

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（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580026

研究課題名（和文）キキョウナデシコを主としたフロックス属の花色および遺伝子資源の解析

研究課題名（英文）Analysis of flower color and gene resources of *Phlox*, especially *P. drummondii*.

研究代表者

國分 尚（KOKUBUN HISASHI）

千葉大学・環境健康フィールド科学センター・准教授

研究者番号：20282452

研究成果の概要（和文）：フロックス属のキキョウナデシコ品種はシバザクラ品種に比べて色幅が広がったが、キキョウナデシコが6種類のアントシアニンを合成するのに対してシバザクラでは2種類のみであることが原因であった。キキョウナデシコ品種のシアニン系とマルビジン系色素の違いは F3'5'H 遺伝子の発現の差が原因であり、遺伝子の上流配列の違いによることが示唆された。シバザクラ品種の葉緑体 DNA の塩基配列から、品種の成立にはシバザクラ以外の種も関与している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed flower color and floral anthocyanin of the cultivars of *Phlox drummondii* and *P. subulata*, and found that *P. drummondii* showed wider variety of colors than *P. subulata*, and the cause was that *P. drummondii* produced six anthocyanidins while *P. subulata* did only two. The factor that differentiates cyanidin and malvidin derivatives in *P. drummondii* cultivars was the expression level of F3'5'H gene, and the *cis*-elements differed among three alleles. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA of *P. subulata* cultivars revealed the involvement of other species than *P. subulata*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：フロックス、シバザクラ、花色、アントシアニン合成系遺伝子

1. 研究開始当初の背景

フロックス属（*Phlox*）はハナシノブ科に属する1年草または多年草で、68種が北米に、*P. sibirica* 1種のみが北東アジアに分布している（Mabberley, 2008）。日本ではオイランソウ（クサキョウチクトウ、*P. paniculata*）とシバザクラ（*P. subulata*）の2種が古くから栽培され、品種も多く作出さ

れている。近年、キキョウナデシコ（*P. drummondii*）も栽培が増え、育種が盛んになっている。

特に、キキョウナデシコは秋まきすることで早春から開花させることができ、花色も豊富であるため、パンジー、プリムラ、キンギョソウ、ストックなど、比較的品目が限られる早春の花壇苗として期待されている。

これら春花壇用品目のうち、キンギョソウは分子生物学のモデル植物であり、多くの研究がなされている。また、パンジー・プリムラ・ストックは経済的な重要性から特に花色について報告が多い。これに対してキキョウナデシコは普及が近年であることから、学術的研究報告は多くない。

国内では種苗会社によるフロックス属の上記3種の育種は進んでいるが、種間雑種を利用した品種は未だに登場していない。また、オイランソウはうどん粉病に弱く、このために栽培が減りつつあり、耐病性育種が急務となっている。一方、近年の学術的研究については Enomoto et al. (2004)の花冠の発達に関するもののみである。

国外においても最新のモノグラフは1950年代のもの (Wherry, 1955, 1956)であり、一部の種についてはアメリカ東部の野生種の研究 (Ferguson et al., 1999; Ferguson and Jansen, 2002)があるが、属全体についての系統解析はまだ行われていない。植物生理学的観点からは数種について交雑親和性やうどん粉病耐性に関する研究が継続的になされているものの、フロックス属をまとめて扱った研究はない。

そこで、千葉大学園芸学部花卉園芸学研究室でペチュニア属について開発した遺伝子資源解析・利用学 (既に品種が成立している植物分類群の野生種をすべて収集し、野生種の系統解析や品種遺伝子の分子遺伝学研究を通して園芸的に重要な野生遺伝資源の開発や経済的育種に対する基礎情報を提供する学問)の手法を用い、フロックス属という新たな材料を解析する。これはフロックス属に関する知見を得るだけでなく、遺伝子資源解析・利用学が果たして普遍的にあらゆる植物分類群に適用できるかどうかを試すのに格好の研究である。

さらに、本研究を継続することでフロックス属全種が収集されれば半世紀にわたって更新されていなかったフロックス属のモノグラフが研究成果として発表され、植物学的新知見が得られることになる。

また、園芸品種との比較で進めていく研究なので、その成果は直ちに種苗業界に利用され、全く新しい品種群が作出される可能性もある。園芸産業界への貢献という点で意義のある研究であると考え。事実、ペチュニアにおいては千葉大学花卉園芸学研究室によるペチュニア研究開始後に品種の幅が広がり、より多くの消費者ニーズに対応できるよう

になった。

2. 研究の目的

フロックス属 (*Phlox*) はハナシノブ科の1年草または多年草で、日本ではクサキョウチクトウとシバザクラの2種が古くから栽培され、近年、キキョウナデシコも増えつつある。本研究ではこれらの花色素の構成と合成系遺伝子についての新知見を得ることを主な目的とする。

また、シバザクラ品種には形態的に他と大きく異なるものがあることから、葉緑体 DNAの塩基配列を用いて系統樹を作成し、形態と遺伝的系統の関連を調査する。

3. 研究の方法

(1) 市販品種と野生種の花冠アントシアニンの決定

- ・市販品種を育成し、花冠アントシアニン構成を分析する。同時にDNAを抽出しておく。一般に入手可能な日本とイギリスの種苗会社の品種については既に栽培を開始した。
- ・代表的なアントシアニン構成を持つ品種を数種選び、自家受粉および品種間交雑を行い、後代を育成する。後代については次年度以降アントシアニンの表現形を調査する。

(2) 市販品種のアントシアニン合成系遺伝子のPCRベースクローニング

- ・遺伝子データベースを検索し、既知のアントシアニン合成酵素のうち、特に重要と考えられるF3'HとF3'5'Hをコードする遺伝子塩基配列を入手する。これに基づいて保存領域の塩基配列から適当なプライマーを作成する。
- ・品種の花冠からRNAを抽出し、RT-PCR法によってフロックス品種の相同な塩基配列を増幅する。
- ・増幅断片をプラスミドに組み込み、塩基配列を決定する。
- ・(1)で決定した表現型の情報により、クローニングした遺伝子を優性・劣性に分類し、塩基配列とアミノ酸配列の分析によって劣性遺伝子の作用機作を推定する。
- ・遺伝子のコピー数確認のためサザンブロット解析を行う。また、劣性遺伝子の作用機作の確認のため、ノーザンブロット解析、RT-PCR解析を行う。
- ・品種からDNAを抽出し、遺伝子のゲノム塩基配列を決定する。

(3) シバザクラ品種の系統解析

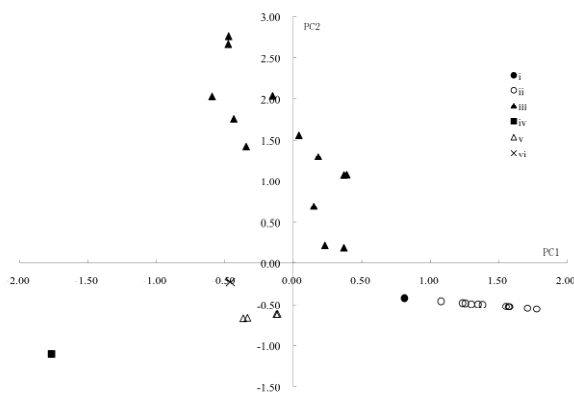
- ・シバザクラ品種を収集し、DNAを抽出する。
- ・野生種で調査されている葉緑体DNAの領域を増幅し、塩基配列を決定する。
- ・野生種の既知の配列とともに系統樹を作成

し、品種の成立過程を推定する。

4. 研究成果

(1) 埼玉県秩父市羊山公園に植栽のシバザクラ9品種と千葉大学園芸学部で栽培したキキョウナデシコ41品種およびシバザクラ30品種の花冠を採集し、抽出したアントシアニジンを HPLC 分析に供した。アントシアニジンは標品とのクロマトグラフィーで決定し、成分濃度データの主成分分析を行った。

花冠アントシアニンとして、シバザクラではシアニン(Cy)とデルフィニン(Dp)が、キキョウナデシコではペラルゴニン(Pg)、Cy、ペオニン(Pn)、Dp、ペチュニン、マルビジン(Mv)の6種類が検出された。成分濃度データの主成分分析により、品種は6グループに分類できた(第1図)。グループ i は Cy 100% であり、赤や桃色のキキョウナデシコ4品種とシバザクラ27品種が属した。グループ ii は赤から桃色で、Cy と Pn を含むが、Pn は最大 41% だった。グループ iii は赤から青紫で、Mv と Cy を主とし、Mv が 26–100%、Cy が 71–0% と様々な割合だったが、Dp や Pn は少なく、メチル化酵素の Dp に対する基質特異性が高いことが予想される。グループ iv は Pg 100% で、赤や桃色のキキョウナデシコ7品種が属した。グループ v は青紫から桃色のシバザクラ5品種で Cy と Dp のみを含み、メチル化の活性が全くない。グループ vi は白花、黄花17品種で、アントシアニジンを含まなかった。グループ iii の花色は赤から青紫と幅広いが、アントシアニンとの相関はあまりなく、アシル化や pH などの関与が示唆された。シバザクラ品種の花色の幅が比較的狭いのは、アントシアニン構成が単純であることが一因と考えられた。



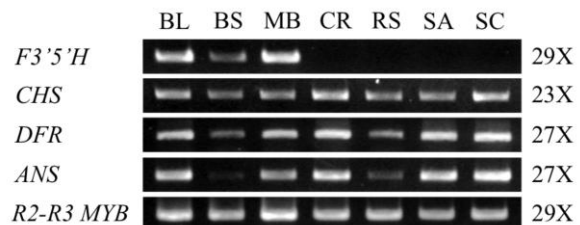
第1図 シバザクラとキキョウナデシコ花冠アントシアニン構成の主成分分析結果。各品種の第1、第2主成分得点による散布図。プロットの種類はアントシアニングループを示す。

(2) ペラルゴニンとシアニジンの合成を切り替える鍵酵素をコードする、F3'5'H のクローニングを目的とし、フロックス属が含まれるツツジ目植物の既知の F3'5'H ゲノム塩基配列から保存領域を

探し、プライマーを設計した。シアニジンを蓄積する品種の蕾から RNA を抽出し、逆転写酵素で合成した cDNA をテンプレートとして PCR 法によって目的の遺伝子を増幅後、塩基配列を決定した。結果として1つの塩基配列を得たが、この配列には保存領域が含まれず、同じファミリーに属する別の遺伝子をクローニングしたものと考えられた。

(3) 千葉大学園芸学部で栽培したキキョウナデシコのマルビジン系3品種 [‘21st Century Blue’ (BL)、‘21st Century Blue Star’ (BS)、‘Moody Blues’ (MB)]、シアニン系2品種 [‘21st Century Crimson’ (CR)、‘21st Century Rose Star’ (RS)]、ペラルゴニン系2品種 [‘21st Century Salmon’ (SA)、‘21st Century Scarlet’ (SC)] の開花前の花冠と若い葉を材料とした。既知の F3'5'H の部分塩基配列からプライマーを設計し、RACE 法によって cDNA 全長、制限酵素 *Nhe* I を用いた Straight Walk 法 (Straight Walk Kit、ベックス) によってコーディング領域 (CDS) の上流を含むゲノム塩基配列をそれぞれ決定し、RT-PCR による発現解析を行った。

BL の cDNA 塩基配列は GenBank の *Phlox drummondii* の F3'5'H と 99~98% の相同性があったため、F3'5'H と確認され、*Hc* アレルと名付けた。また、BL のゲノム塩基配列は2つのエクソンと659塩基のイントロンからなり、さらに CDS の上流 3268 塩基の配列も決定した。CDS の約 2000 塩基上流とエクソン内に BL の塩基配列からプライマーを設計し、ゲノム PCR 解析を行ったところ、マルビジン系3品種に共通の長いバンドがあり、赤花4品種には共通の短いバンドがあった。また、MB、RS、SC はバンドが2本見られた。シーケンス解析により、マルビジン系品種に共通のバンドは *Hc* アレルと一致し、赤花に共通のバンドのうち、CR と SA では CDS 上流に2か所の塩基置換が見られた他は互いに相同であり、これを *hc-1* アレルと名付けた。RS、SC の長いバンドは *Hc* に似ていたが、CDS 上流で3か所の欠失が見られたため、これを *hc-2* アレルと名付けた。*Hc*、*hc-1*、*hc-2* の CDS を比較すると4アミノ酸残基の非同義置換があったが、indel は見



第2図 キキョウナデシコ品種の花冠におけるアントシアニン合成系遺伝子の RT-PCR 発現解析。品種名は本文参照。右の数字は PCR サイクル数を示す。

られなかった。*cis* エレメントでは塩基の置換、挿入や欠失が確認された。RT-PCR 発現解析によって、シアニジン系およびペラルゴニジン系品種においてはF3'5'Hの発現が見られなかったため(第2図)品種においても *cis* エレメントの変異が赤花と青花の違いを決定する要因であると考えられた。また、*Hc hc-1* ヘテロの個体を自家受粉し、後代の遺伝子型と色素を調べたところ、*Hc*ホモと*Hc hc-1*ヘテロの個体はマルビジンを、*hc-1* ホモの個体はシアニジンをそれぞれ蓄積し、遺伝子型と表現型が一致した。*Hc hc-2* ヘテロ個体についても同様の実験を継続中である。

(4) シバザクラ品種の起源を探るため、シバザクラ 39 品種の葉緑体 DNA 遺伝子間領域 (*trnL-F*) の塩基配列を決定し、Genbank に登録されているフロックス属 33 種の配列とともに最節約法による系統解析を行ったところ、シバザクラ品種は8グループに分けられ、内3グループはシバザクラとは別種 (*P. bifida*, *P. douglasii*, *P. nivalis*, *P. oklahomensis*) の葉緑体 DNA に近い配列をもつことが判明し、「シバザクラ」とされる園芸品種の一部は予想以上に複雑な成立過程を経ていることが推察された。

(5) 研究代表者の健康状態により、野生種の収集ができなかった。しかし、キキョウナデシコとシバザクラの品種に関しては多くの知見を得られた。特に、シバザクラ品種の花変異が比較的少ないことと、その原因がアントシアニジンがシアニジン、デルフィニジンの2種のみであることが判明したのは今後の育種に向けて有用な情報である。また、野生種と同様にキキョウナデシコの品種においてシアニジン/ペラルゴニジンとデルフィニジンの合成経路の決定には F3'5'H の転写量が関与していることが判明し、新たな知見としてF3'5'Hの3つの対立遺伝子において、*cis* エレメントの配列に違いが見られた。今後はフロックス属野生種およびクサキョウチクトウについて研究を継続する。

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1件)

- ① 國分尚、宮竹悠佳、フロックス属の遺伝資源解析:シバザクラとキキョウナデシコ品種のアントシアニジン構成、園芸学研究、査読無、9巻(別冊1)、2010、423

[学会発表] (計1件)

- ① 國分尚、宮竹悠佳、フロックス属の遺伝資源解析:シバザクラとキキョウナデシコ品種のアントシアニジン構成、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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國分 尚(KOKUBUN HISASHI)

千葉大学・環境健康フィールド科学センター・准教授

研究者番号: 20282452

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者