

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21309

研究課題名（和文）植物色素毎の生理機能の特徴付けるモデル植物の作出

研究課題名（英文）Re-characterization of biological function among plant pigments using transgenic plants

研究代表者

中塚 貴司（Nakatsuka, Takashi）

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：60435576

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：アントシアニンとベタレインを蓄積する遺伝子組換えペチュニアを作出した。アントシアニンを蓄積した個体は著しい生育抑制が観察されたが、ベタレイン蓄積個体ではわずかな遅延であった。これらの形質転換体は植物色素以外のバックグラウンドが同一であり、各植物色素の生理的役割を比較解析することが可能な研究材料となるだろう。トルコギキョウおよびペチュニアにベタシアニン生合成酵素遺伝子を過剰発現させたところ、これまでにない鮮赤色の花色を有する個体を作出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物色素であるアントシアニンとベタレインは、生理的役割は画一的に環境ストレス防御と抗酸化、病原抵抗性であると考えられている。しかし、それぞれの色素は植物界で排他的に分布するため、種間で見られる生理活性や形態、生育特性などの要因の違いを考慮する必要があり、植物色素の関与する生理活性だけを分離して考察することが困難であった。本研究で、アントシアニンまたはベタシアニンを蓄積するペチュニア形質転換体シリーズを作出することで、同一な遺伝的バックグラウンドで色素機能を比較することが可能とした。

研究成果の概要（英文）：We produced the transgenic petunia plants introduced anthocyanin regulatory gene or betalain biosynthetic genes. Anthocyanin accumulated petunia plants were delayed their growth compared with betalain-accumulated ones. Thus, our study would reveal the difference of biological function between anthocyanin and betalain. In addition, the transgenic lisianthus plants introduced betalain biosynthetic genes were accumulated both anthocyanin and betacyanin in their petals, showed wine red flower colors.

研究分野：花卉園芸

キーワード：アントシアニン ベタレイン 遺伝子組換え 環境ストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の花や果実そして葉は、成熟などの生理応答として着色する。これらの着色には、植物色素の蓄積が関与している。植物色素には、フラボノイド(アントシアニン、オーロンなど)、カロテノイド、クロロフィル、ベタレインの4種類の化合物が関与している。花や果実の着色は、昆虫や動物、鳥類を誘因し、受粉や種子散布を促進する役割があると考えられている。これらの研究では、同属内の蓄積する植物色素が異なる種間同士を比較し、訪花昆虫の違いについて研究されている。しかし、種間比較では植物色素の種類以外にも生理活性物質や形態、生育特性などの要因の違いも考慮する必要がある(Bradleyら, Science 358: 925-828. 2016)。着色としての生理機能以外にも、フラボノイドはオーキシン輸送(Kuhnら, Plant Physiol. 156: 585-595. 2011)や根粒菌の共生シグナル(Sugiyamaら, Plant Physiol. 144: 2000-2008. 2007)、強光・UV耐性(Qiら, Plant Cell 23: 1795-1814. 2011)、病原菌抵抗性(Majorら, New Phytol 215: 1533-1547. 2017)などの役割があると考えられている。これらの知見はモデル植物の変異体解析に基づいており、全ての植物種で共通する生理機能であるかは検証されていない。このように、これまでの研究では植物色素の生理機能は推測の域を出ておらず、厳密に評価されていないのが現状である。

アントシアニンとオーロン、ベタレインは、水溶性で液胞に蓄積するが、化学構造は大きく異なる。また、アントシアニンは植物界に広く分布しているが、ベタレインはナデシコ目の一部の植物種でのみ生成・蓄積する。オーロンを蓄積する植物も、キク科やゴマノハクサ科の一部の植物種に限定されている。さらに、ベタレインとアントシアニンの両方を蓄積する植物は自然界には存在しないため、両色素は進化のうへで排他的な分布を示している。アントシアニン色素と同様に、ベタレイン色素にも環境ストレスに対する抵抗性や耐病性の生理機能があると考えられている(Polturakら, PNAS 114: 9062-9067. 2017)。しかし、アントシアニンとベタレインが異なる植物種に蓄積するため、両色素が持っている生理活性の違いについて単純比較することができない。これらの理由で、アントシアニンやカルコン、ベタレインの生理的機能の違いを読み解くことを困難にしている。

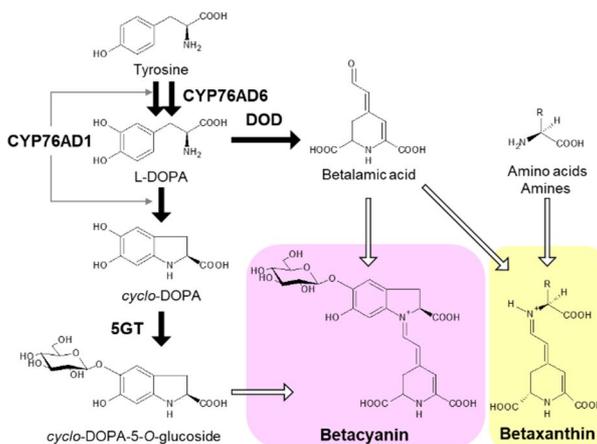
2. 研究の目的

本研究課題の目的は、植物色素であるフラボノイド(アントシアニンとカルコン)とベタレイン(ベタシアニンとベタキサンチン)の植物生理における役割の違いを明らかにし、進化上の謎として残されている排他的分布の理由を推定することである。また、自然界では共存しない組み合わせで植物色素を蓄積した植物体を作成することで、生理応答だけでなく園芸的価値にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ベタシアニンおよびアントシアニン高蓄積ペチュニアの作出

ベタシアニン産生ペチュニアを作成するために、テーブルビート由来 *CYP76AD1*、オシロイバナ由来ドーパ 4,5-ジオキシゲナーゼ遺伝子(*DOD*)、*cDOPA-5* 位配糖化酵素遺伝子(*5GT*)をそれぞれを *CaMV35S* プロモーターで制御したバイナリーベクターを構築した(第1図)。アントシアニン産生ペチュニアを作成するために、アントシアニン合成制御因子遺伝子 *DEEP PURPLE* 遺伝子(*DPL*)を *CaMV35S* プロモーターで制御したバイナリーベクターを構築した。*Agrobacterium* 媒介形質転換法を用いて、ペチュニア‘ミッチェル’葉片に接種し、カナマイシンで選抜した。得られたカナマイシン耐性シュートは、発根を誘導後、順化した。開花した個体は自殖し、T1 種子を獲得した。T1 形質転換体を用いて、形質転換システムのアントシアニンおよびベタレイン、クロロフィル含量を測定した。クロロフィル蛍光パラメーターを測定することで、光合成活性を評価した。



第1図 ベタレイン合成経路

(2) ベタキサンチンおよびオーロン高蓄積ペチュニアの作出

ベタキサンチン合成に必要な *CYP76AD6* と *DOD* の2つの酵素遺伝子を *CaMV35S* プロモーターまたはアサガオ由来 *1nMYB1* プロモーターで制御したバイナリーベクターを構築した。オーロン産生ペチュニアを作成するために、カルコン 4 位配糖化酵素遺伝子(4' *CGT*)とオーロン合成酵素遺伝子(*AUS*)を *CaMV35S* プロモーターで制御したバイナリーベクターを構築した。上述の方法でペチュニアに形質転換をした。得られた形質転換体はゲノム PCR で外来遺伝子の導入を確

認したあと、表現型評価と色素組成を測定した。

(3) ベタレイン蓄積によるトルコギキョウの花色改変

35S プロモーターで *CYP76AD1*、*DOD*、*5GT* の3つの遺伝子を制御したバイナリーベクターを用いて、トルコギキョウ‘ライトピンクサム’を形質転換した。得られたハイグロマイシン耐性植物体は、ゲノムPCRで外来遺伝子の導入を確認後、順化した。開花後、自殖してT1種子を獲得した。T1種子はハイグロマイシン添加培地に播種し、開花した花を用いて遺伝子発現や色素解析を行った。

4. 研究成果

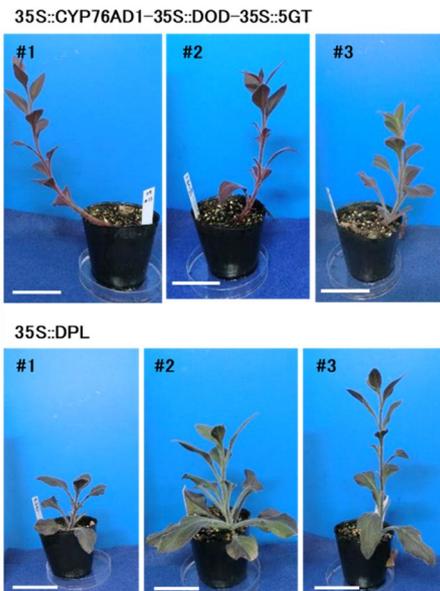
(1) ベタシアニンおよびアントシアニン高蓄積ペチュニアの作出

CaMV35S プロモーターで *CYP76AD1*、*DOD* と *5GT* を過剰発現させた形質転換体は、葉や花が赤く着色し、ベタシアニンの蓄積が検出された。一方、CaMV35S プロモーターで *DPL* を過剰発現した形質転換体も、葉が赤く、花は淡紫色に着色し、アントシアニンの蓄積が検出された。

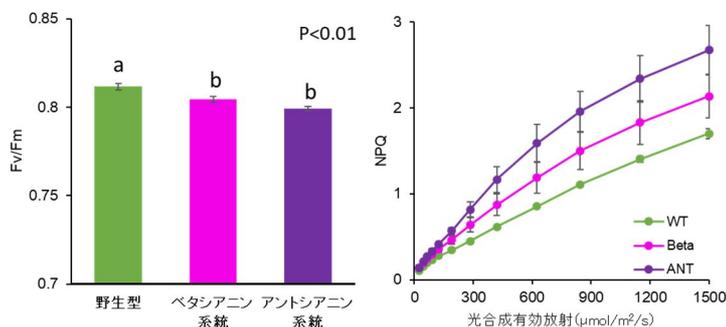
T1 個体を用いて、色素蓄積が植物生理に及ぼす影響を調査した。アントシアニン高蓄積系統では、著しく生育が遅れた。ベタレイン高蓄積系統でも、野生型より開花が遅かったが、アントシアニン系統よりは有意に早かった(第2図)。クロロフィル蛍光測定による光合成機能解析では、ベタシアニン蓄積系統とアントシアニン蓄積系統では、 F_v/F_m は野生型と比較して有意に低かった(第3図)。ベタシアニン系統ではクロロフィル含量が野生型と比較して有意に高かった。NPQは、アントシアニン系統、ベタシアニン系統、野生型の順で高く、生育遅延の程度と一致している。これらの結果から、ベタシアニンおよびアントシアニンが特定の波長領域を吸収することで、光合成効率の低下を引き起こしているが、程度や作用点が異なっていると推定された。形質転換体の実生を用いた塩ストレス処理では、生体重や抗酸化活性に有意差が見られなかった。一方、強光ストレス処理下でのアントシアニン系統において、野生型と比較して、光阻害による F_v/F_m の低下が抑制された。ベタシアニン系統においても同様の効果が見られたが、アントシアニン系統の方が強光ストレスを回避していた。これらの結果から、アントシアニンとベタシアニン色素が葉に蓄積することで過剰な光を吸収し、光防護機能を付与していると推測された。

(2) ベタキサンチンおよびオーロン高蓄積ペチュニアの作出

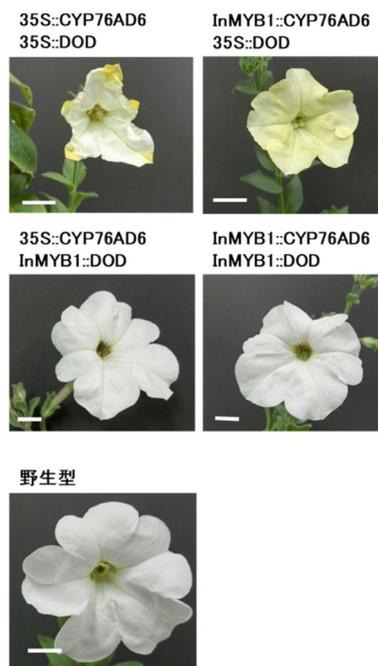
CaMV35S プロモーターで *CYP76AD6* と *DOD* の両遺伝子の発現を制御した形質転換ペチュニアは、生育阻害が観察され、多くの個体は開花に至らなかった。開花した個体もあったが、花が奇形となり局所的にベタキサンチンが蓄積していた(第4図)。これらの系統は後代種子が獲得できなかった。一方、*InMYB1* プロモーターで *CYP76AD6*、35S プロモーターで *DOD* を制御した形質転換体では、花弁が淡黄色に着色した系統が得られた。し



第2図 ベタシアニンおよびアントシアニン蓄積ペチュニア形質転換体の表現型 バーは5cm



第3図 形質転換ペチュニア葉における光合成パラメーター (F_v/F_m と NPQ)



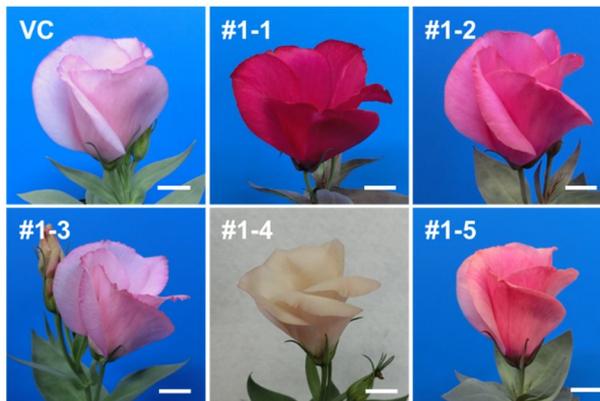
第4図 *CYP76AD6* と *DOD* 形質転換ペチュニアの典型的な花色

しかし、InMYB1 プロモーターで DOD を制御した組み合わせでは、ベタキサンチンの蓄積は見られず、野生型と同じであった。このことから、CYP75AD6 の花弁特異的発現と DOD の構成的発現の組み合わせが、生育障害を起こさず花色改変できる手法であることを明らかにした。

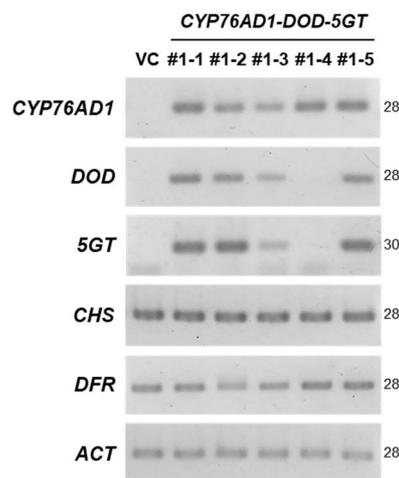
CaMV35S プロモーターで 4' CGT と AUS を過剰発現したペチュニア形質転換体は、オーロンを蓄積しなかった。

(3) ベタレイン蓄積によるトルコギキョウの花色改変

CaMV35S プロモーターで制御したベタレイン生合成に関与する 3 つの遺伝子 (CYP76AD1、DOD、5GT) をトルコギキョウに導入した。得られた T0 形質転換体の花色は野生型より僅かに濃いピンク色であった。自殖して得た T1 個体の実生は、葉が濃赤色に着色する個体と着色しない個体に分離した。さらに、生育させた個体の花色は濃赤色、濃ピンク色、淡ピンク色、クリーム色、黄色味がかったピンク色の 5 つのグループに分離した (第 5 図)。半定量的 RT-PCR 解析で導入遺伝子の発現量を調査し、CYP76AD1 の発現量は形質転換個体間で発現量に差はなかった (第 6 図)。しかし、花色が濃い系統ほど、DOD と 5GT の発現量は多かった。花弁の色素解析では、濃赤色、濃いピンク色、黄ピンク色の花色を持つ個体では、ベタシアニン蓄積が検出され、系統によってはベタキサンチンも検出された。また、ベタレインが蓄積した花弁では、野生型と比較してアントシアニン蓄積量が減少した。自然界において排他的に分布するアントシアニンとベタレイン色素が、トルコギキョウ形質転換体において共存していることが明らかになった。また、トルコギキョウにおいてベタレイン色素の蓄積により鮮赤色の花色を含む多様な花色を誘導できることを示した。



第 5 図 ベタレイン蓄積形質転換トルコギキョウ T1 の典型的な花色



第 6 図 トルコギキョウ形質転換体の花弁における遺伝子発現

本研究で作出した形質転換体を用いることで、これまでベタシアニンとアントシアニン間で同等と考えられていた生理機能における差異を明らかにすることができるかもしれない。植物界で排他的な分布をした進化的な謎の解明につながることを期待される。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nuraini Latifa, Tatsuzawa Fumi, Ochiai Masaki, Suzuki Katsumi, Nakatsuka Takashi	4. 巻 90
2. 論文標題 Two Independent Spontaneous Mutations Related to Anthocyanin-less Flower Coloration in <i>Matthiola incana</i> Cultivars	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 85～96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hortj.UTD-212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nuraini Latifa, Ando Yukiko, Kawai Kentaro, Tatsuzawa Fumi, Tanaka Kotomi, Ochiai Masaki, Suzuki Katsumi, Aragonés Veronica, Daros Jose-Antonio, Nakatsuka Takashi	4. 巻 251
2. 論文標題 Anthocyanin regulatory and structural genes associated with violet flower color of <i>Matthiola incana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 61-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-020-03351-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 該当する

1. 著者名 Tomizawa Eri, Ohtomo Shogo, Asai Kanako, Ohta Yuka, Takiue Yukako, Hasumi Akihiro, Nishihara Masahiro, Nakatsuka Takashi	4. 巻 38
2. 論文標題 Additional betalain accumulation by genetic engineering leads to a novel flower color in <i>Lisianthus</i> (<i>Eustoma grandiflorum</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 323～330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.0516a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 瀧上友佳子・西原昌宏・中塚貴司
2. 発表標題 アントシアニンとベタシアニンの生理機能比較に向けた植物体の作出
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 瀧上友佳子・富澤愛理・西原昌宏・中塚貴司
2. 発表標題 ベタレイン生合成遺伝子の導入による花色改変
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡大学農学部生物資源科学科花卉園芸学研究室
<https://sites.google.com/site/shizuokaflower/home>

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