

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07657

研究課題名(和文) キクにおける集合花の分化および花器官の多様性付与に関わる転写因子の同定

研究課題名(英文) Identification of transcription factors regulating differentiation of a compound flower and/or diversification of floral traits in chrysanthemum

研究代表者

佐々木 克友 (SASAKI, Katsutomo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・上級研究員

研究者番号：60469830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、キクに見られる集合花の分化および花器官の多様性付与に関わる転写因子の解析を目的とした。転写因子の中でも、花器官に重要な働きをもつABCEモデルの転写因子に着目した。ABCEモデルの転写因子(MADS-box)遺伝子の内、クラスAおよびクラスC転写因子について重点的に解析を行った。クラスA転写因子については、機能抑制タイプの組換え体において、花弁や花全体のサイズが小さくなる形態変化が見られた。クラスC転写因子については、キクでは2タイプの転写因子が見られ、この2タイプの機能を同時に抑制した結果、集合花全体において全ての雄蕊および雌蕊が花弁様化した個体が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キク科植物の花は数百もの小花が集まり一つの花のように見える集合花であり、イネ等のモデル植物の花序と大きく異なる。キクは古くから慣れ親しまれる花である一方で、その集合花の分化あるいは花器官形成や花の形の多様性に関する情報に乏しい。本研究では、遺伝子の発現を制御する転写因子に着目して研究を進めた。本研究により、クラスAおよびC転写因子の機能を抑制することで、キクの花器官の形質に多様性を付与させることが可能であることが示された。学術的に特定の転写因子の機能が解明されただけでなく、これまでに見なことの無い新品種のキクが、今後、分子育種で育成される可能性も示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have analyzed functions of transcription factors (TFs) to reveal the differentiation of floral organs and addition of diversity in floral traits in a compound flower of chrysanthemum. Among the plant TFs, MADS-box TFs in the ABCE model were focused. Suppression of a class-A function reduced the size of petals and flower heads in transgenic chrysanthemum plants. Chrysanthemum have two types of class C TFs, and simultaneous suppression of these two class-C functions caused petaloid-stamens and -carpels in transgenic chrysanthemum plants in a whole flower head.

研究分野：園芸学

キーワード：キク 転写因子 花器官 キメラリプレッサー 花

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) キク科植物の花は数百もの小花が集まり一つの花のように見える集合花であり、シロイヌナズナ等のモデル植物の花序と大きく異なる。キク科植物は、キクやヒマワリ等を含み身近な植物として親しまれる一方、その集合花の分化あるいは花器官形成に関する情報は殆ど得られていない。

(2) キクの頭花は、色や形が全く異なる舌状花および管状花の2種類の花で構成され(図1)単純な構造のモデル植物と比較して高度に形態形成が制御されている。キクは花き産業において最も流通量が多い最重要品目である一方、これまで集合花の形成について分子生物学的な研究が進んでおらず、舌状花(雄蕊が退化しており、本来は5枚の花弁が1枚に

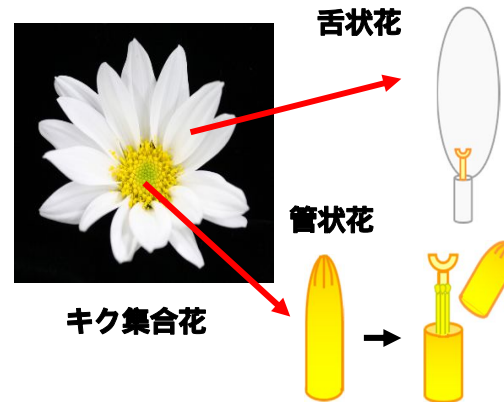


図1 キクの集合花における2種類の花

見える)と管状花(花弁が筒状になり雄蕊と雌蕊を包む)の器官形成や分化に関する情報が殆ど得られていない。

(3) 一般的に花の形態は転写因子により制御されており、当研究グループではこれまで、転写因子の花器官形成における機能の解明や、花弁に新たな形質を付与する技術の開発を目的として、夏の花壇花であるトレニアを材料に100種類程度の転写因子を導入している(Sasaki 2018; Breeding Science、総説)。これらの経験から、キクを用いて舌状花および管状花の形態制御の鍵となる転写因子を解明するための学術的な研究と同時に、花弁形成に関わる転写因子を利用した花弁に対する新たな形質(形や模様の変化)を付与する技術開発が可能という着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では6倍体の栽培ギクを用いて、以下の2つの課題に取り組む。

(1) 集合花を構成する2種類の花である舌状花および管状花の分化の鍵となる因子を明らかにする。キクのオリジナルアレイを利用した詳細なトランスクリプトーム解析により、舌状花および管状花で発現が異なり植物体では発現しない転写因子を選定する。選抜された転写因子の機能を抑制した組換えギクを観察し、分化のバランスに変化が生じる転写因子を明らかにする。

(2) 集合花の分化または花弁の形態を変化させる転写因子を単離する。

花器官の形成に影響を与える可能性がある転写因子およびトランスクリプトーム解析等により選定された転写因子をキクに導入し、花器官を詳細に観察することで舌状花および管状花の分化または器官形成に変化が生じる転写因子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 本課題では、キクの集合花を構成する舌状花および管状花の分化または器官形成の鍵とな

る転写因子を解明するため、花器官形成に関わる転写因子およびトランスクリプトーム解析により解析対象とする転写因子を選定して栽培ギクからターゲット遺伝子を単離し、これらを研究対象とする。当研究グループではこれまで、商業利用される6倍体のギクのEST情報の解読と整備に関する研究を進めており、2017年には、ギクのEST情報およびこれを用いたギクの転写因子ファミリーの分類に関する論文を報告した(Sasaki et al. 2017, BMC genomics)。また、ギクEST情報を利用したオリジナルマイクロアレイを作製しており、既にギクの各植物器官(葉、茎、雄蕊、雌蕊、舌状花弁、管状花弁など)の詳細なアレイデータの収集を終了し、現在はトランスクリプトーム解析を進めている。

(2)トランスクリプトーム解析等で選出された集合花の形成に関わる転写因子の機能を解析する手法として、CRES-T法(Hiratsu et al. 2003)およびCT法を用いる。CRES-T法は、研究対象とした転写因子に12アミノ酸を付与するだけで、解析目的の転写因子が植物内に重複して存在する場合においても転写因子機能をドミナントに抑制する簡便な手法であり、当研究グループではギクにおいても有効な手法であることを報告している(Narumi et al. 2011)。CRES-T法により作出したプラスミドは、CT法等を用いてギクに導入し、これらの花を観察して、集合花の分化または器官形成における機能を解析する。

4. 研究成果

(1)初年度は、複数の栽培品種の花器官におけるトランスクリプトーム解析を中心に行った。当研究グループの遺伝資源で維持・栽培している複数の栽培品種(計6品種)の開花後の花器官からRNAを単離し、本課題でギクモデル品種として利用する‘セイマリン’におけるEST情報(Sasaki et al. 2017, BMC genomics;本研究課題のための先行研究)によりプローブ作成を行った。これを利用してオリジナルマイクロアレイ(180k)を作成し、トランスクリプトーム解析を行った。シロイヌナズナでは、転写因子は1726 loci存在する(Jin et al. 2017, NAR)。一方、‘セイマリン’では、6996コンティグ、2375クラスター(6倍体のため、遺伝子配列が類似した複数のコンティグまたはアレルが存在するため、TBLASTNにおけるE-valueが $1.0e-100$ 以下のコンティグを機能が類似したクラスターとしてまとめた)存在することが明らかとなった。そこで、オリジナルマイクロアレイでは、多数遺伝子のプローブ(180k)を用いてトランスクリプトーム解析を行うのと同時に転写因子の発現に着目して解析を行った。

(2)トランスクリプトーム解析と平行して、花器官形成に重要と思われるABCモデルに関して、ギクの花器官で発現の強いクラスAP2遺伝子(クラスA)のキメラリプレッサー(AP2-SRDX)および、miRNAによる制御を受けないmAP2-ox(過剰発現)の‘セイマリン’への導入を進めた。さらに、セイマリンの花器官で発現が強いギククラスC遺伝子として2種離のを単離し(タイプ1およびタイプ2)、機能の抑制を目的として2タイプのクラスC機能を同時に抑制するためのキメラリプレッサーベクターを作成した。これらのベクターを用いて組換え体の作出と花器官の観察を進めた。AP2-SRDX組換え体については、花弁や花全体のサイズが小さくなる形態変化が見られたが、mAP2-ox組換え体については形態変化が見られなかった。一方、ギククラスC

キメラリプレッサー組換え体については、過剰発現型の 35S プロモーターではほとんど形態変化が見られなかったが、雄蕊雌蕊器官特異的プロモーター（図 2）を利用することで部分的な生殖器官の形態変化、舌状花弁の開裂、花弁の矮小化、頭花における舌状花や管状花のバランスの変化等、複数の形態変化が観察された。

(3) 2 種類のクラス C キメラリプレッサーを導入した組換え体について詳細な調査を進めた。キク由来の花器官特異的プロモーターを用いて 2 種類のキメラリプレッサーを同時にキクに導

入した結果、花器官において複数の形態変化が観察されたが、さらにこれらの個体の中から、管状花の雌蕊および管状花の雄蕊および雌蕊の全ての生殖器官が花弁様化した個体が得られた(図 3)。

(4) 花弁様化した雄蕊および雌蕊について遺伝子発現解析を行った結果、全ての花弁様化雄蕊および雌蕊に関して、内在のクラス C 遺伝子 2 種類の発現が見られなかった。また電子顕微鏡を用いて細胞の形状を観察した結果、全ての花弁様化雄蕊および雌蕊について、花弁と同様の形状の細胞が観察された。これらの結果から、キク由来の花器官特異的プロモーターを用いた 2 種類のキメラリプレッサーを同時にキクに導入することで雄蕊雌蕊を花弁化することが可能であることが明らかになった。また興味深いことに、舌状花および管状花のバランスに変化はなく、舌状花および管状花の分化には他の因子が必要であることが明らかになった (佐々木ら、論文投稿準備中)。

(5) 本研究により、キク由来の転写因子クラス A およびクラス C キメラリプレッサーを導入すること

で、キクの花器官の形質を変化させ、花に多様性を付与させることが可能であることが示された。

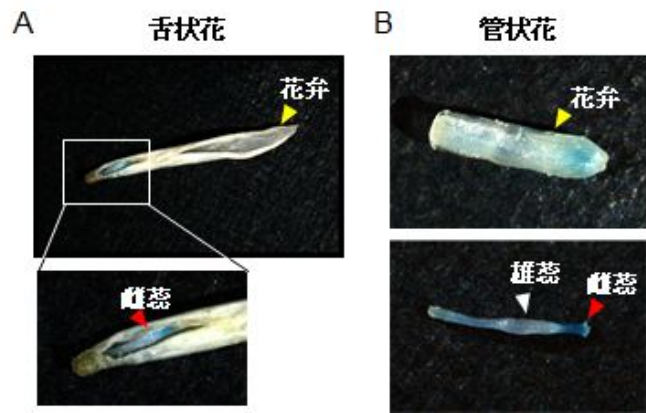


図 2 雄蕊雌蕊器官特異的プロモーターの GUS 解析 (A) 舌状花における雌蕊 (赤矢印) 特異的な発現。(B) 管状花における雄蕊 (白矢印) および雌蕊 (赤矢印) 特異的な発現。

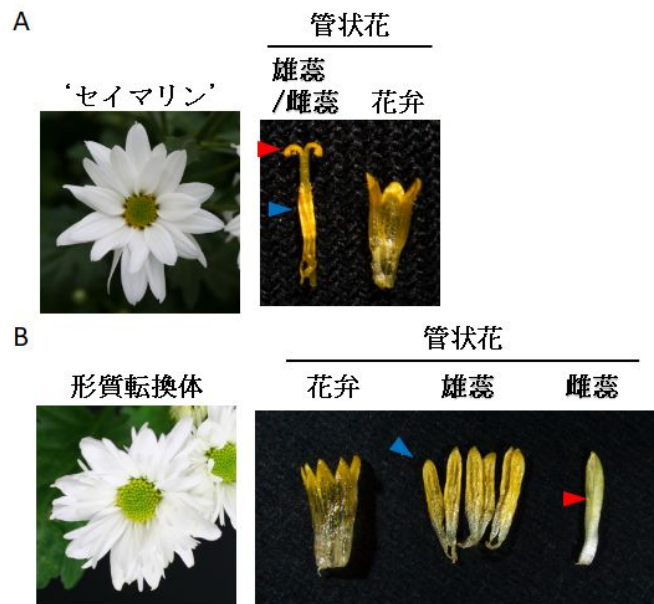


図 3 2 種類のキククラス C タンパク質機能を同時に抑制した組換え体。(A) 栽培品種野生型 'セイマリン' (B) 2 種類のクラス C キメラリプレッサーを導入した組換えキク。雄蕊 (青矢印) および雌蕊 (赤矢印) が花弁化している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----