

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14455

研究課題名(和文)鮮黄色フラボノイドであるブテイン生合成機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of yellow flavonoid butein biosynthesis pathway

研究代表者

大野 翔(Ohno, Sho)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：10722001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ブテインはカルコンの一種でフラボノイド系色素としては珍しく鮮黄色を呈するが、生合成に関わる遺伝子は長く不明であった。本研究ではブテインを花弁に蓄積するダリア‘祝盃’とブテインを花弁に蓄積しない枝変わり‘凜華’を供試して、ブテイン生合成の決定因子であるカルコンレダクターゼ(CHR)遺伝子を探索した。塩基配列解析、遺伝子発現解析、タバコにおける遺伝子組み換え実験からアルドケトレダクターゼ13ファミリーに属するc25599\_g2\_i1がCHRであることが示唆された。また、ブテインの配糖化に関わる候補遺伝子の過剰発現体の作出とダリアの黄色花の濃淡の決定要因の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フラボノイドのみを花に蓄積する植物種は黄色花の品種がないことが多いため、本研究で得られたブテインの生合成および蓄積に関して得られた知見は、ダリアにおける黄色花品種の開発だけではなく、様々な植物種におけるブテインによる黄色花の分子育種に大きく貢献すると考えられる。また、ダリアのCHRが既存のマメ科のCHRと異なる遺伝子であったということは、それぞれのCHRが進化的に異なる過程で獲得されてきたことを意味しており、植物における二次代謝産物生合成の進化の理解の一助となる。

研究成果の概要(英文)：Butein (2',3,4,4'-tetrahydroxychalcone) is one of chalcones and confers bright yellow color, which is rare for flavonoid pigments. However, the genes involved in biosynthesis are remained unidentified. In this study, we investigated the chalcone reductase (CHR) gene, which is a determinant gene of butein biosynthesis in dahlia, using ‘Shukuhai’, which accumulates butein in petals, and its lateral mutant ‘Rinka’ which does not accumulate butein in petals. Sequencing analysis, gene expression analysis, and production of overexpression tobacco plants and agroinfiltration analysis suggested that c25599\_g2\_i1 belonging to the aldo-keto reductase 13 family functions as CHR in dahlia. We also created overexpression lines of candidate glucosyltransferase genes involved in glycosylation of chalcones and analyzed the determinant factor of the intensity of yellow flowers in dahlia.

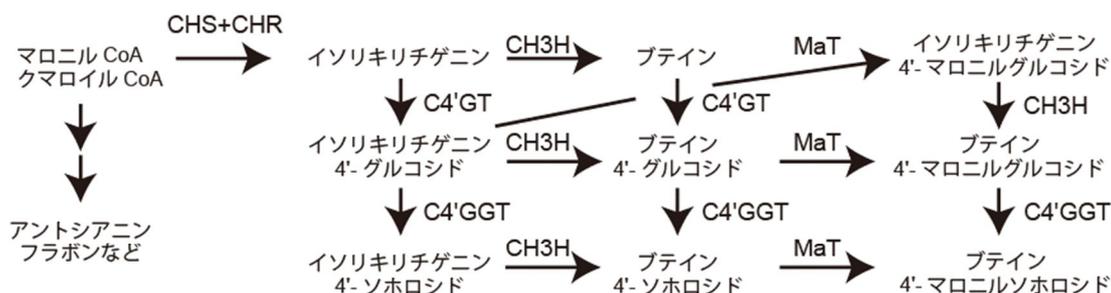
研究分野：園芸科学

キーワード：ブテイン イソリキリチゲニン カルコンレダクターゼ グルコシルトランスフェラーゼ ダリア 花色 黄色花 分子育種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブテインはキク科の一部とマメ科の一部の植物が生合成するカルコンの一種で、フラボノイド系色素としては珍しく鮮黄色を呈する。生合成経路は長く未解明のままであったが、先行研究 (Schlangen ら, 2010) などから、まず基質がイソリキリチゲニンに変換され、その後イソリキリチゲニンからブテインが合成されると推定された (Ohno ら, 2011: 第 1 図)。ブテイン生合成の特徴は、他の主要なフラボノイドと異なりカルコン合成酵素 (CHS) だけでなくカルコンレダクターゼ (CHR) が必要なことで、ブテイン蓄積とイソリキリチゲニン蓄積は必ず連動することから、イソリキリチゲニンの合成に関わる CHR がブテイン生合成の決定因子であると考えられた。また、ダリア‘祝盃’花卉の NMR 解析から、最終産物はブテイン 4'-マロニルソホロシドであることを確認したが、カルコン 3-水酸化酵素 (CH3H: Schlangen ら, 2010) を除く遺伝子の解析は全く行われておらず、『どのような遺伝子がブテイン生合成に関与しているのか』は長く不明なままであった。



第 1 図 ダリアにおいて推定されるブテイン生合成経路

CHR: カルコンレダクターゼ                      CHS: カルコン合成酵素  
 CH3H: カルコン 3-水酸化酵素      MaT: マロニルトランスフェラーゼ  
 C4'GT: カルコン 4'-グルコシルトランスフェラーゼ  
 C4'GGT: カルコン 4'-グルコシドグルコシルトランスフェラーゼ

ブテイン生合成経路の解明に向けて、申請者は研究に好適な材料を探索した結果、ダリア (*Dahlia variabilis*) ‘凜華’ (花色: 紫)・‘祝舟’ (濃赤)・‘祝盃’ (赤)・‘神秘の輝き’ (橙)・‘祝宝’ (黄) の枝変わり品種群を見出した。色素を調査すると、‘祝盃’ (赤) → ‘祝舟’ (濃赤) → ‘凜華’ (紫) の順に段階的に花卉のイソリキリチゲニン・ブテイン蓄積量が減少し、‘凜華’ではイソリキリチゲニン・ブテインを完全に喪失していた (山田ら, 平成 29 年度園芸学会春季大会)。よって、‘祝盃’から‘凜華’への枝変わりではイソリキリチゲニン生合成に段階的に変異を生じており、‘凜華’では完全に欠損していると考えられた。遺伝背景がほぼ同一であるこれらの品種と、申請者がこれまでにダリアで蓄積したフラボノイド生合成経路遺伝子の知見とを組み合わせることでブテイン生合成に関わる遺伝子を特定できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、将来的な黄色花品種の分子育種を目標に、ブテイン生合成に関わる CHR を特定するとともに、ブテインの最終産物 (ブテイン 4'-マロニルソホロシド) の生合成に関わる遺伝子を特定することも目的とする。具体的には以下の 3 つである。

- (1) ブテイン生合成に関わる CHR の単離・同定
- (2) ブテインの配糖化に関わるカルコン 4'-グルコシルトランスフェラーゼ (4'CGT) の単離
- (3) ダリアの黄色花品種における濃淡の決定要因の解明

### 3. 研究の方法

#### (1) *c25599\_g2\_il* の機能解析

‘凜華’（紫）と‘祝盃’（赤）の RNA-seq による発現比較解析から、‘凜華’と比較して‘祝盃’で高発現している遺伝子を探索したところ、発現上位 1000 遺伝子の中では *c25599\_g2\_il* だけが該当した。そこで、*c25599\_g2\_il* の mRNA 配列の決定、ゲノム配列の決定、品種間における発現解析、タバコにおける過剰発現体の作出を行った。

#### (2) プテイン生合成経路の 4'-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子の単離

ダリアにおけるプテインの最終産物は 4'-マロニルソホロシドだが、コレオプシスではプテインはプテイン 4'-グルコシド（コレオプシン）として蓄積している（Geissman, 1941）。したがって、プテインを利用した黄色花の分子育種に必要な最低限の構造はプテイン 4'-グルコシドであると考えられる。プテイン 4'-グルコシドの生合成のためには CHS, CHR, CH3H の他に 4'CGT が必要である。これまでにプテイン生合成経路の 4'-グルコシルトランスフェラーゼは同定されていないが、キンギョソウではオーロンの生合成に関わる *Am4'CGT* が単離されていたため（Onoら, 2006）, *Am4'CGT* との系統関係からプテインあるいはイソリキリチゲニンの 4'配糖化に関わると考えられるグルコシルトランスフェラーゼを探索し、タバコにおける過剰発現形質転換体を作成した。

#### (3) 黄色品種における色素の組成・量と濃淡の関係性の調査

ダリアの黄色品種には黄色の濃淡が異なる品種群があるが、その濃淡の決定因子は明らかではない。将来的なプテインによる分子育種においても重要な知見であるため、ダリアの黄色花 9 品種を供試して、黄色の濃淡を決定する因子の解析を行った。

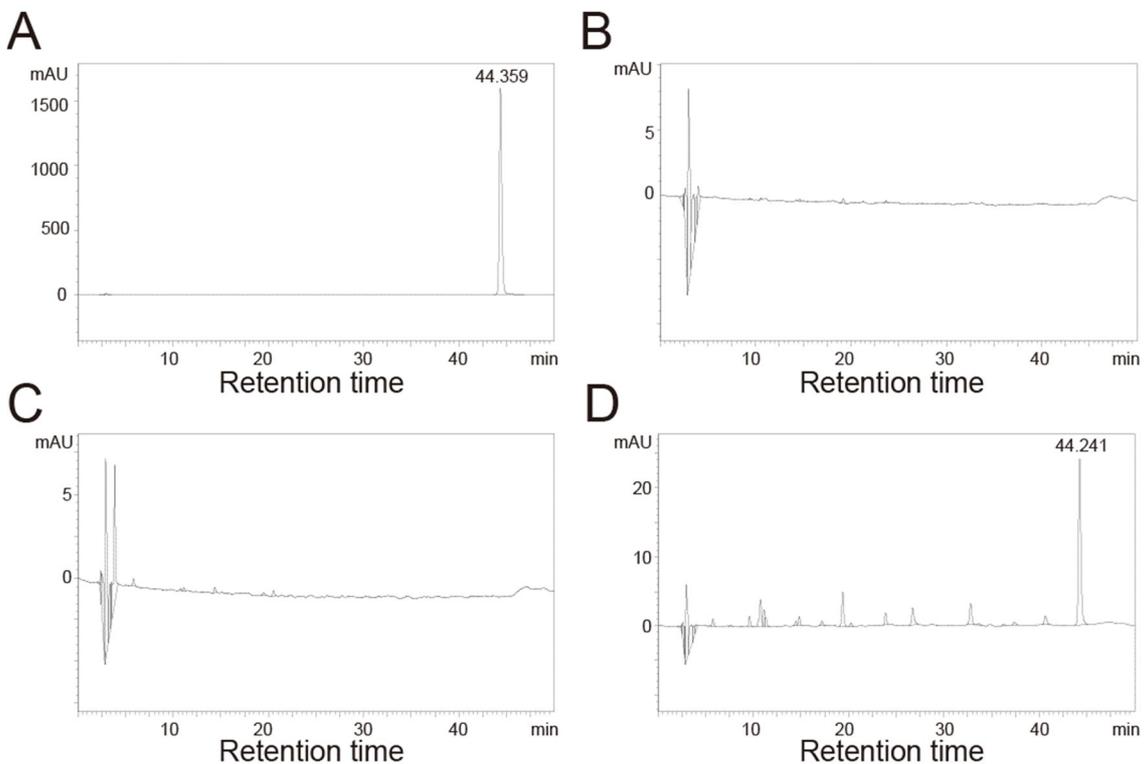
### 4. 研究成果

#### (1) *c25599\_g2\_il* の機能解析

‘祝盃’および‘凜華’で発現している *c25599\_g2\_il* の配列を調査したところ、4 種類の配列が得られた。そのうちの 2 種類の配列（Type1 および Type2）が多く発現しており、Type3 は欠損配列があり、不完全なアミノ酸をコードしていた。プテインを蓄積する赤および黄品種では花弁において *c25599\_g2\_il* の発現が確認されたのに対し、プテインを蓄積しない黒および白品種では *c25599\_g2\_il* の発現は低くなっていた。ダリアに近縁なキク科植物に関して *c25599\_g2\_il* のヘテロプローブノーザンプロットにより発現を調査したところ、花弁にプテインまたはオーロンを蓄積する種ではバンドが検出されたのに対し、花弁にカロテノイドを蓄積する種ではバンドが検出されなかった。以上より、*c25599\_g2\_il* の発現とプテインの蓄積に相関がみられたことから、*c25599\_g2\_il* がダリアにおける CHR であることが示唆された。

マメ科の CHR はアルドケトレダクターゼ（AKR）4A ファミリーに属するが（Jezら, 1997）, *c25599\_g2\_il* は系統的に遠い AKR13 ファミリーに属していた。また、マメ科の CHR は 3 エキソン 2 イントロンのゲノム構造であるのに対し、*c25599\_g2\_il* は 5 エキソン 4 イントロンのゲノム構造であった。よって、ダリアの CHR は既知のマメ科の CHR とは全く異なる遺伝子であると考えられたため、タバコにおいて過剰発現体を作成し、機能を調査した。

タバコ (*Nicotiana tabacum*) において *c25599\_g2\_i1* (Type1 あるいは Type2) の過剰発現体を作出したが、葉あるいは花においてイソリキリチゲニンの蓄積は確認できなかった (第2図C)。しかし、CHR の機能を持つことが証明されている *GmCHR5* あるいは *GmCHR6* の過剰発現体においても葉あるいは花においてイソリキリチゲニンの蓄積は確認できなかったことから、タバコにおいて CHR 単独の過剰発現ではイソリキリチゲニンを蓄積させることができないと考えられた。 *DvCHS2* あるいは *DvCH3H* の過剰発現体も作出し、交雑により複数の遺伝子を過剰発現する形質転換体も作出したが、イソリキリチゲニンの蓄積は確認できなかった。そこで、配糖化とフラボノイド合成能の強化を考慮して、*Am4'CGT* および *CaMYBA* (トウガラシのアントシアニン合成を制御する MYB 転写因子) とともに、*c25599\_g2\_i1*、*GmCHR5* あるいは *GmCHR6* を *N. benthamiana* においてアグロインフィルトレーションにより過剰発現させたところ、葉においてイソリキリチゲニンの蓄積が確認された (第2図D)。よって、*c25599\_g2\_i1* がダリアの CHR であることが示唆された。また、その後の実験によって *Am4'CGT* はイソリキリチゲニン蓄積に必須ではないことが示唆されたため、*CaMYBA* の制御下にある遺伝子がタバコにおけるイソリキリチゲニン蓄積に重要であることが示唆された。



第2図 HPLC クロマトグラム (380nm)

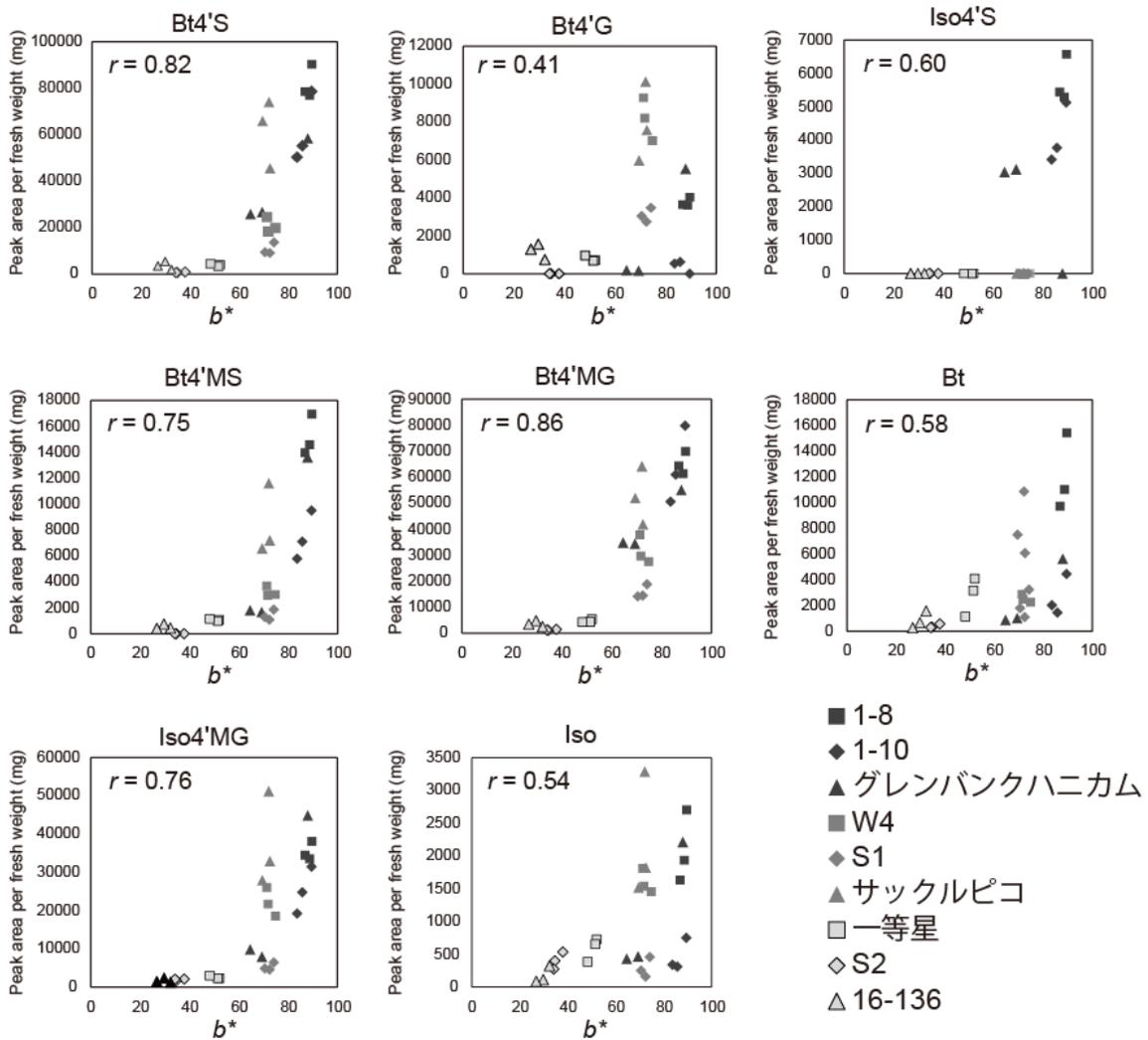
A: イソリキリチゲニン (標品) B: *GUS* コントロールベクターを一過的に過剰発現させた *N. benthamiana* の葉 C: *c25599\_g2\_i1* を過剰発現させた *N. tabacum* の花 D: *c25599\_g2\_i1*, *Am4'CGT*, *CaMYBA* を同時に一過的に過剰発現させた *N. benthamiana* の葉

## (2) プテイン生合成経路の 4'-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子の単離

‘凜華’および‘祝盃’の花弁の RNA-seq データより、*Am4'CGT* と相溶性が高い配列として *c34671\_g1\_i1* と *c35662\_g1\_i1* が得られた。これらは共に UGT88 ファミリーに属していた。*Am4'CGT*、*c34671\_g1\_i1* および *c35662\_g1\_i1* それぞれについてタバコにおける過剰発現システムを作出したので、今後イソリキリチゲニンを生合成する系統との交雑により配糖化の変化を調査する予定である。

(3) 黄色品種における色素の組成・量と濃淡の関係性の調査

黄色の濃淡が異なる 9 品種を供試して、舌状花卉の黄色の程度の指標となる  $b^*$  値と「祝盃」において同定したカルコンのピーク面積との相関関係を調査した。濃淡が異なる品種間で主要なピークの有無に違いはなく、ブテイン 4'-マロニルグルコシド、ブテイン 4'-ソホロシドおよびイソリキリチゲニン 4'-マロニルグルコシドの量に大きな差があった。舌状花卉の  $b^*$  値とピーク面積の相関係数を調査すると、蓄積が多かったこれら 3 種の化合物が上位 3 位となった{ブテイン 4'-マロニルグルコシド ( $r=0.86$ )、ブテイン 4'-ソホロシド ( $r=0.82$ ) およびイソリキリチゲニン 4'-マロニルグルコシド ( $r=0.76$ )}(第 3 図)。これらの結果から、これら 3 種のカルコンの蓄積量がダリアの舌状花卉の黄色の濃淡に寄与していると考えられた。



第 3 図 花卉  $b^*$  値と生鮮重 (mg) 当たりのピーク面積の相関解析。1 つのプロットが 1 枚の花弁の値を示す。Bt4'S, ブテイン 4'-ソホロシド; Bt4'G, ブテイン 4'-グルコシド; Iso4'S, イソリキリチゲニン 4'-ソホロシド; Bt4'MS, ブテイン 4'-マロニルソホロシド; Bt4'MG, ブテイン 4'-マロニルグルコシド; Bt, ブテイン; Iso4'MG, イソリキリチゲニン 4'-マロニルグルコシド; Iso, イソリキリチゲニン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohno S, Yokota M, Yamada H, Tatsuzawa F, Doi M	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of chalcones and their contribution to yellow coloration in Dahlia ( <i>Dahlia variabilis</i> ) ray florets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yamada H, Deguchi A, Hosokawa M, Tatsuzawa F, Doi M, Ohno S
2. 発表標題 A candidate gene of chalcone reductase in butein biosynthesis in dahlia
3. 学会等名 29th International Conference on Polyphenols (ICP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Maruyama K, Yamada H, Yokota M, Deguchi A, Hosokawa M, Tatsuzawa F, Doi M, Ohno S
2. 発表標題 Overexpression of dahlia chalcone reductase candidate gene in tobacco
3. 学会等名 30th International Conference on Polyphenols (ICP2020) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------