

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580047

研究課題名(和文)常緑性ツツジと落葉性黄花ツツジとの遠縁交配で得られた後代の黄花退色化現象の解明

研究課題名(英文)Clarification of fading of yellow flower coloured petals of the progeny from the wide cross between evergreen and yellow flowered deciduous azaleas.

研究代表者

嬉野 健次(Ureshino, Kenji)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号：10333759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：常緑性白花ツツジと落葉性黄花ツツジとの交配で得られたF1実生の花弁内カロテノイド含量が減少する要因について明らかにするため、カロテノイド含量および生合成遺伝子の発現量の啓示的变化を調査した。発現解析を行ったところ、花弁発育に伴い、キレンゲツツジのPSYおよびPDSの発現量が‘ミヤマサツキ’に比べ有意に高くなり、F1実生では両親の中間の発現量を示した。CCDに関しては、‘ミヤマサツキ’およびF1実生のCCD4の発現量が生育期間を通じてキレンゲツツジよりも高かった。以上よりF1実生における花弁内カロテノイド含量の減少は‘ミヤマサツキ’より遺伝したCCD4の発現量の増加によることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Carotenoid content and the expression patterns of carotenoid biosynthesis genes during petal development were compared among a yellow-flowered deciduous azalea (*Rhododendron japonicum* f. *flavum*), a white-flowered evergreen azalea (‘Miyamasatsuki’), and their progeny, to determine the factors that cause reduction in carotenoid content as the petals develop of their progeny. The expression levels of PSY and PDS became significantly higher in *R. japonicum* f. *flavum* than in ‘Miyamasatsuki’ as the flowers developed. Their expressions in the progeny were mid-way between both parents. The expression level of CCD4 was significantly higher in ‘Miyamasatsuki’ and the progeny than in *R. japonicum* f. *flavum* for all development stages. This result suggested that the high expression level of CCD4, which was inherited from ‘Miyamasatsuki’, was the main factor controlling the reduction in carotenoid content in the progeny.

研究分野：花卉園芸学

キーワード：CCD4 カロテノイド ツツジ 黄色花

1. 研究開始当初の背景

(1) ツツジの園芸品種群の成立

日本には、およそ 40 種のツツジ属植物が自生する。園芸品種群として、クルマツツジ、キリシマツツジ、ヒラドツツジ、リュウキュウツツジなどが成立している。

花色は白、桃～赤紫、花型は小輪、中輪、大輪、二重咲、八重咲、しべ咲きなど多種多様な品種が存在するが、これらは、主に、ツツジ亜属ヤマツツジ列に属する常緑性ツツジ種間の自然および人工交雑(種間交雑)による。

(2) ツツジの育種目標(いま求められている形質)

ツツジの育種目標として、常緑性であること、花色では黄色および青色が、また、芳香性があげられる。このうち、黄色に関しては *Pentanthera* 亜属の落葉性種キレンゲツツジが、その形質を有しており、有用な育種素材とされている。

(3) 常緑性黄色花ツツジ育種の現状

亜属間交配における交雑不和合性要因の解明および緑色実生の効率的な獲得法の確立

ツツジ亜属と *Pentanthera* 亜属間の交配では、ツツジ亜属を種子親とした場合にのみしか実生が得られず(一側交雑不和合性)、得られる実生もそのほとんどがアルビノ実生となるため開花まで至る雑種個体を得ることは困難であった。申請者は、この実生のアルビノ化がツツジ亜属種の葉緑体ゲノムと *Pentanthera* 亜属種の核ゲノム間の不和合性(plastome-genome incompatibility)に起因し、葉緑体ゲノムが花粉親の *Pentanthera* 亜属種より遺伝した場合にのみ緑色実生となることを明らかにしている。

さらに申請者は、常緑性ツツジの種間雑種個体を種子親としてキレンゲツツジと交配する三系交配を行うことにより、効率的に緑色雑種実生が得られることを明らかにしている。

亜属間交配で得られた実生の特徴キレンゲツツジとの亜属間交配で得られた F1 実生の花弁にはキレンゲツツジ由来の黄色色素であるカロテノイドが含まれる。しかし、開花時の花弁内カロテノイド含量はキレンゲツツジと比べ少ないため、キレンゲツツジが濃黄色の花色を示すのに対し F1 実生では淡黄色となる。また、樹姿はキレンゲツツジと似た落葉性を示す。これら F1 実生を複二倍体化して花粉親に用い、ツツジ亜属種に戻し交配して得られた BC1 実生は、落葉性が改善され常

緑性を示す。この BC1 の花色については、F1 と同様に淡黄色の花色を示す。

F1 および BC1 実生の花弁発育に伴うカロテノイド色素量の変化  
花弁の退色化現象に伴う色素量の変化を調査したところ、開花前日の花弁には、キレンゲツツジ、ミヤマサツキ、F1 および BC1 実生のいずれの個体にもカロテノイド色素が含まれ、 $\beta$ -カロテンが主要色素であること、開花前日時点での色素量は、キレンゲツツジで  $20 \mu\text{g/gF.W.}$  程度含まれ、ミヤマサツキではその  $1/20$  程度と微量であり、また、F1 および BC1 実生では  $10 \mu\text{g/gF.W.}$  前後とキレンゲツツジの約半量が含まれることを明らかにしている。しかし、開花当日の花弁では、キレンゲツツジで色素量の変化がほとんどみられなかったのに対し、F1 および BC1 実生では  $2 \mu\text{g/gF.W.}$  前後と急激な色素量の減少がみられ、開花 5 日後の花弁では、キレンゲツツジにおいて色素量の変化がみられなかったのに対し、F1 および BC1 実生では色素量が  $1 \mu\text{g/gF.W.}$  以下とほとんど含まれなくなっていることが明らかになっている。

この結果より、F1 および BC1 実生における花弁の退色化現象の要因として、次の 2 つの仮説が考えられる。

- (1) 花弁発育に伴うカロテノイド合成に関与する遺伝子の発現の急速な減少による退色化
- (2) 交配親の常緑性ツツジから遺伝したカロテノイド酸化開裂酵素(carotenoid cleave deoxygenase(CCD))遺伝子によるカロテノイド色素の分解による退色化

2. 研究の目的

本研究では、ツツジ亜属と *Pentanthera* 亜属間の交配で得られた実生における退色化現象のメカニズムを分子生物学的に明らかにすることを目的としている。そのため本研究では、以下のことについて検討する。

カロテノイド生合成にかかわる遺伝子群の発現について

カロテノイド酸化開裂酵素などによるカロテノイド分解の可能性

3. 研究の方法

(1) カロテノイド含量および組成の分析

常緑性ツツジの種間雑種(ミヤマキリシマ×サツキ,以下ミヤマサツキとする) 1 系統,キレンゲツツジ 1 系統およびこれらの交配で得られた F1 実生 1 個体を用いた。各個体より緑蕾(Stage1),開花前日(2)開花当日(3)および開花 5 日後(5)の小花を採取し、ブロッチを含まない下 2 花弁を供試した。色差計により花色を

調査後、アセトン下で花弁を磨砕し、ジエチルエーテルを加え粗抽出液を得た。粗抽出液を水洗、脱水、乾固後、5%水酸化カリウム-メタノール溶液を加えケン化処理を行った。処理後、中性になるまで水洗し、乾固したのち石油エーテルで定容してカロテノイド測定用の試料とした。カロテノイドの測定には分光光度計を用い、キレンゲツツジの主要色素である - カロテンの比吸光係数 (D453, 2592) より算出し、生花弁 1g あたりの - カロテン等量で表した。色素組成の分析には HPLC を用い、主要色素はフォトダイオードアレイ検出器を用いて標品と比較することにより同定した。各個体の HPLC 分析は 3 反復行った。

## (2) カロテノイド生合成および開列酵素遺伝子群の単離および発現解析

緑蕾 (Stage 1)、開花前日 (Stage 2)、開花当日 (Stage 3)、同 2 日後 (Stage 4) および 5 日後 (Stage 5) の花弁の下部 2 弁より全 RNA を抽出し逆転写反応を行った。これを鋳型にして、IPI, PDS, PSY, CRST10, ZDS, LCYB, LCYE, HYB, CCD1 および CCD4 の 10 遺伝子について、既知の植物群の塩基配列をもとに縮重プライマーを作成し Degenerated PCR を行った。その後、3' および 5' RACE 法により各遺伝子の全長塩基配列情報を得た。得られた塩基配列をもとにプライマーを作成し、SYBR Green 検出系によるリアルタイム PCR を行い、相対的定量法による各遺伝子の発現量を調査した。発現解析は各処理区 3 反復で行い、チューキ法により有意差を検定した。

## 4. 研究成果

### (1) 生育に伴う花色の変化

花色について、正の値が高いほど濃い黄色を示す b\* 値を調査したところ、キレンゲツツジでは開花前日の花弁で 50.73、開花当日で 51.18、開花 5 日後で 43.22 とほぼ同じ値を示した (第 1 表)。

Table 1 Change of a\*, b\*, L and h color values during floral development.

Genotype	Floral stage	a*	b*	L*	h*
<i>R. japonicum f. flavum</i>	1	-10.32c	47.82a	67.90d	102.22a
	2	8.17a	50.73a	78.12bc	80.85de
	3	11.07a	51.18a	80.72bc	77.93c
	4	11.17a	49.33a	79.12bc	77.24c
	5	12.23a	43.22ab	80.00bc	74.22c
'Miyamasatsuki'	1	-8.48c	35.33b	75.50c	103.46a
	2	-3.87bc	22.68c	84.16ab	99.73ab
	3	0.42b	8.28d	88.28a	86.98cd
	4	0.81b	5.71d	88.86a	81.93de
	5	1.15b	5.63d	89.24a	78.76de
F <sub>1</sub>	1	-7.10c	42.97ab	66.83d	99.23ab
	2	-1.32b	32.67b	84.43ab	92.31bc
	3	1.18b	10.15d	88.40a	81.91de
	4	1.25b	10.12a	88.78a	82.95de
	5	1.37b	9.27d	88.10a	81.53de

Means followed by the same letters do not significantly differ (Tukey's compromise test, 1% significance).

一方、ミヤマサツキでは開花前日で 22.68、開花当日で 8.28、開花 5 日後で 5.63 となり、開花ステージが進むにつれ b\* 値は減少した。F<sub>1</sub> 実生では開花前日の花弁で 32.67 と比較的高い b\* 値を示したものの、開花当日には 10.15、開花 5 日後には 9.27 となり、開花ステージの

経過に伴って b\* 値の減少、すなわち退色化がみられた。

### (2) カロテノイド含量および組成の変化

生花弁 1g あたりのカロテノイド含量を調査したところ、キレンゲツツジでは開花前日の花弁で 33.21 μg、開花当日で 32.71 μg、開花 5 日後で 21.22 μg となり、開花 5 日後に減少したものの有意な差はみられなかった (第 2 表)。一方、ミヤマサツキでは開花前日で 5.07 μg であったが、開花当日および 5 日後にはそれぞれ 1.25 μg、0.21 μg となり開花前日に比べ有意に減少した。F<sub>1</sub> 実生では開花前日の花弁で 9.17 μg とキレンゲツツジの 1/3 程度のカロテノイドが含まれていたが、開花当日および 5 日後にはそれぞれ 1.82 μg、2.40 μg とミヤマサツキと同様に、開花前日に比べ有意に減少した。

Table 2 Change of total chlorophyll and carotenoid during floral development.

Genotype	Floral stage	Chlorophyll (μg gFW <sup>-1</sup> )	Carotenoid (μg gFW <sup>-1</sup> )
<i>R. japonicum f. flavum</i>	1	213.15b	31.27ab
	2	41.64c	33.21ab
	3	3.01d	32.71ab
	4	2.58d	30.21ab
	5	2.00d	21.22b
'Miyamasatsuki'	1	140.74b	17.84bc
	2	39.44c	5.07cd
	3	4.26d	1.25d
	4	1.56d	0.57d
	5	0.96d	0.21d
F <sub>1</sub>	1	310.90a	42.18a
	2	26.65c	9.17c
	3	0.77d	1.82d
	4	0.98d	2.02d
	5	0.77d	2.40d

Means followed by the same letters do not significantly differ (Tukey's compromise test, 1% significance).

HPLC 分析では 35 のピークが確認され、そのうち葉およびステージ別の花弁のいずれかで 5% 以上の含有率を示したピークは 8 つであった。若葉のカロテノイド組成は、交配親および F<sub>1</sub> とモルティン (50% 前後) の割合が最も多く、次いで - カロテン (17% 前後) の割合が高かった (第 3 表)。一方、花弁について、緑蕾ではいずれも葉の組成と類似していた。交配親および F<sub>1</sub> 実生のいずれも、花弁の発育に伴い、- カロテンとこれを基質とするキサントフィル類である - クリプトキサントフェンおよびゼアキサントフェンの割合が増加し、逆に、ルテインの割合が減少した。

Table 3 Change of carotenoid composition during floral development.

Genotype	Stage	Carotenoid composition (%)							
		C6	V	C12	L	Z	Cr	Ca	
<i>R. japonicum f. flavum</i>	Leaf	6.56	6.15	0.00	51.44	1.57	0.65	0.00	16.95
	1	7.05	13.52	3.98	36.62	0.00	1.60	0.00	19.43
	2	0.00	1.56	0.00	30.65	5.74	0.82	6.31	45.06
	3	0.00	0.69	0.00	18.48	9.91	0.43	9.46	46.57
	4	0.00	0.72	0.50	16.28	3.82	0.81	9.99	45.88
5	0.00	0.83	2.80	8.02	5.20	1.18	12.98	48.43	
'Miyamasatsuki'	Leaf	5.23	8.20	5.41	49.63	3.41	0.00	0.00	17.83
	1	6.02	6.17	0.46	50.99	0.83	7.88	0.00	15.34
	2	1.16	0.50	0.22	64.37	3.52	1.99	0.00	13.88
3	0.84	4.64	1.08	40.64	0.17	28.03	0.00	7.32	
F <sub>1</sub>	Leaf	7.80	10.94	1.78	46.84	0.00	0.00	0.00	16.82
	1	6.03	11.48	0.48	38.13	0.46	0.00	0.00	19.79
	2	2.24	3.89	1.03	41.37	2.82	2.50	0.00	25.35
	3	1.60	2.25	2.05	23.04	7.01	22.34	0.00	25.60
	4	1.23	2.14	2.83	23.65	12.58	21.28	0.00	22.18
5	1.15	2.84	4.87	26.46	17.50	22.27	0.65	14.38	

Abbreviation: V; Violaxanthin, L; Lutein, Z; Zeaxanthin, Cr; β-Cryptoxanthin, Ca; β-Carotene.

### (3) カロテノイド生合成遺伝子群およびカロテノイド開列酵素遺伝子の単離および発現解析

塩基配列解析の結果、推定されたアミノ酸配列の相同性は、いずれの遺伝子もキレンゲツツジとミヤマサツキの間で 94% 以上と高く、既知の植物とも 72% 以上の相同性を示した (第 4 表)。CCD1 および

CCD4 について、細胞内局在性の解析を行ったところ、CCD4 のみクロロプラスト内への局在性が示唆された。

Table 4 Comparison of deduced amino acid sequences of carotenoid biosynthetic genes from *Rhododendron japonicum* f. *flavum* with evergreen azalea 'Miyamasatsuki' and other plants.

Gene name (Accession No.)	Length	Identify on the Level of deduced amino acid sequences (%)	
		'Miyamasatsuki' (Accession No.)	Other plant (Species, Accession No.)
IPI (LC021366)	235	97 (LC021367)	93 ( <i>Nicotiana glauca</i> , AB049816)
PSY (LC021368)	431 (432) <sup>1</sup>	97 (LC021369)	85 ( <i>Actinidia deliciosa</i> , FJ797304)
PDS (LC021370)	580	97 (LC021371)	88 ( <i>Camellia sinensis</i> , KF646537)
CRISO (LC021372)	596	96 (LC021373)	78 ( <i>Daucus carota</i> , KF322205)
ZDS (LC021374)	593	96 (LC021375)	83 ( <i>Vitis vinifera</i> , JQ319636)
LCYB (LC021376)	504	97 (LC021377)	88 ( <i>Vitis vinifera</i> , JQ319639)
LCYE (LC021378)	524 (519) <sup>1</sup>	97 (LC021379)	83 ( <i>Camellia sinensis</i> , HMS36196)
HYB (LC021380)	303 (304) <sup>1</sup>	96 (LC021381)	72 ( <i>Ipomoea nil</i> , AB499058)
CCD1 ( )	544(513) <sup>1</sup>	94 ( )	85 ( <i>Vitis vinifera</i> , JQ712829)
CCD4 ( )	600	96 ( )	73 ( <i>Osmanthus fragrans</i> , EU334434)

<sup>1</sup> Length of the deduced amino acid sequence of 'Miyamasatsuki'.

発現解析を行ったところ、緑蕾では、IPI および CRISO を除く遺伝子で両親間に有意な発現量の差はなかった(第1図)。しかし、開花前日の蕾以降、いくつかの遺伝子で発現量に差がみられた。特にカロテノイド合成経路の中で上流側に位置する PDS は Stage2 および 3 に、また、PSY は Stage 3 にキレンゲツツジでの発現量がミヤマサツキに比べ有意に高くなった。一方、Stage 2 以降にカロテノイド含量の減少がみられる F1 実生についても、PDS と PSY は比較的高い発現量を示した。さらに、両親系統および F1 実生のいずれも、LCYB に比べ LCYE の発現量が Stage 3 以降に著しく低下した。

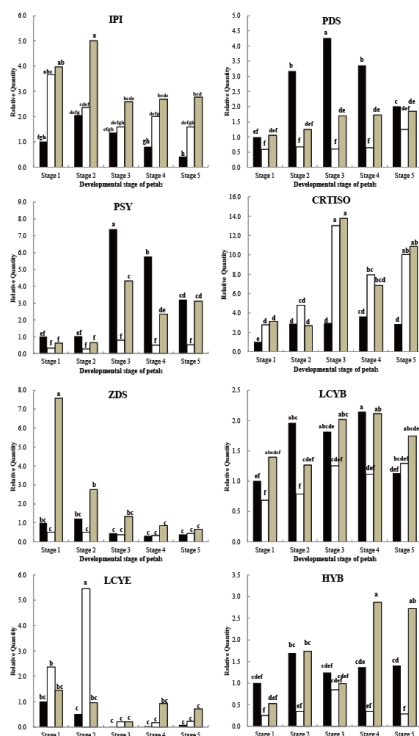


Fig. 1. Relative expression of eight genes involved in carotenoid metabolism during petal development of *Rhododendron japonicum* f. *flavum* (black bars), 'Miyamasatsuki' (white bars) and the progeny (gray bars). Abbreviations: *PSY*, phytylene synthase; *PDS*, phytylene desaturase; *ZDS*,  $\zeta$ -carotene desaturase; *CRISO*, carotenoid isomerase; *LCYB*, lycopene  $\beta$ -cyclase; *LCYE*, lycopene  $\epsilon$ -cyclase; *HYB*,  $\beta$ -carotene hydroxylase. Values marked with different letter indicate statistically significant difference (Tukey's compromise test, 1% significance).

CCD について、発現解析を行ったところ、CCD1 は、花弁発育期間を通して、キレンゲツツジの発現量が高かった(第2図)。一方、CCD4 の発現量は、カロテノイド含量と負の相関がみられ、花弁発育とともにカロテノイド含量の減少がみられるミヤマサツキおよび F1 実生において、生育に伴い発現量の増加がみられた。

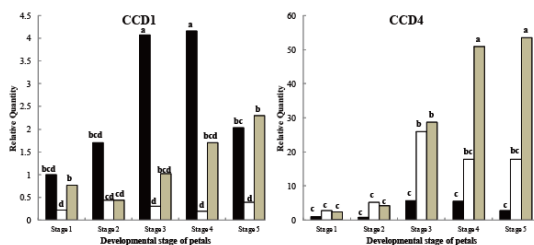


Fig. 2. Relative expression of CCD1 and CCD4 during petal development of *Rhododendron japonicum* f. *flavum* (black bars), 'Miyamasatsuki' (white bars) and the progeny (gray bars). Values marked with different capital letter indicate statistically significant difference (Tukey's compromise test, 1% significance).

#### (4) まとめ

本実験の結果より、F1 実生における花弁内のカロテノイド含量の減少には、CCD4 の発現量の差に起因することが強く示唆された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

嬉野健次・兼城亜紀・宮島郁夫 2015 年 4 月 常緑性ツツジと落葉性キレンゲツツジとの亜属間交配で得られた実生の黄色花弁退色化要因の解明(第4報)カロテノイド合成経路の遺伝子の発現解析 園芸学会春季大会

嬉野健次・田代亜紀羅・宮島郁夫 2014 年 3 月 常緑性ツツジと落葉性キレンゲツツジとの亜属間交配で得られた実生の黄色花弁退色化要因の解明(第3報)葉および花弁に含まれるカロテノイド色素組成の比較 園芸学会春季大会

嬉野健次・中山真義・宮島郁夫 2013 年 3 月 常緑性ツツジと落葉性キレンゲツツジとの亜属間交配で得られた実生の黄色花弁退色化要因の解明(第2報)カロテノイド色素組成の遺伝および花弁生育に伴う組成の変化 園芸学会春季大会

嬉野健次・田代亜紀羅・宮島郁夫 2012 年 9 月 常緑性ツツジと落葉性キレンゲツツジとの亜属間交配で得られた実生の黄色花弁退色化要因の解明(第1報)花弁生育に伴うカロテノイド含量の変化 園芸学会秋季大会

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嬉野 健次 ( URESHINO KENJI )  
琉球大学・農学部・准教授  
研究者番号：10333759

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：