

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15225

研究課題名(和文) 花弁細胞層におけるアントシアニン蓄積の能否を決定する遺伝子の特定

研究課題名(英文) Identification of genes determining the ability of anthocyanin accumulation in each cell layer of petals

研究代表者

出口 亜由美 (Deguchi, Ayumi)

千葉大学・大学院園芸学研究科・特任助教

研究者番号：20780563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：一般的に花弁の内層にはアントシアニンが蓄積しないが、蓄積させることができれば花色の改変方法の一つとなる。本研究では、花弁背軸面表層にも蓄積がみられないカーネーション品種を用いて、花弁の各細胞層においてアントシアニン蓄積の能否を決定する遺伝子の特定を試みた。同品種は花弁に白縁模様も有し、この白色周縁部と有色中心部でのRNA-seqの結果、アントシアニン蓄積と発現傾向が一致する6つの遺伝子を見つけた。これらの遺伝子に関して、レーザーマイクロダイセクション法で獲得した花弁三細胞層サンプルで発現を比較し、細胞層でのアントシアニン蓄積を制御すると考えられる遺伝子として新規のbHLH転写因子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出したアントシアニンの蓄積制御遺伝子を育種利用できれば、花弁内層にアントシアニンを蓄積させたり、白縁を形成させたりすることで、新規花色の作出が可能になると考えられる。また、花弁に限らず、多様な器官でアントシアニンを本来蓄積しない細胞層に蓄積させることができれば、高機能性作物の作出も期待できる。蓄積細胞層が限定されている物質はアントシアニン以外にも多数あることから、本研究はそのような物質と蓄積細胞層との関係を追及する研究の先駆けにもなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Anthocyanins which are reddish pigments accumulating in plants do not generally accumulate in parenchyma cells of petals. Accumulation of anthocyanins in parenchyma cells of petals might be one of the ways to alter flower colors. The purpose of this study was the identification of genes determining the ability of anthocyanin accumulation in each cell layer of petals. Some carnation cultivars whose petals did not accumulate anthocyanin not only in parenchyma cells but also abaxial epidermal cells of petals were used. These cultivars also had white margins in each petal. By the RNA-seq between the white margins and reddish central parts of petals, six genes whose expression tendencies were consistent with accumulation of anthocyanins were found. As a result of the expression analysis of these six genes in each cell layer of petals isolated with laser microdissection, it was suggested that a novel bHLH transcription factor regulated the accumulation of anthocyanins in each cell layer.

研究分野：花卉園芸学

キーワード：アントシアニン 細胞層 花色 カーネーション RNA-seq bHLH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

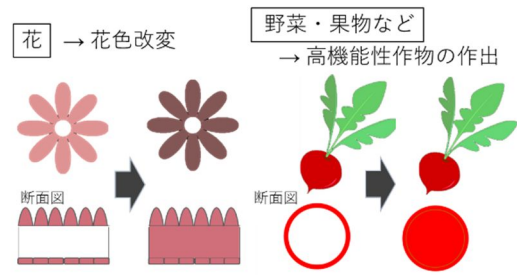
赤色素のアントシアニンが植物の花弁や果実、葉、根などに蓄積するが、それぞれの器官においてアントシアニンが蓄積する細胞層は限定されている。多くの場合、花弁、果実および根においては表層のみに、葉では内層のみに蓄積する。これらの器官において細胞層ごとにアントシアニン蓄積が異なる理由は明らかでなく、蓄積の有無を制御する因子は特定されていない。

研究代表者はダリア (*Dahlia variabilis*) の黒花形成の条件が「濃いアントシアニンの高蓄積」であることを明らかにしている (Deguchi et al., 2013)。吸光率の高いアントシアニンが多量に蓄積されることで花弁に当たる光の大部分が吸収され、黒く見えているものと考えられる。一般的に花弁内でアントシアニンが蓄積するのは向軸および背軸面の表皮細胞一層のみであるが、花弁内層にもアントシアニンが蓄積すれば、光の吸収量は増え、花色はより黒色に近づくと予想される。つまり、様々な植物種で黒花の育種が望まれる中で、「花弁内層にアントシアニンを蓄積させる」ことも黒花育種法の一つになる可能性が高い。また、花弁に限らず、多様な器官でアントシアニンを本来蓄積しない細胞層に蓄積させることができれば、高蓄積による高機能性作物の作出も期待できる (第1図)。

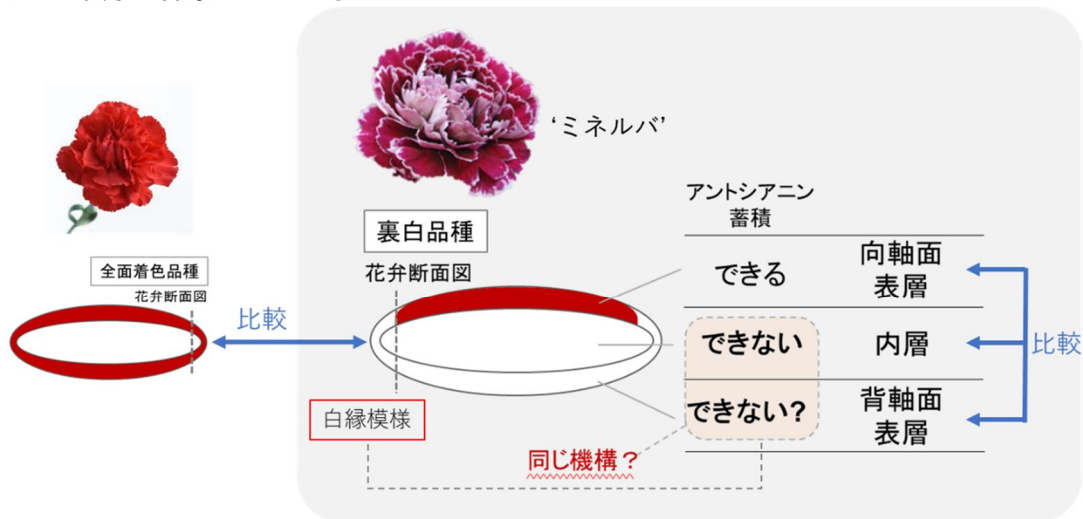
アントシアニン蓄積のできる/できないは細胞層の identity と結びつき制御されている可能性がある。このアントシアニン蓄積の『能否』を決定する因子を特定するには、植物器官を細胞層ごとに分離し、それぞれの状態、すなわち遺伝子発現を把握および比較解析する必要がある。

カーネーション (*Dianthus caryophyllus* L.) には第2図のような花弁背軸面および縁にアントシアニンが蓄積せず、向軸面表層のみが着色する品種が存在する。花弁の向軸面表層と背軸面表層は同じ L1 由来の細胞層であり同じ identity を

有すると考えられるが、この裏白カーネーションではアントシアニン蓄積の有無が異なる。表層と内層という元より由来の異なる細胞層における比較では、異なる形質が多数あるため、アントシアニン蓄積の有無と発現に相関のある遺伝子から制御遺伝子を特定することは困難である。しかし、裏白カーネーションでは向軸面表層 vs 内層+背軸面表層という比較が行えるため、アントシアニン蓄積を制御する遺伝子候補の絞り込みが容易になる (第2図)。さらに、裏白品種は必ず白縁模様も示し、背軸面表層と同様の制御がされていると予想されたことから、各細胞層よりもサンプリングが容易な花弁周縁部を用いて一般的な全面着色品種と比較することで、背軸面表層におけるアントシアニン蓄積を制御する遺伝子候補ならびに白縁模様形成に関与する遺伝子を探索できると考えた。



第1図 本研究の応用例



第2図 裏白カーネーションの写真および本研究でトランスクリプトームを比較する部分の概要

2. 研究の目的

本研究では、花色改変およびアントシアニン高含有作物の作出を応用に見据え、花弁の各細胞層におけるアントシアニン蓄積の『能否』を決定する遺伝子を特定し、アントシアニンの全層蓄積化法を考案することを目的とした。花弁裏の白いカーネーション品種を用いることで可能となる「花弁三細胞層でのトランスクリプトーム比較」をアプローチの主軸として、一般的な全面着色品種との比較解析も行いながら蓄積制御遺伝子の特定を試みた。また、同時に花弁の白縁形成機構に関して制御遺伝子の特定を目指した。

3. 研究の方法

(1)各花弁細胞層の単離およびトランスクリプトーム解析 (RNA-seq)

裏白カーネーション‘ミネルバ’の着色途中の花弁の凍結切片を川本法(川本, 2005)に従い作成した。レーザーマイクロダイセクション(Leica LMD7)を用いて花弁の向軸面表層, 背軸面表層および内層を単離, 回収した。回収したサンプルから RNeasy Micro Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出し, Ovation® RNA-Seq System V2 (NuGEN)を用いて増幅した。龍谷大学農学部永野研究室に委託し, 増幅された一本鎖 cDNA から KAPA Hyper Prep Kit (日本ジェネティクス)を用いてライブラリを作成し, HiSeq2500 を用いて RNA-seq を行った。

(2)花弁細胞層の形態および着色様相の観察

裏白品種および全面着色品種の花弁徒手切片を作成し, 各花弁細胞層における細胞の形態およびアントシアニン蓄積による着色の様相を顕微鏡で観察した。

(3)花弁周縁部の蓄積色素の解析

裏白品種‘ミネルバ’および‘ブラックジャック’, 全面着色品種‘アニー’, ‘スピネル’および‘ベルク’を供試した。展開花弁の周縁部(裏白品種では白色, 全面着色品種では赤色)および中心部(いずれも赤色)をカミソリで切り分けサンプリングした。それぞれ 50 mg から 5% 酢酸水を用いて色素を抽出し, HPLC で測定した。アントシアニンは 530 nm, その他のフラボノイド色素については 350 nm で検出した。

(4)‘ミネルバ’の花弁周縁部および中心部のトランスクリプトーム解析 (RNA-seq)

裏白品種‘ミネルバ’の着色途中の花弁から白色周縁部および赤色中心部をそれぞれサンプリングし, RNA を抽出した。株式会社マクロジェン・ジャパンに委託し, HiSeq2500 で RNA-seq を行った。

(5)花弁発達ステージ別の遺伝子発現解析および花弁周縁部と中心部での発現比較 (qPCR)

裏白品種および全面着色品種の花弁を発達ステージ別にサンプリングし, RNA を抽出した。(4)で配列が確認されたアントシアニン(フラボノイド)合成関連遺伝子に関して, その発現量をリアルタイム RT-PCR で調査した。また, (4)で用いたのと同ステージおよび完全着色の花弁から周縁部および中心部をサンプリングし, 同様に遺伝子発現量を調査した。

(6)‘ミネルバ’の各花弁細胞層における遺伝子発現比較 (qPCR)

(1)で調製した各花弁細胞層由来の cDNA を用いて, (5)と同様の遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR で調査した。

4. 研究成果

(1)各花弁細胞層の単離およびトランスクリプトーム解析 (RNA-seq)

レーザーマイクロダイセクション法による各花弁細胞層の回収, RNA 抽出およびライブラリ作成は順調に進んだものの, トランスクリプトーム解析の結果, カーネーションのリファレンス配列へのマッピング率は異様に低い値となった。微量サンプルに微生物等の混入が生じたことが原因と考えられ, 残念ながら RNA-seq により正確な比較結果を得ることはできなかった。しかし, ライブラリ作成に用いた cDNA を PCR に用い, *Actin* 等の複数の遺伝子の増幅が確認できたことから, これらの cDNA はリアルタイム RT-PCR には使用可能であることがわかった。そこで, 白縁模様形成に関する調査により, アントシアニン蓄積制御遺伝子候補を得た後に, これらの cDNA を用いて発現量解析を行うこととした。

(2)花弁細胞層の形態および着色様相の観察

裏白品種と全面着色品種において, 花弁三細胞層のそれぞれの細胞の配列や形状に差異はなかった。また, 裏白品種の背軸面表層ではアントシアニンによる赤色の着色は見られず, また, 向軸面表層の花弁端から 500~700 μm ほどでも着色は見られなかった(第3図)。以上より, 裏白品種の背軸面表層および花弁周縁部においてアントシアニンが蓄積していないのは, 組織の欠損や細胞の内層化等の変化のためではないことが確認できた。



第3図 裏白品種‘ミネルバ’の花弁周縁部の徒手切片

(3)花弁周縁部の蓄積色素の解析

全面着色品種では, 花弁周縁部と中心部においてアントシアニンおよびその他のフラボノイドのいずれも蓄積量にほとんど差異がなかった。一方で, 裏白品種においては, 花弁周縁部ではアントシアニンが検出されなかったものの, その他のフラボノイドには花弁中心部と比較して大きな差はみられなかった。したがって, 裏白品種の花弁周縁部ではアントシアニン蓄積のみが

抑制されていることが明らかになった。

(4) ‘ミネルバ’の花弁周縁部および中心部のトランスクリプトーム解析 (RNA-seq)

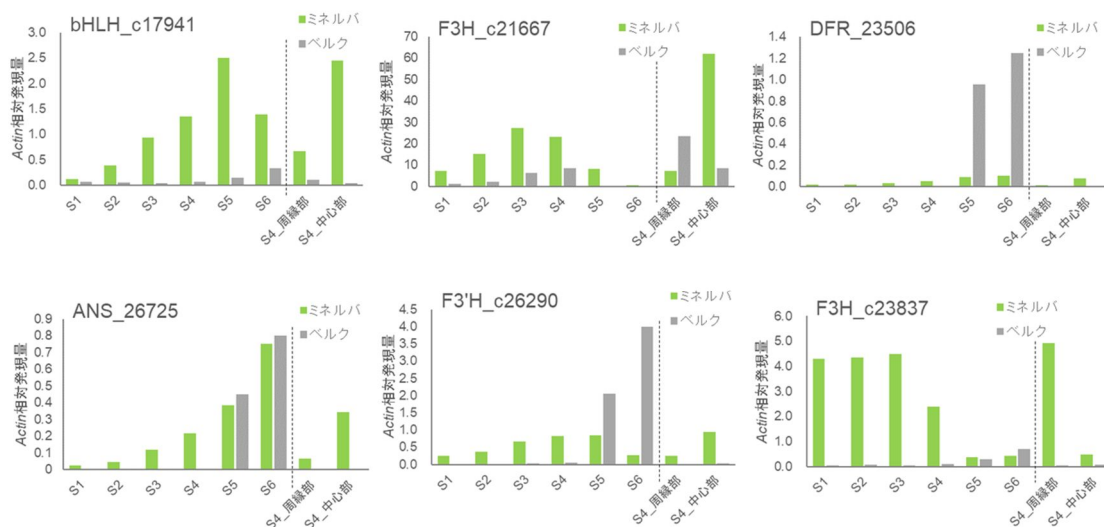
RNA-seqの結果, 花弁周縁部と中心部間で転写因子を含むいくつかのアントシアニン合成関与遺伝子に発現量差がみられた。発現量が9倍以上異なったMYB転写因子, bHLH転写因子, フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL), 桂皮酸4-水酸化酵素遺伝子 (C4H), フラバノン3-水酸化酵素遺伝子 (F3H), ジヒドロフラボノール4-還元酵素遺伝子 (DFR), アントシアニン合成酵素遺伝子 (ANS), フラボノイド3'-水酸化酵素遺伝子 (F3'H) およびグルタチオンS-転移酵素遺伝子 (GST) に関して配列を抽出し, qPCR用のプライマーを作成した。ほとんどの遺伝子が花弁中心部で発現量が高かったが, あるF3Hのみ花弁周縁部での発現が高かった。

(5) 花弁発達ステージ別の遺伝子発現解析および花弁周縁部と中心部での発現比較 (qPCR)

大きさを基準とした6つの発達ステージにおいて花弁をサンプリングしたところ, 裏白品種では全面着色品種と比較して早期にアントシアニンによる着色が開始することがわかった(第4図)。これらのステージ別サンプルにおいて, (4)で作成したプライマーを用いてそれぞれの遺伝子発現量を調査した結果, 裏白品種において早期ステージから発現が高い遺伝子が6つ見つかった(第5図)。裏白品種では着色途中のステージ4 (S4) 花弁における周縁部と中心部での比較において, これら6つの遺伝子のうちbHLH_c17941, F3H_c21667, DFR_c23506, ANS_c26725およびF3'H_c26290は花弁中心部で発現量が高く, F3H_c23837は周縁部で発現が高かった。全面着色品種においては, 発現がほとんどみられない, あるいは, 花弁周縁部において発現が高い結果となった。この傾向は完全着色花弁でも同様であった。したがって, 裏白品種ではこれら6つの遺伝子が白縁形成に関与していることが示唆され, なかでも転写因子であるbHLH_c17941が制御因子である可能性が高いと考えられた。また, F3H_c23837はその発現傾向から, 花弁周縁部でのアントシアニン合成の抑制に関与している可能性が考えられた。



第4図 発達ステージ別花弁
上段: 裏白品種‘ミネルバ’, 下段: 全面着色品種‘ベルク’



第5図 発達ステージ別花弁およびS4の花弁周縁部と中心部の相対遺伝子発現量

(6) ‘ミネルバ’の各花弁細胞層における遺伝子発現比較 (qPCR)

(5)で特定した6つの遺伝子について, (1)で得た花弁三細胞層サンプルでの発現を調査した結果, 内層および背軸面表層ではbHLH, DFR, ANSおよびF3'Hの発現がみられなかった。したがって, これらの遺伝子が細胞層別のアントシアニン蓄積の能否を決定する遺伝子であることが示唆され, 特に転写因子であるbHLHが重要な役割を担っていると考えられた。このbHLHはこれまでにカーネーションで報告されていない新規のものであり, 現在プロモーター領域の配列調査を含め詳細な解析を行っている。このbHLHをCaMV 35Sプロモーター等で過剰発現させれば, アントシアニンの全層蓄積化が見込めると考えられた。また, 各層におけるアントシアニン蓄積の能否は形態形成とも関連している可能性があるため, (1)で得た花弁三細胞層のcDNAを用いて既知の形態形成遺伝子の発現解析を今後行う予定である。

引用文献

Deguchi A, Ohno S, Hosokawa M, Tatsuzawa F, Doi M. 2013. Endogenous post-transcriptional gene silencing of *flavone synthase* resulting in high accumulation of anthocyanins in black dahlia cultivars. *Planta*. 237: 1325-1335.

川本忠文、未固定非脱灰試料からの多目的新鮮凍結切片の作製と応用、2005、組織細胞化学 pp 95-107

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 出口亜由美・立澤文見・三吉一光 |
| 2. 発表標題 カーネーション花卉の緑白模様形成に関わる要因の探索 |
| 3. 学会等名 園芸学会平成31年度春季大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|