

遺伝子組換えによるトレニアの花色の改変

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 花き研究所 間 竜太郎

1. はじめに

現在、遺伝子組換えによって作出された除草剤耐性ダイズや害虫抵抗性トウモロコシなどが、米国やアルゼンチンを中心に大規模に商業栽培されている。花きにおいても、最も重要な形質の1つである花色を中心に遺伝子組換えによる改変が試みられており¹⁾、すでに青紫色のカーネーションが‘ムーンダスト’シリーズとして市販されている²⁾。本稿では、独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構花き研究所において取り組んできた遺伝子組換えによるトレニアの花色改変について紹介したい。なお、遺伝子組換えによるトレニアの花色改変はサントリイ(株)においても取り組まれている³⁾。

2. トレニアについて

まず、トレニアについて紹介したい。トレニア (*Torenia fournieri*) は、熱帯アジア原産のゴマノハグサ科の一年生草本植物である。日



図-1 花壇で咲くトレニア

本では明治時代初期から栽培されており、耐暑性に優れるので夏の花壇用花きとして利用されてきた(図-1)。1990年の大阪花の万博において盛夏期に咲き続けたことが注目されて以来、いっそう幅広く栽培されるようになり、トレニアの園芸植物としての価値は年々高まっている。

一方、あまり知られていないが、トレニアは植物体切片からの組織分化能力が高いことや培養器内で容易に開花することから、形態形成に関する研究の材料としても用いられてきた。古くは1903年、ドイツのWinklerが*T. asiatica*の葉や葉柄の切片からの芽や花の形成を報告している。また、1970年代以降、フランスのChlyahや我が国の谷本らにより、トレニアを用いて芽や根あるいは花の形態形成に関する研究が精力的に行われた。トレニアは、花色や花形などを培養器内で観察できるので、遺伝子組換え法による花きの園芸的形質の改変のためのモデル植物としてたいへん魅力的である。我々はトレニアの実験植物としての有用性に着目し、遺伝子組換え系を開発した。そしてこの系を用いて、トレニアの花色の改変や花の日持ち性の延長等を行ってきた⁴⁾。

3. 遺伝子組換えによるトレニアの花色改変⁵⁾

遺伝子組換えによる形質改変の方法には大きく分けて次の2つがある。1つはターゲットとなる植物が本来発現していない遺伝子を導入し

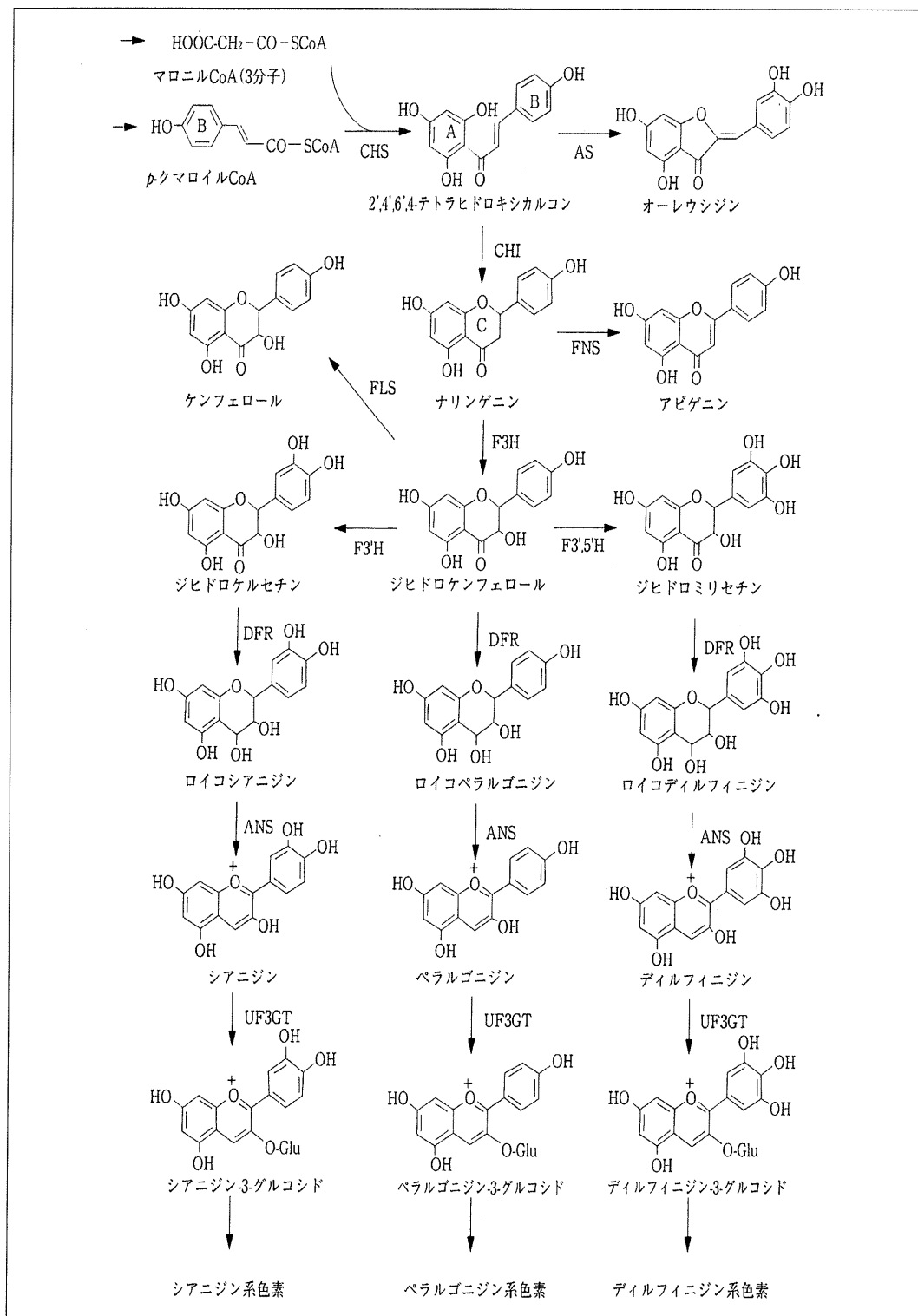


図-2 アントシアニンの生合成系

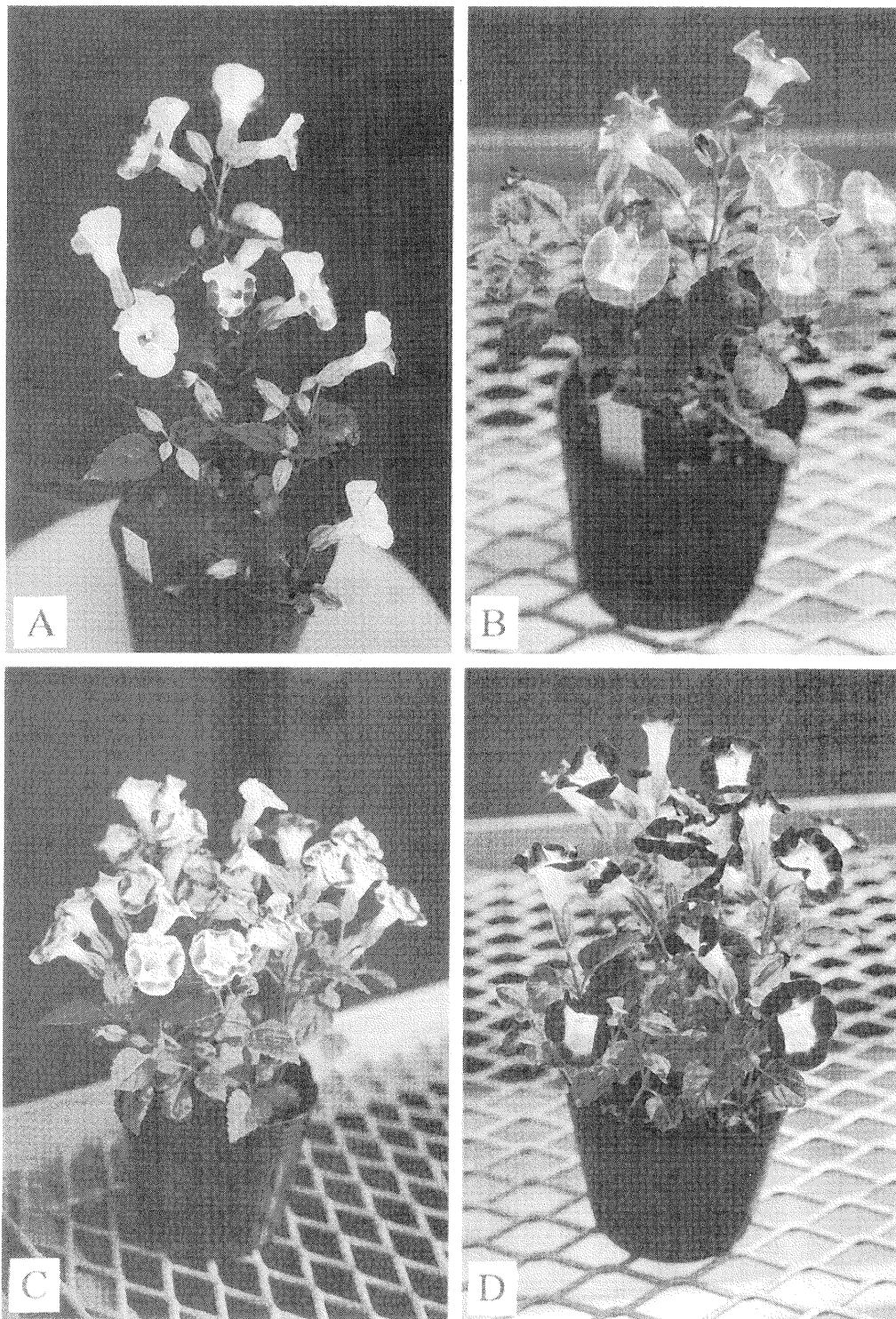


図-3 花色の変化した遺伝子組換えトレニア A；同じ植物体の中で異なる花色が観察された個体（センスCHS導入），B；花冠全体が同程度淡くなった個体（アンチセンスCHS導入），C；唇弁部に波打つような模様が生じた個体（アンチセンスCHS導入），D；筒状部のみ白くなった個体（センスDFR導入）

て発現させる方法である。もう1つは内在して発現している遺伝子を不活化させる方法である。後者は、ターゲット植物が本来持っている遺伝子を同じ向き（センス方向）、逆の向き（アンチセンス方向）あるいはセンス・アンチセンスを組み合わせて再導入することで、その遺伝子が不活化される現象を利用したものである。今回紹介する研究はセンス遺伝子あるいはアンチセンス遺伝子を利用して内在遺伝子を不活化させる手法によるものである。

本実験では、トレニアの花の主要な色素であるアントシアニンの生合成系のジヒドロフラボノール4-リダクターゼ（DFR）遺伝子あるいはカルコンシンターゼ（CHS）遺伝子（図-2）をセンスおよびアンチセンス方向に再導入し、内在遺伝子の不活化による花色の改変を試みた。肉眼によって花色の変化を観察した結果、非組換え体と見かけ上変わらない個体、花冠全体がほぼ同じ程度淡く変化した個体（図3-B）、

唇弁部に比べ筒状部が淡く変化する程度が大きく、結果として色の濃い部分と淡い部分のコントラストがはっきりした個体（図-3D）の3群に判別することができた。DFR遺伝子とCHS遺伝子のどちらを導入した場合においても、アンチセンス遺伝子を導入した個体では花冠全体が同程度淡くなる個体が多く観察されたのに対して、センス遺伝子を導入した個体では筒状部のみが白くなる個体が多かった。この結果から、センス遺伝子導入個体、および、アンチセンス遺伝子導入個体の花色変化のパターンには、それぞれ共通性があることが示された。花色が変化した個体の中には、材料に用いた非組換え体と異なるだけでなく既存のトレニア園芸品種には見られない色調や花色パターンを示すものが見受けられた。例えば、花色が穏やかでパステル風の色調に変化した個体（図-3B）や、唇形部に波打つような模様が生じた個体（図-3C）が生じた。さらに、同じ植物体の中で、異

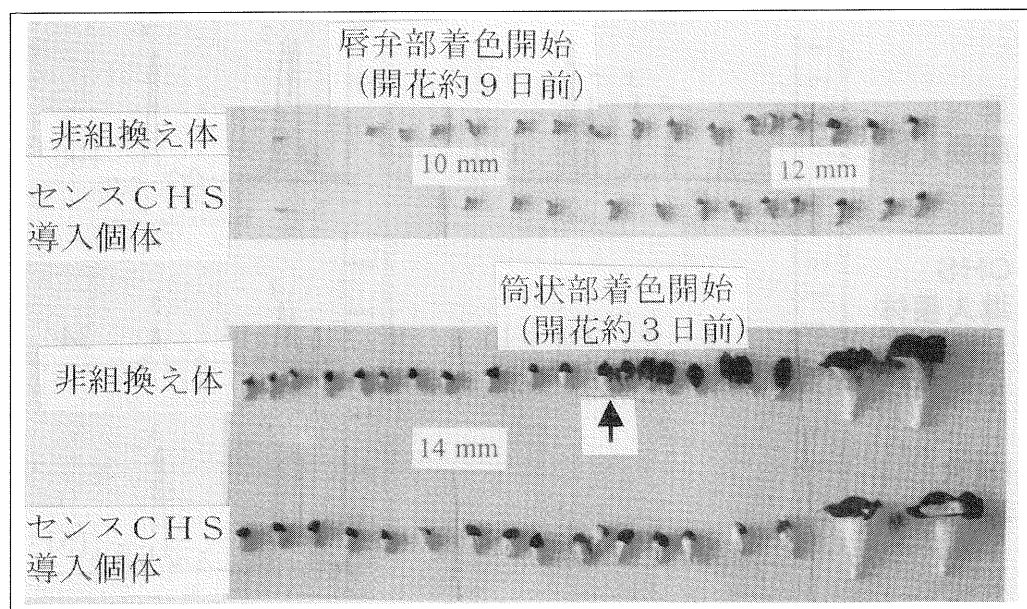


図-4 トレニア花冠の着色時期
唇弁部は開花約9日前、筒状部は開花約3日前に着色が始まる

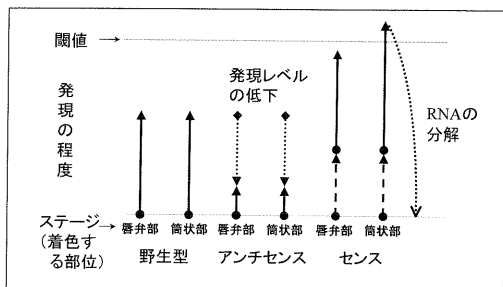


図-5 遺伝子発現抑制のモデル

なる花色が観察された個体 (図-3A) も生じた。

4. センス遺伝子とアンチセンス遺伝子の間に生じた花色の改変パターンの差⁵⁾

センス遺伝子を導入した場合「筒状部のみ白くなる個体」が多く生じたのに対し、アンチセンス遺伝子を導入した場合は、「花冠全体が同程度淡くなる個体」が多く生じた。この改変パ

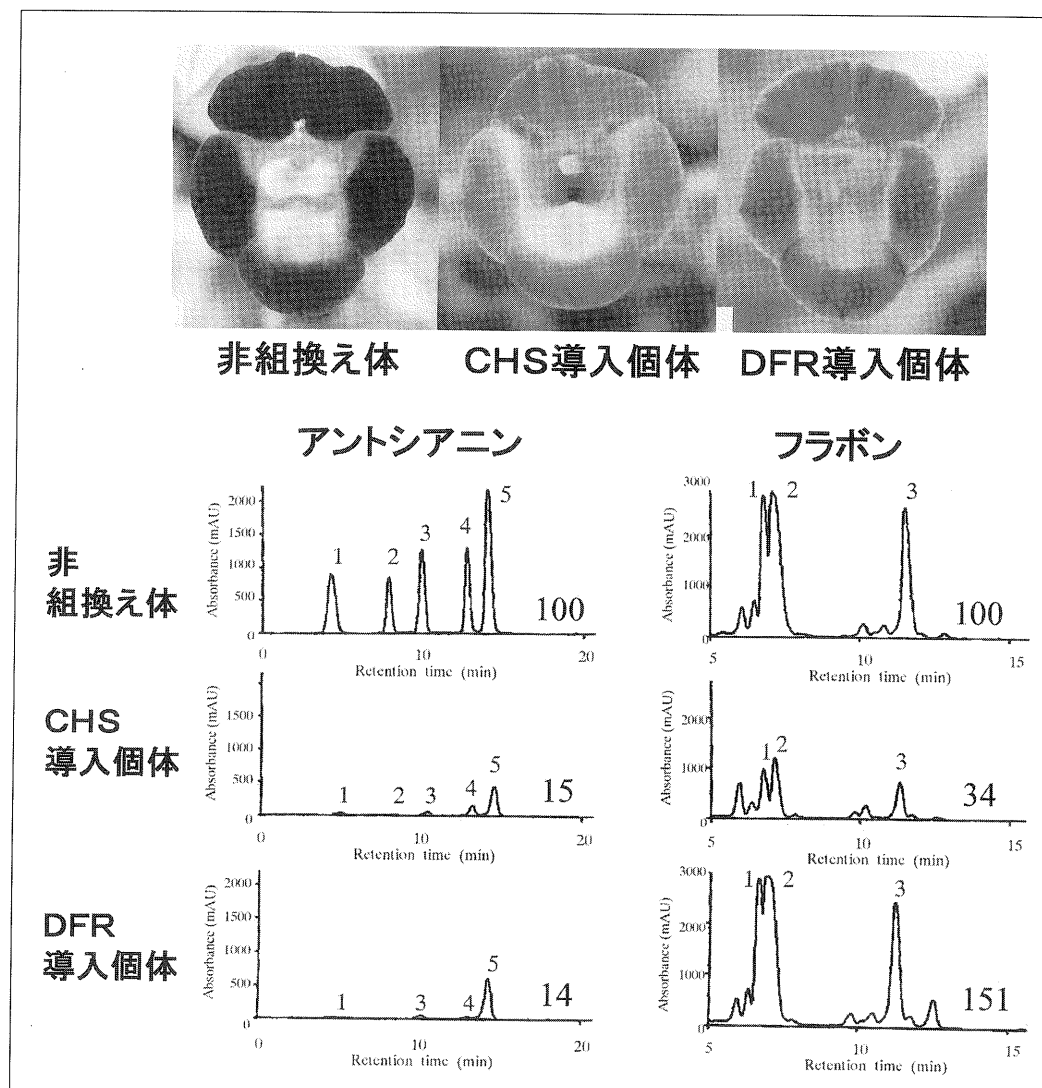


図-6 トレニア花弁に含まれるアントシアニンとフラボンの分析結果

ターンの差は、花冠の部位によって着色時期が異なることが原因であった。トレニアの花冠は、開花の約9日前に唇弁部が、そして約3日前に筒状部が着色を始める(図-4)。つまり、筒状部のみ白くなるセンス遺伝子導入個体では、花の発達段階の途中から色素生成が抑制されたものと考えられた。これは、遺伝子の転写産物であるmRNA量が増加してある閾値を超えると誘導されるタイプの発現抑制機構によって説明することが可能である(図-5)。すなわち、センス遺伝子を導入した場合は、花の発達段階の途中でこのタイプの発現抑制が誘導されることができると考えることができる。一方、アンチセンス遺伝子を導入した場合は、センスの場合とは異なり、発

現抑制が花の発達段階の全体を通して生じるため、花冠全体が淡くなったものと考えられた。

5. CHS遺伝子とDFR遺伝子の間に生じた花色の改変パターンの差⁶⁾

アントシアニン生合成系(図-2参照)において上流に位置するCHS遺伝子を導入した場合に比べて、下流に位置するDFR遺伝子を導入した個体では花色が青みを帯びる現象が認められた。その原因として、アントシアニンがフラボンなどの補色素(コピグメント)と共存することによって青みがかかる現象(コピグメンテーション)が生じていることが推測された。なぜならば、フラボン(アピゲニン等)はアントシアニン

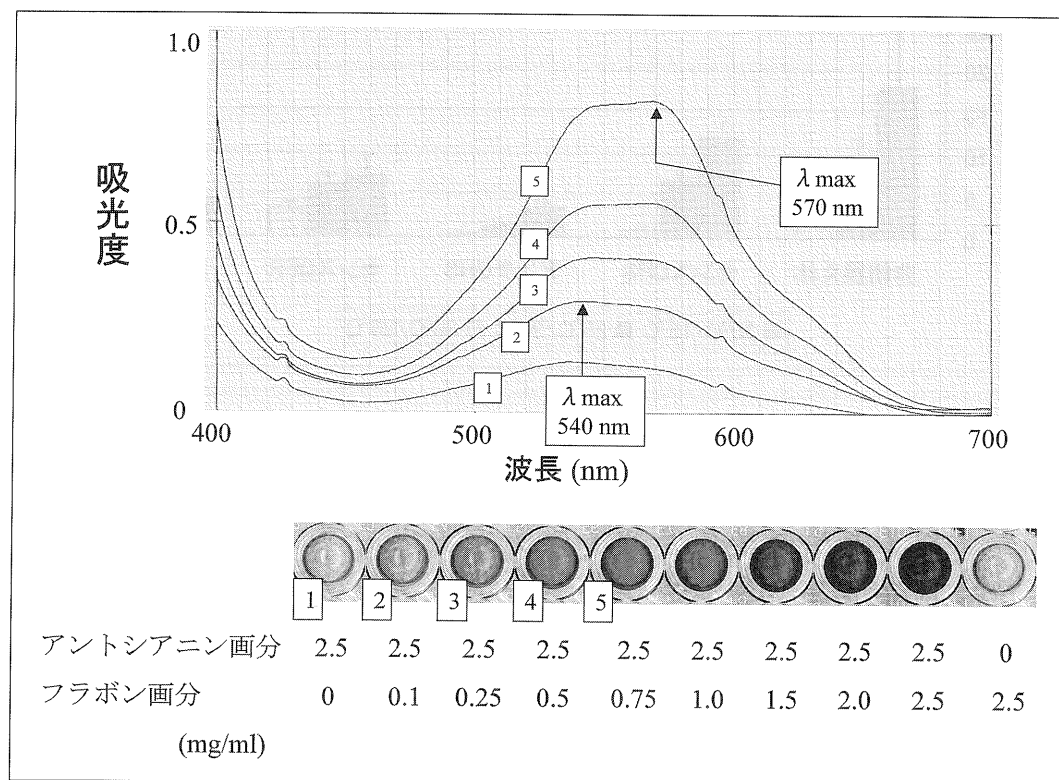
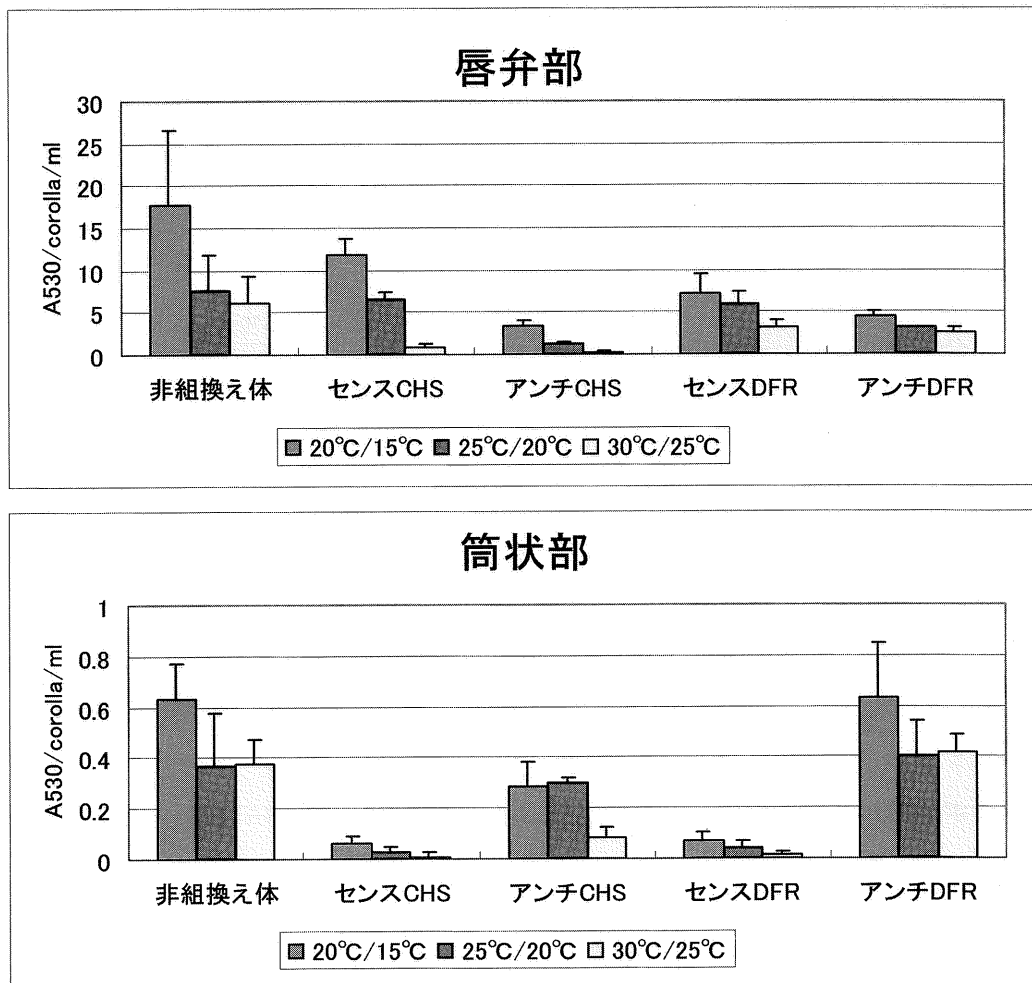


図-7 アントシアニンとフラボンの再混合実験
アントシアニン2.5mg/ml, フラボン0.1mg/mlの混合液の吸収極大値は540nmであり、非組換え体及びアンチセンスCHS導入個体の生花弁及び搾汁の吸収スペクトルとほぼ同じであった。一方、アントシアニン2.5mg/ml, フラボン0.75mg/mlの混合液の吸収極大値は570nmであり、アンチセンスDFR導入個体の生花弁及び搾汁の吸収スペクトルとほぼ同じであった。

生合成系の中間産物であるナリンゲニンから作られる（図－2 参照）ので、アントシアニン生合成系の上流に位置するCHS遺伝子を導入した場合にはアントシアニンとフラボンの両方が減少するのに対し、下流に位置するDFR遺伝子を導入した場合にはアントシアニンが減少しフラボンは増加することが考えられるからである。調査したところ、アントシアニンの量は、非組換え体を100とした場合、アンチセンスCHS導入個体で15、アンチセンスDFR導入個体で14と同様に減少していた。ところが、フラボンの量は、

非組換え体を100とした場合、アンチセンスCHS導入個体では34と同様に減少していたのに対し、アンチセンスDFR導入個体では151と増加していた（図－6）。さらに、トレニア花卉から抽出したアントシアニンとフラボンを再混合する実験を行った。その結果、フラボン画分が増加するにつれて、アントシアニン／フラボン混合液の色は濃くなると同時に青みがかった（図－7）。これらの結果から、DFR遺伝子を導入したトレニアにおいて花色が青みを帯びる現象の原因は、アントシアニン（色素）の減少とフラボン（コ



図－8 異なる温度条件下で栽培した遺伝子組換えトレニアの花冠におけるアントシアニン量

センスDFR導入個体

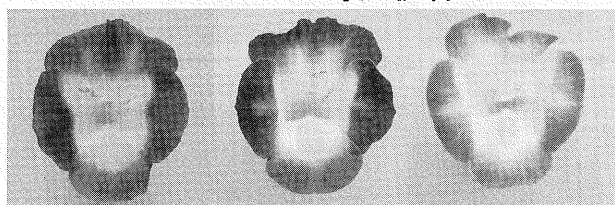


20°C/15°C

25°C/20°C

30°C/25°C

センスCHS導入個体



20°C/15°C

25°C/20°C

30°C/25°C

図-9 異なる温度条件下で栽培した遺伝子組換えトレニアの花冠の着色状況

ピグメント)の増加がコピグメント/色素の比を著しく高くすることで生じたコピグメンテーションによることが明らかとなった。

6. 遺伝子組換えトレニアの花色に温度が及ぼす影響

温度が遺伝子組換えトレニアの花色に及ぼす影響について調査するため、明期(16時間)/暗期(8時間)を20°C/15°C, 25°C/20°C, 30°C/25°Cで栽培したトレニアの花冠についてアントシアニン量の測定を行った(図-8)。その結果、非組換え体においては、30°C/25°C条件下では20°C/15°Cに比べて1/2から1/3程度に減少しており、多くの花きと同様、高温条件下ではアントシアニン量が減少することが示された。DFR遺伝子導入個体では、センス遺伝子導入個体とアンチセンス遺伝子導入個体では花色変化の様相が異なっている

にも関わらず、どちらの方向に導入した場合でも、高温条件下におけるアントシアニン量は1/2から1/3に減少しており非組換え体と同様であった。一方、CHS遺伝子導入個体では、センス、アンチセンスどちらの方向に導入した場合でも、

表-1 遺伝子組換えトレニアの後代植物における花色の分離

	非組換え体 タイプ	改変型 ¹⁾ タイプ	その他	計
非組換え体 自殖後代	35	—	4	39
センスCHS 自殖後代	13	10	7	30
センスCHS×非組換え体	3	7	3	13
センスDFR 自殖後代	30	5	12	47
センスDFR×非組換え体	11	1	3	15
アンチセンスCHS 自殖後代	9	24	4	37
アンチセンスCHS×非組換え体	6	5	4	15
アンチセンスDFR 自殖後代	10	17	12	39
アンチセンスDFR×非組換え体	2	3	4	9

	非組換え体 タイプ	波状 タイプ	アンチセンス タイプ	その他	計
波状着色個体 自殖後代	2	19	3	3	27
波状着色個体×非組換え体	6	17	9	1	33

1) 親に用いた組換え体と同様の花色の個体

高温条件下でのアントシアニン量は1/10程度に減少しており、非組換え体、DFR遺伝子導入個体と比べて明らかに減少の程度が著しかった(図-9)。このように、CHS遺伝子を導入した個体においては、非組換え体、DFR遺伝子導入個体と比べて、高温によるアントシアニン量の減少程度が著しいことが明らかとなった。この原因は、CHS遺伝子が高温による発現抑制を受けやすいのに対し、DFR遺伝子はあまり影響されないためと考えられた。

7. 遺伝子組換えトレニアの後代における花色発現⁷⁾

センス遺伝子導入個体、アンチセンス遺伝子導入個体及び花弁が波状に着色する個体(CHSアンチセンス導入)の、各々自殖後代及び非組換え体との交雑後代植物の花色について調査した。後代植物における花色の分離を表-1に示す。用いた遺伝子組換えトレニアのいずれの後代においても、改変型と同様の花色を示す個体が生じ、遺伝子導入により改変された花色は後代に遺伝することが示された。なお、非組換え体(遺伝子組換えの材料に用いた系統:花冠全体が紫)は花色について遺伝的に固定されていないので、一部の後代において赤紫やピンクの花色が生じた。ゲノミックサザン分析の結果、アンチセンス遺伝子導入個体の後代では導入遺伝子の有無と花色の変化がリンクしていた。一方、センス遺伝子導入個体の後代では導入遺伝子を有しているにもかかわらず花色が変化していない個体が見られ、導入遺伝子の有無と花色は必ずしもリンクしていなかった。さら

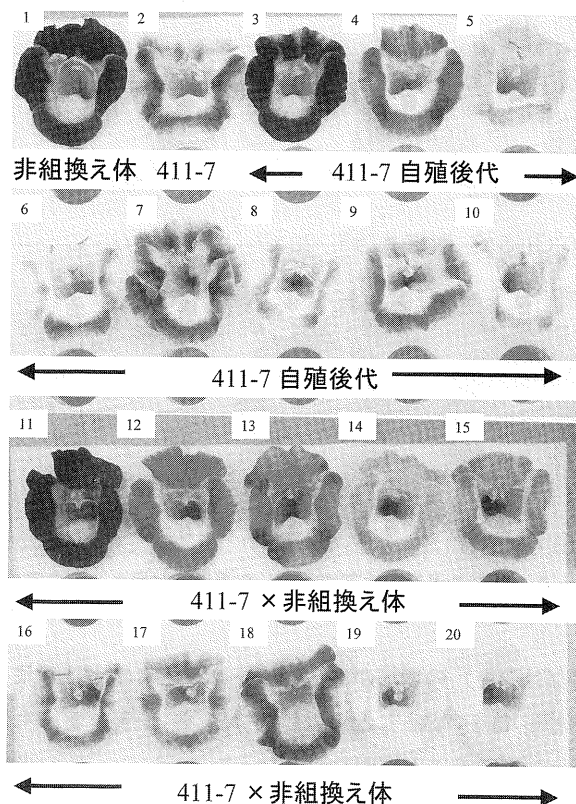


図-10 波状に着色する系統の後代の花色の分離

1: 非組換え体, 2: 遺伝子組換え当代植物(411-7), 11: 非組換え体と同様, 4, 5, 12-15: アンチセンスタイプ, 6-10, 16-20: 波状, 3: その他(部分的に脱色)

にこの場合、生育途中で筒状部が白い花(センス個体特徴的)を生じる個体があった。また、波状に着色する411-7系統の後代(図-10)においては、波状の個体とともに花冠全体が同じ程度に淡く変化した個体(アンチセンス個体特徴的)が生じた。分析の結果、411-7系統には2つの導入遺伝子座があり、一方の遺伝子座(locus A)が波状となる形質を規定し、他方の遺伝子座(locus B)のみ存在した場合には波状にはならず、アンチセンス遺伝子導入個体に通常見られるのと同様な花色となることが明らかとなった(図-11)。

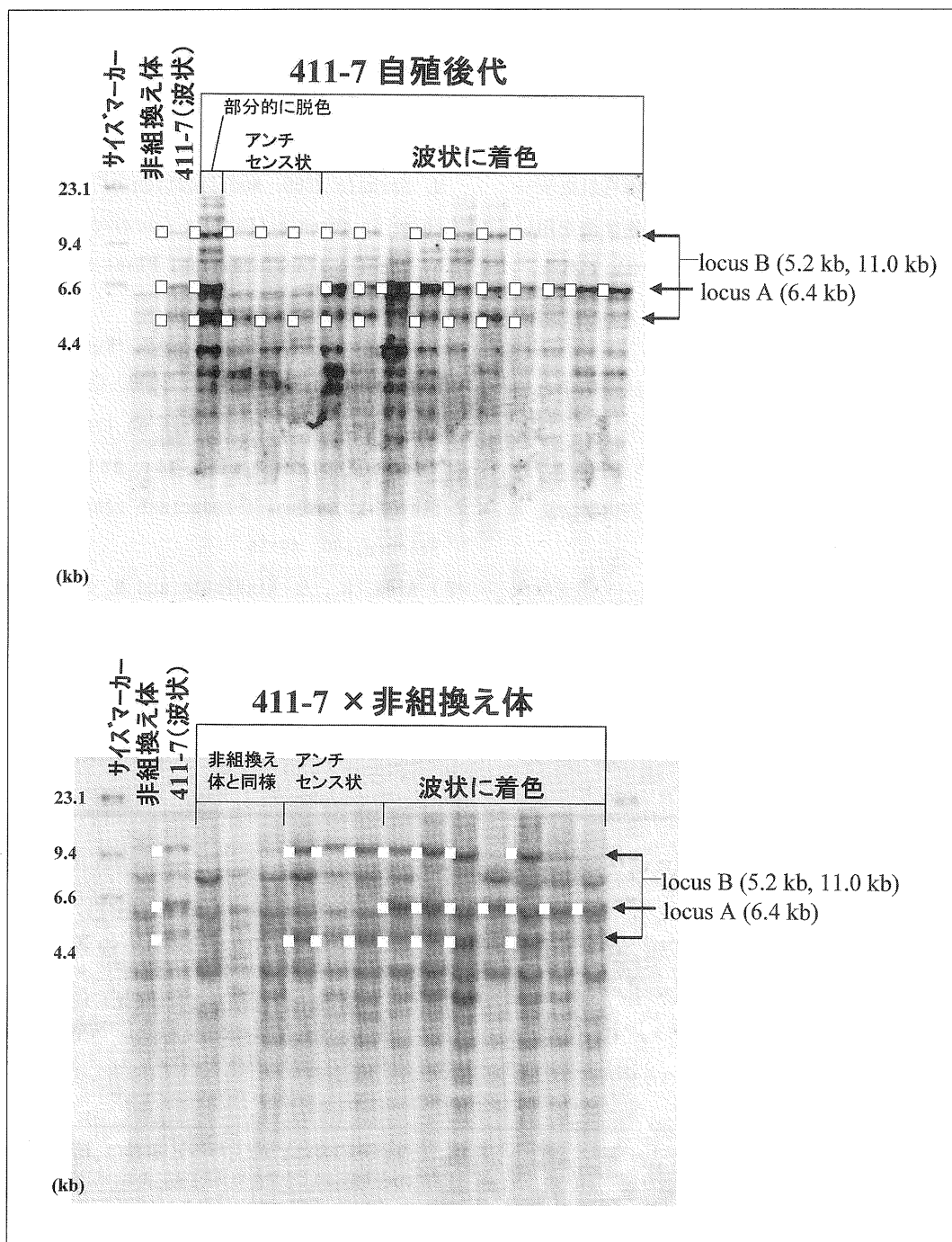


図-11 波状に着色する系統の後代のサザン分析 (CHSプローブ)

8. おわりに

花きにおいて、遺伝子組換え法を育種手法の一つに加えることで、従来は困難であった形質改変が可能となり、育種の可能性は大きく広がるものと考えられる。トレンニアで得られたデータが、他の花きにおける遺伝子組換え法を用いた育種のための基礎知見となれば幸いである。

参考文献

- 1) 腰岡政二 2003. 花色の生合成遺伝子と制御. 農林水産技術研究ジャーナル 26, 27-32
- 2) 田中良和・福知(水谷)正子 1999. フラボノイド生合成とP450. 日本農芸化学会誌 73, 1035-1038
- 3) 久住高章・田中良和・鈴木賢一・勝元幸久 2002. 花色デザイン技術と花卉新品種の開発. 日本農芸化学会誌 76, 700-707
- 4) Aida, R. and M. Shibata 2001. Transgenic *Torenia fournieri* Lind. in "Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 48 Transgenic Crops III" pp. 294-305, Springer-Verlag, Berlin
- 5) Aida, R., S. Kishimoto, Y. Tanaka and M. Shibata 2000. Modification of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation. Plant Science. 153, 33-42
- 6) Aida, R., K. Yoshida, T. Kondo, S. Kishimoto and M. Shibata 2000. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene. Plant Science. 160, 49-56
- 7) Aida, R., S. Kishimoto and M. Shibata 2001. A transgene locus is required for wavy patterned flowers of transgenic torenia plants. Annals of Botany 87, 404-409

この草はなんだろう? 手軽に調べたい。

三二雑草図鑑

——耕地雑草ハンドブック——

A5判 本体2,200円(税別)

耕地には主要なものだけで150種を超える雑草が生えてきます。これら雑草の防除の第一歩は草を知ることです。本書は、農耕地や樹園地などによく見られる雑草397種を写真とともに紹介した、草を知るための野帳版雑草図鑑です。

原色図鑑 芽ばえとたね

浅野 貞夫/著

A4判 本体9,800円(税別)

芽ばえの姿はどうなんだろう。本書は、植物の芽ばえのようすを克明に表した精密図版と、種・成植物の写真による植物の一生図鑑です。成植物のみの図鑑と異なり、芽ばえのようすから紹介しているため、植生などの調査にたいへん役に立つとの声が寄せられています。

全国農村教育協会

〒110-0016 東京都台東区台東1-26-6
Tel. 03-3833-1821 Fax. 03-3833-1665