

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14849

研究課題名(和文) 組織層構造特異的または花芽分化時期特異的な遺伝子発現制御による葉色改変技術の開発

研究課題名(英文) Development of technology for leaf color-alteration by the control of gene expression using tissue layer- or floral differentiation period-specific promoter

研究代表者

鈴木 栄 (suzuki, sakae)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：80397017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、周縁キメラのような部分的な葉色変化、または花芽分化時期特異的な葉色変化を誘導する遺伝子組換え技術の開発について研究を行った。  
モデル植物のタバコにおいて、2つの葉組織特異的プロモーター(*AtPIP2;1*および*AtIAMT1*)と、アントシニン生合成経路の転写因子(*Atpap1*遺伝子)またはカロテノイド生合成経路の抑制遺伝子(*NtPDS-RNAi*)を組み合わせ導入した結果、葉脈を特異的に赤色または白色に改変することができ、その形質は後代にも遺伝することが明らかとなった。一方、栄養成長期から生殖成長期への移行時期(花芽分化時期特異的)に、葉色を変化させることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we try to develop a technology for leaf color-alteration by the control of gene expression using tissue layer- or floral differentiation period-specific promoter.  
In the Tobacco plants, when the vectors of a combination with *AtPIP2;1* or *AtIAMT1* promoter and *Atpap1* or *NtPDS-RNAi* gene were introduced, the color of leaf vein in transgenic plants was changed to red (*Atpap1*) or white (*NtPDS-RNAi*). Furthermore, the same results were observed in the plants of self-pollinated progenies. When the vectors of a combination with *AtFT* promoter and *Atpap1* gene were introduced, in contrast, no color-alteration was observed in transgenic plants.

研究分野：園芸学

キーワード：葉色改変 組織特異的 アントシアニン カロテノイド 花芽分化 キメラ

### 1. 研究開始当初の背景

観賞用園芸作物において、花と同様に葉の色や形も観賞価値に大きく影響する重要な形質である。近年、多彩な葉色をおもな観賞対象とする草本・木本性園芸作物が、カラーリーフプランツとよばれ高い需要を得ている。このような多彩な葉色形質を、花に高い観賞価値をもつ園芸作物にも導入できれば、さらに多様化を促進できる。また、生育ステージの進行に伴い葉色に変化する形質は、これまででない観賞価値の多様化や向上をもたらすことができると考えられる。

多種多様な色相や模様を示す葉色変化は、クロロフィル(緑色)やフラボノイド・カロテノイド色素(赤～黄色)が全面または一部に存在することにより表現されている。また、斑入りや部分的な葉色変化は、それらの植物色素合成と、トランスポゾン、細胞内小器官ゲノムの組織別の変異、細胞質遺伝(母性遺伝)、周縁・区分キメラ化などが複雑に関与するとされている。その中でも、安定した表現型を示す例の多い周縁キメラは、L1～L3の各組織層ごとに異なる核または細胞内小器官ゲノム情報を持つことが知られている。一方、多くの植物において生殖細胞の由来は L2 層であることも知られている。すなわち、L1 や L3 のキメラ化等を起源とする多様な葉色変化形質は、後代への遺伝が不安定なため計画的な交配育種への利用が困難であると考えられている。

### 2. 研究の目的

本申請課題では以下の項目について、モデル植物のタバコおよびゼラニウムを用いて遺伝子組換え技術により目標達成を目指した(最終目標の概念図: 図1)。

- ・周縁キメラ等を起源とする葉色変化に類似した形質(部分的な葉色変化)を、全細胞の核ゲノムにコードされるような安定して後代に遺伝する形質として確立できるかを明らかにする。
- ・栄養成長期から生殖成長期への移行時期(花芽分化時期特異的)に葉色に変化する、新たな葉色形質を確立できるかを明らかにする。
- ・各種プロモーター(全身高発現, L1 層特異的, FT 遺伝子) と、差分的 RNAi 制御法(申請者考案)を組み合わせ、フラボノイド・カロテノイド合成を促進・抑制することにより、上記目標が達成できるかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、以下の項目について検証を行った。

(1) シロイヌナズナ由来の3種類の L1 層特異的プロモーター、シロイヌナズナまたはタバコ由来の FT 遺伝子プロモーターで制御したレポーター遺伝子(GUS・GFP)を、タバコおよびゼラニウムに導入し、発現組織を

確認する。

(2) 各種プロモーター(全身高発現, L1 層特異的, FT 遺伝子) と、差分的 RNAi 制御法を組み合わせ、葉のフラボノイド・カロテノイド合成を部分的に促進・抑制することにより、葉色変化や花芽分化時期特異的な葉色変化が誘導できるかを検証する。また、形質転換体の後代についても、表現型が維持されるかを調査する。

図1 <葉色変化に適用(最終目標の例)>



### 4. 研究成果

#### (1) 形質転換用遺伝子の単離とベクター作成

L1層特異的プロモーターの単離: シロイヌナズナなどの報告をもとに、当初の計画より候補プロモーターを増やし、合計8つの配列郡をクローニングした。当初計画の AtML, AtFDH, AtHDG5に加え、新たに AtSUC2(シヨ糖輸送関連遺伝子), AtMTK1(Yang サイクル関連遺伝子(エチレン合成), AtCYCD3;2(維管束・葉基部・細胞分裂周期特異的), AtPIP2;1(アクアポリンタンパク質関連遺伝子), AtIAMT1(インドール酢酸変換関連遺伝子)を追加した。それぞれ2-3 Kbpの長さの配列をプロモーター領域とし、フラボノイド転写調節遺伝子(Atpap1)の発現制御、またはカロテノイド合成遺伝子(フィトエン不飽和化酵素:NtPDS)の RNAi 発現抑制のベクターを構築した。

花芽分化時期特異的プロモーターの単離: 3または4 kbpのシロイヌナズナ由来の FT 遺伝子のプロモーター領域(AtFTp)を単離し、Atpap1を結合し発現制御ベクターを構築した。

## (2) タバコにおける部分的な葉色改変

アクアポリンタンパク質関連遺伝子の *AtPIP2;1* プロモーター (2.5Kbp) およびインドール酢酸変換関連遺伝子の *AtIAMT1* プロモーター (2.7Kbp) を用いた場合に、葉脈のみが赤色に変化した形質転換体が得られた (図 2-1)。これらの形質転換体の花弁下部の白色部分は、赤色化する傾向があった (図 2-2)。また、この2つのプロモーターで *NtPDS* の RNAi 発現抑制を行ったところ、葉脈のみが白色に変化した形質転換体が得られた (図 3-1)。これらの形質転換体の花色は、非形質転換体とほとんど差がみられなかった (図 3-2)。さらに、これらの系統の自殖後代でも同様の表現型となり、導入形質が次世代に遺伝していることが確認された。



図 2-1



図 3-1

## (3) タバコにおける花芽分化時期特異的な葉色改変

3 または 4 kbp の *AtFTp* で制御した *Atpap1* をタバコへ導入したが、葉色に変化した系統は得られなかった。自殖後代についても同様の結果となった。本研究では、*AtFT* プロモーターを利用した葉色の改変に至らなかったが、その原因のひとつとして、プロモーター活性の弱さが考えられる。今後は、プロモーター領域の延長や転写効率化配列の付加などにより、プロモーター活性を向上することで改善できると考えられる。



図 2-2



図 3-2

## (4) ゼラニウムにおける葉色改変

タバコにおいて効果的だった *AtPIP2;1* および *AtIAMT1* プロモーターを中心に、形質転換体の作出を試みたが、最終的に形質転換体を得ることができなかった。葉脈特異的なプロモーターに加え、比較対象として過剰発現用プロモーターの *35Sp* も利用した結果、それぞれについて、緑色のカルス (図 4-1)、赤色のカルス (図 4-2) を得ることができたが、再分化に至らなかった。この原因として、*Atpap1* 遺伝子により合成されたアントシアニンが、ゼラニウムの再分化を阻害していることが予想される。今後は、他の生合成遺伝子やゼラニウム以外の園芸作物において、本手法を適用することが望ましいと考えられる。

## (5) まとめ

本研究では、モデル植物のタバコにおいて、葉脈を特異的に赤色または白色に改変することができ、その形質は後代にも遺伝することが明らかとなった。一方、栄養成長期から生殖成長期への移行時期 (花芽分化時期特異的) に、葉色を変化させることはできなかった。

本研究が、これまでにない観賞価値を持つ園芸作物の作出方法の開発につながることを期待する。



図 4-1

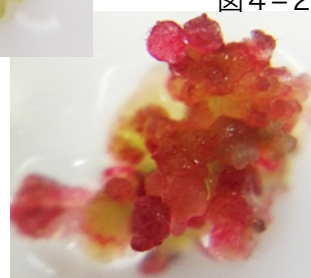


図 4-2

## 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)

[学会発表] (計 5 件)

1. 山本佳穂, 倉持由衣, 松崎光伯, 鈴木 栄  
カロテノイド生合成遺伝子または花成関連遺伝子プロモーターを用いたタバコにおける花卉特異的な花色改変  
2018. 園学研. (Hort. Res. (Japan)) (別) 1:230. 園芸学会, 2018年, 3月24-25日, 近畿大学農学部 (奈良県奈良市中町).

2. 菅野又ますみ, 久永悠生, 有江 力, 鈴木 栄  
機能性植物色素の蓄積を目的としたタバコおよびトマトへのフラボノイド・カロテノイド生合成関連遺伝子の導入  
2018. 園学研. (Hort. Res. (Japan)) (別) 1:359. 園芸学会, 2018年, 3月24-25日, 近畿大学農学部 (奈良県奈良市中町).

3. 伊藤莉沙, 鈴木 栄  
トレニア由来 TfMYB1 遺伝子の過剰発現によるタバコの花色および葉色の改変  
2017. 園学研. (Hort. Res. (Japan)) (別) 2:286. 園芸学会, 2017年, 9月2-4日, 酪農学園大学 (北海道江別市).

4. 江部百合子, 鈴木 栄  
全身発現性プロモーターおよび緑色組織特異的プロモーターを用いた差別的 RNAi 法によるタバコの花色改変  
2016. 園学研. (Hort. Res. (Japan)) (別) 2:497. 園芸学会, 2016年, 9月10-12日, 名城大学天白キャンパス (名古屋市天白区).

5. 小嶋紗英香, 中野 優, 鈴木 栄  
ホトトギス属植物 (*Tricyrtis sp.*) における再分化系確立と花色改変に向けたカロテノイド生合成遺伝子の導入  
2016. 日本植物細胞分子生物学会 上田大会. p162. 日本植物細胞分子生物学会, 2016年, 9月1-3日, 信州大学繊維学部 (長野県上田市).

[その他]

ホームページ等

[http://web.tuat.ac.jp/~engei/2013dong\\_jing\\_nong\\_gong\\_da\\_yuan\\_yun\\_yan\\_jiu\\_shi\\_%28ling\\_mu%29/yan\\_jiuno\\_gai\\_yao2013.html](http://web.tuat.ac.jp/~engei/2013dong_jing_nong_gong_da_yuan_yun_yan_jiu_shi_%28ling_mu%29/yan_jiuno_gai_yao2013.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 栄 (SUZUKI, Sakae)

東京農工大学・大学院農学研究院・講師

研究者番号: 80397017

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

伊藤 莉沙 (ITO, Risa)

江部 百合子 (EBE, Yuriko)

小嶋 紗英香 (KOZIMA, Saeka)

菅野又 ますみ (SUGANOMATA, Masumi)

山本 佳穂 (YAMAMOTO, Kaho)