

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850022

研究課題名(和文)カーネーションの花型決定機構の解明

研究課題名(英文)Identification of the gene controlling flower type in carnation

研究代表者

八木 雅史(Yagi, Masafumi)

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 花き遺伝育種研究領域・主任研究員

研究者番号：40391403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：連鎖地図を用いた連鎖解析からカーネーションの八重咲き性の遺伝子座を明らかにし、CES0212マーカーが極近傍に存在することを明らかにした。CES0212マーカーの近傍に存在するAPETALA2遺伝子について八重咲き品種と一重咲き品種のゲノム配列を比較した結果、八重品種には1019bpの挿入配列が存在することを明らかにした。このことから、カーネーションの八重咲きの発生にはAPETALA2遺伝子の変異が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Linkage analysis using a linkage map revealed the double flower locus in carnation, and identified that CES0212 marker was the tightly linked to the locus. Genome sequence analysis of the APETALA2 gene neighboring to CES0212 marker in double and single flower cultivars revealed that the existence of 1019 bp insertion in the double flower cultivar. These results suggested that the mutation of APETALA2 gene is involved in the occurrence of double flower in carnation.

研究分野：花き育種

キーワード：八重咲き 一重咲き 花型 SSRマーカー 連鎖地図 APETALA2

1. 研究開始当初の背景

一重咲き、八重咲きの花型はカーネーションの重要形質の一つである。カーネーションの八重咲きはペチュニアやホウセンカと同様、花弁そのものが奇形的に生じる器官重複により生じ、雌ずいや雄ずいは健全に存在する。雌ずいや雄ずいの花弁化による八重化に関しては、いわゆる ABC モデルの各クラスの遺伝子の欠損等により生じることが知られており、各遺伝子群は様々な品目で明らかになっているが、カーネーションのように器官重複により生じる八重咲き性に関して、原因遺伝子を特定した報告はこれまでのところない。

2. 研究の目的

カーネーションの一重咲き、八重咲きの花型は優性の単因子 (D) に支配されており、劣性ホモ型 (dd) が一重、ヘテロ型 (Dd) が八重、優性ホモ型 (DD) は奇形八重 (超八重) になると考えられてきた。これまでに連鎖地図を利用した遺伝解析から、D 遺伝子座の連鎖地図上の位置を明らかにし、花型に連鎖する SSR マーカーを見出した。その結果、近年の主要品種は通常ならば奇形八重を生じる DD 型の遺伝子型をもつにもかかわらず、超八重のような花型を示さないことから、奇形花の形成を抑制する新たな s 因子の存在が示唆された。本研究では、s 因子の連鎖地図上へのマッピングを試みるとともに、まだ明らかになっていない D 遺伝子座の責任遺伝子の特定を行う。

3. 研究の方法

(1) D 遺伝子特定

これまでに研究材料として用いた系統 85-11 (八重) × プリティファボーレ (一重) の連鎖解析 F₂ 集団を 500 個体以上に拡大し、連鎖解析から D 座近傍の領域の詳細化を行う。D 座近傍の SSR マーカーの中から、花型の表現型と一致率の高い、より近傍に存在する SSR マーカーの絞り込みを行う。さらに、収集済みのゲノム配列情報を利用してより近傍へのマーカーの設計を試み、詳細マッピングを行うことで、D 遺伝子の候補領域ならびに候補遺伝子の特定を行う。

(2) s 因子の解析

奇形花発生抑制 s 因子解析のために、DDss 型の地中海系品種 (現在の主流品種) と上記の F₂ 集団の中から DDs-型と推定される超八重系統を交配し、100 個体以上の s 因子解析集団を作成し、形質評価ならびに連鎖地図を作成し、s 因子の連鎖地図上へのマッピングを行う。

4. 研究成果

(1) D 遺伝子特定

連鎖地図の詳細化

カーネーションの八重咲き性を支配する

優性の D 遺伝子を明らかにするために、系統 85-11 (八重) × プリティファボーレ (一重) の F₂ 集団を既存の 121 個体から 543 個体に拡大し、花型の調査ならびに遺伝子型解析を行った。これまで明らかにしている八重咲き性の遺伝子座 D に連鎖する 4 つの SSR マーカーを用いて、拡大した分離集団の遺伝子型を調査した結果、一重、八重の花型の形質と遺伝子型の分離は認められなかった (図 1)。一方で、これらの 4 つの SSR マーカーについて、既存の八重品種の遺伝子型を調査した結果、CES0212 マーカーは、40 品種以上の八重咲き品種に関して、花型と遺伝子型に矛盾が認められなかった。このことから、CES0212 マーカーが、八重咲きの遺伝子座の極近傍に存在する可能性が示唆された。

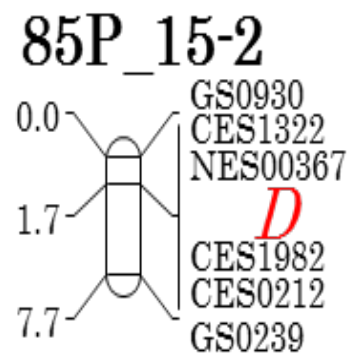


図 1 八重咲き遺伝子座 (D) の座乗する連鎖群 15-2

左は遺伝距離、右は SSR マーカーを示す。

AP2 遺伝子の特定

CES0212 マーカーについて、カーネーションゲノムデータベース (<http://carnation.kazusa.or.jp/>) で検索した結果、CES0212 は 4 個の推定遺伝子領域を含むスキャフォールド A 上に存在し、DcaB 遺伝子上に存在することが明らかになった (図 2)。また、隣に位置する DcaC は、花器官の形態形成に関与することが知られている APETALA2 (AP2) という転写因子であることが明らかになった。そこで、AP2 が有力な候補遺伝子であると考え、AP2 遺伝子に関して、一重品種、八重品種のゲノム塩基配列を解析した。

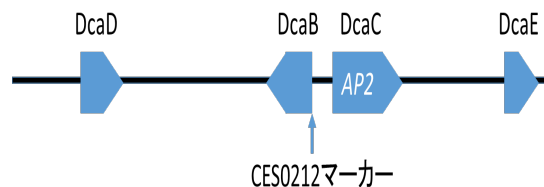


図 2 CES0212 マーカーの含まれる scaffoldA の遺伝子構造

青色の矢印が遺伝子と相対的な長さ、向きを表す。

AP2 遺伝子の配列比較

ゲノムデータベースは、「フランセスコ」という八重品種をもとに作成されていることから、これらの遺伝子配列をもとに設計したプライマーの PCR 増幅産物のシーケンスおよび Straight Walk キットを用いた未知領域の配列決定を組み合わせ、一重品種「プリティファボーレ」の該当遺伝子の塩基配列を決定した。

最終的に、「プリティファボーレ」に関して、プロモーター領域を含む 6292 塩基の配列を決定した。2 品種のゲノム配列の比較解析の結果、両品種ではいくつかの 1 塩基変異や挿入欠失配列が認められたが、miR172 という低分子 RNA により発現制御を受けると考えられる領域において、「フランセスコ」では 1019 塩基の挿入配列が存在することが特徴的であった。そこで、cDNA 配列について二つの品種を比較した結果、「フランセスコ」では挿入配列の影響により、「プリティファボーレ」に比べて遺伝子自体が短い断片になっていると推定された(図3)。

また、挿入配列を基にプライマーを設計し、30 品種以上の八重品種を調査した結果、同様の挿入がすべての品種で確認できた(図4)。

```
          350
'フランセスコ' (八重)  ASGLDLAK-----
'プリティファボーレ' (一重) ASGFPSIATASTAAFGQQQYSNSTSLHYTYPL
          350      360      370      380
```

図3 「フランセスコ」および「プリティファボーレ」の cDNA 配列の比較

数字は開始コドンからのアミノ酸の数を示す。

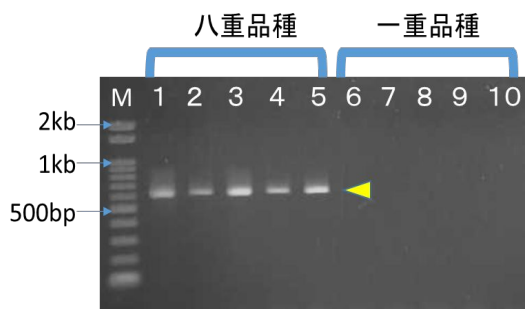


図4 挿入配列に設計したプライマーを用いた八重品種、一重品種の PCR による増幅。八重品種特異的に増幅が認められる。

形質転換体の作出

次に、八重品種「フランセスコ」の AP2 遺伝子配列をもとに、過剰発現用のコンストラクトを作成し、一重のシロイヌナズナおよびトレニアに形質転換を行った。これまでに両種を用いて 30 個体以上の形質転換体を作成したが、これまでのところ、花器官に形質の

変化が認められる個体は得られていない。

以上の結果から、カーネーションの八重咲きは、カーネーションの AP2 遺伝子のマイクロ RNA による発現制御を受けている領域に、約 1kb 前後の挿入配列が生じたことで、AP2 遺伝子の分解制御が抑制されることで、花器官の重複が生じたという仮説が考えられた。今後はこの仮説を実証するために、挿入配列や使用するプロモーター等を考慮して組換え体を作成し、機能解析を進めることが必要であると考えられた。

(2) s 因子の特定

現在の主要な品種群に存在していると想定している、がく割れや貫生花等の超八重咲きのような奇形花発生を抑制する s 因子を明らかにするために、系統 85-11 (八重) × プリティファボーレ (一重) の F₂ 集団の中から DD--型、DDss 型、DDs-型と推定される 7 系統と DDss 型を有すると推定している 4 品種を用いた 42 通りの交配を行い、1482 粒を得た。このうち、4 組み合わせについて、合計 295 個体 (各 101、100、64、30 個体) について、花型の形質調査を行ったが、期待していた、八重、超八重の分離 (およそ 1:1) は認められず、ほとんどが八重咲きであった。

このことから、奇形八重の発生抑制には他の機構の関与を想定する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Yagi M., K. Shirasawa, T. Waki, T. Kume, S. Isobe, K. Tanase and H. Yamaguchi (2017) Construction of an SSR and RAD marker-based genetic linkage map for carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Molecular Biology Reporter* 35 : 110-117. DOI: 10.1007/s11105-016-1010-2 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

八木雅史、白澤健太、和氣貴光、磯部祥子、棚瀬幸司、山口博康、SSR および RAD マーカーによるカーネーション連鎖地図の作成、園芸学会平成 28 年度秋季大会、2016 年 9 月 10 ~ 11 日、名城大学 (愛知県・名古屋市)

八木雅史、藤原すみれ、山口博康、カーネーションの花型遺伝子座近傍に存在する AP2 の配列解析、園芸学会平成 27 年度秋季大会、2015 年 9 月 26 ~ 27 日、徳島大学 (徳島県・徳島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 雅史 (YAGI, Masafumi)

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 花き遺伝育種研

究領域・主任研究員
研究者番号：40391403