

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03762

研究課題名(和文)キクの花型形成機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of flower type formation mechanism in chrysanthemum

研究代表者

柴田 道夫 (SHIBATA, Michio)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：80355718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：キク科のノボロギクで舌状花形成への関与が報告されているCYC2遺伝子を二倍体キク属キクタニギクから7種類単離した。頭状花で発現レベルが高かった3種類について時空間的な発現を解析した結果、舌状花の花弁で発現が認められたのに加えて、筒状花の雄蕊および雌蕊においても発現が認められた。CYC2遺伝子をターゲットとしたCRISPR/Cas9システムによる遺伝子破壊を試みた結果、数塩基が欠失した形質転換体が複数得られ、その表現型変異には舌状花が筒状花化する傾向が認められた。ゲノム編集による遺伝子破壊の結果からも、CYC2遺伝子は舌状花のみならず筒状花における小花形成に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花きでは一般に一重咲きに比べて八重咲きの観賞価値が高い。八重咲きはABCクラス遺伝子の変異によるとの報告があるが、キク科の花は舌状花と筒状花からなる頭状花序を形成していることから、八重咲きのメカニズムは異なると推定される。近年、キク科における筒状花から舌状花への分化を制御する候補遺伝子としてCYC2が注目されてきたが、本研究では、キク科花きで最も重要なキク属のキクタニギクで初めて内在遺伝子破壊に成功し、CYC2遺伝子が舌状花アイデンティティの獲得のみならず筒状花形成にも関与することを明らかにできた。今後の栽培ギクの品種改良にとっても有用な成果である。

研究成果の概要(英文)：Seven CYC2 genes, which had been reported to be involved in ray floret formation in *Senecio vulgaris*, were isolated from a diploid wild species of *Chrysanthemum*, *Chrysanthemum seticuspe*. Spatiotemporal expression analyses of three CYC2 genes with high expression levels in the early stage of capitulum development showed that CYC2 genes were expressed in stamens and pistils of disc florets, as well as petals of ray florets. Gene knock-out by CRISPR/Cas9 genome editing system targeting CYC2 gene resulted in multiple transformants lacking several bases within the target site of CYC2 gene, and phenotypic analysis of these transformants showed a tendency for ray florets to be converted to disc florets. The results of gene disruption by genome editing also suggested that the CYC2 gene is involved in florets formation not only in ray florets but also in disc florets.

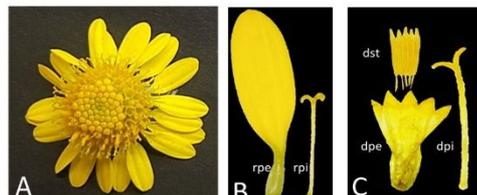
研究分野：園芸科学

キーワード：遺伝子 花型 頭状花序 八重咲き

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) キク科植物は被子植物の中で真正双子葉植物に分類され、単子葉植物のラン科植物と並んで最も進化した植物分類群とされている。今から3,000~4,000 万年前に南アメリカで最初に生まれたとされ、現在は世界に約 1000 属 2 万を超える種が分布している。周囲の舌状花と中心部の筒状花からなる頭状花序を構成している点がキク科植物の大きな特徴である(第 1 図)。栽培ギク (*Chrysanthemum morifolium*) が含まれるキク属には筒状花だけからなる種も存在する一方、栽培ギクには舌状花と筒状花の数と割合が異なるさまざまな花型の品種が存在し、舌状花や筒状花の形も船底状、槌状、管弁、さじ状、丁字咲きなどきわめて多様である。



第1図. キク科キク属二倍体野生種キクタニギクの花
A:頭状花序 B:舌状花 (rpe:花弁,rpi:雌蕊)
C:筒状花 (dpe:花弁,dst:雄蕊,dpi:雌蕊)

(2) 舌状花や筒状花への分化を制御する遺伝子の存在は百年近くも前にノボロギク (*Senecio vulgaris*) で予言され *RAY* と名付けられていたが、その分子実体がキンギョソウの花弁形状を制御する遺伝子として発見された TCP 転写制御遺伝子ファミリーの一つである *CYCLOIDEA* (*CYC*) 遺伝子であることが近年明らかになっている (Kim ら、2008). ヒマワリ (*Helianthus annuus*) では *CYC2* クレードに属する遺伝子の一部に変異が入ることにより八重咲き性を生じていることが示唆されており (Chapman ら、2008,2012) ガーベラでは *CYC2* クレードに属する遺伝子の過剰発現体の形態観察により同遺伝子の八重咲き化への関与が示唆されている (Broholm ら 2008、Juntheikki ら 2014) が、決定的な証明には至っていない。これらの報告では、主に 35S プロモーターによる過剰発現体およびコサプレッション変異体を作成して *CYC2* 遺伝子の機能を推定しているが、これら形質転換体で著しい生育遅延が観察されていることから、過剰発現の副次的な効果である可能性が否定できないことなどが挙げられる。

(3) 近年、マレーシアやベトナムなどからの栽培ギクのスプレーギクの輸入が急増し、花型変異に乏しいわが国独自の夏秋ギク型スプレーギクにおける花型変異の拡大を求める声が高まっている。栽培ギクにおける花型形成機構が明らかになれば、キクの品種改良に直接貢献できる可能性が高い。栽培ギクは六倍体であり、しかもゲノムサイズが大きく、ゲノム解析研究が遅れている。キク属における二倍体野生種であるキクタニギク (*C. seticuspe*) から、世界で初となる花成抑制ホルモン (アンチフロリゲン) をコードする遺伝子 *Anti-florigenic FT/TFL1 family protein (AFT)* が発見される (Higuchi ら 2013) など、キクの花成誘導・抑制機構の大筋が明らかにされ、キクの開花調節の高度化への貢献が期待されている。これまでキクタニギクにおける遺伝子機能解析には主に 1) 35S プロモーターによる過剰発現、2) 転写抑制ドメイン (SRDX) 融合タンパク質の過剰発現、3) RNAi 法による発現抑制が用いられてきた。1) の手法は簡便かつ安定的であるが、遺伝子機能が必要かつ十分であることを示すものではない点、2) の手法は冗長的な複数の転写因子を同時に機能抑制できるが、予期せぬターゲット (off-target) への影響の問題、3) の手法は表現型の解釈について最も信頼性が高いが、完全に発現抑制することが困難であり、期待される表現型が得られる確率も低いという問題点があった。そこで、近年開発されたゲノム編集技術、中でも CRISPR/Cas9 系を用い、機能欠損変異体を安定的に作出・解析することにより、より高い精度での遺伝子機能推定が可能となるものと考えられる。

2. 研究の目的

花きでは一重咲きに比べて八重咲きの観賞価値が高く、多くの花きで育種の進展に伴い八重咲き品種が生み出されてきている。一般に八重咲きは ABCE クラス遺伝子の変異によって形成されると理解されているが、キク科の花は集合花で舌状花と筒状花からなる頭状花序を形成していることから、八重咲きが生まれるメカニズムは異なるものと推定される。近年、筒状花から舌状花への分化を制御する候補遺伝子として *CYCLOIDEA* (*CYC*) が報告されているが、決定的な証明には至っておらず、何よりもキク科花きとして最も重要であるキクにおける研究が未着手であった。そこで本研究では、キク科植物に特徴的な頭状花序における花型形成機構をキク属で解明し、被子植物の花型進化の基礎的知見を得ることを目的とする。得られた研究成果は、栽培ギクにおける花型変異拡大に有用である。

3. 研究の方法

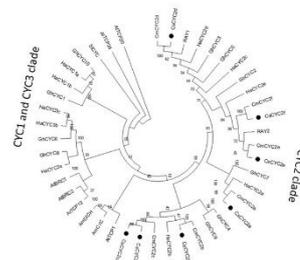
(1) 栽培ギクが含まれるキク属の二倍体野生種で、キク属のモデル植物として位置づけられているキクタニギク (第 1 図) の系統 (NIFS-3) の 1~5 mm の花蕾の舌状花および筒状花から抽出した RNA について RNA-seq 解析を行い、頭状花序発達に伴って発現が変動する遺伝子を網羅的に発現解析し、それぞれに特徴的な発現パターンを示す遺伝子群を抽出した。

(2) 同じくキクタニギクの系統(NIFS-3)の1~5 mmの花蕾を材料として、CYC2およびABCEクラス遺伝子について頭状花発達初期における *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行い、筒状花および舌状花の予定形成領域における発現パターンを明らかにした。

(3) キクタニギクで最も形質転換効率の高い NIFS-3 系統を材料として、ゲノム編集による機能欠損変異体を安定的に作出する技術の開発に取り組んだ。ゲノム編集の手法としては、双子葉植物で汎用されている CRISPR/Cas9 ベクター (pDeCas9_Kan)を用い、導入コンストラクトおよびカルス培養期間等の培養条件の最適化を検討した。まずアグロバクテリウムとしては LBA4404 系統とし、AtU6 プロモーター用いたコンストラクトで実験を開始した。ターゲット遺伝子としてはキクタニギクから単離できた CYC2 遺伝子の中で発現が高かった 3 種類 (*CsCYC2c/d/e*) とした。得られた形質転換体についてターゲットとした CYC2 遺伝子の塩基配列を解析し、ゲノム編集の成否について判定した。数塩基の遺伝子欠失が確認された形質転換体については、人工気象器内で開花させ、表現型変異について解析した。

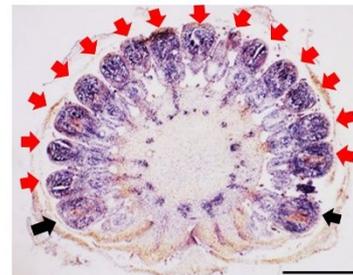
4. 研究成果

(1) 二倍体キク属野生種キクタニギクにおける網羅的な遺伝子発現解析により、キク科のノボロギクで舌状花形成への関与が報告されている CYC2 遺伝子が 7 種類単離できた(第 2 図)。また、頭状花序発達に伴って発現が増加する遺伝子群、頭状花序発達に伴って発現が減少する遺伝子群、3 mm の花蕾で一過的に高発現する遺伝子群など、頭状花序発達に伴って変動する遺伝子を多数特定することができた。



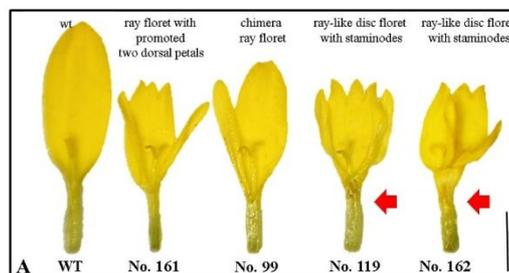
第2図. キクタニギクから単離されたCYC2遺伝子
●Csキクタニギク、Um：銀輪ギク、Hs：ヒマワリ、Gt：カーベス、Rn：ノボロギク、Am：キンギョフウ、Mz：シロイヌナズメ

(2) 単離された CYC2 遺伝子のうち、発現レベルが高かった 3 種類の CYC2 遺伝子 (*CsCYC2 c/d/e*) について時空間的な発現解析を行った結果、ノボロギク同様に舌状花の花弁における発現が認められたのに加えて、筒状花の雄蕊および雌蕊においても発現が認められた(第 3 図)。CYC2 遺伝子はキクタニギクの舌状花のみならず筒状花形成にも関与することが示唆された。



第3図. キクタニギク頭状花序におけるCYC2遺伝子の発現。黒矢印：舌状花、赤矢印：筒状花

(3) キクタニギクの小花形成に関与すると考えられた *CsCYC2c* および *CsCYC2e* をターゲットとした CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子破壊を試みた結果、*CYC2c/e* 遺伝子の数塩基欠失が確認された形質転換個体が複数得られた。ターゲット遺伝子配列の解析の結果、塩基欠失パターンは単純でなく、得られた形質転換個体はキメラとみなされた。得られた形質転換体を開花させ、野生型との表現型変異を解析したところ、野生型に比べて、舌状花、筒状花ともに花弁、雌蕊が短くなる変異が確認された。加えて、舌状花弁では花弁先端の切れ込みや雄蕊様の構造が生じるなど、舌状花が筒状花化する傾向が認められた(第 4 図)。ゲノム編集による遺伝子破壊の結果からも、CYC2 遺伝子は舌状花のみならず筒状花における小花形成に関与することが示唆された。これはキク科植物における世界初のゲノム編集による内在遺伝子破壊の成果であるが、得られた遺伝子破壊株のターゲット遺伝子配列における塩基欠失パターンは単純でなく、かつ得られた形質転換個体はキメラと考えられた。研究期間中に、アグロバクテリウム系統の変更、翻訳エンハンサーや HSP ターミネーターの pDeCas9_Kan ベクターへの導入、AtU6 プロモーターのキクタニギク内在性の CsU6 プロモーターへの変更などについて検討したが、研究期間内にこれらの改変の有効性を確認することができなかった。今後、ゲノム編集による遺伝子破壊での遺伝子の高度な機能解析を行うためには更なる形質転換技術の改良が必要と考えられた。



第4図. ゲノム編集による変異体における舌状花の筒状花化
WT：キクタニギク、右4つ：変異体 赤矢印：雄蕊の痕跡

(4) 本研究では、*CYC2* 遺伝子と ABCE クラス遺伝子のタンパク質間相互作用について BiFC 法により解析したが、当初期待していた相互作用を確認することはできなかった。また、当初、六倍体である栽培ギクについても同様の研究を実施する計画であったが、キクタニギクでの安定した遺伝子破壊実験系に至らなかったこと、併行して進められていたキクタニギクにおける高精度ゲノム解析研究の進捗が遅れ、栽培ギクゲノムの解析を進めることが困難であったことから、栽培ギクでの遺伝子解析に着手することができなかった。但し、栽培ギクの一重咲き品種と八重咲き品種の舌状花および筒状花の分化・発達について調べた結果、舌状花の分化・発達がまず観察されたあと、筒状花の分化・発達が進み、再び舌状花の発達が起こること、多様な舌状花の形態変化は開花直前に起こることが観察された。また、八重咲き品種における舌状花に相当する管弁内に雄蕊様の器官を有する品種の存在が明らかになったほか、丁字咲きの小花にも雄蕊様の器官が存在する品種があることがわかった。なお、本研究の期間中に、自家和合性キクタニギク系統を材料としたキクタニギクのドラフトゲノムの解析結果が報告された(Hirakawaら2019)ほか、まもなくより高精度なキクタニギクのゲノム解析の結果が報告される予定となっている。本研究におけるキク属で初めての内在遺伝子のゲノム編集成功の成果、およびキクタニギクにおける高精度ゲノム解析の研究成果により、今後、複雑であった栽培ギクにおける遺伝子解析が加速されることが期待される。

<引用文献>

Kim, M., M. L. Cui, P. Cubas, A. Gillies, K. Lee, M. A. Chapman, R. J. Abbott and E. Coen. Regulatory genes control a key morphological and ecological trait transferred between species. *Science*.322.2008.1116-1119

Chapman, M. A., J. H. Leebens-Mack and J. M. Burke. Positive selection and expression divergence following gene duplication in the sunflower *CYCLOIDEA* gene family. *Mol. Biol. Evol.* 25. 2008. 1260-1273.

Chapman, M. A., S. Tang, D. Draeger, S. Nambeesan, H. Shaffer, J. G. Barb, S. J. Knapp and J. M. Burke. Genetic analysis of floral symmetry in Van Gogh's sunflowers reveals independent recruitment of *CYCLOIDEA* genes in the Asteraceae. *PLoS Genet*.8. 2012.e1002628.

Broholm, S. K., S. Tahtiharju, R. A. Laitinen, V. A. Albert, T. H. Teeri and P. Elomaa. A TCP domain transcription factor controls flower type specification along the radial axis of the *Gerbera* (Asteraceae) inflorescence. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*. 105. 2008.9117-9122.

Juntheikki-Palovaara, I., S. Tahtiharju, T. Lan, S. K. Broholm, A. S. Rijpkema, R. Ruonala, L. Kale, V. A. Albert, T. H. Teeri and P. Elomaa. Functional diversification of duplicated *CYC2* clade genes in regulation of inflorescence development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant J*.79. 2014.783-796.

Higuchi, Y., T. Narumi, A. Oda, Y. Nakano, K. Sumitomo, S. Fukai and T. Hisamatsu. The gated induction system of a systemic floral inhibitor, antiflorigen, determines obligate short-day flowering in chrysanthemums. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 103.2013.17137-17142.

Hirakawa, H., K. Sumitomo, T. Hisamatsu, S. Nagano, K. Shirasawa, Y. Higuchi, M. Kusaba, M. Koshioka, Y. Nakano, M. Yagi, H. Yamaguchi, K. Taniguchi, M. Nakano, S.N. Isobe. *De novo* whole-genome assembly in *Chrysanthemum seticuspe*, a model species of Chrysanthemums, and its application to genetic and gene discovery analysis. *DNA Res*. 26.2019.195-203

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 呉 業氷・有馬秀和・柴田道夫・樋口洋平
2. 発表標題 Functional analyses of CYC2 genes involved in capitulum development in Chrysanthemum seticuspe
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田道夫
2. 発表標題 遺伝子からみた栽培種の起源ーキクとツバキ
3. 学会等名 園芸学会平成31年度秋季大会小集会第12回伝統園芸研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有馬秀和・樋口洋平・柴田道夫
2. 発表標題 キクタニギクにおけるCYC2遺伝子の時空間的発現と頭状花序形成に関連する遺伝子の探索
3. 学会等名 園芸学会平成30年春季大会
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
研究分担者	樋口 洋平 (HIGUCHI Yohei) (00746844)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授 (12601)	

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