

『光る花』の開発—観賞手法の改良と実用化に向けて—

佐々木克友*・大坪 憲弘

日本の花き産業では、毎年多数の新しい品種が開発・導入されており、市場レベルでは3000～5000種になるとも言われている。新しい品種の開発ターゲットとしては、花の色、形、配色パターンや香りなどがあげられ、多品目でこれらに関する開発が進められている。遺伝子組換え花きについては、日本国内ではすでに第一種使用が承認されており、遺伝子組換えでなければ実現されなかった青いバラや青いカーネーションが販売されている。このように、花き産業では、バイオテクノロジーが実用に直結した技術となりつつある。これまで主に可視化マーカーとして研究利用されてきた蛍光タンパク質を花きに導入して明瞭かつ簡易に観察可能な『光る花』を開発することは、従来の花き産業の開発ターゲットに存在しなかった『光る』という、新しい価値観への大きな展開（パラダイムシフト）にもつながると期待される。また、研究用途においても、非破壊的かつ簡易な植物体レベルでの遺伝子発現解析手法の開発は、これまでは難しかった時間・空間レベルでの機能解析に貢献する画期的な手法となることが期待される。本稿では、『光る花』作出に到るまでの試行錯誤、観察の効率化および実用化に向けた取組とその展望について解説する。

高発現ベクターを利用した『光る花』の開発

緑色蛍光タンパク質であるGFP (green fluorescent protein) は、2008年に下村修博士がノーベル化学賞を受賞したことで世界的にも広く知られている。GFPなどの蛍光タンパク質については、生物種の由来やアミノ酸変異導入の違いにより、さまざまな色調や蛍光特性を示すものが報告されている^{1,2)}。これまで、蛍光タンパク質は、可視化マーカーとして目的遺伝子の細胞内局在解析や、タンパク質-タンパク質結合解析など、さまざまな研究用途で使用されている。本研究開始当初、蛍光タンパク質は、細胞レベルでの解析手法として広く用いられていたが、植物個体レベルの観察については高感度カメラを必要とするほど光量が弱く、花の観察・観賞に堪えられるほど簡易に観察できる蛍光強度の組換え体は報告されていなかった。我々は花の色、形および配色パターンのバラエティ化を目的とした、遺伝子組換えと重イオンビーム照射の組合せによる新規分子育種手法の開発³⁾や、転写因子機能をドミナントに抑制するキメラリプレッサー技術⁴⁾を用いた分子育種技術の開発^{5,6)}を

主な研究として進めていた。花卉のような薄層組織であっても、蛍光タンパク質がマクロレベル（個体・器官レベル）で簡易に観察できる実験系の確立は、転写因子などの機能解析には非常に有効と考えられた。さらに、遺伝子組換え花きについてはすでに社会受容の実績があることも後押しして、従来の新品種開発のターゲットである色、形や香りに加え、『光（蛍光）』が、花き産業における新しい価値観・トレンドを形成する可能性も期待された。

花きは比較的幅広い品目で遺伝子組換えが可能であるが、一般に流通するすべての品目・品種で組換え手法が確立されている訳ではない。我々は、蛍光タンパク質を導入する素材として、すでにアグロバクテリウム法による遺伝子組換え体の作出手法が確立されていたトレンニア (*Torenia fournieri*)⁷⁾の白花系統を用いた。トレンニアはアゼトウガラシ科の一年生植物であり、暑さに強いことから夏の花として一般に流通している。また、他の花きでは、組換え開始から開花に到るまで1年程度（またはそれ以上）を必要とする一方、トレンニアは4～5か月程度と短い期間で開花することから、近年、花のモデル植物としての利用が進んでいる。導入する蛍光タンパク質遺伝子には、市販のオワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来のGFP (AvGFP) 遺伝子を用い、恒常的かつ高発現プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の35Sプロモーターと組み合わせ、AvGFP高発現ベクターを作製した。しかしながら、このベクターを導入した組換えトレンニアでは、蛍光活性はほとんど認められなかった。

AvGFP高発現ベクターの導入によりトレンニアが光らなかつた理由として、AvGFPタンパク質の活性が植物の中で安定性が低かつたこと、また、タンパク質量が充分蓄積しなかつたことなどが推測された。この問題を解決するため、次に、海洋プランクトンの一種であるキリディウス属 (*Chiridius poppei*) 由来の、黄緑色蛍光タンパク質 CpYGFP⁸⁾ (Yellowish-Green Fluorescent Protein) の利用を試みた。CpYGFPは、通常、タンパク質が変性する乾燥や化学処理でも蛍光活性が安定であり、さらにAvGFPと比較して、幅広いpH条件下（植物の細胞内で見られる弱酸性下）でも蛍光活性が保たれるなど、植物利用での利点が認められた。高発現ベクターに用いる他のパーツとしては、タンパク質の高蓄積の実現を目

*著者紹介 (独) 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) E-mail: kattu@affrc.go.jp

的として、翻訳効率を60~100倍近くも活性化するシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の翻訳促進因子であるアルコールデヒドロゲナーゼ (AtADH) の5'UTR⁹⁾を利用した。また、転写産物量の増加を目的として、これまで一般的に用いられていたノパリンシンターゼ (NOS) のターミネーターの代わりに、これより2倍程度mRNAの転写量が上昇するシロイヌナズナのヒートショックプロテインターミネーター (HSPT)¹⁰⁾を用いた。これらを組合せたCpYGFP高発現ベクターをトレニアに導入した結果、AvGFP高発現ベクターでは見られなかった比較的強い蛍光活性が植物体全体で認められた。我々はさらに、CpYGFP高発現ベクターのターミネーターより、1.5倍程度タンパク質量が上昇する新型ターミネーターHSPT878¹¹⁾に置換することで、より蛍光強度を高めた『光る花』の作出を試みた。これについては、CaMV35SプロモーターからHSPT878までの発現ユニットを3重連結した改良型CpYGFP高発現ベクターも作製した(図1A)。これらのベクターをトレニアに導入した結果、これまでになく明瞭かつ簡易的な観察が可能となった世界初の『光る花』の作出に到った(図1B)。

『光る花』観察方法およびその至適化について

蛍光タンパク質はホタルのように自発的に発光する訳ではなく、その観察には、励起光源と蛍光フィルターが必要である。今回用いたCpYGFPは、励起極大509 nmで蛍光極大517 nmとなる黄緑色蛍光を放出する蛍光タンパク質である⁸⁾。これを導入した『光る花』では、青色LED光により励起された蛍光タンパク質が、定常状態に戻る際に放射される黄緑色蛍光が観察される。青色LEDは可視光であるため、蛍光フィルターを介さずに観察した場合は野生型および組換え体どちらも植物全体が青く見えてしまう。そこで、この励起光を遮断して蛍光のみを観察するためのフィルター(青色の補色となるオレンジ色の透明アクリル板など)が必要となる(図2)。

一方、GFP観察などに通常用いられている青色LED光源(極大波長459 nm)と、蛍光フィルターとしての透明オレンジアクリル板の組合せでは、野生型トレニア由来の蛍光が残ってしまう問題があった(図3中央)。その原因となるのは、極大波長459 nmの青色LED光による植物由来の自家蛍光などの励起と推測される。たとえば、クロロフィルを含む葉などの組織では、吸収波長の極大(の一つ)を450 nm付近に有しているため、極大波長459 nmの青色光照射によりクロロフィルが励起されて赤色光が放出されたと考えられる¹²⁾。また、トレニアを含めて紫外光により励起され蛍光を発する色素であるフラボン類やフラボノールを含有する花(花卉)では、吸収極大が350 nm付近ではあるが400 nmを超えた波

長光の照射によっても自家蛍光の放出が見られる¹³⁾。459 nm極大波長の青色LED光源では、これらの自家蛍光の放出を刺激する波長の光量が多いと考えられたことから、光源波長の至適化による自家蛍光の低減化を検討した。CpYGFPは、励起の極大波長(509 nm)と蛍光の極大波長(517 nm)が近いだけでなく、それぞれの波長域が重なっているため、これらの分離は蛍光フィルター単独では困難であると予想された。そこで、459 nm~509 nm間の波長の光源を用いて観察・観賞性を検討することにした。より強い励起が期待できる500 nmの光源を試したが、蛍光との分離が難しかったために、こちらは断念し、その半分くらいの励起でも474 nmを使うことにした。474 nm極大波長のLED光源では、葉で見られた赤色光および花卉における自家蛍光共に低減され、観察性能が向上した。

一方、これらの組合せでも野生型における自家蛍光は、弱いながらも認められた。そこで、『光る花』の蛍光をさらに効果的に観察することを目的として、次に、青色LED光源側に用いる励起フィルターの至適化を検討した。植物由来の自家蛍光の原因となる紫外波長光を光源側で遮断するため、励起フィルターとして、465 nm~475 nm程度の限定的な波長域の光のみを通すバンドパスフィルターと、380 nm~490 nmの波長域を通すバンドパスフィルターを用いて『光る花』を観察した。その結果、組換え体のみ蛍光が観察され、非組換え体における自家蛍光はほぼ完全に除かれた(図3右)。また、これまでは、観察用の蛍光フィルターとして550 nm以上の波長を通す透明オレンジアクリル板を使用していたが、これは蛍光を観察する暗所でもオレンジ色の存在が目立つなど、観賞性に問題があった。現在では、暗所でフィルターの存在を感じさせない520 nm以上の波長を通す透明黄色アクリル板を主に利用している。これら以外にも蛍光フィルターとして、510 nm以上の波長を通し、低波長の光を反射する反射フィルターについても検討している。この反射フィルターは観察性能が非常に良好で、『光る花』がさらにクリアかつシャープに観察されるが、他の蛍光フィルターと比較して価格が非常に高いという難点がある。また、正面からの観察性能に優れている一方、斜めからの観察では青色光が透過してしまうため、野生型および組換え体ともに青く見えてしまうなどの問題が認められた。これらの結果を踏まえ、より簡便・安価で明瞭な蛍光観察を可能とする励起/蛍光フィルターの至適化を進めている。

組換え花きの実用化について

日本では、『遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律』(以下、カルタヘナ法)が2004年の2月から施行されており、組換え体

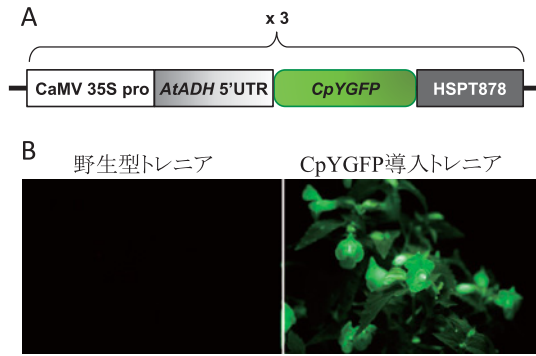


図1. トレニア (*Torenia fournieri*) の白花系統を利用した『光る花』の作出。(A) 『光る花』作出に用いた改良型CpYGFp高発現ベクター。(B) CpYGFpが導入された組換えトレニアでは、野生型では見られない黄緑色の蛍光が観察される。

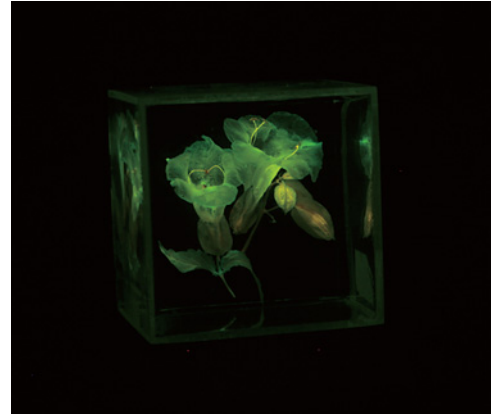


図4. 『光る花』を用いた樹脂封入標本

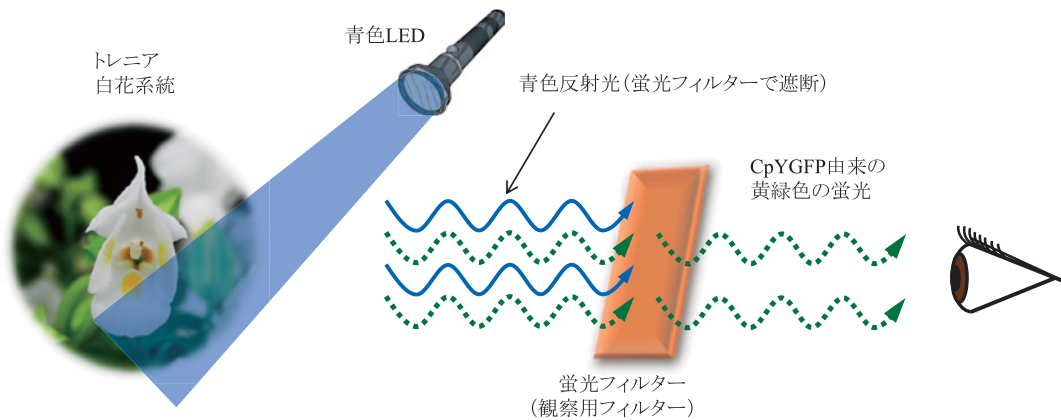


図2. 『光る花』に導入された蛍光タンパク質の観察方法



図3. 『光る花』観察における観察用フィルターの効果. 青色LED (459 nm) と透明オレンジアクリル板による蛍光フィルターの組合せでは、野生型由来の自家蛍光は完全には抑えられない(中央; 上下の比較). 励起フィルターの利用により、その自家蛍光はほとんど抑えられるようになる(右; 上下の比較).

の取扱いにあたってはこれを遵守する必要がある。遺伝子組換え花きの商業利用では青いバラや青いカーネーションなどの実用化例があり、青いカーネーション『アプローズ』が6品種（2014年6月現在）シリーズ販売されている。これらは「第一種使用」（環境中への拡散防止措置をしないで行う使用など、主務大臣の承認）が認められたものであるが、『光る花』も *CpYGFP* 遺伝子が導入された遺伝子組換え植物のため、実用化には使用形態に応じて、「第一種使用」または「第二種使用」の申請が必要となる。『光る花』の親株である *Torenia fournieri* は、インドシナ半島を原産とした品種が流通したものであり、日本国内に交雑可能な野生種がないことが報告されているが¹⁴⁾、他の多くの花きで組換え体の生花を商業利用するためには、導入遺伝子の環境中への拡散などを防止するための不稔化が一つの有効な手段となる。これと同時に、他の花き品目（たとえばキク、バラ、ユリ、カーネーション、トルコギキョウなど）においても、『光る花』の作出が多方面から期待されている。組換え花きの生花利用の申請・承認には、時間を要することが予想されるため、生花以外での早期利用に向けたドライフラワーや樹脂封入など(図4)の開発の検討も進めている。ドライフラワーに関しては、乾燥開始から1年を過ぎても強い蛍光活性が観察されていることから、乾燥条件下でも *CpYGFP* は非常に安定性が高いなど、今後の実用開発が期待される結果が得られている。樹脂封入については、まだ開発途上であり、蛍光強度の維持や封入した花の観賞性の改善が今後の課題と考えている。これらの手法の組合せにより、教材、グッズ、インテリアや展示などの利用について早期の実用化が期待される。

今後の展望

『光る花』の作出の成果については、2013年9月に NECソフト（現NECソリューションイノベータ）、農研機構、インプラントイノベーションズおよび奈良先端大の4者でプレスリリースを行った。『光る花』および *CpYGFP* 発現用ベクターについて、観賞用・研究用の両面の用途で多数の問合せを頂いている。これらについては、筆者らの開発当初の予想を大きく超えた波及効果であること、また、今後についても大きなポテンシャルを秘めていることを実感している。

我々の今後の『光る花』の研究の展望についてであるが、研究面・観賞面の両用途の改良を同時に実現するため、分子生物学的手法で *CpYGFP* 遺伝子の植物体内での発現（または発現部位など）を制御するアプローチを考えている。これまで、植物体を用いた組織レベルにおける目的遺伝子の発現部位の解析には、レポータータンパク質 GUS による組織化学的解析や *in situ* ハイブリダ

イズーション解析など、多くの操作と植物組織の破壊・固定を伴う手法が用いられてきた。改良型 *CpYGFP* 高発現ベクターの利用により、器官または組織レベルのみならず、植物体レベルにおいても非破壊的で、明瞭かつ簡易な観察が可能であることが示された。我々は、ゲノム情報が未知な園芸植物から花卉特異的プロモーターを単離する手法の改良や¹⁵⁾、花卉特異的プロモーターのトレニアにおける利用に関する研究も行っている¹⁶⁾。現在の『光る花』は、蛍光タンパク質の発現に CaMV 35S プロモーターを利用しているため植物体全体で蛍光が観察されるが、花卉特異的プロモーターを利用することで『花卉が（プロモーターによっては部分的に）光る花』の作出が可能となる。また、花器官が部分的に蛍光を帯びるなど、マクロレベルでの目的遺伝子の簡易な発現解析が可能となれば、これまでにない精度・レベルでの目的遺伝子の時間・空間的な機能が予測可能となる画期的な手法になると期待している。

おわりに

『光る花』は、東京上野にある国立科学博物館にて2014年の10月末から約4か月間開催される『ヒカリ展』で展示する予定である。『光る花』の観賞性には、青色 LED 光源の波長、蛍光フィルター、励起フィルターの組合せが重要であり、特に、野生型トレニアと『光る花』との観賞性（見え方）の比較の演出が重要となる。現在は『ヒカリ展』に向けて、多数の関係者の協力のもとに、遺伝子組換え花きの安全な展示と十分な観賞性を同時に満たすための環境設定の検討を進めている。興味のある方は是非、会場まで足を運んで『光る花』をご覧頂きたい。

文 献

- 1) Lippincott-Schwartz, J. and Patterson, G. H.: *Science*, **300**, 87 (2003).
- 2) Patterson, G. H.: *Curr. Protoc. Cytom.*, Chapter 12: Unit 12.23 (2011).
- 3) Sasaki, K. *et al.*: *Plant Biotechnol.*, **25**, 81 (2008).
- 4) Hiratsu, K. *et al.*: *Plant J.*, **34**, 733 (2003).
- 5) Shikata, M. *et al.*: *Plant Biotechnol.*, **28**, 189 (2011).
- 6) Mitsuda, N. *et al.*: *Plant Biotechnol.*, **28**, 123 (2011).
- 7) Aida, R. and Shibata, M.: *Breed. Sci.*, **45**, 71 (1995).
- 8) Masuda, H. *et al.*: *Gene*, **372**, 18 (2006).
- 9) Sugio, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 300 (2008).
- 10) Nagaya, S. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **51**, 328 (2010).
- 11) Matsui, T. *et al.*: *Plant Biotechnol.*, **31**, 191 (2014).
- 12) Porcar-Castell, A. *et al.*: *J. Exp. Bot.*, in press (2014).
- 13) Smith, G. J. and Markham, K. R.: *J. Photochem. Photobiol. A*, **118**, 99 (1998).
- 14) 宮崎 潔ら: 植物環境工学, **19**, 66 (2007).
- 15) Kasajima, I. *et al.*: *Sci. Hortic.*, **164**: 65 (2013).
- 16) Sasaki, K. *et al.*: *Plant Biotechnol.*, **28**: 181 (2011).