

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2017

課題番号：25850021

研究課題名(和文) 花弁の色と質感を決定する花弁表皮細胞形態制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the shape control mechanism of petal epidermal cells determining the tone and texture of petal

研究代表者

鳴海 貴子 (Narumi-Kawasaki, Takako)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：30469829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：花の色は、色素による色彩に加え、花弁表皮細胞の形態によっても決定されている。本研究では、キンギョソウで報告されている花弁表皮細胞関連遺伝子と相同の遺伝子をトレンニアから単離し(TfMYBML1～3)、局在解析などの遺伝子機能解析を行った。その結果、TfMYBML1は影響は与えず、TfMYBML2とTfMYBML3は唇弁部の表皮細胞の形態にわずかに影響を及ぼす転写因子であることが示された。特に、TfMYBML3は、プロッチ部の表皮細胞の形態を主に制御する転写因子であることが示された。以上のことから、TfMYBML1と2はトレンニアの花弁表皮細胞の形態を制御する主因子ではないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Flower color is determined by the components of pigment and the shapes of the petal epidermal cells. The shape of petal epidermal cells influences the tone and texture of petals. Three types of petal epidermal cell-related transcription factor genes (TfMYBML1～3) were isolated from *Torenia fournieri* L., which were homologous with genes reported in *Antirrhinum majus* L. in a previous study. The localization of gene expression and gene function by production of transgenic torenias of these genes was analyzed. The results indicated that TfMYBML1 is a transcription factor which does not affect the shape of petal epidermal cell, and TfMYBML2 and TfMYBML3 are transcription factors which partially affect the shape of the epidermal cell of the petal lips. Most importantly, TfMYBML3 was found to mainly regulate the shape of epidermal cell of the distinctive yellow blotch existing at the abaxial petal of torenia. TfMYBML1 and TfMYBML2 can be ruled out as main factors.

研究分野：花き園芸学

キーワード：花弁表皮細胞 MYB転写因子

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(花弁表皮細胞の形態)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、花弁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。

研究代表者はこれまで、花弁表皮細胞の形態や位置が変化することで質感および花色パターンが劇的に変化することを明らかにした。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思われる。

2. 研究の目的

平成22年度から平成24年度まで科学研究補助金若手研究(B)により、5種類の花弁表皮細胞を有するトレニアを材料に、3種類の花弁表皮細胞関連遺伝子(*TfMYBML1*~*3*)の単離および解析を行った。3種類の花弁表皮細胞関連転写因子遺伝子は、花弁発達過程で遺伝子発現動態が異なることを明らかにしている。3種類の遺伝子の機能を解析するために、過剰発現体および機能抑制形質転換体を作成し、表現型を調査する。さらに、特徴的な表現型を示した系統について、その遺伝子が野生型においてどこで発現しているのか局在解析を行う。

3. 研究の方法

(1) CaMV35S プロモーターを用いた *TfMYBML1*~*3* の過剰発現および機能抑制形質転換体の表現型の調査

平成22年度から平成24年度まで科学研究補助金若手研究(B)で作出した形質転換個体について、走査型電子顕微鏡(JEOL)を用いて花弁表皮細胞の観察を行った。特徴的な表現型を示した *TfMYBML3-SRDX* 形質転換体を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

(2) *TfMYBML3* のプロモーター::*GUS* 遺伝子の構築と遺伝子導入

TfMYBML3 のプロモーター領域を単離し、*GUS* をコードするデスティネーションベクター-pGWB3へ組み換えた。その後、アグロバクテリウム法によりトレニアの葉切片へ遺伝子導入操作を行った。その後、*GUS* 染色を行った。

(3) *TfMYBML3* の局在解析

TfMYBML3 が花弁特異的か調査するため、葉、老化葉、茎、根を用いて qRT-PCR による遺伝子発現解析を行った。

(4) 新規花弁表皮細胞関連遺伝子の探索

花弁表皮細胞が変化した *TCP3-SRDX* 形質転換体あるいは野生型の様々な発達ステージの花弁を混ぜ total RNA 抽出を行い、RNA-seq 解析を行い、パイオインフォマティクス処理により *TCP3-SRDX* 形質転換体で発現量が上昇および減少している TCP 転写因子を抽出し、遺伝子単離および予備的な遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) CaMV35S プロモーターを用いた *TfMYBML1*~*3* の過剰発現および機能抑制形質転換体の花弁表皮細胞の形態調査

TfMYBML1~*3* 過剰発現体は、野生型と同様の表現型を示したため、*TfMYBML1*~*3-SRDX* 導入に個体である機能抑制形質転換体(図1)について花弁表皮細胞の形態を SEM を用いて調査した(図2)。その結果、*TfMYBML1-SRDX* 形質転換体では、外観上は野生型と同じ表現型を示しているにも関わらず、下側の花弁(Lower lip)において細胞の形態変化および細胞配列の変化が認められた。プロッチ部(Blotch)では野生型と同じ細胞型を示した。*TfMYBML2-SRDX* 形質転換体では、下側の花弁およびプロッチ部では野生型と同じ表現型を示した。なお、*TfMYBML2-SRDX* 形質転換体の上側の花弁の白色部は、平面状の細胞を示した。*TfMYBML3-SRDX* 形質転換体では、下側の花弁は野生型と同じ細胞型を示したが、プロッチ部の白色部は平面状細胞に変化していた。上側および側部花弁などの調査も行ったが、*TfMYBML1-SRDX* 形質転換体では下側の花弁以外は野生型と同じ細胞型であり、また *TfMYBML2-SRDX* 形質転換体では白色部以外は野生型と同じ細胞型を示したことから、これら2遺伝子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考えられた。*TfMYBML3-SRDX* 形質転換体では花弁の白色部以外は野生型と同じ表現型であったものの、プロッチ部で白色化する個体が多く、さらに白色部の細胞が平面状に変化していたことから、*TfMYBML3* はトレニアのプロッチ部の細胞の形態を制御する転写因子であることが考えられた。なお、*in situ* ハイブリダイゼーションにより *TfMYBML3* はプロッチ部に主に発現することが観察された。



図1. *TfMYBML1*~*3-SRDX* 機能抑制形質転換体の表現型

- (A) 野生型、
- (B) *TfMYBML1-SRDX*、
- (C) *TfMYBML2-SRDX*、
- (D) *TfMYBML3-SRDX*

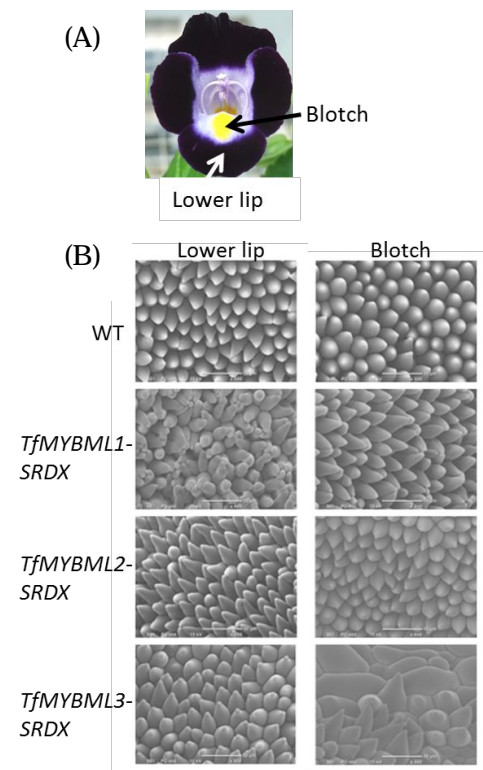


図2．花弁表皮細胞の形態観察
(A)はSEM観察を行った花弁の部位を示している。(B)はSEM観察結果を示している。

(2) *TfMYBML3* のプロモーター::*GUS* 形質転換体の作出

遺伝子導入操作を2回行った。遺伝子導入操作後、カルス形成期の葉片でGUS活性を有するのか調査を行った。#114の個体では20個体中2個体でブルースポットが確認された。#115個体では30個体中3個体でブルースポットが確認された(図3)。これよりに再分化シュートで*TfMYBML3* プロモーターは活性を有することが示唆された。この結果から、*TfMYBML3* は花弁特異的ではないことが推察された。

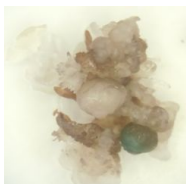


図3．トレニア再分化シュートのGUS染色の様子

(3) *TfMYBML3* の局在解析

TfMYBML3 が花弁特異的か調査するため、葉、老化葉、茎、根を用いてqRT-PCRによる遺伝子発現解析を行ったところ、葉で発現量が多く、老化葉、茎および根においても遺

伝子発現していることが示された(図3)。*TfMYBML3-SRDX* 形質転換体において葉、茎および根の形態に変化は認められないが、*TfMYBML3-SRDX* 形質転換体の無菌培養時に若い葉にトルイジンブルーを処理した際に青色に染まることから、ワックス層の形成に参与していることが考えられている。そのため、若い葉での*TfMYBML3* の発現は、ワックス層の形成あるいは維持に参与していると考えられた。以上のことから、*TfMYBML3* は花弁以外でも発現しており、葉においてはワックス層の形成あるいは維持、花弁においてはプロッチ部の花弁表皮細胞の形態に参与する転写因子であることが明らかになった。

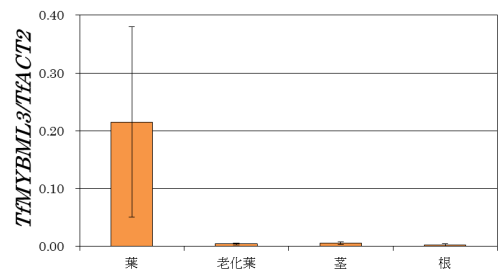


図3．組織別の*TfMYBML3* 発現解析
n=3 標準偏差を示した。*TfACT2* との相対値で示した。

(4) 新規花弁表皮細胞関連転写因子遺伝子の探索

RNA-seq 解析により花弁表皮細胞の形態が変化した *TCP3-SRDX* 形質転換体で発現上昇あるいは発現減少している TCP 転写因子を抽出し、3種類の遺伝子について遺伝子単離を行った。2種類 (*TfTCP7*, *TfTCP8*) は Class I TCP ファミリー特有のアミノ酸残基を有していた。1つ (*TfTCP10*) は、Class II TCP ファミリー特有のアミノ酸残基を有しており、このファミリーが形態形成に関わる TCP 転写因子を構成していることから、*TfTCP10* も形態形成に参与する転写因子であることが推察された。*TCP3-SRDX* 形質転換体と野生型の花弁を用いて予備的な遺伝子発現解析を行った結果、*TfTCP7*, *TfTCP8* の遺伝子発現は野生型と同等であったが、*TfTCP10* は *TCP3-SRDX* 形質転換体において発現量が野生型に比べ3倍多いことが認められた。*TfTCP10* が花弁表皮細胞の形態に参与しているのか機能解析を行う必要がある。

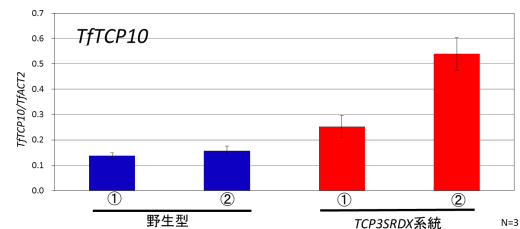


図4．野生型および *TCP3SRDX* 形質転換体の花弁における *TfTCP10* の遺伝子発現解析

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 5件)

Laojunta, T., T. Narumi-Kawasaki and S. Fukai
Characteristics of commercial Torenia cultivars. Acta Horticulturae, 1167, 205-211.2017. 査読無し
DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1167.31

Laojunta, T., T. Narumi-Kawasaki and S. Fukai
Efficient vegetative propagation of torenia cultivars by leaf cutting. Propagation of Ornamental Plants, 17, 55-63. 2017. 査読有り
http://www.journal-pop.org/2017_17_2_55-63.html

鳴海貴子, 吉本知佳, 深井誠一.
バラ, カーネーションおよびトルコギキョウの花弁表皮細胞の観察, 香川大学農学部学術報告, 68, 11-15, 2016 査読無し

Sasaki, K., H. Yamaguchi, I. Kasajima, T. Narumi and N. Ohtsubo.
Generation of Novel Floral Traits Using a Combination of Floral Organ-Specific Promoters and a Chimeric Repressor in Torenia fournieri Lind., Plant and Cell Physiology, 57 (6), 1319-1331, 2016
査読有り、
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcw081>

Niki, T., K. Sasaki, M. Shikata, T. Narumi-Kawasaki, N. Ohtsubo and T. Nishijima
Conversion of Abaxial to Adaxial Petal in a Torenia (Torenia fournieri Lind. ex Fourn.) Mutant Appeared in Selfed Progeny of the Mutable Line "Flecked", The Horticulture Journal, 85 (4), 351-359, 2016 査読有り
DOI: 10.2503/hortj.MI-129

〔学会発表〕(計 3件)

Laojunta, T., T. Narumi-Kawasaki, S. Fukai, P. Suksathan.
New interspecific hybridization of torenia. 園芸研究 16, 別2, 270, 2017年9月, 酪農学園大学

Laojunta, T., T. Narumi-Kawasaki, S. Fukai, P. Suksathan.
Tri-parental hybrids of torenia via ovule culture. 園芸研究 16, 別2, 271, 2017年9月, 酪農学園大学.

Laojunta, T., T. Narumi and S. Fukai
Effective vegetative propagation of torenia cultivars by leaf cutting. 園芸研究 14, 別2, 560, 2015年9月, 徳島大学.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
特になし

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
鳴海 貴子(Takako Narumi-kawasaki)
香川大学・農学部・准教授
研究者番号: 30469829

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号:

(4)研究協力者
()