

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：34406

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24688004

研究課題名(和文) 四季咲き性の原因遺伝子からみた栽培バラの遺伝的多様性

研究課題名(英文) Genetic diversity of cultivated roses evaluated by a gene responsible for continuous-flowering character

研究代表者

河村 耕史 (Kawamura, Koji)

大阪工業大学・工学部・講師

研究者番号：00595613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,400,000円

研究成果の概要(和文)：栽培バラの多くは年中花を咲かせ続ける「四季咲き性」という性質を持っている。これは、野生種の多くが年に1度だけしか花を咲かせない「一季咲き性」であることと対照的である。栽培バラに四季咲き性をもたらした原因となった遺伝子の変異に着目し栽培バラの遺伝的多様性を調べた結果、モダンローズと呼ばれる栽培バラの四季咲き性は単一起源を持つことが示された。一方で、当該遺伝子の変異が無いにも関わらず、四季咲き性を持つバラが少数ながら存在することが分かり、新たな四季咲きバラを生み出すための貴重な遺伝子資源であることを示唆した。

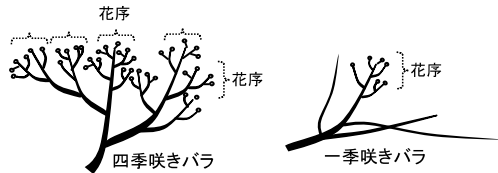
研究成果の概要(英文)：Modern cultivated roses flower continuously during all favorable seasons (i.e., continuous-flowering). In contrast, most wild species flower once per year (i.e., once-flowering). The continuous-flowering character resulted from a genetic mutation in KSN gene, a floral repressor. Genotyping of KSN gene for a wide range of modern cultivars shows the presence of the mutated allele in their genome, demonstrating that their continuous-flowering behavior has a single genetic origin. In contrast, a few wild species and old cultivars with continuous-flowering behaviors do not have any obvious mutations in KSN gene, indicating that they have a novel genetic origin of continuous-flowering behavior. These roses can be good breeding materials for a new continuous-flowering rose.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：四季咲き性 遺伝子資源 レトロトランスポゾン TERMINAL FLOWER 1 バラ属 自家不和合性 栽培化

1. 研究開始当初の背景

バラには「一季咲き性」と「四季咲き性」という開花様式がある。一季咲きバラは春先の一時期にのみ花芽分化をする。逆に、四季咲きバラは年中、花芽分化を繰り返す。ほとんどの野生バラが一季咲き性であるのに対し、現代の栽培バラの半数以上は四季咲き性である。



現代バラに四季咲き性をもたらしたのは、中国古来の栽培バラ、四季咲き性のコウシンバラとされている。コウシンバラは、野生種で一季咲き性のロサ・シネンシス・スポンタニアの突然変異個体が起源とされている(荻巣 2008「幻の植物を追って」)。交配実験によって栽培バラの四季咲き性は単一の劣性遺伝子座に支配された遺伝形質であることが70年代から知られていたが、その原因遺伝子は最近まで特定されていなかった。申請者は、世界に先駆けて、栽培バラに四季咲き性をもたらした突然変異を特定した(Iwata, Kawamura, Foucher et al. 2012. Plant J. 69: 116-125)。コウシンバラに因んで *KSN* と命名した遺伝子にトランスポゾンが挿入し、*KSN* の機能が欠損したことが原因であった。

2. 研究の目的

(1) 栽培バラに四季咲き性をもたらした突然変異が単一起源であるとの通説を検証する

中国のコウシンバラが18世紀にヨーロッパへ渡り、ヨーロッパ系統と交雑して、四季咲き性をもつ現代バラが誕生したとされている。したがって、現代の四季咲き栽培バラの大半は、トランスポゾンが挿入された *KSN* を持つことが予測される。これを、広範な栽培・野生バラの *KSN* の塩基配列を調べる方法で検証したい。また、コウシンバラの起源がロサ・シネンシス・スポンタニアであるとの説を検証するため、トランスポゾンが挿入されている *KSN* 遺伝子の配列と、最も近い配列を持つ野生種が同種かどうかを検証する。

(2) *KSN* 遺伝子に連鎖する S-locus の遺伝的多様性が低いかどうかを検証する

バラは自身の花粉では受精に至らない「自家不和合性」を持つ。この性質は、他のバラ科植物と同様、単一の遺伝子座「S-locus」によって制御されている。めしべの S 遺伝子

型と同じ S 遺伝子型を持つ花粉は、柱頭内の花粉管伸長が阻害され受精に至らないシステムである。

最近、研究協力者である Foucher 博士らは、S-locus と *KSN* が数 cM で近接に連鎖していることを明らかにした (Spiller, Foucher, et al. 2011. Ther. Appl. Genet. 122:489-500)。したがって、*KSN* と S-locus の間では組換えが起こりにくい。そのため、トランスポゾンが挿入された *KSN* 遺伝子の変異アレル *ksn'* と連鎖する S-locus は、*ksn'* への「ボトルネック効果」の影響を受け、遺伝的多様性が低いことが予測される。この仮説を検証する。

3. 研究の方法

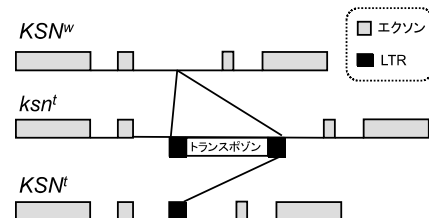
(1) 四季咲き性の突然変異が単一起源であるとの通説を検証する

栽培バラの分類体系をもとに材料種を選定する

栽培バラの品種数は1万以上あるが、系統的に近縁な品種を集めると、せいぜい30程度の系統に分類される (World Federation of Rose Societies)。この分類体系は、DNA マーカーを使った系統解析からも支持されており、起源となった野生種はわずか7-8種とされる (Matsumoto et al. 1998 Scientia Horticulturae)。各系統群から四季咲き性品種と一季咲き品種を1-2種ずつ選ぶ。原種とされている野生バラ(7-8種)と日本の野生種(十数種)も研究対象に加える。サンプル資料が得られ次第、随時、以下に述べる解析を進め、最終的に100種程度まで解析対象を広げる。

KSN 遺伝子へのトランスポゾン挿入の有無を調べる

PCR 法を使って *KSN* 遺伝子へのトランスポゾン挿入の有無を調べる。*KSN* 遺伝子には3つのタイプがこれまで知られている: トランスポゾンの挿入がない野生型 (*KSN^w*)、トランスポゾンの全長が挿入された変異型 (*ksn'*)、トランスポゾンの両端にある繰り返し配列 (LTR) の一端が残された変異型 (*KSN'*) である。



KSN 遺伝子はイントロンも含めて全長1kbp、トランスポゾンは全長9kbp、LTR部分は890bpである。トランスポゾンの長さは縮小表示。

トランスポゾンが挿入されているが、*ksn'* では遺伝子のスプライシングが阻害され mRNA の生成に至らない。しかし、LTR 間で相同組換えが起こり、*ksn'* が *KSN'* に変異すると、遺伝子の転写が回復する (Iwata, Kawamura, Foucher et al. 2012. Plant J. 69: 116-125) したがって、四季咲きバラは *ksn'* をホモで持ち、一季咲きバラは *KSN''* か *KSN'* を少なくとも一つ持つことが予測される。

(2) *KSN* 遺伝子と連鎖する S-locus の遺伝的多様性を調査する

トランスポゾンが挿入された *KSN* の変異アレル *ksn'* と連鎖している S-locus の遺伝的多様性が低いかどうかを検証する。S-locus に座乗し、めしべ側で自家不和合性を制御するのに必要な遺伝子、リボヌクレアーゼ (*S-RNase*) 遺伝子の配列を決定する方法で行う。開花中の花柱から mRNA を抽出・cDNA に逆転写した後、バラ科 *S-RNase* の保存領域に設計した縮合プライマーを使い、*S-RNase* の部分配列をクローニングする。*ksn'* をホモでもつ四季咲きバラと、*ksn'* を持たない一季咲きバラの間で、*S-RNase* の塩基配列の多様性を比較し、上記の検証を行う。

4. 研究成果

(1) 栽培バラに四季咲き性をもたらした突然変異が単一起源であるとの通説を検証する

2012年5月から11月にかけて、大阪市に位置する長居植物園で27種、中之島バラ園で23種、ひらかたパークで36種、浜寺公園で15種、そして、岐阜県の花フェスタ記念公園で89種、合計190種のバラを研究材料に選定し、若葉を数枚サンプリングし、以下に述べるDNA量の推定分析をしたのち、48種についてはさらに *KSN* 遺伝子型の分析を行った。

野生バラは一般的に2倍体であるが、それを交配して作出された栽培バラの中には倍数性(3倍体、4倍体、6倍体など)を持つものがある。2倍体のバラは *KSN* 遺伝子を2セット持っているのに対し、倍数体のバラは2セット以上の *KSN* 遺伝子を持っている。以下に述べる *KSN* 遺伝子の遺伝子型分析を行うにあたって、対象とするバラが何セットの *KSN* 遺伝子を持つかを知っておく必要がある。氷上に置いたシャーレに、バラの葉(できるだけ若い葉)を1.0~1.3gほどのせ、作成しておいた抽出バッファーを5~6ml加えて剃刀で素早く刻む。50mlファルコンチューブに40 μ m径のセルストレイナーをはめ、葉を刻んだシャーレの中の液体を濾過させる。濾過させた液体を300rcf、4で5分間遠心分離さ

せ、上澄み液を捨て500 μ lのバッファーに再懸濁する。懸濁液50 μ lを、DAPI液(1mg/mL)とバッファーを2対148で混合させた液体を150 μ lで染色させる。攪拌させた後、暗所4で5分間置いておいた後、フローサイトメーターで、DAPIの蛍光強度を記録する。分析は、はじめに1種類ずつサンプルを分析し、蛍光強度の絶対値を記録する。次いで、蛍光強度の値が重複しないペアを選んでサンプル(たとえば、AとB)を混合し、蛍光強度を測りなおす。二度目に測定した蛍光強度の絶対値を相対値に変換する。どちらか一方のサンプル(AまたはB)を別のサンプル(C)と混合し、再び蛍光強度を測定し、相対値化する。この作業を繰り返すことで、すべてのサンプルについて、蛍光強度の相対値化を行った。その結果、分析に供した190種のうち、最も、DAPI 蛍光強度の絶対値が小さかったシロバラハマナスの値を1とし、その他のバラの蛍光強度を相対値化した。相対蛍光強度が3.1~3.5のロサ・キネンシス(花フェスタ)、リトルホワイトベット(ひらかたパーク)、グリーンローズ(ひらかたパーク)、ザフェアリー(中之島バラ園)は、先行研究によって2倍体のバラであることが知られている。そのため、この値未満のバラ49種は2倍体品種であると推定された。一方、相対蛍光強度4.0のラフランス(中之島バラ園)、4.2のつるスーヴェニールドウラムメゾン(花フェスタ)、4.4のロサケンティフォリア(ひらかたパーク)などは、3倍体以上の倍数性を持つことが知られているため、この値以上のバラ約100種は倍数性を持つものと推定された。

次いで、*KSN* の遺伝子型を判定するためのPCR法を開発した:3つのプライマーF103(*KSN*の第二エクソン上)、R1(*KSN*の第四エクソン上)、InsR3(トランスポゾンのORF上)を使う方法である。F103 x R1の組み合わせでは、*KSN''* をもつならば614bp、*KSN'* をもつならば1455bpのPCR産物が得られることが期待される。一方、*ksn'* を持つ場合、F103 x InsR3の組み合わせにおいて、1307bpのPCR産物が得られることが期待された。

48種のバラについて、*KSN* 遺伝子型を決定するため、F103 x R1とF103 x InsR3の二通りの組み合わせでPCRを行い、PCR産物の有無とサイズを調べた。また、次の図に示すように、バンドの濃さが明瞭に異なったため、濃淡についても記録した。濃淡は遺伝子の数を反映していると考えられるためである。

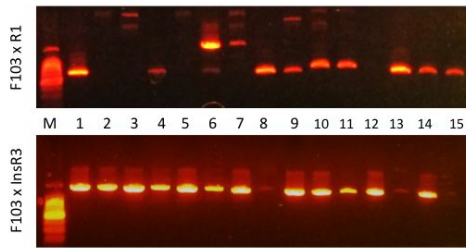


図. *KSN* 遺伝子型の PCR による判別例。

M: 100bp 分子マーカー、レーン 1: ジャックカルティエ、2: スプリングパル、3: スレイターズクリムゾンチャインア、4: チャンピオンオブザワールド、5: つるサマースノー、6: つるスーヴェニールデデュマルメゾン、7: ドルトムント、8: パークスイエローチャイナ、9: パフビューティー、10: 春風、11: バレリーナ、12: ピンクグルーテンドルスト、13: フォーチュンスタブルイエロー、14: ブラッシュノアゼット、15: プリンセスドナツウ (以上、すべて花フェスタ)。

解析した 48 種のうち、*KSN^{wt}* のみを持つバラは 7 種発見された。これらのバラは、正常な *KSN* 遺伝子を持つため、一季咲き性を持つことが予測された。しかし、予測に反して、アダムメゼリッヒとマーメイドは四季咲き性を持った。一方、*KSN^{wt}* を持たないバラは 11 種発見された。これらのバラは予測どおり四季咲き性を持ち、*ksn^f* のバンドが一樣に強く検出されており、*KSN* 遺伝子の機能が完全に欠損していると考えられた。

そして、*KSN^{wt}* と *ksn^f* を両方持っているバラが 29 種発見された。これらのバラでは、正常な *KSN* を持つため、2 倍体であれば一季咲きになると予測される。しかしながら、DNA 量の推定から 2 倍体と予測された 6 種はすべて、返り咲きもしくは四季咲き性を持つバラであった。このうち、コーネリア、ピンクグルーテンドルスト、ブラッシュノアゼット、ラマルクについては、11 月の時点で花芽を形成していることを確認しており、確かに一季咲き性ではなかった。*KSN^{wt}* と *ksn^f* を両方持っているバラのうち 3 倍体以上の倍数性をもつと予測されるバラは 21 種おり、これらの中には返り咲きもしくは四季咲き性とされる品種が 16 種含まれていた。

以上により、*KSN* 遺伝子型の分析から現代の四季咲き性栽培バラの大半は、コウシンバラに起源を持つことが実証された。一方で、コウシンバラとは起源の異なる四季咲き性を持つ可能性のある品種が少数ながら存在することも明らかになった。これらのバラは、ブルボン (B) 系、ハイブリッド・ムスク (HMsk) 系、ハイブリッド・ルゴーサ (HRg) 系、ハイブリッド・ブラクテータ (HBc) 系に、特に多く見られた。それぞれの系統について、交配履歴をたどると、コウシンバラとは異なる起源を持つと考えられる四季咲き

性のバラが存在することが分かった。B 系統ではオータムダマスク、HMsk 系統ではロサ・モスカータ、HRg 系統ではロサ・ルゴーサ (ハマナス)、HBc 系統ではロサ・ブラクテータ (カカヤンバラ) が交配の原種として記載されている四季咲きバラである。これらのバラは、ヨーロッパで古くから栽培されてきたオールドローズの 1 種か、日本列島の野生種であるため、中国のコウシンバラに由来する交雑種ではない。したがって、これらの原種バラにはコウシンバラとは起源の異なる四季咲き性をもたず遺伝子が存在する可能性が高いことが分かった。

(2) *KSN* 遺伝子と連鎖する S-locus の遺伝的多様性を調査する

バラの自家不和合性を制御する S-locus の遺伝子を特定するため、その他のバラ科植物で解明されている遺伝子情報をもとに候補遺伝子を探索し、検証を進めた。バラ科で自家不和合性を制御する S-locus の研究が進んでいるモモやリンゴ、アーモンドの研究によると、めしべで発現する S-RNase 遺伝子と、おしべで発現する F-box 遺伝子が自家不和合性を制御する遺伝子であることが分かっている。通常、S-locus には 1 つの S-RNase 遺伝子と複数の F-box 遺伝子が座乗している。

そこで、第一候補として、バラの花粉から抽出した mRNA から cDNA を合成し、花粉で特異的に発現している F-box 遺伝子を単離した (*SFB2*)。この遺伝子の遺伝子型の分離様式を交配集団内で調べ、また、遺伝的連鎖地図にマッピングする方法で、自家不和合性に関わる遺伝子かどうか、*KSN* と連鎖しているかどうかを検証した。その結果、*SFB2* が自家不和合性の制御に関わっていることを示す証拠は得られなかった。また、*KSN* とは異なる染色体に座乗していることも分かった。したがって、この遺伝子は S-locus に座乗する遺伝子ではないと考えられた。

次に、バラに近縁でゲノム情報が公開されているイチゴのデータベースを利用し、自家不和合性の制御に関わるめしべ側因子である S-RNase 遺伝子の単離を試みた。モモやリンゴなどで得られている S-RNase 遺伝子のアミノ酸配列を参考に、イチゴのゲノム上から候補遺伝子を探索した。その中には、*KSN* と同じ染色体に座乗する遺伝子が 2 つ見つかった。これらのバラホモログを単離し、遺伝的連鎖地図上にマッピングしたところ、予測どおり *KSN* と同じ染色体に座乗することが示された。これらの S-RNase 遺伝子をバラの S-locus の候補遺伝子とし、ゲノムウォーキング法を使って、周辺の塩基配列を解読した。

その結果、バラで単離した 2 つの S-RNase 遺伝子は 15kbp の範囲で互いに連鎖していること、また、同じ領域に花粉側因子と考えられる F-box 遺伝子が複数存在していることが分かった。以上の結果から、この 15kbp の領域がバラの自家不和合性を制御する S-locus である可能性が高いことが分かった。

現在、これらの候補遺伝子群について、めしべ、花粉における発現解析、ならびに、交配集団を使った遺伝子型の分離様式の調査から、自家不和合性を制御する遺伝子かどうかの検証をさらに進めている。同時に、目的 1) で KSN の遺伝子型を調べたバラについて、S-locus 候補遺伝子の遺伝子型を決定する作業を進めている。これらの結果をまとめ、*ksn'* に連鎖した S-locus の遺伝的多様性が低いかどうかを検証する予定である。

5 . 主な発表論文等 (研究代表者、連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Kawamura K, Hibrand-Saint Oyant L, Thouroude T, Jeauffre J, Foucher F (2015) Inheritance of garden rose architecture and its association with flowering behaviour. *Tree Genetics & Genomes* in press. DOI: 10.1007/s11295-015-0844-3

Otagaki S, Ogawa Y, Hibrand-Saint Oyant L, Foucher F, Kawamura K, Horibe T, Matsumoto S (2015) Genotype of *FLOWERING LOCUS T* homologue contributes to flowering time differences in wild and cultivated roses. *Plant Biology* in press. DOI: 10.1111/plb.12299

Horibe T, Yamada K, Otagaki S, Matsumoto S, Kawamura K (2015) Molecular genetic studies on the continuous-flowering roses that are not originated from *Rosa chinensis*. *Acta Horticulturae* 1064: 185-192.
http://www.actahort.org/books/1064/1064_21.htm

Yamazaki K, Nakatani K, Masumoto K, Kawamura K (2014) Slug caterpillars of *Parasa lepida* (Cramer, 1799) (Lepidoptera: Limacodidae) become stuck on rose prickles. *The Pan-Pacific Entomologist* 90: 221-225.
<http://dx.doi.org/10.3956/2014-90.4.221>

Djennane S, Hibrand-Saint Oyant L, Kawamura K, Lalanne D, Laffaire M, Thouroude T, Chalain S, Sakr S, Boumaza R, Foucher F, Leduc N (2014) Impacts of light and temperature on shoot branching gradient and expression of strigolactone synthesis and signalling genes in rose. *Plant, Cell & Environment* 37: 742-757.

DOI: 10.1111/pce.12191

Kawamura K, Hibrand-Saint Oyant L, Foucher F, Thouroude T, Loustau S (2014) Kernel methods for phenotyping complex plant architecture. *Journal of Theoretical Biology* 342: 83-92.
doi:10.1016/j.jtbi.2013.10.016

[学会発表](計 4 件)

小川裕佳子、河村耕史、松本省吾「早咲き・遅咲きバラと FT の遺伝子型」平成 24 年度園芸学会東海支部例会. 2012 年 8 月. 三重県農業研究所.

堀部貴紀、河村耕史、山田邦夫、太田垣駿吾、松本省吾「RoKSN 遺伝子へのレトロトランスポゾン挿入によらない新奇四季咲きバラ」平成 24 年度日本園芸学会秋季大会. 2012 年 9 月. 福井県立大学. 花 007.

Takanori HORIBE, Koji KAWAMURA, Kunio YAMADA, Syungo OTAGAKI, Shogo MATSUMOTO. Molecular Genetic studies on the continuous-flowering roses that are not originated from *Rosa chinensis*. Sixth International Symposium on Rose Research and Cultivation. 25th-30th August 2013.Hannover Congress Centrum, Germany.

小川裕佳子、河村耕史、太田垣駿吾、白武勝裕、松本省吾「バラ FT 遺伝子型による開花開始時期への影響」平成 25 年度日本園芸学会秋季大会. 2013 年 9 月. 岩手大学.

[その他]
ホームページの作成:

<https://sites.google.com/site/kjkawamura/rose>

6 . 研究組織

(1)研究代表者
河村 耕史 (Koji Kawamura)
大阪工業大学工学部環境工学科
講師 (研究者番号: 00595613)

(2)連携研究者
松本 省吾 (Shogo Matsumoto)
名古屋大学大学院生命農学研究科
教授 (研究者番号: 90241489)

上田 善弘 (Yoshihiro Ueda)
岐阜国際園芸アカデミー学長

岩田 光 (Hikaru Iwata)
NPO バラ文化研究所 一般会員

Fabrice Foucher
フランス国立農業研究所 (INRA)
主任研究員