

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450029

研究課題名(和文)フラボノイド生合成系の環境応答を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文)The evaluation of modification of flavonoid biosynthesis by the environmental conditions in molecular level in dahlia.

研究代表者

三吉 一光 (Miyoshi, Kazumitsu)

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号：60312237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ダリアは近年切り花の営利栽培が急増している。しかし、いくつかの品種の冬季栽培では低温により花弁が橙色になる色抜け現象が発生し、安定した赤色花の生産方法の確立が切望されている。本研究ではこの色抜け現象の分子基盤情報を得るために、まず、橙色になる温度環境を明らかにした。さらにフラボノイド生合成系に着目し、遺伝子の発現量を解析した結果、低温により特異的にその活性が抑制される遺伝子を明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The production of cut flower dahlia has been increase in Japan. They are produced in winter time in protected culture regimes. The flowers of some cultivar is red in summer time but orange in winter. We have revealed the low temperature conditions which induces the flower with orange color. Moreover we have found the gene which expression is strongly influenced by low temperature and may play a role in the induction of flower with orange color.

研究分野：花卉園芸学

キーワード：花色 環境応答 施設栽培

1. 研究開始当初の背景

ダリア(キク科)は、近年切り花の営利栽培が急増している。ダリア品種‘熱唱’は露地の夏秋栽培において濃赤色のセミカクタス咲き(第1図a)であり、卸売市場最大手の大田花き(株)の2014年度の品種別の切り花出荷量が6位であった(ハツ田2015)。しかし、冬季間の温室栽培では、低温により花弁が橙色になる色抜け現象が発生し(第1図b)、栽培上の大きな問題となっており、安定した赤色花の生産方法の確立が生産者を始め、流通関係者などから切望されている。

2. 研究の目的

従来、様々な植物において花色に関する研究がされ、その科学情報の蓄積は大きい。環境による花色の変化を遺伝子レベルで精査した報告は限定的である。本研究では、ダリア品種‘熱唱’の安定的な赤色花の生産方法の確立のための基盤情報とするために、色素合成系遺伝子の発現量の違いを栽培環境と関連させ網羅的に調査した。

3. 研究の方法

栽培は、千葉大学松戸キャンパスの研究圃場内の温室にて行った。冬季は植物を加温温室に移動し、栽培した。

鉢土は赤玉:バーク堆肥:パーライトを36:10:5の比で混合し、元肥としてマグアンプK 1g/Lを加えた。

施肥は2ヶ月に一度、緩効性肥料グリーンサム「ポット」C号(エムシー・ファーマティコム株式会社)8-25-8を2粒与えた。また、液肥を夏季は10日に一度、冬季は2週間に一度鉢の底から水が出てくるまで与えた。液肥は住友液肥2号(住友化学株式会社)10-5-8を200倍希釈で用いた。

電照は10月から3月まで行い、日長が13.5時間になるように設定した。10,11,2,3月は日没後17時半から19時まで、12,1月は日出前5時半から7時まで、日没後16時から19時まで電照を行った。この時、電球と植物が近すぎると葉焼けするので注意した。ダリア品種‘熱唱’の赤色花および橙色花の各花弁を発達段階により5つに分けて供試した(第2図)。また、色相値の変化を周期的に記録するために、色彩色差計を用いて発達段階5のL*値、a*値およびb*値を測定した。さらに、暗期中の温度を17および10に設定した2台のグロースチャンパーに着色前の花蕾の付いた植物体を搬入し、最低温度が異なる環境で開花した花弁の色相値を計測した。なお、周期的に採取した赤色および橙色花弁の発達段階5の試料はMAW(メタノール:酢酸:水=4:1:5)に浸し色素抽出し、加水分解処理(1N塩酸, 95℃, 4時間)後HPLC分析を行った。

さらに、赤色花および橙色花からそれぞれ発達段階2,3,4の花弁を採取し、6つの色素合成系遺伝子(*CHI*, *F3H*, *F3'H*, *FNS*, *DFR*, *ANS*)の発現量の差異を調査するために、total RNAを抽出し、逆転写後リアルタイムPCRを行った。なお、内部標準は*Actin*とし、プライマーはGenBankに登録されている配列や本研究で決定した配列を元に設計した。

4. 研究成果

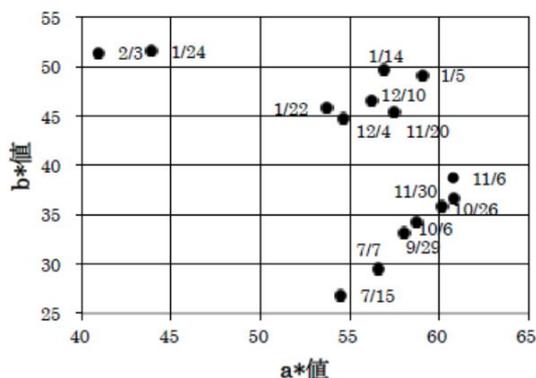
橙色花弁は赤色花弁と比較して、L*値およびb*値が増加し、a*値が減少した。周期的に計測した結果、冬季に色抜けすることを確認した(第3図)。また、暗期中の温度を10に設定して栽培すると、花弁の色相値が橙色方向に変化した(第1表)。HPLC分析より、橙色花弁の色素量は赤色花弁に対してシアニジンが0.16倍、ペラルゴニジンが0.29倍、アピゲニンが74倍、ルテオリンが14倍であった(第4図)。

色素合成遺伝子の発現量解析を行うためには、それらのプライマーを設計する必要がある。Ohnoら(2011)のプライマーを用いて、ダリア品種‘熱唱’が色素合成系遺伝子を有しているか確認した。その結果、*DvCHI*, *DvF3H*, *DvDFR*, *DvANS*のシーケンスに成功した。また、*DvF3'H*, *DvFNS*はシーケンス解析できなかったため、Genbankに登録されているダリアの配列を元にプライマーを自作し、シーケンス解析を行った。Genbankは付録:第9表に、シーケンス用プライマーは付録:第10-1表に、シーケンスの結果は付録:第12図に示した。本研究では扱わなかった*DvCHS1*, *DvCHS2*, *DvFLS*, *DvDEL*もシーケンス解析に成功したため、付録に記載した。またここで、*DvF3'H*の部分配列から、Genbankには登録されていない挿入部分を発見した。

リアルタイムPCR用では、Thillら(2012)のプライマーを用いた。また、*DvF3'H*, *DvFNS*のプライマーはシーケンス解析の結果を参考に自作した。また、リアルタイムPCRでは*DvActin*をハウスキーピング遺伝子とし、Ohnoら(2011)のプライマーを用いた。

*DvActin*に対して、どの程度発現しているかを示す。*DvFNS*にのみ差が見られ、発達段階2では赤色2.88、橙色8.42、発達段階3では赤色1.61、橙色14.97、発達段階4では赤色0.17、橙色4.94であった。これより、*DvFNS*は橙色が赤色に対して発達段階2では2.9倍、発達段階3では9.3倍、発達段階4では28.5倍と、発達段階が大きくなるにつれ、赤色花と橙色花の発現量差が大きくなった。*DvFNS*の発達段階3において有意水準5%で有意差があったが、その他の遺伝子では有意差がなかった。

最低気温が低くなるなどの環境の変化に



第3図 色相値の季節的な変化
a*値が高いと赤色、b*値が高いと黄色であることを示す。

よって、*DvFNS* の発現量が高くなり、橙色に色抜けすることがわかった。これの原因には、Ohno ら(2012)が発見した *DvIVS* 転写因子のような、フラボノイド生合成系を制御する調整遺伝子の働きなどが考えられる。ブドウでは、MYB 転写因子である *VIMYB1-3*, *VIMYBA2*, *VIMYBA1-2* は、気温や光によって発現量が変化する。また、色素合成遺伝子 *VIFLS4* は転写因子 *VIMYBF1* と似た発現をし、環境が色素合成に影響を与えることが報告されている。これは光によって *VIMYBF1* が発現し、*VIFLS4* を調節していると考えられている (Azuma ら, 2012)。また、シロイヌナズナでは、4 の低温遭遇によって色素合成遺伝子である *PAL* と *CHS* の発現量が高くなり、葉と茎にアントシアニンの蓄積が見られたという報告がされている (Leyva ら 1995)。他にも、キャベツの種では 10~15 の低温遭遇によって、アントシアニンの蓄積が起きることが報告されている (Rabino, 1986)。このため、ダリア品種「熱唱」の橙色花では低温遭遇などの環境要因によって転写因子の発現が弱くなり、それに伴い *DvFNS* だけの発現が弱くなり、アントシアニンの構成が変わったと考える。また、他の植物の *FNS* の塩基配列を比べることで、ダリア品種「熱唱」における特異性を見いだせるかもしれない。このように、橙色への色抜け現象は最低気温の低下にともない何らかの遺伝子が、*FNS* の発現量を調整していたと考える。

次世代シーケンサーを利用した網羅的な遺伝子解析に加え *FNS* の上流配列のプロモーター領域を調査すること、またダリア

品種「熱唱」における *DvFNS* のクローニングにより、色抜け現象の原因となる遺伝子の発見が期待される。

【追記】6月15日に遺伝子の網羅的な解析の結果が得られ、今後の研究の方向性を決めるのに重要な知見が得られた。

第1図 ダリア品種「熱唱」(a:赤色,b:橙色)



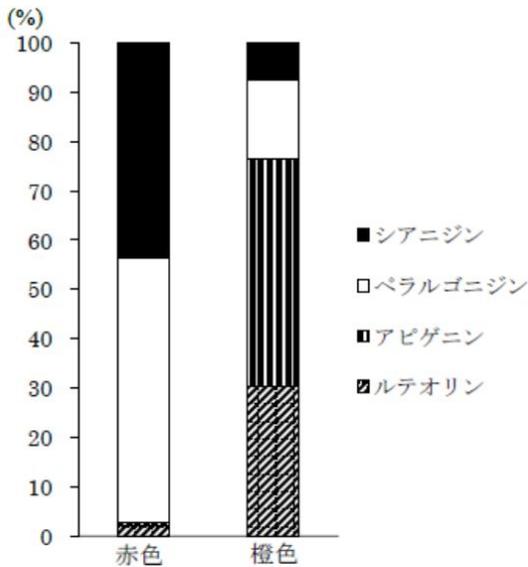
スケールバーは 1cm

を示す。

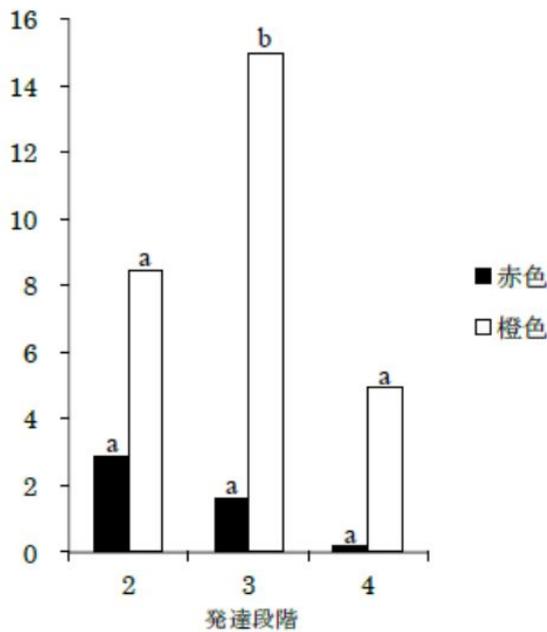
第2図 ダリア品種「熱唱」の花弁の発達段階(1~5)

スケールバーは 1cm を示す。



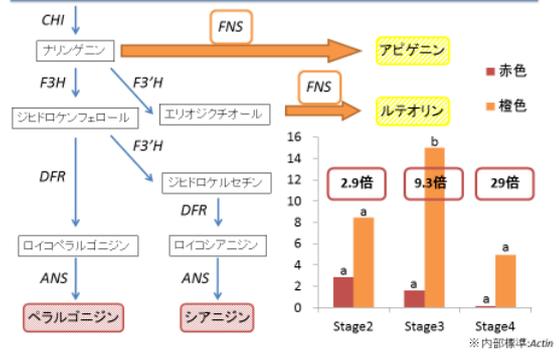


第4図 花卉の色素組成
HPLC分析によるピーク面積で比較した色素の総量は赤色と橙色でほぼ同じであった。



第5図 花卉における FNS の発現量(内部遺伝子 Actin を 1 とする)
発達段階ごとに t 検定を行った。同じアルファベット間は有意水準 5% で有意差なし。

【まとめ】
フラボノイド生合成系における遺伝子の発現量



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 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)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三吉一光 (Miyoshi, Kazumitsu)
千葉大学・大学院園芸学研究所・教授

研究者番号：60312237

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()