

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14651

研究課題名(和文) 花の模様形成に関わる細胞間移行物質の特定

研究課題名(英文) Identification of intercellular mobile substances involved in flower pattern formation

研究代表者

細川 宗孝 (Hosokawa, Munetaka)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：40301246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：起源層別の不定芽誘導個体の花色形質から‘キラウエア’は非キメラ性品種‘かなめ’、‘モニーク’、‘コンコルド’はキメラ性品種であることが明らかになった。キメラ性品種に関してはPCRによって各起源層の遺伝子型を特定した。また、L1層由来のRNAを用いたRT-PCRによって、起源層間を移動する物質はmRNAではないものと思われた。非キメラ性品種においてはsiRNAなどが起源層間を移動しているのではないかと考えられたが網羅解析の結果からこの仮説は否定された。現在はsequelの配列をもとにして、全ゲノムメチル化解析を行い、模様に関与する遺伝子とその遺伝子の不安定性のメカニズムを解析している。

研究成果の概要(英文)：From the flower color traits of the adventitious shoots from each histogen layer, it was revealed that 'Kilauea' is a non-chimeric cultivar, and 'Monique', 'Concord' are chimeric cultivars. For chimeric cultivars, genotype of each histogen layer was identified by PCR. Moreover, the substance migrating between the histogen layers concluded not to be mRNA from the results of RT-PCR using RNA derived from the L1 layer. In non-chimeric cultivars, it was thought that factors related to epigenetics such as siRNA are migrating between the histogen layers, but this hypothesis was denied from the result of NGS analysis. Today, based on the Sequel sequence, genome methylation analysis is carried out to analyze the genes involved in the epigenetics.

研究分野：蔬菜花卉園芸学

キーワード：セントポーリア キメラ 花色 アントシアニン 次世代シーケンス メチル化 siRNA 茎頂分裂組織

1. 研究開始当初の背景

花卉では茎頂分裂組織 L1 層に由来する表皮細胞でのみアントシアニンが蓄積される場合がほとんどである。よって花色発現がアントシアニン由来である場合には L1 層のみが重要な役割を果たす。セントポーリアなどいくつかの花卉品目では花卉の周縁部と中央部の色とが異なる縞模様品種が存在する。これらの模様発現は、茎頂分裂組織の周縁キメラ構造が原因であり、L1 層と L2 層で異なるアントシアニンが発現し重なることで中央部の縞が現れると考えられてきた。ところが、セントポーリアでも他の花卉と同様にアントシアニンは表皮細胞でのみ蓄積しており、花卉中央部の縞部分の表皮細胞は外周部の表皮細胞とは異なるアントシアニン組成となっていた。

このことは、L1 層由来の表皮細胞と L2 層由来の表皮下細胞の間で物質が移動していることを想像させた。L1 層でアントシアニン合成遺伝子の一部が変異し、発現しないはずの RNA が、L1 層由来のトライコームで発現していたことから移動物質は RNA であろうと予想された。また、中央の縞部が白色となる品種の L2 層から不定芽を誘導するとほとんどの植物体が白単色の花を咲かせたことから、白色ストライプの花ではアントシアニンの合成抑制に関わる物質が細胞間移行していることを想像させる。さらには、緑色のストライプを持つ品種では表皮細胞の形態が変化し、L2 層由来の植物体は葉化した花を咲かせることから、アントシアニン合成系と異なるホメオティックな形態形成に関わる物質の移動も起こっているものと考えられる。

2. 研究の目的

縞模様発現をメカニズムごとに分類し、周縁キメラ性およびエピジェネティクスが関与する縞模様発現において L2 層から L1 層へ移行する物質を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 縞模様品種‘かなめ’、‘モニック’、‘キラウエア’および‘コンコルド’の縞模様発現メカニズムを解析するために、まず、それぞれの品種を組織培養し、培養個体の花色表現型を解析した。セントポーリアは葉片培養を行うと、通常は表皮(L1層由来)からシュートが発生することが知られている。そこで、葉片培養のシュートを L1 層由来とした。また、葉柄の表皮をはがし内層由来のシュートを誘導した。また、レジン切片によるシュートの発生過程を観察することで実際にシュートが由来する組織を確認した。次に、周縁キメラであることが明らかになった品種に関しては、花卉の発達過程を組織切片にて観察することで、なぜ縞模様が生まれるのか、について考察を行った。

(2) ‘かなめ’、‘モニック’、‘キラウエア’および‘コンコルド’から RNA および DNA を抽出し、変異の原因になっている遺伝子を特定した。(1)で作出した単色花個体の葉を核酸の抽出に用いた。

(3) キメラ性品種において細胞間を移動する物質を特定することを目的として花卉のパラフィン切片を作成しマイクロダイセクションでサンプルを回収した。また、やすりで軽く花卉の中央部および周縁部を削りとり、ダイレクト RT-PCR を行うことで mRNA が移動しているか否かについて検討した。やすりで削ったサンプルはレジン切片で観察し、表皮細胞のみが削れるサイズのやすりを選択したうえで実験を行った。

(4) ‘キラウエア’の縞模様の原因

‘キラウエア’は非キメラ性品種であると結論付けられた((1)(2)より)。ただ、不定芽発生後代の結果から、本品種の変異芽の形質はキメラ品種的な分離を示す。すなわち、本品種は DNA のメチル化などの不安定な遺伝子発現を各起源層が有する“周縁キメラ”ではないかと考えられた。そこでまず、‘キラウエア’および‘チョコ’(不定芽においてキラウエアと同様の不安定な分離を示す)を用いて total RNA および small RNA を抽出し、HiSeq2000 で網羅的に解読した。これらのデータは現在作成中の Sequel のドラフト遺伝子にマッピングし、白花および青花、さらには花卉の位置別(周縁部と中央部)で発現比較を行い、特異的なものについては Blast でヒットする遺伝子を調査した。

4. 研究成果

(1) セントポーリア‘キラウエア’、‘かなめ’、‘モニック’、‘コンコルド’では一部の再生個体を除き(後述)表皮付きの葉身由来の植物体は縞模様花卉の外周と同じ単色花となり、表皮下組織から誘導したシュートは全て花卉の縞模様の縞部とほぼ同じ花色となった。HPLC 分析においても縞模様花卉の部位と単色花個体では同様の色素が同定されたことから、これらの3品種は周縁キメラであるものと予想された。

花卉発達の経時的観察より、セントポーリアでは5枚の花弁が個別に茎頂分裂組織から発生し、周縁分裂組織が活発に細胞分裂したのち、connection と呼ばれる方法で合着し、1枚の合弁花になることが分かった。すなわち、花卉の周縁部分は L1 層の活発な細胞分裂によって生じた L1 層由来の組織であり、L1 層の形質のみを発現する。L1 層由来の細胞層が花卉同士で合着することで一枚になり、L1 層単独で合着部を構成することから花卉の合着部も L1 層のみから形成される。この推定は、後に‘かなめ’を用いた各起源層別 DNA 解析によって裏付けることができた。今回の実験によって、合弁花であるセントポーリアで縞模様が発現する機構がほぼ明らかになった。合弁花はこれまで考えられてき

たような L2 以下由来の細胞を L1 が包み込むような構造ではなく、L1 と L2 が入り組みながら構成されるものであることが初めて明らかにされた。

一方で、'キラウエア'においては多数の複色花個体が発現し、本品種が周縁キメラ性品種である可能性が低いことが分かった。一方で、L2 層由来の植物体においては白色花個体が多く出現したことから、L1 層が着色層、L2 層が非着色層の周縁キメラ構造を有している可能性を完全に否定することはできなかった。そこで、本品種は L2 層にエピジェネティックに制御される非着色層を持つという仮説を設け、(4)の実験を行うこととした。

(2)'かなめ'では F3'5'H が、'コンコルド'では WDR が、'モニーク'では F3H が変異していることが明らかになった。この結果は各品種の花色の HPLC のデータを裏付けるものであった。'モニーク'および'コンコルド'においても原因 DNA に花色の異なる個体間で欠失、挿入および置換といったさまざまな変異が存在することを示し、それらを特異的に増幅し検出できるプライマーセットを'かなめ'および'コンコルド'において設計することができた。セントポーリアの縞模様品種を用いて縞模様の発現機構について明らかにした。

'かなめ'のピンク単色個体においては、F3'5'Hの不完全な非機能性 RNA が発現しているが、全長を増幅するプライマーセットを機能性 RNA を判別するプライマーセットとして使用できることが示唆された。'コンコルド'の白単色個体においては、WDR の非機能性 RNA が発現しているが、UTR 配列をもとに設計したプライマーセットを機能性 RNA を判別するプライマーセットとして使用できることが示唆された。'モニーク'の白単色個体においては、非機能性 RNA が複数発現していることが示唆され、機能性 RNA を判別する DNA 増幅プライマーセットは設計できなかった。

以上の結果から、3 つの周縁キメラ性品種において、茎頂分裂組織の層状構造を明らかにすることができ、いずれも L1 層の変異であることが明らかになった。

また、(1)にて'コンコルド'と'モニーク'においては表皮付きの葉身から発生した不定芽においてそれぞれ 3.7%、30%のシュートが親と同じ形質の縞模様となった。当初、これらの親株同様の形質個体の出現によってこれら 2 品種が非周縁キメラであることが原因ではないかと思われた。しかし、WDR と F3H の遺伝子型 (F3H においては mRNA 解析を含む) から推定すると、これらの品種は周縁キメラであると考えるのが適当であることが明らかであった。また、'コンコルド'と'モニーク'の単色花個体からさらに不定芽を誘導し、青、白それぞれ 80、30 個体 (コンコルド) 70、80 個体 (モニーク) の花色を調査したところ、全て培養個体と同じ花色

となったことから'キラウエア'のような不安定形質ではないことが明らかになった。

さらに両品種において、L1 由来の白株の成長は著しく悪く、L2 由来の青株の成長は著しく高かった。'かなめ'においては表皮付きの葉身から L1 層由来の植物体のみが発生し、これらの植物体は他の起源層由来の植物体と成長は変わらない。すなわち、'コンコルド'と'モニーク'においては細胞分裂活性が低い L1 層と細胞分裂活性が高い L2 層との周縁キメラ構造が親株と同じものが不定芽で得られる原因になっている可能性が考えられた。組織切片の観察においては、'かなめ'では培養初期から L1 層由来の表皮細胞の分裂が始まり、シュート誘導時まで続いていることが観察された。一方で、'コンコルド'と'モニーク'においては表皮細胞の細胞分裂はほとんど見られず、L2 層由来の表皮下細胞から分裂が始まり、表皮細胞を押し上げるようにシュートの発生が始まるということが観察された。以上のことから、'コンコルド'と'モニーク'は不定芽の形質のみでは判断できなかったが、周縁キメラ性品種であることは間違いなく、L1 層の細胞分裂活性が低いことが親株型シュートを発生させる一つの原因であるものと結論付けられた。

(3)セントポーリアの試料においてはマイクロダイセクション後のパラフィン切片からは RNA は抽出できなかった。複数のプライマーを用いてもバンドは得られなかったため、mRNA そのものが回収できないものと考えられた。やすりをを用いた表皮層の解析手法を確立し、'コンコルド'を供試して調査したところ、機能性 RNA は青単色個体でのみ検出された。これにより、縞模様個体の表皮層には機能性 RNA が存在せず、移動性物質はタンパク質または色素であることが示唆された。今回の実験は'コンコルド'花卉において移動が期待された WDR についてのものである。繰り返し実験においても同様の結果が得られたが、'かなめ'や'モニーク'を用いて同様の実験を行う必要がある。タンパク質の細胞間以降は良く知られるところであるが、色素が細胞間を移動するという報告は見あたらない。また、キメラ性品種の縞模様の境界部分ははっきりとしており、色素がにじんでいるようには見えない。このような点から、おそらく移動しているのはタンパク質であると考えられ、今後、抗体と金コロイドを用いた電顕観察を行ってゆく予定である。

(4)組織培養個体の中から得られた白色花個体と着色個体をそれぞれ 3 個体ずつ用いて発現遺伝子の次世代シーケンズ解析を行ったところ、着色花個体では予想通り多くの花色合成遺伝子やアントシアニンの液胞への輸送にかかわる遺伝子の発現に違いがみられた。複数の花色合成遺伝子や輸送遺伝子の発現に違いがみられたことから、特定の遺伝子の発現というよりは、転写遺伝子の発現抑制が非着色性に関わっている可能性が高

い。そこで、転写因子を探索したところ、R2R3Myb 遺伝子をはじめとした 2 つの転写因子の発現に違いがみられた。

RT-PCR によって次世代シーケンスの解析結果をいくつかの遺伝子で確認したところ、次世代解析の結果が正しいことを確認することができた。以上のことから特に白色変異体（白色部）で発現している R2R3Myb 遺伝子をはじめとしたいくつかの転写因子にターゲットを絞り、解析をすすめる予定である。

セントポーリア‘キラウエア’は着色花卉の中央部が白くなる縞模様品種である。花卉から siRNA を抽出し網羅的に解析した。同時に花卉の全 RNA のシーケンスを行い、de novo でアセンブリしたのち、このアセンブリ配列に対して siRNA をマッピングした。その結果、白花からも着色花からも花色に関わる siRNA は検出されなかった。このことから、花卉中央部の縞模様は分解によるものではなく他のメカニズム（DNA メチル化など）が原因である可能性が高い。現在は、‘キラウエア’の葯から半数体を作成し、sequel で全ゲノム解読を行い、この情報をもとに縞模様発現のメカニズムの全貌を解き明かそうとしている。同じく縞模様品種である‘チョコ’に関して siRNA の網羅的解析を行ったが、本品種においても花色遺伝子の siRNA は検出されなかった。2 品種のみの結果であるが非周縁キメラ型縞模様品種のセントポーリアでは、花色遺伝子の分解によるエピジェネティクスではない原因によって花卉の様相が発生するのではないかと考えられた。mRNA の解析の結果から、花色の不安定性に関わるのは転写制御因子遺伝子である可能性が考えられた。現在は sequel の配列をもとにして、候補である転写制御因子を含めた全ゲノムメチル化解析を行い、模様に関与する遺伝子とその遺伝子の不安定性のメカニズムを解析している。もう一品種として用いた‘チョコ’においても同様の結果が得られ、花色関連の siRNA は得られなかった。この品種についても縞模様発現はエピジェネティックではあるが、RNA の分解というよりは DNA のメチル化を考えたほうがよさそうである。

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 4 件)

出口亜由美・大野 翔・立澤文見・土井元章・細川宗孝、セントポーリア (Saintpaulia) 花卉に蓄積する黄色色素の同定. 園芸学研究, 15 巻, 2016, 123-128

DOI: 10.2503/hrj.15.123

Fumi Tatsuzawa, Munetaka Hosokawa. Flower colors and their anthocyanins in Saintpaulia cultivars (Gesneriaceae). The Horticulture Journal, 85 巻, 2016, 63-69.

DOI: 10.2503/hortj.MI-084

Soo-Jung Yang, Sho Ohno, Ayumi Deguchi, Mitsuru Sato, Mariko Goto, Motoaki Doi, Miki Ohnishi, Fumi Tatsuzawa, Munetaka Hosokawa. Scientia Horticulturae, The histological study in sympetalous corolla development of pinwheel-type flowers of Saintpaulia. 2017, 223. 10-18.

DOI: 10.1016/j.scienta.2017.04.036

Nabeshima T, Yang S, Ohno S, Honda K, Deguchi A, Doi M, Tatsuzawa F, Hosokawa M. Histogen layers contributing to adventitious bud formation are determined by their cell division activities. Front. Plant Sci. 2017. 8. 1-15.

DOI: 10.3389/fpls.2017.01749

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

Jaime A. TEIXEIRA DA SILVA, Yaser Hassan DEWIR, Adhityo WICAKSONO, Mafatlal M. KHER, Haenghoon KIM, Munetaka HOSOKAWA, Songjun ZENG. J. Plant Develop. Morphogenesis and developmental biology of African violet (Saintpaulia ionantha H. Wendl). 2016. 23. 123-128.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

<http://www.hort.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 宗孝 (HOSOKAWA, Munetaka)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：40301246

(2) 研究分担者

大野 翔 (OHNO, Sho)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：10722001