

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07658

研究課題名（和文）遺伝と環境で共通に制御される花弁長決定要因の探索

研究課題名（英文）Research for the genetic and environmental factors for petal size control in *Eustoma*

研究代表者

川勝 恭子（Kawakatsu, Kyoko）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・上級研究員

研究者番号：60581733

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）：野生種の地理的な分布が異なるトルコギキョウ2系統 *Eustoma grandiflorum* と *Eustoma exaltatum* は、花弁サイズが大きく異なる。トルコギキョウは短い育種期間で花冠が巨大化した。その分子メカニズムは不明な点が多い。そこで本研究ではトルコギキョウ花弁サイズ決定機構の解明を目指し、(垂)種間雑種作出と新規ゲノム情報取得により、制御因子の同定を目標に研究を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今のゲノム解読の低価格化は、モデル植物以外の植物種について、遺伝子情報を取得することを可能にした。トルコギキョウ（ユーストマ）は古くから日本で育種され、園芸花き品目として栽培されている。高温となる時期は花弁サイズが変動し安定的な栽培の阻害要因となっている。遺伝・環境の両方の影響を受ける花弁サイズについて、その変動原因を明らかにし、原因を司る遺伝子座を同定することで、安定生産と高品質生産を可能にする。

研究成果の概要（英文）：*Eustoma* consists of two (sub)species, a large-flowered *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn and a small-flowered *E. exaltatum*. To date, cultivated forms of *E. grandiflorum* exhibit large corolla lobes owing to selective breeding in recent decades. In spite of the commercial success of *E. grandiflorum*, the mechanisms of petal size control have been poorly understood. In this study, we conduct cross analysis between *E. grandiflorum* and *E. exaltatum* and de novo assembly of *Eustoma* genome to detect the genetic factors controlling petal size.

研究分野：遺伝学

キーワード：育種学 トルコギキョウ

1. 研究開始当初の背景

花きの価値は色・形・香り・花もちと様々だが、装飾的観点からみると「花型」は最も重要な形質である。大型の花は業務市場での評価が高くなるため、育種・栽培の両面において、より大きな花冠を目指した開発が行なわれている。輸入花きの台頭の原因の一つもまた「花型の違い」であり、特に夏季において輸入バラ/カーネーションは国内産のものより大きいと評価されることが多い。

花型に影響する花弁の大きさは細胞増殖と細胞伸長の程度を反映して変動し、その機構の解明は主にシロイヌナズナの変異体解析を通じて行われてきた。転写因子やタンパク質分解経路因子、microRNA を介した制御等が報告されている。また花弁の大きさを制御する植物ホルモンも報告されている。シロイヌナズナの花弁の大きさを決める経路は全体で 10 を超えて整理されており、今後も統合や追加がなされると予測される。一方でシロイヌナズナ以外の植物種の花弁長制御遺伝子の報告は乏しい。園芸花きのに関して、花弁細胞長に関する解析は国内外で多いものの、細胞数制御に関する知見は少ない。報告例としては、大輪のペチュニアでは、タイプ A のサイトカイニン応答遺伝子の発現量が小輪品種と比較して高いことが示されている。シロイヌナズナで得られた結果の適応性検証や、園芸作物を材料とした解析が、高品質な花き生産に繋がる基礎研究として求められていた。

我々は、花弁サイズが栽培温度の影響を受けること、花弁サイズに温度が影響する生育ステージは生殖成長期全般であることを明らかにしていた。また温度が花弁サイズに影響する程度について、品種間差があることを見出していた。

2. 研究の目的

花冠形質の一つである花冠サイズに影響する花弁サイズについて、遺伝的制御および環境による制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。温度環境による花弁サイズの変動が、花弁細胞の伸長程度の違いによるものか細胞数の変動に因るのかを明らかにする。また花弁サイズを遺伝的に制御する因子の探索を行い、大きな花冠をもつ系統の DNA マーカーを作出し効率的な育種を可能にすることを目的とする。花弁長がどのような作用機作で決定されているのかを各因子の分析と統合により明らかにする。

3. 研究の方法

異なる栽培温度(昼温、夜温)で複数の系統を栽培し、花弁長および幅を計測する。温度による花弁サイズ変動にみられた品種間差の原因を明らかにするために、変動幅の大きい系統と小さい系統の同定、それらの雑種系統を作出して、花弁長制御因子の染色体座乗位置を同定する。当座を含むゲノム断片長の抽出および複数系統を用いた比較ゲノム解析により、原因となる遺伝因子を探索する。

ミコナゾールが花弁サイズに与える影響を調査する。

各因子による花弁サイズの増大が細胞数増大の結果引き起こされていることを示したが、現時点ではそれが細胞分裂速度の昂進なのか細胞分裂を継続する日数の延長が原因なのかの確証はない。そこで、経時的に蕾をサンプリングし細胞を観察することでこの点を明らかにし、各現象の原因について検証と比較を行う。

4. 研究成果

栽培温度が花径に影響し高い温度環境(昼温 30 / 夜温 19)で栽培したトルコギキョウは低い温度環境(昼温 20 / 夜温 19)で栽培したものに比べて花径が小さいこと(図 1A)、中間の温度帯(昼温 24 / 夜温 19)では花弁長も中間的になることを申請者は示した。開花後の花弁細胞を観察すると、栽培温度による細胞の長さの違いは認められなかった。したがって花弁長の変動は細胞数の変動の結果引き起こされることが示唆された。

栽培環境による花弁長制御に加え、遺伝的制御による花弁長の変異も大きい。トルコギキョウには様々な花弁長の品種があるが、その差がどのような遺伝因子で決定されているかについては報告がなかった。申請者は、花弁長の大きく異なる 2 系統について花弁細胞数を調査し、大型の花は小型の花よりもずっと多くの細胞から構成されていることを見出した。この結果は、両系統間の遺伝的多型が花弁の細胞数に影響を与えていることを示した。

栽培温度環境と遺伝的バックグラウンドの違いが共に細胞数制御を通じた花弁長変動を引き起こしていたので、次に両者の関係性について調査した。花弁長の異なる 2 系統について高い温度環境(昼温 30 / 夜温 19)と低い温度環境(昼温 20 / 夜温 19)で栽培した。その結果、花弁が遺伝的に小さい系統でも温度変動による花弁長変動がわずかに認められたものの、その効果は花弁が遺伝的に大きい系統よりも小さかった。この結果から、温度によって変化する花弁長制御経路の一つは、この 2 系統の遺伝的差異を引き起こしている花弁長決定制御因子を介した経路であることが示唆された。

花弁長に隔たりのある *Eustoma grandiflorum* 一重標準系統と *Eustoma exaltatum* 一重系統を材料に、異なる温度条件下で栽培した場合の花弁細胞の観察および到花日数の計測を行った。両系統で共通に、高温区では 2 週間以上の開花前進となった。開花時花弁長は *E. grandiflorum* 系統で顕著に短縮した。一方最大花弁長および花弁幅は *E. grandiflorum* 系統と *E. exaltatum* 系統の両方で高温の影響を受けて短縮した。したがって *E. grandiflorum* で温度環境の影響を受ける花弁長決定因子は、*E. grandiflorum* 系統と *E. exaltatum* 系統の花弁長決定因子群の一部であるが、温度環境が影響する開花以降の花弁伸長については両系統の遺伝的差異の関与が低いことが示唆された。

E. grandiflorum と *E. exaltatum* の花弁サイズを規定する遺伝因子のうち、温度環境の影響を受ける因子の同定を目指し解析を行った。花弁は小さいが、育種の系譜から遺伝的背景は *E. grandiflorum* 近縁であるとされる系統 A を、*E. grandiflorum* 標準系統(花弁大)および *E. exaltatum* 標準系統(花弁小)とそれぞれ交雑し、雑種第一代および雑種第二代の花弁サイズを調査した。*Eustoma grandiflorum* 標準系統 × 系統 A の雑種第一代の花弁サイズは *Eustoma grandiflorum* 標準系統と有意差がなく雑種第二代の分布からも *E. grandiflorum* の花弁巨大化因子は顕性遺伝することが明らかとなった。また *E. exaltatum* 標準系統 × 系統 A の雑種第一代および雑種第二代の花弁サイズを調査したところ相加的効果は認められなかったことから、両系統の花弁微小遺伝因子は同一因子であるかもしくは同一の経路で機能している複数因子である可能性が示唆された。

花弁サイズ決定因子の染色体座乗位置の同定のため、雑種第二代び多検体 DNA を抽出し、多型を大量取得を行い RAD-Seq 解析を行った。両親間で多型を示した塩基を抽出し、130 個体以上で遺伝子型が判明した約 2000 座の情報を用いて連鎖解析および QTL 解析を行ったところ LOD 値 3 以上で花弁サイズに關与する座が同定された。次に当染色体領域に座乗する遺伝子を明らかにするため、*E. grandiflorum* 標準系統について、発蕾から開花までの遺伝子発現プロファイルの取得にむけて、RNA シーケンスを行った。

花弁形成時転写産物に関して、参照配列にマップシアノテーションを付与した。機能アノテーションには KOG、swissprot、Araport の各データベースを用いた。花弁形成 6 ステージ別の花弁と、6 部位(葉、苞

葉、根、茎、栄養成長期分裂組織、花成誘導期間分裂組織)の転写産物情報を取得し、データベース上に可視化した。

花卉サイズ制御に関与していると推定された染色体座乗領域にマップされた遺伝子群のうち、花卉形成時に発現が認められた遺伝子のうち、付与されたアノテーションからサイズ制御に関わる可能性が高いものについて配列比較解析を行ったところ、候補となった1遺伝子のコーティング領域について、花卉の小さい *Eustoma exaltatum* では *E. grandiflorum* 標準系統に対して欠失および挿入が起こっていた。また全ゲノムに対して類似配列の有無を確認したところ、別コンティグ上に類似配列が存在し、それについても *E. grandiflorum* と *E. exaltatum* 間で多型が認められた。

電子顕微鏡観察による細胞学的な解析では、標準系統を含む一般的な *E. grandiflorum* 系統は *E. exaltatum* 系統よりも大きな細胞をもつこと、また細胞数が多いことも花卉の巨大化の原因であった。さらに花卉は小さいが遺伝的背景が *E. grandiflorum* と考えられている系統 A は *E. exaltatum* 系統と同程度の細胞サイズであることを見出した。*E. grandiflorum* 系統 A の到花日数は一般的な *E. grandiflorum* 系統よりも小さく、*E. exaltatum* 系統に近かった。*Eustoma grandiflorum* 系統の開花前後の細胞を部位別に観察した結果、細胞肥大は花卉の先端から基部の広い範囲で同程度に起こることが明らかとなった。

前述の *E. exaltatum* と *E. grandiflorum* 標準系統間で多型が認められた遺伝子について、*E. grandiflorum* 標準系統における経時的発現パターンを確認したところ、花卉形成時に発現していた。

最後に植物ホルモンがトルコギキョウ花卉サイズに与える影響を明らかにすることを目的に、複数の植物成長調節剤について外生投与予備実験を行った。その結果、ジャスモン酸(JA)生合成阻害剤ミコナゾールが花卉を小さくした。生合成阻害剤投与は細胞長に変化をもたらさなかったため、花卉の細胞数がコントロールされている可能性が示唆された。統 B に対しては花卉長短縮効果があったが、系統 C に対しては効果がなかった。また系統 B に対し異なる作型で追試を行ったところ効果が認められなかったため、栽培環境により施用効果が変動する可能性が示唆された。

以上のように、花卉サイズ制御に関わる遺伝因子の染色体座乗領域を QTL 解析により同定し、花卉サイズが環境で変動する原因についても明らかにすることで、今後の育種の加速化に資する知見を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kyoko Kawakatsu, Taro Harada, Ayuko Ushio, Mitsuru Dozono and Naoko Fukuta | 4. 巻 印刷中 |
| 2. 論文標題 Thermal Control Suitable for Increasing Petals in Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 The Horticulture Journal | 6. 最初と最後の頁 394-405 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hortj.OKD-138 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 川勝恭子、牛尾亜由子、道園美弦、福田直子 |
| 2. 発表標題 トルコギキョウ花卉サイズに対する温度の影響 |
| 3. 学会等名 園芸学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 川勝恭子、今村仁、牛尾亜由子、中野善公、福田直子 |
| 2. 発表標題 トルコギキョウ花卉サイズの品種間差と摘蕾の効果について |
| 3. 学会等名 園芸学会平成30年度秋季大会 |
| 4. 発表年 2018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 |
|-------|--|----------------------------|----|
| 連携研究者 | 永野 悳 (Nagano Atsushi) (00619877) | 龍谷大学・農学部・講師 (34316) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|