

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02183

研究課題名（和文）三位一体育種によるストック遺伝資源の創出

研究課題名（英文）Creation of novel garden stock resources by combination of mutagenesis, genomics, and transformant

研究代表者

中塚 貴司（Nakatsuka, Takashi）

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：60435576

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：ストックにおけるゲノム情報を整備し、アノテーションを行った。Agrobacterium媒介形質転換法を確立し、それを利用した形質転換体の作出を行った。MiAG過剰発現体は花冠の縮小を引き起こしたが、八重咲きから一重咲きへの変換した個体は、見られなかった。MiSEP3-SRDX過剰発現体は、貫生花形成により花冠が大きくなる「ポップアップ咲き」という新たな花の形質を生み出した。重イオンビーム照射による突然変異体の中には、花弁細状化変異という、従来の育種では得られなかった形質が出現した。これらのように、ゲノム情報×形質転換×突然変異を組み合わせることで、新たなストック育種の可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストックは、冬季に加温を必要としない「省エネ花卉」として注目されている。この栽培上の利点を生かしたうえで、バラやカーネーションのように消費者に魅力ある花形質を有する品種を開発することが求められている。しかし、日本のストック育種は成熟域に達しており、品種開発が停滞している。本研究でストックにおいて、ゲノミクス育種、突然変異育種、形質転換/ゲノム編集育種という新たな育種の扉を開いた。これらの研究成果は、ストックの国内育種の活性化と、需要拡大に繋がるのが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we revealed genomic sequences of common stock (*Matthiola incana*). And we established Agrobacterium-mediated transformation system in common stock. The overexpression of MiAG in transgenic plants were exhibited the reduced floral size. On the other hands, the transgenic plants with chimeric repressor of MiSEP3 were exhibited increased floral size, resulted in proliferation flower phenotype as termed "Pop-up". The irradiation of Ion beam for mature seeds of common stock was induced emergency of several mutants with narrow petals, increased floral axis, or increased petal number. We demonstrated new floral breeding system combined genomics, molecular genetics and mutagenesis.

研究分野：花卉園芸学

キーワード：ストック 遺伝子組換え ゲノム編集 突然変異 花型 花色

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ストックは、冬季に0以下になることが少ない地域であれば暖房なしで生育、採花することができる省エネ花卉である。また、赤、紫、白、黄色などの花色や、一本立ちおよびスプレー咲きの花型を有する品種が育成され、品目数が少ない冬季の彩りに貢献している。ストックは、日本の民間育種によりトップレベルの品種が開発されている。しかし、国内のストック育種は成熟域を向かえ、新しい花形質を有する品種の開発が停滞している。その一つの理由として、ストック特有の「八重選抜」が関与している。八重選抜は、商品価値の高い八重咲き個体だけを育苗時に選抜する作業である。花型と子葉サイズの形質が強く連鎖しており、大きく色の薄い子葉を持つ実生を選抜することで、八重咲き個体を選ぶことができる。しかし、これらの八重選抜が可能ならすべての品種は、「エバースポータリング系統」に由来するため、遺伝資源の多様性を狭めている。冬季に暖房や補光が必要なバラやカーネーションを栽培する代わりに、冬季に栽培しやすいストックをバラやカーネーションのような多様な花型や草姿、花色に改良していくことが、冬を彩る花の「これからの育種」の方向性であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子解析、突然変異、遺伝子組換え技術(ゲノム編集)を組み合わせ、ストックの新しい遺伝資源を作出することである。研究代表者は、これまでの研究により4つのストック分子基盤を整備した。花器官 cDNA ライブラリー(約7万コンティグ)、ドラフトゲノム配列(約1.9Gbp)の決定、ウイルスベクターを用いた遺伝子機能解析法、安定した形質転換体の作出技術。このような充実した分子基盤技術が整備されている花卉は数品目しかない。また、研究分担者は、ストックにおいて効率的に突然変異が誘発できる条件を明らかにし、突然変異集団を獲得している。冬季の花弁栽培では、灯油代などの燃料費の高騰により、投資以上の収益を得ることが難しくなっている。申請者らは、既存のバラやユリなどの花卉を環境制御して周年出荷する現在の栽培体系を見直し、ストックに代表される冬季に栽培しやすい花卉の高価値化が、花卉産業の復興のために重要であると考えた。その目的達成のためには、遺伝子機能解析、ゲノム編集、突然変異を組み合わせることで、新規花き優良形質を有する品目の育成を行う。

3. 研究の方法

課題1 ストックの花き優良形質を創出できる候補遺伝子の探索 シロイヌナズナの花型およびアントシアニン生合成変異体に関する情報に基づき、構築済みのストック cDNA 情報から相同遺伝子を探索、単離する。TuMV ベクターシステムを用いて、候補遺伝子をウイルス誘導ゾーンサイレンシング(VIGS)で発現抑制し、その表現型を観察する。このVIGSシステムは接種3か月後には表現型を観察可能である。本手法を用いて、花型や花色変化に活用できる遺伝子を明らかにする。

課題2 ストック突然変異体の作出とその評価 重イオンビーム照射により誘導したストック M1 変異集団を播種し、変異体の表現型スクリーニングを行う。M1 系統毎に10個体ずつ育てることで、ホモ化個体の表現型を評価すると共に、自殖して M2 種子を獲得する。花器官に変異が観察された系統については、形質や遺伝様式を評価するとともに、DNA 含量をフローサイトメータでゲノムサイズを調査する。

課題3 ストックにおける形質転換体とゲノム編集個体の獲得 花型や花色変化に関与することが示された候補遺伝子について、ゲノム編集技術を用いたノックアウト個体を作成する。八重選抜に依存しない育種母本の育成のために、MiAG や AP2m3 形質転換体を作成する。得られた形質転換体は、表現型の評価と関連遺伝子の発現解析を実施する。

4. 研究成果

課題1 ストックの花き優良形質を創出できる候補遺伝子の探索

シロイヌナズナ花型変異体を指標に、花型を改変できる遺伝子として花器官決定遺伝子(AP1、AP2、AP3、PI、AG、SHP、SEP)の相同遺伝子をストック cDNA ライブラリーから単離した。これらの遺伝子は、各花器官において強く転写していることが確認され、花器官形成に関与していることが明らかになった。次に幹細胞関連遺伝子(WUS、CLV3)、SUP は、cDNA ライブラリーには相同遺伝子が存在しなかった。そこで、先端ゲノム支援により構築したストック‘ピグミーホワイト’の全ゲノム配列から相同遺伝子配列を探索し、コピーずつ発見した。CLV3 は、アラビドプシス AtCLV3 とペプチドホルモン配列以外は相同性が低かった。単離した WUS、CLV3、SUP が茎頂分裂組織で実際に転写していることを RT-PCR 解析により確認でき、機能的な遺伝子であると推定された。

アントシアニン修飾酵素として、3GXylT、3GCouIT、5GT の候補遺伝子を分子系統樹解析により3遺伝子ずつリストアップした。大腸菌を用いて組換えタンパク質を用いた酵素活性解析よ

る基質特性を調査した。また、ペラルゴニン-3-グルコシドを花卉に蓄積する品種においては、3GCouIT1 にナンセンス変異が存在することが明らかになった。これらの機能解析から、ストックのアントシアニン生合成経路は、アントシアニン 3-グルコシドが 3GCouIT により有機酸が付加された後に、3GXyIT によりキシロースが転移し、その後 5GT により配糖化される順番で修飾が進むことを明らかにした。

ストックの花弁色と種子色は、連動していることが知られている。種子色に關与するプロアントシアニン生合成に關与する遺伝子として、転写調節因子 TT2 と酵素遺伝子 BAN が種子特異的に転写していた。このことから、花色と種子色の生合成において、共通している遺伝子と独立している遺伝子を明確に分類することができた(図1)。

上記で明らかになった候補遺伝子について、ウイルスベクターを用いたジーンサイレンシング実験を行った。その中で、SEP3 の遺伝子発現抑制により、花卉の一部緑化が観察された。このことから、SEP3 は花型・花色改変が可能であると推定された。

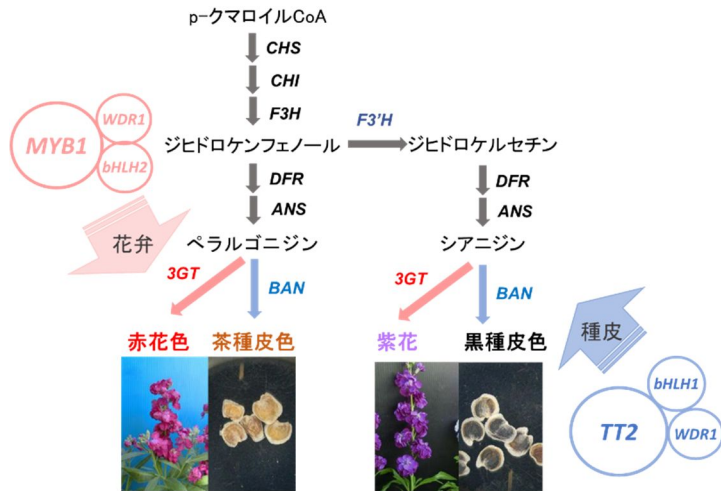


図1 花色と種皮色生合成の制御の違い

課題2 ストック突然変異体の作出とその評価

ストック‘ピグミーラベンダー’乾燥種子に炭素(C)または鉄(Fe)イオンを照射した集団のM2世代において形質を評価した。吸収線量-生存率曲線はC照射区で100 Gy, Fe照射区で10 Gyの吸収線量した種子で生存率の減少が始まり、吸収線量の増加に伴い生存率が減少する傾向が見られた。C100 GyとFe10 Gyがストックの突然変異体を作成する上で有効な指標となることが示唆された。矮化、多分枝化、花軸肥大化、花卉濃色化、花卉細状化などのこれまでの品種とは一線を画す変異個体を複数獲得した(図2)。これらの変異体は自殖して後代を評価したところ、次世代で形質が安定していることを確認した。本研究において、重イオンビームによるストックの効率的な変異誘導技術の確立に成功した。

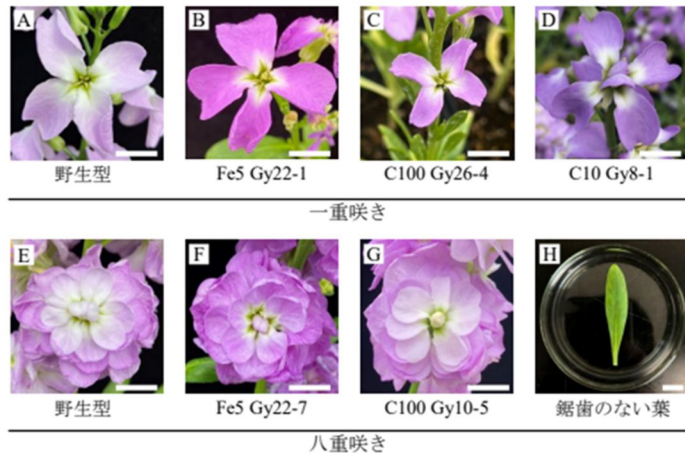


図2 代表的な突然変異体の表現型

課題3 ストックにおける形質転換体とゲノム編集個体の獲得

ストックは1ppm BAを添加した培地において葉片からシュート再生が容易に起こる。そこでストックに対するアグロバクテリウム感染条件を検討した。観戦にはアセトシリゴン添加が必須で、系統はGV3101が最も高い感染効率を示した。共存培養期間は、3日以降で感染が確認され、5-6日目で感染が最大であった。この感染条件とBAによる再分化を組み合わせたが、形質転換体の獲得には至らなかった。新たな再分化系の確立を目指して、新規カルス誘導剤であるFPXを用いたところ、葉片から置床2週間で早期にカルスを誘導できることが明らかになった。この組織培養条件を用いて、Agrobacterium感染と10ppmハイグロマイシン選抜を行ったところ、形質転換カルスを獲得することに成功した。植物ホルモンおよび抗生物質を添加していないMS培地にカルスを継代することでシュートを誘導し、その後発根させ、順化させた。

SEP3にレプレッサードメインを融合させたSEP3-SRDX遺伝子をCaMV35Sプロモーターでドライブし、ストックの形質転換体を作成した。SEP3-SRDX形質転換系統の中には、貫生花を形成し、花冠が大型化した表現系が現れた。このような花型は従来のストック品種には存在せず、「ポツ

プアップ咲き」と命名した（図3）

AP2 が萼や花弁で発現が制限されているのは、miR172 耐性による転写後制御を受けているためである。そこで、AP2 に miR172 耐性になるように変異を導入した AP2m3 を過剰発現した形質転換体を作出した。得られた形質転換系統の多くは、野生型より花冠サイズが減少し、花色が淡くなったが、宿主が八重咲き個体だったことから、花弁数が増加した個体は得られなかった。今後は、一重咲き個体を宿主とした AP2m3 過剰発現体の作出を継続して行う。

ストックにおいて、ゲノム編集個体の作出を目指した。標的遺伝子として *SUP* と *CLV3* を選定し、ガイド RNA を設計して形質転換体を作出した。得られた形質転換体では、Cas9 とガイド RNA の導入が確認されたが、標的遺伝子において、ゲノム編集が起こった形跡は確認できなかった。Cas9 は、タバコやトルコギキョウにおいて実績があった CaMV35S プロモーターでドライブしているベクターを用いたが、ユビキチンベクターなど他の高発現を誘導できるプロモーターを持つコンストラクトも検討していく予定である。

本研究成果により、ゲノム情報 × 形質転換 × 突然変異を組み合わせることで、新たなストック育種の可能性を示すことができた。

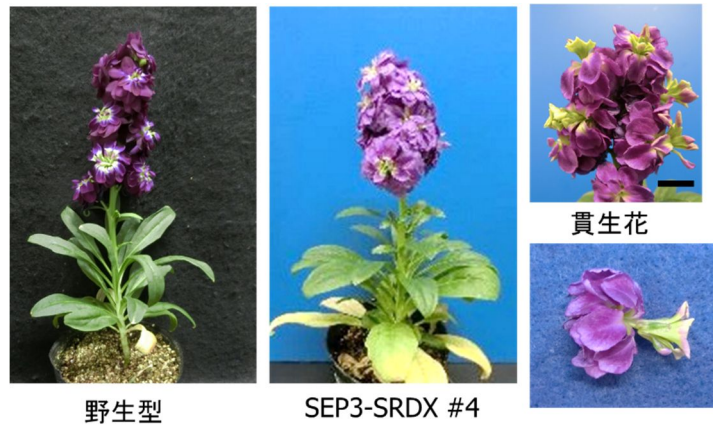


図3 SEP3-SRDX の“ポップアップ咲き”表現型

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 高橋理緒・八幡昌紀・下川卓志・中塚貴司・富永晃好	4. 巻 23
2. 論文標題 イオンビーム照射における元素種および吸収線量がストック (<i>Matthiola incana</i> (L.)R.Br.) の生存率および変異誘発効率に及ぼす影響	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 園芸学研究	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanahara Yoshiki, Yamanaka Kaho, Kawai Kentaro, Ando Yukiko, Nakatsuka Takashi	4. 巻 39
2. 論文標題 Establishment of an efficient transformation method of garden stock (<i>Matthiola incana</i>) using a callus formation chemical inducer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 273 ~ 280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.22.0602a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nuraini Latifa, Tatsuzawa Fumi, Ochiai Masaki, Suzuki Katsumi, Nakatsuka Takashi	4. 巻 90
2. 論文標題 Two independent spontaneous mutations related to anthocyanin-less flower coloration in <i>Matthiola incana</i> cultivars	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 85 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2503/hortj.UTD-212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Fujita, C., M. Yahata, T. Shimokawa, T. Nakatsuka and A. Tominaga.
2. 発表標題 Analysis of a narrow petal mutant in <i>Matthiola incana</i> (L.) R. Br generated using ion beams.
3. 学会等名 The 4th Asian Horticultural Congress (AHC2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takahashi, R., M. Yahata, T. Shimokawa, M. Kurokawa, T. Nakatsuka and A. Tominaga
2. 発表標題 Effect of ion beam irradiation on mutagenesis efficiency of multiple Matthiola Incana Cultivars.
3. 学会等名 The 4th Asian Horticultural Congress (AHC2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 棚原 祥貴・刑部 祐里子・刑部 敬史・中塚 貴司
2. 発表標題 花卉園芸植物ストックにおける遺伝子組換えおよびゲノム編集個体の作出
3. 学会等名 第40回日本植物バイオテクノロジー学会（千葉）大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋理緒・八幡昌紀・下川卓志・成瀬和子・中塚貴司・富永晃好
2. 発表標題 イオンビーム照射によるストックの突然変異誘発効率および変異体の機能解析
3. 学会等名 令和4年園芸学会秋季大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 高橋理緒・八幡昌紀・下川卓志・黒川幹・中塚貴司・富永晃好
2. 発表標題 イオンビーム照射によって得られたストック花卉増加変異体のメカニズム解析
3. 学会等名 令和5年園芸学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福島詩織・鍋田紗妃・中塚貴司.
2. 発表標題 ストックにおける花色の濃淡に關与する遺伝子の探索
3. 学会等名 令和5年園芸学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 峰松美祈・田中裕之・伊藤武彦・鈴木穰・篠澤章久・田崎啓介・中塚貴司
2. 発表標題 ストックのゲノム情報の整備と八重鑑別系統の育成に關与した遺伝子変異の探索
3. 学会等名 令和5年園芸学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 棚原祥貴・山中香穂・安藤有季子・河合健太郎・中塚貴司
2. 発表標題 ストックにおける形質轉換法の確立
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鍋田紗妃・中山峻弥・立澤文見・中塚貴司
2. 発表標題 ストック市販品種におけるアントシアニン生合成關連遺伝子の変異と花色との關係
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鍋田紗妃・古角里佳・中塚貴司
2. 発表標題 ストック品種間におけるアントシアニン生合成関連遺伝子の発現差異
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 高橋理緒・八幡昌紀・下川卓志・成瀬和子・中塚貴司・富永晃好
2. 発表標題 イオンビーム照射によるストックの突然変異誘発技術の検討
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡大学農学部生物資源科学科花卉園芸学研究室 https://sites.google.com/site/shizuokaflower/home

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	富永 晃好 (Tominaga Akiyoshi) (50776490)	静岡大学・農学部・助教 (13801)	

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
---------	---------