

令和元年6月18日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07301

研究課題名(和文) オリエンタルハイブリッド起源種の多様性解析およびユリの栽培化に関わる遺伝子の探索

研究課題名(英文) Genetic variability of ancestral species of Oriental hybrid lilies and their domestication genes

研究代表者

半田 高 (HANDA, TAKASHI)

明治大学・農学部・専任教授

研究者番号：00192708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：オリエンタルハイブリッドの起源であるユリ属Archelirion節植物について自生地集団における形態調査とSSR解析を行った。その結果、各野生種の形態的・遺伝的多様性、種間の類縁関係、各集団の遺伝構造などが明らかとなった。また、野生種各地域集団と一部品種群との関係性も明らかになった。花弁の部位特異的色素蓄積を明らかにするため、'Dizzy'の花弁中肋赤筋におけるアントシアニン合成・輸送に関わる遺伝子の発現量を調べた結果、MYB12が赤筋の主な転写因子であることが分かった。このMYB12遺伝子は塩基配列が一致したことからヤマユリ由来と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ユリの園芸品種群「オリエンタルハイブリッド」の成立に重要な日本固有のArchelirion節植物の野生集団における遺伝的多様性を詳細に調べた。これは、野生集団の保全や復元のガイドラインを作成する上で基礎的情報となる。また、野生種地域集団と品種の比較により、起源種や起源集団の推定が可能になり、今後のユリ育種における未利用遺伝資源の探索が容易になる。さらに、本研究でユリの花色合成に関する転写調節遺伝子が明らかにされたことにより、遺伝子情報に基づく育種計画が策定できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated species of wild population in the genus *Lilium* section Archelirion by using morphological data and SSR analysis. As a result, their genetic diversity, interspecific relations, heredity structure were revealed. In addition, the ancestral species of some oriental hybrid cultivars is becoming clear.

To clarify the accumulation of the site-specific pigmentation in petal, reddish mid rib of 'Dizzy' was used for analysis. Several genes were isolated and they were related to anthocyanin biosynthesis and transportation. Within them, three R2R3-MYB genes were strongly expressed in reddish mid rib and MYB12 was a main transcription factor of this pigmentation. By comparison with sequence analysis of the MYB12 in section Archelirion, this MYB12 was derived from *L. auratum*.

研究分野：花卉園芸学

キーワード：ユリ オリエンタルハイブリッド 遺伝資源 遺伝的多様性 栽培化 アントシアニン合成酵素 転写調節因子 MYB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「オリエンタルハイブリッド」の成立に関わったユリ属 *Archelirion* 節植物は、その殆どが日本に自生する固有種である、本節植物は大型の花冠、多彩な花色、強い芳香などの魅力的な観賞形質を持つことから、ユリの育種において極めて重要な役割を果たしてきた。本節内の種・変種内の多様性に関しての詳細な研究は殆ど行われてこなかったことから、多様性に関しての詳細は不明である。また、ユリの栽培化や育種目標において重要な形質である花色について、分担研究者の山岸は「オリエンタルハイブリッド」における花被全体の花色や花被突起の色(スポット)がアントシアニンの蓄積による結果であることを明らかにしたことから、さらなる解析が求められている。

2. 研究の目的

Archelirion 節植物は「オリエンタルハイブリッド」の主要な交配親であり、我が国における重要な花卉遺伝資源であるが、自生地の野生集団は急激に減少しており、多様性を保った保全が緊急に求められている。また、ユリの栽培化や育種上の重要形質に関する遺伝子はこれまでごく一部しか明らかにされていない。本研究では「オリエンタルハイブリッド」の育種に利用された *Archelirion* 節植物の遺伝的多様性と未利用遺伝資源の探索を行うと共に、ユリの栽培化や育種目標において重要な形質に関わる有用遺伝子を推定することを目的とする。

3. 研究の方法

Archelirion 節植物の野生集団由来個体は、自生地における形態調査を行うと共に DNA 分析用に植物体の一部を採取する。栽培化に関わる遺伝子の探索には、これら以外に交配系統も用いる。形態調査は多変量解析を用いた計算を行う。遺伝的多様性に関する DNA 分析は、SSR 分析と葉緑体マーカーによる多型解析を行う。栽培化に関係する遺伝子の探索には、次世代シーケンサーによる網羅的解析で得られる候補遺伝子の特定と発現解析を行う。

4. 研究成果

Archelirion 節の基本種で東日本に広く分布しているヤマユリに対して、形態調査と SSR マーカーを用いて遺伝的多様性を解析した。SSR マーカーを用いた解析の結果、集団内で近親交配がどの程度行われているのか推定する為の目安となる近交係数は、逗子集団が最小値-0.061、大阪集団が最大値 0.292 であった。対立遺伝子の多様性の指標となる Allelic Richness は、秋田集団が最小値 1.849、三浦(神奈川)集団が最大値 4.007 となった。集団間の遺伝的分化を表す Pairwise F_{st} と地理的距離との相関はある程度見られたが、5%水準での有為性は見られなかった。クラスター解析と主座標分析では、秋田、岩手、新潟の集団が他地域の集団より特異的であった。以上の結果から、ヤマユリは形態的には地域差が明確でないが、東北および新潟集団で遺伝的分化が大きい事が明らかになった。

ヤマユリの変種でユリ属最大の花を咲かせるサクユリについて、遺伝的多様性とヤマユリとの類縁関係を調べた結果からはヤマユリは花被に赤色斑点のみを有するが、サクユリは赤色斑点のみでなく黄色斑点の両方を有することでヤマユリとは区別はされ、また、サクユリ内では伊豆諸島最南端の青ヶ島集団のサクユリは黄色斑点のみを有することから明確に他島の集団とは異なった。SSR マーカーを用いた多様性解析の結果、サクユリの H_o は 0.15 から 0.38、 H_e は 0.43 から 0.59、 F_{is} は 0.18 から 0.66 となり、集団によってはヤマユリより高い自殖傾向にあることが明らかになった。また、本州のヤマユリ集団とはストラクチャー解析およびクラスター解析で遠縁な結果を示し、両種の種間での自然交雑は起きていないと推定された。また、サクユリ各集団間の F_{st} 値は 0.05 から 0.50 と高く、伊豆諸島内での遺伝的分化が進んでいることが示唆され、特に青ヶ島集団は花被の斑点が黄色のみであり、集団間の遺伝的分化を表す F_{st} 値がどの集団とも大きい点から特異的と考えられた。

桃色の花被を持ちそれぞれ西日本と東北地方に自生するヒメサクユリとササクユリにおいて同様に解析を行った結果、南会津町と三条の集団は他集団より雄蕊の長さが長い傾向にあり、主成分分析の結果、南会津町と三条の個体は第 1 主成分が大きくまとまる傾向にあった。SSR 解析の結果、 F_{is} 値は西会津と三条で高い傾向にあり、Allelic richness は南会津、西会津、三条でやや高い傾向にあった。 H_e についても南会津、西会津、三条で高い傾向にあった。 F_{st} は新発田と村上集団の間を除いて有為となり、0.05 以上であることから集団間の遺伝的分化が認められた。クラスター解析の結果、南会津が先ず分かれ、次に、三条の集団が分かれた。地理的に近い集団はクラスターが隣り合う傾向にあった。次に、公開データベースをもとに設計した 3 ペアの葉緑体 SSR プライマーを用いてハプロタイプを決定した。その結果、10 個の葉緑体ハプロタイプが得られた。核 EST および葉緑体の両方の SSR マーカーを用いた解析の結果、南会津と三条集団は、他地域の集団とは高度に分化していることが確認された。また、ヒメサクユリの近縁種とされるササクユリとは遺伝距離が大きく離れ、ハプロタイプも異なる結果となった。

鮮やかな赤い花色を持ち、九州地方の 1 部地域と台湾に自生するカノコユリの SSR マーカーを用いた解析の結果、 H_o は 0.23 から 0.56、 F_{is} 値は -0.125 から 0.588 であり、遺伝的分化を表す F_{st} 値は、甌島の集団間で低く、甌島の集団間では遺伝的な差がほとんどないと推定された、一方甌島と佐世保の集団間では 0.34 から 0.41 と高度な分化が見られた。また、九州各集団と台湾集団との間では F_{st} 値が 0.59~0.68 と非常に高度な分化が見られた。クラスター

解析の結果も同様に、台湾集団と日本の甌島の集団が大きく分かれたが、佐世保集団は甌島集団の中に含まれた。

絶滅危惧種で残存個体数が限られているタモトコリとウケコリにおける SSR 解析の結果、タモトコリは 10 個体のうち 9 個体では遺伝子型に差が見られず、7 ヶ所の遺伝子座のうち 6 ヶ所はホモ接合のみの対立遺伝子座を持っていたことから H_o と H_e は 0.11 となり、今回材料に用いたタモトコリはほとんど遺伝的多様性がないと考えられた。一方、ウケコリ 6 個体の遺伝子型は個体ごとに異なり、 H_e は 0.50 となり、栽培個体であってもタモトコリより遺伝的多様性を保持していると考えられる。

ササコリとヤマコリの自然交雑種と考えられ、伊豆半島のみで自生するイズコリの解析の結果、雑種でのササコリに類似するイズコリ集団は、ササコリより開花期が遅く、花被に突起が見られる点が伊豆半島のササコリと異なった。雑種でヤマコリとササコリの間型の形質を持つイズコリ集団は花被に突起と斑点を持つ個体が見られ、葉幅などは中間的な大きさを示した。SSR 解析では、ストラクチャー解析の結果、ササコリとヤマコリはクラスター分配確率が明確に分かれたが、イズコリでは両種のクラスターが混在する個体が見られた。葉緑体 SSR 解析は、ヤマコリでは 1 種類のハプロタイプのみ得られ、イズコリとササコリでは 2 種類のハプロタイプが得られた。これらの結果および各集団の分布から、形態および核 DNA はササコリの集団であっても、葉緑体 DNA はヤマコリである個体が存在することと、種間交雑は伊豆諸島南部が中心であることが示唆された。

Archelirion 節植物から育種された園芸品種群「オリエンタルハイブリッド」および園芸品種群「OT ハイブリッド」の解析を行った。「オリエンタルハイブリッド 52 品種」「OT ハイブリッド」17 品種の合計 69 品種を用い EST-SSR 解析を行った結果、クラスター 1 と 2 への分配確率が高いグループ A、クラスター 3 への分配確率が高いグループ B、クラスター 4 への分配確率が高いグループ C の 3 つグループに大きくグループを分けることが出来たが、「オリエンタルハイブリッド」と「OT ハイブリッド」は明確には区別出来なかった。また、ヤマコリ節 6 種計 443 個体と「オリエンタルハイブリッド」52 品種を用いた EST-SSR 解析を行い、ストラクチャー解析を行った結果、「オリエンタルハイブリッド」のストラクチャー分配確率はサコリ、ヤマコリと類似した傾向の品種が多く見られた。

総合的に Archelirion 節各種の遺伝的多様性を比較した結果 種ごとに異なるが H_o と H_e の比較から、Archelirion 節植物は自家受粉と他家受粉の両方を行う植物であることが考えられる。また、タモトコリは実生で維持されているが、遺伝子座のホモ接合度が高いことから近交弱勢がおきている可能性もある。種内の遺伝的変異については、遺伝的分化は集団間の距離との相関が見られる場合が多いこと、特に集団間が海で分断される隔離により、遺伝的分化が進むことが示唆された。また、EST-SSR マーカーを用いた系統樹と葉緑体 SSR マーカーを用いた系統樹の比較より、タモトコリとウケコリは核 EST-SSR と葉緑体 SSR の両方ではカノコリと近縁であること、ヤマコリ、サコリ、ササコリ、ヒメサコリは核 EST-SSR と葉緑体 SSR では系統樹に不一致が見られたが、これはササコリとヤマコリにはイズコリのような自然交雑集団があり、節内でこれらの種が近縁であることに起因すると考えられる。以上の結果より、Archelirion 節はカノコリ、ウケコリ、タモトコリからなる南西部に自生するグループとヤマコリとその変種サコリ、ササコリ、ヒメサコリからなる本州に自生する 2 つのグループに大きく分けることができた。また、Archelirion 節植物をもとに成立した「オリエンタルハイブリッド」などの園芸品種は核 SSR の結果より本州のグループと近縁であることが分かった。以上の成果は日本の固有種で構成される Archelirion 節植物の自生地保全のガイドラインを構築する上で重要な基礎的情報を提供すると共に、コリの育種において形態形質や遺伝的多様性において未利用の遺伝資源の存在を提示することができると考えられる。

栽培化に関わる遺伝子の探索では、花の色模様における部位特異的な色素の蓄積がどのように起こるのかを明らかにするため、次世代シーケンサを用いてアントシアニン生合成と輸送に関わる遺伝子をほぼ一揃い単離し、RNA-seq で発現量を調べた結果、これら遺伝子のほとんどは赤筋で強く発現していたことから、「Dizzy」花卉の赤い筋はこれらの転写調節に起因すると考えられた。そこで、アントシアニン生合成遺伝子の発現調節に関わる転写因子を調査した結果、「3 つの Subgroup 6 R2R3-MYB 遺伝子が発現しており、その内 MYB12 の発現が最も強く赤筋で発現量が高かったことから、MYB12 が赤筋の主な転写因子であることが分かった。花卉全体で発現している MYB12 遺伝子はカノコリとオトメコリ由来であるが、「Dizzy」の MYB12 遺伝子はヤマコリの変種「紅筋」のものと塩基配列が一致したことからヤマコリ由来と考えられた。また、カノコリ・オトメコリとヤマコリの MYB12 オーソログ遺伝子は発現様式が異なると考えられた。本研究でコリの花色合成に関する転写調節遺伝子が明らかにされたことにより、遺伝子情報に基づく育種計画が策定できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Yamamoto, S., T. Kikuchi, Y. Yamagiwa and T. Handa. Genetic Diversity of *Lilium auratum* var. *platyphyllum* Endemic to the Izu Archipelago and its Relationship to a Nearby Population of *L. auratum* var. *auratum* by Morphological and SSR Analysis. Hort.J. 86: 379-388. 2017

Yamamoto, S., Y. Yamagiwa, Z. Inaba and T. Handa. Morphological and simple sequence repeat analysis to clarify the diversity of natural *Lilium japonicum* and *L. auratum* hybrids in the hybrid zone of the Izu peninsula, Japan. Hort. J. 87: 115-123. 2018
Yamagishi, M., H. Uchiyama and T. Handa. Floral pigmentation pattern in Oriental hybrid lily (*Lilium* spp.) cultivar 'Dizzy' is caused by transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis genes. J. Plant Physiol. 228: 58-91. 2018

〔学会発表〕(計 6 件)

Yamamoto, S., K. Yamashita, A. Koganei and T. Handa. Morphological and genetic differences among wild populations of *Lilium auratum* in Japan. XII International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials (Kumming, China) 2016
山本将・宮谷真徳・半田高, SSR マーカーに基づくオリエンタルハイブリッドと *Archelirion* (ヤマユリ節) の類縁関係の推定. 園芸学研究 15 別 2: 482 (名城大学) 2016
山本将・糸川一也・久原泰雅・半田高. 形態調査と核および葉緑体 SSR マーカーを用いたヒメサユリの遺伝的多様性解析. 園芸学研究 16 別 1: 411 (日本大学) 2017
山本将・山際豊・稲葉善太郎・菊地哲理・半田高. 葉緑体 SSR マーカーを用いた伊豆半島のヤマユリ, ササユリ, 交雑種イズユリと伊豆半島のササユリの遺伝的多様性解析. 園芸学研究 16 別 2: 535 (酪農学園大) 2017
Yamamoto, H., S. Yamamoto, M. Miyashita and T. Handa. Analysis of genetic diversity of *Hydrangea macrophylla* by nuclear SSR markers. Plant Genome Evolution (Sitges, Spain) 2017
山本将・黄木裕平・平城望・山田結絵・糸川一也・久原泰雅・半田高. 核および葉緑体 SSR マーカーを用いたヒメサユリと近縁地域のササユリの関係性の評価. 園芸学研究 17 別 1: 221 (近畿大学) 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 山岸真澄

ローマ字氏名: YAMAGISHI MASUMI

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 農学研究科

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 40210348

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。