

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03764

研究課題名(和文) アサガオリソースの比較ゲノム解析による花の寿命を支配する遺伝子の探索と機能解明

研究課題名(英文) Search and functional elucidation of genes that control flower lifespan by comparative genome analysis of genetic resources of morning glory

研究代表者

山田 哲也 (Yamada, Tetsuya)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20422511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナショナルバイオリソースプロジェクトで収集されたアサガオ遺伝資源に対してRAD-Seq法による一塩基多型の検出を行い、対立遺伝子の多様性が維持された160系統のコアコレクションを選出した。また、このコアコレクションを用いたゲノムワイド関連解析により、花の寿命の決定要因である開花時刻や花弁老化時刻の系統間差異に関わる可能性の高い対立遺伝子や染色体領域を特定した。さらに、コアコレクションを用いた形質調査より、花の寿命と種子数との間に有意な負の相関が検出されたことから、エチレン処理でアサガオの花弁老化を促進したところ、種子数が有意に増加することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で特定した対立遺伝子や染色体領域は、植物の系統間で花の寿命に差異が生じる機構を解明し、花持ち性を改善した花き品種を育成する技術を開発するための基盤的な知見となる。また、コアコレクションの一塩基多型情報は、ナショナルバイオリソースプロジェクトのゲノム情報整備プログラムで全ゲノムリシーケンス解析を行うアサガオ系統の選出に利用された。さらに、エチレン処理による花弁老化の促進によって種子数が増加することが分かり、花きの種子生産性を向上する技術を開発するための研究が開始された。以上の成果は、鉢花や切り花の消費拡大および生産コストの軽減に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, single nucleotide polymorphisms in genetic resources of Japanese morning glory collected by the National BioResource Project were detected by the RAD-Seq method, and selected core collections in which allelic diversity was maintained. Genome-wide association studies using this core collection identified alleles and chromosomal regions that are likely to be involved in varietal differences in time of flower opening time and petal senescence, which are determinants of flower lifespan. In addition, a significant negative correlation was detected between flower lifespan and the number of seeds in a trait survey using the core collection. Furthermore, it was confirmed that the number of seeds increased when petal senescence was promoted by ethylene treatment.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：花の寿命 花弁老化 アサガオ ナショナルバイオリソースプロジェクト RAD-seq ゲノムワイド関連解析 コアコレクション 種子生産性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の中には特定の時刻に開花する種が存在する。開花の時刻は植物種によって様々であり、これに基づきリンネは花時計を考案した。特定の時期に開花する性質は、虫媒受粉植物では花粉媒介昆虫の訪花を制限し、受粉を効率化するうえで重要な役割を果たしていると考えられる。開花時刻は花弁展開の誘導期間と実行期間で決定される。誘導期間は花蕾が形成されてから花弁展開が開始するまでの時間であり、実行期間は花弁展開の開始から終了までの時間である。花弁展開は、花弁細胞の肥大によって生じる。細胞肥大に関わる遺伝子は数多く同定されており、花弁展開の実行プロセスは解明されつつある。一方、細胞肥大の開始や進行を制御し、花弁展開の誘導期間や実行期間の長短に影響を及ぼす要因には、光や温度などの外的要因と植物ホルモンなどの内的要因がある。しかし、それらの要因によって細胞肥大が制御される仕組みに関わる遺伝子は同定されておらず、開花時刻が決定されるメカニズムは未解明のままである。

アサガオの開花時刻は開花前日に花弁が受ける暗期の長さで決定されている。これまでの研究で、暗期によるアサガオの開花誘導プロセスに概日時計関連遺伝子 (*PRR7* および *RVE1*) が関与することが明らかにされている。また、開花時の花弁で新規に合成されるメラトニンが暗期により誘導されるアサガオの開花 (花弁展開) の実行プロセスの制御には関与するが、誘導プロセスには関与しないことや、開花に必要な暗期の長さにはアサガオの複数の系統間で差異があり、一定期間以上の暗期を与えないと開花しない系統が存在することも確認されている。そのような開花の暗期要求性に見られる系統間差異の原因遺伝子を特定することが出来れば、開花時刻の決定機構を分子レベルで解明する端緒が得られたことを世界に発信できるとともに、開花時刻の調節により受粉効率を向上する新技術の提案も可能になる。

花弁では、開花後あるいは受粉後、一定の期間が過ぎると、変色や萎れなどの変化 (花弁老化) が起こる。花弁老化の時刻も植物種によって様々であり、開花と同様に花粉媒介昆虫の訪花を制限し、受粉を効率化するうえで重要な役割を果たしていると考えられる。花弁老化の時刻は花弁老化の誘導期間と実行期間で決定される。誘導期間は開花あるいは受粉してから花弁老化が開始するまでの時間であり、実行期間は花弁老化の開始から終了までの時間である。花弁老化は花弁細胞のプログラム細胞死 (PCD) によって生じる。花弁 PCD の実行に関わる遺伝子は数多く同定されており、花弁老化の実行プロセスは解明されつつある。一方、花弁 PCD の開始や進行を制御し、花弁老化の誘導期間や実行期間の長短に影響を及ぼす要因には、光や温度などの外的要因や植物ホルモンなどの内的要因のほかに、遺伝的な要因も含まれる。しかし、それらの要因によって花弁 PCD が制御される仕組みに関与する遺伝子は同定されておらず、花弁老化の時刻が決定されるメカニズムは未解明のままである。

これまでの研究で、アサガオ、フリージア、グラジオラスなどの花弁老化が PCD により生じていることが明らかにされている。また、アサガオやグラジオラスの花弁 PCD に関わる遺伝子 (*DAD1*, *ImPSR29*, *ImNAP* など) を特定し、それらが上偏成長やプログラム細胞死に関わる複数の遺伝子の転写調節を介して花弁老化を制御する役割を果たしていることも明らかにされている。さらに、アサガオの花弁老化の誘導期間や実行期間には複数の系統間で差異があり、誘導期間の差異には内生エチレンが関与することも確認されている。そのような花弁老化の誘導期間や実行期間に見られる系統間差異の原因遺伝子を特定することが出来れば、花弁老化時刻の決定機構を分子レベルで解明する端緒が得られたことを世界に発信できるとともに、花弁老化時刻の調節により花持ち性を向上する新技術の提案も可能になる。

2. 研究の目的

本研究課題では申請時に 5 つの実験が計画されていた。各実験の目的と内容は次の通りであった。「実験 1」では、アサガオの標準型である東京古型のゲノム配列を参照配列とし、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) で収集されているアサガオ遺伝資源について、Restriction Associated DNA Sequencing (RAD-Seq) 法による一塩基多型 (SNP) の検出を行い、対立遺伝子の多様性が高いレベルで維持されている系統を「コアコレクション」として選出することを目的とした。「実験 2」では、実験 1 で選出したコアコレクションについて、開花・花弁老化の時刻 (花の寿命)、花弁展開・花弁老化の誘導・実行期間、開花の暗期要求性などを調査し、得られた形質データと RAD-Seq 法で得た SNP データに基づきゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行い、花の寿命の決定要因となっている各形質の系統間差異に関わる対立遺伝子を明らかにすることを目的とした。「実験 3」では、実験 2 で花の寿命と開花の暗期要求性のそれぞれに顕著な差異が検出された 2 組の系統間で F₂ 集団を育成し、各 F₂ 個体について、RAD-Seq 法による SNP 検出、形質調査および QTL 解析を行い、花の寿命と開花の暗期要求性の系統間差異に関わる対立遺伝子を明らかにすることを目的とした。「実験 4」では、実験 3 で用いた 4 系統について、RNA-Seq 法により花蕾形成の終了から花弁老化の終了までの 5 ステージで花弁のトランスクリプトームデータを得て、相関ネットワーク解析等を行い、実験 2 や実験 3 で同定した遺伝子と共発現している遺伝子を検出して、当該遺伝子と関連のある遺伝子を特定することで、花の寿命の決定に果たす役割を明らかにすることを目的とした。「実験 5」では、実験 2 と実験 3 で同定した遺伝子と、実験 4 で検出した共発現遺伝子のうち、実験 3 で QTL 解析に用いた系統間で転写量に有意な差異が認められた遺伝子について、RNA interference (RNAi) 法による発現抑制を行い、開花時刻や花弁老化時刻等に及ぼす影響を評価することで、花の寿命の制御における当該遺伝子の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NBRP「アサガオ」で保存されているアサガオの遺伝資源から系統情報に基づき対立遺伝子の多様性が高いと予想される系統を選定し、それらの種子を入手した。選定したアサガオ系統の実生を 24°C・12 時間日長の恒温室内で栽培し、発芽後 2 週間目に本葉の一部 (100 mg) を採取して total DNA を抽出し、RAD-Seq 法による SNP 検出を実施した。アサガオの標準型である東京古型のゲノム配列を参照配列として RAD-Seq 法により検出された各系統の SNP 情報に基づき分子系統樹を作成し、対立遺伝子の多様性が比較的高いレベルで維持されていると判断される系統を「コアコレクション」として選出した。

(2) コアコレクションの実生を網室および 24°C・12 時間日長に設定した恒温室内で栽培し、開花させた。各系統の個体から、開花前日の花蕾を採取し、蒸留水を入れた 2 mL のプラスチックチューブに挿して、25°C・相対湿度 70%・12 時間日長に設定したインキュベーター内に静置した。切り花の花冠を 5 分間隔で連続撮影し、画像解析により花冠面積の時系列データを得た。花冠面積の変化に基づき、花の寿命に関わる形質である開花時刻、花弁老化時刻、花弁展開誘導期間、花弁展開実行期間、花弁老化誘導期間および花弁老化実行期間を GWAS 用の数値データとして求めた。また、種子生産性に関わる形質である個体あたり種子数や種子重量も測定した。RAD-Seq 法で得た SNP データと花の寿命に関わる 6 つの形質データを用いて GWAS を行い、各形質の系統間差異と関連のある対立遺伝子および染色体領域の検出を試みた。

(3) アサガオ品種「紫」の野生型と 14-3-3 タンパク質をコードした花弁老化関連遺伝子 *InPSR42* の発現を RNAi 法で抑制した 42r 系統の実生を 24°C・12 時間日長の恒温室内で栽培し、開花させた。開花当日の明期開始時刻 (9:00) を開花の基点 ($t=0$ h) とし、開花 12 時間前の花蕾を蒸留水を入れた 2 mL のプラスチックチューブに挿して、25°C・相対湿度 70%・12 時間日長に設定したインキュベーター内に静置し、任意の時間に花弁を採取した。 $t=0$ 、3、6 および 9 h の花弁細胞をプロトプラスト化し、BCECF-AM で染色後、蛍光顕微鏡により液胞崩壊した割合を調査した。また、オートファジーやプロテアソーム阻害剤を処理した野生型の切り花について、 $t=0$ 、14 および 18 h の花弁に含まれる可溶性タンパク質量を RCDC プロテインアッセイにより測定した。さらに、 $t=0$ 、18 および 24 h の花弁から total DNA を抽出し、アガロースゲルで電気泳動後、画像解析により DNA の断片化率を求めた。

(4) 花の寿命が比較的長いアサガオ品種「紫」を 24°C、相対湿度 70%、12 時間日長に設定したインキュベーター内で栽培した。第 1 花が開花した個体について次の操作を行った。開花した全ての花について、花弁が完全に展開した直後に蒸留水 (対照区) または 100 ppm エテホン液剤を花弁の向軸面に向けて 5 cm 上方からスプレーで 1 回ずつ噴霧した (エテホン処理区 1)。また、第 1 花～第 6 花までの花弁には蒸留水、それ以降に開花した全ての花にエテホンを噴霧した (エテホン処理区 2)。第 1 花の開花後 80 日目までに成熟した全ての種子を採種し、個体および果実あたりの平均種子数と平均種子重量を求め、その積から種子生産量を算出した。さらに、老化前後の花弁について、窒素再転流に関わるグルタミン合成酵素遺伝子の転写産物量やグルタミンおよびアスパラギン含量の変化等を調査した。

4. 研究成果

(1) NBRP アサガオ遺伝資源 1195 系統から、次の a)~g) に基準に従い、RAD-Seq 法による SNP 検出に供試する 400 系統を選出した。a) *Ipomoea nil* のみを対象とする (近縁種は除く)、b) 曜白やヘデラセア葉は除く、c) ヘテロの遺伝子型が表記されている系統は除く、d) 枝番つきの系統および表現型が表記されていない系統は除く、e) 表現型、品種名および遺伝子型の表記が重複している系統は除く、f) 品種・系統名が表記されているものはなるべく残す、g) 表現型と遺伝子型の表記を参考に変異が少ないと推測される系統を除く。RAD-Seq 法で検出した 400 系統間の SNP 情報を用いて系統樹解析を行い、遺伝的重複の少ない 160 系統をコアコレクションとして選定した。SNP 情報を用いた主成分分析による集団構造解析から、コアコレクションには分集団化が見られないことを確認した。コアコレクションにおける草丈の系統間差異について GWAS を実施したところ、草丈の違いと高い関連性を示す 3 つの候補 SNP 座を検出した。これらの座位の近傍には、他の植物で茎の伸長などへの関与が報告されている既知の草丈関連遺伝子のホモログが存在することを確認した。以上から、コアコレクションとして選定した 160 系統のアサガオが GWAS による花の寿命決定遺伝子の同定にも適用することが可能であることが示唆された。また、花きのコアコレクションは国内外でも希少であり、本研究で選定したアサガオのコアコレクションは、花や葉の形態、色、模様など、花きの育種上重要な形質の変異も含むため、それらの形質の改変につながる新規有用遺伝子の同定に貢献する可能性がある。

(2) コアコレクション 160 系統を栽培し、花の寿命に関わる諸形質および種子数や種子重量など種子生産性に関わる形質を測定して、形質間の相関性を調査した。その結果、花弁老化と種子生産性との間に負の相関が認められた。花の寿命に関わる諸形質について GWAS を実施した結果、開花時刻に関連した 21 個の SNP が検出され、それらの近傍に時計関連遺伝子などが存在することを確認した。また、花弁老化に関連した 10 個の SNP が検出され、それらの近傍にユビキ

チンやシグナル伝達関連の遺伝子などが存在することを確認した。そこで、開花時刻や花弁老化に顕著な差異が認められた 12 系統のアサガオについて、全ゲノムリシーケンスを実施し、系統間 SNP 情報を得た。この情報に基づき、GWAS で検出された SNP 付近に存在する候補遺伝子について、各形質の系統間差異との関わりが深い SNP の有無を調査した。今後は、この調査で得た SNP 情報に基づき、CRISPR/Cas9 法による当該候補遺伝子のゲノム編集を行い、花の寿命を人為的に改変できることを確認する予定である。

(3) GWAS や QTL 解析により花の寿命決定遺伝子を同定する過程では、多数の候補遺伝子が検出される事が予想される。それらの中から花の寿命決定遺伝子を効率的に同定するためには、開花や花弁老化が誘導される分子機構についてあらかじめ十分な情報を得ておくことが重要である。そこで、先行研究でアサガオの花弁老化への関与が示唆されていた 14-3-3 タンパク質をコードする遺伝子 (*InPSR42*) について RNAi 法による機能解析を行った。その結果、42r 系統の花弁では野生型に比べて液胞崩壊したプロトプラストの割合が有意に低く (図 1)、タンパク質や核酸の分解が抑制されていることを確認した。以上から、当該遺伝子が老化花弁で生じる PCD において液胞崩壊を正に制御する役割を果たしていることを明らかにした。また、オートファジーやプロテアソーム阻害剤を用いた実験より、アサガオの老化花弁におけるタンパク質の分解にはオートファジーが主に関与していることを示唆する結果も得た。

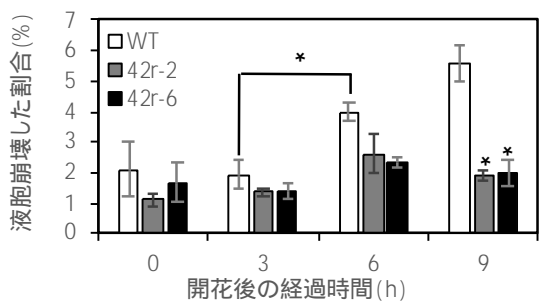


図 1 *InPSR42* の発現抑制が花弁細胞の液胞崩壊に及ぼす影響
* は $p < 0.05$ (t 検定) 垂線は標準誤差 ($n = 3$) を示す。

(4) コアコレクションを用いた形質調査より、花の寿命と種子数との間に有意な負の相関が検出されたことから、花の寿命が長いアサガオ系統でも、花弁老化を促進することで種子数が増加するという仮説を立て、その証明を試みた。エテホンを噴霧した「紫」の切り花では、他の処理に比べ、花弁が展開してから、萎れ始めるまでの時間が有意に短かった。エテホン処理区 1 と 2 では、対照区に比べ、果実あたりの平均種子重量が有意に高い値を示した (表 1)。また、エテホン処理区 2 では、果実あたりの平均種子数も、対照区に比べ有意に高い値を示した。さらに、老化後の花弁では、グルタミンおよびアスパラギン含量とグルタミン合成酵素遺伝子の発現量が増加することを確認した。以上から、アサガオ展開花弁へのエテホン処理により花弁老化を促進すると、オートファジーによる窒素再転流が促進され、果実あたりの種子数が増加することが示された。この結果は、エテホンの処理により特定の個体で一過的に花弁老化を促進することで、種子生産性の向上が可能であることを示唆する。エテホンは市販の植物成長調節剤であり、果樹の着色・熟期促進や摘果・落葉促進など、多面的に利用されている。そこで、現在では、消費者に販売する個体や切り花の花の寿命は長く維持したまま、採種用の個体でのみエテホンを展開花弁に噴霧し、花弁老化を促進することで、種子生産性を高めることのできる技術を開発している。また、本実験の結果から、花の寿命に関わる遺伝子の中には種子生産性に関わる遺伝子も含まれているという新たな仮説も得られた。今後は、この仮説を証明するとともに、種子生産性の低下を伴わずに花の寿命を延長することが可能な有用遺伝子の探索を試みていく予定である。

表 1 アサガオ花弁へのエテホン処理が開花および種子生産性に及ぼす影響

	対照区 ^a	エテホン処理区 1 ^a	エテホン処理区 2 ^b
果実あたりの			
平均種子数 (粒)	2.3 ± 0.1	2.7 ± 0.2	2.9 ± 0.2*
平均種子重量 (mg)	189.7 ± 5.4	215.2 ± 8.3*	233.5 ± 9.3*
個体あたりの			
平均種子数 (粒)	77.8 ± 8.6	66.0 ± 3.0	53.5 ± 11.7
平均 1 粒重 (mg)	76.6 ± 0.8	80.2 ± 2.1	81.1 ± 2.8
種子生産量 (粒 × mg)	5960.7 ± 0647.1	5272.3 ± 191.8	4324.6 ± 920.9

± 以降の各値は標準誤差を示す (a : n=5、b : n=4)
*はDunnnett検定により対照区との間に5%水準で有意差あり

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松村千鶴, 金勝一樹, 山田哲也
2. 発表標題 ペチュニア切り花の老化花弁におけるタンパク質分解機構
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村理沙, 金勝一樹, 山田哲也
2. 発表標題 アサガオ花弁へのエテホン処理による花弁老化の促進が種子生産性に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rubi Heryanto, 高橋明日香, 金勝一樹, 山田哲也
2. 発表標題 Evaluating the performance of core collection of Japanese morning glory developed for identification of novel useful gene using GWAS
3. 学会等名 園芸学会平成31年度春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古内花織, 金勝一樹, 山田哲也
2. 発表標題 アサガオの花弁老化における窒素再転流へのオートファジーの関与
3. 学会等名 園芸学会平成31年度春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋明日香, 金勝一樹, 山田哲也
2. 発表標題 ゲノムワイド関連解析によるアサガオ開花時刻決定遺伝子の探索
3. 学会等名 第10回アサガオ研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田哲也, 高橋明日香, Rubi Heryanto, 金勝一樹
2. 発表標題 アサガオ・コアコレクションを用いたゲノムワイド関連解析による新規有用遺伝子の探索
3. 学会等名 第10回アサガオ研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎聖士, 金勝一樹, 山田哲也
2. 発表標題 花弁老化関連遺伝子 InPSR42はアサガオ花弁のプログラム細胞死における液胞崩壊の制御に関与する
3. 学会等名 第10回アサガオ研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古内花織, 上野尚也, 嵯峨野将季, 金勝一樹, 山田哲也
2. 発表標題 アサガオ切り花へのオートファジー阻害剤処理が老化花弁でのタンパク質分解に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会平成28年度秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 嵯峨野将季, 小野華子, 清水圭一, 石井一夫, 古崎利紀, 渋谷健市, 市村一雄, 荻原勲, 金勝一樹, 山田哲也
2. 発表標題 アサガオの14-3-3タンパク質をコードするInPSR42は液胞プロセシング酵素活性の調節を介して老化花卉における液胞崩壊を制御する
3. 学会等名 園芸学会平成28年度秋季大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 植物における種子生産性の向上方法	発明者 山田哲也	権利者 東京農工大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-049825	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関