

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07300

研究課題名(和文) ファレノプシスのジベレリンによる花成誘導機構のRNAシーケンスによる解析

研究課題名(英文) RNA sequence analysis of flower induction mechanisms by gibberellins in Phalaenopsis

研究代表者

窪田 聡 (KUBOTA, Satoshi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60328705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ファレノプシスのGAによる花成誘導機構を明らかにするために、RNA-Seqによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。GAを投与すると頂芽において、SPL、AP2、FT、AP1などの花成関連遺伝子と、GA20ox、GA3ox、GA2ox、GID1、DELLA等のGA生合成・シグナル伝達遺伝子が大きく変動した。茎頂部のPhFTの発現量は、GA投与前に比べ処理開始7週目に840倍に増加し、ORAP13は8.3倍に増加した。したがって、GAによる頂芽の花成誘導では、茎頂部においてPhFTが著しく発現し、それにつづいてORAP13の発現量も高まるという特徴的な機構の存在が示された。

研究成果の概要(英文)：Gene expression analysis by RNA-Seq was conducted to investigate the flowering induction mechanism of Phalaenopsis by GA. When GA was applied at apical bud, flower-related genes such as SPL, AP2, FT, AP1 and GA biosynthesis and signal transduction genes such as GA20ox, GA3ox, GA2ox, GID1, DELLA were greatly different. The expression level of PhFT and ORAP13 at the shoot apex increased 840 fold and 8.3 fold at 7 weeks after the beginning of GA application compared with those of before GA application, respectively. Therefore, there are specific mechanism that PhFT was remarkably expressed at the shoot apex, followed by the expression level of ORAP13 was also increased during the flower induction at apical bud by GA.

研究分野：花き園芸学

キーワード：ファレノプシス ジベレリン 花成誘導

### 1. 研究開始当初の背景

ファレノプシスは台湾、オランダ、中国などで主に生産され、世界的に見ても主要な鉢花の一つである。約 20 日の低温処理を行うと約 1 ヶ月で腋芽が伸長し花序が発生する。申請者は従来からファレノプシスの花成誘導機構の解明に向けた研究を行っており、現在まで以下のことを明らかにした。

(1) 低温処理約 1 ヶ月後に腋芽から花序が発生し、これとほぼ同時期に花序中の GA<sub>1</sub> 濃度が急激に増加する(窪田ら, 2009a)。(2) 花成誘導されない高温条件において、高濃度の GA<sub>3</sub> を投与すると、通常開花しない主茎が急速に伸長し、花成が誘導される(窪田ら, 2009b)。

このことから、本来栄養成長しかしない主茎も花芽分化能を持ち、花成は GA 単独で誘導され、腋芽と主茎頂部の花序形成には GA が不可欠であると考えられる。従来、ファレノプシスの花成は低温に焦点を当てた研究が行われてきた。しかし、これらのことは GA がファレノプシスの花成の中心的役割を担っていることを示している。

現在まで、被子植物の花成誘導経路として、自律的経路、春化経路、光周期経路、GA 経路が明らかとなっている。モデル植物のアラビドプシスは春化植物であり、花成にはこれらの経路が複雑に絡み合っている(Amasino, 2010)。また、わが国の主要切り花であるキクの開花は、日長による FT と AFT の発現量の違い(Higuchi et al., 2013)に加えて、低温量や GA によっても影響を受ける(Sumitomo et al., 2009)ことが知られている。一方、ファレノプシスはこれらの植物と比べると GA を投与するだけで花成が誘導されるため、花成誘導機構がより単純であり、GA による花成誘導機構を解明する実験材料としても有用であると考えられる。

低温処理と GA 処理を行ったファレノプシスの主茎頂芽において頂芽伸長直前に FT-like の発現量が 30 倍に急増し、それとほぼ同時に AP1/FUL のホモログである ORAP13 の発現が高まった(窪田ら, 2013)。低温処理した植物の腋芽においては内生 GA 量が急増し、伸長を開始する時点で ORAP13 の発現量が急激に高まった。したがって、ファレノプシスにおいても、アラビドプシスで提案されている GA 経路と類似の経路が存在していると考えられるが、GA 生合成遺伝子や花成誘導遺伝子の発現に関する解析はなされておらず、ファレノプシスの GA による花成誘導メカニズムは不明である。

遺伝子発現解析を行う上で、リファレンスシーケンスとなるゲノム情報とそれらの遺伝子の機能を推定した annotation の情報は必須といえる。2014 年にファレノプシスの原種の一つである *equestris* 種のゲノム DNA が次世代シーケンサーによって、

173Gbp リードされている(PRJNA192198)。2010~2012 年には *Phal. equestris* の EST により約 9.6 万の unigene が得られており、annotation を含んだデータベースが構築されている([http://orchidbase.itps.ncku.edu.tw/EST/Orchidaceae\\_Floral.aspx](http://orchidbase.itps.ncku.edu.tw/EST/Orchidaceae_Floral.aspx))。したがって、ファレノプシスに関しては NGS による遺伝子情報が蓄積し、網羅的な解析のバックグラウンドが整ってきたといえる。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、ファレノプシスの GA による花成誘導機構を明らかにするために、次世代シーケンサーにより RNA-Seq を行い、網羅的な遺伝子発現解析を行う。ファレノプシスでは花成のキー遺伝子が不明である。本研究ではこのキー遺伝子の特定と周辺遺伝子および GA 生合成遺伝子の発現解析を行うとともに、低温処理期間中の腋芽の内生 GA を定量する。

### 3. 研究の方法

実験 1 GA 投与による主茎頂芽の花成誘導機構の解明

植物材料は台湾より輸入した 4 号鉢植えの白花大輪系 *Phalaenopsis Sogo Yukidian 'V3'* を供試した。実験区は GA 区と無処理区を設け、GA 区は処理開始から 12 週間後まで毎週 1 回、その後は 14 週間後と 16 週間後にそれぞれ 1 回サンプリングを行った。1 区あたり 3 反復とし、1 反復当たり 3 株を供試した。また、開花調査用の株は全期間を通して、1 反復当たり 6 株を供試した。GA は GA<sub>3</sub> を用い、20mmol/L になるように 50% アセトンで作製した。GA 溶液は主茎頂部に毎週 50μL/株、処理開始 7 週間後まで投与した。植物は昼温 25℃、夜温 18℃ になるように設定したガラス温室で栽培した。腋芽から発生した花序は随時取り除いた。サンプリングは毎回 13 時からはじめ、採取した株を最上位葉の葉鞘部、葉身基部、未展開葉、幼葉、主茎頂部に分けた。幼葉と主茎頂部の採取は実体顕微鏡下で行った。得た植物部位を反復ごとにまとめて速やかに液体窒素で凍結後、分析するまで -80℃ で保存した。Total RNA は RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。RNA シーケンス解析は GA 施用前(0 週)と 4 週間後の主茎頂部の 2 サンプルのみについて行い、所定の方法でライブラリを調整した後 Illumina HiSeq2500 にて、Paired-End 法により 100 塩基を読み取り塩基配列データを取得した。その後、[http://orchidbase.itps.ncku.edu.tw/EST/download/Phalaenopsis\\_gene.zip](http://orchidbase.itps.ncku.edu.tw/EST/download/Phalaenopsis_gene.zip) からダウンロードした *Phal. equestris* の mRNA 情報をリファレンスシーケンスとして CLC Genomics Workbench を用いてマッピングし RPKM 法にて発現解析を行った。コンテイングのアノテーションは、台湾のデータベ-

スで検索し、アノテーションの掲載されていないものはNCBIでBLASTを行うことによりアノテーション情報を付加した。RT-qPCR解析用のcDNAはTaKaRa RNA PCR Kit ver3.0にて合成し、ハウスキーピング遺伝子としてActin1(JN185655)を用い、*PhFT* (JK720571)と*ORAP13* (DQ104327)の相対発現量を求めた。

#### 実験2 低温処理による腋芽の花成誘導機構の解明

植物材料は台湾より輸入した4号鉢植えの白花大輪系 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3'を供試した。植物を昼温25 / 夜温20に設定したガラス温室に導入して低温処理を開始し、低温処理開始0~9週目まで毎週1回サンプリングを行った。1回のサンプリング当たり3反復とし、1反復当たり内生GA定量用と遺伝子調査用としてそれぞれ3株ずつ供試した。サンプリング部位は頂部から下方向に数えて4節目の腋芽を対象とし、0から4週目までは腋芽全体を、5週目以降は腋芽の伸長が見られたため、腋芽の頂部から5mmの範囲を採取した。GAの定量には内部標準物質としてd2-GA53, d2-GA19, d2-GA1を添加し、常法により抽出・精製した後、UPLC/MS/MSにて内生GA53, GA19, GA1を定量した。

GA生合成遺伝子と*PhFT*の発現解析を行うために、実験1と同様の方法で腋芽からTotal RNAを抽出した。実験1のRNA-seqの結果から、*GA20ox*は7つ、*GA3ox*は6つ、*GA2ox*は7つのホモログが確認されたので、これらについてプライマーを設計した。これらのGA生合成遺伝子と*PhFT*のqPCR解析を実験1と同様の方法で行った。

#### 4. 研究成果

##### 実験1 GA投与による主茎頂芽の花成誘導機構の解明

GA施用開始7週間後から主茎頂部は急激に伸長し、16週間後には約1mに達した。これらの株は全て発蕾・開花した。花序における花芽分化開始節位は5.4節であり、この節が形成されたのはGA施用開始9~10週間後であった。無処理区では主茎の伸長と開花は全く観察されず、主茎頂部は葉を形成し続けた。主茎頂部のRNA-seqの結果から、花成関連遺伝子のうちFT遺伝子のRPKMはGA施用開始前では0であったが、植物の外見には全く変化がない施用開始4週間後のサンプルでは68まで大きく上昇した。このFTのリファレンスシーケンスに該当するcontigをBLAST解析したところ、ファレノプシスのFT遺伝子(*PhFT*)のmRNAと一致した。また、*AP1/FUL*のホモログである*ORAP13*の発現も高かった。GA生合成遺伝子は活性

型GAを合成する*GA20ox*や*GA3ox*の発現は低下し、代謝を促進する*GA2ox*の発現は大幅に高まった。*GID1*には4つのホモログが見つかり、*GID1C*の発現は大きく低下した。*DELLA*のうち、*GAI1*, *GAI2*, *DELLA2-2*の発現量が増加した。このことから、GAの投与は内生GA量を減少させ、かつGAに対する反応性を低下させて植物体におけるGAに関わる恒常性を維持するように各種遺伝子が機能していることが示された。このほか、*SPL*では15個、*AP2*では16個の遺伝子が単離され、GA投与によりいくつかの遺伝子の発現量が顕著に増減した。

*PhFT*と*ORAP13*の相対発現量をqPCRによって詳細に解析した結果、主茎頂部の*PhFT*の発現量はGA施用前には極めて低いが、GA施用1週間後には施用開始前の15倍、4週間後には300倍、7週間後には840倍と著しく発現量が高くなり、これをピークとしてその後大きく低下した(図1)。一方、主茎頂部以外の葉などの各部位では*PhFT*の発現は全く確認されなかった。

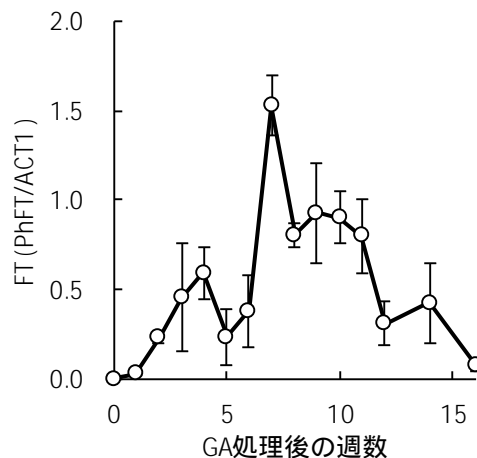


図1 GA施用後の茎頂部における*PhFT*の相対発現量の推移

*ORAP13*も*PhFT*とほぼ同様の変動を示し、7週間後には8.3倍まで発現量が増加した後、低下した(図2)。*ORAP13*は主茎頂部以外でも発現が認められたが、その量は少なかった。

多くの植物では、FT遺伝子は葉において発現し、FTタンパク質が茎頂部に移行することにより花成が誘導されるのが一般的である。しかし、ファレノプシスのGAによる頂芽の花成誘導過程では、葉部ではFT遺伝子の発現は全く見られず茎頂部において*PhFT*が著しく発現し、それとほぼ同時に*AP1/FUL*のホモログである*ORAP13*の発現量も高まるという特徴的な機構の存在が示された。

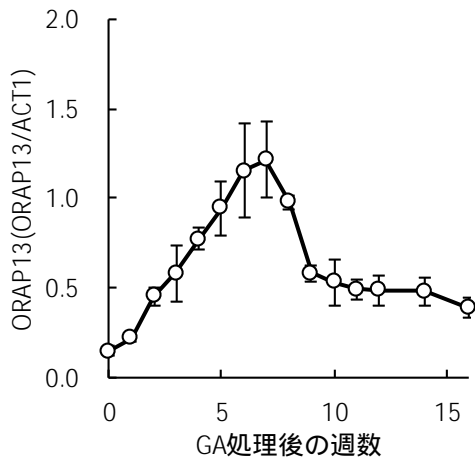


図2 GA施用後の茎頂部におけるORAP13の相対発現量の推移

### 実験2 低温処理による腋芽の花成誘導機構の解明

上位から3および4節目から全ての株が腋芽を発生させ花序を形成した。腋芽の発生は低温処理約4週間後に見られた。腋芽の内生GA<sub>53</sub>量は低温処理開始から4週間後にかけて急激に上昇し、その後大きく減少した(図3)。

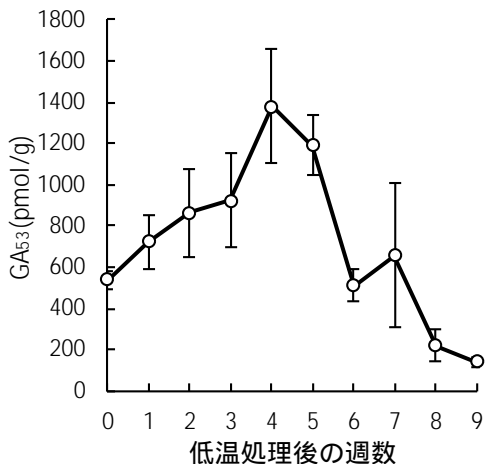


図3 低温処理後の腋芽のGA<sub>53</sub>量の推移

GA<sub>19</sub>とGA<sub>1</sub>についてもGA<sub>53</sub>とほぼ同様の变化を示した。GA<sub>20ox</sub>のうちGA<sub>20ox1-2</sub>の発現量は低温処理開始から8週目にかけて約3倍に上昇したが、その他のGA<sub>20ox</sub>の発現量はほとんど変化しなかった。GA<sub>3ox</sub>についてはGA<sub>3ox3-2</sub>が低温処理開始2週間後に約3倍まで増加しその後減少した。また、GA<sub>2ox</sub>については有意な変動は見られなかった。ファレノプシスのGA生合成経路は早期13位水酸化経路である。この経路ではGA<sub>53</sub>からGA<sub>20</sub>まではGA<sub>20ox</sub>によって、GA<sub>20</sub>からGA<sub>1</sub>はGA<sub>3ox</sub>によって、GA<sub>1</sub>からGA<sub>8</sub>はGA<sub>2ox</sub>によって代謝が進行する。GA<sub>19</sub>とGA<sub>1</sub>の内生量は低温処理から4週目にかけて急激に増加した。これらの内生量の変化はGA<sub>20ox2-1</sub>およびGA<sub>3ox3-2</sub>の発現

量の上昇によってもたらされていると考えられる。一方、GA<sub>19</sub>の上流物質であるGA<sub>53</sub>量は低温処理開始から著しく増加したことから、今回発現解析を行ったGA生合成遺伝子よりも上流域のカウレン酸またはカウレンの合成を制御する遺伝子群が低温によって活性化されている可能性が示唆された。

低温処理後の腋芽のPhFTの発現量は、低温処理2週間以降には増加する傾向が見られたものの、実験1で示された頂芽におけるPhFTの増加程度に比べて極めて小さかった(図4)。したがって、低温による腋芽の花成誘導に対してPhFTの寄与は小さいものと考えられる。

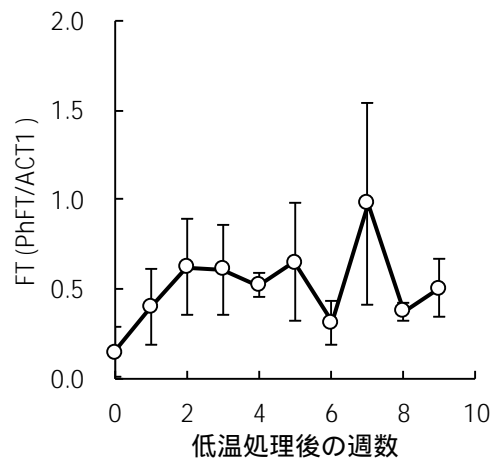


図4 低温処理後の腋芽におけるPhFTの相対発現量の推移

Yuら(2012)によると、アラビドプシスでは葉においてGAがDELLAタンパク質を分解し、これにより一部のSPL遺伝子が発現する。SPLは下流のAP2を抑制し、AP2は下流のFTを抑制しているため、GAによってFTが促進されることになる。今回のファレノプシスのGA投与実験では、葉を取り除いた茎頂部において顕著にPhFTが増加した。GAとFT間のシグナル伝達に関わるSPLやAP2の発現量は、RNA-seqによって一部のホモログにおいてアラビドプシスで示されている仮説に適合する変化を示した。したがって、ファレノプシスでは茎頂においてアラビドプシスと同様のGA-FT間のシグナル伝達機構が機能している可能性が示された。

一方、低温による腋芽からの花序形成に関して、内生GA量は低温によって著しく増加したものの、PhFTの発現量は顕著には増加しなかった。したがって、頂芽と腋芽では異なる花成誘導機構が働いている可能性があるが、ファレノプシスのFTには5つのホモログが存在することが明らかになっていることから、今回測定対象としたPhFT以外のFTが機能している可能性が考えられた。

### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

窪田 聡・佐野仁美・福田直也・腰岡政二．ファレノプシスの GA による花成誘導機構の RNA シーケンス解析．園芸学会．2016．

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

窪田 聡 (KUBOTA, Satoshi)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号：60328705

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし