

## 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25年 6月 5日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780033

研究課題名（和文）カロテノイドによる花卉の模様形成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism of color pattern formation in petals involving carotenoids.

研究代表者

岸本 早苗 (KISHIMOTO SANAE)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所花き研究領域・主任研究員

研究者番号：70355717

研究成果の概要（和文）：トレンニア、シュンギクおよびキンセンカ花卉のカロテノイドによって形成される模様の有無はカロテノイド蓄積関連酵素遺伝子と分解関連酵素遺伝子の全体的な制御によって決定されていることが明らかになった。トレンニア花卉のカロテノイドによる着色部ではカロテノイド生合成・蓄積関連遺伝子だけでなく様々な色素体に局在するタンパク質をコードする遺伝子の発現が上昇していた。

研究成果の概要（英文）：Petal color patterns with carotenoids in petals of torenia, crown daisy, and calendula is caused by overall regulation of carotenoid biosynthesis and cleavage genes. Not only carotenoid biosynthesis and storage related genes but also various plastid localized genes showed increased expression in high-carotenoid content region of torenia petals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生産環境農学、園芸科学

キーワード：カロテノイド・花卉・花き類

### 1. 研究開始当初の背景

花色の形成に関与する色素成分の中で、幅広い植物種に渡って重要な働きをしているのが黄～赤色を示すカロテノイドと赤～青色を示すアントシアニンである。これらの組み合わせによって様々な色調が花卉に生じる。また、これらの色素が局所的に分布することにより特徴的な模様を示すものがある。最も良く知られているものがアサガオやオシロイバナで見られる斑入りや、ペチュニアや多くのキク科植物で見られる覆輪である。しかしながらこれら覆輪や斑入りの機構に関する知見はアントシアニンをはじめとし

たフラボノイド系の色素に限られており、カロテノイドに関しては全く知見がない。

### 2. 研究の目的

覆輪や斑入りといったカロテノイドによる花卉の模様発現に関わる遺伝子を着色部と白色部の比較によって同定し、その機能を解明することによって、花卉でのカロテノイド蓄積量を調節し模様を作り出す機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)キンセンカ‘デイジーアプリコット’、ト

レニア ‘クラウンホワイト’ 及びシュンギク ‘中葉春菊’ のカロテノイドによる着色部と白色部におけるカロテノイド生合成・蓄積関連遺伝子及び分解関連酵素遺伝子の発現を real-time PCR 法を用いて解析する。

(2) トレニア ‘クラウンホワイト’ の着色部および白色部で発現している遺伝子を HiCEP (High Coverage Expression Profiling) 法にて網羅的にピークとして検出する。これらの波形を比較し、着色部特異的もしくは白色部特異的に発現するピークを選び出し、その塩基配列を決定する。

#### 4. 研究成果

(1) 3種の植物の花弁では調査を行った生合成・蓄積関連遺伝子のほとんど全てについて着色部のほうが白色部よりも高い発現量を示していた(図1, 図2)。一方、花弁におけるカロテノイド分解に関わる酵素遺伝子であると推測されている *CCD4* (*Carotenoid cleavage dioxygenase 4*) はいずれの植物においても白色部で発現が高かった。このことから、いずれの植物においてもカロテノイド生合成と分解が全体的に制御されることによってカロテノイド着色の有無が決定されていることが推測された。

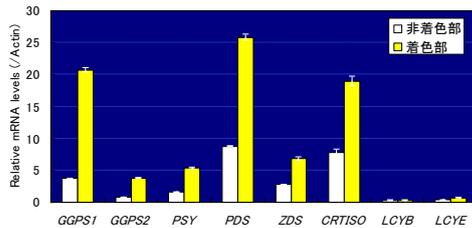


図1. トレニア着色部および白色部におけるカロテノイド生合成系酵素遺伝子の発現解析

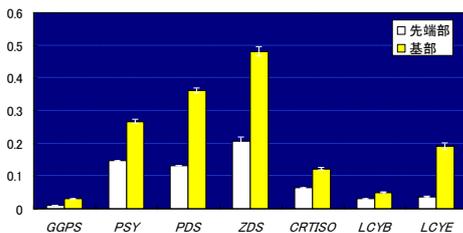


図2. シュンギク着色部および白色部におけるカロテノイド生合成系酵素遺伝子の発現解析

さらに、シュンギクについては模様のある覆輪系統と模様のない全面着色系統の比較を行った。覆輪系統の花弁先端部(白色部)、基部(着色部)、および全面着色系統の花弁先端部、基部におけるカロテノイド生合成・蓄積関連遺伝子 (*1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase*, *1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase*,

*isopentenyl diphosphate isomerase*, *GGPP synthase*, *phytoene synthase*, *phytoene desaturase*,  $\zeta$ -*carotene desaturase*, *lycopene  $\beta$ -cyclase*,  *$\beta$ -ring hydroxylase*, *chromoplast-specific*

*carotenoid-associated protein*) および分解関連遺伝子 (*CCD4*) の発現を解析したところ、カロテノイド生合成・蓄積関連遺伝子の発現はいずれも覆輪系統に比べ全面着色系統の花弁先端部および花弁基部で高かった。一方、カロテノイド酸化開裂酵素遺伝子 *CCD4* は全面着色系統のいずれの部位でも全く発現が検出されず、ゲノミック PCR 解析によりゲノム DNA から *CCD4* が欠落していることが明らかになった(図3, 図4)。このことからシュンギクの覆輪形成には *CCD4* によるカロテノイドの分解が関与しており、*CCD4* が欠損すると花弁全面が均一に着色する全面着色系統になることが明らかになった。

本研究により、花弁にカロテノイドによる覆輪模様を生じさせる原因遺伝子が初めて明らかになった。

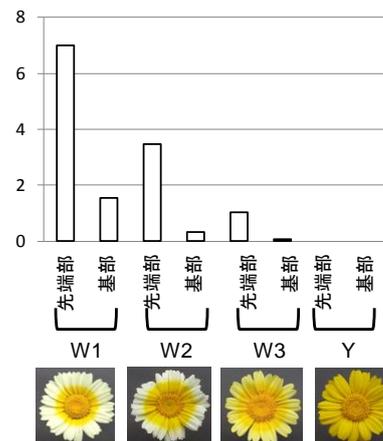


図3. シュンギク覆輪系統 (W1-W3) および全面着色系統 (Y) 花弁における *CCD4* 遺伝子の発現解析

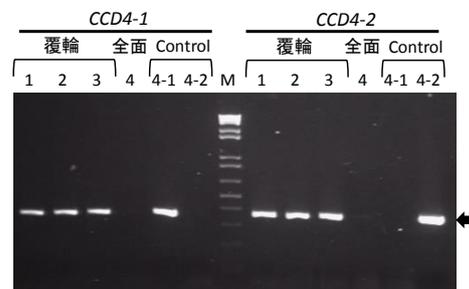


図4. *CCD4-1* および *CCD4-2* 特異的プライマーを用いた覆輪系統および全面着色系統のゲノミック PCR

(2)全体で約 19000 の発現ピークが検出された。これらピークの高さを着色部と白色部で比較したところ、着色部で白色部の2倍以上の発現量を示すピークが300ピーク、白色部で着色部の2倍以上の発現量を示すピークが60ピークであった(図5)。このうち、9倍~3.4倍の差を示す34ピークおよび着色部のみで発現していた6ピークを選び出し、塩基配列を決定した(表)。着色部で高い発現量を示したピークおよび着色部のみで発現していたピークにはカロテノイド生合成・蓄積関連遺伝子のホモログ3種類(*Fibrillin*、*NXS*、*LCYB*)に加え、複数の光合成関連遺伝子が含まれていた。それぞれの遺伝子のシロイヌナズナオルソログを解析した結果、大部分の遺伝子から色素体移行シグナルペプチドをコードする配列が検出された。このことから、トレニア花卉の着色部ではカロテノイド生合成・蓄積関連遺伝子だけでなく色素体に局在するタンパク質をコードする遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった。

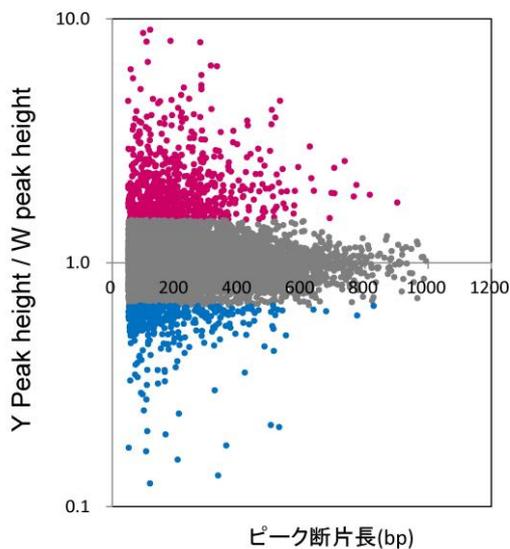


図5. HiCEP 分析によって得られたピークの分布

- 赤点: 着色部で高い発現を示したピーク (倍率2倍以上)
- 青点: 白色部で高い発現を示したピーク (倍率2倍以上)

表. HiCEP 法で単離された着色部で発現量の高い差次的発現遺伝子 (抜粋)

着色部 発現量/ 白色部 発現量	Definition <sup>a</sup>	シグナル ペプチド の有無
9.03	Cupin domain-containing protein /glutelin type A2-like	N
8.07	Putative saccharopine dehydrogenase	CP
8.03	Zinc induced facilitator-like 1 (ZIFL1)	N
6.40	Fructose-1,6-bisphosphatase (FBP)	CP
5.89	<b>Fibrillin 1b (FIB1b)</b>	CP
4.70	Rieske (2Fe-2S) domain-containing protein	CP
4.62	2-Phosphoglycolate phosphatase 1 (PGLP1)	CP
4.32	Dihydropteroate synthase family protein	CP
4.27	Glutaredoxin-C2	N
4.24	<b>Neoxanthin synthase (NSY)</b>	CP
4.04	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1 subunit beta	N
4.03	Dehydroascorbate reductase 3 (DHAR3)	CP
3.98	Low PSII accumulation 3 protein (LPA3)	CP
3.95	Ferredoxin-NADP+ reductase	CP
3.83	<b>Lycopene beta-cyclase (LCYB)</b>	N
3.66	Photosystem I reaction center subunit N (PSAN)	CP
3.44	3-Oxoacyl-ACP reductase	CP

a, 太字: カロテノイド生合成・蓄積関連遺伝子, 網掛け: 光合成関連遺伝子

b, TargetP サーバーによって推測した色素体移行シグナルペプチドの有無. CP: あり, N: なし

#### 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)

[学会発表] (計2件)

①岸本早苗・山溝千尋・大宮あけみ、HiCEP法を用いたトレニア花卉のカロテノイドによる着色部と白色部における差次的発現遺伝子の解析、園芸学会平成25年度春季大会、2013年3月23日、東京農工大学

②岸本早苗・大宮あけみ、シュンギク花卉の覆輪形成にはカロテノイド酸化開裂酵素遺伝子 CCD4 が関与している、園芸学会平成23年度秋季大会、2011年9月24日、岡山大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 早苗 (KISHIMOTO SANAE)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所花き研究領域・主任研究員  
研究者番号：70355717