

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04453

研究課題名(和文) 植物色素ベタレインの種を超えたエンジニアリング基盤の構築

研究課題名(英文) Genetic engineering of betalain pigments beyond plant species

研究代表者

西原 昌宏 (Nishihara, Masahiro)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・研究部長

研究者番号：20390883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：ベタレイン色素はナデシコ目植物特有に含まれる色素であり、鮮やかな赤紫～黄色を呈し、強い抗酸化作用を有することが知られている。本研究ではナデシコ目植物以外におけるベタレイン色素の蓄積を目指して、ベタレイン色素生合成関連遺伝子の導入を行い、タバコ、トレンニア、ペチュニア、トマト、ジャガイモ、リンドウの葉、花、果実、塊茎など様々な器官において、ベタレイン色素を蓄積する植物の作出に成功した。本研究成果は、ベタレイン色素の植物における生理学的機能の解析や機能性等の研究に活用が可能である。

研究成果の概要(英文)：Betalains are plant pigments that specifically accumulate in plant species belonging to the Caryophyllales and they show from yellow to red-violet colors. There is a mutually exclusive nature between betalain and anthocyanin pigments in the plant kingdom. In this study, we attempted to produce betalain pigments, yellow betaxanthins and red-violet betacyanins, in non-betalain-synthesizing plant species by genetic transformation of betalain biosynthetic genes. As the results, successful production of betalain pigments has been achieved in leaves, flowers, fruits and tubers in various plant species such as tobacco, torenia, tomato and potato. The established methods are useful for production of novel flower-colored plants lacking red and yellow colors. They are also useful for production of food crops beneficial for human health and studies of the biological roles of betalain pigments in higher plants in the future.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：植物色素 遺伝子組換え 花色 ゲノム編集 ベタレイン 代謝工学



④ ゲノム編集による *F3H* 遺伝子のノックアウト体の作出

CRISPR/Cas9 法により、タバコ、トレニア、リンドウのフラバノン 3-水酸化酵素 (*F3H*) 遺伝子の第 1 エクソンをターゲットにガイド RNA を設計し、ゲノム編集を行った。アグロバクテリウム法により形質転換を行い、タバコで 19 系統、トレニアで 24 系統作出し、栽培を行い、花色の観察を行った。

4. 研究成果

1. ベタシアニン色素のエンジニアリング

① タバコ培養細胞 (BY2) の結果

BvCYP76AD1 の酵素活性の詳細は直接活性が測定されていなかったため、不明であった。そこで、35S プロモーターの制御に BvCYP76AD1, MjDOD, Mj5GT を繋いだベクター (pSKan-35SpBvCYP76AD1&MjDOD&Mj5GT) をタバコ BY2 培養細胞に導入し、解析を行った。その結果、赤色のカルスが獲得された。遺伝子発現解析と色素解析の結果、これらはベタシアニンが主成分であることが判明し、本コンストラクトによるベタシアニンのエンジニアリングが可能であることが示された。

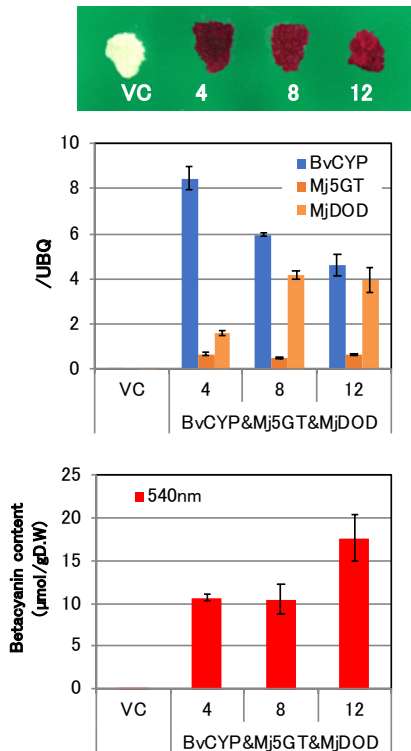


図 2 タバコ培養細胞 BY2 におけるベタシアニン色素のエンジニアリング

② タバコ植物の結果

上記のベクターを用いてタバコ SR1 の形質転換を行った。その結果、再分化カルス、シュートの段階から、赤色の着色が認められた。形質転換体のうち、赤の着色がよかった 2 系統を選抜し、閉鎖系温室での栽培に供試した。本植物は開花した花においても濃い赤色の着色が認められたため、自殖により種子を収穫し、後代を用いて詳細な解析を行った。T<sub>1</sub> 世代の花を図 3 に示す。形質転換体ではワ

イルドタイプのピンク花色に比較して、濃い赤色色素の蓄積が認められた。定量 RT-PCR による発現解析により、導入した外来遺伝子の発現を確認した。また、LC-MS 解析を行ったところ、本赤色の主要色素はベタニン (betanidin-5-glucoside) であることが判明した。定量した結果、いずれの系統でもベタニン (約 1.2 μmol/gFW)、イソベタニン (約 0.2 μmol/gFW) の蓄積量であった。

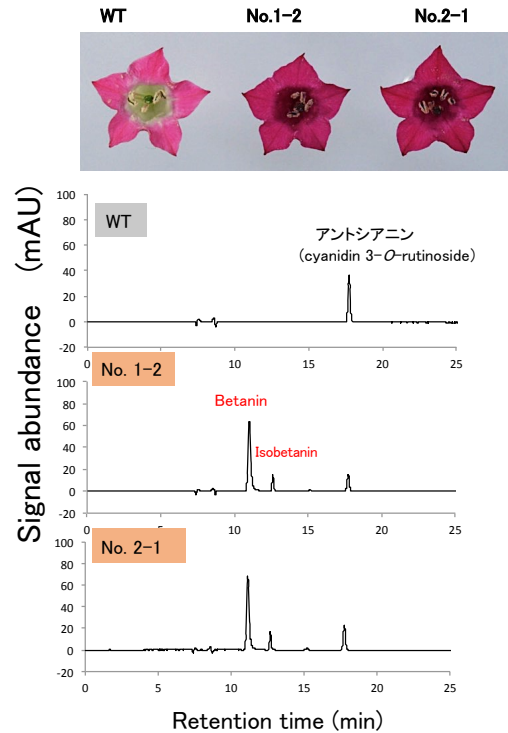


図 3 タバコ花卉におけるベタニンのエンジニアリング

③ トレニア植物の結果

同コンストラクトにより、トレニア紫品種の形質転換を行った結果、茎葉及び花に赤色色素の蓄積が認められた。3 系統を鉢上げし、ノザンプロット解析により外来遺伝子の発現を確認後、LC-MS による色素解析を行った。その結果、赤色色素はベタニンとイソベタニンであることが示された (図 4)

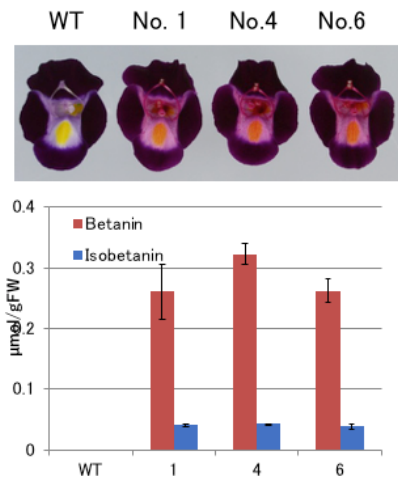


図 4 トレニア花卉におけるベタシアニン色素のエンジニアリング

さらに、本トレンシア形質転換体の花弁を部位別に色彩計で測定した結果、L値とa\*値に有意差が認められ、明度が上がって、赤みが増していることが確認された。

表1 形質転換トレンシア花の色彩計による解析

| 系統    | 部位    | L              | a*              | b*            |
|-------|-------|----------------|-----------------|---------------|
| 紫WT   | 花弁    | 12.21 ± 0.09   | 120.72 ± 2.84   | -2.86 ± 0.44  |
|       | 花弁筒内側 | 65.05 ± 2.82   | 47.65 ± 6.06    | -19.46 ± 3.07 |
| 紫No.1 | 花弁    | 12.39 ± 0.19   | 126.17 ± 3.69*  | -3.39 ± 0.80  |
|       | 花弁筒内側 | 54.58 ± 1.59** | 77.48 ± 3.52**  | -20.57 ± 1.06 |
| 紫No.4 | 花弁    | 12.49 ± 0.50   | 127.12 ± 5.58*  | -3.46 ± 1.25  |
|       | 花弁筒内側 | 53.31 ± 2.43** | 83.21 ± 5.70**  | -20.75 ± 2.96 |
| 紫No.6 | 花弁    | 12.29 ± 0.15   | 127.75 ± 3.86** | -3.66 ± 1.22  |
|       | 花弁筒内側 | 55.66 ± 6.93** | 78.29 ± 8.89**  | -20.88 ± 1.30 |

\*\* 1%水準; \* 5%水準

また、ハイパースペクトルカメラ (NH-7) を用いて花弁表皮細胞について、10細胞の平均スペクトルを解析した結果、野生株では、545nm, abs 値 22 (abs 値 23 以下 540-570nm) であったのに対し、形質転換体 No. 1 では 540-545nm, abs 値 11.3 (abs 値 12.3 以下 530-560nm) であり、極大吸収波長がベタニン標品:  $\lambda_{maz}$  530-536nm (pH5.4 buffer sol) と同様、短波長側にシフトしており、1細胞内でアントシアニンとベタシアニン (ベタニン) の共存が示唆された (図5)。

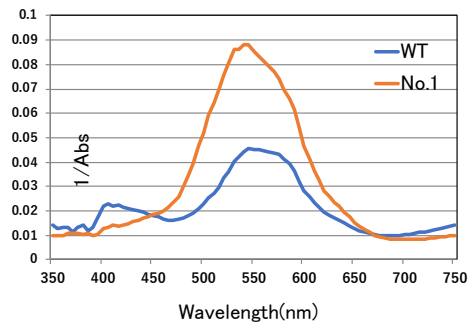


図5 トレンシア花弁の顕微分光観察による解析

#### ④ ペチュニア植物の結果

恒常的発現を示す 35S プロモーターによる形質転換では植物全体の着色が観察されるため、花弁特異的プロモーターの利用により、花弁特異的なベタシアニン蓄積が可能かどうかの検討を行った。アサガオの花弁特異的プロモーター InMYB1pro を用いたベクター (InMYB1proBvCYP76AD1&35SpMj5GT&MjDOD) を構築し、ペチュニア白花品種 Mitchell の形質転換を行った (図5)。その結果、35S プロモーターではペチュニアにおいても茎葉及び花で濃い赤色着色が認められた。InMYB1pro では花弁のみが薄ピンク色であり、茎葉は緑色のままであった。花弁特異的にベタシアニンを蓄積させることに成功したが、さらに濃い花色を作出するにはプロモーターの改良等を進める必要があると思われる。

#### ⑤ リンドウ植物の結果

リンドウでは 35S プロモーターがサイレンシングを受けることが知られており、メチル



図6 ペチュニア花弁におけるベタレインのエンジニアリング

化解析により、64-bp の領域に含まれる GAAGA モチーフが重要であることが示唆された。そこで、35S プロモーターの代替えとして、CmYLCV プロモーターを用いたコンストラクトにより、リンドウ白花品種ポラーノホワイトの形質転換を行った。その結果、リンドウにおいてもベタシアニン蓄積によると思われる花弁のピンク化が認められた (図7)。現在、遺伝子発現や色素解析を進めている。



図7 リンドウ花弁におけるベタシアニン色素のエンジニアリング

#### ⑥ トマト植物の結果

果実特異的プロモーター E8pro を用いたベクター (E8proBvCYP76AD1&35SpMj5GT&MjDOD) により、トマト品種 Micro-Tom の形質転換を行った。その結果、2系統の果実において、果実色の変化が確認された (図8)。LC-MS 解析の結果、ベタシアニンの蓄積が確認された。



図8 トマト果実におけるベタシアニン色素のエンジニアリング



⑤ ジャガイモ植物の結果

塊茎特異的プロモーターを用いたベクター (PatatinproBvCYP76AD1&35SpMj5GT&MjDOD) により、ジャガイモ品種さやか<sup>1</sup>の形質転換を行った。その結果、ジャガイモにおいても塊茎が赤色に着色した系統が作出された。LC-MS 解析の結果、主要色素はベタニンであることが判明した。



図9 ジャガイモ塊茎におけるベタシアニン色素のエンジニアリング

2. ゲノム編集技術の利用

黄色や赤花を作出するにあたって、アントシアニンの蓄積を抑えた白花系統の利用が有効と考えられる。白花品種を利用することができない場合、遺伝子組換え技術による花色の抑制が必要である。そこで本研究では、トレニア白花品種及びタバコ *CHS* の RNAi により作出した白花系統に加えて、近年、開発が進んでいるゲノム編集技術の適用を行った。*F3H* 遺伝子をターゲットにタバコ、トレニア植物の CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行ったところ、タバコで3割、トレニアで8割の個体で白花~薄色になる系統が作出可能であった。トレニア、タバコの例を図10に示す。これら植物からDNAを抽出し、ターゲット *F3H* 配列のシーケンス解析を行った結果、ターゲット配列に In/del, 塩基置換等の様々な編集が認められた。リンドウでも白花系統が作出されており、現在、解析を進めている。



図10 タバコ、トレニアにおける *F3H* 抑制系統の作出 (A) タバコ野生型 (B) タバコ形質転換体 (C) トレニア野生型 (D) トレニア形質転換体

3. ベタキサンチン色素のエンジニアリング

① タバコ及びトレニア植物の結果

研究開始当初、シイタケのチロシナーゼ遺伝子を用いてタバコ、シロイヌナズナの形質転換体を行ったが、いずれも黄花化系統は得られなかった。そこで、本研究ではテーブルビートの *BvCYP76AD6* 遺伝子を用いて花卉特異的プロモーターによりドライブしたベクターを構築し、形質転換を行った。タバコは

リンドウの F3' 5' Hpro&35SpMjDOD、トレニアはトレニアの TfDFRproBvCYP76AD6&35SpMjDOD による形質転換を行った。ホストとして、タバコは *CHS* 遺伝子を RNAi 法により抑制した系統または *F3H* 遺伝子をゲノム編集によりノックアウトした系統 (図10B) を用いた。なお、トレニアは選抜マーカーの関係上、白花品種 Crown White を用いた。その結果、花卉が黄色く着色した系統が作出された。代表的な花を図11に示す。現在、後代の種子を収穫し、詳細な解析を進めている。

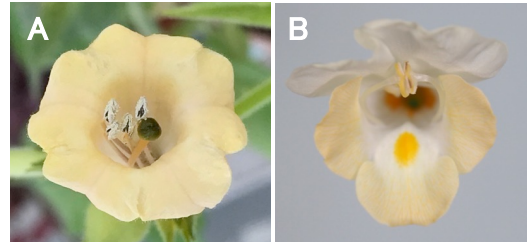


図11 タバコ及びトレニア花におけるベタキサンチン色素のエンジニアリング

③ ジャガイモ植物の結果

ジャガイモについては、研究開始当初、タバコ懸濁培養細胞において、シイタケ由来のチロシナーゼを用いてベタキサンチンの蓄積に成功していたため、塊茎特異的プロモーターとして、Patatin pro を用いてベクター (PatatinproLeTYr&35SpMjDOD) により、ジャガイモ品種さやか<sup>1</sup>の形質転換を行った。形質転換体を作成し、高濃度ショ糖培地でマイクロチューバーを誘導した。その結果、図12に示すように、マイクロチューバーが黄色く着色した系統が4系統得られた。LC-MS により解析した結果、本系統にはベタキサンチン類 (Asn-BX, Arg-BX, Gln-BX, Pro-BX) が蓄積していることが示された。さらに、閉鎖系温室での栽培も実施し、ベタキサンチンの黄色着色は土栽培したジャガイモ塊茎でも認められることを確認した。

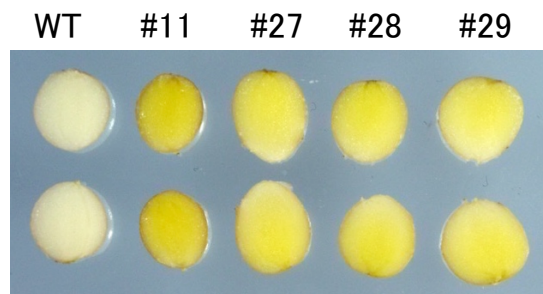


図12 ジャガイモマイクロチューバーにおけるベタキサンチン色素のエンジニアリング

5. 主な発表文等

(研究代表者研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Nishihara, M., Tasaki, K., Sasaki, N.,

Takahashi, H. Development of basic technologies for improvement of breeding and cultivation of Japanese gentian. *Breeding Science* 68: 14-24

(査読あり) DOI: 10.1270/jsbbs.17074

② Shimada, A., Okumura, A., Iwata, Y., Koizumia, N., Nishihara, M., Mishiba, K. The 64-bp sequence containing GAAGA motif is essential for CaMV-35S promoter methylation in gentian. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms* 1860: 861-869

(査読あり)

DOI: 10.1016/j.bbagrm.2017.06.001

[学会発表] (計 7 件)

①西原昌宏 リンドウの花色素合成機構の解明と新規花色創出へ向けての取組み 第52回植物化学シンポジウム 招待講演「オミクス解析を用いた有用な遺伝子・代謝産物の探索と活用 2015年11月東京大学薬学部講堂

②西原昌宏、田崎啓介、樋口敦美、藤田晃平、黒川良美、高橋秀行、佐々木伸大

CRISPR/Cas9 システムによるタバコ及びトレンニアの花色素改変 日本植物生理学会第57回年会 岩手大学上田キャンパス 2016年3月

③西原昌宏、樋口敦美、藤田晃平、田崎啓介、黒川良美、高橋秀行、佐々木伸大

Application of CRISPR/Cas9 System for Modification of Flower Colors in Tobacco and Torenia Plants. *Plant and Animal Genome XXIV Conference*, 2016年1月 San Diego, USA (口頭及びポスター発表)

④西原昌宏、山田恵理、樋口敦美、藤田晃平、黒川良美、中塚貴司、宮原平、小関良宏、高橋秀行、佐々木伸大 タバコ及びトレンニアにおけるベタレイン色素のエンジニアリング 日本植物細胞分子生物学会第34回大会 信州大学上田キャンパス 2016年9月

⑤佐々木伸大 植物のベタレイン合成のメカニズムとその役割 園芸学会 平成28年度秋季大会 公開シンポジウム「園芸植物がもつ色素の機能と可能性」名城大学天白キャンパス 2016年9月

⑤西原昌宏 植物種を超えたベタレイン色素のエンジニアリングアグリ・バイオ公開シンポジウム

Division of Agri-biotechnology, 東京理科大学研究推進機構総合研究院 アグリ・バイオ工学研究部門 2017年7月 東京理科大学葛飾キャンパス

⑥田崎啓介、樋口敦美、渡辺藍子、黒川良美、鷲足理恵、佐々木伸大、西原昌宏 ゲノム編集技術によるリンドウ花色変異体の作出と解析 園芸学会 平成29年度秋季大会 酪農学園大学 2017年9月

⑦Tasaki, K., Watanabe, A., Higuchi, A., Kurokawa, Y., Washiashi, R., Takahashi, H., Nishihara, N. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of flavanone 3-hydroxylase gene in tobacco, torenia and

gentian plants. 日本植物生理学会第59回年会 2018年3月

[図書] (計 1 件)

有村源一郎、西原昌宏(2018) 植物のたくらみー香りと色の植物学 ベレ出版 ISBN: 4860645448

[その他]

謝辞: オシロイバナの遺伝子の提供及び花弁の顕微分光観察において、東京農工大学 小関良宏教授、宮原平助教に協力いただいた。プロモーターの提供: 農研機構 佐々木克友博士、筑波大学 江面 浩博士、基生研 星野敦博士

ホームページ等

<http://www.ibrc.or.jp/>

<http://gentian.ibrc.or.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西原 昌宏 (NISHIHARA, Masahiro)  
公益財団法人 岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・研究部長  
研究者番号: 20390883

### (2) 研究分担者

高橋 秀行 (TAKAHASHI, Hideyuki)  
公益財団法人 岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・主任研究員  
研究者番号: 00455247

研究分担者 (H27-28)

佐々木 伸大 (SASAKI, Nobuhiro)  
東洋大学・食環境科学部食環境科学科・准教授  
研究者番号: 80422099  
H29年度より連携研究者

### (3) 連携研究者 (H29)

佐々木 伸大 (SASAKI, Nobuhiro)  
東洋大学・食環境科学部食環境科学科・准教授  
研究者番号: 80422099

### (4) 研究協力者

樋口 敦美 (Atsumi, Higuchi)  
公益財団法人 岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・研究助手

藤田 晃平 (FUJITA, Kohei)  
公益財団法人 岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・研究助手

渡辺 藍子 (WATANABE, Aiko)  
公益財団法人 岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・研究助手