

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658006

研究課題名(和文)プリリアントブルー花色植物と新規レポーター遺伝子の開発

研究課題名(英文)Development of brilliant blue flowers and a novel reporter gene

研究代表者

草場 信(Kusaba, Makoto)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20370653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌BPSAタンパク質は、グルタミンを基質とし単独で青色色素であるindigoidineを生産する。ただし、その活性化にはPPTaseによる修飾が必要である。放線菌のゲノムは極端にGCリッチであり、コドン使用頻度に大きな偏りがあることから、コドンをシロイヌナズナの使用頻度に合わせて改変した人工遺伝子を作成、大腸菌に両遺伝子を導入した結果、大腸菌は青色呈色を示した。次に、この改変型遺伝子を植物体に形質転換したが、幼苗の胚軸や花弁ともに青色呈色は確認されなかった。これらのタンパク質が植物体内で作用するには、コドン使用頻度以外の要素の改善が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：BPSA from *Streptomyces lavendulae* converts glutamine into the blue pigment indigoidine. For the activation of BPSA, modification by PPTase is required. The codon usage in *Streptomyces lavendulae* is quite different from that in *Arabidopsis*. We introduced artificial BPSA and PPTase genes with the codon usage similar to that of *Arabidopsis* into *E. coli*, resulting in the blue pigment production. Next, we produced transgenic *Arabidopsis* plants harboring the artificial genes. However, we did not observe the blue pigment production in either hypocotyls or petals in the transgenic *Arabidopsis* plants.

研究分野：育種学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：レポーター遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

花色の人為的な改変は人工交雑や突然変異誘発等により行われてきたが、近年の遺伝子組換えの手法により、青色カーネーションや青色バラが作成され、商品化されている (Tanaka et al., 2010)。ここで用いられた系は橙色・赤色系アントシアニンの前駆体でもある dihydrokaempferol から青色系アントシアニンの前駆体 dihydromyricetin を合成させようというものである。生物由来の青色色素のひとつに indigoidine がある。この色素を白い花弁で合成させることが出来れば、青色花色になることが期待される。indigoidine はレポーター遺伝子として有名な GUS により生成される青色色素 (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo) と似た構造を持っている。GUS の青色の発色には基質として X-Gluc が必要であるが、放線菌の non-ribosomal peptide synthase のひとつ BPSA はグルタミンというありふれたアミノ酸から indigoidine を生産する (Takahashi et al., 2007)。したがって、この遺伝子を白色の花に導入するだけで花色を鮮やかな青色にすることが可能と思われる。

これまで遺伝子発現の組織特異性を調査するためのレポーター遺伝子としては GUS が頻用されてきた。BPSA は全ての細胞の様々な場所に多量に存在するアミノ酸であるグルタミンを基質することなどから、新規レポーター遺伝子としての利用が期待される。BPSA は基質を添加する必要がないことから、非破壊 (生きたまま) の観察が出来る点が GUS に比べて大きな利点となる。

## 2. 研究の目的

これまでに遺伝子組換え技術によって青いカーネーションや青いバラなど、青色の花色を持たない種において青色の花が開発され、商品化もされている。これは赤色系アントシ

アニンの生合成系を改変し、青色系アントシアニン生合成をさせたものである。本課題では、白花色の植物 (品) 種に青色色素である indigoidine を生産させようというものである。基本的には放線菌由来のひとつの酵素による反応 (この酵素の活性化因子も導入が必要) であり、基質はどの細胞にも存在するありふれたアミノ酸であるグルタミンであることから、基質を加える必要のない新規の可視的レポーター遺伝子としての活用も目指す。

## 3. 研究の方法

放線菌 *bpsA* 遺伝子と BPSA タンパク質活性化に必要な *phosphopantetheinyl transferase (PPTase)* 遺伝子をシロイヌナズナにアグロバクテリウム法により導入した。放線菌ゲノムは非常に GC 含量が高く、植物体内でタンパク質が合成されない可能性が高いことから、シロイヌナズナのコードン使用頻度に合わせた人工遺伝子を作成・使用した。基質であるグルタミンは細胞内の様々な場所に存在するが、細胞質、プラスチドなどの様々な細胞内小器官での発現も試みた。プロモーターに関して CaMV35S プロモーターのほか、花弁特異的なプロモーターによるコンストラクトも平行して作成した。

## 4. 研究成果

放線菌 *Streptomyces lavendulae* の non-ribosomal peptide synthetase のひとつである BPSA タンパク質は、グルタミンを基質とし単独で青色色素である indigoidine を生産する。しかしながら、その活性化には phosphopantethein transferase (PPTase: ホスホパンテテン転移酵素) による修飾 (セリン基へのホスホパンテテン付加) が必要である。したがって、植物体で indigoidine を生産させるには放線菌の *PPTase (SVP)* 遺伝子も同時に導入する必要がある。まず放線菌の

BPSAとSVPをCaMV35Sプロモーターでドライブすることにより高発現させるコンストラクトを作成し、シロイヌナズナに形質転換した。しかし、幼苗、花ともに青色呈色は見られなかった。放線菌のゲノムは極端にGCリッチであり、コドン使用頻度に大きな偏りがあることから、シロイヌナズナではmRNAが発現してもタンパク質が効率的に翻訳されない可能性が考えられた。そこでコドンを選択シロイヌナズナの使用頻度に合わせて改変した人工遺伝子を作成した(図1、図2)。BPSA遺伝子は、3849nt(1282aa)の大きさを持つ。アミノ酸置換は含まないように改変されたBPSA遺伝子は放線菌BPSA遺伝子に対し72%の相同性しか持たない。GC含量は放線菌BPSA遺伝子で68.5%であるのに対し、改変型BPSA遺伝子は47.2%であった。

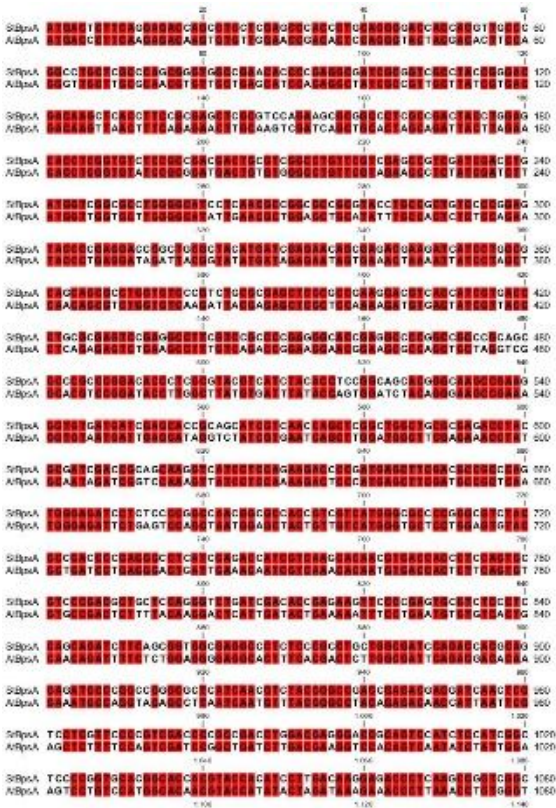


図1. 放線菌BPSA遺伝子とシロイヌナズナ型にコドン使用頻度を改変した人工BPSA遺伝子の相同性。1060ntまでを示す。StBPSAが放線菌BPSA、AtBPSAが改変型BPSAである。



図2. 放線菌SVP遺伝子とシロイヌナズナ型にコドン使用頻度を改変した人工SVP遺伝子の相同性。StSVPが放線菌SVP、AtSVPが改変型SVPである。

同様に改変型SVP遺伝子は741nt(246aa)で放線菌SVP遺伝子に対し、71%の相同性がある。GC含量は放線菌SVP遺伝子は75.2%であるのに対し、改変型SVP遺伝子は56.1%であった。

まず、この改変型BPSAとSVPが青色色素を合成する能力があることを確かめるため、大腸菌に両遺伝子を導入し、発現させた(図3)。その結果、大腸菌は青色呈色を示したことから、改変型BPSAとSVPは正常に機能することが示された。



図 3. シロイヌナズナ型にコドン使用頻度を改変した *BPSA* 遺伝子と *SVP* 遺伝子を形質転換した大腸菌培養液。コントロールは培養に用いた LB 培地。

次に、この改変型遺伝子を CaMV35S プロモーターでドライブしたキメラ遺伝子を植物体に形質転換した。しかし、白色である幼苗の胚軸および花弁においても青色呈色は確認されなかった。花弁特異的プロモーターを用いても同様であった。さらにそれぞれに葉緑体移行シグナルを付加し、葉緑体にターゲットされた形で発現させたが、やはり青色呈色は見られなかった。これらのタンパク質が植物体内で作用するには、コドン使用頻度の違い以外の要素の改善が必要と考えられた。

#### 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 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

草場 信 (KUSABA MAKOTO)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20370653

