

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14645

研究課題名(和文) 転写型遺伝子サイレンシング(TGS)によるシンテッポウユリの花色改変

研究課題名(英文) Flower color modification in *Lilium longiflorum* using transcriptional gene silencing (TGS)

研究代表者

山岸 真澄 (Yamagishi, Masumi)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40210348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ユリの花弁が白くなるメカニズムはよく分かっていない。ユリの花弁は発達の過程でカロテノイド蓄積量が減少することより、カロテノイドを分解するCCD4を解析した。テッポウユリ、オリエンタルハイブリッドユリ、スカシユリからそれぞれ2つのCCD4遺伝子(LhCCD4aとLhCCD4b)が単離された。オリエンタルハイブリッドユリとスカシユリでは、LhCCD4aは発現パターンがカロテノイドの消長と一致したが、LhCCD4bは一致しなかった。テッポウユリではLhCCD4aとLhCCD4bのいずれも、カロテノイド蓄積の減少と発現様式が一致しなかった。ユリの花弁でカロテノイドが分解されるメカニズムは複雑である。

研究成果の概要(英文)：Huge variation in flower color hues, including white, is important sales points for lilies. However, mechanisms that cause white flowers are not well known in *Lilium* species, which were analyzed in this study. Because young flower buds of lilies accumulate high amounts of carotenoids, the degradation of carotenoids during flower development should be important steps that create white flowers. Thus, CCD4 that cleaved carotenoids in flower organs were cloned in *L. longiflorum*, Asiatic hybrid lilies, and Oriental hybrid lilies. These lily species respectively had two CCD4 genes, LhCCD4a and LhCCD4b. The expression profiles of LhCCD4a during flower development were concordant with the reduction of carotenoid contents in Asiatic and Oriental hybrid lilies, but that of LhCCD4b were not concordant with it. In *L. longiflorum*, both LhCCD4a and LhCCD4b were not accordant with color changes in flowers. These results indicate that carotenoid degradation steps are complicated in lily flowers.

研究分野：細胞工学

キーワード：TGS CCD4 NPT VIGS *Lilium* カロテノイド 花色改変 テッポウユリ

1. 研究開始当初の背景

ユリは代表的な花き園芸作物のひとつで、花色の豊富さがセールスポイントのひとつである。花色として白、ピンク、黄、オレンジ、赤があるが、カロテノイドのキサントフィル類とカプサンチンが貯まるとそれぞれ黄色とオレンジに、アントシアニンが貯まるとピンクに、カロテノイドとアントシアニンが同時に貯まると赤に、いずれの有色の色素も貯まらなると白になる。

ユリの若い蕾は緑色で、そこにはクロロフィルに加えてカロテノイドが貯まっている。カロテノイド生合成遺伝子の発現は花弁の発達に伴って上昇し、すなわちカロテノイドは蕾が小さいときから開花するまでずっと生合成されている。一方で花弁にカロテノイドが貯まらない種や品種では、蕾の発達する後半にカロテノイド蓄積量の減少が始まる。カロテノイドが生合成されているにもかかわらず蓄積量が減少することは、花弁でカロテノイドが生合成される以上に分解された結果であろうと予測される。

純白の花弁をつくるにはカロテノイドの量を十分に低くする必要があるし、花弁をきれいなピンクにするときも、少しでもカロテノイドが残っているとくすんだ色になってしまうことより、十分にカロテノイドの量を減らす必要がある。このように、花弁におけるカロテノイドの分解は花の色の品質(善し悪し)を左右する重要な要因であるが、にもかかわらずユリの花弁でカロテノイドが分解されるメカニズムは十分に分かっていない。

2. 研究の目的

植物の花弁でカロテノイドの分解にかかわる酵素タンパクとして Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4 (CCD4) が知られている。キクを皮切りに、いくつかの植物種で機能が調べられており、ユリでもハカタユリ (*Lilium brownii*) で遺伝子が単離されている。ユリの花弁における CCD4 の機能についてはまだ不明なところが多いことより、本研究では複数のユリから CCD4 を単離して主に発現解析を行い、花弁でのカロテノイド蓄積量との関連を調査した。

3. 研究の方法

(1) LhCCD4 の単離

テッポウユリ (*Lilium longiflorum*)、オリエンタルハイブリッドユリ (*Lilium* spp.)、スカシユリ (*Lilium* spp.) を材料に用いた (図 1、2、3)。

花弁由来の cDNA を合成して、PCR を用いて CCD4 遺伝子を単離した。PCR のプライマーは、スカシユリ品種‘ロリポップ’のトランスクリプトームに含まれていた CCD4 様配列

からデザインした。

(2) LhCCD4 の発現

ユリの蕾の各発達ステージより cDNA を合成して発現解析に用いた。発現解析には real-time PCR を用いた。このときユリの ACTIN 遺伝子を内部標準として用いた。

(3) 花弁に蓄積するカロテノイドの定量

エタノールでカロテノイド色素を花弁より抽出し、鹸化、分配の後、カロテノイドを含むエーテル相の吸光度を測定し、全カロテノイド量を求めた。

4. 研究成果

(1) CCD4 遺伝子の単離

テッポウユリ、オリエンタルハイブリッドユリ、スカシユリより CCD4 遺伝子を単離した。これらのユリにはそれぞれ 2 つの CCD4 遺伝子、LhCCD4a と LhCCD4b、が発現していた。

LhCCD4a の塩基配列は、以前ハカタユリ (*L. brownii*) から単離された LbCCD4 と similarity が高く、LbCCD4 のオースログであると考えられたが、アミノ酸配列はハカタユリより C 末側がかなり長かった。他の species の CCD4 と比較しても、ハカタユリの LbCCD4 だけ C 末側が短かったことより、LbCCD4 には何らかの原因で premature STOP codon ができているものと考察した。

LhCCD4b は植物の CCD/NCED

(9-Cis-epoxycarotenoid dioxygenase) 遺伝子ファミリーの中で CCD4 のクラスターに位置づけられたが、塩基配列、アミノ酸配列とも、LhCCD4a やハカタユリの LbCCD4 と異なっており、別の遺伝子であると推察された。

LhCCD4a と LhCCD4b はいずれも N 末にプラスチックドへの移行シグナルが認められた。



図 1 オリエンタルハイブリッドユリ‘リアルト’

(2) LhCCD4a の発現

花弁の各発達ステージ (St) の LhCCD4a の発現を調査した。オリエンタルハイブリッドユリとスカシユリでは、花弁の色の変化が顕著となる St 3 から LhCCD4a の発現は上昇し、開花当日の St 5 で発現量は最大となり、開花後も発現は継続していた。この発現パターンはアントシアニン生合成遺伝子のパターン (アントシアニン生合成遺伝子では St 3 に発現が上昇し、St 4 [開花前日] で最大となり、開花 1 日後には発現は無くなってしまふ) と異なっていた。

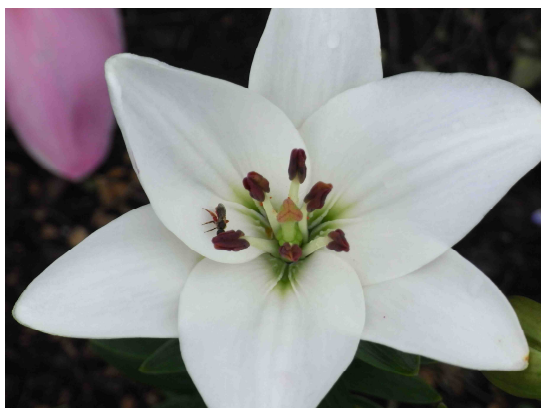


図 2 スカシユリ品種 'シルバーストーン'

花弁の全カロテノイド含量は、St 3 から減少が始まり、開花時に最低となった。すなわち、LhCCD4a の発現パターンはカロテノイド蓄積量の変化と負の関係にあり、カロテノイドの消長をうまく説明できると考えられた。

スカシユリの、白やピンクのカロテノイドを貯めない品種と、黄色や赤のカロテノイドを貯める品種を用いて、LhCCD4a の発現を調査したところ、白やピンクの品種では花弁で高く発現していたが、黄色や赤の品種ではほとんど発現が認められなかった。

花弁以外の花器官 (葯、花糸、子房、花柱) や葉では LhCCD4a の発現は低く、LhCCD4a の発現は花弁に特異的であることが分かった。

以上のことよりオリエンタルハイブリッドユリとスカシユリにおいて LhCCD4a の発現は、開花時の花弁におけるカロテノイド蓄積の有りなしをうまく説明できると考えられた。

テッポウユリ花弁では、花弁が白くなり始める St 3 よりカロテノイドの蓄積量の減少が始まり、開花 1 日後に蓄積量は最低となる。テッポウユリにおける LhCCD4a の発現は、St 1-St 4 で低く、St 5 (開花当日) で上昇し、開花後も発現の高い状態が続いた。このことよりテッポウユリでは、LhCCD4a は開花後の花弁におけるカロテノイドの分解に寄与しているが、開花前から始まるカロテノイド量の低下には寄与しておらず、LhCCD4a のみでカロテノイド蓄積の消長を説明することはできないと考えられた。



図 3 テッポウユリ

(3) LhCCD4b の発現

オリエンタルハイブリッドユリとスカシユリにおける LhCCD4b の発現は、St 3 - St 5 で高かったが、カロテノイド量が減少を始める前の St 1, St 2 でも発現が認められた。またスカシユリでカロテノイドを貯める品種と貯めない品種の間で比較したところ、LhCCD4b はカロテノイド蓄積の有無に関係なく、調査した品種全てで発現していた。このように LhCCD4b は花弁におけるカロテノイドの消長と一致しなかった。

テッポウユリにおける LhCCD4b の発現は、St 5 (開花当日) で上昇し、その後さらに発現量が高くなった。St 1 - St 4 では LhCCD4a 同様、発現量は低く、テッポウユリ花弁で認められる開花前のカロテノイド量の減少を LhCCD4b の発現で説明することはできなかった。

葯、花糸、子房、花柱、葉では LhCCD4b の発現は花弁と比べて著しく低く、LhCCD4b は花弁に特異的であることが分かった。

(4) LhCCD4 の機能解析

ユリ花弁における LhCCD4 の機能を明らかにするために、Virus induced gene silencing の系を用いて LhCCD4 のノックダウンを試みたが、いろいろな手法上の困難さがあってうまく行かなかった。そこでヘアピン RNA を利用した RNAi 法をもちいて、LhCCD4 の発現抑制を現在試みている。研究期間中に成果をまとめるには至らなかったが、もう少しでとりまとめを行い LhCCD4 の機能を明らかにできる段階にまできている。

(5) 考察

ユリの花弁では 2 つの CCD4 遺伝子が発現していた。オリエンタルハイブリッドならびにスカシユリでは開花前から LhCCD4a と LhCCD4b の発現が始まっていた一方で、テッポウユリでは CCD4a, CCD4b とともに開花当日から発現が始まった。このようにオリエンタルハイブリッドならびにスカシユリにおける発現パターンと、テッポウユリにおける発現パターンはずいぶん異なっていた。

オリエンタルハイブリッドならびにスカシユリでは LhCCD4a の発現パターンがカロ

テノイドの蓄積量と負の関係にあり、カロテノイドの消長はLhCCD4aでうまく説明できると考えられた。一方でLhCCD4bの発現パターンはカロテノイド蓄積との関連が認められず、どのような役割を担っているのか明確にならなかった。

テッポウユリでは開花前からカロテノイド量の減少が始まっているにも関わらず、開花前にLhCCD4aとLhCCD4bは発現していなかった。開花前に発現している第3のCCD4遺伝子の存在が予測された。このようにユリの花卉では2つ以上のCCD4が働いており、発現パターンが遺伝子間で異なり、種間でも違っていた。このようにユリのCCD4は複雑である。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山岸 真澄 (YAMAGISHI MASUMI)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：40210348

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()