

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15829

研究課題名(和文)デルフィニウム花色の濃淡を生み出す機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the regulation mechanism of flower color intensity in Delphinium

研究代表者

宮原 平 (Miyahara, Taira)

千葉大学・大学院園芸学研究科・講師

研究者番号：90720889

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)：デルフィニウムにおけるアントシアニン合成関連遺伝子群の変動と花色の濃淡の関連性を包括的に調査し、生産現場における遺伝的要因および環境要因による花色の変化について、花色濃淡が生み出される機構を明らかにすることを目的とした。遺伝的要因による花色変化では、フラボノール合成酵素遺伝子とアントシアニン合成酵素遺伝子の発現の強弱により花色が大きく異なることが示された。また、環境要因による花色変化ではアントシアニン構造自体に変化はなく、アントシアニン代謝経路全体の遺伝子発現を制御している転写調節因子が温度条件により発現変動することで、アントシアニン合成量を制御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

これまでの多くの花色研究では遺伝的に異なる品種や遺伝的背景が不明な品種を比較対象とした解析を行っており、研究対象としている色素合成に関与する遺伝子以外に花色に関連する因子の有無が不明であった。本研究では、同じ親から得られたF2個体群や同一品種における花色変化の原因をトランスクリプトーム解析により包括的に調査することで、発現に変動がみられる遺伝子を真に花色に影響を与える因子として特定した。本研究のように遺伝的背景が明確な個体を使用した解析結果を基礎として、さらに様々な比較解析を行うことで、初めてその原因遺伝子等の因子を特定することが可能であるため、本研究の学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to comprehensively investigate the relationship between changes in the enzyme genes involved in anthocyanin biosynthesis and flower color intensity in Delphinium. To clarify, the mechanism of flower color intensity produces changes in flower color due to genetic factors and environmental factors at the production site. The difference in flower color due to genetic factors has occurred that the flower color differs greatly depending on the expression strength of the flavonol synthase gene and the anthocyanin synthase gene. In addition, the changes in flower color due to environmental factors showed the anthocyanin molecular structures were the same in both different flower colors. The transcriptional factor controls gene expression in the entire anthocyanin metabolic pathway changes in expression depending on temperature conditions, thereby regulating anthocyanin synthesis.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：デルフィニウム 花色 濃淡 アントシアニン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

さまざまな植物種が有する花色は、構造の異なるアントシアニン分子種による基本色とその蓄積量により多様な色彩を呈している。糖や有機酸により修飾されたアントシアニンは液胞内で折りたたまれた構造をとることで色合いに深みを帯びることが知られている<sup>(1)</sup>。このため、アントシアニン構造は、蓄積量とともに花色の決定に重要な要素である。また、共存する蓄積物により花色が変化することも知られている。このように、これまでの花色の研究から、花色の濃淡には酵素遺伝子の発現や蓄積物など複数の因子が関与していることが示唆されている<sup>(2)</sup>。

多くの花色研究では、特定の因子をコードする単一の遺伝子についての機能解明の研究が主である。対象とする遺伝子に変異が入ることにより、不連続的な濃淡（赤色になるか白色になるかなど）が発生し、その両者を比較解析することで機能同定が行われている。一方で、実際の生産現場における濃淡は連続的なもの（白から赤まで様々な色合いなど）である。現状では、この連続性がどのように生み出されているのかは調べられていない。この連続的な濃淡は [1] 交配や生育環境の変化による遺伝子発現変動による影響、[2] 交配やスプライシングバリエーションなどの変異による酵素の基質特異性の変化がもたらす代謝変動による影響を推察している。さらに、[3] アントシアニン構造の変化および共存物質（コピグメント物質）による分子内・分子間相互作用からなる色調変調作用の影響も考えられる。そこで本研究では上記 3 点がどのように複合的に花色の濃淡（量と質）に影響を与えているのかを解明する。本申請研究で材料とするデルフィニウムは青い花として有名な園芸植物であり、様々なバリエーションの花色がある。これらの品種は商品として遺伝的に固定化された濃淡であるが、昨今の夏場の異常な高温により花色が本来の色から大きく退色することがある。このように、花色は生理条件という内的要因と環境条件という外的要因により、同じ品種であっても花色が変調することが経験的に知られている。この問題は商品としてのデルフィニウムの品質や評価を大きく損ねており早急に原因を突き止めるべき課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、アントシアニン合成関連遺伝子群の変動と花色の濃淡の関連性を包括的に明らかにすることを目的とする。計画している方法は、濃淡に差のある品種を交配して得られた F<sub>1</sub> 個体を自殖して得られた F<sub>2</sub> 個体をサンプルとして使用する。F<sub>2</sub> 世代では花色の濃淡に差のあるものが多数得られるため、次世代シーケンス解析によるトランスクリプトーム解析を行う。これにより、各品種内の関連遺伝子群の発現量と塩基配列を網羅的に調査する。さらに塩基配列に変異が確認されたものはその組換え酵素活性測定を行う。またアントシアニンを含む蓄積物の蓄積量（量的要因）と構造（質的要因）を確認し、花色に与える影響を調べる。同様に高温生育時の花色減退が確認された個体についても解析を行う。これにより、交配による内的要因と環境による外的要因の双方による花色変化について、花色の濃淡に影響を与える因子群を総括する

### 3. 研究の方法

#### 【遺伝的要因による花色変化についての解析】

植物材料：

赤色の原種である *Delphinium nudicaule* と黄色原種である *D. luteum* を交配させたデルフィニウム品種の F<sub>2</sub> 個体群の萼片を用いた。使用した花色は、赤紫、赤、オレンジ、黄色の四種類である。

#### 【環境要因による花色変化についての解析】

植物材料：株式会社ヨシから提供されたプラチナーブルー品種を対象として、6月に採花した個体(PB1)、3月に採花した個体(PB2)の2系統を使用した。

#### 【共通実験方法】

萼片からの色素抽出：

凍結保存した萼に 80%メタノール+0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 溶液を 300 μL 加え、スパチュラを用いて萼を破碎した。15,000 rpm、4°C、3 分の遠心後、上清を回収した。D.W.で平衡化した Insert Sep Slim-J C18 カラムにサンプル抽出液 300 μL を滅菌水に溶かしたものを流した。10 mL の D.W. によりカラムを wash した後に、80% メタノール+ 0.1% TFA 溶液 5 mL を用いて色素を回収した。抽出した色素はロータリーエバポレーターにて乾固させ、色素解析を行うまで、-20°C にて保管した。

アントシアニンの酸加水分解：

乾固している色素抽出物に 80% メタノール+0.1% TFA 溶液を 100 μL 加え溶解させた。溶解したサンプル 50 μL をエッペンチューブに移し、6N HCl 300 μL を加え、十分にボルテックスした。その後、100°C、30 分インキュベートした。その後、氷上で冷却した。イソアミルアルコール 200 μL (または 100 μL) を加え、ボルテックスし有機層に色素を移動させ、有機層を回収し、ロータリーエバポレーターにてイソアミルアルコールを完全に蒸発させた。その後、HPLC によ

り解析を行なった。

HPLC の条件：

色素抽出後、-20°C 保管していた色素を 100 µL の 80%メタノール+0.1% TFA 溶液に溶解し、色素解析用のサンプルとして調整した。HPLC 溶媒は A 液に 1.5% リン酸、B 液にメタノールを使用し、流速 1.2 mL/min、oven 40°C の条件で、B 液が 20-80% の濃度勾配で 20 分間のリニアグラジエントとなるメソッドで分離した。尚、アントシアニン検出の際には 520 nm、フラボノール検出の際には 350 nm の吸光度で測定した。酸加水分解後のアントシアニジンの分離では、溶媒、流速および吸光度は上記と同様で、B 液が 40-100% の濃度勾配で 15 分間のリニアグラジエントとなるメソッドを使用した。

RNA 抽出：

Total RNA の抽出は一花分の萼片サンプル、約 0.1 g を乳鉢乳棒を用いて液体窒素中で破碎し、Plant Total RNA Mini Kit (FAVORGEN) を用いてプロトコルに従って抽出した。

トランスクリプトームデータの解析：

次世代シーケンシングサービスから納品されたデータは、はじめに Fastp v0.20.1 により、クオリティの向上、アダプター配列の除去、および 50 bp 以下の配列長のリード除去を行なった。処理後のクオリティの確認は、FastQC v0.11.9 により行なった。Fastp 後のリードは、Trinity v2.11.0 を使用してアセンブルを行なった。アセンブルの評価は、gVolante (<https://gvolante.riken.jp/>) の BUSCO v2 を使用した。得られたコンティグ配列から、冗長的なアイソフォームや、アミノ酸配列が 100 残基以下になってしまう短い配列を除去するため、Trinity に付属しているスクリプトである、align\_and\_estimate\_abundance.pl および filter\_low\_expr\_transcripts.pl を行い、はじめにすべての個体において発現量の正規化された指標である、Transcript per million (TPM) が 1 に満たない配列を除去した。次に CD-HIT v4.8.1 を使用して、コンティグ間で 95% 以上の相同性がある配列を統合した。最後に、Transdecoder v5.5.0 を使用して、open reading frame (ORF) 領域を推定したのちに、アミノ酸配列が 100 残基以下となるコンティグ配列を除去した。これらの操作ののちに得られたコンティグ配列を使用して、マッピングを行なった。マッピングでは RSEM v1.3.3 を使用した。また、作成したコンティグ配列は、Uniprot データベースを対象として blastp によりアノテーション情報を付加した。

Blast 検索：

アントシアニン合成・修飾に関わる遺伝子配列の探索および個体間での発現量の比較のため、blast+ v2.11.0 を使用して、tblastn 検索により相同遺伝子配列を抽出した。検索では、論文として報告されている対象とする遺伝子のアミノ酸配列をクエリーとして、e-value が 1.0e-100 以下となる配列を抽出した。結果では、e-value が 0.0 となるものがあれば、その配列を目的遺伝子の相同配列とした。一方で、e-value が 1.0e-100 以下のものを相同遺伝子とした。E-value が 1.0e-100 以下のものが存在しなかった場合には、transdecoder によるアノテーション情報から該当アミノ酸配列の探索を行なった。また、候補配列が複数ある場合には、それらのアミノ酸配列を fasta 形式でまとめて、MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/>) にて、アライメントおよび系統樹を作成して、候補配列の絞り込みを行なった。候補配列のアミノ酸配列への変換では、transdecoder の結果や ExpASy translate (<https://web.expasy.org/translate/>) を使用した。

#### 4. 研究成果

【遺伝的要因による花色変化についての解析】

4 色のそれぞれの個体に蓄積しているアントシアニンについて Table 1 に示す。赤紫個体のみデルフィニジンを基本骨格とするアントシアニンが蓄積していることが示された。また、赤紫個体とオレンジ個体はアントシアニンの基本骨格の違いだけで、その修飾形態は似たものが蓄積していた。一方で、赤個体はアントシアニンの修飾が 3 位のみ構造だけしか蓄積しておらず、黄色個体ではアントシアニンは蓄積していないことがわかった。4 個体から得られたトランスクリプトームデータを統合してアセンブルを行い、コンティグ配列を得た。その結果、平均コンティグ長 1,620 bp、アセンブルの指標である BUSCO は 82.6% のデータが得られた。また、アセンブル後のコンティグ数は 78,678 配列であったが、精製後 29,078 配列まで冗長的な配列を除去することができた。この配列を使用して、アントシアニン合成関連遺伝子の探索や発現変動遺伝子の探索を行なった。各個体でのアントシアニジン合成までの各酵素遺伝子の発現量について Fig.1 に示す。赤紫個体では唯一デルフィニジンを合成する必須酵素である F3'5'H 遺伝子が発現していることが示されており、蓄積しているアントシアニン構造の結果を支持する結果であった。また、黄色個体では、アントシアニン合成に必須である DFR と ANS の発現が他の個体と比較して顕著に低下しており、この結果、アントシアニンの合成が阻害されていることが示された。また、フラボノールを合成する FLS は他の個体と同レベルで発現していることから、フラボノールの合成が活発であることが考えられた。赤個体ではこの FLS の発現が抑制されており、このため、アントシアニン合成が活発に行われていることが示された。オレンジ個体では FLS と DFR、ANS の発現がともに高く、フラボノール合成とアントシアニン合成が競合している状態にあることがわかった。このため、アントシアニンとフラボノールがともに蓄積するためにオレンジ色を呈することが考えられた。赤紫個体では、オレンジ個体と同様に FLS と DFR、ANS の発現がともに高いが、合成されるアントシアニンは青みを帯びているデルフィニジンで

あるため、青みと黄色が混ざり合った独特な花色が生まれていることが考えられた。さらに、アントシアニン修飾経路の各個体での遺伝子発現について Fig. 2 に示す。黄色個体ではアントシアニンが合成されていないにもかかわらず、一部のアントシアニン修飾酵素遺伝子の発現が検出されていた。同様に赤色個体では蓄積しているアントシアニン構造は 7 位の配糖化以降の修飾がされていない構造であったが、それらの修飾を担う酵素遺伝子の発現が認められていた。アントシアニンの 7 位への修飾反応にはドナーとしてアシルグルコースが使われることが知られているが、そのアシルグルコースを合成する際に必要な配糖化酵素である pHBAGT の発現は赤色個体や黄色個体では検出されていることから、各個体でのアントシアニン 7 位の修飾移行の修飾酵素が働かない原因は不明である。

【環境要因による花色変化についての解析】

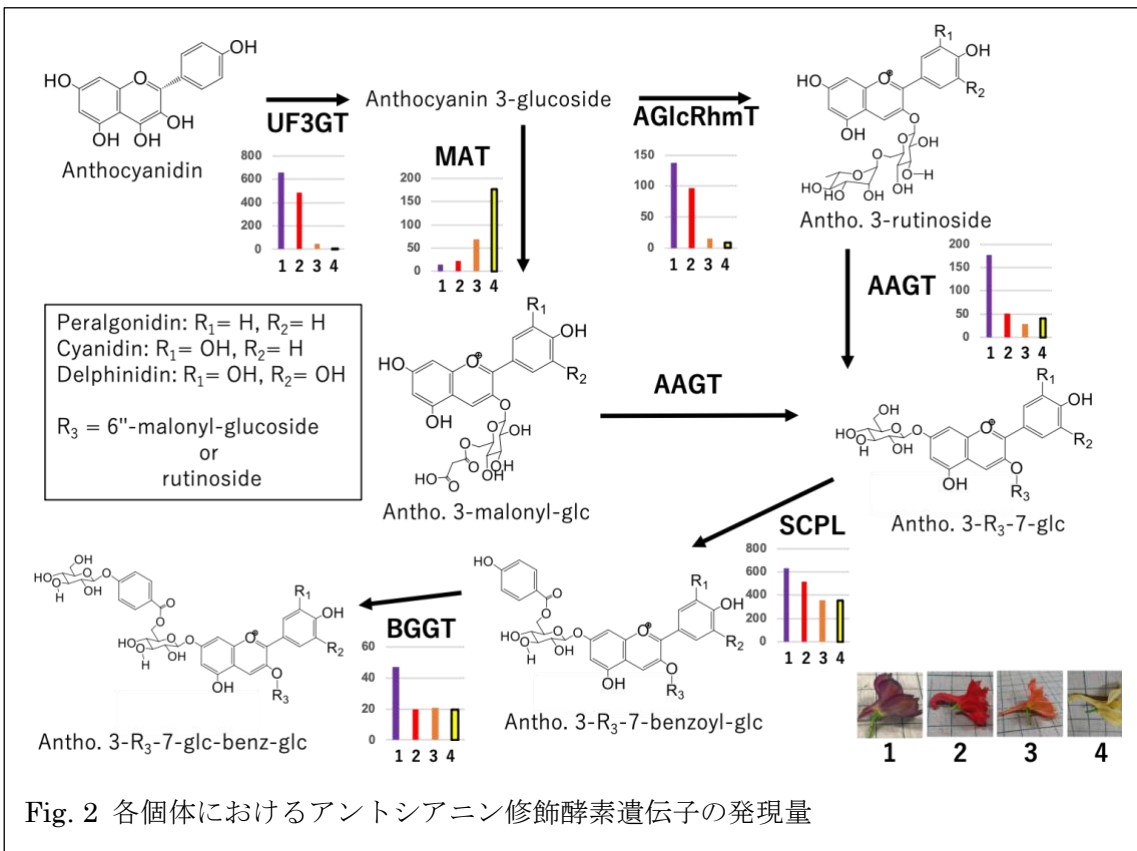
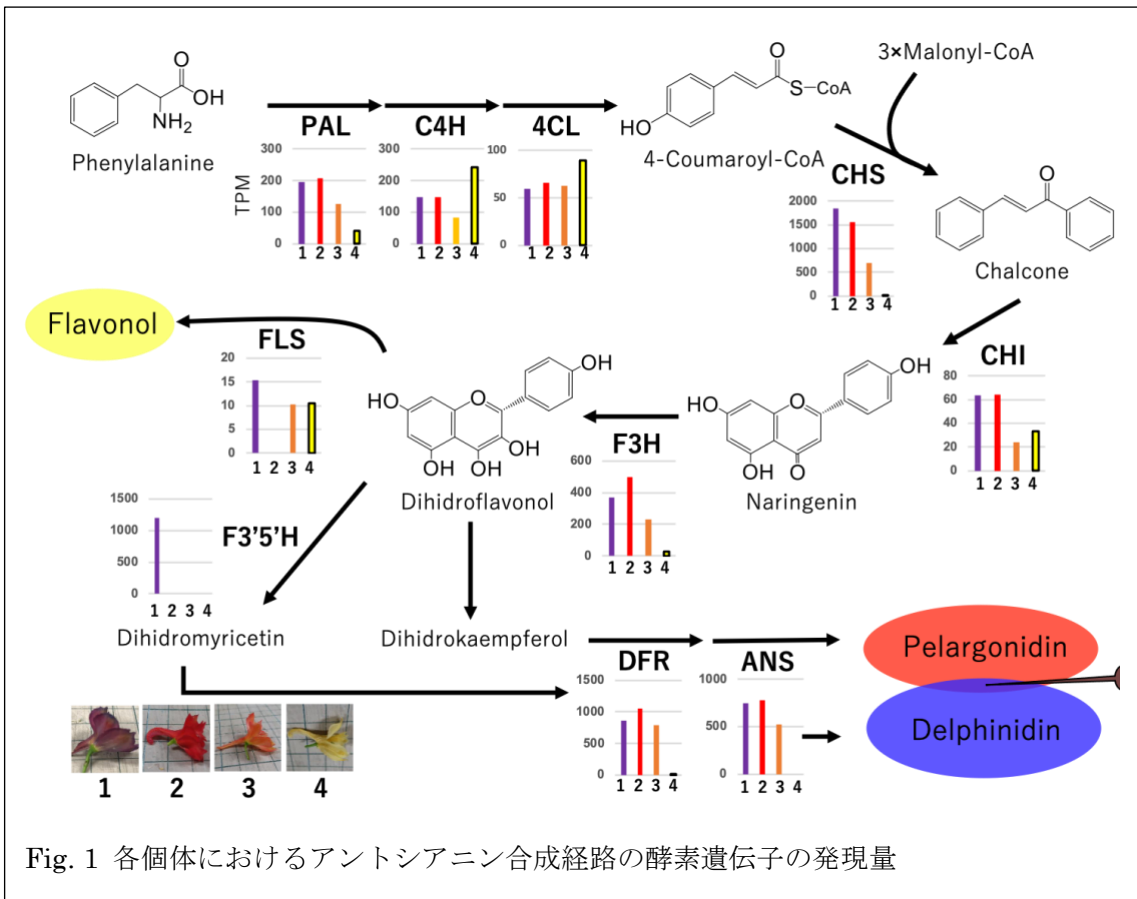
6 月採花の個体 (PB1) と 3 月採花の個体 (PB2) では、RHS CC のカラーチャートによる色調は 101A と 106C であった。明らかに PB2 の個体では花色が薄く、同一の品種でありながら採花する季節によって花色が変化する原因は不明であった。色素解析の結果から、蓄積しているアントシアニン構造はビオルデルフィンとシアノデルフィンであり、ビオルデルフィンの蓄積量は両者に大きな違いはないものの、シアノデルフィンの蓄積量は PB1 の方が PB2 よりも 10 倍近く多く、この違いがそのまま蓄積しているアントシアニン量の差となって、花色の違いが生み出されていることが示された。2 個体から得られたトランスクリプトームデータを統合してアセンブルを行い、コンティグ配列を得た。その結果、平均コンティグ長 1,843 bp、アセンブルの指標である BUSCO は 89.17% のデータが得られた。また、アセンブル後のコンティグ数は 155,382 配列であったが、精製後 26,900 配列まで冗長的な配列を除去することができた。この配列を使用して、アントシアニン合成関連遺伝子の探索や発現変動遺伝子の探索を行なった。PB1 と PB2 ではアントシアニン合成・修飾に関わる遺伝子群の多くが、PB1 よりも PB2 で発現が低下しており、特にアントシアニン合成の後期に関与する酵素遺伝子で発現量の差が顕著であることが示された。このため、転写調節因子についても発現量を調査した結果、MYB や bHLH の発現量が低下していることが示された。特に MYB は温度条件や日照条件の違いにより、下流遺伝子の発現調節をすることが知られているため、今後さらに解析を進める予定である。

<引用文献>

- (1) Dangles et al., *Phytochemistry*. (1993) 34: 119-124.
- (2) Nishizaki et al., *Plant Cell* (2013) 25: 4150-4165.

Table 1 各個体の色調および色素構造

個体番号	花色 (RHS CC)	蓄積しているアントシアニン構造
03N-12	赤紫 (61A)	Delphinidin 3-rutinoside-7-glucosyl-benzoyl-glucoside
03N-15	赤紫 (61A)	Delphinidin 3-malonyl-glucoside-7- glucosyl-benzoyl-glucoside
		Pelargonidin 3-rutinoside-7-benzoyl-glucoside
05N-05	赤 (44B)	Pelargonidin 3-rutinoside
		Pelargonidin 3-malonyl-glucoside
		Pelargonidin 3-neohesperidoside
05N-21	オレンジ (33A)	Pelargonidin 3-rutinoside-7-glucoside
05N-22	オレンジ (33B)	Pelargonidin 3-(6-malonylglucoside)-7-glucoside
05N-34	オレンジ (33B)	Pelargonidin 3-rutinoside-7-(6- <i>p</i> -hydroxybenzoyl)-glucoside
		Pelargonidin 3,7-diglucoside <i>p</i> -hydroxybenzoate
		Pelargonidin 3,7-diglucoside malonate <i>p</i> -hydroxybenzoate
05N-42	黄色 (10A)	アントシアニンの蓄積なし
05N-56	黄色 (12B)	
05N-61	黄色 (11A)	



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sakaguchi Kimitoshi, Isobe Chisato, Fujita Kazuyoshi, Ozeki Yoshihiro, Miyahara Taira	4. 巻 88
2. 論文標題 Production of Novel Red-purple Delphinium Flowers Containing Cyanidin-based Anthocyanin Using Hybridization Breeding	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 HORTICULTURE JOURNAL	6. 最初と最後の頁 514-520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hortj.UTD-100	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------