

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580045

研究課題名（和文） トレニアの装飾的花形の誘導過程における分裂組織形成関連遺伝子の役割の解明

研究課題名（英文） Role of genes involved in meristem formation in induction of decorative flower of torenia (*Torenia fournieri* Lind.).

研究代表者

西島 隆明（NISHIJIMA TAKAAKI）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所・花き研究領域・上席研究員

研究者番号：60355708

研究成果の概要（和文）：トレニアの花芽内におけるサイトカイニンシグナルの高い部位の空間的、時間的分布が装飾的な花形の形成に及ぼす影響を調べた。その結果、幅広い形、細長い形の副花冠、花弁の鋸歯とも、その誘導部位において高いサイトカイニンシグナルが局在することが必要であることが示された。さらに、副花冠の発生は、このようなサイトカイニンシグナルの局在による花芽分裂組織の拡大、ひいては花托の拡大が原因で起こると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The spacial and temporal distribution of enhanced cytokinin signal in flower bud was investigated to elucidate its effect on induction of decorative flower morphologies of torenia (*Torenia fournieri* Lind.). To induce wide and narrow paracorollas and serrated petal, it was shown that high cytokinin signal should be localized to the site of morphological change. Further, enlargement of receptacle, which was induced by enlargement of floral meristem by the localized high cytokinin signal, presumably promoted paracorolla initiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：花形、副花冠、サイトカイニン、花芽分裂組織

1. 研究開始当初の背景

花卉園芸では、野生種に近い形態の品目が、花形の長年の改良によって観賞価値を向上させ、飛躍的に生産・消費の増加につながることが多い。例えば、現在、わが国での切り花生産額が第5位であるトルコギキョウは、野生種に近い花形であった50年前にはわずかに生産されるだけであったが、八重、花弁周縁のフリル、小輪から大輪までの多様な花

の大きさなどの花形のバラエティーが増えるとともに花色が豊富になったことによって、今日、主要な花卉に成長した。

しかし、このような装飾的で魅力的な花形を獲得するには、交雑可能な遺伝資源の範囲や突然変異など、偶然に依存する部分が多い。さらに、育種現場で見いだされる微細な変異から安定した装飾的な花形を得るには、長い年月がかかるのが普通である。もしも、

装飾的な花形を短期間で確実に得ることが出来れば、野生種に近い花形しか存在しない花卉の観賞価値を高め、新たな需要を開拓することが可能になると考えられる。そのためには、花形の形成機構を解明し、それに基づいた改変手法を開発する必要がある。

これまでに、シロイヌナズナ等のモデル植物を研究材料として、ホメオティック遺伝子ならびに花芽分裂組織の維持に関与する遺伝子の解析から、萼、花弁、雄蕊、雌蕊で構成される花の基本構造に関して分子生物学的な解析が進み、花形改変への応用基盤が整いつつある。これに対して、副花冠等の付属器官の発生機構や、花弁の形の決定機構に関しては研究がほとんど進んでいない (Nishijima, 2012)。

私どもの研究グループでは、植物ホルモンのサイトカイニンの分解を抑制し、植物体内にサイトカイニンを蓄積させる CPPU を、夏季の花壇用花きとして用いられるトレニアの花芽に与えることにより、2 種類の副花冠 (幅広のものと細長いもの) の発生、花弁をはじめとする花器官数の増加、花弁周縁の鋸歯など、様々な装飾的花形を誘導できることを明らかにした (Nishijima and Shima, 2006、図 1)。この系では、CPPU を投与する花芽発達ステージに依存して特定の花形が発生する。これらの花形のうち、特に、副花冠は、植物全体を見てもスイセン、トウワタ、トケイソウなど、ごく限られた種にのみ存在し、これらの種独特の観賞性に貢献している。



図 1. CPPU 処理によってトレニアに誘導される花形。(左上) 無処理。(右上) 花弁の鋸歯。(左下) 細長い副花冠。(右下) 幅広い副花冠。

さらに、私どもの研究グループでは、萼および花弁で特異的に発現誘導する *AP1* プロモーター、ならびに、花弁及び雄蕊で特異的に発現誘導する *AP3* プロモーターに、サイトカイニン生合成遺伝子であるイソペンテニ

ル転移酵素遺伝子 (*AtIPT4*) をつないだコンストラクトをトレニアに導入することにより、副花冠の発生、花弁をはじめとする花器官数の増加、花弁周縁の鋸歯など、CPPU 処理によるものと同様の花形変化を認めている。

サイトカイニンは、分裂組織の形成を促進する *WUSCHEL* の発現を促進し、器官分化を促進する *CLAVATA* の発現を抑制することにより、分裂組織を大型化する (Clark et al., 1993; Gordon et al., 2009; Lindsay et al., 2006; Venglat and Sawhney, 1996)。したがって、トレニアに CPPU 処理した場合、花芽におけるサイトカイニン蓄積部位の分布パターンが、分裂組織の制御に関する遺伝子の発現調節を通じて分裂組織の大きさと分布パターンに影響を及ぼすことが予想される。そのような分裂組織の分布パターンの変化は、必然的に花形を変化させるであろう。

このような、花芽におけるサイトカイニン蓄積部位の分布パターン、分裂組織関連遺伝子の発現調節パターンと花形変化の関連が明らかになれば、サイトカイニンや分裂組織関連遺伝子を用いた、装飾的な花形の誘導技術の開発につながるとともに、花の形態形成に関して、新たな角度からの知見を得られる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究計画では、上記のような、CPPU 処理、ならびに *AP1::AtIPT4* および *AP3::AtIPT4* 導入によるトレニアの花形変化の過程における、花芽内のサイトカイニンシグナル、ならびに分裂組織の制御に関わる遺伝子の発現状態の分布を調べる。この結果から、幅広い副花冠、細長い副花冠、花弁周縁の鋸歯などの花形変化が、サイトカイニンシグナルならびに分裂組織の形成の、どのような空間的、時間的パターンによって誘導されているのかを明らかにする。このような知見を得ることにより、これらの花形を計画的に得る技術の開発のための基盤を整備する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) これまでに当研究グループが開発した、上記の花形変化の系、つまり、CPPU 処理の系、ならびに *AP1::AtIPT4* および *AP3::AtIPT4* 導入組換え体を研究材料に用いる。

(2) これらの系の花形変化の過程において、サイトカイニンシグナルの指標となるタイプ A レスポンスレギュレーター遺伝子 (*TyRRI*) およびサイトカイニン酸化酵素遺伝子 (*TyCKX5*) の花芽内における発現状態の分布を経時的に調べる。さらに、分裂組織の形成と維持に関する遺伝子である *WUSCHEL*、*CLAVATA*、*KNOX* の完全長 cDNA をトレニア

から単離し、花芽内における発現状態の分布を調べる。また、遺伝子の発現状態の解析は、定量 PCR 法あるいは *in situ* hybridization 法によって行う。

4. 研究成果

(1) CPPU 処理した花芽の解析

CPPU 処理した花芽において、*TfRR1* および *TfCKX3* は、CPPU 処理を行った花芽発達ステージに依存した発現パターンを示した。以下、誘導される花形ごとに、発現パターンを示す。

幅広い副花冠は、CPPU 処理を、花弁、雄蕊、雌蕊の分化最初期に当たるステージ 3 に行った場合に誘導されるが、この場合、処理後 3 日目では、両遺伝子とも、無処理の花芽に比べて、雄蕊および雌蕊の原基、ならびに萼の向軸側で発現が強まった（図 2 上段）。これに伴って、雄蕊基部の背軸側に新たな分裂組織が形成され、幅広い副花冠が分化、発達した。したがって、幅広い副花冠は、その発生部位に高いサイトカイニンシグナルが局在することによって誘導されることが示された。

細長い副花冠は、CPPU 処理を、花弁、雄蕊、雌蕊の発達初期であるステージ 5 に行っ

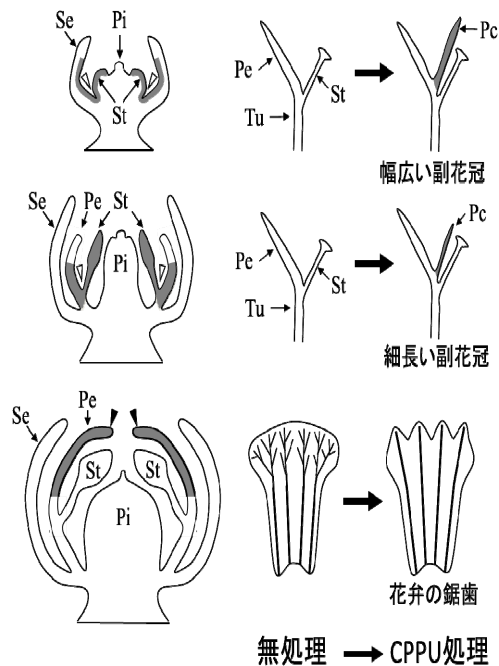


図 2. CPPU 処理による花芽内でのサイトカイニンシグナルの高まり。左：花芽の縦断面。右：開花時の花形（左は無処理、右は CPPU 処理）。CPPU 処理時の花芽のステージは、ステージ 3（上段）、ステージ 5（中段）、ステージ 6（下段）。灰色で着色した部分が、CPPU 処理によってサイトカイニンシグナルが高まる部位。△：副花冠の発生位置。Se：萼、Pe：花弁、St：雄蕊、Pi：雌蕊。

た場合に誘導されるが、この場合、両遺伝子とも、無処理の花芽に比べて、雄蕊ならびに花弁の中央部から基部にかけて発現が高まった（図 2 中段）。これに伴って、雄蕊基部と花弁中央部の境界付近に新たな分裂組織が形成され、細長い副花冠が分化、発達した。したがって、細長い副花冠は、その発生部位に高いサイトカイニンシグナルが局在することによって誘導されることが示された。

花弁の鋸歯は、CPPU 処理を、花弁の発達が進んだステージ 6 に行った場合に誘導されるが、この場合、両遺伝子とも、花弁の中央部から先端部にかけて発現が高まった（図 2 下段）。花弁の鋸歯は、維管束の配列パターンが縁辺部、つまり、花弁の中央部から先端部にかけて変化することにより誘導される。したがって、花弁の鋸歯は、その原因となる維管束の配列パターンの変化が起こる部位においてサイトカイニンシグナルが高まることによって誘導されることが示された。

(2) *AP1::AtIPT4* および *AP3::AtIPT4* 組換え体の解析

AP1::AtIPT4 および *AP3::AtIPT4* 導入組換え体とも、サイトカイニンシグナルは、計画通り、それぞれ萼及び花弁、花弁および雄蕊で高まっていた。

萼および花弁でサイトカイニン生合成を亢進させた *AP1::AtIPT4* 組換え体では、花弁数の増加が認められた（図 3）。これに対して、花弁および雄蕊でサイトカイニンシグナルを高めた *AP3::AtIPT4* 組換え体では、花弁数の増加に加えて、花冠の拡大、花弁の鋸歯、細長い副花冠の発生が認められた。この結果は、*AP3::AtIPT4* 組換え体のみ認められる

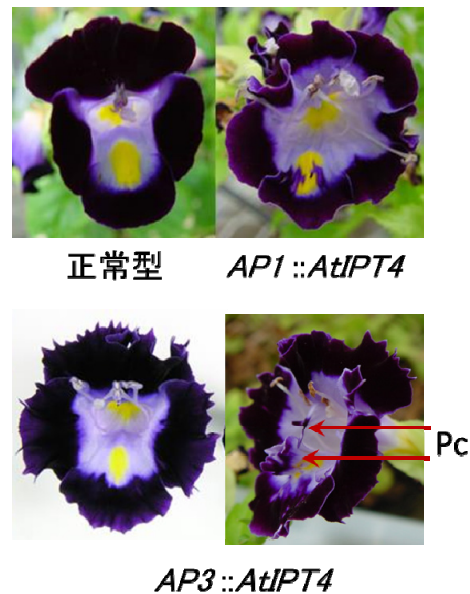


図 3. *AP1::AtIPT4* ならびに *AP3::AtIPT4* 組換え体の花。Pc：副花冠。

花冠の拡大、花弁の鋸歯、細長い副花冠の発生には、*AP1::AtIPT4* 組換え体には認められず、*AP3::AtIPT4* 組換え体に特有な、雄蕊におけるサイトカイニンシグナルの高まりが重要であることを示すものである。

両組換え体とも、正常型に比較して花芽の花托の拡大が認められたが、*AP1::AtIPT4* 組換え体では、花弁、雄蕊、雌蕊の分化が進むステージ4まで花托の拡大が続いた。これに対して、*AP3::AtIPT4* 組換え体では、細長い副花冠が分化するステージ6まで花托の拡大が続くとともに、その拡大の程度が *AP1::AtIPT4* 組換え体に比較して高かった。副花冠は、雄蕊の托葉が発達したものと考えられるため、*AP3::AtIPT4* 組換え体では、雄蕊の分化後に花托の拡大が進むことにより、雄蕊原基の間の距離が広がり、本来は発達しない雄蕊の托葉の発達が促進された可能性

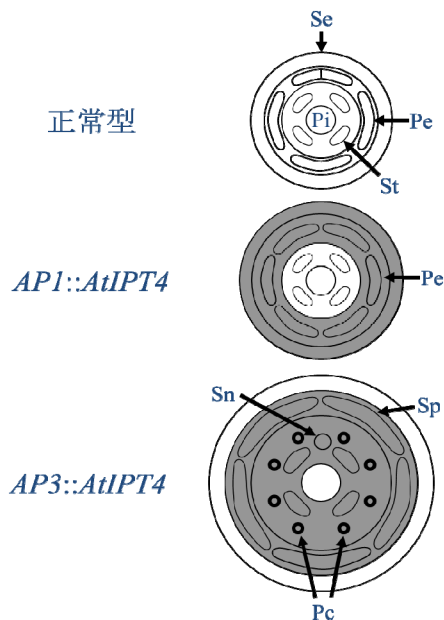


図4 *AP1::AtIPT4* ならびに *AP3::AtIPT4* 組換え体の花芽 (ステージ6) における花托の拡大と花器官の配置。灰色に着色した部分はサイトカイニンシグナルの高まった部位。Se : 萼、Pe : 花弁、St : 雄蕊、Pi : 雌蕊。

がある (図4)。

WUSCHEL、*CLAVATA*、*KNOX* の完全長 cDNA をトレンニアから単離し、花芽内における発現状態の分布を調べた結果、*AP1::AtIPT4* ならびに *AP3::AtIPT4* 組換え体では、正常型に比較して、花弁における *WUSCHEL* の発現が高まっていた。その他の遺伝子の発現には、正常型と比較して有意な差は認められなかった。これらの遺伝子の発現状態の分布には、サイトカイニンシグナルの分布のような、花形変化に関連した変化は認められず、今後、より詳細な検討が必要であると考えられた。

(3) 以上のように、花芽内におけるサイトカイニンシグナルの空間的、時間的分布状態と、誘導される花形との間には直接的な関係が認められた。このことは、サイトカイニンシグナルを花芽内で空間的、時間的に制御することにより、花形の改変が可能であることを示している。実際に、花冠の拡大、花弁の鋸歯の発生に関しては、*AP3::AtIPT4* 組換え体において安定して実現できた。一方で、*AP3::AtIPT4* 組換え体においては、副花冠の発生が不十分であり、CPPU 処理を行った場合のように観賞価値を高めるほどに至らなかった。これは、花芽内におけるサイトカイニンシグナルの局在部位が、副花冠が分化する部位に絞り込まれておらず、比較的広範囲にわたっていたためであると考えられた。今後、この点を改善すれば、副花冠を安定して誘導できると予想された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Niki, T., T. Mahesumu, T. Niki and T. Nishijima, Localized high expression of type-A response regulator and cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in relation to forchlorfenuron-induced changes in flower morphology in *Torenia fournieri* Lind., J. Japan. Soc. Hort. Sci., 査読有, 82 巻, 2012, 69 - 77 . DOI: 10.2503/jjshs1.82.69

Nishijima, T., Large flower size: molecular basis and role of cytokinin, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 査読有, 81 巻, 2012, 129 - 139 . DOI: 10.2503/jjshs1.81.129

Niki, T., M. Hirai, T. Niki, A. Kanno, T. Nishijima, Role of floral homeotic genes in the morphology of forchlorfenuron-induced paracorollas in *Torenia fournieri* Lind., J. Japan. Soc. Hort. Sci., 査読有, 81 巻, 2012, 204 - 212 . DOI: 10.2503/jjshs1.81.204

西島隆明, 花の大型化 —その分子機構とサイトカイニン—, 花き研究所研究報告、研究所内の査読のみ, 12 巻, 2012, 85 - 102 .

Nishijima, T., T. Niki and T. Niki, The large-flowered petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) genotype promotes expressions of type-A response regulator and cytokinin receptor genes like cytokinin response, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 査読有, 80 巻, 2011, 343 - 350 . DOI: 10.2503/jjshs1.80.343

Nishijima, T., T. Niki and T. Niki, Corolla of the Large-flowered petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) cultivars exhibit low endogenous cytokinin concentration through enhanced expression of the genes encoding cytokinin oxidases, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 査読有、80巻、2011、334 - 342 .
DOI : 10.2503/jjshs1.80.334

〔学会発表〕(計5件)

仁木智哉、間竜太郎、仁木朋子、西島隆明、サイトカイニン関連遺伝子の花芽内の局所的な発現がトレニアの花形に与える影響、園芸学会、2013年3月24日、東京農工大学(東京都)。

仁木智哉、T. Mahesumu、仁木朋子、西島隆明、CPPU 処理したトレニアで誘導される花形とサイトカイニンシグナルの局在性の関係、園芸学会、2012年9月22日、福井県立大学(福井県)。

仁木智哉、平井雅代、菅野明、仁木朋子、西島隆明、トレニアの副花冠におけるホメオティック遺伝子の発現パターンの決定要因、園芸学会、2012年3月28日、大阪府立大学(大阪府)。

仁木智哉、平井雅代、菅野明、仁木朋子、西島隆明、CPPU 処理したトレニアで発生する副花冠の形態的特徴とホメオティック遺伝子の発現パターンの解析、園芸学会、2011年3月20日、宇都宮大学(栃木県)。

仁木智哉、間竜太郎、Taximaimaiti Mahesumu、仁木朋子、西島隆明、サイトカイニン関連遺伝子を導入して花形の変化したトレニアの解析、園芸学会、2010年9月20日、大分大学(大分県)。

〔その他〕

仁木智哉、トレニアの副花冠の形態はホメオティック遺伝子の発現パターンの違いにより制御されている、花き研究所ニュース No.22, pp.4 .

西島隆明、花の大きさと形を決める仕組みを探る、静岡県花き育種推進セミナー招待講演、2010年8月27日、静岡県庁(静岡県)。

6. 研究組織

(1)研究代表者

西島 隆明 (NISHIJIMA TAKAAKI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所・花き研究領域・上席研究員

研究者番号：60355708

(2)研究分担者

仁木 智哉 (NIKI TOMOYA)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所・花き研究領域・主任研究員

研究者番号：70355709