

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18637

研究課題名(和文)花ハス成長相転換の生理・遺伝学的解析と次世代型育種・栽培法の開発

研究課題名(英文)Physiological and genetic analysis of growth phase-transition in sacred lotus and development of next generation breeding and cultivation method

研究代表者

樋口 洋平 (HIGUCHI, Yohei)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：00746844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：花ハスの開花期・花型を決定する分子機構を明らかにするため、花芽・花器官形成関連遺伝子を単離し、発現動態を解析した。フロリゲン/アンチフロリゲンをコードするFT/TFL1ファミリー遺伝子を14種類同定した。このうち、FTグループ4種類、TFL1グループ4種類について開花特性の異なる2品種において遺伝子構造と発現パターンを比較した結果、NnFT2がフロリゲンとして機能する可能性、およびNnTFL1が抑制因子として機能する可能性が示唆された。花器官形成に関与するABCEクラス遺伝子(全12種類)の発現解析の結果、ハスの八重咲きはNnAG (Cクラス)の発現低下が原因である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate molecular mechanisms underlying floral induction and flower development in sacred lotus (*Nelumbo nucifera*), we have isolated flowering related- and floral organ identity genes and analyzed their expression profile in detail. At least 14 FT/TFL1-like genes that encode putative florigen/anti-florigen were found in *N. nucifera* genome. Expression analyses of 4 FT-like and 4 TFL1-like genes in two lotus cultivars with different flowering response suggested that NnFT2 may act as florigen, whereas NnTFL1 may act as local repressor of flowering. Expression analyses of 12 ABCE class genes (floral organ identity genes) suggested that down-regulation of NnAG (C-class) is a possible cause of double-flowered phenotype of *N. nucifera*.

研究分野：園芸科学

キーワード：ハス 花芽形成 花器官形成 フロリゲン ABCモデル

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ハス (*Nelumbo nucifera*) は基部真正双子葉植物に分類され、観賞用、食用および生薬としての利用を目的として広く栽培されている。観賞用である花ハスは、大賀ハスに代表される古代種も含め公園等の池に好んで植栽されており、都市緑化に重要な役割を担っている。花ハスは観賞用花きとして優れた性質を持つ一方で、植物体が大型かつ開花調節が困難である、日持ちが極端に悪い等の理由から、花き園芸植物としての利用は極めて限定的であり、一般家庭向けの鉢物および切り花としてはほとんど普及していないのが現状である。小型の栽培容器や低温・低日照下でも開花に至る画期的な新品種の開発が望まれているが、ハスの花芽分化・発達過程はほとんど明らかになっていない。東京大学附属生態調和農学機構では開花期・花型がさまざまな300を超える花ハス遺伝資源を保有し、教育および一般公開を主な目的として維持・管理を行ってきた。2013年に中国古代蓮の全ゲノム配列が解読された (Ming et al., *Genome Biol.* 2013) ことを契機に、花ハス遺伝資源の多様な開花期・花型を決定する遺伝要因を迅速に同定することが可能になると考えられた。

(2) 植物の花芽分化・発達過程の分子機構は主にモデル植物のシロイヌナズナやイネを用いた分子遺伝学的解析からその全体像が明らかとなりつつある。中でも、PEBPファミリーに属する FT/Hd3a タンパク質が花成ホルモン (フロリゲン) の分子実体であることが明らかとなった。一方で、同じ PEBP ファミリーに属する TFL1 が FT と拮抗して花成を抑制することも明らかとなっている。2013年に申請者らの研究グループは、電照菊で知られ、かつ日本で最も生産量の多い切り花品目であるキクにおいて、長距離移動性の花成抑制ホルモン「アンチフロリゲン」の分子実体が TFL1 様のタンパク質 Anti-florigenic FT/TFL1 family protein (AFT) であることを世界で初めて明らかにした (Higuchi et al. *PNAS* 2013)。この結果および他の植物種での報告から、最近では FT/TFL1 ファミリー遺伝子の発現制御機構の違いに加え、アミノ酸配列の置換・欠失などによるタンパク質機能の活性変化が組み合わさることにより、さまざまな植物の多様な開花反応が決まっていると考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究では、花ハス品種の開花早晚性および花型の違いを決定づけている遺伝子を特定し、被子植物の花成および花型進化に関する重要な知見を得ると同時に、人為的な開花制御を可能にするための新たなゲノム育種法および栽培法の開発に向けた基盤整備に

取り組む。研究期間内には以下の事を明らかにする。

(1) 中国古代ハスのゲノム配列に対し花成制御遺伝子 (FT/TFL1)、花芽分裂組織決定遺伝子 (API/FUL)、および花器官決定遺伝子 (AP2, AG, SEP) 等の相同遺伝子の検索および遺伝子構造の予測をおこない、ハスゲノム中の各遺伝子の種類および配列を精査する。

(2) 開花期および花型に特徴のある花ハス品種群において、上記の花成・花型関連相同遺伝子のゲノム配列における多型を解析し、表現型との関連を明らかにする。

(3) 主要な花ハス品種において FT/TFL1 相同遺伝子の時空間的な発現解析をおこない、ハスにおいて主要なフロリゲン・アンチフロリゲンとして機能している FT/TFL1 遺伝子の分子種を特定する。同様に、一重、八重、千弁品種において MADS-box 遺伝子の発現パターンを解析し、形質の発現に寄与する遺伝子を特定する。

(4) 上記で明らかとなった花成・花型関連遺伝子について DNA マーカー化を検討すると同時に、これら遺伝子の発現を指標として開花調節に有効な環境条件を短期間に同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 植物材料の育成

ハスは東京大学西東京フィールド (附属生態調和農学機構) 内のハス見本園にてコンクリート池 (2 x 2 m) あるいは大型円形容器 (65L) で行い、弥生キャンパス内の圃場においては小型円形容器 (20L) で行った。標準ハス系統として連続開花性で一重咲きの「毎葉蓮」、難開花性品種として「桜蓮」、八重咲き品種として「重台蓮」を実験に供試した。

### (2) ハスゲノム中の花成・花器官形成関連遺伝子の予測と単離・同定

NCBI, Lotus DB 等の公共データベースに登録されている中国古代ハスのゲノム配列に対し、blast による遺伝子相同性検索をおこない、ハスゲノム中に存在する花成・花型関連遺伝子の種類および配列を精査する。得られた遺伝子配列を基に他の植物種における相同遺伝子のアミノ酸配列から分子系統樹を作製する。さらに、標準ハス系統から抽出した RNA をもとに cDNA ライブラリを作成し、実際に発現している状態の遺伝子構造を決定する。

### (3) 花成・花器官形成関連遺伝子の多型および発現解析

東京大学保有の花ハス遺伝資源の中から、

これまでに蓄積している開花早晩性のデータを元に早咲き、遅咲き、連続開花性、および不開花性の品種を複数選択する。さらに、古代ハスのゲノム配列を基にプライマーを設計し、選択したハス品種において花成関連遺伝子 (*FT/TFL1*) の全長配列を増幅し、ゲノム配列レベルでの多型の有無を解析する。同様に、一重、半八重、八重、および超多弁品種 (妙蓮、千弁蓮) を複数品種選択し、これら品種において花器官形成に関わる MADS-box タイプの転写制御因子の遺伝子配列の多型を解析する。主要な花ハス品種において開花期の葉、地下茎、茎頂、根、花芽など、さまざまな器官におけるこれら遺伝子の発現量を Q-PCR によって解析し、ハスにおいて主要なフロリゲン・アンチフロリゲンとして機能している *FT/TFL1* 遺伝子の分子種を特定する。

#### 4. 研究成果

(1) ハスの全ゲノム配列データベースにおける BLAST 検索および‘每葉蓮’の cDNA を鋳型とした PCR の結果、FT 様遺伝子を 4 種類 (*NnFT1*, *NnFT2*, *NnFT3*, *NnFT4*)、*TFL1* 様遺伝子を 4 種類 (*NnTFL1*, *NnCEN*, *NnAFT*, *NnBFT*)、それぞれ単離した。‘每葉蓮’と‘桜蓮’における全長遺伝子の PCR の結果、いずれの遺伝子も両品種において増幅がみられたが、*NnTFL1*, *NnCEN*, *NnAFT*, *NnBFT* においては、予想サイズに加えてより高い位置にバンドが検出され、両品種で異なるバンドパターンを示した。‘每葉蓮’から得られた各遺伝子の配列について中国古代ハスのデータベースと比較した結果、より長い増幅産物の配列は 300~800 bp のイントロン領域が残存したスプライシング多型であることが判明した。またそれらのいずれでも途中で終止コドンが認められ、想定されるアミノ酸配列長は 80~100 aa と正常な配列に比べ著しく短縮されていた。正常な増幅産物の塩基配列から想定されるアミノ酸配列はいずれも 175 aa 程度で、*NnFT3* を除き中国古代ハスと 99% 以上の相同性を示すとともに、特に *NnFT1*, *NnFT2*, *NnTFL1*, *NnAFT* で *FT/TFL1* 活性に必須とされる 5 アミノ酸残基が高度に保存されていた。

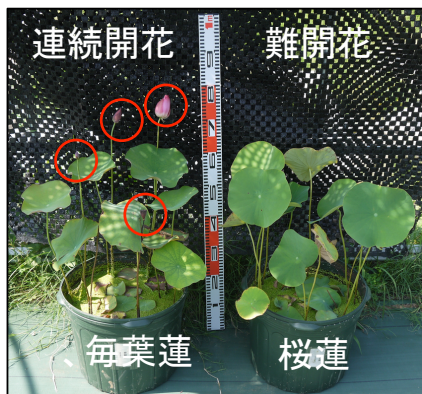


図1. 連続開花性品種‘每葉蓮’と難開花性品種‘桜蓮’

器官別発現解析の結果、*NnFT2* は植物体全体で高く発現していたのに対し、*NnFT1* はいずれの器官においても低い発現量を示した。*NnFT3* は花器官において、*NnFT4* は地下組織において特に高い発現量が認められた。*TFL1* 様 4 遺伝子の発現量には両品種間において差異が見られ、根における *NnTFL1*、茎頂における *NnBFT* の発現量は‘每葉蓮’で相対的に高く、葉における *NnCEN* の発現量は‘桜蓮’で相対的に高かった。また *NnTFL1* と *NnAFT* の発現は一部の器官で特異的にみられ、それぞれ茎頂・根および発達中の蕾で特に高い値を示した。これらの結果から、*TFL1* ファミリーのスプライシング異常と発現量とが開花特性の違いに関与している可能性、および *NnFT2* がハスにおいてフロリゲンとして機能している可能性が示唆された。

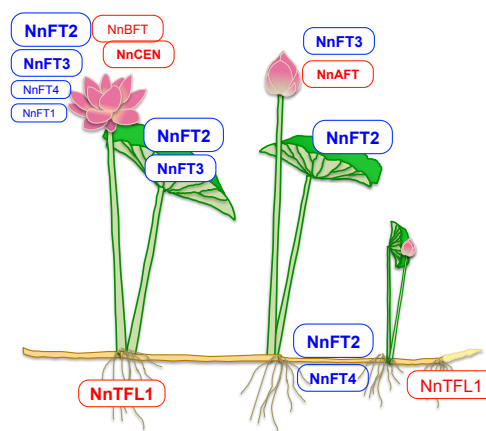


図2. ハスFT/TFL1ファミリー遺伝子の空間的発現パターン。文字の大きさは発現量を表す。

(2) ハスにおいて花器官形成に関与すると考えられる ABCE クラス遺伝子の保存性および多様性を調べるため、ハスの全ゲノム配列データベース (LOTUS-DB) から、各クラス遺伝子のアミノ配列を取得し、分子系統解析を行った。その結果、A クラス遺伝子を 4 種類 (*NnAPI1*, *NnAPI2*, *NnAPI2a*, *NnAPI2b*)、B クラス遺伝子を 3 種類 (*NnPI1*, *NnAPI3a*, *NnAPI3b*)、C クラス遺伝子を 2 種類 (*NnAG1*, *NnAG2*)、E クラス遺伝子を 3 種類 (*NnSEPIa*, *NnSEPIb*, *NnSEPI3*)、それぞれ単離した。アミノ酸配列の多重整列解析の結果から、それぞれの遺伝子機能に重要なドメインの基本構造が高度に保存されていたことから、これらの遺伝子は花器官形成に重要な機能を保持しているのではないかと考えられた。



図3. 一重咲き品種‘每葉蓮’と八重咲き品種‘重台蓮’

次に、八重咲きの原因遺伝子候補として、前述した AG および AP2 に着目し、一重咲き品種‘每葉蓮’と八重咲き品種‘重台蓮’において遺伝子配列の比較解析を行った。その結果、一重咲き品種と八重咲き品種で2つの *NnAG* とともにコード領域の配列に違いがみられなかったことから、ハスの八重咲きは AG の構造的機能欠損が原因ではないと考えられた。3つの *AP2* ホモログについては、両品種でいくつか異なる転写産物が確認されたが、いずれも一重咲きと八重咲きの違いを説明するには不十分であった。ハスの八重咲きは AG および *AP2* の遺伝子構造ではなく発現制御の違いによって起こると予想し、他の ABCE クラス遺伝子を含め発現解析を行った。その結果、一重咲き品種と比較して八重咲き品種の雄ずいにおいて *NnAG1*, *NnAG2* の発現が減少していた。一方で、3つの *AP2* ホモログの発現量に両品種間で明確な違いはみられなかった。さらに、B クラス遺伝子である *NnAP3a*, *NnAP3b* の発現領域が一重咲き品種では雄ずいのみだったのに対し、八重咲き品種では雄ずいに加え花弁にも拡大していた。これらの結果から、ハスの八重咲き性は C クラスおよび B クラス遺伝子の発現制御機構の違いによって引き起こされる可能性が示唆された。

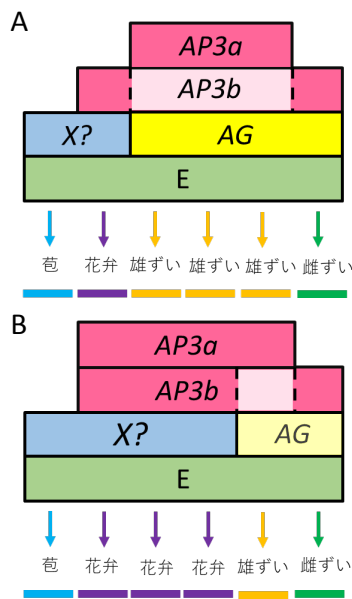


図4. 每葉蓮(A)、重台蓮(B)における花器官形成モデル

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

- ① 和泉隆誠 (代表)、石川祐聖、工藤新司、柴田道夫、樋口洋平、花ハスの *FT/TFL1* 様開花関連遺伝子の単離と発現解析. 園芸学会平成 29 年度春季大会. 2017 年 3 月 19~3 月 20 日. 「日本大学生物資源科学

部 (神奈川県・藤沢市)」

- ② 柏村友実子 (代表)、河鱒実之、樋口洋平、ハスの一重咲きと八重咲き品種における花器官形成遺伝子の比較解析. 園芸学会平成 28 年度秋季大会. 2016 年 9 月 10 日~9 月 12 日. 「名城大学天白キャンパス (愛知県・名古屋市)」
- ③ Higuchi Y (代表), Waizumi R, Ishikawa Y, Kudo S, Shibata M, Flowering time regulation in Sacred lotus: Identification and characterization of PEBP family genes. The Second Asian Horticultural Congress. 2016 年 9 月 26 日~9 月 28 日. 「成都 (中国)」

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(4) 研究協力者

石川 祐聖 (ISHIKAWA, Yusei)

工藤 新司 (KUDO, Shinji)

柏村 友実子 (KASHIWAMURA, Yumiko)

和泉 隆誠 (WAIZUMI, Ryusei)