

平成 23 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19380016

研究課題名 (和文) 形質転換技術を用いたラン科植物特有の花器官形成機構の解明

研究課題名 (英文) Molecular mechanism of orchid-specific floral organogenesis by a transgenic approach.

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

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) の形成機構を明らかにするため, デンドロビウム, サギソウ, コチョウランを用いて花器官形成関連の遺伝子を単離し, その発現解析を行った. その結果, 花卉形成に関与するクラス B 遺伝子の発現パターンがデンドロビウムの花被形態の多様性に関連していることが示唆された. またこれらの遺伝子の機能を明らかにするため, コチョウランに遺伝子導入を行い, 形質転換植物を得た.

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 isolated floral organ identity genes from *Dendrobium*, *Habenaria* and *Phalaenopsis* orchids. The results indicated that expression pattern of class B genes were related to the various morphology of the tepals. Also, to understand the function of the floral organ identity genes, we constructed the transgenic *Phalaenopsis*.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 6,600,000 | 1,980,000 | 8,580,000 |
| 2008 年度 | 4,500,000 | 1,350,000 | 5,850,000 |
| 2009 年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,400,000 | 4,020,000 | 17,420,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：デンドロビウム、コチョウラン、セッコク、サギソウ、MADS-box 遺伝子、遺伝子単離、遺伝子発現、形質転換

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、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、花卉の 1 枚は他の花卉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。これらの花の特殊な形態は、ラン科植物の特徴となっている。しかしながら、唇弁、ずい柱、花粉塊などのラン科植物特有の花器官がどのようにして形成されるのか、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が精力的に進められ、花器官のアイデンティティを決定する機構としてABCモデルが提唱されている。双子葉植物の花は基本的に4つのwhorlから構成され、最も外側のwhorl 1ではがく片が、whorl 2では花弁が、whorl 3では雄ずいが、whorl 4では心皮が分化する。ABCモデルによれば、whorl 1ではクラスA遺伝子が働いてがく片が形成され、whorl 2ではクラスA遺伝子とクラスB遺伝子が働いて花弁が、whorl 3ではクラスB遺伝子とクラスC遺伝子が働いて雄ずいが、whorl 4ではクラスC遺伝子が働いて心皮が形成される。その後、胚珠形成に関わるクラスD遺伝子、ABCモデル遺伝子群と高次複合体を形成するクラスE遺伝子がみつきり、現在ではこれらを含めてABCDEモデルと呼ばれている。ABCDEモデルに関与する遺伝子の多くはMADS-box遺伝子と呼ばれる遺伝子の一群に含まれる。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。

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いる。またラン科植物には6枚の花被片が同色同形のセッコク‘六歌仙’、ずい柱が花弁化して八重花となった蝶咲きシュンランや、コチョウランの「トリプルリップ」(内花被片すべてが唇弁になる)やサギソウの‘飛翔’ (唇弁のすぐ脇に位置する2枚の外花被片が唇弁様になる)のような唇弁形成の変異体が知られており、これら奇形花はラン科植物特有の花器官形成機構を解析する上で非常に良い研究材料だと考えられる。

ラン科植物は被子植物の中でも非常に特徴的な形態の花を有している。本研究ではラン科植物特有の形態 (唇弁、ずい柱、花粉塊) がどのような遺伝子によって支配されているのかを明らかにし、ラン科植物の花器官形成の分子メカニズムを解明するとともに、形質転換技術を用いてラン科植物の花形の改変を試みるものである。

2. 研究の目的

このような背景から、本研究においてはラン科植物に特有な花器官形成に関与すると考えられる遺伝子の単離および発現解析を行い、ラン科植物に特有な花器官形成の分子メカニズムを明らかにすることを目的として、下記の3点に絞って研究を遂行する。

(1) ラン科植物における花器官形成に関わる遺伝子単離と発現解析

申請者らはこれまで3種のラン科植物 (コチョウラン、サギソウ、デンドロビウム) から花器官形成遺伝子の単離を進めており、すでに花のABCDEモデルに関わるMADS-box遺伝子群をいくつか単離している (Song et al. 2006, Kim et al. 2007)。そこで本研究においても引き続き、これら3種のラン科植物からABCDEモデルに関わるMADS-box遺伝子群の単離・発現解析を行う。また、花の左右相称性に関わる *cycloidea* 遺伝子についても単離・発現解析を行う。またディファレンシャルスクリーニング法あるいはcDNA-AFLP-DD法 (Bowman et al. 1989) などにより、ラン科植物特有の器官 (唇弁・ずい柱・花粉塊) 形成に関わる遺伝子の単離を試みる。

(2) ラン科植物の花器官変異体を用いた遺伝子解析

ラン科植物にはさまざまな奇形花が知られている。そこで野生型、変異体のラン科植物を用いて①で単離された花器官形成関連遺伝子群の発現を比較解析するとともに、発現の異なる遺伝子についてはゲノム構造を調べ、変異の原因遺伝子の特定を試みる。

(3) 形質転換技術を用いた花器官形成関連遺伝子群の機能解析

①で単離された花器官形成関連遺伝子群の機能解析を行うために、これらの遺伝子を発現ベクターにクローニングし、モデル植物であるシロイヌナズナとタバコ、ラン科植物のコチョウランとデンドロビウムにそれぞれ形質転換する。

3. 研究の方法

(1)ラン科植物における花器官形成に関わる遺伝子単離と発現解析

3種のラン科植物(コチョウラン, サギソウ, デンドロビウム)を用い, 花芽から全RNAを抽出し, cDNAプールを作成した. このcDNAプールを鋳型にしてMADS領域特異的なプライマーを用いたRACE法を行い, ABCDEモデルに関わるMADS-box遺伝子群のcDNA断片を単離した. さらに5'RACE法, PCR法により遺伝子のcDNA全長クローンの単離を行った.

単離したcDNA断片のうち, 保存性の比較的低いC領域と3'UTR領域を用いてプライマーを作成し, RT-PCR法を用いて発現解析を行った. 発現解析に用いたRNAは分取した花の各器官から抽出したRNAを用いた.

(2)ラン科植物の花器官変異体の選抜・収集と形態観察

さまざまなラン科植物の中から, 花器官形態形成遺伝子の変異が原因と考えられる奇形花や原種を選抜し, それらの花の形態を実体顕微鏡を用いて詳細に観察した. 特にサギソウに関してはがく片が花弁化(一部唇弁化)した品種‘飛翔’を収集した. またサギソウと同属ではあるが, がく片が花弁状花被であるダイサギソウについても収集を行った. さらにセッコクについてはさまざまな花器官変異品種の収集を行った.

(3)コチョウランの花器官形成遺伝子を用いた形質転換実験

コチョウランから単離された3つのMADS-box遺伝子, *PhalGLOA*, *PhalDEFA* (以上クラスB遺伝子), *PhalAG2A* (クラスC遺伝子)を用い, これらのアンチセンスを過剰発現させるよう発現ベクターを構築した. これらをコチョウランおよびナス科植物の *Solanum fiebrigii* にアグロバクテリウム法により形質転換した. 遺伝子導入植物は抗生物質の入った培地で選抜し, 再分化個体についてはPCR法を用いて導入された遺伝子の確認を行った.

4. 研究成果

デンドロビウム属セッコク (*Dendrobium moniliforme*) の野生型ならびにこれら花物の花器官形成関連遺伝子群の発現解析を行うため, MADSボックス遺伝子群のクラスB (

*AP3/DEF*および*PI/GLO*) 遺伝子とクラスC (*AGAMOUS*) 遺伝子を単離し, それぞれ*DMMADS4*, *DMAP3A*, *DMAP3B*, *DMPI*, *DMAG1*と名付けた(図1, 図2). RT-PCRの結果, *DMAP3A*は外花被, 内花被, 唇弁, ずい柱の全てで, *DMAP3B*は内花被, 唇弁, ずい柱のみで発現していた. また*DMMADS4*は内花被, 唇弁, ずい柱で発現し, *DMPI*は外花被, 内花被, 唇弁, ずい柱の全てで発現していた. また*DMMADS4*, *DMPI*両遺伝子は共に, 子房発達時に発現していた(図3). 次に, 2つのクラスB遺伝子(*DMMADS4*, *DMPI*)のタンパク質間相互作用を明らかにするために酵母ツーハイブリッド解析を行った結果, これら2つの遺伝子産物はヘテロダイマーを形成することがわかった. シロイヌナズナを使用した形質転換実験では, *DMMADS4*の強発現個体の花は野生型と変わらなかったが, *DMPI*の強発現個体の花は外花被が花弁様に変化した. また, 開花期間は野生型よりも長くなった. 以上の結果から, セッコクから単離した2つのクラスB遺伝子*DMMADS4*, *DMPI*は花弁の発達と開花期間に関係すると考えられた. *DMAP3B*の強発現個体の花は野生型と変わらなかったが, *DMPI*の強発現形質転換体と交配した後代において, 外花被が花弁様に変化し, 心皮の発達が阻害されていた. これは, やはり*DMMADS4*形質転換体と*DMPI*形質転換体との交配後代で観察された表現型と同じであり, これら3つの遺伝子(*DMAP3B*, *DMMADS4*, *DMPI*)がセッコクの花器官決定にとって重要な役割を担っていることが示唆された(図4).

サギソウからは*HrDEF*遺伝子の他に新規*DEF-like*遺伝子2種類(*HrDEF2*, *HrDEF3*)のcDNAクローン断片を単離した. コチョウランでは4つのクレードに属する*DEF-like*遺伝子4つが単離されているが, サギソウからはこのうちの3つのクレードに属する*DEF-like*遺伝子が単離できた.

コチョウランから単離された3つのMADS-box遺伝子, *PhalGLOA*, *PhalDEFA* (以上クラスB遺伝子), *PhalAG2A* (クラスC遺伝子)の各アンチセンスを過剰発現させた形質転換コチョウランをそれぞれ約30個体ずつ作出した. これらのうち約16個体の発根したハイグロマイシン耐性植物を順化し, PCR法を用いて遺伝子が導入されていることを確認した. 順化した形質転換コチョウランのうち, *PhalAG2A*を導入したものが1株開

花した。この株はリップ化した花弁（ペロリック）の形態を示したが、組織培養によってもこのような変異が生じることが報告されている。従って、今後他のまだ開花していない個体の花の確認及び分子レベルでの解析を行い、培養で生じた変異なのか導入遺伝子の働きなのかを明らかにする必要がある。またコチョウランの3つの遺伝子についてはナス科植物である *Solanum fiebrigii* においても遺伝子導入を行い、形質転換体が得られた。*Solanum fiebrigii* において3つの遺伝子それぞれ約 25 個体の異なる形質転換ラインを順化し、3 種類の形質転換個体はそれぞれ 10 個体以上開花した。しかし、非形質転換体に比べて、花の形態の変化がみられなかった。この結果から導入したコチョウランの各 MADS-box 遺伝子は *Solanum fiebrigii* が持っている標的遺伝子の配列と大きく異なり、二本鎖 RNA 分子の形成ができなかったものと考えられた。

これ以外に、サギソウの野生型およびがく片が花弁化した変異体‘飛翔’を交配し、その後代を作出した。‘飛翔’にみられるがく片の花弁化および側がく片の唇弁化はともに後代に遺伝したので、この形質を他のサギソウ品種に導入することが可能であると考えられた。セッコクおよび同属の複数種の多様な花変異個体を収集・育成した。花芽分化させた後のさまざまなステージの花をサンプリングした。ダイサギソウの花変異個体を育成し、交配・採種した。

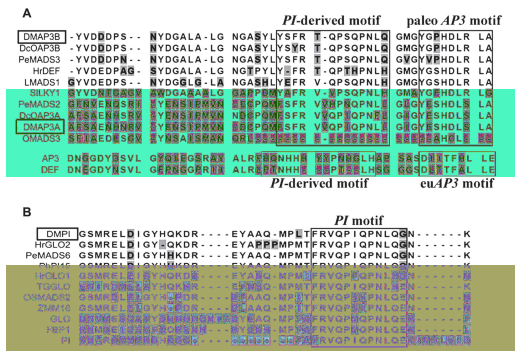


図1. クラス B 遺伝子 (DEF-like 遺伝子) C 末端領域のアミノ酸配列比較解析。

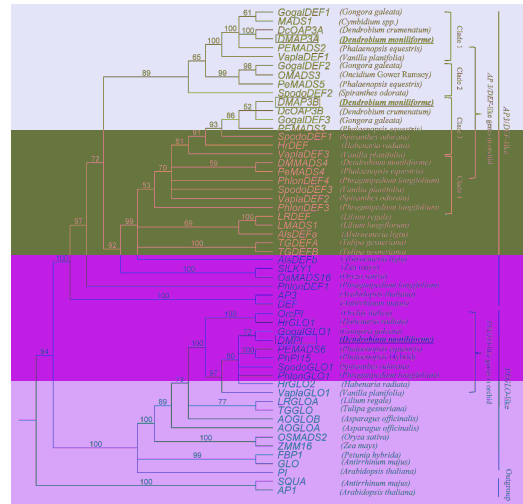


図2. クラス B 遺伝子 (DEF-like および GLO-like 遺伝子) の遺伝子系統樹。

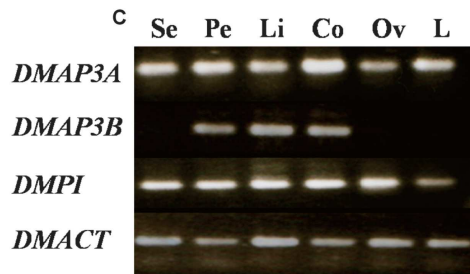


図3. RT-PCR 法によるセッコククラス B 遺伝子 (DEF-like 遺伝子) の発現解析。

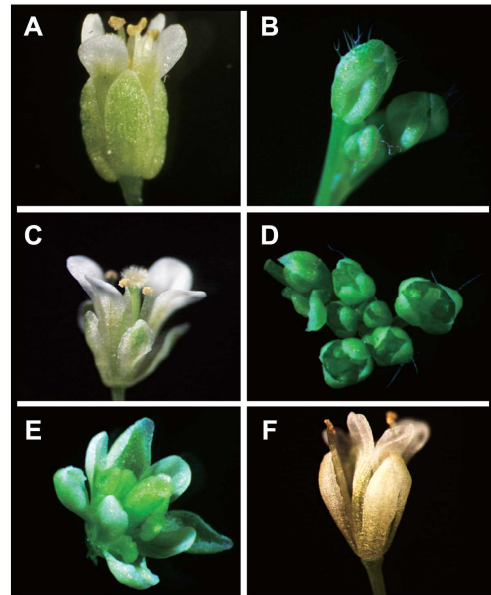


図4. セッコククラス B 遺伝子のシロイヌナズナ形質転換体。A. 野生型。B, C. 35S::DMPI の花。D, E, F. 35S::DMAP3B/35S::DMPI の花。

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1件)

(1) Supatida Sirisawat, Hiroshi Ezura, Naoya Fukuda, Takahiro Kounosu, Takashi Handa, 査読有, Acta Horticulturae 836 巻, 2009 年, 259-264

[学会発表] (計6件)

(1) Supatida Sirisawat, Naoya Fukuda, Hiroshi Ezura, Takashi Handa, 23rd EUCARPIA Symposium, 2009 年 9 月 3 日, ライデン (オランダ)

(2) A. Kanno, M. Endo, S. Y. Kim, 4th International Symposium on Diversity and Conservation of Asian Orchids, 2008 年 12 月 13 日, 国立科学博物館筑波実験植物園

(3) S. Sirisawat, N. Fukuda, H. Ezura, T. Handa, 4th International Symposium on Diversity and Conservation of Asian Orchids, 2008 年 12 月 13 日, 国立科学博物館筑波実験植物園

(4) 菅野明, 金昭英, 遠藤都子, 園芸学会平成 20 年度秋季大会, 2008 年 9 月 27 ~ 28 日, 三重大学

(5) Supatida Sirisawat, 福田直也, 半田 高, 園芸学会平成 20 年度春季大会, 2008 年 3 月 28 日, 東京農業大学農学部 (神奈川)

(6) Supatida Sirisawat, 福田直也, 半田 高, 名古屋国際蘭会議 2008, 2008 年 3 月 13 日, ナゴヤドーム (名古屋)

[図書] (計1件)

(1) A. Kanno and S. Y. Kim, Nova Science Publishers, Inc., 「Plant Breeding」, 2009, 313-323 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・大学院園芸学研究科・教授

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