

芳香シクラメンの新たな品種候補の探索

秋田 祐介*, 森村 志保*, 三上 莉穂**

*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

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

Researches for breeding of the new fragrant cyclamen

Yusuke AKITA*, Shiho MORIMURA* and Riho MIKAMI**

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

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

Abstract

Cyclamen purpurascens is good material for horticultural breeding of cyclamens because it is unique species that has an attractive fragrance. To improve the commercial value of cyclamen flowers, this fragrance has been introduced into ornamental cultivars. However, variation in flower color is somewhat limited in these cultivars. Therefore, it is needed to understand the genetic networks of flower coloration in *C. purpurascens*. We previously isolated some DNA fragments of flavonoid biosynthetic genes from *C. purpurascens*, broadening our understanding of the biosynthetic pathway of flavonols and anthocyanins, which related with flower coloration. In this study, we report the progress about the molecular analyses of flavonoid biosynthesis-related genes isolated from *C. purpurascens*. We also introduce the fragrant cyclamen cultivars and their flower-colored mutants produced by ion-beam irradiation. We finally discuss the possibility of these mutants to reveal the molecular mechanism about flower coloration in cyclamen.

Keywords: Anthocyanin, flavonol, flower color, fragrant cyclamen

Abbreviations:

ANS; anthocyanidin synthase

CHI; chalcone isomerase

CHS; chalcone synthase

DFR; dihydroflavonol 4-reductase

F3H; flavanone 3-hydroxylase

F3'H; flavonoid 3'-hydroxylase

F3'5'H; flavonoid 3'5'-hydroxylase

FLS; flavonol synthase

GT; *O*-glucosyltransferase

MT; *O*-methyltransferase

PCR; polymerase chain reaction

1. 緒言

花の価値を決める重要な形質として、花の「形」や「色」・「香り」が挙げられる。様々な花が開発・栽培されている中で、我々が研究材料としているシクラメンは、原種である *Cyclamen persicum* ($2n=2x=48$) 1種から多くの園芸品種が作出されており、ホームセンターなどで販売されているシクラメンの大半を占めている。これらの園芸品種は、赤や紫、ピンクや黄色といった花色のバリエーションが豊富であり、八重咲やフリンジ咲といった花形も多種多様である。一方でその香り成分は β -カリオフィレントフムレンが主成分として確認されており、例えるなら、乾燥木材のような香りである。これはあまり好ましい香りとはいえず、シクラメンの「香り」については、開発が難しいとされていた。この問題を解決したのが、別種である *C. purpurascens* ($2n=2x=34$, 図 1A) である。*C. purpurascens* の花は小さく、育成が難しいため園芸的に扱いにくいですが、良い芳香性を持つ。この香氣成分はシンナミックアルコールやシトロネロールが含まれており、バラやヒヤシンス、ユリのような香りがする。この *C. purpurascens* を花粉親

にし、*C. persicum* 園芸品種と掛け合わせ、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」(*C. persicum* x *C. purpurascens*, $2n=4x=82$) の作出に成功した (図 1B-D) ⁽¹⁾。このことより、シクラメン育種に「香り」という新たな形質が作られたと同時に、*C. purpurascens* の価値も見直されることとなった。

この芳香シクラメンシリーズは当初、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。そこで、我々はこれまでに新奇花色をもつ芳香シクラメンの開発のために、イオンビーム照射による花色変異体の作出を進めてきた。そこで、花色の主成分であるアントシアニンを含むフラボノイドの生合成に関わる酵素遺伝子群 (図 2) の研究を進め、DNA マーカーとしての有効性の検討を行ってきた。ここでは、これまでのシクラメンの花色研究について遺伝子レベルでの進捗状況を報告する。さらに作出された新奇花色変異体を紹介し、その変異因子について考察する。最後にこれらの成果をまとめ、これからのシクラメン研究の展望について議論していく。

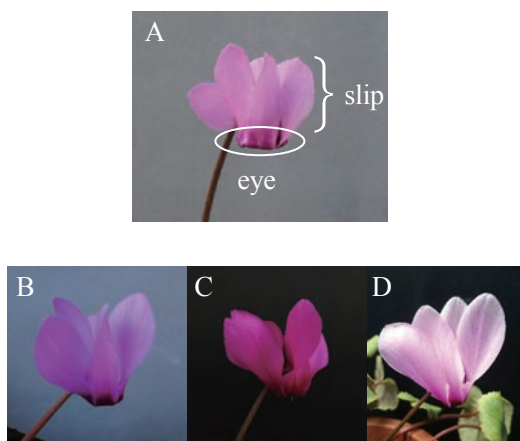


Fig. 1. Flower of cyclamens.
A: *C. purpurascens*, B: 'Koko-no-kaori',
C: 'Kaori-no-mai', D: 'Uruwashi-no-kaori'

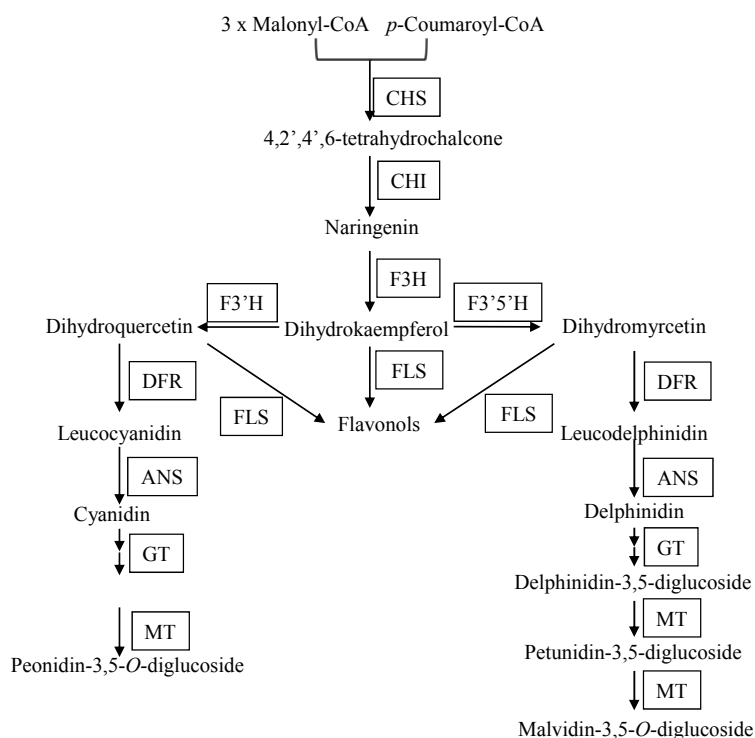


Fig. 2 Schematic representation of the flavonoid biosynthesis pathway in cyclamens.

2. 材料および方法

2.1 材料

芳香シクラメン野生種 *C. purpurascens* と芳香シクラメン品種 ‘孤高の香り’ (KO), ‘香りの舞い’ (KM), および ‘麗しの香り’ (UR) を使用した. 主な花色素は, UR 以外は全て Malvidin 3,5-*O*-diglucoside (Mv3,5dG) というアントシアニンであり, UR は Mv3,5dG だけでなく, Cyanidin 3,5-*O*-diglucoside (Cy3,5dG) および Peonidin 3,5-*O*-diglucoside (Pn3,5dG) も含んでいることが確認されている⁽¹⁾. 各個体の開花前の蕾から, 花弁の大半を占める slip と呼ばれる部分と, 花弁基部にある色の濃い部分 (eye) とに分けてサンプリングし, 液体窒素で急冷した後にディープフリーザーで使用まで保存した.

2.2 花色生合成に関わる遺伝子群の単離

サンプリングした slip を Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB) 法によって total RNA を抽出し, 逆転写反応によって cDNA を合成した. これを鋳型に, Degenerate-PCR によって各遺伝子群の一部を増幅し, シーケンスによって塩基配列を決定した. その後, rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法によって各遺伝子群のオープンリーディングフレーム (ORF) を決定した.

2.3 イオンビーム照射による花色変異体の作出

イオンビーム照射は, 量子科学技術研究開発機構 (QST) 高崎量子応用研究所にある AVF サイクロトロンを使用した. 芳香シクラメン各品種の黄化葉柄に 320 MeV 炭素イオンビーム 0-8 Gy を照射後, 組織培養により再分化個体を獲得し, M₁ 集団を育成した. M₁ 個体の形態観察を行い, 自家受粉により M₂ 種子を採取した. M₂ 種子を基に M₂ 集団を育成し, 花色の選抜を行なった.

2.4 花色変異体の解析

出現した花色変異体の花の生重量に対して 10 倍量の 10%酢酸を加え, すりつぶすことで色素を抽出した. これをろ過したものを, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にかけて, アントシアニン (波長 525 nm) とフラボノール (波長 360 nm) を測定した.

次に, 変異因子の候補となる遺伝子について, 特異的プライマーを設計し, Reverse Transcription (RT) -PCR を行うことで元品種との発現を比較した. 変異体で発現が確認できなかった遺伝子について, 機能解析を行い, ゲノムレベルで比較解析を行うことで変異部位の詳細な特定を目指した.

3. 結果と考察

3.1 花色生合成遺伝子群の単離

C. purpurascens より花色生合成に関わる酵素遺伝子群に相同性の高い配列を, これまでに約 20 種類単離している. その一部は, RT-PCR で発現部位を簡易的に調べた. その結果, 多くの遺伝子が slip と eye で発現し, leaf (葉) で発現が低下していることが確認された (図 3)⁽²⁾. *C. persicum* の園芸品種において, 花色と葉に含まれるアントシアニンが異なっている報告がある⁽³⁾. このことは, 花色生合成に関与する遺伝子群の多くは, 花でのみ特異的に発現して機能している可能性を示している. これによって単離した遺伝子の多くは DNA マーカーとして利用できることも期待される. 一方でこの報告では, アントシアニンの 5 位配糖化酵素 (5GT) に関しては, 花と葉で共通性が見られており⁽³⁾, 遺伝子によって機能する器官が異なっている可能性もある. 今後は遺伝子ごとの詳細な解析が必要になっていく.

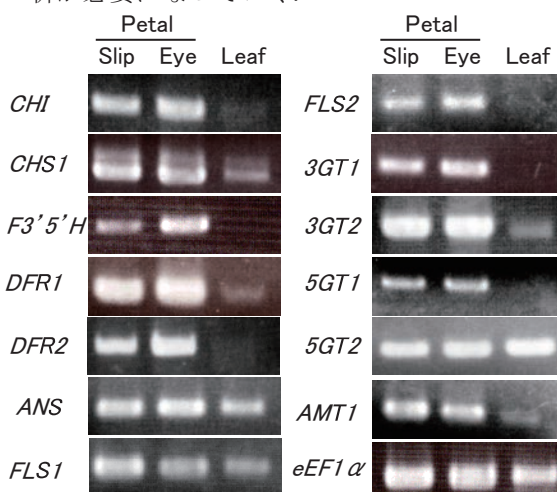


Fig.3 Expression analysis of flavonoid biosynthesis-related genes in *C. purpurascens*. *eEF1α* was used as positive control. (ref. Hase et al. 2012)

3.2 単離した遺伝子の詳細な解析

アントシアニンと同様に花色の変化に関与するものとして、コピグメント効果がある。これはアントシアニンと複合体を形成することで花色の変化を生じさせるものである。コピグメントに関わる因子の一つであるフラボノールは、ジヒドロフラボノールよりフラボノール合成酵素 (FLS) の触媒作用によって合成される (図 2)。これまでに *C. purpurascens* より *FLS* 様遺伝子を 2 種類 (*CpurFLS1*, *CpurFLS2*) 単離してきたが (図 3)⁽²⁾, 簡単な発現解析しか行っていなかったため, さらに詳細な解析を進めた。まず開花前の花の蕾と開花後の花弁, 葯, 葉, 葉柄で発現解析を行った。その結果, *CpurFLS1* は全ての器官で発現していたが, *CpurFLS2* は開花前の蕾で最も強い発現を示し, 開花後にはその発現はほとんど確認できなかった (図 4)⁽⁴⁾。また, モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *fls* 変異体 (*fls1-1*) に *CpurFLS1* と *CpurFLS2* を組込んだところ, それぞれの組換え体でフラボノール含有量が回復していることが確認された (図 5)⁽⁴⁾。このことより, *CpurFLS1*, *CpurFLS2* ともにフラボノールを合成する機能を有していることが明らかとなった。さらに, それぞれの発現パターンが異なっていたことから, 機能分化を起こしている可能性も考えられた。花色に関わる遺伝子群の中には, 開花後に急激に発現量が下がるものが多く報告されている。それは, 花色合成が終了したために, 必要性がなくなったためと考えられ, *CpurFLS2* が似たような発現パターンを示している (図 4)。以上のことより, *CpurFLS2* が花色に関わるフラボノールを合成している可能性が高く, 今後は *CpurFLS2* を中心に基質特異性の解析を進めていく予定である。

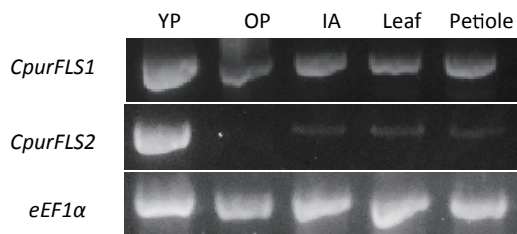


Fig.4 RT-PCR of the *CpurFLS1* and *CpurFLS2* genes. YP: young petals, OP: opened petals, and IA: immature anthers. The *eEF1α* gene was used as an internal control. (ref. Akita et al. 2017)

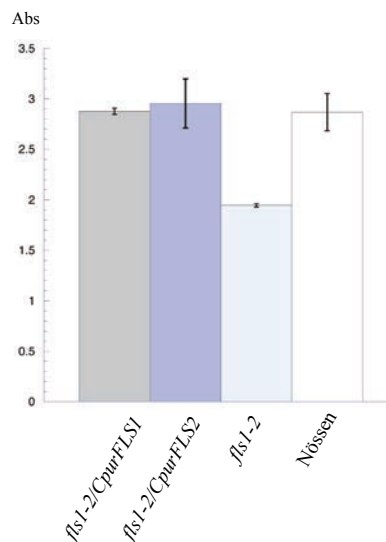


Fig.5 Molecular complementation of *A. thaliana fls* mutants with *CpurFLS1* and *CpurFLS2*. Quantification of flavonols by spectrophotometric analysis. Average results plus the standard error of the mean of three replicates are indicated. (ref. Akita et al. 2017)

3.3 イオンビーム照射による新奇花色変異体

これまでに, イオンビーム照射によって花色に変化の生じた変異体がいくつか作出されている。紫花の KO から, 白花の変異体 (KO_{pw}) および赤紫色の花をもつ KO_{rp} が作出されている (図 6A)。KO よりもやや赤みの強い紫色の花をもつ KM では, さらに赤みの強くなった KMD_p および MY が作出され, 他にも黒みがかかった赤紫色の BRP も作出されている (図 6B)。UR からは花色が濃くなった TN が作出されている (図 6C)。HPLC での花色成分分析により, KO_{pw} ではアントシアニン (Mv3,5dG) が存在せず, KO_{rp} ではフラボノールの存在がほとんど確認されなかった (データ未公表)。これは, フラボノイド生合成に関わる遺伝子群の変異による可能性が非常に高い。KMD_p は, アントシアニンが Delphinidin 3,5-diglucoside (Dp3,5dG) に変わっていることが確認されており⁽⁵⁾, これはメチル基転移酵素 (MT) が KMD_p のゲノム上で完全に欠失していることが確認されている⁽⁶⁾。MY もアントシアニンの構造が変化しており, Mv3,5dG から Malvidin 3-glucoside (Mv3G) に変わっていることが明らかとなっている⁽⁷⁾。TN については, アントシアニンの構造や成分比に大きな変化はなく, アントシ

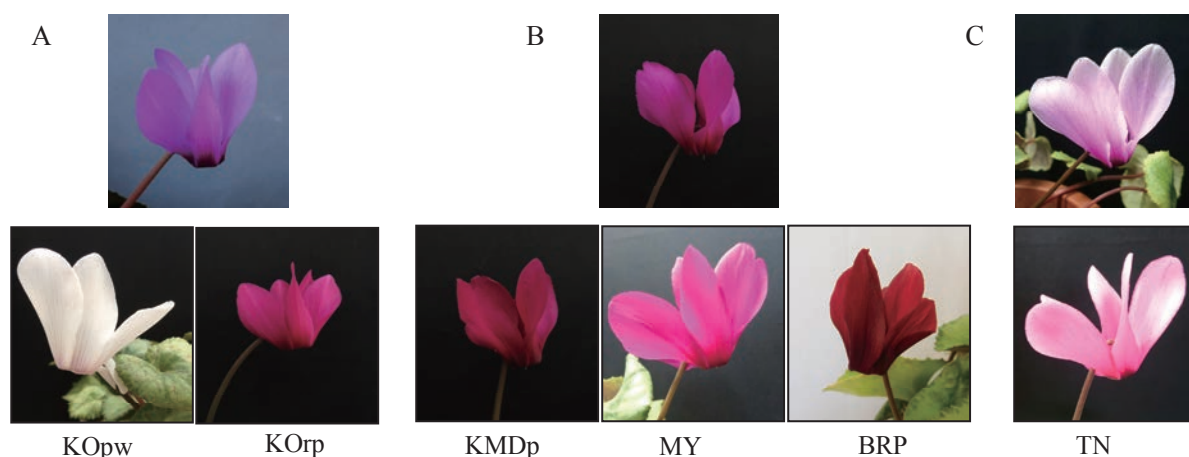


Fig.6 Flower colored mutants of fragrant cyclamens. A: KO and its mutants (KOpw and KOrp).

B: KM and its mutants (KMDp, MY and BRP). C: UR and its mutants (TN).

アニンの含有量が大きく増加し、一方でフラボノール類の含有量は減少している変異体であった (図 6C)⁽⁷⁾. これはフラボノイド生合成に関わる因子が変異したものと異なり、むしろこれらの因子が活性化しているものである。おそらく、フラボノイド生合成に関わる酵素遺伝子群のネガティブレギュレーターが変異しているのではないかと考えている。

4. 今後の展望

これまでに、芳香性野生種 *C. purpurascens* より花色に関わるフラボノイド生合成遺伝子群の単離、解析を進めてきた。発現解析の結果、花卉で主に発現している遺伝子が花色に関わっている可能性が高いが、これだけでは不十分である。特に 5GT や 3GT については、アントシアニンをターゲットにした酵素だけではなく、他のフラボノイド類の配糖化酵素の可能性もある。これはアミノ酸配列だけでは見分けることは難しい。今後は酵素の基質特異性や機能解析を中心とした研究を進め、「真」に花色に関わる酵素遺伝子を同定していかなければならない。

イオンビーム照射による花色変異体は、いくつか作出されてきた。これらの変異体の最大の特徴は、「遺伝的なバックグラウンドが明確である」ことである。これは、栽培の歴史が長い園芸植物の研究では非常に大きなメリットである。今後はこ

れらの変異体を利用することで、「真」に花色に関わる遺伝子群の同定が速やかに進むことを期待している。

5. 謝辞

本研究で用いたシクラメンは埼玉県農業技術研究センターの石坂宏博士、近藤恵美子氏、亀有直子氏が中心に開発、育成しました。また、イオンビーム照射では、量子科学技術研究開発機構・イオンビーム変異誘発グループの皆様にご協力いただきました。ここに記して謝意を表します。

本研究の一部は、JSPS 科研費 (JP15K18641) の助成を受けたものです。

文献

- 1) Ishizaka (2008) *Plant Biotechnol.*, **25**, 511-519
- 2) Hase et al. (2012) *Plant Biotechnol.*, **29**, 193-200
- 3) 高村・濱田 (2015) 香川大学農学部, 67 巻, 31-35
- 4) Akita et al. (2017) *J. Plant Biochem. Biotechnol. online* (DOI: 10.1007/s13562-017-0423-9)
- 5) Kondo et al. (2009) *Plant Biotechnol.*, **26**, 565-569
- 6) Akita et al. (2011) *Planta*, **234**, 1127-1136
- 7) Ishizaka et al. (2012) *Plant Biotechnol.*, **29**, 201-208

