

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05581

研究課題名（和文）花弁の光応答着色における分子制御基盤の構築

研究課題名（英文）Establishing the Molecular Basis for the Regulation of Light-Responsive Pigmentation in Petals

研究代表者

田崎 啓介（Tasaki, Keisuke）

東京農業大学・農学部・准教授

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）：リンドウの花弁におけるアントシアニン蓄積を制御する光応答経路の分子機構を探索した。LED光源を用いた実験において、青色光および赤色光は花弁のフラボノイド生合成経路の早期遺伝子群の発現を誘導した一方で、遠赤色光は青色光による早期遺伝子群の発現を阻害した。赤色光および遠赤色光に対する早期遺伝子群の発現応答から、フィトクロムを介する抑制的な制御経路が青色光による着色促進経路に干渉していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、花の重要形質であるアントシアニンの蓄積の仕組みについて、光応答性の観点から明らかにするものであり、得られた知見は園芸作物の安定着色に繋がる生産および育種技術の開発への活用が期待される。また、本研究を通じて光受容体を介した植物の環境検知と生理応答の理解を深めることで、様々な農業形質に関する研究にも貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanism of the light-responsive pathway controlling anthocyanin accumulation in the petals of the Gentian plant was investigated. In experiments using LED light, blue and red light induced the expression of early biosynthesis genes in the flavonoid biosynthesis pathway in the petals, while far-red light inhibited the expression of these early biosynthesis genes induced by blue light. The expression response of early biosynthesis genes to red and far-red light suggests that a phytochrome-mediated inhibitory pathway interferes with the blue light-induced pigmentation pathway.

研究分野：園芸科学

キーワード：アントシアニン フィトクロム

## 1. 研究開始当初の背景

植物のアントシアニン蓄積に関する光応答性の研究は、主に葉・茎・胚軸における強光ストレスに対する防御応答がモデル植物を用いて先行してきた。アントシアニン生合成経路の転写因子 MYB をポジティブに制御する HY5 が、暗条件下ではユビキチン E3 リガーゼ COP1 の分解のターゲットとなることで着色が抑制され、一方で、UV や可視光の照射下では、光受容体が COP1 を阻害し、HY5 が機能して着色が促進される。花卉園芸植物の重要形質である花弁のアントシアニン蓄積も、一部の植物において光応答性を示すが、その制御機構はほとんど明らかにされていない。リンドウ (*Gentiana triflora*) の花弁におけるアントシアニン蓄積は、青色光で強く、そして赤色光でやや弱く誘導される。この着色強度の違いから、花弁の光応答着色には、青色光と赤色光それぞれで異なる制御経路が存在すると予想された。

## 2. 研究の目的

本研究は、リンドウの花弁におけるアントシアニン生合成を制御する青色光および赤色光を介した着色の分子制御機構を明らかにすることを目的とした。また本研究は、得られた知見を花弁着色の安定化に繋がる生産および育種技術の開発に応用することを見据えて推進した。

## 3. 研究の方法

### (1) リンドウの切り花における単色光照射が花弁のアントシアニン蓄積に及ぼす影響

花弁のアントシアニン蓄積に関わるフラボノイド生合成関連遺伝子について、光応答性と経時的な発現パターンを明らかにするために、エゾリンドウ (*Gentiana triflora*) 栽培系統 Os-r 系統の切り花を用いて光照射実験を行った。切り花は光照射開始前に、3 時間暗黒下に置いた。光源は、青色光、赤色光、および遠赤色光の LED 照明を使用し、各光源は  $90\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  に調整した。また比較のために暗黒区を設けた。光照射は、蕾の花器官の伸長と花弁着色を開始する直前の花の発達ステージ (S2) から開始した。花弁のサンプリングは、光照射開始後 3 時間、6 時間、24 時間と、蕾の花弁が開花に向けて膨らみ始める花の発達ステージ (S3) そして開花直後の花の発達ステージ (S4) で行った。これらのサンプルを用いて、リアルタイム PCR によるフラボノイド生合成関連遺伝子の発現解析を行った。S4 の花弁は、HPLC によるアントシアニン含量の測定にも使用した。

### (2) リンドウの切り花における 2 色光同時照射が花弁のアントシアニン蓄積に及ぼす影響

花弁のアントシアニン蓄積における青色光と赤色光の相補性、および遠赤色光の影響を調べるために、青色光  $90\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  と赤色光  $10\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の同時照射 (BR) および青色光  $90\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  と遠赤色光  $10\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の同時照射 (BFR) を行った。(1)と同様に花弁のサンプリング、遺伝子発現解析、およびアントシアニン含量の測定を行った。

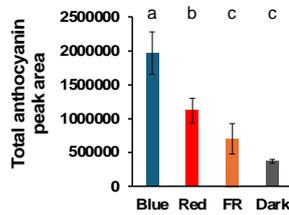
### (3) リンドウの切り花における光照射が花弁の HY5 の発現パターンに及ぼす影響

光照射した切り花の花弁における HY5 の光応答性と経時的な発現パターンを明らかにするために、リンドウの RNA-seq データから選抜された HY5 を単離し、(1)(2)で用いた花弁サンプルを用いてリアルタイム PCR による発現解析を行った。

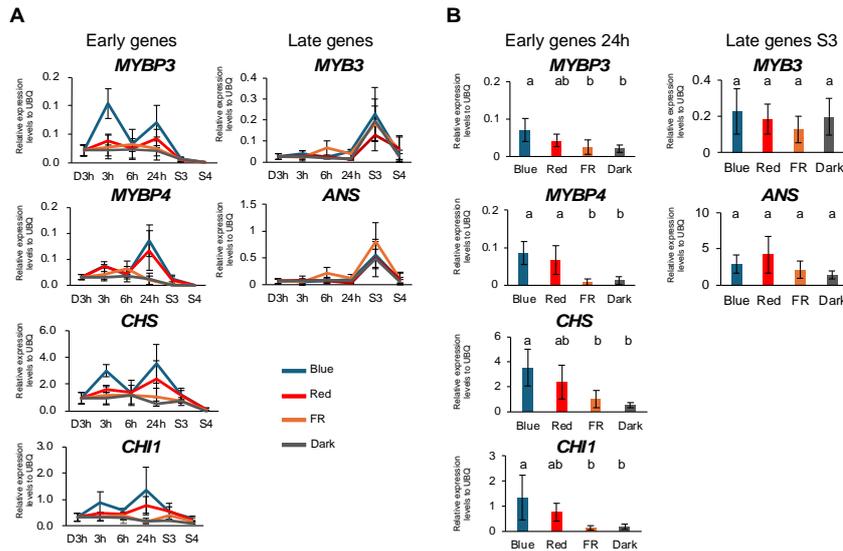
## 4. 研究成果

### (1) リンドウの切り花における単色光照射が花弁のアントシアニン蓄積に及ぼす影響

花弁におけるアントシアニン蓄積レベルは青色光区に次いで赤色光区で高く、一方で遠赤色光区は暗黒区との間に差は認められなかった (Figure 1)。このように、花弁のアントシアニン蓄積は、青色光および赤色光に誘導され、遠赤色光にはほとんど誘導されないことが確認された。フラボノイド生合成経路の早期遺伝子 *CHS*、*CHI1* とその推定転写因子 *MYBP3* および *MYBP4* (早期遺伝子群) の発現は、照射開始後から 24 時間にかけて、青色光区および赤色光区において暗黒区と比較して増加する傾向を示した (Figure 2A)。一方で、遠赤色光区の早期遺伝子群の発現は暗黒区と同じレベルで推移した。フラボノイド生合成経路の後期遺伝子 *ANS* とその転写因子 *MYB3* (後期遺伝子群) の発現は、いずれの区も S3 をピークとする類似したパターンを示した (Figure 2A)。光照射開始後 24 時間における早期遺伝子群の発現レベルは、青色光区で最も高く、赤色光区で有意差はないものの青色光区より低い傾向を示し、遠赤色光区と暗黒区の間には有意差は認められなかった (Figure 2B)。S3 における後期遺伝子群の発現レベルは、各処理区間で有意差は認められなかった (Figure 2B)。これらの結果から、リンドウの花弁におけるアントシアニン蓄積レベルの決定は、早期遺伝子群の速やかな青色光および赤色による発現上昇が影響していると推察された。

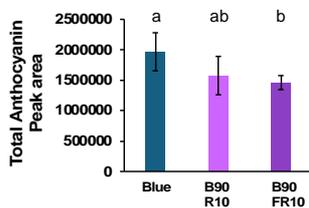


**Figure 1.** Effect of LED light irradiation on anthocyanin accumulation level in petals of *Gentiana triflora* Os-r line. Total anthocyanin accumulation level estimated from the total peak area at HPLC 530 nm. Different letters indicate significant differences at the 1% level by Tukey's multiple test (n=5).

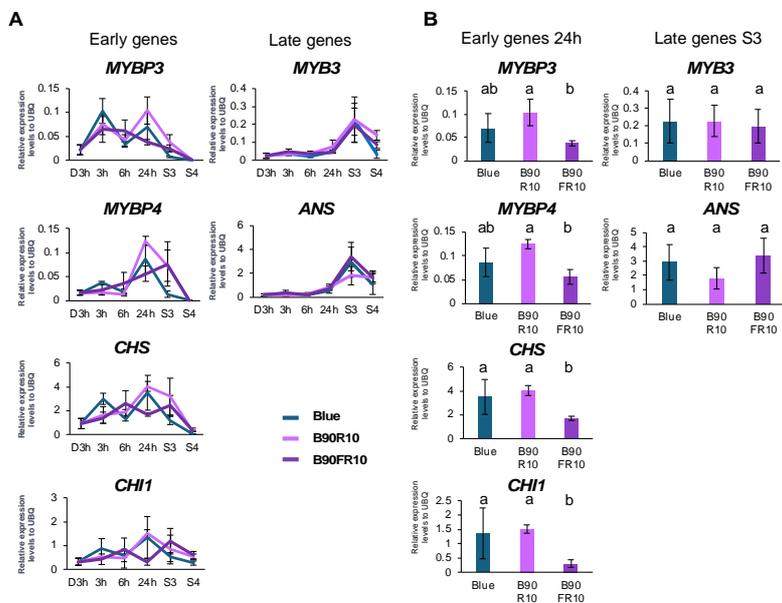


**Figure 2.** Temporal expression of flavonoid biosynthesis-related genes in LED irradiated petals of *Gentiana triflora* Os-r line. (A) Expression patterns of anthocyanin biosynthesis-related genes during flower development after the start of light irradiation. (B) Expression levels of flavonoid biosynthesis-related early genes 24 hours after irradiation and late genes at S3 of petals. Different letters indicate significant differences at the 5% level by Tukey's multiple test (Early genes 24h, n=4; Late genes S3, n=5).

(2) リンドウの切り花における2色光同時照射が花卉のアントシアニン蓄積に及ぼす影響  
 花卉におけるアントシアニン蓄積レベルは、BR 区は青色光区と比較して有意差は認められず、一方で、BFR 区は青色光区と比較して有意に低かった (Figure 3)。早期遺伝子群の発現は、BFR 区が青色光区および BR 区と比較して低く推移する傾向を示した (Figure 4A)。後期遺伝子群の発現は、いずれの区も S3 をピークとする類似したパターンを示した (Figure 4A)。光照射開始後 24 時間における早期遺伝子群の発現レベルは、BR 区は青色光区と比較して差は認められず、BFR 区は *CHS* および *CHI1* の発現レベルが青色光区よりも有意に低かった (Figure 4B)。S3 における後期遺伝子群の発現レベルは、各区間で有意差は認められなかった (Figure 4B)。以上の結果から、赤色光による青色光の着色促進の相補性については、より詳細な解析が必要と考えられた。一方で、青色光による早期遺伝子群の発現促進が遠赤色光により抑制されたことから、赤・遠赤色光受容体であるフィトクロムを介する抑制的な一部の制御経路が、青色光による着色促進経路に干渉していると考えられた。



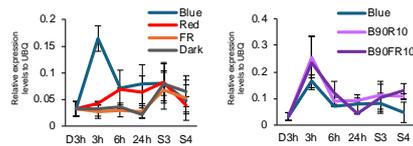
**Figure 3.** Effect of LED combination light irradiation on anthocyanin accumulation level in petals of *Gentiana triflora* Os-r line. Total anthocyanin accumulation level estimated from the total peak area in HPLC 530 nm. B90R10, blue  $90\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  + Red  $10\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; B90FR10, blue  $90\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  + FR  $10\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Different letters indicate significant differences at the 5% level between different signs by Tukey's multiple test (n=5).



**Figure 4. Temporal expression of flavonoid biosynthesis-related genes in LED combination irradiated petals of *Gentiana triflora* Os-r line.** B90R10, blue  $90\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  + Red  $10\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; B90FR10, blue  $90\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  + FR  $10\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A) Expression patterns of flavonoid biosynthesis-related genes during flower development after the start of light irradiation. (B) Expression levels of flavonoid biosynthesis-related early genes 24 hours after irradiation and late genes at S3 of petals. Different letters indicate significant differences at the 5% level by Tukey's multiple test (Early genes 24h, n=4; Late genes S3, n=5).

(3) リンドウの切り花における光照射が花弁のHY5の発現パターンに及ぼす影響

青色光区および赤色光区におけるHY5の発現は、照射開始後3時間から24時間にかけて遠赤色光区および暗黒区よりも高く推移する傾向を示した (Figure 5)。BR区およびBFR区におけるHY5の発現は、青色光区と類似したパターンを示した。早期遺伝子群で確認された遠赤色光による発現抑制は、HY5では認められなかった (Figure 5)。以上の結果から、HY5の発現は、早期遺伝子群と同様に速やかに青色光で強く、赤色光でわずかに誘導されるが、遠赤色光に抑制されないことから、早期遺伝子群と異なりフィトクロムを介する抑制的な一部の制御経路は影響しない可能性が考えられた。



**Figure 5. Temporal expression patterns of HY5 in LED irradiated petals of cut flower of *Gentiana triflora* Os-r line.** B90R10, blue  $90\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  + Red  $10\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; B90FR10, blue  $90\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  + FR  $10\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------