

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292014

研究課題名(和文)キク属植物におけるカロテノイド酸化開裂酵素遺伝子CCD4の多様性の解析

研究課題名(英文) Analysis of the diversity of carotenoid cleavage dioxygenase genes (CCD4s) in Chrysanthemum

研究代表者

柴田 道夫 (SHIBATA, Michio)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：80355718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,700,000円

研究成果の概要(和文)：キク属植物において舌状花弁で特異的に働くカロテノイド酸化開裂酵素遺伝子の多様性について解析した。キク属栽培種および野生種ともにCCD4遺伝子は微少な塩基配列の変異を含むものの、全体としては90%以上の高い配列類似性をもつ多様性を示した。キク属栽培種では98%以上の配列類似性で分類すると、ゲノム中に少なくとも8種類のホモログが存在し、舌状花弁では6種類が発現していた。二倍体のキク属野生種リュウノウギクでは栽培種‘神馬’のCmCCD4a-5に類似した種類のホモログが発現していた。これまで存在しないとされてきたCCD4遺伝子断片が黄色系栽培種および野生種のゲノム中にも見いだされた。

研究成果の概要(英文)：The diversity of carotenoid cleavage dioxygenase genes (CCD4s) which operates specifically in ray florets of Chrysanthemum was analyzed. Although the CCD4 genes contain minor nucleotide sequence mutations, having high sequence similarities of more than 90% in both Chrysanthemum cultivars and wild species, overall, they showed diversity. In Chrysanthemum cultivars at least 8 kinds of CCD4 homologs existed in their genome when classified by sequence similarity of 98% or more, 6 of which were expressed in ray florets. In the diploid Chrysanthemum wild species, Chrysanthemum makinoi, CCD4 homologs similar to CmCCD4a-5 of the cultivar ‘Jimba’ were expressed. CCD4 gene fragments, which have been thought not to exist in the genomes of yellow flowered cultivars and wild species, have also been found.

研究分野：園芸科学

キーワード：遺伝子 カロテノイド キク バイオインフォマティクス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 栽培ギク (*Chrysanthemum morifolium*) では古くから交雑育種とともに突然変異育種が盛んに行われてきている。多くの植物で有色花が白色花に対して優性であることが一般的であるが、栽培ギクではカロテノイド色素を発現していない白色が同色素を発現する黄色に対して優性を示すことおよび突然変異による枝変わりにおいては白色から黄色への変異のみが起こることが知られており、そのメカニズムは謎とされていた。2006年 Ohmiya らがキク花弁においては白色花弁においてもカロテノイド生合成系遺伝子が発現していることを明らかにするとともに、シロイヌナズナのカロテノイド酸化開裂酵素 (Carotenoid cleavage dioxygenase) 遺伝子に相同性のある *CmCCD4* (以下、単に *CCD4* と略す) がキクの花弁において白色花色の発現を担っていることを明らかにした。これらの研究により、これまでキクの育種の上で理解しにくかった白色が黄色に対して優性遺伝することおよび突然変異において白色から黄色への変異しか起こらない現象が一挙に明らかになった。その後、栽培ギクでは *CCD4* が多義遺伝子群を構成しており、花色変異した枝変わり間で *CCD4* 遺伝子群の一部に変異が認められたこと (Yoshioka ら, 2012)、遺伝子組換え技術を利用した *CCD4* 遺伝子の発現抑制により白色品種 '神馬' から黄色花色変異が得られたこと (Ohmiya ら, 2009)、同品種 '神馬' への段階的なイオンビーム照射によって得られた黄色花色変異の濃淡と保有している *CCD4* 遺伝子の数の間に関連が認められたこと (Ohmiya ら, 2012) などが次々に明らかにされてきている。以上より、栽培ギクが保有する *CCD4* 遺伝子の種類や数と、栽培ギクの白色度や易変性の品種間差との関連が推測される。しかし、*CCD4* 遺伝子の多様性については品種 '神馬' で6種類 (うち1種類は偽遺伝子) が単離されている程度で、広く栽培ギク品種における多様性を調べた知見はない。

(2) 栽培ギクは六倍体を中心とした染色体構成をもっており、その成立には複数のキク属野生種が関わっていると推定されている。一方、栽培ギクとキク属野生種は比較的容易に交雑可能であり、柴田ら (1988) は育種的に未利用と考えられてきた舌状花 (花弁) をもたないイソギク (*C. pacificum*) と栽培ギクとの種間交雑により新しい小輪のスーパーギク品種群を作出し、わが国のキク生産に貢献した。Yoshioka ら (2009) は花弁をもたないイソギクと黄色の園芸品種との交雑後代における花色と *CCD4* 遺伝子の存在について解析し、舌状花をもたないイソギクの中に *CCD4* 遺伝子を有するものとそうでないものがある可能性を示した。さらに、栽培ギクに含まれるキク属植物は、中国や日本を中心とする東アジアにのみ自生しており、わが国

にも20種類近いキク属野生種が分布する。その形態的特性および倍数性から、黄色舌状花弁グループ、白色舌状花弁グループ、そして無舌状花弁グループの3つに大別され (図1)、これら3つのグループ内で高次倍数性の系統進化が図られてきたと考えられている。しかしながら、キク属野生種の *CCD4* 遺伝子の変異についてはまったく知見がない。



シマガンギク      コハマギク      イソギク  
舌状花(黄)+管状花      舌状花(白)+管状花      管状花のみ

図1. 3タイプのキク属野生種

## 2. 研究の目的

キクの舌状花弁で特異的に働く *CCD4* はキクの花弁発現においてきわめて重要な役割を果たしている。そこで本研究では、栽培ギクにおける *CCD4* 遺伝子の種類や数に関しての品種間差を解析する。また、日本に広く自生する花弁をもたず育種素材として有用なキク属野生種イソギクとその近縁種シオギク (*C. shiwogiku*) について、*CCD4* 遺伝子の保有状況を明らかにし、キクの種間交雑育種に活用する。さらに、キク属野生種における *CCD4* 遺伝子の多様性を解析することにより、キク属植物の系統進化の過程の解明に役立つ。以上のように、本研究は、多角的にキク属植物の *CCD4* 遺伝子の多様性を解析し、キクの育種のための基礎的知見を得ようとするものである。

## 3. 研究の方法

(1) 供試する栽培ギク品種とキク属野生種としては、連携研究者が所属する独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所 (現 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究領域) に保存されているキク遺伝資源の中から主に選定した。栽培ギク品種に関しては、枝変わり品種には周縁キメラ構造を有することが想定されることから、交雑による実生由来の品種に限定するとともに、さまざまな花色の品種を選定し、白色系品種については特に異なる白色度の品種を複数選定した。なお、当初は栽培ギクとして白色系およびピンク系品種を用いたが、その後、黄、橙、赤といった黄色系品種についても追加で供試した。また、野生種についても広島大学植物遺伝子保管実験施設で保存されているキク属野生種を追加で供試した。

(2) 選定した栽培ギク品種およびキク属野

生種を材料としてゲノム DNA 由来の *CCD4* 部分断片のクローニングを行った。具体的には茎頂部から抽出キットを用いて DNA を抽出し、栽培ギク品種‘神馬’で報告されている *CCD4* 遺伝子配列を基に設計したプライマーで PCR 法により約 500bp の部分断片を増幅した。なお、キクでは *CCD4* 遺伝子ホモログとして機能不明の *CCD4b* 遺伝子についても報告されているが、本研究ではキクの舌状花卉で特異的にカロテノイドを分解する働きをもつと考えられる *CCD4a* を対象とした。PCR 精製産物をベクターに組み込んで大腸菌に形質転換した。コロニー PCR による選抜の後、液体培養で増殖し、プラスミドを抽出した。品種・系統あたり基本的に 24 クローンずつシーケンスを得て、配列を解析した。得られた部分配列には微少な変異が多数含まれていたことから、98% の類似性を基準に分類を行った。また、白色系およびピンク系栽培ギク品種については、開花時の舌状花由来の cDNA と *CCD4* の各ホモログ特異的プライマーを用いて定量 PCR を行い花卉で実際に発現している *CCD4* ホモログの構成を調べた。さらに、白色二倍体野生種リュウノウギク (*C. makinoi*) については、開花時の舌状花由来の cDNA と品種‘神馬’で報告されている *CmCCD4a-5* 遺伝子配列を基に設計したプライマーで PCR を行い、約 1,800bp の完全長の配列断片を増幅し完全長配列を解析した。

(3) 花卉をもたないキク属野生種 2 種については、農研機構 花き研究所に保存されている系統を供試し、Yoshioka ら (2009) の用いたプライマーによって *CCD4* 遺伝子の保有状況について予備的な分析を行ったところ、安定的な電気泳動の結果が得られなかったことから、栽培ギク品種‘神馬’で報告されている 6 種類の *CCD4* 遺伝子において Yoshioka ら (2009) の報告に近接の後半部分 (+1144 ~ +1929) を増幅するプライマーを設計し、(2) に記載した前半部分と併せて *CCD4* 遺伝子の保有状況を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 栽培ギクではまず *CCD4* 遺伝子が発現していると考えられる白色系およびピンク系の 58 品種について、ゲノム DNA における *CCD4* の部分配列の多様性について解析した。1 品種あたり最大 24 クローンについて *CCD4* 遺伝子の部分配列が得られたが、品種ごとに微少な変異を含む 1 ~ 19 種類の配列が認められた。そこで、品種‘神馬’で報告されている *CmCCD4a-1, 2, 3, 4, 5* および 6 の 6 種類との 98% 以上の配列類似性を基準として、58 品種全体で単離された 37 種類のホモログについて分類したところ、‘神馬’で報告されている 6 種類に加えて新たに 2 種類のホモログが見いだされた。すなわち、栽培ギクのゲノムには多くの品種間で認められる主要な *CCD4* 配列が 8 種類 (*CmCCD4a-1, 2, 3, 4, 5, 6, New-1* お

よび *New-2*) あることが明らかにできた。これら 8 種類のホモログのそれぞれの品種における構成をみると、品種間差が認められ、大まかに *CmCCD4a-5* のみ、*CmCCD4a-1, 4* の組み合わせ、*CmCCD4a-2, 3, 6* の組み合わせといった比較的単純な構成と、多くの種類の組み合わせによる複雑な構成に分類できた。

(2) 配列の途中で終止コドンを含むために偽遺伝子と推定された *CmCCD4a-4* と *New-2* を除いた 6 種類について判別可能なプライマーを設計し、満開時の花卉における発現を、白色系およびピンク色系の 20 品種で解析した結果、これら 6 種類がどれも花卉で発現していることが確認された。しかし、発現が比較的高い主要な発現ホモログは *CmCCD4a-1, 2, 3, 5* の 4 種類であること、花卉で発現しているホモログについても、*CmCCD4a-5* のみ、*CmCCD4a-1* のみといった単純な構成のものとして、*CmCCD4a-1, 2, 3, 5, 6, New-1* のほとんどが発現した複雑な構成のものが認められた。白色系品種における白色度や枝変わりの易変性と *CCD4* 遺伝子の種類や数との間には明確な関連は認められなかったが、白色度の高い品種では *CmCCD4a-1* が発現しているものが多い傾向があった。

(3) 一方、無舌状花のキク属野生種イソギク 32 系統およびシオギク 21 系統の *CCD4* 遺伝子の保有について、Yoshioka らの報告によるプライマーでは判別できなかったことから、プライマーを変えて解析したところ、予想外に全ての系統で部分断片が増幅された。これらの実験結果により、当初予定していたイソギクやシオギクの地理的な分布などによる *CCD* 遺伝子の有無の解析は断念せざるを得なかった。

(4) キク属野生種 15 種 29 系統について、品種‘神馬’の 6 種類の *CCD4* ホモログにおいて保存されている領域を PCR のプライマーとして *CCD4* の部分配列を単離し解析したところ、栽培ギク品種同様に野生種の種・系統ごとに微少な変異を含む多様な配列が認められた。98% 以上の配列類似性をもとに *CCD4* 遺伝子ホモログを分類したところ、白色系およびピンク系の栽培種で認められた *CmCCD4a-New1, 2* 以外に、多くの野生種で認められる主要な *CCD4* 配列が 3 種類 (*CCD4-New3, 4, 5*) 見いだされた。なお、供試した全ての野生種で‘神馬’の *CmCCD4a-5* に類似した配列の保有が認められた。さらにこれまでの報告で *CCD4* ホモログを欠くとされてきた黄色の野生種についても部分配列の存在が認められた。

(5) 白色舌状花をもつ二倍体野生種リュウノウギク 3 系統の花卉で発現している *CCD4* 遺伝子の全長配列について解析した結果、3

系統のリウノウギクの白色舌状花からそれぞれ異なる 7~13 種類の *CCD4* 遺伝子の完全長ホモログが単離された。これらはすべてアミノ酸配列からカロテノイドを分解する機能を有するものと考えられた。すなわち、*CCD4* 遺伝子については二倍体のリウノウギクにおいても、複数座で存在し、かつ種内変異および個体内変異が存在することが明らかになった。一方、単離された完全長の *CCD4* 遺伝子は、品種‘神馬’の *CmCCD4a-5* に類似の配列であった。

(6) 当初 *CCD4* 遺伝子をもたないとされていた黄色舌状花をもつ二倍体野生種キクタニギク 2 系統と黄、オレンジ、赤といった黄色系栽培種 12 品種のゲノムにおける *CCD4* 遺伝子の部分配列について解析した結果、黄色二倍体野生種のキクタニギクおよび黄色系栽培種のゲノムには、すべて開始コドンを含む約 500bp 以上の *CCD4* 遺伝子断片配列が存在することが確認された。なお、キクタニギクでは主に *CmCCD4a-1* および *5* に類似の配列が見いだされ、黄色系栽培種ではきわめて多様性に富むものの *CmCCD4a-5* に類似の配列が共通して見いだされた。

(7) Kishimoto ら (2004) はオレンジ色の栽培ギク品種‘サニーオレンジ’の花弁に含まれるカロテノイドを分析し、新規のカロテノイドを含む 16 種類のカロテノイドを同定しているが、そのほとんどがルテインの誘導体および異性体であったとしている。キクの花弁特異的に働いている *CCD4* はこのような多様なカロテノイドを分解することから、その種類は一様でなく多様性に富んでいるのではないかと考えられた。一方、多様ではあるものの *CCD4* 遺伝子については種類および数において品種間差があることも明らかになった。さらに、キク属野生種では *CmCCD4a-5* に類似の *CCD4* が広く認められること、また当初 *CCD4* 遺伝子は黄色系品種や野生種では存在しないと考えられていたが、少なくとも本研究の結果から開始コドンを含む *CCD4* 遺伝子の前半部分は、すべてのキク品種および野生種に存在するのではないかと考えられた。無舌状花野生種で発現している *CCD4* 遺伝子については検出技術も含めて再考する必要性があるものと考えられた。

#### <引用文献>

Satoshi Yoshioka, Ryutaro Aida, Chihiro Yamamizo, Michio Shibata, Akemi Ohmiya, The carotenoid cleavage dioxygenase4 (*CmCCD4a*) gene family encodes a key regulator of petal color mutation in chrysanthemum. *Euphytica* 2012. 184. 377-387.

Akemi Ohmiya, Sanae Kishimoto, Ryutaro Aida, Satoshi Yoshioka and Katsuhiko Sumitomo, Carotenoid cleavage dioxygenase

(*CmCCD4a*) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiology*.142.2006.1193-1201.

Akemi Ohmiya, Tomomi Toyoda, Hideki Watanabe, Keishi Emoto, Yoshihiro Hase, Satoshi Yoshioka. Mechanism behind petal color mutation induced by heavy-ion-beam irradiation of recalcitrant chrysanthemum cultivar. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 81. 2012. 269-274

Satoshi Yoshioka, Katsuhiko Sumitomo, Yuichi Fujita, Atsuko Yamagata, Takashi Onozaki, Michio Shibata, Akemi Ohmiya. Significance of *CmCCD4a* orthologs in apetalous wild chrysanthemum species, responsible for white coloration of ray petals. *Euphytica*. 171.2010, 171:295

柴田道夫, 川田穰一, 天野正之, 亀野貞, 山岸博, 豊田努, 山口隆, 沖村誠, 宇田昌義. 1988. イソギク (*Chrysanthemum pacificum* Nakai) とスプレ-ギク (*C. morifolium* Ramat) との種間交雑による小輪系スプレ-ギク品種 "ム-ンライト" の育成経過とその特性. 野菜茶試研報. A2:257-277.

Sanae Kishimoto, Takashi Maoka, Masayoshi Nakayama, Akemi Ohmiya. Carotenoid composition in petals of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). *Phytochemistry* 65. 2004.2781-2787.

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 5 件)

王力超, 樋口洋平, 柴田道夫(柴田道夫). キク属二倍体野生種白色花弁で発現しているカロテノイド酸化開裂酵素遺伝子の多様性. 園芸学会平成 28 年度秋季大会. 2016 年 9 月 10 日~9 月 11 日. 名城大学天白キャンパス(愛知県・名古屋市)

西崎哲也, 樋口洋平, 高橋麻美, 草場信, 谷口研至, 住友克彦, 大宮あけみ, 柴田道夫(柴田道夫). キク属野生種におけるカロテノイド酸化開裂酵素遺伝子の多様性解析. 園芸学会平成 28 年度春季大会. 2016 年 3 月 26 日~3 月 27 日. 東京農大厚木キャンパス(神奈川県・厚木市)

高橋麻美, 樋口洋平, 住友克彦, 大宮あけみ, 柴田道夫(柴田道夫). キク品種の舌状花弁におけるカロテノイド酸化開裂酵素遺伝子の発現解析. 園芸学会平成 28 年度春季大会. 2016 年 3 月 26 日~3 月 27 日. 東京農大厚木キャンパス(神奈川県・厚木市)

高橋麻美, 樋口洋平, 住友克彦, 大宮あけみ, 柴田道夫(柴田道夫). キク品種のカロテノイド酸化開裂酵素遺伝子の多様性解析. 園芸学会平成 27 年度秋季大会. 2015 年 9 月 26 日~9 月 27 日. 徳島大学常三島キャンパス(徳島県・徳島市)

柴田道夫, 大久保裕史, 草場信, 谷口研至,

住友克彦，大宮あけみ（柴田道夫）. キク属植物におけるカロテノイド酸化開裂酵素遺伝子(CCD4a)の多様性．園芸学会平成 26 年度秋季大会．2014 年 9 月 27 日～9 月 28 日．佐賀大学本庄キャンパス（佐賀県・佐賀市）

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

柴田 道夫（SHIBATA, Michio）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：8 0 3 5 5 7 1 8

### (3)連携研究者

大宮 あけみ（OHMIYA Akemi）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究領域・上席研究員

研究者番号：5 0 3 5 5 7 1 5