

花卉特異的プロモーターを用いたペチュニア・トレニア・トルコギキョウ由来の *Flavonoid 3',5'-hydroxylase* 遺伝子の異所的発現による青色花卉タバコ作製の試み

中村 遙花*・中岡 佳奈子**・大野 奈津美***・賀屋 秀隆***

Haruka NAKAMURA, Kanako NAKAOKA, Natsumi ONO and Hidetaka KAYA

Ectopic Expression of *Flavonoid-3',5'-Hydroxylase* Genes Derived from Petunia, Torenia and Eustoma
using a Petal-Specific Promoter in Tobacco.

Abstract

Blue flowers have the power to attract people. So far, there have been attempts to produce blue flowers using genetic modification techniques. The most famous of these flowers is the blue carnation. Subsequently, blue roses have also been produced. However, the color of the petals of these flowers is not pure blue, but reddish blue or almost reddish purple. These indicate that there is still some improvement to be made in order to produce a true blue flower. We examined whether a petal-specific promoter from *Ipomoea nil* (morning glory) could be used to produce blue petals. Using this promoter, we expressed the *flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H)* gene, which is involved in the synthesis of the blue pigment delphinidin, in tobacco petals. Here we showed that the promoter from morning glory has the capability to express the gene in tobacco petals. Among the *F3'5'H* genes derived from Petunia, Torenia, and Eustoma, the gene from Petunia was the most effective. Here we showed that the promoter from morning glory has the capability to express the gene in tobacco petals. Among the *F3'5'H* genes derived from Petunia, Torenia, and Eustoma, the gene from Petunia was the most effective. Although expressing the Petunia *F3'5'H* gene resulted in tobacco petals being reddish purple rather than blue, the present results suggest co-expressing the *F3'5'H* genes of multiple species with multiple promoters can produce blue petals.

Key words: *Flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H)*, petal-specific promoter, Petunia, Torenia, Eustoma, tobacco

1. 緒言

花の色はおよそ白系, 黄色系, 赤系 (紫からピンク色を含む) で占められており, 青系は多くない. なぜなら, 植物にとって青色を作り出すことは容易ではないからである. それ故に, 青色の花には多くの人を引きつける力がある.

花の色を決めるのは花卉の細胞に含まれる色素である. 主な色素はカロテノイドとフラボノイドである.

カロテノイドは黄色・橙・赤色に, フラボノイドは黄色・橙・赤色・紫・青色に関わる. フラボノイドの一つアントシアニジンは, アントシアニンの発色団として花の色に大きく影響する. アントシアニンは, アントシアニジンに糖が結合した配糖体で, 最終的にこのアントシアニンが水溶性植物色素となる. アントシアニジンには, オレンジ色となるペラルゴニジン, 赤色となるシアニジン, そして青色となるデルフィニジンの3種類ある. これら3つの化合物の違いは, フラボノイドの基本骨格であるA環-C環-B環の内のB環の水酸基 (ヒドロキシル基) の数の違いである (図1). ペラルゴニジンは水酸基が1つ, シアニジンは水酸基が2つ, デルフィニジンは水酸基が3つある. 水酸基の数が多くなると吸収極大値が長波長側にシフトする

2022 年 10 月 5 日受領

2022 年 12 月 1 日採択

*愛媛県立新居浜西高等学校

**愛媛大学大学院農学研究科分子生物資源学教育分野

***愛媛大学農学部分子生物資源学教育分野

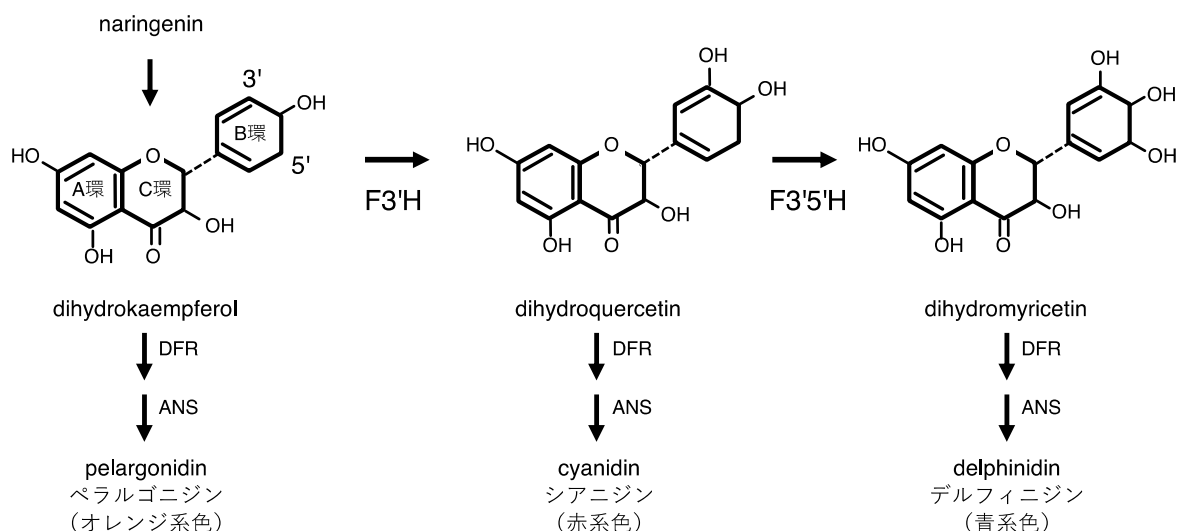


図1 花卉の色に関わるペラルゴニジン，シアニジン，デルフィニジンの合成経路

F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase, F3'5'H: flavonoid 3'5'-hydroxylase, DFR: dihydroflavonol 4-reductase, ANS: anthocyanidin synthase (Katsumoto et al., 2007一部改変)

ために青く見える．すなわち，ペラルゴニジンの水酸基の数を増やすことで，花の色を青くすることが可能である．フラボノイドのB環に水酸基を付加する酵素（水酸化酵素）として，Flavonoid-3'-hydroxylase (F3'H) と Flavonoid-3',5'-hydroxylase (F3'5'H) の2つがあり，花の色を青くさせるためには F3'5'H の機能が必要である．

F3'5'H 遺伝子が初めてクローニングされたのは，ペチュニアである (Holton et al., 1993)．その後，トレニア，トルコギキョウ (Suzuki et al., 2000; Takatori et al., 2015) など様々な植物からも単離された．そして，F3'5'H 遺伝子の過剰発現による青い色の花卉をもつ植物の作製が試みられてきた．有名なのが青いカーネーションやバラである (Tanaka et al., 2005; Katsumoto et al., 2007)．実験植物の中でも形質転換が容易で F3'5'H 遺伝子を持っておらず，ピンク色の花をつけるタバコを用いて，様々な生物種由来の F3'5'H 遺伝子の過剰発現が行われてきた．例えば，Shimada らは，ペチュニアまたはトルコギキョウ由来の F3'5'H 遺伝子をタバコで過剰発現させた．それにより，タバコの花弁で 3', 5' が水酸化されたアントシアニンが検出された．しかし，3', 5' が水酸化されたアントシアニンはそれぞれ 35%，23% で，花卉の色も青色ではなく，マゼンタであった (Shimada et al., 1999)．この様に，これまでにタバコのピンク色の花が青くなったという報告はない．

本研究では，アニメのストーリーにおいて重要なア

イテムとなる架空の植物「青いヒガンバナ」を現実世界において作製するという最終目標に向けて，まずは，タバコにおいて花卉特異的に F3'5'H 遺伝子を発現させるを試みた．これまでに F3'5'H 遺伝子発現に用いられてきたプロモーターは，全てカリフラワーモザイクウイルス由来の CaMV 35S (35S) プロモーターである．35S プロモーターは植物の全組織での恒常的高発現を目的に汎用されているプロモーターである．しかし，花卉の色を変更する為には，花卉特異的に発現させることで，十分に目的を達成することは可能である．また，花卉以外で遺伝子を過剰発現させることは，遺伝子によっては花卉以外での組織への影響もある．そこで，本研究では，アサガオ (*Ipomoea nil*) の MYB1 遺伝子由来のプロモーターを用いた．InMYB1 遺伝子は，アントシアニン合成に関する転写因子で，アサガオの花弁の先端および色づいている部位（花弁の周辺）で発現している (Morita et al., 2006)．この InMYB1 遺伝子のプロモーターの中でも花卉特異的な発現に必要な 332-121b 領域を 3 回繰り返した InMYB1_332-121b×3 に翻訳効率を高める Ω 配列が付加された InMYB1_332-121b×3_TATA_Ω を花卉特異的な発現プロモーターとして用いた (Azuma et al., 2018)．F3'5'H 遺伝子には，トルコギキョウ，ペチュニアとトレニア由来の F3'5'H 遺伝子をタバコの花弁特異的に発現させ花の色の変化を検証した．最終的には，ヒガンバナの花の青色化を目指す．

表1 F3'5'遺伝子クローニング用 プライマー

primer	sequence
Eustoma_F1	5'-ACTATTTACAATTACAGTCGACATGGCTGTTGGAAATGGCGTTTACT-3'
Eustoma_R1	5'-ATCTTCATCTTCATAAGAGCTCTCAAGGAGAGTAAATATGGAGAG-3'
Petunia_F1	5'-AGTCGACATGGTGCTACTTAGTGAGCTTGCTG-3'
Petunia_R1	5'-AGAGCTCTCAAGCTAAAGGTGCATAAACATCAATAG-3'
Torenia_F1	5'-CTATTTACAATTACAGTCGACATGAGTCCCTTAGCCTTGATGATCCTA-3'
Torenia_R1	5'-TCATCTTCATAAGAGCTCTCTAGATTAATAGACATGAGTGGCCAACCGCA-3'

All primers: This study

表2 遺伝子発現解析用 プライマー

primer	sequence	reference
Petunia_RT_F1	5'-TATGGACCAAGATGGAAGTTGCTAA-3'	This study
Petunia_RT_R1	5'-TGTAATAACCATCGACAATGCATGG-3'	This study
Torenia_RT_F1	5'-GACTTGGTTTTCAGACCGTACG-3'	This study
Torenia_RT_R1	5'-CCCCATCATGACGCGTGATAG-3'	This study
NtEF1 α _RT_F1	5'-AGACCACCAAGTACTACTGCACCTG-3'	Waliullah et al.
NtEF1 α _RT_R1	5'-GGAAGAACTCCTTCACGA-3'	Waliullah et al.

2. 材料および方法

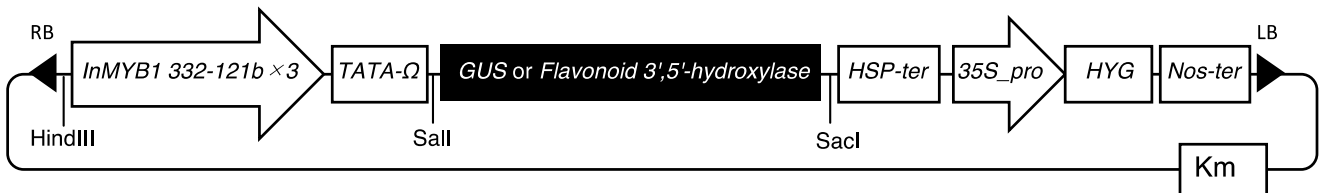
2.1. *Flavonoid-3', 5'-hydroxylase* genes クローニング

ペチュニア、トレニアの青い花びらから RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、逆転写酵素 SuperScript IV (Thermo Fisher) を用い oligo dT primer により first strand cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型に、ペチュニアには Petunia_F1 と Petunia_R1 プライマーを、トレニアには Torenia_F1 と Torenia_R1 プライマーを用いて *F3'5'H* 遺伝子断片を増幅した (表 1)。トルコギキョウの *F3'5'H* 遺伝子断片は、鹿児島大学清水圭一博士より分与して頂いた cDNA を鋳型に Eustoma_F1 と Eustoma_R1 プライマーにより増幅した (表 1)。

2.2. *Flavonoid-3', 5'-hydroxylase* genes 発現用バ

イナリーベクターの構築

花卉特異的プロモーターは、基礎生物学研究所より供与して頂いた *pInMYB1_332-121b×3_*TATA_Ω::GUS* の *InMYB1_332-121b×3_*TATA_Ω* プロモーター領域を含む HindIII-SacI 断片を *pRI-PcUBI-SpCas9_HPT* (Kurokawa et al., 2021) と同じく HindIII-SacI 切断部位にクローニングした *pRI_InMYB1_332-121b×3_*TATA_Ω::GUS_HPT* を作製した (図 2)。SalI-SacI 切断部位で切断して、*GUS* 遺伝子を取り除いた後、トレニア由来、トルコギキョウ由来の *F3'5'H* 遺伝子増幅断片を In-Fusion (TaKaRa) でクローニングした。また、ペチュニア *F3'5'H* 遺伝子断片は、pCRBuntII-TOPO vector (ThermoFisher) にクローニングした後、同じく SalI-SacI 切断部位にサブクローニングした。これにより各 *F3'5'H* 遺伝子発現用バイナリーベクターを作製した (図 2)。***

図2 花卉特異的*GUS*あるいは*Flavonoid 3',5'-hydroxylase*遺伝子発現用 binary vectorの構造

アサガオ由来の*MYB1*遺伝子プロモーターの332-121領域の3回繰り返すと、カリフラワーモザイクウイルス由来のminimumプロモーター (TATA配列) とΩリーダー (タバコモザイクウイルス由来5'-非翻訳配列) の下流に*GUS*遺伝子あるいは各種*F3'5'H*遺伝子を繋いだ。HSP-ter: シロイヌナズナのHEAT SHOCK PROTEIN遺伝子由来のターミネーター。35S_pro: カリフラワーモザイクウイルス由来の35Sプロモーター。HYG: ハイグロマイシン耐性遺伝子。Nos-ter: アグロバクテリウム由来のノパリン合成遺伝子のterminator。RB: right border。LB: left border。Km: カナマイシン耐性遺伝子。GUS: β -glucuronidaseをコードするレポーター遺伝子。

2.3. タバコの形質転換

タバコ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR-1) の形質転換は *Agrobacterium* GV3101::pMP90 を介して、リーフディスク法によりおこなった。形質転換タバコの解析は T₀ あるいは T₁ 世代の植物を用いた。

2.4. GUS 染色

開花した花を 90% アセトンに浸し、-20°C で 1 時間冷却、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で 2 回洗浄後、GUS 染色液 {0.5 mg/mL X-Gluc, 1 mM K₃[Fe(CN)₆], 1 mM K₄[Fe(CN)₆], 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)} に浸して、37°C, 16 時間保温した。0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で 1 回洗浄後、エタノールシリーズ溶液 (50, 70, 80, 90, 95, 99.5%) で脱色後、脱イオン水で水和し、観察した。

2.5. RT-PCR による花卉での *F3' 5' H* 遺伝子の発現解析

タバコの花弁から Sepasol-RNAI SuperG (Nacalai tesque) を用いて total RNA を抽出後、DNaseI (Promega) 処理し、PrimeScript RT-PCR kit (TaKaRa) により逆転写反応した。逆転写後、ペチュニア及びトレニア *F3' 5' H* 遺伝子の発現解析には、Petunia_RT_F1 と Petunia_RT_R1 プライマー及び Torenia_RT_F1 と Torenia_RT_R1 プライマー、内在遺伝子のコントロールとして *EF1α* 遺伝子の発現解析には NtEF1α_RT_F1 と NtEF1α_RT_R1 プライマー (表 2) を用いて KOD-FX Neo (TOYOBO) により PCR 反応をおこなった。PCR 反応は、98°C 15 秒、62°C 30 秒、68°C 45 秒を 30 回繰り返した。

3. 結果

3.1. 花卉での GUS 染色

タバコでの *InMYB1_332-121b×3_TATA_Ω* プロモーターによる花卉特異的遺伝子発現を検証するために

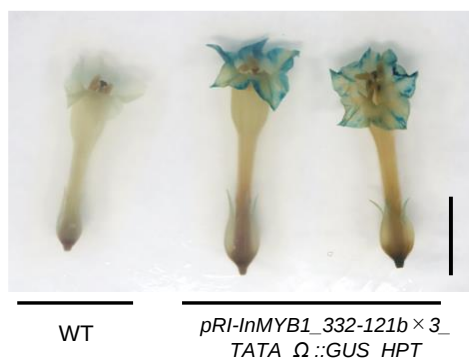


図3 花卉特異的GUS 遺伝子発現タバコでのGUS染色
InMYB1_332-121b×3 プロモーター下でGUS 遺伝子を発現させた形質転換タバコのGUS染色。花卉の周辺部でGUS染色 (青色) が確認された。WTは野生型。スケール: 10 mm

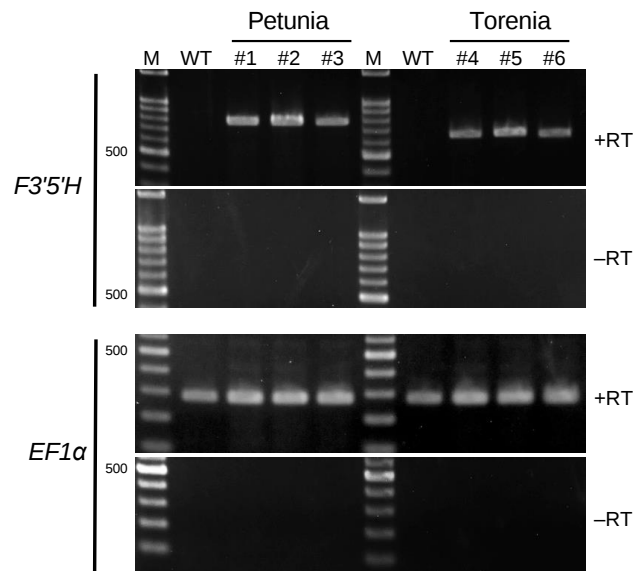


図4 花卉での *F3' 5' H* 遺伝子の発現解析

InMYB1_332-121b×3 プロモーター下で *F3' 5' H* 遺伝子を発現させた形質転換タバコの花弁での遺伝子発現解析。 *F3' 5' H* 遺伝子はペチュニア由来とトレニア由来の *F3' 5' H* 遺伝子を解析した。 *EF1α* 遺伝子は内在遺伝子でポジティブコントロールとして用いた。+RT, -RTはそれぞれ逆転写反応を実施したものと、していないものを示している。WTは野生型、それぞれ3個体の花卉からtotal RNAを抽出し、独立に発現解析した (#1-3, #4-6)。Mは100bp DNA サイズマーカーを示している。各PCR産物のサイズ ペチュニア由来の *F3' 5' H* 遺伝子: 794bp, トレニア由来の *F3' 5' H* 遺伝子: 687bp, *EF1α* 遺伝子: 287bp。

InMYB1_332-121b×3_TATA_Ω::GUS_HPT を導入した形質転換タバコを作出した。T₀ 世代の花弁を GUS 染色したところ、形質転換タバコでは、花冠 (花弁) の周辺部において青色色素の沈着が確認された (図 3)。このことは、*InMYB1_332-121b×3_TATA_Ω* プロモーターにより GUS 遺伝子がタバコ花弁で発現していることを示すものである。一方、花冠筒 (筒状部位) では染色が観察できなかった。この組織はタバコにおいても白色で色素が無い部位である。また、雌蕊、雄蕊においても染色は確認できなかった。萼の先端部でもわずかであるが染色が観察された。しかし、WT (野生型: 非形質転換体) でも同程度の染色が見られることから、ここで観察された染色は GUS 遺伝子の発現によるものではないと考えている。

3.2. 花卉での *F3' 5' H* 遺伝子発現解析

pRI-InMYB1_332-121b×3_TATA_Ω::GUS_HPT の GUS 遺伝子を *F3' 5' H* 遺伝子に置き換えた *pRI-InMYB1_332-121b×3_TATA_Ω::F3' 5' H_HPT* (図 2) を用いてタバコの形質転換をおこなった。得られた形質転換体 T₀ 世代の花弁での *F3' 5' H* 遺伝子の発現を確認するために RT-PCR 解析をおこなった (図 4)。ペチュニア由来とトレニア由来の *F3' 5' H* 遺伝子を発現させたタバコの花弁から total RNA を抽出し解析した。まず、ポジテ

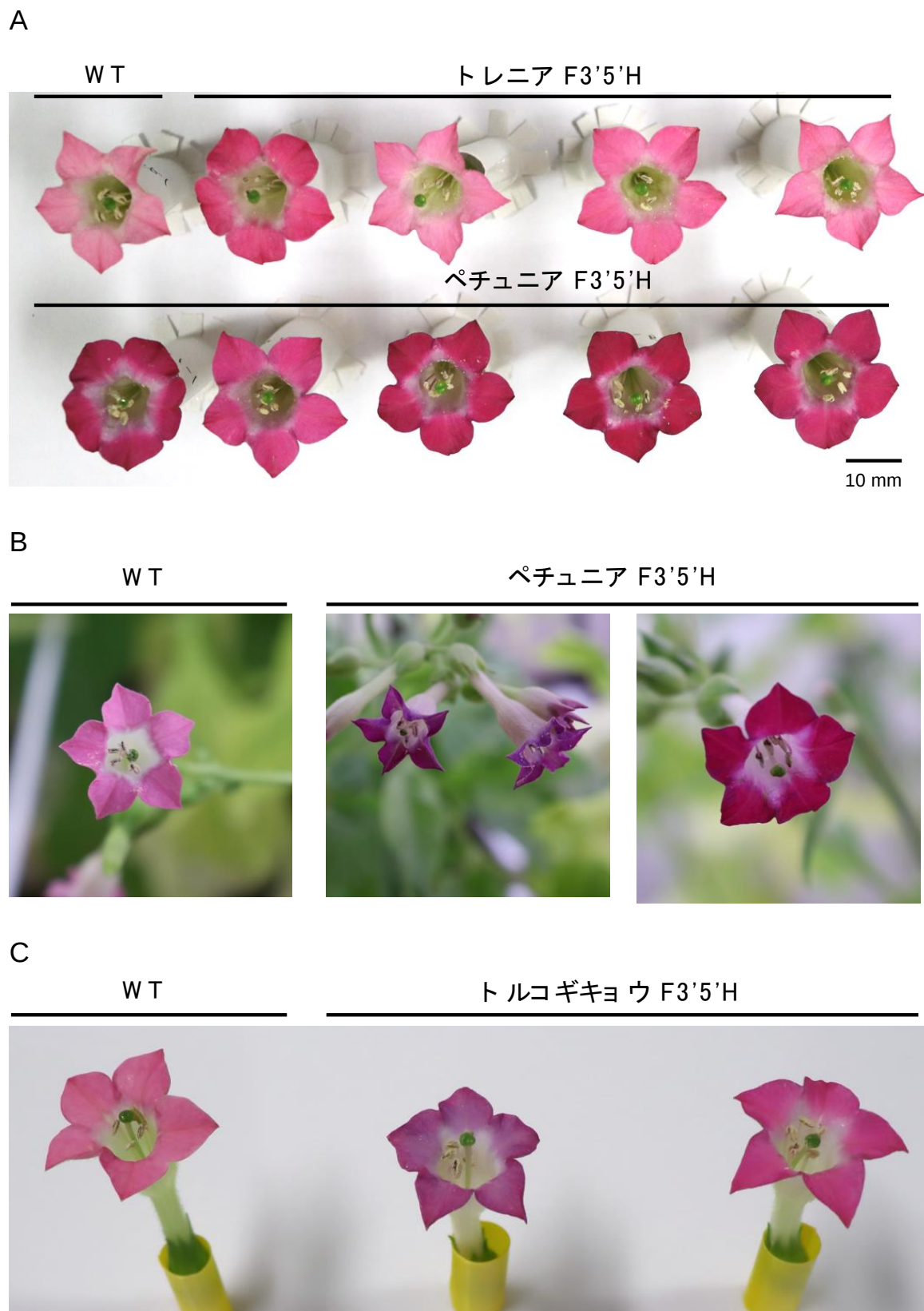


図5 *F3'5'H* 遺伝子を発現させたタバコの花弁の観察

InMYB1_332-121b×3 プロモーター下で*F3'5'H* 遺伝子を発現させた形質転換タバコの花弁の観察。*F3'5'H* 遺伝子はペチュニア由来・トレニア由来とトルコギキョウ由来の*F3'5'H* 遺伝子をそれぞれ発現させた。WTは野生型。

イブコントロールである内在遺伝子 *EF1α* 遺伝子の発現を確認したところ、逆転写反応依存的に野生型を含む全ての形質転換体において、PCR 産物予測サイズの

位置で特異的なバンドを確認した。次に、ペチュニア由来とトレニア由来それぞれの *F3'5'H* 遺伝子の発現を調べたところ、各形質転換体のみにおいて、逆転写

反応依存的かつPCR産物予測サイズの位置で特異的なバンドを確認した。このことから *InMYB1_332-121b*×3_ *TATA_Q* プロモーターによって各種由来の *F3'5'H* 遺伝子が花卉で発現していることを確認した。

3.2. 花卉の色の観察

InMYB1_332-121b×3_ *TATA_Q* プロモーターによって各種由来の *F3'5'H* 遺伝子させたタバコの花弁の色を観察した。トレニア由来の *F3'5'H* 遺伝子を発現させた花卉は、野生型との明確な違いは見いだせなかった (図 5A 上段)。しかし、系統や個体によってはわずかにピンク色が強いものも観察された (図 5A 上段)。ペチュニア由来の *F3'5'H* 遺伝子を発現させた花卉は、観察した全ての花卉で、野生型よりも赤みが強く、濃い赤紫色のような花卉が観察された (図 5A 下段)。いくつかの系統や個体では、青みが強く、青紫色の花弁も観察された (図 5B)。トルコギキョウ由来の *F3'5'H* 遺伝子を発現させた花卉は、トレニアよりも青みが少し強いが、ペチュニア程ではなく、トレニアとペチュニアの中程度のものが多く観察された (図 5C)。

4. 考察

4.1. アサガオ由来の MYB1 遺伝子プロモーターによるタバコでの花卉特異的発現

アサガオ由来の *InMYB1* 遺伝子のプロモーターによる花卉特異的発現は、*InMYB1* 遺伝子の 1 kb 領域を用いた *InMYB1_1kb::GUS* トルコギキョウとシロイヌナズナの形質転換体を用いて示された (Azuma et al., 2016)。一過的発現では、カーネーション、キクの花弁で発現するが、ユリの花弁では機能しないことが示されていた (Azuma et al., 2016)。本研究では、*InMYB1_332-121b*×3_ *TATA_Q::GUS* を導入したタバコを用いた GUS 染色解析において、タバコの花弁で発現していることを確認した (図 3)。並行して、*InMYB1_332-121b*×3_ *TATA_Q::F3'5'H* を導入したタバコを用いた RT-PCR 解析においても、タバコの花弁で発現していることを確認した。本研究では、カリラワーモザイクウイルス由来 35S プロモーターとの発現量の比較はしていないが、タバコでの花卉特異的な発現を目的とする場合、さらには、花卉以外での組織での発現を望まない場合は、35S プロモーターよりも *InMYB1_332-121b*×3 の方を利用することが良いと考えられる。

4.2. 青色花卉のタバコの作出の試みについて

本研究では、*InMYB1_332-121b*×3 プロモーターで、ペチュニア、トレニア、トルコギキョウ由来の *F3'5'H* 遺伝子を花卉特異的に発現させることで、青色花卉をもつタバコの作出を試みたが、残念ながら青色花卉を

もつタバコは作出できなかった。しかし、野生型のピンク色の花卉に比べて、青紫色の花弁を作ることではきた (図 5)。特に、ペチュニア由来の *F3'5'H* 遺伝子はタバコ花卉において、デルフィニジンの合成 (水酸基付加反応) においてある程度は機能していると推測される。一方で、トレニア由来の *F3'5'H* 遺伝子は、ペチュニア程は機能していないと考えられる。これらの違いは、少なくとも用いた *F3'5'H* 遺伝子のタバコ花卉での機能の違いを反映している。他の生物種の *F3'5'H* 遺伝子を用いることで改善が見られる可能性がある。例えば、青いキクではカンパニュラの *F3'5'H* 遺伝子を用いることで、デルフィニジン型アントシアニンの高蓄積に成功している (Noda et al., 2017)。タバコに適した *F3'5'H* 遺伝子を探すことで、青色花卉のタバコ作出に成功する可能性は十分にある。その他の方法として、さらに強力に *F3'5'H* 遺伝子を発現させることで、より青くなる可能性もある。例えば、本研究で用いた *InMYB1_332-121b*×3 プロモーターに加えて 35S プロモーターからも *F3'5'H* 遺伝子を発現させる。この際、ペチュニア由来やトルコギキョウ由来そしてカンパニュラ由来等複数の *F3'5'H* 遺伝子を同時に発現させる。なぜなら、一般的に同一の遺伝子を強力に発現させると、サイレンシングにより遺伝子発現が逆に抑制されることがある。そこで、プロモーターを変え、配列の異なる複数の生物種由来の *F3'5'H* 遺伝子を用いることで、サイレンシングを回避しつつ、*F3'5'H* 遺伝子を強力に発現させることが可能になる。*F3'5'H* 遺伝子を発現させても、花卉が青くならない理由としては他に、花卉細胞の液胞における pH、金属錯体の形成、色素の分子会合、アントシアニン間での分子会合などが考えられる。本研究では、これらに関する検証実験をおこなっていないので言及しないが、青色花卉の植物の作製は多くの人の悲願で、バラ・カーネーション・キク以外においても今後の研究成果次第で様々な植物で可能になると期待される。

本研究は、アニメに登場する青いヒガンバナを実際に自らの手で作製したいという最終目標に向けて、アサガオ由来の *InMYB1_332-121b*×3 プロモーターを採用し、タバコにおいて *F3'5'H* 遺伝子を花卉特異的に発現させる実験から開始した。残念ながら、ヒガンバナを用いた実験までには至らなかったが、本研究結果が青いヒガンバナの作製に向けて有用な知見を与えたものと位置づけられる。

5. 謝辞

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構 グロー

バルサイエンスキャンパス (GS) の支援を受けた愛媛大学グローバルサイエンスキャンパス (eGS) の下で実施された。GS は、将来グローバルに活躍しうる次世代人材育成事業で、地域で卓越した意欲・能力を有する高校生等を募集・選抜し、国際的な活動を含む高度で体系的な理数教育プログラムの開発・実施等を行うことを支援する事業である。eGS の林秀則博士、加藤晶博士には実験についての助言を頂きました。鹿児島大学の清水圭一博士にはトルコギキョウの *F3'5'H* 遺伝子断片を分与して頂きました。

引用文献

- Azuma M, Morimoto R, Hirose M, Morita Y, Hoshino A, Iida S, Oshima Y, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Shiratake K. (2016) A petal-specific *InMYB1* promoter from Japanese morning glory: a useful tool for molecular breeding of floricultural crops. *Plant Biotechnology Journal*. 14: 354–363.
- Azuma M, Oshima Y, Sakamoto S, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Otagaki S, Matsumoto S, Shiratake K. (2018) Dissecting promoter of *InMYB1* gene showing petal-specific expression. *Plant Biotechnology (Tokyo)*. 35: 243–248.
- Holton TA, Brugliera F, Lester DR, Tanaka Y, Hyland CD, Menting JG, Lu CY, Farcy E, Stevenson TW, Cornish E.C. (1993) Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature*. 366: 276–279.
- Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton TA, Karan M, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara K, Togami J, Pigeaire A, Tao GQ, Nehra NS, Lu CY, Dyson BK, Tsuda S, Ashikari T, Kusumi T, Mason JG, Tanaka Y. (2007) Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant and Cell Physiology*. 48: 1589–1600.
- Kurokawa S, Rhaman H, Yamanaka N, Ishizaki C, Islam S, Aiso T, Hirata S, Yamamoto M, Kobayashi K, Kaya H. (2021) A simple heat treatment increases SpCas9-mediated mutation efficiency in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*. 62: 1676–1686.
- Morita Y, Saitoh M, Hoshino A, Nitasaka E, Iida S. (2006) Isolation of cDNAs for *R2R3-MYB*, bHLH and WDR transcriptional regulators and identification of *c* and *ca* mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory. *Plant and Cell Physiology*. 47: 457–470.
- Noda N, Yoshioka S, Kishimoto S, Nakayama M, Douzono M, Tanaka Y, Aida R. (2017) Generation of blue chrysanthemums by anthocyanin B-ring hydroxylation and glucosylation and its coloration mechanism. *Science Advances*. 3: e1602785.
- Shimada Y, Nakano-Shimada R, Ohbayashi M, Okinaka Y, Kiyokawa S, Kikuchi Y. (1999) Expression of chimeric P450 genes encoding flavonoid-3', 5'-hydroxylase in transgenic tobacco and petunia plants. *FEBS Letters*. 461: 241–245.
- Takatori Y, Shimizu K, Ogata J, Endo H, Ishimaru K, Okamoto S, Hashimoto F. (2015) Cloning of the Flavonoid 3'-Hydroxylase gene of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. (*EgF3'H*) and complementation of an F3'H-deficient mutant of *Ipomoea nil* (L.) Roth. by heterologous expression of *EgF3'H*. *The Horticulture Journal*. 84: 131–139.
- Tanaka Y, Katsumoto Y, Brugiera F, Mason J. (2005) Genetic engineering in floriculture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 80: 1–24.
- Waliullah S, Mochizuki T, Sekine KT, Atsumi G, Ali ME, Yaeno Y, Yamaoka N, Nishiguchi M, Kobayashi K. (2014) Artificial induction of a plant virus protein in transgenic tobacco provides a synchronous system for analyzing the process of leaf chlorosis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 88: 43–51.