

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292025

研究課題名(和文) 花卉におけるクロロフィル代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of chlorophyll metabolism in flower petals.

研究代表者

大宮 あけみ (Ohmiya, Akemi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門花き遺伝育種研究領域・主席研究員

研究者番号：50355715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの転写因子のcDNAのみで構成されたライブラリーを用いたイーストワンハイブリッドにより、クロロフィル代謝の鍵酵素遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子を複数獲得した。その中で、SGR1, SGR2, NYC1およびPa0のプロモーター領域に共通に結合する転写因子ANACO46に着目し、さらに解析を進めた。その結果、ANACO46は、クロロフィル分解関連遺伝子の発現制御により葉の老化に関与していることが明らかになった。さらに、ANACO46の機能抑制コンストラクトをペチュニアに導入し、ANACO46が異種植物においてもクロロフィルの分解制御に働くことを示した。

研究成果の概要(英文)：We have searched for transcription factor(s) that bind to the promoter region of chlorophyll metabolic genes using a library composed only of transcription factor cDNAs of Arabidopsis. Among transcription factors identified by the screening, we focused on ANACO46 that specifically bound to the promoters of chlorophyll catabolic genes including SGR1, SGR2, NYC1 and Pa0. Analysis of mutant and transgenic ANACO46 plants showed that ANACO46 is a positive regulator of leaf senescence and exerts its effect by controlling the expression of Chl catabolic genes and senescence-associated genes. Transgenic petunia plants introduced ANACO46-SRDX construct showed a marked increase in chlorophyll content in their flowers, indicating that ANACO46 function as a positive regulator of chlorophyll degradation in petunia plants.

研究分野：二次代謝

キーワード：chlorophyll transcription factor senescence

1. 研究開始当初の背景

(1) クロロフィルは光合成において重要な役割を果たす化合物で、葉や茎などの緑色組織には多量に蓄積している。一方、花卉では、鮮やかな花色を発現するためにクロロフィルを貯めないしくみが働いている。しかし、どのようなメカニズムで葉と花卉においてクロロフィルの蓄積量の違いが生じているのかという点に関して、科学的な知見は乏しい。

(2) クロロフィルの生合成および分解には全部で 23 の酵素が関与している。近年シロイヌナズナ等のモデル植物の葉において、これらの酵素の遺伝子のクローニングや機能解析が急速に進められている¹⁾。しかし、花卉を対象にクロロフィル代謝について解析した例はこれまで報告がない。さらに、クロロフィル代謝関連遺伝子の発現を組織特異的に制御する機構に関してこれまでほとんど研究が行われていない。

2. 研究の目的

マイクロアレイ解析によりクロロフィルの代謝・蓄積関連遺伝子の発現を網羅的に精査し、花卉のクロロフィル量の制御に重要な役割を果たす鍵因子を特定する。さらに鍵因子の発現を組織特異的に正または負に制御している転写因子を探索し、その機能を解析することにより、花卉におけるクロロフィルの蓄積制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 緑色花色の花き品種は、キク、カーネーション、トルコギキョウ、ランなど限られた品目にのみ存在する。これらの品目のなかで、花き研究所において EST 情報の整備が終了しているカーネーション、キクおよびトルコギキョウを材料に用いる。EST 情報を基にマイクロアレイ解析を行い、クロロフィルの代謝・蓄積関連遺伝子の発現を緑色花卉、白色花卉および葉と比較することで、緑色形成の鍵因子を特定する。

(2) シロイヌナズナの転写因子ライブラリーを用いた yeast one-hybrid (Y1H) 法により、クロロフィルの分解および生合成酵素遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子を特定する。得られた転写因子について、プロモーター結合能の解析、発現様式の解析、過剰発現および機能抑制した形質転換植物の表現型の解析、複合体構成因子の特定、発現の組織特異性、異種植物での過剰発現系の解析等、多方面からのアプローチを展開することで、クロロフィル代謝制御における役割を明らかにする。

(3) 特定したクロロフィル代謝制御の鍵因子遺伝子や転写因子遺伝子をペチュニア等の花きへ導入し、緑色花色を持つ花きを作成す

る。

4. 研究成果

(1) カーネーションの白色花卉、緑色花卉および葉におけるクロロフィル代謝関連遺伝子の発現をマイクロアレイ解析により比較した。その結果、緑色花卉ではクロロフィル生合成系酵素遺伝子の発現が葉と同様に高い傾向にあったが、白色花卉では複数の酵素遺伝子の発現が著しく低かった。分解系の遺伝子は葉よりも花卉で顕著に高く、特に stay-green protein (SGR) およびフェオフィチナーゼ遺伝子 (PPH) の発現は緑色花卉および白色花卉ともに高かった。キクおよびトルコギキョウでは、生合成経路で働く大半の酵素遺伝子の発現が花卉において葉よりも顕著に低かった。白色花卉に比べて緑色花卉では発達後期に発現が高い傾向にあった。分解関連の遺伝子の中で、特に SGR の発現が花卉において葉よりも高かった。緑色花卉と白色花卉で分解系遺伝子の発現に大きな差はなかった。以上の結果から、花卉では低い生合成活性と高い分解活性のバランスにより、葉よりもクロロフィル量が少ない状態が考えられていると考えられた。また、緑色花卉では白色花卉よりも生合成活性が高いことが、クロロフィルを蓄積している要因の一つであることが示唆された。

(2) シロイヌナズナの転写因子ライブラリーを用いた Y1H スクリーニングにより、クロロフィル分解に関与する酵素遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子の探索を行った。

NYC1, NOL, HCAR, PPH, PaO, RCCR, CYP89A9, MES16, SGR1, および SGR2 のプロモーター領域をバイトにしてスクリーニングを行った結果、各プロモーターに結合活性を示す転写因子を総計 94 同定した。

この中で NYC1, SGR1, SGR2, および PaO のプロモーター領域に、共通に結合する転写因子 ANAC046 に着目し、さらに詳細に解析を行った。ANAC046 は、これらのプロモーター領域に結合することを *in vivo* および *in planta* で確認した(図 1)。

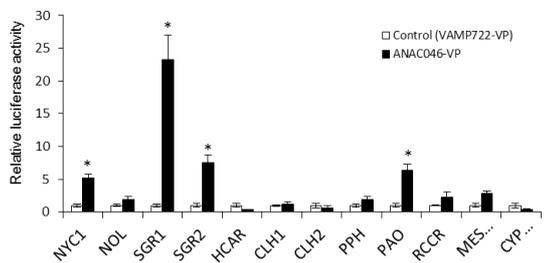


図 1 In Planta 法による ANAC046 のクロロフィル分解系遺伝子のプロモーターへの結合活性の測定

ANAC046 の過剰発現体は、非形質転換体と比較して植物体は小さく、根は短かった。マイクロアレイ解析を行った結果、過剰発現体では *NYCI*、*SGR1*、*SGR2*、および *PaO* の発現が非形質転換体より有意に高かった。また、*SAG12* や *SAG13* 等の老化関連遺伝子の発現も有意に高かった(図2)。機能抑制体および遺伝子破壊系統では暗処理によるクロロフィルの分解が抑えられ、老化が遅延した。以上の結果から、得られた転写因子はクロロフィル分解関連遺伝子の発現制御により老化に関与していると考えられた。

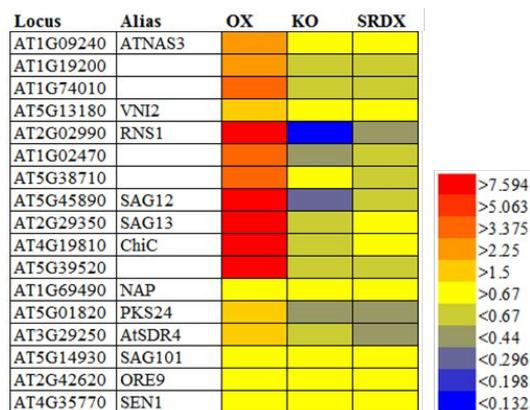


図2 ANAC046 過剰発現体(OX)、遺伝子破壊系統(KO)および機能抑制体(SRDX)における老化関連遺伝子の発現

クロロフィル生合成酵素遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子についてもY1H法によるスクリーニングを行った。その結果、*CHLH*、*CRD*、*PORC* のプロモーター領域に共通に結合する転写因子を見いだした。この転写因子の過剰発現コンストラクトおよび機能抑制コンストラクトを作製し、シロイヌナズナに導入した。得られた転換体の表現型の解析は課題終了後も行う予定である。

(3) 花弁のクロロフィル量を改変する目的で、ANAC046 の機能抑制コンストラクトおよび過剰発現コンストラクトをペチュニアに導入した。その結果、花弁のクロロフィル量が過剰発現体は減少したのに対し、機能抑制体では増加し、黄緑色になった(図3)。発現解析の結果、機能抑制体では *SGR* および *NYCI* の遺伝子発現が非形質転換体と比較して顕著に減少していた。これらの結果から、機能抑制体の花弁では、クロロフィル分解関連の遺伝子発現が抑制され、分解量が減少したため非形質転換体よりもクロロフィルを多く蓄積するようになったものと考えられる。このことから、シロイヌナズナの ANAC046 は異種植物においてもクロロフィル分解の制御に働くことが明らかになった。また、ANAC046 は、組織のクロロフィル量を改変するための遺伝子ツールとして利用可能であることが示された。

非形質転換体 過剰発現体 機能抑制体
WT OX SRDX



図3 ANAC046 の過剰発現コンストラクトおよび機能抑制コンストラクトを導入したペチュニア形質転換体の花

<引用文献>

1) Masuda T and Fujita Y (2008) Regulation and evolution of chlorophyll metabolism. *Photochem Photobiol Sci* 7: 1131-1149.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Oda-Yamamizo C, Mitsuda N, Sakamoto S, Ogawa D, Ohme-Takagi M, Ohmiya A. (2016) The NAC transcription factor ANAC046 is a positive regulator of chlorophyll degradation and senescence in Arabidopsis leaves. *Sci. Rep.* 6:23609.

Ohmiya, A., Hirashima, M., Yagi, M., Tanase, K., Yamamizo, C. (2014) Identification of genes associated with chlorophyll accumulation in flower petals. *PLoS ONE* 9: e113738.

[学会発表](計5件)

大宮あけみ 花弁におけるクロロフィルの蓄積制御機構 植物色素談話会 2016.6.11 筑波実験植物園(つくば市)

山溝千尋・能岡智・光田展隆・大宮あけみ クロロフィル分解関連遺伝子の発現を制御する転写因子を用いたペチュニアの花弁改変 園芸学研究 14(別2),249 2015.9.26 徳島大学(徳島市)

堀川あゆ美・小田桃子・山溝千尋・大宮あけみ・市川裕章・太田垣駿吾・松本省吾・白武勝裕花弁緑色化を目指した花きの分子育種 園芸学研究 14(別2),514 2015.9.26 徳島大学(徳島市)

山溝千尋、光田展隆、坂本真吾、小川大輔、高木優、大宮あけみ クロロフィル分解関連遺伝子の発現を制御する転写因子の探索 第55回日本植物生理学会年会 2015.3.16 東京農大(東京都世田谷区)

大宮あけみ・住友克彦 キクの緑花品種と白花品種の花弁における色素体の微細構造 園芸学研究 13(別1),422 2014.3.29 筑波大学(つくば市)

[図書](計0件)

[その他](計0件)

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大宮 あけみ (OHMIYA, Akemi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・野菜花き研究部門・花き遺伝育
種研究領域・主席研究員

研究者番号：50355715

(2) 研究分担者

光田 展隆 (MITSUDA, Nobutaka)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・
生物プロセス部門・主任研究員

研究者番号：80450667

岸本 早苗 (KISHIMOTO, Sanae)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・野菜花き研究部門・花き遺伝育
種研究領域・上級研究員

研究者番号：70355717