

京都大学	博士（生命科学）	氏名	安居 佑季子
論文題目	シロイヌナズナの光受容体フィトクロム相互作用因子VOZ1とVOZ2による花成制御機構の解析		
（論文内容の要旨） 植物は複数種の光受容体を有することで、光の性質を正確に認識し、外部の光環境に適応している。光受容体のひとつであるフィトクロムは植物の生活環を通じて機能する赤色光/遠赤色光受容体である。これまでにフィトクロムを介する成長相制御機構の解明を目指して、フィトクロム相互作用因子のスクリーニングが行われ、フィトクロムB (phyB) の相互作用因子をコードする遺伝子として <i>VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER1</i> (VOZ1) とVOZ2が単離された。VOZは陸上植物において広く保存されており、植物の転写因子であるNAC転写因子ファミリーに属する。これまでに突然変異体を用いた研究により、VOZ1とVOZ2が重複して phyB下流で花成を促進することが示されていた。本研究は、花成制御におけるVOZの働きを明らかにするため、主として分子遺伝学手法や分子細胞生物学的手法によりVOZを介する信号伝達の分子機構を解析した。 第1章では、phyBシグナル伝達に関連したVOZの分子機構の解析を行った。まず、qRT-PCR法およびGUSレポーターを利用した解析によって組織レベルでのVOZの発現特異性を調べた結果、VOZ1は維管束のみで、VOZ2は維管束を含む植物体全体で発現することが示された。VOZ1とVOZ2は重複して機能するため、共通して発現する維管束がVOZの機能場所であると考えられた。また、VOZタンパク質の細胞内局在を解析するため、GFP-VOZ2発現株における蛍光観察と分画実験を行った。その結果、VOZ2タンパク質は主として細胞質に局在しているが、一部が核にも局在していることがわかった。そこで次に、VOZ2に核移行/核搬出シグナルを付加して核/細胞質どちらに局在するVOZ2が機能的であるかを解析した。その結果、VOZ2は核で機能していることが明らかになった。また、<i>in vivo</i>におけるphyBとVOZの相互作用をBiFC法と共免疫沈降法により解析し、VOZとphyBが遠赤色光条件下において細胞質で相互作用することを示した。光に対するVOZの挙動を解析したところ、核局在のVOZ2タンパク質はphyBが不活性型になる遠赤色光下で分解されることが明らかになり、さらにVOZ2の光質依存的な分解がphyBを含むフィトクロムファミリーによって促進されていることを明らかにした。 第2章では、花成制御経路に注目し、VOZ下流因子の解析を行った。<i>voz1 voz2</i>変異体において、既知のphyB下流因子の花成統合因子である<i>FLOWERING LOCUS T (FT)</i> の発現が減少、<i>FT</i>抑制因子<i>FLOWERING LOCUS C (FLC)</i> の発現量が増加していることが明らかになった。<i>FLC</i>は長期の低温春化处理によりクロマチンレベルでサイレンシングされることが知られている。春化处理後の<i>voz1 voz2</i>変異体は野生型と同程度の花成時期を示し、春化处理前の<i>voz1 voz2</i>変異体の遅咲きは<i>FLC</i>の発現量増加に起因することが示唆された。VOZは<i>FLC</i>の発現を抑制することで花成時期を制御していることが示唆された。これまでにphyBシグナルが<i>FLC</i>の発現を制御しているとの報告はなされていないため、<i>phyB</i>変異体における<i>FLC</i>の発現解析を、VOZが機能していると考えられる葉において行った。その結果、ロゼット葉における<i>FLC</i>の発現量は野生型に比べ、減少していることが示された。さらに、<i>voz1 voz2</i>変異体と同様に遅咲きの表現型を示す<i>phyB voz1 voz2</i>変異体では、<i>FLC</i>の発現量は増加しており、<i>FLC</i>の発現量と花成における表現型が一致する結果が得られた。 本研究により、VOZは<i>in vivo</i>でphyBと相互作用し光質により制御を受けること、VOZは核内で機能し花成関連因子<i>FLC</i>の発現を抑制することによって<i>FT</i>の発現を制御していることが明らかになった。これらの知見をもとに、植物の成長制御における光質による花成調節機構を考察した。			

(論文審査の結果の要旨)

移動能を持たない植物にとって、与えられた環境に自らを適応させ成長や発生過程を調節することは、生存に関わる重要な能力である。光は、最も重要な環境因子であり、光合成のエネルギー源としてのみならず、環境識別の情報源としても機能する。光環境の識別には光受容体が重要な役割を果たす。赤色光/遠赤色光受容体であるフィトクロムの信号伝達は、発生初期の応答である種子発芽や胚軸の伸長抑制を中心に解析されてきた。フィトクロムが制御する生理応答のひとつに花成時期の決定がある。これまでの研究によって、フィトクロム相互作用因子として単離された転写因子をコードする遺伝子 *VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER1 (VOZ1)* および *VOZ2* が phyB 下流で重複して花成促進に機能することが示されていた。しかしながら、光受容から花成制御経路に至るメカニズムは不明であった。本研究は、第1章では phyB との相互作用や細胞内局在や安定性といった観点から VOZ の分子としての機能を解析した。第2章では光受容から花成制御に至る経路上の VOZ の位置づけを解析した。具体的には、以下の知見を得ている。

1. 分離した細胞における mRNA の検出やレポーター遺伝子を利用したプロモーター解析等によって *VOZ1* 及び *VOZ2* 発現の組織特異性を調べ、両者に共通して発現する維管束師部が機能部位であることを示した。
2. GFP 融合 *VOZ2* タンパク質を発現する植物において、蛍光の大部分は細胞質に観察された。タンパク質の細胞内分画と特異的抗体による検出によって、*VOZ2* タンパク質が主として細胞質に局在すること、一部は核内に局在することを示した。
3. BiFC 法および共免疫沈降法によって、phyB と *VOZ2* の結合が細胞質において遠赤色光条件で検出されることを示した。
4. 核局在および細胞質局在シグナルを付与した *VOZ2* を *voz1 voz2* 植物で発現する形質転換体を用いた解析によって、核が VOZ の作用部位であることを明らかにした。
5. 核内における *VOZ2* タンパク質の蓄積量は、phyB が不活性化される遠赤色光条件で低下し、これがフィトクロムに依存する現象であることを明らかにした。タンパク質分解には、プロテオソームによる経路やタンパク質リン酸化が関与する可能性を提示し、制御機構の一端を明らかにした。
6. *voz1 voz2* 二重変異体では *FT* の発現が低下しており遅咲きの原因であることを示した。また、*voz1 voz2* 二重変異体では *FT* を負に制御する因子である *FLC* の発現量が上昇していることから、長期の低温を感知する経路で機能する *FLC* の発現制御を介して *FT* の発現を制御している可能性を考察した。

以上のように、本研究では、花成制御における VOZ の生理機能や光条件における VOZ タンパク質の局在と安定性に関して、分子遺伝学や細胞生物学の多様な手法を複合的に用いて解析し、新たな知見を得た。これは、光による花成制御の実体解明に向けて貢献した研究として評価できる。

従って、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成24年10月10日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日