

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380022

研究課題名（和文）ペチュニアの市販品種の遺伝子に秘められた品種改良の歴史を読み解く

研究課題名（英文）Deciphering breeding history of *Petunia* commercial cultivars through analyses of useful genes.

研究代表者

安藤 敏夫（ANDO TOSHIO）

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号：30026588

研究成果の概要（和文）：ペチュニア市販品種の花色素合成系遺伝子の解析により、色彩の変化（白花・黄花・赤の濃淡）や網目模様の原因遺伝子を決定した。また、これらの遺伝子を野生種と比較して品種改良の歴史の解明を試みた。白花の原因遺伝子から *P. inflata* の関与が初めて確認され、網目模様の原因遺伝子は *P. axillaris* に由来する可能性が示された。黄花および赤の濃淡については抑制される遺伝子を特定したが、その原因までは分からなかった。

研究成果の概要（英文）：We analyzed floral anthocyanin synthesis genes to determine the causal factor of white and yellow flowers and differences between red and salmon in commercial petunia cultivars. We intended to decipher breeding history of cultivars by comparing the causal genes with those of wild species. We found the first evidence of involvement of *P. inflata* in causal gene of white flower. The cause of the vein pattern derived from *P. axillaris*. For the yellow and the deciding factor between red and salmon, we found the gene that was down regulated, but did not find the cause for that.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 6,400,000 | 1,920,000 | 8,320,000 |
| 2010年度 | 4,200,000 | 1,260,000 | 5,460,000 |
| 2011年度 | 4,200,000 | 1,260,000 | 5,460,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,800,000 | 4,440,000 | 19,240,000 |

研究分野：花卉園芸学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：ペチュニア、アントシアニン合成系遺伝子、市販園芸品種、育種、網目模様

1. 研究開始当初の背景

(1) 品種の歴史は【育種と遺伝子の歴史】、と言いたい。品種改良の歴史は、農業・園芸的に重要な遺伝子の変異として、現代品種に受け継がれているはずであり、現存する対立遺伝子の塩基配列には、歴史書にない、知られざる過去が記録されている可能性がある。予備試験の成果を踏まえ、ペチュニアの花色素合成系重要遺伝子について、市販品種と野生

種を比較することにより、育種家による遺伝子の取捨選択、過去に起こった遺伝子の組換えや変異など、これまで見えなかった遺伝子の歴史を明らかにする。【歴史書をDNAに代えて】・【表現型の歴史から遺伝子型の歴史へ】・・・最新のDNA解析技術を駆使して品種改良の歴史を探る先駆的な研究とする。

(2) 本研究は、園芸学に留まらず、野生生物

から永年の育種を経て多くの品種を育成し、利用している農学・林学・畜産学・水産学など、いわば‘応用生物学’に広く新たな研究領域を開拓するパイオニア研究である。本研究の過程で得られた経験は、広く人工生物＝品種というものの歴史を研究するための新たな道しるべとなる。

(3) 本研究はもちろん、モデル植物としてのペチュニア品種で得られていたアントシアニンの合成系遺伝子に関する情報を基礎として進めるものである。本研究が計画する【遺伝子型の歴史】の研究がもたらす直近のヒントは、トウモロコシとキンギョソウの【遺伝子型の歴史】の研究であろう。どちらもアントシアニン合成系のモデル植物であり、既に多くの遺伝子がクローニングされており、なおかつ多くの品種が発達しているから、本研究のアプローチがそのまま応用できる。アラビドプシスで得られた分子生物学的成果はアブラナ科作物の、ミヤコグサの成果はマメ科作物の、それぞれ歴史研究に活かされるべきであるし、今後トマトなど、続々とモデルが設定されて分子情報が蓄積すれば、本研究で経験する試行錯誤が、多くの作物の歴史研究に活かされることとなる。

(4) 本研究を【品種の起源を辿る農学的分子系統学】と評することもできる。しかし、【種の起源を辿る理学的分子系統学】とは一線を画するものであることを強調しておきたい。【理学的分子系統学】が葉緑体 DNA の遺伝子間領域など、そこに変異があっても表現型に影響がない、つまり自然淘汰を受けない、いわば意味のない DNA 領域を解析する必要があるのに対して、【農学的分子系統学】は、構造遺伝子など、そこに変異があれば表現型に影響する、つまり選抜の対象となる、意味のある DNA 領域を解析する必要がある。前者は自然淘汰というものを、後者は人為淘汰＝育種というものを、それぞれ研究するための別々のツールである。

2. 研究の目的

ペチュニア市販園芸品種と野生種の比較により、品種に受け継がれている花色合成系遺伝子の歴史を明らかにすることを目的とする。そのためにペチュニアの色素合成系遺伝子の中から、花のアントシアニンの質と量を制御していると考えられる 5 遺伝子座 (*Hf2*, *DFR*, *FLS*, *CHS*, *AN2*) について、市販品種内の変異の実態を明らかにし、全ての対立遺伝子の種類とそれぞれの構造を解明する。さらに、網目模様、黄花、白花の原因遺伝子と色彩の濃淡また、各遺伝子につき、以下の諸点を明らかにする。

(1) 一部の品種につき、機能を有する遺伝子と、機能を失った遺伝子のゲノム配列を明らかにする。

(2) 配列の分かった対立遺伝子につき、分子マーカーを開発して、表現型との整合性を明らかにする。

(3) 機能を失った遺伝子につき、その原因を明らかにする。

(4) 市販品種に存在する全ての対立遺伝子が、どの野生種に由来し、どのような変異を受け、どのような選抜を受けて、現在に至っているか、知られざる遺伝子の歴史を明らかにする。

3. 研究の方法

ペチュニアの上記遺伝子の既知の塩基配列情報を基に、PCR を利用して野生種および品種の遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定する。模様や色彩変異の原因を特定するため、RT-PCR やノーザンハイブリダイゼーションを用いた発現解析によって、原因を解明する。原因遺伝子の塩基配列によってアレルを整理し、アレル間の交雑後代における表現型の分離および遺伝子型と表現型の相関を明らかにする。野生種の各遺伝子との比較によって品種のアレルの成立過程を推定する。

4. 研究成果

(1) *Hf2* 遺伝子、網目模様形成遺伝子、黄花・白花品種の原因遺伝子、覆輪形成遺伝子、色の濃淡を決める遺伝子の解析を行った。

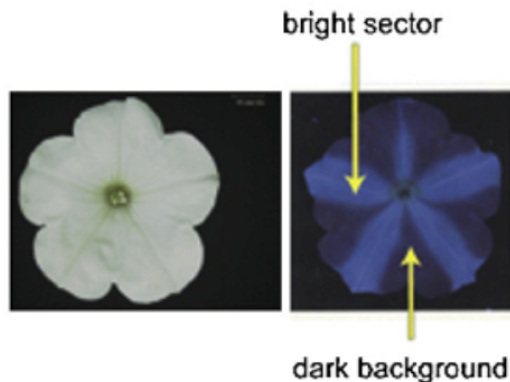
(2) *Hf2* はシアニジン系色素(シアニジン・ペオニン)とデルフィニジン系色素(デルフィニジン・ペチュニジン・マルビジン)の合成系を決定する鍵酵素である F3'5'H をコードする。この遺伝子については、品種の母親である白花の *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* の *Hf2* アレル (*Hf2-a*) の塩基配列が品種の劣性遺伝子 *hf-2* に非常に近い。そこで、実際に *Hf2-a* が劣性遺伝子であるのか、品種との F₂ を作成し、遺伝子型と表現型の相関を調べたところ、*Hf2-a* は実際には合成経路を触媒する能力はあったが、合成される色素の量が極端に少なくなることが判明した。つまり、発現抑制の原因としてこの遺伝子のアミノ酸置換によるタンパクの構造変化などではなく、*Hf2-a* に連鎖する未知の制御遺伝子である可能性が示唆された。また、この野生型アレルが品種の劣性 *hf-2* として現在まで生き延びていると考えられる。(下記雑誌論文⑧)

(3) 予備実験によって市販園芸品種の網目模様の原因遺伝子と同じ遺伝子座に変異をもつことがわかっている *P. integrifolia* (品種の父親とされる有色の野生種) の野生突然変異体(VN)に

おけるアントシアニン合成系遺伝子 *CHS-A*, *CHS-J*, *CHI*, *F3H*, *DFR* の発現を調査したところ、*DFR* の発現が特異的に抑制されていた。そこで、*DFR* のゲノム塩基配列を調べたところ、VN 変異体と野生型は同一であったため、構造遺伝子の変異ではなく制御遺伝子の変異が考えられた。さらに、網目模様の市販園芸品種について遺伝子発現を調べると、VN 変異体と同様に *DFR* のみが発現抑制されていた。そこで、*DFR* の発現に関わる転写因子である *An2* 遺伝子のゲノム配列を調べたところ、第3エクソン上に VN 変異体では1塩基置換によるナンセンス突然変異が、品種では4塩基挿入によるフレームシフトがそれぞれ確認された。これにより *An2* タンパクの機能が不完全となるため *DFR* 遺伝子に対しては制御が不十分となるがその他の遺伝子の制御には影響がないために、網目模様を形成すると考えられた。(雑誌論文⑥)この4塩基挿入は *P. axillaris* の野生個体で見つかっているもの (Hoballah ら, 2007) と一致した。この個体がどこで採集されたものかは明らかでないため、品種の起源地の推定には使えないが、網目模様の育種の歴史が最初に交配に使われた野生種までさかのぼる可能性が示唆された。

(4) 黄花品種においては *DFR* が全品種に共通して抑制されており、このためにアントシアニンの合成が行われず、中間産物を基質とする *FLS* 遺伝子の働きによってフラボノールが蓄積することで黄色が発現していることが示された。その他の遺伝子は正常に発現しているため、*DFR* のみを特異的に抑制する因子の存在が示唆された。(雑誌論文④)

(5) 白花については、*P. axillaris* では *An2* の機能欠損によるアントシアニン合成系の抑制、白花品種においては *CHS-A* 遺伝子の siRNA による RNA 干渉が知られていたが、品種の中に肉眼では分からないが、有機酸を蓄積する部位とフラボノールを蓄積する部位がスター型品種と同じ模様を示すものを見いだした(第1図)。



第1図 白花品種‘カーペットホワイト’の可視光下(左)と紫外線下(右)における発色。紫外線下では明るく輝く部分(bright sector)と暗い部分(dark background)に分かれる。

スター型品種の白い模様に対応する部位は同じく *CHS-A* 遺伝子の siRNA による RNA 干渉、その他の部位では *An2* の機能欠損による *DFR* の抑制によって白花になっていることを示した。(雑誌論文①)また、黄花と同様に *DFR* のみが特異的に抑制される市販品種が確認された。(雑誌論文③)

(6) ピコティと呼ばれる品種群は花冠に白い覆輪をもつ。この覆輪は *CHS-A* 遺伝子の重複による RNA 干渉が原因であることがわかっている。品種の *CHS-A* を調べたところ、3種類のアレル (*PhCHSA*, *PhCHSA-3*, *PhCHSA-1*: *PhCHSA-2*) が確認された。このうち、*PhCHSA-1*: *PhCHSA-2* がピコティの原因となる重複構造をもつ。品種成立に関わったと考えられる野生種 *P. axillaris*, *P. integrifolia*, *P. inflata* の *CHS-A* とこれらを比較したところ、重複の前半部分である *PhCHSA-1* は *P. integrifolia* と *P. inflata* のキメラ、*PhCHSA-2* は *P. axillaris* と *P. inflata* のキメラとなっていた。種間交雑によって生じた *CHS-A* 遺伝子のキメラ化と重複というゲノムの再編成によって、内生的な RNA 干渉の発現が可能な遺伝子構造が形成されたことが一因となり、野生種には見られないピコティ形質が発現したと推察される。*P. inflata* の品種成立への関与は古い文献では示唆されていたが、物理的な証拠は今回初めて明らかとなった。(雑誌論文⑤、⑦)

(7) 市販品種のうちレッド、サーモンと呼ばれる花色は肉眼では明らかに異なって見えるが、同じシアニン系のアントシアニンを蓄積している。その花色の違いはアントシアニンとフラボノールの蓄積量によると考えられていたが、フラボノールは検出されず、アントシアニンの蓄積量のみで決まることを明らかにした。また、その原因として従来考えられていたフラボノール合成酵素との基質の競合ではなく、*F3H* の発現量の違いによることが判明した。その他の合成系遺伝子は抑制されていないため、*F3H* のみを特異的に抑制する因子の存在が示唆された。(雑誌論文②)

(8) ペチュニア品種の育種は1830年代にイギリスで *P. axillaris* と *P. integrifolia* が交配されたことに始まる。文献によっては *P. integrifolia* の近縁種である *P. inflata* の関与が示唆されていたが、本研究により、覆輪の原因遺伝子である重複した *CHS-A* の一部に *P. inflata* の配列が確認され、この種も品種の成立に関与していることが示され、野生種にはない覆輪が種間交雑の結果生じたアレルによることが判明した。遺伝子内での組換えはペチュニア品種の *Hfl* でも知られており (Chen ら, 2007)、種間雑種が野生種にはないアレルを生み出す原動力となっていることが示唆された。また、網目模様の原因となる遺伝子は

An2であり、白花の野生種である*P. axillaris*の野生個体で同じ変異が見つかっていることから、この遺伝子の起源は品種の育種の初期までさかのぼることが示唆された。黄花と色彩の濃淡については抑制される遺伝子が特定されたものの、原因遺伝子の発見には至らなかったため、【遺伝子型の歴史】の解明はできなかった。今後、解析を続けることで原因遺伝子の特定とその歴史を明らかにしていきたい。また、他の植物で同様な研究が行われ、育種の歴史が遺伝子に刻み込まれている事実が普遍的であることが証明されれば、本研究のパイオニアとしての価値が高まると信じる。

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)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Matsubara K, Kei S, Koizumi M, Kodama H, Ando T, RNA silencing in white petunia flowers creates pigmentation patterns invisible to the human eye, *Journal of Plant Physiology*, 査読有, 169 巻, 2012, 920-923
- ② 武藤貴大, 松原紀嘉, 渡辺均, 國分尚, 安藤敏夫, ペチュニア品種における花色の濃淡を制御する因子、園芸学研究、査読無、11 巻別冊 1、2012、203
- ③ 船戸絵理, 松原紀嘉, 渡辺均, 國分尚, 安藤敏夫, ペチュニア属における白花のもう一つの成因、園芸学研究、査読無、11 巻別冊 1、2012、204
- ④ 松原紀嘉, 佐々木秀典, 渡辺均, 國分尚, 安藤敏夫, 市販ペチュニア品種のアントシアニン合成系の解析-黄花の成因-, 園芸学研究、査読無、10 巻別冊 2、2011、277
- ⑤ 森田裕将, 中山真義, 安藤敏夫, Chalcone synthase 遺伝子の構造から示されるペチュニア園芸品種と原種の関係、園芸学研究、査読無、9巻別冊2、2010、266
- ⑥ 武永充正, 松原紀嘉, 國分尚, 安藤敏夫, ペチュニア花冠における網目模様形成に関わる遺伝子、園芸学研究、査読無、9巻別冊 2、2010、267
- ⑦ 森田裕将, 伴雄介, 安藤敏夫, 中山真義, Chalcone synthase の構造から示されたペチュニア品種の形成における *Petunia inflata* の関与とピコティ形成に関わるゲノム構造の成立、園芸学研究、査読無、9巻別冊1、2010、208
- ⑧ 小川優理子, 安藤敏夫, 松原紀嘉, 渡辺均, 國分尚, ペチュニア品種の起源-*Petunia axillaris* の *Hf2* 遺伝子の活性-, 園芸学研究、査読無、8巻別冊2、2009、294

[学会発表] (計7件)

- ① 武藤貴大, 松原紀嘉, 渡辺均, 國分尚, 安

藤敏夫, ペチュニア品種における花色の濃淡を制御する因子、園芸学会平成 23 年度春季大会、2012 年 3 月 29 日、大阪府立大学(大阪府)

- ② 船戸絵理, 松原紀嘉, 渡辺均, 國分尚, 安藤敏夫, ペチュニア属における白花のもう一つの成因、園芸学会平成 23 年度春季大会、2012 年 3 月 29 日、大阪府立大学(大阪府)
- ③ 松原紀嘉, 佐々木秀典, 渡辺均, 國分尚, 安藤敏夫, 市販ペチュニア品種のアントシアニン合成系の解析-黄花の成因-, 園芸学会平成 22 年度秋季大会、2011 年 9 月 25 日、岡山大学(岡山県)
- ④ 森田裕将, 中山真義, 安藤敏夫, Chalcone synthase 遺伝子の構造から示されるペチュニア園芸品種と原種の関係、園芸学会平成 22 年度秋季大会、2010 年 9 月 20 日、大分大学(大分県)
- ⑤ 武永充正, 松原紀嘉, 國分尚, 安藤敏夫, ペチュニア花冠における網目模様形成に関わる遺伝子、園芸学会平成 22 年度秋季大会、2010 年 9 月 20 日、大分大学(大分県)
- ⑥ 森田裕将, 伴雄介, 安藤敏夫, 中山真義, Chalcone synthase の構造から示されたペチュニア品種の形成における *Petunia inflata* の関与とピコティ形成に関わるゲノム構造の成立、園芸学会平成 22 年度春季大会、2010 年 3 月 22 日、日本大学(神奈川県)
- ⑦ 小川優理子, 安藤敏夫, 松原紀嘉, 渡辺均, 國分尚, ペチュニア品種の起源-*Petunia axillaris* の *Hf2* 遺伝子の活性-, 園芸学会平成 21 年度秋季大会、2009 年 9 月 26 日、秋田大学(秋田県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 敏夫(ANDO TOSHIO)
千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授
研究者番号：30026588

(2) 研究分担者

児玉 浩明 (KODAMA HIROAKI)
千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授
研究者番号:30026588

松原 紀嘉 (MATSUBARA KIYOSHI)
千葉大学・環境健康フィールド科学センター・助教
研究者番号:70512250

立澤 文見 (TATSUZAWA FUMI)
岩手大学・農学部・准教授
研究者番号:30320576
(H21~H22)