

## 第5章 総合考察

我が国の代表的な園芸種であるハナショウブは、ノハナショウブから改良され、種内交雑により園芸種として発達したものである。本種は、三英、六英、八重咲き、台咲きなどの花型があり、その花色は紫を中心に青、白、赤などの方向に変化が広がり、絞り、編み目、覆輪、濃淡および無地といった模様も多様となっている。このような多様性にもかかわらず、本種の花色には青、赤、黄、オレンジなどを欠き、より一層の多彩化育種が望まれている。そのためには、ハナショウブの重要な花色素であるアントシアニンの有用変異の探索やその生合成に関する基礎的知見の蓄積が極めて重要である。このような知見の蓄積は、ハナショウブばかりでなく、ダッチアイリス、ジャーマンアイリスなど全ての *Iris* 属園芸種における花色育種をも促進するものである。

本属では、ハナショウブを中心に多くの種においてアントシアニンの特性解明が精力的に行われてきたが(林ら 1987、岩科・大谷 1998、Yabuya *et al.* 2006)、十分な知見が蓄積するまでには至っていない。また、第1章で述べたように、アントシアニン生合成酵素およびその遺伝子に関する情報は全く得られていないのが現状である。

そこで、*Iris* 属植物における花色の多彩化育種を促進する基礎的知見を蓄積するために、本研究を実施した。まず、ハナショウブを中心とした本属植物の外花被含有アントシアニンについてHPLC分析を行い、その新たな有用変異を探索するとともに、赤色花品種を育成するためにアントシアニンと花色の評価を行った。また、ハナショウブの外花被に存在する5GTおよび3ATの特性を調査し、本種におけるアントシアニン生合成経路の末端部を提案した。さらに、5GTおよび3ATをコードするcDNAの単離とその機能解析を行うため、ダッチアイリス花卉のcDNAライブラリーからその遺

伝子のクローニングを試みた。本章では、本研究により得られた成果を基にして、ハナショウブを中心に今後の花色育種に関する論議を行った。

先ず、ハナショウブの品種および野生系統での HPLC によりアントシアニン进行分析したところ、これまでに育成されている品種の中では、「濃姫」、「火の舞」および「火渡り」などが最も赤い品種であるが、いずれの品種も **peonidin 3pCRG5G** 型に属していた(Table 2-1)。しかしながら、これらの品種は赤色花というよりはマゼンタ(紫赤)花を発現しており、この花色は **peonidin** から期待される花色である。これに対して、**cyanidin** からは赤色花が期待され、事実、ペチュニアの赤色花は **cyanidin 3G** および **cyanidin 3RG** によることが報告されている (Wiering and de Vlaming 1984)。また、本研究における有用アントシアニンの探索により、系統 「宮系 4」 の主要アントシアニンとして発見された **cyanidin 3RG5G** は赤色花の育種を行う上で最も重要な色素として注目された。しかしながら、この系統は淡いピンクの花色を発現していた(Fig. 2-3 F)。そこで、ハナショウブにおける赤色花品種を育成するために、この系統を育種材料に用いた以下の育種法を提案したい。

先に述べた **cyanidin 3RG5G** 型系統「宮系 4」と、これまで育成されている中で最も赤い **peonidin 3pCRG5G** 型品種、「濃姫」(Fig. 2-3 D)や「火渡り」などと交雑し、花色の濃い F<sub>1</sub> 個体を選抜する。ハナショウブにおいてアントシアニンの 3-アシル化(AT)およびメチル化(MT)はともに単一の優性対立遺伝子によっているので(藪谷 未発表)、上記の F<sub>1</sub> の自家受粉(または兄妹交雑)により F<sub>2</sub> 集団(または兄妹交雑による後代)を育成する。この F<sub>2</sub> 集団では、**cyanidin 3RG5G** 型個体(二重劣性ホモ: **atatmtmt**)が 1/16 の頻度で期待される。そこで、獲得した **cyanidin 3RG5G** 型個体の中から、最も優秀な赤色花個体を選抜し新規品種を作出する育種法である。

一方、peralgonidin 系アントシアニンによる赤色(オレンジ赤)花品種を育成することも考えられるが、著者の知る限り、このアントシアニンはハナショウブばかりでなく他の *Iris* 属植物においもその存在は未だ確認されていない。従って、peralgonidin 系アントシアニンによりハナショウブの赤色花品種を育成するためには、ペチュニア(Meyer *et al.* 1987、Tanaka *et al.* 1995)においてこのアントシアニンの合成に成功したように、遺伝子組換え技術の導入が必要である。しかしながら、ジャーマンアイリス(Jeknic *et al.* 1999)およびチャショウブ(竹中 2004)では形質転換体が獲得されているものの、ハナショウブにおける形質転換体は全く獲得されていないのが現状である。それ故、ハナショウブに分子育種を導入するためには、先ずその形質転換系の確立が必要である。

ハナショウブの青色花品種を育成するために、アントシアニンの delphinidin 3pCRG5G とフラボンの isovitexin などとのコピグメンテーションを利用した育種法(藪谷 2004、Yabuya *et al.* 2006)が提案されているので、本研究の delphinidin 3pCRG5G 型に属する系統はその重要な遺伝資源である(Table 2-1)。また、ハナショウブではコピグメンテーションが花色の青色化ばかりでなく、花色発現の安定性にも貢献している(Yabuya *et al.* 2000)。従って、コピグメンテーションを利用した育種法は、花色の青色化および安定化を進める上で極めて重要である。

ハナショウブにおいて、これまでに報告されている主要アントシアニンの型のすべては、delphinidin 系または cyanidin 系アントシアニンに属する 1 または 2 種類のアントシアニンにより構成されていた (Yabuya 1991、Yabuya *et al.* 1994a)。しかしながら、本研究では両者の混在型、すなわち malvidin 3RG5G – peonidin 3RG5G および malvidin 3pCRG5G – peonidin 3pCRG5G –

petunidin 3pCRG5G の 2 つの型が発見された。このような混在型は、delphinidin 系アントシアニンによる紫色と cyanidin 系アントシアニンによる赤(マゼンタ)色との混色による新規花色が期待されるので、malvidin3RG 5G—peonidin 3RG5G 型品種「桃児童」、malvidin 3pCRG5G—peonidin 3pCRG5G—petunidin 3pCRG5G 品種、「十六夜」、「伊勢の海」および「不知火」は花色の多彩化育種を促進するための遺伝資源として注目される。

ハナショウブにおけるアントシアニンの主要な型として、本研究では 29 種類が認められた(Table 2-1)。Yabuya (1991) は主要アントシアニンの基本(野生)型が malvidin 3pCRG5G—petunidin 3pCRG5G 型であることを報告しており、このことは本研究の結果からも支持された。従って、Table 2-1 に示したように、malvidin 3pCRG5G—petunidin 3pCRG5G を除いた 28 の主要アントシアニン型はいずれも変異型とみなされる。これらの変異型に属する品種および系統は、ハナショウブにおけるアントシアニン生合成経路の遺伝分析を進める上で貴重な材料となるものである。

ハナショウブ以外の *Iris* 属 13 種についてみると、アヤメおよびジャーマンアイリスからは delphinidin 3CRG5G が、*I. milesii* からは delphinidin 3-cis pCRG5G が本研究により新たに推定された。さらに、これらのアントシアニンは delphinidin 型アントシアニンであるので、アヤメ、ジャーマンアイリスおよび *I. milesii* の青色花を育種するのに有用な色素として大いに期待できる。また、delphinidin 3CRG5G はハナショウブでは未だ発見されていない色素であるので、これらの種はハナショウブの青色花を育種するための遺伝資源としても有用である。

現在、ハナショウブの品種数は 4,000 を超え、育種家の努力により今なお増え続けており、一方 *Iris* 属の種は 242 を数え(Lawrence and Randolph 1959)、ハナショウブ以外の園芸種にも数多くの品種が存在する。本研究でアントシアニンの特性を調査したのはそのごく一部に過ぎない。従って、ハナショウブなどの *Iris* 属植物の花色の多彩化育種を促進するために、今後とも有用アントシアニンの種内・種間変異を探索することに努めたい。

先に述べたように、ハナショウブの主要アントシアニンは malvidin 3pCRG5G—petunidin 3pCRG5G であるので、これら色素の生合成には 5GT および 3AT の酵素が関与している。しかしながら、*Iris* 属が属する単子葉植物では、これまで両酵素の特性やアントシアニン生合成における 5-O-グルコシル化と 3-アシル化の順序についての知見は全く得られていなかった。そこで、本研究では、ハナショウブにおける 5GT および 3AT の基質特異性を明らかにするとともに、アントシアニン生合成経路の末端部を提案した(Fig. 3-1)。

種々の植物種における 5GT および 3AT の基質特異性に関するこれまでの報告により、アントシアニン生合成における 5-O-グルコシル化と 3-アシル化の順序は 4 種類の型に分類された (Table 5-1)。すなわち、アントシアニンの生合成経路において 3 位のアシル化が 5 位の配糖化に先行し、かつ、5 位の配糖化のために 3 位のアシル化が必須であるもの (第 1 型)、3 位のアシル化が 5 位の配糖化に先行するが、5 位の配糖化に 3 位のアシル化を必要とはしないもの (第 2 型)、3 位のアシル化後に 5 位の配糖化と 5 位の配糖化後に 3 位のアシル化が同時に起こるもの (第 3 型)、および 5 位の配糖化が 3 位のアシル化に先行するが、3 位のアシル化に 5 位の配糖化を必要としないもの (第 4 型) である。これらの型のうち、ハナショウブはアントシアニン 3G が 5GT の基質にも 3AT の基質にもなり得ないという点で *S. dioica* (Kamsteeg *et al.* 1978、

Table 5-1. The sequence type of 5-*O*-glucosylation and 3-acylation in anthocyanin biosynthesis

Type	Description and proposed main sequence	Plant source	Reference
1	5- <i>O</i> -glucosylation after 3-acylation		
	3RG → 3-acyl RG → 3-acyl RG5G	<i>Petunia hybrida</i>	Jonsson <i>et al.</i> 1984
	3XG* <sup>1</sup> → 3-acyl XG → 3-acyl XG5G	<i>Matthiola incana</i>	Teusch <i>et al.</i> 1986
	3S* <sup>2</sup> → 3-acyl S → 3-acyl S5G	<i>Ajuga reptans</i>	Callebaut <i>et al.</i> 1996
	3G → 3-acyl G → 3-acyl G5G	<i>Zinnia elegans</i>	Ino <i>et al.</i> 1993a
		<i>Centaurea cyanus</i>	Yamaguchi <i>et al.</i> 1995
2	5- <i>O</i> -glucosylation after 3-acylation or only 5- <i>O</i> -glucosylation		
	3G → 3-acyl G → 3-acyl G5G	<i>Dahlia variabilis</i>	Ogata <i>et al.</i> 2001
	or		
	3G → 3G5G		
3	Simultaneously 5- <i>O</i> -glucosylation and 3-acylation, and vice versa		
	3G → 3G5G → 3-acyl G5G	<i>Perilla frutescens</i>	Yamazaki <i>et al.</i> 1999
	and		
	3G → 3-acyl G → 3-acyl G5G		
4	5- <i>O</i> -glucosylation prior to 3-acylation or only 3-acylation		
	3G → 3G5G → 3-acyl G5G	<i>Silene dioica</i>	Kamsteeg <i>et al.</i> 1980
	3RG → 3RG5G → 3-acyl RG5G		
	or		
	3G → 3-acyl G		
	3RG → 3-acyl RG	<i>Iris ensata</i>	Yabuya <i>et al.</i> 2002
	3RG → 3RG5G → 3-acyl RG5G		
	or		
	3RG → 3-acyl RG		

Only sugars abbreviated are shown in the sequence.

\*1: 3XG, anthocyanidin 3-xylosylglucoside;

\*2: 3S, anthocyanidin 3-sophoroside.

1980)とは異なるが、第 4 の型に属することが明らかになった。アントシアニン生合成における 5GT と 3AT の順序に関するこれまでの知見は、双子葉類植物からのみ得られており、そこに単子葉類植物であるハナショウブの知見が加わったことはアントシアニンの修飾機構を解明する上で非常に意義深い。

アントシアニン生合成酵素をコードする遺伝子に関する研究は専ら双子葉植物で行われており(Heller and Forkmann 1994, Springob *et al.* 2003, 藪谷 2004, Tanaka and Brungliera 2006)、単子葉植物のものは極めて限定されている。本研究では、ダッチアイリスの花蕾から構築した cDNA ライブラリーからのスクリーニングにより、5GT および 3AT cDNA クローンの単離・解析に成功した。このような成功は、単子葉植物では最初のことであった。

Table 5-1 に示したように、ペチュニアでは 5GT がアントシアニン 3RG を利用することができない。それ故、先に述べたように、ペチュニアの赤色花は cyanidin 3G および 3RG によるものであるが(Wiering and de Vlaming 1984)、cyanidin 3RG を主要アントシアニンとして含むペチュニア品種にダッチアイリスの 5GT 遺伝子を導入することにより、ペチュニアが cyanidin 3RG5G を合成することが期待できる。第 2 章で示したように、cyanidin 3RG よりも cyanidin 3RG5G の方がより赤くなるので、これまでにない、明るく、鮮やかな赤色花品種をペチュニアに育成することが可能となろう。このように、ダッチアイリスで単離された 5GT 遺伝子は、*Iris* 属以外の園芸種の分子育種ツールとして利用が大いに期待できる。

一方、ハナショウブと異なり、*S. dioica* の 5GT 遺伝子はアントシアニン 3G を基質として利用できるので(Kamsteeg *et al.* 1978, 1980)(Table 5-1)、この遺伝子をハナショウブに遺伝子導入できれば、ハナショウブが自然界では合成できないアントシアニン 3G5G の生産が可能となる。このような新規のアントシアニンも、ハナショウブの

花色の多彩化育種を促進するであろう。

花卉類の遺伝子組換えに関する研究は、トウモロコシの *DFR* 遺伝子のペチュニアへの導入に始まり (Meyer *et al.* 1987)、これまでにカーネーションではペチュニアの *F3'5'H* と *DFR* をコードする両遺伝子 (図 1-1) を *DFR* 遺伝子欠損の白色花品種に導入し、青紫品種「Moondust」 (Tanaka *et al.* 1998, 田中ら 2002) の育成、またパンジー (*Viola wittrockiana*) の *F3'5'H* 遺伝子のバラ (*Rosa spp.*) への導入により青バラ (勝元・田中 2005) の獲得も報告されている。しかしながら、先に述べたように、*Iris* 属ではジャーマンアイリス (Jeknic *et al.* 1999) やチャショウブ (竹中 2004) において形質転換体を獲得しているにも拘らず、品種の育成までには至っていない。そこで、このような花色の分子育種を進めるためには、本属植物に遺伝子組換え技術を確立するとともに、アントシアニン生合成経路に関する分子遺伝学的知見を蓄積することが重要である。さらに、本研究のハナショウブのように、アントシアニン修飾酵素の基質特異性を明らかにすることにより、その種が自然界で発現していない新規アントシアニンの合成が、他種からの遺伝子導入により期待できる。それ故、アントシアニン生合成経路に関与する酵素およびその遺伝子に関する知見の蓄積や遺伝子ツールの開発は、今後、*Iris* 属植物ばかりでなく花卉類の花色の多彩化育種を進める上でますます重要なものとなろう。