

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23658027

研究課題名（和文）

花色と花弁の質感の改変を目指した転写因子と花弁特異的プロモーターを用いた分子育種

研究課題名（英文）

Molecular breeding of floricultural crops using a petal specific promoter and transcription factors.

研究代表者

白武 勝裕 (KATSUHIRO SHIRATAKE)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：90303586

研究成果の概要（和文）：

花弁特異的に作動する InMYB1 プロモーターが、器官の位置情報を認識しているのではなく花弁的な細胞の性質を認識していること、上流 300 b~200 b に花弁特異性を決める領域が存在することを示した。このプロモーターと転写因子を用いた新奇形質を持つ花きの分子育種の可能性を検証したところ、葉緑体の形成を誘導転写因子の過剰発現による花弁の緑色化には成功しなかったが、表皮細胞の形態形成に関わる転写因子の発現制御によりシロイヌナズナの花弁や花弁細胞の形態を変化させることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we showed that the petal specific InMYB1 promoter recognizes nature of petal cell, but not position of floral organs and that element of this recognition exists 300-200 b upstream of InMYB1. We studied possibilities of molecular breeding to create new flower characters using InMYB1 promoter and transcription factors. Although our trial to make green petal using transcription factor which induce chloroplast formation was not successful, petal morphology of Arabidopsis was successfully changed by controlling transcription factor which controls morphology of epidermal cell.

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

 キーワード：園芸学，育種学，バイオテクノロジー，花き，分子育種，  
花弁特異的プロモーター，花色改変，花弁質感の改変

## 1. 研究開始当初の背景

花きの消費が低迷する中、消費者の購買意欲をかき立てて消費を拡大するためには、今までにない新奇な花き品種を作出することが重要である。花きは食用作物に比べて、遺伝子組換えに対する消費者の拒否反応が少なく、遺伝子組換え技術により花色を改変した花きは、新しいテクノロジーが可能とした新品種として、一般消費者の注目を浴びている。

我々は花きの分子育種における強力なツールとなる「花卉特異的プロモーター」を開発した(特許出願 PCT/JP2009/067720)。本プロモーターは、花卉細胞特異的に遺伝子を発現させることができるため、他の器官における導入遺伝子の悪影響を排除できる。

一方、近年の研究から、葉緑体の形成を誘導する転写因子や、表皮細胞の形を変える転写因子が見つかるが、これらを花きの分子育種に結びつけようという発想はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、我が開発した花卉特異的プロモーターと花卉の形質を改変する可能性を持つ転写因子を組み合わせることにより、消費者の購買意欲をかき立てるような、今までにない形質の花き作出する技術を開発することを目標とした。

具体的には、花卉特異的 InMYB1 プロモーター (InMYB1pro) 下で、葉緑体の形成を誘導する転写因子を発現させて緑の花きを持つ花き作出する方法、また表皮細胞の形を変える転写因子を発現させて花卉の質感を変化させる方法を開発することを目標とした。

## 3. 研究の方法

本研究は、(1) 花卉特異的 InMYB1 プロモーターの作動の検証、(2) 葉緑体形成誘導転写因子過剰発現による花卉の緑色化、(3) 表皮細胞形態形成転写因子の発現改変による花色と花卉質感の改変、の3つから成り、以下にそれぞれの方法を示す。

### (1) 花卉特異的 InMYB1 プロモーターの作動の検証

InMYB1pro の花卉特異的作動を司る領域を特定するために、InMYB1 遺伝子の上流配列を、1000 b, 700 b, 500 b, 400 b, 300 b, 200 b, 140 b と短くし、これら配列の下流に GUS レポーター遺伝子をつなぎ、シロイヌナズナに形質転換した。形質転換体の花や花以外の器官の GUS 染色を行うことにより、それぞれの配列の花き特異性と花きにおけ

る発現強度を明らかにした。

一方、InMYB1pro が花きが発生する器官の位置情報を認識しているのか、あるいは花きの細胞の性質を認識しているかを、以下によって検証した。花の器官形成に関わる ABC モデルの遺伝子の機能が抑制されて花器官が変化したシロイヌナズナに、InMYB1 遺伝子の 1000 b の下流に GUS つないだコンストラクト(項目(1)と同じもの)を導入することで、InMYB1pro の作動を検証した。ABC モデルの遺伝子の機能が抑制されたシロイヌナズナは、温度依存性 *Apetala3* (AP3) 変異体と、AGAMOUS (AG) を CRESE-T 法 (Hiratsu et al. 2003, Plant J 34, 733) で機能抑制した形質転換体を用いた。

### (2) 葉緑体形成誘導転写因子過剰発現による花卉の緑色化

葉緑体形成を誘導する転写因子が、花卉細胞を緑色化するかを、以下の2つの方法で検証した。① 葉緑体形成誘導転写因子を恒常的発現プロモーター (CaMV35Spro) 下につないだ発現ベクターを構築し、ボンバードメント法でトルコギキョウやカーネーションなどの白色花卉に導入し、花卉細胞が緑色化するかを検証した。② 葉緑体形成誘導転写因子を InMYB1pro 下につないだアグロバクテリウム用発現ベクターを構築し、シロイヌナズナに形質転換することで、葉緑体形成誘導転写因子の発現により花卉が緑色化するかを検証した。葉緑体の分解系が働いて葉緑体が蓄積しないという危惧があり、その場合は葉緑体形成誘導転写因子の導入と共に葉緑体の分解系遺伝子を抑制することにより解決を試みた。

### (3) 表皮細胞形態形成転写因子の発現改変による花色と花卉質感の改変

表皮細胞の形状を変化させる転写因子を InMYB1pro 下での過剰発現させるための形質転換ベクターを構築した。一方、CRESE-T 法により表皮細胞形態形成転写因子の機能を抑制するための形質転換ベクター (InMYB1pro 下に表皮細胞形態形成転写因子とそれを抑制するための SRDX 配列をつないだベクター) を構築した。これらをシロイヌナズナおよびトルコギキョウに形質転換し、表皮細胞形態形成転写因子を過剰発現あるいは発現抑制した時の、花や花の表皮細胞の形態変化を、実体顕微鏡あるいは走査型電子顕微鏡下で観察することで検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 花卉特異的 InMYB1 プロモーターの作動の検証

InMYB1 遺伝子の上流配列を, 1000 b, 700 b, 500 b, 400 b, 300 b, 200 b, 140 b と短くした場合, 500 b 以上では GUS 染色が安定的かつ花卉特異的であったが, 400 b, 300 b と短くするに従って, 花卉特異性は保たれたものの, 染色は弱くなり, 200 b 以下では全く染色が見られなくなった. この結果から, InMYB1pro の花卉特性を決定している領域が, 300 b~200 b に存在することが明らかとなった.

一方, 温度依存性 AP3 変異体と AG を CRES-T 法で機能抑制した形質転換体における InMYB1pro の作動を検証したところ, 温度依存性 AP3 変異体で花卉がガク化した場合には作動せず, AG を CRES-T 法で機能抑制した形質転換体で本来の花弁以外に発生した花卉様器官では作動することが明らかとなった. この結果から, InMYB1pro は, 花弁が発生する器官の位置情報を認識しているのではなく, 花卉的な細胞の性質を認識していることが明らかとなった.

##### (2) 葉緑体形成誘導転写因子過剰発現による花卉の緑色化

① 葉緑体形成誘導転写因子を CaMV35Spro 下につなぎ, ボンバードメント法でトルコギキョウやカーネーションなどの白色花弁に導入したところ, 希に緑色の細胞が観察されたが, 多くの場合で緑色化した細胞が観察されなかったため, 観察された細胞は元々の花弁に存在していたものの可能性が高いと考えられた.

② 葉緑体形成誘導転写因子を InMYB1pro 下につなぎ, シロイヌナズナに形質転換したところ, 蕾の段階では花弁が緑色化していたが, 野生型との間に有意な差は見られず, また, 開花時の花弁は野生型と同じく白色であった.

以上のように葉緑体形成誘導転写因子の過剰発現により花卉の緑色化が起きない場合は, 葉緑体の分解に関わる遺伝子を抑制することを計画していたため, 3 種類の葉緑体の分解に関わる遺伝子をそれぞれ単独あるいは複数抑制した変異体を作成して花弁を観察したが, 花弁が緑色化した個体は存在しなかった. なお, この研究項目は独立行政法人花き研究所の協力を得て実施した.

##### (3) 表皮細胞形態形成転写因子の発現改変による花色と花弁質感の改変

表皮細胞の形態形成を司る転写因子を InMYB1pro 下でシロイヌナズナで過剰発現させたところ, 花卉成長の遅延と内巻きにな

る表現型が観察された. 一方, 表皮細胞形態形成転写因子を InMYB1pro 下で CRES-T 法により抑制したところ, 花弁がしわになる個体と, しわにならない個体があった. 前者の花弁の表皮細胞は小さく収縮しており, 後者は平たくなっていた. なお, この研究項目は共同研究先の独立行政法人産業技術総合研究所で実施された.

シロイヌナズナにおいて明確な表現型が見られたため, 同じ形質転換ベクターを用いてトルコギキョウに形質転換を行った. 現在までに数個体しか形質転換体が得られておらず, これらにシロイヌナズナのような明確な表現型が観察されていないが, 今後, 系統数を増やし, 表現型が出る系統を選抜していく必要がある.

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 11 件)

- ① 白武勝裕, 宮下嘉代子, 牧野治子, 水野祐輔, 中川喜夫, 安田拓史, 秋山真仁, 森智治, 吉川 (榊原) 郁恵, 後藤陽加, 雨宮剛, 小八重善裕, 山木昭平「花と果実におけるアクアポリンの発現と役割」第 3 回植物アクアポリン研究検討会, 倉敷芸文館, 2011 年 6 月 3 日 (口頭発表)
- ② 白武勝裕, 森本玲奈, 猫橋茉莉, 廣瀬真名, 星野敦, 森田裕将, 飯田滋「花卉特異的プロモーターの開発—アサガオ由来 InMYB1 プロモーターの解析—」第 29 回日本植物細胞分子生物学会, 九州大学, 2011 年 9 月 6~8 日 (口頭発表)
- ③ 東未来, 猫橋茉莉, 森本玲奈, 廣瀬真名, 松本省吾, 光田展隆, 高木優, 大島良美, 白武勝裕「花卉特異的 InMYB1 プロモーターの花弁特異的発現誘導機構の解明 第 1 報: LFY の機能抑制によりがく化させた花弁における作動」園芸学会, 岡山大学, 2011 年 9 月 24~26 日 (口頭発表)
- ④ 猫橋茉莉, 森本玲奈, 廣瀬真名, 松本省吾, 星野敦, 森田裕将, 飯田滋, 白武勝裕「花卉特異的プロモーターの開発—アサガオ由来 InMYB1 プロモーターの解析—」園芸学会, 岡山大学, 2011 年 9 月 24~26 日 (ポスター発表)
- ⑤ 林裕作, 河村耕史, 白武勝裕, 松本省吾「バラのトゲ形成に関わる遺伝子の探索と解析」園芸学会, 大阪府立大学, 2012 年 3 月 20~22 日 (口頭発表)

- ⑥ 堀部貴紀, 岩田成生, 白武勝裕, 山田邦夫「バラ切り花の開花とアクアポリン」第7回トランスポーター研究会年会, 京都大学, 2012年6月9日~10日 (ポスター発表)
- ⑦ 東未来, 猫橋茉莉, 森本玲奈, 廣瀬真名, 松本省吾, 光田展隆, 高木優, 大島良美, 白武勝裕「花卉特異的 InMYB1 プロモーターの花弁特異的発現誘導機構の解明 第1報: ホメオティック遺伝子の抑制によって構造を改変した花における作動」第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会, 奈良先端科学技術大学, 2012年8月3~5日 (口頭発表)
- ⑧ 東未来, 猫橋茉莉, 森本玲奈, 廣瀬真名, 太田垣駿吾, 松本省吾, 光田展隆, 高木優, 大島良美, 白武勝裕「花卉特異的 InMYB1 プロモーターの花弁特異的発現誘導機構の解明 第2報: 温度依存性 ap3-1 変異体における構造変化した花における作動」園芸学会, 福井県立大学, 2012年9月22~24日 (口頭発表)
- ⑨ 白武勝裕, 森本玲奈, 猫橋茉莉, 廣瀬真名, 東未来, 森田裕将, 星野敦, 飯田滋「アサガオ由来花卉特異的 InMYB1 プロモーター 第一報: アサガオ以外の植物における作動」第53回日本植物生理学会年会, 岡山大学, 2013年3月21~23日 (ポスター発表)
- ⑩ 東未来, 森本玲奈, 猫橋茉莉, 廣瀬真名, 太田垣駿吾, 松本省吾, 大島良美, 光田展隆, 高木優, 白武勝裕「アサガオ由来花卉特異的 InMYB1 プロモーター 第二報: ホメオティック遺伝子の抑制によって構造を改変した花における作動」第53回日本植物生理学会年会, 岡山大学, 2013年3月21~23日 (ポスター発表)
- ⑪ 落合正樹, 太田垣駿吾, 白武勝裕, 松本省吾, 山田邦夫「ジャスモン酸メチルがトルコギキョウ切り花の開花および細胞壁伸展性関連タンパク質に及ぼす影響」園芸学会, 東京農工大学, 2012年3月23~24日 (口頭発表)

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白武 勝裕 (KATSUHIRO SHIRATAKE)  
名古屋大学・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