

論文名：ホトトギス属植物 (*Tricyrtis* spp.) における形質転換技術を用いた草姿および花形の改変に関する研究

新潟大学大学院自然科学研究科

氏名 大谷 真広

本研究では、花き園芸植物における草姿や花形に関する分子育種への形質転換技術の応用を目的として、ユリ科のホトトギス属植物 (*Tricyrtis* spp.) をモデルに用いて以下のような実験を行った。

1. トレニア由来 GA 生合成・代謝経路関連遺伝子が導入された形質転換体の作出および形質調査

ジベレリン (GA) は植物ホルモンの 1 種であり、茎の伸長、葉の展開、花成誘導など、植物の成長・発達の様々な段階において重要な生理現象を制御している。GA 生合成・代謝経路においては、活性型 GA の生合成は GA20ox および GA3ox による連続的な酸化作用により進行し、また、活性型 GA およびその中間体は GA2ox により非活性型の GA に代謝される。ここでは、GA 生合成・代謝経路関連遺伝子を用いた形質転換による草姿の改変を目的として、トレニア (*Torenia fournieri*) 由来の GA20ox 遺伝子 (*TfGA20ox*)、GA3ox 遺伝子 (*TfGA3ox1*) および GA2ox 遺伝子 (*TfGA2ox2*) を過剰発現するホトトギス ‘東雲’ (*Tricyrtis* sp. ‘Shinonome’) 形質転換体の作出および形態調査を行った。

GA 生合成経路関連遺伝子に関しては、*TfGA20ox* および *TfGA3ox1* が導入された形質転換体が、それぞれ 4 系統および 2 系統得られた。全ての形質転換体は、導入した遺伝子の種類に関わらず、非形質転換体と比較して、シュートや節間の長さの短縮、茎の直径の減少を示した。また、全ての形質転換体において、葉や花被が細長くなった。形質転換体に GA₃ および GA 生合成阻害剤のユニコナゾールを外生処理したところ、シュート長はそれぞれ増加および減少し、形質転換体において GA 応答経路が正常に機能していることが示された。

GA 代謝経路関連遺伝子に関しては、*TfGA2ox2* が導入された形質転換体ははじめに 6 系統得られた。全ての形質転換体が著しい矮化を示し、それらは矮化の程度により強矮性および弱矮性に分類された。弱矮性の 3 系統は小型で完全には開花しない花をつけ、また、強矮性の 3 系統では花が形成されなかった。形質転換体においては内生の活性型 GA レベ

ルが大きく減少しており、内生の活性型 GA レベルと *TfGA2ox2* の発現レベルおよび矮化の程度には相関がみられた。また、形質転換体に GA₃ を外生処理したところ、シュート長は増加した。以上の結果から、*TfGA2ox2* が導入された形質転換体における形態変化は、内生の活性型 GAs の減少により引き起こされたことが明らかとなった。

その後、*TfGA2ox2* が導入された形質転換体を新たに作出したところ、そのうちの 1 系統 (G2-55) が完全に展開する花をつけた。G2-55 は弱矮性を示し、シュートあたりの花の数や花の大きさに関して G2-55 と非形質転換体の間に有意差はみられなかった。FCM 分析および染色体観察により、G2-55 が四倍体であることが示された。G2-55 は高い花粉稔性を示したことから、鉢植え植物としての直接の利用ばかりでなく、さらなる育種の材料としても有用であると考えられた。

2. *LFY* ホモログ遺伝子の単離および機能解析

LEAFY(LFY) は植物に特異的に存在する転写因子であり、花芽の誘導において重要な役割を担う。また、最近では、*LFY* が花序の形態形成にも関与している可能性が指摘されている。ホトトギス属植物には 2 つのタイプの花序形態が存在し、ホトトギス (*T. hirta*) が頂生の花と腋生の花をつけるのに対し、タイワンホトトギス (*T. formosana*) は頂生の花のみをつける。ここでは、ホトトギス属における花序形成と *LFY* の関係を明らかにすることを目的として、ホトトギス (*ThirLFY*) およびタイワンホトトギス ‘青竜’ (*TforLFY*) から *LFY* ホモログ遺伝子を単離し、機能解析を行った。

ThirLFY および *TforLFY* において推定される翻訳産物は、いずれも 411 アミノ酸残基であり、両者間で 3 カ所のアミノ酸残基の置換が確認された。*ThirLFY* および *TforLFY* の推定アミノ酸配列は、他の植物種における *LFY* ホモログ遺伝子の推定アミノ酸配列と 24.2–67.6% の相同性を示した。サザンブロットィング法によるコピー数調査を行ったところ、ホトトギスおよびタイワンホトトギスのゲノムには *LFY* ホモログ遺伝子が単一コピーで存在することが明らかになった。*ThirLFY* または *TforLFY* を過剰発現するシロイヌナズナ形質転換体では早期の開花が誘導されたが、両遺伝子間での機能的な違いはみられなかった。花序形成の初期ステージにおいて *in situ* hybridization 法による発現解析を行ったところ、ホトトギスでは頂芽と腋芽の両方において *ThirLFY* が発現していたのに対し、タイワンホトトギス ‘青竜’ では頂芽のみで *TforLFY* が発現していた。*ThirLFY* および *TforLFY* のプロモーター解析を行ったところ、両遺伝子の塩基配列の相同性は低く、また、ホルモン応答モチーフの数と位置は大きく異なっていた。この結果は、*ThirLFY* と *TforLFY* の間における植物ホルモン

への応答性の違いにより両遺伝子の発現はパターンに違いが生じ、結果として異なる花序形態が生じるという可能性を示唆している。

3. CRES-T 法を用いた B クラス MADS-box 遺伝子の機能抑制

B クラス MADS-box 遺伝子は、花卉および雄ずいの形成に重要な役割を担っている。ユリ科植物など一部の単子葉植物の花は同花被花とよばれ、whorl 1 および whorl 2 に花卉様器官が形成される。近年、同花被花植物における花器官形成を説明するため、改変 ABC モデルが提唱された。しかしながら、変異体の作出または遺伝子抑制による改変 ABC モデルの直接の証明はいまだになされていない。ここでは、ホトトギス‘東雲’由来の四倍体系統を材料に用いて、CRES-T 法による B クラス MADS-box 遺伝子 (*TrihDEFa*) の機能抑制を試みた。

リアルタイム RT-PCR 分析により非形質転換体の花器官における ABC モデル関連遺伝子の発現解析を行ったところ、B クラス遺伝子の発現が whorl 2 および whorl 3 に加えて whorl 1 でも検出され、ホトトギス属植物にも改変 ABC モデルが適用されることが示された。CRES-T 法により得られたいくつかの形質転換体においては、期待どおり whorl 1 および whorl 2 に花卉様器官のかわりにがく片様器官が形成された。また、形質転換体の whorl 3 には雄ずいのかわりに心皮様器官が形成され、胚珠および柱頭様の構造も観察された。SEM による観察を行ったところ、形質転換体のがく片様器官とベクターコントロールの花弁様器官の間では、表皮細胞の形態が大きく異なっていた。また、形質転換体の whorl 3 に形成された心皮様器官の表面構造は、ベクターコントロールにおける心皮の表面構造と類似していた。リアルタイム RT-PCR 分析の結果、形質転換体の whorl 1, whorl 2 および whorl 3 における B クラス遺伝子の発現レベルは、非形質転換体と比較して著しく減少していた。これらの結果は、同花被花植物の花器官形成における改変 ABC モデルを強く支持すると考えられる。