

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15833

研究課題名（和文）シクラメンにおける八重咲き形質の多様性と安定性の遺伝的制御機構

研究課題名（英文）Genetic control of various and stable double-flower trait in cyclamen

研究代表者

水ノ江 雄輝（Mizunoe, Yuki）

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：50759206

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）：シクラメンにおける萼弁化は単一の優性遺伝子によって支配されていることが明らかとなった。一重咲きと八重咲きの交雑後代では、開花時期が遅い花ほど萼の弁化程度も大きくなる傾向が認められ、それら季節変化の程度には系統間差および個体間差が認められた。また、八重咲き花における明瞭な花模様が発現には萼由来花弁の弁化程度が影響しており、十分に発達した萼由来花弁では通常花弁と同様の形質が認められた。一重咲きと八重咲きのMADS-box遺伝子の発現量に違いが認められた一方、MADS-box遺伝子のプロモーター領域の塩基配列において、八重咲きに特徴的な配列は認められず、後天的な遺伝子制御機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、遺伝的背景だけでなく、後天的な遺伝的制御機構が花器形態変異（八重咲き）の多様性と安定性に関与している可能性が示唆された。八重咲きには本研究で対象とした萼弁化だけでなく、雄蕊弁化、通常花弁数増加といった多様な花器形態変異が存在する。本研究は、他の花器形態変異の遺伝的制御機構を解明するための重要な足掛かりとなるだけでなく、新規八重咲き花を作出する際の貴重な知見となると考えられる。また、日本において最も生産量の多い鉢花であるシクラメンを研究対象としており、学術だけでなく農業生産上の応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Segregation ratio of BC1 and F1 progenies indicated that the petaloidy of sepals in cyclamen cultivars are regulated by single dominant gene. Their petaloid sepals were well developed in later flowering season, and the degree of seasonal changes were different among accessions and plants. The degree of petaloidy affected appearance of floral pattern, well developed petaloid sepals showed similar floral characteristics to normal petals. Although expression levels of MADS-box genes were different between single- and double-flowered cyclamen, base sequences of MADS-box promoter regions were not unique to double-flowered cyclamen. These results indicated that epigenetic gene regulation influences gene expression level and morphogenesis of double-flower.

研究分野：園芸科学

キーワード：シクラメン 八重咲き 花器形態形成 ABCモデル エピジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

“八重咲き”は花きの観賞価値を高める有用形質であり、シクラメンにおいても雄蕊の弁化、萼の弁化および通常花卉が増加する 3 種の八重咲き花が存在する。このうち萼弁化型のシクラメン (第 1 図) では、Whorl 2 に発達した花卉 (以降、通常花卉: 第 1 図 B) にくわえて、萼の代わりに Whorl 1 に発達した花卉 (同、萼由来花卉: 第 1 図 C) を持つ。

萼弁化型の八重咲きシクラメンでは、萼由来花卉が通常花卉よりも小さく、着色も不完全な系統 (不完全八重) がある一方、萼由来花卉が通常花卉と同程度に発達・着色する系統 (完全八重) が存在する。不完全八重の系統では後代においても萼の弁化程度は不完全であり、環境要因の影響を強く受けるが、完全八重の系統では安定して八重咲き形質が発現することから、シクラメンにおける萼弁化形質は遺伝的に異なる制御機構 (遺伝子) が存在していると推測された。

不完全八重系統では萼弁化程度の個体間差が遺伝子の発現量の違いに起因することが示唆される一方、それら不完全八重系統において遺伝子発現量の個体間差を生じる遺伝的要因、完全八重系統では安定的に萼弁化が生じるという萼弁化程度の系統間差異を説明できない。また、不完全八重の系統では萼由来花卉の発達と着色は生育温度の影響を受け、不適生育環境下では萼由来花卉に代わり萼が形成される場合があることから、萼弁化の主な要因は B クラス遺伝子の機能喪失ではなく発現量の変化であると考えられるが、それら環境応答性の花器形態形成遺伝子および色素生合成遺伝子の発現がどのような遺伝的制御機構によって介在されているのか明らかではない。

塩基配列 (遺伝子の機能) には変化を伴わず発現量に変化が生じる例として、近年では DNA メチル化による発現制御機構が植物においても多く報告されており、これら DNA メチル化による遺伝子発現の変異の多くが後代へ遺伝することが明らかとなっている (西村, 2017)。バラでは低温によって誘導されるプロモーター領域のメチル化によって、C クラス遺伝子の発現が抑制されることが報告されており (Ma et al., 2015)、同様に多くの DNA メチル化が遺伝子の発現抑制に働く一方、DNA メチル化の解除 (脱メチル化) によって遺伝子発現が上昇する例や、C クラス遺伝子がメチル化されることで転写抑制因子が結合できなくなり、他の花器器官で異所的に発現して雄蕊が形成されたペチュニアの例 (Shibuya et al., 2009) も報告されている。



第 1 図. 萼弁化型の不完全八重咲き品種。
(A) 植物体全体、(B) 通常花卉、
(C) 萼由来花卉。

2. 研究の目的

本研究では、シクラメンに認められる完全八重および不完全八重形質に着目した MADS-box 遺伝子の機能、発現およびエピジェネティクス解析により、八重咲き形質に多様性と安定性をもたらす後天的な分子遺伝学的制御機構の解明を目的とした。

はじめに萼弁化形質に関与している遺伝子数を明らかにするため、完全八重、不完全八重の系統における萼弁化形質の遺伝性を調査した (実験 1)。次に親世代および交雑によって得られた分離集団を用いて、MADS-box 遺伝子のゲノムシーケンスと DNA (脱) メチル化による遺伝子機能の変化と表現型との関係について調査した (実験 2)。また、MADS-box 遺伝子とアントシアニン生合成酵素遺伝子の発現量との相関関係を確認した (実験 3)。

3. 研究の方法

(1) 交雑後代における萼弁化形質の遺伝様式の解明

一重咲き品種と不完全八重咲き品種との交配より得られた八重咲きの F₁ 個体、およびそれら個体と一重咲き個体との戻し交配より得られた BC₁ 系統を栽培し、開花期に花器形質を観察した。開花した個体の萼由来花卉において弁化程度を 4 段階、着色程度を 5 段階で評価し、後代への萼弁化形質の遺伝様式を調査した。この際、交配親にフリンジ、もしくは覆輪形質を持つ一重咲き品種を用いることで、後代におけるこれら形質の遺伝様式および萼由来花卉における形質の有無を調査した。また、不完全八重、完全八重を交配親に持つ F₁、S₁ 系統を用いて、開花期を通して萼の弁化程度の経時変化を調査した。

(2) MADS-box 遺伝子の機能解析、および DNA メチル化解析

シクラメンの A クラス遺伝子 (AP1) および B クラス遺伝子 (AP3a, AP3b, PI) のプロモーター領域の配列情報より新たにプライマーを設計した。複数の一重咲き品種および八重咲き品種より抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、得られた PCR 産物をダイレクトシーケンスに供した。また、一重咲きおよび八重咲き品種より抽出した DNA をメチル化感受性制限酵素で処理した。上述のプライマーを用いて各遺伝子のプロモーター領域を PCR により増幅した後、PCR 断片のサイズを電気泳動により確認した。

(3) MADS-box 遺伝子およびアントシアニン生合成酵素遺伝子の発現解析

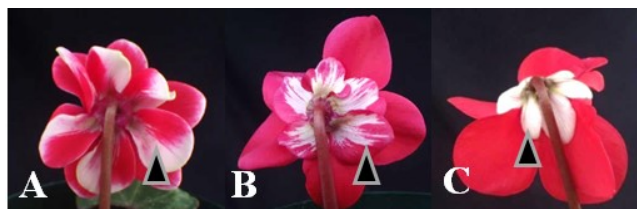
一重咲きおよび八重咲き品種より採取した開花前の蕾を通常花卉と萼、もしくは萼由来花卉に分解して全 RNA を抽出し、逆転写により cDNA を合成した。A クラス遺伝子 (AP1)、B クラス遺伝子 (PI, AP3a) およびアントシアニン生合成酵素遺伝子 (CHS, CHI, F3'5H', DFR) に特異的なプライマーセットを用いたリアルタイム PCR により、萼もしくは萼由来花卉 (Whorl 1) および通常花卉 (Whorl 2) における各遺伝子の発現量を定量した。

4. 研究成果

(1) 交雑後代における萼弁化形質の遺伝様式の解明

萼弁化 (不完全八重) 形質について、一重咲き品種と不完全八重咲き品種との交配より得られた八重咲きの F₁ 個体、およびそれら個体と一重咲き個体の戻し交配より得られた BC₁ 系統を用いて詳細な遺伝様式の解明を試みた。同時に、シクラメンの商業生産では種子繁殖が一般的であることから、F₁ 系統における萼弁化程度の季節変化および系統間差・個体間差、萼由来花卉におけるフリンジ形質および覆輪形質の発現および遺伝様式についても調査した。

BC₁ 系統における萼由来花卉の形態観察より、シクラメンにおける萼弁化形質は単一の優性遺伝子によって支配されている可能性が示唆された。F₁ 系統では、供試した 8 系統いずれにおいても開花時期が遅い花ほど萼の弁化程度も大きくなる傾向 (遺伝的に一重咲きの個体を除く) が認められ、それら季節変化の程度には系統間差および個体間差が認められた。一部の個体では、開花期間を通して萼の弁化程度が一定であったことから、不完全八重咲き系統であっても、このような個体を選抜することで八重咲き形質が安定して発現する園芸品種の作出につながると推測された。また、フリンジ形質および覆輪形質は優性遺伝子によって支配されていること、萼弁化形質と同時に発現可能であることが明らかとなった。しかしながら、萼由来花卉の弁化程度が小さい場合 (萼様形態) でもフリンジ形質の発現が認められた一方、萼由来花卉の着色が不完全なため覆輪形質の発現が確認できなかった (第 2 図) ことから、八重咲き花における明瞭な花模様の発現には萼由来花卉の弁化程度が影響していると考えられた。



第 2 図. F₁ 個体の萼由来花卉 (矢印).

(A) 覆輪を持つ萼由来花卉, (B) 覆輪を持たない萼由来花卉, (C) 発達・着色が不完全な萼由来花卉.

萼弁化 (完全八重) 形質について、一重咲き品種に完全八重咲き品種を交配した複数の F₁ 系統および完全八重咲き品種の S₁ 系統を新たに供試し、萼弁化程度の季節変化および系統間差・個体間差を調査した。F₁ 系統では、一重咲き個体と八重咲き個体が分離し、多くの系統において分離比は 1 : 1 に適合したが、一部の F₁ 系統や S₁ 系統では、異なる分離比を示した。これらの結果は、不完全八重咲き品種に由来する萼弁化形質の遺伝様式とは異なっていた。また、完全八重咲き品種に由来する F₁ 系統の八重咲き個体では、不完全八重咲きの品種を親に持つ場合と比べて、萼弁化程度の季節変化は小さく、萼弁化形質は安定して発現した。そのため、系統間差および個体間差も小さかった。以上のことから、完全八重咲き品種に由来する萼弁化形質については、不完全八重咲き品種とは異なる遺伝子 (遺伝的制御機構) が萼弁化に関与する可能性を考慮し、より詳細な調査が必要であると考えられた。

(2) MADS-box 遺伝子の機能解析、および DNA メチル化解析

シクラメンの萼弁化と MADS-box 遺伝子プロモーター領域の配列情報との関係を明らかにするため、一重咲きおよび八重咲き品種において、A クラス遺伝子 (AP1) および B クラス遺伝子 (AP3a, AP3b, PI) のプロモーター領域の配列比較を行ったが、一重咲き、もしくは八重咲き品種それぞれに特徴的な配列は認められなかったことから、MADS-box 遺伝子のプロモーター領域の配列 (機能) は萼弁化程度に影響を及ぼさないと考えられた。今後は、供試する品種数を増やし、本仮説の検証を進める予定である。

一重咲き、八重咲き品種より抽出した DNA をメチル化感受性制限酵素で消化した場合、品種間で多型が得られた一方、予想とは異なる部位で切断されるものも認められた。本結果の要因として、植物体の生育環境や供試部位がメチル化程度に影響を及ぼしている可能性が考えられたことから、サンプル採取方法の検討を行い、解析方法の最適化を行う必要がある。

(3) MADS-box 遺伝子およびアントシアニン生合成酵素遺伝子の発現解析

MADS-box 遺伝子 (A, B クラス遺伝子) の発現量は、一重咲き品種では、Whorl 1 において AP1、Whorl 2 において AP1, PI, AP3a の発現が認められた。八重咲きでは、Whorl 1 および Whorl 2 の両方において、AP1, PI, AP3a の発現が認められた。アントシアニン生合成酵素遺伝子の発現量は、一重咲き品種では、Whorl 1 と Whorl 2 において発現量に有意な差が見られ、

Whorl 1 における発現はほとんど認められなかった。一方、八重咲き品種では、Whorl 1 および Whorl 2 における発現量は同程度であり、有意な差は認められなかった。

<引用文献>

- ① Ma, N., W. Chen, T. Fan, Y. Tian, S. Zhang, D. Zeng and Y. Li. 2015. Low temperature-induced DNA hypermethylation attenuates expression of *RhAG*, an *AGAMOUS* homolog, and increases petal number in rose (*Rosa hybrida*). *BMC plant biology*, 15: 1-13.
- ② 西村 泰介. 2017. エピ変異：その安定性と表現型へのインパクト. p. 81-98. 種生物学会編. エピジェネティクスの生態学. 文一総合出版. 東京.
- ③ Shibuya, K., S. Fukushima and H. Takatsuji. 2009. RNA-directed DNA methylation induces transcriptional activation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 1660-1665.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuki Mizunoe, Daiki Kumamoto and Yukio Ozaki
2. 発表標題 Seasonal variation of sepal-petaloidy in F1 progenies of double-flowered cyclamen
3. 学会等名 III Asian Horticultural Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 隈元大樹・水ノ江雄輝・尾崎行生
2. 発表標題 萼弁化型八重咲きシクラメンにおけるフリンジ咲き，覆輪形質の発現と遺伝性
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------