

シロイヌナズナ由来 MBW 複合体関連遺伝子が導入された ユリ‘アカプルコ’形質転換体の形質調査

藤本卓生・大谷真広・中野 優*

(2019年12月19日受付)

要 約

花き園芸植物において、花色や葉色は重要な形質である。アントシアニン類は花色や葉色を決定する主要な色素であり、それらはフラボノイド生合成経路により合成される。R2R3-MYB タンパク質、bHLH タンパク質および WDR タンパク質は、複合体 (MBW 複合体) を形成し、フラボノイド生合成酵素遺伝子の転写を活性化することが知られている。本研究では、MBW 複合体関連遺伝子を用いた形質転換によるユリ‘アカプルコ’の花色および葉色の改変を目的として、シロイヌナズナ由来 MBW 複合体関連遺伝子が単独または複数組み合わせで導入された形質転換体の形質調査を行った。一部の形質転換系統では、小植物体の栄養器官が薄赤紫色または濃赤紫色に変化していた。これまでに 4 系統の形質転換体が開花に至ったが、bHLH 遺伝子が単独で導入された 2 系統の形質転換体においては、非形質転換体と比較して花被色が濃くなっていた。形質転換体の花被におけるアントシアニン類の定量分析を行ったところ、色が濃く変化した花被の総アントシアニン含量は非形質転換体と比較して有意に増加していた。これらの結果から、外来 MBW 複合体遺伝子の異所発現により、小植物体の栄養器官や花被における内生フラボノイド生合成酵素遺伝子の転写が活性化され、アントシアニン類の生合成および蓄積が促進されたと考えられる。本研究により、MBW 複合体関連遺伝子を用いた形質転換によるユリの花色および葉色の改変の可能性が示された。

新大農研報, 72:1-6, 2020

キーワード：アントシアニン、MBW 複合体、花き園芸植物、フラボノイド生合成経路、ユリ

花色や葉色は花き園芸植物において重要な形質であり、新たな花色や葉色をもつ新品種の作出は、花き園芸植物の育種目標の 1 つとなっている。アントシアニン類は花色や葉色を決定する主要な色素であり、それらはフラボノイド生合成経路により合成される。この経路はすでに多くの植物種において詳細に解明されており (Forkmann, 1991; Koes ら, 2005)、フラボノイド生合成酵素の遺伝子も様々な植物種から単離されている。また、一部の花き園芸植物では、フラボノイド生合成酵素遺伝子を単独で用いた形質転換による花色の改変が成功している (Kamiishi ら, 2012; Noda ら, 2013)。

一方、近年、黄葉・銅葉・赤葉などカラフルな色彩の葉をもつ花き園芸植物がカラーリーフプランツと呼ばれるようになり、その人気が高まっている。多くのカラーリーフプランツでは、アントシアニン類が葉の細胞で多量に生合成および蓄積されていることから、葉におけるアントシアニン類の生合成誘導により、新たなカラーリーフプランツの作出を行うことができると考えられる。しかしながら、一般的な植物の葉においては複数のフラボノイド生合成酵素遺伝子の発現が欠如しており、単独のフラボノイド生合成酵素遺伝子を用いた形質転換ではアントシアニン類の生合成は生じない。したがって、複数のフラボノイド生合成酵素遺伝子を同時に導入するか、発現を同時に活性化させる必要がある (Kanemaki ら, 2018)。

R2R3-MYB タンパク質、塩基性ヘリックスループヘリックス (basic helix-loop-helix; bHLH) タンパク質および WD40 リピート (WD40 repeat; WDR) タンパク質は、複合体 (MBW 複合体) を形成し、複数のフラボノイド生合成酵素遺伝子の発現を同時に活性化することでアントシアニン類の生合成を誘導する (Koes ら, 2005)。これらのタンパク質をコードする遺伝子のうち、R2R3-MYB 遺伝子は様々な植物から単離されてお

り、その異所発現により植物体全体におけるアントシアニン類の顕著な生合成および蓄積が誘導されている (Bradley ら, 1998; Laitinen ら, 2008)。したがって、R2R3-MYB 遺伝子を用いた形質転換は、花色および葉色の改変に有効であると考えられる。

ユリ (*Lilium* spp.) は、ユリ科に属する重要な花き園芸植物である。一部の品種ではアグロバクテリウム法による形質転換システムが確立されているが (Hoshi ら, 2004, 2005; Wang ら, 2012)、MBW 複合体関連遺伝子を用いた形質転換は行われていない。本研究では、MBW 複合体関連遺伝子を用いた形質転換によるユリの花色および葉色の改変を目的として、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来 MBW 複合体関連遺伝子が単独または複数組み合わせで導入された形質転換体の形質調査を行った。

材料および方法

植物材料

植物材料には、ユリ‘アカプルコ’の形質転換体を用いた。これらの形質転換体には、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター制御下のシロイヌナズナ由来 R2R3-MYB 遺伝子 *PAP1* (アクセッション番号 AF325123; GenBank/EMBL/DDBJ データベース)、bHLH 遺伝子 *GL3* (アクセッション番号 AF246291; GenBank/EMBL/DDBJ データベース) および WDR 遺伝子 *TTG1* (アクセッション番号 AK227211; GenBank/EMBL/DDBJ データベース) が単独または複数組み合わせで導入されている (P1、*PAP1*が単独で導入された系統; G1、*GL3*が単独で導入された系統; T1、*TTG1*が単独で導入された系統; PG、*PAP1*および *GL3*が導

入された系統; PT、*PAP1*および *TTGI*が導入された系統; GT、*GL3*および *TTGI*が導入された系統; PGT、*PAP1*、*GL3*および *TTGI*が導入された系統)。なお、これらの遺伝子に加えて、いずれの形質転換体にも、ノバリン合成酵素遺伝子 (*NOS*) プロモーター制御下のカナマイシン耐性遺伝子 (*NPTII*) 遺伝子および *CaMV35S* プロモーター制御下のハイグロマイシン耐性遺伝子 (*HPT*) が導入されている。形質転換小植物体は、鉢に定植して明るい室内 (20~28℃; 日長調節なし) で栽培した。

形質転換体の形質調査

定植時に、形質転換小植物体の新鮮重を調査した。また、定植時における形質転換小植物体の栄養器官 (鱗片、鱗片葉および根) の色の变化、および開花期 (定植して約36カ月後) における形質転換体の葉および花被の色の变化を肉眼で評価した。コントロールとしては、形質転換体と同様の環境下で栽培した非形質転換体を用いた。

アントシアニン定量分析

開花個体における葉および花被のアントシアニン含量は、Kanemakiら (2018) の報告に従って分析した。新鮮重300 mgの葉および100 mgの花被から総アントシアニンを抽出し、抽出液の530 nmおよび657 nmにおける吸光度を分光光度計 (Ultrospec 3000; GE healthcare) により測定し、総アントシアニン含量は、計算式 ($A_{530} - 0.25 \times A_{657}$) $\times M^{-1}$ で算出した (A_{530} 、530 nmにおける吸光度; A_{657} 、657 nmにおける吸光度; M、新鮮重)。コントロールとしては、形質転換体と同様の環境下で栽培した非形質転換体を用いた。

結果

定植時における形質転換小植物体の形質調査

一部の形質転換小植物体においては、栄養器官 (鱗片、鱗片葉または根) に色の变化 (薄赤紫色~濃赤紫色) が観察された (図1)。栄養器官の色の变化を肉眼により3段階で評価し (-、

色の变化なし; +、薄赤紫色に変化; ++、濃赤紫色に変化)、各器官においてそれぞれの色の变化を示す系統の割合を算出した (表1)。形質転換小植物体の鱗片に関しては、導入遺伝子の種類や組み合わせにかかわらず、薄赤紫色に変化 (+) した系統が観察された。また、P1、G1、PG、GT および PGT 系統においては、鱗片が濃赤紫色に変化 (++) した個体も観察された。形質転換小植物体の鱗片葉に関しては、P1、G1、PG、PT および PGT 系統において薄赤紫色に変化 (+) した個体が観察された。また、G1、PG および PGT 系統においては、鱗片葉が濃赤紫色に変化 (++) した個体も観察された。形質転換小植物体の根に関しては、G1、PG、GT および PGT 系統に

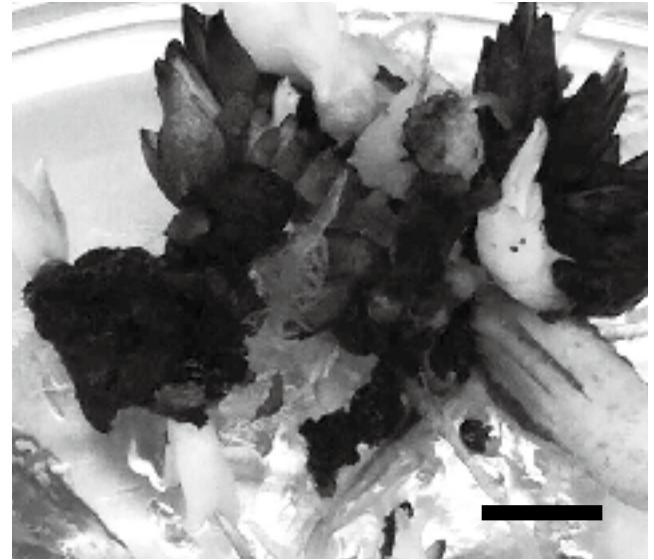


図1 シロイヌナズナ由来 *PAP1* (R2R3-MYB 遺伝子) および *GL3* (bHLH 遺伝子) が導入されたユリ 'アカブルコ' 形質転換小植物体。濃赤紫色に変化した部分が黒く示されている。スケールバー = 1 cm。

表1 シロイヌナズナ由来 MBW 複合体遺伝子が導入されたユリ 'アカブルコ' 形質転換小植物体の各器官における色の变化

形質転換系統 ^a	P1	G1	T1	PG	PT	GT	PGT
全個体数	100	46	100	50	30	60	66
色が変化した個体数 ^b							
鱗片							
-	61 (61.0%)	29 (63.0%)	85 (85.0%)	15 (30.0%)	16 (53.3%)	46 (76.7%)	45 (68.1%)
+	35 (35.0%)	15 (32.6%)	15 (15.0%)	27 (54.0%)	14 (46.7%)	12 (20.0%)	17 (25.8%)
++	4 (4.0%)	2 (4.3%)	0 (0%)	8 (16.0%)	0 (0%)	2 (3.3%)	4 (6.1%)
鱗片葉							
-	81 (81.0%)	40 (86.9%)	100 (100%)	27 (54.0%)	23 (76.7%)	51 (85.0%)	53 (80.3%)
+	19 (19.0%)	5 (10.9%)	0 (0%)	17 (34.0%)	7 (23.3%)	9 (15.0%)	7 (10.6%)
++	0 (0%)	1 (2.2%)	0 (0%)	6 (12.0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (9.1%)
根							
-	100 (100%)	42 (91.3%)	100 (100%)	31 (62.0%)	30 (100%)	57 (95.0%)	56 (84.8%)
+	0 (0%)	3 (6.5%)	0 (0%)	16 (32.0%)	0 (0%)	3 (5.0%)	6 (9.1%)
++	0 (0%)	1 (2.2%)	0 (0%)	3 (6.0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (6.1%)

^a P1、*PAP1* (R2R3-MYB 遺伝子) が単独で導入された系統; G1、*GL3* (bHLH 遺伝子) が単独で導入された系統; T1、*TTGI* (WDR 遺伝子) が単独で導入された系統; PG、*PAP1* および *GL3* が導入された系統; PT、*PAP1* および *TTGI* が導入された系統; GT、*GL3* および *TTGI* が導入された系統; PGT、*PAP1*、*GL3* および *TTGI* が導入された系統。

^b 各形質転換系統における鱗片、鱗片葉および根の色が変化した小植物体数およびその割合 (-、色の变化なし; +、薄赤紫色に変化; ++、濃赤紫色に変化)。

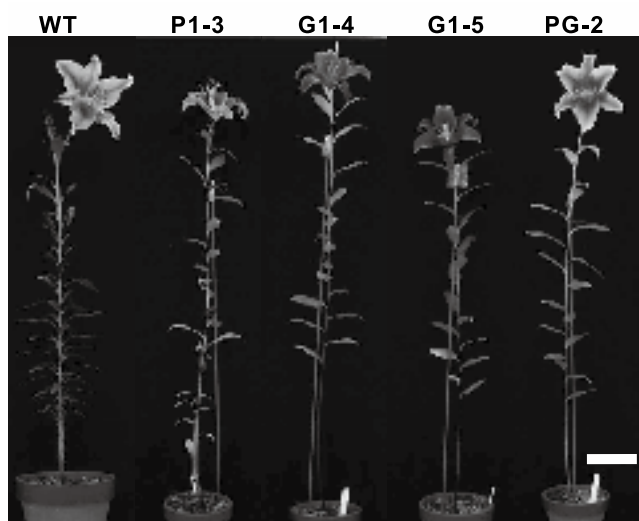


図2 シロイヌナズナ由来 WDR 複合体関連遺伝子が導入されたユリ‘アカプルコ’形質転換体の開花個体。WT、非形質転換体；P1、*PAP1* (*R2R3-MYB* 遺伝子) が単独で導入された系統；G1、*GL3* (*bHLH* 遺伝子) が単独で導入された系統；PG、*PAP1*および *GL3*が導入された系統。スケールバー = 10 cm。

において薄赤紫色に変化 (+) した個体が観察された。また、G1、PG および PGT 系統においては、根が濃赤紫色に変化 (++) した個体も観察された。なお、器官の種類にかかわらず、薄赤紫色に変化 (+) した個体の割合は PG 系統で最も高かった。また、濃赤紫色に変化 (++) した個体の割合は、鱗片および鱗片葉については PG 系統で最も高く、根については PGT 系統で最も高かった。

開花期における形質転換体の形質調査

形質転換体を鉢に定植し、室内で36カ月間栽培した。小植物体の栄養器官に顕著な色の变化を示した形質転換体の多くは、定植後も赤紫色の葉や茎を形成した。しかしながら、このような葉や茎の色が変化した形質転換系統の成長は、非形質転換体と比較して劣っていた。現在のところ、4 個体 (P1-3、G1-4、G1-5 および PG-2) の形質転換体が開花に至っている。これら全ての形質転換系統において、肉眼による葉色の变化は観察されなかった。一方、*GL3*が単独で導入された2 個体 (G1-4 および G1-5) においては、花被色が非形質転換体と比較して濃く変化していた。さらに、G1-4においては、花糸および花柱の一部が薄赤紫色に変化していた (図2；図3)。

開花個体の葉および花被におけるアントシアニン定量分析

開花した4 個体の形質転換体における葉および花被における総アントシアニン含量を分析したところ、葉における総アントシアニン含量に関しては、いずれの形質転換系統においても、非形質転換体と比較して有意差がみられなかった (図4)。一方、花被色が濃く変化した形質転換体 (G1-4 および G1-5) の外花被および内花被における総アントシアニン含量は、非形質転換体と比較して約4 倍と有意に高かった (図4)。この結果から、G1-4 および G1-5 における花被色の变化は、総アントシアニン含量の増加によるものであることが示された。

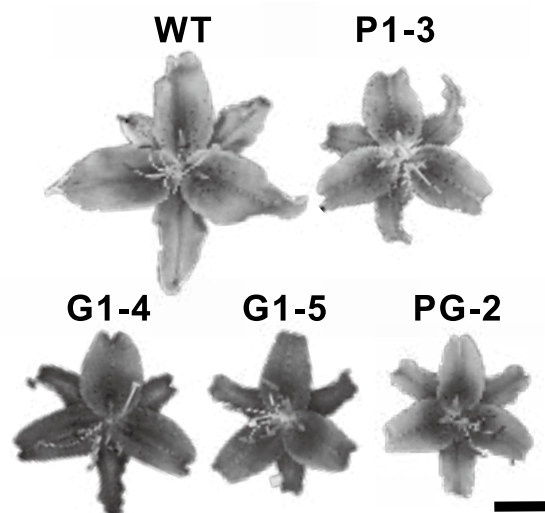


図3 シロイヌナズナ由来 WDR 複合体関連遺伝子が導入されたユリ‘アカプルコ’形質転換体の花器官。WT、非形質転換体；P1、*PAP1* (*R2R3-MYB* 遺伝子) が単独で導入された系統；G1、*GL3* (*bHLH* 遺伝子) が単独で導入された系統；PG、*PAP1*および *GL3*が導入された系統。スケールバー = 5 cm。

考察

本研究で調査した形質転換小植物体の一部では、栄養器官 (鱗片、鱗片葉または根) が薄赤紫色または濃赤紫色に変化していた。分光光度計による分析は行っていないが、これはアントシアニン類の生合成および蓄積によるものと思われる。形質転換小植物体の鱗片に関しては、導入遺伝子の種類や組み合わせにかかわらず色の变化した個体が観察された一方で、根の色が変化した形質転換体は *GL3*が導入された系統 (G1、PG、GT および PGT 系統) でのみ観察された。この結果から、ユリ‘アカプルコ’における内生 MBW 複合体関連遺伝子は栄養器官の種類により異なる発現パターンを示すと考えられ、ユリの根においては内生 *bHLH* 遺伝子が発現していないことが示唆された。

小植物体の栄養器官の色が変化した形質転換体の割合が PG 系統で高かったことから、ユリ栄養器官の色の改変には *R2R3-MYB* 遺伝子と *bHLH* 遺伝子を組み合わせる導入することが効果的であると考えられた。小植物体における栄養器官の色の变化は、鉢植え栽培後に形成された栄養器官にも維持されていたが、このような葉や茎の色が変化した形質転換体の成長は、非形質転換体と比較して明らかに劣っていた。また、開花に至った4 個体の形質転換体の全てにおいて、肉眼による葉色の变化は観察されなかった。これらの結果は、栄養器官におけるアントシアニン類の過剰な蓄積により、形質転換体の成長が抑制されることを示唆している。同様の現象は、*R2R3-MYB* 遺伝子の異所発現により、栄養器官における顕著なアントシアニン類の蓄積が誘導されたペチュニア (Bradley ら、1998)、タバコ (An ら、2015) および宿根トレニア (藤本ら、2018) の形質転換体においても観察されている。

本研究では、4 個体の形質転換体を得られ、うち2 個体の G1 系統において花被色が濃く変化していた。また、これらの花被においては、総アントシアニン含量が非形質転換体と比較

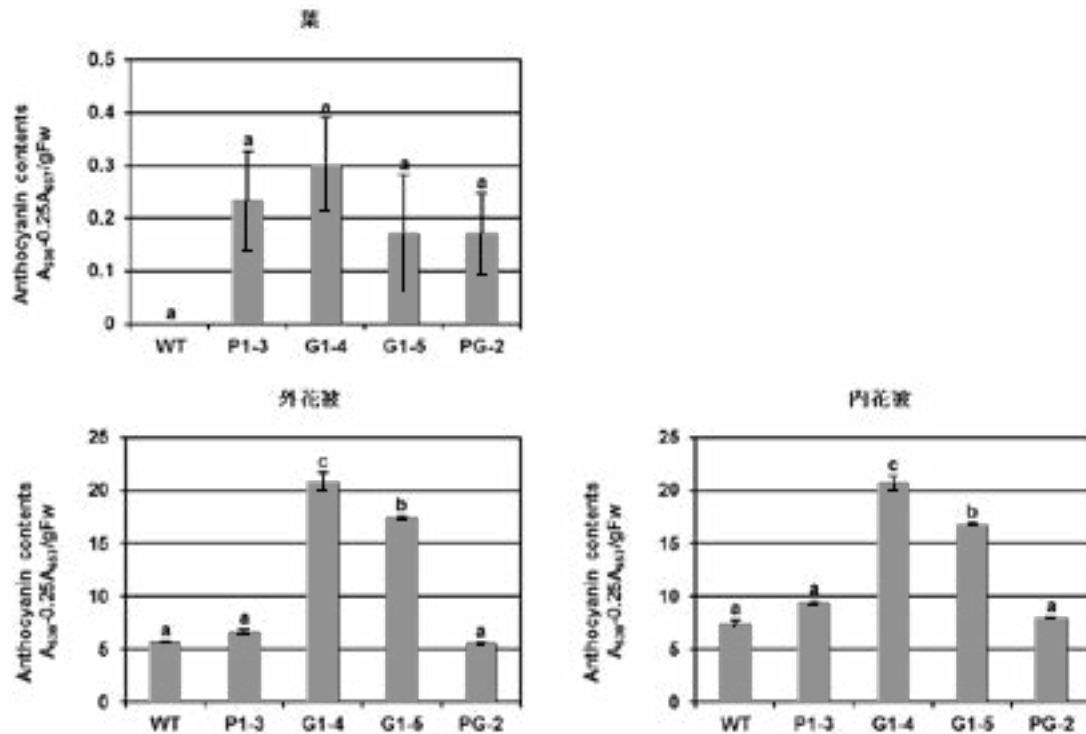


図4 シロイヌナズナ由来 WDR 複合体関連遺伝子が導入されたユリ 'アカブルコ' 形質転換体の開花個体の葉および花被におけるアントシアニン定量分析。WT、非形質転換体；P1、*PAP1* (*R2R3-MYB* 遺伝子) が単独で導入された系統；G1、*GL3* (*bHLH* 遺伝子) が単独で導入された系統；PG、*PAP1* および *GL3* が導入された系統。各分析は3反復し、Tukey-Kramer 法による有意差検定 (1% 水準) を行なった。

して有意に高かった。これらの結果は、ユリの花被におけるアントシアニン類の生合成が、*R2R3-MYB* 遺伝子の発現量よりも *bHLH* 遺伝子の発現量に影響を受けることを示しており、ユリにおけるフラボノイド生合成酵素遺伝子の発現制御において *bHLH* 遺伝子が重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究では、シロイヌナズナ由来 MBW 複合体関連遺伝子の導入により、ユリ 'アカブルコ' の栄養器官および花器官の色の改変に成功した。花色が濃く変化した形質転換体の花被では総アントシアニン含量が有意に増加していたことから、外来 MBW 複合体遺伝子の異所発現により、小植物体の栄養器官や花被における内生フラボノイド生合成酵素遺伝子の発現が活性化され、アントシアニン類の生合成および蓄積が促進されたと考えられる。今後は、ユリの各器官における内生 MBW 複合体関連遺伝子の発現解析および形質転換体における外来 MBW 複合体関連遺伝子の発現解析を行う予定である。また、シロイヌナズナ由来 MBW 複合体関連遺伝子を用いた形質転換が他品種のユリにおける花色および紫色改変に有効かどうかを検討する予定である。

引用文献

- An, C. H., K. W. Lee, S. H. Lee, Y. J. Jeong, S. G. Woo, H. Chun, Y. I. Park, S. S. Kwak and C. Y. Kim. 2015. Heterologous expression of *IbMYB1a* by different promoters exhibits different patterns of anthocyanin accumulation in tobacco. *Plant Physiol. Biochem.*, **89**: 1-10.
- Bradley, J. M., K. M. Davies, S. C. Deroles, S. J. Bloor and D. H. Lewis. 1998. The maize *Lc* regulatory gene up-regulates the flavonoid biosynthetic pathway of *Petunia*. *Plant J.*, **13**: 381-392.
- Forkmann, G. 1991. Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breed.*, **106**: 1-26.
- 藤本卓生・高野美穂・大谷真広・中野 優. 2019. 宿根トレンニアにおける *R2R3-MYB* 遺伝子を用いた形質転換による葉色の改変. 新大農研報, **71**: 35-42.
- Hoshi, Y., M. Kondo, S. Mori, Y. Adachi, M. Nakano and H. Kobayashi. 2004. Production of transgenic lily plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.*, **22**: 359-364.
- Hoshi, Y., M. Kondo, S. Mori, M. Nakano and H. Kobayashi. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lilium longiflorum*. *Acta Hort.*, **673**: 543-547.
- Kamiishi, Y., M. Otani, H. Takagi, D.-S. Han, S. Mori, F. Tatsuzawa, H. Okuhara, H. Kobayashi and M. Nakano. 2012. Flower color alteration in the liliaceous ornamental *Tricyrtis* sp. by RNA interference-mediated suppression of the chalcone synthase gene. *Mol. Breed.*, **30**: 671-680.
- Kanemaki, A., M. Otani, M. Takano, T. Fujimoto, H. Okuhara, T. Nomizu, M. Kondo, H. Kobayashi, F. Tatsuzawa and M. Nakano. 2018. Ectopic expression of the *R2R3-MYB* gene from *Tricyrtis* sp. results in leaf color alteration in

- transgenic *Pelargonium crispum*. *Sci. Hortic.*, **240**: 411-416
- Koes, R., W. Verweij and F. Quattrocchio. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci.*, **10**: 236-242.
- Laitinen, R. A. E., M. Ainasoja, S. K. Broholm, T. H. Teeri and Elomaa, P. 2008. Identification of target genes for a MYB-type anthocyanin regulator in *Gerbera hybrida*. *J. Exp. Bot.*, **59**: 3691-3703.
- Noda, N., R. Aida, S. Kishimoto, K. Ishiguro, M. Fukuchi-Mizutani, Y. Tanaka and A. Ohmiya. 2013. Genetic engineering of novel bluer-colored chrysanthemums produced by accumulation of delphinidin-based anthocyanins. *Plant Cell Physiol.*, **54**: 1684-1695.
- Wang, Y., B. van Kronenburg, T. Menzel, C. Maliepaard, X. Shen and F. Krens. 2012. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of multiple lily cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **111**: 113-122.

Characterization of transgenic *Lilium* 'Acapulco' plants containing MBW-complex-related genes of *Arabidopsis thaliana*

Takuo FUJIMOTO, Masahiro OTANI and Masaru NAKANO*

(Received December 24, 2019)

Summary

Flower and foliage colors are very important traits in ornamental plants. In most cases, anthocyanins are synthesized and accumulated in tepal or leaf cells, resulting in red, purple or violet flowers or leaves. MYB-bHLH-WDR (MBW)-complex, a ternary transcriptional complex, is known to induce anthocyanin accumulation through transcriptional upregulation of multiple genes for the flavonoid biosynthetic pathway. In the present study, we characterized transgenic *Lilium* 'Acapulco' plants containing the MBW-complex genes of *Arabidopsis thaliana* in various combination in order to modify its flower and leaf colors. Some transgenic plantlets had red-purple to deep red-purple vegetative organs (bulb scales, scaly leaves and/or roots). Transgenic plants with colored vegetative organs generally showed poor growth compared with non-transgenic plants, which may be due to an excessive accumulation of anthocyanins. Only four transgenic plants have so far reached the flowering stage, and all of them had green leaves as non-transgenic plants. Among four transgenic plants, two containing only the bHLH gene had deeper red tepals compared with non-transgenic plants. Spectrophotometer analysis showed that the total anthocyanin contents in deeper red tepals was significantly higher than non-transgenic plants. Our results indicate that ectopic expression of the heterogeneous MBW-complex genes in *Lilium* 'Acapulco' may activate the flavonoid biosynthetic pathway leading to anthocyanin synthesis and accumulation in vegetative and floral organs.

Bull. Facul. Agric. Niigata Univ., 72:1-6, 2020

Key words : anthocyanin, flavonoid biosynthetic pathway, *Lilium*, MBW-complex, ornamental plant