

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月21日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04877

研究課題名(和文)キクの季節的成長制御機構の解明 -ロゼット形成と花成能力の変化について-

研究課題名(英文) Seasonal Variability in Dormancy and Flowering Competence in Chrysanthemum

研究代表者

久松 完 (HISAMATSU, TAMOTSU)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・上級研究員

研究者番号：00355710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：キクの季節的成長制御機構の解明に比較トランスクリプトーム解析を導入して取り組んだ結果、ロゼット形成時の茎頂部は休眠状態にあると判断された。シュート伸長および花成能力はいずれも生育温度履歴によって調節され、夏季に温度が上昇した後、伸長能力の低下とともに花成誘導が困難な状態になった。茎頂部が休眠状態に入った後、低温はシュート伸長への抑制を解除する。また、低温は花成能力に關与する2つの制御機構に反対の影響をもち、休眠状態に關連する花成抑制経路は低温遭遇によって解除され、同時に他方の抑制経路による花成抑制を強くする。これら伸長能力と花成能力に影響する3つの要因のバランスが季節的成長制御に關与している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キクの越冬機構であるロゼット形成/花成抑制機構は多年生草本植物であるキクの生存戦略上、非常に重要であり個体の成長や種の繁栄に必要な適応機構である。一方、切り花生産においては、冬季安定生産の妨げとなっている。そこで、ロゼット形成と花成能力の変化に着目したキクの季節的成長制御機構の解明に取り組み、多年生草本植物のライフサイクル制御機構の理解に貢献するとともに、キクをはじめとする産業上重要な多年生草本花き類の周年安定生産を支える基盤となる知見の集積を目指す。

研究成果の概要(英文)：To enhance our understanding of seasonality in chrysanthemums, we have introduced comparative transcriptome analysis to elucidate the mechanism. In chrysanthemum, the dormant meristem lacks the ability for shoot extension and flowering. Both shoot extension and flowering capacity under the subsequent growing conditions were regulated by the temperature of prior growing conditions. After the temperature increased over the summer, chrysanthemums showed a reduced ability for extension growth, and became more difficult to induce flowering. Chilling stimulated the extension growth of shoots when the meristems were entering a dormant state. Chilling had the opposite effect on two regulatory pathways involved in flowering capacity. A pathway related to the meristem dormant state was suppressed by exposure to chilling and induced flowering, and chilling activated an inhibitory regulator in parallel.

研究分野：花き園芸学

キーワード：キク ロゼット 休眠 花成

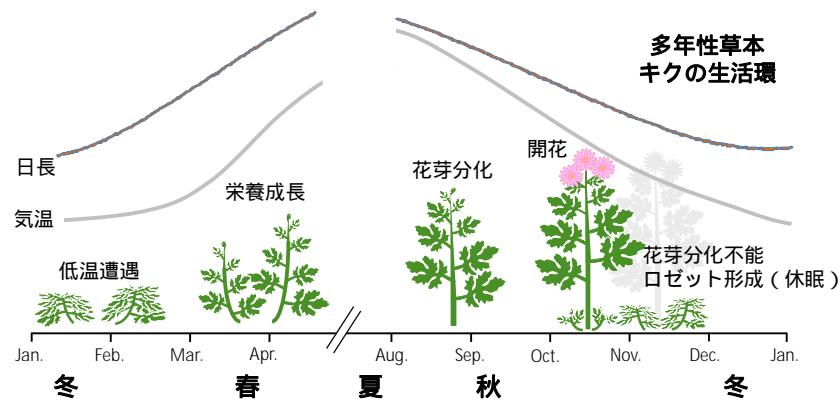
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

キクの越冬機構であるロゼット形成/花成抑制機構は多年生草本植物であるキクの生存戦略上、非常に重要であり個体の成長や種の繁栄に必要な適応機構である。一方、切り花生産においては、冬季安定生産の妨げとなっている。そこで、ロゼット形成と花成能力の変化に着目したキクの季節的成長制御機構の解明に取り組み、多年生草本植物のライフサイクル制御機構の理解に貢献するとともに、キクをはじめとする産業上重要な多年生草本花き類の周年安定生産を支える基盤となる知見の集積を目指す。

2. 研究の目的

本研究では未だ解明されていないキクのもつロゼット形成と花成能力の季節的变化(第1図)について、ゲノム情報に基づいた発現遺伝子プロファイリングによる生理状態の把握を目指すとともに、担当者らが整備したキクの分子遺伝学的解析ツールを駆使して、キクの越冬機構であるロゼット形成/花成抑制機構の解明に取り組み、多年生草本植物のライフサイクル制御機構の理解に貢献することを目的とする。



第1図 キクの生活環：ロゼット形成と花成能力の季節的变化

3. 研究の方法

栽培キクのモデルとして二倍体野生種キクタニギクを供試し、標準系統(AEV2系統自殖第5世代(XMRS10))のゲノム情報の整備を行った。このゲノム情報を基盤に越冬機構の解明に適したキクタニギク系統(NIFS-3)のトランスクリプトーム解析系を構築し、ロゼット形成と花成能力の変化に着目した遺伝子発現プロファイリングを行い、ロゼット形成時の生理状態を評価した。また、抽出されたロゼット形成と花成抑制にかかわる鍵候補遺伝子について、発現解析および過剰発現形質転換体を作成してその生理機能の解明に取り組んだ。さらに、ロゼット形成/打破の鍵となる植物ホルモン、ジベレリン(GA)に着目した解析を行った。

4. 研究成果

(1) キクタニギク系統(NIFS-3)のトランスクリプトーム解析系の構築

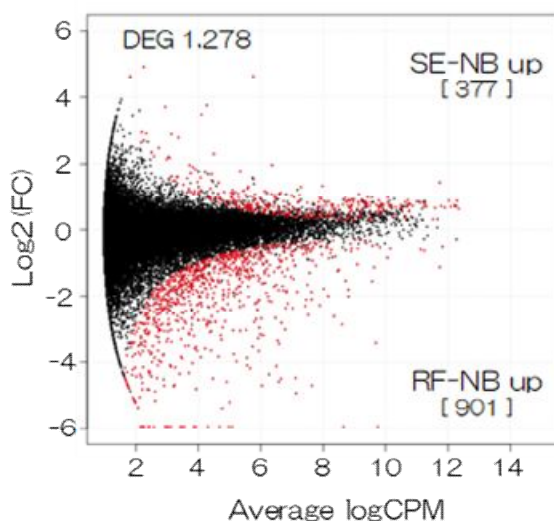
整備した標準系統のゲノム配列情報および予測遺伝子情報(Hirakawa et al., 2019)を基に予測アミノ酸配列をqueryとしたBLAST検索およびOrthoMCLによるオルソログ解析を用いて花成関連遺伝子の網羅的探索を行い、フロリゲン/アンチフロリゲンをコードするFT/TFL1が属するPEBPファミリー遺伝子として新たに2個のTFL1/BFT様遺伝子が同定された。新たに見いだされた遺伝子は花成抑制活性をもつと予測された。一方、花成促進活性をもつFT様遺伝子は既報の3遺伝子(CsFTL1,2,3)のみと推定された。その他、花成、花芽分裂組織決定、花器官形成に関わる遺伝子が高度に保存されていることが明らかになり、得られたゲノム配列情報は網羅率が高いと判断された(樋口ら, 2018)。整備されたゲノム配列(CSE_r1.0.fasta)をリファレンス配列としてbowtie2を用いてNIFS-3系統由来の発現遺伝子配列をマッピングした結果、平均97.3%のマッピング率が得られた。これにより、標準系統のゲノム配列情報をリファレンス配列としたRNA-seqによるトランスクリプトーム解析系が構築された。

(2) ロゼット形成と花成能力の変化に着目した遺伝子発現プロファイリング

20/15・暗期中断(NB)条件で栽培した1)ロゼット形成・NB(RF-NB)区, 2)シュート伸長・NB(SE-NB)区の遺伝子発現解析材料を供試したRNA-seq解析の結果、RF-NB区とSE-NB区の間で1278遺伝子がDEGs(p-value < 0.05, FDR < 0.05)として抽出された(第2図、久松ら, 2018)。これらのうち901遺伝子がRF-NB区で発現上昇し、377遺伝子がSE-NB区で発現上昇した。また、2倍以上の発現変動を示したDEGsはRF-NB区で77%, SE-NB区で22.8%であった。GO解析の結果、SE-NB区で発現上昇したDEGs(SE-NB up)は旺盛な伸長成長に関連すると特徴づけられるGO termが有意に抽出された。着目したRF-NB区で発現上昇したDEGs(RF-NB up)では生物的/非生物的ストレスに関連すると特徴づけられるGO termが有意に抽出され、成長抑制、生物的/非生物的ストレス耐性獲得に関連すると推定される遺伝子が多く見いだされた。ま

た、最近報告された木本類の芽の休眠に関する解析で得られた遺伝子発現プロファイリング情報と比較してロゼット形成時のキクの生理状態は木本類の芽の休眠状態と酷似していた。

以上のようにキクタニギクはロゼット形成時、外観では休止状態にあるが、活発な遺伝子発現が確認され積極的にロゼットを形成し生物的/非生物的ストレスに耐性を高めた生理状態にあると推定された。また、“ロゼット化”と称されてきたキクのロゼット形成は遺伝子発現プロファイリングから休眠現象の一つと考えられた。

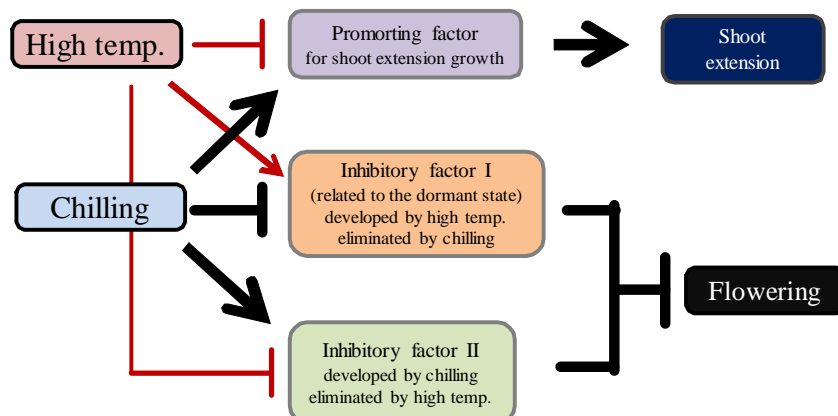


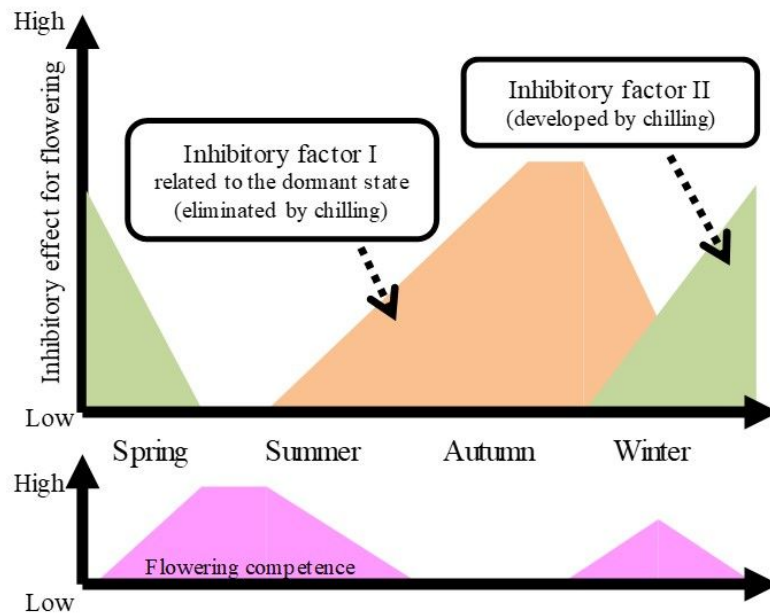
第2図 キクタニギクのロゼット形成時 (RF-NB) とシュート伸長時 (SE-NB) の比較における発現変動遺伝子

(3) ロゼット形成と花成能力の変化に着目した越冬機構の解明

ロゼット形成と花成能力の季節的变化について、シュート伸長能力と花芽分化・発達能力とに区別して夏季の高温遭遇と冬季の低温遭遇の影響の視点から整理した(第3図、Hisamatsu et al., 2017)。さらに花芽分化・発達能力については、2つの抑制因子の存在を仮定した。第一の因子はロゼット形成(休眠)状態と関連の大きく、夏季の高温遭遇によって抑制状態が強くなり、冬季の低温遭遇によって抑制が解除される、第二の因子は第一の因子とは逆に冬季の低温遭遇によって抑制状態が強くなる因子と想定された(第3図、Hisamatsu et al., 2017)。これら2つの抑制因子の連続的な変化によってキクにとって開花するに不適な晩秋から冬季あるいは春の短日条件下での花成を抑制していると考えられた。この機構は、自然環境でのキクの多年生草本としての重要なライフサイクル制御機構の一つと考えられた。

さらにRNA-seq解析の結果、第一の因子を構成する遺伝子としてロゼット形成時(休眠時)の茎頂部において特異的に発現するSPL型転写調節因子(Higuchi et al., 2018)および新規TFL1/CEN様遺伝子を同定した(Hirakawa et al., 2019)。候補遺伝子の発現解析ならびに過剰発現形質転換体の表現型からこれらの遺伝子がキクの休眠時における茎伸長抑制および花成抑制に機能する可能性が示された。



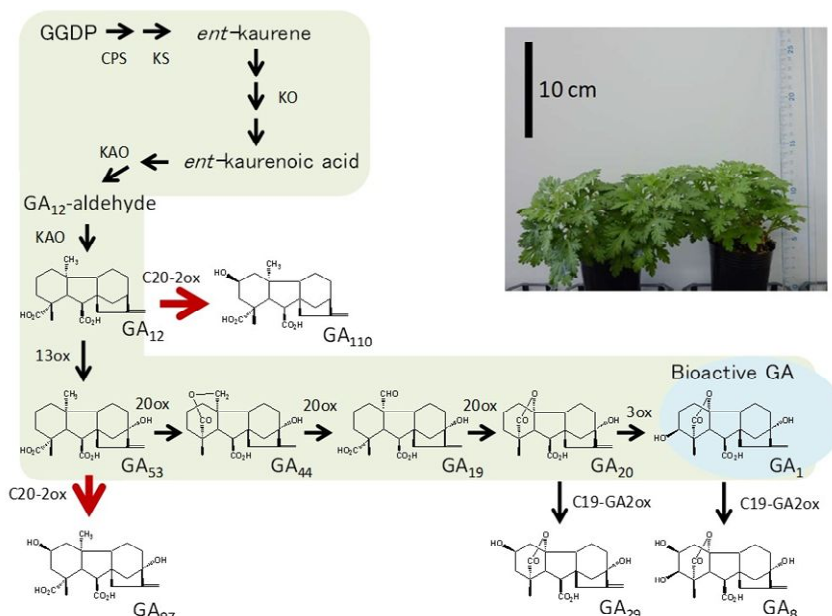


第3図 シュート伸長能力（ロゼット形成）と花成能力の季節的变化

(4) ロゼット形成/打破の鍵となる植物ホルモン、ジベレリン(GA)に着目した解析

栽培ギク(94-4008系統)を供試し、ロゼット形成時とロゼット打破時の茎先端部の内生GA量の比較をおこなった結果、低温遭遇後、ロゼット打破(休眠打破)され、シュート伸長が再開する時には活性型GA(GA₁)の内生量増大を伴うこと、前駆物質の顕著な蓄積は認められないことが明らかになった。

キクタニギク系統(NIFS-3)を20/15・短日(SD)あるいは暗期中断(NB)条件で栽培し、1)ロゼット形成・SD(RF-SD)区、2)シュート伸長・NB(SE-NB)区の遺伝子発現解析材料を供試したRNA-seq解析の結果、活性型GA前駆体の不活化に関わるC20-GA2ox遺伝子の発現変動が鍵であることが推定された(第4図、久松ら、2018)。これにより“生長活性”と概念的に説明されてきたロゼット形成(休眠)時の茎伸長能力を規定する要因の一つが“GA生合成活性”であることが示された。



第4図 キクのジベレリン生合成経路とロゼット形成の鍵段階(赤矢印)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Hideki Hirakawa, Katsuhiko Sumitomo, Tamotsu Hisamatsu, Soichiro Nagano, Kenta Shirasawa, Yohei Higuchi, Makoto Kusaba, Masaji Koshioka, Yoshihiro Nakano, Masafumi Yagi, Hiroyasu Yamaguchi, Kenji Taniguchi, Michiharu Nakano, Sachiko N Isobe. (2019) De novo whole-genome assembly in *Chrysanthemum seticuspe*, a model species of Chrysanthemums, and its application to genetic and gene discovery analysis. DNA Research (査読有) <https://doi.org/10.1093/dnares/dsy048>

Yoshihiro Nakano, Tomoyuki Takase, Shigekazu Takahashi, Katsuhiko Sumitomo, Yohei Higuchi, Tamotsu Hisamatsu. (2019) *Chrysanthemum* requires short-day repeats for anthesis: gradual CsFTL3 induction through a feedback loop under short-day conditions. Plant Sci. (査読有) 283:247-255.

Higuchi Y (2018) Florigen and anti-florigen: Flowering regulation in horticultural crops. Breeding Science (査読有) 68:109-118.

樋口洋平、柴田道夫 (2018) 次世代の flower Industry 発展へのチャレンジ! 知っているようで知らない花の研究 5 キクの育種上の諸特性と開花制御. 化学と生物 (査読有) 56:111-117.

Tamotsu Hisamatsu, Katsuhiko Sumitomo, Michio Shibata, Masaji Koshioka. (2017) Seasonal Variability in Dormancy and Flowering Competence in *Chrysanthemum*: Chilling impacts on shoot extension growth and flowering capacity. JARQ (査読有) 51:343-350.

〔学会発表〕(計3件)

Higuchi Y, Narumi T, Sumitomo K, Hisamatsu T (October 2018) *SPL13*-like gene regulate dormancy-associated flowering incompetence in chrysanthemum. 6th Plant Dormancy Symposium. Kyoto-Japan (Poster presentation)

久松 完、住友克彦、樋口洋平、腰岡政二、永野聡一郎、平川英樹、磯部祥子 (2018年9月) 全ゲノム情報をベースとしたロゼット形成時におけるキクタニギクの遺伝子発現プロファイリング. 園芸学会平成30年度秋季大会(鹿児島) 口頭発表

樋口洋平、久松 完、中野善公、平川英樹、白澤健太、磯部祥子、住友克彦 (2018年9月) キクタニギク的全ゲノムシーケンスを利用した花成関連遺伝子の網羅的探索. 園芸学会平成30年度秋季大会(鹿児島) 口頭発表

〔図書〕(計4件)

久松 完. シーエムシー出版. アグリフォトニクス 第13章 電照補光による花きの開花調節. (2018) 209(137-146).

久松 完. 社団法人農山漁村文化協会. 農業技術大系 花卉編 第3巻 キクの光周性花成のしくみと電照の最適化への展開. (2017) 226-1-14-30.

Yohei HIGUCHI and Tamotsu HISAMATSU. Springer Singapore. In: LED Lighting for Urban Agriculture. Light Acts as a Signal for Regulation of Growth and Development (2016) 454(57-73).

Yohei HIGUCHI and Tamotsu HISAMATSU. Springer Singapore. In: LED Lighting for Urban Agriculture. Factors Affecting Flowering Seasonality (2016) 454(75-89).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久松 完 (HISAMATSU Tamotsu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・花き生産流通研究領域・上級研究員

研究者番号: 00355710

(2) 研究分担者

樋口 洋平 (HIGUCHI Yohei)
国立大学法人東京大学大学院・農学生命科学研究科・講師
研究者番号：00746844

住友 克彦 (SUMITOMO Katsuhiko)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・花き遺伝育種研究領域・上級研究員
研究者番号：70391406

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。