

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780020

研究課題名（和文） ペチュニアのアントシアニン合成系遺伝子の解析と花色選抜マーカーの開発

研究課題名（英文） Molecular marker for the genotype identification of anthocyanin biosynthesis genes governing flower color in commercial petunias

研究代表者

松原 紀嘉（MATSUBARA KIYOSHI）

千葉大学・環境健康フィールド科学センター・助教

研究者番号：70512250

研究成果の概要（和文）：花卉の育種は複数の優良形質を同時に選抜する必要があるため、目的の品種改良には時間とコストがかかる。本申請者は特に重要な育種目標である花色選抜の短縮化を目指し、花色遺伝子のモデル植物であるペチュニアを用いて分子機構を調査し、花色選抜マーカーの開発を試みた。本研究では特に白および黄色の花色の分子機構を解析し、新たな花色選抜マーカーの開発を試みた。

研究成果の概要（英文）：Floricultural plant breeding is necessary to select simultaneously several superior traits. Therefore, the improvement for specific trait of ornamental plant is required both time and cost. Because flower color was important as a breeding objective, we analyzed floral anthocyanin biosynthesis genes using commercial petunias, which were one of model plant of floral color gene, and developed PCR based marker. In this study, the biosynthesis mechanism of white and yellow color in the corolla was analyzed to develop gene marker for white and yellow flower color selection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
22 年度	700,000	210,000	910,000
23 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：花卉

## 1. 研究開始当初の背景

日本における花卉育種技術は世界トップクラスであり、このことは 2004 年に日本の育種家が世界一の育種家の称号である『Breeders' Cup Trophy of AAS』の第 1 回目の受賞者であることでも、日本の育種技術が世界に先駆けていることを証明している。しかしながら、今日の花卉類の消費量を維持ま

たは促進していくためには、新品種を短期間で継続的に生み出していくことが必須となる。つまり、時代の嗜好とニーズに合わせて改良していかなければならない花卉類の重要課題は、育種期間を短縮化する技術開発である。現在、園芸植物の育種は人工交配による交雑育種が一般的であるが、イネやムギなどの重要穀物では、耐病性や高栄養価などの

選抜に遺伝子マーカーを用いる分子育種の試みが進められている。一方、園芸植物である花卉類は、観賞価値に関わる花の色彩、芳香、形態などの花の形質に関する項目から耐病性、早晚性、耐環境性などの項目のように育種目標が多岐にわたっているだけでなく、品目の数も膨大であるため、遺伝子マーカーによる分子育種の基盤がほとんど整備されていない。近年、種苗法や UPOV 条約が整備され、育種により得られた新品種を知的財産と同様に法律で保護されるようになった。そのため、民間大手種苗会社だけでなく、個人や自営業の生産者も独自に品種改良を行い、新品種を育成することが容易となってきた。しかしながら、花卉類の育種では、複数の優良形質を同時に選抜する必要があるため、目的の品種改良のための親株の選抜、交雑後代の選抜、さらにはそれらを何代も繰り返し行う必要がある。また、選抜の際には大量生産が必要であるため、品種改良には時間と生産コストが膨大にかかる。このような問題点の克服と日本の花卉産業の発展の一役を担うため、花卉類における遺伝子マーカーの開発が必要である。

花卉類の育種目標である花の色彩、芳香、形態などの花の形質に関する遺伝様式はそれぞれ独立しており、それぞれの遺伝様式を明らかにすることが育種期間の短縮に繋がる。また遺伝様式のみでなく、それらを操作している重要鍵遺伝子を明確化して解析することにより、目的の形質に沿った短期育種を可能とする遺伝子マーカーを開発できる。また、この分子育種を可能とする遺伝学的な知見は、短期品種開発のための重要な基礎データともなる。これまでに特に重要な育種項目である花の色彩の分子機構及び遺伝子マーカーの開発をペチュニアを用いて行ってきた。ペチュニアの花の色彩様式は、紫色から赤紫、薄青色、桃色、赤色など幅広いが、これらはすべてアントシアニンで構成されている (Ando et al., 2000)。また、ペチュニアはアントシアニン合成系解析のモデル植物として広く研究されているおり、分子遺伝学的な情報も蓄積されているが、市販品種にこれらの情報を適応して研究している例は少ない。さらに市販ペチュニア品種におけるアントシアニンを合成する分子機構の解析から 3 種の花色選抜遺伝子マーカーが開発されている (Nakajima and Matsubara et al., 2005; Matsubara et al., 2005, 2006)。この研究によって、赤花、ピンク花、青~紫花は、開花する前に遺伝子マーカーで選抜が可能となり、花色選抜の簡便化が図れた。このようにペチュニアの花の色彩にはアントシアニンが重要であるが、アントシアニンを蓄

積しない色彩様式をもつ白花や黄花の品種もある。これらの非アントシアニン蓄積花冠の色彩の要因とその合成系の機構はあまり知られていない。そこで本研究では、花色選抜マーカーの多様化をはかるため、ペチュニアにおける白花と黄花の生合成機構を解析し、新たな花色選抜マーカーを開発する。

## 2. 研究の目的

### (1) 白花の分子機構の解析

ペチュニア品種の起源とされる *Petunia axillaris* の白花はアントシアニン合成系制御遺伝子 *An2* のフレームシフト突然変異とナンセンス突然変異が原因とされ (Hoballah ら, 2007)、フラボノールを蓄積している。しかしながら、ペチュニア品種における白花は、その花冠色彩の要因のとなる成分が不明である。また、白花品種においてアントシアニン生合成機構の遺伝子発現がどのように関係しているかも不明である。そこで本研究では、品種の白花の成因を解析し、白花選抜遺伝子マーカーの構築を目指した。

### (2) 黄花の分子機構の解析

ペチュニア品種の花冠の色素は主にアントシアニンで構成されている。一方、黄花品種の花冠はアントシアニンが含まれておらず、他の着色品種と比較してフラボノールを多く蓄積している (Murakami ら, 2004)。また、ペチュニア品種の起源種とされる *Petunia axillaris* はフラボノールの蓄積によって白花となっており、これはアントシアニン合成系構造遺伝子の抑制により生じている。つまり、黄花品種と着色品種の成因の違いは、アントシアニン合成系にあると考えられ、*P. axillaris* と同様のフラボノール蓄積機構が存在すると考えられるそこで本研究では黄花品種におけるアントシアニン合成系遺伝子を解析し、黄花の発色機構について調査した。

## 3. 研究の方法

### (1) 白花の分子機構の解析

白花 29 品種の花冠を UV 下で観察し、花冠より色素を抽出し、高速液体クロマトグラフィによりフラボノールおよびケイ皮酸を分析した。花蕾および幼葉から total RNA および genome DNA を抽出した。GenBank に記載されているアントシアニン合成系遺伝子 (*CHS-A*, *CHS-J*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS*, *FLS*) の配列をもとにプライマーを設計し、cDNA クローニングを行い、RNA プローブを作製した。*P. axillaris* と品種の花冠 RNA を用いて、ノーザン解析をおこなった。*P. axillaris* と白花品種で発現に違いがあった *CHS-A* とそのプロモーター領域の塩基配列を比較した。白花品種について *CHS-A* の siRNA の検出をおこなっ

た。また、*An2* 遺伝子のゲノム配列を比較した。

## (2) 黄花の分子機構の解析

市販黄花ペチュニア品種 ‘California Girl’、 ‘Carpet Butter Cream’、 ‘Prism Sunshine’、 ‘Summer Sun’ および青花品種 ‘Baccara Blue’ ならびに品種の起源種とされる *P. axillaris*、*P. integrifolia* の蕾および幼葉より抽出した total RNA および genome DNA を用いた。GenBank に記載されているアントシアニン合成系遺伝子 (*CHS-A*、*CHS-J*、*CHI-A*、*F3H*、*FLS*、*DFR*、*ANS*) の配列をもとにプローブを設計し、黄花および着色品種ならびに起源種における発現解析を行った。また、発現量に差がみられた *DFR* 遺伝子のゲノム配列を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) 白花の分子機構の解析

白花品種における花冠色素は主にケイ皮酸系またはフラボノール系の2タイプが存在した。さらに特定の白花品種においてケイ皮酸とフラボノールを花冠組織上で異所的に蓄積している系統が存在した (図1、2)。

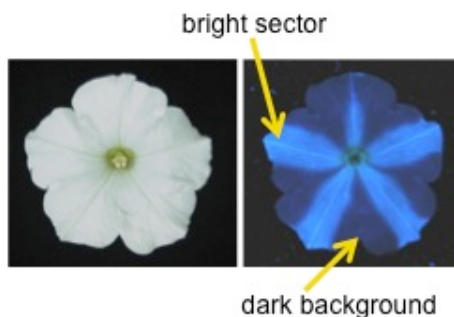


図1 白花品種における UV 照射写真  
ケイ皮酸 (bright sector) とフラボノール (dark background) を花冠組織上で異所的に蓄積している

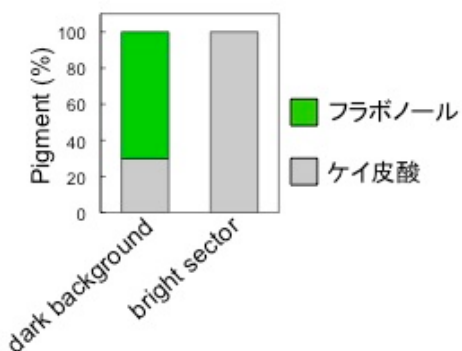


図2 異所的蓄積白花品種における bright sector と dark background の色素成分

当該白花品種におけるアントシアニン合成系遺伝子の発現解析を行ったところ、ケイ皮酸蓄積部位はアントシアニン合成系の上流遺伝子 *CHS-A* の発現が抑制されていた。また、フラボノール蓄積部位においては、*DFR* 遺伝子が抑制されていた。*CHS-A* の抑制部位において *CHS-A* の siRNA が検出されたため、*CHS-A* は RNAi によって発現が抑制されていることが判明した (図3)。

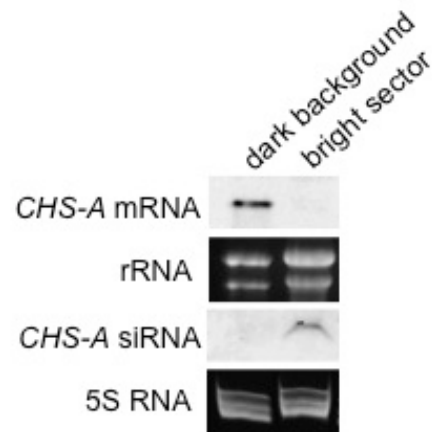


図3 異所的蓄積白花品種の bright sector と dark background における *CHS-A* 遺伝子の発現とその siRNA 発現

さらに他の白花品種の色素を同様に調査した結果、ケイ皮酸蓄積型品種とフラボノール蓄積型品種が存在した。遺伝子発現解析の結果、フラボノール型で *CHS-A* だけでなく、*CHS-J* も発現しており、また *ANS* も発現していた (図4)。

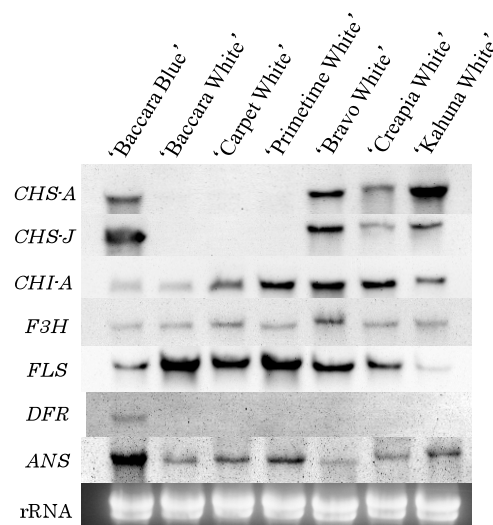


図4 白花品種におけるアントシアニン合成系遺伝子の発現解析

ケイ皮酸系においては CHS の RNAi による発現抑制が原因であり、フラボノール系は転写因子 *An2* の変異による *DFR* の発現抑制が原因であることが判明した。また、ケイ皮酸とフラボノールを花冠組織上で異所的に蓄積している系統は、上述の変異が同時に生じていることが明らかとなった。

## (2) 黄花の分子機構の解析

アントシアニン合成系構造遺伝子の発現解析の結果、青花品種 ‘Baccara Blue’ においては解析したすべての遺伝子の発現が確認された (図 5)。

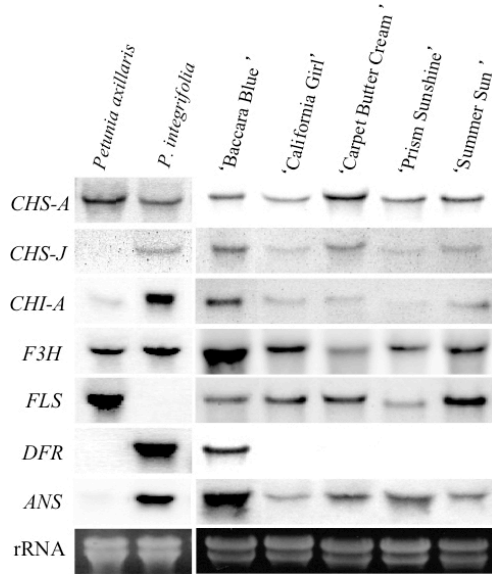


図 5 黄花品種と野生種におけるアントシアニン合成系遺伝子発現

一方、黄花品種における *DFR* 遺伝子の発現は、*P. axillaris* と同様に完全に抑制されていた。*CHS-J* および *ANS* 遺伝子では *P. axillaris* において発現が確認されなかったため、*P. axillaris* とは異なる制御機構であると考えられた。黄花品種における *CHI-A* 遺伝子の発現は *P. axillaris* と同様に抑制されていた。*CHS-A*、*F3H* および *FLS* 遺伝子に関しては、‘Baccara Blue’ および *P. axillaris* と同等の発現を示した。一方、*P. integrifolia* における *FLS* 遺伝子は発現が完全に抑制されていたため、黄花品種の *FLS* 遺伝子は *P. axillaris* より遺伝した可能性が考えられた。また、黄花品種において完全な発現抑制がみられた *DFR* 遺伝子のゲノム配列を解析した結果、黄花品種の配列はプロモーター領域および open reading frame とともに *P. axillaris* と一致し、*P. integrifolia* とは異なる配列を示した。しかしながら、黄花品種の配列は、発現のみられた ‘Baccara Blue’ と一致したため、*DFR* 発現抑制はゲノム配列の変

異によるものではないと考えられた。以上の結果、黄花ペチュニアはアントシアニン合成系遺伝子において品種間で共通した発現機構をもち、*DFR* 遺伝子の発現抑制と *FLS* 遺伝子の発現によるフラボノールの蓄積が黄花の一因と考えられた。また、黄花品種におけるアントシアニン合成系遺伝子の発現様式は *P. axillaris* と類似しており、*DFR* 配列も一致したことから、*P. axillaris* の因子を強く受け継いでいると考えられた。

以上の結果、白花品種の成因は大きく 2 つ存在し、品種の起源種には見られない形質も存在することから、品種改良の過程で生じた変異であると考えられた。さらに、黄花品種は白花品種の成因の一つと同様の変異であるため、白花系統をもとに作出された可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kiyoshi Matsubara, Hiroaki Kodama, Satoko Kei, Mayuko Koizumi, Toshio Ando, RNA silencing in white petunia flowers creates pigmentation patterns invisible to the human eye, *Journal of Plant Physiology*, 査読有り, 169, 920-923, 2012

[学会発表] (計 2 件)

- ① 松原紀嘉・佐々木秀典・渡辺均・國分尚・安藤敏夫、市販ペチュニア品種のアントシアニン合成系の解析—黄花の成因—、園芸学会、2011 年 9 月 25 日、岡山大学
- ② 船戸絵理・松原紀嘉・渡辺均・國分尚・安藤敏夫、ペチュニア属における白花のもう一つの成因、園芸学会、2012 年 3 月 29 日、大阪府立大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松原 紀嘉 (MATSUBARA KIYOSHI)  
千葉大学・環境健康フィールド科学センター・助教  
研究者番号：70512250

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：