

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03767

研究課題名（和文）遺伝子組換えキクの生物多様性影響リスクを低減 - 青いキクの実用化へ

研究課題名（英文）Reduction of the risk of transgene flow from transgenic chrysanthemums to wild relatives: toward commercialization of the blue chrysanthemums

研究代表者

間 竜太郎 (AIDA, Ryutaro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・ユニット長

研究者番号：60355716

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：不稔化と周縁キメラ利用という2つの異なる切り口から、キクにおける交雑による生物多様性影響リスクの低減技術の開発につながる知見を得る研究に取り組んだ。不稔化については、キク内在の2種類のクラスC遺伝子の発現をCRES-T法あるいはRNAi法を用いて同時に抑制することで、雄蕊および雌蕊が花弁化した遺伝子組換え個体を得る手法を開発した。キク周縁キメラの利用については、L1層由来細胞は雌性、雄性生殖細胞ともに構成しないことを示した一方、L1層細胞が栄養繁殖の過程でL2層に移行し、その結果外来遺伝子が後代植物に伝達される可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キクにおいて、雄蕊と雌蕊の形成を制御するクラスC遺伝子の機能を世界で初めて明らかにしたことは学術的に重要な成果である。同時に、本課題で開発したクラスC遺伝子の発現抑制により雌性、雄性ともに不稔にする技術は、近縁野生種との交雑性に起因する遺伝子組換えキクの生物多様性影響リスクの抑制手法として利用できることから社会的な意義も大きい。加えて、蛍光蛋白質遺伝子を持つ周縁キメラを用いて、キク花器官における細胞層の詳細な構造を明らかにしたことは学術的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to obtain the knowledge to reduce the risk of transgene flow from transgenic chrysanthemums to wild relatives by two different manners. The first method was use of sterile chrysanthemum plants. Suppression of the two chrysanthemum class C genes caused morphological alteration of pistils and stamens into petaloid organs in both ray and disk florets. Thus, we developed methods to make male and female sterile chrysanthemums that would reduce the risk of transgene flow by avoiding crossing. The second method was use of periclinal chimeric chrysanthemum plants. We indicated that the germ cells of chrysanthemum are not derived from the L1 layer. However, we also observed cell rearrangements from L1 to the internal layers during vegetative development in chrysanthemum, suggesting that transgene of the L1-chimeric plants would possibly inherit unexpectedly.

研究分野：花き園芸学

キーワード：遺伝子組換え キク 花色 不稔化 周縁キメラ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 花きにおいて新花色の創出は重要な育種目標である。世界3大花きであるキク、バラ、カーネーションにはいずれも青い花が存在せず、「青いバラ」は「存在しないもの」の比喩表現として使われてきた。近年の分子育種技術の進歩に伴い、遺伝子組換え法により作出された青紫色のカーネーション「ムーンダスト」及びバラ「アプローズ」が作出され、生物多様性影響評価の手続きを経て市販されている。

(2) 当研究グループは、カンパニュラ由来の遺伝子をキクに導入することで紫色系の青みを帯びたキクを開発した(Nodaら2013)。さらに、青紫色キク花弁に含まれるアントシアニン色素をさらに修飾することにより真に青色と表現できる花色のキクの開発にも成功した(Nodaら2017)。キクは世界的な主要花きであり、日本においても切り花生産量の約4割を占める花き産業上最も重要な作目である。「青いキク」の実用化により従来のキクのイメージを払拭して新たな需要を喚起することが、花き生産者や市場関係者から期待されている。

(3) 一方、日本に自生するキク属野生種の多くが栽培ギクと交雑可能(中田ら1987)であり、遺伝子組換え体である「青いキク」の実用化にあたっては、近縁野生種との交雑性に起因する生物多様性影響リスクを最小限に抑制する技術の開発が必要と考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題では不稔化と周縁キメラ利用という2つの異なる切り口から、キクにおける交雑による生物多様性影響リスクの低減技術の開発につながる知見を得る研究に取り組む。

(2) 1つめの手法は不稔化である。集合花であるキクの頭花を構成する舌状花及び管状花が全て不稔化した変異体の報告・作出例は無い。一方、花器官形成に関与するクラスC転写因子遺伝子の発現抑制により雄性、雌性稔性ともに失うことが報告されており、この手法のキクへの応用による不稔化手法確立を目指す。

(3) 2つめの手法は周縁キメラの利用である。花弁のアントシアニン色素はL1層由来の表皮細胞に存在する一方、生殖細胞はL2層由来である(Geier2012)。すなわち、L1層にのみ花色改変遺伝子を導入することで、後代への外来遺伝子伝達を阻止できないか検討する。

3. 研究の方法

(1) 不稔化に関しては、組換えキクは花粉親にも種子親にもなり得るため、雄性及び雌性稔性の両方を不稔化する必要がある。花器官形成遺伝子の中で、雄蕊及び雌蕊の形成に関与するクラスC遺伝子の発現を抑制することで、雄蕊、雌蕊が花弁様組織に改変され雄性、雌性稔性ともに失うことが、シロイヌナズナ、アサガオ、シクラメン等で報告されている(図1)。

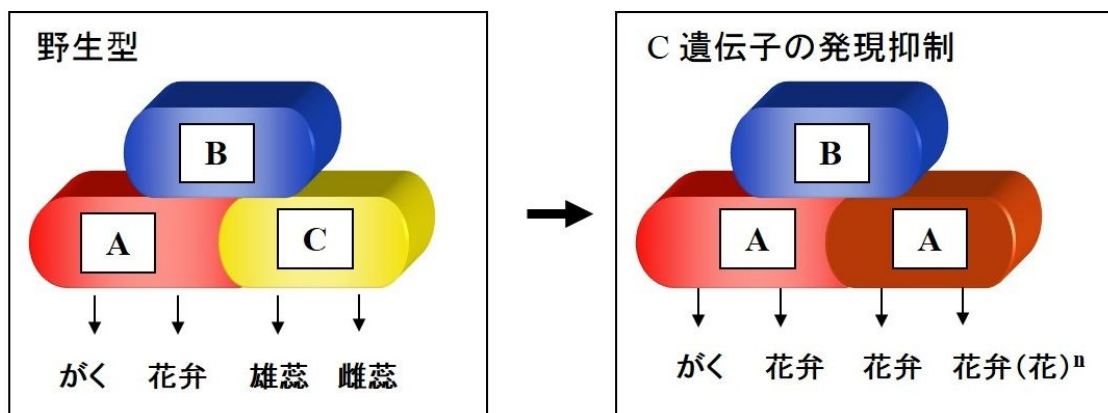


図1 不稔化による生物多様性影響リスクの低減

当研究グループではキクにおいてアンチセンス法によるクラスC遺伝子抑制による不稔化を試みたが、部分的な花弁化は認められたものの不稔化には至らなかった (Aida et al. 2008)。原因として、キクは六倍体であり複数のクラスC遺伝子ホモログを有しているため、全ホモログの発現抑制に至っていないことが考えられる。また、適切な部位や生育ステージで機能するプロモーターを使用する必要も考えられる。本課題では、適切なプロモーターを探索しつつ、キクにおいて転写因子遺伝子の発現をドミナントに抑制可能な CRES-T 法 (Narumi et al. 2011) 及びアンチセンス法よりも効率よく発現抑制が可能である RNAi 法を用いて、キクのクラスC遺伝子を抑制する適切な手法を明らかにする。そのことにより、完全不稔キクの安定的作出技術を開発する。

(2) 植物の茎頂分裂組織を構成する細胞の層構造 (一般的に L1, L2, L3 の三層) は器官分化後の植物体においても比較的安定して維持される。花弁のアントシアニン色素は L1 層由来である表皮細胞に存在しており、市販されている遺伝子組換え花色改変バラ「アプローチ」は L1 層にのみ外来遺伝子が導入された周縁キメラ (偶発的に作出) である (Nakamura ら、2011)。生殖細胞は一般的に L2 層由来であることから (Geier 2012)、L1 層にのみ花色改変遺伝子を導入すれば、花色の改変と後代への外来遺伝子の伝達阻止が同時に達成可能と考えられる (図 2)。

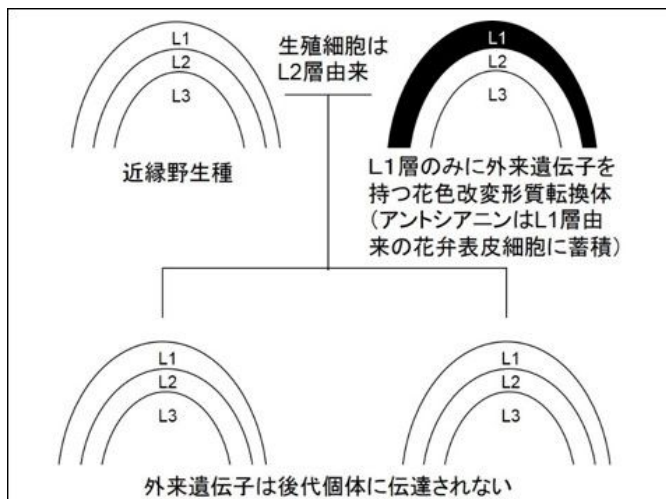


図 2 周縁キメラ利用による生物多様性影響リスクの低減

一方、タバコ属植物において、L1 層を構成する細胞の遺伝子が後代に伝達された例が報告されている (Marcotrigiano and Bernatzky 1995)。当研究グループは、蛍光タンパク質遺伝子を選抜マーカーに用い、培養外植片からの植物体再分化を介したキク周縁キメラ植物の作出に成功している (Aida et al. 2016)。そこで、本課題では、すでに作出した L1 層にのみ蛍光タンパク質遺伝子を持つキクを用いて、周縁キメラ状態の安定性や後代への外来遺伝子の伝達性を調査する。このことにより、キクにおいて、L1 周縁キメラの利用が生物多様性影響リスクの低減手法となり得るかを検証する。

4. 研究成果

(1) 不稔化研究については、まず形質転換の容易な白色花のキク品種「セイマリン」を研究材料に用いた。キクにおいてクラス C 転写因子の機能を抑制するため、本研究では 2 つの手法を用いた。1 つ目の手法は、12 アミノ酸からなる転写抑制ドメイン SRDX を使用して転写因子機能をドミナントに抑制する CRES-T 法 (Hiratsu et al. 2003; Plant J) 2 つ目は遺伝子発現の抑制を目的とした RNAi 法の利用である。本研究では EST 情報の蓄積を進めていた (Sasaki et al. 2017; BMC Genomics) 栽培品種「セイマリン」から単離したアミノ酸配列が異なる 2 種類のクラス C 遺伝子をターゲットにした。CRES-T 法については、2 種類のクラス C 遺伝子に対して SRDX を付加したキメラリプレッサーを持つコンストラクトを作成した。これらのキメラリプレッサー

遺伝子のプロモーターとしては、キククラス C 遺伝子の第二イントロン配列を利用した。2 種類のクラス C 転写因子機能を同時に抑制するためのキメラリプレッサーコンストラクトをキクに導入した結果、CRES-T 法により雄蕊および雌蕊が花弁化した遺伝子組換え個体が得られた（図 3）。また、RNAi 法については、キク由来アクチン遺伝子である *CmACT2* のプロモーターを利用し、2 種類のクラス C 遺伝子の発現を同時に抑制するためのコンストラクトを作成した。これら 2 タイプの RNAi コンストラクトをアグロバクテリウム法により‘セイマリン’に導入した結果、CRES-T 法と同様に雄蕊および雌蕊が花弁化した遺伝子組換え体を得られた。このように、雌雄とも完全に不稔化したキクの作出に成功した（Sasaki et al. 論文投稿中）。

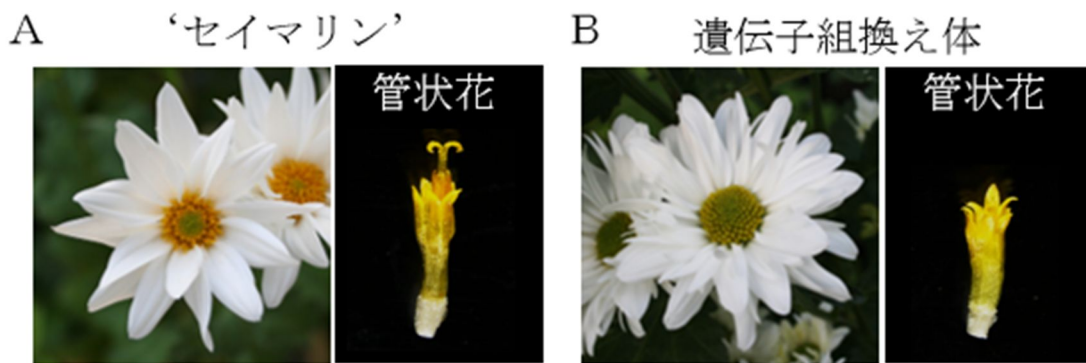


図 3 キク由来クラス C 遺伝子の機能を抑制した遺伝子組換え体

A：栽培品種‘セイマリン’野生型、B：2 種類のキク由来クラス C キメラリプレッサーが導入された遺伝子組換え体。雄蕊および雌蕊が花弁化している。

次に、青いキク実用化のために選抜した商品性に優れたホスト候補系統への遺伝子導入を実施した。得られた形質転換体を閉鎖系温室で育成・開花させて、花器官の形態・稔性を調査した結果、RNAi 法を用いた場合に複数の品種・系統において、雄蕊と雌蕊の花弁化を確認した。すなわち、様々な品種で汎用的に使用可能なキク不稔化のためのターゲット遺伝子及び有効に機能するプロモーターを特定することに成功した。一方、雄蕊と雌蕊の花弁化の程度はホスト系統によって異なっており、同じホスト系統でも形質転換体の個体間差が大きいことが観察された。また、雄蕊と雌蕊の形態変化の程度から、完全な不稔個体を得られる頻度はかなり低いことが推測された。今後、完全な不稔系統を効率よく得るための取組みが必要である。

(2) 周縁キメラを利用した後代への外来遺伝子伝達の阻止の可能性を確認するため、まず、既に作出した L1 層にのみ蛍光タンパク質遺伝子を持つ周縁キメラキクの花器官における蛍光細胞の分布を調査した。その結果、L1 層由来細胞は花梗、花托、花弁、花糸、葯等の表皮細胞を構成することが示された。一方、生殖細胞が存在する花粉及び胚珠の胚のう部分については、全層に蛍光タンパク質遺伝子を持つ形質転換体においても蛍光は観察されず、L1 層由来細胞が雌性、雄性生殖細胞を構成するか不明であった。次に、蛍光タンパク質遺伝子を L1 層に持つ系統、および、L2/L3 層にモザイク状に持つ系統を閉鎖系温室で開花させ、キク属近縁野生種ノジギクと正逆交雑を行った。その結果、L1 層にのみ蛍光タンパク質遺伝子を持つキクを種子親あるいは花粉親として得た後代植物に蛍光を示す個体は全く無かった（図 4 左下）。一方、全層に蛍光タンパク質遺伝子を持つ形質転換体（図 4 右上）、および、L2/L3 層に持つ個体（図 4 右下）を種子親あるいは花粉親に用いた場合には蛍光が観察された。これらの結果から、L1 層に導入した外来遺伝子は後代に伝達されず、L1 層由来細胞は雌性、雄性生殖細胞ともに構成しないことが示された。

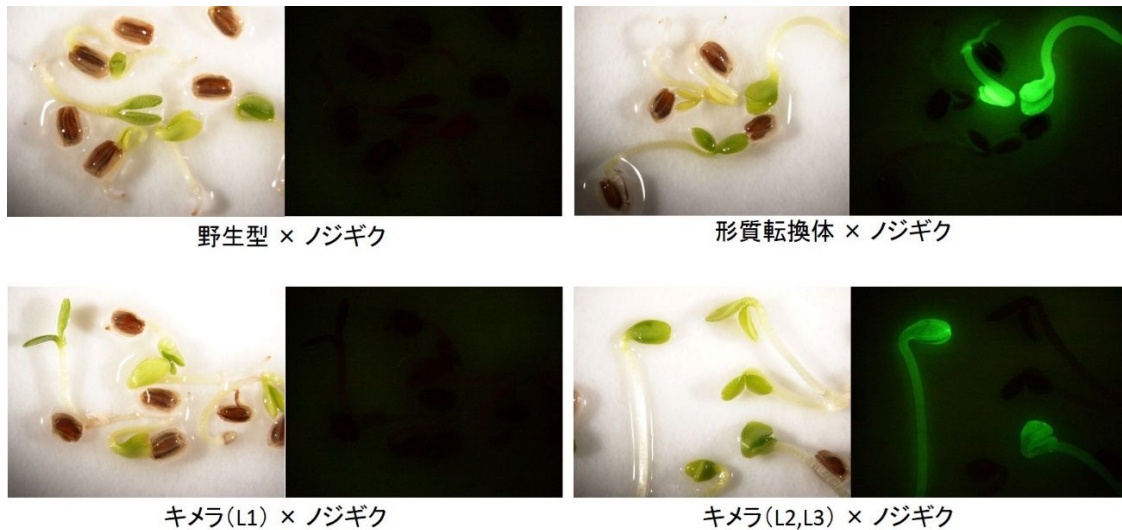


図4 後代実生における蛍光の有無（左：自然光，右：励起光）

さらに、キクの周縁キメラ状態の栄養繁殖時における安定性、特にL1層を構成する細胞のL2層、L3層への移行の有無について調査した。L1層キメラ個体の冬至芽から伸長したシュート延べ64サンプルについて茎断面の蛍光を示す細胞の分布を蛍光実体顕微鏡で観察し、キメラの状態を調査した。その結果、1つのサンプルにおいて部分的に茎の内側の細胞層（L2，L3層）においても蛍光が観察された（図5右）。すなわち、当初はL1層にのみ存在していた蛍光タンパク質遺伝子（図5左）が、栄養繁殖の過程でL2，L3層に移行したことが明らかとなった。L1層を構成する細胞のL2，L3層への移行頻度は明確ではないが、生殖細胞はL2層由来細胞で構成されることから、当初L1層にのみ存在していた外来遺伝子を持つ細胞が栄養繁殖の過程でL2層に移行し、その結果外来遺伝子が後代植物に伝達される可能性が示された。

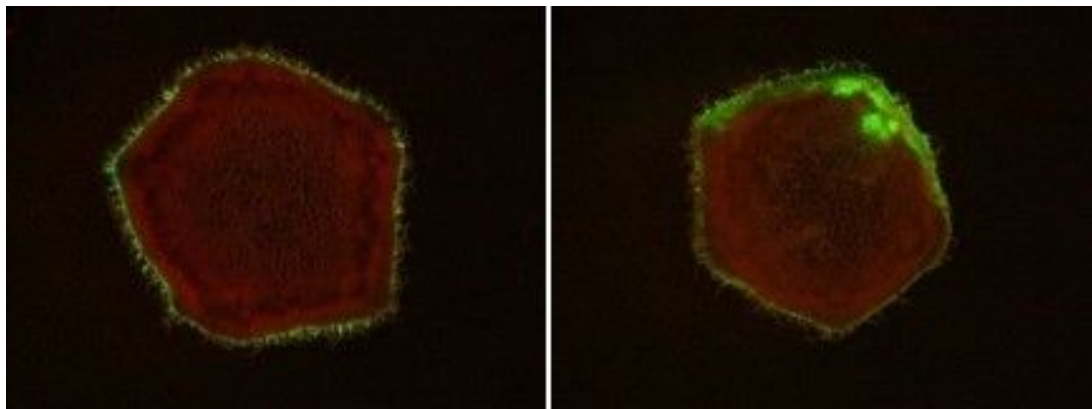


図5 L1層から内側の細胞層に蛍光タンパク質遺伝子を持つ細胞が移行した事例
左：表皮細胞（L1層）のみ蛍光を示す、右：L2、L3層の一部にも蛍光が認められる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryutaro Aida, Katsutomo Sasaki, Satoshi Yoshioka, Naonobu Noda	4. 巻 39
2. 論文標題 Distribution of cell layers in floral organs of chrysanthemum analyzed with periclinal chimeras carrying a transgene encoding fluorescent protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 609 619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00299-020-02518-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 間竜太郎、佐々木克友、能岡智、野田尚信
2. 発表標題 キクの周縁キメラ状態の栄養繁殖時における安定性
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 間竜太郎、佐々木克友、能岡智
2. 発表標題 キクL1層に存在する外来遺伝子の後代への遺伝性
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木克友、能岡智、大坪憲弘
2. 発表標題 キクにおける不稔形質を付与するための技術開発
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐々木 克友 (SASAKI Katsutomo) (60469830)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・上級研究員 (82111)	
研究分担者	野田 尚信 (NODA Naonobu) (10455313)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・上級研究員 (82111)	
研究分担者	能岡 智 (YOSHIOKA Satoshi) (80391407)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・チーム長 (82111)	