

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658032

研究課題名（和文） 落葉樹の紅葉現象の解明

研究課題名（英文） The elucidation of the autumn leaf phenomenon in deciduous trees.

研究代表者

國武 久登 (KUNITAKE HISATO)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：80289628

研究成果の概要（和文）：ブルーベリー葉におけるアントシアニン生合成において、光照射時の温度や光源が大きな影響を与えることが明らかとなった。また、葉においてはシアニジン系のアントシアニンが主として生合成され、アントシアニン生合成の制御機構が、果実とは異なる可能性が高いことが分かった。cDNA サブトラクションおよび degenerated PCR により 9 個のアントシアニン生合成関連遺伝子を単離することに成功した。アントシアニン生合成遺伝子の多くは、24 時間程度の強光照射により、発現が増加した。アントシアニン生合成機構は、光ストレスからの防御のため、素早く反応している可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：The temperatures and the intensities at the light irradiation influenced the synthesis of the anthocyanins in the blueberry leaves. The anthocyanin aglycones in the blueberry leaves were almost the cyanidin. The results suggest that the anthocyanin synthesis control system of the leaves is different from the system of the fruits. The nine anthocyanin synthesis related-genes were isolated by the cDNA subtraction or the degenerated PCR. The many anthocyanin synthesis genes were expressed by the strong irradiation within 24 hours. The anthocyanin synthesis system may response quickly to protect from the light stresses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：園芸学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：ブルーベリー

1. 研究開始当初の背景

(1) 1 週間足らずの比較的短期間の強光照射で、ブルーベリー培養苗葉のアントシアニン (AC) 含量が増加した。

(2) cDNA サブトラクション法によりいくつかのポリフェノール生合成関連遺伝子を単

離した。

(3) 農学的にも生物学的にも重要な 2 次代謝産物であるポリフェノールの 1 種 AC の生合成機構を解明することは非常に重要である。

2. 研究の目的

- (1) 様々な光条件や温度条件で栽培した培養苗の AC を解析することで、紅葉現象が生じる環境要因を解明する。
- (2) AC 生合成関連遺伝子を単離する。
- (3) ブルーベリー葉における AC 生合成関連遺伝子の発現解析を行い、紅葉現象における AC 生合成関連遺伝子の発現機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 光照射試験

①光照射試験に用いた材料は以下のように育成した。約 2 cm に切りそろえたラビットアイブルーベリー「レッドパール」培養苗を、ロックウールを敷き詰めたセルトレイが入ったプラントボックスに移植した (図 1)。1.5mM 硫酸溶液中で 6 週間栽培して発根させた後、0.5M 硫酸で pH5 に調整した培養液中 (ハイポネックス野菜ハーブ 6-6-6、1000 倍希釈液) において 3 か月栽培した。栽培時の気温は 25°C で、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の昼白色蛍光灯 (FL) を、1 日あたり 16 時間、連続照射した。

②照射時の温度は、10°C、15°C、20°C、25°C および 30°C に設定した。

③FL (メロウ 5 N FLR40S-EX-NM36-H 東芝)、青色 LED (パネル LED LED-B 型 東京理化)、赤色 LED (パネル LED LED-R 型 東京理化)、青色 LED または赤色 LED に昼白色蛍光灯を補光した光を連続して 10 日間照射した。

④AC 含量測定および AC 生合成関連遺伝子発現解析のため、照射試験後、葉の収穫を実施した。



図 1. プラントボックスにおけるブルーベリー培養苗の育成

(2) サンプルの前処理

AC 含量測定用の葉は、採取後直ちに凍結させ、速やかに凍結乾燥した。凍結乾燥後は、-20°C にて保存した。発現解析用の葉は、採取後ただちに凍結させ、-80°C にて保存した。

(3) AC 含量の測定

AC は、抽出液 95% (v/v) エタノール・0.1NHCl を用い、25°C の暗所で 20 時間静置して抽出した。AC 含量は、HPLC を用いた Ballington らの手法 (*J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 112, 1987, 859-864) で、測定・解析した。

(4) RNA 抽出

CTAB 法を改良した Fuse らの手法 (雑誌論文②) により RNA を抽出した。

(5) cDNA の合成

逆転写酵素 Superscript III (ライフテクノロジー社) を用い、cDNA を合成した。

(6) AC 生合成関連遺伝子の単離

①cDNA サブトラクション

サブトラクション用の材料として、強光照射した葉 (170 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の FL) と弱光照射した葉 (30 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の FL) を用いた。PCR-Select cDNA サブトラクションキット (クロンテック社) で遺伝子を単離した。

②degenerated PCR

チャ、カンキツ、ブドウ等のアミノ酸配列を比較して作製した縮合プライマーを用い、遺伝子単離を行った。

③機能の推定

単離遺伝子は、日本 DNA データバンクの BLAST 解析により、その機能を推定した。また推定アミノ酸の identity は、Genetyx 7 (ゼネティクス社) により計算した。

(7) AC 生合成関連遺伝子の発現解析

単離した AC 生合成関連遺伝子の発現解析を RT-PCR により行った。PCR は、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ社) を用いて行った。1 サイクルを、94°C 30 秒、64°C 30 秒、72°C 60 秒で実施した。サイクル数および使用したプライマーは表 1 に示した。

表 1. PCR 用プライマー

遺伝子	サイクル数	プライマー名	プライマー配列
ACT	25	AC-F	5'-TGAGGGATATGCCCTCCTCATGC-3'
		AC-R	5'-GCTGAGGGATGCAAGGATAGATCC-3'
CHS1	30	CHS1-F	5'-CTACCACCTCTTAGCAGATCAC-3'
		CHS1-R	5'-CCCGTAGCTTCTCGGGCTTG-3'
CHS2	20	CHS2-F	5'-AGCGAGCACAAGGCTGAGTT-3'
		CHS2-R	5'-AAACCACCAAAACACGAGCC-3'
CHS3	24	CHS3-F	5'-CCAAGTGTGTGCGAGTACAT-3'
		CHS3-R	5'-TCGGCGAGGTCTTTGGCTAGGC-3'
F3H	25	F3H-F	5'-CTCAAGGTGGCCGACAAGC-3'
		F3H-R	5'-ATAGCAAAGTGGGTCTAAGCA-3'
F3'H	25	F3'H-F	5'-TCAACATCGGGACTTCGTG-3'
		F3'H-R	5'-TTGTCCCAAGCTTCTGGATC-3'
LDOX	22	LDOX-F	5'-AGCGAGTATGCGAATCACCT-3'
		LDOX-R	5'-TTGAAGCAGGCAGGCAAAAGT-3'
UFGT	35	UFGT-F	5'-TAACCATGTCCAACCTTCTCA-3'
		UFGT-R	5'-GGTGTAGCCACTGATCCAAA-3'

4. 研究成果

(1) 光照射試験

①光照射時における温度の影響

育成した培養苗において、青色 LED、赤色 LED および FL による光照射 (90 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) を実施した。総 AC 含量は、青色 LED および赤色 LED の場合、15°C 以下で急に増加し、10°C で照射した場合に最も多くなった (図 2)。また、FL の場合、照射時の温度が 15°C 以下の場合、総 AC 含量が著しく増加した (図 2)。30°C で照射した場合、どの光源

図5. 低温時(10°C)におけるブルーベリー培養苗葉の総AC組成への光源の影響

Cy-galはシアニジン3-ガラクトシド, Cy-araはシアニジン3-アラビノシド, Cy-glcはシアニジン3-グルコシド, Dp-galはデルフィニジン3-ガラクトシド, Dp-araはデルフィニジン3-アラビノシドを示している。グラフ中の白抜き文字はDp-araの割合、黒文字はDp-galの割合を示す。

(2) 圃場におけるブルーベリー葉のAC含量
通常時の自然環境中のブルーベリー紅葉葉のAC含量を測定した。2008年12月に収穫した20栽培品種及び1野生種(シャシャンボ)の葉について総AC含量を調査した。その結果、品種間において大きな差があることが分かった(図6)。

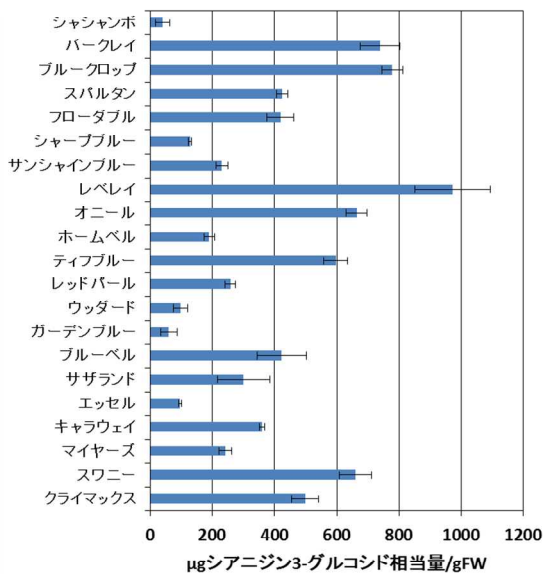


図6. ブルーベリー葉の総AC含量

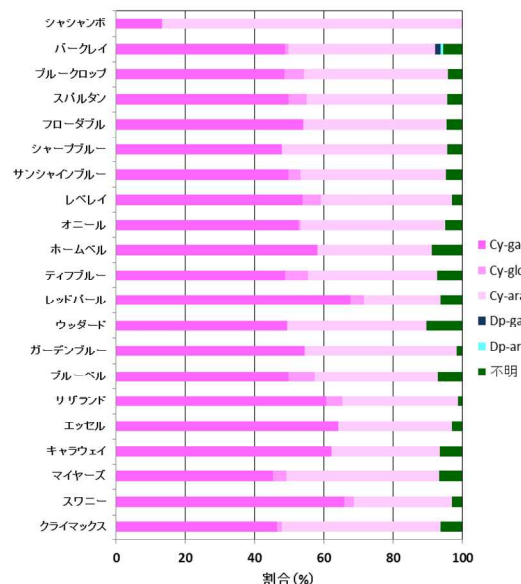


図7. ブルーベリー葉のAC組成

次に、AC組成を調査した。パークレイにおいてデルフィニジン系のACがわずかに検出

された以外は、圃場の紅葉場においてもシアニジン系のACのみしか検出されなかった(図7)。また、ブルーベリー果実のアントシアニン組成について調査した結果、葉と異なり、シアニジン系、デルフィニジン系、マルビジン系等、様々なACが存在していた(図8)。以上の結果は、葉と果実において、AC生合成の制御機構がかなり異なっている可能性が高いことを示唆している。

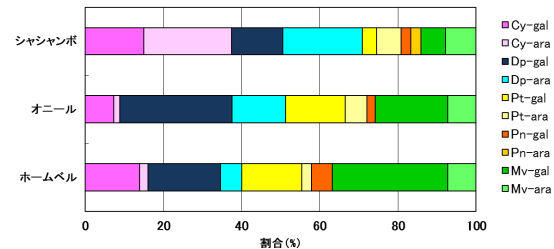


図8. ブルーベリー果実のAC組成

(3) AC生合成遺伝子の単離(図9)

①カルコンシンターゼ(CHS)遺伝子

cDNAサブトラクションにより3種類のCHSを単離した。それぞれの遺伝子で推定アミノ酸配列のidentityを調べたところ、CHS1とCHS2で92%、CHS1とCHS3で88%、CHS2とCHS3で86%となった。また、他植物のCHSとのidentityを調べた結果、CHS1はアザレア(89%)、北部ハイブッシュブルーベリー(83%)およびヤブツバキ(82%)、CHS2は北部ハイブッシュベリー(98%)、アザレア(84%)およびチャ(82%)、CHS3はブドウ(78%)、ウンシュウミカン(77%)およびアザレア(76%)となり、他の植物と高いidentityが見られた。

②UDPグルコースフラボノイド3-O-グリコシルトランスフェラーゼ(UFGT)遺伝子

cDNAサブトラクションにより1種類のUFGTを単離した。推定アミノ酸配列において、他植物とのidentityを調べたところ、キウイフルーツ(67%)、ウド(64%)およびカキ(60%)において比較的高いidentityが見られた。

③フラバノン3-ヒドロキシラーゼ(F3H)遺伝子

cDNAサブトラクションにより1種類のF3Hを単離した。推定アミノ酸配列において、他植物とのidentityを調べたところ、チャ(86%)、リュウガン(86%)およびセッコウベニバナユチャ(85%)において高いidentityが見られた。

④フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3'H)遺伝子

cDNAサブトラクションにより1種類のF3'Hを単離した。推定アミノ酸配列において、他植物とのidentityを調べたところ、キンカチャ(85%)、チャ(83%)およびブドウ(80%)において高いidentityが見られた。

⑤MYB 遺伝子

cDNA サブトラクションにより 1 種類 (*MYB1*) degenerated PCR により 2 種類 (*MYB2*, 3) の *MYB* を単離した。それぞれの遺伝子で推定アミノ酸配列の identity を調べたところ、*MYB1* と *MYB2* で 38%、*MYB1* と *MYB3* で 20%、*MYB2* と *MYB3* で 41% となった。Identity はあまり高くなく、それぞれ異なる機能を持っていると推測される。*MYB1* における他植物との identity を調べたところ、スイカズラ *DIV* (66%) と比較的高い identity が見られた。*MYB2* における他植物との identity を調べたところ、オレンジ (62%) やブドウ (60%) における機能不明な *MYB* と比較的高い identity が見られた。*MYB3* における他植物との identity を調べたところ、カキ (67%) におけるポリフェノール生合成系に関与する *MYB* と比較的高い identity が見られた。

CHI1 (AB694902)
MVTVEEVRKAQRAAGPATVMAIGTATPPNCVDQSTYPDFYFRITNSEHKTELK
EKFQRMCDKSMIKKRYMYLNEEILKENPGVCEYMAPSLDARQDMVVVEPKLG
KEAATAKAIKEWQPKSKITHLVFCTTSGVDMGADYQLTKLLGLRPSVKRLMM
YQQGCFAGGTVLRKAKDLAENNKARVLVVCSEITAVTFRGSPDTHLDSLVGQ
ALFGDGAANAIIIVGADPIPEVEKPLFELVSAQAQITLPSDEGAIDGHLREVGLTF
HLLKDVPLGISKNIEKALTEAFQPLGISDWNISFWIAHPGGPAILDQVELKCN
LKPEKLRAHRVLSYGNMSSACVLFILDEMRRKSAEEGLKTTGEGLEWGVLF
GFGPGLTVEVTVLHLSLCT

CHI2 (AB694903)
MVTVEEVRKAMRAEGPATVLAIGTATPAHCVEQATYPDYFRVITNSEHKAELK
EKFQRMCDKSIKRYMYLNEEILKENPNVCAVYMAPSLDARQDMVVVEIKPLG
KEAATAKAIKEWQPKSKITHLVFCTTSGVDMGADYQLTKLLGLRPSVKRLMM
YQQGCFAGGTVLRKAKDLAENNKARVLVVCSEITAVTFRGSPDTHLDSLVGQ
ALFGDGAANAIIIVGADPIPEVEKPLFELVSAQAQITLPSDEGAIDGHLREVGLTF
HLLKDVPLGISKNIEKSLVEAFQPLGISDWNISFWIAHPGGPAILDQVEKLA
LKPEKLRAHRVLSYGNMSSACVLFILDEMRRKSAEDGFKTTGEGLDWGVLF
GFGPGLTVEVTVLHLSLCT

CHI3 (AB694904)
MAPTGVSVVEIRKAQRAQGPATVLAIGTATPANCNVQAEYPDFYFRITNSEHK
TELKEKFKRCKECSMIKRYMYLNEEILKENPVSCEYMAPSLDARQDMVVVEV
PNLKEAATAKAIKEWQPKSKITHLVFCTTSGVDMGADYQLTKLLGLRPSVK
RGRVEVPTGLFAGGTVLRKAKDLAENNAGSRVLVVCSEITAVTFRGSPDTHL
SLVQALFGDGAANAIIIVGADPIPEVEKPLFELVSAQAQITLPSDEGAIDGHLREV
GLTFHLLKDVPLGISKNIEKSLVEAFQPLGISDWNISFWIAHPGGPAILDQVE
LKLGLKEEKLKATRHVLSYGNMSSACVLFILDEMRRKSAEVEGSGTTGEGLEW
GVLFGFGPGLTVEVTVLHLSLPAQGGVTH

UFGT (AB694899)
MSNFSKDRHVAVLPPFPSTHAAPILSIIRRFASAAPDVTFSFFSIPQSIQTLF
PSENPDNIPKPYVSDGVPEGVYFSGKHEDINLFLAAGKESLAKAGMKAEEAE
IGRRIDCVVADAFWFTQELAEEMGVPIITLWVSGACSLSAHCYTDLIRETVG
MHDIAGRENEIVKFPVGFSEVRLGDLPSGVVYGNLESFFSMMLYNMGQVLHKA
TAVAINSFELEPEHNKVLSEKFKLLNCGPFNSISPPPPSNLDKYGCIPW
LDQHKTRSVAYIGFVSATPPPVEIAALAEALEASGTPFLWLSLDRNFKHLPE
GFLKRTSELGKIMAWAPQVQLAHSSIGVFINHCGWNSVLESIVAGVPIIGRP
FFGDHQVDTWVWVWVIGVVEGVEVFTKSGTMSALELVLVSQEKELREQTG
KYKEFALKAVGPKGRSTQNLNLTLELVRGYNI

F3H (AB610764)
MAPTTLTALSEEKTLNAKFVRDEDERPKVAYNTFSDAIPVILSGLDEVDRGR
AEICKKIVEACEDWGVQVVDHGVDAGLISDMTRLAREFFALPPEKLRFDMS
GGKGGFIVSSHLQGEAVQDWRREIVTYFSYPLRNRDRSRWPKPEGWISVTEK
YSEKLMELACKMLDVLSEAMGLEKDALTKACVDMQKVVVNYPKCEPDLTL
GLKRHTDPGTITLLDQDQVGLQATKDGKNWITVQVVEGAFVNNLGDHGHFL
SNGRFKNADHQAVVNSNYRSLIATFQNPAPNATVYPLKIREGEKSIIMEEPIF
FSEMYRRKMTKLELARKLKAQNAEAQLEAKPIKEIFA

F3H (AB694901)
MASLAFIYSLIGIFLYFVLSLLRNRYPRPLPPGPKPWPVIGNLPHLGTMPH
HSIAALARTYGLMLHLMGVSVVVAASASVAXQFLKTHQDNFSSRRPNSGAK
HIAYNYQDLVFAPYGPWRMLRKCIVHLSAKALDDFRHVRQEEVAIILTRAL
ASAASKTIVNLGQLNLCTTNAIGRVMGLRRVFGDGGGDPKAEFKGMVV
ELMVLAVGNIGDFVPSLEWLDLQGVAGKMKKLSRDFAPLSEILEEHKVGSI
GGGAQSHHTDLSLTIISLKEEDDGGGKLTDTTEIKALLLDLFTAGTDTSSSTV
EWAIAELLRHPKVLAKAQRLEDSVVGPDRLVTEADLAQLTYLQAVIKETFLRH
PSTPLSLPRMAAESCEINGYFIPKGSLLVNVWAIARDPEAWDNPLEFKPERF
LPGGERPNADIRGNDFEIVFPFAGRRICAGMSLGLRMVQLLTATLVHSFNWDL
PEGKLAELNMDEAYGLTLQRAEPLMVHPRPRFGAHVYQA

MYB1
MEILSPSSSYLSGSNWLLLESRSTKWTAENKMFENALAIYDKDTPDRQRVA
AMIPGKTVRDVMRQYKELEDDVSSIEAGLIPIPGYNSTSSPFTLEWGNHGF
GFKQGYGPGGKRSRGSQDQERKKGVPWTEEHKFLGLLGLKYGKGDWRNISR
FVVTTRPTQVASHAQYFIRQLSGGKDKRRASIHDIITVNLNENQTPSPD
QPSPDHSTAMPQHRNSVSMFRTQFQWNPNEGLDFNQTHGNMFI SPHGIDSYG
IHMESHVSGPNMRFMQSTHHYPHG

MYB2
MEILSPSSSYLSGSNWLLLESRSTKWTAENKMFENALAIYDKDTPDRQRVA
AMIPGKTVRDVMRQYKELEDDVSSIEAGLIPIPGYNSTSSPFTLEWGNHGF
GFKQGYGPGGKRSRGSQDQERKKGVPWTEEHKFLGLLGLKYGKGDWRNISR
FVVTTRPTQVASHAQYFIRQLSGGKDKRRASIHDIITVNLNENQTPSPD
QPSPDHSTAMPQHRNSVSMFRTQFQWNPNEGLDFNQTHGNMFI SPHGIDSYG
IHMESHVSGPNMRFMQSTHHYPHG

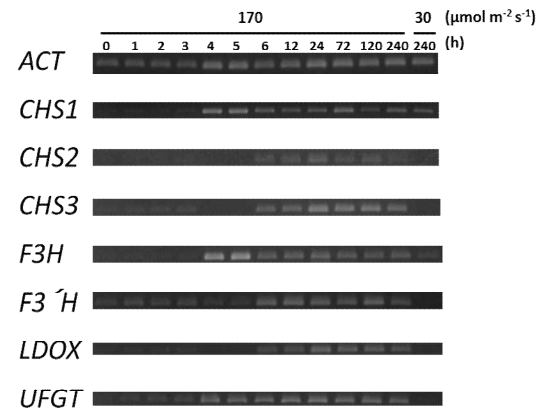
MYB3
MGRAPCCSKVGLHRGPWTAREDSVLTKEYIQVHGEGNWRSPLPKAGLLRCGKSC
RLRWNYLRPDIKRNIAPEDDLIIKMHALLGNRWSLIAGRLPGRDNEIKN
VWNTLHKKLRSGQTDPNTHKKLRDPSEQEPKRRNNSTSKQKNGKNSNE
VLLTEKQKVHAPKPTRIKSLTFSVSRNNSFDWTSGCCSNEGEHRGLFGAEVA
DINNFWNSFKVEVPLIGEDQDHDHNDHNLVNGSDFACGSFVPMGGDNNLEK
YEEYLQLELIGDHDHNDHNLVNGSDFACGSFVPMGGDNNLEK

図 9. 単離した遺伝子の推定アミノ酸配列

(4) AC 生合成遺伝子の発現解析

25°C で、強光 (FL, 170 μmol · m⁻² · s⁻¹) を照射したときの AC 生合成関連遺伝子発現を RT-PCR により解析した。その結果、ほとんどの遺伝子が、24 時間足らずの光照射で発現が増加することが分かった (図 10)。特に *CHS1*、*F3H* および *UFGT* は 4 時間程度の照射で発現が増加していた。ブルーベリー培養苗においては、AC 生合成遺伝子が素早く活性化することで、光ストレスから植物体を保護していることが推測される。

図 10. 強光照射における AC 生合成関連遺伝子の発現



LDOX:ロイコアントシアニンジデオキシゲナーゼ

(5) 総括

総 AC 含量は低温時、特に青色 LED および白色蛍光灯にて顕著に増加する。したがって、照射時における光の波長は、AC 生合成系に影響を与える可能性が高い。低温時の AC 含量の増加には、光強度依存性が見られ、紅葉が顕著に表れるためには、ある程度の光強度が必要である。ブルーベリー葉に含まれる AC は、果実とは異なり、ほぼシアニン系の AC であった。この結果から、ブルーベリー葉と果実における AC 生合成機構の制御機構は異なっている可能性が高いことが示唆された。AC 生合成遺伝子は短期間の光照射で発現が増加するが、光ストレスに対する素早い反応により、植物体を保護していると推測される。現在、AC 生合成系は、*MYB* 等により制御されていると考えられている。本研究においては、3 種類の *MYB* を単離できた。今後、単離した遺伝子の発現解析等を実施し、低温時の光照射における AC 生合成関連遺伝子の発現について調査することで、AC 生合成系の解明し、紅葉現象の究明に努める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

① Tsuda, H., Kunitake, H., Ryoko Kawasaki-Takaki, R., Nishiyama, K., Yamasaki, M., Komatsu, H., Yukizaki, C. Antioxidant Activities and Anti-Cancer Cell Proliferation Properties of Natsuhaze (*Vaccinium oldhamii* Miq.), Shashanbo (*V. bracteatum* Thunb.) and Blueberry Cultivars. *Plants*, 2(1), 2013, 57-71, 査読有 <http://www.mdpi.com/journal/plants>

② Fuse, T., Nishiwaki, A., Kunitake, H. An efficient method for the isolation of RNA from blueberry leaves. *Bull. Facul. Agric. Univ. Miyazaki*, 59, 2013, 57-60, 査読有 <http://ir.lib.miyazaki-u.ac.jp/dspace/handle/10458/16>

〔学会発表〕(計 1 件)

① 布施拓市、西脇亜也、國武久登、ブルーベリー葉におけるアントシアニン含量の品種間差異、園芸学会平成 23 年度秋季大会、平成 23 年 9 月 24 日、岡山大学津島キャンパス

② 藤田葉子、布施拓市、阿部健一、柚木崎千鶴子、松浦靖、國武久登、ブルーベリー葉におけるクロロゲン酸含量の季節変動と品種間差異、平成 23 年 9 月 24 日、岡山大学津島キャンパス

③ 布施拓市、鉄村琢哉、西脇亜也、國武久登、短時間強光照射によりブルーベリー葉ポリフェノール生合成遺伝子の発現は増加する、第 53 回日本植物生理学会年会、平成 24 年 3 月 16 日、京都産業大学

④ 布施拓市、鉄村琢哉、西脇亜也、國武久登、ブルーベリー培養苗中の総プロアントシアニン含量および総アントシアニン含量は温度の影響を受ける、園芸学会平成 24 年度春季大会、平成 24 年 3 月 28 日、大阪府立大学百舌鳥キャンパス

⑤ 大山明子、布施拓市、國武久登、ブルーベリー葉におけるポリフェノール生合成関連遺伝子発現の季節変動、園芸学会平成 24 年度春季大会、平成 24 年 3 月 28 日、大阪府立大学百舌鳥キャンパス

⑥ 大山明子、布施拓市、國武久登、ブルーベリー葉におけるプロアントシアニン及びアントシアニン含量の季節変動とその関連遺伝子の発現、園芸学会平成 24 年度秋季大会、平成 24 年 9 月 28 日、福井県立大学福井キャンパス

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國武 久登 (KUNITAKE HISATO)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：80289628