

## ツツジの異なる花色の花冠における差次的発現解析

小林伸雄, 中務 明

## 目 的

常緑性ツツジにおいて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。また、常緑性ツツジの花色に関して、分子生物学的知見はわずしか得られていない(水田ら, 2007, 2008; 小林ら, 2007; Nakatsuka et al., 2008)。

そこで本研究では、常緑性ツツジの着色機構を DNA レベルで解析し花色改変につなげるため、異なる花色の花冠由来 cDNA ライブラリーを構築し、サブトラクション法による差次的に発現する遺伝子の単離を試みた。また、突然変異により花色が変化したツツジを用いて、アントシアニン分析と遺伝子発現解析を行った。

## 材料と方法

## 1. サブトラクション法による新規の着色関連遺伝子の単離

植物材料として、開花直前のピンク色と白色のキシツツジ (*Rhododendron ripense* Makino) の花冠を用いた。2 つの異なる花色の花冠由来 cDNA ライブラリー (Stratagene) を構築し、DsDD cDNA Subtraction Kit (Wako) を用いてサブトラクションを行った。その後、pGEM-Easy vector (Promega) にサブクローニングし、Big Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いて塩基配列決定を行った。得られた配列は BLAST プログラムを用いて相同性解析を行った。

## 2. 突然変異による花色変化の原因遺伝子探索

植物材料として、開花直前のオオキリシマ ‘大紫’ (紫色) (*R. × pulchrum* Sweet) と赤色変異花の花冠を用いた。花冠はアントシアニン分析と遺伝子発現解析を行った。アントシアニン分析のため、100℃5秒でポリフェノール酸化酵素を失活させた花卉を乾燥させ、50% 酢酸を加え、一晚室温で色素を抽出した。その後、塩酸を加えて加水分解し HPLC で分析した。またフラボノイド 3' 水酸化酵素 (F3'H) とフラボノイド 3'5' 水酸化酵素 (F3'5'H) を花色変化に関連する候補として、それらの遺伝子発現解析を行った。F3'H と F3'5'H 遺伝子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。

## 結果と考察

## 1. サブトラクション法による新規の着色関連遺伝子の単離

白色花冠で発現している cDNA をドライバー、ピンク色花冠で発現している cDNA をテスターとしてサブトラクションを行い、得られた PCR 産物の塩基配列を決定した。BLAST 解析を行った結果、ツツジの花冠から新規の着色関連遺伝子配列は単離できていないことが分かった。この結果より、キシツツジ花冠のアントシアニン着色の有無は、遺伝子発現量の差よりもむしろ DNA 配列構造の差である可能性が示唆された。

## 2. 突然変異による花色変化の原因遺伝子探索

‘大紫’の花冠は赤色のシアニン系色素 (シアニン・ペオニン) と青色のデルフィニン系色素 (デルフィニン・パチュニン・マルビジン) をそれぞれ 49.3% と 50.7% の割合で含んでいたが、赤色変異花はシアニン系色素のみを含んでいた。また、‘大紫’と比較して赤色変異花では、F3'H と F3'5'H 遺伝子の発現量が 1/3 と 1/7 程度であった。これらの結果から、花色の変化は主に F3'5'H 遺伝子発現が開花直前に増加せず、デルフィニン系色素が合成されないために起こったと考えられた。今後は突然変異による F3'5'H 遺伝子の転写量が変化した原因解明のために、F3'5'H 遺伝子のプロモーター配列やイントロン配列などの DNA 配列を詳細に解析する必要があると思われる。

## 引用文献

- 水田大輝・中務 明・小林伸雄. 2007. 常緑性ツツジ ‘大紫’におけるフラボノイド合成関連遺伝子の花冠ステージ別・器官別の量的発現解析. 園芸学会中四国支部研究発表会要旨. 46: 44.
- 小林伸雄・中務 明・中川 強・赤間一仁. 2007. 青い八重咲きツツジの作出に関する基礎研究. 鳥根大学生物資源科学部研究報告. 12: 63-64.
- 水田大輝・伴 琢也・宮島郁夫・中務 明・小林伸雄. 2008. 常緑性ツツジにおける花色とアントシアニン構成の関係について. 園学研 8(別1): 207.
- Nakatsuka A, Mizuta D, Kii Y, Miyajima I and Kobayashi N. 2008. Isolation and expression analysis of flavonoid biosynthesis genes in evergreen azalea. *Sci. Hortic.* (In press).