

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05559

研究課題名(和文)クサキョウチクトウ品種の可逆的花色変化に関する研究

研究課題名(英文) Reversible, diurnal red shift of corolla color in blue cultivars of *Phlox paniculata* (Polemoniaceae)

研究代表者

國分 尚 (Kokubun, Hisashi)

千葉大学・大学院園芸学研究院・准教授

研究者番号：20282452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：クサキョウチクトウ青色品種は1つの花の寿命である1週間程度の間、環境条件によって青紫と赤紫の間で可逆的花色変化する。本研究により概日リズムは否定され、すべての青色品種で17°Cの低温・暗黒で青紫に、30°Cの高温・照明下で赤紫になった。花弁抽出液のpHは色調の変化とともに変化し、青紫の時にpH5.8よりも高くなった。赤花品種でもpHは変化したが最大5.7で、花色変化しない要因の一つと考えられた。RNA-seqによって青紫と赤紫の花弁における遺伝子発現を比較したところ、液胞pHの調節に関与するPHX2のホモログが発見され、その発現は赤紫花冠では青紫花冠に比べて発現量が4分の一以下に減少していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、環境を調節することでpHを任意に設定できれば、クサキョウチクトウが水素イオントランスポーター遺伝子などを始めとするpH調節のモデル植物となり、この分野の学術的発展に繋がる可能性が示された。また、環境条件によって花色が変わる性質を抑制することで、常に安定した青色を発現する品種の開発が可能になるだけでなく、逆にこの性質を強めることで、室温によって色が変化し、冷房の効きすぎを警告するなど温度の目安にもなる品種の開発につながる。また、本研究の副産物として得られたトランスクリプトームの情報は今後のフロックス属の分子遺伝学的研究の基礎資料として有用である。

研究成果の概要(英文)：Phlox paniculata blue cultivars exhibit reversible flower color change between red and blue within a day. The results showed flower color and petal extraction pH did not change under constant environmental conditions, and the petal extraction pH of blue cultivars were classified into three types according to the reaction to the environmental factors: (1) light only, (2) light and temperature, (3) synergistic effects of light and temperature. The red and white cultivars did not visually change flower color, but their petal extraction pH values changed similarly to the blue cultivars although the range of pH differed in red cultivars. We conclude that reversible flower color change in *P. paniculata* is not dependent on circadian rhythms, but influenced solely by the environment. The RNA-seq result revealed an NHX2-like gene that showed 4-fold expression difference between blue and red petals of 'Blue Paradise.'

研究分野：観賞園芸学

キーワード：可逆的花色変化 液胞pH アントシアニン

1. 研究開始当初の背景

クサキョウチクトウは宿根フロックス・オイランソウとも呼ばれるハナシノブ科フロックス属の宿根草で、近年、園芸的利用が増加するのに伴い品種の多様化、特に花色の拡大が求められている品目である。花色は緑・白・朱赤・紅・紫・青紫と幅広いが、黄色や橙色の暖色系の色と黒に近い濃い赤や紫、ツユクサのような純粋な青色が欠けている。本研究課題では花き園芸での通例に従い青紫を「青色」として記述する。

クサキョウチクトウの青色品種は1日のうちでも時間帯や天気によって青と赤紫の間で色調が変化することが観察されており (Harmer et al., 2001, Phlox, The Hardy Plant Society, p. 8) ウェブ上でも趣味家がしばしば報告している。

花色の変化は多くの花で知られるが、通常は不可逆的なもので、開花当日とその後で変化するスイフヨウやニオイバンマツリなど多くの例があり、また花の老化に伴って変化するバラのブルーイングなどがよく知られている。ところが、クサキョウチクトウの場合は同じ花が開花初日からしおれるまで、1日のうちに青から赤に変化し、翌日も同じ変化を繰り返す可逆的なものであり、他には数種の植物でしか知られていない非常に独特な現象である。また、天気や気温にも影響され、雨天時には昼間でも赤くならなかったり、雨天でも気温が高ければ赤くなる。

可逆的花色変化の唯一の研究例として、ナス科植物 *Calibrachoa pygmaea* では同じ花が夜には黄色で昼は白くなり、概日リズムによるカロテノイド合成・分解酵素の制御が原因とされる (村岡ほか 2017, 園芸学研究 16 別 2: 543) が、色素そのものの有無による有色と白色の変化であり、本研究のように同じ花が着色した状態で別の色に変化する現象とは異なる。

本研究で問いたいのは「クサキョウチクトウ青色品種の独特な可逆的花色変化がどのようにして起きるのか」であるが、逆に言えば赤色品種ではなぜ可逆的花色変化が起きないのか、また、他の植物で起きないのはなぜかとも言い換えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的はこの問いに対する答えを、(1) 環境要因、(2) 花色変化を担う色素構成・液胞 pH などの生理的要因、(3) 色素合成・pH 調節遺伝子の発現の3段階で明らかにすることであり、他の植物ではほとんど例のない可逆的花色変化を扱うところに独自性がある。また、園芸的によく知られ、個人の庭や公園でも頻繁に植栽され、豊富な花色を有するクサキョウチクトウの花色素の研究例が少ないことは特筆すべきで、そこに焦点を当てた点にも独自性がある。本研究の結果、環境を調節することで pH を任意に設定できれば、クサキョウチクトウが水素イオントランスポーター遺伝子などを始めとする pH 調節のモデル植物となり、この分野の学術的発展に繋がる可能性がある。また、環境条件によって花色が変わる性質を抑制することで、常に安定した青色を発現する品種の開発が可能になるだけでなく、逆にこの性質を強めることで、室温によって色が変化し、冷房の効きすぎを警告するなど温度の目安にもなる品種の開発につながる独創性も備えている。

3. 研究の方法

材料

以下のクサキョウチクトウ品種を実験に供した。

青色7品種 ‘Alexandra’, ‘Blue Paradise’, ‘Goliath’, ‘Jeff’s Blue’, ‘Ocean’, ‘Swizzle Blue’, ‘Violet Flame’

赤色3品種 ‘Orange Perfection’, ‘Tequila Sunrise’, ‘Watermelon Punch’

白色3品種 ‘Fujiyama’, ‘White Flame’, ‘White Admiral’

実験1. 花色および花弁 pH に与える光と温度の影響

概日リズムの影響を調査するため、各品種を24時間明期、17 および24時間暗期、17 の人工気象室に入れ、花色・花冠抽出液 pH を3時間毎に調査した。花色は色彩色差計を用い、花冠抽出液 pH は採集した花冠を1.5ml エッペンチューブ内で破碎し、純水を加えたのち、15,000rpm 1min で遠心し、上清を別のチューブに移して pH を計測した。

また、品種ごとの環境条件への反応を調査するため、気温 17, 20, 25, 30、暗黒または PAR

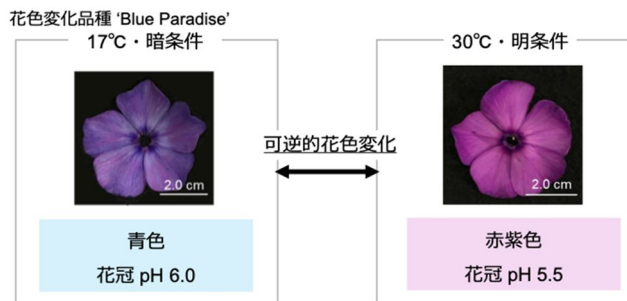


図1 クサキョウチクトウ青色品種の可逆的花色変化

10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の照明下の人工気象室に3時間以上置いた後に花色・花冠抽出液 pH を計測した。

実験2 . pH による吸収スペクトルの変化

各品種の花冠からメタノール:酢酸:水=9:1:10 の溶媒により抽出した色素をカラムクロマトグラフィーによって精製・乾燥して固体(粉末)化し pH 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2 の溶液に溶解し、分光光度計によって吸収スペクトルを測定した。

実験3 . 遺伝子の網羅的発現解析

‘Blue Paradise’ を 17 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 暗黒および 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 照明の人工気象室に12時間置き、それぞれ青色と赤紫色になった花冠から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて RNA-Seq 解析を行った。

得られたトランスクリプトームは7つのデータベース(GO, UniProt, blast to Non-redundant Protein, Pfam, EggNOG, blast to Nucleotide, KO_EUK)によって gene ontology 解析を行った。

実験4 . pH 関連遺伝子の発現解析

他の植物で発見された pH 関連遺伝子、とくに水素イオントランスポーター遺伝子をデータベースから検索し、相同な遺伝子をクサキョウチクトウから単離する。この遺伝子について、リアルタイム PCR 法によって青色品種の色が青から赤、赤から青に変化する環境条件で経時的に発現を調べることで、色変化の機構を推定する。

実験5 . 色素合成系遺伝子の単離

実験3で得られたトランスクリプトームとフロックス属のキキョウナデシコで単離された色素合成系遺伝子 (Hopkins et al. 2011, Nature 469: 411) の情報から、相同な遺伝子をクサキョウチクトウから単離し、青色品種と赤色品種を決定する遺伝子を推定する。

4 . 研究成果

実験1

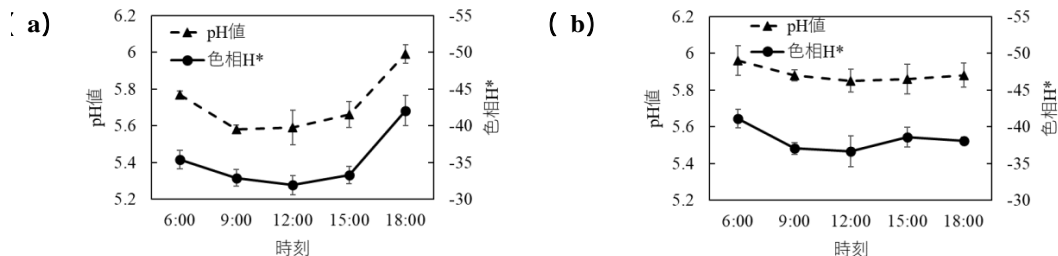


図2 ‘Ocean’ 花冠の花色・花冠抽出液 pH の3時間毎の変化
(a) 晴天時の無加温・温度なりゆきの温室内
(b) 17 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 24時間照明の人工気象室内

環境制御のない温室内では図2(a)のように1日のうちに花色・花冠抽出液 pH に変化があったが、24時間暗期(データ省略)および24時間明期[図2(b)]の人工気象室に入れると花色・pHともに変化をしなくなった。従って、花色変化が概日リズムによらないことがわかった。

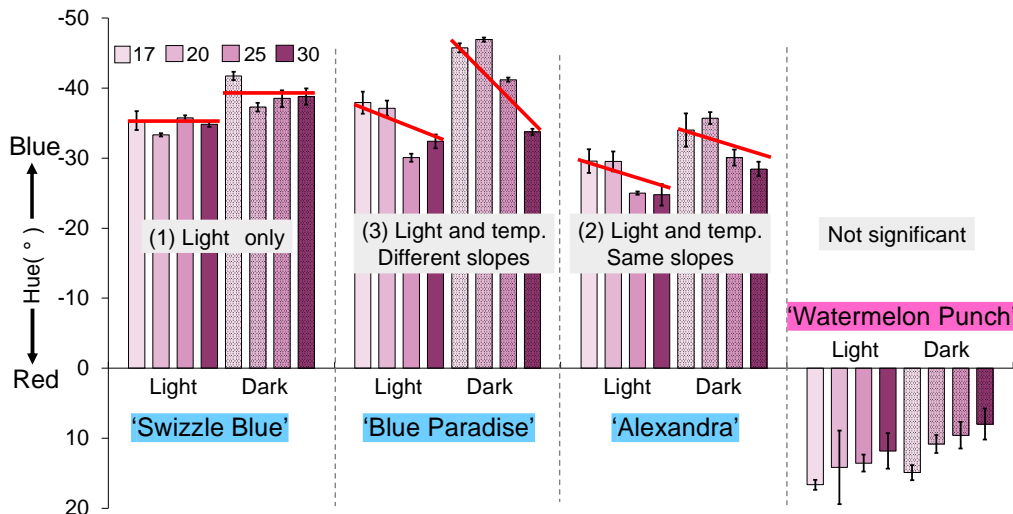


図3 温室から異なる環境条件に移動して3時間静置後の花色

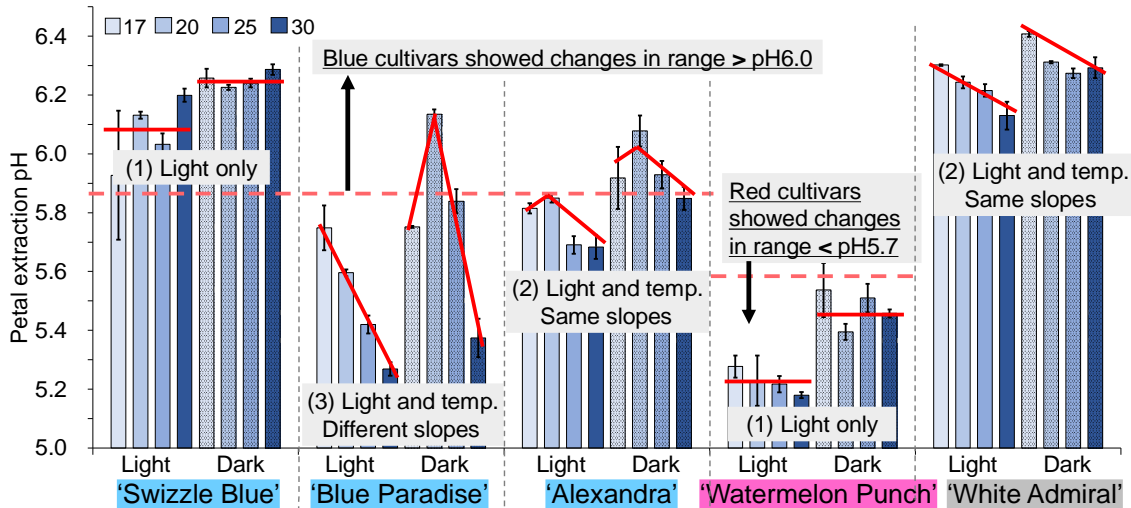


図4 温室から異なる環境条件に移動して3時間静置後の花冠抽出液 pH

人工気象室の温度を 17、20、25、30 °C の 4 水準、光条件を明条件と暗条件の 2 水準とし、植物体搬入 3 時間後に花色と花冠抽出液 pH を比較したところ、青色品種の環境応答は図 3、4 に示したとおり 3 つのタイプに分かれた。(1)光のみが要因、(2)光と温度が要因、(3)光と温度が要因で相乗効果がある。花冠抽出液 pH の変化もこの 3 つのタイプに分かれた。

赤色品種、白色品種も花色は目視では変化しないが花冠抽出液 pH 値は変動し(図 4 ‘Watermelon Punch’, ‘White Admiral’) 赤花品種では青花の最低値よりも低い範囲で変動していた。

以上より可逆的花色変化は概日リズムによらず、その場の環境に影響を受け、花色が変化することが示唆された。青色品種だけでなく、赤色品種や白色品種でも花冠抽出液 pH が変動していることからクサキョウチクトウがもつ性質として環境により花冠抽出液 pH 値が変動し、青花は高 pH の範囲で変化することによってアントシアニンによる花色が変化することが示唆された。花色と花冠抽出液 pH は品種ごとに同パターンで変化をしていたが、花色と花冠抽出液 pH 値の変化が一致しない品種があった。この特殊な例では花冠 pH 以外の要因も花色に影響していると示唆された。

実験 2

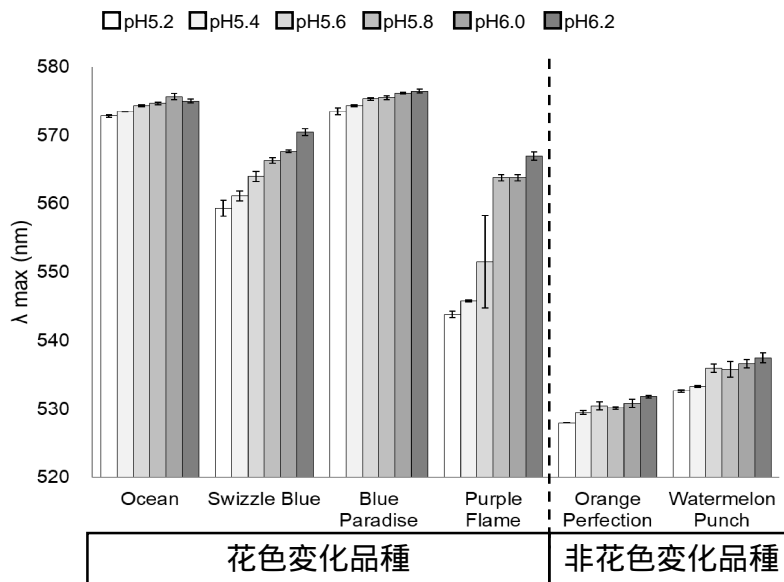


図5 抽出・固体化した花冠色素を異なる pH の溶媒に溶解後の分光光度計による吸収極大波長の変化

花冠から抽出した色素は pH が上がると吸収極大波長(λ_{max})が長くなり、色調が青方向に変化することが判明した(図 5)。ただし、品種によっては λ_{max} の変化はわずかであり、実際に色素溶液を目視しても色調の変化がわからない品種もあった。

このことはアントシアニンの種類と pH 以外にも花色変化の要因がある可能性を示している。

ただし、今回測定した花冠抽出液の pH とアントシアニンが存在している花冠表皮細胞の液胞の pH が同じであるとは限らないため、液胞 pH を直接計測する必要がある。また、コピグメンテーションによる花色変化を考慮した場合、青色花冠と赤紫花冠のアントシアニンとフラボン等の存在比を調査する必要がある。

赤花品種については、計測した pH の範囲において青花品種の最も短い max よりも短い波長の範囲で変化しており、pH が青花より低いことに加えて色素自体の色調もより赤いことが判明した。

実験 3

クサキョウチクトウはモデル植物でないため、参照配列を新規に作成した。2 サンプルを合わせて 84,700,518 塩基 (GC 比 41.4%) が 129,642 のユニゾンとしてアセンブルされた。このうち 40,931 コンティグ (31.57%) は 7 つのデータベースのいずれかで gene ontology 解析ができ、GO によると 7.9% が biological process、9.1% が cellular component、8.3% が molecular function に分類された。

この参照配列に対し発現解析を行ったところ、10,349 コンティグが青花と赤紫花で発現量が 2 倍以上異なるもの ($p < 0.05$) として抽出された。

実験 4

実験 3 で得られたトランスクリプトームに対し、セイヨウアサガオの *1tNHX1* 遺伝子の塩基配列を用いて local blast 検索を行ったところ、c63371_g5_i1 コンティグが候補遺伝子として抽出された。このコンティグは青色花冠での発現量に対し赤紫花冠では 4 分の 1 以下 ($2^{-2.19}$ 倍) の発現量であった。

このコンティグと GeneBank から検索した NHX ファミリー遺伝子の塩基配列の系統樹を作成したところ、c63371_g5_i1 は液胞に局在する遺伝子のクレード (NHX2) に含まれた。従って、このコンティグが NHX の相同遺伝子であると推定され、*PpNHX2-like* と命名した。

2024 年の開花期にこの遺伝子の発現と液胞 pH、花色との相関を調査する予定である。

実験 5

実験 3 で得られたトランスクリプトームに対し、複数の植物の flavonoid 3 -hydroxylase (F3 H) 遺伝子の塩基配列を用いて local blast 検索を行ったところ、c61241_g1_i1 コンティグが候補遺伝子として抽出された。GenBank から F3 H を検索し、このコンティグを含めた系統樹を作成したところ、このコンティグはキク科 *Osteospermum* のものと最も近く、他のキク群の種と同一クレードになったため、F3 H の相同遺伝子である可能性が高い。Hopkins et al. (2011) において *Phlox drummondii* の F3 H 遺伝子以外の主要なアントシアニン合成系遺伝子がクローニングされていたが、F3 H は未知であり、今回初めてフロックス属における F3 H 遺伝子候補が見つかった。

今後はこの配列が実際に F3 H をコードしているか検証し、そうであればこの配列を元に SNP を検索し、アントシアニジンであるペラルゴニジン、シアニジン、デルフィジニンをそれぞれ合成する個体を判別する遺伝子マーカーなどに利用していく予定である。

結論

クサキョウチクトウ青色品種の可逆的花色変化は概日リズムによらず、温度と光の環境要因によって起きていた。

低温・暗黒で青色に、高温・光照射で赤紫になるが、光のみが影響する品種と光と温度両方が影響する品種があり、光と温度両方が影響する品種の中には 2 つの因子の交互作用が存在するものもあった。

花色の変化と花冠抽出液の pH は概ね相関があり、青色の時は pH5.8 以上、赤紫の時はそれ未満の値を示した。また、赤花品種や白花品種でも pH の変化が見られたことから、温度・光環境による花冠 pH の変化はクサキョウチクトウに普遍的に存在する現象と考えられた。

花冠から抽出した色素を pH5.2 から pH6.2 の緩衝液に溶解して吸収極大波長を調べたところ、pH による吸収極大波長の変化は観察されたが、花色変化をこれだけで説明することはできなかった。

RNA-seq 解析の結果、*NHX* 遺伝子の相同配列の発現量が青色花冠と赤紫花冠で異なり、pH を変化させる直接の遺伝子の候補とすることができた。

現在までフロックス属で確認できなかった flavonoid 3 -hydroxylase (F3 H) 遺伝子の相同配列が発見できたことで、今回得られたトランスクリプトームの基礎資料としての有用性が証明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamada, Seishiro; Kokubun, Hisashi; Miyoshi, Kazumitsu
2. 発表標題 Analysis of reversible flower color change in Phlox paniculata cultivars
3. 学会等名 IV Asian Horticultural Congress - AHC2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究協力者	三吉 一光 (Miyoshi Kazumitsu)	千葉大学・大学院園芸学研究院・教授 (12501)	

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