

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：85301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580014

研究課題名(和文)アントシアニン合成制御の分子基盤：新規抑制因子の制御機構と生理機能の解明

研究課題名(英文)The molecular basis of anthocyanin biosynthesis: the mechanism and physiological function of a novel repressor

研究代表者

小田 賢司(Oda, Kenji)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・その他部局等・専門研究員

研究者番号：10344409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：花や果実などの色を決める色素の合成が植物体内でどのように制御されているかは、古くから多くの人の興味の対象であると同時に、農業経済上の関心事でもある。植物の最も主要な色素であるアントシアニンの合成制御は、合成酵素遺伝子の転写誘導により調節されることが明らかにされてきた。本研究では、イネの遺伝子を過剰発現する形質転換シロイヌナズナのライブラリ中から見出されたアントシアニン抑制変異体を調べることで、アントシアニン合成の新しい制御機構とその生理機能を解析した。結果、アントシアニン合成経路の初発段階の酵素はF-boxタンパク質によりタンパク質レベルでの制御を受けていることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：The pigment production in plants is not only of great interest to many people but of importance agronomically. So far, it has been revealed that the biosynthesis of a major pigment, anthocyanin is regulated transcriptionally by the induction of biosynthetic genes. In this study, a novel mechanism of anthocyanin regulation was analyzed by using a new anthocyanin mutant that was found in a library of transgenic Arabidopsis expressing rice genes. The results of this study indicate that the first enzyme of anthocyanin biosynthesis, chalcone synthase is regulated at the protein level by an F-box protein.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、育種学

キーワード：アントシアニン F-boxタンパク質 カルコン合成酵素 イネFOXシロイヌナズナ

### 1. 研究開始当初の背景

赤・青・紫といった多彩な色の表現に関わり、植物の最も主要な色素であるアントシアニンは、花や果実、野菜の色といった作物の商品価値に強く結び付くため、古来より多くの人の興味の対象であると同時に、人為的に制御することに強いニーズがある。そのため、古くから研究が進み、その制御は合成酵素遺伝子の発現誘導によることが明らかにされてきた。

申請者らはイネの遺伝子機能の網羅的解析を目指し、イネ完全長 cDNA を発現するシロイヌナズナの大規模ライブラリを作成してきたが、このライブラリ中に種子が薄黄色を呈し、植物が成熟してもアントシアニンの少ない鮮緑色を示すライン (R10933) を見出した。この変異体は優性の変異体であることから、研究開始当初にはほとんど知られていなかったアントシアニン合成の抑制因子の変異体と示唆され、その解析はアントシアニン制御の新規の制御機構を明らかにすると期待された。

### 2. 研究の目的

本研究では、新規アントシアニン変異体 R10933 の解析を通じて、アントシアニン合成の抑制機構を調べるとともに、植物がアントシアニン抑制機構を有する生理的な意味を探ることを主な目的とした。

これまでの研究で、R10933 はイネの機能未知の F-box タンパク質を過剰発現しており、この遺伝子を野生型のシロイヌナズナに導入すると R10933 同様薄黄色の種子を付けることから、アントシアニン抑制の表現型はイネ F-box タンパク質遺伝子の過剰発現によることが明らかにされていた。F-box タンパク質は標的となるタンパク質のユビキチン化を引き起こし、分解に導く機能が知られている。この F-box タンパク質の標的遺伝子の探索を通じて、分子機構の解明を目指した。さらに、F-box タンパク質の発現解析や変異体の解析を通じて、アントシアニン抑制の生理機能の推察を試みた。

### 3. 研究の方法

アントシアニンは多数の酵素による多段階の反応を経て合成される。この反応経路はフラボノイド経路と呼ばれているが、その鍵となるのは初発反応を触媒するカルコン合成酵素 (CHS) である。予備的実験により、酵母内で F-box タンパク質は CHS と結合する可能性が示唆された。そこで、R10933 で実際に CHS タンパク質量が低下しているか、ウエスタンブロッティング法により解析する。また、F-box タンパク質と CHS タンパク質を合成し、相互作用が検出されるかどうかを明らかにする。

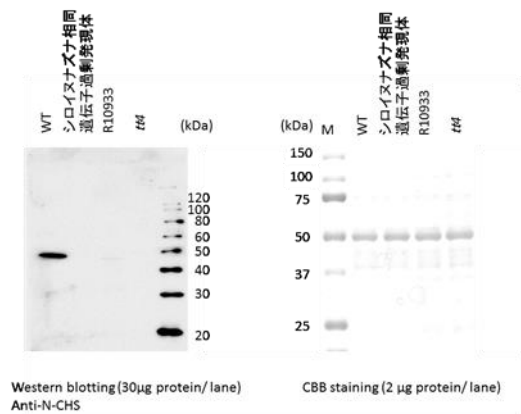
F-box タンパク質の相同遺伝子は、他の植物にも存在することがデータベースの解析により明らかとなっている。そこで、解析の

容易なシロイヌナズナを材料とし、F-box タンパク質の発現解析を行う。特に、アントシアニン合成が誘導される組織やストレスに着目し、CHS の発現パターンと F-box 遺伝子の発現パターンを詳細に比較する。また、この遺伝子の破壊型の変異体を調べることで、遺伝子の生理機能を明らかにする。

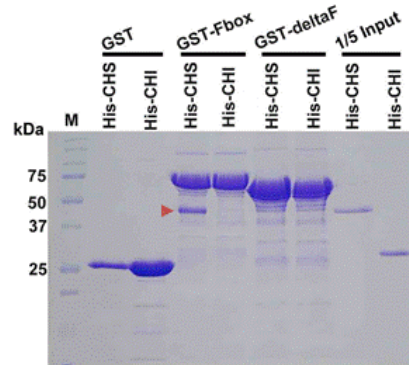
### 4. 研究成果

R10933 の表現型は、CHS 遺伝子の変異体 *tt4* と視覚的にはよく似ている。さらに、アントシアニン合成の中間体であるナリングニンの投与により、*tt4* 同様アントシアニン合成がかなり回復することから、R10933 は合成経路の初期に変異があることが示唆される。このことから、R10933 はアントシアニンだけでなく、他のフラボノイド類も欠損していると推察された。R10933 のフラボノイド類を LC-MS で解析すると、いずれも抑制されており、R10933 はフラボノイドの合成変異体であることが明らかとなった。

R10933 変異の原因である F-box タンパク質が CHS を標的とする可能性が示唆されたことから、成熟した R10933 の本葉よりタンパク質を抽出し、抗 CHS 抗体によるウエスタンブロッティングを行った。下図に示すように、R10933 は *tt4* 変異体同様、CHS タンパク質をほとんど有していないことが明らかとなり、F-box タンパク質の標的が CHS であることが示唆された。



さらに、CHS タンパク質と次の反応を触媒するカルコンイソメラーゼ (CHI) タンパク質に His タグを付けて大腸菌内で発現させ、GST タグを付けた F-box タンパク質との *in vitro* における相互作用を免疫沈降法により



調べた。その結果、図のように、F-box タンパク質はCHS タンパク質との結合が観察されたが、CHI タンパク質との結合は観察されず、このことはCHSがF-box タンパク質の標的との推察とよく一致した。

シロイヌナズナゲノムからイネ F-box タンパク質の相同遺伝子を探索し、野生型シロイヌナズナで過剰発現させたところ、最も相同性の高い一つの遺伝子が成熟した植物体のアントシアニン含量を R10933 同様、顕著に低下させ、シロイヌナズナにもイネと同様の機能を持つ F-box 遺伝子が存在することが明らかとなった。但し、その種子は R10933 よりもむしろ野生型に近い色をしており、種子ではあまり機能しないようである。この成熟個体では、R10933 同様 CHS タンパク質量の低下が認められた。

シロイヌナズナ相同遺伝子の生理機能を調べるため、発現解析を行った。興味深いことに、F-box 遺伝子は種子の成熟後期に種皮で一過的に誘導されることが明らかとなった。CHS 遺伝子の発現は、F-box 遺伝子よりも早い時期に誘導されていた。また、アントシアニンは様々なストレスにより誘導されることが知られている。そこで、強光ストレスや糖ストレスを与えて、発現解析を行ったところ、F-box 遺伝子はストレスにより若干の発現抑制がみられ、ストレス条件から通常栽培条件に戻すと一過的に誘導されることが明らかとなった。すなわち、F-box 遺伝子はアントシアニン合成の終了時に誘導される。この応答パターンは CHS 遺伝子の応答と対照的である。アントシアニン合成を促進する CHS 遺伝子は、ストレスにより誘導され、通常栽培条件に戻してアントシアニン合成を止めると発現量が低下する。これらの結果から、F-box 遺伝子はアントシアニンの合成抑制に生理的にも機能していることが示唆された。

シロイヌナズナの相同遺伝子欠損変異体の解析による生理機能解析を試みたところ、欠損変異体の芽生えは野生型に比べ、アントシアニン含量の2倍程度の増加が認められたものの、増加の程度はわずかであり、顕著な表現型は観察されなかった。そこで、発現誘導が観察されたストレスから通常条件への復帰処理で、アントシアニン含量に差がみられるか調べたものの、アントシアニン量の個体間でのばらつきが大きく、有意な差は認められなかった。アントシアニン合成は合成酵素遺伝子の発現量により規定されるところが大きく、合成終了時に誘導される F-box 遺伝子のアントシアニン量への寄与はあまり大きくないのかもしれない。これらのことから、シロイヌナズナは、アントシアニン合成が不要になった時、合成酵素遺伝子の発現を抑制するだけでなく、F-box タンパク質を誘導して合成を初発段階で速やかに止めていると考えられ、F-box 遺伝子はアントシアニンや合成中間体を不本意に蓄積させない目

的があるのかも知れない。一方、イネでの F-box 遺伝子の機能は未解明であったが、本研究期間中に、この F-box 遺伝子がイネ籾殻溝における褐色色素沈着に関わる遺伝子 (*IBFI*) であることを示す論文が発表され、植物種によってはアントシアニン量に顕著に影響することが示された。

また、イネの F-box 遺伝子をタバコで過剰発現させ、花色への影響を調べたところ、着色が1日程度遅れるようであるものの、最終的な花色は視覚的には野生型と差は認められなかった。花卉において CHS 遺伝子は極めて強く誘導されているため、イネ F-box タンパク質では十分に抑制できないのかもしれない。F-box 遺伝子をアントシアニン抑制体の分子育種に応用するには、さらに効果的に作用させるための工夫が必要と考えられる。

## 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 3 件)

Yosuke Fukamatsu, Takayuki Tamura, Seisuke Hihara, and Kenji Oda (2013) Mutations in the CCD4 Carotenoid Cleavage Dioxygenase Gene of Yellow-Flesh Peaches, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 77:2514-2516

Naoki Yokotani, Takanari Ichikawa, Youichi Kondou, Masaki Iwabuchi, Minami Matsui, Hirohiko Hirochika, and Kenji Oda (2013) Role of the rice transcription factor JAmyb in abiotic stress response, *J. Plant Res.*, 126:131-139

Sakihito Kitajima, Toki Taira, Kenji Oda, Katsuyuki T. Yamato, Yoshihiro Inukai, and Yusuke Hori (2012) Comparative Study of Gene Expression and Major Proteins' Function of Laticifers in Lignified and Unlignified Organs of Mulberry, *Planta*, 235:589-601

[学会発表] (計 3 件)

深松洋介、田村隆行、日原誠介、小田賢司、モモ黄肉種に存在するカロテノイド代謝酵素 CCD4 の変異、日本農芸化学会 2014 年度大会

横谷尚紀、市川尚斉、近藤陽一、岩淵雅樹、松井南、廣近洋彦、小田賢司、イネのジャスモン酸応答性 MYB 遺伝子 JAmyb の非生物的ストレス応答への関与、日本農芸会 2012 年度大会

櫻井哲也、篠崎一雄、小田賢司、廣近洋彦、松井南、RiceFOX:イネ完全長 cDNA 高発現シロイヌナズナ変異体表現形質データベース、第 53 回日本植物生理学会年会

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：リゾクトニア菌抵抗性遺伝子  
発明者：森昌樹、前田哲、横谷尚紀、小田賢司、近藤陽一、松井南  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2013-020066  
出願年月日：2013 年 2 月 5 日  
国内外の別： 国内

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小田賢司 (Oda, Kenji)

研究者番号：10344409

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし