

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05631

研究課題名(和文) ラベンダーの精油生産におけるモノテルペン化合物生産ネットワークの解析

研究課題名(英文) Analysis of monoterpene producing-network in Lavandula

研究代表者

津呂 正人 (Tsuru, Masato)

名城大学・農学部・教授

研究者番号：40410774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラベンダーにおけるモノテルペン化合物生産調節因子の解明を目的とし、主成分の生産酵素遺伝子ノックダウン個体における精油成分の解析を行うとともに、F2集団を用いた遺伝解析を行った。主成分の一つである1,8-シネオールについて、合成酵素遺伝子(CINS)ノックダウン個体は、1,8-シネオールの生産のみが著しく抑制され、他の精油成分の生産に影響を及ぼさないことが示唆されたが、F2集団を用いた精油成分の生産量に関する遺伝解析では、各成分について明確なQTLを明らかにすることができず、複数の因子が精油の生産性に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物から発散される香りは複数の化合物で構成されることが多く、それら化合物の成分比によって独特の香調が決まる。そのため、成分比を改変することで香調は変化させることができると考えられるが、芳香性化合物の生産量を調節する因子が明らかとなっていない。本研究の結果は香りを構成する化合物の種類により生産比の大きな改変の可能性が異なることを示唆しており、今後さらなる解析を進めることで植物の香りの育種が可能となることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the factors regulating monoterpene compound-production in Lavandula, analysis of essential oil compound in both knock-down plant for major monoterpene compound and in F2 population were conducted.

In RNAi analysis targeted the gene for 1,8-cineole synthase (CINS), the transgenic individuals only significantly suppressed the production of 1,8-cineole and did not affect the production of other essential oil components. On the other hand, clear QTLs controlling for monoterpene production were not detected in genetic analysis on F2 population. These results suggested that two types of genes regulate monoterpene production, the one is one gene solely control monoterpene production such as CINS, the other is a numerous genes weakly confer for those production.

研究分野：園芸学

キーワード：ラベンダー 精油 モノテルペン ノックダウン QTL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の香りはひとつの化合物によってもたらされることは殆どなく、複数の化合物が一定の組成比で生成されることにより、特徴的な香調を醸成する。すなわち、香りを構成する化合物の組成比が変化すれば、香調は大きく変化し、「香りが変わった」と認識できる。当研究室ではラベンダー精油の香調改変を目的として、精油の主成分であるリモネン、ゲラニオールおよびリナロール合成酵素遺伝子を強発現させた形質転換体、および、リナロール合成酵素遺伝子をノックダウンした形質転換体を作成したが、形質転換体では標的化合物のみならず他の化合物の生産量も同様に増加あるいは減少し、結果として香りの強弱は見られるものの香調に変化が認められなかったことを明らかにしている。このことは、精油を構成する主成分は組成比を維持するためにネットワークを形成し、生産量を調節していることを示唆している。一方で、ガンマ線照射によって酢酸リナリルのみ生産抑制された個体が得られ、他の精油成分の生産比が増加していたり、一部の精油成分の生産が欠損した個体を当該化合物について生産が認められる交配したときに得られた後代において、当該成分を含め多様な成分比の個体が得られたりするため、到底ネットワーク調節されているとは思えない現象も認められる。そのため、これら化合物の生産量を調節する因子を明らかにすることができれば、より容易に香調改変することが可能になると考えられたため、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、ラベンダーを材料とし主要な精油成分であるモノテルペン化合物について、組成比を維持する機構(モノテルペンネットワーク)を調節する因子の解明と維持対象化合物の同定およびモノテルペンネットワーク非依存型化合物の同定と生産量調節因子の解明を目的とし、主要なモノテルペン化合物合成酵素遺伝子の発現を著しく抑制したノックダウン個体の作出と精油生産量の解析および精油成分比の異なる個体の交雑から得られる F2 分離集団を用いた遺伝連鎖地図に基づく主要精油成分生産量の QTL 解析を行った。

3. 研究の方法

1) RNAi による 1,8-シネオール合成酵素遺伝子およびボルネオール脱水素酵素遺伝子(カンファー合成酵素遺伝子)発現抑制個体の作出と葉および花穂の精油成分分析

モノテルペンネットワーク非依存型化合物の同定を行うため、ラベンダーが生産する主要モノテルペンの一つである 1,8-シネオールの合成酵素遺伝子(CINS)およびカンファーの合成酵素遺伝子(ボルネオール脱水素酵素遺伝子: BDHS)を標的とした RNAi 誘導型ベクターを作成し、ラベンダー種間雑種のラバンジン葉由来カルスに導入し、再分化個体を作成した。得られた個体の葉から RNA を抽出してリアルタイム PCR により標的遺伝子の発現量を比較するとともに、精油成分を抽出し GC で分析した。RNAi 誘導型 CINS 導入個体で 1,8-シネオールの生産が著しく抑制されている個体では、花穂でも同様に CINS 発現量の比較および精油成分の解析を行った。

2) F2 集団を用いた分子連鎖地図の作成とモノテルペン化合物の生産量に関する QTL 解析

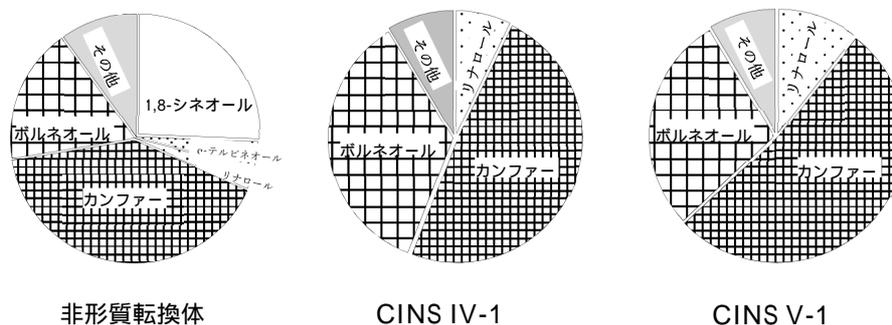
花穂の精油組成が異なる 2 品種「濃紫 3 号」(紫花)と「エレガンス・アイス」(白色花)を交雑し、得られた F2 集団を材料として AFLP および当研究室が開発したゲノム由来 SSR マーカーさらには Adal et al. (2015)が開発した EST 由来 SSR マーカーを用いて多型解析を行い、JoinMAP3.0 を用いて分子連鎖地図を作製した。他方、F2 各個体の花穂を水蒸気蒸留して精油を抽出し、GC を用いて各精油成分量を分析した。得られた各個体の精油成分データをもとに MapQTL3.0 を用いて QTL 解析を行った。

4. 研究成果

1) RNAi による 1,8-シネオール合成酵素遺伝子およびボルネオール脱水素酵素遺伝子(カンファー合成酵素遺伝子)発現抑制個体の作出と葉および花穂の精油成分分析

RNAi 誘導型 CINS 導入個体が 12 個体得られ、そのうち 2 個体(CINS IV-1 および CINS V-1)で葉の精油成分のうち 1,8-シネオールの生産が著しく抑制されていた。これらの個体では他の精

油成分の著しい減少は認められず、1,8-シネオールのみ生産が抑制されていた。結果として精油組成の大きな変化が認められ、香調が変化していた（第1図）。これら個体では花穂の精油も同



第1図．1,8-シネオールの生産が抑制された形質転換体における葉精油成分の組成比

様に1,8-シネオールのみ生産の著しい抑制が認められ、既報で明らかとしたリナロール(LINS)、ゲラニオール(GERS)あるいはリモネン(LIMS)合成酵素遺伝子導入個体でみられる標的成分と他の精油成分との生産の同調性が見られず、ネットワーク非依存型化合物であることが明らかとなった。

また、RNAi 誘導型 BDHS 導入個体が5個体得られ、葉の精油成分について解析したところ、いずれの個体もカンファールの生産抑制が認められたが、他の精油成分についても同様に生産量が低下しており、標的成分と同調性が認められた（第1表）。これらのことからカンファールはネットワーク依存型化合物であることが推察された。

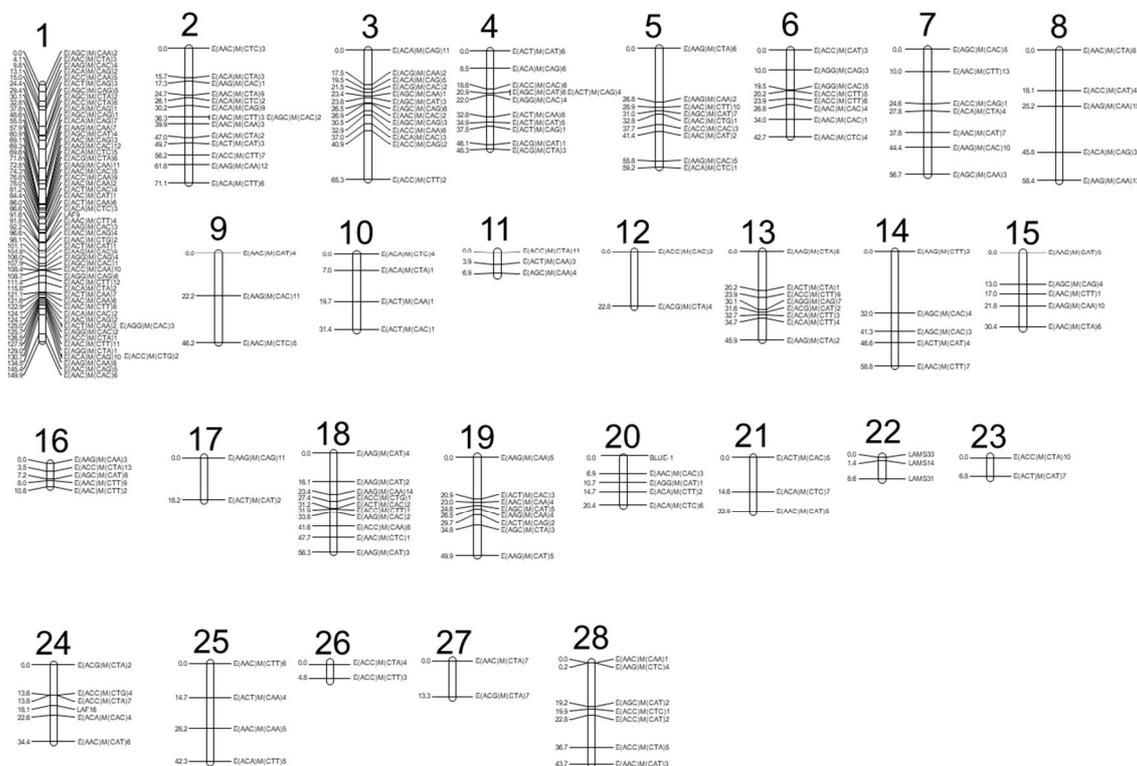
第1表 RNAi 誘導型 BDHS 遺伝子を導入した形質転換体葉の精油成分

精油成分	葉の精油成分量(μg/g F.W.)					
	非形質転換体	BDHS142-1	BDHS142-2	BDHS142-3	BDHS301	BDHS579
-ピネン	89.68	29.27	50.48	40.27	N.D.	44.12
カンフェン	50.34	N.D.	31.67	22.13	N.D.	22.56
-ピネン	73.36	21.79	41.92	29.3	N.D.	33.71
3-カネン	63.25	29.4	33.83	44.89	N.D.	44.78
リモネン	78.91	21.87	37.31	33.47	N.D.	33.9
1,8-シネオール	1417.3	340.55	898.94	601.39	N.D.	720.94
リナロール	127.02	N.D.	N.D.	42.46	N.D.	31.84
カンファール	836.21	247.21	536.71	457.72	29.51	553.4
ボルネオール	468.48	97.06	247.83	149.95	16.3	196.05
-テルピネオール	85.46	25.41	49.83	38.07	N.D.	48.82
-カリオフィレン	45.19	22.34	47.51	37.63	N.D.	34.22
計	3335.2	834.9	1976.03	1497.28	45.81	1764.34

2) F2 集団を用いた分子連鎖地図の作成とモノテルペン化合物の生産量に関する QTL 解析

「濃紫3号」と「エレガンス・アイス」を交雑して得られたF1を自殖して得られたF2 92個体を多型解析したところ、AFLP マーカーが205個、ゲノム由来 SSR マーカーが3個、EST 由来 SSR マーカーが2個および青色の花形質について1個の計211個が座乗し、28連鎖群からなる分子連鎖地図と構築できた。全長は1126.4cM、マーカー間の平均距離は40.22cMであった（第2図）。

F2 92個体の花穂をGC分析し、QTL解析を行った結果、カンフェン、ボルネオール、-テルピネオール、ネロール、酢酸リナリル、酢酸ラバンジュリル、酢酸ネリル、酢酸ゲラニルおよび-カリオフィレンの9成分でLOD値が3.0を超えるQTLが検出された。カンフェンとボルネオールではQTLが重複している領域があり、2成分がともに二環性モノテルペンで複環の形成もしくは生産に共通性の高い遺伝子の支配が考えられた（第2表）。酢酸リナリル、酢酸ラバンジュリルおよび酢酸ネリルでも同様にQTLの重複がみられ、アセチル化には一部共通の因子が関与していると考えられた（第3表）。また、ネロールおよび-カリオフィレンは多数のQTLが検出され、複数のQTLが生産量を支配していると考えられた（第4表）。さらに、-テルピネオールおよび酢酸ゲラニルは他の成分と比較してLODピークが低く比較的寄与率が低いと考えられた（第5表）。このことから修飾基や構造の類似性によりQTLが重複することが明らかになり、共通の因子が関与することが示唆された。しかしながら、各成分について、多数のQTLが認められ、かつ連鎖群全体で高いLOD値を示すなど、各成分の生産性を明確に支配する因子を特定することができず、精油の生産性は極めて複雑に調節されていることが明らかとなった。



第2図. 「濃紫3号」 x 「エレガンス・アイス」 F2 集団における分子連鎖地図

第2表 カンフェンおよびボルネオールのQTL.

精油成分	連鎖群	QTL領域(cM)	LODピーク
カンフェン	8	0.0~40.2	5.14
	15	全長	8.77
	16	全長	7.52
	17	全長	5.34
ボルネオール	11	全長	7.16
	15	全長	7.93
	16	全長	8.26
	17	全長	4.96
	18	46.6~56.3	6.50
	25	42.3付近	3.19

第3表 酢酸リナリル, 酢酸ラバンジュリルおよび酢酸ネリルのQTL.

精油成分	連鎖群	QTL領域(cM)	LODピーク
酢酸リナリル	1	9.1~13.0	7.76
		29.4~30.1	5.83
		42.8~48.6	4.44
	18	46.6~56.3	4.68
酢酸ラバンジュリル	1	0.0~24.4	7.06
		52.8~57.9	6.46
	8	10.0~58.4	5.13
	11	全長	6.12
	14	全長	6.66
	16	全長	4.29
	19	0.0~15.8	4.90
	25	全長	4.45
	8	0.0~30.3	4.37
	11	全長	5.08
酢酸ネリル	14	41.3~46.6	4.50
	17	全長	5.83
	23	全長	4.69

第4表 ネロールおよび -カリオフィレンのQTL.

精油成分	連鎖群	QTL領域(cM)	LODピーク
ネロール	1	42.8~60.9	6.89
	9	42.2~46.2	3.41
	15	5.0~30.4	5.03
	16	3.5~8.0	3.53
-カリオフィレン	1	124.1~127.9	3.84
	2	71.1付近	3.23
	8	25.2~30.2	3.29
	12	全長	3.55
	20	全長	3.83

第5表 -テルピネオールおよび酢酸ゲラニルのQTL.

精油成分	連鎖群	QTL領域(cM)	LODピーク
-テルピネオール	1	42.8~60.9	3.94
	5	41.1~46.2	3.33
酢酸ゲラニル	5	15.0~28.8	3.35
		41.1~46.4	3.20

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 津呂正人・竹内晶子	4. 巻 54
2. 論文標題 子房および胚珠培養を利用した観賞用ストックとアブラナ科数種との雑種個体作出の試み	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 名城大学農学部学術報告	6. 最初と最後の頁 17-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takino Hiroki, Furuya Misako, Sakuma Atsuko, Yamamoto Sumiko, Hirano Saki, Tsuru Masato, Yanagimoto Tatsuya, Tanaka Yoshikazu, Mino Masanobu	4. 巻 93
2. 論文標題 The siRNAs targeting the left or right terminal region of chrysanthemum stunt viroid (CSVd) sequence suppress the development of disease symptoms caused by CSVd infection of chrysanthemum, but do not suppress viroid propagation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Horticultural Science and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 491 ~ 499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14620316.2017.1402668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuru Masato, Tomomatsu Kohki, Inukai Chihiro, Tujii Shiho, Asada Satoshi	4. 巻 55
2. 論文標題 RNAi targeting the gene for 1,8-cineole synthase induces recombination of leaf essential oil in lavandin (<i>Lavandula x intermedia</i> Emeric)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant	6. 最初と最後の頁 165 ~ 171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11627-018-09949-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 津呂正人・坂口瑠菜・友松航基・阿部洋司・浅田怜志
2. 発表標題 精油の生産が著しく抑制されたラバンジン葉の特徴
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津呂正人・犬飼千裕・友松航基・浅田怜志
2. 発表標題 1,8-シネオールの生産を抑制したラバンジン形質転換体の作出
3. 学会等名 園芸学会平成30年度秋季大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

品種出願公表 ラベンダー 「ブルーキャッスル」

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------