

平成 30 年 4 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18638

研究課題名(和文) 栄養繁殖個体間において形質の不均一性を引き起こすエピジェネティクス

研究課題名(英文) Epigenetics associated with phenotypic lability among vegetatively propagated plants

研究代表者

大野 翔 (Ohno, Sho)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：10722001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：赤白複色花ダリア‘結納’では、栄養繁殖後代の個体間において花弁色や葉のフラボノイド蓄積の有無に形質の不均一性が見られる。siRNAのマッピング解析などから、この不均一性にはDvCHS2の転写後遺伝子サイレンシングの有無が重要であることを明らかにした。また、ゲノムの解析から複色花品種では単色花品種と比較して約2倍のDvCHS2ゲノムを有することが示唆された。さらに、葉に蓄積しているフラボノイドの同定からもこの不均一性におけるCHSの重要性が確認された。そして、葉のフラボノイドの有無を指標とすることにより、安定的に品種本来の複色花のみをつける個体を選抜できる可能性が考えられた。

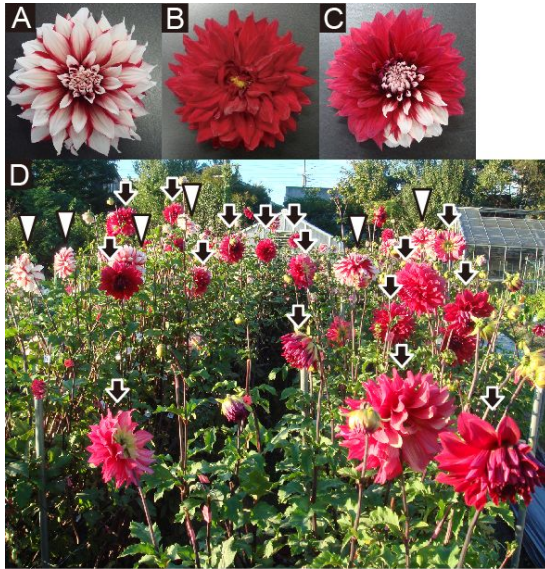
研究成果の概要(英文)：Petal color lability is a prominent feature of bicolor dahlia cultivars, that causes plants to produce not only original bicolor petals with colored bases and pure white tips, but also frequently single-colored petals without white tips. In this study, we analyzed the molecular mechanisms that are associated with petal color lability using the red-white bicolor cultivar ‘Yuino’. Molecular biological analyses such as qRT-PCR and small RNA mapping analysis, suggest that post-transcriptional gene silencing of DvCHS2 plays a key role in phenotypic lability in this bicolor dahlia. Genomic analysis also suggested that DvCHS2 is the key gene involved in bicolor formation. Identification of flavonoids in leaves also confirms the importance of chalcone synthase for phenotypic lability in ‘Yuino’. And, by using the presence or absence of leaf flavonoid as an indicator, it was suggested that plants producing only original bicolor petals could be selected.

研究分野：園芸学

キーワード：ダリア 花色 カルコン合成酵素 フラボノイド 転写後遺伝子サイレンシング siRNA 栄養繁殖 不安定性

1. 研究開始当初の背景

ダリア (*Dahlia variabilis*) の複色花品種の栄養繁殖後代は個体間で不均一な花弁色を示すことが知られている。本来の花弁色は着色部と白色部を合わせ持つ複色であるが(第1図A) 長年の繁殖を繰り返していると単色の花序(第1図B)あるいは花序においてセクター状に単色花弁をつける花序(第1図C)を頻繁に生じるようになっていわれている。



第1図 赤白複色花ダリア'結納'

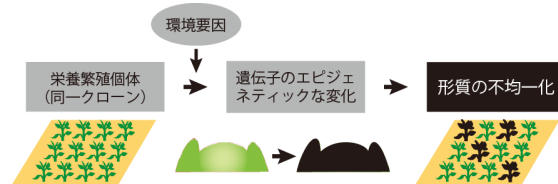
A: 複色花 B: 赤単色花
C: 単色部をセクター状に生じた花
D: 栽培風景 矢尻は複色花を、矢印は赤色花を示す

'結納'は申請者が20以上の複色花品種の中から選び出した、単色花弁の発生頻度が高かった品種である。'結納'の品種本来の花弁色は赤白複色花であるが、栽培すると頻繁に赤色花弁を生じた(第1図D)。赤色花弁は、複色花弁の白色部が縮小して赤くなったものとは違って、白色部を一切生じないため、複色花弁とは完全に異なる。'結納'の赤色花弁のみを生じたシュートから挿し木苗を繁殖したところ、赤色花弁を高頻度で生じた一方で、頻度は高くないが複色花弁も生じたことから、赤色花弁と複色花弁の発生は可逆的な反応であることが示唆された(大野ら、2014、園芸学会)。よって、複色花ダリアの繁殖後代において赤色花弁を生じた原因には、遺伝子の突然変異ではなくエピジェネティックな変異が関与していると考えられた。

シュートにも違いがあるかを調査するために、葉におけるフラボノイド蓄積を比較したところ、赤色花序個体ではフラボノイドを蓄積していたが、複色花序個体ではフラボノイドを蓄積していない傾向が見られた。したがって、花弁色だけでなく個体そのもの、すなわち茎頂分裂組織がエピジェネティックに変化していることが示唆された。さらに、赤色花弁の発生には夏季に多く冬季に少な

いという明白な季節的偏りが見られたことから、エピジェネティックな変化に環境因子が関与することが示唆された。

以上より、'結納'に見られた現象をまとめると第2図のようになると考えた。すなわち、栄養繁殖後代に環境因子が作用することで遺伝子のエピジェネティックな変化が誘起され、形質の不均一化が引き起こされる、ということである。'結納'では形質の不均一化は花色の違いや葉におけるフラボノイド蓄積の有無として生じていると考えられる。



第2図 本研究の概念図

2. 研究の目的

本研究では、'結納'を用いて栄養繁殖後代の形質の不均一性を引き起こすエピジェネティックなメカニズムを明らかにすることを目的とする。

(1) 形質の不安定化現象の詳細な解析と品種本来の形質安定化技術の開発

'結納'における形質の不安定化は花弁色だけでなく、葉におけるフラボノイド蓄積においても観察される。その関係性に関して詳細を明らかにするとともに、品種本来の複色花弁のみを安定的に形成させる技術開発の可能性を探る。

(2) 形質を不安定化させる遺伝子の特定

<複色花弁・フラボノイド無しの葉>と<赤色花弁・フラボノイド有りの葉>間において、表現型の違いを生み出す原因遺伝子を特定・単離する。

(3) エピジェネティックに変異している遺伝子領域の決定

<複色花弁・フラボノイド無しの葉>と<赤色花弁・フラボノイド有りの葉>間において、2で特定した遺伝子のエピジェネティックな変異を生じている遺伝子領域を決定する。

3. 研究の方法

(1) 花弁色とシュートにおけるフラボノイド合成能との関係性

天花仕立てに仕立てた個体の花序の花弁色と植物体全体の葉のフラボノイド蓄積の関連を解析した。また、そこで赤色花弁を生

じた花序と複色花弁のみを生じた花序を比較した際に、下から第4葉で最もフラボノイド蓄積に差があるというデータが得られたため、下から第4葉のフラボノイド蓄積と開花した花序の花弁色の関係を調査した。葉のフラボノイド蓄積の有無は、葉 100-200 mg を酢酸メタノールバッファー（酢酸：メタノール：水=1：4：5）中で磨砕し、遠心後の上清を回収し、分光光度計で ABS_{400}/ABS_{370} を測定することで調査した。

(2) '結納'の葉に蓄積しているフラボノイドの同定

赤色花弁を生じやすいR系統の凍結乾燥葉 80 g から、50%メタノールを用いて蓄積しているフラボノイド・有機酸エステルなどを抽出した。その後、ペーパークロマトグラフィーおよび Sephadex LH-20 カラムを用いたカラムクロマトグラフィーで 13 の物質を分離・回収した。JEOL AL-400 NMR spectrometer を用いて 1H (400 MHz) および ^{13}C (100 MHz) NMR スペクトルを測定することで、葉に蓄積しているフラボノイド・有機酸エステルを同定した。

(3) '結納'の不安定性にかかわる分子メカニズム

同一花序から得られた複色花弁と赤色花弁を、花弁外側と花弁内側に分けてフラボノイド生成関連遺伝子の発現解析を行った。また、GmCHS7 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。さらに、フラボノイドを蓄積している葉と蓄積していない葉に関して、フラボノイド生成関連遺伝子の発現解析、RNA ゲルブロット分析による siRNA の検出、NGS による small RNA のマッピング解析および GmCHS7 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。

PTGS を生じる遺伝子構造として反復配列が知られているため、花弁と葉で共通して PTGS を生じる *DvCHS2* に関して、Inverse PCR により 5'および 3'近傍配列を単離した。また、他の複色花品種および単色花品種を供試して、DNA ゲルブロット分析および qPCR によるゲノム量の比較を行った。

4. 研究成果

(1) 花弁色とシュートにおけるフラボノイド合成能との関係

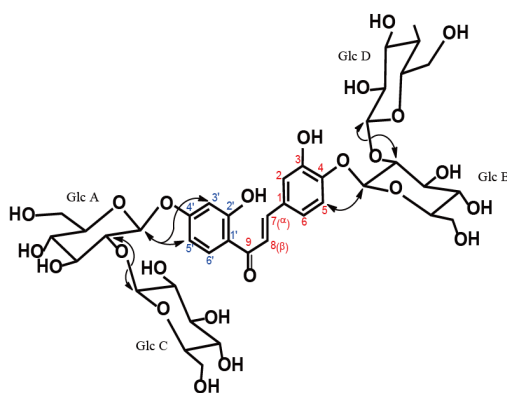
花弁色とシュートにおけるフラボノイド蓄積の関係を詳細に明らかにするために、天花仕立てに仕立てた個体の花序の花弁色と植物体全体の葉のフラボノイド蓄積の関連を解析した。その結果、花序に一枚でも赤色花弁を生じた個体は植物体全体にフラボノ

イドを蓄積しやすく、逆に植物体にフラボノイドを蓄積しにくい個体はすべて複色花弁のみの花序を生じた。

挿し木苗の下から第4葉のフラボノイド蓄積と開花した花序の花弁色の関係を調査すると、第4葉でフラボノイド蓄積が見られなかった個体は必ず複色花弁のみの花序を着生した。一方で、第4葉でフラボノイド蓄積が見られた個体の中には、赤色花弁のみの個体や複色花弁と赤色花弁の両方をつけた個体、あるいは複色花弁のみの個体が混在した。したがって、'結納'における形質の不安定性には方向性があり、フラボノイドを蓄積する状態からフラボノイドを蓄積しない状態、あるいは赤色花弁をつける状態から複色花弁をつける状態に変化していくと考えられた。

(2) '結納'の葉に蓄積しているフラボノイドの同定

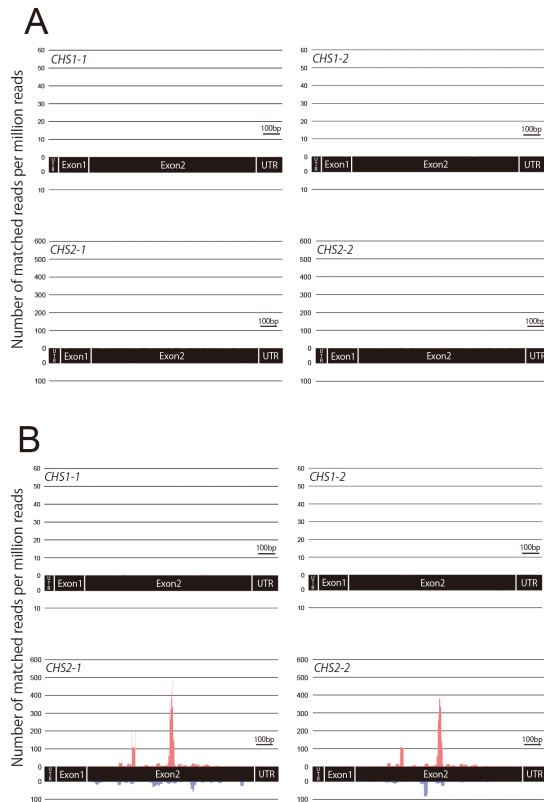
NMR 解析により'結納'の葉のフラボノイドの同定を行った。フラボノイドを蓄積する葉からは 30 以上のピークが検出され、そのうち 6 種のカフェ酸エステル、4 種のフラボノール、3 種の新規ブテイン化合物 (butein 4',4-O-di-[2-O-(β -glucopyranosyl)- β -glucopyranoside] (第3図)、butein 4'-O-[2-O-(β -glucopyranosyl)- β -glucopyranoside]-4-O- β -glucopyranoside および butein 4'-[6-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)- β -glucopyranoside]-4-O- β -glucopyranoside) を同定した。一方で、フラボノイドを蓄積しない葉からはカフェ酸エステル 6 種のみが検出された。よって、'結納'の葉に蓄積するフラボノイドはフラボノールとカルコン類のブテインであることが示され、ブテインとフラボノールの合成に共通するのはカルコン合成酵素であることから、'結納'に見られる葉のフラボノイド蓄積の不安定性におけるカルコン合成酵素の重要性が確認された。



第3図 同定した butein 4',4-O-di-[2-O-(β -glucopyranosyl)- β -glucopyranoside]の構造

(3) '結納'の不安定性にかかわる分子メカニズム

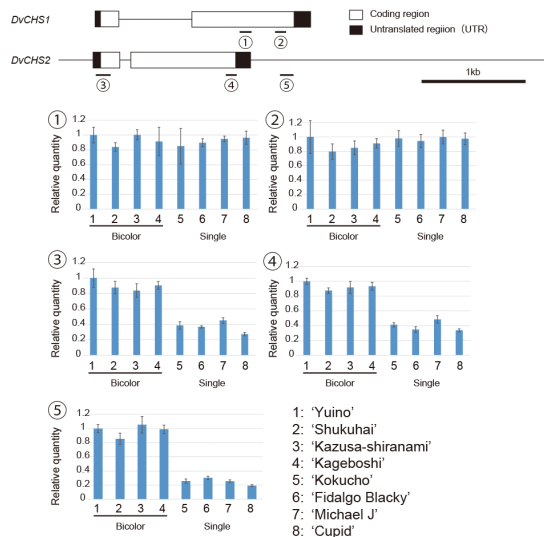
複色花弁と赤色花弁、あるいはフラボノイド蓄積の有無に差異のある葉におけるフラボノイド合成に関わる遺伝子の発現比較を行ったところ、複色花弁の純白部では複色花弁の赤色部と比較して *DvCHS1* および *DvCHS2*、フラボノイドを蓄積していない葉ではフラボノイドを蓄積している葉と比較して *DvCHS2* の発現量の減少が見られた。RNA ゲルプロット分析よりフラボノイドを蓄積しない葉からは *CHS* の siRNA が検出され、NGS による small RNA のマッピング解析では、フラボノイドを蓄積しない葉からのみ *DvCHS2* にマッピングされる small RNA が検出された(第4図)。よって、フラボノイドを蓄積しない葉において *DvCHS2* の PTGS を生じていることが示された。ダイズの *GmCHS7* 抗体を用いたウエスタンブロット解析から、遺伝子発現の結果と同様に、花弁赤色部と比較して花弁純白部で、また、フラボノイド蓄積する葉と比較してフラボノイドを蓄積しない葉で *DvCHS* タンパク質量が少ないことが示唆された。



第4図 *DvCHS1* および *DvCHS2* への small RNA のマッピング解析
 A: フラボノイドを蓄積している葉
 B: フラボノイドを蓄積しない葉

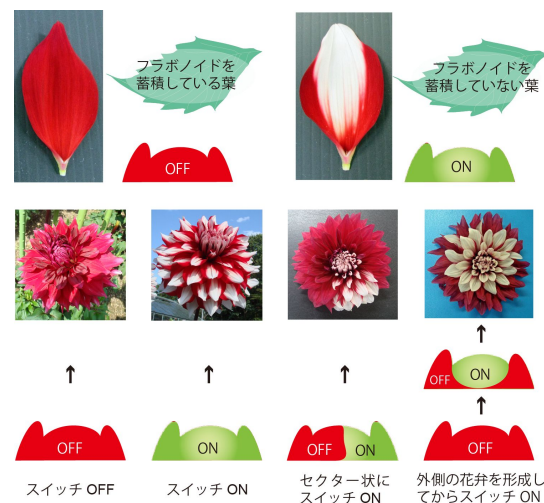
以上の結果から、花弁と葉で共通して変動している *DvCHS2* の PTGS を引き起こす遺伝子が、表現型に違いを生み出す原因遺伝子であると考えられた。これまでの研究より、PTGS を誘導する遺伝子構造として、ゲノムにおける遺伝子のタンデムあるいは逆位リピート構造が知られている (Kusaba ら、2003 など)。そこで、複色花品種と単色花品種に

ついて *DvCHS1* および *DvCHS2* のゲノム量を qPCR により解析すると、複色花品種で *DvCHS2* のコード領域および 3' 近傍領域でゲノム量が単色花品種の 2 倍以上あることが示唆された(第5図)。また、*DvCHS2* をプローブに用いて DNA ゲルプロット分析を行うと、複色花品種特異的に濃いバンドが検出された。このアレルを単離し、Inverse PCR によって 3' 近傍領域下流約 3kb まで解析したところ、反復配列は見当たらなかった。よって、*DvCHS2* の PTGS を生じる原因遺伝子は単純な反復配列ではなく、*DvCHS2* の比較的長い配列の重複であると考えられた。



第5図 品種別の *DvCHS1* および *DvCHS2* のゲノム量の比較
 丸囲み数字はプライマーの位置を、バーは標準偏差を示す。

以上より、'結納'における形質の不安定性は、植物体全体での *DvCHS2* の PTGS の ON (複色花弁・フラボノイド無しの葉)/OFF (赤色花弁・フラボノイド有りの葉)の切り替わりによる現象として理解できると考えられた(第6図)。



第6図 '結納'における形質の不安定性のモデル図

DvCHS2 の PTGS は OFF から ON の方向に切り替わり、その切り替わりのタイミングが栄養繁殖後代間で一定しないことから不安定性として観察されると考えられる。一旦 ON の状態になるとその状態は維持されたことから、ON の状態の苗、すなわち葉にフラボノイドを蓄積していない苗を選抜することにより、安定的な複色花開花株を選抜できると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Ohno S*, Hori W, Hosokawa M, Tatsuzawa F, Doi M. 2018. Post-transcriptional silencing of *chalcone synthase* is involved in phenotypic lability in petals and leaves of bicolor dahlia (*Dahlia variabilis*) 'Yuino'. *Planta* 247: 413-428. doi: 10.1007/s00425-017-2796-3. (査読有)

Ohno S*, Hori W, Hosokawa M, Tatsuzawa F, Doi M. 2018. Identification of flavonoids in leaves of a labile bicolor flowering dahlia (*Dahlia variabilis*) 'Yuino'. *The Horticulture Journal* 87: 140-148. doi: 10.2503/hortj.OKD-099. (査読有)

Ohno S*, Hori W, Hosokawa M, Tatsuzawa F, Doi M. 2016. Petal color is associated with leaf flavonoid accumulation in a labile bicolor flowering dahlia (*Dahlia variabilis*) 'Yuino'. *The Horticulture Journal* 85: 177-186. doi: 10.2503/hortj.MI-075. (査読有)

[学会発表](計6件)

Ohno S, Hori W, Hosokawa M, Tatsuzawa F, Doi M. Post-transcriptional gene silencing of *chalcone synthase* plays an important role in petal color lability of bicolor flowering dahlia. *Latest Advances in Plant Development & Environmental Response, Cold Spring Harbor Conferences Asia (CSHA2016)*. Awaji, Japan. 2016年11月

Ohno S, Hori W, Hosokawa M, Tatsuzawa F, Doi M. Post-transcriptional gene silencing of *chalcone synthase* is associated with petal color lability in a bicolor flowering dahlia. *2nd Asian Horticultural Congress (AHC2016)*: Keynote speech. Chengdu, China. 2016年9月(招待講演)

大野翔、保里和香子、細川宗孝、立澤文見、土井元章. 複色花ダリアの複色模様

形成を引き起こす候補遺伝子. 園芸学会平成28年度秋季大会:P219. 名城大学. 2016年9月

大野翔、保里和香子、細川宗孝、立澤文見、土井元章. 「複色花ダリア『結納』のフラボノイドを蓄積しない葉における *CHS* の転写後ジーンサイレンシング. 園芸学会平成28年度春季大会:P166. 東京農業大学. 2016年3月

保里和香子、細川宗孝、立澤文見、土井元章、大野翔. 複色花ダリアにおける不安定な花色は葉のフラボノイド蓄積と関連する. 園芸学会平成27年度秋季大会:花008. 徳島大学. 2015年9月

Ohno S, Hosokawa M, Tatsuzawa F, Doi M. Involvement of simultaneous post-transcriptional silencing of multiple chalcone synthase genes in petal color lability of a bicolor flowering dahlia. *8th International Workshop on Anthocyanins (IWA2015)*: S1-P13. Montpellier, France. 2015年9月

[その他]

ホームページ等

<http://www.hort.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大野 翔 (OHNO, Sho)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 10722001

(4)研究協力者

保里 和香子 (HORI, Wakako)