

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12日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：22780025

研究課題名（和文） 花卉表皮細胞の形態制御による新規花色パターン作出技術の開発

研究課題名（英文） Development of technology for creating novel flower color patterns via shape control of petal epidermal cells

研究代表者

鳴海 貴子（NARUMI TAKAKO）

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：30469829

研究成果の概要（和文）：トレンニアから単離した *TfMYBML1*、*TfMYBML2* および *TfMYBML3* は、花卉発達過程で異なる遺伝子発現パターンを示した。各遺伝子の機能抑制形質転換体の調査により、花卉のブロッチ部の表皮細胞形成に *TfMYBML3* が関与していることが示唆されたが、各過剰発現体が野生型と同等の表現型を示した事から *TfMYBML1*、*2*、*3* はトレンニアの花卉表皮細胞の形態を制御する主因子では無いことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, *TfMYBML1*, *TfMYBML2*, and *TfMYBML3* isolated from *Torenia fournieri* were found to inhibit the expression patterns of different genes according to petal development of torenia. Analysis of *TfMYBML1*-, *TfMYBML2*-, and *TfMYBML3*-suppressed transgenic torenia plants suggested that *TfMYBML3* is closely related to the epidermal cell differentiation of a yellow blotch on the lower petal. However, each transgenic *torenia* plant constitutively overexpressing *TfMYBML1*, *TfMYBML2*, and *TfMYBML3* showed the same phenotype as the wild-type plant. These results suggest that *TfMYBML1*, *TfMYBML2*, and *TfMYBML3* are not the main factors responsible for controlling epidermal cell shape in the petals of *T. fournieri*.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2011年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 2012年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

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：花卉、花卉表皮細胞、CRES-T

1. 研究開始当初の背景

花き園芸植物の最大の特徴は、多彩な花色、花形を持つ品種が多数存在していることである。花の観賞性を多様に表現している花色は、色素による色彩に加え質感（花卉表皮細胞の形態）によっても決定されている。花色

に関して、色素成分の分析や花色関連遺伝子の機能解析が精力的に行われているが、花卉表皮細胞の形態によって制御されている質感については、光の反射や屈折などの光学的観点からの解析が主であり、その形態制御機構についての報告は少ない。従来_の育種技術

では、色彩や花形の改変は可能であるが、花弁表皮細胞の形態変化によって質感および花色パターンが変化した花きは作出されていない。従って、花弁表皮細胞の形態制御技術を開発することにより従来の育種では実現できない新たな質感・花色パターンを、花き園芸植物に付与することができると考えられる。

2. 研究の目的

花弁表皮細胞の形態制御による新規花色パターン花きの作出を目指し、器官分化関連遺伝子を用いた解析や花弁表皮細胞形態関連遺伝子の機能解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 形質転換が容易で5種類の花弁表皮細胞を有するトレニアを材料に、花弁表皮細胞関連 MYB 転写因子遺伝子を単離し、花弁発達過程および花弁部位別の遺伝子発現解析を行った。花弁発達過程は、ガク裂開前のステージを4つ分け、ガク裂開後から満開までの3ステージを設けた

(2) トレニアから単離した転写因子遺伝子を用いて、構成的に発現を誘導する CaMV35S プロモーターを用いてアグロバクテリウム法により機能抑制形質転換体および過剰発現体を作成し、形態観察等を行った。なお、機能抑制形質転換体の作出法として転写因子にリプレッサー遺伝子配列を連結することによって転写因子機能を抑制する CRES-T 法を用いた。

(3) シロイヌナズナの器官分化関連遺伝子 *TCP3* にリプレッサー遺伝子配列 (*SRDX*) を連結した *TCP3-SRDX* 遺伝子がトレニアの花弁表皮細胞の変化および葉の形態変化を誘導したことから、主要花卉品目であるカーネーションにおいても同等の変化を誘導できるのか調査するため、CaMV35S プロモーターに連結した *TCP3-SRDX* 遺伝子をカーネーション‘セトノオトメ’へアグロバクテリウム法により導入した。獲得した形質転換体の形質を評価した。

4. 研究成果

(1) トレニアから既に単離している花弁表皮細胞形態形成関連 MYB 転写因子をコードす

る *TfMYBML1* および *TfMYBML2* 遺伝子に加え、新たに *TfMYBML3* 遺伝子を単離した。花弁発達過程における *TfMYBML1*~*3* 遺伝子発現動態を調査した結果、花弁発達過程においてガクの裂開後に急激に発現量を減少する *TfMYBML1* および *TfMYBML2* とは異なり、*TfMYBML3* の遺伝子発現は満開まである程度維持されている事が認められた。さらに、トレニア花弁を唇弁部、筒部、基部に切り分け、花弁発達過程の各遺伝子発現量を調査したところ、各遺伝子は唇弁部、筒部、基部において発現しており、唇弁部のみで発現するというような特徴的な発現パターンは示さなかった。

(2) 3種の転写因子がどのように花弁表皮細胞の形態に関与しているのか明らかにするため、転写因子機能解析法として効率の良い新規遺伝子サイレンシング法である CRES-T 法を用いた。CaMV35S プロモーターに *TfMYBML1*~*3SRDX* を連結した3種の遺伝子と過剰発現を誘導する *TfMYBML1*~*3* を連結した3種の遺伝子、合計6遺伝子をアグロバクテリウム法によりトレニアへ導入し、各20個体以上の形質転換体を獲得した。これらの個体を順化・鉢上げし、花の形態を調査したところ、*TfMYBML1-SRDX* 形質転換体では花弁のプロッチの領域が拡大する表現型を示し、*TfMYBML2-SRDX* および *TfMYBML3-SRDX* 形質転換体は花弁先端や唇形部の一部で花弁表皮細胞の形成が認められない表現型を示し、さらに *TfMYBML3-SRDX* 形質転換体においてはプロッチ部の表皮細胞が認められない表現型を示した。*TfMYBML1*~*3* 過剰発現体に関しては、顕微鏡での形態観察では野生型と大きな違いが認められなかった(図1)。以上の事から、*TfMYBML3* はトレニア花弁のプロッチ部の表皮細胞形成に関与する転写因子であること、*TfMYBML1*~*3* は花弁表皮細胞の形態を制御する主因子ではないことが示唆された。

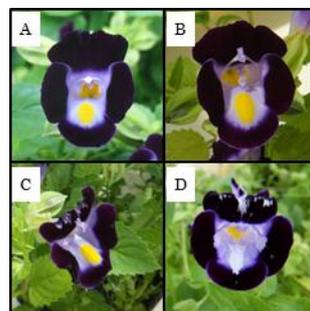


図1 各形質転換体の表現型
A:野生型、B:*TfMYBML1-SRDX* 個体
C: *TfMYBML2-SRDX* 個体、
D: *TfMYBML3-SRDX* 個体

(3) *TCP3-SRDX* をアグロバクテリウム法によりカーネーション‘セトノオトメ’へ導入した。選抜培養において葉の一部の縁辺がフリル化する多芽体が認められたが、選抜培養を進めるにつれて葉の縁辺がフリル化を示す多芽体は少なくなった。82 個の多芽体由来のシュートのうち 78 個体で導入遺伝子が検出された。培養条件下で表現型を調査したところ、葉が肥厚し葉縁辺が内側に湾曲する個体群、葉がやや肥厚し葉の先端がカール様に巻かれている個体群、非形質転換体と同等の葉を有する個体群に分けられた。各個体群から 6 個体ずつ選抜し、順化・鉢上げを行い隔離温室で栽培した。葉が肥厚し葉縁辺が内側に湾曲する個体群では、栽培条件下でも同様の葉の表現型を示し、生育が緩慢であった (図 2)。一方、葉がやや肥厚していた個体群は野生型と同等の表現型を示した。シロイヌナズナ由来の *TCP3-SRDX* を導入した事によって葉の形態が変化した事から、カーネーションにも *TCP3* と相同な転写因子が葉の形態を制御していることが示唆された。



図 2 野生型 (左) と *TCP3-SRDX* 形質転換体 (右) の葉の表現型の違い

(4) トレニアの花弁表皮細胞の形態制御に着目して得られた成果は、これまで未解明だったトレニア花弁のブロッチ部の制御機構を明らかにする可能性を示している。この制御機構を明らかにすることによって、花き園芸植物花弁に存在するブロッチ部がどのように分化するのか明らかになることが考えられる。

トレニアから単離した 3 種類の転写因子遺伝子はキンギョソウにおいて花弁表皮細胞の形態制御に関与する転写因子遺伝子と相同にも関わらず、機能抑制形質転換体では既に報告されている順遺伝学手法で得られているキンギョソウの突然変異体とは異なる表現型を示した。さらに、過剰発現体においても、キンギョソウ由来の花弁表皮細胞関連

MYB 転写因子遺伝子をタバコに導入し過剰発現させた表現型とは異なる表現型を示した。この事から、キンギョソウとトレニアでは機能が異なる可能性と花弁表皮細胞の形態を制御する新規主因子が存在する可能性が示唆された。新規主因子の存在の可能性については、これまで提唱されておらず、本研究が初めて国内外に向けて提唱すると考えられる。

今回用いたトレニアの 3 種類の転写因子の機能を詳細に解析し、花弁表皮細胞の形態形成へどのように関与しているのか明らかにするためには、ネイティブプロモーターを用いた解析が必要であると考えられる。ネイティブプロモーターを用いて CRES-T 法を適用することにより、その転写因子の機能を時間的・空間的に制御することが可能となるため、今回の知見以上のデータが得られ、*TfMYBML3* のブロッチ部の制御、*TfMYBML1*~*3* の花弁表皮細胞の形態制御への関与の有無が明確になると考えられる。本研究で得られた知見と今後得られる知見をまとめて発表することによって、花弁表皮細胞関連 MYB 転写因子の逆遺伝学的解析としては世界初となることが予想される。

カーネーションにシロイヌナズナ *TCP3-SRDX* を導入することによって得られた成果は、*TCP3-SRDX* はトレニアやキクのみならず、カーネーションでも形質を変化させる効果を有していることを示していた。しかしながら、*TCP3-SRDX* 導入によって形質が変化した形質転換体において、生育が遅い傾向を示したことから、本試験期間中に開花まで至らなかったことから、*CaMV35S* プロモーターの影響によって器官分化および生長に影響を与えたことが考えられた。*TCP3-SRDX* 導入による花弁の変化の有無を確認するためには花弁特異的なプロモーターを使用する必要があると考えられた。今後、葉が肥厚し葉縁辺が内側に湾曲する個体群の開花の様子を顕微鏡等で観察する予定である。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 太田己翔・鳴海貴子・深井誠一、トレニア表皮細胞関連転写因子遺伝子の単離および解析、園芸学会、2011 年 9 月 25 日、岡山大学津島キャンパス
- ② 鳴海貴子・太田己翔・大坪憲弘・深井誠

一、トレニアから単離した花卉表皮細胞
関連 MYB 転写因子遺伝子の発現解析、日
本植物細胞分子生物学会、2012 年 8 月 5
日、奈良先端科学技術大学院大学

- ③ 鳴海貴子・太田己翔・深井誠一、トレニ
アの花弁表皮細胞形成に関わる MYB 転写
因子遺伝子の機能解析、園芸学会、2012
年 9 月 22 日、福井県立大学福井キャン
パス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳴海 貴子 (NARUMI TAKAKO)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：30469829