

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780034

研究課題名(和文)キクの集合花の形成を制御する転写因子群の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Study of the transcription factors that play important roles in the development of floral organs in *Chrysanthemum morifolium*

研究代表者

佐々木 克友 (Sasaki, Katsutomo)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所花き研究領域・主任研究員

研究者番号：60469830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：舌状花および管状花で構成されるキクの集合花について、その花芽分化から花器官形成の制御を明らかにすることを目的として転写因子を中心とした研究を行った。キクでカスタムアレイを作製し、園芸キク10品種の花器官を用いてマイクロアレイ解析を行った。また、1品種については舌状花、管状花、葉などを用いてマイクロアレイ解析を行った。他植物種で花器官形成に重要な機能を有することが明らかとなっている一方で、キクにおいては花器官形成に関する機能がほとんど知られていない転写因子を中心として解析を行った。

研究成果の概要(英文)：To understand control mechanisms for the development of *Chrysanthemum* flowers which consist of ligulate flowers and tubular flowers, comprehensive genetic analyses were performed in *Chrysanthemum morifolium*. Microarray analyses were performed using floral organs of ten *Chrysanthemum* cultivars whose floral morphologies are different from each other. In addition, to obtain the information of function of key transcription factors for the development of ligulate flowers and tubular flowers, microarray analyses were performed using ligulate flowers, tubular flowers, and leaf of a *Chrysanthemum* cultivar. In model plants, transcription factors play important roles in the development of floral organs, therefore, transcript factors were intensively studied in this work.

研究分野：園芸学、植物生理学、応用生命科学

キーワード：キク 転写因子 舌状花 管状花 集合花

1. 研究開始当初の背景

(1) キクの花は、色や形の異なる舌状花および管状花の2種類の花が多数集合した複雑な集合花を構成しており、単純な構造のモデル植物と比較して、より高次の形態制御が行われている。モデル植物の花の形成制御については、花芽分化を制御する転写因子が多数単離されており¹⁾、その後のイベントである花器官形成についてもこれまでの報告から MADS-box 型の転写因子を中心とした ABC モデルで説明することができる²⁾。一方、キク科植物の複雑な集合花の形成や2種類の花が形成されるメカニズムについては、モデル植物の知見だけでは説明が困難である。

(2) これまでキクを用いて遺伝子組換え植物を作出しているが、他植物種で花器官に変化が見られる遺伝子を導入しても、導入遺伝子が発現しているにも係わらずキクでは花序全体の形態が変化しにくい傾向が見られた。このことは、①キク科植物の花器官形成はモデル植物のようにシンプルな ABC モデルだけでは説明出来ないこと、②複雑な集合花の形成にはモデル植物にはない重複した(相同) 遺伝子による機能分担が存在する可能性、③時間・空間的に複雑かつ高次の遺伝子発現制御機構が存在する可能性等を示唆している。

2. 研究の目的

(1) キク科植物はモデル植物とは花の構造が大きく異なり、数百もの小花が集まり一つの花のように見える集合花を形成している。キク科植物はキク、ひまわりやタンポポに代表されるように一般にも親しみのある花であるが、この複雑な集合花の形成機構に関しては、これまで分子生物学的な解析対象とされてこなかった。本研究ではキクを用い、集合花における花芽分化から花器官形成の制御に係わる分子基盤を明らかにすることを目的とした。

(2) 一方、花器官の発達そして形態形成に関しては、モデル植物であるシロイヌナズナで顕著な研究成果が多数得られており、転写因子が重要な役割を担うことが知られている。シロイヌナズナでは約 2000 個の転写因子が存在しており、これらの転写因子は DNA 結合ドメインのアミノ酸配列を参考にして、分類方法にもよるが~70 種類程度と多数の転写因子ファミリーに分類されている³⁾。また、花の形態形成に関する変異体の原因遺伝子の多くが転写因子であることから、本研究ではキクを用いて特に集合花形成の鍵となることが推測される転写因子の機能の解明を主な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究機関で先行して進めていたキクの EST 解析情報により園芸ギクから 21 万コンティグの遺伝子情報を取得した。この情報を基にして、園芸ギクのオリジナルカスタムアレイを作製し、キクのマイクロアレイ解析に用いた。

(2) キクの集合花の花形のパターン、そして舌状花および管状花形成(これら2種類の花の形成比率の違いなど)については、園芸ギクに豊富な花形の種類が見られる。これらの形成に関する情報を得ることを目的として、花形および舌状花管状花の形状、形成比



‘セイマリン’ ‘ホマロ’ ‘ジェニーピンク’



‘系統1’ ‘系統2’

図1. 花形の異なる5種類のキク

率が異なる5種類のキク(図1)等を対象として、花器官由来の mRNA を利用したマイクロアレイ解析を行った。転写因子は花器官が完全に分化または形成する前に発現が見られることを予想し、つぼみの状態の未熟花弁由来の mRNA をサンプリングして解析に供した。

(3) 栽培ギク‘セイマリン’における舌状花および管状花の形成に係わる転写因子に関する情報を得るため、舌状花弁、管状花弁葉などをサンプリングして、前出のキクオリジナルカスタムアレイにてマイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) 先行して進めていた園芸キクにおける EST 解析(次世代シーケンズソフトウェアのアップロード作業に半年以上を要したため、研究計画が遅れていた)では、総計 3,573,676 の配列が解読され、213,205 コンティグが得られた。有効なコンティグの抽出の後に、新しくキクオリジナルマイクロアレイ(180k プローブ)を作成し、花弁の形または花形が大きく異なる 10 種類の園芸ギクを用いたマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析の結果、キクの花器官形成の制御に関わることが予想される MADS (図2)、TCP (図3)、bHLH (図4)などの転写因子の発現がそれぞれの品種によって異なっていた。このうち、5種類の園芸ギクの結果を用いて、学会発表を行った。

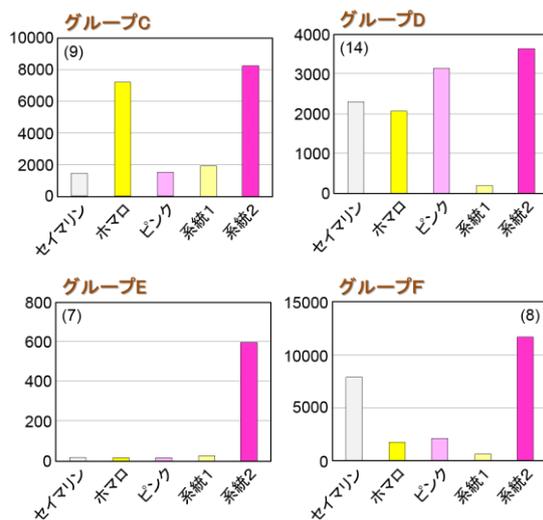


図2. MADS ファミリーのマイクロアレイ解析

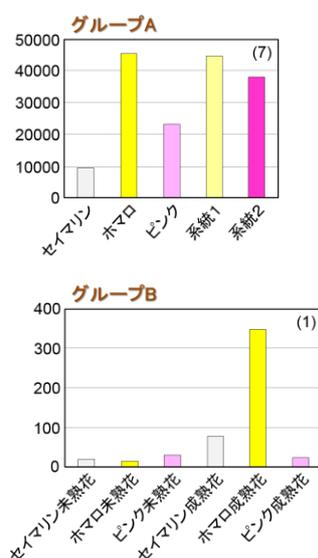


図3. TCP ファミリーのマイクロアレイ解析

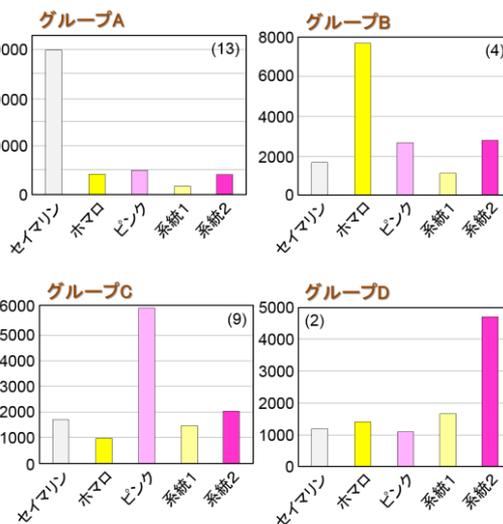
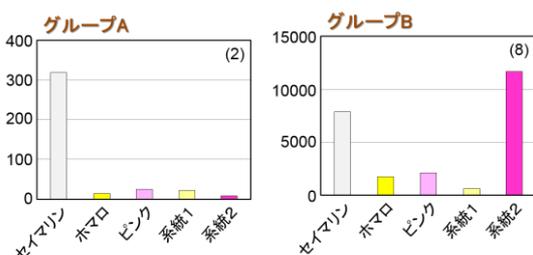


図4. bHLH ファミリーのマイクロアレイ解析

MADS ファミリー (シロイヌナズナ 106 遺伝子、キク 247 コンティグ) に関しては、それぞれの品種で異なる発現パターンを示す 6 つの発現グループが認められた。また、bHLH (シロイヌナズナ 157、キク 100) および TCP ファミリー (シロイヌナズナ 24、キク 35) では 2 または 4 グループずつが認められるなど、それぞれの品種における特徴的な形態形成への関連が推測される多様な発現プロファイルが認められた。

(2) H26 度にはさらに栽培ギク ‘セイマリソ’ の花器官を細分化 (舌状花弁、管状花弁、雄蕊、舌状花弁雌蕊、管状花弁等) してサンプリングを行い、マイクロアレイ解析を進めた。現在は、セイマリソの舌状花および管状花において特異的な発現が見られた転写因子の発現、また、キクにおける転写因子の分類の解析に焦点を当てて解析を進めている。結果がまとまり次第、学会発表および論文発表を予定している。

(3) 本研究で対象とした転写因子の解析に先行して、シロイヌナズナ由来の転写因子を用いて遺伝子組換えギクを作出した。転写因子特異的に機能を抑制する手法である CRES-T 法および 35S プロモーターを組み合わせて、クラス A MADS-box 転写因子 (APETALA2) キメラリプレッサーを導入したが、形質が顕著に変化したキクは得られなかった。また、多くの組換え植物で 35S プロモーター領域のメチル化等の影響と推測されるサイレンシングにより、導入遺伝子の発現そのものが見られないケースも見られた。今後、導入遺伝子の機能を効率よく解析するためには、キクの花器官で有用なプロモーターの開発や RNAi 法による解析等、キクの転写因子解析に必要なベクター系の開発も必要であると考えられた。

<引用文献>

- 1) Irish V. The flowering of Arabidopsis flower development、The Plant Journal、61 巻、2010、1014-1028
- 2) Jack T., Fox GL., Meyerowitz EM. Arabidopsis homeotic gene APETALA3 ectopic expression: transcriptional and posttranscriptional regulation determine floral organ identity、Cell、76 巻、703-716
- 3) Mitsuda N., Ohme-Takagi M. Functional analysis of transcription factors in Arabidopsis、Plant Cell Physiol、2009、50 巻、1232-1248

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

佐々木克友、岸本久太郎、大坪憲弘、大宮あけみ、『栽培ギクのオリジナルカスタムアレイを用いた花器官における転写因子の発現解析』、第 31 回日本植物細胞分子生物学会 (札幌) 大会・シンポジウム、2013 年 9 月、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 克友 (Katsutomo Sasaki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所花き研究領域・主任研究員

研究者番号：60469830