

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14462

研究課題名（和文）花卉のアントシアニン着色を制御する光応答経路の解明

研究課題名（英文）Research of the molecular mechanism of light-induced anthocyanin pigmentation in petal

研究代表者

田崎 啓介（TASAKI, Keisuke）

東京農業大学・農学部・助教

研究者番号：80733419

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、花卉着色の光誘導における分子機構の解明を目的に、我が国の主要切り花品目の一つであるリンドウを用いて、白色光による明条件、暗条件、そしてLED光源を用いた波長域別の光処理実験を行った。光処理した花卉サンプルのRNA-seq解析から、光に応答して着色を促す候補遺伝子を選抜し、それら遺伝子についてリンドウのゲノム編集個体を作成することで機能解析を行った。その結果、候補遺伝子の一つであるGST1は花卉において光に応答して発現し、生合成されたアントシアニンの液胞輸送に関与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、これまで情報の乏しかった花卉の光応答着色の機構を理解するための知見拡充に貢献するものである。応用面においては、鮮やかな濃青色を魅力とするリンドウの品質向上を目的とした技術開発や、LEDの活用が進む露地、ハウス、温室、あるいは植物工場など様々な環境で生産される園芸作物（花卉・野菜・果樹）の品質向上に向けた光を介した技術開発の基礎情報として活用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, to elucidate the molecular mechanism of light-induced anthocyanin pigmentation in petal, light-treatment experiments using white light and different wavelength ranges using LED light, were conducted using gentian, one of the major cut flowers in Japan. From the results of RNA-seq analysis using light-treated gentian petal samples, candidate genes that promote coloration in response to light were selected, and their functions were analyzed by genome editing. The results showed that one of the candidate genes, GST1, was expressed in petals in response to light and functioned in the accumulation of anthocyanins in vacuoles.

研究分野：園芸科学

キーワード：アントシアニン ゲノム編集 GST LED リンドウ

## 1. 研究開始当初の背景

フラボノイドの一種であるアントシアニンは、植物において茎や葉におけるストレスに対する防御や花粉・種子運搬者への視覚シグナルとして機能している。フラボノイド生合成経路をポジティブに制御する MYB、そしてその MYB をポジティブに制御する HY5 は、暗条件下ではユビキチン E3 リガーゼである COP1 により分解のターゲットになっているが、可視光や UV-B などが照射されると光受容体が COP1 を阻害し、アントシアニン蓄積が促進される (Maier et al, 2013 the Plant journal 74:638-651)。リンゴなどの果樹類 (Li et al, 2012 Plant Physiology 160: 1011-1022) でも類似した制御機構が報告されているが、一方で花き類の報告はほとんどない。申請者はエゾリンドウ (*Gentiana triflora*) の切り花を用いた実験から、花弁のアントシアニン着色における光の重要性を明らかにしている (図 1)。この花弁サンプルを用いた RNA-seq 解析では、果皮の報告と同様に、暗条件下においてフラボノイド生合成関連遺伝子、カルコン合成酵素 (*GtCHS*)、カルコン異性化酵素 (*GtCHI*)、フラバノン 3 ヒドロキシラーゼ (*GtF3H*) の発現減少が認められた。リンドウでは、転写因子の *GtMYBP3* が *GtCHS* などのフラボン生合成遺伝子の発現を、*GtMYB3* が *GtDFR* などのアントシアニン生合成遺伝子の発現をポジティブに制御することを報告しているが、両因子の顕著な光応答は認められなかった。そこで光応答する転写因子を探索するために、構造遺伝子と転写因子の発現について相関解析を行なったところ、*GtF3H* と正の相関を示す 1 種類の R1-MYB と、*GtCHS* と負の相関を示す 2 種類の R2R3-MYB (*MYBx1*、*MYBx2*) を選抜した。いずれの MYB も機能は不明だが、アントシアニン着色に働く MYB に共通のモチーフが認められた。2 つの MYB は暗処理区で発現上昇し、*GtMYBx1* はリプレッサードメイン EAR 様モチーフを有していたことから、後者 2 つの MYB は暗条件下で発現して着色の抑制に機能していると考えられた。このことから、リンドウにはリンゴなどの果皮と同様に既知の COP1 と HY5 を介した「第一光応答経路」のほかに、暗条件下で積極的にアントシアニン蓄積を抑制する「第二光応答経路」の存在が予想された。しかし、着色を制御する転写因子は MYB 以外にも bHLH などを含めて検討する必要がある。また、転写因子より下流の生合成関連遺伝子についても詳細に解析を行うことで、全体的な解析から光応答着色の関連因子を選抜していく必要がある。



第1図. リンドウのつぼみへの光処理実験。花の発達ステージS2~S3期の光環境が着色レベルを決定する。  
Bar=1cm

## 2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集など各種解析技術が充実したリンドウの花弁を用いて、フラボノイド生合成経路の上流で見出された COP1 を介すると予想される「第一光応答経路」と、COP1 を介さない、あるいは暗黒下で積極的に着色抑制に働く「第二光応答経路」を検証することを目的に、詳細な光処理実験を行った。本研究はこれまで詳細に解析されてこなかった花弁における光応答着色の制御経路の解明を最終目標としている。

## 3. 研究の方法

光を介した花弁着色における第一および第二光応答の予想経路に働く候補遺伝子を選抜するために、(1)リンドウ花弁への光処理実験を行い、それらのサンプルを用いて(2)RNA-seq 解析を実施した。そして、(3)選抜した候補因子についてゲノム編集による機能解析を行った。

### (1) リンドウへの LED 照射実験

着色に寄与する限定的な光波長域の照射により RNA-seq 解析による光応答着色の関連因子選抜のバイアスを削減するために、本実験ではエゾリンドウ系統の切り花に波長域の異なる LED 光源を用いた光照射処理を行った。光照射区は白色光 (赤色光 [660 nm]・青色光 [445 nm]・緑色 [518 nm] LED 素子の混合光源による明条件と無照射の暗条件、そして青色光 [445nm]、緑色 [518 nm]、赤色光 [660nm] LED による単波長の条件を設け、それぞれ  $90\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  で照射した。処理時間は 16 時間照射/8 時間無照射とした。リンドウの切り花は 1 節 2 花に調整し、蒸留水を含むバイアル瓶に挿したものをを用いた。花の発達ステージ S2 (着色開始期) から光処理を開始し、S3 (着色完了した未開花の蕾) 花弁をサンプリングした。

### (2) RNA-seq 解析

光処理したリンドウの花弁サンプルは RNA 抽出を行い、Illumina 社 NextSeq および BGI 社 DNBSEQ-G400 を用いたシークエンスによりリード情報を収集した。全てのリードはフィルタリング後、de novo assembly で作成したエゾリンドウの fasta ファイルをリファレンスとして、RSEM および TMM による発現プロファイル作成に用いた。これを用いて光応答着色の候補遺伝子の発現パターンを調査した。また過去に得られた RNA-seq データの再解析も合わせて行い、光応答着色に寄与する候補因子の選抜を行った。

### (3) リンドウにおける選抜遺伝子のゲノム編集

RNA-seq データから選抜した 2 種類の bHLH (bHLHa, bHLHb) と、アントシアニン輸送への関与が予想されるグルタチオン S-トランスフェラーゼ(Phi class GST1)遺伝子の機能を調べるために CRISPR/Cas9 システムによるリンドウのゲノム編集を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) リンドウへの光処理実験

花卉の着色レベルは分光測色計で測定した L\*値を指標とした。LED による光照射の結果、白色光および青色光はもっとも着色に寄与することが明らかとなった。しかし波長域により未着色となるような極端な差はなく、緑色光および赤色光においても着色は認められた。予備実験においてブルーベリーの果皮、リンゴの果皮、およびカブの背軸におけるこれら 3 色の LED 照射による着色を調べたところ、いずれもリンドウと同様に青色光で強く着色したが、緑色光および赤色光で着色はほとんど認められなかった。以上の結果から、リンドウ花卉の光応答着色は他の植物組織と異なり、青色光だけでなく他の波長域もまた着色に寄与することが明らかとなった。

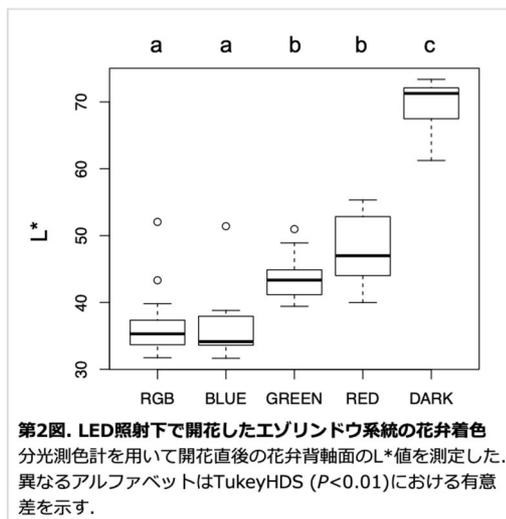
##### (2) RNA-seq 解析

白色光、青色光、および赤色光を照射したリンドウ花卉サンプルの RNA-seq データから発現プロファイル (RNA-seq) を作成した。また、過去に実施した光処理サンプルの RNA-seq データから作成した発現プロファイル (RNA-seq) の再解析と合わせて着色に寄与する光応答因子の選抜を行った。RNA-seq で選抜した 3 種類の MYB 転写因子について、RNA-seq における発現の挙動を確認したところ、R1-MYB は照射した波長域による発現レベルに差は少なく、着色レベルとの高い相関は認められなかった。一方で、MYBx1 および MYBx2 は、青色光よりも赤色光と暗条件において発現レベルが上昇しており、花卉の色素レベルと負の相関が認められた。RNA-seq の再解析において *GtCHS* と高い相関を示した 2 種類の PIF 様 bHLH は、RNA-seq において、明暗条件間および波長域間で顕著な発現レベルの差は認められず、再現性は得られなかった。さらに転写因子以外の着色への関与が予想される光応答因子を探索したところ、これまでリンドウで明らかにされていなかったアントシアニン色素の液胞輸送への関与が予想される 2 種類のグルタチオン S-トランスフェラーゼ(Phi class GST1, Tau class GSTU)を選抜した。

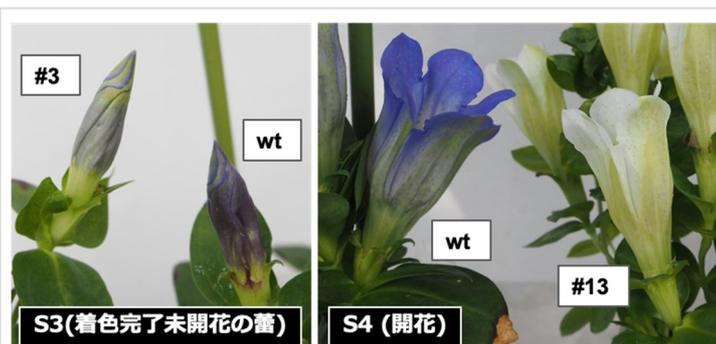
##### (3) リンドウにおける選抜遺伝子のゲノム編集

本計画 1 年目に実施した光処理実験は、停電トラブルによりサンプルを消失したため RNA-seq は実施できなかったが、リンドウの形質転換体作出と花色表現型の確認は長い期間を要することから、先行して RNA-seq の再解析で選抜した 2 種類の bHLH および GST1 のゲノム編集によるノックアウトシステムの作出を行った。その結果、2 種類の bHLH ノックアウト系統の花色表現型はそれぞれ濃青色を呈する野生型と比べて差は認められなかった。RNA-seq の発現パターンの結果においても 2 種類の bHLH は明暗および光源による発現レベルの顕著な差が認められなかったため、光応答着色に関与する可能性は低いと考えられた。一方で、GST1 ノックアウト系統の花色表現型は薄青色を呈する #3 系統、および微かに薄青色を呈する白色の #13 系統が確認された (第 3 図)。#3 系統は GST1 遺伝子 2 アリルのうち 1 アリルはゲノム編集のターゲット配列を中心に大きな変異が生じており、完全に機能を失ったと推定された。残りの 1 アリルはフレームシフトを伴わない 9 塩基欠損が生じていた。#3 系統はこれらの変異が GST1 の機能低下を引き起こした結果、弱いアントシアニン蓄積による薄青の花色表現型が生じたと考えられた。一方で、#13 系統のターゲット配列は 2 アリルともに致命的な変異が生じていた。しかし、花卉はアントシアニン蓄積を著しく低下させたものの完全な白色にはならなかった。この結果から、リンドウにおけるアントシアニンの液胞輸送は GST1 だけでなく Tau class GSTU あるいはその他の因子と相補的に機能している可能性が考えられた。

このように本研究ではリンドウで初めてアントシアニン輸送関連遺伝子の機能証明に成功した (Tasaki et al, 2020, BMC Plant Biology 20:370)。しかし、光による発現制御の対象がフラボノイド生合成経路の上流で機



第2図. LED照射下で開花したエゾリンドウ系統の花弁着色  
分光測色計を用いて開花直後の花弁背軸面のL\*値を測定した。異なるアルファベットはTukeyHDS ( $P < 0.01$ )における有意差を示す。



第3図. リンドウGST1ゲノム編集個体の花色表現型

着色完了する花卉発達ステージS3において#3系統の花弁は淡青色を呈していた。#13系統の花弁は白色に見えるが、わずかに薄青色を帯びる。

能する CHS などに留まらず、生合成後のアントシアニンの輸送に関する GST1 にまで及ぶ理由については疑問を残している。このリンドウの GST1 は光依存的な発現を示すが、その発現パターンは *GtCHS* と異なっていた。これは、光応答着色において複数の制御経路の存在を示唆するものである。

今後は *GtCHS*、*GtCHI*、*GtF3H* だけでなく、*GST1* を含めた遺伝子の上流制御因子を探索する必要がある。また、RNA-seq の遅延により遅れている MYBx1、MYBx2 についても継続して機能解析を進める予定である。

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 1件）

1. 著者名 Tasaki Keisuke, Yoshida Momo, Nakajima Minori, Higuchi Atsumi, Watanabe Aiko, Nishihara Masahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Molecular characterization of an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in Japanese gentian with the CRISPR/Cas9 system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Plant Biology	6. 最初と最後の頁 370
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12870-020-02565-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------