

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	木 下 有 羽
論文題目	Studies on the floral regulatory mechanism in a non-flowering cabbage mutant that spontaneously reacquires flowering ability (偶発的な開花復帰性をもつ非開花性キャベツ変異体の開花制御機構に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>キャベツ (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>) は植物体春化型の植物であり、一定以上の大きさに成長した苗が低温遭遇することにより花芽分化する。1978年にキャベツ母本‘T15’の採種圃場で非開花性変異体として発見された‘nfc’は、他のキャベツ品種が100%開花する花成誘導条件下ではほとんど開花しないが、主茎基部から発生した側枝が春に偶発的に開花することが明らかとなっている。本論文は、この‘nfc’の非開花性メカニズムおよび偶発的な開花の原因を明らかにすることで、春化による植物の開花制御メカニズムを検討したものであり、次の3章からなっている。</p> <p>第1章では、‘nfc’を‘T15’とともに3年間にわたり秋から春にかけて露地栽培し、開花特性を調査した。その結果、‘T15’はいずれの年も100%開花したのに対して、‘nfc’は一部の個体で少数の側枝が開花するのみで、主枝の頂芽はいずれも栄養成長を続けることを確認した。また、‘nfc’の側枝の開花は‘T15’と比較して遅れた。次に、‘nfc’がキメラ植物ではないかと考え、葉肉組織からプロトプラストを単離して個体再生させ、12のプロトプラスト系統について開花特性を調査したところ、5つのプロトプラスト系統において開花個体と非開花個体の両方が出現したことから、‘nfc’の開花がキメラ性に起因するという仮説は否定された。加えて、‘nfc’の開花は植物体サイズや年次ごとの平均気温の推移でも説明できないことを示した。</p> <p>第2章では、‘nfc’の非開花性を担う候補遺伝子の特定を行った。ダイコンへの接ぎ木によって人為的に開花させた‘nfc’を、類縁関係が異なる<i>B. oleracea</i>の3品種と交雑し、F₂集団を作成した。各F₂集団の開花調査を行って、早く開花したEarly-bulk、非開花個体を含む遅く開花したLate-bulkを用いてQTL-seq解析を行った。その結果、2つの交雑組み合わせのF₂集団において、第9染色体51 Mb付近にΔ SNP-indexのピークが検出された。このゲノム領域が開花の早晩に関与するQTLであることを確認後、ファインマッピングによって、‘TO1000’のリファレンスゲノムの第9染色体約1.3 Mbに対応する領域にQTL領域を絞り込んだ。この領域に座乗する241遺伝子のうちシロイヌナズナの開花時期関連遺伝子のホモログは4つ検出されたが、この4遺伝子のコーディング配列は‘T15’、‘nfc’間で同一だった。そこで、RNA-seq解析を行ったところ、4遺伝子のうち2遺伝子が2品種間で発現変動していることが明らかになったことから、この2遺伝子を非開花性の原因候補遺伝子として特定した。</p> <p>これらの2遺伝子は、ともにMADS-box転写因子をコードする花成抑制遺伝子FLOWERING LOCUS C (FLC) のホモログ<i>BoFLC1</i>であり、レファレンスゲノム上では17.5 kb離れてタンデムに並んでおり、それぞれ<i>BoFLC1a</i>、<i>BoFLC1b</i>と命名した。<i>BoFLC1b</i>は既報で花成抑制機能が証明されている<i>BoFLC1</i>と同一のアミノ酸配列を有していた。<i>BoFLC1a</i>からは3つのアイソフォームが発現しており、そのうち1つは<i>BoFLC1</i>とほぼ同一のアミノ酸立体構造を持つことが推定され、花成抑制機能があると考えられた。また、発現解析の結果から‘T15’およびキャベツ固定品種である‘W1’では<i>BoFLC1a</i>、<i>BoFLC1b</i>の発現量が10月から1月にかけて徐々に低下する一方で、‘nfc’では初期の発現量が高く、さらに低温遭遇によって低下せず、<i>BoFT</i>の発現量も4月にほとんど増加しないことを確認した。これらの結果から、<i>BoFLC1a</i>および<i>BoFLC1b</i>の高発現がともに‘nfc’の非開花性に寄与している可能性が高いと考えられた。また、これら2遺伝子の高発現は近傍の共通のシス変異に起因するのではないかと考察した。しかし、Illuminaショートリードを用いた配列比較の結果からは、こ</p>			

れら2遺伝子およびその前後100 kbにおいてホモ接合のゲノム多型は存在しなかった。

第3章では、‘nfc’の開花特性の準安定的な遺伝性および可逆性に関する解析を行った。‘nfc’の開花特性がエピアレルに制御されている可能性を考え、‘nfc’、‘nfc’プロトプラスト再生個体の開花個体および接ぎ木で人為的に開花させた‘nfc’の自殖後代（それぞれnfcV1-3、nfcP1-4、nfcG1）を得、それらの開花特性を調査してその遺伝様式がエピアレルの特性と合致するかを検証した。その結果、nfcG1は概ね‘nfc’の非開花性を維持していた一方で、nfcV1-3およびnfcP1-4では約90%が開花したことから、低温に応答して開花した個体は開花能力を再獲得しており、その開花能力が後代にも準安定的に遺伝することを示した。一方で、残りの10%は非開花に戻ったことから、開花から非開花への可逆性が認められた。また、nfcV1-3、nfcP1-4の開花日や開花シュート数には親と後代系統の中央値との間で正の相関がみられた。以上より、‘nfc’の開花はエピアレルに制御されていると考えられた。さらに、本研究期間中にも‘T15’の中から非開花個体が出現したことから、‘T15’と‘nfc’の開花特性の違いは、エピジェネティック状態の違いのみに起因すると考えられた。また、*BoFLC1a*および*BoFLC1b*の発現量はともに系統ごとに異なっており、‘nfc’自殖後代の開花特性と有意に相関したことから、*BoFLC1a*および*BoFLC1b*が‘nfc’の開花/非開花を制御するエピアレルであると考えられた。

本論文では、接ぎ木花成誘導法を利用して‘nfc’を強制的に開花させ、F₂集団を作成し、マッピング解析を行うことにより‘nfc’の非開花性を担うQTLの特定に成功している。また、‘nfc’の非開花性が*BoFLC1a*および*BoFLC1b*の恒常的な高発現に起因している可能性を示した。さらに、‘nfc’の偶発的な開花は、エピアレルの可逆性を持った遺伝様式に起因すると考えられ、*BoFLC1a*および*BoFLC1b*の発現量が開花特性と相関したことから、両遺伝子がエピアレル化していることが示唆された。加えて、‘nfc’の不開花性は継世代エピジェネティクスの反応を示すことが示唆された。以上のとおり、本研究の成果はアブラナ科作物の開花特性の多様化に貢献するとともに、春化に関するエピアレルの特性について新知見を与えるものである。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、キャベツ (*Brassica oleracea* var. *capitata*) 育種母本 ‘T15’ より生じた非開花性変異体の ‘nfc’ を用いて、その非開花性のメカニズムおよび偶発的な開花の原因を明らかにすることで、春化による植物の開花制御メカニズムを検討したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. ‘nfc’ を ‘T15’ とともに3年間露地栽培して開花特性を調査し、‘T15’ が100%開花する条件下でも ‘nfc’ は一部の個体で少数の側枝が開花するのみで、主枝の頂芽はいずれも栄養成長を続けることを明らかにした。また、プロトプラスト系統の開花特性調査の結果から、‘nfc’ の開花がキメラ性に起因するものでないことを示した。
2. ダイコンへの接ぎ木によって ‘nfc’ を人為的に開花させることにより、他の *B. oleracea* の品種と交雑して F₂ 集団の作成に成功し、‘nfc’ の非開花性を担う候補遺伝子の特定を試みたところ、‘TO1000’ のリファレンスゲノムの第9染色体、51 Mb 付近の約 1.3 Mb に QTL 領域を絞り込むことができ、この領域に座乗する4つの開花時期関連遺伝子を検出した。それらのコーディング配列は ‘T15’、‘nfc’ 間で同一であるものの、RNA-seq の結果から発現変動する2遺伝子を非開花性の原因候補遺伝子として特定し、*BoFLC1a*、*BoFLC1b* と命名した。
3. これら2遺伝子は、ともに MADS-box 転写因子をコードする花成抑制遺伝子 *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) のホモログ *BoFLC1* であり、タンデムに並んでいること、花成抑制機能が証明されている *BoFLC1* と同一または類似のアミノ酸立体構造を有すること、‘nfc’ では初期の発現量が高く、さらに低温遭遇によって低下しないことを明らかにし、これら2遺伝子の高発現がともに ‘nfc’ の非開花性に寄与しているとした。
4. 低温遭遇後に開花した ‘nfc’ 個体、‘nfc’ プロトプラスト系統の開花個体、および接ぎ木で人為的に開花させた ‘nfc’ から自殖後代を得、その遺伝様式がエピアレルの特性と合致することを明らかにした。すなわち、偶発的に ‘nfc’ が獲得した開花能力は、後代にも準安定的に遺伝する一方で、開花から非開花への可逆性が認められることを示した。これらより、‘nfc’ の開花はエピアレルに制御されており、‘T15’ と ‘nfc’ の開花特性の違いは、エピジェネティック状態の違いのみに起因すると考えられ、*BoFLC1a* および *BoFLC1b* が ‘nfc’ の開花/非開花を制御するエピアレルであるとした。

以上のように、本論文は、キャベツ ‘nfc’ の非開花性を担う QTL を特定し、そこに座乗する2つの遺伝子がエピアレル化して恒常的に高発現することが非開花の原因であることを明らかにし、‘nfc’ の偶発的な開花はエピアレルが有する可逆性に起因することを示した。また、非開花性が継世代エピジェネティクスの反応を示すことを示唆しており、本論文は蔬菜花卉園芸学、植物繁殖学、植物開花生理学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和5年2月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)