

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02978

研究課題名（和文）世界初の赤色レンコン‘友弘’における根茎着色特性と遺伝様式の解明

研究課題名（英文）Characteristics of rhizome coloration and its inheritance in the world's first red rhizome lotus 'Tomohiro'

研究代表者

尾崎 行生 (OZAKI, Yukio)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：60253514

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、赤色レンコン‘友弘’における根茎着色の様相を調査するとともに赤色素（6つのアントシアニン）を同定した。また、白色根茎品種と赤色根茎品種の根茎からmRNAを抽出し、アントシアニン生合成関連相同遺伝子群の発現量を比較し、赤色根茎品種の未着色期において複数の遺伝子での発現量の違いが認められた。また、紫外線除去・照射による根茎着色への影響は認められなかったが、外与の植物ホルモンにより根茎着色の促進・遅延効果が認められた。根茎着色形質の遺伝様式の解明し、DNAマーカーを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物における色素発現では、エピジェネティックな発現の促進と抑制が主要な制御機構であると考えられるが、本来発現が抑制されている根茎等の部位において、本品種のように発現抑制が解除されるメカニズムを明らかにすることで、植物における部位特異的な遺伝子発現の仕組みについて明らかにできるだけでなく、これまでの想定を超えた新たな独自形質を持つ品種の育成を実現でき、園芸育種の新たな概念を構築できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The coloration of red rhizome lotus 'Tomohiro' was investigated and six red pigments (anthocyanins) were identified. The expression levels of homologous genes related to anthocyanin biosynthesis were compared between white and red rhizome cultivars, and differences in the expression levels of several genes were observed in the unpigmented stage of the red rhizome cultivar. No effect of UV removal or irradiation on rhizome coloration was observed, but the effect of exogenous phytohormones on rhizome coloration was accelerated or retarded. The inheritance of rhizome coloration traits was elucidated, and DNA markers were successfully constructed.

研究分野：園芸学

キーワード：レンコン 食用ハス 赤色根茎 アントシアニン DNAマーカー RAD-seq解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

レンコン(食用ハス)は、わが国で古くから栽培されている伝統的な野菜であり、縁起物として正月料理や精進料理に欠かせない食材である。淡泊な見た目からは想像もできないほど栄養が豊富であり、ビタミンCをはじめ、ムチンやペクチンなどの食物繊維などを多く含む。単位面積当たりの粗収益が高い野菜品目の一つであり、収穫作業適期が広い(8月~翌年3月)ことから出荷調整が容易で、後継者が多く、今後も重要な品目であることは間違いない。本作物では、これまで収量、肥大性、節間長などに着目した育種が行われており、生産性の高い品種が育成されているが、形質変異に乏しいことが長年の課題であった。このようななか、徳島県のレンコン栽培圃場において根茎全体が赤色に着色するレンコン‘友弘’が発見された。ハスは食用としてだけでなく観賞用としても利用されており、様々な花色を持つ品種が知られているが、この‘友弘’のように肥大根茎が赤色に着色する品種は食用・観賞用のいずれにおいても全く報告がなく、世界で初めて見出された突然変異形質である。そのため本品種は高付加価値品種として期待されているが、低収量であるため収益性が低いことが難点である。

研究開始当初の予備的な調査により、本品種の肥大根茎に含まれる赤色素はアントシアニンであることを明らかにしている。食用・観賞用ハスの花弁に含まれる色素はアントシアニンであることが報告されていることから、本植物がアントシアニン色素を生成する能力を持つことは間違いないが、通常肥大根茎では発現しないことから、異所的な発現制御が機能していると考えられ、その制御機構に変異が生じたのがこの赤色レンコンであると捉えている。

### 2. 研究の目的

植物におけるアントシアニン色素の存在意義として、受粉のための昆虫や鳥の誘引作用、果皮着色による動物の種子散布の促進、紫外線による植物体DNA損傷からの保護、耐病原性(ファイトアレキシン)作用、成長因子などが提唱されている(大庭ら, 2000)。多くの植物では、花弁や葉など、特定の部位にのみアントシアニンが蓄積し、それ以外の部位では蓄積されない。このような制御の仕組みによって、限られた代謝エネルギーを使ってアントシアニン色素を効率的に蓄積させ、最大限の効果を達成している。そこで、本研究では、園芸上重要な品目であるレンコンを対象として、まず「赤色レンコン品種では、なぜ根茎においてアントシアニン色素が合成されるのか?」について追究し、植物におけるアントシアニン色素関連遺伝子の異所的発現の仕組みを明らかにする。さらに「赤色根茎形質はどのような遺伝的制御下にあるのか」について追究し、生産性の高い赤色根茎品種育成を実現させるための根茎着色形質の育種的利用の方法論を確立することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### 【赤色素の同定】

赤色レンコン‘友弘’の肥大根茎を供試し、剃刀の刃を用いて徒手法で横断切片と縦断切片を作成し、少量の蒸留水で洗浄した後、蒸留水、0.1N 塩酸、0.1N 水酸化ナトリウム溶液のいずれかを滴下したプレパラートを作成し、光学顕微鏡を用いて色素の分布と色調を観察した。次に、肥大根茎および花弁を供試して 10% 硝酸水溶液で抽出した色素を吸着型カラムクロマトグラフで精製した後、分配型カラムクロマトグラフによって分画に分け、それぞれのフラクションのスペクトルを調査した後に、高速液体クロマトグラフ(HPLC)およびLC-MS/MS分析によって色素構成を調査し、肥大根茎と花弁における色素構成を比較した。

#### 【色素合成関連遺伝子群の発現解析】

2013年に中国古代ハスの全ゲノム配列が解読された(Ming et al., Genome Biol., 2013). このゲノム配列に対し, アントシアニン生合成に係わる遺伝子(PAL, CHS, CHIなど)等の相同遺伝子の検索および遺伝子構造の予測を行い, ハスゲノム中の各遺伝子の種類および配列を精査する. 次に対照品種および赤色品種‘友弘’におけるアントシアニン生合成関連相同遺伝子のゲノム配列における多型を解析し, 表現型との関連を明らかにする. さらに, 対照品種および赤色品種‘友弘’の各生育段階別の根茎からmRNAを抽出し, アントシアニン生合成関連相同遺伝子群の発現量を比較し, 根茎着色に寄与する遺伝子を特定する.

#### 【栽培環境と根茎着色との関連解析】

赤色レンコン‘友弘’をビニルフィルム(紫外線透過性)および紫外線除去フィルム内で栽培し, 根茎着色の違いについて調査する. 次に, 根茎肥大開始~完了期に相当する7月~10月に(1)昼間UV照射, (2)夜間UV照射, (3)無処理(対照)の3処理区を設けてブラックライト蛍光灯を用いたUV照射を行い, 根茎着色程度を比較した. さらに外与の植物ホルモンが根茎着色に及ぼす影響についても調べた.

#### 【根茎着色形質の遺伝様式の解明】

根茎着色形質の遺伝様式を推定するため, 赤色レンコン‘友弘’から交雑後代を作出する必要があるが, 一般にレンコンでは, 播種から開花までに少なくとも3~4年以上を要し, 本研究材料の‘友弘’は難開花性の品種であるため, さらに長い期間が必要である. しかも開花を目的とした栽培では広い面積が要求されるため, 遺伝様式の解明に必要な雑種第一代( $F_1$ ), 雑種第二代( $F_2$ ), 戻し交雑第一代( $BC_1F_1$ )を作出するためには広い栽培圃場と10年以上の期間が必要であると見込まれた. そこで本研究では根茎着色形質の遺伝様式を解明するにあたり, 本研究では播種から開花までの期間が短い「短幼若性」の観賞用ハスを活用した. これら短幼若性観賞用ハス品種と‘友弘’とを交配した実生を利用したところ, 直径30cm程度のポットで栽培した場合でも一部の個体で播種当年に開花が認められたことから, レンコン品種間では想定できなかったような短期間で‘友弘’交雑後代実生の獲得を実現させることができた. これらの方法で獲得した交雑後代について, 集団内での白色個体と赤色個体の分離比を調査して根茎着色個体の遺伝様式を明らかにするとともに, 分離集団を対象として, 次世代シーケンサー(MiSeq)を用いたRAD-seqによるSNPの検出, および根茎着色形質も含めた連鎖分析を行い, 連鎖地図を作成する.

## 4. 研究成果

#### 【赤色色素の同定】

根茎の赤色色素は横断面全体に点在分布しており, 特に根茎中央部や根茎の周縁部の表皮付近に多くの集積がみられた. 根茎中央部の色素蓄積部位を光学顕微鏡で観察した結果, ‘友弘’根茎の縦断切片において, 肥大根茎の長軸方向に筋状に分布していることを認めた. 0.1N塩酸を滴下した場合, 蓄積色素は鮮やかな赤色を呈したのに対し, 0.1N水酸化ナトリウム水溶液を滴下するとくすんだ紫色を呈した. このことから, ‘友弘’肥大根茎に含まれる赤色色素はアントシアニンであると考えられた.

‘友弘’の赤色肥大根茎から得られた色素抽出物をHPLCで分析した結果, 6つの主要なピークが確認され, それぞれのピークをA1~A6とした. これらの主要な6つのピークが示すアントシアニンのうち, ピークA2についてLC-MS/MS分析を行った結果, 質量電荷比449と287の位置にピークが認められた. このことからピークA2のアントシアニンはcyanidin 3-glucosideの可能性が示

唆された．そこで，cyanidin 3-glucoside標品を用いて，同様にHPLC分析とLC-MS/MS分析を行った結果，HPLC分析ではピークA2と同様に保持時間7.2分にピークを示し，LC-MS/MS分析では質量電荷比449と287の位置にピークを認めたことから，ピークA2が示すアントシアニンはcyanidin 3-glucosideであることが明らかになった．同様の方法でピークA1，A3～A6のアントシアニンの同定を行い，アントシアニン標品と比較した結果，A1はdelphinidin 3-glucoside，A3はpetunidin 3-glucoside，A4はpelargonidin 3-glucoside，A5はpeonidin 3-glucoside，A6はmalvidin 3-glucosideであることが分かった．‘友弘’花弁に含まれるアントシアニンについてもHPLC分析により調査し，肥大根茎と同様の6種類のアントシアニンが含まれていることが示された．なお，A1～A6アントシアニン色素の含有率（組成割合）は両器官で異なり，花弁では根茎よりもデルフィニジン系アントシアニンの割合が多かったことから，花弁では根茎に比べてF3'5'H遺伝子がより強く作用していると考えられた．

#### 【色素生合成関連遺伝子群の発現解析】

初年目においてアントシアニン生合成関連遺伝子の相同性遺伝子の検索を行った後，赤色レンコン‘友弘’および白色レンコン‘備中’および‘小寿星’の根茎を供試してアントシアニン生合成関連遺伝子群の発現を比較した結果，2年目では調査した12種類の遺伝子（アントシアニン生合成酵素遺伝子（それぞれ2種のPAL，DFR遺伝子とそれぞれ1種のCHS，CHI，F3H，ANS遺伝子）およびそれらの転写因子（2種のMYB遺伝子と1種のWD40，bHLH遺伝子））において発現量の顕著な違いは認められなかったが，3年目の調査では，発現が認められたCHS遺伝子（1種），CHI遺伝子（1種），F3'H遺伝子（3種），F3'5'H遺伝子（1種），DFR遺伝子（3種），ANS遺伝子（1種），GST遺伝子（3種）のすべての遺伝子において，‘備中’に比べ‘友弘’白色根茎で発現量が高く，‘友弘’赤色根茎では多くの遺伝子で発現量が低かった．‘小寿星’では‘備中’に比べ多くの遺伝子で発現量が低いことが，発現が確認できなかった．

#### 【栽培環境と根茎着色との関連解析】

まず，赤色レンコンにおける根茎着色について調査したところ，生育初期の根茎は白色であり，その後，根茎が伸長するにしたがって種レンコン（基部）側から徐々に根茎の着色が進行し，根茎の肥大が完了する10月には先端部まで着色することを認めた．‘友弘’と白色根茎品種との交雑後代では，すべての節間が赤色に着色する個体とすべての節間が白色の個体とが出現すること，いずれの個体でも根茎の表皮と内部の着色が同調することを認めた．

紫外線除去フィルムならびに対照（紫外線透過性）フィルム内で栽培した赤色レンコン‘友弘’の肥大根茎着色を比較した結果，根茎着色に有意な差が認められず，地上部・地下部の生育にも有意な差は認められなかった．紫外線照射実験においても，すべての処理区間で根茎着色への影響は認められなかった．

外与のエセフォン処理を行ったところ，根茎の伸長促進・肥大抑制が起こり，結果的に根茎の着色が遅れたのに対し，‘友弘’栽培時のアブシジン酸溶液湛液処理を行うと，6月および7月調査時の両方で，対照に比べて根茎の表皮および内部の着色が早まり，アブシジン酸処理によるアントシアニン蓄積促進効果が認められた．

#### 【根茎着色形質の遺伝様式の解明】

赤色レンコン‘友弘’と短幼若性（易開花性）品種の交雑後代（雑種第一代（F<sub>1</sub>），雑種第二代（F<sub>2</sub>），戻し交雑第一代（BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>））を育成し，根茎色の遺伝様式を調査した．その結果，‘友弘’の自家交配（S<sub>1</sub>）個体の根茎色はすべて赤色，‘友弘’と白色根茎品種との交配により得たF<sub>1</sub>個体ではすべて白色，F<sub>1</sub>の自家交配により得たF<sub>2</sub>個体では根茎色が白：赤=3：1に分離することを示し，赤色レンコン‘友弘’の赤色形質は白色が顕性，赤色が潜性の1遺伝子支配であること

がわかった．次世代シーケンサー（MiSeq）を用いたF<sub>2</sub>集団のRAD-seq（Restriction-site Associated DNA Sequence）解析により，根莖着色形質に関連する12か所のSNPを検出し，このうち4か所から作製したdCAPSマーカーの適用性の検証により，これらのマーカーが根莖着色遺伝子と連鎖関係にあることを認め 根莖着色遺伝子との組換え価はそれぞれ3.80% ,1.91% ,11.79% , 7.30%であった．マーカー作成の際に参照したゲノム情報のSNPの座乗位置から，今回作成したマーカーはいずれも1番染色体上に位置すること，マーカーの座乗位置と参照ゲノム上の座乗順とも相違がないことを確認でき，根莖着色個体の早期選抜に適用できることが分かった．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomiyoshi Keita, Masuda Jun-ichiro, Fujimori Sae, Kurisaki Maiko, In Misaki, Ogata Junpei, Murakami Naofumi, Matsuishi Takahiro, Miyajima Ikuo, Mizunoe Yuki, Sakai Kaori, Hirata Sho, Ozaki Yukio	4. 巻 91
2. 論文標題 Characteristics and Genetic Control of Rhizome Coloration in Red Rhizome Lotus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 366 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2503/hortj.UTD-350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤森咲衣・富吉啓太・因 美咲・宮島郁夫・水ノ江雄輝・村上直史・若柳友弘・増田順一郎・尾崎行生
2. 発表標題 赤色根茎レンコン‘友弘’の着色根茎に含まれる色素の同定
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会研究発表
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 公益財団法人遺伝学普及会	4. 発行年 2023年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 80
3. 書名 生物の科学 遺伝 2023年5月発行号 (Vol.77 No.3)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	山形 悦透 (YAMAGATA Yoshiyuki) (00600446)	九州大学・農学研究院・准教授  (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	宮島 郁夫  (MIYAJIMA Ikuo)  (20182024)	九州大学・熱帯農学研究センター・教授    (17102)	
研究分担者	水ノ江 雄輝  (MIZUNOE Yuki)  (50759206)	九州大学・農学研究院・助教    (17102)	
研究分担者	増田 順一郎  (MASUDA Jun-ichiro)  (60452744)	宮崎大学・農学部・准教授    (17601)	

	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
研究協力者	富吉 啓太  (TOMIYOSHI Keita)	九州大学・農学部附属農場・技術専門職員    (17102)	

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