

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05574

研究課題名（和文）アントシアニン着色変動遺伝子の特定とそのエピジェネティックなメカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on unstable anthocyanin pigmentation genes and epigenetic mechanisms

研究代表者

大野 翔（OHNO, Sho）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：10722001

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：アントシアニンを蓄積するトウガラシ 'Peruvian Purple' から枝変わりによって生じた着色変動性を示すUP系統の着色変動メカニズムを解析した。着色変動の原因遺伝子はアントシアニン生成の転写因子CaMYBAを含む約1Mbの領域に座乗することが示唆された。CaMYBAに挿入しているレトロトランスポゾンLINE-1の5'末端領域のDNAメチル化と着色に相関がみられたことから、この領域のDNAメチル化の変動がUP系統の着色変動性に関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

園芸植物において、同じ遺伝背景を有しながらも異なる表現型を示すことが多くあり時には問題となるが、その多くで詳細なメカニズムは明らかになっていない。本課題ではそのモデルとして、突然変異により着色変動性を示すようになったトウガラシのUP系統の着色変動メカニズムを解析している。本研究によって、着色変動に関わると考えられるDNAメチル化領域を特定することができ、さらにMcrBC-PCRによる判別マーカーも作出できたことから、今後さらに研究を進めることで環境要因が及ぼすエピジェネティックな影響を解析できるようになったと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, the mechanism of unstable anthocyanin pigmentation was analyzed in the UP line, which exhibits color variation in flowers due to lateral mutant of anthocyanin-accumulating chili pepper 'Peruvian Purple'. It was suggested that the gene responsible for the unstable anthocyanin pigmentation was mapped on an approximately 1 Mb region containing the positive anthocyanin regulating transcription factor CaMYBA. Since there was a correlation between anthocyanin pigmentation and DNA methylation in the 5'-terminal region of the retrotransposon LINE-1 inserted into CaMYBA, it was suggested that variations in DNA methylation in this region are involved in the unstable anthocyanin pigmentation of the UP line.

研究分野：園芸科学

キーワード：トウガラシ アントシアニン エピジェネティクス MYB転写因子 レトロトランスポゾン DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

トウガラシ (*Capsicum annuum*) 'Peruvian Purple' はアントシアニンを蓄積し安定して紫花となる固定品種である。ある冬季に、枝変わり様にアントシアニンを蓄積しない白花・緑葉を着生し、この枝変わりの自家受粉後代 (Unstable Pigmentation 系統: 以下 UP 系統とする) は同一個体内において紫花・白花・紫と白の複色花を同時に着生した (第 1 図)。詳細に観察すると、複色の場合も着色面積は一定せず、0-100% の間で変動していた。通常の品種では着色は安定するため、UP 系統では枝変わりによってアントシアニン量が変動する『着色変動遺伝子』を生じたと考えられた。



第 1 図 UP 系統における花の着色変動
同一日に同一個体に着生した花。左上が紫花，右上が白花

トウガラシの花色は *Anthocyanin* (A) 遺伝子座によって制御される (Wang・Bosland, 2006)。UP 系統を着色しない 'タカノツメ' と交雑すると、 F_1 は白～複色 (0-50%) の着色変動を示し、 F_2 では白：白～複色 (0-50%)：白～紫 (0-100%) = 1:2:1 の分離比となった。もし、『着色変動遺伝子』と A 遺伝子座が独立であればこの F_2 集団では紫花個体が出現するはずであるが実際には出現しなかったことから、『着色変動遺伝子』は A 遺伝子座と強く連鎖していると考えられた。したがって、枝変わりによって生じた『着色変動遺伝子 (UP)』は着色割合を 0-50% の間で変動させる遺伝子で、UP 系統は *UP/UP* の遺伝子型となり 0-100% の間で着色が変動していると考えられた。よって、UP 系統に生じた変異を解明することで『着色変動遺伝子』を特定できると考えた。

2. 研究の目的

UP 系統における着色変動性は後代に安定して遺伝することから、枝変わりによって着色変動性を獲得する突然変異を生じたと考えられた。紫花・複色花・白花が同一個体内で同時に観察されることから、着色変動自体は着色遺伝子のエピジェネティックな変化によって生じていると考えられた。したがって、UP 系統では着色遺伝子のエピジェネティックな変化を誘導することで着色変動性を引き起こす突然変異を生じたと考えられた。そこで本研究では、この『着色変動遺伝子』の特定と着色を制御するエピジェネティックなメカニズムの解明を目的とする。具体的には以下の 3 つである。

実験 1: 『着色変動遺伝子』のマッピング

実験 2: *CaMYBA* 近傍領域のエピジェネティクス解析

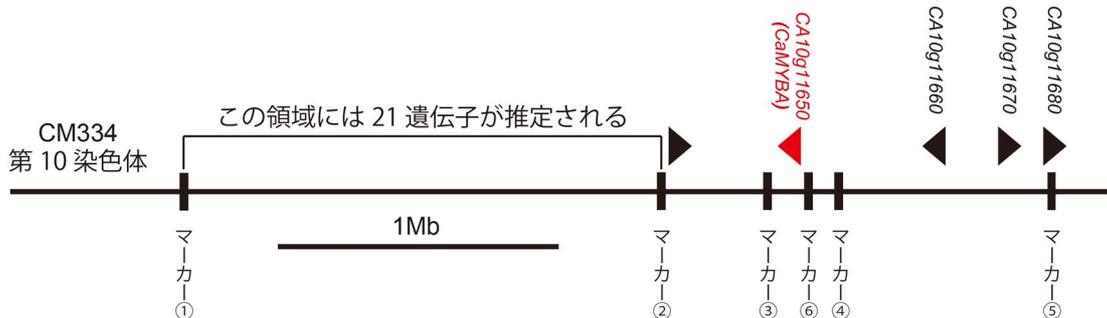
実験 3: 着色変動を制御する環境要因の探索

3. 研究の方法

<実験 1: 『着色変動遺伝子』のマッピング>

『着色変動遺伝子』は第 10 染色体上の *CaMYBA* と強く連鎖したが、UP 系統と元品種である 'Peruvian Purple' の *LINE-1* を含む *CaMYBA* ゲノム配列には違いがなかったことから、

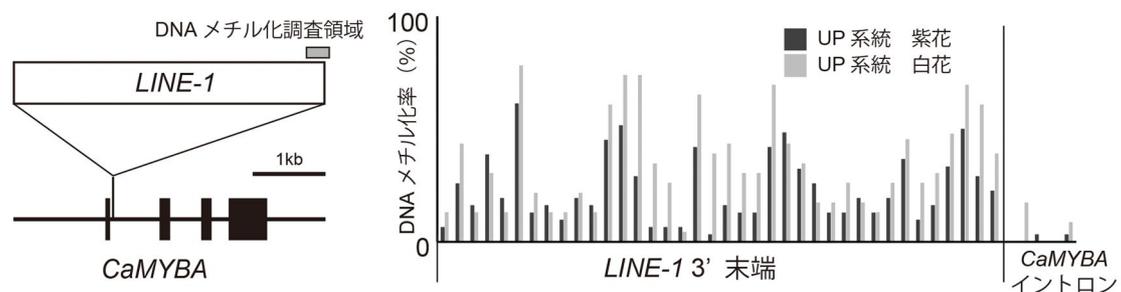
CaMYBA の近傍領域に何らかの変異を生じた可能性が考えられた。そこで‘UP 系統’×‘紫とうがらし’の F₂ 集団を用いて『着色変動遺伝子』のマッピングを行った。‘Peruvian Purple’ および‘紫とうがらし’のリシーケンスデータを‘CM334’を参照ゲノム配列として解析した結果、*CaMYBA* の近傍約 3Mb において少なくとも 27 の SNP があり、そのうちの 6 つをマーカー化できたため（第 2 図）、これらのマーカーを用いて‘UP 系統’×‘紫とうがらし’ F₂ 集団において『着色変動遺伝子』のマッピングを行った。



第 2 図 ‘Peruvian Purple’ と‘紫とうがらし’間で作成した CAPS マーカーと座乗する遺伝子の位置

< 実験 2 : *CaMYBA* 近傍領域のエピジェネティクス解析 >

UP 系統の紫花 (UP-P) と白花 (UP-W) の遺伝子発現解析を行うと、*CaMYBA* といくつかの酵素遺伝子の発現量に差があり、転写因子である *CaMYBA* の発現変動が着色変動を引き起こしていると考えられた。*LINE-1* 挿入箇所の 3' 末端領域約 300 bp の DNA メチル化をバイサルファイト PCR で解析したところ、UP 系統の白花では紫花と比較して CHH メチル化がやや高かった（第 3 図）。したがって、UP 系統内における着色程度の違いには DNA メチル化の変化が関与していると考えられた。そこで、エピジェネティックな変化を解析するために、UP 系統の紫花および白花、元の系統である‘Peruvian Purple’の紫花を供試して *McrBC*-PCR を行い *CaMYBA* 領域における DNA メチル化を比較した。また、*McrBC*-PCR によって差が見られた領域に関してはバイサルファイト PCR で解析した。さらに、UP 系統の紫花および白花について RNA-seq により発現変動遺伝子を網羅的に解析した。



第 3 図 *CaMYBA* に挿入している *LINE-1* の CHH サイトの DNA メチル化率 *LINE-1* の 3' 末端 38 か所、隣接する *CaMYBA* のイントロン 5 か所の DNA メチル化率を調査した

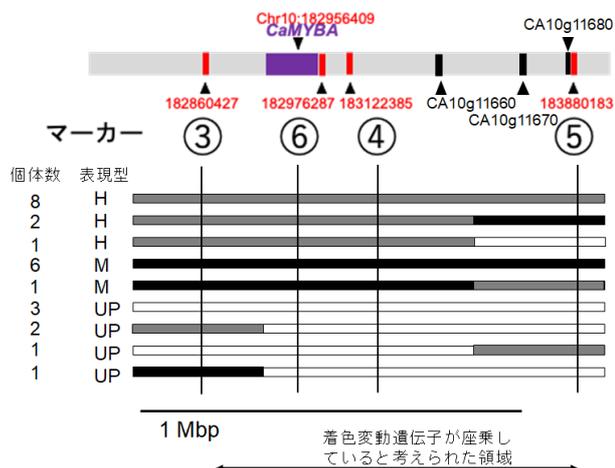
< 実験 3 : 着色変動を制御する環境要因の探索 >

圃場や温室で UP 系統を栽培すると着色変動性が顕著に観察されるが 20 あるいは 26 一定のインキュベーター内で花色を 5 か月間継続的に調査したところ、12 個体中 10 個体で白花のみを着生し、着色変動性を示さなかった。このことは温度の変動が着色変動性を誘導している可能性を示唆している。そこで、変温あるいは温度一定に設定したインキュベーターで UP 系統を育成し、着色変動を制御する環境要因を探索した。

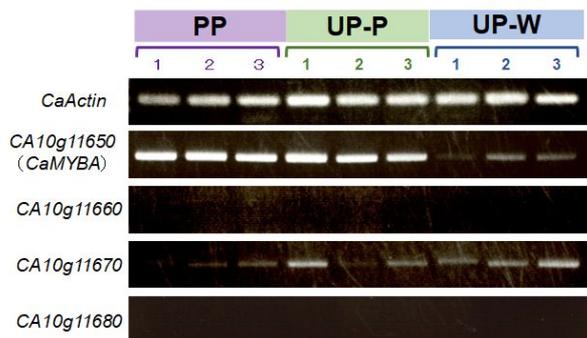
4. 研究成果

<実験 1: 『着色変動遺伝子』のマッピング>

着色変動性を示す UP 系統と安定着色を示す‘紫とうがらし’との F₂ 集団 628 個体を用いて着色変動遺伝子のマッピング解析を行った。用いたマーカー間において遺伝的組換えを生じていた 25 個体の結果から、『着色変動遺伝子』は *CaMYBA* 含む約 1Mb の領域に座乗していることが示唆された(第 4 図)。この候補領域には *CaMYBA* を含む 4 つの遺伝子があると推定されたため、これらの 4 遺伝子の発現解析を行ったところ、*CaMYBA* のみが着色変動と相関がみられた(第 5 図)。したがって、『着色変動遺伝子』は *CaMYBA* である可能性が高いと考えられた。UP 系統と元品種である‘Peruvian Purple’の *LINE-1* を含む *CaMYBA* ゲノム配列には違いがなかったことから、塩基配列の変異ではなくエピジェネティックなメカニズムが関与していると考えられた。



第 4 図 着色変動遺伝子のマッピング
 M: 紫色花のみを着生, H: 紫色-複色花を着生, UP: 紫色-複色-白色花を着生. 黒色領域: ‘紫とうがらし’遺伝子型ホモ, 灰色領域: 遺伝子型ヘテロ, 白色領域: UP 遺伝子型ホモ.



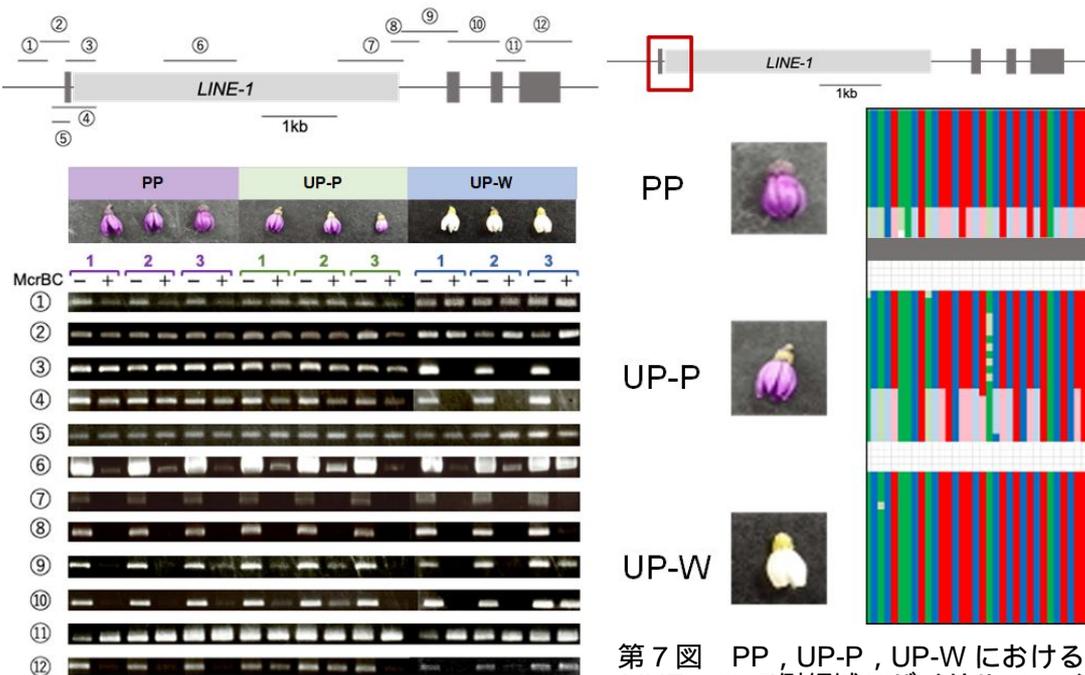
第 5 図 マーカー から の間に存在する遺伝子の発現解析
 CA10g11650: *CaMYBA*
 CA10g11660: *transcription factor MYB113-like*
 CA10g11670: *neurofilament medium polypeptide-like*
 CA10g11680: *uncharacterized protein*

<実験 2: *CaMYBA* 近傍領域のエピジェネティクス解析>

CaMYBA 領域の DNA のメチル化を調査するために, ‘Peruvian Purple’の紫花 (PP)・UP 系統の紫花 (UP-P)・UP 系統の白花 (UP-W) を供試して, *McrBC*-PCR 解析を行った。その結果, *CaMYBA* に挿入している *LINE-1* の 5' 領域において白花においてのみ強く DNA のメチル化を生じているという結果が得られた(第 6 図)。次にバイサルファイトシーケンスにより *CaMYBA* に挿入している *LINE-1* の 5' 末端近傍領域の DNA メチル化を調査した。その結果, ‘Peruvian Purple’では DNA メチル化率が低下していることが示唆された。また, UP-P でも一部の領域で DNA メチル化率が低下していることが示唆されたが, その一方で UP-W ではその領域の DNA メチル化率は高く維持されていた(第 7 図)。したがって, *CaMYBA* に

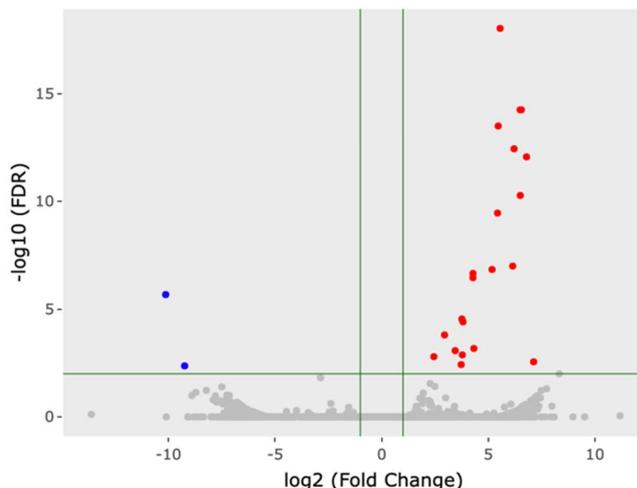
挿入している *LINE-1* の 5'領域着色変動を引き起こす原因領域であり、この領域の DNA メチル化が着色変動性に関与していると考えられた。

UP 系統の紫花と白花について RNA-seq を行ったところ、*CaMYBA* を含む 22 遺伝子が紫花で有意に高発現しており、その約半数がアントシアニン生合成関連遺伝子だった。よって、*CaMYBA* が *CHS*, *DFR*, *ANS*, *GT* などのアントシアニン生合成に関わる遺伝子を制御していることが示唆され、*CaMYBA* 特異的な発現変動が着色変動を引き起こしていると考えられた。



第6図 *LINE-1*における *McrBC*-PCR
+ : *McrBC*処理あり . - : *McrBC*処理なし . それぞれ3反復行った。

第7図 PP, UP-P, UP-W における *LINE-1* の 5'側領域のバイサルファイトシーケンス解析 . 赤 : CG, 青 : CHG, 緑 : CHH を示す . 濃い領域 : メチル化シトシン . 薄い領域 : 非メチル化シトシン .



第8図 RNA-seq 比較解析による UP-P と UP-W 間で発現量に差がある遺伝子の解析 . Fold Change は正が UP-P で高発現していた遺伝子を、負が UP-W で高発現していた遺伝子を示す .

<実験 3 : 着色変動を制御する環境要因の探索>

着色変動を誘導する栽培環境に関して、インキュベーターを利用して温度条件に関して検討した。いずれの温度条件でも UP 系統では紫花の出現頻度が低く、多くが白花となり着色変動を生じにくかったことから、温度以外の別の環境要因が UP 系統の着色変動に関わっていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 卯川亜美・田中義行・大野翔
2. 発表標題 アントシアニン着色変動性を示すトウガラシの花のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 令和6年度園芸学会春季大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ukawa A, Ishikuro H, Ueno M, Doi M, Ohno S
2. 発表標題 Mapping of a gene inducing unstable anthocyanin pigmentation in pepper
3. 学会等名 日本ナス科コンソーシアムシンポジウム（JSOL2022）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 卯川亜美・石黒寛人・上野舞子・土井元章・大野翔
2. 発表標題 トウガラシにおけるアントシアニン着色変動にはCaMYBA領域のDNAメチル化が関与する
3. 学会等名 令和5年度園芸学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 卯川亜美・石黒寛人・上野舞子・土井元章・大野翔
2. 発表標題 トウガラシにおけるアントシアニン着色変動遺伝子のマッピング解析
3. 学会等名 令和4年度園芸学会春季大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	卯川 亜美 (Ukawa Ami)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------