

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580005
 研究課題名 (和文) ダッチアイリスにおけるアントシアニンとフラボンのコピーグメンテーション機構の解明
 研究課題名 (英文) A molecular genetic study of copigmentation between anthocyanins and flavones in the flowers of *Iris hollandica*
 研究代表者
 藪谷 勤 (YABUYA TSUTOMU)
 宮崎大学・農学部・教授
 研究者番号：70112414

研究成果の概要：ダッチアイリスにおけるアントシアニンとフラボンのコピーグメンテーション分子機構を解明するために本研究を実施した。その結果、アントシアニン生合成遺伝子として、*CHS*、*CHI*(断片)、*F3H*、*DFR*、*ANS*及び*3GT*遺伝子を単離し、花蕾の発育時期別のこれら遺伝子の発現レベルとアントシアニンやフラボンの蓄積量との関係も明らかにした。さらに、コピーグメンテーション発現の鍵酵素、*F3H* の基質特異性を解明するとともに、*F3H* 遺伝子のペチュニアへの導入にも成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：植物育種学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：ダッチアイリス、アントシアニン、フラボン、コピーグメンテーション、生合成遺伝子、発現解析、基質特異性、ペチュニア形質転換体

1. 研究開始当初の背景

花卉類の育種において最も重要なターゲットは花色であり、その代表的な色素がアントシアニンである。園芸種では、これまでに多数の品種が育成されているにもかかわらず、ハナショウブ、バラ、ユリ、チューリップなどでは青色花品種がなく、その育成が強く望まれている。アントシアニンは、フラボンやフラボノールなどとのコピーグメンテーションにより花色の青色化をもたらすことがダッチアイリス、ハナショウブなどの多くの植物種で報告されている。しかしながら、

コピーグメンテーションの分子機構に関する知見は全く得られていないのが現状である。さらに、双子葉類におけるアントシアニン及びその関連色素の生合成遺伝子に関する報告は数多くあるにもかかわらず、単子葉類のものは極めて限定されている。そこで、単子葉の代表的な園芸種であるダッチアイリスにおけるアントシアニンとフラボン生合成遺伝子の単離・解析、及び両色素によるコピーグメンテーション分子機構の解明とその育種的利用に向けて、今が絶好の機会と捉え、本研究を実施した。

2. 研究の目的

- (1) ダッチアイリスにおけるアントシアニン、フラボン生合成遺伝子及びこれら生合成遺伝子の制御遺伝子の単離・解析を試みる。
- (2) 単離された生合成遺伝子及びその制御遺伝子の発現がアントシアニン及びフラボンの蓄積量に及ぼす影響を調べるために、ダッチアイリスの花の発達におけるアントシアニン、フラボン蓄積量の経時的变化や器官間差異を分析するとともに、各遺伝子の時期・器官特異的発現を解析する。
- (3) ダッチアイリスの青紫花品種「Blue Diamond」、複色花品種「Surprise」及び白色花品種「White Wedgewood」の間でアントシアニン生合成遺伝子の発現を比較解析し、「Surprise」及び「White Wedgewood」における花器官白色化の原因を究明する。
- (4) コピグメンテーション発現の鍵遺伝子、*F3H* の大腸菌での異種発現により、*F3H* の機能を確認するとともに、その基質特異性を明らかにする。
- (5) ダッチアイリスの *F3H* 遺伝子を導入したペチュニア形質転換体を獲得し、その特性を調査する。

3. 研究の方法

- (1) アントシアニン、フラボン生合成遺伝子その制御遺伝子に関する RT-PCR (reverse transcription- polymerase chain reaction) 用のプライマーを作製し、その発現解析をするために、先ずダッチアイリス花蕾より構築した cDNA ライブラリーから各遺伝子の単離・解析を試みた。各遺伝子の単離は、キンギョソウから得られた既知遺伝子のプローブなどを用いたダッチアイリス品種「Blue Diamond」花蕾由来の cDNA ライブラリーからのプラークハイブリダイゼーション法によるスクリーニング、ダッチアイリス EST 情報を基礎とした PCR 及びライブラリーのランダムスクリーニングにより行った。

(2) 植物材料として、ダッチアイリスの青紫色花品種、「Blue Diamond」(内、外両花被及び雌蕊とも青紫)、複色花品種「Surprise」(外花被及び雌蕊は白、内花被は淡紫)及び白色花品種「White Wedgewood」(内・外両花被及び雌蕊とも白)を供試した。花の発育段階におけるアントシアニン及びフラボンの蓄積パターン、及びアントシアニン生合成遺伝子の時期特異的発現を調査するために、「Blue Diamond」の花蕾を5つの発育段階分けて採取し、それぞれの段階の外花被を試料として用いた。また、アントシアニン及びフラボンの器官特異的蓄積の調査には、3品種における開花当日の内・外両花被および雌蕊の各器官を用いた。さらに、アントシアニン生合成遺伝子の部位特異的発現解析には、各品種の葉、内・外両花被、雄蕊及び雌蕊を用いた。アントシアニン生合成遺伝子、*IhCHI*、*IhF3H*、*IhDFR*、*IhANS*、*Ih3GT*、*Ih5GT* 及び *Ih3AT* 遺伝子の発現解析は RT-PCR 法で、またアントシアニンおよびフラボンの分析は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で行った。

- (3) ダッチアイリスの *F3H* をコードする3つの cDNA クローン(*IhF3H1*~*3*)を大腸菌に組み込み、6 × His-Tag との融合タンパク質として発現させ、それを基質に反応させて得られた生成物を HPLC で確認することにより、基質特異性を調査した。*IhF3H* 組換えタンパク質の異種発現用のフラバノン基質としてナリングニン (naringenin)、エリオジクチオール (eriodictyol)、ホモエリオジクチオール (homoeriodictyol)、サクラネチン (sakuranetin)、イソサクラネチン (isosakuranetin)、ヘスペレチン (hesperetin)、リキリチゲニン (liquiritigenin)、ピノセンプリン (pinocembrin)及び2,3-ジヒドロフラボン

(2, 3-dihydroflavone) を供試した。

(4) 植物材料として、ペチュニア品種「ブリエッタ・バイオレット」を供試した。ダッチアイリス *F3H* 遺伝子のペチュニアへの形質転換実験では、アグロバクテリウム菌系 EHA105/ pBIF3H を用いた Leaf-disk 培養により得られた再生植物体における *F3H* 遺伝子及びアグロバクテリウムの *virG* 遺伝子の特異的プライマーを用いた PCR 分析により、形質転換体の確認を行った。また、獲得したペチュニア形質転換体の花色を調査するとともに、花卉含有アントシアニンを HPLC で分析した。

4. 研究成果

アントシアニンはフラボン、フラボノール等とのコピグメンテーションにより花色の青色化を発現することがよく知られている。そこで、本研究では *Iris* 属の代表的な園芸種であるダッチアイリスにおけるアントシアニン及びフラボン生合成に関与する遺伝子やその制御遺伝子の分子遺伝学的研究を進めることにより、アントシアニンとフラボンによるコピグメンテーションの分子機構の解明を目指した。得られた研究成果は以下の通りである。

(1) キンギョソウの *CHS*、*F3H*、*UFGT* cDNA の全長、及びダッチアイリスの *DFR* cDNA 断片をプローブとして用いたダッチアイリス cDNA ライブラリーのスクリーニングにより、*CHS*、*F3H1*~*3*(3 クローン)、*DFR* 及び *3GT* をコードする cDNA を獲得した。また、ダッチアイリス EST 情報を基礎とした PCR 及びライブラリーのランダムスクリーニングにより、*CHI* cDNA 断片及び *ANS* cDNA のクローニングに成功した。これに対して、*F3H* と同様、コピグメンテーション発現に重要で、かつフラボン生合成の鍵酵素であるフラボンシンターゼ (FNS) をコードす

る遺伝子及びアントシアニン生合成遺伝子を制御する *MYB* 転写因子についてもクローニングを試みたが、両遺伝子の cDNA クローンを単離するまでには至らなかった。

(2) 青紫品種「Blue Diamond」花蕾の発育段階を 5 ステージに分けて行った調査では、アントシアニン生合成遺伝子(*IhCHI*、*IhF3H*、*IhDFR*、*IhANS*、*Ih3GT*、*Ih5GT*及び *Ih3AT*) はステージ 1 から 4 にかけて高い発現レベルを維持しており(図 1)、それに付随してアントシアニンの蓄積は花卉の発達が進むにつれて増加、開花直前のステージ 4 において最大となることが明らかになった。このように、花の時期および器官においてアントシア

花蕾の発育ステージ

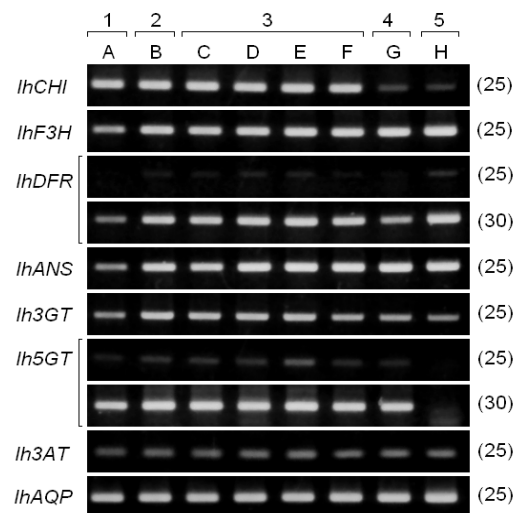


図 1. ダッチアイリス青紫品種「Blue Diamond」の外花被各発育ステージ(1~5)におけるアントシアニン生合成遺伝子の発現。括弧内の数値：PCR 反応の回数、*IhAQP*：ダッチアイリスのアクアポリン遺伝子(ポジティブコントロール)、外花被の発育ステージ 1：20 - 29 mm(蕾の長さ)、2：30 - 39mm、3：(C: 40 - 44mm, D: 45 - 49mm, E: 50 - 54mm, F: 55 - 59mm)、4：60 - 75mm、5：開花期。

ニンの蓄積量と生合成遺伝子の発現レベルはよく対応しており、アントシアニン生合成がそれぞれの反応を触媒する酵素遺伝子の転写レベルで制御されていることが示唆された。これに対して、フラボン蓄積量はアントシアニン蓄積量が増加するとともに減少した。また、「Blue Diamond」の葉では、*IhCHI*および*IhF3H*を除くアントシアニン生合成遺伝子の発現が確認されなかった。さらに、複色品種「Surprise」の外花被及び雌蕊の白色化は *DFR* 遺伝子発現の顕著な減少に、一方白色品種「White Wedgewood」の内、外両花被及び雌蕊の白色化は *DFR* 遺伝子発現の欠損または顕著な減少に起因することが明らかにされた。

(3) F3H の主要な基質であるナリングeninを用いた酵素アッセイにより、*IhF3H1*、*Ih3H2* 及び *IhF3H3* のすべてがフラバノンからジヒドロフラボノールへの反応を触媒する活性を持つことが示された。また、活性が高かった *IhF3H1* 及び *IhF3H2* を用いて種々のフラバノンに対する基質特異性を分析したところ、これらの酵素は分析したフラバノンのほぼすべてに活性を示したが、その A 環 7 位の *O*-メチル化が F3H 活性を大幅に減少させる傾向が認められた(表 1)。さらに、*IhF3H* はペチュニア F3H の機能と非常に類似していることが指摘された。筆者の知る限り、これまで F3H の基質特異性に関する報告はペチュニア F3H のみであり、他種植物での報告は見当たらない。本研究は、F3H の基質特異性を植物種間で比較した最初の報告である。

(4) ダッチアイリスの F3H cDNA をペチュニア品種「ブリエッタ・バイオレット」への導入を試みたところ、EHA105/pBIF3H を使用した処理区において Leaf-disk 培養により 9 個体の再生植物体を獲得した。次に、9 個体の BV-EHA105/pBIF3H のうち、形質転換

表 1. 種々のフラバノンに対する組換え

IhF3H1 及び Ih3H2 の基質特異性		
基質	F3H1	F3H2
ナリングenin	100 ¹	100 ¹
サクラネチン	<1	<1
イソサクラネチン	100	81
エリオジクチオール	98	95
ホモエリオジクチオール	194	133
ヘスペレチン	22	28
ピノセンブリン	39	27
リキリチゲニン	282	183
2,3-ジヒドロフラボン	n.d. ²	n.d. ²

¹ ナリングeninで測定された F3H の活性値を 100%とした。

² 活性が検出されなかった。



図2. ペチュニア形質転換体。
左: コントロール品種「ブリエッタ・バイオレット」。
右: ダッチアイリスF3H遺伝子を導入した形質転換体。

体を同定するために、*F3H* 及び *virG* 遺伝子のプライマーを使用して PCR による導入遺伝子の確認をしたところ、全ての個体において *virG* 遺伝子のプライマーの増幅により期待されるバンドではなく、*F3H* プライマーの増幅により期待されるバンドが認められた。従って、*F3H* プライマーにより検出されたバンドは残存アグロバクテリウムによるものではなく、導入遺伝子によるものと判定された。以上の結果、本研究ではペチュニア形質転換体の獲得に成功した(図 2)。このような

形質転換体の獲得は本研究が最初である。次に、得られたペチュニア形質転換体における花の形態や色について調査したところ、*F3H* 形質転換体の花弁の一部に濃紫のにじみや白い斑点が出現したことを除けば、花の形態や色に関してコントロール(非形質転換体)と顕著な差異は認められなかった。また、花弁含有アントシアニンの HPLC 分析を行ったが、形質転換体はコントロールばかりでなく、その個体間の比較においてもアントシアニン量及びその成分に関して明白な差異が認められなかった。今後、更に多くの形質転換体を獲得し、その特性を詳細に調査することが重要である。

最後に、本研究で得られたアントシアニン生合成に関する知見は、コピグメンテーションの分子機構の解明を促進するものであり、さらに単離されたコピグメンテーション発現の鍵遺伝子、*F3H* は花卉類の青色花育種の遺伝子ツールとしての利用が大いに期待される。また、もう1つの鍵遺伝子、*FNS* の単離・解析に向けて、現在、実験中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ①Yoshihara Noriko, Fukuchi-Mizutani, Masako, Okuhara Hiroaki, Tanaka Yoshikazu, Yabuya Tsutomu, Molecular cloning and characterization of *O*-methyltransferases from the flower buds of *Iris hollandica*, *Journal of Plant Physiology*, 165: 415-422, 2008, 査読有
- ②Inoue Kouichi, Takeshi Tomita, Yoshihara Noriko, Yabuya Tsutomu, Interspecific hybrids between *Iris setosa* var. *setosa* and *I. laevigata* and their relationships to *I. setosa* var. *hondoensis* or *I. setosa* var. *nasuensis*, *Cytologia*, 73, 401-410, 2008, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ①濱砂紳也、松尾勇一朗、吉原法子、水谷正子、田中良和、藪谷 勤、ダッチアイリス

におけるカルコン合成酵素 cDNA クローンの単離と解析、日本育種学会、2007、9月23日、山形大学農学部

- ②吉原法子、水谷正子、田中良和、藪谷 勤、ダッチアイリスにおけるアントシアニン生合成酵素遺伝子の発現解析、日本育種学会、2007、9月23日、山形大学農学部

[図書] (計 1 件)

- ①藪谷 勤(共著)、IV-1 花色育種の現状(p.177-182)、IV-2 ハナショウブにおける花色育種(p.183-189)、参考文献(p.207-210)、植物色素研究法(第2版、植物色素研究会編)、大阪公立大学共同出版会、2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藪谷 勤 (YABUYA TSUTOMU)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：70112414

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

①吉原法子

鹿児島大学大学院連合農学研究科

博士課程院生

②井上公一

鹿児島大学大学院連合農学研究科

博士課程院生

③濱砂紳也

宮崎大学大学院農学研究科

修士課程院生

④黒木鉄治

宮崎大学大学院農学研究科

修士課程院生

⑤松尾勇一朗

宮崎大学大学院農学研究科

修士課程院生