

平成21年5月1日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006年～2008年
 課題番号：18380019
 研究課題名（和文） マイクロアレイを用いた花の有用形質を制御する遺伝子群の解析
 研究課題名（英文） Genomics of floral genes using a microarray
 研究代表者
 安藤 敏夫（ANDO TOSHIO）
 千葉大学・園芸学研究科・教授
 研究者番号：30026588

研究成果の概要：ペチュニアの2野生種を用いた雑種の蕾で発現している遺伝子のうち、重複のない2,976遺伝子を単離し、マイクロアレイを作成した。これを用いて、花冠の縁が緑色になる野生突然変異を解析したところ、緑色部分と通常の花冠で光合成関連遺伝子の発現量が異なった。これは花冠縁部の花器官化と葉器官化の決定を調節する転写因子が突然変異の原因であることが示唆された。さらに、原因遺伝子 *FBP2* を特定し、トランスポゾンの挿入によることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：花卉園芸学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

マイクロアレイとは、数千から数万種類の遺伝子をスライドガラスの上にスポットしたDNAチップを用いて、網羅的かつ一度に多数の遺伝子の発現をモニターできる実験技術である。スポットする遺伝子としてcDNAを用いる場合、cDNAマイクロアレイと呼ぶ。cDNAマイクロアレイはその有用性から多くの研究者および企業から注目されているが、その作成に大きな投資を必要とすることから、現在植物で一般に利用できるマイクロアレイは、モデル植物であるアラビドプシスと重要作物であるイネに限られてい

る。

ペチュニアは、キンギョソウと並ぶ数少ない花卉のモデル植物であり、世界の多くの研究者が主に分子生物学的な研究にペチュニアを使っている。研究代表者は、原生地南アメリカを中心としてペチュニア野生遺伝資源を収集してきた。その一環としてペチュニアの花に発現している遺伝子の完全長cDNAマイクロアレイを研究分担者（児玉）とともに作成してきた。

本研究の全体構想は、研究代表者が17年かけて収集して作り上げたペチュニアの野生遺伝資源群と、研究分担者が蓄積したマイ

クローアの作成および解析のノウハウとを活用して、観賞価値に深く係わる花の色彩、芳香、形態と、その育種に係わる自家不和合性など、園芸的に有用な花の形質を制御している遺伝子群を明らかにするものであり、世界にも類のない研究である。また、本研究の成果をふまえて、将来的に日本の花卉研究者が共有できるツールとしてこのcDNAマイクロアレイを開放していく構想である。これらのリソースは園芸学の基盤としての価値が非常に高い。

2. 研究の目的

野生遺伝資源コレクションの中には花冠の一部が葉あるいはガクへと逆戻りした突然変異株、本来合弁花なのに花冠に切れ込みが入り、あたかも離弁花であるような表現型を示す突然変異株、花冠に縞模様を表す突然変異株があり、本研究ではcDNAマイクロアレイを利用してこれらの突然変異の原因となっている遺伝子を明らかにすることを主な目的とする。

花冠であるために必要とされる遺伝子、および分類上も重要な意味をもつ合弁花と離弁花の決定に関与する遺伝子を単離できれば、花の模様や形は、これらの遺伝子と色素合成系遺伝子、および形態形成遺伝子との相互作用によって決定されている可能性が高い。したがってこの研究から得られる成果は、基礎研究と産業への応用の両方において重要である。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ解析対象植物の検討

栽培中のペチュニア属植物のうち、花の色や模様が特殊な野生突然変異個体や品種を選抜し、人工交配した後代の分離比を調査し、原因遺伝子の優性劣性と関与する遺伝子数を推定するとともに、原因遺伝子をホモで保有する個体を選抜した。

(2) 花色遺伝子の発現解析

ホモ個体が選抜されたら、従来型のRNAノーザンブロット解析により色素合成遺伝子の発現を確認した。一部の園芸品種、特に野生種にない黄花、特殊な色素分布を示すモーソン系品種において同様に発現解析を行った。

(3) マイクロアレイの作成

ペチュニア品種の起源種とされる *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* と *P. integrifolia* を交配し、雑種第1代の蕾から単離したRNAより完全長cDNAライブラリーを構築し、EST解析を行った。任意のcDNAクローンを解析し、重複のないcDNAクローンからcDNAマイクロアレイを作製した。

(4) 対象植物のマイクロアレイ解析

FBP2 遺伝子の変異により花冠縁部が葉化した *P. inflata* (green corolla segment、以下、GCS 変異体) と野生型 *P. inflata* の蕾の花冠縁部より TriZOL (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit (Amersham) を用いて cDNA 合成と同時に蛍光色素によるラベリングを行い、CyScribe GFX Purification Kit (Amersham) を用いて精製した。cDNA をアレイ膜に 65°C でハイブリダイズさせた。発現程度は ScanAlyze を用いて解析した。

(5) 原因遺伝子の解析

突然変異の原因遺伝子の候補をクローニングし、塩基配列を決定してその原因を解明した。

4. 研究成果

(1) *Petunia inflata* の GCS 変異体と野生型の F₁ は野生型の表現型を示し、F₂ で野生型 : GCS = 3:1 に分離した。従って、GCS 変異体は単一の劣性遺伝子によることが判明した。また、*P. integrifolia* の淡色野生変異個体(B1197b)を固定し、市販 44 品種と交配し、F₁ の表現型を観察した。ペイン系品種との後代はすべてペインか、ペインと単色が 1:1 に分離した。また、1 品種について F₂ の分離比が単色 : ペイン=3:1 に分離した。以上から、B1197b のもつ淡色遺伝子と品種のペイン遺伝子が同一であり、これらの形質が単一劣性遺伝子支配であることが明らかになった。

(2) 野生種の白花は制御遺伝子 *An2* の変異による可能性が高いが、市販品種の白花では原因が異なることが予想されている。これもマイクロアレイで解析する予定であったが、品種と *P. axillaris* subsp. *axillaris* の白花の違いを含有成分と既知の色素合成遺伝子の発現から研究した。花冠の含有成分は品種が有機酸であったのに対し、*P. axillaris* ではフラボノールであった。このことから品種では合成系の上流で変異が起きていることが予想された。既知の色素合成遺伝子の発現を調べると、品種では CHS-A と CHS-J が抑制されていたが、*P. axillaris* では CHS-J のみが抑制されていた。さらに詳しく調べたところ、品種では CHS-A の siRNA が蓄積しており、市販白花品種はサイレンシングによって CHS-A の発現が抑制されていることが判明した。

(3) 任意の cDNA クローン 7001 種の EST 解析により 611 群の関連した遺伝子と 2976 種の固有 cDNA クローンを選抜した。このうち、1098 の高度に保存された EST では機能を推定した。こうして得られた重複のないクロー

ンから cDNA マイクロアレイを作製した。

作成したマイクロアレイの有効性を調査するため、蕾をステージごとに採集し、RNA を抽出して解析したところ、112 の機能を推定した遺伝子で開花直前に発現量が増加した。アントシアニン合成系やタンパク分解に関係する遺伝子もこれらに含まれたため、このマイクロアレイがペチュニアの開花に関する遺伝子の発現解析に有効であることが示された。

(4) GCS 変異体の緑色花冠縁部と花冠中部または野生型のがくとの間において、発現量の差 (fold change) が 2 倍以上あった遺伝子は合計 111 個であった (図 1)。

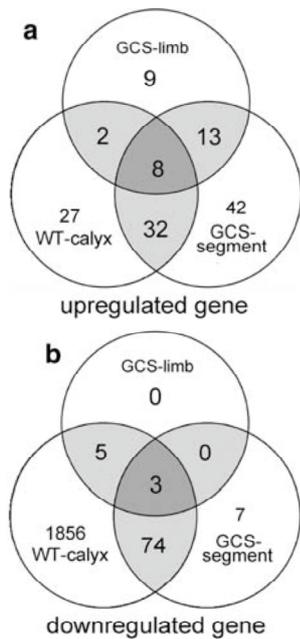


図 1 GCS 変異体の花冠縁部 (GCS-segment)、花冠中部 (GCS-limb)、野生型のがく (WT-calyx) の間で発現量に差がある遺伝子数

アレイにスポットされている光合成関連遺伝子が GCS 変異体でのみ顕著に増加した。特に最も発現の差があった遺伝子は光合成関連遺伝子 ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase のホモログで 10 倍以上の相対的発現量が増加した。以上の結果から、GCS 変異体は花冠縁部の花器官化と葉器官化の決定を調節する転写因子機能の損失による可能性が示唆された。

(5) 電子顕微鏡で観察すると、GCS 変異体の花冠縁部は、気孔をもつなど葉に近い構造をしていた (図 2)。(4)の結果を踏まえて、過去に発表された論文から GCS 変異体の原因遺伝子となりうる遺伝子を検索したところ、E クラス MADS-box に属する *FBP2* 遺伝子の変異が GCS 変異個体に似た表現型を引

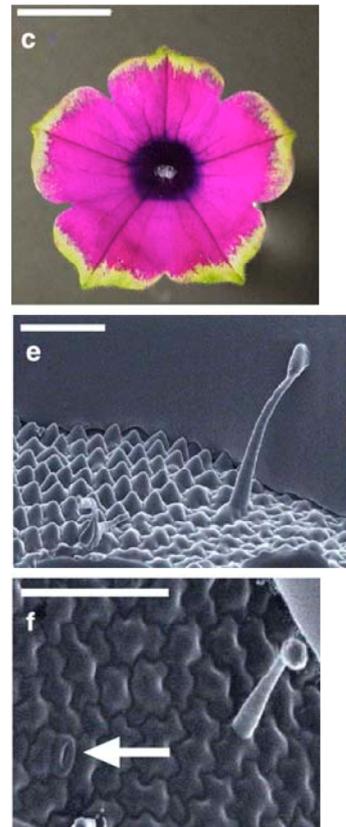


図 2 GCS 変異体の花冠の構造
c: 花冠正面図、縁部の緑色部分が GCS-segment、赤紫の部分が GCS-limb (バー=10mm)、e: segment (手前) と limb (奥) の境界 (バー=100 μm)、f: segment の正面図、矢印は気孔 (バー=100 μm)

き起こすことが分かった。そこで、GCS 変異個体の *FBP2* 遺伝子をゲノム DNA からクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、第 2 イントロンに *spm* 様の新規トランスポゾンが挿入されており、これを *dPifTp1* と名付けた (図 3)。エクソンの配列は正常な遺伝子と同じであったことから、このトランスポゾン挿入によって *FBP2* の転写が抑制されていることが示唆された。

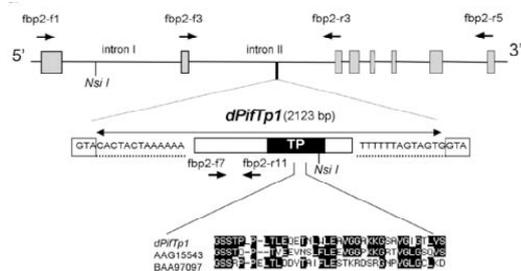


図 3 GCS 変異個体のゲノム *FBP2* の構造

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2件)

- ① Matsubara, K., K. Shimamura, H. Kodama, H. Kokubun, H. Watanabe, I. L. Basualdo, T. Ando, Green corolla segments in a wild *Petunia* species caused by a mutation in *FBP2*, a *SEPALLATA*-like MADS box gene, *Planta*, 228, 401-409, 2008, 査読あり
- ② Shimamura, K., T. Ishimizu, K. Nishimura, K. Matsubara, H. Kodama, H. Watanabe, S. Hase, T. Ando, Analysis of expressed sequence tags from *Petunia* flowers, *Plant Science*, 173, 295-500, 2007, 査読あり

[学会発表] (計4件)

- ① 毛井智子、佐々木秀典、小泉真佑子、松原紀嘉、立澤文見、児玉浩明、安藤敏夫、ペチュニア属の野生種と品種の白花の成因、園芸学会平成21年度春季大会、2009年3月19日、明治大学駿河台キャンパス(東京都千代田区)
- ② 西村一馬、佐々英徳、ペチュニア花部・花粉・花粉管における EST 解析、日本植物学会第71回大会、2007年9月8日、東京理科大学(千葉県野田市)
- ③ 松原紀嘉、島村克好、児玉浩明、渡辺均、國分尚、安藤敏夫、cDNA マイクロアレイを用いた *fbp2* 遺伝子変異体の解析、園芸学会平成19年度春季大会、2007年3月24日、京都テルサ(京都市)
- ④ Matsubara, K., K. Shimamura, H. Kodama, H. Watanabe, H. Kokubun, T. Ando, Leaf-like morphogenesis caused by mutation of *Fbp2* gene, The 8th World *Petunia* Days, 2006年10月12日、アメリカ合衆国フロリダ州ジャクソンビルビーチ

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 敏夫 (ANDO TOSHIO)
千葉大学・園芸学研究科・教授
研究者番号:30026588

(2) 研究分担者

児玉 浩明 (KODAMA HIROAKI)
千葉大学・園芸学研究科・准教授
研究者番号:30026588

佐々 英徳 (SASSA HIDENORI)
千葉大学・園芸学研究科・准教授
研究者番号:30026588

(3) 連携研究者

なし