

研究終了報告書

「花の構造色を呈する微細構造 -フォトンクス農業実現のための基盤構築-」

研究期間：2021年10月～2024年3月

研究者：越水 静

1. 研究のねらい

農業は、農作物の安定的な生産や、世界の食料需要を満たすために不可欠であるが、水質汚染、生物多様性の破壊、人体への健康被害など、環境汚染物質としての悪影響が問題になっている [Tang et al., 2021]。研究代表者はこの問題に対し、植物成長調整剤や殺虫剤などの農薬を使用しない新体系「フォトンクス農業」を提案する。具体的には、これまでほとんど研究がなされていない「花の構造色」に着目し、構造色発色に必要な微細構造形成メカニズムの解明と、その知見を利用することによって構造色を発色する植物の分子デザイン技術の開発を目指す。これにより「農薬不要の作物」の実現が期待できる。

まず初めに構造色とは、物質そのものが色素を持たないにも関わらず、物体表面の微細構造によって生じる色のことである。構造色の例として、コンパクトディスク(CD)や、昆虫の翅(モルフォチョウやタマムシ)が挙げられる。構造色は植物の花弁にも発見されており、構造色を示す花弁細胞の断面を観察すると、微細な突起(幅 $1\mu\text{m}$ 以下)が1細胞に複数形成されている(図1)。この微細な凹凸構造により光が回折・干渉し、構造色が発色する。

花弁の構造色は、ハチ(花粉媒介者)を誘引することが示唆されている [Moyroud et al, 2017]。このことは、ハチの誘引性を利用した「着果剤や人工授粉の不要な作物の開発」だけでなく、害虫が好まない構造色の付加による「農薬不要作物の開発」に繋がる可能性を示唆する。また、構造色は衣料や食品加工などで産業利用が盛んであるが、セルロースやクチンなどを主成分とする植物細胞由来の構造色は、人体にとって非アレルギー性の安全分子であるだけでなく、再生可能な生物資源として循環型経済への貢献も期待できる。しかし、構造色を呈する微細構造の形成メカニズムの知見は皆無であった。

本研究では、花の構造色を農業・産業に応用することを目的とし、ギンセンカ(*Hibiscus trionum*, 図1)をモデルとした構造色を呈する微細構造の形成メカニズム解明を行う。

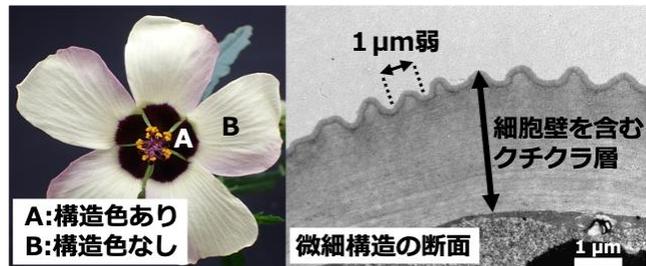


図1. 花弁の構造色微細構造

2. 研究成果

(1) 概要

ギンセンカは1枚の花弁で構造色を発色する部分と発色しない部分を作り分ける植物である(前項図1左)。研究代表者は、ギンセンカを研究材料とし、構造色を将来発色する領域と発色しない領域を用いた RNA-seq 解析を ACT-X の研究を開始する以前に実施しており、構造色発色に必要な微細構造形成に関わる候補因子を絞り込んでいた。まずそれら候補因子をゲノム編集にてノックアウトする計画であったため、ゲノム編集に必要なオフターゲット予測に使用するゲノム配列の決定が、取り組むべき最初の課題であった。しかしながら、これまで実験に使用していた系統が四倍体であることがわかり、急遽、二倍体の系統を探ることとなった。

日本全国からギンセンカを集めて調査した結果、二倍体のギンセンカ系統を発見できたが、ギンセンカには多量の多糖類が含まれているため、ロングリードシーケンスのための高分子ゲノム DNA の抽出が困難な状況であった。さまざまな工夫を重ねた末、解決に成功し、領域内アドバイザーの研究グループとの共同研究にてゲノム配列決定を行った。次に、得られたゲノム

配列上に存在する遺伝子を、RNA-seq データや他種タンパク質配列を用いて予測した。結果、クオリティの高いゲノム配列に加えて、高精度の遺伝子予測をすることに成功した。また、BLAST、PlantTFDB、InterPro、OrthoFinder などを用いて遺伝子の特徴付け(アノテーション付け)も完了させている。

そして、予測した遺伝子配列を用い RNA-seq データの再解析を行った結果、ACT-X 研究開始前より得ていた候補因子とは全く異なる、かつ、より信憑性の高い候補因子を絞り込むことに成功した。下記(2)にて詳細を述べる 3 遺伝子が最も有力な候補であり、3 つ全てがモデル植物であるシロイヌナズナ花卉にて微細構造の形成に関わることが示されている。候補因子の絞り込みの際、初めは 6000 もの遺伝子が検出されてしまったが、これまでの経験を活かして閾値の再決定や条件付けを行い、候補因子の絞り込みに成功している。

また、構造色を発色する微細構造の有無について、偏光を観察することにより簡便に評価することができる装置の開発に関わった他、ACT-X 内での共同研究により微細構造が形成されるクチクラ層の物性の評価にも成功しつつある。

(2) 詳細

研究テーマ1 「ギンセンカのゲノム配列決定」

上記概要にて記載の通り、候補因子のゲノム編集を行うために必要なゲノム配列決定にまず取り掛かった。ギンセンカは二倍体と四倍体どちらの系統も報告があり、四倍体では遺伝子のノックアウトが困難になるため、元より二倍体の報告があった植物園よりギンセンカを取り寄せ使用していたが、k-mer 解析の結果、四倍体であることが発覚した。そこで日本全国の植物園や園芸店から種子を取り寄せ、核相解析とフローサイトメーターによる倍数性解析を行った。そして、二倍体のギンセンカ系統を発見するに至った。ゲノム配列決定は、ヘテロ性が高いと難度が増すため、自殖操作を 3 世代に渡り繰り返すことでホモ接合の割合を増やし、ゲノムシーケンスに使用する個体を用意した。また、ギンセンカには多量の多糖類が含まれており、ロングリードシーケンス用の高分子ゲノム DNA の抽出が困難を極めた。しかしながら、様々な工夫を行い、最終的にはソルビトールを含む洗浄 buffer を用いることで抽出に成功した。ゲノム配列決定に必要なロングリードシーケンスおよび配列構築は領域内アドバイザーの研究グループとの共同研究にて行い、高品質のゲノム配列を得ることができた。10 Mb を超える contig は 45 配列であり、二倍体のギンセンカの染色体数は 28 本のため、リード配列同士の繋がり是非常に良い。また含まれるコア遺伝子も 99% と非常に高かった。なお、ゲノム配列の主な使用目的であるゲノム編集時のオフターゲット予測には、十分すぎるクオリティである。

研究テーマ2 「微細構造形成に関わる因子の推定」

RNA-seq データの再解析によって有力な候補因子を絞り込むことに成功した。下記に詳しく述べる。

研究テーマ1にて得られたギンセンカのゲノム配列を用い、まずはゲノム配列上の遺伝子を予測した。予測にはギンセンカの RNA-seq データと他植物種のタンパク質配列を用い、BRAKER2 を使用して行った。その結果、予測した約 53000 遺伝子中に含まれるコア遺伝子の割合は 98% となり、高精度の遺伝子配列を得ることに成功した。また BLAST、PlantTFDB、InterPro、OrthoFinder などを用いて遺伝子の特徴付けも完了している。

得られた遺伝子配列を用い RNA-seq データを再解析した結果、ACT-X 研究開始前より得ていた候補因子とは全く異なる、かつ、より信憑性の高い候補因子を絞り込むことに成功した。次の 3 遺伝子が最も有力な候補である。

- ・ *SHINE1*: 植物のクチクラ形成に関わる転写因子。
- ・ *CUTIN SYNTHASE 2*: クチクラ成分の 1 つであるクチンの合成因子。
- ・ *CYP77A* ファミリー遺伝子: 同じクチンの合成に関わる因子。

これら全てがモデル植物であるシロイヌナズナ花卉に存在する放射状の微細構造形成に関わることが示されており、植物のクチクラ成分の 1 つであるクチンの合成に関与することがわかっ

ている。このことから、これら 3 因子が微細構造形成に関わる可能性が非常に高く、重要な成分がクチンであることも見えてきた。

また、今回解析した RNA-seq データは構造色を示す/示さない領域の 2 群間比較であるが、通常 RNA-seq の 2 群間比較では、発現変動遺伝子が数千単位で検出されてしまう。今回も 6000 もの遺伝子が候補因子として検出されたが、これまでの経験を活かし、fold-change や FDR などの閾値の再設定や条件付け、付加したアノテーションによる精査の結果、絞り込みに成功している。

その他の研究成果

微細構造は通常、走査型電子顕微鏡にて観察しているが、真空状態への移行に時間を要する。そこで研究代表者は共同研究にて簡便に偏光観察することができる安価な装置 P-MIRU による観察を行った。その結果、観察時間の大幅削減に成功した。構造色を示す微細構造など、微小な凹凸構造に光が当たると偏光が起きる。そのため、偏光を観察する装置によって、凹凸構造の有無を確認可能である。P-MIRU は小型 PC の Raspberry Pi にカメラと偏光板を取り付けた非常に安価で手軽に作成できる装置であり、高価な解析用カメラ等は全く必要ない。P-MIRU にて偏光の観察条件を検討した結果、構造色をもつ領域にて強い偏光を短時間かつ簡便に観察することができた。この方法を用いれば、今後微細構造の変異体を素早くスクリーニングすることが可能である。

その他、領域内の共同研究によって微細構造形成に関わる重要な知見も得られつつある。

3. 今後の展開

研究代表者は、応用研究と基礎研究、どちらにも本研究を発展させる予定である。

【応用研究: 花の構造色の農業への応用】

上述のように、花の構造色はハチを誘引することが知られている [Moyroud et al., 2017]。本研究において、構造色の発色に必要な微細構造の形成メカニズムが明らかになれば、構造色を持つ植物をデザインするという新技術の開発が可能となり、ハチの誘引性を利用することで、着果剤使用や人工交配に依存する他殖性作物の受粉作業の大幅な削減も可能となる。また害虫が好まない構造色の付加によって、農薬不要作物の開発への貢献も期待できる。

【基礎研究: 昆虫との相互作用と収斂進化の解明】

花の構造色は、様々な被子植物において系統的に分散して観察される他、ハチの誘引性があり、袋状の花など花弁の裏側がよく見える花の場合、花弁の裏側に構造色が観察される。これらのことから、花の構造色は、花粉媒介を促進するための収斂進化と考えられている [Moyroud et al., 2017]。本研究にて、シロイヌナズナにおいて微細構造の形成に関与する遺伝子のオーソログがギンセンカにおいても有力な微細構造形成因子として浮上してきた。このことから、微細構造を形成する分子メカニズムは植物間で共通のものを使用している可能性が高いと考えている。今後、微細構造の形成に関わる因子を明らかにするとともに、昆虫の視覚や好みとの関係性も含めて解析することによって、収斂進化の可能性の有無や生物間相互作用による共進化に迫ることができると期待される。

4. 自己評価

研究期間内に候補因子の機能解析まで行いたかったが、研究計画進行中にいくつかの困難に直面し、その解決に時間が割かれたためタイムオーバーとなった。しかし、それらの問題は自身のアイデアと不屈の精神により解決し、その結果、上述の研究成果を得ることに成功した。これらの成果は、上記の「今後の展開」に繋がるものであり、それが実現すれば、着果剤使用や受粉作業の大幅な削減も可能となるほか、農薬不要作物の開発にも貢献できる可能性を秘めている。故に、限られた時間の中でこれらの成果を得られたことを評価したい。

また、ACT-X 内での共同研究により良い成果が得られつつある。ACT-X という様々な分野の研究者が集まる環境下で、その利点を活かし研究できたことは大変貴重な経験であった。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. **Shizuka Koshimizu***, Sachiko Masuda, Arisa Shibata, Takayoshi Ishii, Ken Shirasu, Atsushi Hoshino, Masanori Arita. Genome and transcriptome analyses reveal genes involved in the formation of fine ridges on petal epidermal cells in *Hibiscus trionum*. *DNA Research*. 2023, 30(5), dsad019. ***責任著者**

概要: ギンセンカ(*Hibiscus trionum*)は、花卉に構造色を持つ植物の1つである。著者らはギンセンカのゲノム解析やトランスクリプトーム解析を行った結果、構造色の発色に必要な微細構造の形成に関わる因子の絞り込みに成功した。絞り込んだ主な因子は次の3つである。*SHINE1*, *CUTIN SYNTHASE 2*, *CYP77A* ファミリー遺伝子。これらの因子は、シロイヌナズナ花卉の微細構造形成への関与が知られているため、ギンセンカの微細構造形成にも関与する可能性が高い。

2. Alfonso Balandra, Yuki Doll, Shogo Hirose, Tomoaki Kajiwara, Zendai Kashino, Masahiko Inami, **Shizuka Koshimizu**, Hidehiro Fukaki, Masaaki K Watahiki. P-MIRU, a polarized-spectral imaging system, reveals reflection information on the biological surface. *Plant and Cell Physiology*. 2023, pcad045

概要: 生体表面からの反射光は、色素組成や分布、組織構造、表面微細構造など、膨大な情報を持っている。しかし、私たちの目は光の偏光に対する感度をほとんど持たない他、既存の解析システムは非常に高価である。そこで我々は、反射光のマルチスペクトルおよび偏光イメージングシステムであるP-MIRUを安価な材料によって開発した。P-MIRUによって、可視/非可視波長のマルチスペクトル反射の観察に成功し、様々な表面表現型を解析可能とした。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. **越水静**, 花の構造色: 発色に必要な微細構造形成に迫る, 日本植物学会 第6回一般向け講演会, 2023年12月3日(招待講演)
2. **越水静**, 植物の生殖における進化, 宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター 学内公開セミナー, 2022年7月19日(招待講演)
3. **越水静**, 花の構造色を呈する微細構造 -フォトニクス農業実現のための基盤構築-, ACT-X「環境とバイオテクノロジー」は 地球環境の危機を救う! II, 2022年4月11日(招待講演)
4. **越水静**, 植物の生殖における進化, 第85回C-Bioセミナー, 2022年1月19日(招待講演)