

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07287

研究課題名(和文) ホトトギス属植物における花序形成分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of a molecular mechanism of inflorescence development in *Tricyrtis* spp.

研究代表者

中野 優 (Nakano, Masaru)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00262460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：花序形態の異なる2種のホトトギス属植物(ホトトギスおよびタイワンホトトギス)を用いて、LEAFY(LFY)ホモログ遺伝子と花序形態との関係を調査した。その結果、両種間でLFYホモログ遺伝子の構造、機能および幼苗期の発現パターンには違いがみられなかった。今後は、開花期における発現パターンの調査を行う予定である。一方、LFYホモログ遺伝子を異所発現する形質転換体においては矮化や早期開花等の変化がみられ、LFYホモログ遺伝子を用いた形質転換の育種利用の可能性が示された。さらに、LFYと拮抗的に発現するTFL1のホモログ遺伝子のアミノ酸配列においても、両種間で違いはみられなかった。

研究成果の概要(英文)：The relation between inflorescence architecture and LEAFY(LFY)-like gene was examined by using two *Tricyrtis* spp. (*T. hirta* and *T. formosana*) showing different inflorescence architectures. No differences in the structure, function and expression pattern in young plants of the LFY-like genes were observed between these species. Further expression analysis of the LFY-like genes is necessary at the flowering stage. Transgenic plants ectopically expressing the LFY-like genes showed dwarf and early-flowering phenotypes, indicating a possibility of breeding of ornamental plants by genetic transformation with the LFY-like genes. TFL1-like genes, which have been reported to be expressed antagonistically with LFY-like genes, were then isolated from *T. hirta* and *T. formosana*. However, no difference in the estimated amino acid sequence of the TFL1-like genes was observed between these species.

研究分野：農学

キーワード：ホトトギス属植物 花序形成 LEAFY遺伝子 TFL1遺伝子 花き園芸植物 形質転換

1. 研究開始当初の背景

植物は、種によって様々な花序形態を示すが、これは多様な生育環境に適応するための重要な役割を担っている。一方、花き園芸植物においては、花序の形態は草姿や花数に直接かかわることから、重要な形質のひとつと考えられる。しかしながら、これまでのところ、花序形成に関する分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。

近年、花序の形態形成に関与する遺伝子の候補として、*LEAFY* (*LFY*) があげられている。*LFY* は植物に固有な転写因子をコードしており、花芽分裂組織の運命を決定し、栄養成長相から生殖成長相への転換を媒介するスイッチの構成要素として働くことが知られている (Weigel & Nilsson, 1995)。一方、複数の植物種において、*lfy* 変異体では花序の形態や分枝パターンに変化が生じることから、花序形成にも *LFY* が関与していることが示唆されている (Moyroud et al., 2010)。また、異なる属に属し、異なる花序形態を示す4種のアブラナ科植物 (シロイヌナズナを含む) を用いた研究では、異なる花序形態の植物種間では *LFY* ホモログ遺伝子の発現パターンおよび機能に明らかな違いがあり、*LFY* が花序の形態形成に関与していることが強く示唆されている (Yoon et al., 2004)。しかしながら、この研究では、材料に用いた4種の植物が遠縁であることや、シロイヌナズナ以外の植物種では形質転換が困難なことから、花序形成と *LFY* の関係性の証明には至っていない。

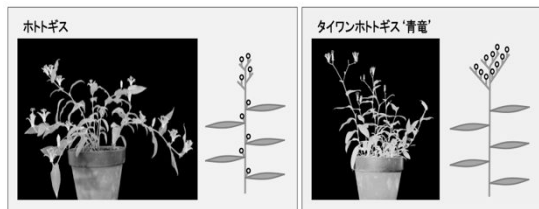
本研究で用いるホトトギス属植物 (*Tricyrtis* spp.) は、ユリ科に属する花き園芸植物で、種間で多様な草姿・花形・花色を示す。また、形質転換が容易で、形質転換体の再生から開花までの期間が短く、かつ栽培も容易なことから、我々の研究グループでは、単子葉花き園芸植物における形質転換を用いた園芸形質の解析・改良のモデルとして位置づけている (Mori et al., 2008)。これまでに、形質転換により、花形 (Nakano et al., 2007) や花色 (Kamiishi et al., 2012)、草丈 (Otani et al., 2013) 等が変化したホトトギス属植物を作出している。

ホトトギス属植物のうち、ホトトギス (*T. hirta*) が頂生と腋生の花を付けるのに対し、台湾ホトトギス (*T. formosana*) は頂生の花のみを付ける (第1図)。また、両者の種間雑種では、ホトトギスと同様に、頂生と腋生両方の花がみられる。我々は、このようなホトトギス属種間における花序形態の違いに注目し、それぞれの種から *LFY* ホモログ遺伝子の cDNA クローンを単離した (ホトトギス *ThirLFY*; 台湾ホトトギス *TforLFY*)。RT-PCR 法による発現解析を行ったところ、いずれの種においても、*LFY* ホモログ遺伝子は若い花蕾でのみ発現していた。また、*in situ* hybridization 法により花序発達初期における発現解析を行ったところ、ホトトギスでは頂芽および腋芽の両方で *ThirLFY* の発現がみ

れたのに対し、台湾ホトトギスでは頂芽のみで *TforLFY* の発現がみられた。さらに、*ThirLFY* と *TforLFY* の推定アミノ酸配列を比較したところ、両遺伝子間で3アミノ酸残基の違いが確認された。また、プロモーター領域の塩基配列を比較したところ、*ThirLFY* と *TforLFY* 間でホルモン応答モチーフの数や位置に大きな違いがみられた。これらの結果から、ホトトギス属植物における花序形態の違いには、*LFY* ホモログ遺伝子の機能または発現パターンの違いが関与していると予想された。また、*LFY* ホモログ遺伝子の発現の違いには異なる植物ホルモンへの応答性が関与していることも示唆された。

2. 研究の目的

上述のような予備実験をふまえて、本研究は、ホトトギス属植物における花序形成分子メカニズムに関する基礎的な知見を得ることを目的に行う。そのため、*ThirLFY* および *TforLFY* のゲノミッククローンを単離して、*LFY* ホモログ遺伝子の構造の違いを調査するとともに、*ThirLFY* および *TforLFY* をシロイヌナズナおよびホトトギス属植物で異所発現させ、機能解析を行う。また、レポーター遺伝子を用いたプロモーター解析を行い、*ThirLFY* および *TforLFY* の発現パターンを調査する。さらに、*LFY* と拮抗的に発現する *TFL1* のホモログ遺伝子も新たに単離し、塩基配列の比較や発現解析を行う。



第1図 ホトトギスおよび台湾ホトトギスの花序形態の違い

3. 研究の方法

(1) *LFY* ホモログ遺伝子のゲノミッククローンの単離

ThirLFY および *TforLFY* の cDNA クローンをもとにして、PCR によりそれぞれのゲノミッククローンを単離し、構造等を比較した。

(2) *LFY* ホモログ遺伝子の機能解析

カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター制御下の *ThirLFY* および *TforLFY* をシロイヌナズナ、ホトトギスおよび台湾ホトトギスに導入し、形態調査等を行なった。

(3) *LFY* ホモログ遺伝子のプロモーター解析

ThirLFY および *TforLFY* のプロモーター領域に GUS レポーター遺伝子を連結したコンストラクトを作製し、シロイヌナズナやホトトギス属植物に導入した。

(4) *TFL1* のホモログ遺伝子の単離

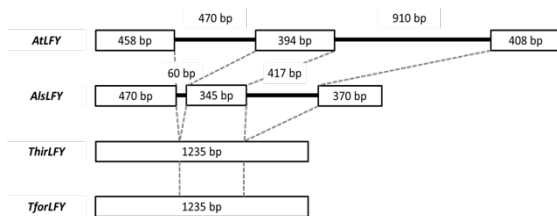
ホトトギスおよび台湾ホトトギスから、RACE 法により *TFL1* ホモログ遺伝子を単離した。

4. 研究成果

(1) *LFY* ホモログ遺伝子のゲノミッククローンの単離

ThirLFY および *TforLFY* のゲノミッククローンを単離することができた。両ゲノミッククローン間には配列および構造的な違いがみられず、*LFY* ホモログ遺伝子の構造が花序形態の違いに及ぼす影響は無いと考えられた。

なお、これまでに単離されている双子葉植物種の *LFY* ホモログ遺伝子には2つのイントロンが存在すると報告されている。しかしながら、*ThirLFY* および *TforLFY* のゲノミッククローンの ORF の長さは cDNA と同じであり、これらの *LFY* ホモログ遺伝子にはイントロンは存在していなかった。そこで、他のホトトギス属植物 (キイジョウロウホトトギス、キバナノホトトギス、ヤマジノホトトギス) やユリ科 (APGIII 植物分類体系) の他属に属する植物 (ユリ、チューリップ、オオバタケシマラン) の *LFY* ホモログ遺伝子を調査したところ、これらの植物種においてもイントロンが欠失していた (第 2 図)。一方、ユリ目 (APGIII 植物分類体系) の他科に属するアルストロメリアにおいては、2つのイントロンの存在がすでに報告されている (第 2 図)。したがって、APGIII 植物分類体系におけるユリ目植物のうち、ユリ科植物では *LFY* ホモログ遺伝子のイントロンが欠失していると予想された。これらの結果は、植物の進化と *LFY* ホモログ遺伝子との関係を考察する上で、非常に興味深い。

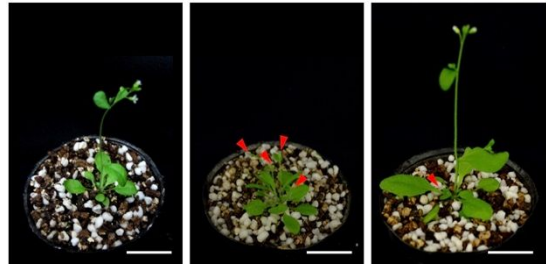


第 2 図 シロイヌナズナ (*AtLFY*)、アルストロメリア (*AlsLFY*)、ホトトギス (*ThirLFY*) および Тайワンホトトギス (*TforLFY*) のゲノミッククローンの構造

(2) *LFY* ホモログ遺伝子の機能解析

ThirLFY や *TforLFY* を異所発現させたシロイヌナズナの形質転換体は、野生型のシロイヌナズナと比較して早期開花を示した (第 3 図)。 *ThirLFY* や *TforLFY* による早期開花の程度は、シロイヌナズナ由来の *LFY* を過剰発現させた場合とほぼ同様であり、*ThirLFY* および *TforLFY* が *LFY* としての機能を有することが示された。

一方、*ThirLFY* や *TforLFY* を異所発現させたホトトギスや Тайワンホトトギスの形質転換体においても、矮化や早期開花等の変化が観察された (第 4 図)。なお、 Тайワンホトトギス形質転換体の一部では、花序形態に若干の変化が観察された。この点については、形質転換体の株が充実した後に詳細に調査する予定である。



第 3 図 野生型のシロイヌナズナ (左)、およびシロイヌナズナ由来 *LFY* (中) またはホトトギス由来 *LFY* ホモログ遺伝子 (右) を異所発現するシロイヌナズナ形質転換体。発芽 30 日後



第 4 図 ホトトギス '東雲' の非形質転換体 (左) および *LFY* ホモログ遺伝子を異所発現する形質転換体 (中・右)

なお、矮化や早期開花は花き園芸植物にとって重要な形質であるため、ペチュニア、トレニア、カラコエ等の花き園芸植物において、*ThirLFY* または *TforLFY* を異所発現する形質転換体を作成した。その結果、それらの形質転換体においても矮化や早期開花等の変化が観察され、*LFY* ホモログ遺伝子を用いた形質転換の育種利用の可能性が示された。

(3) *LFY* ホモログ遺伝子のプロモーター解析

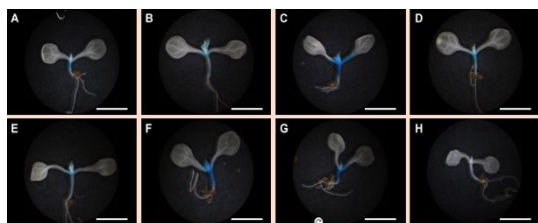
ThirLFY および *TforLFY* のプロモーター領域に GUS レポーター遺伝子を連結したコンストラクトを作製し、シロイヌナズナ、ホトトギスおよび Тайワンホトトギスに導入した。シロイヌナズナ形質転換体の実生においては、プロモーターの種類にかかわらず、主に胚軸において GUS 遺伝子の発現が観察された (第 5 図)。

シロイヌナズナ形質転換体の実生をサイトカイニン (BA) 単独、BA + ジベレリン (GA_3) またはオーキシシン (2,4-D) + GA_3 で処理したところ、胚軸での GUS 遺伝子の発現が促進された。一方、2,4-D 単独、2,4-D + BA または 2,4-D + BA + GA_3 で処理したところ、胚軸での GUS 遺伝子の発現が抑制された (第 5 図)。

ホトトギスおよび Тайワンホトトギスの形質転換体においては、少なくとも幼苗期では茎頂部付近で GUS 遺伝子の発現が観察された。その発現に及ぼす植物成長調整物質処理の影響に関しては、シロイヌナズナ形質転換体とほぼ同様の結果が得られた。

以上のように、少なくとも幼苗期においては *ThirLFY* と *TforLFY* の発現には顕著な差異はみられていない。今後は、開花期における

同様の調査を行う予定である。



第5図 *ThirLFY*プロモーター制御下のGUSレポーター遺伝子が導入されたシロイヌナズナ形質転換体の実生におけるGUS遺伝子の発現。A、植物成長調節物質無処理。B、2,4-D処理。C、BA処理。D、GA₃処理。E、2,4-D + BA処理。F、2,4-D + GA₃処理。G、BA + GA₃処理。H、2,4-D + BA + GA₃処理

(4) *TFL1* のホモログ遺伝子の単離

ホトトギス (*ThirTFL1*) および台湾ホトトギス (*TforTFL1*) から *TFL1* のホモログ遺伝子のcDNAクローンを単離することができた。しかしながら、それらのアミノ酸配列に違いはみられなかった。

今後は、これらの *TFL1* ホモログ遺伝子の発現解析、ゲノミッククローンの単離および構造解析、GUSレポーター遺伝子を用いたプロモーター解析等を行う予定である。

以上のように、現在までのところ、ホトトギス属植物の花序形態の違いと *LFY* および *TFL1* ホモログ遺伝子との関係は明瞭にはなっていない。研究は現在も継続中であり、今後、開花期の形質転換体を用いた *LFY* および *TFL1* ホモログ遺伝子のプロモーター解析や、*LFY* および *TFL1* ホモログ遺伝子のノックアウト系統の作出等により、何らかの新知見が得られるものと期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Masahiro Otani, Ahmad Sharifi, Shosei Kubota, Kanako Oizumi, Fumi Uetake, Masayo Hirai, Yoichiro Hoshino, Akira Kanno, Masaru Nakano, Suppression of B function strongly supports the modified ABCE model in *Tricyrtis* sp. (Liliaceae), Scientific Reports, 査読有, 6巻, 2016, 24549, DOI: 10.1038/srep24549

〔学会発表〕(計4件)

大谷真広、佐藤翔一、中野 優、ホトトギス属植物におけるシロイヌナズナ由来 *LEAFY* を導入した形質転換体の作出および形質調査、園芸学会平成29年度春季大会、2017年3月20日、日本大学生物資源科学部、藤沢市

大場史也、佐藤翔一、大谷真広、中野 優、ホトトギス属植物における *LEAFY* ゲノミッククローンの単離および構造解析、園芸学会北陸支部平成28年度大会、2016年11月29日、朱鷺メッセ、新潟市
Fumiya Oba, Shoichi Sato, Masahiro Otani,

Masaru Nakano, Isolation and characterization of *LEAFY*-like genes from two *Tricyrtis* spp., *T. hirta* and *T. formosana*, showing different inflorescence architectures., 2016年3月2日、新潟大学、新潟市
佐藤翔一、大谷真広、村上瑞気、中野 優、ホトトギス (*Tricyrtis hirta*) における *LEAFY* ホモログ遺伝子の機能およびプロモーター解析、園芸学会平成27年度春季大会、2015年9月27日、徳島大学常三島キャンパス、徳島市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.niigata-u.ac.jp/~mnakano/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 優 (NAKANO MASARU)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：00262460