

「青いキク」の開発と実用化に向けて

農研機構 野菜花き研究部門
花き遺伝育種研究領域

野田 尚信

はじめに

キク (*Chrysanthemum morifolium*) は、バラに次いで世界的に生産量が多く、三大打り花の一つに数えられる。また、キクは日本において、切り花類の出荷量の約40%となる約15億本（農林水産省 2018a）、産出額の32%となる680億円（農林水産省 2018b）を占める花き産業において最も重要な品目である。このような地位にキクがあるのは、歴史的に日本人に愛されてきたことに加え、これまでの育種によるバラエティに富んだ品種の育成、優れた日持ち性、電照などを利用した開花調節技術による周年安定生産などによると考えられる。日本の切り花生産は、キク、バラ、ユリおよびカーネーションの4品目で総産出額の約55%を占める（図-1）。しかしながら、これらの品目では青い花をもつ交雑可能な近縁野生種が存在しない。このため、青い花色の品種を作出することは、交配や突然変異といった従来の育種方法ではできなかった。また、紫色、青色や水色といった青い花色をもつ切り花の流通割合は低く、仕入れに占める紫色の花の割合は6~7%、青色の花では1~2%となっている（宍戸 2010）。これらのことから、主要な花き品目に青い花色形質を付与するための新たな技術の開発が望まれていた。そこで、農業・食品産業技術総合研究機構（以下、農研機構）では、2001年から遺伝子組換え技術を用いて青い花色のキク

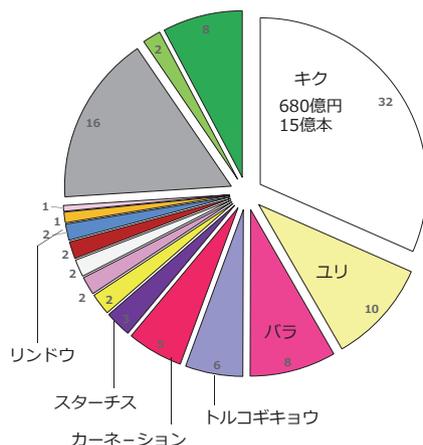


図-1 日本国内での切り花生産におけるキクの割合

農林水産省統計「平成28年花木等生産状況調査」「平成29年産花きの作付（収穫）面積及び出荷量」
円グラフ内の各数値は産出額の割合 (%) を示す。

クを作出する取り組みを開始した。まず遺伝子を導入するためのキク再分化系および形質転換系を確立し（間 2003; Aida *et al.* 2004）、サントリグローバルイノベーションセンター（株）と共同で、青色化に有効と考えられる様々な遺伝子を導入し研究を進めた。その結果、2017年にキクにあざやかな青い花を咲かせる技術の確立に成功した（Noda *et al.* 2017）。本稿ではキクに青色の花色を付与する技術の開発とその青色発色機構、そして現在の取り組みについて紹介する。

アントシアニン色素の基本骨格を改変

キクは交配や突然変異を利用した育種により、白、黄、オレンジ、ピンク、赤、

緑など、様々な花色が作出されている。赤色系はアントシアニン、黄色系はカロテノイド、および緑色はクロロフィルと呼ばれる色素が花卉に蓄積して発色する。これらの色素のうち、アントシアニンは基本骨格であるアントシアニジンに糖（グルコース、ガラクトース、キシロースなど）が結合した配糖体で細胞の液胞中に蓄積する。さらに、結合した糖に脂肪族や芳香族の有機酸が結合する場合もあり、アントシアニン色素の安定性向上や発色の多様性を生み出している。

アントシアニジンはA, B, C環の3つの環構造からなり、B環の水酸基(-OH)やメトキシル基(-OCH₃)の数により色調が異なり、B環の水酸化の程度により、ペラルゴニジン型、シアニジン型、デルフィニジン型の3タイプに分けることができる。キクの花弁の発色を担うのはシアニジン型アントシアニンである。色素の色調としては、水酸基の数が多いほど青みを増す傾向にある（図-2）。ペラルゴニジン型アントシアニンで青を発色している植物の報告例はなく、シアニジンやペオニジンといったシアニジン型アントシアニンでも非常に少ない。これまでにエゾエンゴサク (*Corydalis ambigua*)、ヤグルマギク (*Centaurea cyanus*)、ソライロアサガオ (*Ipomoea tricolor*)、青いケシ (*Meconopsis* spp.) 等の限られた青い花の主要色素としてシアニジン型アントシアニンが報告されている（Tatsuzawa *et al.* 2005; Yoshida *et al.* 2009）。紫や青

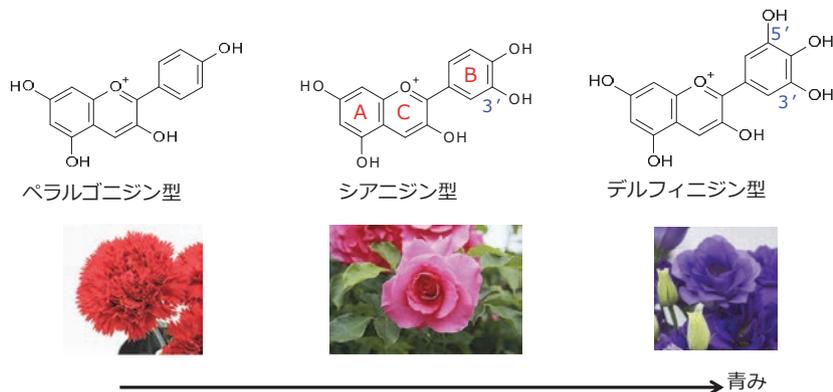


図-2 アントシアニンの基本骨格と花色

ベラルゴニジン型アントシアニンで発色するカーネーション、シアニジン型アントシアニンで発色するバラ、デルフィニジン型アントシアニンで発色するトルコギキョウ

などの青い花に含まれるアントシアニンの多くは、デルフィニジン、ペチュニジン、マルビジンといったデルフィニジン型である。

このデルフィニジンの生合成において鍵となる酵素は、フラボノイド 3', 5'-水酸化酵素 (F3' 5' H) である。この酵素はアントシアニンの生合成系において、デルフィニジンの前駆体であるフラバノンやジヒドロフラボノールの B 環 3' 位及び 5' 位の水酸化を触媒する。このフラボノイド 3', 5'-水酸化酵素をコードする遺伝子である F3'5'H が初めてクローニングされたのはペチュニアからであった (Holton *et al.* 1993)。その後、様々な植物種から当該遺伝子がクローニングされ、遺伝子導入によるデルフィニジンの人為的な合成が試みられた。多くの研究の結果、導入した F3'5'H の由来や宿主の違いにより、デルフィニジン型アントシアニンの生産性に違いがあることが判った。青い花がなかった花きにおいてデルフィニジン型アントシアニンを合成・蓄積させる上で最適な F3'5'H は、カーネーションではペチュニア (*Petunia hybrida*)、ブルーサルビア (*Salvia spp.*) やパンジー (*Viola spp.*) 由来、バラではパンジー由来であることが判っている (Tanaka and Brugliera 2013)。

キクでは、10 種類以上の F3'5'H を用いて検討したところ、キキョウ科のカンパニュラ (*Campanula medium*) 由来の F3'5'H が最適であった。カンパニュラ F3'5'H は、ユリ (田中ら 2012) やタバコ (Okinaka *et al.* 2003) の花卉でデルフィニジンを合成させる上でも適していることが報告されている。また、F3'5'H の発現を制御するために用いるプロモーター配列についても 10 種類以上を試験した。その結果、カンパニュラ F3'5'H を、キク由来のフラバノン 3-水酸化酵素 (F3H) 遺伝子のプロモーター配列とタバコなどのアルコール脱水素酵素 (ADH) 遺伝子の 5' 非翻訳領域 (ADH-5' UTR) を翻訳促進因子に用いて F3'5'H を発現させることで、花卉に含まれるアントシアニンのほぼ 100% をデルフィニジン型アントシアニンにできることを明らかにし、花色が紫～青紫色を呈するキクの作出に成功した (Noda *et al.* 2013)。

花の青色発色メカニズムの適用

キクの花弁で外来の F3'5'H を機能させてアントシアニンの基本骨格をシアニジンからデルフィニジンに改変することに成功したことから、次に、よ

りあざやかな青色を発色させるための研究を進めた。

青色の花の発色には大きく 2 通りのメカニズムがある。ひとつは、アントシアニンに 2 分子以上の芳香族有機酸 (芳香族アシル基) が結合したポリアシル化アントシアニンの蓄積である。アントシアニンと芳香族アシル基が分子内会合し相互作用することで青を発色する。このメカニズムにより青を発色する花の例として、リンドウ (*Gentiana spp.*)、デルフィニウム (*Delphinium spp.*)、キキョウ (*Platycodon grandiflorus*) などがあげられる (Yoshida *et al.* 2009)。ソライロアサガオでは、アントシアニンのポリアシル化に加えて液胞内 pH の弱アルカリ化も関係する (Fukuda-Tanaka *et al.* 2000)。もうひとつは、アントシアニンが他の化合物や金属イオンと共存して青くなる場合で、アントシアニンがフラボノイド類や有機酸エステル類といった助色素 (コピグメント) および金属イオンとの分子間相互作用または錯体形成により青を発色する。金属イオンが関係しない例としてはダッチアイリス (*Iris hollandica*) やトレニア (*Torenia fournieri*) など、金属イオンが関係する例としては、ツククサ (*Commelina communis*)、ヤグルマギク (*Centaurea cyanus*)、アジサイ (*Hydrangea macrophylla*)、青いケシ (*Meconopsis spp.*) などの青い花が該当する (Yoshida *et al.* 2009)。ツククサやヤグルマギクなどは金属錯体形成が青色発色の要因になってい

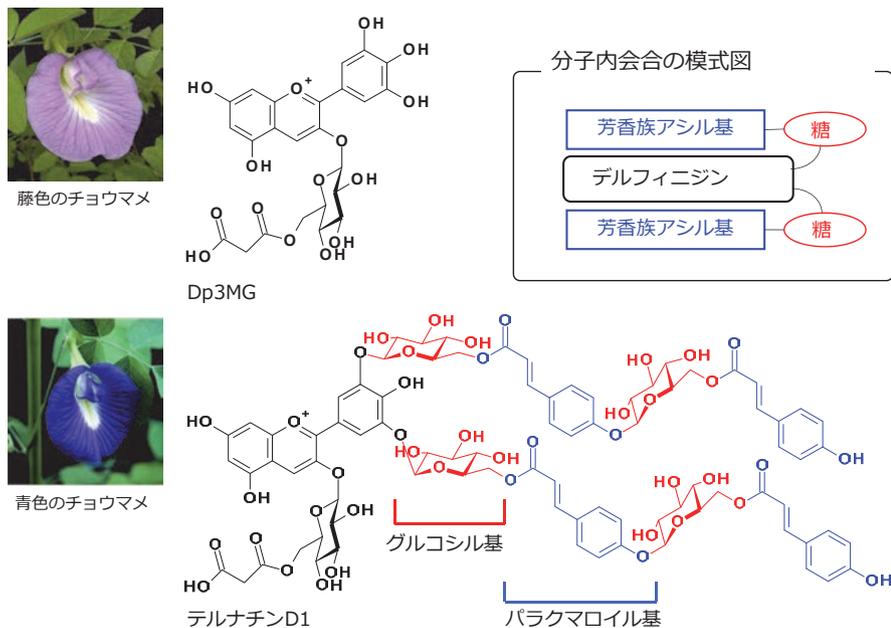


図-3 アントシアニンのポリアシル化による青の発色例

芳香族アシル基がデルフィニジンとサンドイッチ状に会合し相互作用することで青を発色すると考えられている (分子内会合の模式図)。Dp3MG: デルフィニジン 3-(6''-マロニル) グルコシド

る。このように、キクの花弁をあざやかな青に発色させるためには、*F3'5'H*を発現させることによりアントシアニンの基本骨格をデルフィニジン型に改変することに加えて、糖を介した複数の芳香族有機酸による修飾 (ポリアシル化) や、助色素や金属イオンとの共存といった青色発色メカニズムの導入が必要と考えられた。

筆者らは、マメ科のチョウマメ (*Clitoria ternatea*) の花色に注目した。チョウマメの青い花は、テルナチン類と呼ばれるポリアシル化アントシアニンの蓄積で発色している (Saito *et al.* 1985)。これまでに 15 種類報告さ

れているテルナチン類は、デルフィニジン 3-(6''-マロニル) グルコシド (Dp3MG) を共通の構造に持ち、デルフィニジンの B 環に位置する 3' 位および 5' 位の水酸基に、様々な長さでグルコシル基とパラクマロイル基が交互に結合している (寺原 1993)。この B 環の修飾が行われていない Dp3MG が花弁に蓄積している変異体の花色は藤色になる (Kazuma *et al.* 2003) (図-3)。また *F3'5'H* を導入して紫色に花色を改変したキク花弁の主要色素も藤色のチョウマメと同じく Dp3MG であった (Noda *et al.* 2013)。このことから、アントシアニ

ンの基本骨格をデルフィニジン型に改変することに加えて、糖を介した複数の芳香族有機酸による修飾を行い、テルナチン類を合成させれば、チョウマメのような青い花色にキクを改変できると考えられた。そこで、青を発色するテルナチン類の中で最も単純な構造であるテルナチン D3 [デルフィニジン 3-(6''-マロニル) グルコシド-3', 5'-ジ-(6'''-パラクマロイル) グルコシド] をキクで合成することを目指して研究を進めた。テルナチン D3 を合成するためには、*F3'5'H* に加え、3' 位および 5' 位の水酸基を共にグルコシル化するアントシアニン 3', 5'-グルコシル基転移酵素 (A3' 5' GT), 3' 位および 5' 位に結合したグルコシル基をアシル化するアントシアニン 3', 5'-アシル基転移酵素 (A3' 5' AT), そして A3' 5' AT のアシル基供与体である 1-O-アシルグルコースを合成するためのヒドロキシケイ皮酸 1-O-グルコシル基転移酵素 (アシルグルコース合成酵素, AGS) をコードする 3 つの遺伝子が必要である (野

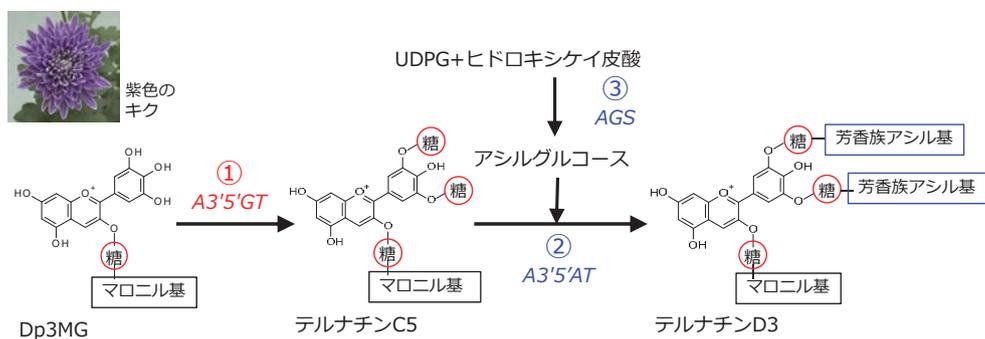


図-4 キクで青色色素テルナチン D3 をつくらせるために必要な酵素遺伝子

A3'5'GT: アントシアニン 3', 5'-グルコシル基転移酵素遺伝子, A3'5'AT: アントシアニン 3', 5'-アシル基転移酵素遺伝子, AGS: ヒドロキシケイ皮酸 1-O-グルコシル基転移酵素遺伝子 (アシルグルコース合成酵素遺伝子), 糖: グルコシル基, UDPG: UDP-グルコース



図-5 カンパニュラ F3'5'H とチョウマメ A3'5'GT の導入によるキク花卉の青色化の例

田ら 2004, 2005, 2006) (図-4)。これらの遺伝子をキクへ導入したところ、意外なことに F3'5'H と A3'5'GT の遺伝子2つを働かせて、Dp3MG の3'位および5'位をグルコシル化したテルナチン C5 [デルフィニジン 3-(6''-マロニル)グルコシド-3', 5'-ジグルコシド] を合成させるだけで、キクの花弁が青色に改変できることが明らかになった (図-5)。花卉の青色は、英国王立園芸協会のカラーチャート (RHS カラーチャート) で Blue 100, Violet-Blue 97, 96, 95 等を、CIE (国際照明委員会) による L*a*b* 表色系の色相角において 230 ~ 290° を示した。

想定していたよりも少ない数の遺伝子を導入することで、キク花卉の青色化を達成することができたが、青の発

色には複数の芳香族有機酸により修飾する必要があったと考えていたため、青色発色のメカニズムは不明であった。また、これまでアントシアニンの3'位および5'位がグルコシル化されると、可視部の吸収極大波長が短波長側にシフトすることから、テルナチン C5 のようなアントシアニンが花卉に蓄積すると花色は赤くなると考えられていた。そこで次に、キクが青くなったメカニズムの解明を行った。

青いキクの主要色素であるテルナチン C5 を花卉搾汁と同じ pH5.6 の緩衝液に溶解したところ紫色を呈した。また、その吸収スペクトルを測定したところ、青い生花卉の吸収スペクトルと比べて、吸収極大波長が短波長側に

あり、600 ~ 620nm 付近の光の吸収が小さいことが示された。このことから、キク花卉の青色発色はテルナチン C5 の蓄積だけではなく、テルナチン C5 と相互作用することで吸収極大の長波長側へのシフトと 600 ~ 620nm 付近の光の吸収を増大させる助色素 (コピグメント) の関与が示唆された。

そこで、交差薄層クロマトグラフィー (交差 TLC) 法を用いて、青色花卉の抽出物に含まれるアントシアニンと共存するとアントシアニンの発色を青色方向にシフトさせるコピグメントの探索を行った。交差 TLC 法は、化合物の分離と混合を一度に行うことで、化合物間の相互作用を解析することができる (中山 2015)。花卉抽出

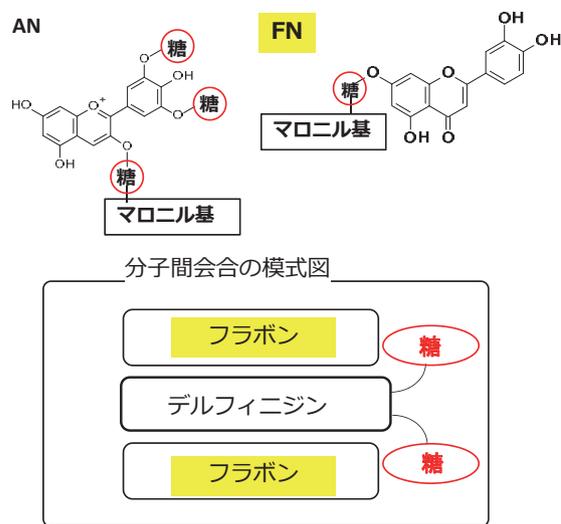
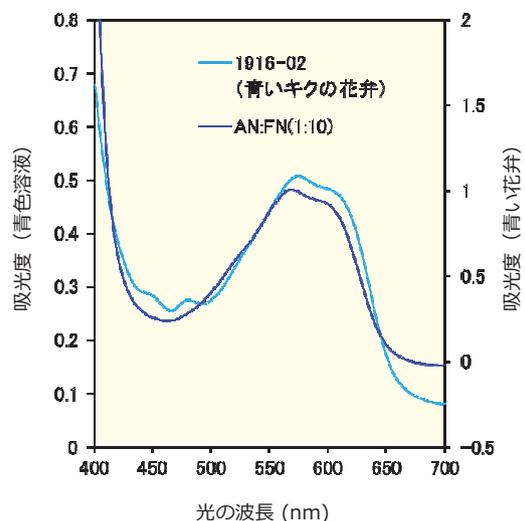


図-6 分子間コピグメンテーションによるキク花卉の青色発色

テルナチン C5 (AN) とコピグメントであるフラボン配糖体 (FN) との分子間会合による相互作用により青を発色する (左: 分子間会合の模式図)。AN と FN を 1:10 の量比で混合した青色溶液 [AN:FN(1:10)] と青い花卉の吸収スペクトル (1916-02) は、ほぼ同じスペクトルパターンを示す (右)。糖: グルコシル基



物を溶媒で展開した後、アントシアニンの赤いバンドが青や青紫に変化している部分に交差していた化合物をコピグメント候補として回収し、その分子量を液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)で解析した。該当する分子量を持つ化合物を花卉から精製して構造を決定したところ、コピグメントはフラボン配糖体であるルテオリン7-(6'-マロニル)グルコシドおよびトリセチン7-(6'-マロニル)グルコシドであることが明らかになった。

これらのフラボン配糖体を pH5.6 の緩衝液中でテルナチン C5 の 5 ないし 10 当量混合した溶液は青色を呈した。この青色溶液の吸収スペクトルは青いキクの生花卉のものと同様のスペクトルパターンを示した(図-6)。このことから、青いキクの花弁に含まれるアントシアニンは、単独では紫色を呈するが、キクが花卉で合成・蓄積していた無色のフラボン配糖体との分子間相互作用(分子間コピグメンテーション)により、青色を発色することが明らかになった。フラボン配糖体は、アントシアニンとの相互作用により青い花色に寄与するコピグメントとして知られていたが、3',5'位がグルコシル化されたデルフィニジン配糖体とのコピグメンテーションで青を発色することは、筆者らの研究で初めて明らかになった。アントシアニンの3',5'位がグルコシル化されることで、フラボン配糖体との会合がどのように変化し、またどのような分子間相互作用により青色を発色するかを明らかにする

ためには、さらなる研究が必要である。

以上のように、カンパニュラ由来の *F3'5'H* とチョウマメ由来の *A3'5'GT* という2つの遺伝子を導入することによりキク花卉の青色化に成功した。遺伝子工学技術を用いて、このような青い花を開発したのは、世界で初めてであった。筆者らが確立した方法は、デージー咲き、デコラ咲き、ポンポン咲き、アネモネ咲きなど様々なタイプのキクに適用し青色花を作出することができる(能岡ら 2018)。

今後の展望

現在、農研機構では青いキクの実用化に向けた取り組みを進めている。遺伝子組換え技術により作出した青いキクを環境中での拡散防止措置を執らずに使用するためには、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(通称:カルタヘナ法)に従って、生物多様性影響評価の審査を受け、承認を受ける必要がある。この生物多様性影響評価の項目の一つには「交雑性」がある。この項目では、青いキクが近縁のキク野生種と交雑し、導入した遺伝子等が伝達することによって、野生種又は野生種の個体群の維持に支障を及ぼすおそれがあるか否かについて判断する必要がある(財務省他告示 2003)。日本には多様なキク野生種が自生している(谷口 2013)が、江戸時代より栽培菊との交雑が報告されており、雑種個体群に種小名が付けられた例もあ

る(中田 2013)。紫色や青色に花色を改変した形質転換キクは、日本国内に自生している野生種のノジギク(*Chrysanthemum japonense*)と人為的に交配すると後代が得られ、その後代には導入した遺伝子と花色形質が伝わることを確認されている(Aida *et al.* 2018)。これらのことから、青いキクとキク野生種との交雑による生物多様性影響リスクを低減するための技術開発を進めている。具体的には、花器官において雌蕊及び雄蕊の形成に関与するクラス C 遺伝子の機能を抑制することによる不稔形質の付与などである(佐々木ら 2018)。このような不稔化技術を用いて、不稔で青いキクの作出をこれまで花色改変に成功している品種や系統で進め、実用化を目指すにふさわしい青いキクの開発を進める。

おわりに

年間通じて流通可能で、花持ちのよい青い花は少ないのが現状である。キクの青色化の方法は、青い花色のない他の花きにも応用できる可能性がある。キク、ユリ、バラ、カーネーションといった主要な花きで、これまでに無かった「青」の新花色を実用化すれば、新たな価値を創造し、これからの花き産業の発展にも貢献できると期待される。

謝辞

本稿を執筆するにあたり貴重なご助

言を頂きました，農研機構の間竜太郎博士に感謝申し上げます。

引用文献

- 間竜太郎 2003. キク遺伝子組換えのモデル系の開発. 農業および園芸 78, 303-308.
- Aida, R. *et al.* 2004. Efficient transgene expression in chrysanthemum, *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura, by using the promoter of a gene for chrysanthemum chlorophyll-a/b-binding protein. *Breed. Sci.* 54, 51-58.
- Aida, R. *et al.* 2018. Inheritance of bluish flower color of transgenic chrysanthemum by interspecific hybrids. *Jpn. Agr. Res. Q.* 52, 339-345.
- Fukuda-Tanaka, S. *et al.* 2000. Colour-enhancing protein in blue petals. *Nature* 407, 581.
- Holton, T.A. *et al.* 1993. Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* 366, 276-279.
- Kazuma, K. *et al.* Flavonoid composition related to petal color in different lines of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry* 64, 1133-1139.
- 中田政司 2013. 栽培菊と外来ギクによる日本産野生ギクの遺伝的汚染. 栽培植物の自然史 II (山口裕文編著). 北海道大学出版会. pp.209-212.
- 中山真義 2015. 化合物の分離と混合を同時に行う交差 TLC 法の開発. 植物の生長調節. 50, 156-161.
- 野田尚信ら 2004. チョウマメにおいてテルナチン生合成に関与するアントシアニン 3', 5' 位グルコシル基転移酵素遺伝子の単離と機能解析. 第 45 回日本植物生理学会年会講演要旨集. 416.
- 野田尚信ら 2005. チョウマメにおけるテルナチン類の生合成に関与する 1-O-アシルグルコース依存性アントシアニン芳香族アシル基転移酵素遺伝子. 第 47 回日本植物生理学会年会要旨集. 189.
- 野田尚信ら 2006. チョウマメにおけるヒドロキシ桂皮酸 1-O-グルコシル基転移酵素遺伝子とポリアシル化アントシアニン生合成系遺伝子群の同調的な発現. 育種学研究. 8 (別 2), 341.
- Noda, N. *et al.* 2013. Genetic engineering of novel bluer-colored chrysanthemums produced by accumulation of delphinidin-based anthocyanins. *Plant Cell Physiol.* 54, 1684-1695.
- Noda, N. *et al.* 2017. Generation of blue chrysanthemums by anthocyanin B-ring hydroxylation and glucosylation and its coloration mechanism. *Sci. Adv.* 3, e1602785.
- 農林水産省 2018a. 平成 29 年産花きの作付(収穫)面積及び出荷量. <http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kaki/index.html>.
- 農林水産省 2018b. 平成 28 年 生産農業所得 統計 <http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/nougyou_sansyutu/#r>.
- Okinaka, Y. *et al.* 2003. Selective accumulation of delphinidin derivatives in tobacco using a putative flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNA from *Campanula medium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 161-165.
- Saito, N. *et al.* 1985 Acylated delphinidin glucosides and flavonols from *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry* 24, 1583-1586.
- 佐々木克友ら 2018. キクにおける不稔形質を付与するための技術開発. 園学研 17 (別 1), 237.
- 穴戸純 2010. 花色によるマーケティング. 農業技術体系花卉編第 4 巻追録第 12 号. pp. 89-100.
- 田中良和ら 2012. 花卉にデルフィニジンを含むユリの生産方法. 国際公開公報 WO2012036290.
- Tanaka, Y. and F. Brugliera 2013. Flower colour and cytochrome P450. *Trans. R. Soc. B* 368, 20120432.
- 谷口研至 2013. イエギク. 栽培植物の自然史 II (山口裕文編著) 北海道大学出版会 pp.139-158.
- Tatsuzawa, F. *et al.* 2005. Cyanidin glycosides in flowers of genus *Corydalis* (Fumariaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 789-798.
- 寺原典彦 1993. チョウマメ花色素について. FFI ジャーナル 155, 36-43.
- Yoshida, K. *et al.* 2009. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Nat. Prod. Rep.* 26, 884-915.
- 能岡智ら 2018. 実用化を見据えた宿主選抜と多様な色・形の青いキクの作出. 園学研 17 (別 1), 235.
- 財務・文部科学・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省告示第 2 号 2003 遺伝子組換え生物等の第一種使用等による生物多様性影響評価実施要領.