

花卉のように花卉ではない花器官 —副花冠— その発生と形を決めるしくみ

(独法)農研機構・花き研究所 仁木智哉

1. はじめに

花の形は、花色や香りと同様、花きの観賞価値を左右する重要な形質の1つである。野生種では一重で小輪の花が多いのに対し、日本の主要切り花であるキク、カーネーション、バラを見ると、八重、大輪などの装飾的な花形を持つ品種が主に流通している。また、育種による花形改良によって装飾性の高い花形を付与することにより、同じ品目でも経済的価値が向上する例が多い。例えば、現在わが国での切り花生産額が5位となっているトルコギキョウは、50年前にはほとんど生産がなかったが、原種に近い一重の花形から、八重、花卉周縁の鋸歯、大輪など、様々な花形が育種されるとともに、花色が多様化したことにより、主要な花きに成長した¹⁾。

そのような装飾的な花形の1つとして、スイセンを代表例とする副花冠があげられる。副花冠は、スイセン以外にも、キンギョソウ、トケイソウ、トウワタなどでも見られるが、植物全体を見渡すと、ごく限られた植物種に特異的な花器官である。また、その形態も多様性に富み、スイセンではラッパ状の部分が副花冠であるが、キンギョソウでは花卉状のもの、トケイソウでは細長いものなど様々であり(図-1)、その形態の違いがそれぞれの植物種を特徴付けるとともに、観賞価値を大いに高めている²⁾。

スイセン キンギョソウ トケイソウ



図-1 副花冠の見られる花
矢印は副花冠を示す。

しかしながら、副花冠の発生や形態の制御メカニズムについては、これまであまり研究が行われていない。

近年、花の形の制御には、植物ホルモンのサイトカイニンが関与することが明らかにされている。トレニアの場合には、花芽にジフェニルウレア系の合成サイトカイニンであるホルクロルフェニユロン (CPPU)³⁾ を処理することにより、副花冠や鋸歯の発生、花卉数の増加など、新たに装飾的な花形が誘導されることが明らかにされている(図-2)⁴⁾。CPPUはサイトカイニンの分解を司るサイトカイニン酸化酵素 (Cytokinin oxidase/dehydrogenase; CKX) の阻害剤であることから⁵⁾、CPPU処理により誘導されるトレニアの様々な花形は、花芽内で内生サイトカイニン濃度が上昇することにより引き起こされていると考えられる。さらに、これらの花形は、CPPU処理を行う花芽の発達ステージに依存して規則的に誘導される。このよ

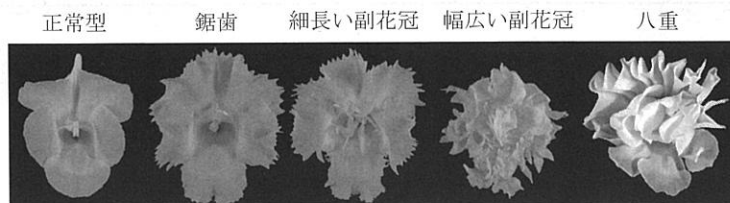


図-2 CPPU 処理によりトレニアで誘導される様々な装飾的な花形

うに、副花冠を人為的に、しかも安定的に誘導できる実験系はこれまでなかったことから、CPPU 処理したトレニアは、副花冠の発生メカニズムの解析に非常に有効であると考えられる。さらに、CPPU 処理したトレニアで誘導される副花冠は、花卉の形態に近い幅広いものと、雄ずいの形態に近い細長いものがあり(図-2)、これらも特定の花芽発達ステージに CPPU 処理を行うことでそれぞれ誘導できることから⁴⁾、副花冠の形態の制御メカニズムについても解析できると考えられる。副花冠の発生や形態の制御メカニズムが明らかになれば、遺伝子組換えなどの育種手法により関係する遺伝子を調節することによって、これまでにない新たな花形を作り出すことも可能になると期待できる。

そこで、CPPU 処理したトレニアを利用して、副花冠の発生とその形態を制御している要因を探るとともに、花形改良に向けた育種技術開発のために、遺伝子組換え技術を利用した副花冠の付与技術について、花き研究所で実施した研究成果を中心に紹介したい^{6) .7) .8)}。

2. 副花冠の発生と花芽内のサイトカニンシグナルの局在性

上に述べたように、CPPU 処理によるトレニアの花形の変化は、処理を行う花芽の発達ステージに依存して規則的に発生することから、処理を行う花芽発達ステージによって、花芽内

におけるサイトカニン濃度の高い部位の分布が異なり、そのために処理時の花芽発達ステージに依存して特定の花形が誘導されると予想される。従って、副花冠が発生する際の花芽内のサイトカニン濃度の空間的、時間的な分布パターンを解析することにより、副花冠の発生メカニズムが解析できると考えられる。しかしながら、微小な花芽内のサイトカニン濃度の分布を直接解析することは、非常に困難である。そこで、サイトカニン応答性遺伝子であり、サイトカニンのシグナル強度に応じて発現量に変化する *type-A response regulator (RR)* 遺伝子 (*TYRRI*)^{9) .10) .11) .12)} および CKX 遺伝子 (*TYCKX5*)^{13) .14) .15)} の発現変化を解析することにより、花芽内のサイトカニンシグナルの分布を明らかにすることを試みた⁶⁾。

まず、花芽内における *TYRRI* および *TYCKX5* 遺伝子の時間的な発現変動を解析したところ、両遺伝子の発現は、いずれの花器官においても、CPPU 処理後 1 日目から大きく上昇し、花芽に CPPU 処理による初期の形態変化が認められる 5 日目まで高い発現が維持された。さらに、花芽内における空間的な発現変動を解析したところ、花卉に近い形態の幅広い副花冠が誘導されるがく片伸長期の花芽に CPPU 処理した場合は、両遺伝子とも副花冠の発生位置である雄ずい原基の背軸側で強い発現が見られ(図-3 上段)、雄ずいに近い形態の細長い副花冠が誘導される花卉伸

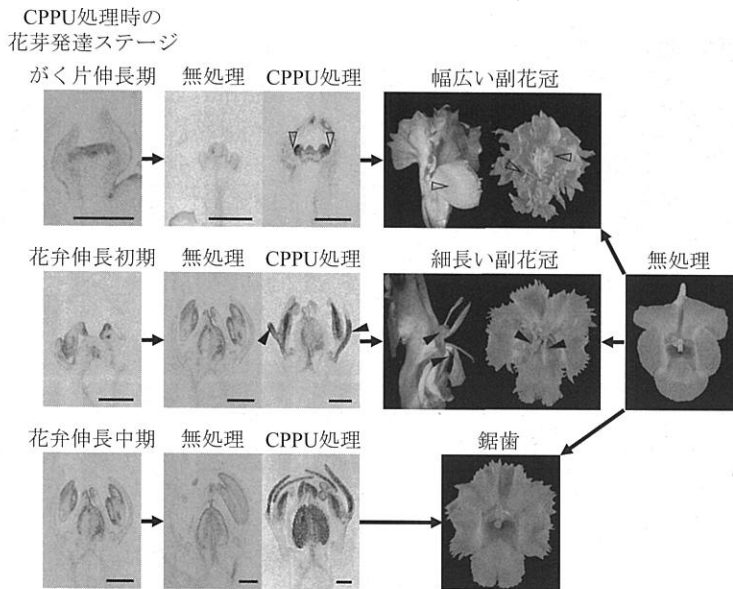


図-3 形態の異なる花形が誘導される際の *TYCKX5* 遺伝子の発現部位の違い
 上段：幅広い副花冠の誘導時，中段：細長い副花冠の誘導時，下段：鋸歯の誘導時。
 △：幅広い副花冠の発現位置，▲：細長い副花冠の発現位置，黒棒は0.2mmを示す。

長初期の花芽に CPPU 処理した場合には、雄ずいの基部ならびに副花冠の発現位置である花弁の基部から中央部にかけて強い発現が見られた (図-3 中段)。一方、花弁周縁に鋸歯が誘導される花弁伸長中期の花芽に CPPU 処理した場合には、鋸歯が形成される花弁の中央部から先端部にかけて強い発現が見られた (図-3 下段)。

以上の結果から、CPPU 処理による副花冠および花弁の鋸歯の発現は、それらが形成される花芽内の特定の部位で、サイトカニンシグナルが持続的に高まることによって誘導されると考えられる。

3. 副花冠の形態の制御メカニズム

副花冠の形態には、植物種によって様々なものがあり、CPPU 処理したトレニアでも幅広いものと細長いものの2種類が誘導される (図

-2)。全般的には、副花冠の形態は花弁と類似しているが、形態学的な由来は植物種によって異なり、スイセンやキンギョソウでは雄ずいの托葉が花弁状に変化したもの、トケイソウでは花托が花弁状に変化したものと考えられている^{2), 16)}。では、副花冠の形態はどのようにして決められているのだろうか？その点を明らかにするために、まず、副花冠が花器官としてどのような特徴を持っているかについて、CPPU 処理したトレニアで誘導される副花冠の詳細な形態観察を行った⁷⁾。

幅広い副花冠は、花弁と同様に幅広い形態であり、アントシアニンによる着色も認められた (図-4 上段)。また、表皮では円錐状の細胞が並び (図-4 中段)、維管束は網目状に分岐していた (図-4 下段)。これらは花弁と同様の特徴であった (図-4)。一方、細長い副花冠は、アントシアニンによる着色が認められるものと認

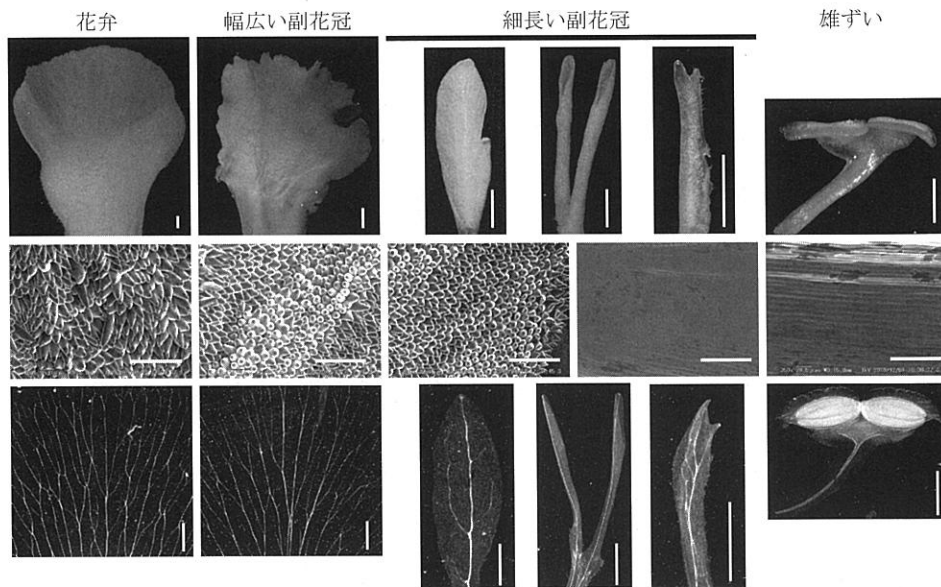


図-4 CPPU 処理により誘導される副花冠の形態の特徴の比較
 上段：生の花器官の写真，中段：表皮細胞の電子顕微鏡写真，下段：維管束の写真，白棒は 1mm を示す

められないものが存在し、また、その形態については平板状のもの、基部が筒状のもの、棒状で先端部に2つの裂片を生じるものが混在していた(図-4 上段)。また、表皮には花弁のような円錐状の細胞から花糸のような細長い細胞まで見られ(図-4 中段)、維管束は花糸と同様に分岐が少なかった(図-4 下段)。以上の結果は、細長い副花冠の特徴は、花弁と雄ずいの特徴が混在していることを示していると考えられる。

一方、花器官の形態形成については、転写因子をコードしている3つのクラスの花器官ホメオティック遺伝子の組み合わせによる ABC model により花器官のアイデンティティーの決定が説明されている^{17)・18)・19)}。花器官を4つの花輪(whorl)と見た場合、一番外側の whorl 1 ではクラス A 遺伝子が単独で発現することによりがく片が、whorl 2 ではクラス A と B 遺伝子が重複して発現することにより花弁が、whorl 3 ではクラス B と C 遺伝子が重

複して発現することにより雄ずいが、最も内側の whorl 4 ではクラス C 遺伝子が単独で発現することにより雌ずいが形成される(図-6)。シロイヌナズナやキンギョソウでは、突然変異によりクラス C 遺伝子の発現が失われた場合、クラス A 遺伝子が whorl 3 および whorl 4 でも発現し、これらの whorl における花器官ホメオティック遺伝子の組合せが、花弁を誘導するクラス A と B 遺伝子の組み合わせに変化することにより、八重化することが知られている^{20)・21)・22)・23)}。そこで、CPPU 処理により誘導されるトレニアの副花冠の形態の違いにも花器官ホメオティック遺伝子が関与している可能性が考えられることから、CPPU 処理した各花器官における花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンを解析した⁷⁾。

副花冠形成初期には、幅広い副花冠では、クラス A 遺伝子(*TISQUA*)は副花冠の原基の基部で強い発現が見られ、クラス B 遺伝子

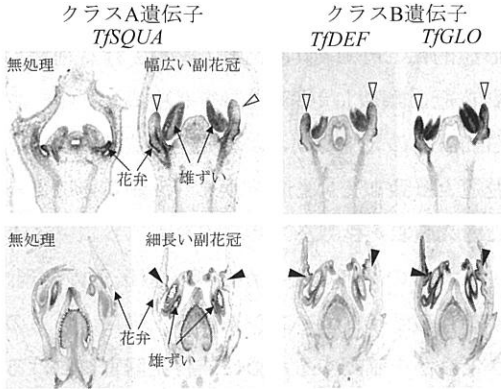


図-5 形態の異なる副花冠におけるクラス A および B 遺伝子の発現パターンの違い
 上段: 幅広い副花冠形成初期の蕾 (花弁伸長前期)
 下段: 細長い副花冠形成初期の蕾 (花弁伸長後期)
 △: 幅広い副花冠の原基, ▲: 細長い副花冠の原基

(*TYDEF*, *TYGLO*) は副花冠の原基全体で強い発現が見られた (図-5 上段)。これらの発現パターンは無処理の花弁と同様であった (図-5 上段)。一方、細長い副花冠では、クラス B 遺伝子は副花冠の原基全体で発現が見られたが、クラス A 遺伝子は副花冠原基の周縁部のみで弱い発現が見られた (図-5 下段)。クラス C 遺伝子 (*TYPLE1*, *TYFAR*) は、いずれの副花冠の原基でもほとんど発現が見られなかった。さらに、これらの発現パターンを、花芽内でそれぞれの副花冠が分化する部位の発現パターンと比較したところ、両者は一致していることがわかった。

以上の結果から、副花冠の形態は、副花冠形成初期において、花芽内で副花冠が分化する部位の花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンによって制御されると考えられる。つまり、花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンが、花弁と同様にクラス A および B 遺伝子が中心になると、副花冠が形態的にも組織的にも花弁に近い状態に発達した幅広い形態になり、クラス A および C 遺伝子の発現がともに低く、

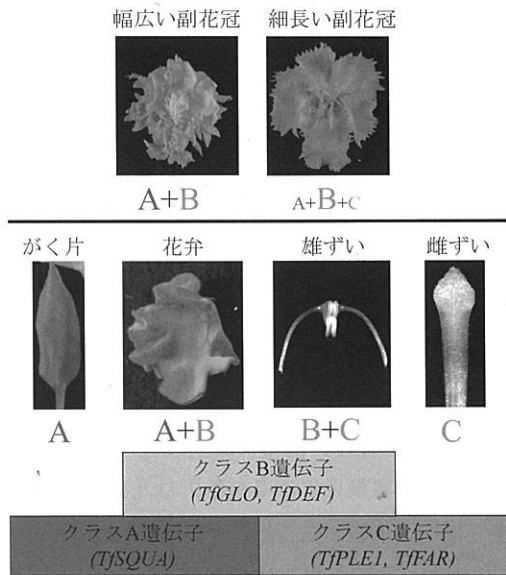


図-6 トレニアの副花冠の形態と ABC モデル花器官ホメオティック遺伝子の発現が、花弁パターン (クラス A+B) になると副花冠は幅広い形態に、クラス B が中心 (クラス A と C はともに低い) になると細長い形態になる。

クラス B 遺伝子が中心の発現パターンになると、副花冠のアイデンティティーが花弁になるか雄ずいになるかが不安定な状態になり、形態的にも組織的にも花弁に近いものから雄ずいに近いものが混在した細長い形態になる (図-6)。

4. 遺伝子組換え技術を利用した副花冠の付与

これらの結果を応用し、サイトカイニンを、花弁伸長初期に花弁および雄ずい原基の基部に蓄積させれば、花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンがクラス A および B 遺伝子の組み合わせによる幅広い副花冠を、花弁伸長中期に花弁の基部から中央部に蓄積させれば、クラス B 遺伝子の発現が中心となった細長い副花冠を誘導でき、またサイトカイニンを花弁の中央部から先端部に蓄積させれば、花弁周縁部の鋸歯を誘導できると考えられる。これらの知見

の花き育種および生産への応用を目指す場合、突然変異を中心とした個々の遺伝子の変異の集積によるこれまでの育種法では、花芽内の特定の器官にサイトカニン蓄積する個体を得ることは困難である。また、CPPU 処理によって特定の花形を得ようとする場合、特定の花芽発達ステージに処理することが必要であり、経済栽培に応用することは困難である。そこで、シロイヌナズナのサイトカニン生合成遺伝子 (*AtIPT4*) を利用して、サイトカニンの蓄積を花芽の部位特異的に制御したトレニアを作出し、遺伝子組換えによる装飾的な花形誘導の可能性について検討を行った⁸⁾。

AtIPT4 遺伝子を、がく片および花弁で発現誘導する *API* プロモーターの制御下で導入した組換え体 (*API::AtIPT4* 植物) では、正常型では花弁数が 5 枚であるのに対し、花弁数が 6~7 枚へと増加した。一方、*AtIPT4* 遺伝子を、花弁および雄ずいで発現誘導する *AP3* プロモーターの制御下で導入した組換え体 (*AP3::AtIPT4* 植物) では、花弁数の増加だけでなく、花弁の大型化により花冠が拡大し、花弁周縁部に鋸歯の発生が見られた (図-7)。さらに、花弁に細長い付属弁の発生も見られた (図-7)。この付属弁は、雄ずいの基部の背軸側の

側方から発生していた (図-7)。この付属弁は、形態的に CPPU 処理により誘導される細長い副花冠と類似し (図-2, 図-3 中段)^{4)・7)}、さらに、その発生時期および発生位置も細長い副花冠と一致していたことから⁴⁾、副花冠であると考えられた。

これらの花形の変化が、導入遺伝子の発現、すなわちサイトカニン濃度の上昇によるものかどうかを確認するために、各花器官における導入遺伝子の発現産物の解析を行ったところ、予想されたように、導入した *AtIPT4* 遺伝子は、*API::AtIPT4* 植物ではがく片および花弁において、また *AP3::AtIPT4* 植物では花弁および雄ずいで発現していた。さらに、*API::AtIPT4* 植物では、サイトカニンシグナル強度の指標となる *TYRRI* および *TYCKX5* 遺伝子の発現は、正常型に比べてがく片および花弁において、*AP3::AtIPT4* 植物では、花弁および雄ずいにおいて、それぞれ大きく上昇していた。

以上の結果から、プロモーターの異なる組換え体における花の形態の違いは、導入した *AtIPT4* 遺伝子の花芽内における発現部位の違いにより引き起こされ、*API::AtIPT4* 植物ではがく片および花弁における、*AP3::AtIPT4* 植物では花弁および雄ずいにおけるサイトカニン

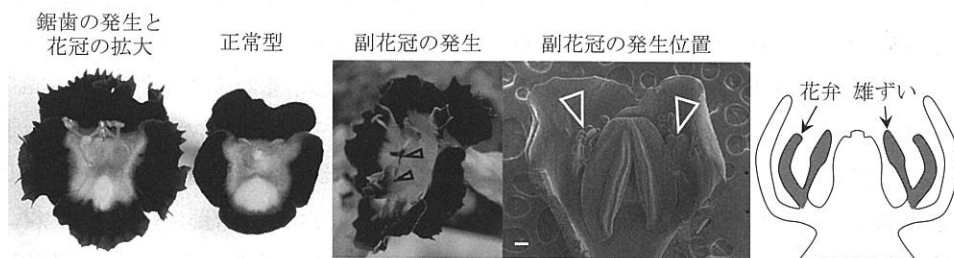


図-7 *AP3::AtIPT4* 植物の花形変化とサイトカニンシグナルの上昇部位

△は発生した副花冠、白棒は 0.1mm を示す。模式図の灰色の部分、は、サイトカニンシグナルが上昇した花器官を示す。

AP3 プロモーターの働きにより、花弁と雄ずいで *AtIPT4* が発現し、これらの部位でサイトカニンシグナルが上昇することにより、副花冠や鋸歯が発生する。

シグナルの上昇が花形の変化をもたらしていると考えられ、遺伝子組換えにより、サイトカイニンの蓄積を花芽の部位特異的、特に花弁および雄ずい特異的に制御することにより、副花冠の付与を始め、花弁数の増加、花弁周縁の鋸歯の発生など、装飾的な花形を誘導できることが示された。

5. 終わりに

これまで副花冠の発生や形態の制御に関する研究は進んでいなかったが、今回紹介したトレニアを用いた研究により、花芽内の部位および時期特異的なサイトカイニンの蓄積パターンにより、きめ細かく制御されていることが明らかになった。これらの結果は、スイセンを始めとする、遺伝的に副花冠を持つ植物の副花冠の発生・形態制御メカニズム解明の突破口になることが期待される。さらに、遺伝子組換え技術を用いて、サイトカイニンシグナルを花芽内の部位特異的に蓄積することにより、副花冠を付与することが可能であることも示され、花きの花形改良のための育種技術の開発に役立つことも期待される。しかしながら、これらの結果を実用化するためには、副花冠の安定的な誘導や、CPPU 処理で誘導されるような幅広い副花冠の付与も必要である。そのためには、花芽内におけるサイトカイニンの蓄積を副花冠の発生部位に限定的にし、さらに花芽発達時期特異的に制御する必要があると考えられる。今後、そのようなプロモーターが開発されることにより、遺伝子組換え技術を利用して、副花冠を始めとした、装飾的な花形の付与技術が開発されることを期待したい。

謝辞

本稿の内容および使用した図は、Niki et al., J. Japan. Soc. Hort. Sci. 81: 204–212 (2012), Niki et al., J. Japan. Soc. Hort. Sci. 82: 69–77 (2013), Niki et al., J. Japan. Soc. Hort. Sci. 82: 328–336 (2013) の一部を和訳、改変したものである。

これらの研究を行うにあたり、農研機構花き研究所の西島隆明博士、間竜太郎博士、東北大学の菅野明教授、平井雅代博士をはじめ、多くの方からご指導、ご協力をいただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 八代嘉昭. 1994. 原産と来歴. p. 387–390. 農山漁村文化協会編. 農業技術体系花卉編第8巻. 農山漁村文化協会. 東京.
- 2) Troll, W. 1957. Praktische Einführung in die Pflanzenmorphologie 2. Fischer, Jena. (Troll, W. 2004. 図説植物形態学ハンドブック 2. 中村信一・戸部博訳. 朝倉書店. 東京.)
- 3) Mok, D. W. and M. C. Mok. 2001. Cytokinin metabolism and action. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 89–118.
- 4) Nishijima, T. and K. Shima. 2006. Change in flower morphology of *Torenia fournieri* Lind. induced by forchlorfenuron application. Sci. Hort. 109: 254–261.
- 5) Bilyeu, K. D., J. L. Cole, J. G. Laskey, W. R. Riekhof, T. J. Esparza, M. D. Kramer and R. O. Morris. 2001. Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. Plant Physiol. 125: 378–386.
- 6) Niki, T., T. Mahesumu, T. Niki and T. Nishijima. 2013. Localized high expression

- of type-A response regulator and cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in relation to forchlorfenuron-induced changes in flower morphology in *Torenia fournieri* Lind. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 82: 69–77.
- 7) Niki, T., M. Hirai, T. Niki, A. Kanno and T. Nishijima. 2012. Role of floral homeotic genes in the morphology of forchlorfenuron-induced paracorollas in *Torenia fournieri* Lind. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 81: 204–212.
- 8) Niki, T., R. Aida, T. Niki and T. Nishijima. 2013. Effect of localized promotion of cytokinin biosynthesis on flower morphology in flower buds of *Torenia fournieri* Lind. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 82 : 328–336
- 9) Brandstatter, I. and J. J. Kieber. 1998. Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. Plant Cell 10: 1009–1019.
- 10) D' Agostino, I. B., J. Deruère and J. J. Kieber. 2000. Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. Plant Physiol. 124: 1706–1717.
- 11) Nishijima, T., T. Niki and T. Niki. 2011b. The large-flowered petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) genotype promotes expressions of type-A response regulator and cytokinin receptor genes like cytokinin response. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 80: 343–350.
- 12) Taniguchi, M., T. Kiba, H. Sakakibara, C. Ueguchi, T. Mizuno and T. Sugiyama. 1998. Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. FEBS Lett. 429: 259–262.
- 13) Brugière, N., S. Jiao, S. Hantke, C. Zinselmeier, J. A. Roessler, X. Niu, R. J. Jones and J. E. Habben. 2003. Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. Plant Physiol. 132: 1228–1240.
- 14) Kiba, T., T. Naitou, N. Koizumi, T. Yamashino, H. Sakakibara and T. Mizuno. 2005. Combinatorial microarray analysis revealing *Arabidopsis* genes implicates in cytokinin responses through the His → Asp phosphorelay circuitry. Plant Cell Physiol. 46: 339–355.
- 15) Nishijima, T., T. Niki and T. Niki. 2011a. Corolla of the large-flowered petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) cultivars exhibit low endogenous cytokinin concentration through enhanced expression of the genes encoding cytokinin oxidases. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 80: 334–342.
- 16) Yamaguchi, H., T. Niki, T. Niki and T. Nishijima. 2010. Morphological property and role of homeotic genes in paracorolla development of *Antirrhinum majus*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 79: 192–199.
- 17) Bowman, J. L., D. R. Smyth and E. M. Meyerowitz. 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. Development 112: 1–20.
- 18) Coen, E. S. and E. M. Meyerowitz. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. Nature 353: 31–37.
- 19) Rijpkema, A. S., T. Gerats and M. Vandebussche. 2007. Evolutionary complexity of MADS complexes. Curr. Opin. Plant Biol. 10: 32–38.

- 20) Yanofsky, M. F., H. Ma, J. L. Bowman, G. N. Drews, K. A. Feldman and E. M. Meyerowitz. 1990. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* 346: 35–39.
- 21) Drews, G. N., J. L. Bowman and E. M. Meyerowitz. 1991. Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell* 65: 991–1002.
- 22) Bradley, D., R. Carpenter, H. Sommer, N. Hartley and E. Coen. 1993. Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *plena* locus of *Antirrhinum*. *Cell* 72: 85–95.
- 23) Davies, B., P. Motte, E. Keck, H. Saedler, H. Sommer and Z. Schwarz-Sommer. 1999. *PLENA* and *FARINELLI*: redundancy and regulatory interactions between two *Antirrhinum* MADS-box factors controlling flower development. *EMBO J.* 18: 4023–4034.

◆救荒雑草とは、我々が日常食べている農作物が、干ばつ・冷害・水害などのために稔らなかった凶作の年に、飢えを凌ぐのに役立った雑草のことです。

◆とかく駆除の対象となりがちな雑草の中には、薬草や食用となる種が多く存在します。本書では、それらの中から史実上記載のある種(救荒雑草)をまとめて掲載しました。

◆飽食の時代といわれる今日、戦中～戦後の食糧危機時を経験した世代が少数となり、救荒植物への興味が薄れ、スーパーや八百屋で販売されるものしか食べない世代へ変わりつつあり、食の歴史を考える上でも救荒植物として史実に残った植物を後世に残したい思いでつづつた植物誌です。

◆身近な雑草を起点として救荒植物と接することができるように、草本植物を主に取りあげ、記載しました。

全国農村教育協会
<http://www.zennokyo.co.jp>
 〒110-0016 東京都台東区台東1-26-6
 TEL.03-3839-9160 FAX.03-3833-1665

救荒雑草 [飢えを救った雑草たち]
 著者/佐合 隆一
 A5判 192ページ
 (内カラー口絵32p)
 本体価格1,800円