

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380018

研究課題名（和文） ラン科モデル植物シグモルキスを用いた花器官形成モデルの構築

研究課題名（英文） Molecular mechanism of floral organogenesis using orchid model plant, *Psychomorphis pusilla*.

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、シグモルキスの培養系を確立するとともに、アグロバクテリウム法による形質転換系を開発した。また、イオンビーム照射や EMS 処理を行い、突然変異体を得るための条件検討を行った。さらにシグモルキスとサギソウより、花弁形成に関与するクラス B 遺伝子の 1 つ *DEFICIENS*-like 遺伝子断片を単離した。

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 *Psychomorphis pusilla*. We also analyzed the optimal condition for mutant generation with ion beam and EMS. cDNA fragment of a floral homeotic gene, *DEFICIENS*-like gene, was isolated from *Psychomorphis pusilla* and *Habenaria radiata*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2011 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2012 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：シグモルキス，サギソウ，MADS-box 遺伝子，遺伝子単離，遺伝子発現，形質転換，突然変異体

## 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 本の柱となつて

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、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 遺伝子とクラス B 遺伝子が働いて花弁が、クラス B 遺伝子とクラス 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。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。これまで研究分担者の三位により、コチョウランの形質転換系が報告され (Sjahril and Mii 2006), また菅野が単離したコチョウランの花器官形成遺伝子 (Song et al. 2006) を形質転換したコチョウランも作出している (未発表)。しかしながら、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し、基盤研究 B (課題番号 19380016) が開始された時点で形質転換個体が得られていたものの、未だ開花に至っていない。また菅野らは、がく片が花弁化したサギソウの変異体品種を用いた遺伝解析を行っているが、サギソウは播種から開花まで2~3年を要するために現在 F1 雑種の自殖種子が得られているものの、F2 の表現型を観察するまでにさらに2~3年を要する。そのため、ラン科植物の花器官形成の分子機構解明に向けては、早期に開花し、遺伝解析も容易で、しかも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った。

## 2. 研究の目的

ラン科植物のシグモルキス (*Psychomorphis pusilla*, 図) は、フラスコ内で開花させることのできる植物として知られており、日本でもガラス容器内で培養し開花させた「マイクロフローラ」が販売されている。ゲノムサイズは 1,470Mbp でラン科植物の中では極めて小さいこと、また染色体数はラン科植物の中で最も少ない 12 本 (2n=12) であることが知られている。三位はアグロバクテリウムを用いてシグモルキスへの形質転換を試みた結果、予備的な結果ではあるが、形質転換に成功した。またフラスコ内で開花させて自殖種子が得られることから、遺伝解析にも利用できる。そこで本研究においては、このシグモルキスをラン科植物のモデルと位置づけるための実験系を組み、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ことを目的とした。



図 1. φ9cm のポット内で無菌培養し、開花したシグモルキス。

### (1) シグモルキスのモデル植物化に関する研究基盤整備

三位による予備実験では、アグロバクテリウム法を用いた形質転換によりシグモルキスへの遺伝子導入に成功している。本研究では、より効率的な形質転換系の確立を行う。また T-DNA タグラインの作出、EMS 処理による突然変異系統の作成も行う。

### (2) ラン科植物を用いた花器官形成遺伝子群および *cycloidea*-like 遺伝子の単離および発現解析

これまでシグモルキスを用いた遺伝子解析の報告はない。そこで本研究においてはシグモルキスから花器官形成遺伝子群および花の相称性に関わる *cycloidea*-like 遺

伝子の単離を試み、それらの遺伝子発現を解析する。またこれまで遺伝子単離解析に用いてきたコショウラン、デンドロビウム、サギソウにおいて、その遺伝子のオーソログ遺伝子すべてについて単離する。単離した遺伝子の発現パターンを4種のラン科植物で比較解析することにより、ラン科植物における各遺伝子の発現パターンの特異性を明らかにする。

### (3) 形質転換系および突然変異系統を用いた花器官形成遺伝子群の機能解析

上記で単離された遺伝子をシグモルキスに形質転換し、形態にどのような変異が生じるかを解析することにより、遺伝子の機能解析を行う。また花器官に変異が生じた突然変異系統を選抜し、遺伝解析による優劣性や突然変異遺伝子座の数の推定を行い、原因遺伝子を特定するとともに、遺伝子構造解析を行い、変異領域を特定する。

## 3. 研究の方法

### (1) シグモルキスのモデル植物化に関する研究基盤整備

#### ① シグモルキスの効率的 in vitro 増殖系および遺伝解析系の確立

シグモルキスの効率的 in vitro 増殖系確立のため、PLB (protocorm like body:プロトコーム様体) 培養におけるナフトレン酢酸 (NAA) と 6-ベンジルアデニン (BA) の影響を調査した。さまざまな濃度の NAA と BA を含む培地で PLB を増殖させ、それぞれの増殖率を調査することにより、NAA と BA の最適濃度を調査した。

また、シグモルキスの遺伝解析には、シグモルキス近縁種も用いることから、シグモルキス近縁種を収集するとともに、シグモルキスと近縁属ラン間での雑種判別マーカーを開発し、実際に PCR-RFLP 法での判別を試みた。

#### ② シグモルキスのアグロバクテリウム法を用いた形質転換系の開発

アグロバクテリウム接種時における無機塩の有無、プラスミドの種類および接種時間の検討を行った。得られた形質転換個体については全 DNA を抽出し、PCR によって遺伝子が導入されていることを確認した。

#### ③ シグモルキスにおける突然変異体の作出

シグモルキスを無菌播種により大量増殖

し、花芽・葉・根・PLB よりシグモルキスの変異体作成に関する実験として、変異源となる炭素イオンビーム照射ならびに EMS の処理条件を検討した。また、変異処理を行った PLB から DNA を抽出し、ISSR マーカーによる変異検出を試みた。

### (2) ラン科植物を用いた花器官形成遺伝子群および *cycloidea*-like 遺伝子の単離および発現解析

シグモルキスの花芽から全 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。

同様にサギソウの花芽から作成した cDNA プールを鋳型にして、DEF-like 遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR を行い、新規 DEF-like 遺伝子断片を単離した。さらに遺伝子特異的配列を用いて野生型と獅子咲き変異品種「飛翔」の花芽における遺伝子発現パターンを比較解析した。

## 4. 研究成果

### (1) シグモルキスのモデル植物化に関する研究基盤整備

#### ① シグモルキスの効率的 in vitro 増殖系および遺伝解析系の確立

シグモルキスの効率的 in vitro 増殖系確立のため、PLB (protocorm like body:プロトコーム様体) 培養におけるナフトレン酢酸 (NAA) と 6-ベンジルアデニン (BA) の影響を調査した。その結果、NAA に関して 0.05mg/L, 0.1 mg/L, 0.5mg/L, 1.0mg/L の4区、BA は 0.5mg/L, 1.0mg/L, 1.5mg/L, 2.0mg/L の4区において、増殖率を比較した結果、シグモルキスの PLB 培養においては、NAA 0.1mg/L, BA 1.5mg/L の添加が最も増殖を促進することが判った。また BA の 2.0区において PLB の増加率は劣ったが、他の区に比べて植物体への分化の起点となる幼原基を多く形成した。このことから、BA 2.0 条件下では PLB の増殖が抑制される代わりに植物体への分化が誘導される可能性がある。

シグモルキスの遺伝解析では、シグモルキス近縁種を収集するとともに、シグモルキスと近縁属ラン間での雑種判別マーカーを開発し、実際に PCR-RFLP 法での判別を試みた結果、近縁属 7 属 7 種との間での判別が可能となった。

②シグモルキスのアグロバクテリウム法を用いた形質転換系の開発

無機塩類を除去した培地で接種および共存培養したPLBは、共存培養後の一過的なGUS発現は通常の培地を用いた時と比べて顕著に高くなった。また、選抜開始から1ヶ月の時点では、通常の培地で接種を行ったPLBがほとんど褐変したのに対して、接種時に無機塩なしの試験区では多くのPLBが生き残っていた。しかし、これらの生き残ったPLBのほとんどは増殖せず、徐々に褐変していくことが見られ、選抜から2ヶ月後にわずかに残っていた。このことからシグモルキスは、今回使用したCaMV35Sとトウモロコシ由来のUbiquitinプロモーターではジーンサイレンシングが起きやすい可能性が高いと考えられた。

次に、無機塩除去培地を用い、プラスミドの種類および接種時間の検討を行った。その結果、従来の15分間接種に比べて3時間で接種を行ったPLBにおいて、供試した二つのプラスミド、すなわちpIG121-HmおよびpEKH2-nosNPTII-UbiGUS-35SHmとも、強い一過的なGUS発現が見られた。これに対して通常の無機塩培地を用いた場合は、3時間の接種でもわずかに一過的なGUS発現が見られるだけであった。現在、植物生長調節物質の除いた培地に移した一部のハイグロマイシン耐性PLBから、葉の形成した小植物体が確認できた。また、ハイグロマイシン耐性のPLBからDNAを抽出し、PCRを行った結果、hpt遺伝子の増幅が確認できた。またこの個体が葉枚数3-4枚程度になった段階でのGUS発現を調査した結果、出葉中の若い葉においてのみGUS発現を確認できた。

③シグモルキスにおける突然変異体の作出

炭素イオンビームでは2~50グレイの強度でPLBに照射後、ホルモンフリーのNDM固形培地に置床し30日後の生存率を観察したところ、10グレイまでは約90%の生存率で50グレイで0%となったことから、10~50グレイ間に適切な強度があると予想された。

EMSでは0.25%および0.5%水溶液でそれぞれ2時間あるいは4時間の処理を行ったところ、30日後に0.25%ではいずれの処理時間でも20~30%の生存率であったが、0.5%は2時間で20%、4時間で0%の生存率となった。

また、これらの処理を行ったPLBからDNAを抽出し、ISSRマーカーによる変異検出を試みたところ、イオンビーム照射ではグレイ数が上昇するのに伴い、変異したバンド数が増加する傾向がみられたことから、本検出法によ

るDNAレベルでの変異検出が有効であると考えられた。

(2)ラン科植物を用いた花器官形成遺伝子群および *cycloidea*-like 遺伝子の単離および発現解析

シグモルキスからは花弁形成に関与するクラスB遺伝子の1つ *DEFICIENS*-like 遺伝子断片を単離した。ラン科植物には4つのタイプの *DEFICIENS*-like 遺伝子があることが知られているが、遺伝子系統解析の結果、今回単離された遺伝子はclade 3に属する *DEFICIENS*-like 遺伝子であることが分かった。

サギソウに関しては、ラン科植物から単離された *DEF* 様遺伝子 cDNA 配列を基に作成したプライマーを用いてPCRを行い、これまで単離されている *HrDEF* 遺伝子の他に新たに2つの *DEF* 様遺伝子を単離した。系統解析の結果、この2つの遺伝子はclade 1とclade 4に分類され、Kimらによって単離された *HrDEF* はclade 3に分類されたため、clade 1の遺伝子を *HrDEF-C1*、clade 4の遺伝子を *HrDEF-C4* と名付け、*HrDEF* は *HrDEF-C3* へと改名した。

サギソウの3つの *DEF* 様遺伝子の発現パターンを野生株と‘飛翔’とで比較するため、RT-PCRとリアルタイムPCRを用いて発現解析を行った。その結果、野生株では *HrDEF-C1* はすべての器官で、*HrDEF-C3* はがく片以外の器官で、*HrDEF-C4* は花弁とずい柱で発現が検出された。発現量は、*HrDEF-C1* と *HrDEF-C3* は花弁で、*HrDEF-C4* はずい柱で最も高かった。他のラン科植物における発現解析と比較すると、clade 1の遺伝子の発現量が花弁で高く、唇弁で低いことには一致するが、clade 3, 4の遺伝子の発現量が花弁で低く、唇弁で高いことには一致しなかった。獅子咲き品種‘飛翔’における発現解析の結果、*HrDEF-C1* と *HrDEF-C3* はすべての器官で、*HrDEF-C4* は花弁とずい柱で発現が検出された。すべての遺伝子で花弁における発現量が最も高かった。野生株と‘飛翔’における発現パターンを比較すると、*HrDEF-C1* と *HrDEF-C3* の発現に違いが見られた。すなわち、*HrDEF-C1* の発現量が野生株のがく片よりも‘飛翔’の花弁化したのがく片の方が高くなっており、*HrDEF-C3* は野生株のがく片では発現が全く検出されなかったのに対し、‘飛翔’の花弁化および唇弁化したのがく片で発現が検出された。この結果より、*HrDEF-C1* はがく片の花弁化に、*HrDEF-C3* ががく片の花弁化・唇弁化に関与している可能性が示唆された。

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)

1. 菅野 明, 査読無, ランの花を遺伝子で語る～サギソウを例に. *Orchid* 51 巻, 2012 年, 28-31

2. Takamiya, T., T. Handa, T. Yukawa et al., 査読有, Identification of *Dendrobium* species used for herbal medicines based on ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence. *Biol. Pharm. Bull.* 34 巻, 2011 年, 779-782

3. Song, I. J., T. Fukuda, S. M. Ko, T. Ito, J. Yokoyama, H. Ichikawa, Y. Horikawa, T. Kameya, A. Kanno and H. Y. Lee, 査読有, Expression analysis of an *APETALA1/FRUITFULL*-like gene in *Phalaenopsis* sp. 'Hatsuyuki' (Orchidaceae). *Hort. Environ. Biotechnol.* 52 巻, 2011 年, 183-195

4. Kim, S. Y., M. Endo and A. Kanno, 査読有, Production of intraspecific hybrids between wild-type and petaloid-sepal cultivars in *Habenaria radiata*. *Scientia Horticulturae* 124 巻, 2010 年, 415-418

5. Sirisawat, S., H. Ezura, N. Fukuda, T. Kounosu and T. Handa, 査読有, Ectopic expression of an *AP3*-like and a *PI*-like genes from 'Sekoku' orchid (*Dendrobium moniliforme*) causes the homeotic conversion of sepals to petals in whorl 1 and the suppression of carpel development in whorl 4 in *Arabidopsis* flowers. *Plant Biotechnology* 27 巻, 2010 年, 183-192

6. De Keyser, E., V. Scariot, N. Kobayashi, J. De Riek and T. Handa, 査読有, Azalea phylogeny reconstructed by means of molecular techniques. *Methods Mol. Biol.*, 589 巻, 2010 年, 349-364

[学会発表] (計9件)

1. Chin, D. P., Matsuda, H. and Mii, M., Agrobacterium-mediated transformation of *Psychomorphis pusilla*. The 11th Asia Pacific Orchid Conference. 2013年02月02日～2013年02月04日, 沖縄

2. R. Hayashi, M. Endo, A. Kanno, Expression analysis of paralogous *DEFICIENS*-like genes in the floral organs of *Habenaria radiata* (Orchidaceae). 10th International Congress on Plant Molecular Biology, 2012年10月21日～2012年10月26日, Jeju, Korea

3. T. Kodama and T. Handa, Effects of NAA and BA on PLB growth of *Psychomorphis pusilla*. International symposium on orchids and ornamental plants, 2012 年 1 月 10 日, ChiangMai (Thailand)

4. 高宮知子・半田高・遊川知久他, ラン科セッコク属 *Dendrobium* 節および近縁節の網羅的分子系統解析. 第20回日本DNA多型学会学術集会, 2011年12月2日, 横浜

5. 高宮知子・半田高・遊川知久他, 石斛の基源植物(ラン科 *Dendrobium* 属)の遺伝子分類と HPLC プロファイルの相関に関する研究. 日本生薬学会第58回年会, 2011年9月24日, 昭和大学(東京)

6. 高宮知子・Pheravut Wongsawad・田島奈津子・塩田奈緒・半田高・飯島洋・北中進・遊川知久, ラン科 *Dendrobium* 属の rDNA-ITS データベースを用いた生薬「石斛」の基源植物の同定. 日本DNA多型学会, 2010年1月18日～19日, 三島市(静岡県)

7. 宮脇実桜・大澤良・半田高, SSR マーカーに基づく常緑性ツツジ九州野生集団の遺伝的構造の解明と園芸品種群との関係. 園芸学会, 2010年9月19日～20日, 大分大学

8. Akira Kanno, So-Young Kim and Miyako Endo, Morphological characteristics and genetic analysis of floral homeotic mutant in *Habenaria radiata* (Orchidaceae). 国際園芸学会, 2010年8月23日～26日, リスボン(ポルトガル)

9. Mori, T., C. Lian, R. Osawa, T. Tabuchi and T. Handa, Development of microsatellite markers in *Iris ensata* (Iridaceae). 国際園芸学会, 2010年8月23日～26日, リスボン(ポルトガル)

[図書] (計4件)

1. 半田高, 実教出版, 東京, 検定教科書「草花」, 2013年, 255 ページ

2. 半田高, 明治大学リバティーアカデミー, 東京, ランの世界, 2013年, 46 ページ

3. Abdullakasim, S. and T. Handa, Genetic transformation and analysis of protein-protein interaction of class B MADS-box genes from *Dendrobium moniliforme*. InTech, Rijeka, Current frontiers and perspectives in cell biology, 2012, 163-178ページ

4. Keyser, E., V. Scariot, N. Kobayashi and T. Handa and J. De Riek, Human Press, London, Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, 2010, 349-364 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所・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