

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850017

研究課題名(和文) フロリゲン・アンチフロリゲン遺伝子群から探るサクラの花序形態形成の多様性

研究課題名(英文) The variation in inflorescence architecture of flowering-cherries, and its clarification by expression analysis of FT/TFL1/CEN homologous genes

研究代表者

江角 智也 (ESUMI, Tomoya)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：30548764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：サクラは散房花序から散形花序の形態多様性を示す。その違いを遺伝子レベルで特徴付けて解明することを目指し、フロリゲン・アンチフロリゲン遺伝子を解析の糸口として花序の形態形成の分子メカニズムを探った。サクラ140品種の花序形態を調査し、花序軸伸長と花数との関係、花序軸伸長と開花の早晚との関係を見出した。次に、サクラ7品種の花芽分化を走査型電子顕微鏡で比較観察し、花序発達の初期段階の小花原基誘導の違いについて明らかにした。花序組織におけるFT相同遺伝子、TFL1相同遺伝子、およびCEN相同遺伝子などの遺伝子発現について調査したが、それら遺伝子発現と花序形態の違いとに関係性を見出すことは出来なかった。

研究成果の概要(英文)：The variety of flowering-cherries show various inflorescence architectures, which is one of the important traits affecting their ornamental quality. The size and structure of each inflorescence of 140 flowering-cherry cultivars were investigated at full-bloom stage. The inflorescence architecture diverged widely from corymb to umbel. The inflorescence size of each cultivar was related to the blooming date of each. The first step of inflorescence development was observed at the floral differentiation stage when flower primordia were initiated in the bud. The expression of some of FT/TFL1/CEN homologous genes were detected in inflorescence tissues, however the relationship between these gene expression and morphological variation couldn't be elucidated.

研究分野：農学

キーワード：花序形態 花芽分化 花数 花序軸伸長 サクラゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

植物の開花にまつわる研究において、ABCモデルに代表される花器官形成に関することや、フロリゲン遺伝子 (*FT* 遺伝子) に代表される花成誘導に関することは、近年の分子生物学的研究により、その理解がかなり深まってきた研究領域である。しかしながら、花成が起きてから開花に至る過程で、花がどのようにまたいくつ着生するのかといった「花序の形態形成」については、未解明の部分が多い研究領域となっている。花序の形づくりは植物種によって様々であることから、それぞれの種もしくは属・科において研究を進めていくことがその理解のためには必要である。

園芸植物において、花序の形態は花の観賞価値や果実の生産性などに関わる重要な形質であり、良質な果実生産を行うための摘花(果)作業の作業性にも影響する形質である。花序の形づくりのメカニズムを理解することは、形態を改変するような品種改良や、形態形成の特徴を活かした栽培技術の開発に繋がるものと考えられる。

### 2. 研究の目的

種内においても異なる花序形態を示すサクラ品種・系統を用い、フロリゲン・アンチフロリゲン遺伝子 (*FT*・*TFL1* 相同遺伝子) を糸口に、既知情報に基づき花序形態形成への関与が疑われる遺伝子の発現パターンと花序の形態形成パターンとの関係性を解明することで、サクラの花序発達において働いている転写因子遺伝子を中心とした遺伝子群を明らかにし、形態多様性が生じる遺伝的原因を追及していく。

サクラの花序形成に関する遺伝的分子メカニズムの解明は、花序形態を改変するような育種の基盤となり、例えば1花そう当たりの花数が多くゴージャスな見栄えのサクラや、近縁のサクラ属果樹においてはブドウのように房成りの果実となるオウトウやモモ、ウメなどの作出に繋がるかもしれない。

### 3. 研究の方法

(1) 島根大学で維持管理しているサクラ遺伝資源 140 品種の花序の発達について、複数年間にわたり花序形態の調査を行い分類や特徴付けを行った。

(2) 花序形態の異なる品種をいくつか用いて、それらの花芽分化を走査型電子顕微鏡によって観察し、花序発達の初期段階について調査した。

(3) 花序形態の異なる品種の花序軸および花梗における遺伝子発現レベルの比較を行った。フォスファチジルエタノールアミン結合蛋白質 (PEBP) をコードする *FT* (フロリゲン)、*TFL1* (アンチフロリゲン) および *CEN* (アンチフロリゲン) の相同遺伝子についてまず調査した。また、花の形成に関与する *LFY* および *API* の相同遺伝子の発現についても調

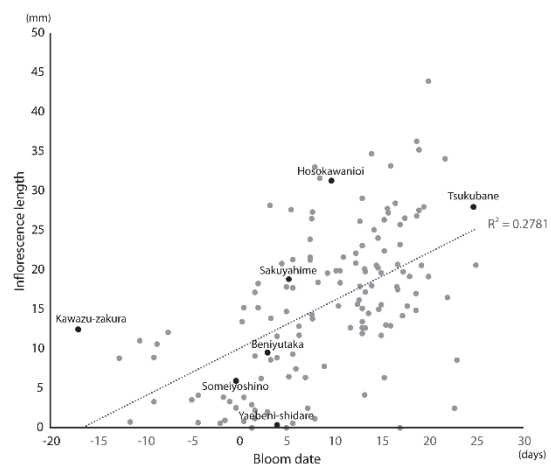
査した。

(4) 花序形態形成に関与する遺伝子を新たに見出していくために、網羅的解析手法も必要であると考え、そのための研究基盤の構築、および花序形態データを用いたゲノムワイド関連解析による SNPs マーカーの探索を試みた。

### 4. 研究成果

(1) 140 品種・系統の開花時の花序構造について計測を行った。当初、ノギスによる計測を行っていたが、イメージスキャナによる画像取り込みと PC を用いた画像解析による計測方法を確立し、多数のサンプルを高効率に、また高精度に計測できるように工夫した。

花序軸の長さ、花梗の長さ、1 花序あたりの花数、また満開時期について、それぞれの関係性を求めたところ、満開時期の遅い品種・系統ほど、花序軸および花梗が長く伸長し、散房花序を形成することが明らかとなった(第1図)。また、1 花序あたりの花数と花序軸長についても弱い正の相関が見られた(データ略)。



第1図 満開日と花序軸の長さとの関係

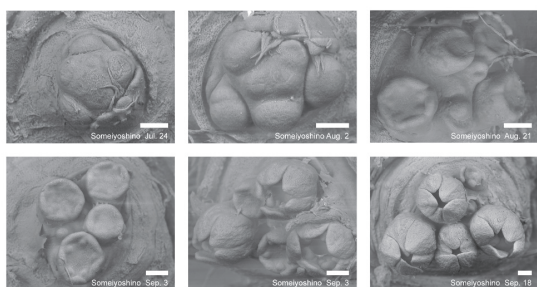
横軸は各品種・系統の満開日を「染井吉野」の満開日との差で示している。縦軸は花序軸の長さ (mm)。

花序軸が長く、1 花序あたりの花数が多い品種・系統は、オオシマザクラやサトザクラに分類されるものが多く、逆に、花序軸が伸長せず散房花序を示す品種・系統は、エドヒガンに分類されるものに多かった。オオシマザクラやサトザクラの品種・系統では、春に花芽が萌芽した後、開花までに花序軸や花梗が急速に伸長し、見た目として大きな花序を形成する。花序軸の伸長程度は年によるばらつきも大きく、環境条件の影響も受けていることが明らかとなった。

(2) 前項の開花時の形態調査を踏まえ、花序形態や開花時期の異なる品種を用いて、花芽分化の過程について比較観察を行った。満開時期の早い順に、「河津桜」、「染井吉野」、「八重紅枝垂」、「紅豊」、「咲耶姫」、「細川句」、および「突羽根」の計 7 品種を用い

た。また、花序形態的特徴差異として、‘咲耶姫’と‘細川匂’は満開時の1花序あたりの花数が5個程度になる品種であり、‘紅豊’と‘突羽根’は満開時の1花序あたりの花数が3個未満の品種である。

2015年と2016年の7~10月にかけて当年枝に形成された腋芽内部の様子を経時的に観察し、その花芽への分化のタイミングや形態変化を比較した(第2図)。その結果、花芽分化時期は翌春の開花・満開時期とは関係がないこと、1つの花芽中に分化する小花原基数は開花時の1花序あたりの花数より若干多いことなどが分かった。花芽分化時の観察からは、花序軸や花梗の伸長の程度の違いについては明らかにならなかった。



第2図 ‘染井吉野’の花芽分化の様子

2015年7月24日から9月18日にかけての花芽内部の小花原基の分化と発達。バーは100 μm。

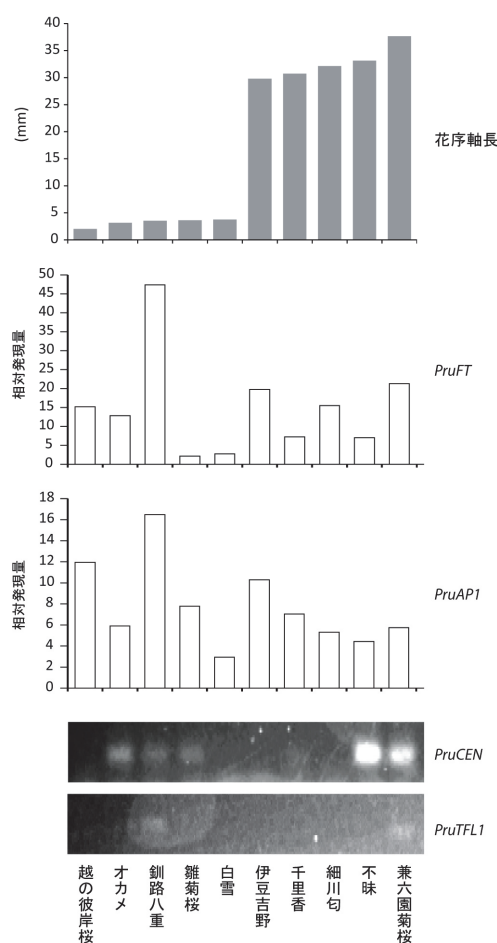
花序形態は、花芽分化時に誘導される小花原基の数が基本となるが、春の萌芽期から満開まで花序軸および花梗の伸長程度もあわさって最終的な花序形態が出来上がることが明らかとなった。

(3) いくつかの品種を取り上げ、花序軸および花梗における *FT* 相同遺伝子 (*PruFT*)、*TFL1* 相同遺伝子 (*PruTFL1*)、*CEN* 相同遺伝子 (*PruCEN*) の発現解析を行った。また、モデル植物などで小花原基の形成に関わるとされる *LFY* 相同遺伝子 (*PruLFY*) と *API* 相同遺伝子 (*PruAPI*) についても発現解析を行った。発現解析は、SYBR-green 色素のリアルタイム PCR 法による定量 RT-PCR、もしくは RT-PCR を行い増幅させた DNA 断片をアガロースゲルで電気泳動し EtBr 染色で検出する方法を用いた。

本実験において、*PruLFY* は RT-PCR では増幅が見られず、花序軸や花梗において発現していないものと考えられた(データ略)。また、*PruTFL1* は、35 サイクルの RT-PCR を行った後、アガロースゲルで電気泳動し EtBr 染色すると、いくつかの品種で辛うじて薄い増幅 DNA バンドが検出される程度であった(第3図)。開花時の花序軸や花梗において *PruTFL1* はほとんど発現していないものと考えられた。一方、*PruCEN* はいくつかの品種の花序軸や花梗で特異的に強く発現していたが、花序軸や花梗の伸長程度との関係性は見出せなかった。しかしながら、他の解析した遺伝子に比べて、品種間の発現量の差異が顕

著であることが、アガロースゲルによる検出からでも窺えることから、*PruCEN* の働きについて今後解明していくことは興味深いと思われた。

*PruAPI* および *PruFT* は、アガロースゲルを用いた検出による RT-PCR で十分な発現が確認されたことから、リアルタイム PCR による定量的解析によって最終的なデータを得た。その結果、花序伸長に対して抑制的に働くと想定していた *PruAPI* は、長い花序軸を持つ品種の花序軸でも十分に発現しており、花序軸の長さによる発現量の大小に関係性は見られなかった。さらに、フロリゲン遺伝子である *PruFT* も、花序軸や花梗の伸長に対して何かしらの関係性を持つと想定していたが、発現解析の結果からはその関係性を見出せなかった。



第3図 花序軸長の異なる品種の花序軸における遺伝子発現解析

*PruFT* および *PruAPI* はリアルタイム PCR 法を用いた定量 RT-PCR (ハウスキーピング遺伝子 (*PruTEF2*) の発現量で補正済)、*PruCEN* および *PruTFL1* は 35 サイクルの RT-PCR の産物をアガロースゲルによる電気泳動後 EtBr 染色で検出したもの。 *PruTEF2* の RT-PCR 後ゲル泳動写真については記載省略。

*FT* 相同遺伝子については、ヨーロッパスモモにおいて *FT* 相同遺伝子を高発現させる組換えを行うと花序組織の伸長や花数の増加が観察されていること(引用①)や、同じバラ科植物のニホンナシにおいては芽の休

眠・萌芽への関与が示されている(引用②)ことから、本研究においても満開日の違い(つまり休眠の程度の違い)や、1花序あたりに形成される花数の違い、また花序軸・花梗の伸長程度に何かしらの関係性があるものと考えているが、本実験ではその関係性の有無を論じるための十分なデータが得られていない段階にある。今後、遺伝子発現の解析に供試する品種・系統の数をさらに増やすとともに、花序の花数は花芽分化の段階で既に決定されていることも踏まえ、花芽分化時期も考慮した遺伝子発現解析などを進めて行く必要があると考えている。

(4) 花序の形態形成に関わる遺伝子探索のためのゲノムワイド関連解析を実施するにあたり、サクラのゲノム情報があるとよいが、現状サクラゲノムは未解読である。

そこで、サクラのゲノム解読を、かずさDNA研究所(千葉県)の白澤氏の協力を得て進めることとした。サクラで開花などの標準木に使用される‘染井吉野’の原木候補(上野恩賜公園植栽)からDNAを抽出し、illumina MiSeq シークエンサーによるショットガンシーケンスを行った。既に解読を完了されているオウトウ(サクランボ)のゲノム情報も参考にシーケンスデータの整理を行ったが、‘染井吉野’はこれまでの研究論文などで雑種起源であると述べられている通り、遺伝的なヘテロ性のため不十分な解読結果となった。今後、ロングリードのシーケンスデータを補うなどして、ゲノム解読を完成させたい。

一方、サクラ品種および近縁植物の計138種のゲノムDNAを用いたRAD-seq(Restriction Site Associated DNA Sequence)法による系統解析が白澤氏により進められた。現在、その解析データを参考に花数や花序軸長の形質についてGWAS(ゲノムワイド関連解析)によるマーカー探索を試みているところであるが、暫定的な解析結果では関連するマーカーを見出せず、継続して再解析を進めている状況にある。この解析を高精度で行うためには、やはり、その研究基盤としてサクラゲノム解読や人為的交雑による分離集団が必要であるとも考えられた。

#### <引用文献>

① SRINIVASAN, C., DARDICK, C., CALLAHAN, A., and SCORZA, R. Plum (*Prunus domestica*) trees transformed with poplar *FTI* result in altered architecture, dormancy requirement, and continuous flowering. *PLoS ONE* 7(7): e40715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040715>. (2012)

② ITO, A., SAITO, T., SAKAMOTO, D., SUGIURA, T., BAI, S., and MORIGUCHI T. Physiological differences between bud

breaking and flowering after dormancy completion revealed by *DAM* and *FT/TFL1* expression in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Tree Physiol* 36 (1): 109-120. doi: 10.1093/treephys/tpv115. (2016)

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① ESUMI, T., TADA, Y., and ITAMURA, H. Variation in the period of flower differentiation and the time of blooming in Japanese flowering-cherries. *Acta Horticulturae* (8th International Cherry Symposium), 査読有, (投稿中)

[学会発表] (計 3 件)

- ① ESUMI, T., YOSHIBAYASHI, R., SUEHIRO, Y., and ITAMURA, H. Development and flowering-related gene expressions in inflorescence and peduncles in Japanese flowering-cherries. 7th International Rosaceae Genomics Conference, Seattle, USA. (2014 Jun. 24-26)
- ② ESUMI, T., TADA, Y., and ITAMURA, H. Phenotyping of inflorescence morphology for flowering-cherry ‘Sakura’ genetic resource. 8th International Rosaceae Genomics Conference, Angers, France. (2016 Jun. 21-24)
- ③ ESUMI, T., TADA, Y., and ITAMURA, H. Variation in the period of flower differentiation and the time of blooming in Japanese flowering-cherries. 8th International Cherry Symposium, Yamagata, Japan. (2017 Jun. 5-9)

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

江角 智也 (ESUMI, Tomoya)  
島根大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号: 30548764

##### (4) 研究協力者

多田 康浩 (TADA, Yasuhiro)  
吉林 隆太 (YOSHIBAYASHI, Ryuta)  
末廣 優加 (SUEHIRO, Yuka)  
板村 裕之 (ITAMURA, Hiroyuki)  
白澤 健太 (SHIRASAWA, Kenta)