

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580011
 研究課題名（和文）カテキン類からプロアントシアニジン合成で働く遺伝子およびタンパク質の解析
 研究課題名（英文）Detections of genes and proteins related proanthocyanidins synthesis from catechins
 研究代表者
 松井 勝弘（MATSUI KATSUHIRO）
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター・作物開発・利用研究領域・主任研究員
 研究者番号：30343974

研究成果の概要（和文）：

本研究では普通ソバに由来する MYB 転写因子遺伝子が、プロアントシアニジン（PA）合成制御に関係しているかを形質転換体の作出等により明らかにし、それらを用いて、カテキン類から PA 合成で働く遺伝子やタンパク質の検出を試みた。MYB 転写因子遺伝子を高発現させたタバコの形質転換体では PA 合成が確認され、普通ソバより単離した MYB 転写因子遺伝子が、PA 合成制御に関係していることが明らかにできた。cDNA-AFLP では PA 合成で働く特異的遺伝子を検出できなかったため、今後はゲルフリーのプロテオーム解析等により進める予定である。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I had clarified that a gene of MYB transcription factor which was isolated from buckwheat was related to PA synthesis and regulations by production of transgenic plants. I also tried to detect genes and proteins relating synthesis PA by comparison of wild type and transgenic plants with cDNA-AFLP. I didn't find any specific genes by the way, and now I am preparing to do gel-free proteomic analysis to find them.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物育種・遺伝

1. 研究開始当初の背景

近年、先進諸国の消費者は機能性の高い食品を好む動向にある。フラボノイド系化合物は高い抗酸化性やガン抑制効果など多くの薬理的効果が認められることから、世界中の医

療・食品関係の研究者に注目されている。フラボノイド系の化合物はフラボノイド生合成系とよばれる異なる化合物を合成するのに必要な枝分かれした経路を通して合成される二次代謝産物である（図1）。また、そ

それぞれのステップは1つの遺伝子によりコードされる酵素によって行われ、その酵素(群)はMYBなどの転写因子により制御されていることが分かっている。フラボノイド生合成経路は、その主要部位は明らかとなりつつあるが、依然カテキン類からプロアントシアニジン合成に至る重合の過程はモデル植物においても明らかとなっていない(図1)。

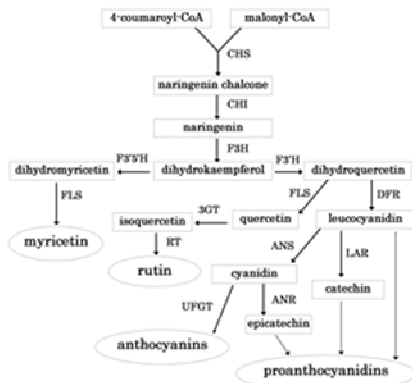


図1. ソバにおいて推定されるフラボノイド生合成系(濃線は他の植物においても未だ未解明部分を示す。)

フラボノイド生合成系の各ステップで働く酵素は、先に述べたように、MYBなどの転写因子に制御されるが、アントシアニンやプロアントシアニジンはMYBタンパク質単独ではなく、タンパク複合体(MYB-bHLH-WD40)により制御されることが知られる。そのタンパク複合体は1つの遺伝子に作用する場合もあるが、同時に複数の遺伝子に作用する場合が多いことが知られている。

近年、アラビドプシスやブドウなどではプロアントシアニジン合成を制御するMYB転写因子が報告され、プロアントシアニジン合成に関わるANSやLAR等の転写制御をしていることが報告されている。また、ミヤコグサではプロアントシアニジン合成に関する2つのLAR遺伝子(LAR1およびLAR2)が報告され、2つのうちLAR1およびその他のプロアントシアニジン合成に関するANS、ANRおよびDFRは転写因子のSnによって制御されるがLAR2はこの転写因子に制御されていないことが報告されている。このようなことから、カテキン類からプロアントシアニジン合成に関係するMYB転写因子の解析が不可欠である。

古くから機能性が高いことで知られる日本伝統の作物にソバがある。ソバはルチン(フラボノールの一種)含量が高く、またプロアントシアニジンやアントシアニンも含まれ、さらに近年、アルツハイマー病予防に効果が高いと考えられるミリセチンも含ま

れることが分かってきた。しかし、ソバは他殖性の1年性作物であるため、遺伝子のホモ化および変異系統の作出・維持の難しさから、各々の物質の効能はもとより、それぞれの化合物がどのように合成制御されているかの研究もほとんどされていない。

研究代表者はこれまでにソバのフラボノイド合成制御機構を明らかにするため、自殖性のソバを開発し、合成系の主要となるDFR等の遺伝子を単離した。また、近年アントシアニンを蓄積しない変異系統を作出し、その形質が1つの遺伝子に支配され、アントシアニンを合成しない代わりに、プロアントシアニジンを多く合成することを明らかにしている。さらに近年ソバからプロアントシアニジン合成に関係すると系統分類学的に推定されるMYB転写因子をコードする遺伝子を単離した(図2)。

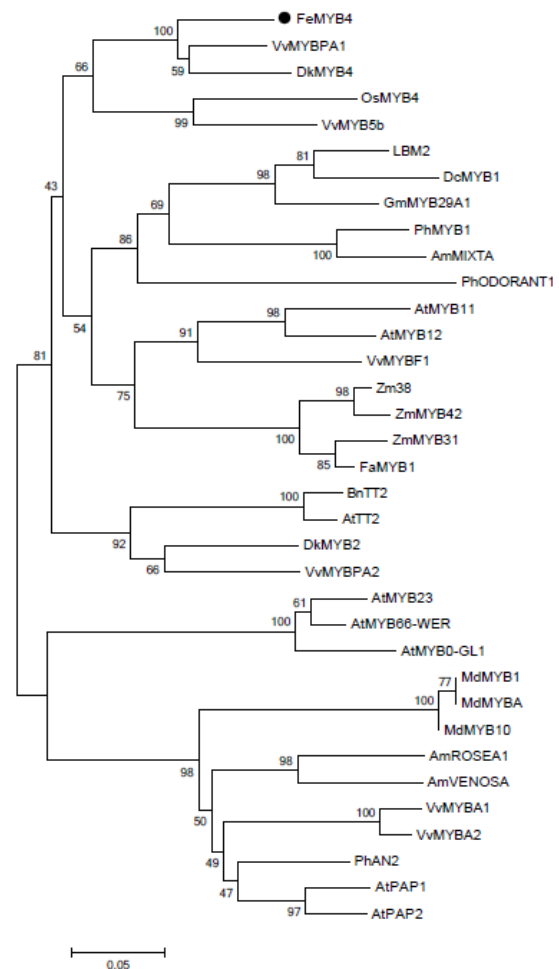


図2 ソバから単離したMYBタンパク質(FeMYB4)の既知MYBタンパク質との類似性の解析 FeMYB4はブドウやカキで報告されているプロアントシアニジン合成制御をするMYBタンパク質と類似している。

本研究では世界中の研究者が依然解明できていないこの領域をプロアントシアニジン合成過程で働くと考えられるソバ由来の MYB 転写因子をタバコやアラビドプシスに形質転換し、それらを用いて、分子レベルでプロアントシアニジン合成制御系の解明を試みる。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、カテキン類からプロアントシアニジンに至る過程で働く遺伝子を特定しようとするものであるが、本研究期間内では①既にソバから単離したプロアントシアニジン合成制御に関与していると推定されている MYB 遺伝子 (*FeMYB4*) が真にプロアントシアニジン合成を制御しているのかを明らかにする。また、②MYB 遺伝子を恒常的に発現または抑制させた場合の各フラボノイド化合物含量の変化やフラボノイド合成系の遺伝子発現およびタンパク質の変化を明らかにし、カテキン類からプロアントシアニジン合成で働くタンパク質や遺伝子を検出する。

3. 研究の方法

(1) *FeMYB4* がプロアントシアニジン合成を制御しているかを明らかにするため、*FeMYB4* を 35S プロモーターへ連結し、タバコおよびアラビドプシスへ導入した。また、*FeMYB4* がアラビドプシスのプロアントシアニジン合成できない変異体 (*tt2*) のプロアントシアニジン合成を回復できるかを調べるため、*TT2* プロモーターに *FeMYB4* を連結し *tt2* 変異体へ導入した。さらに、転写因子遺伝子が制御する酵素遺伝子の働きを抑制することができる方法 (CRES-T 法) を用いて、アラビドプシスのプロアントシアニジン合成を抑えられることができるかを調査した。

また、作出した形質転換体を用いて、合成系のどの遺伝子の転写活性が変化したのかをリアルタイム PCR 法を用いて調査した。CRES-T 法を用いた形質転換体の作出等は独立行政法人産業総合研究所の高木博士や光田博士等の助けを得て行った。

(2) カテキン類からプロアントシアニジン合成の際に働く遺伝子やタンパク質を見つけるため、タバコの高発現形質転換体と野生型のサムスンを用いて、cDNA-AFLP および 2 次元電気泳動法を行った。cDNA-AFLP のテンプレートは EcoRI および MseI 処理をして作出したものと、制限酵素処理をせず、直接 5' 側にアダプターを付けて作出した 2 つの方法を用いた。2 次元電気泳動は 1 次元目に pH4-7 までの勾配ができるように等電点電気泳動を行い、2 次元目に SDS-PAGE を行った。

4. 研究成果

普通ソバ由来の PA 合成を制御すると考えられた MYB 転写因子遺伝子をアラビドプシスおよびタバコで高発現させた形質転換体を作成した。これまで、プロアントシアニジン合成を制御する MYB 転写因子を高発現した場合、その植物はその毒性から枯死してしまうか、もともと発芽しないなどの報告があったが、タバコおよびアラビドプシスとも形質転換体を得ることができた。タバコにおいてはソバ由来 MYB 転写因子遺伝子を高発現させた形質転換体では花卉に PA を蓄積することを DMACA 染色および HPLC 分析で確認した (図 3)。



図3 ソバ由来 MYB 転写因子遺伝子を高発現させたタバコの花(上:サムスン、下:形質転換体)
(プロアントシアニジン染色する DMACA で染色。プロアントシアニジンは青色に染まる。)

また、この遺伝子にリプレッションドメインを付加して、この転写因子が制御する遺伝子の発現を抑制 (CRES-T) した形質転換体も作成した。さらに、アラビドプシスのプロアントシアニジン合成を制御する *TT2* 遺伝子に変異が生じ、プロアントシアニジン合成ができなくなった *tt2* 変異体に、ソバ由来の MYB 転写因子を導入した形質転換体ではプロアントシアニジン合成が回復した。

形質転換体から RNA を抽出し、cDNA にした後、フラボノイド合成系のどの遺伝子が活性化され、また抑えられているのかをリアルタイム PCR を用いて分析し、合成系で活性化される遺伝子を明らかにした。これらの実験から、これまでに単離したソバ由来 MYB 転写因子遺伝子は明らかにタバコとアラビドプシスにおいてプロアントシアニジン合成を制御していることが明らかとなった。

タバコにおいて MYB 転写因子遺伝子を高発現させた形質転換体とコントロールのサムスンを用いて cDNA-AFLP を行い、バンドの比較を行ったところ、多くの異なるバンドが確認され、さらにそれらバンドが不安定であったため、現在のところプロアントシアニジン合成で特異的に働く遺伝子の同定ができていない。また 2 次元電気泳動法においても、微量の酵素差異の検出は難しいと考えられ

た。

FeMYB4 の形質転換体の作出などに基づいた機能解析の結果については現在論文を執筆中であり、プロアントシアニジン合成の際に働く遺伝子およびタンパク質の検出に関しては、現在ゲルフリープロテオーム解析等の準備を進めている。

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)

[学会発表] (計1件)

Matsui K, Takos, A.M., Parker J.L., Robinson, S.P. and Walker, A.R. Apple R2R3 MYB transcription factor, MdMYB2, acts as a repressor of anthocyanin biosynthesis. JAPAN-AUSTRALIA SYMPOSIUM ON PLANT SCIENCES FOR AGRICULTURE (2012年1月20日発表) 北海道大学農学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 勝弘 (MATSUI KATSUHIRO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター・作物開発・利用研究領域・主任研究員

研究者番号：30343974