

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658133

研究課題名(和文) 花成ホルモン根系生産システムの利用による樹木の早期開花技術の開発

研究課題名(英文) Development of rapid floral induction technique for trees by production of flowering hormone through root system.

研究代表者

小長谷 賢一 (Konagaya, Ken-ichi)

独立行政法人森林総合研究所・森林バイオ研究センター・主任研究員

研究者番号：30582762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：樹木は播種から開花に至るまで数年から数十年という長い栽培年月を必要とする。効率的な着花法が開発できれば、交雑育種における育種年限を短縮化することが可能となる。本研究ではタバコ属植物をモデルとし、毛根病菌と呼ばれる遺伝子導入ベクターを用いて、着花を誘導する花成ホルモンを挿し木時に発根した根系から生産させる手法を開発した。その結果、地上部を遺伝子組換えすることなく開花を迅速に誘導させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Trees require a long juvenile phase for years to decades before flowering. An efficient method for floral induction is effective in shortening the breeding period in crossbreeding. In the present study, we developed a technique for producing flowering hormone through root system that induced in a cutting by *Agrobacterium rhizogenes* as a gene transfer vector, and *Nicotiana* plants were used as model plants. We have succeeded in rapidly inducing flowering without genetic transformation of aerial parts.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林科学

キーワード：Flowering locus T 毛状根 *Agrobacterium rhizogenes* タバコ マツ

1. 研究開始当初の背景

日本のアカマツ・クロマツ林に多発しているマツ枯れ(マツ材線虫病)は我が国国土に被害域を拡大しつつあり、各地域の生育に適した抵抗性品種の導入が急務である。しかし、マツは一般に開花に至るまでに8年以上の栽培年月を必要とし、交配育種による品種開発が未だ実現できていないのが現状である。スギやヒノキで実用化されている薬剤処理による着花誘導はマツ類では効果がなく、効率的な着花誘導法が求められている。

近年、花成制御に関する分子メカニズムが明らかにされつつあり、その中で花成誘導遺伝子 *Flowering locus T (FT)* が花成ホルモン遺伝子の本体であることが証明された (Corbesier ら, 2007. *Science* 316:1030-1033)。樹木においても *FT* 遺伝子を導入した組換えポプラ、果樹類が早期開花性を示すことが報告されている。さらに、*FT* タンパク質は師管内を移行し茎頂で作用するため、*FT* 導入個体を台木として利用し、接ぎ穂においても同様に早期開花することがポプラにおいて示されている (Zhang ら, 2010. *J Exp Bot* 61:2549-2560)。しかしながら、これら手法は遺伝子組換え技術が確立されている樹種に限定される上、組換え体作製に要する期間や、最終的に *FT* 遺伝子を除去する必要性があり、実用的ではない。

筆者らは植物への遺伝子導入法として、これまでに毛根病菌 *Agrobacterium rhizogenes* の利用を検討してきた。本菌は接種部位に遺伝子導入された組織を毛状根と呼ばれる不定根として誘導する。毛根病菌の宿主域は極めて広く、マツ類を含めた樹木においても、挿し木苗の発根等に応用されている (Li ら, 2003. *Electron J Biotechnol* 6:251-258)。そこで本研究では毛根病菌により根系を容易に形質転換できるという利点と *FT* の組織移行性に着目し、*FT* を根系で大量生産させ、地上部へ移行させることで着花誘導する系を着想するに至った (図1)。

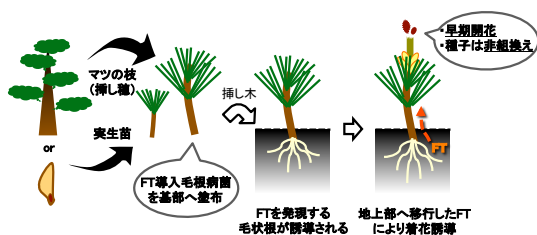


図1. 毛状根を用いた *FT* の根系発現による早期開花システムのモデル図。

2. 研究の目的

本研究ではマツの挿し木において *FT* 遺伝子を転移する毛根病菌を接種し、形成された毛状根から茎頂へ移行された *FT* により着花を誘起させるシステムを開発する。そのために効率的な毛状根の誘導法、*FT* の発現と地上部への移行性、着花誘導の各ステップを明ら

かにする。

3. 研究の方法

(1) ベクター構築

形質転換毛状根を作製するため構築したプラスミドベクターの概略図を図2に示す。外来遺伝子が導入された毛状根を可視化するために、可視化マーカーである緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*EmGFP*) または β -グルクロニダーゼ遺伝子 (*GUS*) をタバコモザイクウイルス由来恒常的発現プロモーター (*E12 Ω*) に連結したベクター *E12 Ω ::EmGFP*、*E12 Ω ::GUS* を作製した。また、*FT* は師部の伴細胞で発現し、師管へ移行するため、伴細胞特異的なプロモーターとして知られるシロイヌナズナ由来ショ糖輸送体プロモーター (*AtSUC2*) および毛根病菌由来 *rolC* プロモーター (*rolC*) 下流へ、シロイヌナズナ由来 *FT* 遺伝子 (*AtFT*) を連結したベクター *AtSUC2::AtFT*、*rolC::AtFT* も作製した。各プロモーターの毛状根における発現部位の観察には *GUS* 遺伝子を連結した *AtSUC2::GUS*、*rolC::GUS* を使用した。これらベクターにはいずれもシロイヌナズナ由来熱ショックタンパク質遺伝子のターミネーター配列 (*HSP-T*) を遺伝子下流に組み込んだ。

得られたプラスミドベクターは農業生物資源研究所ジーンバンクより配布されている毛根病菌へエレクトロポレーション法により導入し、500 mg/L スペクチノマイシンを含む YEB 培地にて選抜培養した。

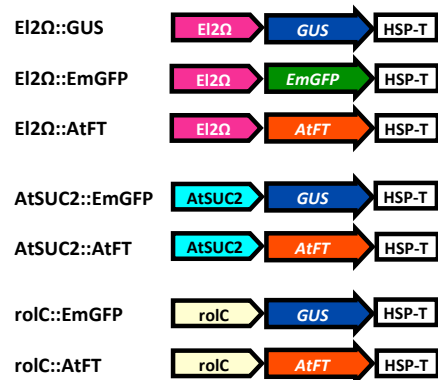


図2. ベクターの概念図 (ベクター骨格は pGWB)。

詳細な解説は文中を参照

(2) 毛状根の誘導

①クロマツの毛状根誘導

クロマツへの毛根病菌接種はヨーロッパクロマツにおける Mihaljević ら (1996, *Plant Cell Reports* 15:610-614) とアレポマツにおける Tzfira ら (1996, *Plant Cell Rep* 16:26-31) の報告を一部改変して行った。まず、クロマツ種子は 1/2MS 固形培地に無菌播種し、2週間後の子葉展開前の地上部、胚軸および子葉の 1 cm 長切片を供試材料とした。毛根病菌は遠心により集菌後、RIM 培地 (Abo

Al-Nil, 1982. US patent 4353184) に懸濁し、クロマツ切片を浸漬して接種した。接種後の切片はろ紙に染み込ませた液体培地上で共存培養し、毛根病菌を除菌するため 10mg/L のメロペネムを含む培地で継代培養した。

(2) タバコの毛状根誘導

タバコ (*Nicotiana tabacum*) およびベンサミアナタバコ (*N. benthamiana*) は MS 培地に無菌播種、またはパーミキュライトへ播種し、2 週間から 2 ヶ月間培養した幼植物体から切り取った地上部を供試材料とした。切断面へ毛根病菌を接種し、共存培養後の植物体を 10mg/L のメロペネムを含む MS 培地またはパーミキュライトへ挿し木した。無菌培養したタバコ個体は約 1 ヶ月後に閉鎖系温室へ馴化した。

(3) 着花誘導

E12Ω::AtFT、AtSUC2::AtFT、rolC::AtFT をそれぞれ保有する毛根病菌を用いて、前述で確立した毛状根誘導系により根系で FT を発現させ、地上部での着花性を経時的に調査した。

4. 研究成果

(1) クロマツにおける毛状根誘導系の検討

本研究で使用する毛根病菌は国内より分離された菌株を使用することとし、農業生物資源研究所ジーンバンクで配布されている菌株の内、澤田ら (1992, 日植病報 58:37-45) の生理学的な分類、白川ら (1989, 野菜・茶業試験場研究報告 A3:35-43) の血清学的分類、および分離源・採取地・biovar (生物型) を考慮して計 8 系統を選定した (表 1)。E12Ω::EmGFP をこれら菌株に導入し接種源としたクロマツの毛状根誘導試験において、菌株の種類、接種時の菌密度、共存培養時の培地の種類および培地量、除菌培養時の培地の種類、活性炭の添加、支持体の種類 (固形培地、ろ紙) 等を比較検討した。幾つかの試験区で不定根の誘導が観察されたが、いずれも可視化マーカーである EmGFP の緑色蛍光は観察されず、また、不定根から抽出したゲノム DNA の PCR においても *EmGFP* および毛状根特異的な *rol* 遺伝子の増幅は検出されなかった。こ

表 1 本研究で使った毛根病菌

MAFF 番号	分離源	採集地	biovar
643001	マルバカイドウ	青森	2
211704	バラ	山形	2
211728	ナシ	長崎	2
211707	モモ	岡山	2
301724	メロン	千葉	1
106579	メロン	千葉	1
106591	メロン	静岡	1
210266	メロン	千葉	不明

のことより、国内株の毛根病菌を用いたクロマツにおける毛状根誘導は困難であると判断し、次に、タバコをモデル植物とした FT 根系発現システムの構築を試みた。

(2) タバコ属植物における毛状根を用いた根系遺伝子発現システムの構築

葉切片を用いた予備的試験より、タバコおよびベンサミアナタバコでは表 1 の 8 菌株の内、MAFF210266 が最も毛状根誘導能が高かった。そこで、以後の試験では本菌株を使用した。タバコ属植物の効率的な根系遺伝子発現法を検討するため、可視化マーカーとして E12Ω::EmGFP を保有する毛根病菌を用い、植物体の接種時期、接種源の培地、共存培養法について検討した。その結果、無菌播種 3 週間後に切り取った地上部を供試材料とし、切断面を緩衝液 (10mM MES, pH5.6、10mM 塩化カルシウム、100 μM アセトシリソニン) へ懸濁した毛根病菌 (OD₆₀₀=0.4) に 20 秒間浸漬後、水を浸潤させたろ紙上にて、20°C で 2 日間共存培養した場合、効率的に緑色蛍光を発する毛状根の発根が観察された (図 3)。また、無菌操作を必要としない手法を検討するため、パーミキュライト上で温室栽培したタバコの利用を試みた。その結果、播種 50 日後の上位 5cm 長の挿し穂を用いた場合に、効率的に緑色蛍光を発する毛状根の発根が確認された (図 4)。これらの結果より、タバコ属植物における毛状根を用いた根系遺伝子発現システムの確立に成功した。

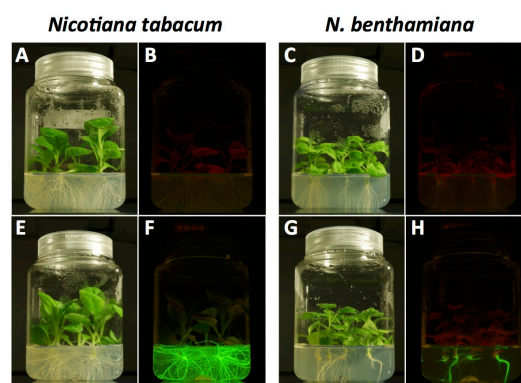


図 3. 無菌的に挿し木したタバコ属植物における EmGFP の根系発現。

毛根病菌接種した挿し穂を培地に挿し木し、培養 2 週間後に撮影した。A-D: 非接種区、E-H: E12Ω::EmGFP 接種区、A, C, E, G: 明視野像、B, D, F, H: 励起光照射した蛍光像

(3) 根系における FT の発現と着花性

前述の根系遺伝子発現システムを用いて、タバコ属植物における FT の根系発現と着花性について調査した。まず、FT を発現させる伴細胞特異的な発現プロモーターについて、GUS レポーター遺伝子を用いた毛状根における発現解析を行った。その結果、E12Ω::GUS を導入したタバコ毛状根では組織全体に発現活性が観察されたのに対して、

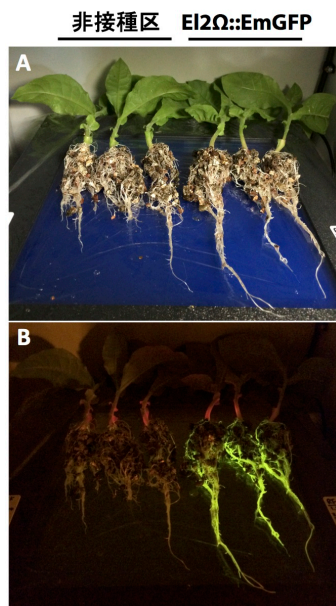


図 4. 土壌で栽培したタバコにおける EmGFP の根系発現。
毛根病菌接種した挿し穂をバーミキュライトに挿し木し、1 ヶ月後に掘り出した個体を撮影した。
左 3 個体が非接種区、右 3 個体が E12Ω::EmGFP 接種区、A: 明視野像、B: 励起光照射した蛍光像

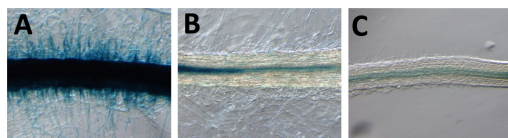


図 5. GUS レポーター遺伝子を用いたタバコ毛状根における各種プロモーターの発現解析。
A: E12Ω::EmGFP、B: AtSUC2::GUS、C: rolC::GUS

AtSUC2::GUS および rolC::GUS では想定される維管束領域で発現活性が認められた (図 5)。このことより、毛状根においてもこれらプロモーターが既報 (Imlau ら, 1999. Plant Cell 11:309-322) の根における発現と同様の発現活性を有していると推定された。次に、E12Ω::AtFT、AtSUC2::AtFT、rolC::AtFT をそれぞれ保有する毛根病菌を用いて、前述の根系遺伝子発現システムによりタバコ属植物への接種試験を行った。タバコの無菌個体について接種 1 ヶ月後に馴化し、5 ヶ月間温室にて栽培した。その結果、対照として AtSUC2::EmGFP および rolC::EmGFP を根系に導入したタバコ個体では馴化後それぞれ平均 109 日および 130 日で開花したのに対し、AtSUC2::AtFT および rolC::AtFT を根系に導入したタバコ個体ではそれぞれ平均 83 日および 97 日となり、有意に開花日が短縮された (図 6)。一方、E12Ω::AtFT を用

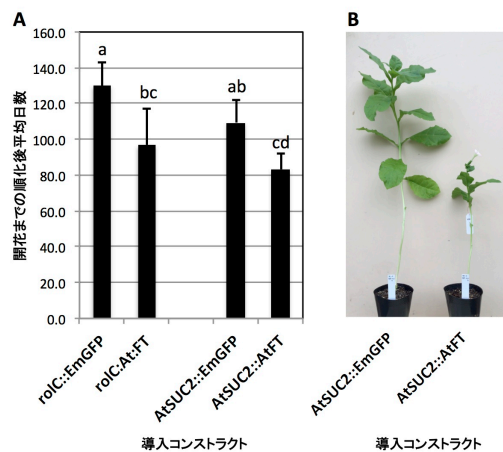


図 6. FT を根系発現させたタバコにおける開花までの順化後日数 (A) と馴化 4 ヶ月後の植物体 (B)。

バーは 5 個体試験した標準偏差、異なるアルファベット間には有意な差 (Tukey's HSD test, $p < 0.05$) があることを示す

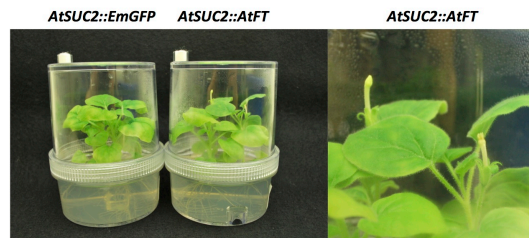


図 7. FT を根系発現させたベンサミアナタバコにおける着花。

接種 3 週間後に撮影した。右は AtSUC2::AtFT の着花部分の拡大写真

いた場合には開花日の短縮化は認められなかった。次に、タバコにおいて最も開花日が短縮された AtSUC2::AtFT を用いて同様にベンサミアナタバコにおける FT の根系発現を行った。その結果、わずか接種 3 週間後に 14 個体中 11 個体が培養瓶内で着花した (図 7)。一方、対照とした AtSUC2::EmGFP 接種区では接種後 1 ヶ月を経過しても、試験した 15 個体全て着花は観察されなかった。

以上の結果より、本研究で確立したシステムにより FT を根系で発現させることにより、タバコ属植物の地上部を遺伝子組換えすることなく早期着花させることに成功した。今回、針葉樹であるクロマツでは国内から単離された菌株を用いて毛状根を誘導することができなかったが、既に毛状根誘導系が一般的に確立されているポプラ、果樹等の広葉樹を含め、多くの草本植物においても育種年限を短縮化できる着花法として応用できる可能性がある。今後、適用可能な植物種の調査を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

(1) Konagaya K, Kurita M, Taniguchi T, High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Cryptomeria japonica* D. Don by co-cultivation on filter paper wicks followed by meropenem treatment to eliminate *Agrobacterium*. Plant Biotechnology, 30:523-528 (2014), 査読有, DOI: 10.5511/plantbiotechnology.13.0909a

〔学会発表〕（計4件）

(1) 小長谷賢一、栗田学、坪村美代子、平尾知士、渡辺敦史、石井克明、谷口亨、「遺伝子組換え技術による無花粉スギの作出と形質評価」、第2回森林遺伝育種学会大会、2013年11月8日、東京大学

(2) Konagaya K, Kurita M, Tsubomura M, Hirao T, Watanabe A, Ishii K, Taniguchi T, Induction of male sterility in transgenic sugi (*Cryptomeria japonica*) by barnase/barstar system. IUFRO Tree Biotechnology 2013, 2013年5月27日、アッシュビル（米国）

(3) 小長谷賢一、栗田学、谷口亨、石井克明、「遺伝子組換え技術による雄性不稔スギの作出」、第124回日本森林学会大会、2013年3月27日、岩手大学

(4) 小長谷賢一、栗田学、谷口亨、石井克明、「雄性不稔化に向けた遺伝子組換えスギの作製」、第30回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム、2012年8月5日、奈良先端科学技術大学院大学

〔図書〕（計1件）

(1) 谷口亨、小長谷賢一、化学同人、「形質転換プロトコール」、2012年、286-293

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小長谷 賢一 (KONAGAYA KEN-ICHI)

独立行政法人森林総合研究所・森林バイオ研究センター・主任研究員

研究者番号：30582762

(2) 研究分担者

平尾 知士 (HIRAO TOMONORI)

独立行政法人森林総合研究所・森林バイオ研究センター・主任研究員

研究者番号：90457763