

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292018

研究課題名(和文)ラン科植物における花被形態の多様化とその分子的基盤

研究課題名(英文)Molecular mechanism of floral diversification in orchids

研究代表者

菅野 明 (KANNO, AKIRA)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：10260449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラン科植物特有の花器官(唇弁、ずい柱、花粉塊など)形成の分子メカニズムを明らかにするため、培養ポット内で栽培可能なラン科植物シグモルキスを用い、培養系を確立、アグロバクテリウム法による形質転換系の確立、イオンビーム照射やEMS処理による突然変異体獲得の条件検討、次世代シーケンサーによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。さらにシグモルキスとサギソウより、花被形成に關与する遺伝子群の単離を行った。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the molecular mechanism of the orchid-specific floral organs such as lip, column, pollinium, we established the cultivation system and Agrobacterium-mediated transformation system in *Psychomorchis pusilla*. We also analyzed the optimal condition for mutant generation with ion beam and EMS. cDNA fragments related to floral development were isolated from *Psychomorchis pusilla* and *Habenaria radiata*.

研究分野：農学

キーワード：遺伝子単離 遺伝子発現 ゲノム解析 形質転換 変異体 シグモルキス サギソウ

## 1. 研究開始当初の背景

ラン科植物は単子葉植物の中で最も進化した、2 万を超える種が含まれる最大の科である。ラン科植物の花は左右相称であり、花弁の 1 枚は他の花弁に比べて著しく形態を異にし、唇弁と呼ばれている。また雄ずいと雌ずいは合着してずい柱と呼ばれる 1 本の柱となっており、その先端部の葯室には花粉が集まってできた花粉塊がある。唇弁、ずい柱、花粉塊はラン科植物特有の器官であるが、これらの花器官がどのように形成されるのか、その遺伝的背景は全く分かっていない。

これまで花の器官形成に関しては、シロイヌナズナなどのモデル植物を中心とした研究により、花器官のアイデンティティーを決定する機構として ABC モデルが提唱された。双子葉植物の花は 4 つの whorl から構成され、がく片、花弁、雄ずい、心皮が分化する。ABC モデルによれば、クラス A 遺伝子が働いてがく片が形成され、クラス A・B 遺伝子が働いて花弁が、クラス B・C 遺伝子が働いて雄ずいが、クラス C 遺伝子が働いて心皮が形成される。ABC モデルに関与する遺伝子の多くは MADS-box 遺伝子と呼ばれる転写因子であり、最近の研究から、MADS-box 遺伝子は双子葉植物のみならず、ユリ科植物やラン科植物においても存在し、その中には花器官のアイデンティティーを決定する役割をもつものがあることもわかってきた。さらに、コチョウランの野生型と唇弁形成変異体とで発現パターンが異なる MADS-box 遺伝子が発見され (Tsai et al. 2004)、MADS-box 遺伝子が whorl ごとの花器官のアイデンティティーだけでなく、その形態形成にも関与することが示唆されている (Mondragon-Palomino and Theissen 2011)。

形態形成に関与する遺伝子を解析する上で、形質転換技術を用いた遺伝子機能解析と突然変異体を用いた研究は非常に効果的である。ラン科植物においては、近年の精力的な研究により、形質転換技術が大きく進歩してきた。これまで三位(研究分担者)により、コチョウランの形質転換系が報告され (Sjahril and Mii 2006)、菅野が単離したコチョウランのクラス C 遺伝子 (Song et al. 2006) を導入したコチョウランも作出している(未発表)。しかし、コチョウランは形質転換してから開花するまで数年を要するため、遺伝子機能解析を進める上で大きな障害となっていた。そこで菅野らはラン科植物の花器官形成の分子機構解明のためには、早期に開花し、遺伝解析も容易

で、ゲノムサイズが小さいラン科のモデル植物を用いた研究が不可欠であるとの認識に至り、ゲノムサイズが 1,470Mbp でラン科植物の中では極めて小さいこと、フラスコ内で栽培し開花させることのできる植物であることからシグモルキス (*Psycmorchis pusilla*, 図 1) をラン科植物のモデル植物として利用できるよう基盤整備を進めた (基盤研究 B (課題番号 22380018))。

これにより、シグモルキスのフラスコ内での栽培系を確立するとともに(遊川)、形質転換系の確立に成功した(三位)。また、花器官形成に関わる AGAMOUS-like 遺伝子 (クラス C) と DEFICIENS (DEF)-like 遺伝子 (クラス B) の cDNA 断片が得られている(菅野)。さらにシグモルキスを用いた突然変異体作成と EST 解析はそれぞれ半田、佐藤(分担者)が進めている。

一方、ラン科植物には唇弁形成が変異した品種が知られている。サギソウとダイサギソウでは側がく片 (whorl 1) が唇弁化した獅子咲き変異、シランやコチョウランでは花弁 (whorl 2) が唇弁化した三蝶咲き変異がある。菅野はサギソウの野生型と獅子咲き変異体の遺伝子発現を比較解析し、DEF-like 遺伝子の発現が異なることを明らかにしている (Kim et al. 2007)。さらに獅子咲き変異体を用いた遺伝解析を行い、獅子咲き変異が優性に遺伝すること (Kim et al. 2010)、さらに DEF-like 遺伝子が獅子咲き変異と連鎖していることを明らかにした(未発表)。



図 1. 9cm のポット内で無菌培養し、開花したシグモルキス。

## 2. 研究の目的

本研究においては、ラン科植物のモデルとなるシグモルキスの分子的基盤整備を行うとともに、花器官形成遺伝子の単離と機能解析を行う。さらにラン科植物の唇弁形成変異体を用いて、その原因遺伝子を特定し、花被の唇弁化の分子機構を明らかにする。これらの研究成果を統合することによ

り、ラン科植物特有の花被形態がどのように形成されるのかを明らかにし、ラン科植物の花被形態の多様化が生じた分子メカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) モデル植物シグモルキスの分子的基盤構築

アグロバクテリウム法によるシグモルキスの効率的な形質転換系の確立

アグロバクテリウム法を用いたシグモルキスへの遺伝子導入システムの効率化を検討するため、イントロンが挿入されたGUSレポーター遺伝子(*intron-GUS*)の一過性発現を指標とし、遺伝子導入に適した植物組織・遺伝子型やアグロバクテリウム系統の選定、遺伝子導入効率に及ぼす植物組織の前処理、アグロバクテリウムとの共存培養期間、アグロバクテリウムの*vir*領域を活性化する物質(アセトシリゴン等)、アグロバクテリウムを接種する組織の物理的処理、等の効果を調査した。

#### シグモルキスの突然変異系統の作成

シグモルキスの種子、プロトコーム、プロトコーム類似球体(PLB)にEMS処理等の変異源処理を施し、致死率を調査した。致死率が約50%になる条件を用いて変異源処理を施し、シグモルキスを生育させ、形態調査および生育調査を行った。

#### シグモルキスの遺伝子発現プロファイルの作成

シグモルキスの各器官(花芽, 葉, 根, PLB)からmRNAを抽出し、次世代シークエンサーにより配列を解析した。

#### (2) シグモルキスにおける花器官形成遺伝子群の単離と発現・機能解析

##### シグモルキスにおけるMADS-box遺伝子群の単離

菅野はすでにRACE法により、花器官形成に関わるAGAMOUS-like遺伝子(クラスC)とDEF-like遺伝子(クラスB)のcDNA断片を得ていた。上記(1)においてシグモルキスの花を含む各器官の遺伝子発現の網羅的解析結果から、MADS-box遺伝子と相同性のある配列を選抜した。

##### シグモルキスにおける花器官形成遺伝子群の単離

シグモルキス遺伝子発現プロファイルの結果を利用し、花芽特異的に発現している遺伝子の配列情報から、PCR法・5'RACE法・3'RACE法によりそれらの遺伝子全長cDNAを単離した。

#### (3) 花被形成変異系統および形質転換系を用いた花器官形成遺伝子の機能解析

##### サギソウにおける獅子咲き変異品種の遺伝解析および遺伝子分析

サギソウの野生型と獅子咲き品種から花被形成に関与するDEF-like遺伝子群を単離し、RT-PCRならびにリアルタイムPCR法により、遺伝子の発現比較解析を行った。また野生型と獅子咲き品種の交雑後代を用い、獅子咲き変異と連鎖する遺伝子の探索を行った。

##### ラン科植物唇弁形成変異体の遺伝解析および遺伝子分析

ダイサギソウの野生型と獅子咲き品種を交配し、雑種後代種子を得た。これを無菌播種し、適当な時期に順化させ、ポットに移植して温室内で生育させた。開花するまで育て、雑種後代の花の表現型を観察し、遺伝様式を調査した。

### 4. 研究成果

#### (1) モデル植物シグモルキスの分子的基盤構築

アグロバクテリウム法によるシグモルキスの効率的な形質転換系の確立

シグモルキスの効率的な形質転換系の確立については、まずレポーター遺伝子としてGUS遺伝子を持ち、そのプロモーター領域が異なる二種類のベクター、pIG121Hm(CaMV35Sプロモーター)とpEKH2-nosPNPTII-ubiPGUS-35SPHPT(ユビキチンプロモーター)をそれぞれ持つアグロバクテリウム菌株を用いて、シグモルキス実生由来PLBを接種し、形質転換を試みた。共存培養培地と共存培養期間について条件検討を行い、最も高い形質転換効率では6.7%が得られた。しかしながら、ハイグロマイシンで選抜できたPLBはわずかであり、しかもそのすべてでGUS発現が見られなかった。この原因が導入遺伝子のサイレンシングによるものと考え、サイレンシング抑制剤であるSulfamethazineを共存培養以後の培地に添加し、その影響を調査した。その結果、接種1ヶ月後のPLBにおけるGUS発現は有意に高くなるものの、1年後に選抜されるPLB数は増加せず、選抜されたPLBにGUS発現はみられなかった。

#### シグモルキスの突然変異系統の作成

シグモルキスの変異源処理に関してはPLBに対するEMS処理と炭素イオンビーム処理を行った。処理方法と処理量の再検討を行った結果、処理強度の増加に伴い生存率が低下する反応が見られ、EMS処理では0.3%4h処理において生存率45%、炭素イオ

ンビーム処理においては25Gy処理において生存率41.7%が記録され、今回の処理区の中では最もLD50に近い結果となった。

#### シグモルキスの遺伝子発現プロファイルの作成

無菌播種により大量増殖したシグモルキスの花芽をがく片、花弁、唇弁、ずい柱に分け、それぞれから抽出した mRNA を用いて遺伝子発現解析を行った。植物体の器官の RNA シーケンスによりリファレンスとなる遺伝子配列情報が得られたため、リード数を重視し MiSeq シーケンサーを用いて配列解析を行った結果、各花器官から 3 百万リードの情報を集めることができ、それを基に高精度の組織間発現比較を行った。

#### (2) シグモルキスにおける花器官形成遺伝子群の単離と発現・機能解析

##### シグモルキスにおける MADS-box 遺伝子群の単離

シグモルキスの花芽、葉、根、PLB から単離した mRNA を用いて 454 シーケンサーによる配列解析を行い、シグモルキス発現遺伝子のリファレンス配列を得るとともに、各組織の発現プロファイルを作製した。また得られた配列およびデータベースに登録されている配列から花器官形成に関与する MADS-box 遺伝子に相同性のある配列を抽出するとともに、各遺伝子特異的な配列をもとにプライマーを作成し、cDNA 断片をクローン化した。

##### シグモルキスにおける花器官形成遺伝子群の単離

花器官形成遺伝子の単離解析に関しては、花の相称性に関わる TCP 遺伝子の単離を試み、全 RNA シーケンスより 6 つの TCP 遺伝子候補となる配列を確認した。そのうちの 1 つについては全長 cDNA 単離を行い、EpTCP と名付けた。遺伝子系統解析の結果、EpTCP 遺伝子は TB1、CYC が属する class に属し、その中でも CIN-like のクレードに属する事が確認された。

#### (3) 花被形成変異系統および形質転換系を用いた花器官形成遺伝子の機能解析

##### サギソウにおける獅子咲き変異品種の遺伝解析および遺伝子分析

サギソウの側がく片が唇弁化、背がく片が花弁化した獅子咲き品種‘飛翔’において、花被形成に関与する B クラス DEF 様遺伝子 (HrDEFs) をサギソウから単離し、野生型と獅子咲き変異品種の各花器官における遺伝子発現を比較解析した結果、DEF 様遺伝子の 1 つ HrDEF-C3 遺伝子

ががく片の花弁化および唇弁化に関与していることを示した。また‘飛翔’と野生型品種を用いた遺伝解析の結果、獅子咲き形質と HrDEF-C3 遺伝子が連鎖することが明らかとなった。

##### ラン科植物唇弁形成変異体の遺伝解析および遺伝子分析

ダイサギソウの獅子咲き変異品種‘白鳳獅子’を野生型と交配し、後代を得た。得られた F1 個体の花の表現型を観察した結果、表現型の強さにばらつきがあるものの、ダイサギソウにおいては獅子咲き形質が後代に遺伝することが分かった。

#### 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)

Gale, S. W., J. Li, A. Kinoshita and T. Yukawa, Studies in Asian Nervilia (Orchidaceae) V: *N. futago*, a cryptic new species from southwest Japan confirmed by morphological, cytological and molecular analyses, Systematic Botany、査読有、40 巻、2015 年、413-425

Kodama, T. and T. Handa, Effects of NAA and BA on PLB growth of *Psychomorphis pusilla*, Acta Hort., 査読有、1025 巻、2014 年、195-199

Takamiya T., P. Wongsawad, A. Sathapattayanon, N. Tajima, S. Suzuki, S. Kitamura, N. Shioda, T. Handa, S. Kitanaka, H. Iijima and T. Yukawa, Molecular phylogenetics and character evolution of morphologically diverse group, *Dendrobium* Section *Dendrobium* and allies, AoB PLANTS, 査読有、6 巻、2014 年、plu045、DOI 10.1093/aobpla/plu045

Tatsuzawa, F., N. Saito, T. Yukawa, T. Honda, K. Shinoda, K. Kato and K. Miyoshi, Acylated cyanidin 3,7-diglucosides in the red-purple flowers of *Sophranitis wittigiana* (Orchidaceae), Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 査読有、83 巻、2014 年、64-71、DOI 10.2503/jjshs1.CH-084

Yukawa, T. and P. J. Cribb, Nomenclatural changes in the genus *Calanthe* (Orchidaceae), Bulletin of the National Museum of Nature and Science Series B (Botany)、査読有、40 巻、2014 年、145-151

Tang, Y., T. Yukawa, R. M. Bateman, H.

Jiang and H. Peng、Phylogeny and classification of the East Asian *Amitostigma* alliance (Orchidaceae: Orchidaceae) based on six DNA markers、BMC Evolutionary Biology、査読有、15 巻、2014 年、96、DOI 10.1186/s12862-015-0376-3

〔学会発表〕(計 10 件)

古賀成彦・半田高、変化アサガオ「獅子系統」の腋芽培養における表現型の違いについて、第 31 回植物細胞分子生物学会大会 講演要旨 p.302、2013 年 9 月 10-12 日、北海道大学(北海道札幌市)

徐慧・辻田有紀・深澤遊・阿部晴恵・馬田英隆・手塚賢至・後藤利幸・牧雅之・遊川知久、菌従属栄養植物タカツランの菌根菌の多様性、日本菌学会第 58 回大会、2014 年 6 月 13 日-15 日、サイエンスヒルズこまつ(石川県小松市)

辻田有紀・三吉一光・堤千絵・遊川知久、ラン科シユンラン属の生活形・栄養摂取様式の進化 - 13: 独立栄養植物と菌従属栄養植物の雑種の世界初開花、日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 12 日-14 日、明治大学(神奈川県川崎市)

木下晃彦・辻田有紀・遊川知久、ラン科シユンラン属の生活形・栄養、摂取様式の進化 - 12: 生活史ステージによる菌根菌シフトの種間比較、日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 12 日-14 日、明治大学(神奈川県川崎市)

三苦舞・林里沙・菅野明、サギソウの花器官における DEFICIENS 様遺伝子群の単離と発現解析、園芸学会平成 26 年度秋季大会、2014 年 9 月 27 日-28 日、佐賀大学(佐賀県佐賀市)

高宮知子・海保有芳・鶴牧友梨香・曾根麻友美・藤原有紀子・町田智美・松本亮平・北中進・飯島洋・遊川知久、ラン科セッコク属植物の包括的な情報構築と分類に基づく薬用資源の探索、第 23 回日本 DNA 多型学会学術集会、2014 年 11 月 26 日-28 日、ウインクあいち(愛知県名古屋市)

曾根麻友美・藤原有紀子・町田智美・松本亮平・菊地泰平・清水玲子・吉野圭一・北中進・遊川知久・飯島洋・高宮知子、ラン科セッコク属の多様性解析に基づく薬用資源の探索、日本植物園協会第 50 回大会、2015 年 6 月 25 日-27 日、国立京都国際会館(京都市)

關根健人・菅野明・佐藤修正・半田高、ラン科植物 *Erycina pusilla* における TCP 遺伝

子の単離、第 33 回日本植物細胞分子生物学会、2015 年 8 月 10 日-12 日、東京大学(東京都文京区)

梶野祐未・三苦舞・林里沙・菅野明、サギソウ獅子咲き形質に連鎖する DEF 様遺伝子の同定、園芸学会平成 27 年度秋季大会、2015 年 9 月 26 日-28 日、徳島大学(徳島県徳島市)

Yukawa, T., K. Suzuki and Y. Ogura-Tsujita, Diversity and conservation status of Japanese indigenous orchids、11th International Symposium on Diversity and Conservation of Asian Orchids (Janghang)、2015 年 12 月 16 日-18 日、ソチョン郡(韓国)

〔図書〕(計 1 件)

半田高、明治大学リバティーアカデミー、ラン科植物の遺伝子解析最前線、リバティーアカデミーブックレット 22 巻「ランの世界」(夏井高人編)、2013 年、14-21 ページ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅野 明 (KANNO AKIRA)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授  
研究者番号：10260449

### (2) 研究分担者

三位 正洋 (MII MASAHIRO)

千葉大学・環境健康フィールド科学センター・特任研究員  
研究者番号：30093074

半田 高 (HANDA TAKASHI)

明治大学・農学部・教授  
研究者番号：00192708

遊川 知久 (YUKAWA TOMOHISA)

独立行政法人国立科学博物館・筑波実験植物園・研究主幹  
研究者番号：50280524

佐藤 修正 (SATO SYUSEI)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授  
研究者番号：70370921