

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660022

研究課題名(和文)フラボノイド・カロテノイド生合成経路の花弁特異的同時制御による花色改変技術の開発

研究課題名(英文)Development of technology for flower color-alteration using flower petals-specific simultaneous controls of flavonoids and carotenoids biosynthesis pathway

研究代表者

鈴木 栄(suzuki, sakae)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：80397017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、フラボノイドおよびカロテノイド生合成経路を花弁特異的に同時制御し、花色を改変する技術の開発を行った。

各色素の生合成関連遺伝子を全身で過剰発現させたところ、タバコおよびトレンニアでは、フラボノイドとカロテノイドが葉と花弁に蓄積し、葉色と花色が変化した。ミヤコグサではカロテノイドの蓄積により葉色と花色が変化した。フラボノイド色素の蓄積はみられなかった。また、新たに開発した差別的RNAi制御法により、花弁特異的な遺伝子発現制御を試みたところ、タバコにおいて花弁特異的なフラボノイドの高蓄積が確認された。しかし、トレンニアとミヤコグサでは、花弁特異的ではなく全身で色素蓄積が観察された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we try to develop a technology for flower color-alteration using flower petals-specific simultaneous controls of flavonoids and carotenoids biosynthesis pathway. Transgenic plants overexpressing of each biosynthesis pathway genes of two plant pigments were produced in some model plants. In the transgenic plants of Tobacco and Torenia, flavonoids and carotenoids pigments were accumulated in these flower tissues and leaves, and the color of the flower and leaf were changed.

A newly developed method, a subtractive tissue-specific RNAi expression method were used for flower petals-specific gene expression in some model plants. As a result, flower color-specific alteration were observed in Tobacco plants, but on the other hand, color-changing of flower petals and leaves were observed in Lotus japonicus and Torenia.

研究分野：園芸学

キーワード：アントシアニン カロテノイド 花色 花弁特異的 RNAi ミヤコグサ トレンニア

1. 研究開始当初の背景

花色を構成する2大植物色素のうち、フラボノイドについては、様々な植物種で生合成経路に関する発現解析や操作が行われており、青いバラなどが市販化されている。一方、カロテノイド色素については、イネやトマトなどの食用作物において、生合成経路の解析や改変が行われ、食用器官に高濃度のカロテノイドを含むものが作出されている。観賞作物では、キクやマリーゴールドなどでカロテノイド生合成経路の解析が進んでいるが、生合成経路操作による花色改変は報告されていない。このような背景のもと申請者は、モデル植物のミヤコグサを材料として、海洋細菌由来カロテノイド生合成遺伝子を過剰発現させ、花色改変できることを報告した。

このように、両色素は花色を表現する重要な色素であるにもかかわらず、これまで独立的に研究されており、同一植物個体で両生合成経路を操作することは検討されていない。さらに、両色素遺伝子を制御するプロモーターについても改良すべき課題がある。申請者は、カロテノイド色素のさらなる高蓄積化を目指し、全身高発現プロモーターで制御した crtW 遺伝子などをタバコに導入したが、生育異常や再分化不能が観察された。この原因は、カロテノイド生合成経路がジベレリン・アブシジン酸合成経路に関与する上、緑色組織の光合成機能の維持に必須であるためと考えられる。このような現象は、フラボノイド生合成経路操作ではほとんど見られない。フラボノイド生合成経路操作における花色改変では、主に同色素の生合成・転写調節関連遺伝子や花器官形成関連遺伝子のプロモーターなどを利用し成果が得られている。しかし、これらのプロモーターは厳密な花卉特異性が低く花卉での発現も弱いことが多いため、花弁組織のみでカロテノイド生合成経路を操作する場合には、効果的ではない。したがって、緑色組織に影響せず厳密に花卉特異的に両色素生合成経路を高発現制御するためには、これまでとは異なる手法を適用する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、主に以下の項目について明らかにすることを目的とした。

(1)タバコ、ミヤコグサ、トレニア、ビオラなどの複数のモデル植物へ、両色素生合成経路に関する遺伝子を導入し、両色素の同時代謝制御が可能かを明らかにする。

(2)各色素について、新たに提案する「差分的 RNAi 制御法」を用い、より厳密な花卉特異的発現制御が可能かを明らかにし、両色素生合成経路の花弁特異的同時制御による花色改変技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、以下の項目について検証を行った。

(1) 全身高発現または差分的 RNAi 制御法により、フラボノイドまたはカロテノイドの各色素生合成経路関連遺伝子を複数のモデル植物へ導入し、差分的 RNAi 制御法の有効性を検証した。

(2) 差分的 RNAi 制御法により、フラボノイドおよびカロテノイドの両色素生合成経路関連遺伝子を複数のモデル植物へ導入し、両色素生合成経路の花弁特異的同時発現制御が可能かを検証した。

4. 研究成果

(1) タバコ、ミヤコグサ、トレニアの各モデル植物に、フラボノイド生合成経路の転写調節遺伝子の1つであるシロイヌナズナ由来 Atpap1 遺伝子、および海洋細菌由来カロテノイド生合成遺伝子 crtW(Paracoccus 由来または Brevandimonas 由来)を、全身高発現 CaMV35S プロモーターで制御し導入した。

その結果、タバコでは、全身が赤色の個体が得られ、葉および花弁には高濃度のアントシアニンおよびケトカロテノイドが蓄積した

(図1)。ミヤコグサとトレニアではケトカロテノイドの蓄積により葉が濃緑色になったが、アントシアニンの高蓄積はみられなかった。花弁について、ミヤコグサは全体が黄色から橙色に変化し、トレニアも黄色部分が橙色に変化した。また、トレニア花弁の赤色部分は、アントシアニンの高蓄積により濃赤色に変化した(図2)。この結果より、3植物種で両色素生合成経路を同時に制御できることが示された。特に、両色素を花弁に持つトレニアでは、目視による色変化を花卉で確認できた。

図1

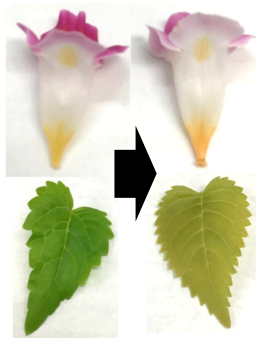


[全身発現プロモーター::フラボノイド転写調節遺伝子(Atpap1)]を導入
→全身が赤色に変化

図 2



ミヤコグサの花弁と葉（左：非形質転換体，右：形質転換体）



トレニアの花弁と葉（左：非形質転換体，右：形質転換体）

(2) 次に、1での手法を花卉特異的に制御するため、差分的 RNAi 制御法を用いて形質転換を行った。アントシアニン色素について、全身高発現 LjUbi プロモーターで制御した Atpap1 遺伝子と、緑色器官特異的 PnZip プロモーターで RNAi 発現抑制した Atpap1 遺伝子の統合ベクターを作成し、タバコに導入した。その結果、葉およびガクは緑色で花弁のみ濃赤色に変化した個体を得られ、本手法が花卉特異的遺伝子制御法として利用できることがわかった (図 3)。

図 3



非形質転換体

<フラボノイド色素と花器官に差分的 RNAi 制御法を適用>

(3) 最終年度は、この手法をカロテノイド色素についても適用するため、ミヤコグサおよびトレニアで同様の実験を実施した。緑色器官特異的 PnZip プロモーターで RNAi 発現抑制したカロテノイド生合成遺伝子の統合ベクターを用い、複数の形質転換体を得ることができた。結果として、ミヤコグサおよびトレニアの形質転換体では、花弁が黄色から橙色に変化した。葉も緑色から濃緑色に変化する系統が多くみられた。したがって、カロテノイド色素については、葉において RNAi 抑制が機能していない可能性があり、差分的 RNAi 制御法を用いた花卉特異的発現制御が困難であることが示された。

結果として、カロテノイド色素については、差分的 RNAi 制御法により、花弁でのカロテノイド色素の高蓄積化と再分化を両立することはできた。しかし、花弁は赤色などの劇的な変化がみられず、葉色も変化していたことから、厳密な花卉特異的発現制御と劇的な花色改変効果の達成までは到達していない。

(4) 複数のモデル植物において、フラボノイドおよびカロテノイド色素生合成経路の改変と花色または葉色の変化を誘導することができた。一方、差分的 RNAi 制御法は、フラボノイド色素について、タバコでは目的が達成されたが、カロテノイド色素については、当初の目的まで到達することはできなかった。今後は、カロテノイド色素についても、他の手法を検討し、タバコ以外の実用品種にも応用できる技術を開発する予定である。

本研究が、これまでにない観賞価値を持つ園芸作物の作出方法の開発につながることを期待する。

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)

[学会発表] (計 5 件)

① 木村茉莉・鈴木栄 有色花ユキヤナギの作出に向けた Atpap1 遺伝子の導入とカルスからの植物体再生. 2016. 園学研. (Hort. Res. (Japan)) (別) 1: 437. 園芸学会, 2016 年 3 月 26-27 日, 東京農業大学厚木キャンパス (神奈川県厚木市).

② 平下雄也・鈴木栄 A. rhizogenes によるフラボノイド・カロテノイド生合成関連遺伝子の導入がタバコの形質に及ぼす影響. 2015. 園学研. (Hort. Res. (Japan)) (別) 2: 409. 園芸学会, 2015 年 9 月 26-28 日, 徳島大学常三島キャンパス, 徳島県徳島市.

③ 松崎光伯・倉持由衣・鈴木栄 ミヤコグサにおけるカロテノイド生合成関連遺伝子および花成関連遺伝子プロモーターを利用

した花器特異的発現調査. 2015. 園学研.
(Hort. Res. (Japan)) (別) 1: 418. 園芸学
会, 2015年3月28-29日, 千葉大学西千葉キャン
パス, 千葉県千葉市.

④ 本間悠希子・鈴木栄 フラボノイドおよ
びカロテノイド色素関連遺伝子の同時導入
がトレニア形質に及ぼす影響. 2015. (Hort.
Res. (Japan)) (別) 1: 417. 園芸学会, 2015
年3月28-29日, 千葉大学西千葉キャンパス,
千葉県千葉市.

⑤ 中川和紀・鈴木栄 Atpap1 全身発現コデ
マリにおける発現解析および形態調査. 2015.
園学研. (Hort. Res. (Japan)) (別) 1: 416.
園芸学会, 2015年3月28-29日, 千葉大学西千
葉キャンパス, 千葉県千葉市.

[その他]

ホームページ等

[http://web.tuat.ac.jp/~engei/2013dong_j
ing_nong_gong_da_yuan_yun_yan_jiu_shi_%
28ling_mu%29/yan_jiuno_gai_yao2013.html](http://web.tuat.ac.jp/~engei/2013dong_jing_nong_gong_da_yuan_yun_yan_jiu_shi_%28ling_mu%29/yan_jiuno_gai_yao2013.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 栄 (SUZUKI, Sakae)

東京農工大学・大学院農学研究院・講師

研究者番号：80397017

(2) 研究協力者

中川 和紀 (NAKAGAWA, Waki)

本間 悠希子 (HOMMA, Yukiko)

松崎 光伯 (MATSUZAKI, Mitsunori)

平下 雄也 (HIRASHITA, Yuya)

木村 茉莉 (KIMURA, Mari)