

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07643

研究課題名(和文)世界的ツバキ名花‘玉之浦’における覆輪形成のエピゲノム制御機構解明

研究課題名(英文) Analysis of epigenomic regulation mechanism in picotee formation of worldwide marvelous camellia 'Tamanoura'

研究代表者

尾崎 行生 (OZAKI, Yukio)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：60253514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：覆輪ヤブツバキ‘玉之浦’に見られる覆輪形成現象とその環境依存性のメカニズムについて調査した。転写因子の発現量解析の結果、白色部位と赤色部位との間に有意差が認められなかったことから、転写後遺伝子サイレンシングに起因している可能性が示された。花卉着色開始前後に採取した花卉への温度処理やケミカル処理を行ったが、覆輪形成を制御することはできなかった。植物体へのキュウリモザイクウイルス接種による花卉覆輪形成への影響について調査した結果、接種個体の中に覆輪幅が極めて狭い花の着生が認められたことも転写後ジーンサイレンシングの可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

覆輪ヤブツバキ‘玉之浦’花卉の白色部(外縁部)と赤色部(地色部)における花卉DNAの違いはないことを考慮すると、覆輪形成現象には特殊な遺伝子発現調節の仕組みが内在していると考えられる。特に、開花時期(花卉着色時期の気温)によって覆輪幅が異なる、いわゆる環境依存型覆輪形成現象を認めており、この仕組みを明らかにすることは、花色発現の制御機構について解き明かす糸口にもなりうる点で、学術的な意義が極めて大きい。また、新規な覆輪品種を育成する上での有用な情報を提供できる。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of picotee formation with environmental factors was investigated in *Camellia japonica* 'Tamanoura' flowers. As a result of analysis of the expression level of the transcription factor, no significant difference was observed between the white and red regions in the petals, suggesting that it may be due to post-transcriptional gene silencing. The petals collected before and after petal coloration were subjected to temperature and chemical treatments, but the picotee formation could not be controlled. Infection of cucumber mosaic virus to *camellia* 'Tamanoura' plants did not affect the picotee formation, so that it was suggested that picotee formation was resulted from post-transcriptional gene silencing.

研究分野：園芸学

キーワード：ヤブツバキ 花卉着色 覆輪形成

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヤブツバキの花色には白色～濃紅色の変異がみられるが、それに加えて「覆輪」、「斑入り」、「絞り」などの様々なタイプの複色花が存在し、園芸的な価値をさらに高めている。‘玉之浦’は花卉地色が濃紅色で白色の縁取りを持つヤブツバキ覆輪品種である。本品種は人為的な交配ではなく、長崎県五島列島福江島の山林中で偶然発見された突然変異であり、本品種を交配親としてこれまでに多数の覆輪品種が作出されているが、新品種の作出は未だに愛好家による偶発的な育種に頼っており、体系的な育種はなされていない。わが国においてツバキを対象として研究を行っている機関・施設は極めて限られており、ペチュニアやキンギョソウなど、他の花卉植物に比べて近年の分子生物学的なアプローチも大きく後れをとっている。

「覆輪」は花卉類の観賞価値を高める形質の一つであり、地色と外縁部の色の組み合わせ、花卉面積に占める外縁(非)着色部の割合、外縁(非)着色部の形状、地色部と外縁(非)着色部との境界の明瞭さなどが、観賞価値を大きく左右する。われわれはこれまでの研究で‘玉之浦’の白覆輪は、花卉周縁部におけるカルコン合成酵素(CHS)遺伝子発現量の低下により起こることを明らかにしている(Tateishi et al., 2010)。その一方で、白覆輪形成が環境依存型の形質であることも見だしている。すなわち、ヤブツバキ‘玉之浦’の開花期間は概ね1月下旬～4月上旬であるが、この期間の中で早い時期に咲いた花では覆輪の幅が広く明瞭であるのに対し、遅い時期に咲いた花では覆輪の幅が狭く、覆輪がほとんど見られない場合もある。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず‘玉之浦’における覆輪形成メカニズムを明らかにするため、花卉外縁部(覆輪部分)における「ジーンサイレンシング」現象の詳細を明らかにする。花色発現における「ジーンサイレンシング」には、転写前遺伝子サイレンシングと転写後遺伝子サイレンシングという異なるタイプが知られていることから、‘玉之浦’における覆輪形成がいずれに起因するのかを明らかにする。次に、転写されたCHS遺伝子mRNAが短鎖RNA分子によるガイドを受けて分解されるRNAサイレンシングの可能性について検討するため、ペチュニアで報告されているCMV(Cucumber mosaic virus)接種による花色発現への影響について調査する。すなわち、CMVは配列特異的なRNA分解を抑制する2bタンパク質をコードしており、‘玉之浦’花卉の覆輪形成が転写後遺伝子サイレンシングに起因しているとするれば、植物体をCMV(CMV-0系統を予定)に感染させると‘玉之浦’花卉の外縁部分が濃赤色に変化すると考えられる。これらの結果をもとに、‘玉之浦’花卉における覆輪形成のエピゲノム制御機構を明らかにする。

上記の研究で得られる知見を基盤として、環境依存型の覆輪形成現象について明らかにするため、まず培養花卉への低温遭遇の有無による覆輪形成への影響について調べる。さらに、ペチュニア覆輪品種で覆輪模様を変化させる効果が知られているピリミジン系薬剤や脱メチル化効果のある5-アザシチジンを*in vitro*で処理した場合の花卉内アントシアニン蓄積の局在性への影響を調査し、これらの処理による覆輪幅制御技術を確認するとともに、ジーンサイレンシング現象への影響について明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 転写因子分析

CHS遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を決定するために、アダプターPCR法を実施した。制限酵素DraI、EcoRV、PvuII、StuIで消化した‘玉之浦’のゲノムDNAを用いて、アダプター配列特異的プライマーとCHS遺伝子配列特異的プライマーでPCRを行った結果、PvuIIで消化したDNAでのみ2つのバンドが検出された。さらに、それぞれのPCR産物でNested PCRを実施したところ、PvuIIでのみ約3400bpと約2900bpにバンドが検出された。しかしながら、これらの増幅産物の解析を行ったところ、いずれもCHSプロモーター領域ではないことが判明した。そこで新たにプライマーを作成してゲノムウォーキング法を実施したところ、約1000bpの増幅産物を確認でき、シーケンス解析の結果からCHSプロモーター領域であることが示された。プロモーター領域の解析の結果、多数のCpGサイトを確認したが、CpGアイランドは存在していないことがわかった。転写因子の単離および発現量解析を行い、アントシアニン合成経路電子を制御している転写因子である3遺伝子の発現量の比較の結果、いずれも白色部位と赤色部位とで統計的に優位な差は認められなかった。

#### (2) CMV接種試験

覆輪形成花卉の外縁(白色)部におけるCHS遺伝子の発現抑制について、RNAiによる転写後遺伝子サイレンシングの可能性について検討した。転写後遺伝子サイレンシング抑制効果が報告されているCMV(キュウリモザイクウイルス)感染が、花卉覆輪形成に及ぼす影響について調査したところ、2018年度の結果では、CMV接種個体の中に、覆輪幅が極めて狭い花の着生が認められた。2019年度の結果では、いずれの接種個体の花も対照個体の花との間に覆輪幅の有意差は認められず、採取花卉のイムノアッセイを行ったところ、いずれの花弁からもCMVを検出できなかった。以上の結果を総合すると、CMV接種によって覆輪幅が対照区よりも明らかに狭くなる場合が認められた。

#### (3) 生育温度と覆輪形成

花芽発達期の低温処理が覆輪形成に及ぼす影響について調査した。11月10日（花蕾内の花弁着色開始期）以降の全期間を20℃ファイトトロンで栽培した場合に覆輪割合が最も大きかったのに対し、11月10日から1か月および3か月の低温処理を行った後に20℃ファイトトロンで栽培すると、覆輪割合が小さかった。花弁着色が進行したと思われる1月10日から1か月の低温処理を行っても覆輪割合は大きかったことから、1月上旬までに覆輪幅は決定されており、その後の低温によって変化することはないことが示唆された。

#### (4) 培養花弁への温度処理とケミカル処理

温度と光が覆輪形成に及ぼす影響を明らかにするため、*in vitro* で花弁培養を行った。花蕾を採取し、向軸側から3枚の花弁を摘出して15℃、20℃、25℃の明条件および25℃の暗条件下で10日間の10%ショ糖溶液による培養を行った。培養後はいずれの処理区でも花弁幅が広くなり、温度が高い方がより広くなる傾向にあった。花弁幅に対する覆輪幅の比は花弁培養後に小さくなる傾向にあったが、処理区間での明確な比率の差異は認められなかった。花弁着色開始時期から培養を開始し、3日間～1か月の低温（5℃）処理を行った場合でも、処理区間での覆輪割合の差異は認められなかった。

異なる濃度のアザシチジン（脱メチル化剤）、ピリミジン系薬剤処理が覆輪形成に及ぼす影響についても調査したが、処理による覆輪幅への影響は認められなかった。

#### 4. 研究成果

3. (1)および3. (2)の結果から、‘玉之浦’の花弁覆輪部におけるCHS発現抑制をとまなう白覆輪形成はCHS遺伝子における転写後遺伝サイレンシングに起因している可能性が示された。

ヤブツバキ‘玉之浦’の開花期間は概ね1月下旬～4月上旬であり、この期間の中で早い時期に咲いた花では覆輪の幅が広く明瞭であるのに対し、遅い時期に咲いた花では覆輪の幅が狭く、覆輪がほとんど見られない場合もある。これは花蕾発達期の花弁着色期における遭遇温度の影響を受けていると考えられる。すなわち、開花時期が早い花では花弁着色時に低温遭遇せずに覆輪幅が広いこと、開花時期が遅い花では花弁着色時に低温遭遇したため、覆輪幅が狭いと考えている。3. (3)に示すように、花弁着色期に一定低温非遭遇期間が経過した後に低温処理を行っても、覆輪幅が狭くならなかったことから、一旦覆輪幅が決定すると、その後の低温処理によっても覆輪幅は狭くならない、非可塑的な反応であることが明らかになった。

3. (4)で述べたように、*in vitro* で培養した花弁に種々の温度処理やケミカル処理を施しても、覆輪幅に影響を与えなかったことから、培養系を用いた花弁覆輪形成の実験系を確立することはできなかった。

#### <引用文献>

なし

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 板坂朋美・水ノ江雄輝・増田順一郎・尾崎行生
2. 発表標題 低温処理およびアザシチジン処理がヤブツバキ‘玉之浦’花卉の白覆輪形成に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	水ノ江 雄輝 (MIZUNOE Yuki) (50759206)	九州大学・農学研究院・助教  (17102)	
研究分担者	増田 順一郎 (MASUDA Jun-ichiro) (60452744)	宮崎大学・農学部・准教授  (17601)	
研究協力者	竹下 稔 (TAKESHITA Minoru)		