

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06028

研究課題名(和文) ホトトギス属植物の花被における無秩序な斑点形成に関する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of spot formation in flower tepals of *Tricyrtis* spp.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：花被に無秩序に斑点を形成するホトトギス属植物から、花被の地色形成に関与すると予想される転写因子の遺伝子(TrMYB1)と、花被の斑点形成に関与すると予想される転写因子の遺伝子(TrMYB2)を単離した。異所発現実験から、両遺伝子が転写因子R2R3-MYBの遺伝子として機能することが明らかとなった。さらに、RNAi法によるノックダウン実験から、TrMYB1が実際に花被の地色形成に関与していることが示された。現在、ゲノム編集を用いたノックアウト実験によるTrMYB2の機能解析、GUSレポーター遺伝子を用いた両遺伝子のプロモーター解析、およびWISH法による両遺伝子の発現解析を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホトトギス属植物の花被には、赤紫色の斑点が無秩序に形成される。本研究では、花被の地色形成に関与する転写因子の遺伝子を単離した。また、花被の斑点形成に関与すると予想される転写因子の遺伝子を単離し、現在、ノックアウト実験等によりその機能を解析中である。ホトトギス属植物の花被模様は、これまで他の植物種で報告されている花被模様とは明らかに異なっているため、学術的独自性が高く、花被の模様形成に関する新発見が得られると考えられる。また、様々な花き園芸植物における遺伝子組換えやゲノム編集等の手法による有斑点・無斑点花新品種の育成等、応用分野への展開も期待される。

研究成果の概要(英文)：The following two transcription factor genes were isolated from *Tricyrtis* sp., whose tepals show random spot formation: TrMYB1 which may be involved in tepal background color formation; and TrMYB2 which may be involved in tepal spot formation. Ectopic expression analysis using some plant species indicated that both genes function as R2R3-MYB genes. In addition, RNAi-mediated knockdown analysis in *Tricyrtis* sp. indicated that TrMYB1 is actually involved in tepal background color formation. Genome editing-mediated knockout analysis of TrMYB2, promoter analysis of both genes by using GUS reporter gene, and expression analysis of both genes by WISH are now in progress.

研究分野：農学

キーワード：花被の斑点形成 ホトトギス属植物 アントシアニン生合成 転写因子 R2R3-MYB遺伝子 遺伝子発現  
プロモーター解析 形質転換

### 1. 研究開始当初の背景

花き園芸植物においては、花の色および花の様子は最も重要な形質のひとつである。アントシアニン類など花色を決定する色素については、これまでに様々な植物種で研究が行われており、生合成酵素や遺伝子に関する知見が多数蓄積されている。一方、覆輪・セクター・絞り・斑点など花の様子の形成、すなわち花弁（花被）における色素生合成・蓄積の位置的なパターン（着色パターン）形成に関する研究は、一部の植物種で行われているに過ぎない。

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ある。ホトトギス属植物の花被の向軸側には、シアニジン系アントシアニン類の蓄積による赤紫色の斑点が無秩序に形成される（図1）。これは本属植物に基本的な花被模様であり、斑点の数や大きさに差異はあるものの、ほとんどの種・品種の花被で同様の斑点がみられる。ホトトギス属植物の花被模様は、これまで他の植物種で研究報告のある模様（アサガオ等におけるトランスポゾンによるセクターや絞り形成、ペチュニア等における siRNA の関与による覆輪形成、ユリ類における維管束や突起等の特定の組織の着色など）とは明らかに異なっており、未知の分子メカニズムが関与している可能性が高い。したがって、この分子メカニズムの解明により、花被の模様形成に関する基礎的な新知見が得られると期待される。

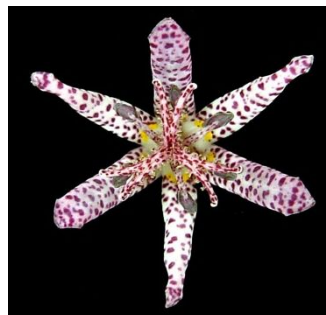


図1 ホトトギス‘東雲’の花

我々は、本研究の前段階として、通常栽培したホトトギス属植物からアントシアニン生合成関連遺伝子（生合成反応を触媒する酵素の遺伝子および転写因子の遺伝子）を網羅的に単離した（Otani et al. 2018）。斑点形成については、一部のアントシアニン生合成関連遺伝子の発現が不安定で、その遺伝子が偶発的に発現した領域でのみアントシアニン類が生合成・蓄積されることで生ずると予想した。そこで、斑点特異的な発現を示す遺伝子（＝斑点形成の鍵となる遺伝子）を特定するため、花被を斑点領域とその他の領域に分けて発現解析を試みた。しかしながら、花被向軸側の斑点以外の領域や花被背軸側にも多少のアントシアニン類の蓄積（花被の地色）がみられるため、斑点領域のみを厳密に分離することが技術的に困難であった。

一方、本研究とは無関係の種間交雑実験において、ホトトギス属植物の未熟花蕾に袋がけを行ったところ、開花時の花被色が薄くなる現象が見出された。これをもとに、予備実験としてホトトギス‘東雲’においてアルミホイルによる未熟花蕾の遮光処理を行ったところ、開花時の花被では地色がほとんど消失して斑点のみが形成されるという驚くべき結果が得られた（図2）。すなわち、花蕾の遮光処理により地色の色素形成のみを抑制させることができ、斑点形成特異的な遺伝子をスクリーニングできる見通しが立った。

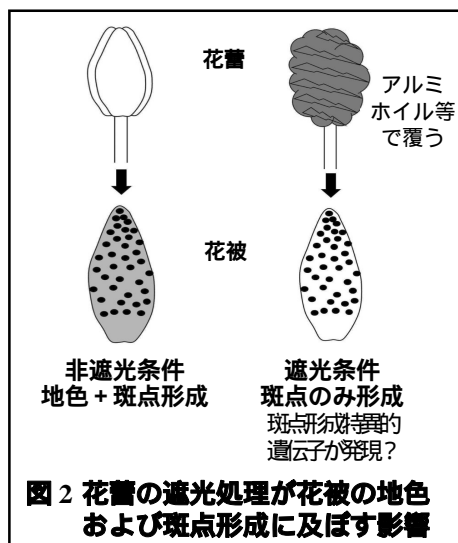


図2 花蕾の遮光処理が花被の地色および斑点形成に及ぼす影響

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ホトトギス属植物の花被における無秩序な斑点形成に関する分子メカニズムの解明である。前述のように、この花被模様はこれまで他の植物種で報告されている花被模様とは明らかに異なっているため、学術的独自性が高く、花被の模様形成に関する基礎的な新知見が得られると期待される。また、ホトトギス属植物と同様に花被における斑点形成メカニズムが未だ明らかにされていない他の植物種（カルセオラリアやラン類等）への研究展開も期待される。さらには、様々な花き園芸植物における遺伝子組換えやゲノム編集等の手法による有斑点・無斑点花新品種の育成など、応用分野への展開も期待される。

本研究では、予備実験において確立された花蕾の遮光処理を利用して、非遮光・遮光条件下の花被におけるアントシアニン生合成関連遺伝子の網羅的な発現解析を行うとともに、花被の地色および斑点形成に関与する遺伝子の単離、機能解析、プロモーター解析等を検討する。通常、アントシアニン類の生合成は光照射下で促進されることから、非光照射下でのアントシアニン生合成（光によるアントシアニン生合成制御）に関する新知見も得られると期待している。

### 3. 研究の方法

遮光条件下の花被からの新たなアントシアニン生合成関連遺伝子の単離  
ホトトギス‘東雲’の遮光条件下の花被から RNA を抽出し、RACE 法により、遮光条件下で発現する新たなアントシアニン生合成関連遺伝子の単離を試みた。

斑点形成に関するアントシアニン生合成関連遺伝子のスクリーニング  
ホトトギス‘東雲’の非遮光・遮光条件下の花被において、RT-PCR 法により、これまでに単離されたアントシアニン生合成関連遺伝子 (Otani et al. 2018) および上記 で新たに単離されたアントシアニン生合成関連遺伝子の発現解析を行った。これにより、斑点形成に関する候補遺伝子のスクリーニングを試みた。

RNA-seq 法による斑点形成に関する遺伝子のスクリーニング  
RNA-seq 法により、非遮光・遮光条件下におけるホトトギス‘東雲’花被の遺伝子発現プロファイルを作成した。これらのプロファイルを比較解析することによって候補遺伝子群をスクリーニングし、さらに GO 解析による機能類推を行って斑点形成に関する候補遺伝子の絞り込みを試みた。

斑点形成に関する遺伝子の機能解析およびプロモーター解析  
上記①～③においてスクリーニングされた遺伝子について、過剰発現または発現が抑制された形質転換体を作成し、機能解析を試みた。また、プロモーターを単離して塩基配列を調査するとともに、GUS レポーター遺伝子を用いた発現解析を検討した。

whole mount *in situ* hybridization (WISH) 法プロトコルの確立  
WISH 法とは、組織切片等を作製せずに器官・組織で直接 *in situ* hybridization を行い、遺伝子発現領域を可視化する手法である。従来、WISH 法は動物実験において広く用いられてきた研究手法であり、植物の成熟器官・組織を材料に用いた研究はこれまで報告されていない。本研究では、WISH 法による斑点形成に関する遺伝子の特定に向けて、まず、ホトトギス‘東雲’の花蕾および花被を材料に用いた WISH 法プロトコルの確立を検討した。

#### 4. 研究成果

遮光条件下の花被からの新たなアントシアニン生合成関連遺伝子の単離

遮光条件下の花被でも発現が低下しない新規の R2R3-MYB 遺伝子 (*TrMYB2*) の完全長 cDNA を単離した。*TrMYB2* は、非遮光条件下の花被から単離した R2R3-MYB 遺伝子 (*TrMYB1*; Otani et al. 2018) と比較して、推定アミノ酸配列レベルで 89 % の相同性を示した。

斑点形成に関するアントシアニン生合成関連遺伝子のスクリーニング

非遮光・遮光条件下の花被におけるアントシアニン生合成関連遺伝子の発現解析を網羅的に行ったところ、*TrMYB2* が斑点形成に関与していることが示唆された。一方、花被の地色形成には、別の転写因子 (*TrMYB1* および *TrbHLH*) が関与していることも示唆された (図 3)。

RNA-seq 法による斑点形成に関する遺伝子のスクリーニング

数年度にわたり、非遮光・遮光条件下の花蕾から RNA を抽出し、各条件下における遺伝子発現プロファイルを作成した。しかしながら、ウイルス様の遺伝子や植物の遺伝子とは相同性が非常に低い遺伝子が多数スクリーニングされ、アントシアニン生合成に関与するような遺伝子はみられなかった。これは、遮光処理により病原体の増殖等の予期せぬ状況が誘導された結果であると考えている。今後は、遮光処理した花蕾ではなく、*TrMYB1* の RNAi コンストラクトを導入した形質転換体の花蕾 (花被の地色形成が抑制されている; 下記 参照) をサンプルに用いる予定である。

斑点形成に関する遺伝子の機能解析およびプロモーター解析

*TrMYB1* および *TrMYB2* について過剰発現コンストラクトを構築し、それらを用いて様々な植物の形質転換を行なった。その結果、形質転換体の栄養器官は赤紫色に変化し、アントシアニン類の蓄積もみられた。また、栄養器官の色の変化の程度と導入遺伝子の発現レベルには相関がみられ、さらに形質転換体では内生のアントシアニン生合成経路遺伝子の発現上昇も確認された。

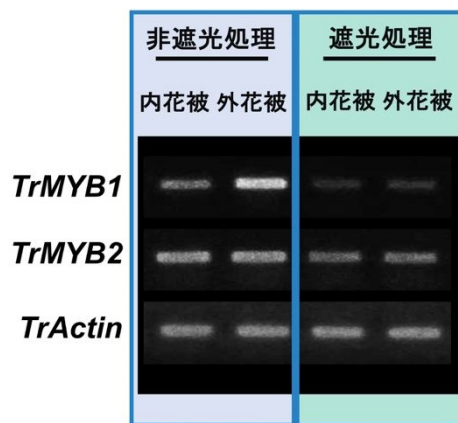


図 3 非遮光・遮光条件下の花被における *TrMYB1* および *TrMYB2* の発現解析

これらの結果から、*TrMYB1* (図 4) および *TrMYB2* (図 5) がいずれも R2R3-MYB 遺伝子として機能することが示された。また、*TrMYB1* の RNAi コンストラクトを導入したホトトギス‘東雲’形質転換体を作成したところ、花被における地色形成が大きく抑制され、一方で斑点形成にはほとんど変化がみられなかった (図 6)。形質転換体における内生遺伝子の発現解析を行ったところ、*TrMYB1* およびアントシアニン生合成酵素遺伝子の発現は低下していたが、*TrMYB2* の遺伝子発現には大きな変化はみられなかった。これらの結果から、花被の地色形成と斑点形成が異なる R2R3-MYB 遺伝子により制御されていること、および地色形成が *TrMYB1* により制御されていることが明らかとなった。今後は、*TrMYB2* の RNAi コンストラクトを導入した形質転換体の開花を待って、花被の地色および斑点形成に関する調査を行う予定である。また、現在、ゲノム編集による機能解析を行うために、両遺伝子の CRISPR/Cas9 コンストラクトを導入した形質転換体を育成中である。

プロモーター解析に関しては、TAIL-PCR 法により、*TrMYB1* および *TrMYB2* の ORF 上流域を単離した。これらの上流域に GUS レポーター遺伝子を連結したコンストラクトを構築し、それらそれらが導入された形質転換体を育成中である。



図 4 *TrMYB1* を過剰発現するカラコエ形質転換体 (右) およびベクターコントロール



図 5 *TrMYB2* を過剰発現するタバコ形質転換体 (右) およびベクターコントロール



図 6 *TrMYB1* RNAi コンストラクト導入したホトトギス‘東雲’ (右) およびベクターコントロール

#### WISH 法プロトコルの確立

数年度にわたり、ホトトギス‘東雲’の花蕾および花被を用いて検討したが、現在までのところ再現性のあるプロトコルは確立されていない。今後は、ホトトギス‘東雲’の葉や、他の植物の花蕾・花被等を用いた検討を行う予定である。

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 Takuo Fujimoto, Masahiro Otani and Masaru Nakano	4. 巻 -
2. 論文標題 Production of colored foliage phenotypes in Kalanchoe blossfeldiana by ectopic expression of R2R3-MYB genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13562-021-00760-3	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 1件）

1. 発表者名 稲川翔・中野優・大谷真広
2. 発表標題 ホトトギス属植物におけるR2R3-MYB遺伝子 (TrMYB1) の機能解析
3. 学会等名 園芸学会 令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. INAGAWA, M. OTANI, M. NAKANO
2. 発表標題 Functional analysis of an R2R3-MYB gene, TrMYB1, from Tricyrtis sp.
3. 学会等名 ISFAE 2021 NIIGATA (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渋谷 舞, 印牧雄亮, 大谷真広, 中野 優
2. 発表標題 ホトトギス (Tricyrtis sp.) における花被の斑点形成に関連した新規R2R3-MYB遺伝子の単離
3. 学会等名 植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------