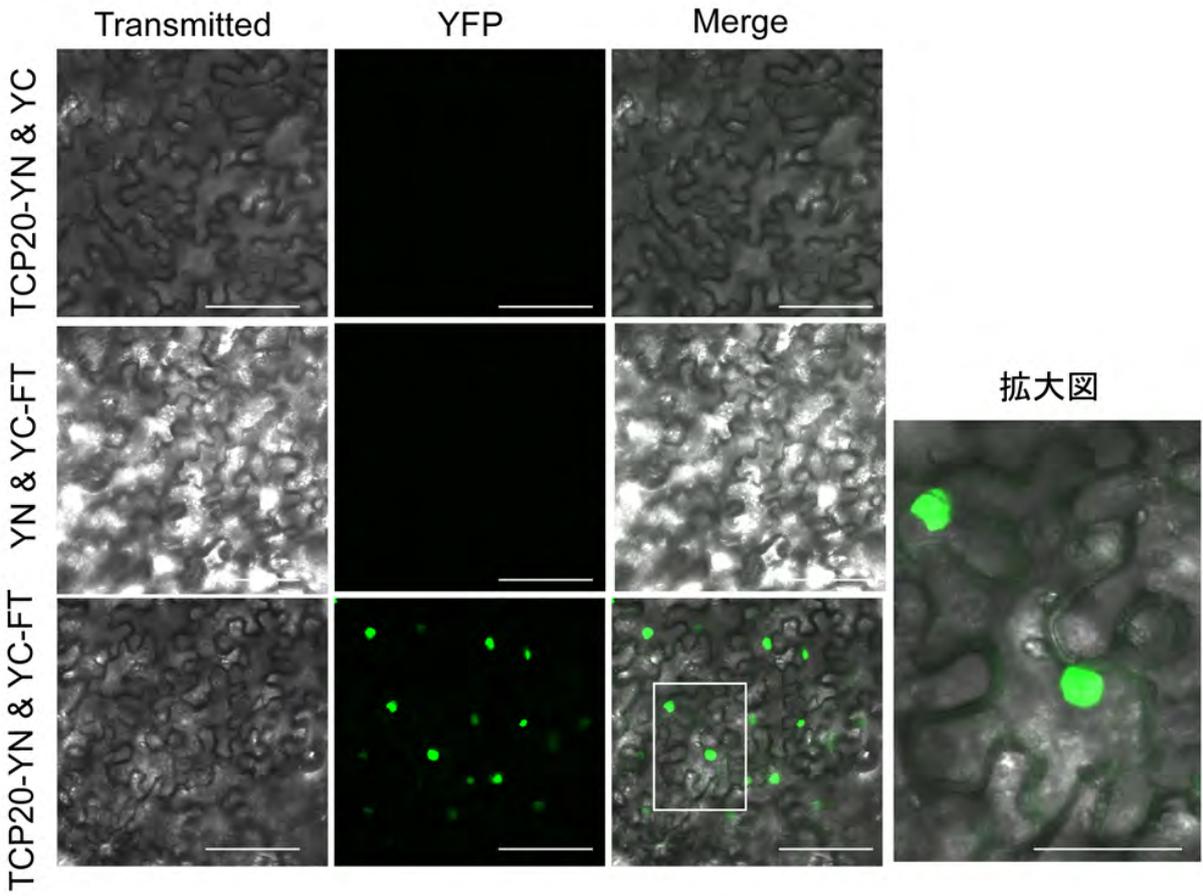
TCP4

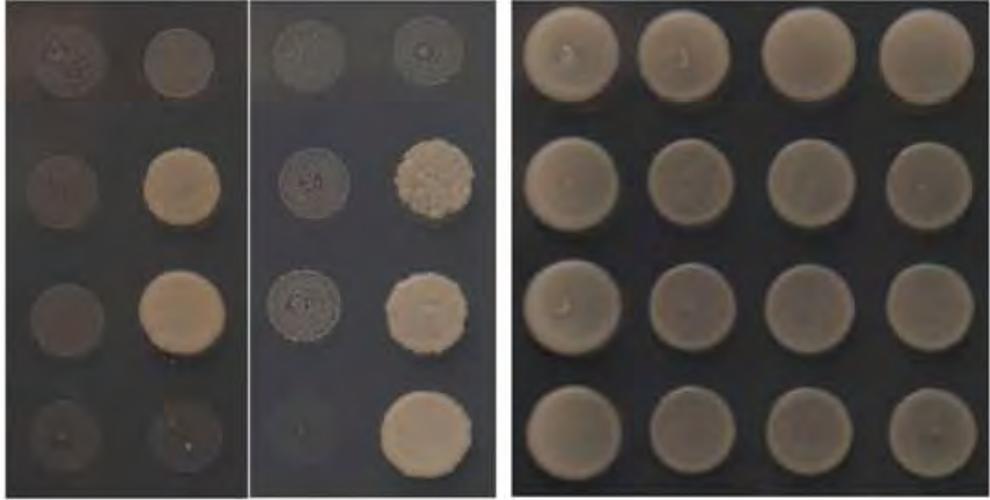


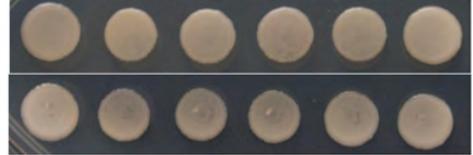
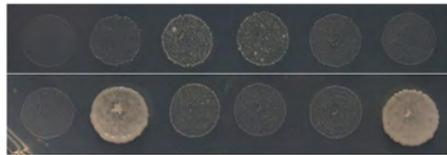
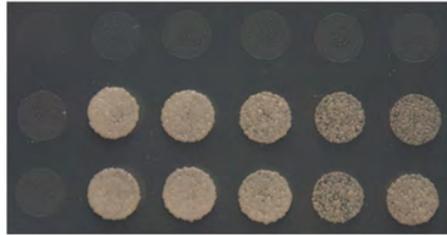
TCP18



TCP20

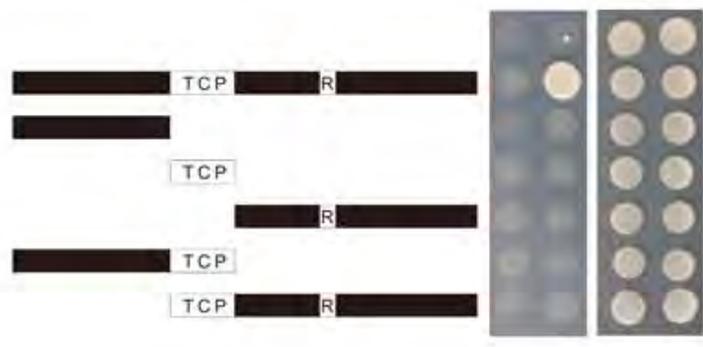
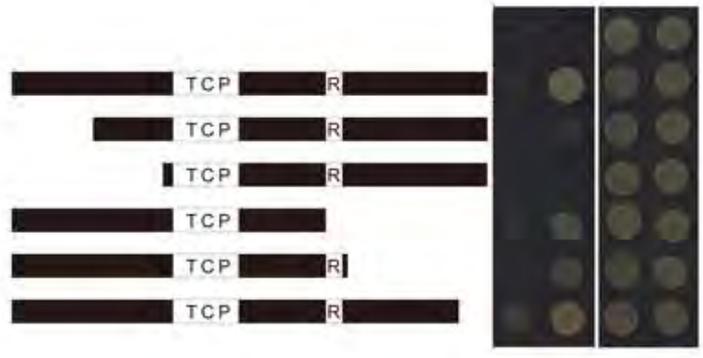


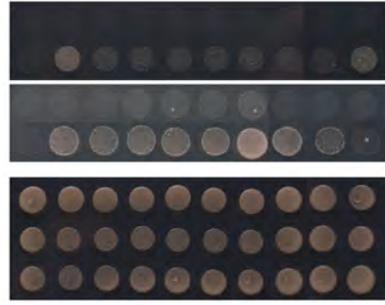
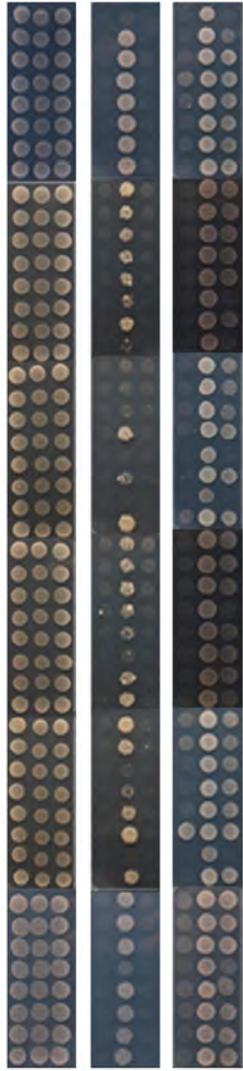


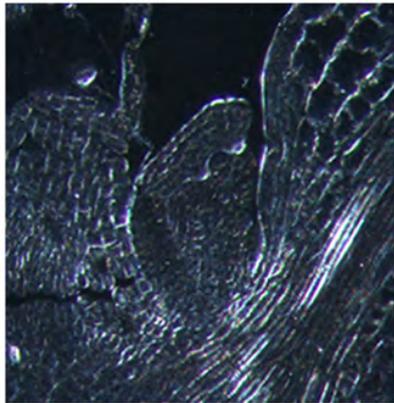
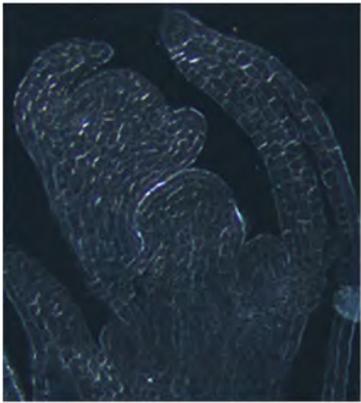
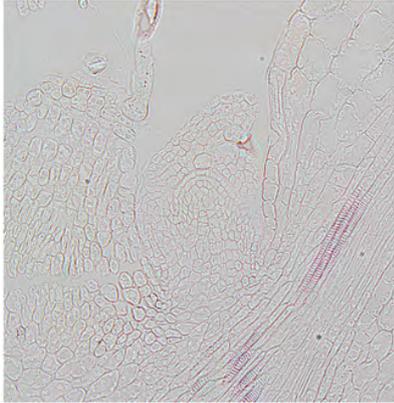
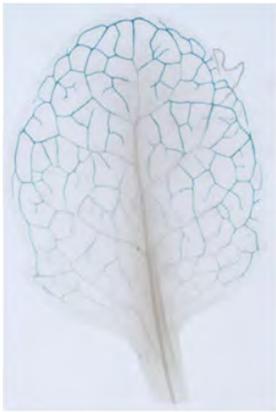


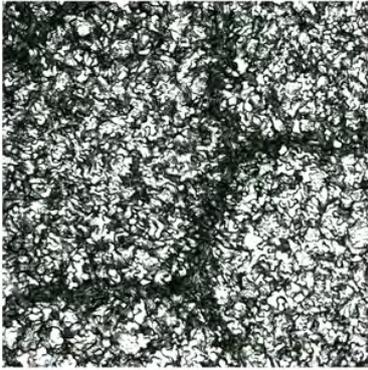
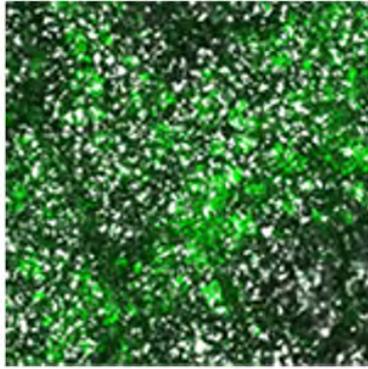
TCP R

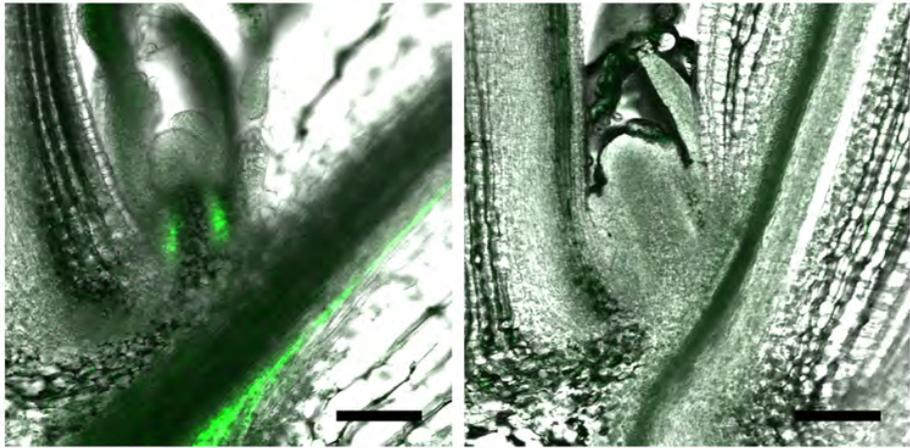


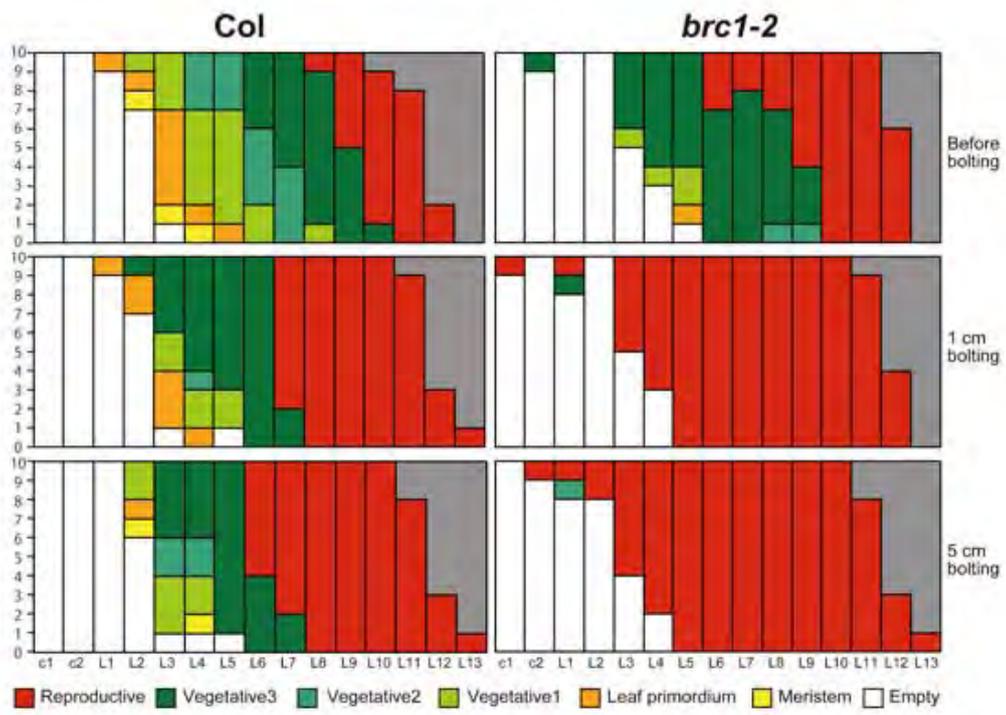


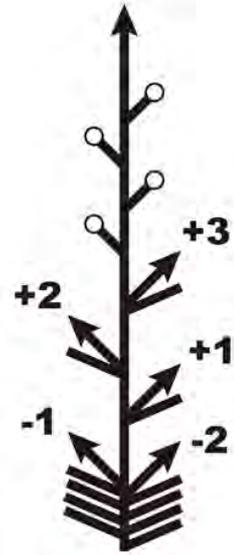
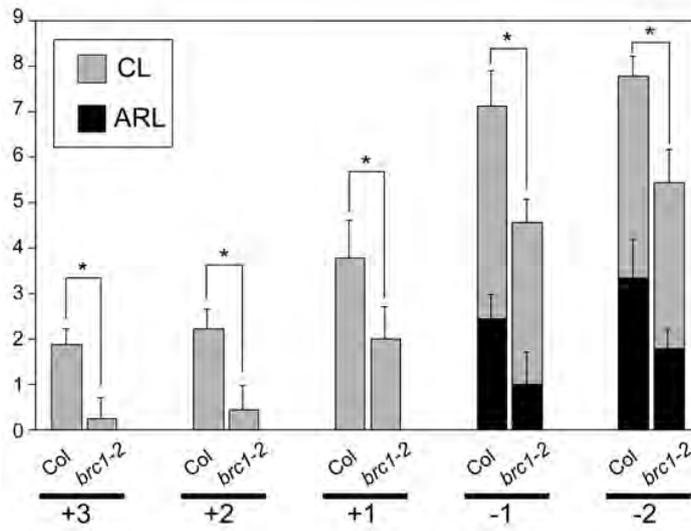


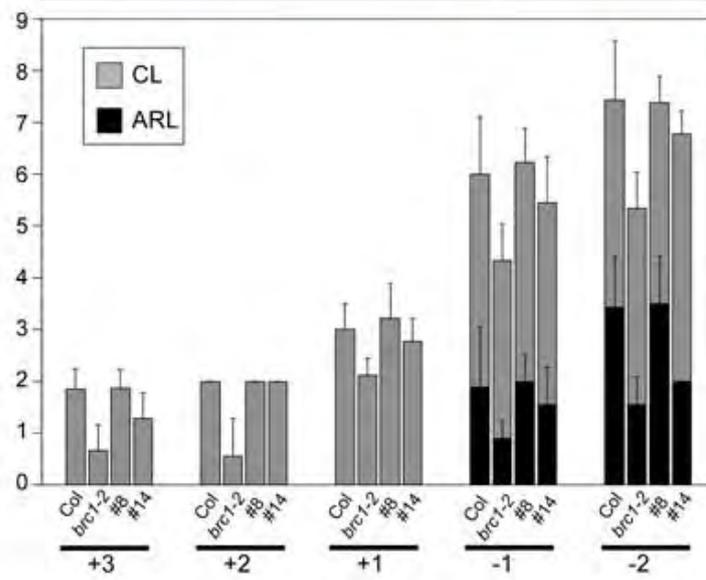


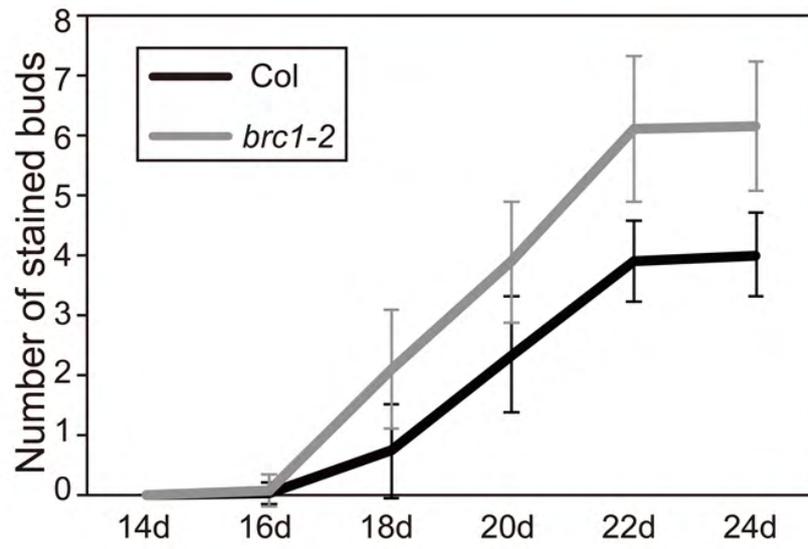


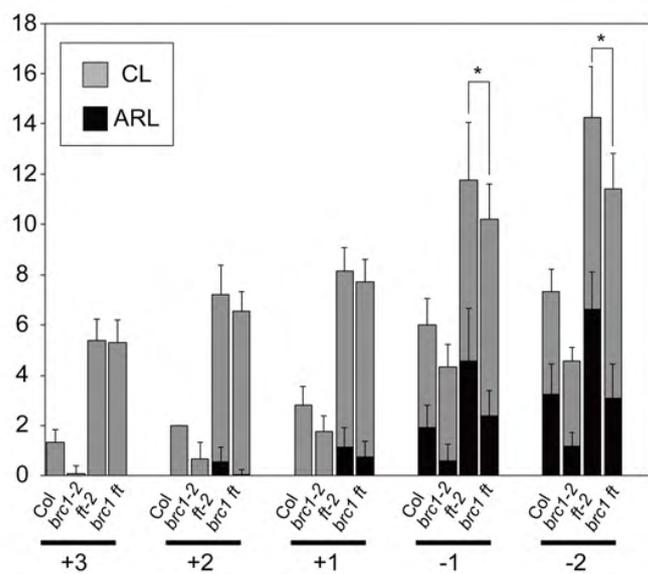


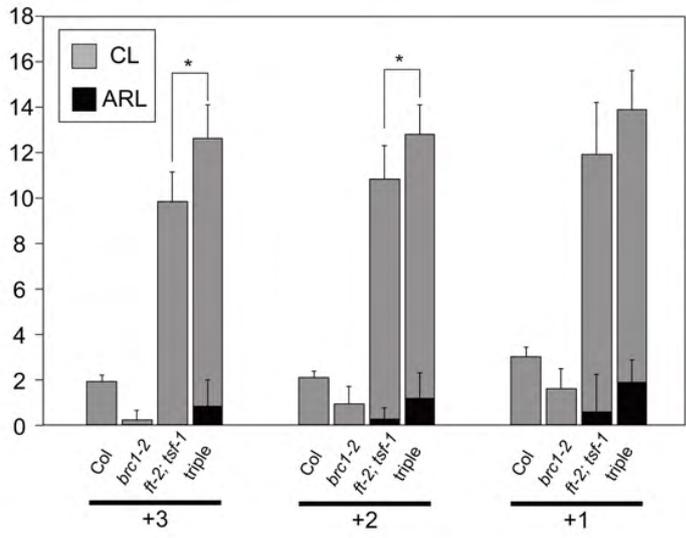


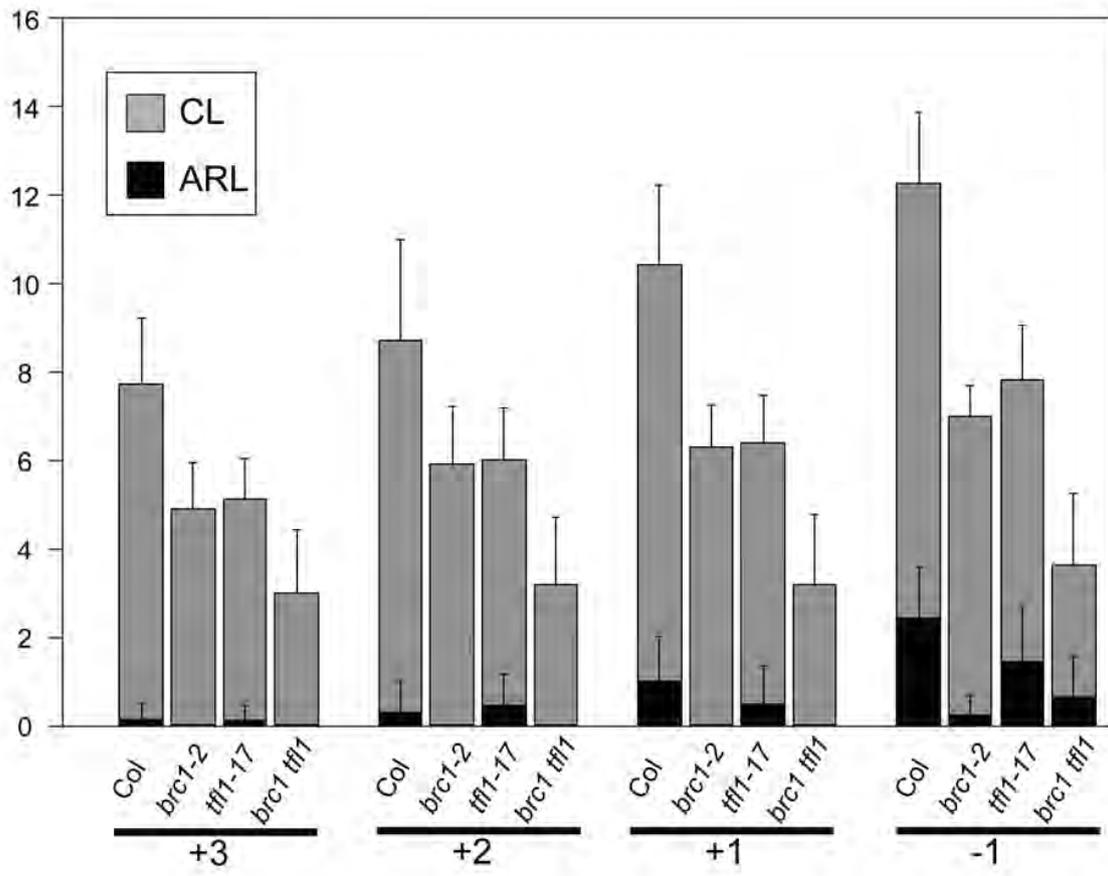




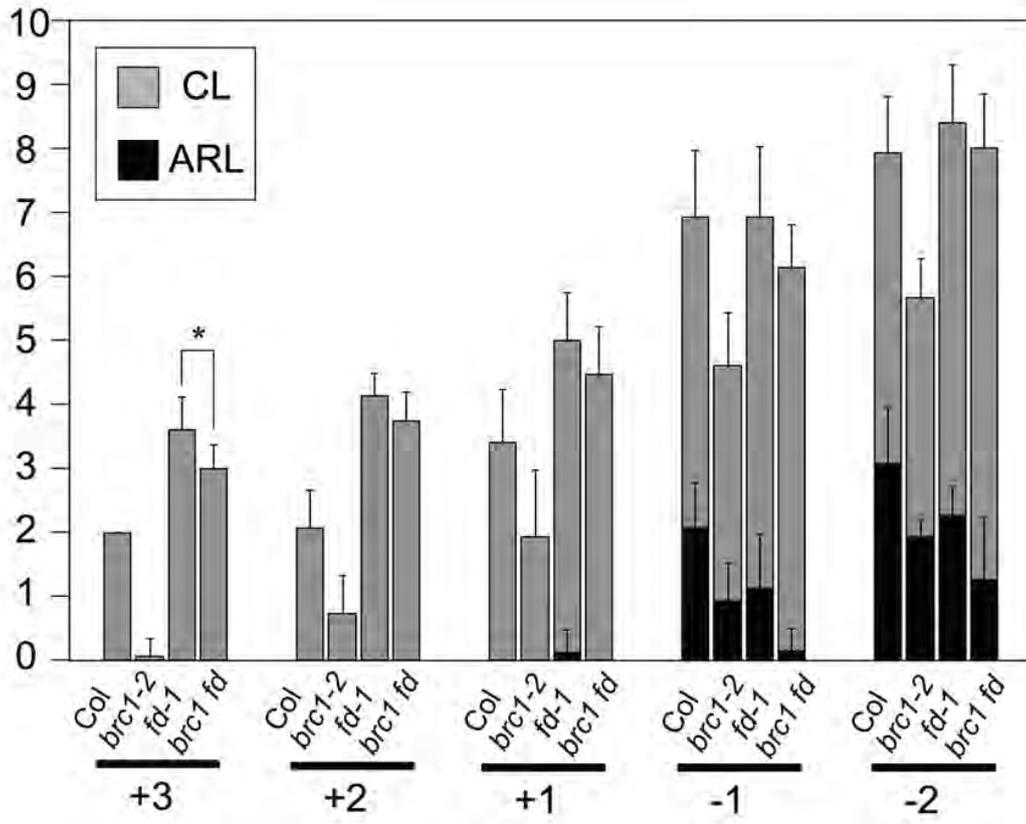


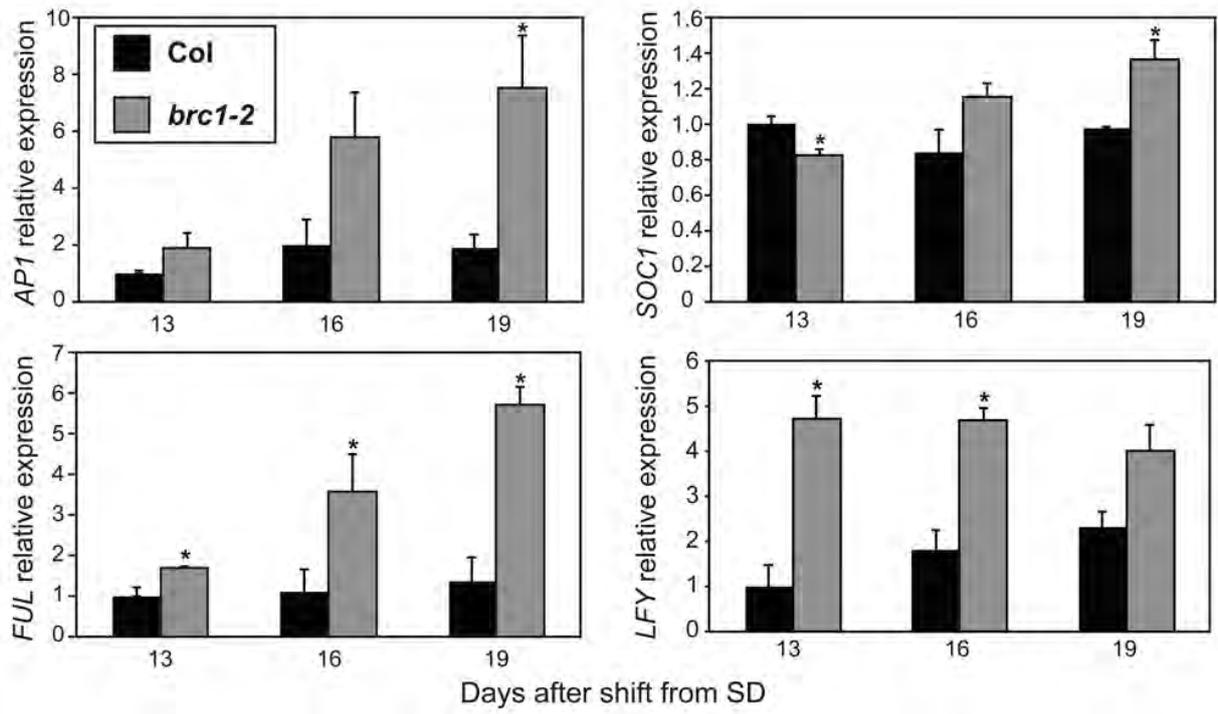


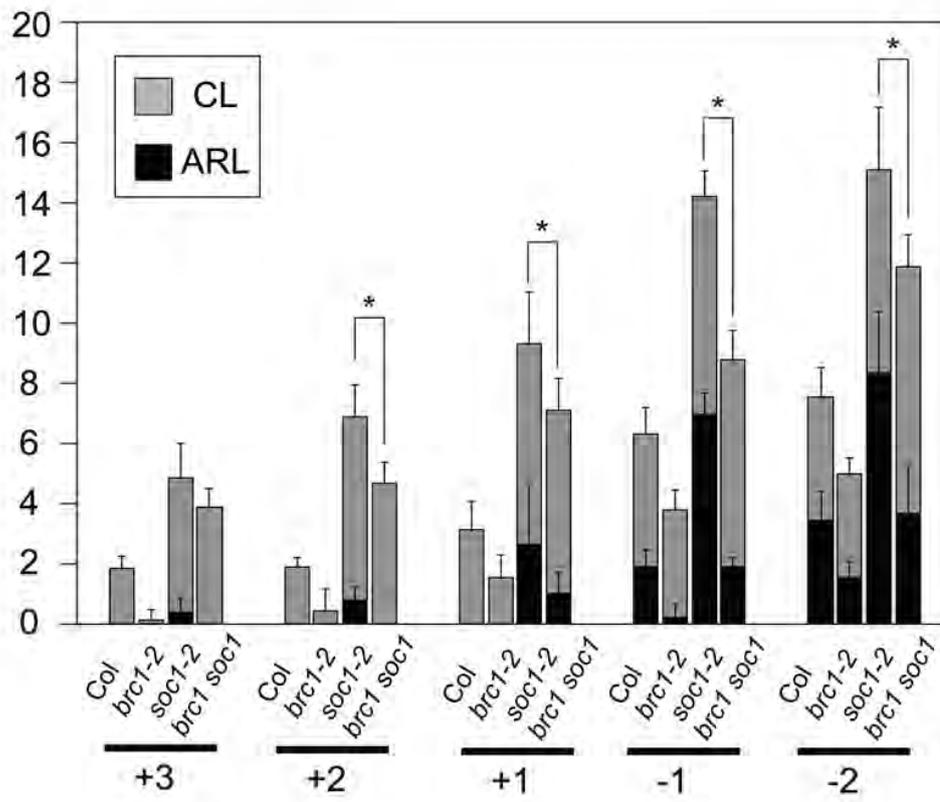


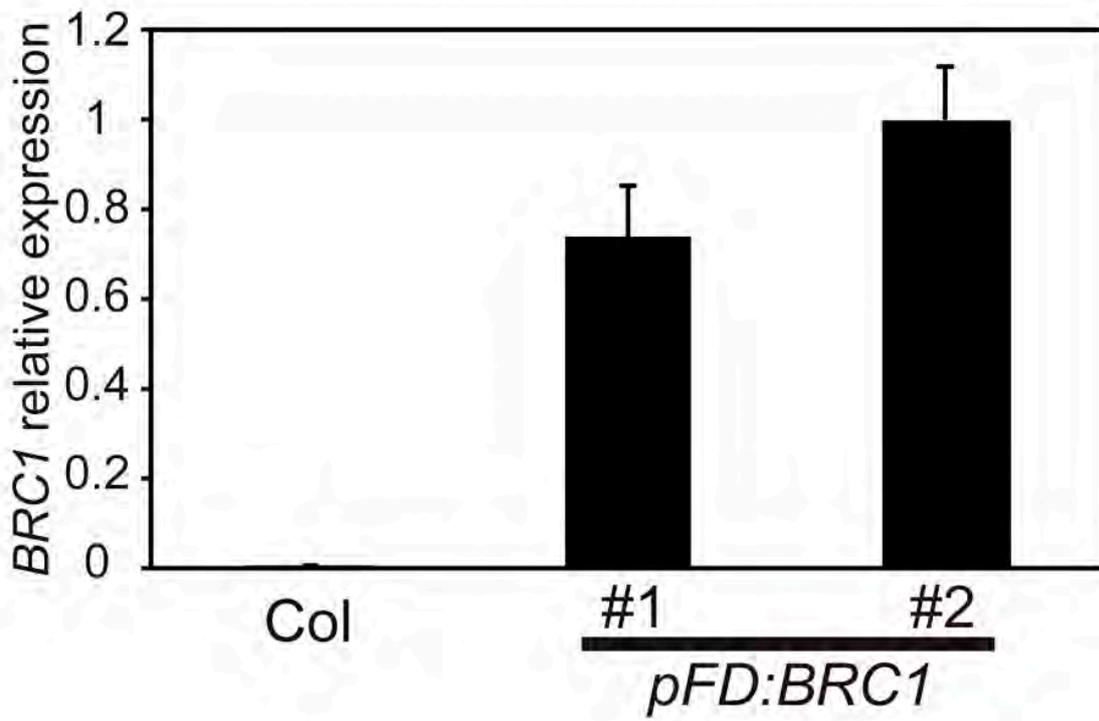


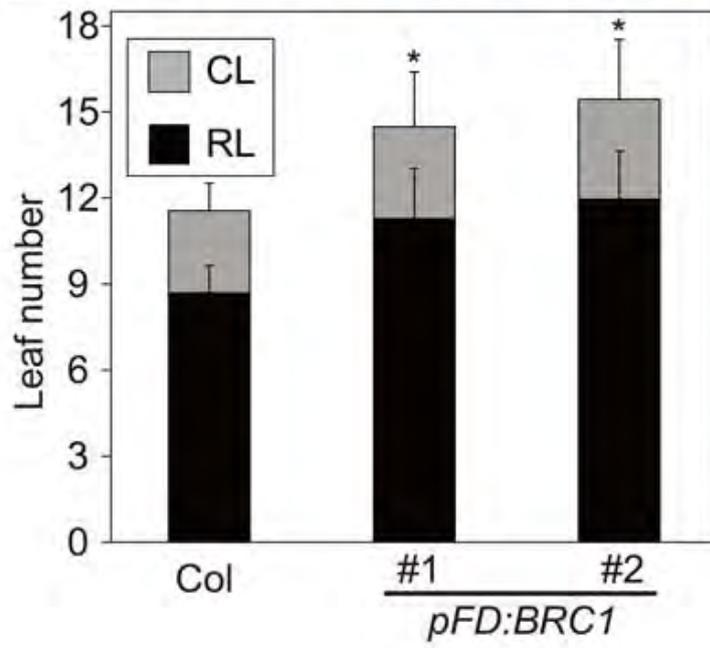












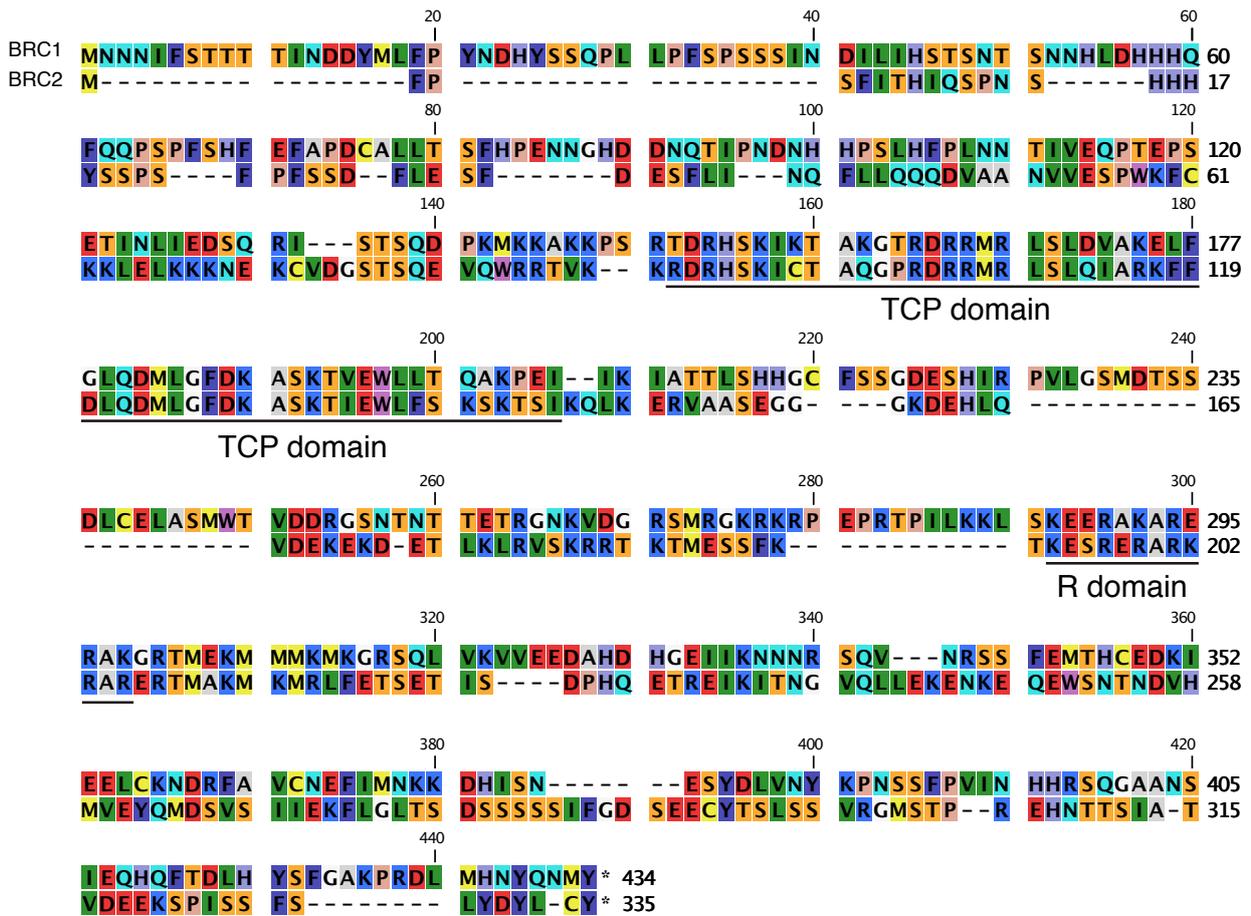


図25. BRC1蛋白質とBRC2蛋白質のアミノ酸配列のアラインメント

保存されたTCPドメインおよびRドメインを下線で示した。

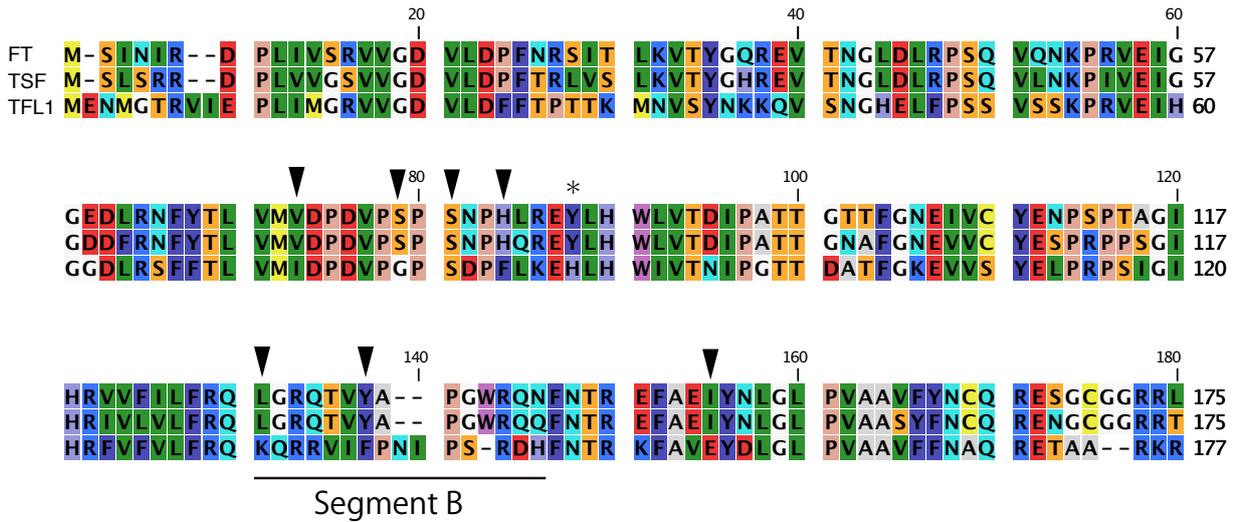


図26. FTおよびTSF、TFL蛋白質のアミノ酸配列のアラインメント

矢尻でFT蛋白質におけるBRC1蛋白質との結合に必要なアミノ酸を示した。また、FT蛋白質とTFL1蛋白質の機能の違いを規定する重要な配列について、アスタリスクでHanzawaら(2005)により示されたアミノ酸を、下線でAhnら(2006)によりSegment Bと名付けられたループ領域を示した。

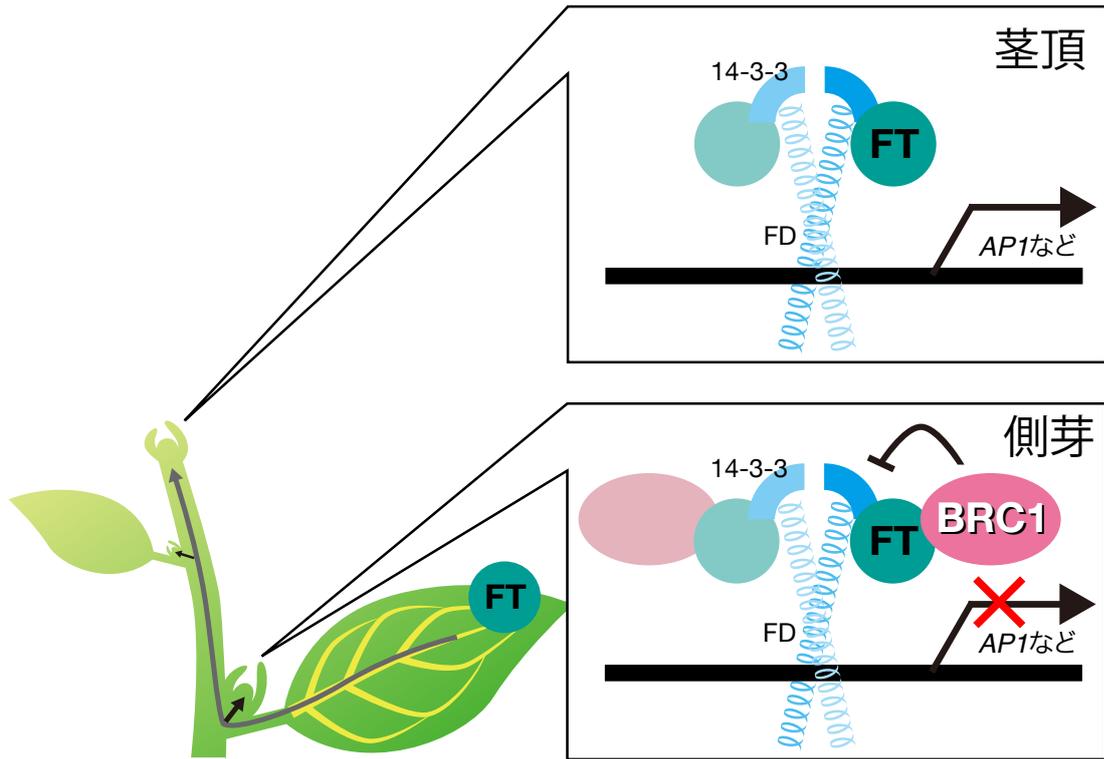


図27. BRC1蛋白質によるFTおよびTSF蛋白質の機能阻害モデル

葉で発現したFT蛋白質は茎頂分裂組織に加え、側芽へも移動する(左図)。茎頂分裂組織においては、*BRC1*遺伝子が発現していないため、FT-FD複合体は転写活性化因子として十分に機能することができる(右上図)。側芽においてはBRC1蛋白質が側芽特異的に発現しており、FT-FD複合体の転写活性化異能を阻害することで、下流遺伝子の誘導を妨げ、相転換を遅延させる(右下図)。