

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19580033

研究課題名（和文）

キクにおける外来花成関連遺伝子の発現に関する研究

研究課題名（英文）

Study on gene expression of introduced *Arabidopsis* flowering genes in *Chrysanthemum*.

研究代表者

深井 誠一 (FUKAI SEIICHI)

香川大学・農学部・教授・

研究者番号：80228858

研究成果の概要（和文）：

栽培キク神馬及び二倍体野生キクキクタニギクを用い、アラビドプシスから単離した *CCA1*, *CO*, *FT*, *LKP2*, *TOC1* 各遺伝子を導入した形質転換体を作成した。*FT*形質転換体神馬及びキクタニギクで長日の *in vitro* 条件下で花成が誘導されたが、他の遺伝子の形質転換体では野生型と同様栄養状態を保った。*FT*形質転換体は花成と栄養生長を繰り返す宿根草特有の花成パターンを示し、用いたデュアルプロモーターの特性により、下位節でより強い花成誘導が見られた。また *FT*形質転換体の花成は、光の有無、培地の糖濃度に関わりなく誘導された。

研究成果の概要（英文）：

Greenhouse chrysanthemum (*Zinba*) and diploid wild chrysanthemum (*Chrysanthemum boreale*) were transformed with several floral induction and circadian clock genes (*CCA1*, *CO*, *FT*, *LKP2*, *TOC1*). Only *FT* transformed plants showed *in vitro* flowering. The *FT* transformed plants repeated vegetative- and reproductive- growth. The floral induction appeared stronger in the one-node explant derived from lower positions of stock *FT* transformed plants, due to expression characteristics of Pmas dual promoter. Floral induction of *FT* transformed chrysanthemum was appeared regardless light conditions and sucrose levels in the medium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：花園芸学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：キク、花成、遺伝子、*FT*

## 1. 研究開始当初の背景

キクはわが国で最も重要な花きである。現

在わが国のキク生産は、基本的に日長をコントロールすることにより周年生産体系が確

立している。昨今の原油高は、より低温開花性のキクを、また温暖化等の異常気象は高温耐性のキクを要求している。これらの諸問題の解決には、環境調節だけでは限界があり、より高度な遺伝資源の活用（品種育成）が必要である。このためにはどうしても花成の基本的かつ高度な理解が必要であり、遺伝子レベルでの花成の解明が不可欠である。近年のモデル植物を用いた花成の遺伝子レベルでの解明は大きく進展し、フロリゲンの実態が、FT タンパクであることが明らかになった。こうしたモデル植物での知見が、有用植物で日長反応が最もクリアなキクでどの程度まで適応できるのかを明らかにすることは、きわめて重要な課題である。

## 2. 研究の目的

本研究は、アラビドプシスから分離した花成関連遺伝子をキクに導入し、その発現と働きを明らかにする事を目的としている。このため *FT*, *CO* 遺伝子形質転換神馬を用いてその花成の様相および光環境の影響等を明らかにする。また二倍体キクタニギクを用いて同様の形質転換体を作成し、その花成の様相を明らかにする。さらにこうした外来花成遺伝子の発現と花成の様相との関連を明らかにする。以上の研究を通して、宿根草であるキクの花成の特徴を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 概日時計および花成制御関連遺伝子の導入

材料に用いた秋ギク品種神馬およびキクタニギクの無菌植物は、 $38\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 16 時間日長,  $24^\circ\text{C}$  の条件下で、ハイポネックス培地（粉末ハイポネックス 3g/l, ショ糖 20g/l, 寒天 8g/l）で継代培養した。上位 4 枚の展開葉から約 4mm 四方の葉片を切り出し外植体とした。

培地はムラシゲスクーグ培地に BA 0/5mg/l, NAA 1.0mg/l, ショ糖 30g/l, ジェランガム 3g/l 添加した培地を基本培地とした。共存培地は、基本培地にカザミノ酸 1.0g/l 添加、除菌培地はカルベニシリン 500mg/l 添加、選択培地は G418 20mg/l, カルベニシリン 250 または 500mg/l 添加した。

アグロバクテリウム AGL0 系統を用い、バイナリーベクター pBIK201G にアラビドプシスから単離した *CCA1*, *CO*, *FT*, *LKP2*, *TOC1* 各遺伝子と *NPTII* 遺伝子を挿入して形質転換を行った。キクタニギクではこの内 *FT*, *CO* についてのみ形質転換を行った。なおこのバイナリーベクターは mas デュアルプロモーターを持ったものである。LB 培地で約 5 時間震盪培養したバクテリウムけん濁液を O. D. 660 約 0.1~0.2 に調整しアセトシリシリン 50 $\mu\text{M}$ , Tween 20 を加えて接種液とした。およそ 30 分間葉片を浸漬しその後共存培地上に 3 日間

暗黒で培養し、その後明条件下で除菌培地で 7 日間、さらに選択培地に移植して培養を継続してシュート再生を促した。不定芽原基を思われる部分を外植体から切り離し、選択培地の空いている部分におく方法で、選抜のシュートの生長を同時に進行させた。ここで生長したシュートは、PCR で形質転換体かどうかを確認した。

得られた転換体は、ハイポネックス培地で節挿しをしながら増殖・維持した。また一部の個体については順化し、P1P 温室内で深夜 4 時間の光中断を与えた長日条件下で栽培した。

### 3-2. FT 転換体の花成の特性

#### 3-2-1. FT 転換体の軸上の花成の勾配と FT 遺伝子発現

In vitro で継代培養した *FT* 形質転換体を使用し、栄養成長を示す (V) シュートと、花芽分化した (R) シュートを一節ごとに切り分け、部位を明確にして培養した。さらに V シュートの節から発生した栄養成長を示した (V-V) シュート、花芽分化を示した (V-R) シュート、R のシュートの節から発生した栄養成長を示した (R-V) シュート、花芽分化を示した (R-R) シュートとし、先と同様一節ごとに切り分け、部位を明確にして培養した。さらに発生した腋芽由来の若いシュートから抽出した total RNA を用いて real time PCR を行い、*FT* 導入遺伝子とその下流で機能する花芽形成関連遺伝子 *CDM111* (AP1 ホモログ) の遺伝子発現を調査した。

#### 3-2-2. FT 転換体における導入 *FT* 遺伝子発現量の経時的変化と花芽分化の関係

栄養成長を示す (V) シュートの上位節と下位節、花芽分化した (R) シュートの上位節と下位節をそれぞれ一節ごとに切り分け、部位を明確にしてハイポネックス培地に置床し、腋芽由来のシュートにおいて、葉が 4 枚展開したときに上位から 3 葉目を採取した。以降、3 葉展開毎に上位から 3 葉目を採取した。腋芽由来のシュートが花芽分化した場合、その時点での第 3 葉を採取し、花芽分化しない場合、継代 40 日後で終了とした。採取した葉から抽出した total RNA を用いて real time PCR を行い、導入 *FT* 遺伝子発現量の経時的な変化を調査した。

さらに継代 40 日後の非形質転換体および上記と同様の *FT* 形質転換体の V シュート、R シュートを使用し、各シュートの上位葉、中位葉、下位葉から抽出した total RNA を用いて real time PCR を行い、導入 *FT* 遺伝子発現解析を行い、導入 *FT* 遺伝子発現量から *Pmas* dual プロモーターの性質について検討した。

### 3-3. FT 転換体の開花に及ぼす光の影響

*FT* 転換体および野生株の中、下位節から得

たシュートを用い、葉を1, 2, 3枚付けた外植体を調整し、マジエンダボックスに4本ずつ植え付けた。

R/FR比が20.6のFL40SPG(以下PG)と1.0のFL40SFRP(以下FR・R)の2種類の蛍光灯下および暗黒下において花芽分化までの日数と展開様数を計測した。観察は移植後50日まで行った。

### 3-4. FT 転換体の開花に及ぼす培地の糖の影響

花芽分化していないFT転換体の中、下位節から得たシュートを用い1枚の葉を持つ外植体を調整した。これをマジエンダボックス当たり4外植体植付けた。培地はハイポネックス培地にショ糖0, 1, 2, 3, 4, 5%添加したものをを用いた。同時に培養室の日長を16時間(長日)と8時間(短日)として両区へそれぞれマジエンダボックス2個ずつにおいて花成を比較した。

### 3-5. FT 転換体の接ぎ木

In vitroの植物を用いFT転換体を台木にして野生型の神馬を穂木に、またを野生型の神馬を木にしてFT転換体を穂木にした接ぎ木を行った。接ぎ木後はマジエンダボックスに再び植え付け、長日条件下で培養した。

## 4. 研究成果

### 4-1. 概日時計および花成制御関連遺伝子の導入

キクへ導入を試みた5つの遺伝子 *CCA1*, *CO*, *FT*, *LKP2*, *TOC1* すべてで、形質転換体獲得出来た。形質転換効率は、3.4~16.8%であった。

得られた形質転換体は、ハイポネックス培地で節培養により増殖し、16時間日長下で培養維持した。この中でFT形質転換体では、ハイポネックス培地に移植後間もなく *in vitro* で花成が確認された。頂芽が花芽となり、下位の腋芽が栄養生長をして再び頂芽が花芽分化した。花芽分化するシュートは全体的に葉が丸みを帯びるように変化した。なお他の遺伝子による形質転換体は野生株と同様に栄養状態を維持し続けた。

キクタニギクでも同様にFT転換体で花成が誘導され、*in vitro* で開花したが、CO転換体では花成は確認できなかった。またFT転換体キクタニギクはほとんどの液芽で花成誘導が起こり、数回の継代培養後に栄養芽が形成されなくなり、枯死した。

順化したFT形質転換体神馬は、頂芽がすぐに花になり下位から栄養芽が伸びて花芽分化するものと順化時のシュートがしばらく伸長し頂芽及び上位の液芽が順次花になるものに別れた。いずれも下位から栄養芽が伸長し、株全体が枯れることはなかった。(以

下すべての結果は神馬を用いたものである。)

順化個体の花の形態は、外観は野生株と同様であったが、いくつかの小花では通常雌蕊が形成される部分が小さな花芽様になっているものが観察された。これをハイポネックス培地に置床すると花芽へと発達して開花した。

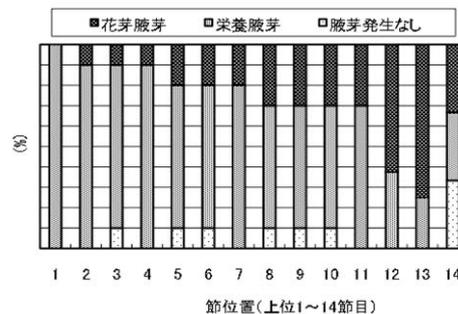
### 4-2. FT 転換体の花成の特性

#### 4-2-1. FT 転換体のキクの軸上の花成の勾配とFT遺伝子発現

培養60日後において、Vシュートは「腋芽発生なし」の割合が低く、上位節ほど栄養腋芽の割合が高く下位節ほど「花芽腋芽」の割合が高い傾向が認められた(第1図)。一方、Rのシュートでは上位節ほど「腋芽発生なし」の割合が高く、Vのシュートと同様で、下位節ほど「花芽腋芽」の割合が高い傾向が認められた。継代したV,Rいずれのシュートでも同様の傾向が認められた。

V,Rシュートの節から発生した若いシュート部において、FT導入遺伝子の発現が確認されたが、個体間差が大きく、FT導入遺伝子の発現とV,Rシュートの間に明らかな関係は認められなかった。同様に *CDM11* についても個体間差が大きく、FT導入遺伝子発現との間に相関は認められなかった。これらの原因として幼植物体の段階ではVまたはRの出現が特定できないため、発現量と花成の関係が不明瞭になったと考えられた。

第1図 Vシュートから得た異なる節位の外

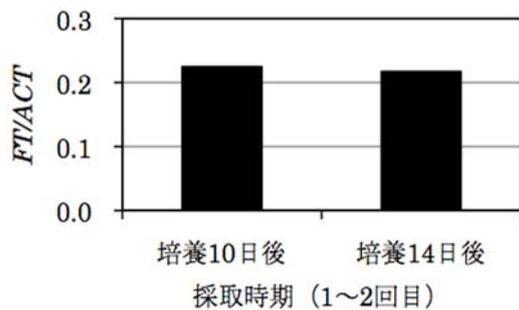


植体の花成誘導

#### 4-2-2. FT 転換体における導入FT遺伝子発現量の経時的変化と花芽分化の関係

Vシュートの上位節および下位節を用いたすべての処理区において、発生した腋芽由来のシュートは花芽分化せず、採取1回目と2回目の間で導入FT遺伝子発現量の大幅な減少が認められた。一方、Rシュートの上位節から発生した腋芽由来のシュートは花芽分化し、導入FT遺伝子発現量は維持されていた。これらのことから、FT形質転換体キクの花芽分化は、導入FT遺伝子発現量が維持されることで生じることが考えられた。

第2図 導入 *FT* 遺伝子発現量の経時的な変化



上位葉に比べ下位葉ほど導入 *FT* 遺伝子発現量が多いことが示された。これより、*Pmas dual* プロモーターは下位節ほど目的遺伝子の発現を誘導することが示唆された。このことから、*FT*形質転換体が上位節に比べ下位節から発生した腋芽由来のシュートが花芽分化しやすい要因として、*Pmas dual* プロモーターの性質が影響していることが考えられた。腋芽由来のシュートが花芽分化しない場合、生育に従い葉で導入 *FT* 遺伝子発現量が著しく減少していたことから、上位節で *Pmas dual* プロモーターの発現誘導が減少するという性質と一致していることが考えられた。一方で、花芽分化を誘導する場合、*Pmas dual* プロモーターの発現はキク植物内の何らかの性質により維持される可能性が考えられた。このため、導入遺伝子発現量の経時変化がプロモーターの性質に依存するのかわかりやすくするため、キク全身で構成的に発現する *EF1a* プロモーターを用いて調査を行う必要がある。

#### 4-3. *FT* 転換体の開花に及ぼす光の影響

PG および FR・R の光源の違いによる花成の程度に顕著な差異は認められなかった。光源 PG のもとで、新たに形成されたシュートの花芽分化までの葉数は、葉数 0 枚節から 3 枚節まで順に 13.0, 12.3, 11.8, 9.3 枚であり、花芽分化までの日数は同様の順で 32.3, 25.0, 28.2, 19.7 日であった。すなわち外植体の葉の数が多いほど新たなシュート上の葉枚数は少なく花芽分化までの日数は少なくなった。しかし、外植体に付いていた葉枚数を加算すると、葉数 0 枚節から 3 枚節まで順に 13.0, 13.3, 13.8, 12.3 枚と差はほとんどなく、花芽分化するまでに約 13 枚の葉が必要ということもできた。

暗黒条件下でも葉数 0 枚節から 3 枚節までの区でも花成が誘導された。また光条件下に比べて新たに形成されたシュート上の花芽分化までの葉枚数は、葉数 0 枚節から順に 5.3, 4.4, 3.7, 3.9 枚とかなり少なかった。一方花芽分までの日数は、葉数 0 枚節から順

に 42.0, 38.4, 38.7, 42.6 日であり、光条件下より全体に長い日数を要した。

以上の結果より、*FT* 転換体の花成誘導に光は絶対的な影響を及ぼさないものと判断された。

#### 4-4. *FT* 転換体の開花に及ぼす培地の糖の影響

いずれのショ糖濃度区でも日長条件区でも花成が誘導された。

長日ショ糖 1% 区で花芽分化するまで平均 29 日、葉枚数 10.3 に対し、ショ糖 5% 区では 19.3 日、8.6 枚であった。またシュートのボリュームは培地のショ糖濃度が高いほど大きかった。

以上のことより *FT* 転換体の花成誘導は培地のショ糖により直接左右されることはなく、植物体の生長を促進することで間接的に花成を促進するものと考えられた。

#### 4-5. *FT* 転換体の接ぎ木

*FT* 転換体を穂木にした場合も台木にした場合も野生型神馬シュートに花成は誘導されなかった。接ぎ木活着面の連結が不十分であった可能性が考えられた。

### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

2. 川崎真裕・鳴海貴子・深井誠一、*FT* 形質転換ギクにおける導入 *FT* 遺伝子発現量の経時変化と花芽分化の関係、園芸学会平成 22 年度秋季大会、2010. 3. 21-22、日本大学生物資源学部

1. 川崎真裕・鳴海貴子・清末知宏・深井誠一、シロイヌナズナ *FT* 遺伝子を導入したキクの軸上の花成の勾配と *FT* 遺伝子発現、園芸学会平成 21 年春季大会、2009. 3. 19-20、明治大学

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

深井 誠一 (FUKAI SEIICHI)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：80228858

#### (2) 研究分担者

柳 智 (YANAGI TOMOHIRO)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：70221645