

## 青い八重咲きツツジの作出に関する基礎的研究

小林伸雄, 中務 明, 中川 強, 赤間一仁

### 目 的

常緑性ツツジにおいて青色花をはじめとする新花色領域の創出は長年の目標であり, これまで遠縁交雑等の様々な試みが行われているが, いまだ十分な成果は得られていない. 一方, 我々は多様なツツジ遺伝資源を収集し, 花色や花器形態に関する遺伝子の解析や組織培養による植物体の再生系に関する研究を行い, 着実な成果が得られつつある. そこで本研究では, これらの研究をさらに発展させ, 遺伝子組み換えによる青色花ツツジの作出を最終目的にして, 常緑性ツツジにおけるフラボノイド合成の関連遺伝子の単離と発現解析, *in vitro* 植物体の再生系確立, 遺伝子導入までの基礎的研究を行うものである.

### 材料と方法

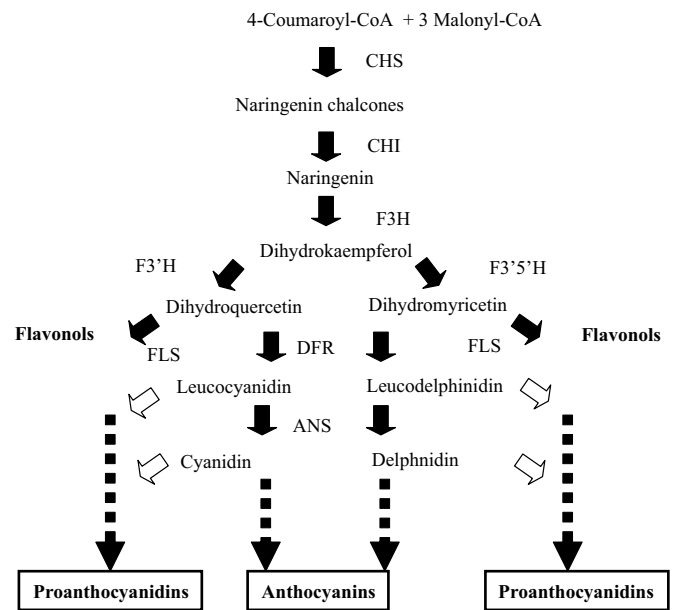
#### 1. フラボノイド生合成遺伝子の時期別・器官別発現解析

植物材料として, 常緑性ツツジの‘大紫’ (*Rhododendron × pulchrum* Sweet) を用いた. 花冠は異なる4つの発育段階 (1; 未着色, 2; 着色開始, 3; 開花直前, 4; 開花時) を用いた (第1表). 加えて, 開花当日の花器官 (がく・雄ずい・雌ずい) および葉の各器官も用いた. それぞれのサンプルから全RNAを抽出後, RNase-free DNase Iで処理後, 逆転写酵素にてcDNAを合成した. 新しく単離したカルコン異性化酵素を含む8種のフラボノイド生合成遺伝子 (第1図, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS*, *FLS*, *F3' H*, *F3' 5' H*) の配列を元にして, 特異的なプライマーとSYBR-Green Iを用いて, Thermal Cycler Dice Real Time System (TAKARA) によるリアルタイムPCRを行った. 内部標準には, ツツジのアクチン遺伝子を用いた.

また, 花冠についてアントシアニン含量の測定を行った. 新鮮重0.1gの組織に対して1%塩酸メタノールを1ml加えて, 一晩4℃でインキュベートした. 抽出液は分光光度計にてOD525nmの吸光度を測定した.

#### 2. *in vitro* 植物体の再生系確立

植物材料として‘大紫’の変異品種で雄ずいが花弁化し花粉の出ない‘千重大紫’を用いた. すでに発根した‘千重大紫’を滅菌した鹿沼土に移植し, 順化条件を検討した. その後, 9cmポットに移植し, 圃場における生育を調査した.



第1図 フラボノイド生合成経路

CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3' H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3' 5' H, flavonoid 3', 5'-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; ANS, anthocyanidin synthase: 黒の矢印はツツジより単離した8遺伝子を示す.

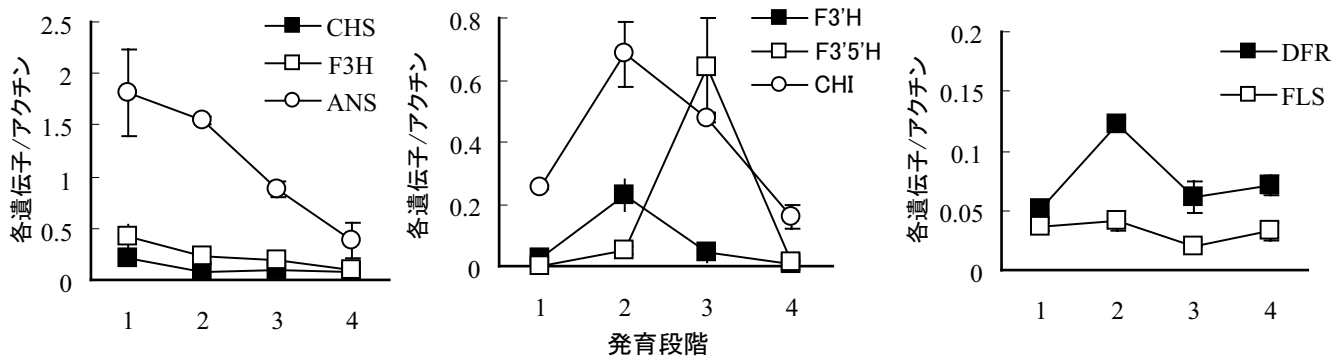
### 結果と考察

#### 1. フラボノイド生合成遺伝子の時期別・器官別発現解析

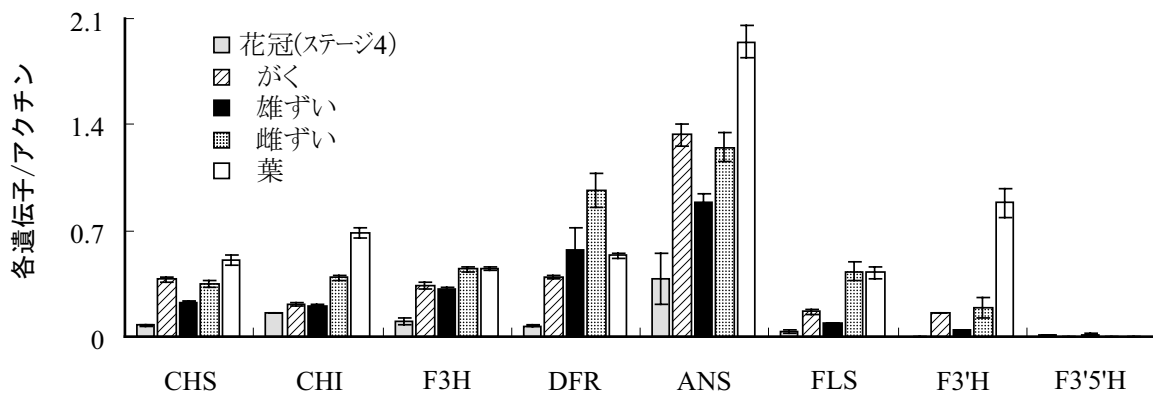
ツツジ‘大紫’において, 約1.1cmの花蕾でアントシ

第1表 花冠を採取した花器の発育ステージの定義とアントシアニン含量

| ステージ | 定義                 | 花蕾長(cm) | アントシアニン含量 (OD 525nm) |
|------|--------------------|---------|----------------------|
| 1    | 着色していない花蕾          | 約 1.0   | 0.058                |
| 2    | 着色を開始した花蕾 (先端が色着く) | 約 1.1   | 0.258                |
| 3    | 完全に着色し、開花直前の蕾      | 4.0 以上  | 4.318                |
| 4    | 開花後の花冠             | —       | 1.944                |



第2図 花冠の異なる発育段階におけるリアルタイム PCR の発現解析



第3図 異なる器官別におけるリアルタイム PCR の発現解析

アニン着色が開始された。完全に着色した開花直前のアントシアニン含量は着色開始期の20倍以上に増加し、開花後には減少した(第1表)。

リアルタイム PCR の結果より、各遺伝子の発現パターンは、着色していない花蕾で最も発現しその後減少するタイプ (*CHS*, *F3H*, *ANS*)、一時的に発現量が増加するタイプ (*CHI*, *F3'H*, *F3'5'H*) および発現の変化が一定でないタイプ (*DFR*, *FLS*) の3つに分類できた(第2図)。 *CHI*, *F3'H* 遺伝子は一時的にステージ2で、 *F3'5'H* はステージ3でそれぞれ増加し、その後減少した。この一時的に発現量が増加する *CHI*, *F3'H*, *F3'5'H* は、花冠の着色開始期やアントシアニン蓄積が活発に行われている発育段階と発現の傾向が一致していた(第1表, 第2図)。一方、器官別に発現解析を行ったところ、 *F3'5'H* を除く7種の遺伝子は、花冠よりもがく・雄ずい・雌ずい・葉で強く発現しており、特に葉で顕著に発現がみられた(第3図)。

以上の結果から、 *F3'5'H* 遺伝子は花冠の色素合成に関与すること、それ以外の遺伝子は葉などに含まれる他のフラボノイド系色素の合成にも関連することが示唆された。青いツツジを作出するために、 *F3'H* 遺伝子の発現

を抑制し、赤色色素を生成させない方法で形質転換する予定であるが、他の器官(特に葉)に影響を及ぼす可能性が考えられる。そのため花冠特異的プロモーターの開発が必要であるだろう。また現在、花色に関わる新たな遺伝子の単離と解析を目指して、EST解析を進行中である。ツツジのフラボノイド生成に関する遺伝子情報が蓄積することで、花色の改変に対する戦略がより具体的になるものと思われる。

## 2. *in vitro* 植物体の再生系確立と遺伝子導入

順化後に圃場に移した個体は、順調に約10cmの大きさまでに生育した。葉切片から個体再生、さらに圃場での栽培まで一連の過程を確立できた。現在、組換えツツジ植物の作出を目指した形質転換実験として、ツツジの各種園芸品種を用いて、GUSレポーター遺伝子を指標としてアグロバクテリウムを介した植物細胞への遺伝子導入を開始した。感染に用いるアグロバクテリウム株の系統、ツツジの系統品種・感染に用いる組織・組織培養条件などを検討して、効率の良いツツジ形質転換法を確立し、青い八重咲きツツジの作出に向けてさらに一歩前進させたい。