

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 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：17601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580007
 研究課題名（和文） ダッチアイリスにおけるアントシアニン生合成機構の解明とその育種的利用
 研究課題名（英文） Study on the mechanism of anthocyanin biosynthesis and flower color breeding of Dutch iris
 研究代表者
 藪谷 勤（YABUYA TSUTOMU）
 宮崎大学・農学部・教授
 研究者番号：70112414

研究成果の概要（和文）：ダッチアイリスのアントシアニン生合成機構を解明し、その成果を育種に利用するために本研究を実施した。その結果、まずアヤメ属では新規のマロニル化アントシアニンやアセチル化フラボンの存在を推定した。次に、アントシアニン生合成に関与している *DFR* および *3RT* 遺伝子などを単離・解析し、*CHS* および *5GT* 遺伝子のペチュニアへの導入にも成功した。さらに、*DFR* 遺伝子のプロモーター領域へのレトロトランスポゾンの挿入が外花被の白色化を誘導する可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, to promote flower color breeding of the *Iris* garden species, anthocyanins, flavones and anthocyanin biosynthetic genes of Dutch iris (*Iris x hollandica*) cultivars were characterized. Malonate anthocyanins of delphinidin3pCRG5G, petunidin 3pCRG5G, malvidin3pCRG5G and acetylated C-glycosyl flavones were presumed as novel pigments in the genus *Iris*. As anthocyanin biosynthetic genes, full length of *DFR* genes (gDNA) and cDNA homologues of *3RT*, *F3' 5' H*, *CHI* genes were isolated. In addition, transgenic petunia lines with *CHS* or *5GT* genes isolated from the cultivar, 'Blue Diamond' were obtained by *Agrobacterium* methods and were characterized. Finally, the defect or reduction of *DFR* gene expression in outer perianths of the cultivars 'White Wedgewood' and 'Surprise' were presumed to be caused by insertions LTR-like retrotransposons into promoter regions of their *DFR* genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物育種学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：ダッチアイリス、アントシアニン、フラボン、アントシアニン生合成遺伝子、*CHS* 遺伝子、*5GT* 遺伝子、ペチュニア形質転換体、外花被の白色化

1. 研究開始当初の背景

花卉類における最も重要な育種目標は新規花色の開発であり、その代表的な色素がア

ントシアニンである。双子葉類におけるアントシアニンの生合成遺伝子に関する報告は数多くあるにもかかわらず、単子葉類のもの

は極めて少ない。また、単子葉類の代表的な園芸種であるダッチアイリスでは、新規アントシアニンやフラボンの存在が示唆されている。そこで、本種におけるアントシアニン生合成遺伝子の単離・解析によるアントシアニン生合成機構の解明とその育種の利用に向けて、今が絶好の機会と捉え、本研究を実施した。

2. 研究の目的

- (1) ダッチアイリスにおける新規のアントシアニンおよびフラボンを探索する。
- (2) ダッチアイリスにおける新たなアントシアニン生合成遺伝子を単離・解析する。
- (3) 既に単離したダッチアイリスのカルコン合成酵素遺伝子 (*IhCHS*) およびアントシアニン 5-*O*-グルコシル基転移酵素遺伝子 (*5GT*) をアグロバクテリウム法によりペチュニア品種「ブリエッタ・バイオレット」に導入し、形質転換体を獲得する。
- (4) ダッチアイリスの白色花品種「ホワイト・ウエッジウッド」および複色花品種「サプライズ」における外花被の白色化はジヒドロフラボノール 4-還元酵素遺伝子 (*DFR*) 発現の欠損または顕著な低下が関係していることが既に明らかにされている。そこで、このような遺伝子発現の原因を解明するために、青紫花品種「ブルーダイヤモンド」を加えた 3 品種の *DFR* 遺伝子 (gDNA) およびその 5' 上流領域を単離・解析する。

3. 研究の方法

- (1) ダッチアイリス品種「ブルーダイヤモンド」および「照紫」における外花被含有アントシアニンの HPLC 分析を行い、その特性を比較検討する。アントシアニンの同定は、両品種の外花被より得られた粗色素液を HP-20 カラムに吸着後水洗し、酢酸で溶出する。その溶出液を PC で分離し、各アントシアニン成分を減圧・乾固させる。これらを酢酸に溶解し、分取 HPLC で精製する。精製された未同定の各アントシアニン成分は、LC-MS によ

り同定した。また、上記の方法に準じて、フラボンの新規成分も探索した。

- (2) アントシアニン生合成遺伝子のうち、カルコン異性化酵素 (*CHI*) およびフラボノイド 3' 5' 水酸化酵素遺伝子 (*F3' 5' H*) の単離は、キンギョソウから得られた既知遺伝子のプローブなどを用いたダッチアイリス品種「ブルーダイヤモンド」花蕾由来の cDNA ライブラリーからのプラークハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。また、UDP ラムノース : アントシアニジン 3-*O*-グルコシドラムノシルトランスフェラーゼ (*3RT*) およびアントシアニンマロニルトランスフェラーゼ (*AaT*) 遺伝子の単離は「ブルーダイヤモンド」の花蕾から全 RNA を抽出し、ペチュニアの *3RT* 塩基配列から作成したプライマーを用いた RT-PCR 分析により、スクリーニングした。

- (3) 植物材料として、ペチュニア品種「ブリエッタ・バイオレット」を供試した。ダッチアイリス *IhCHS* または *Ih5GT* 遺伝子のペチュニアへの形質転換実験では、アグロバクテリウム菌系 EHA105/pBCHS または EHA 105/pB5GT を用いた葉片培養を行い、得られた再生植物体における *IhCHS* または *Ih5GT* 遺伝子およびアグロバクテリウムの *virG* 遺伝子の特異的プライマーを用いた PCR 分析により、形質転換体の確認を行った。さらに、獲得したペチュニア形各質転換体と非形質転換体の「ブリエッタ・バイオレット」における花色を色差計により測定するとともに、花卉含有アントシアニンおよびフラボノールを HPLC で分析した。

- (4) 白色品種「ホワイト・ウエッジウッド」、複色品種「サプライズ」およびの青紫品種「ブルーダイヤモンド」の 3 品種を用いて、既に単離されている *IhDFR* cDNA を鋳型として nested PCR および inverse PCR 分析を行い、

DFR 構造遺伝子とその 5' 上流領域配列を単離し、各配列の比較解析を行った。

4. 研究成果

ダッチアイリスにおけるアントシアニン合成機構の解明とその育種的利用に向けて本研究を実施した。得られた研究成果は以下の通りである。

(1) 色素分析により、デルフィニジン 3-(*p*-クマロイルルチノシド)-5-グルコシド (Dp3 μ CRG5G)、ペチュニジン (Pt) 3 μ CRG5G およびマルビジン (Mv) 3 μ CRG5G が同定された。また、分子量からデルフィニジン 3-(カフェオイルルチノシド)-5-グルコシド (Dp3CRG5G)、マロニル Dp3CRG5G およびマロニル Dp3 μ CRG5G が推定された。このように、*p*-クマル酸とマロン酸の 2 種類の有機酸によるポリアシル化アントシアニンが推定されたのはアヤメ属では最初である。さらに、4 種の新規のアセチル化 C-グリコシルフラボンの存在が推定された。このような新規の色素は、花色の多彩化育種に有用である。

(2) 本実験では、*IhF3' 5' H*、*IhCHI1*、2 および *Ih3RT* の cDNA クローンを単離した。*IhF3' 5' H* は他植物種の F3' 5' H と高い相同性を有するほぼ全長の cDNA クローンであり、1,347bp で構成され、350 のアミノ酸をコードしていた。そこで、*IhF3' 5' H* と他植物種 F3' 5' H との間で推定アミノ酸配列を比較したところ、*IhF3' 5' H* はシトクロム P450 に特異的なヘム結合領域及び F3' 5' H の C 末端側に 5' 位の水酸化に重要なセリン残基を保存しており、花蕾や花での遺伝子発現も確認されたので、F3' 5' H 遺伝子であることが推定された。また、*IhCHI1* (411 bp) および *IhCHI2* (306 bp) の 2 つの cDNA クローン断片は、既知遺伝子との推定アミノ酸配列の比較によりナリングニン結合残基を有していたので、両 cDNA クローン断片は *CHI*

ホモログであると推定した。さらに、*Ih3RT*

(1, 297 bp) は機能が確認されている既知の *3RT* 遺伝子と 99% の極めて高い相同性を有することから、*3RT* cDNA ホモログ断片とみなした。これに対して、ポリアシル化遺伝子の *MaT* に関してもクローニングを試みたが、単離するまでには至らなかった。現在、単離された各 cDNA ホモログ断片については 5' RACE および 3' RACE 法などにより全長 cDNA クローンの獲得を試みている。

(3) *IhCHS* のペチュニアへの形質転換実験では、形質転換体と確認した 14 系統 (T-CHS-1~14) と「ブリエッタ・バイオレット」(非形質転換体) との間で花色(紫)に関して比較観察を行ったが、両者の間に顕著な差異は認められなかった。また、花色の明度および色度についてみると、各形質転換体系統の L*値は非形質転換体と比較して特定の傾向が見られなかったが、いずれの形質転換体系統も非形質転換植物体より a*値および b*値とも低下する傾向があった。次に、アントシアニンの分析結果についてみると、形質転換体系統と非形質転換体の間で特定のアントシアニン成分に関して顕著な差異はなく、また T-CHS-13 を除いたすべての形質転換体系統のアントシアニン量は、非形質転換体よりも低下していたが、系統間の分散分析では有意差が認められなかった。一方、各形質転換体系統のフラボノール量は、非形質転換体よりも有意に低下した。さらに、すべての形質転換体系統では *IhCHS1* 遺伝子の発現が確認されたものの、その発現程度は低いことが明らかになった。以上のことから、本形質転換体系統ではダッチアイリス由来の *IhCHS1* の発現力が弱いために、花色やアントシアニン量に明らかな変化が生じなかったものと考えられる。

一方、*Ih5GT* 遺伝子のペチュニアへの形質転換実験では、形質転換体 14 系統 (T-5GT1~

14)と「ブリエッタ・バイオレット」との間で花色について比較したところ、両者とも紫を発現し、顕著な差異は確認できなかった(図 1)。そこで、両者の花色についてより詳細に比較するために、色差計を用いた花卉色彩の分析を行ったところ、すべての形質転換体系統において、非形質転換体と比較し、b*値の増加傾向、すなわち青味の減少が見られたものの、明度および色度の分散分析では、各系統(全形質転換系統およびコントロール品種「ブリエッタ・バイオレット」)間に有意差が認められなかった。



図 1. ペチュニア形質転換体

A: コントロール品種「ブリエッタ・バイオレット」、B: ダッチアイリス 5GT 遺伝子を導入した形質転換系統「T-5GT-13」、バーは 1 cm を示す。

ペチュニアの 5GT がアントシアニン 3RG ではなくアントシアニン 3pCRG を基質として利用するが、ハナショウブの 5GT はアントシアニン 3pCRG ではなく、アントシアニン 3RG を基質として利用することが既に明らかにされている。従って、ダッチアイリスの *Ih5GT* 遺伝子を導入したペチュニア形質転換系統では、ペチュニア品種では生産できないアントシアニン 3RG5G の発現が期待できる。そこで、アントシアニンの HPLC 分析結果に

ついてみると、各形質転換体系統におけるアントシアニン組成は、非形質転換体と比較して明らかな差異が認められず、また形質転換体系統でのみ生成が期待されるアントシアニン、Mv3RG5G および Pt3RG5G のピークは検出されなかった。さらに、アントシアニン量およびフラボノール量に関しても分散分析を実施したが、各系統(全形質転換系統および「ブリエッタ・バイオレット」)間に有意差は認められなかった。このように、本実験の各形質転換体系統では、非形質転換体と比較して花色、アントシアニン組成、アントシアニン総量およびフラボノール総量とも明白な差異が認められなかった。そこで、RT-PCR を用いて、各形質転換系統におけるダッチアイリスの *Ih5GT* 遺伝子の転写確認を行った。その結果、各系統における発現程度には差異があるものの、T-5GT-3 を除いた全ての形質転換系統の葉および花蕾において *Ih5GT* 遺伝子の発現を確認した(図 2)。

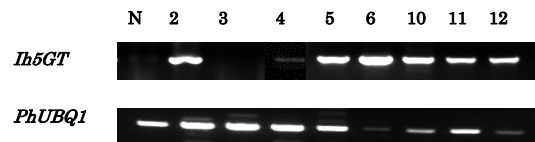


図 2. ペチュニア形質転換系統の花におけるダッチアイリスの *Ih5GT* 遺伝子の発現。

N: ネガティブコントロール、2-6, 10-12: ペチュニア形質転換系統、*PhUBQ1*: ローディングコントロールとして用いたペチュニアのユビキチン遺伝子

先に述べたように、ハナショウブの 5GT はアントシアニン 3pCRG ではなく、アントシアニン 3RG を基質として利用するが、ペチュニアでは 3AT がアントシアニン 3RG を基質として利用するので、ペチュニア形質転換体系統では同一の基質に対して 5GT と 3AT の間で競合している可能性が高い。それ故、ダッチアイリス 5GT の発現がペチュニア形質転換体系統で確認されているにもかかわらず、

Mv3RG5G および Pt3RG5G が検出されなかった原因として、ダッチアイリス 5GT よりもペチュニアの 3AT の方が Mv3RG および Pt3RG に対して優位に触媒したものと推察される。以上のことから、本研究のペチュニア形質転換体系統ではダッチアイリス由来の Ih5GT が発現したものの、アントシアニンの生産に関与できなかったため、花色やアントシアニン成分や量に明らかな変化が生じなかったものと考えられる。従って、今後はペチュニアの 3AT 遺伝子の劣性突然変異系統の利用や Ih5GT と 3AT RNAi を導入した二重形質転換系統を獲得することにより、ペチュニアが有していない Mv3RG5G および Pt3RG5G を生産することが期待される。

(4) 青紫花品種「ブルーダイヤモンド」で単離されている *DFR* 遺伝子 (*IhDFR* cDNA) を鋳型として nested PCR を行い、「ブルーダイヤモンド」、白色花品種「ホワイト・ウエッジウッド」および複色花品種「サプライズ」における *DFR* ゲノム遺伝子 (*IhDFR* gDNA) を単離した。その結果、単離された各品種の *DFR* ゲノム遺伝子が 5 つのエキソンからなる 1,086 bp の ORF と、4 つのイントロンから構成されており、そのエキソン数は植物種間で 4~6 に変異していた (表 1)。また、ダッチアイリスの各 *DFR* ゲノム遺伝子は *DFR* 遺伝子発現の欠損につながるナンセンス変異やフレームシフト変異を有していなかった。従って、「ホワイト・ウエッジウッド」および「サプライズ」における *DFR* 遺伝子の発現が欠損または著しく低下することに、*DFR* 遺伝子自体の構造変異は関与していないことが確認された。

そこで、両品種における *DFR* 遺伝子の発現が異常な原因を解明するために、その 5' 上流領域の単離・解析した。その結果、「ブルーダイヤモンド」はプロモーター領域にレトロトランスポゾンが挿入した *DFR* 遺伝子と未

挿入の *DFR* 遺伝子の両方を有していたが、「ホワイト・ウエッジウッド」や「サプライズ」ではレトロトランスポゾンが挿入した *DFR* 遺伝子のみが検出された。このことから、両品種における *DFR* 遺伝子発現の欠損または低下による外花被の白色化はレトロトランスポゾンの挿入によるものと推察された。

表 1. *DFR* 遺伝子 (gDNA) に関するダッチアイリスと他植物種との比較

植 物	E1*	I1*	E2	I2
シロイヌナズナ	118	91	170	79
ペチュニア	148	149	170	92
ダイズ	124	143	170	1,025
タマネギ	210	91	170	104
アガパンサス	142	142	170	464
ダッチアイリス	109	92	170	90
パンコムギ	118	76	170	75

E3	I3	E4	I4	E5	I5	E6
195	86	160	79	193	90	319
195	89	160	138	193	86	277
195	630	160	344	193	103	223
195	63	160	81	193	79	332
355	1,842	193	80	277		
195	110	160	580	453		
195	85	582				

*E: エキソン、I: イントロン

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 2 件)

①Yoshihara Noriko, Fukuchi-Mizutani, Masako, Okuhara Hiroaki, Tanaka Yoshikazu, Yabuya Tsutomu, Molecular characterization of cDNA clones encoding flavanone 3-hydroxylase from Dutch iris *Iris x hollandica*, *Cytologia* 77: 359-367, 2012, 査読有

②Mizuno Takaaki, Yabuya Tsutomu, Sasaki Nobuhiro, Iwashina Tsukasa Phenolic compounds, including novel C-glycosylflavone, from the flowers of the tall bearded iris cultivar 'Victoria Falls', *Natural Product Communications*,

7:
1591-1594, 2012, 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

- ①水野貴行、藪谷 勤、北島潤一、岩科 司、
ダッチアイリス品種の花色構成色素と発現
機構の解析、日本植物学会、2010、9月
9日、中部大学
- ②服崎佑亮、瀧砂紳也、二宮裕美子、平本 優、
藪谷 勤、ダッチアイリスのカルコン合成遺
伝子を導入したペチュニア形質転換体の解
析、日本育種学会、2010、9月24日、秋田
県立大学
- ③東 沙樹、二宮裕美子、藪谷 勤、ハナシ
ョウブにおける青色花および赤色花品種の
開発に関する研究、日本育種学会、2010、9
月24日、秋田県立大学
- ④藪谷 勤、原田信次、花崎 歩、井上公一、
二倍体ヒオウギアヤメと二倍体カキツバタ
の種間交雑による異質三倍体の獲得、日本育
種学会、2011、9月24日、福井県立大学
- ⑤Mizuno Takayuki, Yabuya Tsutomu,
Kitajima Junichi, Iwashina Tsukasa,
Pigment components in the flowers of Dutch
iris cultivars and their contribution to
the flower color, 18th International
Botanical Congress, 2011, 26 July,
Melbourne, Australia
- ⑥藪谷 勤、*Iris* 属植物における花色色素の研
究、植物色素研究会、2011年、11月19日、
南九州大学
- ⑦藪谷 勤、花崎 歩、富田武志、井上公一、
ナスヒオウギアヤメおよびキリガミネヒオ
ウギアヤメの起源、日本育種学会、2012、9
月15日、京都産業大学
- ⑧Mizuno Takayuki, Yabuya Tsutomu,
Kitajima Junichi, Iwashina Tsukasa,
Comparison of flower color and flavonoid
composition between blue and violet
flowers of Dutch iris cultivars, XXVI th
International Conference on Polyphenols,
24 July, Florence, Italy
- ⑨水野貴行、藪谷 勤、佐々木伸大、岩科 司、
ジャーマンアイリスの青紫色花品種‘ビク
トリア・フォールズ’のフェノール成分、植
物色素研究会、2012年、11月17日、熊本大
学
- ⑩水野貴行、藪谷 勤、岩科 司、青紫系ダ
ッチアイリス品種の花色発現の機構、日本園
芸学会、2013年、3月23日、東京農工大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藪谷 勤 (YABUYA TSUTOMU)
宮崎大学・農学部・教授
研究者番号：70112414

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者

- ①二宮 裕美子 (NINOMIYA YUMIKO)
宮崎大学大学院農学研究科
修士課程院生
- ②服崎 佑亮 (HARAZAKI YUUSUKE)
宮崎大学大学院農学研究科
修士課程院生
- ③東 沙樹 (HIGASHI SAKI)
宮崎大学大学院農学研究科
修士課程院生
- ④野崎 友則 (NOZAKI TOMONORI)
宮崎大学大学院農学研究科
修士課程院生
- ⑤赤岩 ゆみ (AKAIWA YUMI)
宮崎大学農学部
研究生
- ⑥水野 貴行 (MIZUNO TAKAYUKI)
東京農工大学連合農学研究科
博士課程院生