

令和 4 年 10 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04449

研究課題名(和文) 花卉緑色化と花持ち性向上を目的とした花きの分子育種技術の開発とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular breeding of floricultural crops for greening of petals and flower life extension and their mechanisms

研究代表者

白武 勝裕 (Shiratake, Katsuhiko)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：90303586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,350,000円

研究成果の概要(和文)：アサガオ由来花卉特異的InMYB1プロモーターは、茎頂分裂組織の花弁を発生する位置情報whole2を認識するのではなく、花弁のidentityを細胞レベルで認識して作動することを明らかにした。また、InMYB1上流332-121 bに花卉特異性を規定する領域が存在することを明らかにし、この領域を3連結した改良型発現ベクターを開発した。一方、イネ由来のGPP遺伝子を用い、シロイヌナズナ、アサガオ、ペチュニアの花弁を緑色化し、花弁の形態を変化できること、前者2つの植物では花弁の老化を遅延できることを示し、これが花弁が葉のidentityを持つことによって起きることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、アサガオ由来花卉特異的InMYB1プロモーターが、花弁のidentityを細胞レベルで認識して作動すること、InMYB1上流332-121 bに花卉特異性を規定する領域が存在することを明らかにしたことは、植物生理学における学術的意義が大きい。また、このInMYB1プロモーターベースとし、花卉特異的な遺伝子発現を誘導する形質転換ベクターを開発し、アサガオやペチュニアの花を緑色化すると共に、花弁の老化を遅延できることを示したことは、花きの分子育種の発展に大きく貢献するものであり、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Petal specific InMYB1 promoter from morning glory functions recognizing petal identity at cell level, but not whole2 position in shoot apical meristem. In the upstream region of InMYB1, the 332-121 b upstream region contains cis-element, which defines petal identity. We produced the vector harboring 3 repeats of the 332-121 b upstream region of InMYB1 for molecular breeding of floricultural crops. GPP gene from rice can induce greening, morphological change and life extension in the petals of Arabidopsis, morning glory and petunia. These changes caused by addition of leaf identity to petals.

研究分野：園芸生理・生化学

キーワード：花卉緑色化 花持ち性向上 花形変化 分子育種 オミクス

## 1. 研究開始当初の背景

花きの消費を拡大するためには、今までにない色や形の花き品種の作出や、鑑賞期間の長い花き品種の作出が必要であり、その一つのアプローチが遺伝子組換え技術の活用である。遺伝子組換え作物を食べることに対する消費者の拒否反応が大きい一方で、青いバラをはじめとする遺伝子組換え花きに対する消費者の目は好意的であり、日本国内で唯一栽培されている遺伝子組換え作物は花き(青いバラ)である。

最近の花きの消費動向として、白や緑などの淡い色の花が好まれる傾向にある。花弁を緑色化する遺伝子がいくつか報告されているが、それらのほとんどは花器官形成に関わる ABC モデルの遺伝子 (MADS box 遺伝子) であり、花弁がガクや葉に近い形態に変化するため、鑑賞価値を持つものは皆無である。研究代表者の白武らは、白色のシロイヌナズナの花弁を、花弁らしさを保ったまま緑色化するタンパク質 (GPP\*) を見出した。GPP は花弁を緑色化するだけでなく、花弁の形を変化させる働きや、花弁の寿命を延長する働きも持っている。

一方、花きの分子育種には、花の形質を改変するための遺伝子のみならず、花器官で特異的に遺伝子発現を誘導するプロモーターが必要である。研究代表者の白武らは、双子葉植物で広く機能する花弁特異的なプロモーター (*InMYB1* プロモーター) の開発に成功した。

本研究では、花弁を緑色化する GPP と花弁特異的な *InMYB1* プロモーターを活用して、花きの分子育種を試みることに加え、GPP や *InMYB1* プロモーターの機能を明らかにすることを目標とした。

\*このタンパク質が F-box Protein に相同性を持つことから、申請時は F-box protein Green Petal (FGP) と呼んだが、タンパク質構造を精査した結果、このタンパク質は F-box domain を持たないことが明らかとなったため、Green Petal inducible Protein (GPP) に名称を変更した。

## 2. 研究の目的

前述のように、花きの分子育種 (遺伝子組換え) を行うためには、花の形質を改変する遺伝子のみならず、花弁特異的に遺伝子発現を誘導するプロモーターが必要である。研究代表者の白武らは、双子葉植物で広く機能する、花弁特異的なプロモーター (*InMYB1* プロモーター) を見出しており、本研究では、*InMYB1* プロモーターの花弁特異的な作動メカニズムの解明に取り組んだ。すなわち、*InMYB1* プロモーターは、何を認識して花弁特異的な作動を行うのか (茎頂分裂組織の花弁を発生する位置情報 *whole2* を認識するのか、あるいは分化後の花弁の *identity* を認識するのか) を明らかにし、そして、*InMYB1* プロモーターの花弁特異性を決定する領域

(シス配列) の特定を試みた。さらに、この特定した花弁特異性を決定する領域を用いて、オリジナルの *InMYB1* プロモーターよりも遺伝子発現の能力が高い、強化型花弁特異的な発現ベクターを構築した。

一方、研究代表者の白武らが見出した、白色のシロイヌナズナの花弁を、花弁らしさを保ったまま緑色化し、花弁の形の変化や花の寿命の延長を誘導するタンパク質 (GPP) を用い、アサガオ、トレニア、ペチュニアなどで、緑色の花弁を持ち、花弁の形が変化し、そして花持ちが良い花きの分子育種を試みた。さらに、GPP の発現により、なぜ花弁が緑色化し、形態が変化し、花の寿命が延長するのかのメカニズムの解明にも取り組んだ。

## 3. 研究の方法

(1) *InMYB1* プロモーターの花弁特異的な領域の絞り込みおよび強化型花弁特異的な発現ベクターの構築:

*InMYB1* 上流 1 kb の領域を、約 100 b ずつ削っていく (deletion し)、これをレポーター遺伝子 *GUS* の直上に連結して、シロイヌナズナに形質転換した。そして、得られた形質転換シロイヌナズナの花弁の *GUS* 染色および RT-PCR による *GUS* mRNA の定量により、プロモーター活性を評価した。

上記の deletion 実験の結果に加え、EST database から 5' 非翻訳領域 (5' UTR) を特定し、*InMYB1* 上流で花弁特異的な遺伝子発現を規定する領域を特定した。

絞り込んだ *InMYB1* プロモーターの花弁特異性を規定する領域を 3 連結し、TATA 配列と  $\Omega$  配列を連結し (*InMYB332b*  $\times$  3: TATA:  $\Omega$ )、これを上述と同様に *GUS* の直上に接続してシロイヌナズナに形質転換し、プロモーター活性を評価した。

(2) *InMYB1* プロモーターの作動機構の解明:

*InMYB1* プロモーターが、茎頂分裂組織の花弁を発生する位置情報 *whole2* を認識するのか、あるいは花弁分化後の細胞の *identity* を認識するのかを明らかにするために、シロイヌナズナの花器官形成の ABC モデル遺伝子の変異体 (クラス C 遺伝子 *AGAMOUS* (AG) とクラス B 遺伝子 *APETALA* (*AP*)<sub>3</sub> の変異体) ならびに形質転換体 (*PISTILLATA* (PI); *AP3*; *AP1*; *SEPARATA* (*SEP*)<sub>3</sub> 過剰発現体) に、*InMYB1* プロモーターと *GUS* を連結した配列を形質転換し、*InMYB1* プロモーターの作動を *GUS* 染色により評価した。

(3) GPP を用いた緑色花弁を持つ花きの開発:

カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター下に GPP を結合し、白花のアサガオ、トレニア、ペチュニアに形質転換し、花弁の緑色化、花弁の形態変化、花の寿命を評価した。

(4) GPP 導入による花弁緑色化のメカニズムの解明:

先行研究で得た GPP を発現させた花弁緑色化シロイヌナズナおよび、上記(3)で得た花弁緑色化アサガオについて、光学顕微鏡ならびに走査型電子顕微鏡(SEM)による花弁の表皮細胞の形状の観察、光学顕微鏡ならびに透過型電子顕微鏡(TAM)による花弁組織および花弁細胞の内部構造の観察を行った。また、花弁に含まれるクロロフィル含量とカロテノイド含量を定量した。さらに、シロイヌナズナについては、マイクロアレイ解析を実施し、GPP 導入による遺伝子発現の変化を明らかにした。

#### 4. 研究成果

(1) *InMYB1* プロモーターの花弁特異的領域の絞り込みおよび強化型花弁特異的発現ベクターの構築:

*InMYB1* 上流領域の deletion を行ったところ、403b および 332b まで削ったところで、プロモーター活性が大きく減少し、そして 200b まで削るとプロモーター活性が消失した(図1)。一方、EST database に存在する *InMYB1* の cDNA 情報から、*InMYB1* 上流 120 b は 5'UTR であることが明らかとなった。以上の結果から、*InMYB1* 上流領域に存在する花弁特異性を規定する領域は、上流 332-121 b に存在することが示唆された。

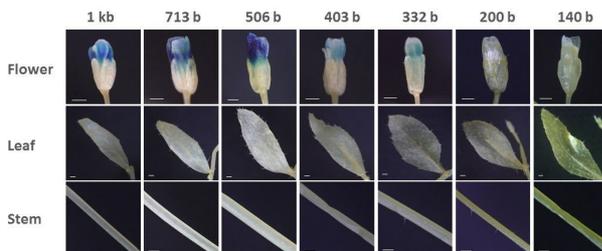


図1. *InMYB1* プロモーターの花弁特異的領域の絞り込み

この *InMYB1* 上流 332-121 b に花弁特異性を規定する領域が存在するのかを確認するために、この配列を 3 連結し、転写活性化配列 TATA と  $\Omega$  配列を連結した *InMYB332b* $\times$ 3: TATA: $\Omega$  のプロモーター活性を調べたところ、*InMYB1* 上流 1 kb の領域の約 2 倍の花弁特異的なプロモーター活性を示した。このことから、*InMYB1* 上流 332-121 b に、花弁特異性を規定する領域が存在することが明らかとなった (Azuma et al. *Plant Biotechnol.* 2018)。

この *InMYB332b* $\times$ 3:TATA: $\Omega$  をプロモーターとする発現ベクターは、花弁特異性を保ちつつ高い遺伝子発現能力を有するベクターであるため、花きの分子育種のツールとして有用である。そこで本ベクターを米国において、特許申請した (U.S. Patent 095387-0016)。

(2) *InMYB1* プロモーターの作動機構の解明:

ABC モデルのクラス C 遺伝子 *AG* を欠損したシロイヌナズナの花は、whole2 だけでなく whole3 にも花弁が形成されるが、*InMYB1* プロモーターは、whole2 だけでなく whole3 に発生した花弁においても作動した(図2)。

クラス B 遺伝子 *AP3* の温度依存的変異体は、16 で栽培すると正常な花弁が形成されるが、23 で栽培すると花弁がガク化することが報告されている (Yi and Jack 1998)。本研究では、この変異体を様々な温度条件で栽培することにより、花弁とガクの間接的な identity を持つ器官を発生させることに成功した(図2)。そして、この花弁とガクの間接的な器官において、*InMYB1* プロモーターは花弁の identity に応じてた強さで GUS 遺伝子の発現を誘導した(図2)。

PI;AP3;AP1;SEP3 過剰発現体の花は、一部が緑色のガクラしさを保ちつつ、一部の細胞が花弁の identity を持つ白色の細胞に変化したガクを発生させた(図2)。このガクにおいて、*InMYB1* プロモーター活性を調べたところ、緑色のガクラしい細胞ではプロモーターが機能せず、白色の花弁の identity を持つ細胞において作動した(図2)。

以上の結果から、*InMYB1* プロモーターは、茎頂分裂組織の花弁を発生する位置情報 whole2 を認識するのではなく、花弁の identity を認識して作動しており、それは器官や組織レベルではなく、細胞レベルで花弁の identity を認識して作動していることが明らかとなった (Azuma et al. *Plant Biotechnol. J.* 2016, Azuma et al. *Plant Cell Physiol.* 2016)。

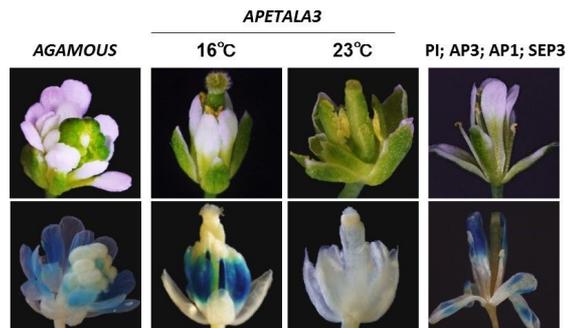


図2. *AGAMOUS*, 温度依存的 *APETALA3* の機能変異体, PI;AP3;AP1;SEP3 過剰発現体の花の表現型と *InMYB1* プロモーターの作動

(3) GPP を用いた緑色花弁を持つ花きの開発:

GPP は白色のシロイヌナズナの花弁を緑色化するだけでなく、花弁の形状を丸くし、そして長角果が大きく成長しても、花弁が老化しないという形質を示す。そこで、GPP を実用花きで発現させ、花弁の緑色化、花弁の形態変化、そして花持ち性の延長が可能かを検証した。

GPP をアサガオで発現させると、花弁の緑色化、花弁の形態変化(先が尖るキキョウ咲きとなった)、そして開花している時間が

半日から1日半へと長くなった。

一方、トレニアで GPP を発現させても、顕著な表現型の変化を観察できなかった。

さらに、GPP をペチュニアで発現させたところ、花弁の緑色化と花弁の形態変化（花弁の皺が深くなる）が観察されたが、花の寿命に顕著な差は見られなかった。

以上から、全ての花きではないが、GPP は実用花きにおいても、花弁の緑色化、花弁の形態変化、花持ち性の延長を行うことが可能であることが明らかとなり、その内容の特許申請を行った（特願 2018-073960）。

（4）GPP 導入による花弁緑色化のメカニズムの解明：

GPP は花弁を持たないイネ由来のタンパク質であり、その機能は全く明らかにされていない。GPP 導入植物では、花弁の緑色化、花弁の形態変化、花持ち性の延長といった表現型が観察されたが、なぜこのような形態変化が生じたのであろうか？本研究では、これらの表現型の発生メカニズムの解明に取り組んだ。

花弁の表皮の形態観察を行ったところ、真上から見た場合、野生型で円形の花弁の表皮細胞の形が、GPP 導入植物の緑色化した花弁では、葉の表皮細胞のようにジグソーパズルのようになり、気孔が形成されていた。また、横方向から花弁の表皮細胞を観察すると、野生型では円錐形の表皮細胞の形が、平たくなり葉の表皮細胞のように変化していた。ガクの表皮細胞の形態の比較を行ったが、GPP 導入植物の花弁の表皮細胞は、ガクの表皮細胞とは形態が異なっており、葉の表皮細胞の形態に近いことが分かった。

花弁の内部構造を観察したところ、GPP 導入植物の緑色化した花弁には、ラメラ構造が発達した葉緑体が発達しており、葉緑体の中にデンプン粒が存在した。この結果から、GPP 導入植物の花弁には、光合成活性を持つ葉緑体が存在することが示された。また、花弁に含まれるクロロフィル含量と葉緑体型のカロテノイド含量を定量したところ、これらが野生型植物の花弁にほとんど含まれないのに対し、GPP 導入植物の緑色化した花弁に多く含まれることが明らかとなった。

さらに、シロイヌナズナの花弁について、マイクロアレイ解析を実施したところ、GPP 導入植物の緑色化した花弁では、光合成や葉緑体に関わる遺伝子（葉緑体形成のマスター因子 *GLK* など）の発現、気孔形成のマスター因子 *STOMAGEN* などの発現が高く、逆に、クロロフィル分解の鍵酵素である *NYC* やサイトカイニン分解酵素 *CKX* の遺伝子発現が低下しており、葉緑体やクロロフィルの維持に関わる遺伝子の発現が高いことが示された。

以上の結果から、イネ由来の GPP は、双子葉植物で発現させることにより、花弁の identity を残しつつ、花弁に葉の identity を加

えることによって、表皮細胞の性状の変化、気孔の形成、光合成能力を持つ葉緑体の発達を誘導することにより、花弁の緑色化や花の寿命の延長を引き起こしているものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Azuma M., Oshima Y., Sakamoto S., Mitsuda N., Ohme-Takagi M., Otagaki S., Matsumoto S. and Shiratake K. (2018) Dissecting promoter of *InMYB1* gene showing petal-specific expression. *Plant Biotechnol.* 35, 243–248. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.18.0529a 査読有

白武勝裕 (2018) ゲノム編集による作物育種。バイオテック東海。82号 8 - 13. 査読無

Azuma M., Mitsuda N., Goto K., Oshima Y., Ohme-Takagi M., Otagaki S., Matsumoto S. and Shiratake K. (2016) *InMYB1* promoter functions petal-specifically by recognizing petaloid cell identity. *Plant Cell Physiol.* 57: 580–587. DOI: 10.1093/pcp/pcw017 査読有

Azuma M., Morimoto R., Hirose M., Morita Y., Hoshino A., Iida S., Oshima Y., Mitsuda N., Ohme-Takagi M. and Shiratake K. (2016) A petal-specific *InMYB1* promoter from Japanese morning glory: a useful tool for molecular breeding of floricultural crops. *Plant Biotechnol. J.* 14: 354–363. DOI: 10.1155/2016/3101864 査読有

〔学会発表〕(計13件)

白武勝裕。ゲノム編集による作物育種～現状・問題点・これから～。NPO 法人東海地域生物系先端技術研究会 平成 30 年度第 1 回セミナー。2018 年 6 月 14 日  
白武勝裕。園芸学研究は新しい生物学の流れをどう取り入れて発展して行くべきか。園芸学会平成 30 年度春季大会小集会「次世代の園芸研究を見据えた先端ゲノム研究(第 5 回)」。2018 年 3 月 23 日

関口なつみ、大島良美、白武勝裕、佐々木克友、光田展隆。花器官特異的プロモーターを用いた花き新形質を誘導する転写因子の探索。平成 30 年度園芸学会春季大会。2018 年 3 月 24 - 25 日

Katsuhiko Shiratake。Dynamic Vacuoles in Plants 2017。第 58 回日本植物生理学会年会シンポジウム。2017 年 3 月 16 - 18 日  
白武勝裕、東未来、森本玲奈、森田裕将、星野敦、飯田滋、大島良美、坂本真吾、光田展隆、高木優、後藤弘爾。アサガオ由来花弁特異的 *InMYB1* プロモーター。第 9 回アサガオ研究集会。2017 年 3 月 4 日 - 5 日

関口なつみ、大島良美、白武勝裕、佐々

木克友, 光田展隆. 花卉特異的プロモーターと転写因子を用いた新形質花きの開発. 平成 29 年度園芸学会春季大会. 2017 年 3 月 19 - 20 日

白武勝裕. 緑色の花きを作成する分子育種. 第 4 回メタポローム勉強会. 2017 年 2 月 11 - 13 日

白武勝裕. 果樹・果菜・花きの品質向上を目指した分子基盤研究. 農学中手の会・第 2 回研究集会. 2016 年 11 月 10 - 11 日

東未来, 白武勝裕. 花きの分子育種に有効な花卉特異的プロモーターの開発とその作動機構の解明. 花色研究会. 2016 年 3 月 29 日

東未来, 森本玲奈, 猫橋茉莉, 森田裕将, 星野敦, 飯田滋, 大島良美, 坂本真吾, 光田展隆, 高木優, 後藤弘爾, 白武勝裕. アサガオ由来花卉特異的 *InMYB1* プロモーターの作動機構の解明. 第 57 回日本植物生理学会年会. 2016 年 3 月 18 - 20 日

白武勝裕. 花卉特異的プロモーターと緑花作出のバイオテクノロジー ~ 花卉の identity とは? ~. 第 3 回メタポローム勉強会. 2016 年 2 月 13 - 15 日

堀川あゆ美, 小田桃子, 山満千尋, 大宮あけみ, 市川裕章, 太田垣駿吾, 松本省吾, 白武勝裕. 花色変化を目指した花卉の分子育種. 平成 27 年度園芸学会秋季大会. 2015 年 9 月 26 - 28 日

東未来, 太田垣駿吾, 松本省吾, 白武勝裕. 花卉特異的 *InMYB1* プロモーターの花卉特異的発現誘導機構の解明 第 5 報: *InMYB1* プロモーターの多様な環境下における花卉特異性の検証. 平成 27 年度園芸学会秋季大会. 2015 年 9 月 26 - 28 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: 植物形質調節剤  
(花の寿命延長, 花卉の形, 花卉の緑色化を誘導する遺伝子)

発明者: 白武勝裕, 小田桃子, 堀川あゆ美, 牧野治子

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2018-073960

出願年月日: 2018 年 4 月 6 日

国内外の別: 国内

名称: A petal-specific *InMYB1* promoter from Japanese morning glory: a useful tool for molecular breeding of floricultural crops

発明者: Katsuhiko Shiratake, Mirai Azuma

権利者: 同上

種類: 特許

番号: U.S. Patent 095387-0016

出願年月日: 2016 年 9 月 15 日

国内外の別: 海外

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~hort/shira/top/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白武 勝裕 (SHIRATAKE, Katsuhiko)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・

准教授

研究者番号: 90303586

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし