

令和元年6月19日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07602

研究課題名(和文) ツツジ亜属種におけるCCD4遺伝子の発現と常緑性黄花ツツジ育種への応用

研究課題名(英文) Comparison of expression levels of CCD4 gene among azalea species belonging to subgenus tsutsusi and its application to breeding of yellow flowered evergreen azaleas

研究代表者

嬉野 健次 (URESHINO, Kenji)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号：10333759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：常緑性黄色花ツツジ作出を目的として常緑性ツツジ種とキレンゲツツジとの亜属間交配を行った場合、F1後代の花弁では常緑性ツツジ種より遺伝したCCD4遺伝子が高発現するため花弁発育とともに退色化する。本研究では、花弁発育中CCD4の発現量が低い常緑性ツツジ種を選抜するため、16種の開花当日の花弁を用いてCCD4遺伝子の発現量を調査した。常緑性ツツジ種間の発現量はキレンゲツツジの2～20倍まで幅広い変異を示した。そのうち、サキシマツツジは花弁の全発育期間を通してキレンゲツツジの発現量と有意差がなかった。以上の結果より、サキシマツツジは常緑性黄色花ツツジ作出のための交配親として有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花卉類における黄花品種の作出は、多くの種目において育種目標としてあげられている。常緑性黄色花ツツジ作出を目的とした、白花常緑性ツツジと黄花落葉性キレンゲツツジとの交配において、F1実生は、カロテノイド色素生成能自体は優性形質としてキレンゲツツジから遺伝しているものの、常緑性種より遺伝したCCD4の高発現により退色化している。本研究では、複数の常緑性ツツジ種について開花花弁におけるCCD4遺伝子発現量を調査し、発現量の低い常緑性種を明らかにしている。この結果は、今後、本種を交配親に用いることで、常緑性黄色花ツツジ作出の可能性を示しており、学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Intersubgeneric crosses between white-flowered evergreen azalea species and *Rhododendron japonicum* f. *flavum* can produce yellow-flowered evergreen azaleas. The petal color of F1 progenies is known to fade during petal development, due to a high expression of the CCD4 gene inherited from the evergreen species. In this study, to facilitate the selection of evergreen azalea species as cross parents that have low expression levels of CCD4 in developing petals, CCD4 expression levels were compared among 16 evergreen azalea species. The expression levels of CCD4 genes in petals of evergreen azalea species at the day of anthesis varied widely from 2 to 20 times relative to that in *R. japonicum*. Among these species, *R. amanoi* maintained low CCD4 expression levels throughout all petal development stages, which were not significantly different from those of *R. japonicum*. This species, therefore, is considered a promising breeding material for producing yellow-flowered evergreen azaleas.

研究分野：園芸科学

キーワード：ツツジ カロテノイド CCD4

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

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) ツツジの育種目標(いま求められている形質)

日本には、およそ 40 種のツツジ属植物が自生する。園芸品種群の花色は白、桃～赤紫、花型は小輪、中輪、大輪、二重咲、八重咲、しべ咲きなど多種多様な品種が存在するが、これらは、主に、ツツジ亜属ヤマツツジ列に属する常緑性ツツジ種間の自然および人工交雑(種間交雑)による。ツツジの育種目標として、常緑性であること、花色では黄色および青色が、また、芳香性があげられる。このうち、黄色に関しては *Pentanthera* 亜属の落葉性種キレンゲツツジが、花弁内に黄色の主要色素であるカロテノイド類を有しており、有用な育種素材とされている。

### (2) 常緑性黄色花ツツジ育種の現状

亜属間交配における交雑不和合性要因の解明と緑色実生の効率的な獲得法の確立

(研究成果 1)

ツツジ亜属と *Pentanthera* 亜属間の交配では、ツツジ亜属を種子親とした場合にのみしか実生が得られず(一側交雑不和合性)、得られる実生もそのほとんどがアルビノ実生となるため開花まで至る雑種個体を得ることは困難であった。申請者は、この実生のアルビノ化がツツジ亜属種の葉緑体ゲノムと *Pentanthera* 亜属種の核ゲノム間の不和合性(plastome-genome incompatibility)に起因し、葉緑体ゲノムが花粉親の *Pentanthera* 亜属種より遺伝した場合にのみ緑色実生となることを明らかにしている(Ureshino et al, 1999)。さらに申請者は、常緑性ツツジの種間雑種個体を種子親としてキレンゲツツジと交配する三系交配を行うことにより、効率的に緑色雑種実生が得られることを明らかにしている(Ureshino et al., 1998)。

亜属間交配で得られた実生の花色(研究成果 2)

常緑性白花雑種ツツジ(ミヤマサツキ)、黄花キレンゲツツジおよび両者の三系交配で得られた F1 実生における花色は、開花前日の蕾では黄色を示すが、開花当日以降の花弁では退色化がみられ、白色に近づいていく。申請者は、この黄色花の主要色素がカロテノイド類の  $\beta$ -カロテンであること、F1 実生における退色化は花弁發育に伴うカロテノイド含量の減少に起因することを明らかにしている(Ureshino et al., 2015)。

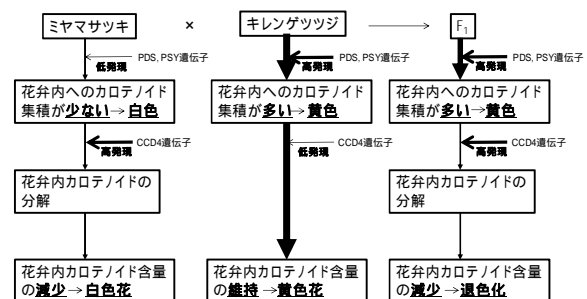
F1 実生における黄色花退色化に関与する遺伝子群(研究成果 3)

前述の交配親および F1 実生について、カロテノイド合成に関与する遺伝子群(IPI, PSY, PDS, CRTISO, ZDS, LCYb, LCYe, HYB)および合成されたカロテノイドを開裂し無色のアポカロテノイドにする遺伝子(CCD1, CCD4)のクローニングおよび発現解析を行った(Ureshino et al., 2015)。その結果、各遺伝子で推定されるアミノ酸レベルの相同性は両親間で 94%以上と非常に高いことが明らかとなっている。また、RT-qPCR による遺伝子の発現量比較を両親間で行ったところ、カロテノイド合成遺伝子群のなかでは合成経路の上流に位置する PSY および PDS の発現量が、交配親の黄色花キレンゲツツジの方が白花ミヤマサツキに比べ有意に高いこと、また、カロテノイド開裂酵素遺伝子では、ミヤマサツキの CCD4 の発現量がキレンゲツツジに比べ、有意に高いことを明らかにしている。すなわち、常緑性白花ツツジのミヤマサツキにおいて、黄花の主要色素であるカロテノイド含量が低いのは、PSY および PDS の低発現、CCD4 の高発現の 2 つの要因によることを明らかにしている。一方、両者の F1 実生では、キレンゲツツジより遺伝した PSY および PDY によりこれら 2 遺伝子の発現量が高いが、ミヤマサツキより遺伝した CCD4 の高発現により、集積したカロテノイドがアポカロテノイドに分解され、このことが黄色退色化の要因であることが強く示唆されている。

これまでの研究結果を踏まえた常緑性黄色花ツツジ作出の方策(第 1 図参照)

先に述べたように、常緑性白花ツツジのカロテノイド低集積の要因は、カロテノイド合成遺伝子の PSY と PDS の低発現、カロテノイド開裂酵素遺伝子 CCD4 の高発現の 2 つに起因している。このうち、PSY および PDS については、キレンゲツツジが高発現のため、これらの F1 実生では発現量が高く、カロテノイドが効率的に合成されている。しかし、CCD4 は常緑性白花ツツジより遺伝した CCD4 により高発現になる。すなわち、常緑性白花ツツジとキレンゲツツジとの交配では、CCD4 低発現個体の作出が黄色花作出の鍵となる。

日本には、ツツジ亜属に属する常緑性ツツジ種が約 20 種自生している。これらは種間交雑が比較的容易であり、前述の三系交配を利用すればキレンゲツツジとの亜属間交配も可能である。これらのなかで、花弁内にカロテノイドを多く集積し黄色花を示す種は存在しないが、この要因が、カロテノイド合成遺伝子の PSY および PDS の低発現、カロテノイド開裂酵



第 1 図 常緑性白花ツツジ(ミヤマサツキ)とキレンゲツツジとの交配で得られた実生の黄色花退色化のメカニズム

素遺伝子 CCD4 の高発現のいずれか、あるいはその両者によるものかは不明である。仮に、カロテノイド生合成遺伝子の PSY および PDS の低発現のみが要因になっていて、CCD4 も発現量が低い種が存在すれば、キレンゲツツジとの亜属間交配による黄色退色化は克服できると考えられる。しかしながら、常緑性ツツジ種におけるカロテノイド組成、含量および生合成遺伝子と開裂酵素に関与する遺伝子群の調査などはこれまで皆無である。

## 2. 研究の目的

前述のように、亜属間交配における常緑性黄色花ツツジの作出には、得られた実生の CCD4 の低発現が鍵となる。一方、キレンゲツツジでも常緑性ツツジと相同性が非常に高い CCD4 遺伝子が存在し、その発現量は低いながらも認められていることから、この両親間の発現量の差が何に起因するのかを明らかにすることは重要である。よって、本研究では、以下の点について検討する。

- ミヤマサツキとキレンゲツツジ間でみられた CCD4 発現量の差をもたらす要因は何か？
- ツツジ亜属の他の常緑性ツツジ種における CCD4 遺伝子の発現量の違いはあるのか？

## 3. 研究の方法

### (1) 常緑性ツツジ (ミヤマサツキ) とキレンゲツツジ間の CCD4 遺伝子ゲノム構造の比較

ミヤマサツキおよびキレンゲツツジ各 1 系統より若葉を採取し、改変 CTAB 法により DNA を抽出した。これを鋳型にして、CCD4 遺伝子の全翻訳領域が増幅できるように設計したプライマーを用いて PCR 反応を行った。得られた増幅産物を用いて平滑末端クローニングおよびシーケンシングを行い、塩基配列情報を得た。この塩基配列と既報の CCD4 の cDNA 配列を比較し、エキソンおよびイントロンの配列を決定した。また、第 2 エキソン 第 2 イントロン 第 3 エキソン間でのスプライシング効率を確認するために、開花当日花弁より抽出した RNA を逆転写した cDNA を用いて、第 2 エキソン 第 3 エキソン間で設計したプライマー (EX2F-EX3R) および第 2 エキソン 第 2 イントロン間で設計したプライマー (EX2F-IN2R) により、SYBR Green 検出系によるリアルタイム PCR を行った。

### (2) 常緑性ツツジ種花弁内における CCD4 遺伝子の発現量の比較

常緑性ツツジとして、ツツジ亜属ケラマツツジ亜節 6 種、同亜属サツキ亜節サツキ列 4 種およびヤマツツジ列 7 種の計 17 種 26 系統を、落葉性ツツジとしてレンゲツツジ亜属キレンゲツツジを用いた。開花当日の花弁の下部 2 弁より全 RNA を抽出し逆転写反応を行った。これを鋳型にして、CCD4 遺伝子について SYBR Green 検出系によるリアルタイム PCR を行い、相対的定量法による遺伝子の発現量を調査した。なお発現量はキレンゲツツジの発現量を 1 とした。発現解析は各処理区 3 反復で行い、フィッシャーの LSD 法により有意差を検定した。

### (3) ツツジ亜属内の CCD4 遺伝子の相同性およびイントロンサイズの比較

(2) で供試したツツジ亜属に属する種を用いた。開花当日の花弁の下部 2 弁より全 RNA を抽出し、逆転写反応を行った。これを鋳型にして、CCD4 遺伝子について PCR により CDS 領域を増幅し、増幅産物について TA クローニングおよびシーケンシングを行い、塩基配列情報を得た。次に、イントロンサイズを調査するため、葉より DNA を抽出し、これを鋳型にして、先に調査した塩基配列情報をもとに設計したプライマーを用いて、第 1 および第 2 イントロン領域を PCR により増幅した。増幅産物を電気泳動し、イントロンサイズを決定した。

### (4) 数種の常緑性ツツジの花弁発育に伴う CCD4 遺伝子の発現量の変化

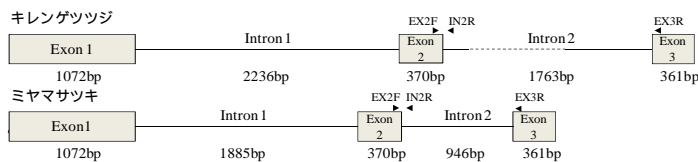
ツツジ亜属の常緑性ツツジ種のうち、(2) の結果より、開花当日の花弁内での CCD4 遺伝子の発現量が低かったケラマツツジ亜節のサキシマツツジ (AMA) およびヤクシマヤマツツジ (YAK)、サツキ亜節サツキ列のサツキ (IND) の 3 種と、逆に、CCD4 遺伝子の発現量が高かったサツキ亜節サツキ列のセンカクツツジ (TAW)、サツキ亜節ヤマツツジ列のタイワンヤマツツジ (SIM) およびオオシマツツジ (MAC) の 3 種を用いた。また、発現量の比較のためにレンゲツツジ亜属のキレンゲツツジ (JPN) も用いた。開花前日 (Stage 1)、開花当日 (Stage 2)、同 2 日後 (Stage 3) および 5 日後 (Stage 4) の花弁の下部 2 弁より全 RNA を抽出し逆転写反応を行った。これを鋳型にして、CCD4 遺伝子について SYBR Green 検出系によるリアルタイム PCR を行い、相対的定量法による発現量を調査した。発現解析は各処理区 3 反復で行い、チューキー法により有意差を検定した。なお、発現量について、キレンゲツツジの開花前日の花弁の発現量を 1 とした。

## 4. 研究成果

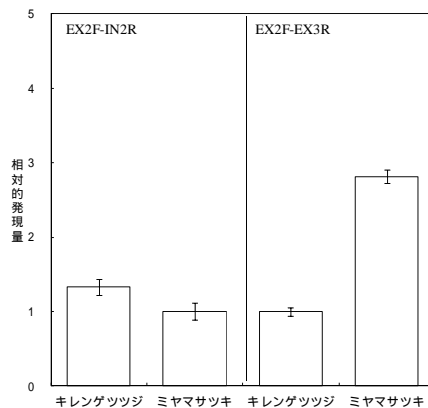
### (1) 常緑性ツツジ (ミヤマサツキ) とキレンゲツツジ間の CCD4 遺伝子ゲノム構造の比較

開始コドンから終止コドンまでの増幅サイズは、ミヤマサツキで 4634bp、キレンゲツツジで 5802bp であった。シーケンシングの結果、両者とも 2 つのイントロンの挿入が確認され、第 1、第 2 および第 3 エキシソンのサイズは、共に、1072、370、361bp と同じであった (第 1 図)。一方、イントロンのサイズは両者間で異なり、第 1 イントロンはキレンゲツツジで 2236bp、ミヤマサツキで 1885bp、第 2 イントロンはキレンゲツツジで 1763bp、ミヤマサツキで 946bp と、

いずれもキレンゲツツジの方が大きかった。特に、第2イントロンでは、同イントロン開始点より222bpから1030bpにかけてキレンゲツツジで809bpの挿入配列が確認された。そこで、次に、第2エクソン-第2イントロン-第3エクソン間でのスプライシング効率を確認するために、リアルタイムPCRを行ったところ、第2エクソン-第3エクソン間で設計したプライマー(EX2F-EX3R)では、ミヤマサツキの発現量がキレンゲツツジに比べ3倍高かったのに対し、第2エクソン-第2イントロン間で設計したプライマー(EX2F-IN2R)では、キレンゲツツジの方が1.3倍高かった(第2図)。以上の結果より、ミヤマサツキとキレンゲツツジにおけるCCD4遺伝子の発現量の差に、第2イントロンのサイズが影響している可能性が考えられた。



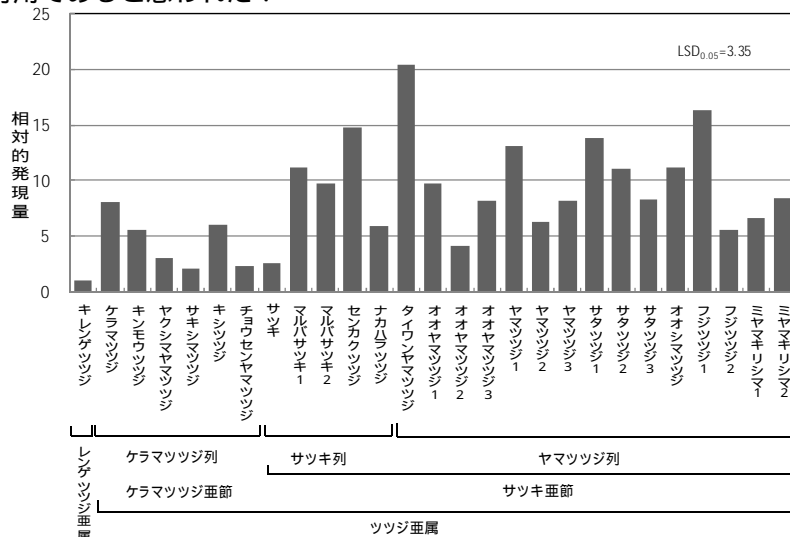
第1図 キレンゲツツジおよびミヤマサツキにおけるCCD4遺伝子のゲノム構造。破線は挿入配列の領域を示す。矢印はリアルタイムPCRに用いたプライマーの位置を表す。



第2図 リアルタイムPCRを用いたCCD4遺伝子第2イントロンのスプライシング効率の比較。barは標準誤差を表す。

## (2) 常緑性ツツジ種花卉内におけるCCD4遺伝子の発現量の比較

ツツジ亜属におけるCCD4遺伝子の開花当日花卉での相対的発現量は、いずれの種もキレンゲツツジより高かった(第3図)。また、その発現量は種および系統により大きく異なり、キレンゲツツジの2.04倍から20.47倍まで分布した。このうちキレンゲツツジとの発現量の差がLSD(p0.05)値の3.35より低かったのは、5種5系統であった。最も発現量が低かったのはケラマツツジ列に属するサキシマツツジの2.04で、次いで同列チヨウセンヤマツツジの2.31、サツキ列サツキの2.63、ケラマツツジ列ヤクシマヤマツツジの3.00であり、ケラマツツジ列およびサツキ列で発現量の低い種がみられた。以上の結果より、ツツジ亜属の常緑性ツツジ種におけるCCD4遺伝子の花卉内での発現量は種により大きく異なることが明らかとなった。また、ケラマツツジ列に発現量の低い種が3種みられ、これらの種は常緑性黄花ツツジ作出の育種親として有用であると思われる。

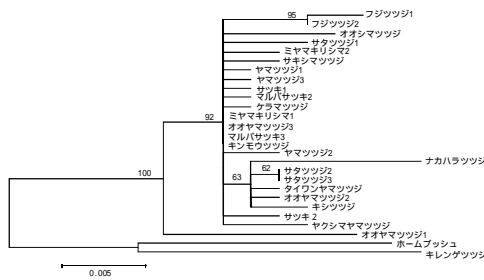


第3図 常緑性ツツジ種における開花当日花卉のCCD4遺伝子の相対的発現量

## (3) ツツジ亜属内のCCD4遺伝子の相同性およびイントロンサイズの比較

塩基配列解析の結果、推定されるアミノ酸配列の長さは、ナカハラツツジが595であったのを除き、いずれも600アミノ酸残基であった。また、いずれの系統でもCCD4の活性に関与する4つのヒスチジン、グルタミンおよびアスパラギンを配列内に保有していた。アミノ酸レベルでの相同性は、レンゲツツジ亜属とツツジ亜属間で95~96%、ツツジ亜属内の種間では97~100%と高かった。また系統樹を作成したところ、レンゲツツジ亜属とツツジ亜属間で分岐したが、ツツジ亜属内の亜節間での明瞭な分岐はみられなかった(第4図)。次に、イントロンサイズを調査したところ、第1、第2イントロンともに種間での変異がみられた(第1表)。第1イント

ロンのサイズは、レンゲツツジ亜属のキレンゲツツジおよびエクスパリーアザレア‘ホームブッシュ’のサイズが2236bpで、ツツジ亜属の種は1885~2033bpとレンゲツツジ亜属の種に比べ小さかった。第2イントロンではレンゲツツジ亜属内でもサイズが異なり、CCD4遺伝子の相対的発現量が低いキレンゲツツジの1763bpに比べ、発現量の高い‘ホームブッシュ’のサイズが小さかった。ツツジ亜属の第2イントロンのサイズは、いずれもキレンゲツツジに比べ小さかった。また、ツツジ亜属内ではCCD4遺伝子の相対的発現量と第2イントロンサイズとの関連性はみられなかった。以上のことから、キレンゲツツジのCCD4遺伝子の低発現には第2イントロンのサイズの関与が考えられたが、ツツジ亜属種間におけるCCD4遺伝子発現量の差には、他の要因が関与していると思われる。



第4図 ツツジ属における最大節約法を用いた CCD4 遺伝子のアミノ酸配列による系統樹

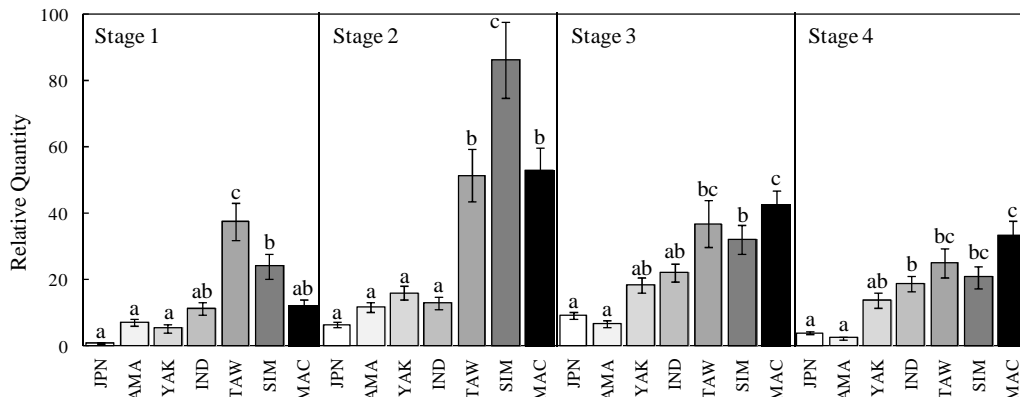
第1表 ツツジ各系統における CCD4 遺伝子ゲノムのイントロンサイズ

種	相対的 <sup>2</sup> 発現量	第1イントロン (bp)	第2イントロン (bp)
レンゲツツジ亜属			
キレンゲツツジ	1.00	2236	1763
‘ホームブッシュ’	6.46	2236	946, 861
ツツジ亜属			
ケラマツツジ亜節			
ケラマツツジ列			
ケラマツツジ	8.10	1885	933
キンモウツツジ	5.61	1942	946
ヤクシマヤマツツジ	3.00	1885	946
サキシマツツジ	2.04	2033, 1885	933
キシマツツジ	6.09	1942, 1885	1315
チョウセンヤマツツジ	2.31	2148	816
サツキ亜節			
サツキ列			
サツキ	2.63	1885	946
マルバサツキ1	11.21	1942	933
マルバサツキ2	9.80	1885	946
センカクツツジ	14.78	1942	946
ナカハラツツジ	5.88	1885	946
ヤマツツジ列			
タイワンヤマツツジ	20.47	1942	946
オオヤマツツジ1	9.79	1942	946
オオヤマツツジ2	4.19	1942	946
オオヤマツツジ3	8.19	1942	1232
ヤマツツジ1	13.16	1885	946
ヤマツツジ2	6.27	1942	1232, 946
ヤマツツジ3	8.17	1885	946
サタツツジ1	13.86	2033	946
サタツツジ2	11.03	1942	946
サタツツジ3	8.29	1885	933
オオシマツツジ	11.14	1942	1232, 946
フジツツジ1	16.31	1885	1232, 946
フジツツジ2	5.62	1885	1232, 946
サツキ1	6.60	1885	933
サツキ2	8.49	1885	946

<sup>2</sup>リアルタイムPCRによる CCD4 遺伝子の相対的発現量。

(4) 数種の常緑性ツツジの花弁発育に伴う CCD4 遺伝子の発現量の変化

花弁発育に伴う CCD4 遺伝子の発現量のパターンは種により異なった (第5図)。サキシマツツジ(AMA)、センカクツツジ(TAW)、タイワンヤマツツジ(SIM)およびオオシマツツジ(MAC)では、開花前日から当日にかけて発現量が増加し、その後、減少した。残りの3種では、開花前日から2日後にかけて発現量が増加し、その後、減少した。キレンゲツツジ(JPN)の発現量と比較すると、センカクツツジ(TAW)およびタイワンヤマツツジ(SIM)の発現量は全発育期間を通して有意に高く、また、オオシマツツジ(MAC)の発現量は開花当日以降、サツキ(IND)の発現量は開花2日後以降に有意に高かった。一方、サキシマツツジ(AMA)およびヤクシマヤマツツジ(YAK)の2種では、全発育期間を通してキレンゲツツジの発現量と有意差はみられなかった。特に、サキシマツツジ(AMA)の発現量は、開花当日以降で調査した常緑性ツツジの中で最も低く、また、開花2日後以降では、キレンゲツツジ(JPN)より発現量が低かった。以上の結果より、ケラマツツジ亜節のサキシマツツジおよびヤクシマヤマツツジの2種は、全花弁発育期間を通して CCD4 遺伝子の発現量が低いことが明らかとなった。特に、サキシマツツジは常緑性ツツジの中で CCD4 遺伝子の発現量が最も低いことから、常緑性黄色花ツツジ作出のための交配親として最も有望であると考えられた。



第5図 花弁発育に伴う CCD4 発現量の変化。図中の同じアルファベットはチューキー法のより5%水準で有意差がないことを示す。図中の bar は、標準誤差を表す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

嬉野健次、常緑性ツツジと落葉性キレンゲツツジとの亜属間交配で得られた実生の黄色花弁退色化要因の解明(第9報)数種の常緑性ツツジの花弁発育に伴う CCD4 遺伝子の発現量の変化、園芸学会、2019

嬉野健次、常緑性ツツジと落葉性キレンゲツツジとの亜属間交配で得られた実生の黄色花弁退色化要因の解明(第8報)ツツジ亜属内の CCD4 遺伝子の相同性およびイントロンサイズの比較、園芸学会、2018

嬉野健次、常緑性ツツジと落葉性キレンゲツツジとの亜属間交配で得られた実生の黄色花弁退色化要因の解明(第7報)常緑性ツツジとキレンゲツツジ間の CCD4 遺伝子ゲノム構造の比較、園芸学会、2018

嬉野健次、常緑性ツツジと落葉性キレンゲツツジとの亜属間交配で得られた実生の黄色花弁退色化要因の解明(第6報)常緑性ツツジ種花弁内における CCD4 遺伝子の発現量の比較、園芸学会、2017

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：宮島 郁夫

ローマ字氏名：MIYAJIMA, Ikuo

所属研究機関名：九州大学

部局名：熱帯農学研究センター

職名：准教授

研究者番号(8桁): 20182024

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。