

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月10日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2009～2012
 課題番号：21380025
 研究課題名(和文) 合弁花の三次元形態の定量的評価とその多様性を形成する花弁細胞の成長パターンの解析
 研究課題名(英文) Quantitative analysis of the diverse three-dimensional shapes of the corolla and their association with the regulation of petal cell expansion
 研究代表者
 河籬 実之 (KAWABATA SANEYUKI)
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
 研究者番号：10234113

研究成果の概要(和文)：

トルコギキョウ花弁の成長と花冠の3次元形態との関係を調査した。花冠先端が外側に反る品種では、開花後半に花弁先端部の横方向への成長が大きかった。コップ型の品種では花弁中間部や基部での横幅の著しい拡大がみられた。湾曲の少ない漏斗型の花では、花弁の部位間における成長の差は小さかった。これらのことから、花冠の立体的な形態は、花弁の細胞の成長パターンに由来する花弁内の領域的な成長の差によって生じていることが推定された。

研究成果の概要(英文)：

Associations between petal growth patterns and the formation of three-dimensional corolla shapes were investigated in *Eustoma grandiflorum*. The cultivars showing outward curvature in the distal regions of petals exhibited a rapid distal widening during the later stages of flower opening, whereas the cup-shaped cultivars exhibited a rapid widening in the basal to middle regions of petals during earlier stages of flower development. In a funnel-shaped cultivar showing no apparent curvature, no regional differences in petal expansion were found. The data suggested that non-uniform cell expansion within a petal results in petal distortion, and this plays a central role in corolla curvature formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	9,900,000	2,970,000	12,870,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学 園芸学・造園学

キーワード：トルコギキョウ, 花冠, 花形, 開花, 花弁成長, エクспанション

1. 研究開始当初の背景

合弁花類など横幅の広い花弁をもつ花では、花冠を構成する花弁が立体的湾曲構造をもち、そのために、ロート型、ベル型、コッ

プ型など多様な花型が形成される。トルコギキョウの野生種の花冠は花軸に対して放射相称対の構造をしており、真横から輪郭をみると、ベル状あるいはロート状の形をしてい

る。塚田 (1984) は、トルコギキョウの花型を、ベル型、ロート型、コップ方型、平碗型の4種に分けた。また、Harbaugh (2006) は、花型を flat/open 型, bell 型, tube 型に分けている。

花冠の立体的な形態は、花冠を構成する各花弁の大きさと湾曲とによって決まる。花の立体的な形態は花の印象を大きく左右する基本的な形態であるにもかかわらず、それがどのようなしくみにより形成されるのかは、いまだ明らかでなく、特に花弁の湾曲形成機構についてはほとんど解明されていない。

ユリやチューリップでは、開花時に花被が外側に曲がって開いていく。この過程は花被中肋の向軸側と背軸側との間にみられる成長速度の差が原因であるとされる (van Doorn & van Meeteren, 2003)。しかし、このような差次成長により花弁の湾曲が説明できるのは、ユリの中肋のように厚みの大きい器官に限られる。例えば、厚さ 0.1mm の平板が曲率半径 1cm のカーブを形成しているとき、平板の両面の長さの差はわずか 1% にしかならない。このような微少な差は弾性により十分生じる範囲であり、そのために、薄い花弁は容易に曲げることができる。一方、ユリやチューリップの花弁は容易に曲げることができず、無理に曲げようとすれば、花被が割れてしまう。また、バラやトルコギキョウのように薄くてカーブした花弁に切れ目を入れると立体的な形態が崩れ平面的な形態になる。このことは、薄い花弁からなる花冠では花弁が力学的な構造を持つことによって立体形態を維持していることを示す。

トルコギキョウなどの花冠の立体形態を形成する原因は、花弁の表裏における差次成長ではなく、花弁の部位間における不均一な成長であると考えられる。Coen らは、葉状の植物器官の立体的な湾曲がどのように形成されるのかを、細胞の肥大成長の観点から考察している (Nath et al., 2003; Coen et al., 2004; Rolland-Lagan et al., 2003)。例えば、拡大する円盤状の組織を考えると、もし円盤のすべての部位で均一な成長が起きると、平板状の形のまま円盤は拡大するが、もし周縁部における成長が中心部に比べ遅いと、円盤中央部がドーム状に膨れあがると予想される。また逆に周縁部の成長が速ければ周囲がフリル状になる。この考えに基づく、合弁花の花冠あるいは幅の広い花弁からなる花冠の立体的な形態は、花弁成長速度の局所的不均一性により形成されると考えられる。各花弁の中央部分の成長が基部側および末端側に比べ速いと、花弁中央部にドーム状の形態が形成され、釣り鐘状、あるいはコップ状の形態になると予想される。また、花弁の先端側の成長が非常に速いと先端側は外側に広がりトランペット型の形態にな

ると予想される。

2. 研究の目的

本研究では、多様な花冠の立体的形態がどのような仕組みにより形成されるのかを、花弁の局所的な肥大成長の不均一性に着目して明らかにすることを目的とする。

花冠の湾曲を平面に投影した輪郭は、フーリエ変換とフーリエ係数の主成分分析に基づく方法により、定量的に解析することができる。本研究では、1) この方法によりトルコギキョウの多数の品種における形態の差異を定量的に評価すること、2) 花弁の湾曲形成と花弁の局所的な成長の不均一性との関係を明らかにすること、3) 花弁成長の不均一性と細胞肥大との関係を明らかにすること、4) 肥大成長の不均一性を生じる分子生物学的背景を明らかにすること、を目的とする。

3. 研究の方法

(1) フーリエ変換と主成分分析によるトルコギキョウ花冠の湾曲形態の定量化

フーリエ変換による解析法とは対象物の輪郭あるいは平面上の曲線を周期関数に変換し、これをフーリエ級数展開することで得られた係数を、形の記述子として用いる方法である。主成分分析と組み合わせることで、独立した形状特徴を抽出することができる。

野生種含めた合計 122 系統・品種 (Table 1) のトルコギキョウにおいて、花弁を横から見た時の花弁背軸側の中央脈に沿った輪郭

(Fig. 1) と、スキャナーにより記録した花弁の二次元形状を定量的に評価した。花弁の湾曲は、花弁を側面から見た花弁中央脈の背軸面に沿った曲線をトレースし、得られたカーブの輪郭をフーリエ係数に変換して、これらを主成分分析により解析した花弁の二次元形態は楕円フーリエ変換を用いた方法により解析した。

Table 1. Cultivars of Eustoma used in this study.

No. Cultivars	No. Cultivars
1 04-164	29 Peach Impact
2 Aloha Blue Line	30 Piccolo Pink Flash
3 Annie Blue	31 Piccolo White
4 Annie Light pink	32 Pink Silhouette
5 Annie Pink	33 Pinocchio
6 Aries Blue Heaven	34 Rainy Orange
7 Aries Pink	35 Shihomi
8 Aries Rose	36 Shinano Fantasy
9 Aries Silver	37 Shinano Fantasy Pink
10 Asuka no Fubuki	38 Sirena White
11 Asuka no Soyokaze	39 Summer Kiss
12 Broad Blue	40 Sun Pink 141
13 Broad Rose	41 Sun Surf 26
14 Cool Peach	42 Spica Marine18
15 Excel Navy Ring	43 Torino Blue

16 Funny Pink	44 Tsukushi no
17 Furin	Hagoromo
18 Hokutosei	45 Tsukushi no
19 Juno	Shinsetsu
20 Kaguya Hime	46 Tsukushi no
21 Kanna	Soyokaze
22 Kanna Blue	47 Tsukushi no Yuki
23 Maite Lady	48 Vega Coral 74
24 Mellow Yellow	49 Vega Marine 28
25 MEX4106	50 Vega Surf 29
26 Moco White	51 Vega Serenade 194
27 Noble Jade	52 Vulcan Champagne
28 Orihime Mini	53-122 Breeding Lines

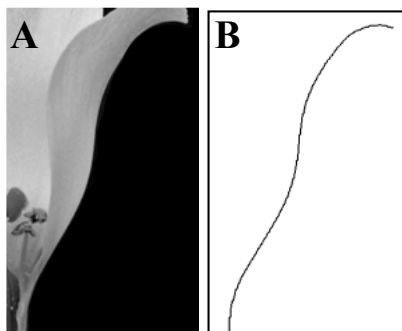


Fig. 1. Side view image of an isolated single petal (A) and the outer contour of the petal extracted from image A (B).

(2) 開花過程における花卉の領域的成長の測定

特徴的な花冠の立体形態の形成において、花卉の成長プロセスがどのように関係しているのかを明らかにするため、特徴的な花冠形態をもつ品種を用いて、花卉を複数の領域に分け、それぞれの領域における花卉の局所的な成長を調査した。

トルコギキョウは比較的大きなつぼみを形成し、急速な開花が始まると2-3日で完全に開花する。そこで急速な開花が始まる直前のつぼみ（ステージ4）を選び、蕾を開いて花卉1枚を丁寧に取り出し、スタンプを用いて、花卉の裏側に5mm間隔のドットをマークした。その後、丁寧に蕾を閉じ、元の状態に戻した。その後、開花前日（ステージ5）、開花開始時（ステージ6）、開花時（ステージ7）にドットをマークした花卉を採取し、400倍に拡大した花卉の画像を得た。花卉を9つの領域に分け、ドットの2点間の距離を測定した。各領域につき2ヶ所測定した。スタンプ面のドット間の距離を基準とし、各花卉部位の成長率を算出した。なお、この処理により、花卉の最終的な形態は影響を受けなかった。

(3) 開花過程における花卉の表皮細胞サイズの測定

花卉の表皮細胞は、花の発達初期に細胞分裂をするが、急速な肥大成長期には分裂をほ

とんどしないことが、種々の花で知られている。急速な開花期における花卉の面積拡大は主に細胞肥大によると考えられる。

各品種について、ステージ4から7までの花卉の表皮細胞サイズを計測した。各品種の各ステージの花をランダムに4~8個採取し、1つの花冠から花卉1枚を採取した。花卉の向軸側表面に透明のマニキュアを塗布し、乾燥後テープでマニキュアを剥がしてスライドガラスに貼付した。光学顕微鏡を使って、各部位において花脈に平行な方向と垂直な方向の直線1mm上に配置している細胞数をカウントした。1mmを細胞数の個数で除することで細胞の縦と横の長さを算出した。これらの積を花卉表皮細胞の面積とした。

(4) トルコギキョウ花卉において発現する遺伝子のDNA塩基配列の解析

様々な品種、ステージのトルコギキョウ花卉からRNAを抽出し、次世代シーケンサー（FLX, Roche）により約60万リードの塩基配列を決定した。発現量の低いRNAの塩基配列も読めるよう、シーケンシングに用いたライブラリーは均一化処理を行った。

また2系統のトルコギキョウについて、次世代DNAシーケンサー（HiSeq2000, イルミナ）によるゲノム配列のショットガンシーケンシングを行った。それぞれの系統について、40Gbの塩基配列を決定し、アセンブリングを行った。

(5) トルコギキョウ花冠における遺伝子発現解析

得られたEST配列データをアセンブルして得られたコンティグから11,000コンティグを選び、それぞれについて設計した2種類の60bpのオリゴプローブをプロットしたマイクロアレイを作成した。これらのマイクロアレイを用いて標準的な花形をもつトルコギキョウ‘あずまの紫’において蕾から開花に至る4ステージにおいて遺伝子発現の変化を調査した。

また、次世代シーケンサーによる解析、および縮重プライマーを用いたRT-PCR法により得られたエクспанション遺伝子について、花形の異なる品種について花卉の部位別にリアルタイムPCRにより発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) フーリエ変換と主成分分析によるトルコギキョウの湾曲形態の定量化

トルコギキョウの花型は、1) ボウル型（Fig. 2-A：花の開きが大きく、花卉がカーブするタイプ）、2) コップ型：花の開きが小さく、花卉がカーブするタイプ（Fig. 2-B）、3) トランペット型：花卉の開きが大きく、

花弁に大きな反りを持つタイプ (Fig. 2-C), 4) ロート型: 花弁の開きが小さく, 花弁のカーブが小さいタイプ (Fig. 2-D) の 4 つの特徴的な花型が見出された。更に自己組織化マップ解析から, 花弁の湾曲形態と平面形態との間に関連性が認められた。すなわち, 花弁中基部に膨らみを持つボウル型とコップ型では, 両者とも横幅の広い花弁を持ち, 比較的直線的に伸びるロート型や花弁に反りを持つトランペット型では, 花弁がいずれも細長い形をしていた。

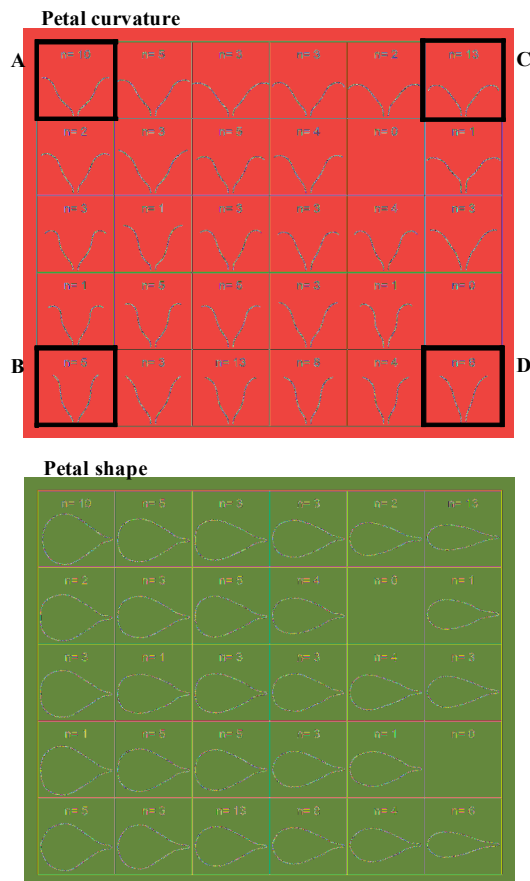


Fig.2 Clustering of cultivars by SOMs using all coefficients of DFTs of petal curvature and petal shapes.

(2) 開花過程における花弁の領域的成長の測定

花冠の立体形態ごとに, 花弁の局所的成長に特徴的なパターンが認められた (Fig. 3). 花弁の湾曲の少ないロート型の品種 'Maite Lady' では, 花弁全体が縦横両方向に均一に成長していた。一方, 花弁先端に反りをもつ品種 'Mellow Yellow' と 'Pinocchio' では, 花弁先端部の横方向への成長が縦方向よりも大きかった。花弁中基部に膨らみを持つコップ型の品種 'Piccolo White' や 'Cute Blue Picotee' では, 花弁基部の横方向への成長が顕著であった。これらの結果を総合すると, 横方向の成長が促進される場合に, その部分に立体的湾曲が形成されていた。このことか

ら, トルコギキョウのように薄い花弁からなる花冠では, 花弁の表裏における長さの違いではなく, 花弁の局所的な成長の歪みによって力学的な構造を持つことにより立体形態が維持されていると考えられた。すなわち, ロート型においては, 花弁の各部位が均一に拡大することで, 平面的な形状が維持され, 一方, トランペット型における花弁先端のカーブは, 花弁先端部が急速に成長することにより, またコップ型においては, 花弁基部が横方向へ成長することによって, 花弁内で不均一な成長による歪みが生じ, それぞれトランペット状, あるいはドーム状の花弁が形成されたと考えられた。

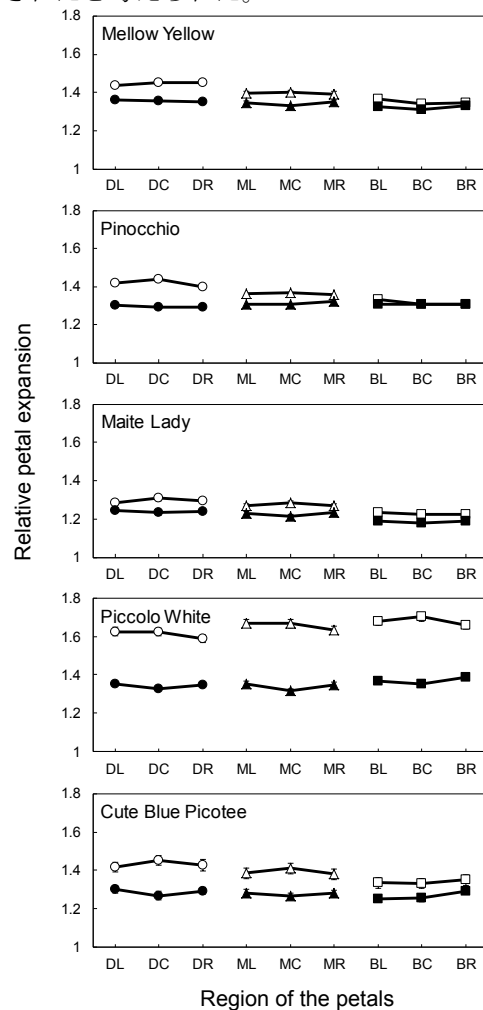


Fig.3 Petal expansion in longitudinal (●, ▲, ■) and latitudinal (○, △, □) directions at distal left (DL), distal center (DC), distal right (DR), middle left (ML), middle center (MC), middle right (MR), basal left (BL), basal center (BC), and basal right (BR) areas during flower opening.

(3) 開花過程における花弁の表皮細胞サイズの測定

特徴的な花冠を持つトルコギキョウ花弁について, 蕾から満開に至るまでの各ステージで, 花弁の表皮細胞のサイズを測定した結

果、花卉に反りを持つ品種 ‘Mellow Yellow’ や ‘Pinocchio’ では、花卉先端の反り返りが起こる時期（開花前後）に、花卉上部の急速な細胞肥大がみられた (Fig. 4). 花卉先端部の横方向への成長は、開花期における著しい細胞肥大に起因していると考えられた。花卉カーブの形成には、細胞肥大が大きく関与していると思われる。ロート型品種 ‘Maite Lady’ では、細胞サイズは、開花過程を通じて直線的に増加しており、細胞の縦横比にも目立った変化は見られなかった。ロート型では、花卉全体の細胞が縦横両方向に均一に成長し、これによって平面的な花卉形状が維持されると考えられた。花卉の横幅が広く、花卉中基部に膨らみを持つコップ型品種の ‘Piccolo White’ では、花卉全部位の細胞が、開花の早い段階で著しく肥大していた。また同時に、細胞の形は横に伸びた形に変化していた。 ‘Piccolo White’ の花卉は横方向への伸長が顕著であったが、これは細胞の縦横比、および開花初期の著しい細胞肥大に由来していると考えられた。

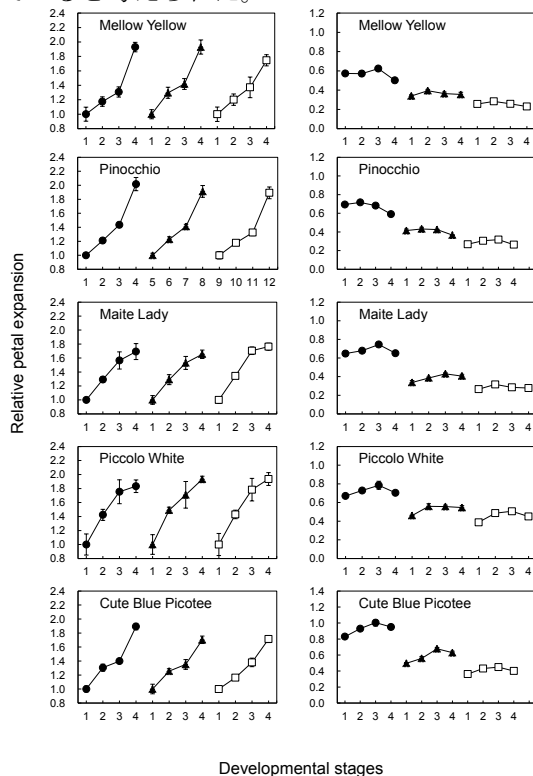


Fig.4 Developmental changes in the size and width-to-length ratio of epidermal cells in distal (●), middle (▲), and basal (□) regions of the adaxial side of petals.

(4) トルコギキョウ花卉において発現する遺伝子の DNA 塩基配列の解析

トルコギキョウ花卉から抽出した RNA をもとに、均一化ライブラリーを作製するとともに、次世代シーケンサーを用いてその塩基配列を決定した。合計 64 万リードが得られ、その平均長は 298bp、総塩基数は 190Mbp であった。これをアセンブリした結果、

63,401 コンティグ (2 以上のリードからなる) が得られ、1Kbp 以上のコンティグは 3,688 個存在した。

またゲノム配列のショットガンシーケンシングを行った 2 系統のトルコギキョウについて、アセンブルにより総塩基長 1.5Gb ずつの scaffold を得た。この配列データを元に細胞成長関連遺伝子を検索した。エクспанシンはファミリーを形成しシロイヌナズナでは少なくとも 36 個が存在する。これらのエクспанシンの類似した配列をトルコギキョウゲノム scaffold に対して検索したところ、36 種類のうち 5 種類が計 8 個のトルコギキョウ scaffold にヒットした。また、エクспанシン特異的な縮重 PCR プライマーを用いて増幅して得られたエクспанシン 5 種類は、計 10 個のトルコギキョウ scaffold にヒットした。

(5) トルコギキョウ花冠における遺伝子発現解析

マイクロアレイ上の全配列の約 20% において、FDR5% 水準で開花に伴う有意な発現の変化が認められた。発現の変化が認められた遺伝子について、GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) により解析した結果、ステージ前半で発現が高い遺伝子セットには、ジャスモン酸応答、細胞壁代謝に関連した遺伝子が多く含まれ、ステージ後半で発現が高い遺伝子セットには、アントシアニン代謝、テルペノイド代謝、表皮細胞修飾に関連する遺伝子が多く含まれた。

花卉での発現が高かった 3 種類のエクспан (EXP1, 3, 5) について花冠形態の異なる品種で花卉内の部位別発現解析を行ったところ、もっとも発現の高いエクспанが品種により異なるとともに、それぞれ品種ごとに固有の発現パターンを示した。ロート型の ‘マイテレディ’ は開花後半に EXP3 の発現が著しく高まったのに対し、コップ型の ‘バルカンイエロー’ では、EXP5 の発現が開花前半、後半いずれでも高く、特に開花後半には花卉基部側で発現が高まった。この発現パターンはコップ型で予想された花卉基部での発現促進と一致し、コップ型の形成に EXP5 が関与する可能性を示した。しかし、トランペット型の ‘メローイエロー’ では、肥大速度とエクспанシンの関係ははっきりしなかった。

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 5 件)

(1) Kawabata S, Li Y., Miyamoto K. EST sequencing and microarray analysis of the

floral transcriptome of *Eustoma grandiflorum*, *Scientia Horticulturae*, 査読有, vol.144, 2012年, 230-235.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.12.024>

(2) Kawabata S, Yokoo M., Nii K. Three-dimensional formation of corolla shapes in relation to the developmental distortion of petals in *Eustoma grandiflorum*, *Scientia Horticulturae*, 査読有, vol.132: 2011年, 66-70.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.034>

(3) Nii K, Kawabata S. The assessment of the association between the three-dimensional shape of the corolla and two-dimensional shapes of the petals by using Fourier descriptors and principal component analysis in *lisianthus*, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 査読有, vol. 80, 2011, 200-205.

<http://dx.doi.org/10.2503/jjshs1.80.200>

(4) Kawabata S, Li Y, Saito T, Zhou B. Identification of differentially expressed genes during flower opening by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray analysis in *Eustoma grandiflorum*, *Scientia Horticulturae*, 査読有, vol.122, 2009年, 129-133.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2009.03.011>

(5) Kawabata S, Yokoo M, Nii K. Quantitative analysis of corolla shapes and petal contours in single-flower cultivars of *lisianthus*, *Scientia Horticulturae*, 査読有, vol. 121, 2009年, 206-212.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2009.01.024>

[学会発表] (計5件)

① Zhang, Yingting. Analysis of α -expansin genes associated with flower opening and corolla shape formation in *Eustoma grandiflorum*. 園芸学会平成 25 年度春季大会. 2013 年 03 月 23 日, 東京農工大学 (東京都)

② 石森 元幸, トルコギキョウの花器官における MADS-box 遺伝子の発現, 園芸学会平成 24 年度秋季大会, 2012 年 09 月 22 日, 福井県立大学(福井県)

③ 河鱒実之. トルコギキョウの花弁成長に伴う遺伝子発現プロファイルのマイクロアレイ解析. 園芸学会平成 23 年度春季大会, 2011 年 3 月 21 日, 宇都宮大学 (栃木県)

④ 宮本健太郎. 次世代シーケンサーを利用したトルコギキョウの花における cDNA デー

タベースの構築. 園芸学会平成 22 年度秋季大会, 10 年 9 月 20 日, 大分大学 (大分県)

⑤ 新居加恵子・河鱒実之. 異なる花型をもつトルコギキョウの開花過程における花弁の形の変化. 園芸学会平成 21 年度秋季大会. 2009 年 9 月 27 日, 秋田大学手形キャンパス (秋田県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河鱒 実之 (KAWABATA SANEYUKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号 : 10234113