

令和元年6月4日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07141

研究課題名(和文)常緑性ツツジにおける花冠の着色および枝変わりによる花模様形成の機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism about flower coloration and flower pattern formation by bud sport in evergreen azalea

研究代表者

水田 大輝(MIZUTA, Daiki)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：30595096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：まず、常緑性ツツジの花色多様化に関わるデルフィニジン系色素合成のF3'5'H遺伝子について調査した。その結果、F3'5'H遺伝子の上流域では、デルフィニジン系色素を有するミヤマキリシマとデルフィニジン系色素を有さないヤマツツジでは、いくつかの配列が異なることを明らかにした。また、赤や白、絞り咲き等の咲き分けをするサツキ品種'松浪'の花冠を用いて次世代シーケンサーによる網羅的な発現遺伝子の解析を行った。その結果、'松浪'の赤色花冠より、フラボノイド色素合成に関連する12の構造遺伝子とMYBやbHLH等の転写調節因子の配列情報を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では野生種が数多く自生し、古典園芸植物の一つであるツツジは、野生種からの選抜や交雑を通して江戸時代より様々な園芸品種が作出されてきた。現在では、花色や模様が多岐にわたっており、また、同一株から白色花や赤色花、絞り咲き、覆輪など複数の表現型を引き起こす品種も存在するが、これらの要因は謎に包まれている。本研究では、花色の多様化や枝変わりの要因を解明する糸口となる遺伝子等の配列情報を獲得することができた。

研究成果の概要(英文)：At first, we analyzed the flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) gene which synthesizes delphinidin series pigments related to flower color diversification in evergreen azalea. It was clarified that some sequences of upstream region of F3'5'H gene differed between *R. kiusianum* with delphinidin series pigments and *R. kaempferi* with no delphinidin series pigments. *R. indicum* 'Matsunami' which produces red, white and variegated flowers in a stock were subsequently performed comprehensive analysis of expression genes by next-generation sequencing. From this results, sequence information of twelve flavonoid biosynthetic genes and some transcriptional regulatory factors such as MYB and bHLH were obtained from red corolla of 'Matsunami'.

研究分野：花卉園芸学

キーワード：花色 ツツジ 遺伝子

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

1. 研究開始当初の背景

世界の中でも野生ツツジの種類が多い日本では、古くから人々の身近にあり親しまれた花木であったため、野生種からの選抜や種間交雑をもとにして江戸時代より江戸キリシマ、サツキ、リュウキュウツツジ、ヒラドツツジ、クルマツツジなど様々な園芸品種群が作出されてきた。このように発展したツツジの園芸的な栽培により、現在では花色や模様が多様化した園芸品種が数多く存在している。例えば、白、赤、ピンク、紅紫色の花色に加え、絞り咲き、覆輪、底白、玉斑などの模様が組み合わさり、それぞれが園芸品種として成立している。さらに、一つの株から白色花や赤色花、大小の絞り花、覆輪など多彩な花を咲かせる枝変わりを頻繁に引き起こす鑑賞価値の高い品種が存在する。

常緑性ツツジの花色は、大きく分けるとフラボノイドの一つであるアントシアニン（赤色のシアニジン系色素と青色のデルフィニジン系色素）やフラボノール（無色または薄いクリーム色の花色）と呼ばれる色素によって着色しており（図1）特に、デルフィニジン系色素およびフラボノール色素の有無が花色の幅を広げている

ことが報告されている(Mizuta ら, 2009)。一方、色素合成に関わる遺伝子情報に関しては、Nakatsuka ら (2008) が、常緑性ツツジのオオキリシマ '大紫' を用いてフラボノイド合成関連遺伝子の部分塩基配列を 8 種単離し、花冠の発育ステージ別におけるこれら遺伝子の発現傾向を調査した報告がある。また、我々は、九州の霧島山系に自生するミヤマキリシマ (*R. kiusianum*)、ヤマツツジ (*R. kaempferi*) およびこれらの雑種を用いて色素構成と遺伝子の発現を比較し、デルフィニジン系色素を有する個体では必ずフラボノイド 3', 5' 水酸化酵素 (F3' 5' H) 遺伝子が発現していることを明らかにしている (Mizuta ら, 2014)。一方、ツツジの枝変わりによる花色変異に関する報告は限られており、園芸品種における花色変異の規則性 (Kobayashi・Shimano, 1998) やフラボノール色素の含量が変化したアザレア 'レッドウィング' の突然変異 (Asen ら, 1971)、デルフィニジン系色素が合成されず F3' 5' H 遺伝子の発現が大幅に減少していた '大紫' の赤花変異体 (Mizuta ら, 2010) が報告されている。しかし、これらは表現型の調査や含まれる色素成分の変化、遺伝子の発現量の変化が明らかになっただけで、直接的な枝変わりの原因解明には至っていない。また、常緑性ツツジは、多岐にわたる花色・模様を有しているにもかかわらず、その根本的な分子メカニズムは謎に包まれたままである。

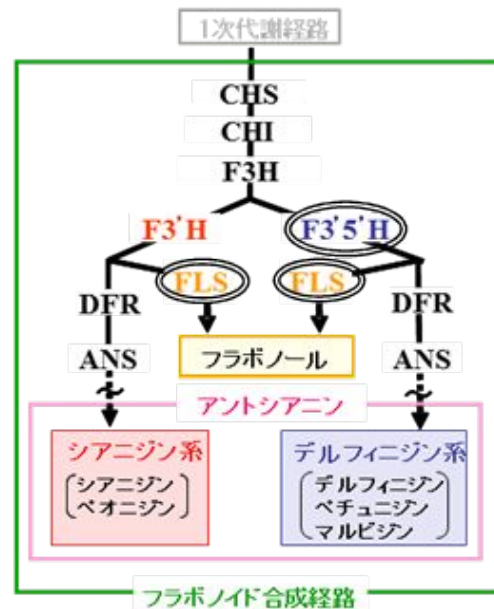


図1. ツツジにおけるフラボノイド色素合成経路の概略図

2. 研究の目的

本研究では、ツツジの有色花において花色の多様化に関わるデルフィニジン系色素合成の F3' 5' H 遺伝子についてその構造およびプロモーターを含む上流域の配列と花色・色素構成との関係の調査を行うこと、また、枝変わりを引き起こす園芸品種を用いて、その株内で発生する白色花、有色花、絞り咲きなど各花色・模様の要因を遺伝子レベルで調査することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 霧島山系産ミヤマキリシマ (K-1180-10、T-1120-5)、ヤマツツジ (Ki-440-3、Ki-520-8) およびこれらの自然雑種 (T800-13、T800-15) を、また、比較対象として F3' 5' H 遺伝子の cDNA 配列が単離されているオオキリシマ '大紫' の計 7 個体を供試した (下線は、先行研究で F3' 5' H 遺伝子の発現が見られた個体)。各植物材料の葉 5 mg から DNA を抽出し、イントロンを含む F3' 5' H 遺伝子の特異的プライマーで PCR 増幅し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を調査した。

(2) (1) で用いた植物材料のうち紅紫色のミヤマキリシマ K-1180-10 と赤色系のヤマツツジ ki-440-3 を用いて、F3' 5' H 遺伝子のプロモーターを含む上流域を Genome Walking 法によ

て獲得後、ダイレクシーケンスで配列を決定し、デルフィニジン系色素合成の有無と塩基配列の関係を調査した。

(3)(2)で明らかにしたミヤマキリシマ K-1180-10 とヤマツツジ Ki-440-3 の F3'5'H 遺伝子の上流域の配列の差異を用いて各配列に特異的なプライマーを作成し、デルフィニジン系色素合成の有無を識別する DNA マーカー (Multiplex PCR によるマーカー) の開発を試みた。

(4)一つの株で赤花や白花、絞り咲き等の咲き分けをするサツキ '松波' (図2)の花弁から全 RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて発現遺伝子の網羅的解析を行うことにより、常緑性ツツジ花冠における色素合成関連遺伝子の配列情報を収集した。



図2. サツキ '松波' の開花時の様子

4. 研究成果

(1)ツツジ7個体の F3'5'H 遺伝子の DNA 塩基配列は2つのエキソン (約0.9および0.65 kb) と1つのイントロンを持ち、エキソン部分については '大紫' の

F3'5'H 遺伝子 cDNA 配列と99%の高い相同性を示した。今回用いたツツジ7個体のうち、F3'5'H の遺伝子発現がないヤマツツジ Ki-440-3 や自然雑種個体においても、ゲノム上で F3'5'H 遺伝子配列を有することが明らかになった。なお、7個体の F3'5'H 遺伝子の配列を比較すると、一部、個体間で塩基置換が見られたが、配列の差異と F3'5'H 遺伝子の発現の有無やデルフィニジン系色素の有無に明確な相関は見られなかった。

また、ヤマツツジおよびミヤマキリシマにおける F3'5'H 遺伝子のイントロンを挟んだ PCR を行ったところ、(デルフィニジン系色素を有さず)シアニジン系色素のみを有する個体では3 kb に1本のバンドが、シアニジンおよびデルフィニジン系色素の両方を有する個体では、3 kb と4 kb の計2本のバンドが得られた。約4 kb のバンドはデルフィニジン系色素を有する個体でのみ確認され、これは活性を有する F3'5'H 遺伝子の対立遺伝子である可能性が考えられた。

(2) F3'5'H 遺伝子の上流域の解析では、ミヤマキリシマ K-1180-10 およびヤマツツジ Ki-440-3 を用いた Genome Walking 法により、ミヤマキリシマ K-1180-10 では合計約1.4 kb、ヤマツツジ Ki-440-3 では約2.4 kb の上流配列を獲得した。両サンプルを比較したところ、翻訳開始点から上流約800 bp は複数の塩基配列の置換、挿入または欠損がみられたものの、既知のアントシアニン合成関連の MYB のシスエレメント、TATA box および転写開始点は保存されていた。一方、そこからさらに上流では両サンプルで全く異なる配列になっていたが、ミヤマキリシマ K-1180-10 およびヤマツツジ Ki-440-3 それぞれの配列で複数の MYB のシスエレメントが確認された。デルフィニジン系色素合成の有無の原因は、F3'5'H 遺伝子上流域における配列の差異によると推測され、その中に未知の転写調節因子の結合領域が存在している可能性が考えられたことから、今後、各配列の持つ機能の確認が必要である。

(3) ミヤマキリシマ K-1180-10 およびヤマツツジ Ki-440-3 の F3'5'H 遺伝子上流配列をもとに設計した特異的プライマーの PCR では、ミヤマキリシマ特異的プライマーの場合、ヤマツツジでは増幅産物が何も得られず、ミヤマキリシマ K-1180-10 のみで約1.3 kb のバンドが確認された。一方、ヤマツツジ特異的プライマーではヤマツツジ Ki-440-3 だけでなくミヤマキリシマ K-1180-10 においても約0.6 kb のバンドが確認された。

また、ミヤマキリシマおよびヤマツツジの F3'5'H 遺伝子上流域における特異的プライマーを3つ以上用いた Multiplex PCR では、ミヤマキリシマとヤマツツジのデルフィニジン系色素の有無を識別することができたため、今後、様々な野生種や園芸品種でも花色識別のマーカーとして利用できるか検討していく予定である。

(4) 花冠着色に関わる一通りの遺伝子情報を獲得するため、一株の中に赤色花や白色花、絞り咲き等の咲き分けをするサツキ品種 '松波' の花冠を用いて次世代シーケンサーによる網羅的な発現遺伝子の解析を行った。その結果、'松波' の赤色花冠より、CHS や DFR、ANS などフラボノイド色素合成に関連する12の構造遺伝子の配列情報が得られた。また、これら構造遺伝子の発現を調節する MYB や bHLH、WD40 の転写調節因子の配列情報も得ることができた。今回、得られたこれらの遺伝子は部分塩基配列であるため、今後、RACE 法による各遺伝子の全鎖長配列の獲得、および咲き分け品種の白色や赤色、絞り咲きなど各花における色素合成関連遺伝子の DNA 構造や発現解析を進めていく。

< 引用文献 >

- Asen, S., R. N. Stewart and K. H. Norris. 1971. Co-pigmentation effect of quercetin glycosides on absorption characteristics of cyanidin glycosides and color of red wing azalea. *Phytochemistry* 10: 171-175.
- Kobayashi, N. and Y. Shimano. 1998. A pattern of flower color sport in azalea cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67 (Suppl. 1): 232.
- Mizuta, D., T. Ban, I. Miyajima, A. Nakatsuka and N. Kobayashi. 2009. Comparison of flower color with anthocyanin composition patterns in evergreen azalea. *Sci. Hortic.* 122: 594-602.
- Mizuta D., A. Nakatsuka, I. Miyajima, T. Ban, and N. Kobayashi. 2010. Pigment composition patterns and expression analysis of flavonoid biosynthesis genes in the petals of evergreen azalea 'Oomurasaki' and its red flower sport. *Plant Breeding*, 129(5): 558-562.
- Mizuta D., A. Nakatsuka, T. Ban, I. Miyajima and N. Kobayashi. 2014. Pigment Composition Patterns and Expression of Anthocyanin Biosynthesis Genes in *Rhododendron kiusianum*, *R. kaempferi* and their Natural Hybrids on Kirishima Mountain Mass, Japan. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 83(2): 156-162.
- Nakatsuka A., D. Mizuta, Y. Kii, I. Miyajima and N. Kobayashi. 2008. Isolation and expression analysis of flavonoid biosynthesis genes in evergreen azalea. *Sci. Hortic.* 118: 314-320.

5 . 主な発表論文等

〔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:

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

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~agb/laboratory/hanano/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：