

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻  
平成 23 年度博士課程入学

氏名 石森元幸  
指導教官名 河緒実之

論文題目 トルコギキョウのゲノム解析および八重咲き性原因遺伝子の解明

トルコギキョウ *Eustoma grandiflorum* はアメリカ中南部に自生するリンドウ科の花きである。平成 25 年の国内作付面積は切り花類品目別で第四位であった。その花色や花形は品種によって様々であり、花弁数が通常の花よりも多い『八重咲き性』の品種も数多く見られる。リンドウ科ではモデル植物が確立しておらず、遺伝子情報リソースや分子発生的な研究は極めて限られている。本研究ではトルコギキョウゲノムの解読と花器官アイデンティティ遺伝子の解析を通して、その分子進化遺伝学的特徴や花器形態形成機構の詳細を明らかにしようと試みた。

### 第 1 章 トルコギキョウのゲノム解析

長野野菜花き試験場から供試された八重咲き自殖系統‘620’のゲノム配列を、HiSeq 2000 シーケンサーにより読み取った。‘620’のゲノムサイズは約 1.45 Gb と推定された。これはシロイヌナズナゲノムの約 12 倍の大きさである。合計アセンブリ長は 1.05 Gb で、高度反復領域を除く、全ゲノムの 72.4%が解読されたと考えられる。アセンブリ中の 69.9%は反復配列であり、その過半は LTR 型レトロトランスポゾン (LTR-RT) であった。LTR-RT の主要なファミリーは *Copia* であり、多くの植物種ゲノムで優占的な *Gypsy* よりも広い領域を占めていた。また非 LTR-RT である LINE がゲノム中に占める割合も、過去にゲノム解読された植物種よりも高かった。ゲノム中の総遺伝子数は 38,660 個であった。この数はトマトやシロイヌナズナよりも多く、より冗長的に重複遺伝子を有していることが予期された。重複遺伝子間の分岐時間の推定から、過去に 2 回の特異的な全ゲノム重複 (WGD) が起きてい

ることが示唆された。一方、比較的最近に WGD を経験したダイズなどの種と比べると、その遺伝子冗長度は低かった。トルコギキョウでは同定された病害抵抗性遺伝子の数が少なく、特に NB-LRR 遺伝子の数はシロイヌナズナの半分以下であった。トルコギキョウの病害抵抗性遺伝子の多くはシソ類(リンドウ目, ナス目を含む真正キク類 I) の分岐後に獲得、もしくは多様化したものに由来していた。防御・抵抗性関連遺伝子とは対照的に、形態形成に関与する転写因子は遠縁種とも相同性を示し、より古い祖先種から保存されてきたと考えられる。花器官形成や開花に関連する遺伝子の比率は増加しており、トルコギキョウは花器形態の多様性に関わる遺伝子を進化の過程で蓄積させてきた可能性がある。

## 第2章 トルコギキョウの種内変異の解析

種内や近縁種内の遺伝的変異は、最も重要な遺伝子リソースである。同様に長野野菜花き試験場から供試された一重咲き自殖系統‘503’は、様々な生理生態形質が前章で使用した‘620’とは異なっている。本章では‘620’と‘503’ゲノムの比較解析を通して、トルコギキョウに潜在している遺伝的多様性の特徴の解明を試みた。‘503’のゲノムアセンブリ長 (1.03 Gb)、遺伝子数 (38,461) は共に‘620’と大差がなかった。また、反復配列の構成にも明確な差は見られなかった。よって二系統間には倍数性の違いなどの、ゲノムレベルの遺伝的変異が存在していないことが予期された。二系統から 1,976,927 個の SNPs/INDELs が見出され、‘503’ではその 90%以上がホモ接合で固定していた。変異の 54.2%は遺伝子間領域に位置していた。遺伝子機能に大きな影響を与えると予想された変異は全体の 0.1%の 2,769 箇所であった。二系統間で多様化が進んでいる遺伝子の多くは機能未知であり、レトロエレメント様の配列と相同性を有していた。一方、開花・花器官形成関連遺伝子や防御関連遺伝子にも多様性が存在していたことから、有用な遺伝的変異がより広範な系統に潜在している可能性が示唆された。また RAD シーケンシングによって遺伝子と密接に連鎖する遺伝的多型を簡便に検出できることが示され、大量の遺伝資源を解析する手法として有望であると考えられた。

## 第3章 トルコギキョウの MADS-box 転写因子ファミリーの解析

真正双子葉植物の花は、基本的に4つの花器官(がく片, 花弁, 雄ずい, 雌ずい)から

構成されている。花器官のアイデンティティは主に MADS-box 転写因子ファミリーに属する ABCDE という 5 つのクラスの遺伝子によって決定される。本章ではトルコギキョウの花において発現している MADS-box 遺伝子を同定し、その分子系統学的特徴や発現様式の解明を行った。トルコギキョウの花で発現が確認された 23 個の MADS-box 遺伝子のうち、18 遺伝子は ABCDE 遺伝子のホモログであった。分子系統樹解析に基づき、ほぼ全てのクレードで遺伝子重複が起きていたことが明らかになった。特に BCE 遺伝子には極めて相同性の高いホモログがそれぞれに見られたことから、比較的最近の遺伝子重複によって新しい遺伝子が誕生したと考えられる。ゲノム中には花から単離された遺伝子以外にも多数の MADS-box 遺伝子が存在しており、重複遺伝子の推定分岐年代は 15 MYA 付近に集中していた。したがって、WGD によってこれらの重複遺伝子が生じたことが示唆された。また 65 MYA にもリンドウ科植物に共通する可能性のある WGD の痕跡が残されていた。WGD 後に大部分の重複遺伝子は消失していった一方で、花器官のアイデンティティに関わる MADS-box 遺伝子は保持されてきたと考えられる。重複したホモログ間の発現パターンは、クレードによって保存的なものと多様化したものに分かれた。特に E クラス遺伝子では類似した発現パターンを示すホモログが少なく、機能の多様化が進んでいることが示唆された。一部の MADS-box 遺伝子は消失の渦中にある可能性があり、トルコギキョウゲノムの遺伝子構成は引き続き変化していく可能性がある。

#### 第 4 章 トルコギキョウの八重咲き花形成を制御する遺伝子の解析

様々な花きにおいて、多様な形態の『八重咲き性』品種が作出されている。雄ずいが花弁に転換し、花芽分裂組織の有限性が失われる『ホメオティック変異型』八重咲きの原因遺伝子は、C クラス MADS-box 遺伝子である。一方、雌雄ずいが正常な『ホール重複型』八重咲き花の形成機構は明らかではない。トルコギキョウの八重咲き花は雌雄ずいを有しており、『ホール重複型』である。本章ではトルコギキョウの八重咲き花の原因遺伝子を同定し、『ホール重複型』八重咲き花形成の分子機構の解明を試みた。まず八重咲き系統‘620’と一重咲き系統‘503’を交雑して  $F_1$ 、 $F_2$  を養成し、八重咲き性の遺伝性質を調べた。その結果、トルコギキョウの八重咲き性は半優性遺伝子座 ( $D$ ) により制御されることが示唆された。‘620’ ( $DD$  型) では最も外側の花弁ががく片化していたが、 $F_1$  ( $Dd$  型) ではがく片化が起こらず正常な八重咲きを呈した。次に八重咲き性原因遺伝子を同定するために、 $F_2$  個

体の DNA を‘八重’と‘一重’の 2 つのバルク別にして RAD シーケンシングを行った。D 遺伝子座と連鎖している遺伝子には、シロイヌナズナの花被形成に関与する A クラス遺伝子 *APETALA2* (*AP2*) のホモログが含まれていた。トルコギキョウゲノム配列中には 4 つの *AP2* ホモログ (*EgAP2a-d*) が存在し、D 遺伝子座と連鎖していたのは *EgAP2d* であった。

F<sub>2</sub> 個体の両親間の遺伝変異を調べたところ、八重咲き‘620’の *EgAP2d* では、microRNA172 (miR172) の結合モチーフに一塩基置換が起こっていた (miRNA 抵抗性変異)。miRNA 抵抗性変異は転写後抑制に影響を及ぼす場合があり、八重咲き花では *EgAP2d* タンパク質の発現量が増加している可能性がある。‘620’以外の複数の八重咲き品種にも同一の miR172 抵抗性変異が共通して存在しており、トルコギキョウの八重咲き品種は全て同一の変異に由来している可能性があった。一重咲き花では、*EgAP2d* は花芽原基や各花器官原基、花芽分裂組織で転写されていた。八重咲き花では、余分に複数の花器官ホールが形成された後も、花器官原基における転写が維持されていた。また、花弁と雄ずいのアイデンティティを規定する B クラス遺伝子の発現開始が、八重咲き花では遅延しており、その発現領域にも異常が見られた。雌雄ずいの形成と花芽分裂組織の終結に必要な C クラス遺伝子の発現開始も、八重咲き花では一重咲き花よりも遅くなっていた。miR172 抵抗性変異による *EgAP2d* の発現増大が、BC クラス遺伝子の発現遅延を引き起こし、花弁のがく片化や花芽分裂組織の有限性の部分的な喪失が起きたと考えられる。*EgAP2d* は BC クラス遺伝子の器官特異的なリプレッサーであり、miR172 は *AP2* 遺伝子を通して花芽分裂組織の維持に寄与し、花の有限性を規定する普遍的な役割を果たしているのだろう。

トルコギキョウの進化において、特異的な LTR-RT の増加、2 度の WGD が、ゲノム構造の変遷に大きな影響を及ぼした可能性が高く、現在の特徴的な遺伝子構成はその進化過程に起因すると考えられる。近縁種内には多様な遺伝的変異が存在しており、今後は生理生態学解析によって有用な変異を同定していく必要がある。トルコギキョウには花器官のアイデンティティに関わる MADS-box 転写因子のように多くの重複遺伝子があり、これらの遺伝子の機能的な多様化が花器官の形態形成に寄与しているのかもしれない。トルコギキョウの八重咲き花形成には miR172-*AP2* 経路が関与しており、その分子機構は植物種を超えて保存されている可能性が示唆される。