

学位論文題名

Molecular and genetic analyses of the mechanism of floral induction in *cop1-6*.(シロイヌナズナ *cop1-6* 変異体における花成誘導機構の分子遺伝学的解析)

学位論文内容の要旨

cop1 変異体は暗黒下で光形態形成する突然変異体として単離され、長日、短日にかかわらず早咲きとなる。*cop1* の弱いアレルである *cop1-6* 変異体は暗黒下で花成が誘導される。以上のことより、*COPI* は花成においても重要な役割を持っていると考えられる。しかし、これまで行われた *COPI* の研究の多くは、芽生えにおける暗黒下の光形態形成機構に集中しており、花成における *COPI* の役割については、ほとんど省みられてこなかった。そこで、花成における *COPI* の役割解明を目指し、*cop1-6* 変異体の花成について解析を行った。

野生型と *cop1-1*, *cop1-4*, *cop1-6* 変異体を 0.1, 1, 2, 5, 8% sucrose 添加 MS 培地で暗黒下で栽培したところ、これまで報告されていたように *cop1-6* だけが暗黒下で花成を誘導するのではなく、*cop1-1*, *cop1-4* も暗黒下で花成を誘導した。このことは *COPI* が暗黒下での芽生えの光形態形成だけではなく、花成の抑制にも(少なくとも暗黒下では)働いていることを示唆した。また、*cop1-1*, *cop1-4* 変異体は培地の糖濃度を上げることにより花成が誘導されたことから、*COPI* の花成に対する抑制は糖により解除されうる可能性が示唆された。

COPI-1, *COPI-4*, *COPI-6* 変異体タンパク質の細胞内局在を調べるために GFP-*COPI* 変異融合タンパク質を作成し、タマネギの表皮細胞で transient assay を行った。野生型の *COPI* 融合タンパク質は、核にのみ局在が観察されたが、*COPI* 変異融合タンパク質は核特異的な局在を示さず、主に細胞質でその存在が確認された。*COPI* 変異融合タンパク質の一部は核に移行し、少量の speckle が核内で観察された。以上の結果から、これらの *COPI* 変異融合タンパク質は野生型に比べ、核に局在しにくいことが示唆された。

cop1-6 変異体の暗黒花成誘導で使用されている遺伝的経路を探ることを目的に、RT-PCR 法を用いて、暗黒条件で 5% sucrose 添加 MS 培地で 3 週間栽培した野生型と *cop1-6* 植物における花成関与遺伝子の発現について調べた。長日誘導経路に存在する遺伝子 *CRY2*, *ELF3*, *GI*, *CO* の発現量は野生型と *cop1-6* では差が検出されなかった。*CO* より下流の遺伝子 *SOC1/AGL20*, *FT*, *LFY*, *API* は、野生型植物に比べ *cop1-6* 植物で高い発現を示した。自律的経路に存在する遺伝子 *LD*, *FCA*(γ) の発現は野生型と *cop1-6* で差は見られなかったが、*FLC* 遺伝子は野生型で *cop1-6* より高い発現を示した。以上のことより、*cop1-6* は暗黒花成において、*CO* より下流の遺伝子の発現に関わっている可能性が示唆された。また、自律的経路に存在する *LD* と *FCA*(γ) の発現に野生型と *cop1-6* で差が見

られなかったにもかかわらず、*cop1-6* で *FLC* の発現が減少していることから、*COP1* が自律的経路を介さずに *FLC* の発現に影響を与える可能性も考えられた。

cop1-6 変異体の暗黒花成における花成誘導の遺伝的経路を知るために、*cop1-6* 変異体と花成遅延変異体との二重変異体を暗黒条件で 5% sucrose 添加 MS 培地で栽培し、その花成について解析を行った。長日誘導経路に存在する *cry2-1*、*gi-2*、*co-1*、自律的経路に存在する *ld-1* を用いて二重変異体を作成した。*cry2-1 cop1-6* を除き、すべての二重変異体で *cop1-6* に比べ、花成が遅延した。従って、*cop1-6* の暗黒下での花成誘導能は使用した花成遅延変異に対して epistatic であることがわかった。*cry2-1 cop1-6* は *cop1-6* と葉の枚数がほぼ同じだった。*GI*、*CO*、*LD* の遺伝子の変異が *cop1-6* の暗黒花成の誘導に影響したことから、*cop1-6* の暗黒花成の誘導に長日誘導経路と自律的経路が使われていることが推測された。

光条件下と暗黒下での *cop1-6* の花成誘導経路の違いがあるかを調べるために、二重変異体を連続光照射条件下、2% sucrose 添加 MS 培地で栽培し、葉の枚数を指標に解析を行った。二重変異体の花成遅延は *gi-2 cop1-6* を除き、光照射下と暗黒下でよく似た傾向を示した。このことから *cop1-6* の暗黒花成は光条件下と同様の花成誘導経路を使っている可能性が示唆された。

光照射下の *cop1-6* における花成誘導経路を調べるために、2% sucrose 添加 MS 培地で栽培した二重変異体と花成遅延変異体の花成遅延率を葉の枚数を指標に比較した。*cry2-1 cop1-6* の葉の枚数は暗黒下と同様に *cop1-6* とほとんど同じであり、*cry2-1* による花成遅延は外的光環境に関わらず *cop1-6* によってほぼ完全に抑制されることがわかった。*gi-2 cop1-6* は暗黒下で光照射下に比べ葉の増加の抑制が見られたが、光照射下で *gi-2 cop1-6* と *gi-2* の花成遅延率はほぼ同じであった。このことから *gi-2* の花成遅延に対する *cop1-6* の抑制は暗黒条件特異的であることが示された。*co-1 cop1-6* と *co-1* はほぼ同じ花成遅延率を示した。*ld-1 cop1-6* は暗黒下と光照射下でほぼ同じ花成遅延率を示し、光照射下では *ld-1* に比べ著しい花成遅延抑制を示した。この結果は、外的光条件にかかわらず *cop1-6* の花成において *ld-1* はあまり影響しない、または *cop1-6* が *ld-1* による花成遅延を抑制する働きを持つことを推測させた。

2% sucrose 添加 MS 培地で栽培すると野生型及び花成遅延変異体が日長非感受性を示したことから、その影響を排除するために二重変異体をロックウールとバーミキュライトで栽培し、連続光照射と短日条件での花成について解析を行った。すべての二重変異体が日長非感受性を示し、*cop1-6* の花成における日長非感受性は使用した花成遅延変異に対して epistatic であることがわかった。

連続光照射条件下の二重変異体と花成変異体の花成遅延率を葉の枚数を指標に比較した。*gi-2 cop1-6* と *gi-2* はほぼ同じ花成遅延率を示した。培地条件とは異なり、*ld-1 cop1-6* と *ld-1* はほぼ同じ花成遅延率を示し、この栽培条件では *cop1-6* は *ld-1* の花成遅延を強く抑制しないことがわかった。*co-1 cop1-6* は *co-1* に比べ著しい花成遅延を示した。従って、*cop1-6* の花成促進は *co-1* により強い抑制を受けることがわかった。

以上の解析から、*COP1* は暗黒下での光形態形成の抑制だけではなく、(少なくとも暗黒下では)花成の抑制にも関与しており、その抑制は糖により解除されうること、*COP1* の花成抑制に *CO* と *FLC* が関わっていることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 敦 之

副 査 教 授 山 本 與太朗

副 査 教 授 山 口 淳 二

副 査 教 授 米 田 好 文 (東京大学大学院理学系研究科)

学 位 論 文 題 名

Molecular and genetic analyses of the mechanism of floral induction in *cop1-6*.

(シロイヌナズナ *cop1-6* 変異体における花成誘導機構の分子遺伝学的解析)

cop1 変異体は暗黒下で光形態形成を行う突然変異体として単離され、長日、短日にかかわらず早咲きとなる。弱いアレルである *cop1-6* 変異体は暗黒下で花成が誘導されることより、*COP1* は花成においても重要な役割を持つと考えられるが、これまでの研究は芽生えにおける暗黒下の光形態形成機構に集中しており、花成における役割については解析されていない。そこで申請者は花成における *COP1* の役割解明を目指し、*cop1-6* 変異体を用いて、遺伝学的、並びに分子生物学的な解析を行った。

申請者は *cop1-6* だけが暗黒下で花成を誘導するのではなく、*cop1-1*, *cop1-4* も培地の糖濃度を上げることで暗黒下で花成を誘導することを見いだした。

暗黒条件における花成関与遺伝子の発現解析より、*cop1-6* は暗黒花成において *CO* より下流の遺伝子の発現及び *FLC* の発現抑制に関わっている可能性が示された。

cop1-6 変異体と花成遅延変異体 (長日誘導経路に存在する *cry2-1*, *gi-2*, *co-1*, 自律的経路に存在する *ld-1*) との二重変異体を作製し、その花成について解析を行ったところ、*cop1-6* の暗黒花成の誘導に長日誘導経路と自律的経路が使われていることがわかった。さらに、*cop1-6* の暗黒花成は光条件下と同様の花成誘導経路を使っている可能性が示された。

光照射下での二重変異体の花成の解析からは、*gi-2* の花成遅延に対する *cop1-6* の抑制は暗黒条件特異的であること、外的光条件にかかわらず *cop1-6* の花成において *ld-1* はあまり影響しないこと、*cop1-6* の花成促進は *co-1* により強い抑制を受けることがわかった。また、*cop1-6* の花成における日長非感受性は使用した花成遅延変異に対して上位性を示した。

以上の解析から、*COP1* は暗黒下での光形態形成の抑制だけではなく、花成の抑制にも関与しており、その抑制は糖により解除されうること、*COP1* の花成抑制に *CO* と *FLC* が関わっていることを明らかにし、*COP1* を含めた花芽形成に必要な遺伝子ネットワークのモデルを提唱した。本研究は植物の花芽形成という重要な生命現象に新たな知見を付け加えるものである。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格があるものと認める。