

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22301

研究課題名（和文）液胞のパレット化による新規の花色改変法の開発

研究課題名（英文）Development of vacuole palette for creating novel flower color

研究代表者

小野 道之（Ono, Michiyuki）

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：50201405

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000 円

研究成果の概要（和文）：ナデシコ目の限られた植物でのみ合成される色素ベタレインの合成経路をアサガオに遺伝子導入して花色改変に挑戦した。ベタキサンチンによる薄黄色花弁を実現したが、植物体を衰弱させる障害があった。その原因を解明して解決法を発見した。ベタキサンチンとアントシアニンの液胞における共存については、トランスポゾンによる白花の復帰変異体で観察した。自然界では液胞内に共存しない両色素の共存を顕微鏡で確認すると共に、分光測色計と色素分析により色調の変化等を解析した。また、アサガオより長命な花弁を持つシクラメンの全ゲノム塩基配列を先新ゲノム支援により世界で初めて解読し「液胞のパレット化」として安定した実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アサガオなどの黄花化は育種家の夢であるが、ベタキサンチン合成系遺伝子の導入によりアサガオの黄花化に成功した。形質転換植物に生育障害が観察されたが、その原因を特定し、多くの植物種に適用できる解決策を考案した。自然界でベタシアニンを合成する植物種は限られており、その合成系とフラボノイド合成系は互いに排他的である。今回、ベタキサンチンとフラボノイドが同一の液胞内に共存することを顕微鏡レベルで世界で初めて示すと共に、両色素合成の初発物質を解析した。また、アサガオより長命な花弁を持つシクラメンの全ゲノム塩基配列を先進ゲノム支援により世界で初めて解読し「液胞のパレット化」のための安定した実験系を確立した。

研究成果の概要（英文）：Making a new yellow flower is a dream of breeders, and we succeeded in yellowing morning glory flowers by introducing betaxanthin synthesis genes. Growth defects were observed in the transformed plants, but we identified the causes of these defects and devised a solution that can be adapted to many plant species. Only a limited number of plant species synthesize betacyanin in nature, and its synthesis system and flavonoid synthesis system are mutually exclusive. In this study, we demonstrated for the first time in the world that betaxanthin and flavonoids coexist in the same vacuole at the microscopic level, and analyzed the primary substances of both pigment syntheses. In addition, the whole genome sequence of cyclamen, which has longer-lived petals than morning glory, was decoded for the first time in the world with support by the Platform for Advanced Genome Science (PAGS) and many collaborators, and a stable experimental system for "the vacuolar palette" was established.

研究分野：植物バイオテクノロジー

キーワード：アサガオ アントシアニン 液胞 花色 形質転換植物 シクラメン ベタキサンチン ベタレイン

1. 研究開始当初の背景

(1) アサガオ、シクラメンなどの園芸花きには黄花が無い。バラのように近縁種に黄花がある植物種では人工交雑により黄花が育種できたが、近縁種にも黄花が無い場合には代謝工学的に黄花化することが期待される。

(2) アサガオでは、江戸時代には黄花の変異体の図版が数多く描かれているが、現在ではフラボノイドによる淡黄色が数品種残るのみであり、しかもフラボノイド蓄積による生理障害のために花卉が縮れている。フラボノイドの一種で黄色色素であるオーロンの合成経路がキンギョソウで解明されている。この遺伝子群をアサガオに形質転換した、オーロンによる黄花のアサガオの作出が考えられたが、オーロンを合成させると花卉が縮れることが予想された。

(3) アサガオの花弁に別の黄色色素であるカロテノイドを蓄積させる試みを、研究代表者は共同研究者らと行ってきたが、薄い黄色に留まっていた。これは、カロテノイド合成酵素の遺伝子群をアサガオに形質転換する研究と、カロテノイドを代謝分解する酵素の遺伝子をゲノム編集によりノックアウトする研究である。両系統を交配した結果においても薄い黄色に留まっていた。

(4) 花卉の黄色い色素は基本構造から3種類に大別されるが、3番目の色素となるベタキサンチンは、ナデシコ目の限られた植物種のみで合成される珍しい色素である。その生合成経路の遺伝子群が最近、明らかになり、この合成経路の遺伝子を形質転換により導入できるようになった。

(5) ナデシコ目には、ベタレインを合成する種と、アントシアニンを合成する種があり、分子系統樹中に混在しているが、両方の色素を合成する種は無く「ベタレイン合成の謎」とされている。アントシアニンの合成能力を失ったナデシコ目の祖先種がベタレイン合成能力を得たが、その後、アントシアニンの合成能力を復活させてベタレイン合成能力を失った種があると推定されている。アサガオはアントシアニンを合成するため、新たにベタキサンチンを合成させることで、二種の色素の混色による新規花色の創造が期待できる。同時に、得られた植物は、ベタレイン合成の謎に迫る成果も期待できる。

(6) 我が国で開発された遺伝子組換え花きは現在、切花として生産されている。これらの多くは海外で生産されおり、国内で商業的に栽培されているものは僅かである。花きの国産化のためには、切花ではなく、輸出入が難しい鉢花としての遺伝子組換え花きを開発することが望まれる。

(7) 我が国では、遺伝子組換え技術については、国民の理解と支持が得られていない面がある。新規の花きはサイエンスアートとして、遺伝子組換えなどの新しい技術に対する、市民の理解を醸成する効果を期待している。鉢花は育成期間が長く、特にその効果が高いのではと期待する。

2. 研究の目的

(1) 文部科学省ナショナルバイオリソースの一つアサガオ(*Ipomoea nil*)は、花きのモデル植物である。その花色には、野生型のアントシアニンによる青色に始まり、トランスポゾン転移による突然変異の結果、多様な色があるとされているが、黄色、橙色、真紅、黒色は無い。本研究では、代謝工学により、アサガオが天然では合成しないベタレイン色素を合成させることにより、新規の花色の創出を試みた。

(2) 研究の最初の目的は、ベタレイン合成経路の導入による花色改変であり、ベタキサンチン合成による黄花と、ベタシアニン合成による赤花の作出である。また、それらとアントシアニンが同じ液胞に蓄積することから、液胞内で異なる色素の共存による混色により新規の花色が生じることを期待した。両色素が液胞に蓄積することから「液胞のパレット化」と呼称した。

(3) ベタレイン合成経路を導入したアサガオでは、予想に反して色素量が少なかったため、その濃色化を新たな目的とした。ベタキサンチン(黄)ではレモン色にはなったが、その色素量は、構造決定のためには不十分であった。ベタシアニン(赤)は開花中の花卉にはほとんど蓄積しなかった。コンストラクトを見直して、より強い発現系にすると共に、より強い酵素遺伝子とし、さらに、代謝経路の強化を目的として、より上流の代謝経路の遺伝子も導入した。

(4) ベタキサンチンを発現するアサガオの1系統で、トランスポゾン転移によるアントシアニン合成酵素遺伝子の復帰変異体を得られた。この花を用いて、ベタキサンチンとフラボノイドが同一の液胞内に共存することを世界で初めて顕微鏡レベルで示すとともに、花色の変化を解析することを目的とした。

(5) ベタレイン合成経路を導入したアサガオでは、予期しなかった生育障害が観察されたため、その原因解明と、それを回避する方法の考案を新たな目的とした。生育障害が活性酸素種 (ROS) の発生によるものであることを活性染色により調べることも目的とした。

(6) アサガオを用いた場合には形質転換植物を作り花色を観察するまで約1年を必要とする。そこで、長命な花を持つシクラメン(*Cyclamen persicum*)の花弁細胞に一過性に遺伝子等を直接導入することで、短時間に結果を得て研究を加速することを提案し、「先進ゲノム支援」に応募した。シクラメンはゲノムが未解読であったため、全ゲノム塩基配列の解読を新たな目的として、液胞パレット実験系の確立を目的とした。

(7) 新花を創作し、遺伝子組換えに興味・関心の無い一般市民に対して、遺伝子組換えの魅力を伝えるサイエンス・アートの役割を果たすことも目的とする。

3. 研究の方法

(1) アサガオの形質転換は、研究代表者らが開発した方法で行った。無菌的に培養した未熟胚由来の胚性カルスにアグロバクテリウムを用いて外来遺伝子を組み込み、カナマイシン耐性で選抜しながら二次胚を誘導し、発芽させることで植物体を再生させた。ベタキササンチンの合成経路とベタシアニンの合成経路の遺伝子群は、アグロバクテリウムの T-DNA に載せてアサガオのゲノムに組み込んだ。酵素遺伝子群を含むバイナリーベクターのコンストラクトは、西原昌宏博士 (岩手生物工学研究センター) に頂いた。

(2) 形質転換体の葉は、生育初期は正常に見えるが、数週間以内に特徴のある褐変を示して枯れ落ちる。花も大きく開花せずに花弁の端が縮れることがある。これらはベタレイン合成経路の中間産物である L-DOPA がベタシアニン合成とは異なる経路で代謝されることにより活性酸素種 (ROS) を発生するためではないかと考えた。実際に L-DOPA がアレロパシーの原因となるアレロケミカルとなる植物種もある。そこで ROS の検出を活性染色により解析した。L-DOPA の合成酵素遺伝子のプロモーターを花弁の器官特異的プロモーターに変えたコンストラクトを作製して、アサガオへの形質転換を行った。

(3) ベタキササンチンとベタシアニンの定量は、佐々木伸大博士 (大阪公立大学) に解析頂いた。

(4) シクラメンの基本的な品種であるワインレッド[インプラントイノベーションズ(株)]のゲノム DNA を抽出し、先進ゲノム支援の採択により SequelII(PacBio 社)の出力を頂き (豊田敦博士、国立遺伝学研究所)、矢野健太郎博士・越水静博士・佐藤綾博士 (明治大学) と中村保一博士・望月孝子博士 (国立遺伝学研究所) によるアセンブルと解析を頂いた。

4. 研究成果

(1) 形質転換体

アサガオ[白花系統の AK77, 星野敦博士 (基礎生物学研究所)]でベタキササンチンとベタシアニンを合成する形質転換体を作出した。結果の一例を示す (図1)。導入した全ての酵素遺伝子を CaMV35S プロモーターにより全身で発現させた。ベタキササンチンを合成する形質転換植物では黄色から白色の花弁まで濃淡が観察された。最も黄色が濃かった花色は、RHS カラーチャート(英国王立園芸協会; 第5版)の黄4C相当であった (図1C)。ベタシアニン合成経路酵素遺伝子の形質転換植物では極薄いピンク色の花弁もあったが、多くは白色であり、翌日の萎れた花弁の端が明瞭な薄いピンク色になる程度に留まった。一方、両ベタレインは、根に強く蓄積した (図1B, 図2B)。

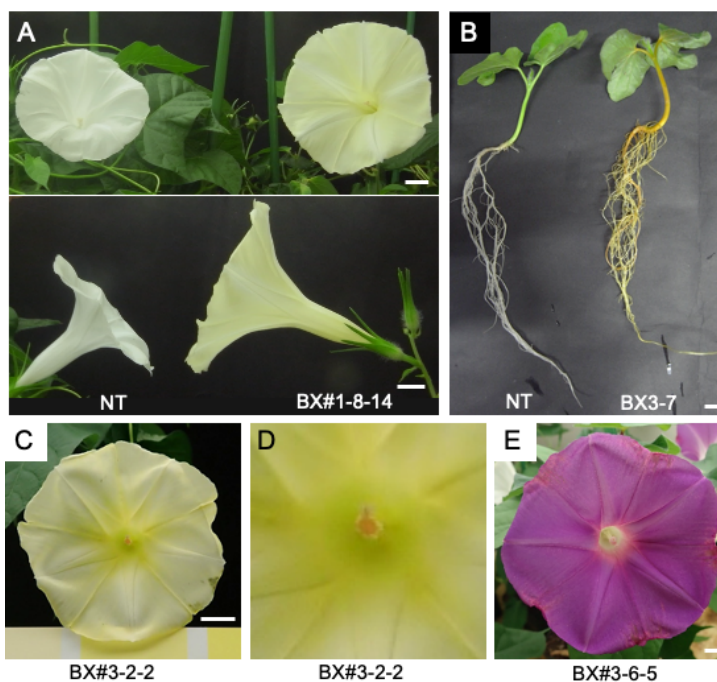


図1 ベタシアニン(BX)合成経路酵素遺伝子を導入したアサガオ

(2) 色素の同定

ベタキサンチンは一連の化合物の総称であり、L-DOPA から代謝されたベタラミン酸と細胞内のアミノ酸やアミン類との自然縮合反応により生じた、さまざまな種類の化合物を含む。アサガオで合成されたベタキサンチンは、既知のものとは一致しない可能性が示されたが、構造解析のためには量が不足しており同定には至らなかった。今後、色素の濃度を高めるなどにより、機器分析のために十分量の色素を得ることが必要である。一方、ベタシアニンは既知のベタシアニンである、ベタニンとイソベタニンであることが示された。

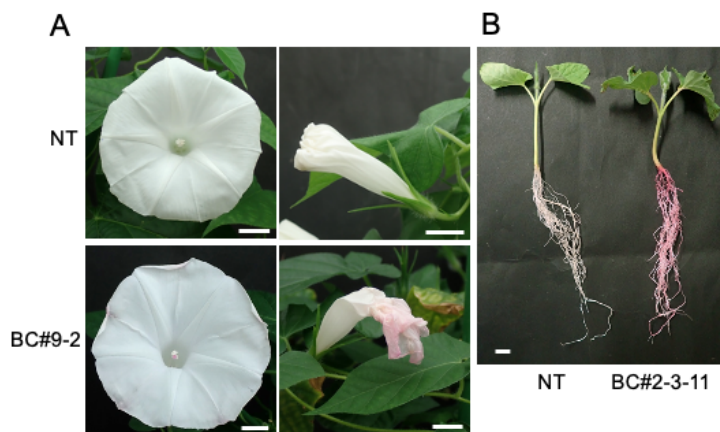


図2 ベタシアニン(BC)合成経路酵素遺伝子を導入したアサガオ

(3) 生育障害

ベタキサンチンを合成する形質転換体には特有の生育障害が観察された(図3)。子葉には斑点状の、本葉には維管束の根元を中心に、褐変が生じた(図3 B,C)。子葉では播種後21日目頃から斑点が生じて、1週間ほどで枯れ落ちた。生理障害は花卉に観察されており、同じ系統であっても花毎に障害の程度は安定しなかった(図3D)。これは、ベタキサンチンの生合成経路の中間代謝物である L-DOPA がベタラミン酸以外の物質に代謝されて活性酸素種(ROS)が生じた結果、生理障害を生じるものと推察した。ROSの発生は活性染色を用いて確認した。

(4) 液胞における共局在

ベタキサンチンを発現するアサガオはアントシアニンの合成経路がトランスポゾン変異により不活化した系統を用いていた。その中から、トランスポゾンの転移によりアントシアニン合成が復帰変異した系統が得られた(図1E)。この花卉では、ベタキサンチンとアントシアニンの両方の色素を合成することが判った。花の色調の変化を分光測色計により分析すると共に、花卉のプロトプラストを顕微鏡観察した。その結果、花卉の液胞にベタキサンチンとアントシアニンが共局在することを観察した。「ベタレインの謎」として両色素を持つ植物は自然界には存在しないことから、液胞における共局在の確認は世界で初めてのことで考えられる。一方、ベタレインの謎に迫るべく、代謝産物について草野都博士(筑波大学と理研)と朝比奈雅志博士(帝京大学)に分析して頂いた。

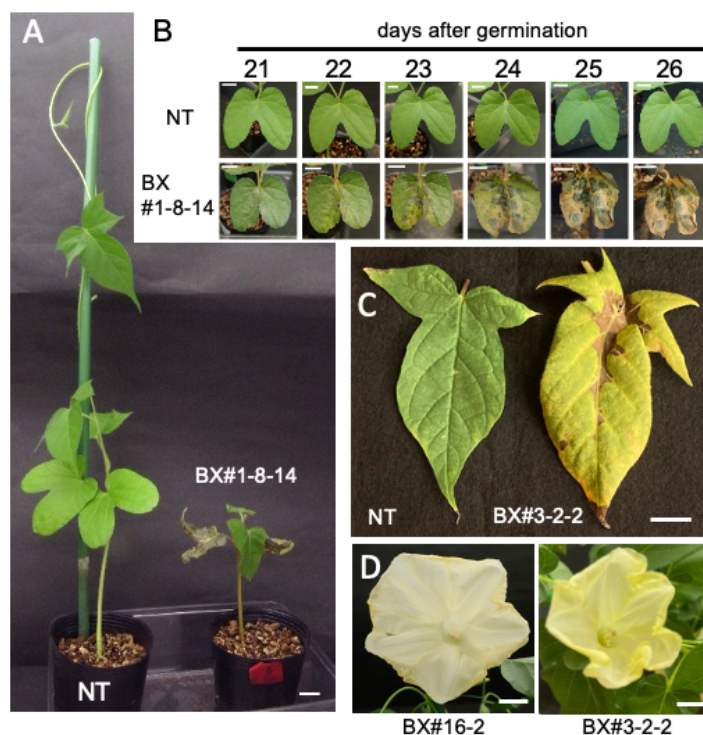


図3 ベタキサンチン(BX)を合成するアサガオにおける生理障害

(5) 濃色化と生理障害の回避とシクラメンを用いた「液胞のパレット化」実験系

ベタキサンチン合成経路の上流はチロシンであるため、チロシンの合成酵素遺伝子を新たに導入することで、合成経路全体の強化を試みる。また、L-DOPA による生理障害を避ける目的で、L-DOPA の合成酵素を花卉や花器官に特異的なプロモーターを用いた形質転換体を作製している。一方で、全ての試みについて、形質転換植物を作出することは時間などの面でも難しいことから、一過性発現系を用いた「液胞のパレット化」実験を進めている。アサガオは半日花であるため、花の寿命が長いシクラメンの花弁を用いることを提案して進めており、重要な知見が得られた。次の機会に報告する。

【謝辞】多くの方のお世話になりました。この場をお借りして御礼を申し上げます。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 檜垣愛理；澁谷美乃里；渡邊健太；小野公代；西原昌宏；佐々木伸大；小野 道之
2 . 発表標題 形質転換アサガオの花弁細胞における アントシアニンとベタレインの共存
3 . 学会等名 第38回日本植物バイオテクノロジー学会(つくば)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 佐々木伸大、澁谷美乃里、渡邊健太、小野公代、西原昌宏、小野道之
2 . 発表標題 ベタレイン色素合成経路の導入によるアサガオの新規花色の分子育種
3 . 学会等名 形質転換植物デザイン研究拠点 令和元年度成果報告会
4 . 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1 . 著者名 田部井豊、七里吉彦、三柴啓一郎、安本周平	4 . 発行年 2022年
2 . 出版社 国際文献	5 . 総ページ数 408
3 . 書名 植物バイオテクノロジー入門	

〔産業財産権〕

〔その他〕

つくば機能植物イノベーション研究センター (T-PIRC)
https://www.t-pirc.tsukuba.ac.jp
Tsukuba-Plant Innovation Research Center (T-PIRC)
https://www.t-pirc.tsukuba.ac.jp/en/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	Department of Plant Sciences	University of Cambridge		