

# 青色芳香シクラメン作出にむけた研究

栗原 千恵\*, 細井 真太郎\*\*, 近藤 恵美子\*\*\*, 荘司 和明\*\*\*\*, 秋田 祐介\*

\*埼玉工業大学大学院 工学研究科 応用化学専攻

\*\*埼玉工業大学 工学部 生命環境化学科

\*\*\*埼玉県農業技術研究センター

\*\*\*\*富山県農林水産総合技術センター 園芸研究所

akita@sit.ac.jp (Y. Akita)

## Genetic Approach for Breeding of the Blue-flowered Fragrant Cyclamen

Chie KURIHARA\*, Shintaro HOSOI\*\*, Emiko KONDO\*\*\*, Kazuaki SHOJI\*\*\*\* and  
Yusuke AKITA\*

\* Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering,  
Saitama Institute of Technology

\*\* Department of Life Science & Green Chemistry, Faculty of Engineering,  
Saitama Institute of Technology

\*\*\* Saitama Prefecture Agricultural Technology Research Center

\*\*\*\* Horticultural Research Institute, Toyama Prefectural Agricultural Forestry &  
Fisheries Research Center

### Abstract

Though many ornamental cyclamen cultivars have various colors (*ex.* purple, pink, red, pale yellow, or white), the blue-flowered cyclamens have not been created yet. For the purpose of creating blue-flowered cyclamen, we previously produced a new flower-colored cyclamen (KMDp) by ion-beam irradiation. KMDp has delphinidin-derived anthocyanin, delphinidin- 3,5-diglucoside (Dp3,5dG) as a main anthocyanin in petals. Dp3,5dG is called ‘blue-pigment’ and blue-rose is also containing Dp3,5dG, however, the flower-color of KMDp is not bluish (red-purple). For modifying the color of flowers (petals), it is needed not only anthocyanin components but also other factors such as co-pigments, vacuolar pH, and metal ions. Some reports are demonstrated that metal ions are effective for flower-coloration. In this study, we analyzed the effect of metal ion for flower-coloration of KMDp, and tried to change the flower-coloration (red-purple to blue) by genetic modification.

Keywords: Anthocyanin, blue-flower, fragrant cyclamen, metal ion

## 1. 緒言

一般的なシクラメンは、原種である *Cyclamen persicum* 1 種から栽培が始まっている。これらの園芸品種では、赤やピンク、黄や紫といった様々な花色をもつ品種が作出されている。一方、これらの園芸品種では乾燥木材のような香りであり、お世辞にも良い香りとはいえない。石坂はバラやヒヤシンス、ユリのような香りのする芳香シクラメン野生種 *C. purpurascens* と *C. persicum* を掛け合わせ、染色体を倍加処理することによって、香りがよく種子も採取可能な「芳香シクラメン」シリーズの作出に成功した<sup>(1)</sup>。この芳香シクラメンシリーズは、花の色が紫色かピンク色のみで、花色のバリエーション増加が求められていた。特に「青色シクラメン」は、これまでに作られたことがなく、シクラメン育種の最終目標の一つとなっている。シクラメンの花色の主成分はアントシアニンであり、アントシアニンの変化が花色の変化につながると考えられる。そこで、「青色芳香シクラメン」の作出を目標として、芳香シクラメンにイオンビームを照射することで突然変異を誘発し、花色の変化した個体の作出を行ってきた。その中で、紫花の芳香シクラメン品種「香りの舞い」(KM) より、花色が変化した個体 (KMDp) を作出した (Fig. 1)<sup>(2)</sup>。この KMDp の主な花色素は Delphinidin 3,5-diglucoside (Dp3,5dG) であり、アントシアニンのメチル基転移酵素 (OMT) の欠失によるものであることが判明している (Fig. 2)<sup>(3)</sup>。この Dp3,5dG は「青色色素」と呼ばれ、青いバラの色素もこの Dp3,5dG である<sup>(4)</sup>。しかしながら、この KMDp の実際の花色は赤紫色であり、青色を呈するには、別の因子が必要であることが予想されている。

アントシアニン以外に花色に影響を及ぼす因子として、フラボノールによる「コピグメント効果」、液胞内の pH などが考えられるが、我々は、金属イオンの存在に着目した。金属イオンと花色の変化の好例として、アジサイがある。アジサイの花色は赤と青であるが、色素は同じアントシアニンであり、この花色の違いには、アルミニウムイオンの有無が大きく関わっている。これまでの研究

より、KM と KMDp との比較で、フラボノールの組成は大差がなかったため、赤紫色の芳香シクラメン KMDp でも花色に関わる金属イオンが存在する可能性が考えられた。そこで本研究では、デルフィニジン系アントシアニンを有する芳香シクラメン変異体 KMDp の花が青色を呈するのに必要な金属イオンの探索を行い、バイオテクノロジー技術によって青色を呈する可能性についての検証を行った。



Fig. 1. Flower of KM (left) and KMDp (right).

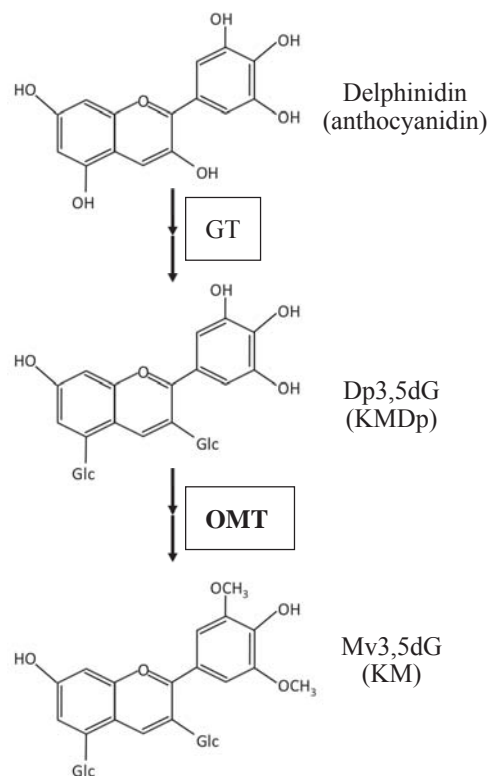


Fig. 2 Schematic representation of late stages in the anthocyanin biosynthesis pathway in cyclamen KM. OMT (highlighted in **bold**) is putatively inactivated in KMDp. GT: glucosyltransferase

## 2. 材料および方法

### 2.1 材料

Malvidin 3,5-diglucoside (Mv3,5dG) を主な花色素とする紫花の芳香シクラメン ‘香りの舞い’ (KM) と, KM へのイオンビーム照射によって得られた花色変異体シクラメン (KMDp) を主な材料とした. また, 色素変化の比較として, Peonidin 3-neohesperidoside (Pn3Nh) を主な花色素とする赤花のシクラメン園芸品種 ‘Strauss’ (‘シュトラウス’) も使用した.

### 2.2 金属イオン添加による色素変化

開花したシクラメンの花弁をサンプリングし, pH を 5.6 に調整した 10%酢酸水を新鮮重の 10 倍量加え, これを乳鉢内ですり潰しながら色素を抽出した. 抽出した色素液はろ紙を用いてろ過した. 抽出液に終濃度 2.0 mM となるように硫酸鉄 (II) 七水和物, 硫酸マグネシウム七水和物, 硫酸銅 (II) 五水和物および硫酸マンガン (II) 五水和物をそれぞれ添加して, 色調の変化を確認した.

### 2.3 パーティクルボンバードメント法によるターゲット遺伝子の導入

直径 1.0  $\mu\text{m}$  の金粒子 (60 mg/mL) を 100% エタノールで洗浄し, 滅菌水でリンスした. これを 50% グリセロールに懸濁し, コーティングに使用した. コーティングは金粒子 50  $\mu\text{L}$  (0.3 mg), DNA 溶液 5  $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 2.5 M  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu\text{L}$ , 0.1 M スペルミジン 20  $\mu\text{L}$  を順番に入れ, 3 分間ボルテックスしながら DNA を金粒子にコーティングした. これを 30 分室温で静置し, 8,000 rpm で 3 分遠心した後, 沈殿をエタノールで洗浄した. 洗浄後, 100% エタノール 50  $\mu\text{L}$  加えてソニケーションし, 5  $\mu\text{L}$  ずつマイクロキャリアにアプライし, 風乾した. これをパーティクルガン (PDS-1000/He system) を用いて 1,350 psi で寒天培地上に置いた KMDp の花弁に打ち込み, 48 時間後に顕微鏡観察を行った.

### 2.4 アグロバクテリウム法による *TgVIT* の

#### 形質転換

アグロバクテリウムはシクラメンの形質転換に最適とされる AGL0 株を使用した. 形質転換用プラスミド DNA の pBI-OX-GW に *TgVIT* を組み込ん

だベクターを作製し, これをエレクトロポレーション法により AGL0 株へ導入した. なお, 今回はプロモーターとして, 過剰発現プロモーターである 35S プロモーター (35Spro) および花特異的プロモーターである MYB プロモーター (MYBpro) の 2 種類を使用した.

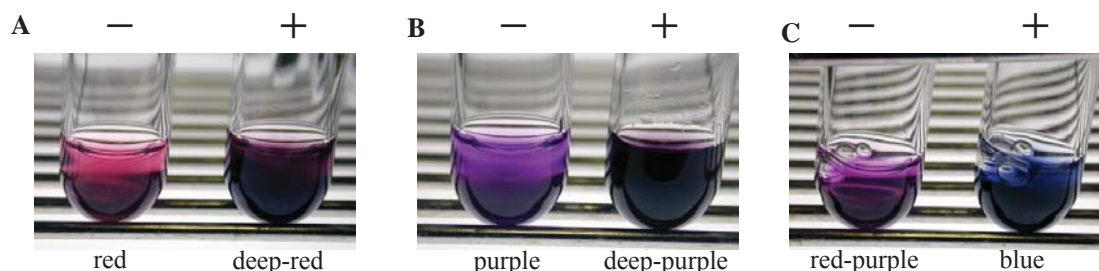
暗黒下で育成した KMDp の黄化葉柄を切断してカルス誘導培地にてカルス化し, 形質転換した AGL0 株を感染させ, 除菌処理後, 抗生物質を添加した培地で育成することで選抜を行った. 選抜後, 発根誘導培地にて発根を促し, その後土壌培地に移植して順化をさせた. 葉が 3 枚ほど展開した後, 葉をサンプリングしてゲノム DNA を抽出し, GFP プライマーを用いて PCR を行い, 導入遺伝子の有無を確認した.

## 3. 結果と考察

### 3.1 鉄イオンによる KMDp 色素の青色化

3 種類のシクラメンの花弁より抽出した色素液に, 終濃度 2.0 mM となる硫酸鉄 (II) 七水和物の水溶液 ( $\text{FeSO}_4$  溶液) を加えたところ, Pn3Nh を花色素とする ‘Strauss’ と, Mv3,5dG を花色素とする KM の色素抽出液では色の深化は起こったが, 青色化は起きなかった (Fig. 3A, B). 一方, KMDp からの色素抽出液では,  $\text{FeSO}_4$  溶液を加えることで青色化を起こした (Fig. 3C). 他の金属イオンを含んだ水溶液を加えても青色化は起きなかった (data not shown). このことより, KMDp の花色素である Dp3,5dG は, 鉄イオンの存在によって青色化が起きることが確認され, この現象は Dp3,5dG 以外の色素では起きないことが明らかとなった.

以上より, KMDp の青色化には金属イオンのうち, 鉄イオンが必要であることが明らかとなった. 青色化への次のステップは, アントシアニンが存在している花弁内の液胞に鉄イオンを輸送することであり, 液胞型の鉄イオントランスポーター (Vacuolar Iron Transporter, VIT) を花弁で機能させることができれば, KMDp の青色化が実現する可能性が考えられた.



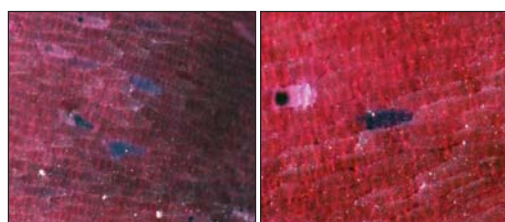
**Fig. 3** Flower extracts from 'Strauss' (A), KM (B) and KMDp (C).

Comparison of color changes between before ( - ) and after ( + ) addition of iron (II) sulfate

### 3.2 パーティクルボンバードメント法による鉄イオントランスポーターの発現

液胞輸送型の鉄イオントランスポーターは、すでにチューリップ (*Tulipa gesneriana*) から単離されており (*TgVIT1*), チューリップの花被が青色化するのに重要であることが報告されている<sup>5</sup>。そこで, *TgVIT1* を過剰発現プロモーターである 35S プロモーター(35Spro)と, 導入確認用のマーカーとして使用した緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein) をコードする遺伝子 (*GFP* 遺伝子) をもった形質転換用ベクターに組込んだ (*GFP-35Spro-TgVIT1*)。これを DNA 溶液として, パーティクルボンバードメント法で KMDp の花弁に *GFP-35Spro-TgVIT1* を導入した。その結果, *TgVIT1* が導入されたと思われる細胞が, 青色に変化していることが確認された (Fig. 4)。

この結果より, KMDp 花弁の青色化には鉄イオンが必要であり, 花弁への鉄イオン輸送にはチューリップ由来のトランスポーターでも十分に機能することが明らかとなった。一方で, パーティクルボンバードメント法ではごく一部の花弁細胞にしか目的遺伝子を導入することができない。本研究の目的は花全体の青色化であり, *TgVIT1* を花全体で機能させることで青色花のシクラメンの作出が可能になると考えられた。

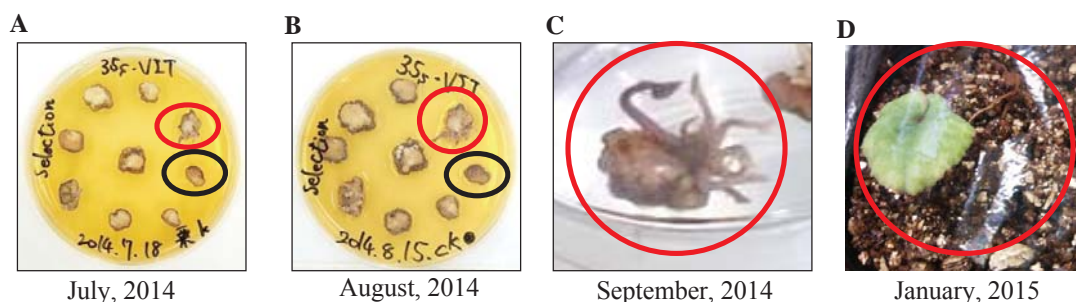


**Fig. 4** Transient expression of *TgVIT1* in red-purple cells of KMDp petals.

### 3.3 アグロバクテリウム法による *TgVIT1* の導入

*TgVIT1* を花全体で発現させるために, アグロバクテリウム法による KMDp の形質転換を行った。ベクターとして, 35Spro を使用した *GFP-35Spro-TgVIT1* と花特異的プロモーターである MYB プロモーター (MYBpro) を使用した形質転換用ベクターに *TgVIT1* を組み込んだ *GFP-MYBpro-TgVIT1* を使用した。アグロバクテリウム感染後, カナマイシンでの選抜を経て成長したカルス (Fig. 5A, B) を発根誘導培地へ移植した (Fig. 5C)。その後, 寒天培地から取り出して土壌培地へ移植して順化を行った (Fig. 5D)。葉が十分に展開した後, 葉からゲノム抽出を行い, *GFP* 遺伝子をターゲットとした PCR を行うことで, ベクターの導入を確認した。*GFP* をターゲットにしたのは, *TgVIT* と相同性の高い配列がシクラメンのゲノム内に存在する可能性も考えられたためである。PCR の結果, 非形質転換体の KMDp では何も増幅は見られず, 形質転換体では, *GFP* と予想サイズが一致する増幅産物が確認された (Fig. 6)。このことより, 選抜から順化まで成長した個体には *TgVIT1* が導入されていることが推察された。しかしながら, *GFP-35Spro-TgVIT1* の導入個体はその後の育成段階ですべて枯死してしまった (data not shown)。これは, 35Spro の影響で鉄イオンが植物体全体に過剰蓄積してしまい, 生育に障害が発生した可能性も考えられた。現在は, 再実験を進めている。一方で, 花だけでの発現を狙った *GFP-MYBpro-TgVIT1* の導入個体は, 現在 3 個体育成中であり, そのうち 2 個体は半年以内に開花する可能性があり, 開花後に花色を観察する予定である。





**Fig. 5** Growth process of transformants regenerated from etiolated petiole of KMDp.

Regenerated plant surrounded with red-circle (A-D) is the same individual surviving from antibiotic selection and a dead one is surrounded with black-circle.

#### 4. 今後の展望

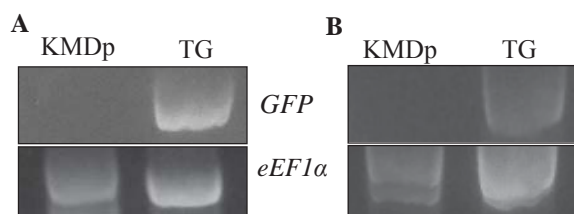
これまでに、「青色色素」である Dp3,5dG を主な花色素とする芳香シクラメン KMDp を世界で始めて獲得し、この花色の青色化には鉄イオンの存在が必要であることを明らかにした。花色の主成分であるアントシアニンは液胞内に存在しているため、液胞に鉄イオンを輸送するトランスポーターである *TgVIT1* 遺伝子の KMDp への導入は、青色シクラメン作出への大きな近道となっている。しかしながら、園芸植物への形質転換効率は総じて低く、導入個体すべてで導入遺伝子が機能するとは限らない。つまり、現状の2個体では心もとないため、形質転換体の数を増やす必要があり、現在は形質転換体数の増加を進めている。また、仮に青色化が成功したとしても、一般的な消費者（我々も含めて）が求める青色になるかは不透明である。そのため、現在は KMDp と花色が異なる別種との交配を行い、Dp3,5dG を有しつつ、花色が薄めのシクラメン個体を育成させている。これに *TgVIT1* を組み込むことで、より求める青色（スカイブルー）に近づけるよう、さらなる研究を続けていく予定である。

#### 5. 謝辞

本研究で用いたシクラメンは、埼玉県花と緑の振興センターの石坂宏博士のご協力の下で育成しました。また、農業・食品産業技術総合研究機構花き研究所の中山真義博士には、色素分析や金属イオンによる花色変化についてご助言をいただきました。形質転換に使用したアグロバクテリウム AGL0 株は、日本原子力研究開発機構の大野豊博士に分譲していただきました。ここに記して謝意を表します。

#### 文献

- 1) H. Ishizaka (2008) *Plant Biotechnol.*, **25**, 511-519
- 2) E. Kondo et al., (2009) *Plant Biotechnol.*, **26**, 565-569
- 3) Y. Akita et al., (2011) *Planta*, **234**, 1127-1136
- 4) Y. Katsumoto et al., (2007) *Plant Cell Physiol.*, **48**, 1589-1600
- 5) K. Momonoi et al., (2009) *Plant J.*, **59**, 437-444



**Fig. 6** Genomic PCR for GFP detection.

Template genomic DNAs were isolated from KMDp, transgenic (TG) KMDp with *GFP-35Spro-TgVIT1* (A) and TG with *GFP-MYBpro-TgVIT1* (B). *eEF1α* was used as a positive control.