

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 17 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850020

研究課題名(和文) アサガオにパステル調の色合いを付与する花色変異の同定と多彩な花色発現機構の解明

研究課題名(英文) Identification of dingy mutation conferring pastel color flowers in the Japanese morning glory

研究代表者

森田 裕将 (MORITA, Yasumasa)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：30435523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アサガオ(*Ipomoea nil*) 花卉に蓄積するアントシアニン色素は、複数のカフェ酸やグルコースが付加した複雑な側鎖構造を持ち、グルコース付加の欠損に起因する花色変異体、*dusky*及び*duskish*について変異の同定を行ってきた。本研究では、カフェ酸付加の欠損に起因してパステル調の花色を示す*dingy*変異体について、変異の同定を試みた。

アサガオで発現する31種類のアシル基転移酵素遺伝子の中から花卉で特異的に発現し、他の花色関連酵素遺伝子と同様な転写制御を受けている遺伝子を絞り込んだ後、*dingy*変異体はこのアシル基転移酵素遺伝子中にトランスポゾンが挿入した欠損変異であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Wild type plants of the Japanese morning glory (*Ipomoea nil*) display bright blue flowers. These flowers contain poly-acylated and -glucosylated anthocyanin pigments, and flower color mutants, *dusky* and *duskish*, which lack the glucosylations have been isolated. A flower color mutant *dingy* accumulates anthocyanins lacking of caffeic acid as the acyl moiety and displays pastel color flowers. It was tried to identify the *dingy* mutation and clarify the role of the *Dingy* gene for flower coloration. At first, cDNA clones for 31 acyltransferase genes were isolated and it was checked whether their gene expressions in the petal were regulated by transcriptional activators for anthocyanin biosynthesis. One candidate acyltransferase gene, which shows petal-specific expression manner regulated by the transcriptional activators, was characterized. Cloning and structural analysis of the acyltransferase gene of *dingy* mutants revealed insertion sequences of transposable elements in two mutant alleles.

研究分野：花卉園芸植物における花色発現機の研究

キーワード：花色遺伝子 アントシアニン 花色の多様性

1. 研究開始当初の背景

花卉園芸植物には多種多様な色調の花々が見られる。アントシアニンは主要な花色色素であり、糖やアシル基による修飾の違いにより多様なアントシアニンの存在が知られ、修飾構造と花色との関係が議論されている。また、糖やアシル基によるアントシアニン修飾が、花色発現に寄与する分子機構の解明及び理解は、新奇花色を有する品種育成への利用につながる事が期待されていた。これまでのアサガオ花色変異体の研究から、アントシアニンの配糖化酵素遺伝子についての解析は進んでいるものの (Morita et al. 2005)、アシル化酵素遺伝子については不明な点が多く、研究成果は得られていなかった。

2. 研究の目的

アサガオは、長い栽培の歴史と古典遺伝学的な研究から花色発現に関わる種々の変異体が得られている。野生型アサガオが青色の花を咲かせるのに対して、花色変異体の一つ、*dingy* 変異体はパステル調の色彩を持った花を咲かせる (図 1)。*dingy* 変異の同定により、パステル調の花色形成機構の解明を目指した。



図 1. 野生型 (左) と *dingy* 変異体 (右) の表現型

3. 研究の方法

(1) アシル化酵素をコードする cDNA の単離

基礎生物学研究所の星野らにより作成されたアサガオの野生型系統に由来する約 6 万からなる EST ライブラリーの遺伝子情報を基に、アシル化酵素をコードすることが予想される 31 種類の遺伝子について cDNA クローンを単離し、塩基配列の解析を行った。

(2) アントシアニン生合成に関与するアシル化酵素遺伝子の検索

白色の花を咲かせるアサガオ花色変異体の解析から、アントシアニン生合成酵素遺伝子を制御する転写制御遺伝子の欠損変異体はでは、生合成酵素遺伝子群の発現が低下することを明らかにしている (Morita et al. 2006)。31 種類の *Dingy* 候補遺伝子の中から、転写制御遺伝子の欠損変異体の白色花卉で発現が低下しているアシル化酵素遺伝子を RT-PCR 法により検索した。

(3) *Dingy* 候補遺伝子の発現解析

アサガオの野生型系統の植物体各部分よりトータル RNA の抽出を行い、RT-PCR によ

って *Dingy* 候補遺伝子の器官特異的な発現様式の有無を確認した。併せて、ノザンプロット法により *Dingy* 候補遺伝子の花卉での発現解析を行った。

(4) *dingy* 突然変異の同定

Dingy 候補遺伝子のゲノム構造を明らかにするため、5' 及び 3' の非コード領域に設計したプライマーを用いてゲノム PCR を行い、得られた PCR 産物の配列解析を行った。併せて *dingy* 変異体についても、園芸品種及び、九州大学で保存される系統についてゲノム配列の解析を行い、野生型と比較を行った。

野生型系統と *dingy* 変異体との F2 個体について表現型と遺伝子型の同時分離を検証した。

4. 研究成果

(1) アシル化酵素をコードする cDNA の単離

アサガオの EST データベースを、アシル基転移酵素に相同性を示す配列情報を基に検索を行い、アサガオ植物体で発現するアシル基転移酵素遺伝子の抽出を行った。アシル基転移酵素遺伝子のクローンについて DNA シークセンサーを用いて塩基配列情報を取得し、解析を行った結果、31 種類のアシル基転移酵素に分類された。

(2) アントシアニン生合成に関与するアシル化酵素遺伝子の検索

アントシアニン生合成酵素遺伝子の発現は、三種類の転写制御因子 Myb, bHLH, WDR により制御されている。白色の花を咲かせるアサガオの花色変異体内、*c-1* 及び *ca* 変異体は、それぞれ Myb, WDR 遺伝子の機能欠損変異である (Morita et al. 200)。RT-PCR 法により、*c-1* 及び *ca* 変異体の白色花卉において、他のアントシアニン生合成酵素遺伝子と同様に、mRNA の蓄積が低下しているアシル化酵素遺伝子を検索した。その結果、*c-1* 及び *ca* 変異体花卉で蓄積が低下するアシル化酵素遺伝子 (*Dingy* 候補遺伝子) を見出した。

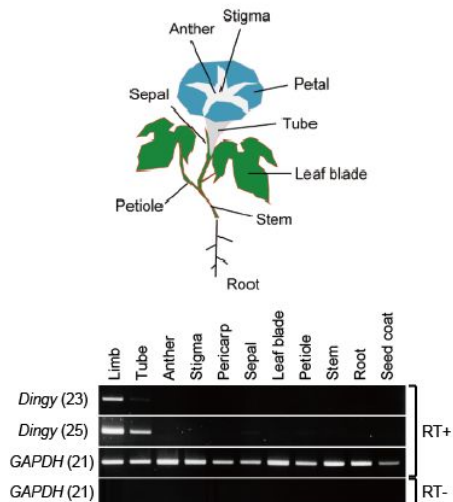


図 2. 花卉特異的な *Dingy* 遺伝子の発現

(3) *Dingy* 候補遺伝子の発現解析

アサガオ植物体における *Dingy* 候補遺伝子の植物体における発現様式を RT-PCR 法により解析した結果、このアシル化酵素遺伝子は花弁 (Limb 及び Tube) において特異的な発現をしていることを示す結果を得た (図 2)。

ノザンプロットにより、花弁における *Dingy* 候補遺伝子の発現量を野生型と *c-1* 及び *ca* 変異体で比較した結果、*c-1* と *ca* 変異体のいずれの花弁においても顕著に低下していることが明らかとなった (図 3)。

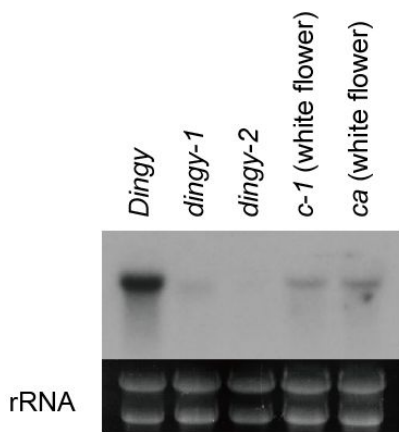


図 3. アサガオ花弁における *Dingy* 遺伝子の発現様式

(4) *dingy* 突然変異の同定

Dingy 候補遺伝子のゲノム構造

アシル化酵素をコードする *Dingy* 候補遺伝子についてゲノム構造を明らかにするため、ゲノム PCR によって増幅された遺伝子領域 (図 4) について配列解析を行った。その結果、14 のエクソンからなるゲノム構造が明らかとなった (図 5)。

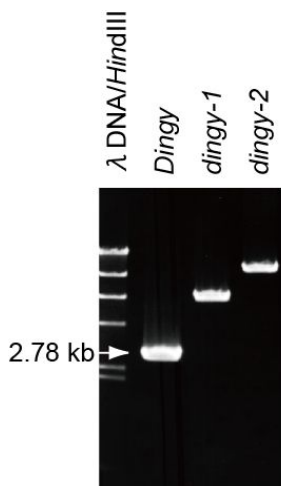


図 4. PCR により増幅された *Dingy* 遺伝子のゲノム断片

dingy 変異体のゲノム構造解析

パステル調の花を咲かせる *dingy* 変異体は、園芸品種として流通している。色素解析の結果からアシル基の修飾が欠損し *dingy* 変異体に特徴的なアントシアニンを蓄積する園芸品種と九州大学が管理するアサガオのナショナルバイオリソース中の *dingy* 変異体からゲノム PCR により *Dingy* 候補遺伝子の増幅を行った。その結果いずれの *dingy* 変異体系統においても分子量の増加した増幅産物 (*dingy-1* もしくは *dingy-2*) が得られた (図 4)。

塩基配列の解析を行ったところ、いずれの *dingy-1* 変異体系統においても、第 2 エクソン中に *Tpn15* と名付けたトランスポソンの挿入が確認された (図 5)。一方、*dingy-2* 変異体系統では、第 9 イントロン中に *Tpn16* と名付けたトランスポソンが挿入していることが明らかとなった (図 5)。

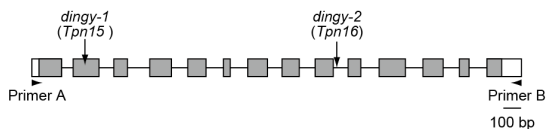


図 5. *Dingy* 遺伝子のゲノム構造と増幅に用いた Primer

ノザンプロット解析から、*dingy-1*、*dingy-2* 変異体のいずれもアシル化酵素遺伝子の mRNA 蓄積は著しく減少していた (図 3)。*dingy-1* 変異体では若干量の mRNA が検出されるが、サイズが異なっており、トランスポソンの配列を含んだ不完全な転写産物であると考えられた。これらのことから、トランスポソンの挿入は *dingy-1*、*dingy-2* 変異のいずれも機能欠損変異であることが推測された。

更に、野生型系統と *dingy* 変異体との F2 個体について表現型と遺伝子型の同時分離を検証した結果、60 個体全てにおいて同時分離が確認された。

本研究課題により得られた結果から、アサガオの花弁にパステル調の色調を付与する *dingy* 変異は、アシル基転移酵素遺伝子にトランスポソンが挿入した突然変異であると結論付けられた。

(5) 得られた結果の位置付けと今後の展望

園芸品種に観られる多彩な色調や模様の発現には、植物種や品種ごとの多様な分子機構の存在が示唆されており、これら多岐に渡る分子機構の解明は、国際的に注目を浴びるホットな領域となっている。アントシアニン色素のアシル化についても継続的な研究がなされているが、機能が同定されたアシル化酵素遺伝子も限られており、複雑で多様な側鎖構造を形成する機構については不明な点が多い。アシル化酵素遺伝子に生じた突然変異と花色との関係を明らかにした例は、本研究課題で取り組んでいる液胞局在型のアシ

ル化酵素については見当たらない。今回得られた結果は、アントシアニンが複雑な側鎖構造を獲得していく機構についての研究に発展できるのではないかと考えている。また、他の花卉品目においても、今後の育種や品種開発に繋がることが期待される。

<引用文献>

Morita Y., A. Hoshino, Y. Kikuchi, H. Okuhara, E. Ono, Y. Tanaka, Y. Fukui, N. Saito, E. Nitasaka, H. Noguchi and S. Iida (2005) Japanese morning glory dusky mutants displaying reddish-brown or purplish-grey flowers are deficient in a novel glycosylation enzyme for anthocyanin biosynthesis, UDPglucose: anthocyanidin 3-O-glucoside-2"-O-glucosyltransferase, due to 4-bp insertions in the gene. *Plant J.* 42:353-363.

Morita Y., M. Saitoh, A. Hoshino, E. Nitasaka and S. Iida (2006) Isolation of cDNAs for R2R3-MYB, bHLH, and WDR transcriptional regulators and identification of c and ca mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory. *Plant Cell Physiol.* 47:457-470.

Å

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

森田 裕将 (MORITA, Yasumasa)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号 : 30435523