

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15515

研究課題名（和文）花色に寄与するアントシアニン液胞内凝集体の形成条件および形成制御遺伝子の特定

研究課題名（英文）Identification of the factors and regulating genes for the formation of anthocyanic vacuolar inclusions that contributes to characteristic flower color

研究代表者

出口 亜由美 (Deguchi, Ayumi)

千葉大学・大学院園芸学研究院・助教

研究者番号：20780563

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）：水溶性の赤色素アントシアニン（ANT）は稀にAnthocyanic vacuolar inclusions (AVIs)と呼ばれる凝集体を形成する。花色等を特徴的な色へ変えるAVIsの形成機構は不明な点が多い。本研究では、ニチニチソウとダリアを用いてAVIs形成条件や制御遺伝子を調査した。両種のANTは別であったが、種内で特定のANTが高蓄積した場合にのみAVIsが形成されることがわかった。ダリアではマロニル基転移酵素遺伝子およびフラボン合成酵素遺伝子の低発現がAVIs形成に関与することが示唆された。交配実験の結果、ニチニチソウのAVIs形成形質は劣性で一遺伝子支配である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アントシアニンを蓄積する花卉品目は多いが、AVIsを形成することがわかっている品目は数えるほどである。よって、本研究で得られたAVIs形成に関する知見は、ニチニチソウおよびダリアの花色素育種に限らず、幅広い花卉品目の新奇花色開発に貢献できると考えられる。さらには、アントシアニンを蓄積する野菜や果実などの果皮色変化へも応用できる可能性がある。また、AVIsはアントシアニンの高蓄積との関連が示唆されているため、機能性物質であるアントシアニンを高蓄積させた高機能性作物の育種への応用も見込める。

研究成果の概要（英文）：The soluble red pigment anthocyanins (ANTs) sometimes form aggregates called anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs). The formation mechanism of AVIs, which change the color of flowers to characteristic colors, is still unclear. In this study, the factors and the genes that regulate the formation of AVIs were investigated in *Catharanthus roseus* and *Dahlia variabilis*. Although the ANT in the petals of both species were different, it was found that AVIs were formed only when specific ANTs were highly accumulated in each species. In dahlia, low expression of anthocyanin 3-O-glucoside-6''-O-malonyltransferase and flavone synthase was suggested to be involved in AVIs formation. The results of the crossbreeding experiments indicated that the AVIs-forming trait in *Catharanthus roseus* was recessive and likely regulated by one gene.

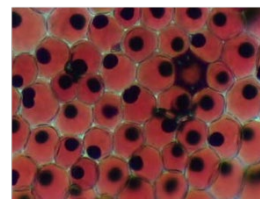
研究分野：園芸科学

キーワード：アントシアニン AVIs ダリア ニチニチソウ 花色 フラボン合成酵素遺伝子 マロニル基転移酵素遺伝子

1. 研究開始当初の背景

植物の花や果実、葉などの着色に寄与する赤色素アントシアニンは、水溶性であるため、一般的に細胞の液胞内で拡散し均一的な着色を示す。しかし、稀に液胞内で凝集体 Anthocyanin vacuolar inclusions (AVIs)を形成し不均一に着色することがある(第1図)。AVIsが形成されると花色や果皮色はくすみがかかった色や、あるいはキラキラと光沢をもつ特徴的な色を示すと言われている(Okamura et al., 2013 ほか)。AVIsの形成にはアントシアニンの種類、特に糖やアシル基の修飾の有無が関与していることが示唆されているが(Chanoca et al., 2015 ほか)、種類に一貫性はなく、共通する条件は不明である。AVIs形成はアントシアニンの高蓄積とも関連が示唆されており(Okamura et al., 2013)、形成機構を解明することは、先述の花色や果皮色の改変への利用だけでなく、機能性物質とされるアントシアニンの高蓄積化への応用も見込まれる。

研究代表者は、ニチニチソウおよびダリアにおいて花卉に AVIs を形成する品種を発見した。AVIs を形成するニチニチソウ ‘ジャムズ&ジェリー ブラックベリー’ は他に類を見ない黒系花色を示し、他品種とアントシアニンの種類が異なる新規のアントシアニンを蓄積していた(Deguchi et al., 2020)。また、AVIs を形成するダリア 2 品種はくすみがかかったアンティーク調の深紅色を示す。これらの品種は花色が季節により変わり、冬季には AVIs が見られない、すなわち同一品種内で AVIs 形成の有無が環境に左右されることがわかっている。純系品種が展開されているため交配後代の解析が可能なニチニチソウと、季節変化することから同一品種内での比較解析が可能なダリアの両品種を用いれば、AVIs 形成条件や制御遺伝子の詳細な知見が得られると考えた。



第1図 ダリアの花弁表皮細胞
上：一般的な赤紫色系品種
下：AVIsを形成する品種

2. 研究の目的

本研究では、将来的な花色育種および高機能性作物育種への活用を目標に、ニチニチソウおよびダリアにおける AVIs 形成条件を特定するとともに、形成に関わる遺伝子を特定することを目的とした。さらに、ダリアにおいては、環境に関わらず AVIs を形成し続ける系統の獲得も目的とした。

3. 研究の方法

ニチニチソウとダリアの両種において、以下の3点を調査した。

- (1) AVIs 形成品種(系統)に特異的な花卉色素蓄積
- (2) AVIs 形成品種(系統)に特異的な遺伝子発現傾向
- (3) AVIs 形成品種の交配後代系統における表現型および遺伝様式

ニチニチソウ

AVIs 形成品種：黒系 ‘ジャムズ&ジェリー ブラックベリー’ (JJBB)、黒目(花卉先端部はピンク、花卉基部は黒色) ‘タトゥー パパイヤ’ (TP), ‘タトゥー ブラックチェリー’ (TBC), ‘タトゥー ラズベリー’ (TR)

AVIs 非形成品種：赤系 ‘エクエイター ディープアプリコット’ (EDA), ‘エクエイター レッド’ (ER), 紫系 ‘エクエイター ブルー’ (EB)

(1)色素解析

ER 以外の供試品種の花弁先端部(黒目品種ではピンク色部)および花卉基部(黒目品種では黒目部)から5%酢酸水で色素を抽出し、HPLCで測定した。アントシアニンは530 nm、淡黄色フラボノイド(主にフラボノール)は350 nmで検出した。なお、ニチニチソウの AVIs は5%酢酸水で溶解する。

(2)遺伝子発現解析

供試したすべての品種において展開前花卉から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。黒目品種においては、展開花卉の先端部および基部間でも RNA-seq による発現比較を行った。

(3) 交配後代の表現型および遺伝様式の調査

JJBB と EDA, ER, EB の正逆交配を行い、F1 の花色および AVIs 形成の有無を調査した。また、JJBB と EDA の F1 の自殖により得られた F2 集団 188 系統の花色および AVIs 形成の有無を調査した。

ダリア

AVIs 形成品種：深紅系 ‘ブロッケン’, ‘NAMAHAIGE ココア’

AVIs 非形成品種：黒系 ‘黒豹’, ‘黒蝶’, ‘Chat Noir’, ‘Black Satin’

ヘテロ性の高いダリアにおいて諸々の解析を行うため、まず(3)の交配によって AVIs 形成系統数を確保してから、(1)および(2)の調査を行った。

(1) 色素解析

供試品種および後述(3)の交配後代系統の花弁から DMSO で色素を抽出し、HPLC で測定した。アントシアニン は 530 nm, 淡黄色フラボノイド (主にフラボン) は 350 nm で検出した。なお、ダリアの AVIs は 5%酢酸水には溶解せず、DMSO には溶解する。AVIs 形成 ‘ブロッケン’, ‘NAMAHAIGE ココア’ においては、夏季 (AVIs 形成あり) および冬季 (AVIs 形成なし) の色素組成の変化を調査した。また、花弁を湯せんして溶解アントシアニンのみを洗い流した後、DMSO で抽出することで AVIs 構成アントシアニンを調査した。

(2) 遺伝子発現解析

供試品種および後述(3)の交配後代系統の花弁から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により、アントシアニン 3-マロニル基転移酵素遺伝子 (*anthocyanin 3-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase: 3MaT*) およびフラボン合成酵素遺伝子 (*flavone synthase: FNS*) の発現量を調査した。

(3) 交配後代の表現型および遺伝様式の調査

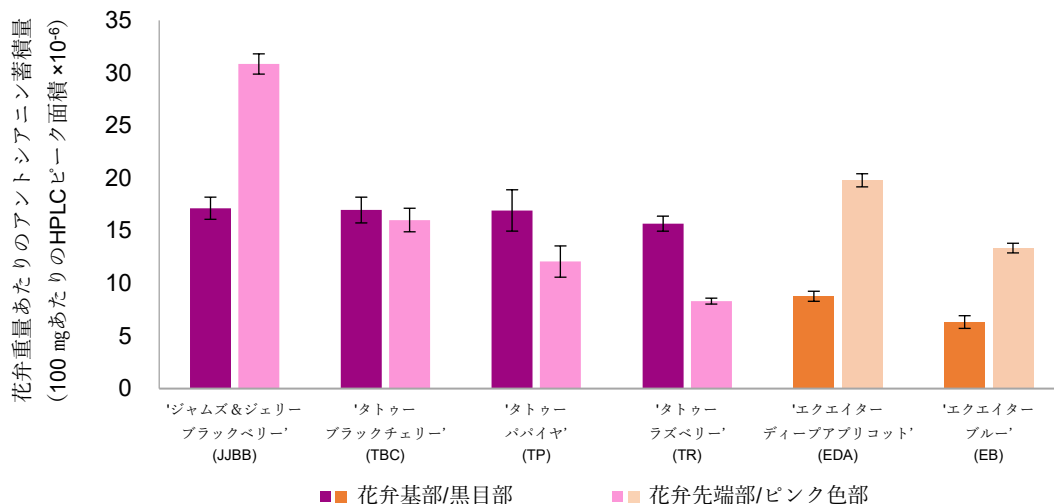
‘ブロッケン’, ‘NAMAHAIGE ココア’ の正逆交配により 163 系統を、‘ブロッケン’ および黒系 ‘Chat Noir’ の正逆交配により 60 系統を獲得し、AVIs 形成の有無を調査した。一部を(1)(2)の解析に使用した。また、得られた AVIs 形成系統において、夏冬の AVIs 形成を観察し、季節変化の有無を調査した。

4. 研究成果

ニチニチソウ

(1) 色素解析

黒目 3 品種は花弁基部、すなわち黒目部では大多数の細胞で AVIs を形成していたのに対し、花弁先端部、すなわちピンク色部分では少数の細胞のみで AVIs が観察された。また、黒目品種のアントシアニンは、両部ともに、AVIs を全面に形成する黒系品種 JJBB と同じく、ペオニジン 3-ロビノビオシド (*Pn 3-rob*) 1 種類であった。黒目品種の花弁基部のアントシアニン蓄積量はすべての品種で JJBB の蓄積量と同程度であったのに対し、花弁先端部の蓄積量は JJBB の半量以下であった (第 2 図)。JJBB の花弁基部のアントシアニン蓄積量は花弁先端部の半量程度であったが、両部の花弁色に差異がないこと、EDA や EB でも同様の傾向がみられことから、花弁基部と花弁先端部では面積当たりの花弁重量に差があるため、重量あたりの蓄積量に違いが出たと考えられた。したがって、黒目品種では花弁基部特異的に *Pn 3-rob* が高蓄積することで AVIs が形成されると考えられた。TP は JJBB と同様に花弁全体でフラボノールを蓄積していなかったのに対し、TBC および TR は花弁先端部、花弁先端部のいずれにおいてもフラボノールを蓄積していた。TBC および TR において、フラボノール蓄積量に対する *Pn 3-rob* 蓄積量の割合は、花弁先端部よりも花弁基部、すなわち黒目部分において高かった。以上のことから、ニチニチソウにおける AVIs 形成条件として、*Pn 3-rob* を高蓄積することが示唆され、また、フラボノールの蓄積は AVIs 形成を阻害しないことが示された (出口ら, 2022; 令和 4 年度園芸学会春季大会)。



第 2 図 ニチニチソウの花弁重量あたりのアントシアニン蓄積量
n=5 の平均値, バーは標準誤差

(2) 遺伝子発現解析

Pn 3-rob はニチニチソウに蓄積する他のアントシアニンとは異なり、7位にメチル基が付加していない。ゆえに、AVIs 形成品種ではメチル基転移酵素遺伝子の発現が低いことが予想された。AVIs を形成する (Pn 3-rob を蓄積する) JJBB, TP, TBC, TR と、AVIs を形成しない (他のアントシアニンを蓄積する) EDA, ER, EB 間において花卉の RNA-seq 解析をしたところ、明確な発現差のあるメチル基転移酵素遺伝子は見つからず、その他に発現差のあるアントシアニン合成関連遺伝子も見つからなかった。Pn 3-rob 合成にはアントシアニン合成とは直接関係のない遺伝子が関与している、あるいはマッピングに使用したリファレンスが適切でなかった可能性が考えられた。黒目品種の先端部および基部間の RNA-seq の結果、*flavanone 3-hydroxylase* をはじめとする複数のアントシアニン合成関連遺伝子に発現差がみられた。したがって、これらの遺伝子の高発現が花卉基部における Pn 3-rob の高蓄積、すなわち AVIs 形成を制御している可能性が示唆された。

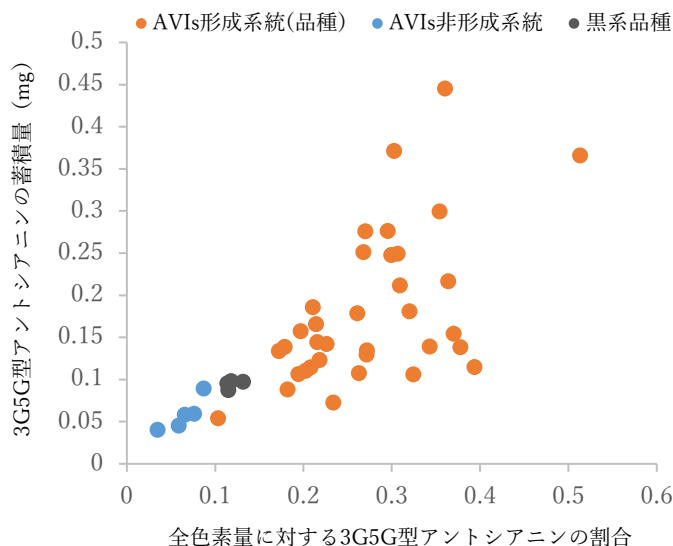
(3) 交配後代の表現型および遺伝様式の調査

JJBB と EDA, ER, EB の正逆交配で得られた F1 は、すべて JJBB とは異なる親と同じ花色を示し、花卉に AVIs を形成していなかった。JJBB と EDA の F1 の自殖により得られた F2 集団では JJBB と同様の黒系、EDA と同様の赤系に加えて、新たなピンク系花色の系統が出現した。黒系は Pn 3-rob を蓄積し、赤系およびピンク系は EDA と同じアントシアニンを蓄積していた。F2 集団全体に対する黒系系統の割合はおおよそ 4 分の 1 であった。したがって、AVIs 形成を誘導する Pn 3-rob を蓄積する形質は劣性形質であり、一遺伝子により制御されている可能性が示された。

ダリア

(1) 色素解析

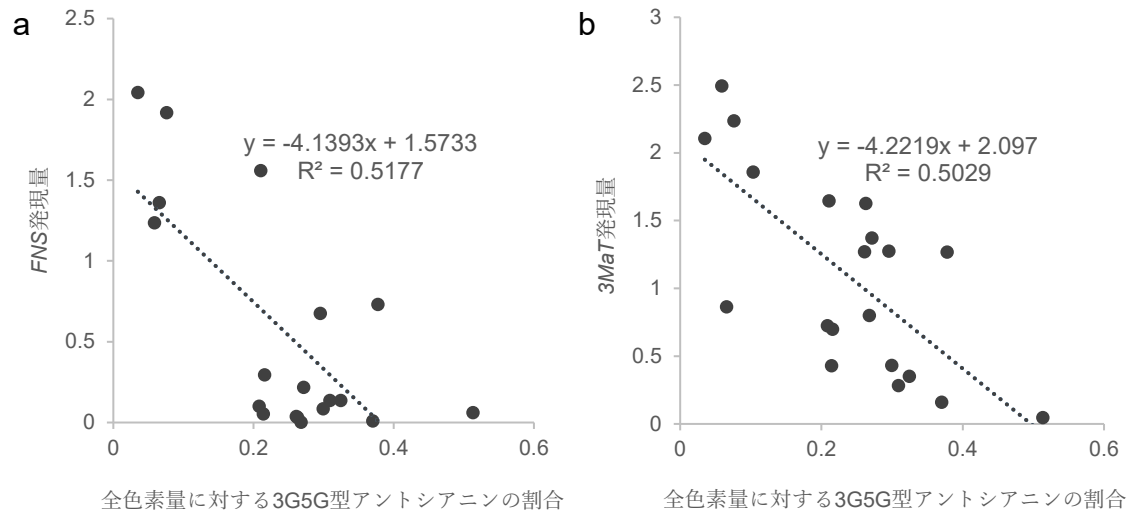
AVIs 形成品種の AVIs を形成する時期 (夏季) の花卉にはフラボンが蓄積していなかったのに対し、AVIs を形成しない時期 (冬季) の花卉にはフラボンが蓄積し、アントシアニン蓄積量が減少していた。よって、フラボン蓄積は AVIs 形成を抑制することが示唆された。ダリアの主要アントシアニンはペラルゴニジンおよびシアニジンの 3-マロニルグルコシド-5-グルコシド (3MG5G 型) であり、次いで 3,5-ジグルコシド (3G5G 型) が蓄積している。AVIs を構成するアントシアニンはほぼ 3G5G 型アントシアニンであった (玉井ら, 2021; 令和 3 年度園芸学会春季大会)。AVIs 形成 2 品種とフラボンを蓄積せず AVIs も形成しない黒系 4 品種、および交配により得られた AVIs 形成雑種 33 系統、AVIs 非形成雑種 5 系統を用いて、夏季の花卉の色素解析を行った。AVIs 形成雑種系統のなかには、フラボンを蓄積しても AVIs を形成する系統が存在した。また、3G5G 型アントシアニンの蓄積絶対量が黒系品種や AVIs 非形成系統よりも低い AVIs 形成系統も複数存在した。1 系統を除いて、AVIs 形成系統は全色素量 (総アントシアニン+総フラボン) あたりの 3G5G 型アントシアニンの割合が高いことがわかった (第 3 図)。したがって、AVIs 形成はフラボン蓄積により直接的には阻害されないこと、3G5G 型アントシアニン蓄積絶対量よりも、全色素量に対する 3G5G 型アントシアニン蓄積割合が高いことが最も重要な形成条件であることが示唆された。



第 3 図 全色素量 (総アントシアニン+総フラボン) に対する 3G5G 型アントシアニン蓄積量の割合と 3G5G 型アントシアニン蓄積量 (花卉 2 cm²あたり) シアニジン-3-グルコシド当量

(2) 遺伝子発現解析

AVIs 形成品種において、夏季の花卉では *FNS* がほとんど発現していなかったのに対し、冬季の花卉では *FNS* が発現していた。3*MaT* は夏冬で著しい発現差はみられなかった。よって、AVIs 形成の季節変化は *FNS* の発現差によるものであると示唆された。AVIs 形成雑種 16 系統、AVIs 非形成雑種 4 系統において、3*MaT* および *FNS* の発現量を調査した。両遺伝子の発現量と全色素量に対する 3G5G 型アントシアニンの割合との相関を調査したところ、いずれの遺伝子も負の相関を示した (第 4 図)。したがって、3*MaT* および *FNS* の低発現が 3G5G 型アントシアニンの蓄積割合を高くすること、すなわち AVIs 形成に関与していることが示唆された。



第4図 遺伝子発現量と全色素量（総アントシアニン+総フラボン）に対する3G5G型アントシアニンの割合の相関 a; 3MaT, b; FNS
 遺伝子発現量は Actin 相対量

(3) 交配後代の表現型および遺伝様式の調査

AVIs 形成 2 品種 ‘ブロッケン’, ‘NAMAHAIGE ココア’ の正逆交配により得られた 163 系統のうち、花卉に AVIs を形成していたのは 108 系統であった。AVIs 形成 ‘ブロッケン’ および AVIs 非形成黒系品種 ‘Chat Noir’ の正逆交配により得られた 60 系統のうち、花卉に AVIs を形成していたのは 38 系統であった。これら AVIs 形成系統において、AVIs 形成の季節変化を調べたところ、それぞれ 34 系統、7 系統が季節変化せず、冬季も AVIs を形成し続けることがわかった。これらの結果から、AVIs 形成品種を使用した交配では 65% 程度の割合で AVIs を形成する後代が得られることが示された。また、AVIs 形成形質とその季節変化形質は分離可能であり、環境に関わらず AVIs を形成し続けるダリア系統を獲得することができた。

ニチニチソウとダリアの両種での調査により、AVIs 形成には特定のアントシアニンを高蓄積することが共通条件として示唆された。ダリアでは全色素量に対する蓄積割合が高いことが最も重要な AVIs 形成条件だと考えられたが、これがニチニチソウにも共通するか否かは、植物材料を拡大して検証する必要がある。また、AVIs を形成するアントシアニンに構造的特徴があるかも引き続き調査する必要がある。

<引用文献>

Chanoca, A., N. Kovinich, B. Burkel, S. Stecha, A. Bohorquez-Restrepo, T. Ueda, K. W. Eliceiri, E. Grotewold and M. S. Otegui. 2015. Anthocyanin vacuolar inclusions form by a microautophagy mechanism. *Plant Cell* 27: 2545-2559.

Deguchi, A., F. Tatsuzawa and K. Miyoshi. 2020. A blackish-flowered cultivar of *Catharanthus roseus* accumulates high concentrations of a novel anthocyanin with a unique feature of aggregation in weak acid solutions. *Dyes Pigm.* 173: 108001.

Okamura, M., M. Nakayama, N. Umemoto, E. A. Cano, Y. Hase, Y. Nishizaki, N. Sasaki and Y. Ozeki. 2013. Crossbreeding of a metallic color carnation and diversification of the peculiar coloration by ion-beam irradiation. *Euphytica* 191: 45-56.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 出口亜由美	4. 巻 9
2. 論文標題 ニチニチソウ黒系品種 'Jams 'N Jellies Blackberry' の発色機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JATAFFジャーナル	6. 最初と最後の頁 34-38
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 無
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 出口亜由美・立澤文見・三吉一光
2. 発表標題 ニチニチソウ「タトゥー」シリーズの花弁黒目の形成要因
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉井孝典・立澤文見・出口亜由美・三吉一光
2. 発表標題 ダリア花弁における液胞内アントシアニン凝集体の形成に関わる色素蓄積
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------