

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450045

研究課題名(和文) ラベンダーの香調を決定するモノテルペン生合成調節因子の解明

研究課題名(英文) Analysis of factors regulating monoterpene production in Lavandula

研究代表者

津呂 正人 (Tsuru, Masato)

名城大学・農学部・教授

研究者番号：40410774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：真正ラベンダーF1交雑集団を用いて、420個のAFLPマーカーおよび7個のSSRマーカーが座乗した30連鎖群からなる分子連鎖地図を構築し、精油の主要13成分のうち9成分で生産量を支配するQTLを検出した。

主要精油成分であるリナロール(LINS)および1,8-シネオール生合成遺伝子(CINS)について、siRNA誘導型LINSおよびCINS導入個体の作出した。LINSおよびCINSいずれのノックダウン個体も葉において標的遺伝子の抑制が認められたが、精油全体の生産抑制が観察され、精油生産量全体を調節する因子の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A genetic linkage map of English lavender (*Lavandula angustifolia*) was constructed using an F1 segregating population based on AFLP and SSR markers. The linkage map was generated from 427 loci (420 AFLPs and 7 SSRs) and separated into thirty linkage groups. Thereover, the QTLs, controlling production of 9 out of 13 monoterpene compounds, were identified based on this linkage map.

Transgenic lavandin (*Lavandula intermedia*) plants with siRNA-inducing construct against linalool synthase (LINS) and 1,8-cineole synthase were produced. All the plants were not only inhibited production of targeted compounds as linalool and 1,8-cineole, but also reduced total essential oil production. These results suggested in existence of some genetic factors controlling total essential oil production.

研究分野：園芸学

キーワード：ラベンダー 精油 QTL siRNA リナロール 1,8-シネオール

1. 研究開始当初の背景

Lavandula 属の *Lavandula* 節に属する真正ラベンダー (*L. angustifolia*)、スパイクラベンダー (*L. latifolia*) およびその種間雑種であるラバンジン (*L. × intermedia*) は、花穂に強い芳香性があり、水蒸気蒸留して得られる精油成分が香料として用いられることから、観賞用のみならず産業用としても利用価値が高い。この精油成分は 10 種類程度のモノテルペン化合物で構成されており、その含有比率によって香調が大きく変化する。この含有比率は品種ごとに維持されており、品種識別の指標としても利用可能であるとされている。一方、近年モノテルペンの生合成に関する知見は多くの誌面で紹介されつつあり、各モノテルペン合成酵素は色素体内の非メバロン酸経路 (MEP 経路) を介して生成されたゲラニルピロリン酸 (GPP) を基質として、脱リン酸、環化あるいは水との接触等を促して目的の化合物に変換させることが明らかとなっている。しかしながら、これらモノテルペン合成酵素の多くは、最終産物として目的とするモノテルペン化合物のみならず複数の異なる化合物を生成する 'multi product enzyme' であることが知られており、例えばリモネン合成酵素ではリモネンの他にピネン、カンフェン、テルピノレン、ミルセンが、シネオール合成酵素では 1,8-シネオールの他にサピネン、リモネン、 α -テルペニオールが、また、リナロール合成酵素ではリナロールの他にセスキテルペンであるネロリドールが生成される。これら副生成物は、それぞれ異なる香調を示すばかりでなく、ラベンダーでは主要な構成成分となっている場合があり、主要なモノテルペン合成酵素が他の主要成分を副生成物として互いに生産していることが考えられる。このように、多経路から主要成分が合成されるにも関わらず、品種として一定の含有比率が維持されているのは、個体ごとに高度に生産量が調節されているということに他ならないと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ラベンダー精油の種類と量に着目し、主要な精油成分の生産について遺伝解析を行い、精油生産の調節因子を明らかにする。

具体的には主要な精油成分の生産量が大きく異なる 2 つの品種を交雑し、作成した F1 解析集団を用いて分子連鎖地図の構築を行うと同時に、連鎖地図をもとに各精油成分の生産量を調節する量的形質遺伝子座 (QTL) の解明を行う。

また、精油の主成分であるリナロールおよ

び 1,8-シネオール合成酵素遺伝子について、RNA 干渉させることで発現抑制を行い、含有比率の変異を誘導して新たな香調の創造を試みる。

3. 研究の方法

(1) 香りを支配する遺伝的背景の解明

香調を含む諸形質が大きく異なる真正ラベンダー 2 品種「濃紫 3 号」(紫花, 1 季咲) と「エレガンス・アイス」(白花, 2 季咲) を交配して得られた F1 集団 94 個体を作成し、AFLP および SSR を用いて分子連鎖地図を作成した。

F1 集団各個体の花穂より水蒸気蒸留で精油を抽出し、GC-MS を用いて成分の同定を行うとともに、GC を用いて成分の定量を行った。得られた結果をもとに主要な 9 化合物について生産量に関する QTL 解析を行った。

(2) 遺伝子発現抑制による香調の改変

花穂で発現している mRNA からラベンダー種間雑種であるラバンジン精油の主成分であるリナロールおよびリモネン合成酵素遺伝子 (*LINS* および *CINS*) cDNA を作成し、全長および上流または下流の一部をセンス・アンチセンス方向に連結した siRNA 誘導型コンストラクトをラバンジンに導入し、形質転換体を作成した。得られた形質転換体について、葉および花穂の精油成分を抽出し、各成分を GC で定量するとともに、*LINS* および *CINS* の発現量をリアルタイム PCR で比較・定量した。

4. 研究成果

(1) 真正ラベンダー分子連鎖地図の作成

AFLP では 54 組のプライマーペアから 1017 個の多型を検出した。他方、SSR では 6 プライマーペアから 12 個の多型を検出した。F₁ 集団で分離したマーカーは 764 個 (AFLP 758 個, SSR 8 個) であり、「濃紫 3 号」由来マーカーが 522 個、「エレガンス・アイス」由来マーカーが 242 個であった。そのうち 427 個を地図上に座乗させることができた (第 1 表)。得られた地図は 420 個の AFLP, 7 個の SSR マーカーから構成された 30 連鎖群からなり、全長 2099.3 cM, マーカー間の平均距離は 4.9 cM であった。連鎖群の全長の最大値は 151.3 cM, 最小値は 16.0 cM であった。また、第 1 連鎖群および第 27 連鎖群のマーカー密度が非常に高く、平均 3.1 cM および 2.0 cM であった。また、分離比が歪んだマーカーのみで構成された連鎖群が 3 群あった。今後 F₂ 集団を用いることで分離比が合致するマーカーが増加すると考えられる。本地図はラベンダーで初めての連鎖地図であり、シソ科植物

でも初の地図となる。

第1表 AFLPおよびSSRで認められた多型数

	多型由来親			計
	‘濃紫3号’	‘エレガンス・アイス’		
AFLP	517 (321) ¹⁾	239 (99)		756 (420)
SSR	5 (5)	3 (2)		8 (7)
計	522 (326)	242 (101)		764 (427)

1)括弧内の数値は連鎖地図上に座乗できたマーカー数を示す

(2) 精油成分の生産を支配する QTL 解析

-ピネン, カンフェン, -ピネン, 3-カレン, リモネン, 1,8-シネオール, カンファー, リナロール, 酢酸リナリル, -カリオフィレン, +-ボルネオール, --ボルネオールおよびゲラニオールの13成分が定量され, このうち -ピネン, カンフェン, -ピネン, カンファー, リナロール, 酢酸リナリル, -カリオフィレン, +-ボルネオールおよびゲラニオールの9成分でQTLが確認された。QTLは7つの連鎖群に幅広く認められ, 各成分がそれぞれ独立して量的に支配されていることが示唆された(第2表)。一方, 3-カレン, リモネン, 1,8-シネオールおよび--ボルネオールではQTLを検出できなかった。また, カンファーは‘濃紫3号’でのみ認められ, ‘エレガンス・アイス’がボルネオール脱水素酵素を生産していないことが推察された。本研究で得られたQTL領域には全て‘濃紫3号’由来の優性マーカーが座乗していたため, 今後香りの育種を進める上では‘エレガンス・アイス’由来の優性マーカー獲得も必要であると思われる。また, F1個体は全て紫色花, 2季咲き形質を示していたため, それぞれ花色は‘濃紫3号’が, 開花習性は‘エレガンス・アイス’が優性ホモであることが推察された。

第2表 ‘濃紫3号’ × ‘エレガンス・アイス’ F1 集団で検出した精油成分生産調節 QTL

精油成分	連鎖群	位置(cM)	距離(cM)	有意差	マーカーの由来
a-ピネン	1	16.5-45.4	28.9	*****	濃紫3号
カンフェン	15	27.9-38.6	10.7	*****	濃紫3号
	26	36.1-56.7	20.6	****, ***	
β-ピネン	9	10.3-27.4	17.1	*, **, ****	濃紫3号
3-カレン	?	?	?	?	?
リモネン	?	?	?	?	?
1,8-シネオール	?	?	?	?	?
カンファー	2	70.6-79.9	9.3	***, ****	濃紫3号
	9	0.0-37.4	37.4	*****	濃紫3号
リナロール	5	40.5-60.0	19.5	** , ***, ****	濃紫3号
	1	99.1-115.5	16.4	** , ****	濃紫3号
	6	51.4-64.9	13.5	** , ****	濃紫3号
β-カリオフィレン	6	0.0-64.9	64.9	*****	濃紫3号
	9	0.0-49.8	49.8	*****	濃紫3号
	10	44.0-54.3	10.3	** , ***, ****	濃紫3号
+ -ボルネオール	9	0.0-49.8	49.8	*****	濃紫3号
- -ボルネオール	?	?	?	?	?
ゲラニオール	1	9.7-22.0	12.3	****	濃紫3号

有意差: * 0.1, **0.05, ***0.01, ****0.005, *****0.001,

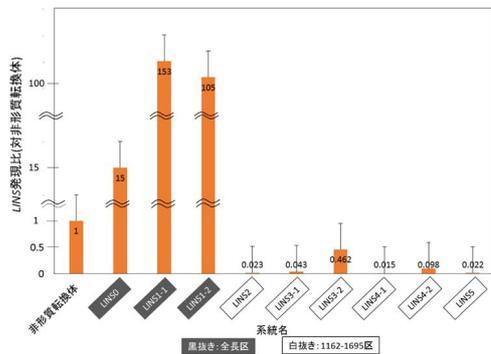
(3) siRNA 誘導型リナロール合成酵素遺伝子導入個体の解析

各形質転換体の葉の精油成分を分析したところ, すべての個体で非形質転換体と比較して, リナロール生産量は減少しているとともに, 他のモノテルペン化合物の生産量の低下も認められた(第3表)。一方, LINS 発現量を比較したとき下流部標的個体のいずれも LINS の発現が著しく抑制されていることが確認され, 導入遺伝子が機能していることが確認されたが, 全長標的個体では発現量が15~150倍となっており, リナロールの生産量と LINS 発現量との間には大きな差異が認められ, 再解析の必要性が示唆された(第1図)。形質転換体の精油成分比は個体毎に大きく異なっており, 香調に変化が見られると考えられた。しかしながら, これらの個体は必ずしもリナロールの成分比のみが低下しているわけではなく, 香調の変化は偶発的であった。

第3表 siRNA 誘導型 LINS 導入個体における葉の精油成分量

精油成分	非形質転換体	葉の精油成分(μg/g FWT)									
		LINS0	LINS1-1	LINS1-2	LINS2	LINS1-2	LINS4-1	LINS4-2	LINS5		
-ピネン	54.2 ± 11.6	55.8 ± 21.9	8.2 ± 0.8**	15.9 ± 1.9	ND	5.8 ± 3.6*	11.4 ± 1.4	3.7 ± 3.7**	8.2 ± 5.1*	52.3 ± 19.3	
カンフェン	37.3 ± 6.1	23.2 ± 8.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16.3 ± 8.8	
-ピネン	41.4 ± 9.7	58.4 ± 27.5	19.3 ± 1.2*	17.5 ± 2.9*	14.6 ± 7.8*	25.0 ± 5.7	11.4 ± 1.4*	61.3 ± 21.0	48.2 ± 19.2	47.7 ± 17.5	
3-カレン	32.6 ± 10.6	48.9 ± 17.6	ND	25 ± 8.8	ND	ND	ND	ND	ND	25.1 ± 9.5	
リモネン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
1,8-シネオール	381.2 ± 51.8	354.1 ± 186.3	186.4 ± 81.1	113.3 ± 13.3**	ND	46.6 ± 17.9**	57.8 ± 10.1**	39.8 ± 11.3**	56.7 ± 20.0**	261.4 ± 68.3	
リナロール	25.8 ± 2.3	13.9 ± 4.9	ND	ND	ND	ND	ND	22.2 ± 2.2**	ND	8.7 ± 4.9*	
カンファー	1032.2 ± 152.2	388.8 ± 65.6	73.4 ± 4.1**	ND	ND	5.0 ± 5.0*	7.6 ± 3.9*	37.3 ± 7.3**	7.6 ± 4.4**	385.5 ± 126.5**	
酢酸リナリル	378.7 ± 177.1	448.3 ± 232.8	85.4 ± 7.7	97.2 ± 15.6	ND	27.2 ± 2.7	4.7 ± 3.2	5.4 ± 3.0	8.1 ± 3.9	215.5 ± 78.1	
-カリオフィレン	6.6 ± 0.4	93.6 ± 54.0	10.2 ± 0.7**	25.9 ± 3.2**	ND	7.7 ± 4.7	14.4 ± 2.8**	7.2 ± 4.2	6.0 ± 3.3	68.3 ± 24.1*	
酢酸リナリル	ND	2.7 ± 2.7	ND	ND	5.2 ± 2.8	9.4 ± 5.6	21.2 ± 4.4**	8.8 ± 1.0**	21.7 ± 7.4**	ND	
-カリオフィレン	28.2 ± 9.9	69.5 ± 27.1	84.8 ± 6.3**	144.2 ± 13.9**	23.0 ± 7.2	33.9 ± 12.9	59.0 ± 14.2	69.6 ± 29.3	87.1 ± 32.4	42.2 ± 18.0	
合計	2524.4 ± 323.0	1791.3 ± 475.6	439.8 ± 220.9*	484 ± 89.0*	78.4 ± 39.8*	212.9 ± 66.1**	378.6 ± 87.8**	357.3 ± 140.8**	476.4 ± 188.6**	285.5 ± 448.4*	

平均 ± 標準偏差
*, ** 1個体以上の複製標的個体LS%が2/F1水準で有意差あり
ND: 検出できず
葉採取: 全長区 自採: 142-149区

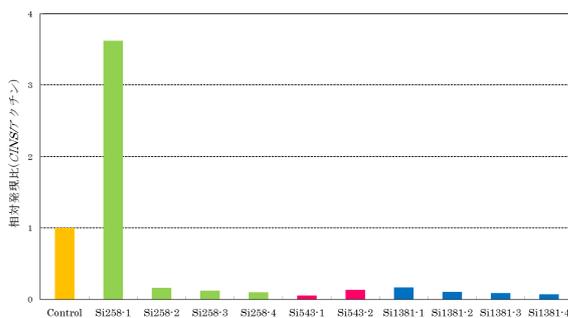


第1図. siRNA誘導型LINS導入個体の葉におけるLINS発現比.

(4) siRNA誘導型1,8-シネオール合成酵素遺伝子導入個体の解析

1個体を除いたすべての形質転換体で葉のCINS発現量が0.05~0.16倍と大幅に低下しており、CINS断片の長さが長いほど抑制効果が高い傾向にあった(第2図)。また、精油成分を分析したところ、CINS発現量の低下に伴い1,8-シネオール生産量も低下していた。しかしながら、他の精油成分および総生産量も低下しており、組成比に大きな変化は見られなかった。

したがって、(3)および(4)の結果からラバンジンでは植物体内で各精油成分合成遺伝子の他に、総精油生産量や組成比を調節する仕組み(モノテルペン生産ネットワーク)が存在する可能性が示唆された。



第2図. siRNA誘導型CINS導入個体におけるCINS発現比.

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 3件)

1. Masato Tsuru, Natsumi Kondo, Marii Noda, Keiko Ota, Yoshinori Nakao and Satoshi Asada (2016) In vitro induction of autotetraploid of Roman chamomile

(*Chamaemelum nobile* L.) by colchicine treatment and essential oil productivity of its capitulum. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 52: 479-483. (査読有り)

2. 南山泰宏・多和田美咲・山田明音・津呂正人(2016) ラベンダーにおけるSSRマーカーの開発と連鎖地図の作成.名城大学農学部 学術報告 52: 11-16. (査読有り)

3. Hiromi Takino, Misako Furuya, Sumiko Yamamoto, Atsuko Sakuma, Masato Tsuru, Tatsuya Yanagimoto, Yoshikazu Tanaka and Masanobu Mino (2015) Improving the Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) resistance of chrysanthemum. Journal of Crop Research 60: 13-17. (査読有り)

[学会発表](計 6件)

1. 津呂正人・犬飼千裕・浅田怜志(2017) 1,8-シネオール合成酵素遺伝子の発現を抑制したラバンジンにおける葉の精油成分. 園芸学会平成 29 年度春季大会, 平成 29 年 3 月 20 日) 日本大学

2. 津呂正人・近藤奈津美・野田万里伊・浅田怜志(2015) ローマンカモミール(*Chamaemelum nobile* L.)倍加個体の作出と花序の精油成分. 平成 27 年度 園芸学会東海支部研究発表会, 平成 27 年 9 月 1 日, B nest 静岡市産学交流センター

3. 田内翔子・大原健史・根岸孝至・津呂正人・吉田久美.(2015) アジサイのアルミニウム処理による組織AI量と輸送体の発現量の変動. 第56回 日本植物生理学会年会, 平成 27 年 3 月 18 日, 東京農業大学

4. 瀧野博己・古谷美佐子・山本すみ子・佐久間敦子・津呂正人・田中良和・三野眞布.(2014) siRNA を利用するキクワイ化ウィロド(CSVd)病抵抗性 育種の可能性. 近畿作物・育種研究会 第178回例会, 平成 26 年 11 月 22 日, 京都府立大学

5. 山田愛子・山本果歩・三好敬太・森あか音・宮島 司・浅田怜志・津呂正人.(2014) スイートバジル由来ゲラニオール合成酵素遺伝子を導入したラバンジン形質転換体の作出.園芸学会平成 26 年度秋季大会, 平成 26 年 9 月 28 日, 佐賀大学

6. 犬飼千裕・浅田怜志・津呂正人.(2014)

リナロール合成酵素遺伝子を導入したラバンジン (*Lavandula × intermedia* Emeric)花穂で見られる精油成分．園芸学会平成 26 年度秋季大会，平成 26 年 9 月 28 日，佐賀大学

〔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 0 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

津呂 正人 (TSURO MASATO)
名城大学・農学部・教授
研究者番号：40419774

(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

()

