

機関番号：81202
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21780028
 研究課題名(和文) 高温による花器官発達抑制の分子生物学的解析
 研究課題名(英文) Suppression of floral development in high temperature condition
 研究代表者
 中塚 貴司(NAKATSUKA TAKASHI)
 財団法人岩手生物工学研究センター・細胞工学研究部・主任研究員
 研究者番号：60435576

研究成果の概要(和文): リンドウ花卉で発現している6個の B-class MADS box (*GsDEF1*~*3*, *GsGLO1*~*3*) 遺伝子を単離した。*GsGLO2* は、*GsDEF1* または *GsDEF2* とタンパク質間相互作用し、その強度が低温条件において10倍以上に増加することが明らかになった。*GsGLO2* と *GsDEF1* または *GsGLO2* と *GsDEF2* を共発現した形質転換タバコやシロイヌナズナでは、萼が花卉様組織に変換した。しかし生体内における相互作用と温度の関係について明らかにすることはできなかった。今後は、リンドウ形質転換体を作成し、詳細に解析を行う。

研究成果の概要(英文): Six B-class MADS-box genes (*GsDEF1-3*, *GsGLO1-3*) were isolated from the petals of Japanese gentian. Yeast two-hybrid analysis showed that *GsGLO2* interacted with both *GsDEF1* and *GsDEF2*. In low-temperature condition, the interaction intensities between *GsGLO2* and *GsDEF1/2* were increased. The transgenic Arabidopsis and tobacco plants co-overexpressing *GsGLO2* and *GsDEF1/2* induced the conversion of sepal into petal-like organs, but the relationships between *in vivo* protein-to-protein interaction and temperature could not be elucidated. Now, I am producing transgenic gentian plants, and further studies will make clear these problems.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物分子育種

科研費の分科・細目：農学/園芸学・造園学

キーワード：花器官形成、高温障害、MADS-box

1. 研究開始当初の背景

近年、温暖化に伴い農業生産において高温障害が新たな問題になってきている。花き園芸においても同様で、それぞれの花き産地において従来の栽培適温よりも温暖になってきている。そのため高温障害による奇形花の発生や着色不良などは、花の品質に直接的に影響する障害であるため、今後ますます問題となってくる可能性がある。し

かし、なぜ高温が花の発達に影響を及ぼすかについてはほとんど理解されていない。花器官の高温障害の原因となる遺伝子を同定し、解析することで、栽培上の問題を回避する手がかりがつかめることが期待される。花器官の形成には、MADS box ドメインを有するタンパク質が重要であることが、シロイヌナズナやキンギョソウなどのモデル植物で明らかになっている。それら

ち花卉形成には、*B-class MADS box* 遺伝子が関与している。*B-class MADS box* は、AP3/DEF と PI/GLO の 2 つのサブファミリーで存在し、それらがヘテロダイマーを形成することで機能すると考えられている。私は、*B-class MADS box* タンパク質のヘテロダイマー形成が、温度の影響するのではないかと仮説を立て以下に示すような解析を行った。

2. 研究の目的

リンドウにおいて、高温障害の一つとして「ハチマキ」と呼ばれる花卉の中央部の着色が抑制される現象が発生している。着色が抑制されている花卉領域は、花卉の発達が部分的に抑制されているが、詳しい解析はなされていない。本研究では、花器官形成や発達に重要な *B-class MADS box* 遺伝子に注目し、温度と *MADS box* 遺伝子機能との関係性について明らかにし、高温障害の回避に向けた手がかりを見つけることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) リンドウ *MADS box* 遺伝子の単離

リンドウ品種「アルタ」の花冠から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。*B-class MADS box* 特異的な縮重プライマーを用いて、増幅を行った。増幅断片は、サブクローニング後、シーケンス解析および分子系統解析を行うことで、*B-class MADS box* 遺伝子を分類した。

(2) *B-class MADS box* タンパク質の相互作用 酵母 2 ハイブリッドシステム

リンドウ *B-class MADS-box* 間のタンパク質間相互作用を調査するために、MatchMaker 酵母 2 ハイブリッドシステム (Clonotech 社製) を用いた。*GsGLO1~3* および *GsDEF1~3* の ORF を、常法に従い pGADT7 および pGBKT7 に導入した。酵母ストレイン AH107 に様々なプラスミド組み合わせで形質転換を行い、Leu と Trp 欠損培地で選抜を行った。タンパク質間相互作用は、Ade、His、Leu、Trp 欠損培地で培養することで評価を行った。相互作用強度は、 β -グルコシダーゼ活性に基づいて定量を行った。

Split-YFP システム

植物体内でのタンパク質間相互作用を調査するために、Split-YFP 法を用いた。プラスミドは、金粒子にコーティングし、パーティクルボンバードメント (PS-100, Bio-Rad) でタマネギ表皮細胞に導入した。24 時間後、共焦点蛍光顕微鏡で YFP 蛍光を観察した。

(3) タバコ形質転換体の作出

酵母 2 ハイブリッド解析で相互作用が確認された *GsDEF1*、*GsDEF2*、*GsGLO2* について過剰発現タバコを作成した。T2 個体を獲得後、

さまざまな組み合わせで交雑することで、共発現体を獲得した。

(4) シロイヌナズナ形質転換の作出
タバコ形質転換体同様のバイナリーベクターを用いて形質転換体を作成した。

4. 研究成果

(1) リンドウ *B-class MADS box* 遺伝子の単離
リンドウ品種「アルタ」花冠をテンプレートに縮重 PCR を行った結果、14 種類の *MADS-box* 遺伝子が単離された。これらの得られた配列から、RACE-法において全長配列を決定した。系統解析の結果、6 つの *B-class MADS box* 遺伝子が得られた。*B-class MADS box* は、AP3/DEF と PI/GLO の 2 タイプが存在し、リンドウから単離したものは、それぞれ 3 個ずつであり、*GsDEF1~3*、*GsGLO1~3* と名付けた。

(2) 酵母 2 ハイブリッドによるタンパク質相互作用

アラビドプシスやキンギョソウでは、AP3/DEF と PI/GLO はヘテロダイマーを形成して機能することが知られている。そこで、リンドウから単離した *GsDEF* と *GsGLO* 間のタンパク質間相互作用を酵母 2 ハイブリッド法を用いて調査した。通常のスクリーニング条件である 30 °C で培養した場合、*GsGLO2* と *GsDEF1*、または *GsGLO2* と *GsDEF2* 間でわずかな相互作用が観察されるだけであった (図 1 A)。しかし、20 °C で培養した場合はその相互作用強度が 10 倍以上になることが示された (図 1 B)。このことは、リンドウの栽培適温においてヘテロダイマー形成が促進されることが推定される。

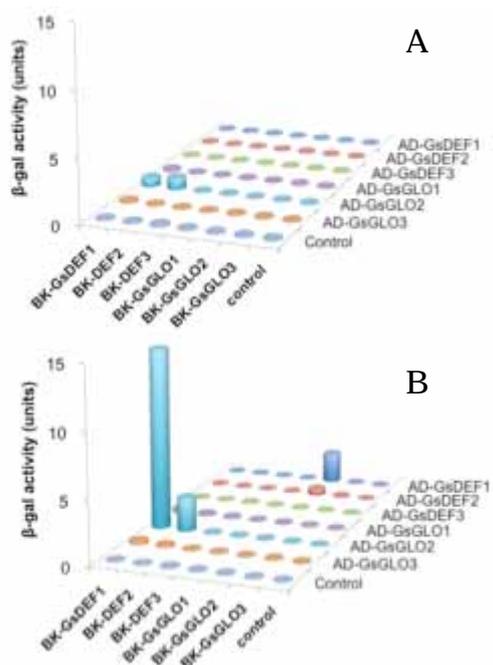


図1 酵母2ハイブリッド β -Gal 活性解析
A) 30 培養、B) 20 培養

(3) BiFC によるタンパク質間相互作用

酵母2ハイブリッド法で示されたヘテロダイマー形成が植物細胞内でも同様の結果であるかを調査するために、タマネギ表皮細胞を用いた Split-YFP 法を行った。GsDEF1 と GsGLO2 または GsDEF2 と GsGLO2 間では、相互作用を示す YFP 蛍光が核局在で観察された (図2)。その蛍光強度は、30 の高温では消失する傾向が示されたが、定量的に測定することができなかった。

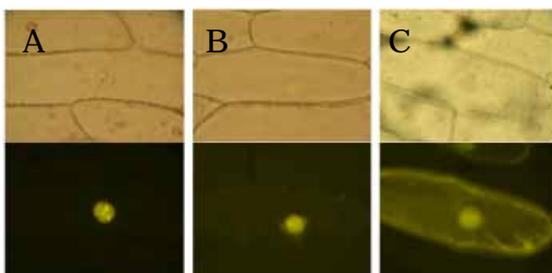


図2 Split-YFP 法

タマネギ表皮細胞を用いて、パーティクルガンで遺伝子導入を行った。上写真が可視光、下写真が青色光のもとで撮影した。

- A) GsGLO2-YC/GsDEF1-YN
- B) GsGLO2-YC/GsDEF2-YN
- C) YFP

(4) リンドウ *B-class MADS box* 遺伝子過剰発現タバコの解析

GsGLO2、GsDEF1、GsDEF2 を CaMV35S プロモーターでドライブしたバイナリーベクター

を構築し、形質転換体を作成した。GsGLO2 過剰発現タバコでは、萼の伸張が見られた。一方、GsDEF1 と GsDEF2 過剰発現タバコは、野生型と有意な差は観察されなかった。これらの T₂ 形質転換体同士を交雑して、共発現している個体を獲得した。その結果、GsGLO2/GsDEF2 共発現体では、GsGLO2 単独よりシビアな表現型になり、萼が花弁様組織に変換されていた (図3)。GsGLO2/GsDEF1 共発現体についても同様の結果ではあったが、GsGLO2/GsDEF2 共発現体よりマイルドな表現型であった。

通常タバコを栽培する 25 以外に、20 と 30 度でも栽培したが、生育速度には差は見られなかったが花冠の表現型は 25 度生育と比較して変化は認められなかった。



図3 タバコ形質転換体の表現型

左から GsGLO2 単独、GsDEF2 単独、GsGLO2/GsDEF2 共発現形質転換体の花器官。

(5) リンドウ *B-class MADS box* 遺伝子過剰発現シロイヌナズナの解析

タバコ形質転換体を作成した同様のコンストラクトで形質転換体を作成した結果、GsGLO2 過剰発現体では、萼が緩んだ表現型を示した (図4D)。一方、GsDEF1 または GsDEF2 過剰発現体では、野生型と有意な差は観察されなかった (図4B,C)。GsGLO2/GsDEF2 共発現体は、萼の花分化が観察されたが (図4F)、GsGLO2/GsDEF1 共発現体は GsGLO2 単独と同じであり、相乗効果は認められなかった (図4E)。GsGLO2/GsDEF2 共発現体の表現型は、エイジが進むに連れてシビアになる傾向が示された。



図4 シロイヌナズナ形質転換体
A) 野生型、B) GsDEF1、C) GsDEF2、D) GsGLO2、
E) GsDEF1/GsGLO2、F) GsDEF2/GsGLO2 過剰発
現体

(6)考察

今回リンドウから単離した B-class MADS box 遺伝子のうち、GsGLO2 と GsDEF1/2 間でタンパク質間相互作用し、その相互作用強度は温度によって変化することを酵母 2 ハイブリッド法によって確認することができた。タバコおよびシロイヌナズナ形質転換体を用いた解析により、GsGLO2 と GsDEF1/2 が共存することで花弁器官形成を決定することが明らかになった。ヘテロダイマーによる機能獲得については明らかになったが、植物生体内でのリンドウ B-class MADS 間のタンパク質間相互作用と温度の影響は明らかにできなかった。それは、異種モデル植物を用いた解析によるため、内在の花器官形成に関わる遺伝子の影響が拭いきれなかったためだと思われる。現在、リンドウにおいて形質転換を作出中であり、リンドウ自身を用いることで、今回明らかになった問題点が克服され、高温障害の影響の解明につながると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

中塚貴司、齋藤美沙、吉田恵理、西原昌宏、リンドウ花器官形成に關与する *MADS box* 遺伝子の解析、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 21 日、熊本大学

中塚貴司・齋藤美沙・山田恵理・木村惣一・西原昌宏、遺伝子組換えによるリンドウの多様化の可能性 花色、形態から開花期まで、植物細胞分子生物学会第 28 回大会・シンポジウム、2010 年 9 月 3 日、東北大学

齋藤美沙・中塚貴司・西原昌宏、リンドウから単離した *MADS box* 遺伝子の機能解析、植物細胞分子生物学会第 28 回大会・シンポジウム、2010 年 9 月 3 日、東北大学

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ibrc.or.jp/HPData2010/03Labo/03MoIBreeding/FFHOME/FF_Homepage.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中塚 貴司 (NAKATSUKA TAKASHI)

財団法人岩手生物工学研究センター・細胞

工学研究部・主任研究員

研究者番号：60435576