

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4690197号

(P4690197)

(45) 発行日 平成23年6月1日(2011.6.1)

(24) 登録日 平成23年2月25日(2011.2.25)

(51) Int.Cl.		F I		
AO 1 H	5/00	(2006.01)	AO 1 H	5/00 Z N A A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 O 3

請求項の数 3 (全 55 頁)

(21) 出願番号	特願2005-513219 (P2005-513219)	(73) 特許権者	599093731
(86) (22) 出願日	平成16年8月13日 (2004.8.13)		インターナショナル フラワー ディベロ プメンツ プロプライエタリー リミティ ド
(86) 国際出願番号	PCT/JP2004/011958		オーストラリア ヴィクトリア州 308 3 バンドーラ パーク ドライブ 1
(87) 国際公開番号	W02005/017147	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成17年2月24日 (2005.2.24)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成19年8月8日 (2007.8.8)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	特願2003-293121 (P2003-293121)		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成15年8月13日 (2003.8.13)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 福本 積
(31) 優先権主張番号	特願2004-192034 (P2004-192034)	(74) 代理人	100082898
(32) 優先日	平成16年6月29日 (2004.6.29)		弁理士 西山 雅也
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 花色が変更されたバラの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バラの内在性のジヒドロフラボノール還元酵素の発現を人為的に抑制し、かつパンジー由来のフラボノイド 3', 5'-水酸化酵素をコードする遺伝子及びバラ以外の由来のジヒドロフラボノール還元酵素をコードする遺伝子を発現させることを特徴とするバラの製造方法。

【請求項 2】

バラの内在性のフラボノイド 3'-水酸化酵素の発現を人為的に抑制し、かつパンジー由来のフラボノイド 3', 5'-水酸化酵素をコードする遺伝子を発現させる、請求項 1に記載のバラの製造方法。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の製造方法により得られるバラもしくははその子孫またはそれらの組織。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、新たな花色を有するバラの製造方法に関するものである。詳しくは、バラ内在性の代謝経路を人為的に抑制し、かつパンジーのフラボノイド 3', 5'-水酸化酵素をコードする遺伝子と、ジヒドロミリセチンを還元するジヒドロフラボノール還元酵素をコードする遺伝子を発現させることによるバラの製造方法に関するものである。

【背景技術】

花卉の役割は花粉を運ぶ昆虫・鳥類などのポリネーターを魅了することにあるため、花の色や形、模様、香りはポリネーターと共進化してきた（本田利夫ら 現代化学5月号25-32（1998））。おそらくはその結果、ひとつの種の花があらゆる色をもつ場合は少なく、例えば、バラやカーネーションには紫から青の品種がなく、ショウブやリンドウには鮮やかな赤い品種はない。花の色は鑑賞の際にも花卉の最も重要な形質であることから、古くから様々な色の花が交配によって育種されてきた。特にバラは花の女王と呼ばれ、また、市場価値も高いことから、世界中で交配が行われてきた。

例えば、黄色の品種のなかったバラに西アジア原産の *Rosa foetida* を交配することにより現在の黄色のバラが育種された。しかしながら花の色はその植物のもつ遺伝的能力によって決定されているため、利用できる遺伝子源が限定される交配による育種では実現できる花色には限界がある（Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 39 1119-1126, 1998、Mol et al. Curr. Opinion Biotechnol. 10, 198-201 1999）。なかでも青いバラの育成は不可能の代名詞とも、アーサー王の聖杯に匹敵するとされてきた（大場英章「バラの誕生」1997中公新書、鈴木正彦「植物バイオの魔法 青いバラも夢ではなくなった」1990講談社ブルーバックス、最相葉月「青いバラ」2001小学館）。

現在、一般に「青バラ」と呼ばれる品種は存在するが、これは「藤色系」のバラのことを指す。交配による「青バラ」の品種改良は1945年作出された薄紫を帯びた灰色の「グレーパール」が最初であると言われている。その後、1957年に薄紫ピンクの「スターリングシルバー」が作出され、これらの品種を交配親として「ブルームーン」（1964年作出）や「マダムビオレ」（1981年作出）など、多くの藤色系バラが作られている。また、これらの藤色系バラなどを利用し、さらに育種を重ねることで、「青龍」（1992年作出）や「ブルーヘブン」（2002年作出）などの、淡いグレー系のバラが作出され、新タイプの「青バラ」として注目を集めている。

しかしながらこれらの花の色は実際には青くはなく灰色がかったぼんやりしたピンクに留まっており、長年の育種努力にも関わらず、未だ「青」と呼べるバラは存在しない。園芸業界においては一般にイギリス王立園芸協会カラーチャート（RHSCC: The Royal Horticultural Society Colour Chart）でバイオレットからブルーのグループが「青」と呼ばれることが多い。本発明はイギリス王立園芸協会カラーチャートでバイオレットグループ、バイオレットーブルーグループまたはブルーグループに示される花色を有するバラの創出を目指すものである。

花の色は主にアントシアニン、カロテノイド、ベタレインの3種の化合物群に由来するが、青色を司るのは極大吸収波長の幅が最も広い（オレンジ色から青色）アントシアニンである。アントシアニンはフラボノイドの一種で図1に示した代謝経路で生合成される。アントシアニンは、通常上皮細胞の液胞中に局在する。アントシアニンの色調（すなわち花の色）は、アントシアニンの構造に大きく依存し、B環の水酸基の数が多いほど青くなる。B環の水酸化は、フラボノイド3'-水酸化酵素（F3'H）およびフラボノイド3', 5'-水酸化酵素（F3'5'H）によって触媒される。F3'H活性とF3'5'H活性がない場合にはペラルゴニン（橙色から赤色）が合成され、F3'H活性がある場合はシアニン（赤から紅色）が合成され、F3'5'H活性がある場合はデルフィニン（紫色）が合成される。

これらのアントシアニンは糖やアシル基により修飾され、様々なアントシアニンとなる。一般的に修飾する芳香族アシル基が多いほどアントシアニンは青くなる。アントシアニンは液胞のpH、共存するフラボノールやフラボン、金属イオンなどによっても大きく色を変える（斎藤規夫 蛋白質核酸酵素 47 202-209 2002, Brouillard and Dangles, In the flavonoids: Advances in Research since 1986 (Ed by Harborne) Capmann and Hall, London pp565-588, Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 39 1119-1126

10

20

30

40

50

, 1998, Mol et al, Trends in Plant Science 3, 212-217 1998, Mol et al. Curr. Opinion Biotechnol. 10, 198-201 1999)。

バラの花弁のアントシアニンは、ペラルゴニジンとシアニジンおよびペオニジンの誘導体であり、デルフィニジンの誘導体は存在しない (Biolley and May, J. Experimental Botany, 44, 1725-1734 1993, Mikanagi Y, Saito N, Yokoi M and Tatsuzawa F (2000) Biochem Systematics Ecol. 28:887-902)。これが青いバラがない最大の理由とされている。現在のバラは、交配可能なバラの近縁種 (*R. multiflora*, *R. chinensis*, *R. gigantea*, *R. moschata*, *R. gallica*, *R. whichuraiana*, *R. foetida* など) の交配によって作出された。

多くの交配の努力にもかかわらず、青いバラが実現していないのはバラの近縁種にはデルフィニジンを生産する能力がないからだと考えられている。花卉でデルフィニジンを生産するためには上述のように F3'5'H が花卉で発現する必要があるが、バラ及びバラの近縁種の花弁では F3'5'H が発現していないと考えられている。したがって交配によりデルフィニジンを花卉で蓄積させ青いバラを取得することは不可能であろう。また、バラ花卉に微量の青い色素ロザシアニンが含まれることは知られており、その化学構造も決定されているが (特開 2002-201372)、ロザシアニンを増加させることにより青いバラを作出した報告はなく、ロザシアニンの生合成経路、それに関わる酵素や遺伝子の知見もない。

また、生物が生産する青や紫の色素の例として藍が生産するインディゴ (たとえば, Appl Microbiol Biotechnol 2003 Feb; 60(6): 720-5) や微生物が生産するビオラセイン (J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2000 Oct; 2(4): 513-9, Org. Lett., Vol. 3, No. 13, 2001, 1981-1984) があり、これらはトリプトファンに由来することや生合成経路についても知見はある。

この他にクチナシの実由来のイリドイド化合物による青色色素 (S. Fujikawa, Y. Fukui, K. Koga, T. Iwashita, H. Komura, K. Nomoto, (1987) Structure of genipocyanin G1, a spontaneous reaction product between genipin and glycine. Tetrahedron Lett. 28(40), 4699-700, S. Fujikawa, Y. Fukui, K. Koga, J. Kumada, (1987) Brilliant skyblue pigment formation from gardenia fruits. J. Ferment. Technol. 65(4), 419-24) や、コケ由来のアズレン (和光純薬工業株式会社) など知られているが、これらを植物花卉で発現させ、花色を青くした報告はない。

バラに他の植物で発現している F3'5'H の遺伝子を導入し花卉で発現させることができれば青いバラを作出できるのではないかと期待されていた (最相葉月 「青いバラ」 2001 小学館)。F3'5'H 遺伝子はペチュニア、リンドウ、トルコギキョウなど多くの植物から得られている (Holton et al. Nature 366, 276-279, 1993, Tanaka et al. Plant Cell Physiology. 37, 711-716 1996, WO93/18155)。また、バラの形質転換系についても報告はある (たとえば Firoozabady et al. Bio/Technology 12:883-888 (1994), US 5480789, US 5792927, EP 536 327 A1, US 20010007157 A1)。

さらに、実際にバラにペチュニアの F3'5'H 遺伝子を導入した報告もある (WO93/18155, WO94/28140)。

しかしながら、青いバラを得るまでには到っておらず、青いバラを得るためにはバラに適した花色色素の代謝を改変する工夫が必要であると考えられる。

一方、F3'5'H遺伝子を、デルフィニジンを生産せずペラルゴニジンを生産している赤いカーネーションに導入したところ、ペラルゴニジンとともに、デルフィニジンの蓄積が確認されたが、花色はやや紫がかった赤に変わるに留まった(WO94/28140)。この結果は、F3'5'Hの発現だけでは「青い」カーネーションを得ることはできず、カーネーションの内在性のペラルゴニジン合成への代謝の流れを抑制する必要があることを示唆している。

カーネーションの内在性の代謝経路(ジヒドロフラボノール還元酵素(DFR)によるジヒドロケンフェロール(DHK)の還元)との競合を回避するために、白いカーネーションの中からDFRが欠損している品種を選択した。このカーネーションに、F3'5'HとペチュニアDFR(DHKを還元できず、ジヒドロミリセチン(DHM)を効率よく還元することが知られていた)の遺伝子を導入した。その結果、デルフィニジンの含量がほぼ100%で、花色も従来のカーネーションにはない青紫色となった組換えカーネーションを取得することができた例がある(蛋白質核酸酵素, Vol. 47, No. 3, p 228, 2002)。このようにカーネーションに青い花を実現するためには、F3'5'H遺伝子の発現によるデルフィニジンの蓄積だけではなく、工夫が必要であった。

DFRはすでに多くの植物からクローニングされている(ペチュニア、タバコ、バラ、トレニア、キンギョソウ、ガーベラ、シンビジウム、オオムギ、トウモロコシなど)(Meyer et al. Nature 330, 677-678, 1987, Helariutta et al. Plant Mol. Biol. 22 183-193 1993, Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 36, 1023-1031, Johnson et al. Plant J. 19, 81-85, 1999)。DFR遺伝子については植物種によって基質特異性が異なり、ペチュニア、タバコ、シンビジウムのDFR遺伝子はDHKを還元できないこと、ペチュニアのDFR遺伝子はジヒドロフラボノールの中ではDHMをもっとも効率よく還元することが知られている(Forkmann et al. Z. Naturforsch. 42c, 1146-1148, 1987, Johnson et al. Plant J. 19, 81-85, 1999)。しかしながらこれらのDFR遺伝子をバラで発現させた例は報告されていない。

内在性の代謝経路や酵素と外来の遺伝子由来の酵素たとえばF3'5'Hとの競合を回避する方法としては上述のように、ある遺伝子が欠損した品種に遺伝子を導入する方法がある。また、人為的に目的の遺伝子の発現を抑制する方法として、目的の遺伝子を相同組換えなどにより欠失させる方法も知られてはいるが、相同組換えの頻度が低く、適応できる植物種も限定されているため、実用化にはいたっていない(たとえば, Nat Biotechnol 2002, 20:1030-4)。

転写レベルでの抑制方法として、標的遺伝子のmRNAのアンチセンスRNAを転写させるアンチセンス法(van der Krol et al. Nature 333, 866-869, 1988)、標的の遺伝子のmRNAと同じRNAを転写させるセンス(コサプレッション)法(Napoli et al. Plant Cell 2, 279-289, 1990)、標的の遺伝子のmRNAに対応する二本鎖RNAを転写する方法(RNAi法, Waterhouse et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13959-13964 1998)が利用されている。

これらの3つの方法については多くの成功例が知られている。バラにおいてはアントシアニンの合成に必要なカルコンシンターゼ(CHS)遺伝子のコサプレッションにより、花色を赤からピンクに改変した報告がある(Guttererson Hort Science 30:964-966 1995)が、この場合CHSの抑制が不完全であり、完全にアントシアニンの合成を抑制し白い花の系統を得るには至らなかった。

【特許文献1】特開2002-201372号公報

【特許文献2】WO93/18155

10

20

30

40

50

- 【特許文献3】USP 5480789
- 【特許文献4】USP 5792927
- 【特許文献5】EP 536 327 A1
- 【特許文献6】US 20010007157 A1
- 【特許文献7】WO94/28140
- 【非特許文献1】本田利夫ら 現代化学5月号25-32 (1998)
- 【非特許文献2】Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 39 1119-1126, 1998
- 【非特許文献3】Mol et al. Curr. Opinion Biotechnol. 10, 198-201 1999 10
- 【非特許文献4】大場英章「バラの誕生」1997中公新書
- 【非特許文献5】鈴木正彦 「植物バイオの魔法 青いバラも夢ではなくなった」1990講談社ブルーバックス
- 【非特許文献6】最相葉月 「青いバラ」2001小学館
- 【非特許文献7】斎藤規夫 蛋白質核酸酵素 47 202-209 2002
- 【非特許文献8】Brouillard et al. In the flavonoids: Advances in Research since 1986 (Ed by Harborne) Capmann and Hall, London pp565-588
- 【非特許文献9】Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 39 1119-1126, 1998 20
- 【非特許文献10】Mol et al, Trends in Plant Science 3, 212-217 1998
- 【非特許文献11】Mol et al. Curr. Opinion Biotechnol. 10, 198-201 1999
- 【非特許文献12】Biolley and May, J. Experimental Botany, 44, 1725-1734 1993
- 【非特許文献13】Mikanagi Y, et al. (2000) Biochem Systematics Ecol. 28:887-902
- 【非特許文献14】Appl Microbiol Biotechnol 2003 Feb; 60 (6): 720-5 30
- 【非特許文献15】J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2000 Oct; 2 (4): 513-9
- 【非特許文献16】Org. Lett., Vol. 3, No. 13, 2001, 1981-1984
- 【非特許文献17】S. Fujikawa, et al. (1987) Tetrahedron Lett. 28 (40), 4699-700
- 【非特許文献18】S. Fujikawa, et al. (1987) J. Ferment. Technol. 65 (4), 419-24
- 【非特許文献19】Holton et al. Nature 366, 276-279 40, 1993
- 【非特許文献20】Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 37, 711-716 1996
- 【非特許文献21】Firoozababy et al. Bio/Technology 12:883-888 (1994)
- 【非特許文献22】蛋白質核酸酵素, Vol. 47, No. 3, p228, 2002
- 【非特許文献23】Meyer et al. Nature 330, 677-678, 1987
- 【非特許文献24】Helariutta et al. Plant Mol. Biol. 22 183-193 1993 50

【非特許文献25】Tanaka et al. Plant Cell Physiol . 36, 1023-1031

【非特許文献26】Johnson et al. Plant J. 19, 81-85, 1999

【非特許文献27】Forkmann et al. Z. Naturforsch. 42c, 1146-1148, 1987

【非特許文献28】Nat Biotechnol 2002、20:1030-4

【非特許文献29】van der Krol et al. Nature 333, 866-869, 1988

【非特許文献30】Napoli et al. Plant Cell 2, 279-289, 1990 10

【非特許文献31】Waterhouse et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13959-13964 1998

【非特許文献32】Guttererson HortScience 30:964-966 1995

【非特許文献33】鈴木省三, 「ばら、花図譜」, 小学館, p. 256-260, 1990

【発明の開示】

上記のようにバラにF3'5'H遺伝子を導入し、花卉で発現させることによりバラの花の色を改変することができた。カーネーションでは、DFR欠損の品種でF3'5'H遺伝子とペチュニアDFR遺伝子を発現させることにより、青紫色のカーネーションを作ることができた。しかしながら、いまだに「青いバラ」は創出されていない。そこで、未発明は、青い花を咲かせるバラを提供しようとするものである。 20

従って本発明は、(1)バラの内在性の代謝経路を人為的に抑制し、かつパンジー由来のフラボノイド3', 5'-水酸化酵素をコードする遺伝子を発現させることを特徴とするバラの製造方法を提供する。

本発明はまた、(2)バラの内在性の代謝経路を人為的に抑制し、かつパンジー由来のフラボノイド3', 5'-水酸化酵素をコードする遺伝子及びジヒドロフラボノール還元酵素をコードする遺伝子を発現させることを特徴とするバラの製造方法を提供する。

本発明は更に、(3)バラの内在性のジヒドロフラボノール還元酵素の発現を人為的に抑制し、かつパンジー由来のフラボノイド3', 5'-水酸化酵素をコードする遺伝子及びバラ以外の由来のジヒドロフラボノール還元酵素をコードする遺伝子を発現させることを特徴とするバラの製造方法を提供する。 30

本発明は更に、(4)バラの内在性のフラボノイド3'-水酸化酵素の発現を人為的に抑制し、かつパンジー由来のフラボノイド3', 5'-水酸化酵素をコードする遺伝子を発現させることを特徴とするバラの製造方法を提供する。

前記のパンジーのフラボノイド3', 5'-水酸化酵素をコードする遺伝子は、例えば、配列番号: 1または配列番号: 3記載の遺伝子である。また、前記のジヒドロフラボノール還元酵素をコードする遺伝子は、好ましくは、アイリス、ニーレンベルギア、ペチュニア、シンビジウム、リンドウ、トルコギキョウ由来である。 40

本発明は更に、(5)上記(1)~(4)のいずれかに記載の製造方法により得られるバラもしくはそれと同じ性質を有するその子孫またはそれらの組織を提供する。

本発明はまた、(6)上記(1)~(4)のいずれかの製造方法により得られたバラの花弁の色が、紫、青紫又は青であるバラもしくはそれと同じ性質を有する子孫またはそれらの組織を提供する。

本発明はまた、バラの花弁の色が、イギリス王立園芸協会カラーチャート(RHSCC)のバイオレットグループ、バイオレットブルーグループまたはブルーグループに属するものであり、上記(6)に記載のバラもしくはそれと同じ性質を有する子孫またはそれらの組織を提供する。

本発明は更に、バラの花弁の色が、イギリス王立園芸協会カラーチャート(RHSCC 50

) のバイオレットグループの 85a または 85b に属するものである、上記 (7) に記載のバラもしくははそれと同じ性質を有する子孫またはそれらの組織を提供する。

【図面の簡単な説明】

図 1 は、フラボノイドの生合成経路を示す。

CHS：カルコン合成酵素、CHI：カルコンイソメラーゼ、

FNS：フラボン合成酵素、F3H：フラバノン 3-水酸化酵素、

F3'H：フラボノイド 3'-水酸化酵素、

F3'5'H：フラボノイド 3'5'-水酸化酵素、FLS：フラボノール合成酵素、

DFR：ジヒドロフラボノール 4-還元酵素、

ANS：アントシアニン合成酵素、AS：オーロン合成酵素、

C2'GT：カルコン 2'配糖化酵素

図 2 は、プラスミド pBERD1 の構造を示す。

図 3 は、プラスミド pBPDBP2 の構造を示す。

図 4 は、プラスミド pBPDBP8 の構造を示す。

図 5 は、プラスミド pSPB461 の構造を示す。

図 6 は、プラスミド pSPB472 の構造を示す。

図 7 は、プラスミド pSPB130 の構造を示す。

図 8 は、プラスミド pSPB919 の構造を示す。

図 9 は、プラスミド pSPB920 の構造を示す。

図 10 は、プラスミド pSPB1106 の構造を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

バラでデルフィニジンが生産されても花色が青くならない理由にはいくつか考えられる。アシル基や糖の修飾によってアントシアニンの安定性、溶解度、色が変化する。すなわち、芳香族アシル基の付加により青くなることが知られている。また、フラボノールやフラボンといったコピグメントとアントシアニンが複合体を形成すると、色が青くなり、極大吸収波長は長波長にシフトし吸光度も増す。アントシアニンの色は pH によっても変化する。pH が低いと赤く、中性付近で青くなるため、花の色はアントシアニンが局在する液胞の pH に依存する。また、 Al^{3+} 、 Mg^{2+} などの金属イオンとの共存による金属錯体の形成が花色に重要な影響を与える場合もある。試行錯誤と鋭意検討の結果、ここでは花卉でのデルフィニジンの割合を高める工夫を考案した。

まず、青紫色のカーネーションの作出と同様な手法で青いバラの作出を試みた。すなわち白いバラ 112 品種を解析し DFR 欠損株の同定を試みたが、カーネーションの場合とは異なり完全な DFR 欠損系統を取得することはできなかった。これはカーネーションが 2 倍体であるのに対し、通常栽培されるバラは 4 倍体であるため、単一の遺伝子の欠損株を求めることが困難であるためであろう。

次に、花色が白い品種 Tineke にパンジーの F3'5'H 遺伝子とペチュニアの DFR 遺伝子を導入したところ、デルフィニジンの蓄積は認められたが、量がわずかであり、青いバラには至らなかった。

本発明においては、バラの内在性のフラボノイド合成経路に属する酵素である DFR の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて人為的に抑制し、かつパンジーの F3'5'H 遺伝子を発現させ、さらにジヒドロミリセチンを還元する DFR 遺伝子を発現させることによりデルフィニジンの含有率を花卉に含まれる総アントシアニン中のほぼ 80-100% にすることにより、青いバラを実現することができた。

ジヒドロミリセチンを還元する DFR 遺伝子はここではアイリス（アヤメ科）、ニールンベルギア（ナス科）、ペチュニア（ナス科）を用いたが、他にジヒドロミリセチンを還元する DFR 遺伝子の起源としてはタバコ（ナス科）、シクラメン（サクラソウ科）、デルフィニウム（キンポウゲ科）、シンビジウム（ラン科）、リンドウ（リンドウ科）、トルコギキョウ（リンドウ科）などペラルゴニジンを蓄積しない植物を挙げることができる（Forkmann 1991 Plant Breeding 106 1-26 Johnsonら、Plant J. 1999 19 81-85）。本発明において使用

するDFR遺伝子は、ジヒドロミリセチンを好んで還元する遺伝子が好ましい。

また、本発明においては、バラの内在性のフラボノイド合成経路に属する酵素であるフラボノイド3'-水酸化酵素(F3'H)の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて人為的に抑制し、かつパンジーのF3'5'H遺伝子を発現させることにより、デルフィニジンの含有率を花卉に含まれる総アントシアニン中のほぼ80-100%にすることにより、青いバラを実現することができた。

本発明により得られたバラは、これまでにない花色を有するものであり、本発明により、イギリス王立園芸協会カラーチャートで、レッド-パープルグループ、パープルグループ、パープル-バイオレットグループのみならず、バイオレットグループ、バイオレット-ブルーグループ、ブルーグループに属する花色を有するバラを提供することができる。

10

【実施例】

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法はとくに断らない限り、Molecular Cloning (Sambrook and Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) に依った。

〔実施例1〕 花色測定方法

花卉色彩評価は、分光測色計CM2022 (ミノルタ株式会社、日本) を用いて10度視野、D65光源で測定し、色彩管理ソフトSpectraMagic (ミノルタ株式会社、日本) により解析を行った。なお、イギリス王立園芸協会カラーチャート(RHSCC) 番号は、目視判定および上記の機器測定により得られた色彩値(CIE L*a*b*表色系) をもとに、色彩分類システムVersion 2.1.1 (株式会社日本総合研究所(日本)、特開2002-016935号公報) を用いて近似色の照合をおこなった。このシステムを用いることにより客観的に近似のRHSCC番号を選択できる。

20

この方法で従来いわゆる“青いバラ”と呼ばれている品種の花弁の色彩を測定し、RHSCCにおける近似色を求めたところ、ブルームーンやマダムビオレは186d (GREYED-PURPLE GROUP)、ラバンデは186c (GREYED-PURPLE GROUP)、青龍は189d (GREYED-GREEN GROUP)、ブルーヘブンは198d (GREYED-GREEN GROUP) であった。したがってこれらの品種は青いバラと呼ばれているがRHSCC番号の分類ではグレーグループであり、本発明が目的としている青さを有していなかった。

30

〔実施例2〕 フラボノイドの分析

1) 花卉色素の抽出

凍結乾燥した花卉0.5gを4mlの0.1%TFAを含む50%アセトニトリル(CH_3CN) 中で20分間、超音波下で抽出し0.45 μm のフィルターで濾過した。この抽出液のアントシアニンの高速液体クロマトグラフィー(HPLC) 分析は以下の条件で行った。カラムはRSpak DE-413L (4.6mm ϕ x 25cm、昭工株式会社) を用い、流速0.6ml/minで、移動相は0.5%トリフルオロ酢酸(TFA) を含む10%から50%の $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ の直線濃度勾配15分間の後、0.5%TFAを含む50% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ で10分間のイソクラティック溶出を行った。検出はフォトダイオードアレイ検出器SPD-M10A (島津製作所) を用い、600-250nmの波長領域を検出し、520nmの吸光度の面積により各アントシアニンの存在比を求めた。

40

2) アントシアニジンの分析

上記濾液0.2mlをガラス試験管中で減圧乾固し、0.2mlの6N塩酸(HCl) に溶解し、100℃で20分間、加水分解を行った。分解後のアントシアニジンは0.2mlの1-ペンタノールで抽出し、有機層をHPLCで以下の条件により分析した。カラムはODS-A312 (6mm ϕ x 15cm、ワイエムシー株式会社) を用い移動相には $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}=15:20:65$ の溶液を用い流速1ml/minで溶出した。

検出はフォトダイオードアレイ検出器SPD-M10A (島津製作所) で600-40

50

0 nmのスペクトルを測定し、吸収極大 ($\lambda_{\max}$) およびリテンションタイム (R. T.) で同定し 520 nmの吸光度の面積で定量した。このHPLC条件下でデルフィニンおよびシアニジンのリテンションタイムおよび $\lambda_{\max}$ は4.0分、5.2分および534 nm、525 nmであった。同定、定量にはフナコシ株式会社より購入したデルフィニン塩酸塩およびシアニジン塩酸塩を標品として用いた。

3) フラボノールの分析

花卉の抽出濾液0.2 mlを1.5 mlのエッペンドルフチューブ中で減圧乾固し0.2 mlの0.1 Mリン酸カリウム緩衝液 (KPB) pH 4.5に溶解し、6ユニットの β -グルコシダーゼ (新日本化学株式会社) と1 unitのナリンゲナーゼ (Sigma Chemical Co., MO, USA)を加え、30℃で16時間保持した。反応後、0.2 mlの90% CH₃CNを酵素反応液に添加し、反応を終了した。この液を0.45 μ mのフィルターでろ過し、下記の条件でHPLCを行った。

カラムはDevelosil C30-UG-5 (4.6 mm ϕ x 15 cm、野村化学株式会社)を用い、流速0.6 ml/minで、移動相は0.1% TFAを含む18%から63%のCH₃CN/H₂Oの直線濃度勾配10分間の後、0.1% TFAを含む63%のCH₃CN/H₂Oのイソクラティック溶出10分間を行った。検出はフォトダイオードアレイ検出器SPD-M10Aを使用し、400-250 nmの波長領域を検出した。この条件下でケンフェロールとケルセチンのR. T. と $\lambda_{\max}$ はそれぞれ11.6分間、365 nmおよび10.3分間、370 nmであった。定量はA330 nmの面積で行い、標品としてフナコシ株式会社のケンフェロールとケルセチンを用いた。

[実施例3] pHの測定方法

-80℃で1時間以上凍結したバラ花卉約2 gを、ホモジナイザーを用いて搾り、搾汁液を得た。これをpHメーター (F-22、堀場製作所) に微小電極6069-10C (堀場製作所) を接続しpHを測定した。

[実施例4] バラの形質転換

バラの形質転換に関してはすでに多くの方法が報告されており (たとえばFiroozababy et al. Bio/Technology 12:883-888 (1994)、US 5480789、US 5792927、EP 536 327 A1、US 20010007157 A1)、これらの方法に従って形質転換を実施できる。具体的にはアグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) Ag10株 (Lazo et al. Bio/Technology 9:963-967, 1991) の菌液中に、無菌苗の葉から誘導したバラのカルスを5分間浸し、滅菌濾紙で余分な菌液を拭き取った後、継代用培地に移植し、2日間暗所で共存培養した。

その後、カルベニシリンを400 mg/L加えたMS液体培地で洗浄し、継代用培地にカナマイシン50 mg/Lとカルベニシリン200 mg/Lを加えた選抜・除菌用培地へ移植した。選抜培地上で生育阻害を受けず、正常に増殖する部分の移植と培養を繰り返し、カナマイシン耐性カルスを選抜した。カナマイシン耐性を示した形質転換カルスを、カナマイシン50 mg/L、カルベニシリン200 mg/Lを添加した再分化用の培地で培養し、カナマイシン耐性シュートを得た。得られたシュートは1/2 MS培地で発根させた後、馴化を行った。馴化個体は鉢上げ後、閉鎖系温室で栽培して開花させた。

[実施例5] バラのフラボノイド遺伝子の取得

バラ品種カーディナル花卉由来のcDNAライブラリーをペチュニアのDFR遺伝子 (WO96/36716に記載) をプローブにしてスクリーニングしバラのDFR cDNAを取得し、pCGP645とした。詳細はすでに報告されている (Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 36, 1023-1031 1995)。

同様に、同じライブラリーをペチュニアのカルコンシンターゼA (CHS-A) 遺伝子 (Koes et al. Gene (1989) 81, 245-257) とキンギョソウのアントシアニンシンターゼ (ANS) 遺伝子 (Martin et al. Pla

10

20

30

40

50

nt J, (1991) 1, 37-49) で、公知の方法 (Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 36, 1023-1031 1995) でスクリーニングすることによりバラのカルコンシンターゼ (CHS) とアントシアニンシンターゼ (ANS) のホモログを取得し、それぞれ pCGP634 と pCGP1375 とした。バラの CHS の塩基配列を配列表・配列番号: 5 に、バラの ANS の塩基配列を配列番号: 6 にそれぞれ示す。

[実施例 6] 白バラスクリーニング

遺伝子組換えの手法で青い品種を作出するためには、内在性のアントシアニン合成経路と導入する遺伝子 (具体的には F3'5'H 遺伝子) との競合を回避するために DFR 遺伝子のみが欠損している品種を選抜し、その品種にペチュニア由来 DFR 遺伝子と F3'5'H 遺伝子を導入すればよい (WO96/36716)。

10

白いバラの品種は多数あり、この中で DFR 遺伝子のみが欠損し、他のアントシアニン生合成酵素遺伝子は正常に発現している品種を探索した。花の色が白くなる原因は、アントシアニン生合成に関わる構造遺伝子の変異あるいは欠失に寄る場合とアントシアニン生合成に関わる構造遺伝子の転写を制御する転写調節因子の欠失に寄る場合があると考えられる。ここでは WO96/36716 に従い、DFR 遺伝子の mRNA が欠損しているバラを探索した。

主に白色のバラ 112 系統についてまず実施例 1 に記載した方法により花卉のフラボノイドの組成を分析し、フラボノールが高蓄積している系統を選択した。その後、花卉の搾汁の pH を測定し、相対的に pH が高い品種 80 系統を一次候補とした。

20

次に、これら品種の花弁から RNA を抽出した。RNA の抽出は公知の方法に従った (Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 36, 1023-1031 1995)。得られた RNA を用いてバラ DFR 遺伝子 (Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 36, 1023-1031 1995) とバラアントシアニンシンターゼ (ANS) 遺伝子に対応する mRNA の有無を調べた。RT-PCR 法により、内在性の DFR mRNA の発現量が低く、かつ ANS mRNA 量が正常なレベルの品種 8 品種 (WKS-11、13、22、36、43、ホワイトキラニー、つる No. 2、ティネケ) を選抜した。

なお、RT-PCR はそれぞれの品種の花弁から得た RNA を用いて Super Script First-strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用いた。DFR mRNA の検出には DFR-2F (5'-CAAGCAATGGCATCGGAATC-3') (配列番号: 13) と DFR-2B (5'-TTTCCAGTGAGTGGCGAAAGTC-3') (配列番号: 14) のプライマーを、ANS mRNA の検出には ANS-2F (5'-TGGACTCGAAGAACTCGTCC-3') (配列番号: 15) と ANS-2B (5'-CCTCACCTTCTCCCTTGTT-3') (配列番号: 16) のプライマーを用いた。

30

これらの 8 品種について、ノザン解析を行い (表 1)、DFR mRNA レベルが低い傾向を示し、ANS mRNA レベルが正常であり、かつ培養特性が優れ、形質転換可能な 2 品種 (ティネケ、WKS36) について実際にデルフィニジン生産用コンストラクトを導入することを決定した。

40

表 1

品種名	フラボノール (mg/g petal)			pH	RT-PCR		
	Q	K	Total		DFR	CHS	ANS
WKS-36	0.082	8.095	8.177	4.81	—	+	+
ホワイトキラニー	1.343	6.113	7.456	4.7	+	+	+
つるNo2.	0.715	5.188	5.903	4.7	+	+	+
WKS-11	2.028	0.475	2.503	4.51	+	+	+
ティネケ	0.097	4.337	4.434	4.45	—	+	+
WKS-13	0.320	3.993	4.313	4.45	—	+	+
WKS-22	0.145	10.469	10.614	4.41	—	+	+
WKS-43	0.045	2.104	2.149	4.07	—	+	+

＋：mRNA が有色のバラ（品種ローテローゼ）と同程度検出されたもの。

－：mRNA が有色のバラ（品種ローテローゼ）より低レベルなもの。

Q：ケルセチン、K：ケンフェロール

〔実施例 7〕 ティネケへのバラ由来 DFR 遺伝子の導入

pE2113 (Mitsuhara et al. Plant Vell Physiol. 37, 45-59 1996) はエンハンサー配列を繰り返したカリフラワーモザイクウイルス 35S (E1235S) プロモーターとノパリンシンターゼターミネーターを有する。このプラスミドを SacI で消化し、Blunting Kit (タカラ) を用いて平滑末端にした。この DNA 断片を 8bp の SalI リンカー (タカラ) とライゲーションし、得られたプラスミドを pUE5 とした。

pUE5 を HindIII と EcoRI で消化して得られる約 3kb の DNA 断片を HindIII と EcoRI で消化した pBin19 (Bevan M, Binary Agrobacterium Vector for plant transformation. Nucl. Acid Res. 12, 8711-21, 1984) に導入し、得られたプラスミドを pBE5 とした。pCGP645 を BamHI と XhoI で消化して完全長のバラ DFR cDNA を含む DNA 断片を得た。これを BamHI と XhoI で消化した pBE5 に連結し、pBERD1 (図 2) とした。このプラスミドを Agrobacterium tumefaciens Ag10 株に導入した。

白色系バラ品種「ティネケ」へ pBERD1 (図 2) を導入し、18 個体の形質転換体を得た。得られた形質転換体のうち 6 個体で花色が変化した。白からピンクへの明確な花色がみられた 2 個体について色素分析を行ったところ、いずれもシアニジン、ペラルゴニジンの蓄積が確認された (表 2)。この結果により、品種ティネケは DFR 遺伝子が欠損した品種であるということが推察された。

表 2

個体番号	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)
1	0.014	0.005
2	0.014	0.006

Cya：シアニジン、Pel：ペラルゴニジン

〔実施例 8〕 ティネケへのパンジー由来 F3'5'H 遺伝子 (#18) とペチュニア由来 DFR 遺伝子の導入

パンジー（品種ブラックパンジー）の若い蕾の花弁からTurpenとGriffithの方法（BioTechniques 4:11-15, 1986）に従ってRNAを抽出し、oligotex-dT（Qiagen）を用いてpolyA+RNAを精製した。本polyA+RNAとλZAPII/GigapackIIクローニングキット（Stratagene）を用いて、パンジー若い蕾の花弁に由来するcDNAライブラリーを作製した。NZYプレート上で生育させた約100,000 pfuのファージプラークをColony/Plaque Screen（DuPont）に転写した後、製造元推奨の方法に従って処理をした。これらを³²Pでラベルした、ペチュニアHf1 cDNA（pCGP602, Holton et al., Nature, 366, p276-279, 1993）をプローブとしてスクリーニングした。

10

メンブレンをハイブリダイゼーションバッファー（10%（v/v）ホルムアミド、1M NaCl, 10%（w/v）デキストランサルフェート、1% SDS）中で42℃、1時間プレハイブリダイゼーションした後、³²Pラベルしたプローブを1×10⁶ cpm/mlとなるように加えて、42℃、16時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、メンブレンを2×SSC, 1% SDS中、42℃、1時間洗浄し、さらに新たな洗浄液に換えて1時間洗浄した。洗浄後のメンブレンをコダックXARフィルムに増感スクリーンとともに感光させ、ハイブリダイゼーションシグナルを検出した。

得られたcDNAの解析の結果、ペチュニアHf1と高い同一性を示す2種類のcDNAが得られたことが明らかとなった。この2種類のcDNAをパンジーのF3', 5' H cDNA, BP#18（pCGP1959）ならびにBP#40（pCGP1961）とした。#18の塩基配列を配列番号：1、そのアミノ酸配列を配列番号：2に示し、#40の塩基配列を配列番号：3、そのアミノ酸配列を配列番号：4に示す。BP#18とBP#40はDNAレベルで82%の同一性を有する。またBP#18とBP#40はともにDNAレベルで、ペチュニアHf1と60%、ペチュニアHf2（Holton et al., Nature, 366, p276-279, 1993）と62%の同一性を示す。

20

一方、pUE5をEcoRIで消化し、Blunting Kit（タカラ）を用いて平滑末端にしたDNA断片と8bpのHindIIIリンカー（タカラ）とライゲーションし、得られたプラスミドをpUE5Hとした。パンジー由来のF3' 5' H#18 cDNAを含むプラスミド pCGP1959（をBamHIで完全消化し、さらにXhoIで部分消化し得られる約1.8kbのDNA断片を回収した。一方、これとBamHIとXhoIで消化したpUE5Hとライゲーションし得られたプラスミドをpUEBP18とした。

30

一方、ペチュニアDFR cDNAを含むDNA断片を、pCGP1403（WO96/36716）をBamHIとXhoIで消化することにより回収し、このDNA断片とBamHIとXhoIで消化したpBE5と連結し、pBEPD2とした。次にpUEBP18をHindIIIで部分消化し、E1235Sプロモーター、パンジー由来F3' 5' H#18 cDNA、ノスターミネーターを含む約2.8kbのDNA断片を回収した。この断片とpBEPD2をHindIIIで部分消化したDNA断片とを連結し、バイナリーベクタープラスミドpBPDBP2（図3）を得た。このプラスミドをアグロバクテリウム・ツメファシエンズ（Agrobacterium tumefaciens）Ag10株に導入した。

40

白色系バラ品種「ティネケ」へpBPDBP2（図3）を導入し、40個体の形質転換体を得た。得られた形質転換体のうち23個体で花色が変化し、色素分析を行った19個体のうち16個体でデルフィニジンの蓄積を確認した（表3）。デルフィニジン含有率は最高100%（平均87%）となったが、色素量が最高でも花弁1gあたり0.035mgと極めて少なく、花色はRHSカラーチャート158d（YELLOW-WHITE GROUP）から、56a（RED GROUP）や65b（RED-PURPLE GROUP）への変化に止まりRHSCCのバイオレットグループ、バイオレットブルーグループ、ブルーグループには至らず、目的の青いバラを得ることは出来なかった。

50

表 3

個体番号	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	87	0.002	0.000	0.000	0.058	0.354
2	100	0.004	0.000	0.338	0.059	1.921
3	82	0.002	0.001	0.203	0.039	1.382
4	100	0.003	0.000	0.245	0.050	1.840
5	76	0.005	0.001	0.000	0.280	3.288
6	0	0.000	0.000	0.000	0.098	0.409
7	0	0.000	0.001	0.000	0.101	0.358
8	0	0.000	0.001	0.000	0.030	2.277
9	83	0.013	0.003	0.000	0.117	0.841
10	85	0.011	0.002	0.000	0.104	3.300
11	84	0.020	0.004	0.000	0.168	3.137
12	91	0.025	0.002	0.294	0.119	1.252
13	90	0.028	0.003	0.000	0.075	1.912
14	91	0.014	0.001	0.000	0.152	2.667
15	90	0.035	0.004	0.000	0.086	1.616
16	83	0.023	0.005	0.000	0.117	2.267
17	91	0.014	0.001	0.000	0.113	0.825
18	76	0.003	0.001	0.000	0.085	2.351
19	82	0.005	0.001	0.000	0.054	1.616

Del : デルフィニジン、M : ミリセチン

〔実施例 9〕 ティネケへのパンジー由来 F 3 ' 5 ' H 遺伝子 (# 4 0) とペチュニア由来 D F R 遺伝子の導入

プラスミド p E 2 1 1 3 (M i t s u h a r a e t a l . P l a n t V e l l P h y s i o l . 3 7 , 4 5 - 5 9 1 9 9 6) を H i n d I I I と X b a I で消化して得られる約 8 0 0 b p の DNA 断片を回収し、H i n d I I I と X b a I で消化した p B i n 1 9 (B e v a n M , B i n a r y A g r o b a c t e r i u m V e c t o r f o r p l a n t t r a n s f o r m a t i o n . N u c l . A c i d R e s . 1 2 . 8 7 1 1 - 2 1 , 1 9 8 4) に連結した。得られたプラスミドを p C G P 1 3 9 1 とした。一方、p C G P 6 6 9 (W O 9 4 / 2 8 1 4 0 に記載) はペチュニアのカルコンシンターゼ A (C H S - A) 遺伝子のプロモーターを含んでいる。このプラスミドを E c o R I で消化した後平滑末端化し、さらに H i n d I I I で消化した。

この約 7 0 0 b p の DNA 断片を H i n d I I I と S n a B I で消化した p C G P 1 3 9 1 と連結し、得られたプラスミドを p C G P 1 7 0 7 とした。また、パンジー由来の F 3 ' 5 ' H # 4 0 c D N A を含むプラスミド p C G P 1 9 6 1 を B a m H I で完全消化し、さらに X h o I で部分消化し得られる約 1 . 8 k b の DNA 断片を回収し、これと B a m H I と X h o I で消化した p U E 5 H とライゲーションし得られたプラスミドを p U E B P 4 0 とした。p U E B P 4 0 を E c o R V と X b a I で消化した約 5 . 5 k b の DNA 断片を回収した。

この断片と、p C G P 1 7 0 7 を H i n d I I I で消化後平滑末端化し、さらに X b a I で消化して得られる約 7 0 0 b p の断片を連結し、p U F B P 4 0 を得た。次に p U F

BP40をHindIIIで部分消化し、カリフラワー35Sプロモーターエンハンサー、CHS-Aプロモーター、パンジー由来F3'5'H#40 cDNA、nosターミネーターを含む約3.4kbのDNA断片を回収した。この断片とpBEPD2をHindIIIで部分消化したDNA断片とを連結し、バイナリーベクタープラスミドpBPD BP8 (図4)を得た。このプラスミドをAgrobacterium tumefaciens Ag10株に導入した。

白色系バラ品種「ティネケ」へpBPD BP8 (図4)を導入し、53個体の形質転換体を得た。得られた形質転換体のうち17個体で花色が変化し、色素分析を行った9個体のうち8個体でデルフィニジンの蓄積を確認した(表4)。デルフィニジン含有率は最高93% (平均79%)となったが、色素量が最高でも花弁1gあたり0.014mgと極めて少なく、花色はRHSカラーチャート158d (YELLOW-WHITE GROUP)から、56a (RED GROUP)や65b (Red-Purple Group)への変化に止まりRHSCCのバイオレットグループ、バイオレットブルーグループ、ブルーグループには至らず、目的の青いバラを得ることは出来なかった。また、以上は品種ティネケがDFR遺伝子のみが欠損した品種ではないことを示唆している。

表 4

個体番号	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	0	0.000	0.001	0.000	0.018	2.023
2	9	0.001	0.006	na	na	na
3	93	0.011	0.001	0.000	0.036	2.724
4	86	0.007	0.001	0.000	0.076	2.957
5	71	0.013	0.006	0.000	0.073	2.503
6	87	0.014	0.002	0.000	0.058	3.390
7	78	0.005	0.002	0.000	0.049	1.241
8	47	0.004	0.004	0.000	0.070	1.800
9	78	0.004	0.001	0.000	0.029	2.326

na : 分析・測定せず

[実施例10] WKS36へのパンジー由来F3'5'H遺伝子(#18)とペチュニア由来DFR遺伝子の導入

白色系バラ「WKS36」へpBPD BP2 (図3)を導入し、138個体の形質転換体を得た。得られた形質転換体のうち10個体で花色が変化し、全ての個体でデルフィニジンの蓄積を確認した(表5)。デルフィニジン含有率は最高91% (平均60%)となったが、色素量が花弁1gあたり0.033mgと極めて少なく、花色はごく薄いピンクへの変化に止まりRHSCCのバイオレットグループ、バイオレットブルーグループ、ブルーグループには至らず、目的の青いバラを得ることは出来なかった。また、以上は品種WKS36はDFR遺伝子のみが欠損した品種ではないことを示唆している。

表 5

個体番号	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	60	0.008	0.005	0.381	0.169	2.291
2	40	0.006	0.009	0.633	0.486	2.911
3	54	0.005	0.005	0.654	0.336	3.460
4	43	0.016	0.021	0.000	0.656	2.469
5	53	0.009	0.008	0.404	0.325	2.397
6	53	0.004	0.003	0.498	0.251	2.768
7	45	0.013	0.016	0.000	0.381	1.537
8	83	0.004	0.001	0.000	0.156	1.632
9	80	0.033	0.008	0.000	0.557	3.766
10	91	0.013	0.000	0.000	0.184	2.610

〔実施例 11〕 WKS36 へのパンジー由来 F3'5'H 遺伝子 (#18) とペチュニア由来 DFR 遺伝子の導入

pUCAP (van Engelen et al. Transgenic Research 4, 288-290, 1995) の Asc I 部位を Pac I リンカーで置換したプラスミドを pUCPP とした。一方、バラのカルコンシンターゼプロモーターとパンジー由来の F3'5'H #18 cDNA と nos ターミネーターを連結した発現カセットを以下のように得た。

バラ品種 Kardin al の若い葉から染色体 DNA を抽出した (Tanaka et al., Plant Cell Physiol., 36:1023-1031, 1995)。約 100 μg の DNA を Sau3A I で部分消化し、ショ糖密度勾配により約 20 kb の DNA 画分を回収した。

これと BamH I で消化したラムダファージ EMBL3 (たとえばストラタジーン社) と連結し、製造者が推奨する方法で染色体 DNA ライブラリーを作製した。このライブラリーをバラのカルコンシンターゼ cDNA (DNA データベース GenBank のアクセッション番号 AB038246) をプローブとして公知の方法 (Tanaka et al., Plant Cell Physiol., 36:1023-1031, 1995) でスクリーニングした。得られたカルコンシンターゼの染色体クローンのうちラムダ CHS20 にはカルコンシンターゼの開始コドンの上流約 6.4 kb の DNA 配列が含まれていた。ラムダ CHS20 を HindIII と EcoRV で消化して得られる約 2.9 kb の DNA 断片にはカルコンシンターゼのプロモーター領域が含まれている。

この断片を pUC19 (Yanisch-Perron C et al., Gene 33:103-119, 1985) を HindIII と SmaI で消化した断片と連結した。これを pCGP1116 とした。これに含まれるカルコンシンターゼプロモーター部分の配列は配列番号: 21 に示した。pCGP1116 を HindIII と KpnI で消化して得られる約 2.9 kb の DNA 断片と、pJB1 (Bodeau, Molecular and genetic regulation of Bronze-2 and other maize anthocyanin genes. Dissertation (学位論文), Stanford University, USA, 1994) を HindIII と KpnI で消化して得られる DNA 断片を連結し pCGP197 を得た。

他方、pUE5 を SacI と KpnI で消化して得られる約 300 bp のノパリンシンターゼターミネーターを含む DNA 断片を平滑末端化し、EcoRV と BamH I で消化しさらに平滑末端化した pBluescript SK- と結合した。得られるプラスミド

のうちターミネーターの5'側がpBluescriptSK-のSalIに近いものをpCGP1986とした。pCGP1986をXhoIで消化し、平滑末端化し、さらにSalIで消化したDNA断片と、pCGP197をHindIIIで消化した後平滑末端化しさらにSalIで消化して得られるDNA断片を連結し、pCGP2201を得た。

さらに、pCGP2201をSalIで消化し、平滑末端化したDNA断片とpCGP1959をBamHIとKpnIで消化しさらに平滑末端化した約1.7kbのDNA断片（パンジーのフラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子を含む）を連結した。得られるプラスミドのうちバラカルコンシンターゼプロモーターがパンジーのフラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子を順方向に転写できる向きに挿入されたものをpCGP2203とした。プラスミドpCGP2203をHindIIIとSacIで消化することにより回収した。このDNA断片をpUCPPのHindIIIとSacI部位にクローニングし、これをpSPB459とした。次にプラスミドpE2113をSnaBIで消化し、BamHIリンカー（タカラ）を挿入して得られたプラスミドをpUE6とした。

pUE6をHindIIIとBamHIで消化して得られる約700bpのDNA断片と、pCGP1405（WO96/36716）をBamHIとBglIIで消化して得られる約2.2kbのDNA断片と、HindIIIとBamHIで消化したバイナリーベクターpBinplus（van Engelen et al. Transgenic Research 4, 288-290, 1995）を連結し、pSPB460を得た。pSPB459をPacIで消化して得られる約5kbのDNA断片を、pSPB460のPacIサイトに導入することによって、バイナリーベクター上でペチュニアDFRとパンジーF3'5'H#18遺伝子が順方向に連結されたpSPB461（図5）を得た。本プラスミドは植物においてはペチュニア由来のDFR遺伝子を構成的に発現し、パンジー由来のF3'5'H#18遺伝子を花卉特異的に転写するように工夫されている。このプラスミドをアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）Ag10株に導入した。

白色系バラ「WKS36」へpSPB461（図5）を導入し、229個体の形質転換体を得た。得られた形質転換体のうち16個体で花色が変化し、色素分析を行った12個体全てでデルフィニジンの蓄積を確認した（表6）。デルフィニジン含有率は最高79%（平均58%）となったが、色素量が花卉1gあたり0.031mgと極めて少なく、花色はごく薄いピンクへの変化に止まりRHSCCのバイオレットグループ、バイオレットブルーグループ、ブルーグループには至らず、目的の青いバラを得ることは出来なかった。また品種WKS36はDFR遺伝子のみが欠損した品種ではないことを示唆された。

10

20

30

表 6

個体番号	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	39	0.002	0.004	0.000	0.414	3.744
2	52	0.006	0.005	0.000	0.465	3.363
3	27	0.002	0.005	0.000	0.342	3.703
4	58	0.014	0.010	0.000	0.430	2.780
5	62	0.008	0.005	0.498	0.281	2.189
6	72	0.002	0.001	0.000	0.193	2.391
7	71	0.010	0.004	0.000	0.152	4.021
8	79	0.031	0.008	0.403	0.215	2.660
9	26	0.004	0.011	0.000	0.249	2.331
10	54	0.007	0.006	0.000	0.299	2.085
11	74	0.017	0.006	0.145	0.248	3.505
12	74	0.013	0.005	0.000	0.229	2.005

〔実施例 12〕 W K S 3 6 へのパンジー由来 F 3 ' 5 ' H 遺伝子 (# 1 8)、ペチュニア由来 D F R 遺伝子およびシソ由来アントシアニン 3-グルコシドアシル基転移酵素遺伝子の導入

シソ由来のヒドロキシシナモイル C o A : アントシアニン 3-グルコシドアシル基転移酵素 (3 A T) 遺伝子に開始コドンが付加した遺伝子を p S A T 2 0 8 F (Y o n e k u r a - S a k a k i b a r a e t a l . P l a n t C e l l P h y s i o l . 4 1 , 4 9 5 - 5 0 2 , 2 0 0 0) とした。p S P B 5 8 0 (P C T / A U 0 3 / 0 0 0 7 9) を B a m H I と X h o I で消化して得られる約 3 . 9 k b の DNA 断片と p S A T 2 0 8 F を B a m H I と X h o I で消化して得られる約 1 . 8 k b の DNA 断片を連結した。

得られたプラスミドを A s c I で消化することにより、E 1 2 3 5 S プロモーターとシソ 3 A T 遺伝子とペチュニアフォスホリピドトランスファー蛋白質由来のターミネーターを含む DNA 断片を回収した。この DNA 断片を前述の p S P B 4 6 1 の A s c I 部位に挿入し、シソ由来 3 A T、ペチュニア由来 D F R、パンジー由来 F 3 ' 5 ' H # 1 8 の遺伝子の転写方向が順方向になっているプラスミド p S P B 4 7 2 (図 6) を得た。本プラスミドは植物においてはシソ由来 3 A T 遺伝子とペチュニア由来 D F R 遺伝子を構成的に発現し、パンジー由来 F 3 ' 5 ' H # 1 8 遺伝子を花卉特異的に転写するように工夫されている。このプラスミドをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (A g r o b a c t e r i u m t u m e f a c i e n s) A g 1 0 株に導入した。

白色系バラ「W K S 3 6」へ p S P B 4 7 2 (図 6) を導入し、7 5 個体の形質転換体を得た。得られた形質転換体のうち 4 個体で花色が変化し、色素分析を行った 3 個体全てでデルフィニジンの蓄積を確認した (表 7) 。デルフィニジン含有率は最高 6 7 % (平均 4 9 %) となったが、色素量が花卉 1 g あたり 0 . 0 1 1 m g と極めて少なく、花色はごく薄いピンクへの変化に止まり R H S C C のバイオレットグループ、バイオレットブルーグループ、ブルーグループには至らず、目的の青いバラを得ることは出来なかった。以上も品種 W K S 3 6 は D F R 遺伝子のみが欠損した品種ではないことを示唆している。

表 7

個体番号	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	32	0.003	0.006	0.219	0.236	1.972
2	67	0.011	0.005	0.520	0.329	3.234
3	46	0.006	0.007	0.000	0.579	3.874

このように多数の白いバラをスクリーニングしたにもかかわらずD F R遺伝子のみが欠損した品種を得ることができなかった。すなわち、青色のカーネーションを作出した方法(W O 9 4 / 2 8 1 4 0)では青いバラを得ることはできなかった。

〔実施例 1 3〕 コサプレッションによるバラ由来D F R遺伝子の抑制

藤色系バラ品種「ラバンデ」へp B E R D 1を導入し、26個体の形質転換体を得た。しかし、花色の変化した個体は全く得られず、コサプレッション法ではバラの内在性のD F R遺伝子を抑制することが困難であることが示唆された。

〔実施例 1 4〕 有色バラのスクリーニング

次に有色のバラの中から、青いバラを作製するための品種を選抜することにした。有色のバラの中で相対的に青みを帯びている品種を中心に目視により136系統を選抜し、89系統について色素分析を行った。調査した有色バラの分析値を表8～表10に示す。

10

20

表 8

名称	Cya (mg/g)	Pe1 (mg/g)	Peo (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
ラバンデ	0.078	0.000	0.000	0.451	0.078
マダムビオレ	0.055	0.000	0.000	1.780	0.189
Vol de Nuit	0.317	0.003	0.000	2.661	0.316
ブルームーン	0.049	0.000	0.000	1.341	0.119
青龍	0.015	0.000	0.000	3.030	1.300
WKS077	1.875	0.008	0.000	1.430	0.247
WKS078	0.211	0.000	0.000	1.286	0.133
WKS079	2.864	0.003	0.000	1.030	0.106
WKS080	0.040	0.000	0.000	0.362	0.047
WKS081	0.032	0.000	0.000	4.480	1.563
WKS082	0.074	0.000	0.000	2.400	0.196
WKS083	0.018	0.405	0.000	0.146	0.962
WKS084	0.055	0.000	0.000	1.269	0.159
WKS087	0.032	0.000	0.000	0.797	0.134
WKS089	0.030	0.000	0.000	1.484	0.317
WKS090	1.571	0.007	0.000	1.346	0.339
WKS091	0.045	0.169	0.000	0.186	0.899
WKS092	0.038	0.002	0.000	1.358	0.135
WKS095	0.015	0.000	0.000	2.945	0.255
WKS096	0.024	0.000	0.000	2.032	0.349
WKS097	0.991	0.002	0.000	1.659	0.185
WKS100	0.051	0.000	0.000	1.410	0.615
WKS101	0.424	0.000	0.000	2.194	0.482
WKS104	0.066	0.000	0.000	2.347	0.424
WKS107	1.202	0.004	0.000	3.134	0.460
WKS114	0.429	0.000	0.000	3.509	0.541
WKS116	0.026	0.000	0.000	3.440	0.868
WKS117	0.027	0.000	0.000	0.227	0.149
WKS121	0.669	0.006	0.000	1.336	0.453
WKS123	0.487	0.003	0.000	3.663	0.826

Peo : ペオニジン

表 9

名称	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
WKS124	0.022	0.045	0.000	0.192	2.012
WKS125	0.187	0.002	0.000	0.349	0.089
WKS126	0.544	0.002	0.000	2.226	0.895
WKS127	1.609	0.008	0.006	2.278	0.528
WKS128	1.844	0.003	0.007	2.576	0.409
WKS129	1.645	0.002	0.006	0.450	0.160
WKS130	1.332	0.008	0.005	1.599	0.525
WKS131	0.582	0.002	0.001	2.460	0.567
WKS132	1.101	0.006	0.000	0.298	0.208
WKS133	2.773	0.003	0.000	1.263	0.230
WKS133	3.487	0.011	0.023	0.414	0.108
WKS134	1.084	0.001	0.002	2.777	0.413
WKS135	0.241	0.007	0.001	0.803	0.113
WKS136	0.637	0.000	0.003	1.451	0.062
WKS137	1.208	0.014	0.002	1.034	1.027
WKS138	1.955	0.006	0.000	3.857	0.855
WKS139	0.285	0.003	0.000	1.363	0.538
WKS140	0.075	0.000	0.000	0.291	0.097
WKS141	0.197	0.000	0.000	0.358	0.045
WKS142	1.906	0.029	0.106	1.890	1.860
WKS143	1.125	0.027	0.020	1.596	1.129
WKS144	2.685	0.484	0.000	0.160	0.184
WKS145	0.948	0.006	0.000	3.086	1.222
WKS146	3.108	0.047	0.000	0.228	0.398
WKS147	0.593	0.003	0.004	3.619	0.924
WKS148	0.059	0.000	0.000	3.113	0.466
WKS149	1.101	0.013	0.000	1.481	1.866
WKS150	0.498	0.562	0.000	0.061	0.156
WKS151	0.947	1.073	0.000	0.038	0.227
WKS152	0.303	1.599	0.000	0.015	0.464

Peo : ペオニジン

表10

名称	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
WKS153	1.178	0.796	0.000	0.020	0.179
WKS154	0.219	0.659	0.000	0.007	0.265
WKS155	0.547	0.006	0.000	1.274	0.073
WKS156	0.851	0.005	0.000	1.139	0.238
WKS157	0.955	0.555	0.000	0.133	1.315
WKS158	0.634	0.005	0.000	0.526	0.219
WKS159	0.106	0.320	0.000	0.034	0.959
WKS160	0.750	0.005	0.000	2.283	0.768
WKS161	0.262	0.419	0.000	0.197	1.115
WKS162	0.039	0.564	0.000	0.041	0.447
WKS163	0.184	0.002	0.000	0.756	0.105
WKS164	0.918	0.012	0.000	1.954	2.832
WKS165	0.097	0.604	0.000	0.026	0.197
WKS166	0.116	0.015	0.000	0.488	0.566
WKS167	0.647	0.002	0.000	2.507	0.499
WKS168	1.109	0.029	0.000	1.797	2.328
WKS169	0.070	0.003	0.000	0.208	1.369
Baby Faurax	2.247	0.022	0.058	4.518	0.580
Indigo	0.891	0.006	0.000	5.781	3.820
Intermezzo	0.040	0.000	0.000	1.075	0.443
James Veitch	1.281	0.004	0.002	2.087	0.923
Lagoon	0.053	0.000	0.000	2.887	0.315
Magenta	0.126	0.000	0.000	1.062	0.191
MRS COLVILLE	1.666	0.012	0.000	3.500	2.940
Mme. Isaac Pereire	0.629	0.003	0.000	1.021	0.105
Mme. de La Roche-Lambert	0.869	0.005	0.000	4.994	2.794
Roseraie de L'hay	0.364	0.005	1.256	0.156	0.077
Rose de Rescht	1.348	0.004	0.000	4.027	0.842
Rose du Roi a Fleurs Pourpres	2.556	0.017	0.000	0.968	0.411

Peo : ペオニジン

〔実施例15〕 ラバンデへのパンジー由来F3'5'H遺伝子(#40)とトレニア由来アントシアニン5-アシル基転移酵素遺伝子の導入

アントシアニンを芳香族アシル基により修飾することによりアントシアニンを安定化させ、かつその色を青くすることができる(たとえば、WO96/25500)。アシル化したデルフィニジン型アントシアニンの生産を目指して以下の実験を行った。

トレニア品種サマーウェーブ花卉からRNAを得、さらにこれからpoly A⁺ RNAを調製した。このpoly A⁺ RNAからλZAPII(Stratagene社)をベクターとするcDNAライブラリーをdirectional cDNAライブラリー作製キット(Stratagene社)を用いて製造者が推奨する方法で作製した。トレニアの主要アントシアニンはその5位のグルコースが芳香族アシル基により修飾されている(Suzuki et al. Molecular Breeding 2000 6,

10

20

30

40

50

239-246) ので、トレニア花卉においてはアントシアニンアシル基転移酵素が発現している。

アントシアニンアシル基転移酵素は A s p - P h e - G l y - T r p - G l y - L y s というアミノ酸配列が保存されており、これに対応する合成 DNA をプライマーとして用いることによりアントシアニンアシル基転移酵素遺伝子を取得することができる (WO 96/25500)。具体的には、トレニア cDNA ライブラリー作製の際に合成した 1 本鎖 cDNA 10 ng を鋳型とし、100 ng の A T C プライマー (5' - G A (T C) T T (T C) G G I T G G G G I A A - 3', I はイノシン) (配列番号: 17)、100 ng のオリゴ d T プライマー (5' - T T T T T T T T T T T T T T T T C T C G A G - 3') (配列番号: 18) をプライマーとし、T a q ポリメラーゼ (タカラ、日本) を用いて製造者の推奨する条件で P C R を行った。

P C R は、95℃にて1分間、55℃にて1分間、及び72℃にて1分間を1サイクルとする反応を25サイクル行った。得られた約400bpのDNA断片をGene Clean II (BIO, 101, Inc.) により製造者の推奨する方法で回収し、pC R - T O P O にサブクローニングした。その塩基配列を決定したところリンドウのアシル基転移酵素遺伝子 (F u j i w a r a e t a l. (1998) Plant J. 16 421-431) に相同な配列が見られた。なお塩基配列はダイプライマー法 (アプライドバイオシステムズ社) を用い、シークエンサー310あるいは377 (いずれもアプライドバイオシステムズ社) を用いて決定した。

このDNA断片をDIG標識検出キット (日本ロッシュ) を用いてDIGにより標識し、製造者が推奨する方法でトレニアのcDNAライブラリーをブランクハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。得られたポジティブシグナルをもたらしたクローンを無作為に12選択し、そこからプラスミドを回収し、塩基配列を決定した。これらはアントシアニンアシル基転移酵素により相同性を示した。これらのクローンのうちpTAT7としたクローンに含まれるcDNAの全塩基配列を決定した。この塩基配列を配列番号: 7に示し、そしてそてに対応するアミノ酸配列を配列番号: 8に示す。

pBE2113-GUS (M i t s u h a r a e t a l. Plant Vell Physiol. 37, 45-59 1996) を S a c I で消化した後、平滑末端化し、8bpのXhoIリンカー (タカラ) を挿入した。このプラスミドのBamHIとXhoI部位にpTAT7をBamHIとXhoIで消化して得られる約1.7kbのDNAを挿入し、pSPB120を得た。pSPB120をSnaBIとBamHIで消化した後平滑末端化しライゲーションすることによりpSPB120'を得た。一方、パンジー由来のF3'5'H#40 cDNAを含むプラスミドpCGP1961をBamHIで完全消化し、さらにXhoIで部分消化し得られる約1.8kbのDNA断片を回収し、これとBamHIとXhoIで消化したpUE5Hとライゲーションし得られたプラスミドをpUEBP40とした。

pUEBP40をSnaBIとBamHIで消化した後平滑末端化しライゲーションすることによりpUEBP40'を得た。pUEBP40'をHindIIIで部分消化し得られる約2.7kbのDNA断片を回収し、pSPB120'をHindIIIで部分消化したDNA断片と連結した。得られたプラスミドのうち、バイナリーベクター上でライトボーダー側から、ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子、パンジー由来F3'5'H#40遺伝子、トレニア由来5AT遺伝子の順にそれぞれが同方向に連結されたバイナリーベクターをpSPB130 (図7) とした。本プラスミドは植物においてはパンジー由来F3'5'H#40遺伝子とトレニア由来5AT遺伝子構成的に発現し、遺伝子を花卉特異的に転写するように工夫されている。このプラスミドをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (A g r o b a c t e r i u m t u m e f a c i e n s) Ag 10株に導入した。

藤色系バラ品種「ラバンデ」へpSPB130 (図7) を導入し、41個体の形質転換体を得た。色素分析を行った32個体のうち20個体でデルフィニジンの蓄積を確認した (表11及び表12)。デルフィニジン含有率は最高71% (平均36%) であった。花

色はRHSカラーチャート186c (GRAYED-PURPLE GROUP) から79d (PURPLE GROUP) へ変化した。またこの際のアシル化アントシアニンの割合は総アントシアニンの30%程度に留まった。アシル化されたアントシアニンのスペクトルを測定したところ、その吸収極大波長はデルフィニジン3, 5-ジグルコシドよりも4nm長波長シフトしていたが、総アントシアニン中の割合が低いため、花色に明瞭な効果を与えるには至らなかった。

表11

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	0	9	0.005	0.050	na	na	na
2	0	11	0.009	0.069	na	na	na
3	0	10	0.010	0.087	na	na	na
4	0	22	0.028	0.102	na	na	na
5	5	51	0.073	0.069	na	na	na
6	4	57	0.093	0.069	na	na	na
7	5	48	0.039	0.042	na	na	na
8	13	0	0.000	0.065	na	na	na
9	17	9	0.006	0.062	na	na	na
10	26	0	0.000	0.104	na	na	na
11	17	67	0.074	0.036	na	na	na
12	0	0	0.000	0.131	na	na	na
13	0	0	0.000	0.083	na	na	na
14	6	48	0.084	0.092	na	na	na
15	0	20	0.020	0.081	na	na	na
16	42	13	0.020	0.131	0.000	0.637	0.020
17	32	36	0.032	0.058	na	na	na
18	7	0	0.000	0.146	na	na	na
19	0	0	0.000	0.069	na	na	na
20	0	0	0.000	0.142	na	na	na
21	0	0	0.000	0.080	na	na	na

na : 分析・測定せず

表12

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
22	0	0	0.000	0.069	na	na	na
23	0	0	0.000	0.057	na	na	na
24	18	4	0.006	0.149	na	na	na
25	17	4	0.008	0.208	na	na	na
26	0	0	0.000	0.188	na	na	na
27	0	0	0.000	0.078	na	na	na
28	17	67	0.090	0.044	na	na	na
29	17	71	0.057	0.024	na	na	na
30	16	40	0.040	0.059	na	na	na
31	21	70	0.082	0.036	0.305	0.062	0.008
32	18	62	0.066	0.040	na	na	na

na : 分析・測定せず

[実施例16] WKS100へのパンジー由来F3'5'H遺伝子(#40)とトレニア由来アントシアニン5-アシル基転移酵素遺伝子の導入

藤色系バラ「WKS100」へpSPB130(図7)を導入し、146個体の形質転換体を得た。色素分析を行った63個体のうち56個体でデルフィニジンの蓄積を確認した(表13~表15)。デルフィニジン含有率は最高95%(平均44%)であった。花色はRHSカラーチャート56d(RED GROUP)から186d(GRAYED-PURPLE GROUP)へ変化した。しかしながらRHSCCのバイオレットグループ、バイオレット-ブルーグループ、ブルーグループには至らず、目的の青いバラを得ることは出来なかった。

表13

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	20	75	0.036	0.012	0.000	2.944	0.974	0.322
2	16	51	0.027	0.027	0.000	1.685	1.734	0.512
3	13	50	0.024	0.024	0.000	0.000	1.382	1.912
4	23	50	0.037	0.037	0.000	na	na	na
5	9	25	0.013	0.033	0.005	na	na	na
6	10	26	0.034	0.097	0.000	na	na	na
7	13	65	0.053	0.028	0.000	1.936	1.184	0.760
8	13	65	0.044	0.024	0.000	1.622	1.065	0.562
9	14	62	0.033	0.021	0.000	2.096	1.444	0.710
10	14	95	0.137	0.008	0.000	0.000	0.156	1.097
11	10	62	0.036	0.022	0.000	2.025	1.194	0.799
12	5	59	0.054	0.038	0.000	2.194	1.289	0.783
13	9	43	0.033	0.044	0.000	2.542	1.803	0.734
14	9	50	0.030	0.031	0.000	0.020	1.971	0.741
15	1	70	0.066	0.028	0.000	1.652	1.659	0.867
16	0	20	0.008	0.023	0.008	0.308	2.632	1.463
17	1	63	0.068	0.040	0.000	2.037	2.128	1.554
18	21	51	0.037	0.035	0.000	2.659	1.936	1.002
19	0	0	0.000	0.095	0.000	na	na	na
20	0	0	0.000	0.037	0.000	na	na	na
21	0	23	0.026	0.086	0.003	0.182	4.554	3.083
22	4	71	0.110	0.044	0.000	3.265	1.643	1.341
23	12	65	0.051	0.025	0.002	1.356	0.888	0.387
24	6	58	0.038	0.027	0.000	2.374	2.016	0.809
25	5	52	0.044	0.040	0.000	2.651	2.546	1.108

na : 分析・測定せず

10

20

30

表14

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
26	6	64	0.033	0.019	0.000	2.707	1.546	0.605
27	16	0	0.000	0.041	0.000	na	na	na
28	16	13	0.007	0.050	0.000	0.249	3.359	1.459
29	12	7	0.007	0.095	0.000	na	na	na
30	15	9	0.007	0.069	0.000	na	na	na
31	15	8	0.007	0.081	0.000	na	na	na
32	7	7	0.007	0.094	0.000	na	na	na
33	13	10	0.006	0.055	0.000	na	na	na
34	14	46	0.078	0.090	0.002	na	na	na
35	7	8	0.007	0.078	0.000	na	na	na
36	3	48	0.045	0.039	0.010	3.050	2.304	1.326
37	2	39	0.029	0.046	0.000	na	na	na
38	1	55	0.073	0.059	0.000	1.608	2.138	1.015
39	1	33	0.030	0.063	0.000	na	na	na
40	2	59	0.050	0.035	0.000	3.651	2.727	1.076
41	17	15	0.011	0.061	0.000	na	na	na
42	0	0	0.000	0.048	0.002	na	na	na
43	3	17	0.009	0.046	0.000	na	na	na
44	40	32	0.027	0.058	0.000	na	na	na
45	2	0	0.000	0.031	0.000	na	na	na
46	2	0	0.000	0.038	0.000	na	na	na
47	1	8	0.004	0.048	0.000	na	na	na
48	19	57	0.046	0.034	0.000	2.626	2.165	0.900
49	10	59	0.047	0.032	0.000	1.737	1.901	1.054
50	2	70	0.057	0.024	0.000	1.545	0.880	0.694

na : 分析・測定せず

10

20

30

表15

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
51	4	10	0.006	0.056	0.000	na	na	na
52	16	12	0.006	0.039	0.002	na	na	na
53	34	84	0.156	0.030	0.000	5.100	1.056	0.511
54	32	89	0.131	0.017	0.000	3.907	0.803	0.431
55	29	89	0.098	0.013	0.000	3.687	0.453	0.226
56	21	83	0.083	0.017	0.000	2.679	0.817	0.431
57	14	8	0.007	0.082	0.000	na	na	na
58	9	44	0.034	0.041	0.002	2.258	2.054	0.672
59	7	51	0.040	0.038	0.000	2.246	2.151	0.765
60	0	7	0.008	0.111	0.000	na	na	na
61	1	48	0.069	0.073	0.000	1.558	1.730	0.565
62	13	0	0.000	0.036	0.000	na	na	na
63	16	14	0.005	0.029	0.000	na	na	na

na：分析・測定せず

〔実施例17〕 WKS116へのパンジー由来F3'5'H遺伝子(#40)とトレニア由来アントシアニン5-アシル基転移酵素遺伝子の導入

薄藤色系バラ「WKS116」へpSPB130(図7)を導入し、282個体の形質転換体を得た。色素分析を行った36個体のうち33個体でデルフィニジンの蓄積を確認した(表16及び表17)。デルフィニジン含有率は最高80%(平均73%)であった。RHSカラーチャート196d(GRAYED-GREEN GROUP)から186d(GRAYED-PURPLE GROUP)へ変化した。しかしながらRHSCCのバイオレットグループ、バイオレット-ブルーグループ、ブルーグループには至らず、目的の青いバラを得ることは出来なかった。

10

20

30

表16

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	1.8	78	0.015	0.004	0.746	0.753	0.507
2	12.7	78	0.097	0.028	1.826	2.352	1.572
3	5.9	78	0.030	0.009	1.000	1.452	0.934
4	0.0	76	0.030	0.010	0.813	0.990	0.480
5	2.6	72	0.038	0.015	1.279	1.835	0.832
6	0.0	72	0.019	0.007	0.839	0.983	0.642
7	3.1	75	0.033	0.011	1.131	1.476	0.877
8	1.9	75	0.028	0.009	0.761	0.977	0.466
9	2.6	76	0.034	0.011	na	na	na
10	2.7	73	0.031	0.011	na	na	na
11	4.4	77	0.033	0.010	1.001	1.003	0.618
12	7.0	74	0.035	0.012	0.849	0.945	0.577
13	9.3	74	0.025	0.009	na	na	na
14	3.2	80	0.044	0.011	1.045	0.959	0.545
15	4.5	75	0.031	0.010	1.115	1.256	0.729
16	10.5	71	0.028	0.012	1.055	1.155	0.670
17	1.7	51	0.016	0.016	0.330	1.537	1.052
18	10.5	77	0.112	0.033	2.008	2.976	2.216
19	0.0	0	0.000	0.010	na	na	na
20	0.0	30	0.007	0.015	na	na	na
21	na	56	0.013	0.010	0.197	1.960	1.463
22	4.4	47	0.006	0.007	na	na	na
23	3.6	77	0.026	0.008	na	na	na

na : 分析・測定せず

10

20

30

表17

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
24	7.2	82	0.028	0.006	1.295	1.272	0.805
25	3.5	83	0.035	0.007	na	na	na
26	17.4	26	0.009	0.025	na	na	na
27	39.3	91	0.101	0.010	3.499	0.563	0.178
28	28.2	85	0.047	0.005	na	na	na
29	0.0	0	0.000	0.025	na	na	na
30	10.4	89	0.092	0.012	na	na	na
31	1.9	0	0.000	0.036	na	na	na
32	5.8	76	0.027	0.009	na	na	na
33	16.8	88	0.066	0.009	na	na	na
34	10.5	87	0.103	0.015	na	na	na
35	13.7	38	0.021	0.034	na	na	na
36	18.3	95	0.051	0.003	na	na	na

na : 分析・測定せず

[実施例18] WKS124パンジー由来F3'5'H遺伝子(#40)とトレニア由来アントシアニン5-アシル基転移酵素遺伝子の導入

薄橙色系バラ「WKS124」へpSPB130(図7)を導入し、50個体の形質転換体を得た。色素分析を行った15個体のうち13個体でデルフィニジンの蓄積を確認した(表18)。デルフィニジン含有率は最高95%(平均82%)であった。花色はRHSカラーチャート52d(RED GROUP)から71c(RED-PURPLE GROUP)へ変化した。しかしながらRHSCCのバイオレットグループ、バイオレットブルーグループ、ブルーグループには至らず、目的の青いバラを得ることは出来なかった。

表18

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	PeI (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	0.6	0	0.000	0.013	0.069	na	na	na
2	35.5	75	0.256	0.051	0.034	0.066	0.093	1.190
3	43.0	78	0.385	0.068	0.041	0.039	0.046	1.197
4	44.2	85	0.811	0.120	0.028	0.106	0.094	1.021
5	na	86	0.907	0.123	0.024	0.219	0.066	0.852
6	4.6	0	0.000	0.023	0.075	na	na	na
7	7.9	90	1.498	0.169	0.008	0.905	0.143	0.679
8	8.4	90	1.403	0.146	0.008	0.971	0.145	0.827
9	26.7	88	0.521	0.066	0.003	0.623	0.108	0.853
10	21.9	89	0.504	0.058	0.003	0.636	0.098	0.727
11	26.0	85	0.928	0.145	0.019	0.424	0.152	0.455
12	3.8	95	1.017	0.058	0.000	1.161	0.140	0.262
13	11.6	84	0.939	0.156	0.025	0.748	0.128	0.262
14	38.5	69	0.166	0.071	0.007	0.000	0.059	0.776
15	27.1	55	0.137	0.040	0.074	0.000	0.021	2.330

na : 分析・測定せず

〔実施例19〕 WKS132へのパンジー由来F3'5'H遺伝子(#40)とトレニア由来アントシアニン5-アシル基転移酵素遺伝子の導入

鮮紅色系バラ「WKS132」へpSPB130(図7)を導入し、24個体の形質転換体を得た。色素分析を行った7個体のうち6個体でデルフィニジンの蓄積を確認した(表19)。デルフィニジン含有率は最高43%(平均12%)であった。花色はRHSカラーチャート57a(RED-PURPLE GROUP)から66a(RED-PURPLE GROUP)へ変化した。しかしながらRHSCCのバイオレットグループ、バイオレット-ブルーグループ、ブルーグループには至らず、目的の青いバラを得ることは出来なかった。

表19

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	PeI (mg/g)
1	1.8	0.4	0.008	1.872	0.009
2	1.0	0.0	0.000	1.409	0.010
3	21.3	11.4	0.237	1.841	0.007
4	6.8	42.5	0.461	0.619	0.006
5	7.6	9.5	0.204	1.936	0.011
6	na	1.3	0.016	1.227	0.007
7	23.7	5.4	0.081	1.407	0.005

〔実施例20〕 WKS133へのパンジー由来F3'5'H遺伝子(#40)とトレニア由来アントシアニン5-アシル基転移酵素遺伝子の導入

濃赤紫系バラ「WKS133」へpSPB130(図7)を導入し、16個体の形質転

換体を得た。色素分析を行った8個体全てでデルフィニジンの蓄積を確認した(表20)。デルフィニジン含有率は最高34%(平均11%)であった。花色はRHSカラーチャート53a(RED GROUP)から61a(RED-PURPLE GROUP)へ変化した。しかしながらRHSCCのバイオレットグループ、バイオレット-ブルーグループ、ブルーグループには至らず、目的の青いバラを得ることは出来なかった。

表20

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Del (mg/g)	Peo (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	10.3	23.7	1.322	4.253	0.009	0.004	0.691	0.792	0.133
2	11.8	33.8	1.192	2.324	0.005	0.003	0.621	0.422	0.093
3	6.1	12.9	0.009	0.060	0.000	0.000	0.102	0.500	0.048
4	3.8	9.1	0.363	3.627	0.005	0.008	na	na	na
5	15.8	2.0	0.078	3.774	0.009	0.000	0.045	0.939	0.472
6	11.5	2.7	0.135	4.771	0.011	0.005	0.046	0.576	0.034
7	13.3	3.0	0.180	5.800	0.009	0.009	0.100	0.937	0.179
8	12.2	3.5	0.161	4.470	0.009	0.009	0.068	0.738	0.148

na: 分析・測定せず

[実施例21] WKS137へのパンジー由来F3'5'H遺伝子(#40)とトレニア由来アントシアニン5-アシル基転移酵素遺伝子の導入

濃赤紫系バラ「WKS137」へpSPB130(図7)を導入し、20個体の形質転換体を得た。色素分析を行った17個体全てでデルフィニジンの蓄積を確認した(表21)。デルフィニジン含有率は最高1.3%(平均0.4%)であった。花色はRHSカラーチャート61b(RED-PURPLE GROUP)から変化はみられなかった。

表 21

個体番号	アシル化 (%)	De1含有率 (%)	De1 (mg/g)	Cya (mg/g)	Pe1 (mg/g)	Peo (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	0.5	0.3	0.008	2.821	0.037	0.000	na	na	na
2	0.8	0.3	0.010	3.384	0.051	0.000	na	na	na
3	0.4	0.3	0.005	1.982	0.014	0.000	na	na	na
4	0.6	0.2	0.008	3.344	0.057	0.000	na	na	na
5	0.7	0.4	0.011	3.145	0.035	0.000	na	na	na
6	0.7	1.3	0.025	2.919	0.040	0.003	na	na	na
7	0.4	0.3	0.008	2.820	0.045	0.000	na	na	na
8	0.5	0.4	0.010	2.467	0.042	0.000	na	na	na
9	0.7	0.2	0.010	3.836	0.024	0.000	na	na	na
10	0.1	0.5	0.008	1.743	0.016	0.000	na	na	na
11	0.7	0.4	0.011	2.593	0.027	0.003	na	na	na
12	0.6	0.3	0.007	2.393	0.022	0.000	0.048	3.026	2.812
13	1.4	0.2	0.009	3.756	0.065	0.000	na	na	na
14	0.7	0.4	0.008	2.149	0.024	0.001	na	na	na
15	0.8	0.5	0.007	2.281	0.041	0.000	na	na	na
16	0.5	0.5	0.007	1.314	0.014	0.000	na	na	na
17	1.0	0.2	0.007	2.892	0.051	0.000	na	na	na

na : 分析・測定せず

〔実施例 2 2〕 W K S 1 4 0 へのパンジー由来 F 3 ' 5 ' H 遺伝子 (# 4 0) とトレニア由来アントシアニン 5-アシル基転移酵素遺伝子の導入

藤色系バラ「W K S 1 4 0」へ p S P B 1 3 0 (図 7) を導入し、1 9 7 個体の形質転換体を得た。色素分析を行った 4 5 個体のうち 3 7 個体でデルフィニジンの蓄積を確認した(表 2 2 及び表 2 3)。デルフィニジン含有率は最高 9 4 % (平均 4 7 %) であった。花色は R H S カラーチャート 1 8 6 d (GREYED-PURPLE GROUP) から 7 9 d (PURPLE GROUP) へ変化した。しかしながら R H S C C のバイオレットグループ、バイオレットブルーグループ、ブルーグループには至らず、目的の青いバラを得ることは出来なかった。

10

20

30

40

表 22

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	3.5	0.0	0.000	0.090	na	na	na
2	2.5	0.0	0.000	0.093	0.096	2.429	0.246
3	5.5	63.5	0.061	0.035	0.688	1.090	0.106
4	13.2	17.7	0.013	0.059	na	na	na
5	5.4	11.6	0.017	0.129	na	na	na
6	3.6	12.3	0.011	0.078	na	na	na
7	13.6	11.7	0.009	0.069	na	na	na
8	4.1	22.3	0.012	0.041	0.057	1.950	0.492
9	3.3	0.0	0.000	0.071	na	na	na
10	2.6	18.6	0.017	0.076	na	na	na
11	4.2	18.6	0.012	0.052	0.130	3.101	1.172
12	6.5	25.0	0.026	0.079	0.251	2.300	0.592
13	1.3	0.0	0.000	0.062	0.000	2.200	0.552
14	22.7	85.4	0.261	0.045	1.649	0.943	0.126
15	20.9	57.4	0.093	0.069	0.481	1.418	0.182
16	16.4	39.9	0.052	0.078	na	na	na
17	15.2	50.8	0.074	0.072	na	na	na
18	6.1	22.6	0.036	0.111	0.148	2.152	0.279
19	2.7	0.0	0.000	0.033	na	na	na
20	9.1	52.6	0.041	0.037	na	na	na
21	4.4	46.2	0.075	0.087	na	na	na
22	8.5	34.7	0.040	0.075	0.195	1.847	0.394
23	11.0	30.9	0.018	0.040	0.155	1.106	0.142
24	13.4	46.8	0.056	0.063	na	na	na
25	2.8	5.1	0.006	0.107	na	na	na

na:分析・測定せず

10

20

30

表 23

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
26	4.1	6.8	0.007	0.098	na	na	na
27	31.4	93.4	0.252	0.018	1.434	0.361	0.052
28	13.4	86.7	0.101	0.016	1.237	1.740	0.499
29	32.3	94.2	0.200	0.012	0.862	0.131	0.029
30	13.0	89.7	0.176	0.020	0.553	0.289	0.026
31	12.3	87.1	0.150	0.022	1.007	0.674	0.135
32	6.7	9.9	0.009	0.086	na	na	na
33	11.5	67.4	0.108	0.052	na	na	na
34	5.0	11.2	0.014	0.110	0.074	2.588	0.659
35	12.5	79.7	0.088	0.022	1.192	1.185	0.574
36	15.0	83.4	0.065	0.013	1.478	1.147	0.570
37	1.8	0.0	0.000	0.068	na	na	na
38	1.3	44.3	0.105	0.132	0.582	3.259	1.232
39	2.5	73.6	0.114	0.041	na	na	na
40	14.0	85.3	0.165	0.028	1.881	1.035	0.180
41	0.5	4.3	0.006	0.144	na	na	na
42	9.9	53.3	0.040	0.035	0.373	1.038	0.164
43	33.5	87.4	0.275	0.040	1.851	0.701	0.148
44	1.3	0.0	0.000	0.073	na	na	na
45	1.5	0.0	0.000	0.062	na	na	na

na:分析・測定せず

[実施例 23] WKS77 へのパンジー由来 F3'5'H 遺伝子 (#40) とトレニア由来アントシアニン 5-アシル基転移酵素遺伝子の導入

濃赤紫系バラ「WKS77」へ pSPB130 (図 7) を導入し、35 個体の形質転換体を得た。色素分析を行った 17 個体全てでデルフィニジンの蓄積を確認した (表 24)。デルフィニジン含有率は最高 57% (平均 33%) であった。花色は RHS カラーチャート 57a (RED-PURPLE GROUP) から 71a (RED-PURPLE GROUP) へ変化した。しかしながら RHSCC のバイオレットグループ、バイオレット-ブルーグループ、ブルーグループには至らず、目的の青いバラを得ることは出来なかった。

10

20

30

表 24

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	6.2	42.5	1.153	1.552	0.008	0.484	0.679	0.196
2	7.6	38.6	0.618	0.979	0.005	0.267	0.465	0.094
3	3.9	40.4	0.706	1.030	0.011	1.266	1.768	0.722
4	2.0	46.9	0.372	0.417	0.004	0.363	0.608	0.276
5	5.4	40.6	0.540	0.784	0.005	1.077	1.809	0.645
6	2.0	44.7	1.078	1.325	0.009	0.516	1.034	0.382
7	2.1	46.5	0.398	0.453	0.005	0.353	0.792	0.569
8	5.8	39.7	0.647	0.980	0.005	0.425	0.706	0.183
9	4.7	40.0	0.844	1.268	0.000	0.310	0.764	0.199
10	7.6	39.7	1.345	2.033	0.009	0.350	0.635	0.119
11	14.1	2.9	0.068	2.274	0.013	na	na	na
12	12.8	6.9	0.126	1.688	0.009	na	na	na
13	12.7	4.2	0.109	2.468	0.012	0.060	1.541	0.366
14	13.0	20.9	0.704	2.669	0.000	0.407	2.502	0.694
15	19.3	43.5	1.011	1.308	0.007	0.357	0.843	0.276
16	19.6	6.1	0.092	1.414	0.010	0.120	1.740	0.477
17	22.8	56.6	1.068	0.814	0.004	0.604	0.503	0.126

na : 分析・測定せず

[実施例 2 4] WKS82 へのパンジー由来 F3'5'H 遺伝子 (#40) とトレニア由来アントシアニン 5-アシル基転移酵素遺伝子の導入

藤色系バラ「WKS82」へ pSPB130 (図 7) を導入し、89 個体の形質転換体を得た。色素分析を行った 44 個体全てでデルフィニジンの蓄積を確認した (表 25 及び表 26)。デルフィニジン含有率は最高 91% (平均 49%) であった。花色は RHS カラーチャート 186d (GREYED-PURPLE GROUP) から 80c (PURPLE-VIOLET GROUP) へ変化した。しかしながら RHSCC のバイオレットグループ、バイオレットブルーグループ、ブルーグループには至らず、目的の青いバラを得ることは出来なかった。

10

20

30

表25

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	10.5	52.3	0.055	0.050	0.000	0.430	0.883	0.083
2	15.9	62.5	0.091	0.054	0.000	0.570	0.549	0.030
3	15.9	36.6	0.044	0.076	0.000	0.622	2.221	0.102
4	6.8	40.0	0.023	0.034	0.000	0.247	0.986	0.172
5	15.0	82.9	0.087	0.018	0.000	5.451	0.403	0.042
6	na	89.7	0.072	0.008	0.000	0.853	0.163	0.062
7	9.5	89.5	0.101	0.012	0.000	0.719	0.144	0.019
8	14.7	11.4	0.012	0.090	0.000	na	na	na
9	11.6	29.3	0.024	0.059	0.000	na	na	na
10	8.7	15.2	0.010	0.053	0.000	na	na	na
11	7.9	59.0	0.046	0.032	0.000	0.580	0.619	0.022
12	8.5	55.6	0.060	0.048	0.000	1.318	1.615	0.165
13	13.9	42.3	0.026	0.035	0.000	0.603	1.094	0.052
14	10.1	10.3	0.008	0.073	0.000	na	na	na
15	10.6	18.8	0.018	0.079	0.000	na	na	na
16	9.3	11.7	0.009	0.066	0.000	na	na	na
17	14.3	76.2	0.112	0.035	0.000	3.741	1.587	0.377
18	12.7	76.7	0.101	0.031	0.000	1.608	0.656	0.075
19	9.8	71.7	0.057	0.022	0.000	1.403	0.455	0.041
20	5.3	14.1	0.011	0.068	0.000	0.132	2.999	0.720
21	3.5	18.5	0.008	0.035	0.000	na	na	na
22	7.7	23.1	0.017	0.055	0.000	0.141	0.929	0.034
23	5.4	19.0	0.015	0.065	0.000	0.297	4.128	1.350

na : 分析・測定せず

10

20

30

表26

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
24	1.1	42.1	0.036	0.050	0.000	0.609	2.929	0.679
25	22.7	91.0	0.079	0.008	0.000	0.964	0.218	0.018
26	6.1	61.3	0.048	0.030	0.000	0.490	0.468	0.029
27	8.7	91.3	0.097	0.009	0.000	2.053	0.339	0.123
28	9.4	59.9	0.060	0.040	0.000	1.537	1.631	0.422
29	5.5	51.2	0.040	0.038	0.000	0.688	0.723	0.038
30	5.1	61.4	0.056	0.032	0.003	0.637	0.537	0.087
31	7.0	53.3	0.037	0.032	0.000	0.706	1.032	0.051
32	5.7	58.1	0.071	0.051	0.000	1.592	1.478	0.220
33	4.3	64.6	0.092	0.050	0.000	0.849	0.753	0.035
34	6.4	61.7	0.042	0.026	0.000	0.477	0.468	0.023
35	8.9	58.8	0.048	0.034	0.000	0.646	0.928	0.063
36	6.2	11.6	0.007	0.057	0.000	0.094	1.132	0.066
37	7.1	51.2	0.038	0.036	0.000	0.911	1.135	0.079
38	5.8	50.8	0.029	0.028	0.000	0.868	1.105	0.096
39	5.5	47.0	0.027	0.023	0.007	1.366	1.632	0.105
40	4.9	67.0	0.044	0.022	0.000	0.795	0.586	0.051
41	na	61.1	0.053	0.033	0.000	1.310	1.466	0.259
42	9.6	71.0	0.074	0.030	0.000	0.460	0.337	0.023
43	1.2	27.6	0.009	0.024	0.000	na	na	na
44	5.2	13.8	0.013	0.078	0.000	na	na	na

na : 分析・測定せず

〔実施例25〕 W K S 9 1 へのパンジー由来 F 3 ' 5 ' H 遺伝子 (# 4 0) とトレニア由来アントシアニン5-アシル基転移酵素遺伝子の導入

薄橙色系バラ「W K S 9 1」へ p S P B 1 3 0 (図7)を導入し、10個体の形質転換体を得た。色素分析を行った2個体のうち1個体のみでデルフィニジンの蓄積を確認した(表27)。デルフィニジン含有率は最高2%であった。花色はR H S カラーチャート43c (RED GROUP) から変化がみられなかった。

表27

個体番号	アシル化 (%)	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)
1	0.7	0.0	0.000	0.090	0.307
2	0.0	1.8	0.006	0.040	0.295

〔実施例26〕 ラバンデでのパンジー由来 F 3 ' 5 ' H 遺伝子 (# 4 0) とアイリス由 D F R 遺伝子の発現とバラ内在性 D F R 遺伝子の抑制

切花の青いアイリス花卉からRNAを得、さらにこれから p o l y A ⁺ RNA を調製した。この p o l y A ⁺ RNA から λ Z A P I I (S t r a t a g e n e 社) をベクターとする c D N A ライブラリーを c D N A ライブラリー作製キット (S t r a t a g e n e 社) を用いて製造者が推奨する方法で作製した。アイリスの D F R 遺伝子断片は、リンドウ

のDFR遺伝子断片を取得した報告と同様に行った(Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 37, 711-716, 1996)。

得られた約400bpのDNA断片をジーンクリーンにより製造者の推奨する方法で回収し、pCRTOPPOにサブクロニングした。その塩基配列を決定したところバラDFR遺伝子に相同な配列が見られた。このDNA断片を用いてアイリスcDNAライブラリーをスクリーニングし、全長のアミノ酸配列を含むアイリスDFRcDNAを得た。そのうちpSPB906としたクローンに含まれるcDNAの全塩基配列を決定した。この塩基配列を配列番号: 9に示し、そして対応するアミノ酸配列を配列番号: 10に示す。

次にpSPB580をBamHIとXhoIで消化して得られる約3.9kbのDNA断片とpSPB906をBamHIとXhoIで消化して得られる約1.5kbのDNA断片を連結し得られたプラスミドをpSPB909とした。

植物中でバラDFRcDNAの二本鎖RNAを転写するは次のように作製した。pCGP1364(Tanaka et al. Plant Cell Physiol. (1995) 36 1023-1031)をPstIで部分消化して得られる約3.5kbのDNA断片(MacIプロモーター、バラDFRcDNA, masターミネーターを含む)をpUC19(Yanisch-Perron et al., Gene 33: 103-119, 1985)のPstI部位に挿入することによって得られるプラスミドのうちpUC19のHindIII部位がMacIプロモーターに近接しているものをpCGP1394とした。

次に、pCGP1394をHindIIIとSacIで消化して得られる約1.4kbのDNA断片と、pCGP1394をPstIで消化した後平滑末端化しさらにSacIで消化して得られる約1.9kbのDNA断片と、pBinPLUSをSacIで消化した後平滑末端化しさらにHindIIIで消化して得られるバイナリーベクター断片を連結しpSPB185を得た。pSPB185をXbaIで消化し、平滑末端化し、SalIリンカーとライゲーションすることにより、pSPB521を得た。pUE6をHindIIIとBamHIで消化して得られる約700bpのDNA断片と、pSPB521をHindIIIとSacIで消化して得られるバイナリーベクターDNA断片とpE2113をBamHIとSacIで消化して得られるGUS遺伝子DNA断片を連結することによりpSPB528を得た。

pSPB528はエンハンサーを有するカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターとモノピンシンターゼターミネーターの間に構造遺伝子を挿入し植物で発現させることができるバイナリーベクターである。また、pCGP645に含まれるバラDFRcDNAの5'非翻訳領域配列を短くするためにpCGP645をSmaIとPvuIで消化した後平滑末端化し、ライゲーションして得られたpCGP645sを得た。

バラDFRcDNAの5'側配列を、pCGP645sを鋳型にリバースプライマーと合成プライマーRDF310(5'-CCCTCGAGCCCTTGATGGCCTCGTCG-3') (配列番号: 19)をプライマーに用いてPCRにより増幅することにより取得し、pCRTOPPOにクローニングした。DNAの塩基配列を決定しPCRによるエラーがないことを確認した。これをpSPB569とした。また長さの異なるバラDFRcDNAの5'側配列を、pCGP645sを鋳型にリバースプライマーと合成プライマーRDF830(5'-GGGTCGACGCGGCCCTCTGCTTTTCGG-3') (配列番号: 20)をプライマーに用いてPCRにより増幅することにより取得し、pCRTOPPOにクローニングした。DNAの塩基配列を決定しPCRによるエラーがないことを確認した。

これをpSPB570とした。pSPB528をBamHIとSacIで消化して得られるバイナリーベクターのDNA断片と、pSPB569をSacIとXhoIで消化して得られる0.3kbのDNA断片とpSPB570をBamHIとSalIで消化して得られるDNA断片を連結しpSPB572を得た。本ベクターは植物中でバラDFRcDNAの二本鎖RNAを転写するようにデザインされている。

pUE6をSacIで消化し、平滑末端化し、SalIリンカーを挿入しpUE8を得

10

20

30

40

50

た。pUE8をHindIIIとEcoRIで消化して得られるDNA断片をpBinPLUSのHindIIIとEcoRI部位に導入し、pSPB189とした。pSPB189をBamHIとSalIで消化して得られる約3.7kbのDNA断片とpCGP1961をBamHIで完全消化しさらにXhoIで部分消化して得られる約1.8kbのDNA断片を連結しpSPB567を得た。pSPB572をPacI消化し、脱リン酸化処理を行った後、pSPB567をPacIで消化して得られる約2.8kbのDNA断片を連結し、nptII遺伝子とパンジー由来のF3'5'H#40が同じ向きに転写されるプラスミドを選択し、pSPB905とした。

pSPB905をAscIで消化し、脱リン酸化処理を行った後、pSPB909をAscIで消化して得られる約2.5kbのDNA断片を連結し、nptII遺伝子と同じ方向にアイリスDFR遺伝子が転写されるプラスミドを得、pSPB919（図8）とした。本プラスミドはバラにおいてはアイリス由来のDFR遺伝子とパンジー由来のF3'5'H#40遺伝子を転写し、バラのDFR遺伝子の発現を二本鎖RNAの転写により抑制することが期待される。このプラスミドをAgrobacterium tumefaciens AglO株に導入した。

藤色系バラ品種「ラバンデ」へpSPB919（図8）を導入し、87個体の形質転換体を得た。色素分析を行った38個体のうち31個体でデルフィニジンの蓄積を確認した（表28及び表29）。デルフィニジン含有率は最高100%（平均76%）であった。花色はRHSカラーチャート186c（GREYED-PURPLE GROUP）から85a, b（VIOLET GROUP）へと大きく変化した。

バラ花卉からRNAを前述のように抽出し、アガロースゲル電気泳動によりRNAを分離した後ハイボンドN（アマシャム社）に転写した（たとえばTanaka et al. 1995）。mRNAの検出はDIG Northern Starter Kit（Roche）を用いて製造者の推奨する方法により行った。バラDFRmRNAの検出にはpCGP645（Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 36, 1023-1031 1995）を鋳型として用いてT7プライマーで転写したものをプローブとして用いた。

パンジーF3'5'H#40 mRNAの検出にはpCGP1961を鋳型として用いてT7プライマーで転写したものをプローブとして用いた。アイリスDFRmRNAの検出にはpSPB906を鋳型として用いてT7プライマーで転写したものをプローブとして用いた。色の変化したバラにおいては、パンジー由来F3'5'H#40とアイリスDFR遺伝子のmRNAは検出された。一方、バラDFRmRNAは宿主に比べ有意に減少しており、低分子量の位置にバンドが検出されることからバラDFR mRNAの分解が起きていることがわかった。

10

20

30

表28

個体番号	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (ng/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	0.0	0.000	0.105	0.036	0.856	0.038
2	0.0	0.000	0.125	na	na	na
3	0.0	0.000	0.091	0.023	0.851	0.101
4	0.0	0.000	0.116	0.000	1.336	0.087
5	0.0	0.000	0.048	na	na	na
6	88.5	0.086	0.011	1.626	1.187	0.411
7	90.8	0.089	0.009	0.797	1.548	0.087
8	84.0	0.046	0.009	0.163	0.699	0.016
9	87.8	0.062	0.009	0.193	0.760	0.022
10	89.3	0.072	0.009	0.210	0.575	0.033
11	91.5	0.049	0.005	0.398	0.805	0.050
12	91.5	0.032	0.003	0.100	0.811	0.014
13	85.7	0.040	0.007	0.092	0.497	0.012
14	64.9	0.040	0.021	0.263	0.327	0.015
15	88.3	0.041	0.005	na	na	na
16	66.4	0.011	0.006	0.036	1.221	0.030
17	79.7	0.008	0.002	0.030	0.765	0.009
18	100.0	0.010	0.000	0.048	1.343	0.067
19	95.9	0.040	0.002	0.159	0.136	0.004
20	65.4	0.016	0.008	0.090	1.244	0.048
21	18.8	0.011	0.049	0.048	0.855	0.020
22	0.0	0.000	0.110	0.000	1.274	0.079
23	0.0	0.000	0.140	0.000	1.952	0.200

na : 分析・測定せず

10

20

30

表29

個体番号	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
24	41.4	0.102	0.144	0.265	0.417	0.015
25	34.3	0.042	0.081	0.167	0.429	0.024
26	34.6	0.023	0.043	na	na	na
27	41.4	0.082	0.116	0.232	0.385	0.019
28	37.7	0.046	0.076	0.254	0.429	0.018
29	36.1	0.032	0.057	0.151	0.235	0.042
30	97.2	0.052	0.002	0.208	0.088	0.004
31	93.0	0.038	0.003	0.347	0.137	0.007
32	98.2	0.101	0.002	0.339	0.258	0.029
33	91.3	0.039	0.004	na	na	na
34	91.9	0.041	0.004	0.332	0.120	0.007
35	96.8	0.052	0.002	na	na	na
36	96.7	0.084	0.003	0.342	0.168	0.010
37	88.0	0.014	0.002	0.076	1.000	0.029
38	84.5	0.016	0.003	0.074	1.121	0.025

na : 分析・測定せず

〔実施例27〕 ラバンデでのパンジー由来F3'5'H遺伝子(#40)とニーレンベルギア由来DFR遺伝子の発現とバラ内在性DFR遺伝子の抑制

ニーレンベルギア(*Nierembergia hybrida*)品種フェアリーベルパティオライトブルー(サントリーフラワーズ株式会社)の花弁からRNAを得、さらにこれからpolyA⁺RNAを調製した。このpolyA⁺RNAからλZAPII(Stratagene社)をベクターとするcDNAライブラリーをcDNAライブラリー合成キット(Stratagene社)を用いて製造者が推奨する方法で作製した。このcDNAライブラリーをDIG標識したペチュニアDFR cDNA(pCGP1405由来)を用いてスクリーニングした。

スクリーニングの条件はDIG標識システムで製造者が推奨するブラークハイブリダイゼーション方法に従った。ただし、プレハイブリダイゼーションならびにハイブリダイゼーションバッファー中のホルムアミド濃度30%とし、37℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。またメンブレンの洗浄は、1%SDSを含む5xSSC中55℃で行った。得られた多数のポジティブなシグナルのうち20プラークからプラスミドを回収し、リバースプライマー(タカラ)を用いて塩基配列の決定を行った。これらはペチュニアはじめ他の植物のDFR遺伝子に相同性を示した。これらのうちpSPB709としたクローンのcDNAの全配列を決定した。得られた塩基配列を配列番号:11に示し、そしてそれに対応するアミノ酸配列を配列番号:12に示す。

pSPB580をBamHIとXhoIで消化して得られる約3.9kbのDNA断片とpSPB709をBamHIとXhoIで消化して得られる約1.5kbのDNA断片を連結し得られたプラスミドをpSPB910とした。pSPB905をAscIで消化し、脱リン酸化処理を行った後、pSPB910をAscIで消化して得られる約2.5kbのDNA断片を連結し、nptII遺伝子と同じ方向にニーレンベルギアDFR遺伝子が転写されるプラスミドを得、pSPB920(図9)とした。本プラスミドはバラにおいてはニーレンベルギア由来のDFR遺伝子とパンジー由来のF3'5'H#40遺伝子を転写し、バラのDFR遺伝子の発現を二本鎖RNAの転写により抑制することが期待

される。このプラスミドをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) AglO株に導入した。

藤色系バラ品種「ラバンデ」へpSPB920 (図9)を導入し、56個体の形質転換体を得た。色素分析を行った24個体のうち23個体でデルフィニジンの蓄積を確認した (表30)。デルフィニジン含有率は最高100% (平均43%)であった。花色はRHSカラーチャート186c (GREYED-PURPLE GROUP) から85b (VIOLET GROUP)へと変化した。

表30

個体番号	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	69.5	0.025	0.002	0.081	2.265	0.066
2	85.4	0.024	0.004	0.114	1.355	0.032
3	71.8	0.006	0.002	0.043	0.781	0.027
4	100.0	0.012	0.000	0.414	0.283	0.030
5	88.2	0.015	0.002	0.506	0.126	0.030
6	100.0	0.013	0.000	0.430	0.123	0.008
7	33.3	0.019	0.038	na	na	na
8	37.3	0.012	0.020	na	na	na
9	48.2	0.012	0.013	na	na	na
10	18.9	0.011	0.049	0.053	1.023	0.022
11	39.7	0.037	0.056	0.120	1.157	0.035
12	9.4	0.010	0.095	na	na	na
13	11.0	0.008	0.062	na	na	na
14	24.4	0.017	0.054	0.128	1.852	0.181
15	12.4	0.015	0.102	na	na	na
16	89.7	0.089	0.010	0.530	1.424	0.165
17	15.4	0.006	0.035	na	na	na
18	22.3	0.006	0.019	0.018	1.286	0.038
19	10.4	0.007	0.058	0.039	1.673	0.045
20	28.3	0.006	0.015	0.028	0.932	0.025
21	35.2	0.015	0.028	0.105	0.743	0.028
22	16.0	0.010	0.052	na	na	na
23	0.0	0.000	0.018	0.013	1.764	0.027
24	13.7	0.007	0.042	0.033	1.469	0.041

na : 分析・測定せず

〔実施例28〕 後代への形質の遺伝

藤色系バラ品種「ラバンデ」へpSPB919 (図8)を導入し得られた形質転換体 (LA/919-2-13)を花粉親に用い、母親として非組換え体のWKS77あるいはWKS133を用いて交配 (鈴木省三, 「ばら、花図譜」、小学館, p. 256-260、1990)を行った。受粉後100日目に果実を収穫した。播種は、まず果実を剥いて瘦果を採取し、さらに瘦果を剥いて胚を取り出した後、シャーレ内の湿らせたろ紙上に置床した。播種時に使用する水は滅菌水にPPM^TM (Plant Preservative Mixture, PLANT CELL TECHNOLOGY, INC.)を1ml/l、カナマイシンを50mg/l添加したものをを用い、正常に発芽したもののみを

鉢上げし、育苗を行った。

得られた形質転換体後代のうち、色素分析を行った40個体全てでデルフィニジンの蓄積を確認した(表31及び表32)。デルフィニジン含有率は最高99%(平均46%)であった。

表31

個体番号	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)
1	89.8	0.494	0.056	0.000	0.000
2	96.1	3.900	0.153	0.005	0.000
3	55.9	0.836	0.660	0.000	0.000
4	24.6	0.041	0.127	0.000	0.000
5	23.5	1.108	3.605	0.009	0.002
6	25.9	0.191	0.545	0.003	0.000
7	0.5	0.013	2.552	0.012	0.002
8	75.8	0.283	0.090	0.000	0.000
9	95.9	1.420	0.061	0.000	0.000
10	30.8	0.862	1.841	0.007	0.105
11	13.3	0.068	0.441	0.004	0.000
12	23.9	0.529	1.667	0.023	0.000
12	43.7	0.280	0.362	0.000	0.000
14	19.3	0.035	0.145	0.000	0.000
15	0.6	0.008	1.418	0.021	0.000
16	20.8	0.048	0.183	0.000	0.000
17	92.5	2.257	0.177	0.007	0.000
18	66.4	2.496	1.247	0.015	0.000
19	42.4	0.369	0.497	0.004	0.000
20	75.6	0.597	0.183	0.010	0.000
21	19.6	0.271	1.103	0.008	0.000
22	71.0	0.107	0.044	0.000	0.000
23	0.6	0.006	0.850	0.004	0.000

10

20

30

表32

個体番号	Del含有率 (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)	Peo (mg/g)
24	16.7	0.053	0.263	0.000	0.000
25	71.8	0.211	0.083	0.000	0.000
26	18.6	0.177	0.769	0.003	0.000
27	1.3	0.009	0.652	0.004	0.000
28	59.7	0.183	0.124	0.000	0.000
29	39.6	0.124	0.187	0.003	0.000
30	21.4	0.187	0.684	0.003	0.000
31	0.6	0.005	0.763	0.004	0.000
32	38.8	0.226	0.353	0.003	0.000
33	50.5	0.154	0.151	0.000	0.000
34	28.0	0.267	0.682	0.003	0.000
35	83.9	0.204	0.039	0.000	0.000
36	64.9	0.380	0.205	0.000	0.000
37	78.8	0.239	0.064	0.000	0.000
38	97.4	0.614	0.016	0.000	0.000
39	98.7	0.805	0.011	0.000	0.000
40	54.9	0.083	0.068	0.000	0.000

〔実施例29〕 WKS140でのパンジーF3'5'H#40遺伝子とアイリスDFR遺伝子の発現とバラ内在性DFR遺伝子の抑制

藤色系バラ品種「WKS140」へpSPB919を導入し、89個体の形質転換体を得た。色素分析を行った79個体のうち74個体でデルフィニジンの蓄積を確認した。デルフィニジン含有率は最高100%（平均68%）であった。花色はRHSカラーチャート186d（GREYED-PURPLE GROUP）から主に84c（VIOLET GROUP）へと変化した。

表 33

個体番号	Del (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)
1	0.0%	0.0000	0.0423	0.0000
2	89.9%	0.0242	0.0027	na
3	90.0%	0.0245	0.0027	na
4	88.6%	0.0093	0.0012	na
5	43.5%	0.0042	0.0054	na
6	91.2%	0.0118	0.0011	na
7	81.2%	0.0027	0.0006	na
8	81.0%	0.0173	0.0041	na
9	73.9%	0.0733	0.0259	na
10	62.9%	0.0321	0.0190	na
11	91.9%	0.0962	0.0084	na
12	99.1%	0.1606	0.0015	na
13	94.7%	0.0588	0.0033	na
14	100.0%	0.0839	0.0000	na
15	0.0%	0.0000	0.0005	na
16	98.4%	0.0296	0.0005	na
17	80.4%	0.1748	0.0451	na
18	94.6%	0.0190	0.0000	na
19	0.0%	0.0000	0.0714	na
20	34.3%	0.0099	0.0191	na
21	30.9%	0.0126	0.0282	na
22	65.6%	0.0294	0.0154	na
23	24.1%	0.0205	0.0646	na

na：分析・測定せず

〔実施例 30〕 WKS77 でのパンジー F3'5'H#40 遺伝子とアイリス DFR 遺伝子の発現とバラ内在性 DFR 遺伝子の抑制

濃赤紫系バラ品種「WKS77」へ pSPB919 を導入し、50 個体の形質転換体を得た。色素分析を行った 23 個体のうち 21 個体でデルフィニジンの蓄積を確認した。デルフィニジン含有率は最高 81%（平均 19%）であった。花色は RHS カラーチャート 57a（RED-PURPLE GROUP）から 77b（PURPLE GROUP）へ変化した。

表 34

個体番号	Del (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)
1	26.0%	1.2028	3.4033	0.0117
2	41.5%	0.6473	0.9093	0.0048
3	80.8%	0.2210	0.0526	na
4	68.0%	0.1865	0.0878	na
5	68.5%	0.2090	0.0951	0.0010
6	1.5%	0.0119	0.7731	0.0051
7	1.5%	0.0114	0.7304	0.0041
8	0.2%	0.0069	2.9266	0.0063
9	0.2%	0.0017	1.0791	0.0062
10	0.0%	0.0000	0.5013	0.0043
11	0.1%	0.0028	2.3418	0.0110
12	0.4%	0.0091	2.4603	0.0126
13	0.2%	0.0040	1.7766	0.0096
14	0.3%	0.0026	0.9046	0.0052
15	0.0%	0.0000	1.6063	0.0100
16	22.2%	0.3279	1.1392	0.0049
17	24.0%	0.2638	0.8288	0.0052
18	1.4%	0.0240	1.6777	0.0118
19	1.1%	0.0186	1.6352	0.0101
20	26.7%	0.2645	0.7230	0.0037
21	22.7%	0.2200	0.7460	0.0046
22	40.1%	0.8929	1.3374	0.0071

na : 分析・測定せず

[実施例 31] WKS77 でのパンジー F3'5'H#40 遺伝子とニーレンベルギア DFR 遺伝子の発現とバラ内在性 DFR 遺伝子の抑制

濃赤紫系バラ「WKS77」へ pSPB920 を導入し、30 個体の形質転換体を得た。色素分析を行った 27 個体中、26 個体でデルフィニジンの蓄積を確認した。デルフィニジン含有率は最高 98% (平均 60%) であった。花色は RHS カラーチャート 57a (RED-PURPLE GROUP) から 77b (PURPLE GROUP) へ変化した。

表 35

個体番号	Del (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)
1	93.9%	0.1679	0.0110	0.0000
2	97.6%	0.2311	0.0058	na
3	96.3%	0.1684	0.0065	na
4	97.1%	0.1012	0.0017	na
5	9.6%	0.0946	0.7810	0.1104
6	21.9%	0.1462	0.5166	0.0034
7	12.7%	0.1097	0.7495	0.0049
8	97.9%	0.1942	0.0042	na
9	98.1%	0.1228	0.0024	na
10	3.2%	0.0360	1.0689	0.0035
11	3.1%	0.0267	0.9587	0.0032
12	4.8%	0.1138	2.2562	0.0049
13	6.2%	0.1066	1.5999	0.0080
14	96.5%	0.3541	0.0132	na
15	2.1%	0.0173	0.7852	0.0068
16	94.7%	0.2898	0.0160	0.0000
17	96.7%	0.0819	0.0020	0.0000
18	95.8%	0.6969	0.0309	na
19	96.4%	0.4868	0.0181	na
20	64.3%	0.3092	0.1724	na
21	26.9%	0.2740	0.7431	0.0025
22	19.9%	0.3760	1.5028	0.0071
23	88.2%	0.0316	0.0042	na
24	94.2%	0.0259	0.0016	na
25	90.4%	0.0481	0.0051	na

na : 分析・測定せず

[実施例 3 2] W K S 7 7 でのパンジー F 3 ' 5 ' H # 4 0 遺伝子とペチュニア D F R 遺伝子の発現とバラ内在性 D F R 遺伝子の抑制

濃赤紫系バラ「W K S 7 7」へ p S P B 9 2 1 を導入し、15 個体の形質転換体を得た。色素分析を行った 13 個体のうち 12 個体でデルフィニジンの蓄積を確認した。デルフィニジン含有率は最高 98 % (平均 60 %) であった。花色は R H S カラーチャート 5 7 a (RED-PURPLE GROUP) から 7 2 b (RED-PURPLE GROUP) へ変化した。

表36

個体番号	Del (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)
1	90.0%	0.0549	0.0061	na
2	38.4%	0.3397	0.5402	0.0041
3	56.9%	0.7834	0.5824	0.0099
4	58.5%	0.0196	0.0139	na
5	90.3%	0.1336	0.0144	na
6	90.9%	0.1251	0.0126	na
7	86.7%	0.1771	0.0274	na
8	91.6%	0.0113	0.0010	na
9	97.5%	0.0864	0.0022	na
10	9.5%	0.2687	2.6591	0.0000
11	8.8%	0.1421	1.4598	0.0071
12	0.4%	0.0060	1.3554	0.0053

na : 分析・測定せず

〔実施例33〕 後代への形質の遺伝

藤色系バラ品種「ラバンデ」へpSPB919を導入し得られた形質転換体（LA／919-4-10）を花粉親に用い、母親として非組換え体バラの品種ブラックバカラを用いて実施例28と同様に交配を行った。受粉後100日目に果実を収穫した。播種は、まず果実を剥いて瘦果を採取し、さらに瘦果を剥いて胚を取り出した後、シャーレ内の湿らせたろ紙上に置床した。播種時に使用する水は滅菌水にPPMTM（Plant Preservative Mixture, PLANT CELL TECHNOLOGY, INC.）を1ml／l、カナマイシンを50mg／l添加したものをを用い、正常に発芽したもののみを鉢上げし、育苗を行った。

得られた形質転換体後代のうち、色素分析を行った18個体全てでデルフィニジンの蓄積を確認した。デルフィニジン含有率は最高99.8%（平均98.7%）であった。

表 37

個体番号	Del (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)
1	97.8%	0.6633	0.0142	0.0009
2	99.0%	0.9002	0.0096	na
3	98.5%	0.5385	0.0080	na
4	99.5%	2.0561	0.0087	0.0016
5	99.8%	1.6556	0.0034	na
6	96.6%	0.5601	0.0200	na
7	99.0%	0.6148	0.0063	na
8	98.9%	1.6867	0.0193	na
9	95.0%	0.5740	0.0304	na
10	96.9%	0.1152	0.0036	na
11	99.3%	0.0683	0.0005	na
12	99.6%	0.1248	0.0005	na
13	99.5%	0.3574	0.0010	0.0000
14	99.6%	0.5500	0.0021	na
15	99.6%	1.2322	0.0049	na
16	99.7%	1.4384	0.0042	na
17	99.8%	0.5117	0.0010	na
18	98.3%	0.8073	0.0140	na

na : 分析・測定せず

[実施例 34] WKS77でのパンジーF3'5'H#40遺伝子の発現とバラ内在性F3'H遺伝子の抑制

濃赤紫系バラ品種「WKS77」へpSPB1106 (図10)を導入し、40個体の形質転換体を得た。色素分析を行った26個体全てでデルフィニジンの蓄積を確認した。デルフィニジン含有率は最高80.0% (平均30.5%)であった。花色はRHSカラーチャート57a (RED-PURPLE GROUP) から83d (VIOLET GROUP)へと大きく変化した。

10

20

30

表 38

個体番号	Del (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	68.7%	0.5497	0.2275	0.0241	na	na	na
2	78.8%	0.3449	0.0830	0.0096	na	na	na
3	80.0%	0.6949	0.1604	0.0144	na	na	na
4	71.2%	0.4377	0.1563	0.0214	na	na	na
5	72.7%	0.5260	0.1715	0.0266	0.3812	0.2275	1.7669
6	70.7%	0.3829	0.1449	0.0146	na	na	na
7	10.3%	0.0358	0.3031	0.0071	na	na	na
8	15.6%	0.1847	0.9530	0.0444	na	na	na
9	4.8%	0.0739	1.4586	0.0149	na	na	na
10	1.1%	0.0114	1.0411	0.0144	na	na	na
11	54.0%	1.3206	1.1166	0.0092	na	na	na
12	57.8%	0.8842	0.6410	0.0056	na	na	na
13	0.9%	0.0242	2.5500	0.0168	na	na	na
14	23.0%	0.2087	0.6909	0.0062	na	na	na
15	12.7%	0.1645	1.1271	0.0058	na	na	na
16	26.4%	0.5275	1.4645	0.0132	na	na	na
17	18.7%	0.3555	1.5310	0.0109	na	na	na
18	24.2%	0.4388	1.3687	0.0072	na	na	na
19	64.7%	0.4029	0.1945	0.0249	0.6368	0.3949	2.0567
20	0.1%	0.0021	1.8646	0.0077	na	na	na
21	0.0%	0.0000	0.9708	0.0062	na	na	na
22	0.1%	0.0022	2.6049	0.0127	na	na	na
23	0.4%	0.0066	1.8002	0.0066	na	na	na
24	0.5%	0.0079	1.4670	0.0056	0.0000	1.3096	0.2414
25	17.3%	0.1000	0.4671	0.0099	na	na	na
26	18.3%	0.1232	0.5418	0.0052	na	na	na

na : 分析・測定せず

[実施例 35] Lavande でのパンジー F3'5'H#40 遺伝子の発現とバラ内在性 F3'H 遺伝子の抑制

藤色系バラ品種「Lavande」へ pSPB1106 を導入し、40 個体の形質転換体を得た。色素分析を行った 25 個体のうち 23 個体でデルフィニジンの蓄積を確認した。デルフィニジン含有率は最高 98.3% (平均 46.9%) であった。

表 39

個体番号	Del (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
1	76.8%	0.0732	0.0188	0.0032	0.5705	0.1595	0.3073
2	80.1%	0.1441	0.0296	0.0061	0.5298	0.1881	4.3294
3	3.7%	0.0086	0.2174	0.0027	na	na	na
4	4.4%	0.0079	0.1691	0.0034	na	na	na
5	8.8%	0.0158	0.1557	0.0070	na	na	na
6	39.0%	0.0212	0.0128	0.0204	0.0000	0.0363	1.3107
7	44.4%	0.0089	0.0027	0.0084	0.0756	0.0573	1.3689
8	40.4%	0.0165	0.0071	0.0172	0.0365	0.0592	2.5211
9	42.0%	0.0087	0.0036	0.0084	0.0752	0.0596	1.2661
10	13.5%	0.0153	0.0939	0.0040	0.1288	1.0594	0.5440
11	81.6%	0.2252	0.0447	0.0061	0.3947	0.1401	0.3947
12	78.8%	0.1022	0.0239	0.0036	0.6700	0.2137	0.5847
13	81.7%	0.2125	0.0438	0.0036	1.3616	0.4621	0.7478
14	80.9%	0.1829	0.0388	0.0044	0.4100	0.2405	0.0567
15	70.9%	0.0664	0.0204	0.0069	0.4230	0.1221	0.1788
16	0.0%	0.0000	0.0844	0.0000	na	na	na
17	98.0%	0.2363	0.0048	0.0000	0.0000	1.0613	0.2698
18	98.3%	0.1398	0.0025	0.0000	0.0479	0.7060	0.1299
19	4.2%	0.0078	0.1724	0.0040	0.0000	0.8627	0.2075
20	0.0%	0.0000	0.1696	0.0043	na	na	na
21	60.0%	0.0333	0.0115	0.0107	0.0000	0.0740	1.8678
22	14.3%	0.0091	0.0454	0.0088	0.1096	0.5305	0.6453
23	15.1%	0.0082	0.0408	0.0053	na	na	na
24	17.6%	0.0082	0.0324	0.0059	na	na	na
25	24.4%	0.0147	0.0375	0.0080	0.0000	0.2147	0.9765

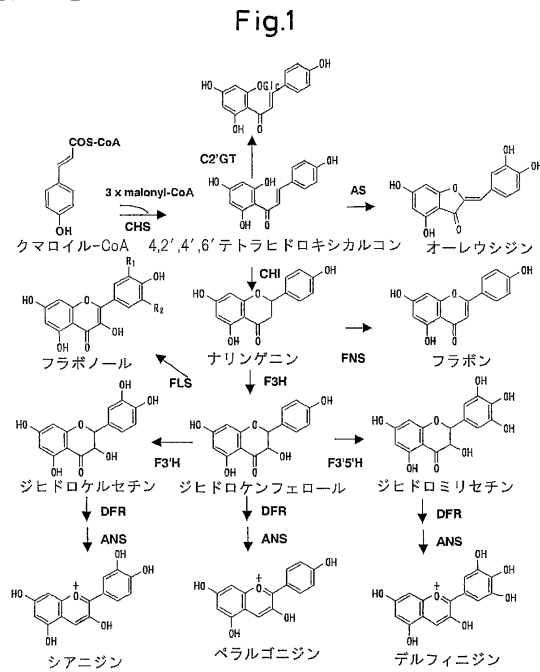
na : 分析・測定せず

以上は導入した外来遺伝子が後代へ伝達され、かつその遺伝子が後代において発現し、本来バラ花卉では見られないディフィニジンを生成するという形質が後代のバラに伝わることを示している。したがって、本遺伝子を用いて色の変化したバラを交配育種することによって、青や紫を含む新しい色のバラを作出できることを示している。

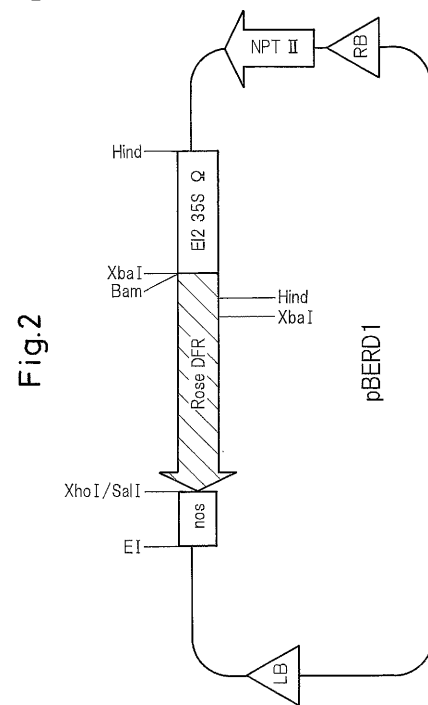
【産業上の利用可能性】

バラの内在性の代謝経路の働き、例えばジヒドロフラボノール還元酵素の発現、を人為的に抑制し、かつパンジー由来のフラボノイド 3', 5'-水酸化酵素をコードする遺伝子及びバラ以外の由来のジヒドロフラボノール還元酵素をコードする遺伝子を発現させることにより、青～紫のバラを作出することが出来る。また、これらの遺伝子は次の世代にも伝達され、青いバラの形質は交配により利用されうることもわかった。

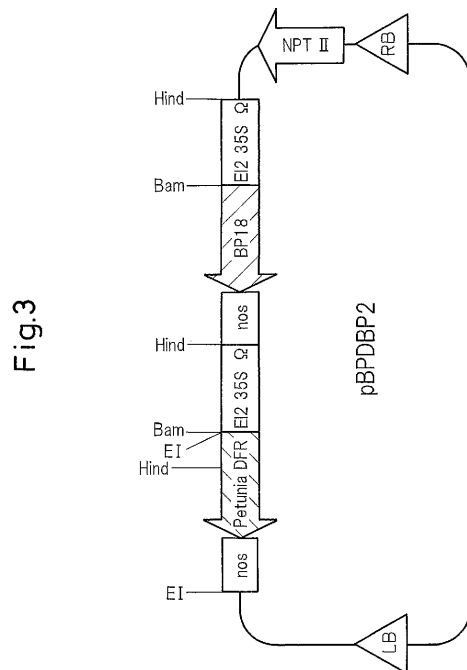
【図 1】



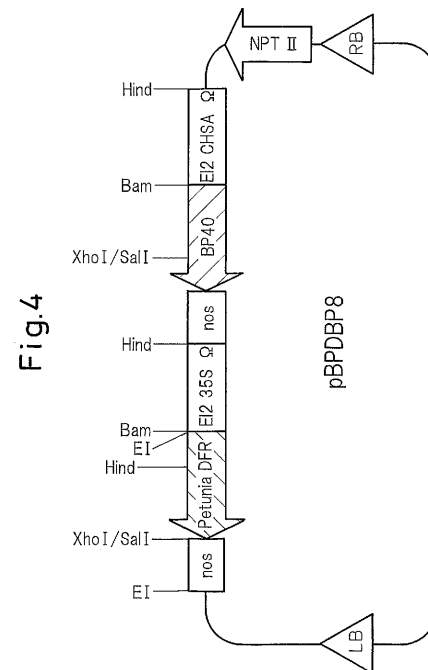
【図 2】



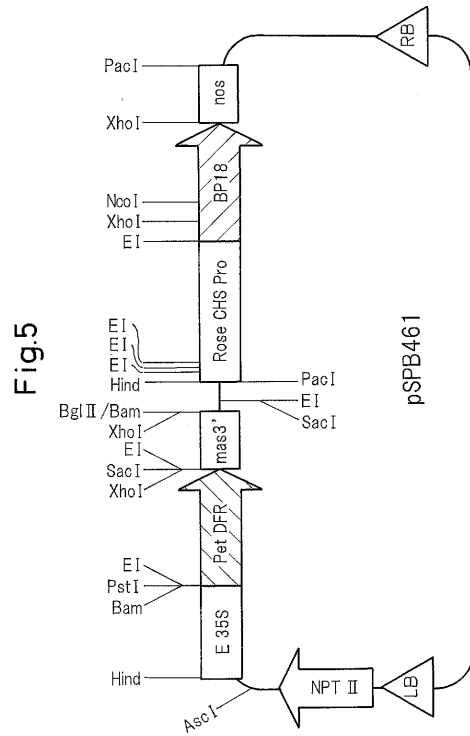
【図 3】



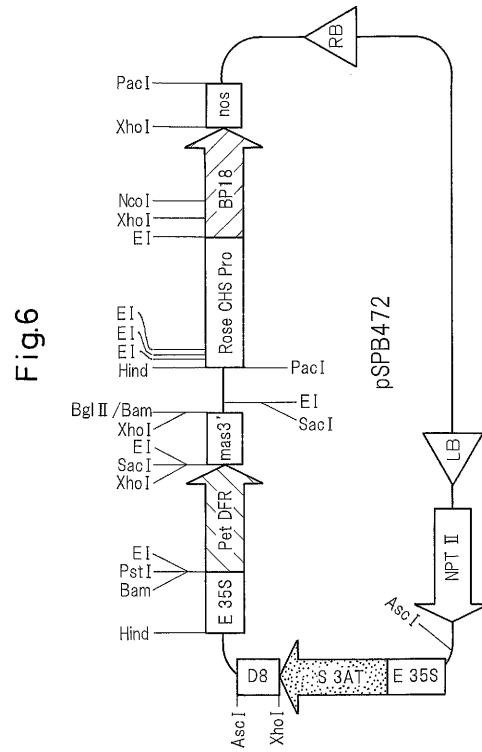
【図 4】



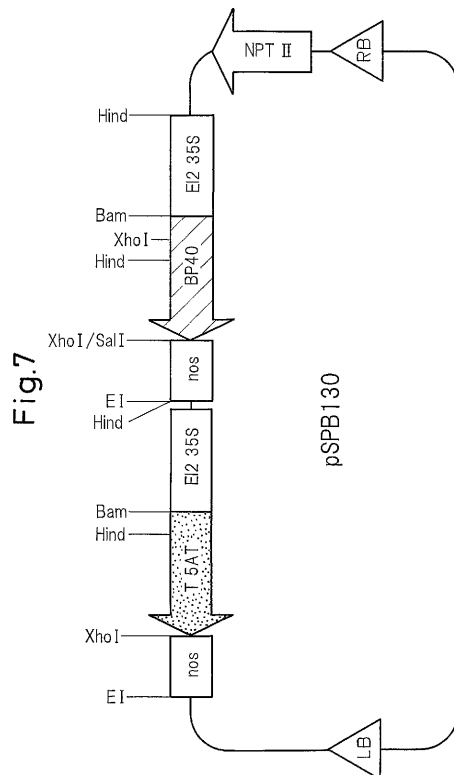
【図 5】



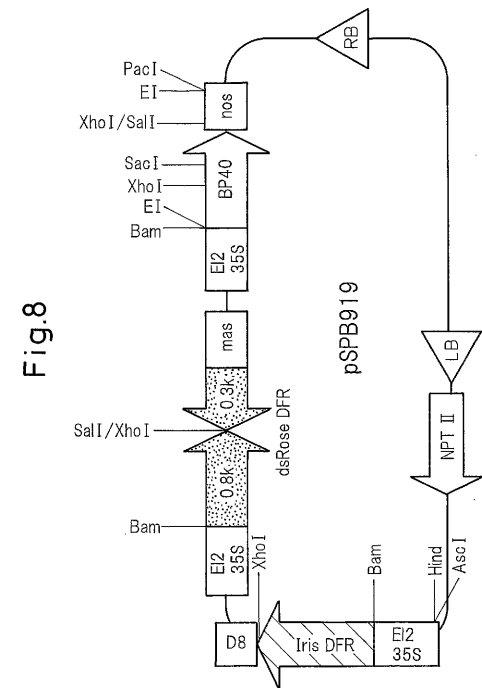
【図 6】



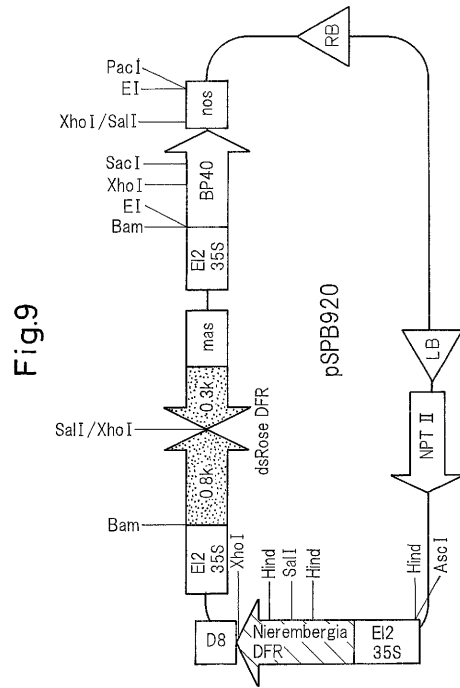
【図 7】



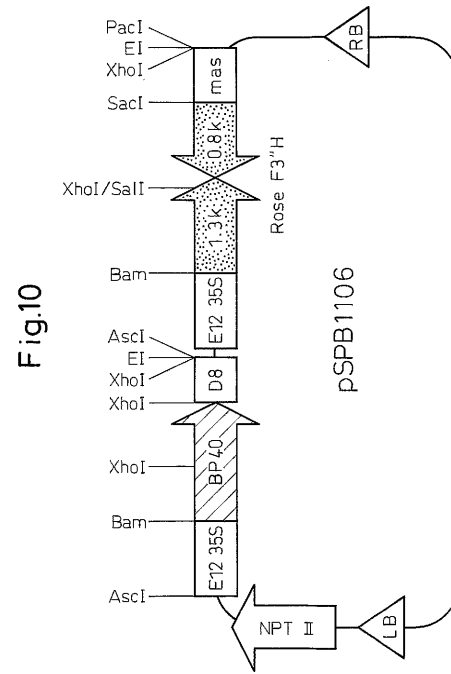
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

0004690197000001.xml

フロントページの続き

- (72)発明者 田中 良和
滋賀県大津市仰木の里 2-7-4
- (72)発明者 福井 祐子
大阪府高槻市芥川町 1-2 A-1 0 0 7
- (72)発明者 戸上 純一
大阪府高槻市富田町 5-1 5-1 0-3 0 3
- (72)発明者 勝元 幸久
大阪府三島郡島本町山崎 1-9-5-4 0 2
- (72)発明者 水谷 正子
京都府京都市西京区桂乾町 5 3-6 0

審査官 長井 啓子

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 4 / 0 2 0 6 3 7 (WO, A 1)
実験医学, vol.18(6), pp.767-770 (2000)
農業および園芸, vol.77, pp.286-291 (2002)
Current Opinion in Biotechnology, vol.10, pp.198-201 (1999)
Current Opinion in Biotechnology, vol.12, pp.155-160 (2001)
Phytochemistry, vol.63, pp.15-23 (2003)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

A01H 5/00
C12N 15/09
BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JST7580(JDreamII)