

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02945

研究課題名(和文) ユリを始めとする花き園芸植物において花の模様形成に関わるmicroRNAの解析

研究課題名(英文) Roles of microRNA on flower color patterning in floricultural plants including lilies

研究代表者

山岸 真澄 (Yamagishi, Masumi)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40210348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：花の模様のひとつにバイカラーがある。バイカラー発生のしくみをユリで解析した。ユリの花でアントシアニン生合成を調節しているMYB12の蓄積量は白い部分で有意に減少していた。一方でmicroRNAの一つmiR828が花弁の白い部分で優先的に蓄積していた。このmiR828はMYB12のmRNAを選択的に切断すること、その後さらにMYB12 mRNAを細かく分解していることが分かった。白い部分で特異的に蓄積したmiR828が、MYB12の発現を抑制してアントシアニン生合成を阻害したと考えられた。microRNAが花の模様形成に関わっていることを示すのは本研究が初めてである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1) 花に模様ができるしくみとしてこれまでに主に、転写因子による空間特異的な転写調節、トランスポゾンの転移、CHS遺伝子のPost-Transcriptional Gene Silencingの3つが知られているが、microRNAによる模様形成は全く新しいしくみである(このしくみは花のモデル植物でも報告されていない)。(2) バイカラー形成の遺伝的背景が明らかになり、今後のユリ育種の効率化に寄与する。(3) microRNAが関与する現象は環境の影響を受けやすいとされており、温度などにたいするmicroRNA蓄積量の変化を明らかにすれば、模様の大きさを一定にする栽培条件の改良につながる。

研究成果の概要(英文)：Some Asiatic hybrid lily cultivars develop bicolor tepals, which consist of anthocyanin-pigmented upper halves and un-pigmented lower halves. MYB12 positively regulating anthocyanin biosynthesis is downregulated in the lower halves. Since the lily MYB12 mRNA harbored a binding site for microRNA828 (miR828), the involvement of miR828 in variable spatial accumulation of MYB12 transcripts was evaluated. In the bicolor tepals, mature miR828 was more highly accumulated in the lower halves than in the upper halves, and miR828-directed cleavage of MYB12 transcripts was observed predominantly in the lower halves. Moreover, the cleavage triggered the production of secondary siRNA from MYB12 transcripts, and the siRNAs were accumulated predominantly in the lower halves. Consequently, miR828 suppressed MYB12 transcript accumulation in the white region, and the miR828/MYB12 module participated in the development of bicolor patterns in lily flowers.

研究分野：園芸科学

キーワード：花の模様 microRNA アントシアニン 遺伝子発現制御 R2R3-MYB PTGS

1. 研究開始当初の背景

花に現れるさまざまな模様は消費者を魅了する重要な形質のひとつである。模様ができる遺伝的なしくみが明らかになれば、花の品種改良や、模様の形や大きさを均一にする栽培技術の確立に役立つと期待され、花き園芸に大きく貢献できる。模様ができるしくみとしてこれまでに、(1)トランスポゾンの転移による斑入り(アサガオなど)、(2)アントシアニン生合成遺伝子のひとつ **CHS** の、転写後遺伝子サイレンシング (**PTGS**) によっておこるバイカラー(2色の染め分け)、(3)アントシアニンを生合成する遺伝子の発現を調節している転写因子による花弁内の部位特異的な色素合成、が明らかにされてきた。最後のしくみは、アントシアニン生合成は **R2R3-MYB** 転写因子によって制御されているが、植物はこの **R2R3-MYB** を複数持ち、複数ある **R2R3-MYB** は発現する場所やタイミングが異なるために、これらの転写因子の組合せによって色素が貯まる場所や濃さが異なり、その結果模様となるもので、ペチュニア、ミゾホオズキなどのモデル植物で明らかにされている。いまのところ模様をつくる最も普遍的なしくみであろうと考えられている。

申請者はこれまでユリ (*Lilium spp.*) を用いて模様ができるしくみを解析してきた。ユリはアントシアニン生合成を促進する **R2R3-MYB** 転写因子を複数持ち、このうち **MYB12** は花弁全体で色素を合成し、**MYBSPL** はしぶき状の斑点を誘導し、**MYB15** は蕾の光のあたる部位だけに着色を誘導し、**MYB18** を持つと花弁の基部に大きな斑点が現れることを明らかにした。

ユリ花弁に認められる模様のひとつに、花弁の上部にアントシアニン色素が溜り(赤くなる)下部には溜まらない(白くなる)バイカラーがある。申請者は先行する科研費研究において、ユリでバイカラーが発生する原因を検討した。次世代シーケンズを用いる **RNA-seq** で、花弁の赤い部分と白い部分で発現している遺伝子を網羅的に解析したところ、白い部分では全てのアントシアニン生合成遺伝子の発現が赤い部分の **1/10** 程度にまで低下していたことより、ユリのバイカラーは生合成遺伝子の転写調節によると考えた。その一方でアントシアニン生合成遺伝子の発現を調節している **R2R3-MYB** 転写因子は、**MYB12** のみが強く発現しており、それ以外で発現の強いものはなかった。一方、**MYB12** は白い部分で赤い部分の **1/2** 程度にしか発現が低下しておらず、**MYB12** の発現差だけで生合成遺伝子の発現レベルの違いは説明できなかった (**Suzuki K, Suzuki T, Nakatsuka T, Dohra H, Yamagishi M Matsuyama K, Matsuura H (2016) RNA-seq-based evaluation of bicolor tepal pigmentation in Asiatic hybrid lilies (Lilium spp.). BMC Genomics, 17: 611.**)。これまでにユリや他の植物で明らかにされた模様を作るしくみではユリのバイカラーは説明できない。よって、生合成遺伝子の発現に影響する **R2R3-MYB** 転写因子以外の要因について検討をおこない新たな仕組みを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

microRNA は **non-coding RNA** のひとつで、おもに転写因子の働きを抑制する。本研究では、ユリをはじめとした複数の花き園芸植物を用いて、**microRNA** が花弁でバイカラーの模様をつくる原因となっていることを明らかにする。

(1) ユリのバイカラー品種を用いて **microRNA** を網羅的に解析し、着色部分と非着色部分で蓄積量に違いのある **microRNA** (候補 **microRNA**) をすべてリストアップする。

(2) 次に一過性遺伝子発現系を用いた解析などにより、これらの候補 **microRNA** の機能をユリ花弁で解析し、バイカラーの原因となっていることを証明する。

(3) 他のユリや他の花き園芸植物でも同様の解析を行い、その結果を比較することによって、バイカラー形成における **microRNA** の役割の普遍性と多様性を明らかにする。

3. 研究の方法

スカシユリ (*Asiatic hybrid lilies, Lilium spp.*) のバイカラー品種とフルカラー品種を主に用いた。他のユリや他の園芸植物を用いた解析では、エゾスカシユリ、マツバユリ、オリエンタルハイブリッドユリ、サルビア(チェリーセージ)、チューリップ、アルストロメリアを用いた。

small RNA を網羅的に解析するために、バイカラー品種ロリポップの花弁を用いて **microRNA seq** を行った。

定量的 **RT-PCR** 法で遺伝子の発現量を比較した。**microRNA** の蓄積量は **Stem-Loop PCR** 法

で評価した。

5'RACE PCR 法を改良した **RNA ligase-mediated amplification of cDNA ends (RLM-RACE)** 法を用いて **MYB12 mRNA** の 5'末端を決め、切断部位を特定した。

pre-MIR828 や **MYB12** を発現するコンストラクトを、アグロインフィルトレーション法でタバコに導入し（一過性発現） **mature** な **miR828** の蓄積や **MYB12** の発現を評価した。

4. 研究成果

ユリの花弁に蓄積している **microRNA** で、**MYB12** の抑制に関わっているものをスクリーニングしたところ、**microRNA** の一つである **microRNA828 (miR828)** が候補として浮かび上がった。**miR828** の前駆体は花弁で発現していた。**mature** な **miR828** の蓄積量は、調査した全てのバイカラー品種で花弁基部の白い部位で十分に多かったが、花弁全体が赤い **full-pink** の品種では **miR828** の蓄積は少なく、花弁の部位による差も無いことが分かった。また **MYB12** 転写因子の塩基配列に **miR828** と 2 本鎖 **RNA** をつくる領域が見つかり、2 本鎖をつくるときの自由エネルギーは **-32 kcal/mol** と十分に低かったことより（2 本鎖をつくる可能性が高い）**MYB12** は **miR828** の標的であると考えられた。

miR828 が **MYB12** の働きを直接抑制することを、タバコを用いた一過性発現で検討した。その結果、**miR828** は **MYB12** と結合する部位で **MYB12** を切断することがわかった。さらにこのサイトでの **MYB12** の切断は、ユリの花弁でも起こっていること、切断の頻度は花弁の白い部分で高いことを確認した。

miR828 による **MYB12** の抑制をさらに確認するために、バイカラーの花弁を用いて **microRNA seq** を行った。その結果、**MYB12** は結合部位で切断された後、その 3'側がさらに細かく切断されること、この切断は花弁の白い部分で活発に起こることがわかった。

以上のことより、ユリ花弁の白い部分では **miR828** が **MYB12 mRNA** と結合してその機能を転写後に抑制し、その結果アントシアニン生合成遺伝子の発現を誘導できず、色素が合成されないと結論した。

花に模様をつくるメカニズムとして、転写因子による空間特異的な転写調節、トランスポゾンの転移、**CHS** 遺伝子の **Post-Transcriptional Gene Silencing** などが知られているが、**microRNA** が花の模様形成に関わっていることを示すのは本研究が初めてである。

次に、**miR828** が関与する模様が他のユリや他の植物でも認められるかどうか検討した。原種のユリであるエゾスカシユリの花弁では（園芸種の）スカシユリ品種と同じように花弁の上半分にアントシアニン色素が溜まりバイカラーとなっていることが分かった。そこで **miR828** と **MYB12** 転写因子を調査したところ、**miR828** の蓄積と **MYB12** の発現が負に相関していることがわかった。エゾスカシユリでもスカシユリ品種と同様なメカニズムで模様が発生していることがわかった。北海道に自生するエゾスカシユリはスカシユリの成立に関わった原種のユリの一つで、花弁におけるアントシアニン着色を制御する **MYB12** 遺伝子もエゾスカシユリに由来することがわかっている。今回の結果より、バイカラーの形質もエゾスカシユリに由来する可能性が出てきた。

一方で、他のユリ（マツバユリとオリエンタルハイブリッドユリ）やチューリップ、アルストロメリア、サルビアでは、**miR828** の蓄積量が概して少なく（バイカラー品種ほど高くない）バイカラーの発生に **miR828** が関与している手がかりは得られなかった。このことは **miR828** が関与する花の模様形成はユリに特異的であることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masumi Yamagishi	4. 巻 272
2. 論文標題 MYB19LONG is involved in brushmark pattern development in Asiatic hybrid lily (<i>Lilium</i> spp.) flowers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 109570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scienta.2020.109570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masumi Yamagishi	4. 巻 250
2. 論文標題 Isolation and identification of MYB transcription factors (MYB19Long and MYB19Short) involved in raised spot anthocyanin pigmentation in lilies (<i>Lilium</i> spp.)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 153164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jplph.2020.153164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masumi Yamagishi, Moeko Sakai	4. 巻 11
2. 論文標題 The microRNA828/MYB12 module mediates bicolor pattern development in Asiatic hybrid lily (<i>Lilium</i> spp.) flowers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 590791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.590791	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kana Kurokawa, Junya Kobayashi, Keiichirou Nemoto, Akira Nozawa, Tatsuya Sawasaki, Takashi Nakatsuka, Masumi Yamagishi	4. 巻 11
2. 論文標題 Expression of LhFT1, the flowering inducer of Asiatic hybrid lily, in the bulb scales	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 570915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.570915	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keisuke Tasaki, Masumi Yamagishi, and Chikara Masuta	4. 巻 2172
2. 論文標題 Virus-induced gene silencing in lilies using Cucumber Mosaic Virus vectors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamagishi Masumi	4. 巻 260
2. 論文標題 White with partially pink flower color in <i>Lilium cernuum</i> var. <i>album</i> is caused by transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 108880 ~ 108880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scienta.2019.108880	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamagishi Masumi	4. 巻 296
2. 論文標題 High promoter sequence variation in subgroup 6 members of R2R3-MYB genes is involved in different floral anthocyanin color patterns in <i>Lilium</i> spp.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Genomics	6. 最初と最後の頁 1005 ~ 1015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00438-021-01799-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamagishi Masumi	4. 巻 in press
2. 論文標題 High temperature enhances anthocyanin coloration in Asiatic hybrid lily flowers via upregulation of the MYB12 positive regulator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Horticultural Plant Journal	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hpj.2022.05.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamagishi Masumi	4. 巻 in press
2. 論文標題 MicroRNA828/MYB12 module mediated bicolor flower development in Lilium dauricum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2503/hortj.UTD-373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
研究分担者	中塚 貴司 (NAKATSUKA TAKASHI) (60435576)	静岡大学・農学部・准教授 (13801)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------