

## カロテノイド代謝工学による新規花色アサガオ作出に関する研究

佐々木 郁弥 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小野 道之 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景・目的】

アサガオ(*Ipomoea nil*)は日本独自に発達した伝統的園芸植物、ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)のモデル植物でもあり豊富な遺伝資源がある。江戸時代には園芸ブームを迎え、その多彩な色や模様、形が広く観賞され熱心に栽培されていた。当時の文献には黄色い花卉を持つアサガオの記述が数多く残っているが、鮮やかな黄色を呈する花色のアサガオは現存しない。

植物の花弁における黄色色素は、フラボノイドとカロテノイド、ベタレインに大別されるが、本研究ではカロテノイドに着目した。カロテノイドは脂溶性で、有色体に蓄積され数段階の酵素反応を経てβカロテンやゼアザンチン、ルテイン等が合成される。カロテノイドは光合成のアンテナ色素で光保護作用を持ち、葉緑体に必ず含まれる。しかし花弁に蓄積しない植物種も多く、アサガオは花弁にカロテノイドを蓄積しない代表的な例である。

先行研究においてキク由来の花弁特異的プロモーター*pF3H* (promoter *Flavanone 3-hydroxylase*)を用いたカロテノイド生合成経路の強化(5 遺伝子 *GPeLC*の導入)と、カロテノイド酸化開裂酵素(*ccd4*)のノックアウトで花弁のカロテノイド濃度はある程度上昇した。しかし、花色は変化無しまたは淡い黄色に留まっている。また、カロテノイド生合成経路の上流の鍵酵素である *DXS* (1-deoxy-D- xylulose-5-phosphate synthase)、カロテノイドを安定化する *XES* (xanthophyll esterase)および *CHRC* (chromoplast-specific carotenoid-associated)、カロテノイド生合成酵素 *PSY* (phytoene synthase)を安定化する *Or* (*Orange*)のcDNAがそれぞれ導入されたが、*Or*を除いて花色に変化はなかった。

これらの結果より、アサガオ花弁におけるカロテノイドによる黄花化のためには生合成の強化、カロテノイド分解の抑制、カロテノイド蓄積が組合わさる必要があると考えた。そこで、上記導入遺伝子群の集積により、花弁のさらなるカロテノイド蓄積をねらう。本研究では、カロテノイド関連遺伝子群の導入およびノックアウトにより、新規花色アサガオを作出し、カロテノイド類の蓄積や有色体分化の制御機構の解明を試みることを目的とする。

## 【材料】

植物は生理実験系統の *st. Violet*、その白花変異体の *st. AK77*[アントシアニン生合成系酵素をコードする *DFR-B* (*dihydroflavonol 4-reductase*)のトランスポゾンによる変異体]およびアサガオと同じ *Ipomoea* 属で黄花を持つキバナイポメア (*Ipomoea obscura* var. *lutea*: Q1111)を用いた。 *GPeLC* (*pF3H*)と *XES* (*p35S*)、*CHRC* (*pF3H*)はキバナイポメア由来、*DXS* (*p35S*)は内生由来、*Or*は内生遺伝子に黄色の蓄を形成するカリフラワー変異体様の挿入を加え *Or\_INS* (*p35S*)とした(Watanabe 未発表)。*ccd4*はCRISPR/Cas9の導入によりノックアウトされた(Watanabe *et al.* 2018)。

## 【方法】

- カロテノイド蓄積におけるプロモーターの有効性の検討 *p35S::GUS*および *pF3H::GUS*の花弁嚙間をGUS染色した。それらの切片の顕微鏡観察を行い、キバナイポメア花弁嚙間のカロテノイドの蓄積部位と比較した。
- 導入遺伝子群の集積 交配によって導入遺伝子群を集積した。

## 【結果】

1. カロテノイド蓄積におけるプロモーターの有効性の検討 キバナイポメアの花弁嚙間はカロテノイドが主に向軸側のL1層の細胞に蓄積していた。*p35S::GUS*はL1~3層に関係なくすべての細胞が染色、*pF3H::GUS*は向軸側のL1層と維管束が染色されておりキバナイポメアのカロテノイド蓄積部位と一致していた。
2. 導入遺伝子群の集積状況 *GPeLC*#13-11 ; *ccd*#13-3 ; *Or\_INS*#48-1 の F2 , *XES*#9-1 ; *DXS*#4-1 ; *ccd*#13-1 の F2, *GPeLC*#13-11 ; *ccd*#13-3 ; *CHRC*#11-2 の F2 を作出, 開花を待つ。
3. 形質転換体および導入遺伝子集積個体の表現型 詳細は卒業研究発表会にて報告する。

## 【考察・展望】

キバナイポメアの花弁におけるカロテノイド蓄積部位は、主に向軸側のL1層の細胞であった。GUS染色した *p35S::GUS* と *pF3H::GUS* の花弁嚙間の観察より、花弁において *p35S* はL1~L3層の細胞、*pF3H* は向軸側のL1層の細胞と維管束で発現をもたらすプロモーターであることが分かった。これは *p35S* および *pF3H* による遺伝子発現部位がキバナイポメアのカロテノイド蓄積部位に重なることを示す。したがって *p35S* および *pF3H* はアサガオ花弁の黄花化のためのカロテノイド関連遺伝子群の発現に有効なプロモーターであると考えられる。

本研究によりカロテノイド代謝の総合的制御による黄花花弁作出の新たな方法の開発することで、江戸時代に存在したとされる黄花アサガオを再現し、遺伝子組換えやゲノム編集技術に対する国民的理解に貢献することを期待している。

今後は、花弁における導入遺伝子群の発現解析、HPLC解析により色素の定性・定量を行う。また導入遺伝子群の集積を継続する。

## 【謝辞】

共同研究者の小田(山溝)千尋博士・大宮あけみ博士(農研機構)、種子の提供していただいたNBRP「アサガオ」に感謝申し上げます。