

令和元年5月17日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18564

研究課題名(和文)デルフィニウムの花色多様性に関する液胞内メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of the anthocyanin modification mechanism in vacuole about delphinium flower color variation

研究代表者

宮原 平 (Miyahara, Taira)

千葉大学・大学院園芸学研究科・講師

研究者番号：90720889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究結果から、まず、ピオルデルフィン合成に必須である配糖化酵素の二重欠損体を発見し、当該酵素遺伝子が一方でも正常であればピオルデルフィンの合成が進み、双方ともに欠損している場合ではピオルデルフィンの合成が起こらないことを *in vivo* および *in vitro* の両方で確認することができた。これにより当該配糖化酵素遺伝子がデルフィニウムの花における責任遺伝子であることを示した。また、液胞内共存物質の中に色を薄く見せる作用のある色調減退物質が含まれていることを発見した。さらに、デルフィニウムの花からこれまで報告例のないシアノデルフィンの前駆物質となりうる構造のアントシアニンを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は複雑な構造のアントシアニンがどのように合成されているのかを知るための一助となるものである。複雑な構造のアントシアニンは細胞内で積層構造を形成し、色合いに深みができることが知られている。また、複雑なアントシアニンは安定性が増すことも既知である。このため、アントシアニンがどのような酵素遺伝子により複雑性を増しているのかを明らかにすることは、新規花色開発や色素の食品への利用などの観点から非常に重要である。本研究により明らかになったアントシアニン修飾酵素遺伝子をマーカーとして用いることで、デルフィニウムのみならず多くのアントシアニンを合成する植物での目的に適った育種を行うことが可能となる。

研究成果の概要(英文)：I have identified the double-knockout mutant of acyl-glucose dependent anthocyanin 7-benzoyl-glucoside: glucosyltransferase (BGGT1 and 2). BGGTs produce violdelphin that is precursor of cyanodelphin in vacuole. I have confirmed only single mutant of BGGT could produce violdelphin but double mutant could not produce by enzyme analysis using crude protein extract. These results indicate BGGTs are the responsible genes for producing violdelphin in delphinium. Moreover, in this research showed co-pigmentation materials are in vacuole that decreasing flower color intensity in white-flowered delphinium. Additionally, I have identified the breeding line accumulate a novel anthocyanin molecule that might be precursor of cyanodelphin. The breeding line would be defected anthocyanin modification enzyme gene involved in producing cyanodelphin.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：アントシアニン アントシアニン修飾酵素 デルフィニウム 花色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

デルフィニウムの花の濃青色は複雑な構造のアントシアニンが蓄積していることにより、その色合いを呈している。アントシアニンが7つの糖と4つ有機酸により複雑に修飾されることにより、花色に深みが生まれている。研究開始当初までにアントシアニンの7位の糖および有機酸の修飾は液胞内環境において行われていることが示されていた。これら液胞内での修飾にはアシルグルコースを基質とした酵素反応が行われており、最も複雑な構造であるシアノデルフィンに至る合成経路が未解明の状態であった。また、一部の品種において乾燥状態になると花の色合いが変化することが知られており、液胞内に色調を変調させる物質の存在が示唆されていた。

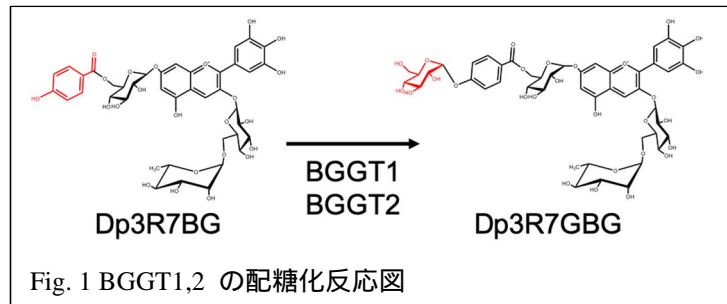
### 2. 研究の目的

本研究ではこのアントシアニン7位への修飾を行う、液胞内修飾酵素遺伝子の同定を進めることを目的とした。また、液胞内には色調変調物質の存在も示唆されていることから、液胞に蓄積している物質の変調作用についても調査を行なった。これらの結果から、デルフィニウムにおいて花色の多様性を産み出す液胞内メカニズムの解析を行った。

### 3. 研究の方法

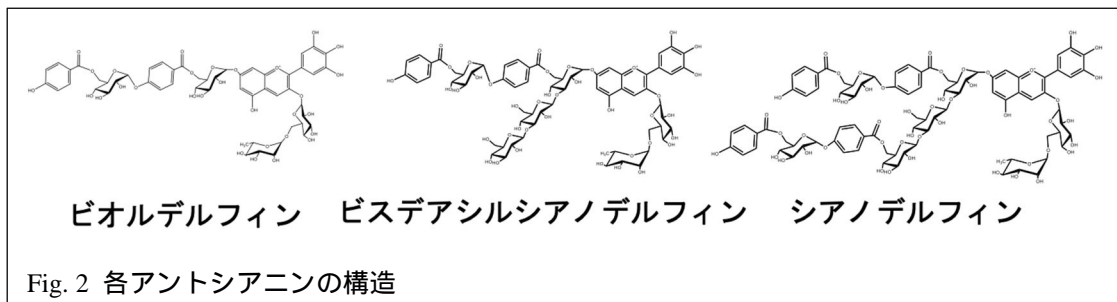
#### (1) 配糖化酵素 BGGTs に関する解析

それまでの研究から、シアノデルフィンの前駆物質と考えられるピオルデルフィンまでの酵素遺伝子は同定されていた (Fig. 1)。しかし、ピオルデルフィン合成の際の有機酸へ配糖化を行う酵素遺伝子 (BGGTs) が生体内で唯一の責任酵素遺伝子であるか未証明であった。そこで、BGGTs の二重欠損体を用いた遺伝子発現解析、遺伝子配列の確認、花からの粗酵素活性の測定、蓄積物の解析を行った。



#### (2) シアノデルフィンが合成される経路の確認

ピオルデルフィンからシアノデルフィンに至る経路の解析では、ピオルデルフィンの合成と同様にアシルグルコース依存的な酵素反応によりシアノデルフィンまでの合成が行われているのか粗酵素活性により調査を行った (Fig. 2)。特に、ピオルデルフィンに2分子のグルコースが連結した構造のビスデアシルシアノデルフィンに有機酸が結合する反応がアシルグルコース依存性か確認するために、ビスデアシルシアノデルフィンを主に蓄積する品種を探索し、酵素活性測定の際に気質として利用するために単離精製を行った。



#### (3) 色調変調物質の探索

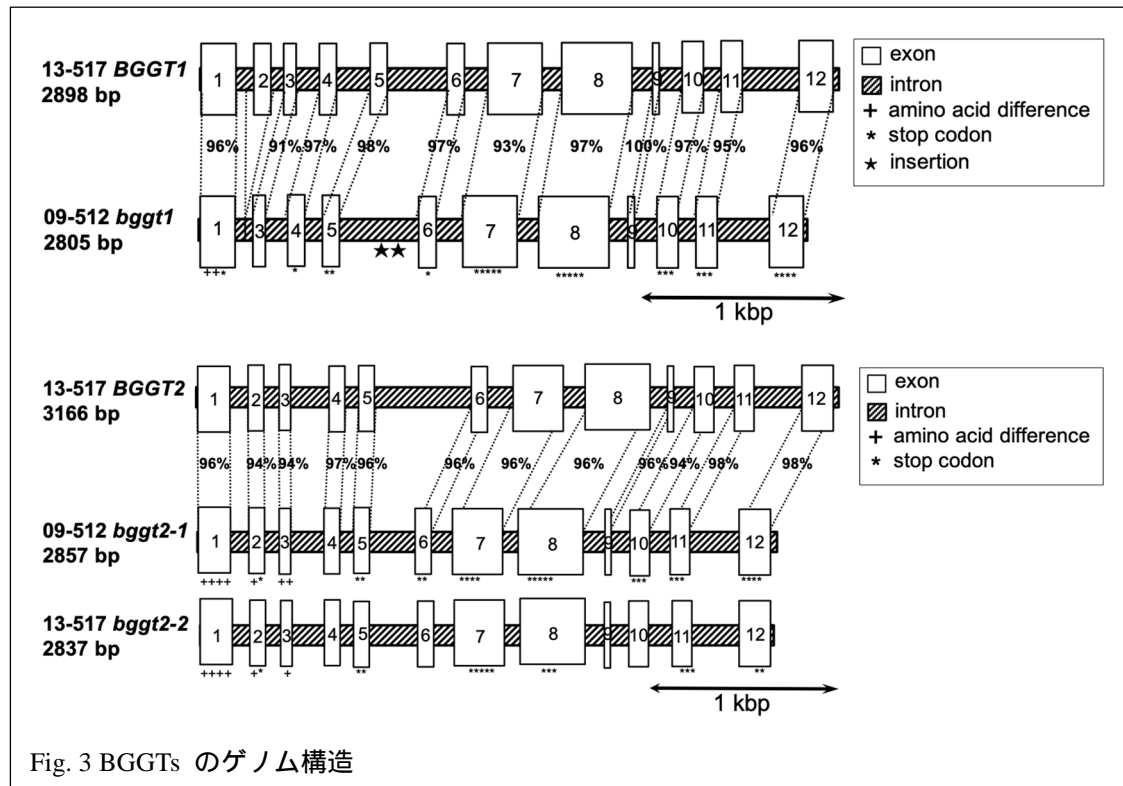
色調変調物質の調査では、アントシアニン以外の蓄積物について、乾燥状態で色変わりが起こる品種とその品種の近縁品種を比較して、蓄積量が異なる物質について調査を行った。低分子化合物として7種類の物質の蓄積量が両者間で異なっていることが、HPLCを使用した解析から示されたため、それら7種類の物質を単離生成し、MSにより分子量を決定した。また、単離した物質を生体内の濃度と同じ比率になるようにアントシアニンと混合し、その吸光度に影響を与えるか調査した。

### 4. 研究成果

#### (1) 配糖化酵素 BGGTs に関する解析

様々な品種の色素解析から、育種系統 09-512 において BGGT1,2 の両方の遺伝子が欠損してい

ることを突き止めた。09-512 では蓄積しているアントシアニンが Dp3R7BG であり、遺伝子配列の解析からはどちらの遺伝子もエキソンの途中にストップコドンが存在することが示された (Fig. 3)。



BGGTs が正常な 13-517 ではピオルデルフィンが蓄積していることが確認された。また、遺伝子発現解析や花からの粗酵素活性の測定においても 09-512 では遺伝子発現および酵素活性を検出することができないことが確認された。他の品種において BGGT1 のみ欠損している品種も確認されたが、そちらではピオルデルフィンを蓄積していた。この結果より、デルフィニウムにおいて BGGT1,2 が Dp3R7BG にグルコースを転移して Dp3R7GBG とする反応の責任遺伝子であることが示された (詳細に関しては発表論文を参照: Ishii et al., 2017)。

### (2) シアノデルフィンが合成される経路の確認

まずピオルデルフィンに二分子のグルコースが連結したビスデアシルシアノデルフィンを基質として使用するために単離精製を行った。ビスデアシルシアノデルフィンをアクセプター基質、アシルグルコースをドナー基質としてシアノデルフィンを蓄積する品種の粗酵素液を使用して酵素反応の検出を試みた結果、新規の生成物は確認することができなかった。これまでの研究から液胞内環境におけるアシル基転移反応は SCPL 様アシル基転移酵素により触媒されていると考えられている。今回の結果からは、ピオルデルフィン合成の際に機能する SCPL2 とは異なる酵素遺伝子がシアノデルフィン合成には作用していること、またアシルグルコース以外のドナー基質が使用されていることが考えられた。同様に、Dp3R7G をアクセプター基質としてアシルグルコースで反応を行なった場合でも、ピオルデルフィンまでの合成しか行われないことが確認された。ドナーとして pHBG の p 位のヒドロキシ基にグルコースが結合した pGBG をドナーとして反応した場合には、SCPL2 により pGB が 1 ユニットごと転移してピオルデルフィンまで合成されることが確認されている。この結果より、ピオルデルフィンまでの構造は pHBG がドナーとして合成が進み、ビスデアシルシアノデルフィン以降のシアノデルフィンに至る経路では pHBG とは異なる構造のアシルグルコースがドナーとして作用することが示唆された。

また、この解析の際に様々なアクセプター基質を単離精製したところ、これまでに報告例のないアントシアニンの構造を蓄積している品種を発見した。その構造はビスデアシルシアノデルフィンからシアノデルフィンに至る経路の途中の構造であると推察されることから、現在は、その構造解析を進めている。構造が確定したのちには、その品種の酵素遺伝子を調べることでシアノデルフィンの合成に関与する酵素遺伝子の同定に繋がると考えている。

### (3) 色調変調物質の探索

色調変調物質の探索として、切り花から乾燥状態になると花の色が青くなる品種とシアノデルフィンを蓄積している品種をサンプルに実験を行なった。花色変調品種は通常白い花を咲かせるが、サンプリング後乾燥させるか、液体窒素で瞬間凍結することで青く変色する (Fig. 4)。一方のシアノデルフィンを蓄積している品種はどの状態においても濃青色のままである。これよ

り、花色変調品種では状態が変化する際にアントシアニン構造が変化して花色に影響を与えていると考えられる。他の植物種の研究報告では、アントシアニンと共存するコピグメント物質により、花色の濃淡が変化することが示されており、また、デルフィニウムではコピグメント物質の解析はされていないため、本研究ではコピグメント物質の調査を行った。

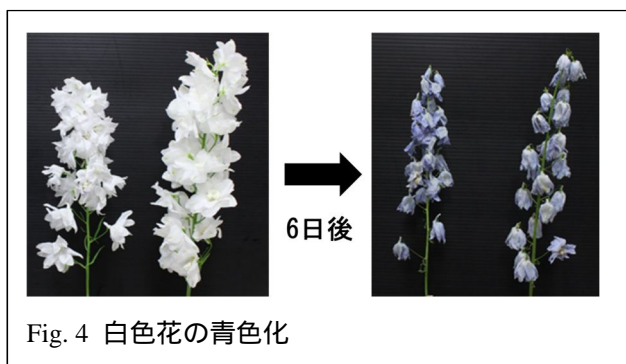


Fig. 4 白色花の青色化

花色変調品種では色調減退物質が存在しており、状態が変化することで色調減退物質の構造が変化し青色化していると仮定して、恒常的な青色花の品種とアントシアニン以外の物質の比較解析を行った。その結果、低分子化合物では 7 種類の物質の蓄積量が異なっていた (Fig. 5)。

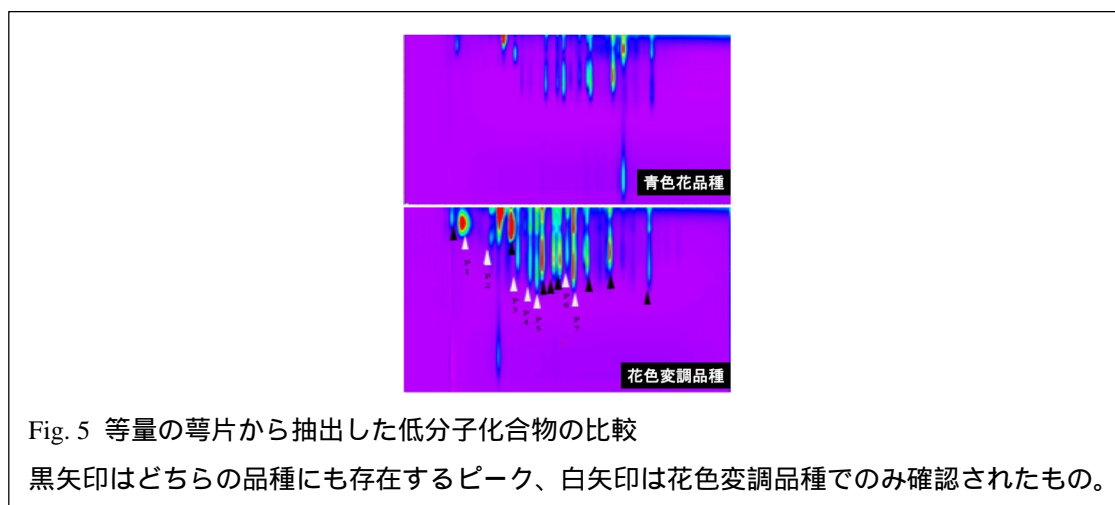


Fig. 5 等量の萼片から抽出した低分子化合物の比較

黒矢印はどちらの品種にも存在するピーク、白矢印は花色変調品種でのみ確認されたもの。

確認された 7 種類の低分子化合物について単離精製を行い、分子量を測定した。その結果、Fig. 6 の左から溶出時間の早い順に P1: 462、P2: 505、P3: 294、P4: 491、P5: 429、P6: 607、P7: 450 と測定された。さらに単離した物質を植物内のアントシアニンとの濃度が等しくなるように混合し吸光度を測定した。その結果、P6 の物質とアントシアニンを混合した際にアントシアニンの吸光度が低下することが観察された (Fig. 6)。

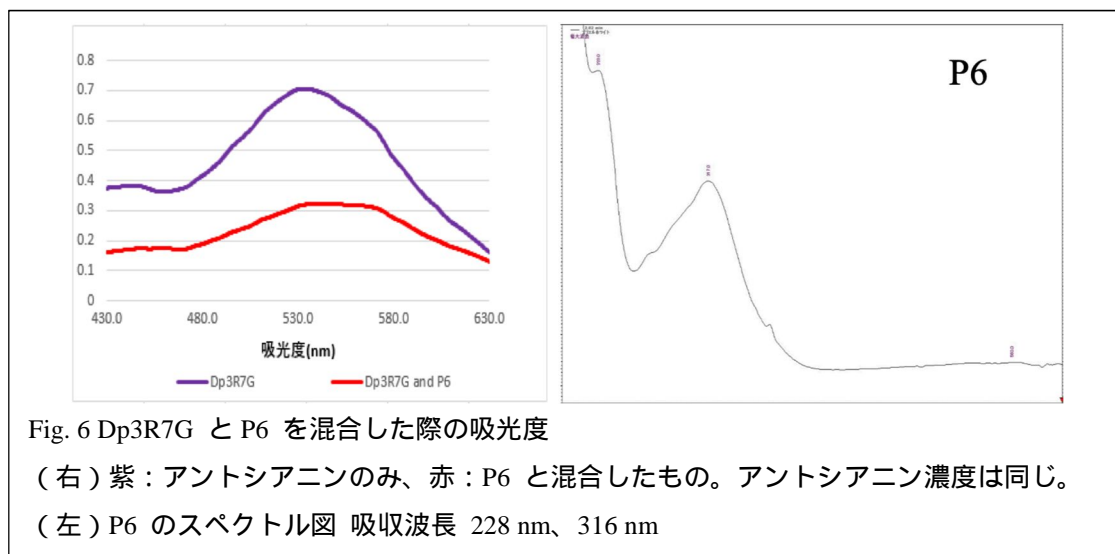


Fig. 6 Dp3R7G と P6 を混合した際の吸光度

(右) 紫：アントシアニンのみ、赤：P6 と混合したもの。アントシアニン濃度は同じ。

(左) P6 のスペクトル図 吸収波長 228 nm、316 nm

低分子化合物とアントシアニンの混合試験では、P6 においてアントシアニンの吸光が減少することが示された。一方で、P2, 4, 5 ではアントシアニンと混合した際にアントシアニンの吸光が増加することが確認された。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Ishii Izumi, Sakaguchi Kimitoshi, Fujita Kazuyoshi, Ozeki Yoshihiro, Miyahara Taira, A double knockout mutant of acyl-glucose-dependent anthocyanin glucosyltransferase genes in *Delphinium grandiflorum*. Journal of Plant Physiology, 査読有、216 巻、2017、74-78、DOI: 10.1016/j.jplph.2017.05.009

### 〔学会発表〕(計4件)

宮原平、坂口公敏、磯部知里、藤田和義、小関良宏、シアニジンを蓄積するデルフィニウムの育種、日本植物細胞分子生物学会、2018 年

國井竜太、宮原平、小関良宏、黄色オシロイバナにおけるチロシン水産科酵素遺伝子の同定、日本植物生理学会、2018 年

田村浩太郎、宮原平、小関良宏、ニンジンにおけるアントシアニン合成・修飾酵素遺伝子の探索、日本食品化学学会、2017 年

石井いずみ、西崎雄三、宮原平、坂口公敏、八木聡明、小関良宏、デルフィニウムにおける AA7BG-GT1/AA7BG-GT2 遺伝子変異体の解析、日本植物細胞分子生物学会、2016 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。