

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450032

研究課題名(和文)花模様形成の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of flower pigmentation pattern

研究代表者

中塚 貴司 (NAKATSUKA, Takashi)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：60435576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：花模様は、被子植物にとって訪花昆虫の誘引だけでなく、花卉の園芸的価値を高めることに貢献している。本研究では、リンドウおよびシンビジウムを利用したトランスクリプトーム解析や代謝解析を行うことで、花模様形成に関わる制御因子の同定を行った。シンビジウムの唇弁着色には、転写調節因子 MYB1 とシアニンジンを生合成酵素である F3' H 遺伝子の特異的発現が関与していた。一方、リンドウのストライプ模様は、裂片部におけるカルコン合成酵素 (CHS) の mRNA が分解されていることで引き起こされていることが明らかになった。このように花模様形成は、植物種毎に異なることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Flower color pattern is important not only for induction of insects but also for enhanced value of floricultural plants. This study was attempted to reveal the molecular mechanism by transcriptome and metabolic analyses using Japanese gentian and Cymbidium. In Cymbidium, flavonoid 3'-hydroxylase (F3' H) and transcription factor CyMYB1 were responsible for the pigmentation of labellum organ. On the other hand, strip flower color of Japanese gentian was degraded chalcone synthase (CHS) mRNA in white-color lobe organs. These results indicated different molecular mechanism of flower pigmentation pattern among plant species.

研究分野：花卉園芸学

キーワード：花模様 アントシアニン シンビジウム リンドウ RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

多くの被子植物において、花色は香りと共に訪花昆虫を誘引するうえで重要な役割を担っている。花色には、花卉全体に単色で着色する色と、周りより濃い色で蓄積することで花模様を形成している色が存在する。花模様は、雄蕊を取り巻くように花卉上で形成し、道標として花粉媒介者を誘導するために重要である。また、花卉園芸において花模様は、バラエティを拡大させるために貢献し、花模様を安定形質として新品種に導入することが育種で求められている。しかし、花模様形成に關与する研究は、ほとんど行われていない。

2. 研究の目的

花模様は、被子植物にとって訪花昆虫の誘引のシグナルとして重要であるだけでなく、花卉の園芸的価値を高めることに貢献している。本研究では、リンドウ科およびラン科植物を利用して花模様形成に關わる制御因子を比較トランスクリプトーム解析と代謝解析から特定し、花卉園芸の育種や栽培制御における新しい利用法を提案する。具体的には、花模様の形成機構、つまりは花卉組織内の局所的で厳密に制御される花色素生合成の分子調節機構を明らかにする。

3. 研究の方法

花模様形成の分子機構を3年間の研究期間で明らかにするために、以下に示す研究項目を計画している。研究材料として、温度により花模様を誘導できるシンビジウム唇弁を利用する。

(1) シンビジウムおよびリンドウの花模様形成部位におけるアントシアニン生合成遺伝子の発現解析で局所的な色素合成で影響を受ける生合成遺伝子を特定する。

(2) シンビジウムにおける温度誘導花模様形成を用いた継時的かつ網羅的遺伝子発現解析と代謝解析から、花模様形成制御因子の候補遺伝子を特定する。

(3) リンドウのストライプ模様に関するアントシアニン生合成酵素遺伝子の原因遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1) シンビジウムの花模様形成機構

シンビジウム‘ワルツロマンズ’とその唇弁非着色変異体の唇弁をそれぞれ3反復用いてRNA-seq解析を行った。全てのタグを51,143コンティグが構成された。発現差解析を行ったところ、変異体で野生型と比べて10倍以上発現が上昇したコンティグが19、一方、発現が減少したコンティグが66存在した。これらの85コンティグについて、Real Time PCRで発現量調査を行ったところ、有意な差を示す3つのコンティグが存在した(図1)。

1つは、アントシアニン生合成酵素遺伝子

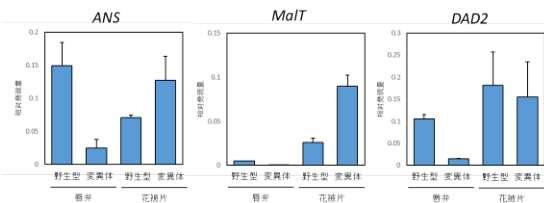


図1 シンビジウム野生型と唇弁非着色変異体の発現解析

の一つであるアントシアニン合成酵素(ANS)であった。唇弁において野生型の17%まで減少していた。2つ目は、アントシアニンマロニル-CoA転移酵素(MalT)の相同遺伝子で、野生型の18%まで減少していた。シンビジウムでは、シアニン3-O-グルコシドと3-O-ルテノシドそして3-O-マロニルグルコシドが主要色素であることが知られている。しかし、アントシアニンマロニル基転移酵素について明らかになっておらず、今回新たに単離された。3つ目は、ストリゴラクトン受容体であるDECREASED APICAL DOMINANCE 2(DAD2)相同遺伝子で、唇弁において野生型の18%まで減少していた。ストリゴラクトンは、アラビドプシスの研究において栄養欠乏によるアントシアニン蓄積と関連がある報告がされている(Ito et al. PLoS One 10: e0119724, 2015)。変異体は受粉をすることで、僅かにアントシアニンの着色を誘導できるため、アントシアニン生合成の欠損変異体ではないと考えられた(図2)。



図2 シンビジウム唇弁非着色変異体の未受粉花(左)と受粉花(右)

これらの結果から、シンビジウム唇弁非着色変異体に、ストリゴラクトンを介したアントシアニン生合成に欠損が出ているかもしれないと仮説を立てた。そこで、ストリゴラクトンのアゴニストであるGR24を変異体の唇弁に塗布したところ、変化は観察されなかった。

現在、シンビジウムDAD2遺伝子をアラビドプシスおよびタバコに導入した過剰発現体を作成している。形質転換体におけるアントシアニン蓄積の変化を調査する予定である。

(2) シンビジウムの温度誘導花模様形成の解析

シンビジウム‘サザナミチャンピオン’

を 20/15 または 30/25 で栽培し、その時の着色程度とアントシアニン生合成遺伝子の発現を調査した。高温条件で栽培したとき、花被ではアントシアニン着色が減少し、一方唇弁では斑点模様が大きくなることが確認された(図3)。

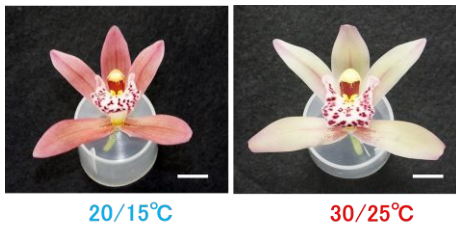


図3 異なる栽培温度で管理したシンビジウム花

アントシアニンの蓄積量は花被片で 30/25 処理によって 40%まで減少していたが、フラボノール含量は差が無かった(図4)。

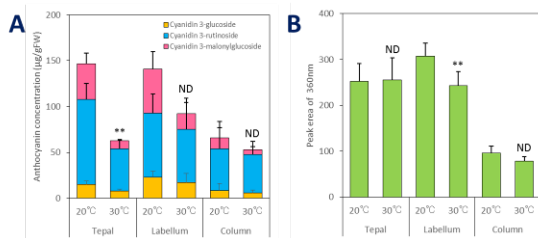


図4 異なる温度で栽培したシンビジウム花器官のアントシアニン(A)とフラボン蓄積量(B)

次に、アントシアニン生合成遺伝子の発現解析を行った(図5)。多くのアントシアニン生合成に関わる遺伝子(DFR)は、高温処理により著しく減少していた。一方、フラボン生合成に関与する遺伝子(FLS)は、栽培温度による影響をほとんど受けなかった。アントシアニン生合成の調節因子遺伝子であるMYB1は、DFR等の生合成遺伝子の発現様式と類似していた。このことから、転写調節因子であるMYB1の発現量が、温度による着色程度を制御していることが明らかになった。

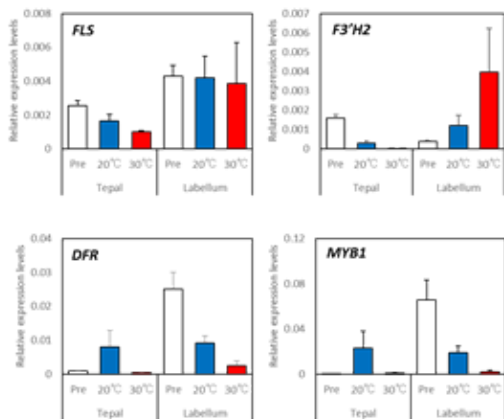


図5 異なる温度で栽培したシンビジウム花器官のアントシアニン生合成関連遺伝子の発現

一方、F3'H2遺伝子は、他のアントシアニン生合成遺伝子と異なり、高温区で唇弁において発現が著しく上昇した。F3'H遺伝子は、シアニジン生合成の鍵酵素であるため、この発現誘導が、唇弁における高温時の着色範囲の拡大を制御しているかもしれない。

(3) シンビジウム花模様の品種間差解析
着色様式の異なるシンビジウム4つの品種のアントシアニン生合成経路遺伝子の発現解析を行った(図6)。唇弁の着色とF3'H2遺伝子の発現に強い相関があった。このことから、シンビジウムの唇弁の着色には、シアニジン生合成酵素遺伝子のF3'H2の発現の有無が関与していることを明らかにした。

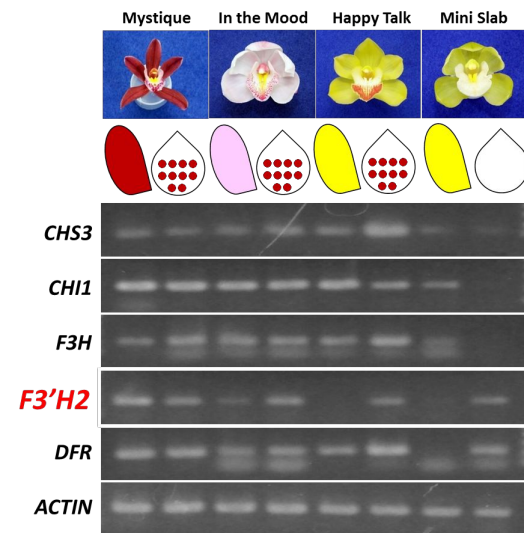


図6 花模様が異なるシンビジウム4品種におけるアントシアニン生合成遺伝子の発現解析

(4) リンドウの花模様形成機構
リンドウ'白寿'は、裂片部は白色で副裂片部は青色のストライプ模様を示す(図7)。



図7 リンドウ'白寿'

それぞれ部位でのアントシアニン生合成関連遺伝子の発現解析を行ったところ、カルコン合成酵素(CHS)遺伝子の発現が、裂片部で著しく減少していることが明らかになった(図8)。また、裂片の白色部においてCHS siRNAが検出された(図9)。これらの結果から白寿の花模様は、裂片部において転写後ジーンサイレンス(PTGS)によってCHS mRNAが分解され、アントシアニン生合成が阻害されるために花模様が形成されると考えられた。

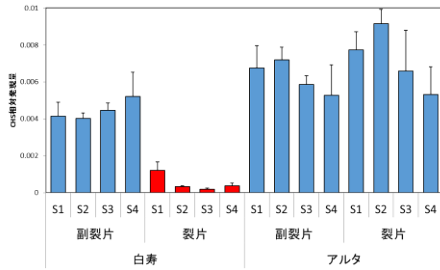


図8 CHS遺伝子の発現様式

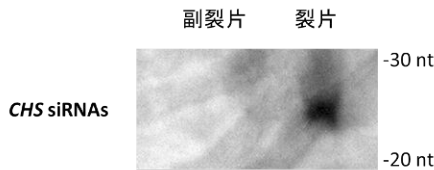


図9 CHS siRNAの蓄積

以上の解析から、シンビジウム唇弁着色にはアントシアニン生合成制御因子 *MYB1* が関与していることが明らかになった。また、唇弁の模様形成には、植物ホルモンの一つであるストリゴラクトンの関与が示唆された。一方、リンドウの模様形成には、*CHS* mRNAの分解が関与していた。このように、植物種毎に、花模様形成機構が異なることが明らかになった。今後は、本研究で明らかになった現象の原因をさらに特定することを目指すことで、花色の育種に貢献することが期待できる。

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 5件)

LhMYB12, regulating tepal anthocyanin pigmentation in Asiatic hybrid lilies, is derived from *Lilium dauricum* and *L. bulbiferum*. Yamagishi M. and Nakatsuka T. Horticulture Journal (in press). 2017. 査読有り

RNA-seq-based evaluation of bicolor tepal pigmentation in Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.). Suzuki K., Suzuki T., Nakatsuka T., Dohra H., Yamagishi M., Matsuyama K. and Matsuura H. BMC genomics 17: 611. 2016. 査読有り

Identification of the glucosyltransferase that mediates direct flavone C-glucosylation in *Gentiana triflora*. Sasaki N., Nishizaki Y., Yamada E., Tatsuzawa F., Nakatsuka T., Takahashi H. and Nishihara M. FEBS Letters 589: 182-187.

2015. 査読有り

Molecular breeding of Japanese gentians - Applications of genetic transformation, metabolome analyses, and genetic markers. Nishihara, M., Mishiba K., Imamura T., Takahashi H. and Nakatsuka T. (Eds.) Rybczyński, J.J., M.R. Davey and A. Mikula. The Gentianaceae: Volume 2: Biotechnology and Applications. pp 239-265. 2015. 査読有り

Transcriptional regulators of flavonoid biosynthesis and their application to flower color modification in Japanese gentians. Nakatsuka T., Sasaki N. and Nishihara M. Plant Biotechnology 31: 389-399. 2014. 査読有り

[学会発表](計 10件)

Nakatsuka T., Kobayashi Y., Harada K. and Ohno H. Different expression profiles of anthocyanin biosynthetic genes among Cymbidium cultivars. The XXVIIIth International Conference on Polyphenols. Vienna, Austria. 11-15 July 2016

中塚貴司. 花色を決める分子機構. 第10回超領域研究会 ~次世代を担う静岡大学の研究~. 静岡大学浜松キャンパス. 静岡県浜松市. 平成28年6月30日
中塚貴司・厚見剛・山田恵理・西原昌宏. リンドウの花模様形成機構の解析. 園芸学会平成28年度春季大会. 東京農業大学厚木キャンパス. 神奈川県厚木市. 平成28年3月27日

中塚貴司. ウイルスを利用した花き園芸植物の遺伝子機能解析の利点. 園芸学とウイルス学の異分野融合研究会. 園芸学会平成28年度春季大会小集会. プロミティあつぎ. 神奈川県厚木市. 平成28年3月25日

中塚貴司. 花が彩る分子メカニズムの解明. 第71回静岡生命科学若手フォーラム 生命科学若手セミナー. 静岡大学大谷キャンパス. 静岡県静岡市. 平成27年5月29日

鈴木一真・松山光平・鈴木智大・中塚貴司・道羅英夫・山岸真澄. RNA-Seqを用いたアジアティックハイブリッドユリの花被片着色におけるトランスクリプトーム解析. 園芸学会平成27年春季大会. 千葉大学西千葉キャンパス. 千葉県千葉市. 平成27年3月29日

中塚貴司・原田健二・鈴木智大・道羅英夫・大野始. シンビジウムのアントシアニン生合成制御機構の解析. 園芸学会平成27年春季大会. 千葉大学西千葉キャンパス. 千葉県千葉市. 平成27年3月28日.

中塚貴司・原田健二・鈴木智大・道羅英夫・大野始. シンビジウムのアントシアニン生合成. 第 56 回日本植物生理学会大会. 東京農業大学世田谷キャンパス. 東京都世田谷区. 平成 27 年 3 月 18 日.
佐々木伸大・山田恵理・西澤雄三・**中塚貴司**・立澤文見・樋口敦美・藤田晃平・高橋秀行・西原昌宏. エゾリンドウからのフラボン配糖化酵素遺伝子群の単離. 第 56 回日本植物生理学会大会. 東京農業大学世田谷キャンパス. 東京都世田谷区. 平成 27 年 3 月 17 日.
佐々木伸大・山田恵理・西崎雄三・**中塚貴司**・立澤文見・樋口敦美・藤田晃平・高橋秀行・西原昌宏. リンドウからのフラボン C-配糖化酵素の単離. 第 32 回日本植物細胞分子生物学会大会. アイーナ. 岩手県盛岡市. 平成 26 年 8 月 21 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/shizuokaflower/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中塚 貴司 (NAKATSUKA, Takashi)
静岡大学・農学部・助教
研究者番号: 60435576

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし