

令和元年6月11日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07601

研究課題名(和文)トルコギキョウの斑入り花で見つかったトランスポゾンの解析と利用

研究課題名(英文) Analysis and utilization of transposon isolated from a variegated flower line in *Eustoma grandiflorum*

研究代表者

清水 圭一 (Shimizu, Keiichi)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：30305164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：トルコギキョウは我が国の重要な花卉であり、様々な性質を持った品種が作出されている。さらなる品種改良のためには、突然変異を効率的に起こすことが必要である。近年、植物に変異を起こす因子として動く遺伝子トランスポゾンが注目されている。本研究ではトルコギキョウにおいて斑入り花を引き起こすトランスポゾンを単離し、突然変異育種の変異原として利用できないかを検討した。その結果、本研究で調査したトルコギキョウのトランスポゾンは活性をもち、引き起こされた変異が後代に伝達することを確認した。また、トランスポゾンの性質を利用して、桃色系の斑入り花を作出することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、トルコギキョウにおいて我々が単離したトランスポゾンが転移活性を保持しており、品種改良の変異原として利用可能であることが示された。これまでに、有用植物に突然変異を起こす方法として、放射線照射や化学物質処理が多く用いられてきたが、前者は高価な装置を必要とし、後者は危険な薬品を使う必要があり、一般の人には実行が難しい。本研究の手法による突然変異の誘発は、高価な装置、危険な薬品、特別な施設や専門知識も必要なく、誰でも手軽にトルコギキョウで突然変異育種を行える可能性を提供するものである。また、トルコギキョウの商業的な品種改良においても、さらなる変異の拡大に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)： *Eustoma grandiflorum* is an important ornamental plant in Japan, producing various types of flowers. For further breeding, it is necessary to induce mutations efficiently. During recent years, transposable elements (TEs), which move in a genome causing mutations, have attracted attention as a mutagen for plant breeding. Transposable elements are also known to cause variegation in flowers in some species. We isolated transposable element from a variegated flower cultivar of *E. grandiflorum* and examined its use as a mutagen for mutation breeding. The results confirmed that the TE was active and that the mutation induced was inherited in the offspring. So far, there have been only purple variegated flower cultivars in *E. grandiflorum*, but for the first time, we succeeded in producing flowers with pink variegation in this study.

研究分野：園芸学

キーワード：トランスポゾン 突然変異育種 トルコギキョウ 斑入り

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)トルコギキョウは、主に我が国で育種が進み、戦後の数十年間という比較的短期間で、原種の紫色から、赤、桃、黄、白、緑、藤色など様々な花色が現れ、覆輪、逆覆輪、斑入りなどの形質も加わり多彩な花色と模様品種、約700余りが作出されているとされる(引用文献)。更なる花色の多彩化は本種の園芸的価値を高めるものと期待される。

(2)トルコギキョウの品種‘スピカロマン’は右図のように花卉に斑が入る特徴を持っている。しかし、この形質は自殖を繰り返しても完全には固定せず、一定数の斑の無い全色個体が後代に現れる。一方、動く遺伝子であるDNA型トランスポゾン(Transposon)は育種における変異原として有用であり(引用文献)。また、このような斑入りの原因であることが複数の植物で報告されている(引用文献)。我々は、これまで‘スピカロマン’の花卉の地色(薄紫)の部位では、花卉色素の生合成に関わる*F3H*遺伝子の発現量が低下していること、この*F3H*遺伝子にDNA型トランスポゾンの特徴を持った配列(*dTeg1*)が挿入されていること、さらに、紫色の斑の部位では*dTeg1*が転移して、*F3H*の発現が復帰している可能性があることを見出している。*dTeg1*は両端の逆位末端配列にCACTAを含む*En/Spm*スーパーファミリーに属するトランスポゾンで、内部に転移酵素をコードしていない非自立性因子である。



図1 ‘スピカロマン’

### 2. 研究の目的

我々はトルコギキョウの表現型の遺伝とDNA上の変異をリンクさせる研究を長年行ってきた(引用文献)。花色の表現型の遺伝とゲノムDNA上の変異を結びつけることができれば、DNAマーカーの開発につながり、育種を効率化することが出来る。このような研究の中で、我々はトルコギキョウの品種‘スピカロマン’の斑入りに着目し、本種の斑入りと*dTeg1*の関係を詳しく解明することで、この*dTeg1*を育種における変異原やDNAマーカーとして利用できる可能性があるとの着想に至った。また、トルコギキョウには紫の斑入りの品種しか無かったので桃色や赤系の斑入りの系統を作ることも目的として実験を行った。

### 3. 研究の方法

*dTeg1*をトルコギキョウの育種に利用するためには、その性質を調査する必要がある。そのため、以下の(1)から(3)の実験を行った。

(1)斑入り遺伝様式の調査: ‘スピカロマン’に斑入りの無い桃色の花卉を持つ系統(全色桃色花系統)の‘ピンクサム’を交配し、斑入りの遺伝様式を調査した。交配の相手として‘ピンクサム’を選んだのは、これまでトルコギキョウには紫の斑入り品種しかなかったため、桃色～赤色系の斑入り系統を作出するためである。

(2)*dTeg1*挿入の系統間差異や転移活性を調査: ‘スピカロマン’や市販品種由来の系統や野生種を使って、ゲノム内での*dTeg1*の挿入パターンの系統間差異を、トランスポゾンディスプレイ法(TD法)によって調査する。また、‘スピカロマン’の自殖後代で、親系統に無い新しい挿入がどの程度の頻度で起こるかを調査する。TD法の具体的な手法は、まず制限酵素でゲノムを切断し、切断箇所にアダプター配列をライゲーションする。次に、アダプター配列に特異的なプライマーとトランスポゾンに特異的なプライマーを用いてPCRを行いゲノム中の様々な場所に分布しているトランスポゾンを検出する。本手法はイネ、ペチュニア、アサガオ等ですでに報告されており、トランスポゾンのゲノム中での分布を調べるための強力なツールである(引用文献)。

(3)斑入り固定しない原因の調査: ‘スピカロマン’の自殖後代に現れる斑入りの無い個体の*F3H*遺伝子の配列の変異などを調査する。

### 4. 研究成果

(1)トルコギキョウの斑入りの遺伝様式の調査に関しては、紫色の斑入り品種の‘スピカロマン’と全色桃色花品種の‘ピンクサム’を交配し、後代での遺伝様式を観察した。その結果、 $F_1$ 世代では全て全色紫の花になった。これは、斑入り形質と桃色花形質がともに紫色花形質に対して潜性であることを示している。また、 $F_2$ 世代115個体での形質の分離は、紫全色69個体、薄紫全色17個体、紫斑入り2個体、ピンク全色14個体、白色11個体、ピンク斑入り2個体、となった。前述のように、トルコギキョウには紫色の斑入り品種しかなく、本研究における桃色系の斑入り花系統の作出は初めての成果である。また、 $F_2$ 集団に現れた白色花は薄紫花形質とピンク色花形質が合わさったものと考えられ、このような組み合わせに



図2 ‘スピカロマン’×‘ピンクサム’の $F_2$ 集団で観察された桃色斑入り(▲)個体。

白色花は薄紫花形質とピンク色花形質が合わさったものと考えられ、このような組み合わせに

において白色花が作出できるということを示したのは本研究が初めての成果である。

本研究では、桃色の斑入り花の作出に成功したが、斑入りの数は少なく、1花冠あたり2個程度で、その面積も小さいものであった(図2)。この原因として、交配に使用した‘ピンクサム’が *dTeg1* の転移を抑制する因子を持っていた可能性や、*dTeg1* の転移を活性化する因子が交配の過程で抜けた可能性が考えられる。現在、ピンク色の斑入り個体に‘スピカロマン’を戻し交雑して斑入りが強くなった個体の育成を検討している。

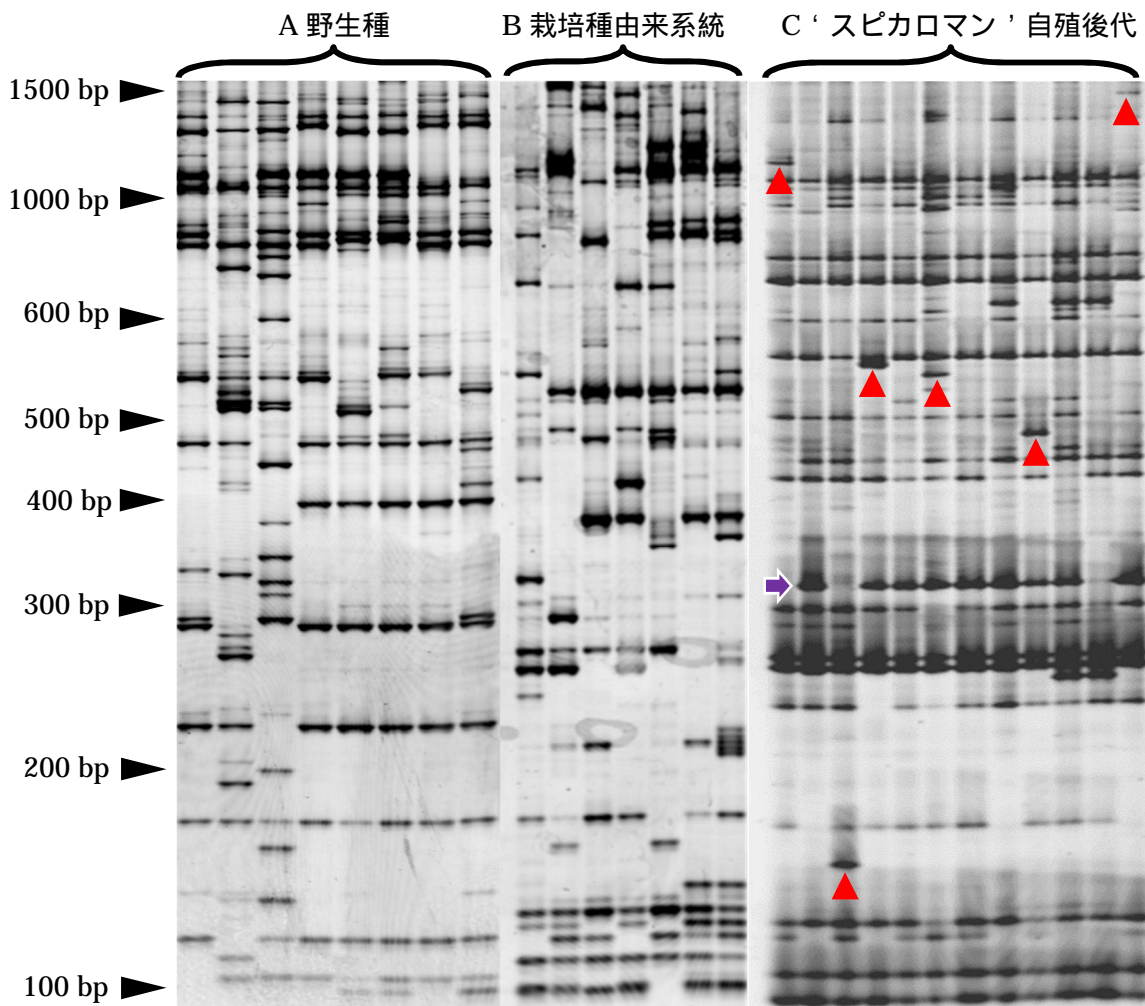


図3 トルコギキョウにおける TD 法による *dTeg1* 様配列の検出。A:野生種における *dTeg1* 様配列の分布パターンの系統間差異、B:栽培種に由来する系統における *dTeg1* 様配列の分布パターンの系統間差異、C:‘スピカロマン’の自殖後代 12 個体での *dTeg1* 様トランスポゾンの分布。12 個体中 1 個体のみ認められる増幅産物( )は、*dTeg1* 様トランスポゾンの新たな転移によって生じたものと考えられる。紫色の矢印( )は *F3H* 遺伝子に挿入されている *dTeg1*。

(2) 従来の研究では、*dTeg1* は *F3H* 遺伝子に挿入されているのみであった。そこで、ゲノムの他の領域に存在している *dTeg1* 様トランスポゾンを検出し解析するため、TD 法を用いて *dTeg1* 様トランスポゾンの検出を試みた。

本研究では最初に、TD 法で得られたバンドが *dTeg1* 様トランスポゾンの挿入を反映しているかどうかの調査を行った。TD 法では図3に示したような多数のバンドが得られており、このうちのいくつかのバンドを切り出して配列決定を行った。TD 法はトランスポゾンの末端にプライマーを設定しているため、そのままバンドの配列決定を行っても、そのバンドがトランスポゾンの挿入を反映しているかは判別できない。そのため、切り出したバンドから得られた配列とトランスポゾンの末端より内側の配列を元にプライマーを設計して PCR を行い、得られた増幅産物の配列の決定を行った。その結果、調査を行ったバンドの多くは *dTeg1* の末端配列を含んでおり、本研究の TD 法は *dTeg1* 様トランスポゾンの検出に有効であることが示された。

また、TD 法により検出されるバンドの数は‘スピカロマン’で 20-40 本であった。スピカロマン以外の市販の品種に由来する系統や野生種でも同様のバンド数であった(図3A, B)。 *dTeg1* 様トランスポゾンはトルコギキョウの系統間に広く分布し、それぞれ個体のゲノム中に少なくとも数十コピー以上存在すると考えられる。トランスポゾンディスプレイ法によるバンドパタ

ーンは品種や系統によって大きく異なっており、本手法は品種の識別などに応用可能であると  
考えられる。

(3) 次に、‘スピカロマン’含むトルコギキョウの6系統の自殖後代で *dTeg1* 様トランスポ  
ソンの活性を TD 法で調査した。自殖後代において、親系統が持っていない新しいバンドが出た場  
合、新たな位置にトランスポソンが挿入された可能性があるとして判断した。‘スピカロマン’の後  
代では 12 個体あたり、6 個の新たな挿入を示すバンドが検出された(図 3C)。また、‘スピカロ  
マン’以外の系統では、全く検出されなかったものが 2 系統、2-3 個検出されたものが 3 系統で  
あった。‘スピカロマン’の後代で得られた新しいバンドを切り出し配列の決定を行い相同性の  
検索を行ったところ、ほとんどは他の遺伝子と相同性を持たない配列であったが、そのうちの 1  
つはペクチンリアーゼと相同性を持つ配列を含んでいた。これらの新たな挿入を示すバンドは  
後代に遺伝していることも確認した。以上の結果、*dTeg1* 様トランスポソンの転移と挿入が花卉  
の体細胞だけでなく、生殖細胞または生殖細胞を形成する体細胞でも起こり、後代に遺伝してい  
ることが確認された。このことから、*dTeg1* はトルコギキョウの育種における変異原として利用  
可能であると考えられる。

(4) トルコギキョウはその栽培化の過程で、短期間に変異を拡大させている。そのため、我々  
は本研究を開始するにあたり、栽培化の過程で *dTeg1* 様トランスポソンが活性化され、変異の拡  
大に貢献した可能性があると考えていた。その場合は、栽培種では野生種と比較して *dTeg1* 様ト  
ランスポソンのコピー数が増大している可能性がある。また、ゲノム中での分布パターンの系統  
間差は栽培種のほうが大きいと考えられた。本研究では、アメリカ合衆国南部の各地で採取した  
野生種を供試して、栽培種由来の系統で TD 法を行い、分布パターンを比較した。その結果、栽  
培種では野生種と比較して、*dTeg1* のコピー数の増加は見られなかった。また、その分布パター  
ンの系統間差は、野生種と栽培種で目立った差はなかった(図 3A, B)。本研究で行った実験  
からは、トルコギキョウの栽培化の過程で *dTeg1* 様トランスポソンが活性化したという証拠は得  
られなかった。今後は、さらに多くの栽培種と野生種の自殖後代を供試して、TD 法で新たな挿  
入の数を調査する等の方法で、トランスポソンの活性に野生種と栽培種で違いがあるかを突き止  
め、トルコギキョウの栽培化と *dTeg1* 様トランスポソンの関係を研究する必要がある。

(5) ‘スピカロマン’で斑入りが固定されない原因については、*dTeg1* の切り出しによって  
*F3H* 遺伝子に復帰や変異が起こっていると予想された。一般に、トランスポソンが離脱すると、  
多くの場合挿入前の塩基配列には戻らず、数 bp の DNA の再編成が起こる。トランスポソンが  
イントロン、調節領域、非翻訳領域に挿入されている場合は離脱後に配列の再編成が起こっても、  
遺伝子の機能に変化が起こらず、復帰が起こりやすい。これに対して、トランスポソンがエク  
ソンに挿入さ

れている場  
合は離脱に  
伴う配列の  
再編成より  
遺伝子の機  
能の復帰が  
起こらない  
場合が多い  
と考えられ  
ている。本  
研究の  
*dTeg1* は

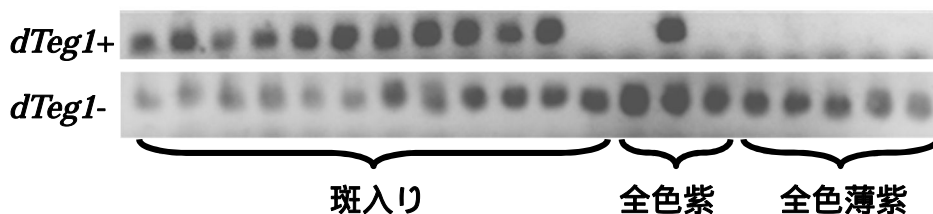


図 4 ‘スピカロマン’の自殖後代の *F3H* 遺伝子における *dTeg1* の検出。  
*dTeg1+* : *dTeg1* が *F3H* 遺伝子に挿入されている場合増幅産物が検出される、  
*dTeg1-* : *dTeg1* が *F3H* 遺伝子に存在しない場合増幅産物が検出される

*F3H* 遺伝子のエクソンに挿入されており、通常であれば離脱によって機能が復帰するのは難しい  
はずである。しかしながら、実際には高頻度の斑入りが観察されており、*dTeg1* の離脱によって  
*F3H* の機能は復帰しているものと考えられる。また、後代に薄紫の全色個体も現れていることか  
ら、機能が復帰していない離脱も起こっているか、*dTeg1* が離脱しないままになっているものと  
予測された。

そこで、‘スピカロマン’の自殖後代(斑入り 12 個体、紫 3 個体、薄紫 5 個体)で *F3H* 遺  
伝子における *dTeg1* 挿入の有無を PCR 法により調査した。その結果、図 4 に示したように斑入  
り個体では 12 個体中 11 個体で *F3H* 遺伝子に *dTeg1* の挿入が見られた。*dTeg1* の挿入が見られな  
かった 1 個体については、斑入り花から DNA を抽出した時に、*dTeg1* が離脱してしまった細胞  
しか含まない部分からサンプリングした可能性がある。これに対して、全色の個体では、全色紫  
の 1 個体のみが *dTeg1* をヘテロで含んでいた他は、全ての個体で *dTeg1* が離脱した *F3H* 遺伝子  
をホモで持っていた。全色紫色の個体は、トランスポソンの離脱により復帰変異が起り、それが  
後代に遺伝したのと考えられる。薄紫色の個体では、全てで *dTeg1* が離脱しており、*F3H* 遺  
伝子の機能に変異しているものと考えられる。

次にトランスポソンの離脱によって現れる *F3H* 遺伝子の配列の変異を、フラグメント解析や  
シーケンスによって解析した。その結果、全色紫個体の *F3H* 遺伝子は野生型、もしくは 3 塩

基が欠失型のいずれかを、必ず持っていた。一方、全色薄紫個体では6塩基欠失、4塩基の挿入、4塩基の挿入を示す *F3H* 遺伝子をホモまたはヘテロで有していたが、野生型や3塩基欠失型の *F3H* 遺伝子は存在しなかった。3塩基欠失によって1アミノ酸残基の欠失が引き起こされ、6塩基欠失では2アミノ酸残基が欠失した *F3H* タンパク質となる。また、4塩基欠失と4塩基挿入ではフレームシフトが起こる。フレームシフトによって配列が変わってしまった *F3H* 遺伝子の領域には双子葉植物と単子葉植物で保存されているアミノ酸配列を含んでいる。我々は当初、このようなトランスポゾン離脱によりフレームシフトで、*F3H* 遺伝子の正常な機能が失われ、薄紫色の花色の変異が起こるのではないかと予想していた。しかしながら、本研究の結果は、フレームシフトは必ずしも必要ではなく、2アミノ酸残基の欠失が薄紫花変異の発現に十分であることを示している。2アミノ酸残基の欠失が変異を引き起こしていることは‘スピカロマン’と全色桃色のピンクサムを交配した  $F_2$  集団の解析からも支持された。この集団では、調査した全色薄紫個体はすべて2アミノ酸残基の欠失型であり、全色紫花個体は野生型の *F3H* 遺伝子を持っていた。以上のことから、‘スピカロマン’の斑入り花が固定しない理由は、トランスポゾンの離脱により復帰型、または機能変異型の *F3H* を持った配偶体が常に一定数形成されるためと考えられる。また、*dTeg1* が挿入されたまま動かなくなり機能変異型 *F3H* を持っている配偶体も存在している可能性もある。

(6) 以上の結果、本研究により、以下の成果が得られた。

トルコギキョウのトランスポゾン *dTeg1* が、品種‘スピカロマン’において転移活性を保持しており、育種の変異原として利用可能であることが示された。これまでに、作物の突然変異育種の変異原として、放射線照射や化学物質処理が多く用いられてきたが(引用文献) 前者は高価な装置を必要とし、後者は危険な薬品を使う必要があり、設備の整った施設と専門知識を持った研究者を有する機関しか利用できない。本研究の手法による突然変異の誘発は、高価な装置や危険な薬品を必要とせず、特別な施設や専門知識も必要なく、‘スピカロマン’に由来する種子を手に入れるだけで、誰でも手軽にトルコギキョウの突然変異育種を行える機会を提供できる可能性がある。

桃色全色の品種‘ピンクサム’と‘スピカロマン’を交配することで、桃色の斑入りの系統を作出することにも成功した。

斑入りが固定されない原因についても *dTeg1* の離脱時に *F3H* の配列が再編成され、それが後代に伝わるためと特定された。

(7) 今後の課題としては、以下のことがあげられる。

*dTeg1* が実際にどの程度の効率で変異体を得られるかが不明であるため、‘スピカロマン’の自殖後代を多数育成し、変異体が現れる確率を調査する必要がある。また、より効率よく転移活性の検定を行うために、転移酵素のクローニングを行い、RT-PCRによって転移活性を調査できるようにする必要がある。

桃色系の斑入りが強く入った系統を得るために、‘スピカロマン’と戻し交雑を行い、赤の斑入りの系統の育成を進める必要がある。

本研究の結果、*dTeg1* の離脱が後代に遺伝するため、斑入り形質が固定しないことがわかった。そのため、斑入り花形質を固定させるためには、*dTeg1* の転移が花弁等の生殖細胞を形成しない組織に限定するような変異体を探す必要がある。

#### <引用文献>

- Naonobu Noda, Yoshiaki Kanno, Naoki Kato, Kohei Kazuma, Masahiko Suzuki, Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), *Physiologia Plantarum*, 122 巻 2004, 305–313
- 金澤 章、深井英吾、宮尾安藝雄、佐瀬英俊、築山拓司、トランスポゾンによる変異創成とその育種への利用、*育種学研究* 17 巻、2015、77–87
- Takaaki Nishijima, Yasumasa Morita, Katsutomo Sasaki, Masayoshi Nakayama, Hiroyasu Yamaguchi, Norihiro Ohtsubo, Tomoya Niki, Tomoko Niki, A *Torenia* (*Torenia fournieri* Lind. ex Fourn.) Novel Mutant ‘Flecked’ Produces Variegated Flowers by Insertion of a DNA Transposon into an R2R3-MYB Gene, *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 82 巻、2013、39–50
- Fumio Hashimoto, A. F. M. Jamal Uddin, Keiichi Shimizu, Yusuke Sakata, Multiple Allelism in Flavonoid Hydroxylation in *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. *Flowers*, *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 73 巻、2004、235–240
- Keiichi Shimizu, Nanako Ohnishi, Noriyuki Morikawa, Ai Ishigami, Saeko Otake, Isselmou Ould Rabah, Yusuke Sakata, Fumio Hashimoto, A 94-bp Deletion of Anthocyanidin Synthase Gene in Acyanic Flower Lines of Lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.], *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 80 巻、2011、434–442
- Yuka Takatori, Keiichi Shimizu, Jun Ogata, Hiroki Endo, Kanji Ishimaru, Shigehisa Okamoto, Fumio Hashimoto, Cloning of the Flavonoid 3'-Hydroxylase Gene of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. (*EgF3'H*) and Complementation of an F3'H-deficient Mutant of *Ipomoea nil* (L.) Roth. by Heterologous Expression of *EgF3'H*, *The Horticulture Journal*, 84 巻、2015、131-139.

Yusuff Oladosu, Mohd Y. Rafii, Norhani Abdullah, Ghazali Hussin, Asfaliza Ramli, Harun A. Rahim, Gous Miah, Magaji Usman, Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30 卷、2016、1-16

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

高取由佳・清水圭一・橋本文雄、*Anthocyanidin synthase (ANS)* 遺伝子の多型がトルコギキョウ花卉のアントシアニン色素の蓄積に及ぼす影響、園芸学会平成29年度秋季大会、2017年

安永智希・加藤文俊・鮫島理沙・田代桃子・江上大貴・清水圭一・高取由佳・草留大陸・橋本文雄、近年のトルコギキョウ品種にみられる新奇な花冠形質の遺伝について、園芸学会平成29年度秋季大会、2017年

江上大貴・小畑舞・針原彩乃・福山達也・高取由佳・清水圭一・橋本文雄、トルコギキョウの花弁の斑入りに関する研究、植物色素研究会熊本、2017年

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称：トルコギキョウの新品種作出方法

発明者：橋本文雄、清水圭一、高取由佳

権利者：国立大学法人 鹿児島大学

種類：特許

番号：特許第6153213号

取得年：平成29年

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：橋本 文雄

ローマ字氏名：(HASHIMOTO, fumio)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：70244142

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。