

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03765

研究課題名（和文）アブラナ科花きの分子基盤の構築

研究課題名（英文）Molecular mechanism of important traits in Brassicaceae floricultural plant

研究代表者

中塚 貴司（Nakatsuka, Takashi）

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：60435576

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,200,000円

研究成果の概要（和文）：ストックは日本で冬から春にかけて咲く重要な花卉品目の一つである。本研究では、ストック花卉のトランスクリプトーム解析を行い、花色に関わるアントシアニン合成酵素および制御遺伝子の特定を行った。さらに花色の濃淡に関わるbHLH1、白花に関わるansやbhlh2変異を特定した。遺伝子の機能解析のために、ウイルスベクターを用いた過剰発現やジーンサイレンシングシステム、ステーブル形質転換体作出法の開発にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストックは冬季に栽培しやすい品目であり、その品種開発については日本がトップレベルである。これまでストックの品種開発は交雑育種によって行われてきた。主要な作物や野菜では遺伝子やゲノム情報が育種に活用されている。新たな形質を持ったストック品種の作出のためには遺伝子やゲノム情報の整備が必要不可欠であった。本研究によりストック遺伝子情報や機能解析ツールが整備され、今後ストック育種が促進されることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Garden stock (*Matthiola incana*) is one of the most popular floricultural plants in winter season. We performed RNA-seq analysis using the petals of Vintage Lavender, and were successful to identify the anthocyanin biosynthetic structural and regulator genes. In addition, we revealed that the levels of bHLH2 transcripts were correlated well with those of anthocyanin accumulation, and that the deficiencies of either ans or bhlh1 were responsible for white flower coloration. TuMV vector is good tool to analysis gene function in stock. Moreover, we were also successful to produce stable transgenic stock plants.

研究分野：花卉園芸

キーワード：ストック アントシアニン RNA-seq 遺伝子変異 ゲノム解析 ウイルスベクター 形質転換

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ストック (*Matthiola incana*, アブラナ科) は、冬から春を代表する花であり、特に冬季に生産・出荷できる品目が限られるため、とても重宝される。多彩な花色 (白、ピンク、赤、紫) と芳香が好まれ、人気のある花の一つである。現在流通している大部分のストック品種が個人育種家によって育成されている。ストックでは、ボリュームがある八重咲きに商品価値があるが、八重咲き個体は雄しべ雌しべの花弁化により、種子を得ることができない。そこで、ヘテロ個体の自殖後代から、実生や種子の段階で八重咲き株だけを選抜する八重鑑別が行われる。八重鑑別は、八重咲き/一重咲き形質と連鎖している花色/種子色、葉色、葉の鋸歯などの形質を表現型マーカーして選抜する技術である。ストックのこれらの形質については、古くから遺伝研究が行われ (Saunders 1915, 1928; Philp and Huskins 1931; Waddington 1929; Johnson 1952)、品種育成に利用されている (藤田 1994)。生産者が八重鑑別を可能とするために、八重咲きとこれらの形態的形質が連鎖した育種母本が積極的に利用され、その結果ストックの育種資源の幅を限定させる要因となっている。ストックの形質に関する研究は、花色素 (立澤ら 2012, 2014)、アントシアニン生合成に關する酵素特性 (Heller et al. 1985)、花色の遺伝子解析 (Nicola et al. 2003)、花成 (Hisamatsu et al. 2000) に関する研究が単発的に存在するだけである。ストックの花色/種子色、葉色や鋸歯形成は、園芸学的に価値のある形質にかかわらず、その原因遺伝子は明らかになっていない。本研究では、ストック研究の分子基盤を確立し、ストックの八重咲きや花色、葉色、鋸歯の原因遺伝子の同定を行い、ストック育種への利用、遺伝子資源の花卉園芸作物への展開を行う。

### 2. 研究の目的

花卉園芸植物のストックでは、花色、葉の鋸歯、葉色の遺伝様式が古くから知られている。これら全ての形質が一重/八重咲き形質と強く連鎖しているが、その実体は明らかになっていない。本研究の目的は、八重咲きの原因遺伝子の解明とストックの分子基盤を構築することである。そして、構築した分子基盤を用いて花色、鋸歯、葉色などの重要形質の原因遺伝子の同定を行う。

本研究により得られる成果は、ストック品種の多様性を生み出す育種に繋がる。また、これらの花に関する形質は花卉園芸にとって重要な形質であり、原因遺伝子の解明は多くの花卉作物の実用的な観賞価値の向上に結びつくことが期待できる。

### 3. 研究の方法

#### 1) 花色関連遺伝子の特定

ストック鉢物品種 'ピンテージラベンダー' の花弁から total RNA を抽出し、RNA-seq 解析をユーロフィンに委託した。得られたシーケンス情報は、DDBJ 次世代シーケンスデータの解析プラットフォーム maser 上で trinity を用いて *de novo* アセンブリした。Stand alone BLAST とアラビドプシス TAIR10 を用いて、得られた contig のアノテーションを行った。

#### 2) 遺伝子発現解析

各品種の花弁と葉、茎、花芽、葯をサンプリングし、RNAiso (タカラバイオ) を用いて total RNA を抽出し、逆転写反応を行った。リアルタイム PCR 装置を用いて、相対的遺伝子発現量を測定した。

#### 3) タンパク質相互作用解析

アントシアニン生合成転写調節遺伝子の ORF は、pGAD-T7 と pGBK-T7 にクローニングし、酵母 AH109 に形質転換した。-Leu-Trp または -Leu-Trp-His-Ade 培地上で生育させ、相互作用の有無を調査した。

#### 4) 一重咲きおよび八重咲きを識別できる DNA マーカーの開発

ピグミーホワイトの一重咲き個体と八重咲き個体からゲノム DNA を抽出し、GRAS-Di 法をユーロフィンに委託し、解析した。

#### 5) ドラフトゲノム配列の決定

ピグミーホワイト一重咲き個体からゲノム DNA を抽出した。先端ゲノム支援 (2019-2020 年度) で illumina Novaseq5000 (150bp PE) と nanopore を用いてシーケンスを獲得し、ゲノムのアセンブリを実施してもらった。

#### 6) ウイルスベクターによる一過的遺伝子発現系の開発

カブモザイクウイルス (TuMV) ベクターは、スペイン IBMCP の José-Antonio Daròs 博士から分与してもらった。pGTuMV:GFP にストック遺伝子の ORF を挿入し、*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 に形質転換した。ベンサミアナタバコに Agroinfiltration し、接種 1 週間後に接種葉と上位葉を回収した。ベンサミアナタバコ葉は摩砕後、ストック品種キスミーバイオレッドの 1.5 か月実生の本葉にカーボランダム接種を行った。開花するまで栽培し、形態観察を行った。

#### 7) ステابل形質転換体の作出方法の開発

品種キスミーラベンダーの無菌 1 か月実生の本葉を約 5 × 5mm に切り取り、12.5 μM FPX と 100 μM AS を添加した MS 培地で 3 日間培養した。前培養した葉片は、*Agrobacterium* 感染液に 5 分間浸漬し、その後 5 日間、共存培養を行った。30 ppm ハイグロマイシン、10 ppm メロペン、12.5 μM

FPX を添加した MS 培地で選抜を行った。形成されたカルスは、同様の培地に継代し、その後選抜と再分化を行った。

#### 4. 研究成果

##### 1) ストックのアントシアニン生合成に関する遺伝子の特定

ストック‘ピンテージラベンダー’花弁を用いた RNA-seq 解析により、9 個のアントシアニン生合成酵素遺伝子と 4 個のアントシアニン生合成転写調節因子遺伝子を単離した。遺伝子発現解析の結果、フラバノン 3 水酸化酵素 (F3H) 以降のアントシアニン生合成酵素遺伝子は花弁発達にともない発現量が増加し、アントシアニンの蓄積様式とも一致していた。*MiMYB1* と *MibHLH2* の 2 つの転写調節因子遺伝子の発現は、これらのアントシアニン生合成酵素遺伝子の発現と相関していた (図 1)。酵母 2 ハイブリッドは、*MiMYB1* は *MibHLH1*、*MibHLH2*、*MiWDR1* とタンパク質相互作用を示した。このことから、ストック花弁におけるアントシアニン生合成は、*MiMYB1*-*MibHLH2*-*MiWDR1* の複合体が制御していると考えられた。一方、*MibHLH1* は‘ピンテージラベンダー’の花弁ではほとんど発現していなかった。しかし、アントシアニン蓄積量の多い‘ピンテージバーガンディ’、‘ピンテージレッド’、‘ピンテージローズ’、‘ピンテージカップパー’では *MibHLH1* の発現量が著しく高かった (図 2)。このことから、*MibHLH1* は、*MiMYB1*-*MibHLH2*-*MiWDR1* の活性を促進するエンハンサーとして働き、アントシアニンの量を制御していると考えられた。

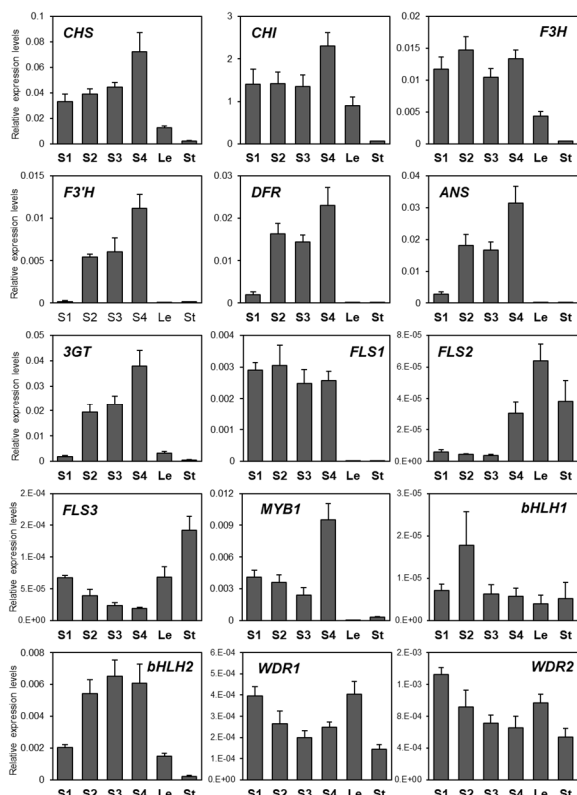


図 1 アントシアニン生合成関連遺伝子の発現様式

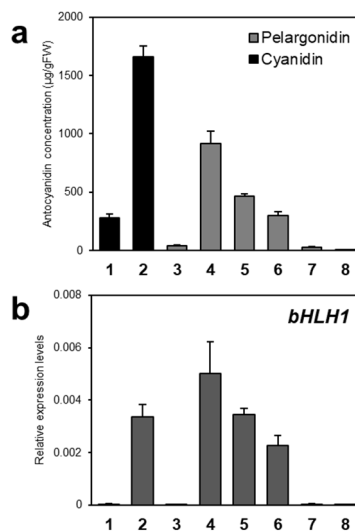


図 2 アントシアニン蓄積量(a)と *bHLH1* の発現量 (b)

1:ピンテージラベンダー、2:バーガンディ、3:ライラック、4:レッド 5:ローズ 6:カップパー、7:ピーチ、8:イエロー

##### 2) ストックの白花品種の原因遺伝子の同定

ストックの白花品種のうち、‘キスミーホワイト’と‘ピグミーホワイト’は、多くのアントシアニン生合成酵素遺伝子の発現が有色品種より有意に抑制されていた。一方、*MibHLH2* の発現量は、有色品種より 2 倍以上高かった。一方、‘ピンテージホワイト’、‘アイアンホワイト’、‘ホワイトワンダー2号’、‘カルテットホワイト’では、アントシアニン生合成酵素 (*ANS*) 遺伝子の発現が抑制されていた。*MibHLH2* のゲノム配列を調査したところ、‘キスミーホワイト’と‘ピグミーホワイト’ではトランスポゾンが挿入されていた (図 3)。また、全ての白花品種の *ANS* 遺伝子は、第 1 エキソンに 1 塩基欠損が存在し、ナンセンス変異が誘発されていた (図 3)。このことから、ストックの白花品

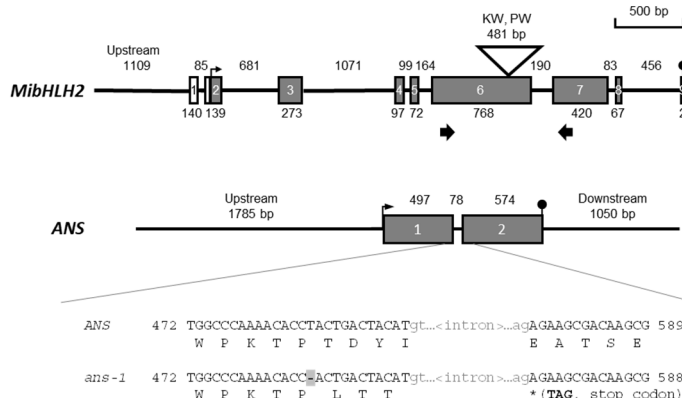


図 3 白花品種における *ans* と *bhlh2* の変異

種は、*ANS* 変異と *MibHLH2* 変異が関与していることが明らかになった。さらに、これらの変異を識別できる DNA マーカーの開発にも成功した。

### 3) ウイルスベクターを用いた遺伝子機能解析法の開発

ストックから単離した遺伝子の機能を行うために、ウイルスベクターの開発を行った。TRV や ALSV などの汎用性の高いウイルスベクターは、ストックに感染させることはできなかった。そこで、ストックの主要病害であるカブモザイクウイルス (TuMV) のウイルスベクターである pGTuMV-GFP を接種したところ、接種 3 日後から接種葉で GFP 蛍光が検出され、ウイルスの増殖が観察された。さらに 1 週間後には上位葉でも GFP 蛍光を観察した。次に、アントシアニン生合成調節因子遺伝子である *MiMYB1* を挿入した pGTuMV-MiMYB1 を接種したところ、接種 1 週間後の上位葉でアントシアニンの着色が検出された (図 4)。また、TuMV-MiMYB1 を接種した個体が開花したところ、アントシアニン生合成が抑制され、白色化した。このことから、TuMV ベクターを用いることで、葉においては外来遺伝子の一過的な発現を誘導できるとともに、花器官では遺伝子のサイレンシングに利用できることが明らかになった (図 4)。

#### ① 過剰発現システム



対照



*MiMYB1* 過剰発現

*MiMYB1* 遺伝子の過剰発現により異所的なアントシアニン蓄積が誘導 (矢印)

#### ② 遺伝子抑制システム



対照



*MiMYB1* silencing

ウイルスベクターによる内生 *MiMYB1* 遺伝子のサイレンシングで花色が白色化 (矢印)

図 4 TuMV ベクターによる遺伝子機能解析の一例

### 4) 形質転換体の作出法の確立

ストックは安定した形質転換体を作成する技術が存在していなかった。*Agrobacterium* の系統を比較したところ、GV3101 が効率的に感染し、5 日間の共存培養で最大となることが明らかになった。形質転換体の選抜には、10 ppm ハイグロマイシンが最適であった。この条件で、1 ppm ベンジルアデニン (BA) を添加した再分化培地を用いて接種と選抜を行ったが、形質転換カルスの獲得には至らなかった。BA 添加では葉片を置床してから 1 か月後まで反応がなかったことが問題と考えた。そこで、新規カルス誘導剤である FPX を 12.5 $\mu$ M 添加した培地に葉片を置床したところ、2 週間後にはカルス形成が観察された。このカルス誘導培地を用いて *Agrobacterium* 接種、ハイグロマイシン選抜を行ったところ、形質転換カルスを獲得した。カルスは、1 ppm BA を添加した培地に移植し、シュートを誘導した。このシュートには、GUS 遺伝子の導入を示す青い染色が観察され、ストックの形質転換に成功した。

### 5) ドラフトゲノムの決定

先端ゲノム支援において、'ピグミーホワイト' 一重咲き個体の次世代シーケンス解析を実施した。Novaseq5000 でストックゲノムサイズ (推定 1.97Gb) の 166 倍、Oxford nanopore で 87 倍の塩基配列を獲得し、ゲノムアセンブリを実施した。その結果、1.9 Gbp で 989 Scaffold、平均 1.9 Mbp、 $N_{50}$  3.8 Mbp でゲノム配列を獲得することができた。

GRAS-Di による一重咲きマーカーに基づいてゲノムをスクリーニングした結果、*AGAMOUS* 遺伝子に連鎖していると推定される 4 つの scaffolds を選抜することができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nuraini L, Ando Y, Kawai K, Tatsuzawa F, Tanaka K, Ochiai M, Suzuki K, Aragonés V, Daros JA, and Nakatsuka T.	4. 巻 251
2. 論文標題 Anthocyanin regulatory and structural genes associated with violet flower color of <i>Matthiola incana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-020-03351-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakatsuka T, Suzuki T, Harada K, Kobayashi Y, Dohra H, Ohno H.	4. 巻 287
2. 論文標題 Floral organ- and temperature-dependent regulation of anthocyanin biosynthesis in <i>Cymbidium</i> hybrid flowers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 110173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plantsci.2019.110173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ban Yusuke, Morita Yasumasa, Ogawa Mika, Higashi Katsumi, Nakatsuka Takashi, Nishihara Masahiro, Nakayama Masayoshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Inhibition of post-transcriptional gene silencing of chalcone synthase genes in <i>petunia</i> petals by fluacrypyrim	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 1513 ~ 1523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erz009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakatsuka T, Koishi K	4. 巻 268
2. 論文標題 Molecular characterization of a double-flower mutation in <i>Matthiola incana</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 39 ~ 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plantsci.2017.12.009	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 -

1. 著者名 Nuraini L, Tatsuzawa F, Ochiai M, Suzuki K, Nakatsuka T	4. 巻 90
2. 論文標題 Two Independent Spontaneous Mutations Related to Anthocyanin-less Flower Coloration in <i>Matthiola incana</i> Cultivars	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 85 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2503/hortj.UTD-212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中塚貴司・Latifa Nuraini・安藤有季子
2. 発表標題 ストック花色に関わるアントシアニン生合成遺伝子の特定.
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤有季子・河合健太郎・田中琴巳・Aragones Veronica・Daros Jose-Antonio・中塚 貴司
2. 発表標題 ストックにおけるカブモザイクウイルスベクターによる一過的遺伝子発現
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Latifa Nuraini, Yukiko Ando, Kentaro Kawai, Veronica Aragones, Jose-Antonio Daros and Takashi Nakatsuka
2. 発表標題 Identification of anthocyanin biosynthetic regulatory genes in <i>Matthiola incana</i>
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河合健太郎・中塚貴司
2. 発表標題 ストックにおける形質転換法の検討
3. 学会等名 園芸学会平成29年度春季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中塚貴司
2. 発表標題 ストック品種の白花化に関連した変異遺伝子の特定
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡大学農学部生物資源科学科花卉園芸学研究室 <a href="https://sites.google.com/site/shizuokaflower/home">https://sites.google.com/site/shizuokaflower/home</a>
---

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
---------	---------