

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：81202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660030

研究課題名(和文)3-デオキシアントシアニン生合成経路の解明と代謝制御による新規花色創出

研究課題名(英文)Elucidation of 3-deoxyanthocyanin biosynthetic pathway and genetic engineering of novel flower color

研究代表者

西原 昌宏(Nishihara, Masahiro)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・研究部長

研究者番号：20390883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：3-デオキシアントシアニンの一部の植物種に存在する希なフラボノイド色素であり、通常の植物が生産する3-ヒドロキシアントシアニンと比較して安定な色素である。その鮮やかな色(赤褐-橙色)を利用した花色改変を目的にイワタバコ科植物シンニンギアの解析を行った。また、トレニアにおいてフラバノン3水酸化酵素遺伝子の変異体を同定し、シンニンギアとソルガムの関連遺伝子を用いて形質転換を行った結果、花色変化(クリーム-薄紅色)が認められた。花卉のLC-MS解析により、3-デオキシアントシアニン(Apigeninidin 5-O-glucoside)の蓄積が確認され、本色素による花色改変が可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：3-deoxyanthocyanins are rare plant anthocyanins found in a limited plant species. We attempted to elucidate the 3-deoxyanthocyanin biosynthetic pathway in *Sinningia cardinalis* for genetic engineering of flower color using these rare pigments. To this end, the flowers of *S. cardinalis* were subjected to RNA-seq analysis and expression profiles of the related genes were acquired. Next, we analyzed a white-flowered *toenia* cultivar (Crown White) and identified three mutations including flavanone 3-hydroxylase (F3H) gene which suppression is prerequisite for accumulation of 3-deoxyanthocyanins. By the transformation of Crown White with related genes of *Sinningia* and sorghum, some transgenic *toenia* plants showed cream to light-pink flowers. LC-MS analysis indicated that successful accumulation of 3-deoxyanthocyanin (apigeninidin 5-O-glucoside) in the petals. These results demonstrated that genetic engineering of flower color by 3-deoxyanthocyanin pigments was possible in higher plants.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：フラボノイド 3-デオキシアントシアニン 花色 シンニンギア 遺伝子工学 トレニア タバコ

1. 研究開始当初の背景

フラボノイドの一種であるアントシアニンは植物に広く存在する色素であり、花、果実、葉、塊茎等の様々な器官における発色の要因となっている。その生合成経路は詳細に解析されており、遺伝子工学的手法による花色変化の例も多く報告されている。一方、一部の植物種やコケ類においてはC環の3位に水酸基を持たない3-デオキシタイプのアントシアニンを蓄積することが知られているが、その生合成経路の全容は明らかとなっていない。特に、イワタバコ科植物種の一部の花弁で蓄積する3-デオキシアントシアニン(3-dAnt)は赤褐色～橙色の色調を示すため、本色素を利用したエンジニアリングはそれらの花色調を有しない植物種における花色変化に有効であると考えられる。これまでのところ3-デオキシアントシアニンの生合成にはフラバノン還元酵素遺伝子(*FNR*)と3-デオキシアントシアニン特異的配糖化酵素遺伝子(*5GT*)が関与することが報告されている。*FNR*はジヒドロフラボノール4-リダクターゼ(*DFR*)と同一遺伝子がコードすると推定されている。さらに、3-デオキシアントシアニンの蓄積にはフラバノンの触媒酵素であるフラバノン3水酸化酵素遺伝子(*F3H*)の活性抑制が必須であると考えられている。

2. 研究の目的

3-デオキシアントシアニン生合成経路の解明を行い、本生合成に関わる酵素遺伝子を明らかにする。さらに、3-デオキシアントシアニンを生産する植物を遺伝子工学的手法により作出し、その特性を解析することで本色素を利用した花色エンジニアリングの可能性を探る。また、3-デオキシアントシアニンのエンジニアリング法に加えて、本色素の蓄積に必須である*F3H*変異体の解析、作出法について検討する。

3. 研究の方法

(1)イワタバコ科植物シニンギア(*Sinnigia cardinalis*)花弁を用いて3-デオキシアントシアニンの生合成に関わる酵素遺伝子の単離を行う。白花変異系統と野生系統を用いて、RNA-seq解析を行い、遺伝子発現プロファイルを取得する。その中から3-dAnt生合成に関わると推定される候補遺伝子の単離、発現解析を行い、後述の形質転換実験に供試する。

(2) *F3H*抑制植物の探索と解析、*F3H*変異系統の作出

トレニア白花系品種(Crown White)の色素解析、発現解析、ゲノム配列解析を行い、突然変異の原因を解明する。本白花系統は*F3H*の発現低下が観察されており、当研究における形質転換ホストの第一候補である。さらに、タバコにおいては*F3H*変異体を見い出せなかったため、RNAiによる抑制用バイナリーベクターを構築し、タバコ品種SR1の形質転換を

行い、*F3H*抑制系統を作出する。

(3) 3-デオキシアントシアニン生合成経路の改変による花色改変植物の作出

上記解析で得られた候補遺伝子と植物ホストを用いて形質転換実験を行い、3-dAntの蓄積による花色改変系統の作出を行う。得られた形質転換系統について、花色の観察と発現解析、HPLC-MS分析により、3-dAntの蓄積を調査する。

4. 研究成果

(1) イワタバコ科植物シニンギアの解析

赤花シニンギア及び白花変異体シニンギアの花弁RNAを用いてIllumina社HiSeq2000によりRNA-seq解析を行った。赤、白花弁とも約50億塩基対配列データが得られた。アセンブル後、Unigeneとして赤花19,506(平均長454bp)、白花19,679(平均長454bp)が獲得された。本配列を用いてバイオインフォマティクス解析によるCDS配列の予測、GOアノテーションを行った。得られた配列の中には既知の*DFR/FNR*、*ANS*、*F3H*等のフラボノイド生合成関連遺伝子に加えて、これまでシニンギアで報告されていない*CHS*、*CHI*、*FNSII*、*F3'H*、*ANR*等の候補遺伝子が含まれていた。ソルガムではAnthocyanidin reductase様酵素が3-デオキシアントシアニンの生合成に関わる可能性が報告されており、相同検索により*ANR-like*遺伝子の探索を行った結果、シニンギア花弁から5種類(*ScANR-like1*~*like5*)の遺伝子が見いだされた(図1)。cDNAの単離を試みた結果、*ScANR-like1*以外の4遺伝子の全長cDNAが単離され、RT-PCRによる発現解析によっても花弁での発現が認められた(図2)。

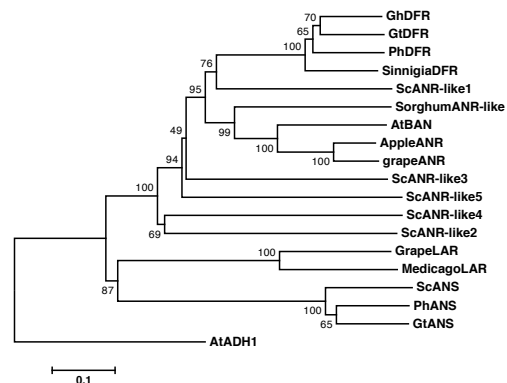


図1 シニンギア ANR-like 遺伝子の系統解析

なお、シニンギア白花変異体においては、*CHS*遺伝子の発現抑制が見られたため(図2)、イントロンとプロモーター領域(ATG上流1,662bp)の配列を決定し比較したが、赤と白で差が認められなかった。このことから、*CHS*遺伝子の発現抑制はエピジェネティック変異あるいは上流の転写制御因子の変異である可能性が示唆された。

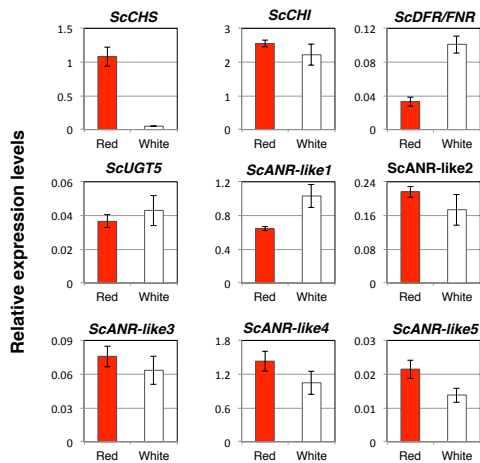


図2 RT-PCRによる発現解析

(2) *F3H* 抑制植物の探索と解析、*F3H* 変異系統の作出

① 白花トレニアの解析

紫花トレニア (Crown Violet) と白花トレニア (Crown White) の花弁におけるフラボノイド生合成関連遺伝子の発現解析を行った結果、白花において *F3H* 遺伝子のみ発現抑制が認められた。また、色素解析の結果から、フラボンの Luteolin が検出されず、本変異系統はフラボノイド 3' 水酸化酵素遺伝子 (*F3'H*)、フラボノイド 3', 5' 水酸化酵素遺伝子 *F3'5'H* の変異の可能性も示唆された。そこで、これら 3 遺伝子のゲノム構造の解析を行った結果、白花では *F3H* 遺伝子のプロモーター領域に 3, 464bp のレトロトランスポゾン様配列 (*TORE1*) の挿入が認められ、本白花変異の原因と推定された。*F3H* プロモーターのデリジョンアッセイを行った結果、本挿入配列によりプロモーター活性の低下が認められた。さらに、本白花トレニアにリンドウの *F3H* 遺伝子を導入した形質転換体を作出したところ、花色が復帰したことより、本白花トレニアの変異は *F3H* の発現抑制によるものであることが確認された。本変異以外に *F3'H*、*F3'5'H* にもデリジョン変異が認められ、本変異体は三重変異体であることが示された (引用文献①)。そこで本白花品種を用い、3-デオキシアントシアニンによる花色改変を試みた。

② *F3H* 遺伝子抑制タバコ形質転換体の作出

タバコにおいては *F3H* 変異体を見いだすことができなかったため、RNAi による抑制を試みた。タバコ *F3H* 遺伝子の約 600bp を hairpin 構造として発現するバイナリーベクターを構築し、タバコ品種 SR1 に導入したところ、15 系統中 4 系統で花色の抑制系統が得られた (図 3)。自殖により T₂ 種子を採種し、最も薄い花色を示した 1 系統のホモ系統 (No. 15-3) を用いて 3-デオキシアントシアニンによる花色改変を試みた。さらに、ゲノム編集技術

(CRISPR/Cas9) により *F3H* 遺伝子をターゲットに花色抑制を行った系統を作出した。



図3 タバコ *F3H* 抑制系統 (左 SR1, 右 RNAi)

(3) 3-デオキシアントシアニン生合成経路の改変による花色改変植物の作出

3-デオキシアントシアニン蓄積による花色改変を目的に以下の 5 種類のバイナリーベクターを構築した。シンニンギア *FNR/DFR*、シンニンギア *ScUGT5* に加えて、シンニンギア *ANR-like1~4*、ソルガム *ANR-like* のいずれかを有するベクターにより、トレニア (Crown White) 及びタバコ (*F3H*-RNAi) 系統の形質転換を行った。

その結果、トレニアにおいて、シンニンギア *FNR/DFR*、*ScUGT5*、ソルガム *ANR-like* を有するバイナリーベクターを導入した 17 系統中 6 系統において花色の変化 (クリーム～薄紅色) が認められた。代表的な系統を図 4 に示す。また、発現解析により、導入した遺伝子の発現が認められた。さらに色素解析により、形質転換体の花弁には 3-デオキシアントシアニンの一種である apigeninidin 5-*O*-glucoside の存在が確認された (図 5)。また、カルコン誘導体と思われるピークも観察された。他系統については現在、解析中である。



図4 トレニア形質転換体の花色

左 導入元 真ん中、右 形質転換体 No. 2, 3

一方、タバコにおいてはほとんどの系統は感染宿主である *F3H* RNAi 系統の花色とかわらず、LC-MS 解析によっても 3-デオキシアントシアニンのピークは認められなかった。一部の系統においてはピンク色の復帰が認められたが、RNAi による *F3H* 抑制が解除されたものと考えられた。そこで、今後は CRISPR/CAS9 により作出した *F3H* 遺伝子の完全ノックアウト個体を用いて形質転換を進める予定である。

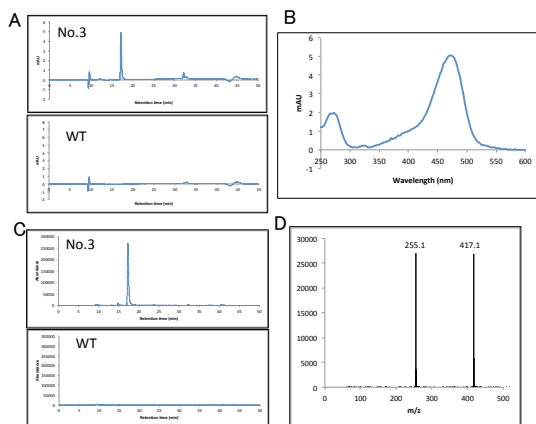


図5 トレニア形質転換花卉のHPLC解析

A HPLC (480nm) B ピークの吸収スペクトラム
C LC-MS解析 D ピークのLC-MS/MS解析

<引用文献>

- ① Nishihara, M., Yamada, E., Saito, M., Fujita, K., Takahashi, H., Nakatsuka, T. (2014) Molecular characterization of mutations in white-flowered torenia plants. *BMC Plant Biology* 14:86

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 1 件)

- ① Nishihara, M., Yamada, E., Saito, M., Fujita, K., Takahashi, H., Nakatsuka, T. (2014) Molecular characterization of mutations in white-flowered torenia plants. *BMC Plant Biology* 14:86 (査読あり) DOI: 10.1186/1471-2229-14-86

[学会発表] (計 7 件)

- ① 西原昌宏、田崎啓介、樋口敦美、藤田晃平、黒川良美、高橋秀行、佐々木伸大 (2016) CRISPR/Cas9 システムによるタバコ及びトレニアの花色改変 日本植物生理学会第 57 回年会 岩手大学上田キャンパス 2016 年 3 月 18 日～20 日
② 西原昌宏、樋口敦美、藤田晃平、田崎啓介、黒川良美、高橋秀行、佐々木伸大 Application of CRISPR/Cas9 System for Modification of Flower Colors in Tobacco and Torenia Plants. Plant and Animal Genome XXIV Conference, San Diego, USA 2016 年 1 月 9 日～13 日
③ 西原昌宏 リンドウの花色生合成機構の解明と新規花色創出へ向けての取組み 第 52 回植物化学シンポジウム「オミクス解析を用

いた有用な遺伝子・代謝産物の探索と活用」東京大学薬学部講堂 2015 年 11 月 13 日

④ 西原昌宏、山田恵理、藤田晃平、佐々木伸大、高橋秀行 植物の稀少色素 3-デオキシアントシアニンを利用した花色改変手法の開発 日本植物生理学会第 56 回年会 東京農業大学世田谷キャンパス 2015 年 3 月 16 日～18 日

⑤ 山田恵理、中塚貴司、齋藤美沙、藤田晃平、高橋秀行、西原昌宏 白花トレニアの変異原因遺伝子の同定 日本植物細胞分子生物学会第 32 回大会・シンポジウム アイーナ (いわて県民情報交流センター) 2014 年 8 月 21 日～22 日

⑥ 西原昌宏、山田恵理、藤田晃平、千葉恵美子、高橋秀行、佐々木伸大 イワタバコ科植物シンニンギアの花色素発色機構の解明と花色改変への応用 日本植物細胞分子生物学会第 32 回大会・シンポジウム アイーナ (いわて県民情報交流センター) 2014 年 8 月 21 日～22 日

⑦ 西原昌宏、山田恵理、藤田晃平、佐々木伸大 RNA-seq によるイワタバコ科植物シンニンギア花卉のトランスクリプトーム解析 日本植物生理学会第 55 回年会 富山大学五福キャンパス 2014 年 3 月 18 日～20 日

[図書] (計 1 件)

- ① 下田武志、西原昌宏、有村源一郎 (2014) 植物の香りと色の代謝工学が拓く新時代 B&I バイオサイエンスとインダストリー 72: 197-202

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 1 件)

名称：3-デオキシ型アントシアニン配糖化酵素遺伝子とその利用
発明者：中塚貴司、阿部善子、柿崎裕子、西原昌宏
権利者：岩手県
種類：特許
番号：特許第 5279304 号
取得年月日：平成 25 年 5 月 13 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等
<http://www.ibrc.or.jp/>
<http://gentian.ibrc.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西原昌宏 (NISHIHARA, Masahiro)
(公財) 岩手生物工学研究センター
園芸資源研究部 研究部長
研究者番号 : 24380024

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

山田恵理 (YAMADA, Eri)
藤田晃平 (FUJITA, Kohei)