

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：83207

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450049

研究課題名(和文) 花弁特異的シスエレメントの同定と「青いチューリップ」創出への応用

研究課題名(英文) Identification of petal-specific cis-element and its application to create a novel 'blue tulip'.

研究代表者

莊司 和明 (Shoji, Kazuaki)

富山県農林水産総合技術センター・富山県農林水産総合技術センター農業研究所・副主幹研究員

研究者番号：50504461

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)：チューリップおよびユリにおいて、花弁特異的な遺伝子発現に関わるシスエレメント配列の解析を行った。解析は、MYB遺伝子プロモーター領域への変異導入と液胞型鉄イオン輸送体(VIT)遺伝子を活用した独自の方法による。その結果、チューリップでは3つのTCATモチーフ、ユリではAAACTTTモチーフが花弁特異性に関わるシスエレメントであることが示唆された。また、ルシフェラーゼ(Luc)を活用して定量解析を行った結果、モチーフ数の増加に比例したLuc活性の増加が認められた。これらのモチーフとVIT遺伝子を活用して、アグロバクテリウム法により「青いチューリップ」作出のための形質転換体を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Flower petal-specific cis-elements of MYB genes, which are expressing only at the petals, were identified in tulip and lily plants. Analysis was done by original method using a combination with introducing mutations in MYB promoter regions and vacuolar iron transporter (VIT) as a reporter gene. After bombardment to purple or red petal cells, we could decide the cis-element sequences by altering the color or not. If mutation is not introduced in cis-element region, the color will change to blue. But, if mutation is introduced in its region, the color will never change. As the results, three TCAT motifs in tulip and AAAC TTT motif in lily were suggested as cis-elements. Quantitative analysis of motifs using luciferase (Luc) as a reporter gene was also supported these sequences. In this study, we could obtain the transgenic plants from tulip by super agrobacterium method using a vector harboring these promoters and VIT gene for produce a novel 'blue tulip'.

研究分野：植物分子生物学

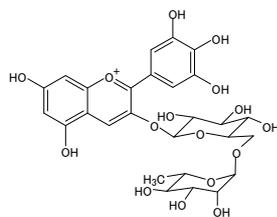
キーワード：チューリップ ユリ プロモーター シスエレメント 花色 形質転換

1. 研究開始当初の背景

(1) 高等植物の多くは花の色素としてアントシアニンを持っている。アントシアニンは、その母核にアントシアニジンを持ち配糖化された化合物の総称である。アントシアニジンはその構造的違いからペラルゴニジン(Pg)、シアニジン(Cy)、デルフィニジン(Dp)に大別され、一般的な植物細胞内の pH である弱酸性下ではそれぞれ橙色、赤色、紫色を呈する (Brouillard and Dangles, 1994)。植物の種類によりアントシアニンの組成や含有量が異なるため多彩な花色が存在している。

近年、青色花はその希少性と学術的意義から様々な植物において青色化機構の解明が進められている (Yoshida et al., 2009)。また、青色花の多くが Dp を母核とするアントシアニンを持つことから Dp 合成の Key 酵素であるフラボノイド 3', 5'-水酸化酵素 (F3'5'H) 遺伝子を活用した花卉の青色化が、F3'5'H 遺伝子を持たないバラやキク等で試みられている (Katsumoto et al., 2007; Noda et al., 2013)。しかし、その花色は未だ紫色で真の青色までには至っていない。

(2) チューリップの花色は多彩であり、花弁色素として Pg, Cy, Dp を持つアントシアニンが見出されている。しかしながら、花弁全体が青くなる「青いチューリップ」は存在しない。品種「紫水晶」は花弁上部が紫色で花底部だけが青色を呈している (図 1)。



Delphinidin 3-rutinoside

図 1 チューリップ「紫水晶」と花底部青色発現および花弁色素

我々は色素分析の結果、花弁上部と花底部はどちらも Dp 3-rutinoside であり、花底部の青色発現は鉄イオンとの錯体形成が原因であることを明らかにした。また、その青色化には液胞型鉄イオントランスポーター (VIT) 遺伝子が関わっていることを明らかにし、紫色の花弁細胞において VIT 遺伝子を発現させると青色化することを実証している (Shoji et al., 2007, Momonoi et al., 2009, Shoji et al., 2010)。

2. 研究の目的

(1) チューリップの花底部で特異的に見られる青色発現は、デルフィニジン色素と鉄イオンによる錯体形成が主な原因であり、花底部特異的な液胞型鉄イオントランスポーター遺伝子 (VIT) の発現が関与している。この VIT 遺伝子を花弁全体で発現誘導することにより「青いチューリップ」を実現できると考えられる。しかし、これまで他の植物を含め、花弁特異的に遺伝子発現を誘導するプロモーターの研究例は殆ど無く、チューリップでの存在も知られていない。そこで、我々はチューリップとユリを材料に花弁特異的に発現している遺伝子を解析し、それぞれ転写因子の一種である MYB 遺伝子が花弁特異的に発現していることを明らかにした。RT-PCR 法により各々 MYB 遺伝子の cDNA を単離した後、その遺伝子情報を基に各プロモーター領域をクローン化した。

本研究では、VIT 遺伝子を活用した新たな解析手法 (青色化の有無) により、これらプロモーターにおける花弁特異性を決定するシスエレメント配列を特定し、その特性を明らかにすることを目指している。

(2) また、これらプロモーターを活用した組換えチューリップの作出を図るため、チューリップの培養系を活用した効率的な形質転換体の作出技術を開発する。

3. 研究の方法

(1) シスエレメント配列の解析

MYB プロモーター領域の 5' 側より順次欠失を行い、VIT 遺伝子を繋いだ遺伝子導入用ベクターを構築する。そのベクターを紫色花弁細胞にパーティクルガン法で遺伝子導入を行い細胞の青色化の有無によりプロモーター活性を評価する。プロモーター活性があれば VIT 遺伝子の発現が誘導され細胞は青色化し、プロモーター活性が無ければ青色化しない。

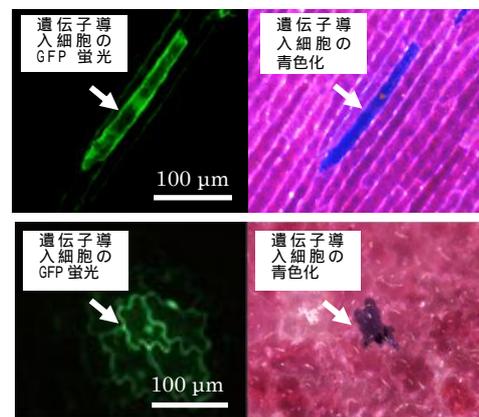


図 2 VIT 遺伝子導入による紫色花弁細胞の青色化 チューリップ花弁細胞 (上段) およびユリ花弁細胞 (下段). 遺伝子導入の目印として GFP (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子も同時に導入している。

また、シスエレメント領域がある程度特定できた段階において、次に inverse PCR (iPCR)

法にてシスエレメント領域に任意の欠失変異を導入する。花卉細胞への遺伝子導入により同様の評価手法でシスエレメント配列を特定できる。この方法は細胞の色の変化で評価できる新たな解析手法である。

(2) プロモーター活性の定量化

シスエレメント配列およびその改良型配列をルシフェラーゼ(Luc)遺伝子に繋いだベクターを構築する。そのベクターを花卉細胞または葉の細胞への遺伝子導入を行い、粗タンパク質を抽出後に Luc 活性を測定する。

(3) 形質転換体の作出

MYB プロモーターのシスエレメント(および改良型配列)を活用した VIT 遺伝子発現ベクターを構築し、アグロバクテリウム法によりチュールリップ培養細胞に遺伝子導入する。ピアラホス耐性による細胞選抜と再分化誘導を行い形質転換体の作出を試みる。

4. 研究成果

(1) シスエレメント配列の解析

チュールリップ MYB プロモーター領域(1.2 kb)およびユリ MYB プロモーター領域(2.8 kb)の中で、末端からの欠失解析によりシスエレメントが存在すると推定された領域は各々200 bpと150 bpである。この結果を基に、inverse PCR 法により各シスエレメント領域において任意の部位に 40 bp の欠失変異を、次に 20 bp の欠失変異を導入し、花卉細胞における青色化の有無により更なる絞り込みを試みた(図3)。その結果、チュールリップでは異なる2カ所の20 bp 欠失部位に、ユリでは隣接する2カ所の20 bp 欠失部位にそれぞれシスエレメント配列が存在することが示された。

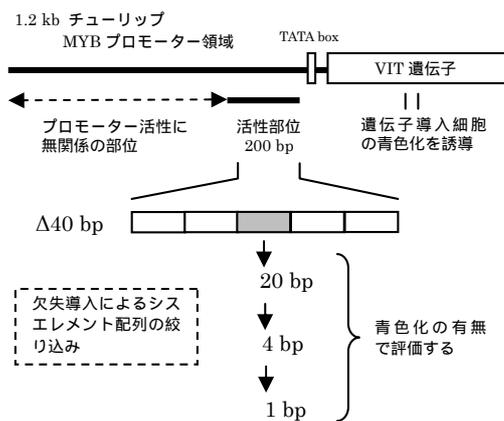


図3 チュールリップ MYB プロモーター領域におけるシスエレメント配列の解析法
iPCR 法によりプロモーター領域に欠失変異を導入し、遺伝子導入細胞の青色化の有無により塩基配列を特定する。

そこで更に配列を特定するため、これらの部位に 4 bp、次に 1 bp ずつの欠失変異を導入した結果、チュールリップではこの領域内に存在する3つのTCAT配列に変異が導入されるとプロモーター活性が低下することが判明

した。同様にユリでは AAACCTTT 配列に変異が導入されるとプロモーター活性が低下することから、これらの塩基配列が各々の MYB プロモーターにおける花卉特異性に関わるモチーフである可能性が示唆された。また、ユリの場合、AAACCTTT モチーフ(LTSE1 モチーフと命名)とは別に弱いながらもプロモーター活性に影響を及ぼす2つのモチーフの存在も示唆された。尚、これらのモチーフでは 4 bp の欠失を導入した際には導入細胞の青色化は認められず、プロモーター活性は完全に失われるが、1 bp の欠失導入では青色化する場合と青色化しない場合がありプロモーター活性の消失ではなく、活性の低下が生じていると考えられる。

(2) プロモーター活性の定量化

プロモーター活性を定量化するため、(1)で明らかになったモチーフとルシフェラーゼ(Luc)遺伝子をレポーターとするベクターを構築し、花卉組織および葉組織に遺伝子導入を行った。粗タンパク質を抽出し、Luc 活性を測定した結果、LTSE1 モチーフを繋いだベクターは花卉のみで発現が認められ、葉組織での発現は認められなかった。さらに、LTSE1 モチーフを3個、6個とタンデムに連結したベクターを構築し Luc 活性を測定したところ、モチーフの数に比例した Luc 活性の増加が認められた(図4)。これらのことから、LTSE1 モチーフはユリにおける花卉特異的シスエレメントであることが強く示唆された。

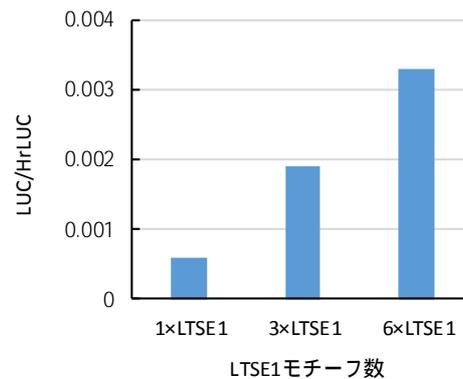


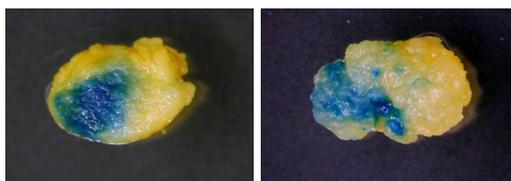
図4 LTSE1 モチーフ数と転写活性の関係

同様に、チュールリップの3つのTCATモチーフにおいても Luc 活性が認められている。また、ユリの LTSE1 モチーフはチュールリップの花弁組織でも発現誘導するのにに対し、チュールリップの TCAT モチーフはユリの花弁組織では発現誘導しないことが判明した。このことから TCAT モチーフはチュールリップの花弁に特異的なシスエレメントである可能性が示唆された。

(3) 形質転換体の作出

チュールリップは組織培養による増殖が可能であり、主に球根のりん片または花茎が出発材料になる。共にカルスからの再分化が可能であるが、再分化率は花茎を材料とした方

が高く安定しているため形質転換は主に花茎由来のカルスを使って進めてきた。培養に用いた品種は比較的再分化率の高い「夢の紫」で花弁は「紫水晶」と同様に Dp 3-rutinoside により紫色を呈する。花茎は球根から葉先が 3~5 cm 伸びた時期 (11 月~12 月) に球根内部にある約 1 cm ほどのものを輪切りにして使い 1/2MS 基本培地にショ糖 3%、2,4-D 1 ppm、BA (ベンジルアデニン) 1 ppm、ゲランガム 2%の寒天培地上に置床した。培養は 20℃、暗培養で行いカルス形成を誘導した。約 1 ヶ月後、誘導されたカルスにアグロバクテリウム法で遺伝子導入を行うため、アセトシリンゴン 10 ppm を含む共存培地で 20℃、4 日間共存培養を行った。ベクターは pRI201 (タカラバイオ) を基本としチューリップまたはユリの MYB プロモーターと VIT 遺伝子を繋いだものを構築した。また、対照として GUS 遺伝子を持つベクターも構築した。アグロバクテリウムは EHA101 株を用いた。近年、アグロバクテリウムの感染時にエチレンが生成され感染効率が低下することが報告されている。これを防ぐため、エチレンを分解する能力をもつスーパーアグロバクテリウム法が開発された (Nonaka et al., 2008)。本研究においてもスーパーアグロバクテリウム法による遺伝子導入を行い従来法との比較を行った結果、従来法に比べスーパーアグロバクテリウム法は約 5% 遺伝子導入効率が高いことが明らかになった (図 5, 6)。



通常のアグロバクテリウム スーパーアグロバクテリウム

図5 アグロバクテリウム法とスーパーアグロバクテリウム法によるチューリップ培養カルスへの GUS 遺伝子導入

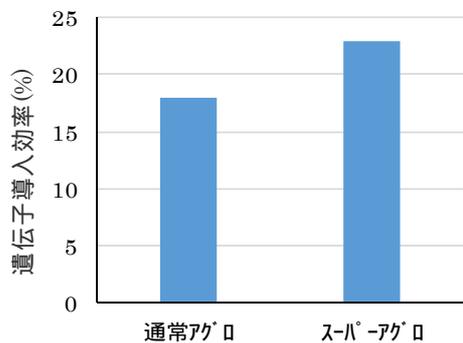


図6 アグロバクテリウム法の違いによる遺伝子導入効率の比較

共存培養後に除菌した後、ピアラホス 10 ppm で細胞選抜を行い、再分化誘導培地 (2,4-D 0.1 ppm、BA 1.0 ppm) でシュート形成を

誘導した (図 7)。

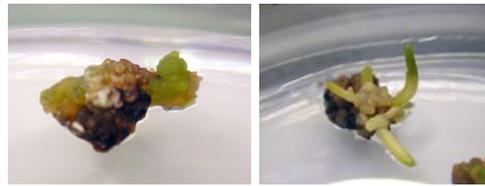


図7 導入後のピアラホスによる細胞選抜と再分化誘導によるシュート形成

チューリップでは、得られた再分化個体 (シュート) は発根機能を持っていないため、直接土で順化育成することはできない。発根は球根の根盤からのみ行われるため、シュート形成後は球根形成を誘導する必要がある。そのためには再分化した個体をそのまま低温 (7℃) で 2~3 ヶ月処理する必要がある。低温処理後、20℃ に戻して培養を続けることで球根形成が促進される (図 8)。

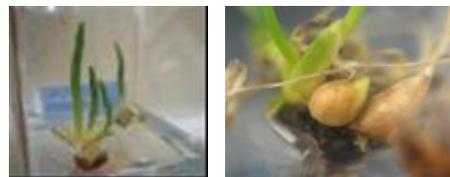


図8 再分化個体における低温処理と小球根形成

得られた球根は非常に小さく直径が 1~5 mm 程度である。これを培土で栽培することでようやく次世代へと繋げることが可能となる。この間、球根育成を続けるとともに形質転換体における導入遺伝子 (ピアラホス耐性遺伝子 Bar を指標とする) の確認を行った (図 9)。

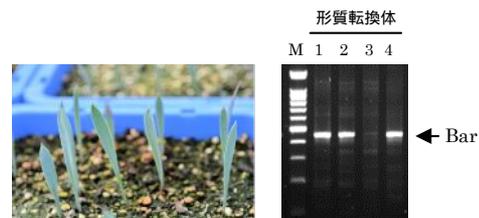


図9 培養土での形質転換体の育成と導入遺伝子の確認

初開花までには直径約 3 cm の球根にまで育てなければならず、そのためにはさらに長い年月を要する。

<引用文献>

Brouillard, R. and Dangles, O. Flavonoids and flower colour. In *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Edited by Harborne, J.B. 1994, 565-588.

Yoshida, K., Mori, M. and Kondo, T. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Nat. Prod. Rep.*, 2009, 26, 884-915.

Katsumoto, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Brugliera, F., Holton, T.A.,

Karan, M., et al. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. Plant Cell Physiol. 48, 2007, 1589-1600.

Noda, N., Aida, R., Kishimoto, S., Ishiguro, K., Fukuchi-Mizutani, m., Tanaka, Y. and Ohmiya, A. Plant Cell Physiol., 54, 2013, 1684-1695.

Shoji, K., Miki, N., Nakajima, N., Momonoi, K., Kato, C. and Yoshida, K. Perianth bottom-specific blue color development in tulip cv. 'Murasakizuisho' requires ferric ions. Plant Cell Physiol. 48. 2007. 243-251.

Momonoi, K., Yoshida, K., Mano, S., Takahashi, H., NAKAMORI, C., Shoji, K., et al. A vacuolar iron transporter in tulip, TgVit1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. Plant J. 59. 2009. 437-447.

Shoji, K., Momonoi, K. and Tsuji, T. Alternative expression of vacuolar iron transporter and ferritin genes leads to blue/purple coloration of flowers in tulip cv. 'Murasakizuisho'. Plant Cell Physiol. 51. 2010. 215-224.

Nonaka, S., Sugawara, M., Minamisawa, K., Yuhashi, K. and Ezura, H. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase enhances Agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer into plant cells. Applied and Environmental Microbiol., 2008, 2526-2528.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

莊司和明、チューリップの花弁特異的 TgMYB1 プロモーター領域におけるシスエレメント配列の同定、園芸学会平成 26 年度秋季大会、2014.9.28、佐賀大学本庄キャンパス(佐賀市)

莊司和明、チューリップの花弁特異的 TgMYB1 プロモーターにおけるシスエレメントの同定と花色改変への応用、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015.3.29、岡山大学津島キャンパス(岡山市)

莊司和明、酸化型グルタチオン(GSSG)によるチューリップ球根の肥大化促進効果、園芸学会平成 27 年度秋季大会、2015.9.27、徳島大学常三島キャンパス(徳島市)

安藤貴子、水島美羽、丸山温子、若杉達也、莊司和明、山本将之、ユリの花被片特異的な発現を促すシスエレメントの解析、日本育種学会第 131 回講演会、2017.3.30、名古屋大学(名古屋市)

〔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

<http://taffrc.pref.toyama.jp/nsgc/index.phtml>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

莊司 和明 (SHOJI, Kazuaki)

富山県農林水産総合技術センター・農業研究所・副主幹研究員

研究者番号： 5 0 5 0 4 4 6 1

(2) 研究分担者

山本 将之 (YAMAMOTO, Masayuki)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・講師

研究者番号： 1 0 4 5 6 4 0 2

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

山田 恭司 (YAMADA, Kyoji)

若杉 達也 (WAKASUGI, Tatsuya)

丸山 温子 (MARUYAMA, Atsuko)

水島 美羽 (MIZUSIMA, Miu)

安藤 貴子 (ANDO, Takako)

池川 志穂 (IKEGAWA, Shiho)