

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06026

研究課題名（和文）B環配糖化デルフィニジンとフラボノールとの相互作用によるトルコギキョウの花色改変

研究課題名（英文）Flower color modification through interaction between B-ring glycosylated delphinidins and flavonols in *Eustoma grandiflorum*

研究代表者

野田 尚信（Noda, Naonobu）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・上級研究員

研究者番号：10455313

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、トルコギキョウの花弁に蓄積するデルフィニジン型アントシアニンの構造を改変することで、共存するフラボノール配糖体との相互作用によって花色の青色化を実現するための知見を得た。外来遺伝子の発現とともに、内在のアントシアニン糖転移酵素遺伝子を抑制させることで、効果的にアントシアニンの構造を改変するための手法を確立した。このことによりトルコギキョウに新花色形質を付与することを可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、花色を担うアントシアニンの修飾を担う糖転移酵素遺伝子の抑制と外来の遺伝子発現を同時に行って花色を改変することにトルコギキョウで初めて成功した。得られた知見を元に、新たなトルコギキョウの品種が開発されることで、現在国内での切り花の産出額第4位のトルコギキョウの産業利用の活性化につながる。またフラボノール配糖体を花弁で合成する、他の花きの新花色品種開発にもつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we obtained knowledge of the structural modification of delphinidin-based anthocyanins that accumulate in lisianthus petals using genetic engineering methods to achieve blue flower coloration through interaction with coexisting flavonol glycosides. We established a method for effectively modifying the anthocyanin structure by suppressing the endogenous anthocyanin glycosyltransferase genes along with the expression of a transgene. This made it possible to introduce a new flower color trait to lisianthus flower.

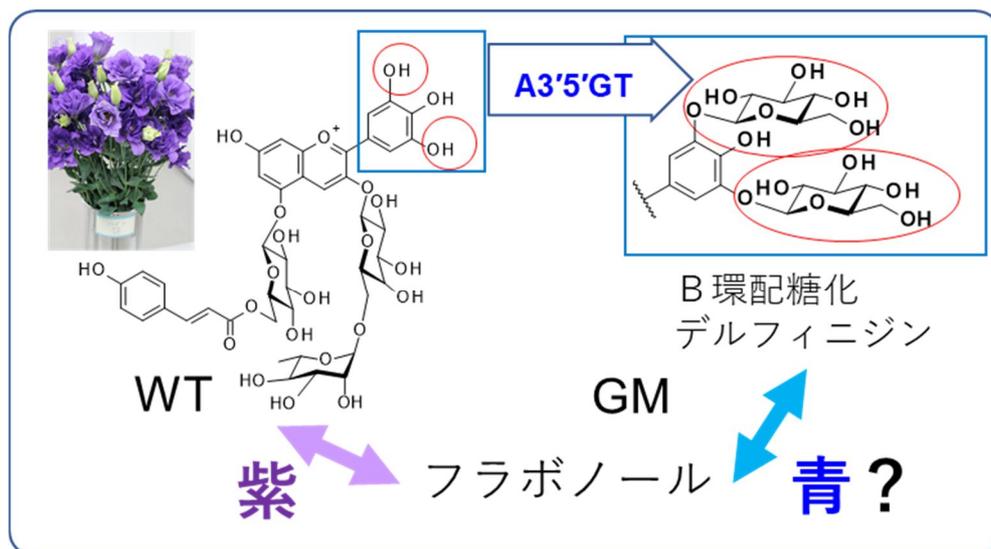
研究分野：花き園芸学

キーワード：トルコギキョウ 花色 アントシアニン グルコシル化 フラボノール コピグメンテーション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

トルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum*) は北米原産の花きであるが、日本での育種が盛んであり、切り花の産出額は 116 億円 (R 元年度品目別第 4 位) と、キク、ユリ、バラに次ぐ重要な品目に成長している。改良された品種の花色は、紫、紅、ピンク、白、淡黄、淡緑と多様である。一方で、紫や青の花色の基となるデルフィニジン型アントシアニンを花弁に蓄積するが、その花色は薄紫や紫であり、赤みのない青色や水色の品種はこれまで作出されていない。これは内在するデルフィニジン型アントシアニンが、青の発現メカニズムの一つである分子内コピグメンテーションに必要な芳香族有機酸によるポリアシル化されていないこと、また、アントシアニンと共存するフラボノール配糖体との分子間コピグメンテーションが鮮やかな青の発色に寄与できないことが原因と考えられる<sup>1,2</sup>。研究代表者らは、デルフィニジン型アントシアニンの B 環にグルコシル基を結合させると、液胞中で共存するフラボン配糖体と分子間相互作用 (分子間コピグメンテーション) することで、キクの花弁をあざやかな青色に改変できることを報告した<sup>3</sup>。このような、B 環配糖化デルフィニジン色素とフラボノイド類 (フラボン配糖体やフラボノール配糖体等) が分子間コピグメンテーションによって青を発色する例は、当時キク以外では報告がなかった。ところが試験管内での実験により、フラボン配糖体以外に、フラボノール配糖体もコピグメントとして機能する可能性が示唆された。すなわち、内在アントシアニンの B 環を配糖化し、フラボノール配糖体等と分子間コピグメンテーションを生じさせることで、フラボノール配糖体を花弁に持つトルコギキョウなどの花の色を、より青くできる可能性が示唆された (第 1 図)。



第 1 図 B 環配糖化デルフィニジン色素とフラボノール配糖体との分子間コピグメンテーション

### 2. 研究の目的

この仮説を実証するためには、まずフラボノール配糖体を花弁に含むトルコギキョウで、アントシアニン B 環配糖化に必要な代謝工学的手法を確立する必要がある。また、新たに合成された B 環配糖化デルフィニジン色素と内在のフラボノール配糖体が、分子間コピグメンテーションによって青色化を生じさせられるのかを、作出した形質転換体の花色と花色素を分析して検証しなければならない。このように本研究では、B 環配糖化デルフィニジン色素とフラボノール配糖体の分子間コピグメンテーションについて、トルコギキョウを用いて検証し、試験管内の実験では得られない知見を得る。

### 3. 研究の方法

#### (1) 形質転換の植物材料

トルコギキョウ‘パープルサム’の自殖後代系統、‘ロイヤルバイオレット’の自殖後代系統、および紫盃の組織培養苗を形質転換体作出の材料に用いた。

#### (2) 導入遺伝子の構築

B 環配糖化デルフィニジン色素とフラボノール配糖体をトルコギキョウ花弁で共存させるためには、B 環配糖化酵素をコードするチョウマメ由来の *A3'5'GT* 遺伝子をトルコギキョウの花弁

で適切に発現・制御する手法を明らかにする必要がある。そこで、まず、チョウマメ *A3'5'GT* 遺伝子が機能するために、構成的プロモーター2種類と花弁特異的プロモーター1種類を用いてバイナリーベクターを構築した。また、チョウマメ *A3'5'GT* の基質特異性を考慮すると、アントシアニン3位の配糖化、および5位の配糖化とアシル化の状態を改変する必要があると考えられる。具体的には、3位結合糖のグルコシル基への改変、および5位のグルコシル基やアシル基の修飾抑制が必要性と想定される。そこで、チョウマメ *A3'5'GT* 単独で導入するコンストラクトに加え、構成的プロモーター2種類で、アントシアニン3-ガラクトシル基転移酵素遺伝子 (*A3GalT*) とアントシアニン5-グルコシル基転移酵素遺伝子 (*A5GT*) を発現抑制するための RNAi カセットを組み合わせたバイナリーベクターも作製した。

### (3) 形質転換体の作出

形質転換体の作出は、フローラルディップ法<sup>4</sup>およびリーフディスク法<sup>5,6</sup>にて行った。得られたシュートはゲノミックPCRにて導入遺伝子の確認をした後、生育させて開花させた。また、インビトロでの早期開花のため、*FT* 遺伝子を発現させるバイナリーベクターとコトランスフォーマーメーションした個体の作出も試みた。

### (4) 花色と花色素の分析

得られた形質転換体の花色は、色彩色差計(日本電色工業, NF-555)にて測定した。花弁のフラボノイドは、採取した凍結花弁を粉碎後、約5倍当量の10%酢酸を添加し抽出した。抽出液をフィルター濾過した後、5 $\mu$ lをACQUITY UPLC-ESI-MSシステム(Waters)にて分析した。溶媒Aに1%ギ酸水溶液、溶媒Bに1%ギ酸アセトニトリルを用い、流速0.1ml/分で、35分間にB濃度を5から30%に上昇させるリニアグラジエントの後、45分までの10分間はB濃度30%を維持して分離溶出させた。質量分析計による検出は、ポジティブモードでおこなった。

## 4. 研究成果

### (1) 形質転換体の作出

当初は、主にフローラルディップ法による遺伝子導入を行い、形質転換体の作出を進めた。しかしながら、得られた種子からはカナマイシン耐性の個体が数個体得られたのみであった。そこで、花弁特異的プロモーターでチョウマメ *A3'5'GT* を発現させるコンストラクトにしばり、リーフディスク法による形質転換体の作出を進めた。その結果、チョウマメ *A3'5'GT* を発現させて、内在のアントシアニン糖転移酵素遺伝子を抑制させるコンストラクトを導入した‘パープルサム’の自殖後代系統から、導入遺伝子を持つ形質転換体が複数得られ開花に至った。また、‘ロイヤルバイオレット’の自殖後代系統、および紫盃からも、チョウマメ *A3'5'GT* 単独で導入した組換え体や、内在の配糖化酵素遺伝子の抑制カセットを組み合わせたコンストラクトを導入した組換え体のシュートが複数得られ、将来の解析が可能になった。

### (2) 得られた形質転換体の花色

PCRで導入遺伝子が確認された形質転換体の花色を、紫色花の野生型と比較したところ、赤みが増した個体と青みが増した個体を得られた。

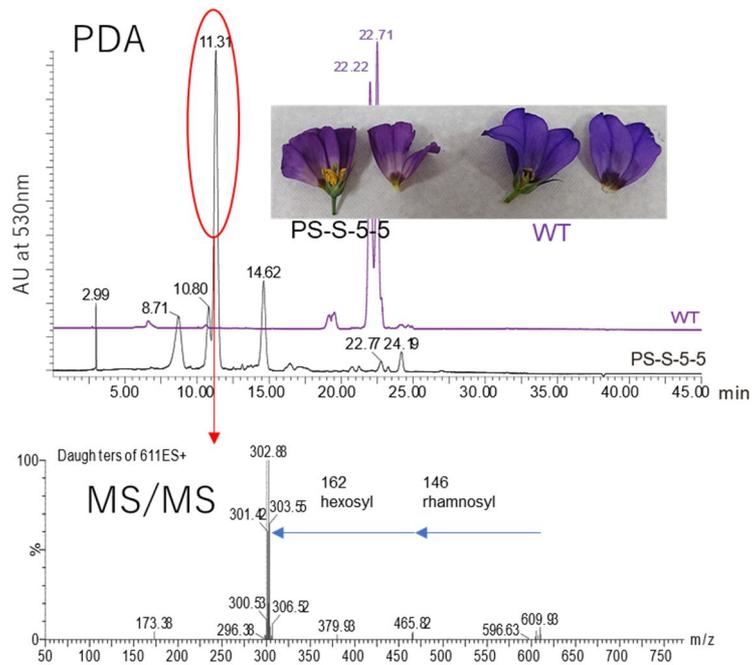
赤みが増した個体(系統番号5-5)の花色を色彩色差計で測定したところ、同時に開花した野生型の花色と比較してa\*値が-3.9である一方b\*値が+15.7を示し、色相角が13度赤色方向へシフトしていた。このことから導入した遺伝子の働きによりアントシアニンの構造が変化し、花色が変化したと考えられた。

※非形質転換体の紫色と比較にして青みが増した個体の結果は、一定期間公表を見合わせ、後日再提出する。

### (3) 形質転換体の花色素分析

紫色花の野生型に含まれている主要アントシアニンは、既知のデルフィニジン3-(6-ラムノシル)ガラクトシル-5-(6-p-クマロイル)グルコシドとデルフィニジン3-(6-ラムノシル)ガラクトシル-5-(6-フェルロイル)グルコシドであった。一方、赤みが増した形質転換体における主要なアントシアニンピークは、野生型より溶出時間  $t_R=11.3$  と早く、質量分析計にて正イオンを検出した場合の分子量は、 $[M]^+=611$  であった。このピークをMS/MS分析すると $[M]^+=303$  および465が検出された(第2図)。この結果と、導入したアントシアニン3-ガラクトシル基転移酵素遺伝子 (*A3GalT*) とアントシアニン5-グルコシル基転移酵素遺伝子 (*A5GT*) のRNAiカセットの働きにを考えると、この主要アントシアニンの構造は、デルフィニジン3-(6-ラムノシル)グルコシドまたはデルフィニジン3-(6-ラムノシル)ガラクトシドと考えられた。これらのことから、赤みが増した原因は、5位の配糖化が抑制されたことによって、芳香族有機酸による修飾がされなかったためと考えられた。

※非形質転換体の紫色と比較にして青みが増した個体の結果は、一定期間公表を見合わせ、後日再提出する。



第2図：赤みが増した形質転換体の花弁主要アントシアニンのLC-MS分析． $t_R=11.31$ のピークは、デルフィニジン 3-(6-ラムノシル)グルコシドまたは、デルフィニジン 3-(6-ラムノシル)ガラクトシドと推定される．

< 引用文献 >

1. Markham K. and Ofman D. (1993) *Phytochemistry* 34: 679–685.
2. Nielsen K. *et al.* (2002) *Mol. Breed.* 9: 217–229.
3. Noda N. *et al.* (2017) *Sci. Adv.* 3: e160278.
4. Fang *et al.* (2018) *Plant J.* 96: 869–879
5. 五十鈴川寛司 (2012) トルコギキョウの形質転換プロトコール, 形質転換プロトコール[植物編](田部井編), pp.258–263.
6. 野田尚信ら (2004)アグロバクテリウム法による花き類の形質転換, 植物色素研究法(植物色素研究会編), pp.161–168.

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 清水 圭一<br><br>(Shimizu Keiichi)<br><br>(30305164) | 鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授<br><br><br>(17701) |    |
| 研究分担者 | 橋本 文雄<br><br>(Hashimoto Fumio)<br><br>(70244142) | 鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授<br><br><br>(17701)  |    |

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