

ベタレイン生合成経路遺伝子の導入による黄花アサガオの改良

安納 萌香（筑波大学 生物学類） 指導教員：小野 道之（筑波大学 生命環境系）

【背景・目的】

花卉植物は永らく、より美しい花、より珍しい花を目指した色彩豊かな花々の作出が行われてきた。近年では遺伝子組換え技術による品種改良も盛んに行われており、モデル花卉植物の一つとしてアサガオ(*Ipomoea nil*)が使用されている。アサガオは日本独自に発展した園芸植物であり、江戸時代から多様な花色や模様、形をしたアサガオがつくられ現代まで保存されてきた、鑑賞的価値の高い花である。一方で、江戸時代の図版には残されているが現存しないものもある。中でも黄花のアサガオは「幻のアサガオ」と呼ばれ育種家・愛好家の夢となっている。本研究最大の目標は、遺伝子組換え技術を用いた幻の黄花アサガオの再現である。植物色素であるフラボノイド、カロテノイド、ベタレインの3種は黄色の化合物を含む。アサガオはフラボノイドの一種であるアントシアニンを花卉で合成することで、赤や青、紫色を呈している。先行研究において、フラボノイドの一種であるオーロンやカロテノイドの蓄積による黄花アサガオの作出が行われたが、それらは淡黄色に留まっている。ベタレインは他2種の色素とは異なっておりアサガオが合成していない色素であり、ベタレインを用いた黄花アサガオは作出されていない。そこで本研究では、ベタレイン生合成遺伝子導入による黄花アサガオの作出が試みられてきた。ベタレインは黄色のベタキサンチンと赤色のベタシアニンに大別される。これまでにベタキサンチン生合成経路遺伝子の導入により、明瞭な黄色を呈するが重篤な生育障害が生じる35S黄花系統（異所的過剰発現するCaMV35Sプロモーターを使用）と、淡黄色に留まるが生育障害のない花卉特異的黄花系統（花卉特異的発現プロモーターを使用）が得られている。生育障害はL-DOPAの意図しない代謝に伴う活性酸素種の発生によるもの、淡黄色はベタキサンチンの合成量が少ないためであり、共にL-DOPAからBetalamic acidへの代謝を行うDOPA 4,5-dioxygenase (DOD)の活性が弱いことが原因であると推察された。そこで本研究では、より強いDOD活性を持つDOD(A)を導入する(Sheehan *et al.*, 2019)などのベクターコンストラクトの改良を行うこと、生育障害を生じない濃黄色を呈する形質転換体の作出を目指した。

【材料】

植物材料として、AK77、35S黄花系統、花卉特異的黄花系統を用いた。AK77は、アントシアニン合成に関わる酵素DFR-B(*dihydroflavonol 4-reductase*)変異体で白花のアサガオ系統。35S黄花系統は、AK77を背景にビート(*Beta vulgaris*)由来のBvCYP76AD6およびオシロイバナ(*Mirabilis jalapa*)由来のMjDOD(DOPA 4,5-dioxygenase)をCaMV35Sプロモーターで発現させた形質転換体系統。花卉特異的黄花系統は、AK77を背景にビート由来のBvADH α (*alcohol dehydrogenase*)、BvCYP76AD6をCaMV35Sプロモーターで発現させBvDOD(DOPA 4,5-dioxygenase)を花卉特異的プロモーターで発現させた形質転換体系統である。導入ベクターの改良にはベタキサンチン

生合成遺伝子として、BvADH α 、BvCYP76AD6、BvDOD、MjDODを使用した。また、形質転換体選抜のためにカナマイシン耐性遺伝子、緑色蛍光タンパク質遺伝子(ZsGreen)を用いた。

【方法】

- ベクターコンストラクトの改良と形質転換
BvADH α 、BvCYP76AD6、BvDOD、AmVT-MjDOD、ZsGreenをCaMV35Sプロモーターで恒常的に発現させるベクターを設計した。それぞれIn-Fusion Cloningで各モジュールベクターを作成し、Golden Gate CloningでBinary Vectorに組み込んだ。アグロバクテリウムに形質転換し、アサガオの未熟胚由来の胚性カルスに形質転換した。
- 一過性発現による改良ベクター有効性の検証
改良ベクターをアグロバクテリウムに形質転換し、アグロインフィルトレーション法によりベンサムアナタバコ(*Nicotiana benthamiana*)の葉へ導入した。また、Particle Gunによりタマネギ(*Allium cepa*)の鱗葉表皮細胞へ導入し、顕微鏡下で蛍光観察を行なった。
- 交配による生育障害を回避した濃色化
35S黄花系統と花卉特異的黄花系統、薄色系のアサガオ品種との交配を行なった。

【結果・考察】

- 黄花ベクターの改良
改良ベクターを完成し、形質転換を進めている。
- 一過性発現による改良ベクター有効性の検証
詳細は発表会にて報告する。
- 交配による生育障害を回避した濃色化
現在、交配により得られた種子を播種してF1を栽培中。

【展望】

改良ベクターを導入した形質転換体の作出、花卉で合成されたベタキサンチンの構造決定を行う。また、交配によって得られた系統の生育障害の有無と花色を確認する。

【謝辞】

cDNAの提供を頂いたSamuel F. Brockington博士(ケンブリッジ大学)、LC-MS/MSによるL-DOPA定量を行なっていただいた朝比奈雅志教授(帝京大学)に深く御礼を申し上げます。