

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14648

研究課題名(和文) 組織培養を利用した周縁キメラ解消によるキク突然変異の原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) Survey of flower color causing-genes in chrysanthemum mutated cultivars by eliminating their periclinal chimerical structure through tubular floret culture

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：多彩な花色変異を有するキクの枝変わりデージー系品種について、小花培養によって周縁キメラ構造を解消した全層変異体を作成した。4品種中3品種では全層変異体の花色は変化しなかった。全層変異体の花弁からRNAを抽出し、RNA-seq法により花色変異に関する原因遺伝子の探索を試みた結果、約5万の網羅的な発現遺伝子情報が取得できた。アントシアニンおよびカロテノイド色素の生合成系や分解系および転写調節に関わる遺伝子配列が取得でき、その一部で枝変わり品種間で顕著な発現レベルの違いが認められた。

研究成果の概要(英文)：In chrysanthemum 'Daisy' sporting family with a wide flower color variation, solid mutants were obtained by eliminating their periclinal chimerical structure through tubular floret culture. The flower colors of solid mutants was stable in three out of four 'Daisy' cultivars. To search for flower color causing-genes, RNA-seq was performed using RNA extracted from the petals of solid mutants. From the RNA-seq, exhaustive expression gene information of about 50,000 genes was obtained. Using bioinformatics tools, several genes involved in the biosynthesis, degradation and transcriptional regulation of anthocyanins and carotenoid pigments were obtained. Significant differences in the expression levels were observed in several genes among solid mutants.

研究分野：園芸科学

キーワード：花色 突然変異 遺伝子 周縁キメラ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 栽培ギクは六倍体起源とされ、高次倍数性を有することから、諸形質の遺伝様式については研究蓄積が非常に乏しい。加えて基本的に自家不和合性を有するために純系品種を作出することができない。一方、実際生産においては容易に挿し芽による栄養繁殖を行うことができるために、新品種の育成は専ら従来型の交雑育種により進められてきた。交雑に用いる親品種の遺伝的背景はきわめてヘテロ性が高いことから、目標とする優良形質を兼ね備えた品種を得るためには、やむを得ず、偶然に期待して数万とも数十万ともいわれる大量の実生を作出するしかなかった。また、交雑育種により育成された傑出品種からは花色変異などの枝変わりが突然変異育種などによって作出されるが、花色変異の原因遺伝子についてもそのほとんどが未解明であるために、突然変異もまた偶然を期待して取り組まれているのが現状である。このような状況はキクだけに止まらず多くの栄養繁殖性園芸作物にも当てはまる。原因遺伝子の探索の道が拓かれれば、育種効率がきわめて低かった作物において、科学的な知見に基づく飛躍的な育種の効率化が図れると期待できる。

(2) 栽培ギクにおいては自然突然変異に加え放射線照射による人為突然変異が既に広く実際育種に利用されてきているが、高次倍数性かつ巨大ゲノムを有することから、有用形質の原因遺伝子の単離の例はごく一部に限られている (Ohmiya ら, 2006)。作物育種のための遺伝子解析では、目的とする形質の分離集団を作出し、連鎖解析などにより直接原因遺伝子を確定したり、原因遺伝子近傍の分子マーカーを明らかにしながら最終的に原因遺伝子にたどり着く取り組みが一般的である。しかし、高次倍数性で巨大なゲノムをもつキクではこのような取り組みが全く適用できなかった。一方、突然変異による枝変わりは同質遺伝子系統と同様に遺伝子解析の有力なツールとなり得る。しかし、キクの枝変わり品種の多くが有する周縁キメラ構造は遺伝子解析にとって障害になっている。Shibata ら (1998) はキクの枝変わりマーブル系品種群が異数性を伴う周縁キメラ構造を有していること、さらに小花培養により最外の起原層 L1 由来の植物体を獲得できることを明らかにしている。周縁キメラ変異ではなく全層変異を用いることで変異の原因遺伝子を効率よく探索できる可能性があると考えられる。

(3) 近年、多くの作物で次世代シーケンサーを用いたゲノム解析研究が着手されるようになったが、花き分野では 2014 年になって初めて二倍体で比較的ゲノムサイズの小さいカーネーションで全ゲノム解読がなされる (Yagi ら, 2014) などまだ緒についた段

階である。主要花きは種子繁殖性でなく栄養繁殖性の種類がほとんどであるために、ゲノム解析の成果がマーカー育種などへ直接利用される例は少ないが、改変するターゲットとなる遺伝子が明らかにできれば、ゲノム編集技術などの新しい育種技術により画期的な形質改変を行うことも夢ではなくなっている。既に、カーネーションの枝変わり品種ではアントシアニンの液胞への輸送に関連するグルタチオン転移酵素遺伝子への自律性トランスポゾンの挿入および脱落が花色変異を引き起こすことが明らかにされている (Momose ら, 2013) ほか、花きではないがブドウの果皮色の変異が転写因子へのレトロトランスポゾンの挿入による (Kobayashi ら, 2004) ことが報告されており、枝変わりを利用した形質発現の原因遺伝子の解明は今後の育種の進捗にとって重要性を増すものと思われる。

## 2. 研究の目的

花きでは多様な色や形が観賞上重要であるが、多様な色や形の形質発現に関わる原因遺伝子の詳細のほとんどは未解明のままである。特に主要な栄養繁殖性花きにおいては、諸形質の遺伝解析の研究蓄積が乏しいこと、また、高次倍数性や巨大ゲノムを有する種類が数多くあることなどから原因遺伝子の解明が非常に困難であった。一方、キクのような栄養繁殖性花きでは古くから突然変異による枝変わりが広く利用されてきている。枝変わり品種間では変異形質以外は基本的に同一の遺伝的背景をもつことから、種子繁殖性作物における同質遺伝子系統と同様に有用な遺伝子解析のツールになり得る。しかし、実際には枝変わり品種の多くは周縁キメラ構造を有することから、遺伝子解析への枝変わりの利用はごく一部に限られてきた。本研究は高次倍数性でゲノムサイズの大きなキクにおいて、枝変わりの周縁キメラ構造を組織培養により解消することにより、枝変わり品種間の変異の原因遺伝子の効率的な解明を試みるものである。

## 3. 研究の方法

(1) 図 1 に示したキクの枝変わりデージー系 4 品種 (淡桃色の 'ピンクデージー' (左下)、赤紫色の 'ダークピンクデージー' (右



図1. デージー系枝変わり品種

下),淡橙色の‘ゴールドンデージー’(左上),赤色の‘レッドリジェコ’(右上)を栽培して開花させ,各枝変わり品種の筒状花を次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面滅菌後,植物ホルモンであるナフタレン酢酸(NAA)の濃度を0.2mg/Lと2.0mg/Lの2段階,ベンジルアデニン(BA)の濃度を2.0mg/Lとして添加した2種類のMS寒天培地に置床し,子房上位の部分から不定芽を再生させることにより,L1層由来の全層変異体を誘導した。

(2) 得られた再分化植物体は順化後,鉢上げ増殖した後に開花させ,主に花色の変異について色彩度計を用いて調べた。また,デージー系4品種の周縁キメラ構造を解析する目的で,花卉の表皮および内層におけるアントシアニン色素およびカロテノイド色素の発現程度を顕微鏡による観察で調べるとともに,黄色品種‘マルテル’を種子親,デージー系4品種を花粉親とした交雑後代の花色分離を調べた。

(3) 得られた全層変異体の花卉からRNAを抽出し,Illumina社HiSeqによるRNA-seqを行い,網羅的な発現遺伝子情報を取得した。その中から,全層変異体間で異なる発現を示す遺伝子を抽出するとともに,アントシアニンの発現の濃淡やカロテノイドの発現の有無の原因遺伝子の絞り込みを行った。

#### 4. 研究成果

(1) デージー系4品種すべてにおいて,NAAの濃度を0.2mg/L,BAの濃度を2.0mg/Lとした培地で再分化率が高い傾向が認められた。再分化シュートが生じた培養物はNAAを0.02mg/Lを添加したMS寒天培地に移植し,再分化シュートを伸長させた上で,メトロミックス360を充填したプラグトレイに挿し芽し順化した。

(2) デージー系品種の小花培養由来全層変異体を開花させた結果,枝変わり元品種である‘ピンクデージー’と枝変わり品種の‘ダークピンクデージー’と‘レッドリジェコ’)3品種の全層変異体は元の品種と同じ花色を示したものの,‘ゴールドンデージー’では全層変異体で黄色から赤色へ花色が変化し



図2. 全層変異体の花色

た(図2)。なお,‘ゴールドンデージー’における周縁キメラ構造の存在が示唆されたものの,黄色から赤色への変化については元品種の花色から疑問がもたれたことから,小花培養について追試を継続中である。

(3) デージー系4品種の花弁表皮および内層におけるアントシアニンおよびカロテノイド色素の発現程度を調べた結果,アントシアニンについては花弁表皮における発現について2通り(‘ピンクデージー’と‘ゴールドンデージー’:弱,‘ダークピンクデージー’と‘レッドリジェコ’:強),カロテノイドについては表皮と内層における発現の有無について3通り(‘ピンクデージー’と‘ダークピンクデージー’:表皮・内層とも発現なし,‘レッドリジェコ’:表皮・内層とも発現あり,‘ゴールドンデージー’:表皮のみで発現あり)の違いが認められ,‘ゴールドンデージー’がカロテノイド発現について周縁



図3. ゴールドンデージーの花弁の表皮および内層におけるカロテノイドの発現

キメラであることが確認できた(図3)。また,黄色品種‘マルテル’との交雑後代における花色変異の解析の結果,花粉親を‘ピンクデージー’,‘ゴールドンデージー’および‘ダークピンクデージー’とした場合にはカロテノイド色素を発現する後代と発現しない後代の両方が出現したのに対し,花粉親を‘レッドリジェコ’とした場合にはカロテノイド色素を発現する後代のみが出現した。花粉はL2層由来とされているので,この結果はデージー系品種の花弁内層におけるカロテノイドの発現の違いを反映したものと考えられた。以上のことから,デージー系品種における周縁キメラ構造の存在が確認された。

(4) 栽培ギクは基本的に高次倍数性を有し六倍体に近いゲノム構成をもつことから,当初RNA-seqによる遺伝子情報の取得が困難ではないかと懸念されたものの,4種類の全層変異体によるRNA-seq解析の結果,約5万の

表1. RNA-seqで単離されたアントシアニン合成系、カロテノイド分解系遺伝子および転写調節因子の例
アントシアニン合成系: CHS(2), CHI(1), <b>F3H</b> (1), F3'H(7)
DFR(1), ANS(1), UFGT(1)
カロテノイド分解系: <b>CCD4a</b> (2)
転写調節因子: MYB6(1), b HLH2(1)
括弧内はクローン数、太字アンダーラインは全層変異体間で顕著な発現の差異が認められたもの

発現遺伝子の全長および部分配列が得られ、花色変異の原因遺伝子の解析に有効な網羅的な発現遺伝子情報が取得できた。表1に示したように、既に主要なアントシアニン生合成系、カロテノイド分解系遺伝子および転写調節因子遺伝子などの遺伝子情報が取得できており、さらにその一部では花色変異との関連が考えられる顕著な発現レベルの違いが認められている。以上のように、当初の目的であるキクの枝変わり品種の花色変異の原因遺伝子の解明に有用な遺伝子情報の整備を図ることができた。今後、異なる花色変異を有する枝変わりにおける全層変異体を作成するとともに、枝変わりによる花色変異の原因遺伝子の解明を進めていく予定である。

#### <引用文献>

Akemi Ohmiya, Sanae Kishimoto, Ryutaro Aida, Satoshi Yoshioka and Katsuhiko Sumitomo, Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiology*.142.2006.1193-1201.

Michio Shibata, Sanae Kishimoto, Masashi Hirai, Ikumi Ikeda, Ryutaro Aida, Analysis of the periclinal chimeric structure of chrysanthemum sports by random amplified polymorphic DNA. *Acta Horticulturae* 454,1998,347-353

Masafumi Yagi, Shunichi Kosugi, Hideki Hirakawa, Akemi Ohmiya, Koji Tanase, Taro Harada, Kyutaro Kishimoto, Masayoshi Nakayama, Kazuo Ichimura, Takashi Onozaki, Hiroyasu Yamaguchi, Nobuhiro Sasaki, Taira Miyahara, Yuzo Nishizaki, Yoshihiro Ozeki, Noriko Nakamura, Takamasa Suzuki, Yoshikazu Tanaka, Shusei Sato, Kenta Shirasawa, Sachiko Isobe, Yoshinori Miyamura, Akiko Watanabe, Shinobu Nakayama, Yoshie Kishida, Mitsuyo Kohara, Satoshi Tabata□Sequence analysis of the genome of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), *DNA Res.* 21, 2014, 231-241.

Masaki Momose, Yoshio Itoh, Naoyuki Umemoto, Masayoshi Nakayama, Yoshihiro Ozeki. Reverted glutathione S-transferase-like genes that influence flower color intensity of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) originated from excision of a transposable element (2013) *Breed. Sci.* 63,2013, 435-440.

Shozo Kobayashi, Nami Goto-Yamamoto, Hirohiko Hirochika, Retrotransposon-induced mutations in grape skin color, *Science* 304,2004. 982

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1件)

加藤眞悟, 肖澤芝, 白井深雪, 樋口洋平, 柴田道夫(柴田道夫). キクの枝変わり‘デージー’系品種の交雑後代における花色変異. 園芸学会平成 29 年度春季大会. 2017 年 3 月 19 日~3 月 20 日. 日本大学生物資源学部(神奈川県・藤沢市)

#### 6. 研究組織

##### (1)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・教授  
研究者番号：80355718

##### (2)研究分担者

樋口 洋平 HIGUCHI, Yohei)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教  
研究者番号：00746844