

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24247013

研究課題名(和文) 花成遺伝子の多型による開花期の地域適応と種分化機構の解明

研究課題名(英文) Intraspecific differentiation reinforced by flowering time differentiation as local adaptation caused by the genotype polymorphisms

研究代表者

瀬戸口 浩彰 (Setoguchi, Hiroaki)

京都大学・人間・環境学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70206647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物が成長相転換を行うタイミングを適切に測ることは、その種の生存に極めて重要なイベントである。発芽から枝葉を茂らせて光合成と成長に専念する栄養成長を、どのタイミングで繁殖成長に切り替えるかは、様々な外的・内的な要因がある。この研究では、日長と温度(春化)という、二つの環境要因に焦点を当てて、ミヤコグサとハマダイコンを用いて研究を行った。ミヤコグサでは基本的に次世代シーケンサーを用いた全ゲノム比較を行って、開花の早晚に関与する遺伝子を探索し、EMF2などの重要な候補遺伝子などの関与を見いだした。ハマダイコンでは、低緯度の系統で抽だいと開花に春化处理が不要であることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Growth stage conversion is essential event for survival success of local populations of plant species as a sessile organism. This project aimed to elucidate mechanisms of flowering time determination for abiotic environmental factors, day length and vernalization, for *Lotus japonicas* (Fagaceae) and wild radish (*Rhaphanus sativus*: Brassicaceae). For *Lotus japonicas*, whole genome sequences of 131 wild lines were compared and candidate genes involved in flowering time determination. Among the 375 SNPs that were differentiated between the early- and late flowering wild lines, 22 SNPs on gene were identified. EMBRYONIC FLOWER gene 2 (EMF2) were identified as the candidate gene. In wild radish, we found clear north-south differentiation along the Japanese islands. Comparative studies their growth pattern and gene expression (FT and FLC), southern populations can convert to reproductive stage without vernalization, whereas vernalization is essential for northern populations.

研究分野：生物多様性・分類

キーワード：成長相転換 花芽形成 種内分化 環境適応 日長 春化 ミヤコグサ ハマダイコン

1. 研究開始当初の背景

植物は発芽した場所から移動することが出来ないために、光の質と量・あるいは気温などの無機的な環境要因をセンシングすることによって、生育地の緯度に適した開花のタイミングを測っている。実際に、日本各地から同一の野生植物種を採取して京都で一斉に栽培していると、開花の時期が採集地の緯度によって異なることが観察される。これは京都の光環境に対して、花成誘導に関わる遺伝子群の反応(感受性)が様々に多様化していることを示唆している。

申請者はこれまでに、日本の高山植物であるアブラナ科のミヤマタネツケバナやツツジ科のコメバツガザクラなどで、中部山岳の集団と東北・北海道の集団の間においてフィトクロムE遺伝子が大きく南北分化を起こしていることを見出した。そして胚軸伸長などのフィトクロムに起因する典型的な光応答性が、南北集団の間で大いに異なっているなどの知見を得てきた。しかしながら同様な趣旨の研究は、ヨーロッパに自生するシロイヌナズナを対象にしても行われており、これにはフィトクロムC (PHYC) の適応進化が関与していることが明らかになっていた。先行研究との間には、PHYCかPHYEかの違いが存在するものの、全ゲノム解析と様々な変異体が完備されたシロイヌナズナ研究との差は大きかった。そこで、日本に自生する野生植物で、全ゲノムが解析されており、開花時期が光環境によって大きく影響を受ける植物を探したところ、マメ科のミヤコグサとダイコンの野生種のハマダイコンに辿り着いた。両方の種ともに、全ゲノム配列が既知であり、ゲノム比較やRNAseqなどの研究がやり易いメリットがある。

2. 研究の目的

本研究は4年間の期間内に、ゲノム基盤が整っているミヤコグサとハマダイコンを用いて、広範囲な緯度傾度(北海道から沖縄県南部にまで自生)に伴う光環境変化に対して、概日時計遺伝子群(CONSTANS, GIGANTEA)やPHYAを中心とする花成誘導遺伝子がどのような遺伝子型として集団に維持されており、その遺伝子型が開花時期の決定に対してどのような機能変化をもたらすのかを同定する。ハマダイコンでは春化応答性に焦点を当てて研究を進める。本研究の遂行は、南北に長い日本列島を場にして、緯度傾度ともなう光環境・温度環境の傾度の中で、野生植物が遺伝子をどのように適応させて生殖

の時期を制御しているのかを解明することにつながる。開花のタイミングの「ずれ」は生殖的隔離をもたらすので、換言すると種分化を促進する遺伝子制御機構を解明する一端を担うことになる。

3. 研究の方法

(1) ミヤコグサ

国内野生系統131系統を対象にして、共通圃場にて播種から開花までの所要日数を計測した。これだけの大規模な共通圃場実験は初めてである。引き続き、全ゲノム配列が為されていない野生系統について、次世代シーケンサーを用いてリシーケンスを行った。ゲノムワイド関連解析(GWAS)を行い、24の環境要素と遺伝子上の一塩基多型(SNAP)の相関を求めた。この中から、開花時期の早晩に関わる遺伝子を探索した。

とくに早咲きの系統と遅咲きの系統を選抜して、この二群間の全ゲノムを比較して、開花の早晩に関わる遺伝子を探索した。

上記二つの実験結果から、開花の早晩に関わると見込まれる遺伝子E1とEMF2の「早咲き型」と「遅咲き型」の効果を検証するために、遅咲き型の遺伝子を早咲き系の個体に組み換えた「組み換え体」の作成を行った。

ミヤコグサでは花芽形成を促進するFT遺伝子の発現が地上部で見られないため、開花前の個体のRNAseqを行って、花芽形成を促進する代替の遺伝子の候補を探索した。

(2) ハマダイコン

日本国内における種内系統を探るために、マイクロサテライト解析による系統地理構造を探した。また、核遺伝子の塩基配列に基づいて、分断分散解析(IM解析)を適用して、国内の種内系統の分岐年代推定と遺伝子流動の方向性や相対量を比較した。

国内の24野生系統を対象にして、共通圃場にて、播種から開花までの所用日数を計測した。この実験を行うにあたっては、発芽後に低温処理(4℃、3週間)を施したのちに21℃で生育したものと、低温処理を施さずに21℃の生育温度のまま維持した2系統を作成した。

春化処理の感受関連遺伝子としてFLC、ならびに抽茎と花芽形成を促進する遺伝子としてFTの発現量の変遷を、「高緯度遅咲き系統」と「低緯度早咲き系統」の間で、発現しているRNA量を比較定量するRT-PCRを行った。

4. 研究成果

(1) ミヤコグサ

国内野生系統 131 系統の開花所要日数は、その産地の緯度に沿って有意な相関を持つことが判った。高緯度になるほど、開花所要日数が長くなり、47 日間～194 日間の幅があった。

引き続き、全ゲノム配列に基づく解析では以下の知見が得られた

ゲノムワイド関連解析 (GWAS) では、開花時期の早晚に関わる遺伝子の絞り込みにノイズが入ってしまい、解析方法に修正が必要になった。これについては、オース大学との共同研究者と修正作業を行っている。

とくに早咲きの系統と遅咲きの系統を選抜して、この二群間の全ゲノムを比較した結果、375 個の SNP が得られた。この中から遺伝子に存在するものを選抜した結果、22 SNP に絞り込んだ。このなかにはシロイヌナズナで開花抑制に関与する *EMF2* 遺伝子が含まれていた。その他には物質輸送に関わるトランスポーター遺伝子(2 個)、細胞骨格形成に関与する遺伝子(2 個)などが得られた。5 個の遺伝子は未同定のものであった。

E1 と *EMF2* の「遅咲き型」の遺伝子を早咲き系の Miyakojima MG-20 の個体に組み換えた「組み換え体」の作成を行った。これについては、様々な困難があったが、ようやく成功して、現在カルスの状態からようやく分化したところである。これについては経過観察をしている。

開花前個体の RNAseq は、最終データが 3 月末に得られたばかりで、現在、開花前に発現が急増する遺伝子を解析中である。

(2) ハマダイコン

日本国内におけるハマダイコンは、屋久島と種子島の間を境にして南北分化を起こしていた。分断分散解析では、この分化が約 2 万年前に起きたこと、南から北の方向に遺伝子流動が進んだことが明らかになった。この南北の分化は、生態ニッチモデルによって、年間最低気温が海岸部で 4 以下に下がるか、5 以上かによる境界にあたり、シロイヌナズナにおける春化処理の温度と一致していた。南から北への遺伝子流動が大きいのは、黒潮による種子散布が関与していると考察された。

屋久島以南のハマダイコンは、抽茎・開花に春化処理を必要とせず、発芽から開花まで平均で 52 日であった。その一方で北方系のハマダイコンに春化処理を施さないと 93 日間であり、開花に至らなかった個体も 30% ほど

であった。春化処理をした場合には、南の系統で 40 日程度に短縮する効果が見られ、北の系統では 50 日程度に大きく短縮の効果が見られた。このことから、南の系統では、抽茎開花に春化処理は必ずしも必要ではなく、低温に晒された場合には更に促進されること、北の系統では春化処理が必要であることが判った。

発現している RNA 量を比較定量する RT-PCR では、南系統では春化処理の有無に関わらず *FLC* と *FT* の発現が確認される一方で、北系統では、春化処理をした場合のみにおいて *FLC* と *FT* の発現が確認された。

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 5 件)

Han, Q., Higashi, H., Mitsui, Y., Setoguchi, H. 2016. Lineage isolation in the face of active gene flow in the coastal plant wild radish is reinforced by differentiated vernalisation responses. *BMC Evolutionary Biology* (in press)
DOI: 10.1186/s12862-016-0655-7

Ikeda, H., Sakaguchi, S., Yakubov, V., Barkalov, V., Setoguchi, H. 2015. Importance of demographic history for phylogeographic inference on the arctic-alpine plant *Phyllodoce caerulea* in East Asia. *Heredity* 116: 232-238.
DOI: 10.1038/hdy.2015.95

Han, Q., Higashi, H., Mitsui, Y., Setoguchi, H. 2015. Distinct phylogeographical structures of wild radish (*Raphanus sativus* L. var. *raphanistroides* Makino) in Japan. *PLOS ONE* 10(8): e0135132.
DOI: 10.1371/journal.pone.0135132

Ikeda, H., Yoneta, Y., Higashi, H., Eidesen, P.B., Barkalov, V., Yakubov, V., Brochmann, C., Setoguchi, H. 2015. Persistent history of the bird-dispersed arctic-alpine plant *Vaccinium vitis-idaea* (Ericaceae) in Japan. *Journal of Plant Research* 128: 437-444.
DOI: 10.1007/s10265-015-0709-8

Wakabayashi, T., Oh, H., Kawaguchi, M., Harada, K., Sato, S., Ikeda, H., Setoguchi, H. 2014. Polymorphisms of *E1* and *GIGANTEA* in wild populations of *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research* 127: 651-660.
DOI: 10.1007/s10265-014-0649-8

〔学会発表〕(計11件)

若林智美, 呉ハナ, 川口正代司, 原田久也, 瀬戸口浩彰, 日本国内のミヤコグサにおける開花関連遺伝子 *E1*, *GIGANTEA* の種内多型 日本植物学会第 77 大会, 北海道大学, 札幌, 9月13日~15日. 2013年

若林智美, 呉ハナ, 川口正代司, 原田久也, 佐藤修正, 池田啓, 瀬戸口浩彰, 日本国内のミヤコグサにおける開花関連遺伝子 *E1*, *GIGANTEA* の種内多型. 日本植物分類学会第 13 大会, 熊本大学, 熊本市, 3月20日~23日. 2014年

Setoguchi, H., Wakabayashi, T.

Differentiation of flowering time of *Lotus japonicus* wild accession.

植物のフェノーム解析による国際コロキウム, トヨタテクノミュージアム産業技術記念館, 豊田市, 2014年5月29日~30日

若林智美, 山篠貴史, 川口正代司, 瀬戸口浩彰, 国内のミヤコグサの開花期多様性への開花関連遺伝子 *E1*, *FT* の発現解析によるアプローチ. 日本植物学会第 78 大会, 明治大学, 生田, 9月11日~14日. 2014年.

Qingxiang Han, Hiroaki Setoguchi,

Phylogeography of wild radish (*Rhaphanus sativus* L.) based on cpDNA variation and SSR analyses. 日本植物学会第 78 大会, 明治大学, 生田, 9月11日~14日. 2014年

若林智美, Stig Andersen, 佐藤修正, 半田佳宏, 川口正代司, 瀬戸口浩彰, 全ゲノム配列を使った日本産ミヤコグサの開花時期多様性に関する遺伝的背景の比較 日本植物分類学会第 14 大会, 福島大学, 福島市, 3月5日~8日. 2015年

Qingxiang Han, Yuki Mitsui, Hiroyuki Higashi, Hiroaki Setoguchi. Contrasting Phylogeographic patterns and demographic history between mainland and Ryukyu Islands populations of wild radish in Japan.

若林智美, Stig Andersen, 佐藤修正, 川口正代司, 瀬戸口浩彰, 全ゲノム配列を使った日本産ミヤコグサの開花時期多様性に関する遺伝的背景の比較. 日本植物学会第 79 大会, 新潟市, 9月5日~8日. 2015年

池田啓, Lovisa Gustafson, Christian Brochmann, 瀬戸口浩彰, ミヤマタネツケバナ *Cardamine nipponica* の系統解析と PHYE の分子進化. P-025 日本植物学会第 79 大会, 新潟市, 9月5日~8日. 2015年.

Qingxiang Han, Hiroaki Setoguchi Lineage isolation in the face of active gene flow in the coastal plant wild radish is reinforced by differentiated vernalisation responses.

日本植物分類学会第 15 大会, 富山大学五福

キャンパス, 富山市, 3月5日~8日. 2016年
若林智美, Stig Andersen, 佐藤修正, 川口正代司, 瀬戸口浩彰, 全ゲノム配列を用いた、ミヤコグサの開花所要日数の種内多型に関する候補遺伝子の探索

日本植物分類学会第 15 大会, 富山大学五福キャンパス, 富山市, 3月5日~8日. 2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬戸口 浩彰 (SETOGUCHI, Hiroaki)
京都大学・人間・環境学研究所・教授
研究者番号: 70206647

(2) 研究分担者

川口 正代司 (KAWAGUCHI, Masayoshi)
自然科学研究機構・基礎生物学研究所・
教授
研究者番号: 30260508

池田 啓 (IKEDA, Hajime)
岡山大学・資源植物科学研究所・助教
研究者番号: 70580405