

【31】

氏 名（本籍）	ふじ 藤	わら 原	す み れ すみれ	（三 重 県）
学 位 の 種 類	博	士	（理 学）	
学 位 記 番 号	博	甲	第 3863 号	
学位授与年月日	平成 17 年 11 月 30 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科			
学 位 論 文 題 目	<b>Genetic and Molecular Analysis on Functional Interactions Between Clock Components LHY/CCA1 and Flowering Regulation in <i>Arabidopsis</i></b> (シロイヌナズナにおける概日時計因子 LHY/CCA1 と花成制御の関係に関する遺伝学および分子生物学的解析)			
主 査	筑波大学教授	理学博士	鎌 田	博
副 査	筑波大学教授	理学博士	白 岩	善 博
副 査	筑波大学教授	理学博士	佐 藤	忍
副 査	筑波大学教授	理学博士	漆 原	秀 子

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

植物にとって花成時期の制御は子孫を残す上で極めて重要である。適した季節に花成を誘導するため、多くの植物は、概日リズム制御機構を用いて光周期を測定し、季節を認識している。LATE ELONGATED HYPOCOTYL(LHY) と CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) は、概日リズム制御系で中心的に機能するとされる転写因子であり、*lhy cca1* 二重機能欠損株は、短日条件下で花成期間の短縮を示す。一方、光周期依存型の花成制御経路には多くの因子が関わり、なかでも主に 3 つの花成促進因子、GIGANTEA(GI)、CONSTANS(CO)、FLOWERING LOCUS T(FT) が極めて重要機能を有することが明らかにされてきた。これらの因子の転写レベルは、概日時計の制御下にあること、FT の発現の有無が花成誘導に強く関わるものが既に明らかにされている。また、シロイヌナズナが長日条件下と短日条件下で異なる花成時期を示す主な原因は、CO タンパク質と光の存在のタイミングに依存する可能性が報告されている。しかし、GI の役割を含め、概日時計による花成制御のメカニズムについては、未だ未解明な点が多く残されている。そこで本研究では、概日時計による花成制御の分子メカニズムの解明を目的としている。

まず、*lhy cca1* が短日条件下で示す花成期間の短縮形質の原因解明を試みた。各種多重変異体の花成時期調査および遺伝子発現解析により、この花成期間の短縮形質は、GI の発現ピークの前進、CO の発現ピークの明期中への前進、FT の大幅な発現上昇によって引き起こされていることを見出した。*gi* 機能欠損株や GI 過剰発現体において、花成に直接関係しない LHY や CCR2 などの発現振動に有為な変化が生じることが共同研究者によって明らかにされたが、その変化は CO や FT などの花成関連遺伝子の発現に与える影響と比較すると極めて小さかった。これらの結果から、GI は時計本体の制御にも関わり得るが、それとは別の機構により、時計の出力経路における花成制御において非常に重要な機能を持つ可能性を提示した。

上記の解析を進める中で、*lhy cca1* が、恒明条件下では花成遅延形質を示すことが明らかになり、GI、CO 共に転写レベルは野生型と同様で、FT の転写量だけが大幅に低下することを見出した。これらのことから、*lhy cca1* が恒明条件下に置かれた場合、CO のタンパク質レベルでの制御、もしくは CO を介さない FT

の転写制御が異常になる可能性が考えられた。この花成遅延形質の原因を明らかにするため、*lhy cca1* を突然変異誘発剤によって処理し、恒明条件下で花成遅延しない系統を単離した。この中から、*FLOWERING LOCUS C (FLC)* もしくは *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* の発現が消失もしくは低下する系統を複数得た。また、*ELF3* 遺伝子内に変異を持つ2系統を同定した。*FLC* と *ELF3* は共に機能欠損によって花成期間の短縮、過剰発現によって花成遅延形質を示すことが報告されている。*FLC* は、自律的花成促進経路と春化依存花成促進経路の制御下で、*FT* の発現を抑えることによって花成抑制因子として機能することが報告されており、*ELF3* は概日時計の光による同調機構において機能すると考えられている。*FLC* 過剰発現体を恒明条件下で栽培したところ、*lhy cca1* と酷似した形質を示すことを発見した。これらのことから、恒明条件下における *lhy cca1* の花成遅延形質に *FLC* や *ELF3*、もしくはそれらの制御因子が関わる可能性を示唆した。

さらに、*lhy cca1* に変異を加え、短日条件下でさらなる花成期間の短縮を示す系統を解析し、これらの系統の中から *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* 遺伝子の変異の新規アリルを同定した。*TFL1* は茎頂部において花器官形成に抑制的に働く因子であり、*tfl1* 機能欠損株は、茎頂に terminal flower を形成し、花成期間の短縮が起こることが既に報告されている。また、これらの形質は長日条件下で強く、短日条件下で弱まることも報告されているが、その原因については全く解明されていなかった。*tfl1* 機能欠損株は、*lhy cca1* と組み合わせると、短日条件下においても極端な花成期間の短縮および強い terminal flower 形質を示した。長日・短日両条件下において、*lhy cca1* では *FT* の発現が高く、*gi* 機能欠損株では低いことから、*tfl1* 機能欠損株が示す花成時期と花の形態の日長依存性は、*FT* の発現の有無に起因する可能性を提示した。

以上の主に3つの研究結果から、「*lhy cca1* 二重機能欠損株の光周期非感受性のメカニズム」、「*lhy cca1* 二重機能欠損株の短日／恒明条件下における花成形質の逆転現象のメカニズム」、「概日時計と *TFL1* による花成制御のメカニズム」について新しい知見を得るとともに、光周性花成誘導に関する新規なモデルを提示した。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、シロイヌナズナというモデル実験材料のもつ利点を最大限に活用し、他の植物では解析が困難な「概日リズムと光周性応答の関係」について、分子メカニズムを解析したものである。*GI* の花成への影響、概日リズムへの影響はこれまでに確認されてはいるものの、*GI* の遺伝学的作用点について明らかにした報告はなく、*GI* 過剰発現体を用いた多重変異体の解析と RT-PCR による花成・概日リズムマーカー遺伝子群の詳細な発現解析により、1日のなかでの *GI* の発現時期が *CO* 発現時期を決め、*FT* 発現の有無を決定することを初めて明らかにした点は極めて高く評価できる。また、*lhy cca1* 二重変異体が、明暗周期下とは異なり、恒明条件下においては花成遅延を引き起こし、その際、*GI* と *CO* の発現変動を伴わずに、*FT* 発現量が低下することを新たに見出し、その原因を解明するため、機能抑圧変異体を単離し、その原因遺伝子の候補を複数同定し、概日時計 (*LHY/CCA1*) による花成制御に関し、*GI-CO-FT* とは別の新規な経路の存在の可能性を示唆した。この経路は、概日時計機能が不全になった *lhy cca1* 変異体を、概日時計を同調しえない恒明条件下において長期間生育させたことにより初めて明らかにできたものであり、光周性応答における概日時計の役割を研究する上で、極めて重要な知見を与えるものである。

以上のように、光周性依存型花成における *LHY* と *CCA1* の作用機構の一端を解明した本研究は、植物のみならず、生物の光周時計と概日時計の関係を明らかにする上で重要な基礎的知見を提供するものであり、時間生物学に関する研究の発展に多大な貢献をするものと強く期待される。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。