

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14461

研究課題名(和文) アジサイが形成する2種類の花器官-その作り分け機構の解明

研究課題名(英文) How hydrangea create two types of flowers?

研究代表者

奈島 賢児 (NASHIMA, Kenji)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：30779616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アジサイの装飾花・非装飾花の形態形成の制御機構の解明を目指し、その一端として装飾花・非装飾花の着生パターンの異なる、手まり咲きノがく咲き性に着目し、その原因遺伝子の同定を試みた。全ゲノム解読・RNAシーケンスによる発現比較・全ゲノムリシーケンスによる変異箇所決定を行い、原因遺伝子解明を試みたところ、第4染色体上に原因遺伝子候補が見出された。この遺伝子は手まり咲き性の場合には必ず機能欠損している対立遺伝子のみを保有しており、原因遺伝子として極めて有力であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではアジサイの装飾花および非装飾花の着生位置・着生数を支配する重要遺伝子候補を見出した。今後機能解析を進めることで、2種類の花の作り分け機構の解明を進めることができると期待される。また着生数・パターンを制御する遺伝子で、他の植物に対して応用することで、収量の増加や新しい形態を有する花きなどの作出が可能になるかもしれない。研究遂行の過程で、アジサイの全ゲノム解読を完了した。今後のアジサイ研究の際に、ゲノム配列情報や遺伝子予測などが幅広く利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Aiming to elucidate the control mechanism of the morphology of decorative flowers and non-decorative flowers of hydrangea, we focused on the hortensia/lace-cap phenotype of hydrangea, which has different arrangement patterns of decorative and non-decorative flowers. We performing whole-genome de novo sequencing, expression comparison by RNA sequencing, and mutation detection by whole-genome resequencing to elucidate the causative gene. Finally, a candidate causative gene was found on chromosome 4. Because all hortensia cultivars possessed only functionally deficient allele, it was considered to be promising as the causative gene.

研究分野：園芸学

キーワード：アジサイ 手まり咲き 装飾花 形態形成 ゲノム解読

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アジサイは日本が原産の植物であり、幅広い遺伝資源が存在している。アジサイは花弁用がく片が大きく成長した装飾花と、通常のがく片を有する非装飾花の2種類を着生する。この2種類の花の着生位置により、周縁部のみ装飾花が着生するがく咲きと、花の全体に装飾花が分散して着生する手まり咲きが存在することが知られている。

装飾花と非装飾花の2種類を着生する性質、またこれらの花の着生位置の異なる2種類の花序が存在する性質はアジサイ特有の現象である。どのように制御されるのかが解明されることで、花序の形成や2種類の花の作り分け機構を解明できると考えた。なお手まり咲き性については、連鎖地図情報から第4染色体に原因遺伝子が座乗すると明らかにされていたが、具体的な遺伝子は特定されていなかった。

遺伝子の同定に関しては、研究開始時点ではアジサイのゲノム・遺伝子情報は乏しく、研究の推進が十分にできない状態であった。そのためゲノム配列や遺伝子配列など、基盤情報の整備を行う必要があると考えられた。

### 2. 研究の目的

- (1) アジサイの2種類の花の作り分け機構・その着生位置の制御機構を解明するため、がく咲き/手まり咲き遺伝子の原因遺伝子を同定する。
- (2) 遺伝子同定に先立ち、アジサイのゲノム配列・遺伝子情報を整備する。

### 3. 研究の方法

#### (1) アジサイの全ゲノム解読

アジサイ「青ヶ島-1」の全ゲノム配列を、ロングリードタイプの次世代シーケンサー **Sequel (Pacific Biosciences 社)** で解読し、**De novo** アセンブルを行い、コンティグを取得した。各コンティグについては、座乗遺伝子の予測を実施した。

**12GM1 集団** (「ポージブーケ グレイス」×「ブルーピコティ マナスル」の **F2**) について、**double-digest restriction-site associated sequence (ddRAD-Seq)** を実施し、得られた **SNPs** から連鎖地図を作成した。作成した連鎖地図を基にコンティグを配置し、各染色体に対応した **pseudomolecule** 配列を構築した。

#### (2) 原因遺伝子の座乗位置の推定

**12GM1 集団** および **KF 集団** (「きらきら星」×「フラウ ヨシミ」の **F2**) についての **ddRAD-Seq** データから連鎖地図を作成した。形質(がく咲き/手まり咲き)との合致率から、原因遺伝子の座乗コンティグ候補を探索した。

#### (3) 手まり咲き—がく咲き個体間の **RNA-Seq** 解析による発現比較

がく咲き系統である「栃木7号」と手まり咲き品種である「てまりてまり」の花芽をサンプリングし、**RNA-Seq** 解析を行った。手まり咲き/がく咲きの原因遺伝子近傍に座乗する遺伝子の中で、発現量に違いのある遺伝子の探索を行った。

#### (4) 全ゲノムリシーケンスによる変異遺伝子の検出

「ポージブーケ グレイス」(がく咲き)、「フラウ ヨシミ」(手まり咲き)、「ブルーピコティ マナスル」(手まり咲き)、「ブルースカイ」(がく咲き)についてロングリードタイプの次世代シーケンサー **Sequel** を用いて全ゲノムリシーケンスを行った。原因遺伝子の推定座乗位置に存在する形態形成に関与する可能性のある遺伝子について、対立遺伝子間での配列比較を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) アジサイの全ゲノム解読

ロングリード次世代シーケンサー **Sequel** の解読データのアセンブルを行ったところ、**3,779** 個のコンティグ(全長約 **2.2Gb**) が構築された。コンティグ中からは **36,930** 個の遺伝子が予測された。**12GM1 集団** の **ddRAD-Seq** データから作成した連鎖地図を基に **pseudomolecule** 配列を構築したところ、コンティグ全長の約半分にあたる **1.07Gb** について **pseudomolecule** に配置された。これらのゲノム・遺伝子情報については、**Plant Garden** 内、**Hydrangea macrophylla** データベース (<https://plantgarden.jp/ja/list/t23110>) に登録・公開されている。

#### (2) 原因遺伝子の座乗位置の推定

**ddRAD-Seq** 分析を実施したところ、**12GM1 集団** および **KF 集団** のいずれにおいても、手まり咲き/がく咲き性は第4染色体に座乗するコンティグに強く連鎖することが明らかとなった。

手まり咲き性に連鎖したコンティグとしては、**02F、46F、60F、84F、176F、340F、493F、653F、669F、735F、744F、1257F、1612F、1617F、2933F**が見出された。

### (3) 手まり咲き—がく咲き個体間の RNA-Seq 解析による発現比較

がく咲き品種—手まり咲き品種間で RNA-Seq 解析による、網羅的な遺伝子発現比較を実施した。

がく咲き品種—手まり咲き品種間で発現量に有意な差があり、かつ原因遺伝子に連鎖するコンティグ上に座乗する形態形成関連遺伝子に着目したが、該当する遺伝子は見出されなかった。

### (4) 全ゲノムリシーケンスによる変異遺伝子の検出

手まり咲き品種およびがく咲き品種計4品種について **Sequel** による全ゲノムリシーケンス配列を取得した。全ゲノムリシーケンスデータを基に、てまり咲き性に連鎖するコンティグ中に見出された形態形成遺伝子の配列比較を行った。この結果、第4連鎖群中に見出された形態形成遺伝子 **S** に4種類の対立遺伝子が存在すること、またこのうち2種類についてはナンセンス変異もしくは大規模配列の挿入による機能欠損を起こしている対立遺伝子であることが見出された(図1)。また手まり咲き品種においては機能欠損型の対立遺伝子のみを保有していることが明らかとなった(図2)。

機能欠損変異を検出する DNA マーカーを作成し、主要なアジサイ品種に対して DNA マーカー検定を行ったところ、ほとんどの品種において、機能欠損型対立遺伝子のみを保有している場合に手まり咲き性となることが明らかとなった。このルールに当てはまらない手まり咲き品種が見出されたが、1種類の未同定の機能欠損型対立遺伝子があると仮定すると説明ができた。また、新規に2種類の、未同定の機能型対立遺伝子が存在することも確認された。今後、さらにリシーケンス解析を追加して行うことで、これらの未同定対立遺伝子の配列を決定することができると考えられた。

以上のことより、連鎖解析により手まり咲き性が座乗すると推定される領域上に、機能型/機能欠損型の対立遺伝子が存在し、がく咲き性/手まり咲き性と高い水準で相関が認められたことから、当該遺伝子は手まり咲き性の原因遺伝子として有力であると考えられた。今後の研究で、この遺伝子がどのように手まり咲き性/がく咲き性の制御をしているのか、その機能解明に加え、中央花/装飾花をどのように咲き分けているのか、その機構の解明を明らかにすることが期待される。

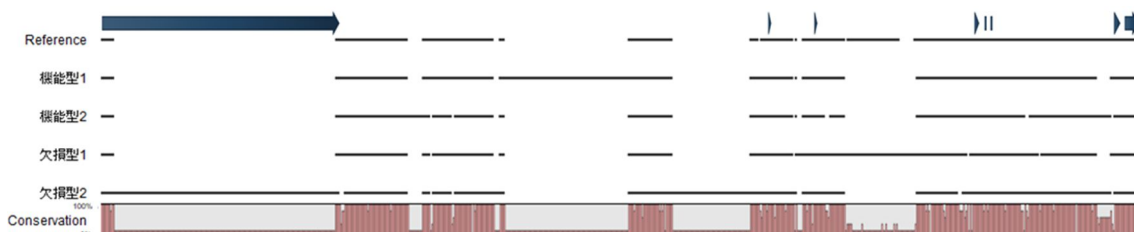


図1. 遺伝子 **S** のリシーケンスから見出された対立遺伝子のゲノム DNA 配列アラインメント  
欠損型1では **nonsense** 変異が、欠損型2では大規模挿入がそれぞれ第1エキソンに存在した。  
図中の矢印はエキソンを示している。



図2. リシーケンスに供試したアジサイ品種とその保有している対立遺伝子

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 Nashima Kenji, Shirasawa Kenta, Ghelfi Andrea, Hirakawa Hideki, Isobe Sachiko, Suyama Takuro, Wada Takuya, Kurokura Takeshi, Uemachi Tatuya, Azuma Mirai, Akutsu Midori, Kodama Masaharu, Nakazawa Yoshiko, Namai Kiyoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Genome sequence of Hydrangea macrophylla and its application in analysis of the double flower phenotype	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/dnares/dsaa026	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nashima Kenji, Shirasawa Kenta, Hirakawa Hideki, Isobe Sachiko, Suyama Takuro, Wada Takuya, Kurokura Takeshi, Uemachi Tatuya, Azuma Mirai, Akutsu Midori, Kodama Masaharu, Nakazawa Yoshiko, Namai Kiyoshi
2. 発表標題 DNA marker development for two different loci linked to double flower phenotype of Hydrangea macrophylla
3. 学会等名 IV international symposium on woody ornamentals of the temperate zone（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奈島賢児・白澤健太・平川英樹・磯部祥子・巢山拓郎・和田卓也・黒倉健・上町達也・東未来・阿久津翠・中澤佳子・小玉雅晴・生井潔
2. 発表標題 アジサイの全ゲノム配列解読および八重咲き性選抜DNAマーカーの開発
3. 学会等名 令和2年度園芸学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奈島賢児
2. 発表標題 八重咲き・手まり咲き遺伝子同定の試み
3. 学会等名 令和元年度園芸学会秋季大会内 アジサイ研究小集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------