

平成30年 9月28日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18654

研究課題名(和文) リンドウの青色花におけるゲノム編集技術を活用したコピグメント効果の検証

研究課題名(英文) Verification of the copigmentation effect in the blue color flower of gentian using genome editing

研究代表者

田崎 啓介 (Tasaki, Keisuke)

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・研究員

研究者番号：80733419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リンドウの花が青く発色するメカニズムをリンドウ生体内で明らかにするために、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を活用し、リンドウ花卉の主要色素ゲンチオデルフィンの基本骨格デルフィニジン(De1)の修飾関連遺伝子の変異系統を作出した。変異系統の花色表現型を分光測色計で、花卉色素抽出物をHPLCで解析した結果、De1-5、3'位双方、あるいは少なくともDe1-3'位の配糖化に続くカフェ酸分子の結合は分子内コピグメンテーションを誘導し、それによりリンドウ花卉はより青く・濃く・鮮やかに発色していると考えられた。変異体の生花卉を用いた解析によって、リンドウ花卉の発色に関する直接的な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Deep blue color of gentian flower is derived from polyacylated anthocyanin, gentiodelphin. To clarify the blue color development mechanism in gentian plants in vivo, we developed mutant lines of anthocyanin modification genes encoding glycosyltransferase and acyltransferase by genome editing using the CRISPR/Cas9 system. To evaluate the flower color phenotype of mutants, abaxial surface of raw-petal was measured directly by spectrophotometry. Then, anthocyanin composition of petal extracts was analyzed by HPLC. In this study, we suggested that the presence of caffeoyl moieties of gentiodelphin 5- and 3'-position or at least 3'-position is important for intramolecular copigmentation effect contributing deep and vivid blue gentian flower color. Thus, the analysis of the raw-petals of mutants successfully provided practical information about the blue color development mechanism of the gentian flower.

研究分野：農学

キーワード：アントシアニン ゲノム編集 コピグメント リンドウ

1. 研究開始当初の背景

本国において第一位の生産量を誇る岩手県のリンドウは、青花の着色安定性が生産および育種の重要課題となっている。このリンドウの青い花色を作りだすデルフィニジンの一種であるゲンチオデルフィン¹は、基本骨格の3、5、3'位が、アントシアニン3位糖転移酵素(3GT)、アントシアニン5位糖転移酵素(5GT)およびアントシアニン3'位糖転移酵素(3'GT)により配糖化され、さらにアントシアニン5/3'位アシル基転移酵素(5/3'AT)の働きにより5、3'位のグルコースに芳香族有機酸(カフェ酸)が結合した状態で存在する。ゲンチオデルフィンは、単体では紫の発色を示すが、結合した糖と有機酸が基本骨格を包むように折りたたまれた形になることで青の発色を呈する、青色効果が生じる。これを分子内コピグメンテーションと呼ぶ。特に、3'位に結合する糖と有機酸は、ゲンチオデルフィンの青の発色に最も寄与することが *in vitro* で証明されている(Yoshida et al., 2000)。しかし、花卉細胞の液胞中には様々なコピグメントが存在しており、例えば、ダッチアイリスではフラボンとデルフィニジンの分子間コピグメンテーションによる青色効果が報告されている(Mizuno et al., 2015)。リンドウもまたフラボンのルテオリンを多く蓄積しているが、青の発色への関与は不明である。青色効果に関わるコピグメントを明らかにするには、生体内における解析が必須となるが、リンドウにはフラボノイド修飾酵素の欠損変異体が存在せず、これが解析の障壁となっていた。しかし近年、動植物においてゲノム編集技術の開発が進み、植物ではCRISPR/Cas9システムを利用した遺伝子改変がタバコ、シロイヌナズナ、イネ、コムギなどで報告されている(総説 Schaeffer & Nakata 2015)。現在、リンドウにおいてもCRISPR/Cas9システムの開発をスタートしている。これまでの予備実験において、視覚マーカーとなるPDS遺伝子への変異導入を試み、図1に示すような白色化個体が得られている(図1)。このように、ゲノム編集技術はリンドウにおいても現実的な解析手法として利用できる可能性が見えてきた。

2. 研究の目的

本課題は、リンドウのゲノム編集技術を確立・活用することで、フラボノイド生合成遺伝子の変異体を用いた青色効果に真に寄与するコピグメントの検証を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

[平成28年度]

1. 各種ベクターの構築

CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集用のベクター構築を行う。Cas9をドライブするプロモーターはCaMV35Sp、CmYLCVp、rolCpを用いて発現を試みる。CaMV35Sプロモーターはすでに構築済みであり、CmYLCVp、NOSpを構築する。ベクター至適化のために、PDS遺伝子をターゲットとする。次に、フラボノイド生合成に関わる、カルコン合成酵素(CHS)、カルコン異性化酵素(CHI)、フラボン-3'-ヒドロキシラーゼ(F3H)、フラボノイド-3', 5'-水酸化酵素(F3'5'H)、アントシアニン合成酵素(ANS)、ジヒドロフラボノール還元酵素(DFR)、5GT、3'GT、5/3'AT、UDP-glucose-dependent glucosyltransferase(UF6CGT)および新規に単離したグルタチオンS-転移酵素(GST)の遺伝子をターゲットに、single guideRNA、および複数遺伝子を組み合わせたdual guideRNA用ベクター構築する。その際、pre-tRNA配列(Xieら、PNAS112:3570-5,2015)も利用する。

2. リンドウの形質転換および変異導入効率の至適化

構築した各種バイナリーベクターをアグロバクテリウムEHA101菌株に導入してリンドウに感染する。リンドウの形質転換は通常のリーフディスク法により行い、形質転換体を作成する。形質転換体の選抜に用いるピアラフォスは濃度勾配を設けて、各処理区における形質転換効率および変異導入効率を算出して最適条件を明らかにする。

形成したカルスおよび再生シュートを用いて、形質転換の確認をダイレクトPCRで行い、変異導入の確認をダイレクトシーケンシングで行う。その際、ヘテロ性の高いリンドウでは複数のアリルが存在する遺伝子もあるため、全アリルにおける変異導入パターンを解析する。アリル数およびアリルの配列については全遺伝子で解析を行う。CHS、CHI、F3'5'H、ANS、DFRのノックアウトでは、これまでの研究結果から白色あるいはピンク色の花色表現型現れると予想される。そこでこれらの系統は花の表現型を確認した後、最終的なノックアウト効率の算出に用いる。そのため、1系統につき200個体を花の表現型を確認のために生育する。

分子内・分子間コピグメンテーションを解析するために、5GT、3'GT、5/3'ATおよびU6CGTについては、完全なノックアウト系統を選抜し、花の表現型を確認するために生育する。

[平成29年度]

3. 分子内・分子間コピグメンテーション分子の特定

5GT、3'GT、5/3'ATおよびU6CGTノックアウト系統の花弁は、上記と同様の解析を行い、完全なノックアウトである確認する。さ

らに、分光測色計および HPLC による花卉の色彩および色素構成の分析を行う。この表現型の結果を踏まえ、リンドウ生体内における、これら酵素によりゲンチオデルフィンに結合する糖および有機酸、あるいは修飾されるフラボンのコピグメント効果を検証する。

4. 研究成果

平成 28 年度から 29 年度にかけて、様々なフラボノイド生合成関連遺伝子のゲノム編集を行い、変異系統を選抜して閉鎖系温室に馴化した。平成 29 年度までに F3'5'H、DFR、F3H、GST、5GT、3'GT、5/3'AT 変異系統で開花個体が得られ、それぞれ鮮やかなピンク色、白色、淡い青色、青みがかった白色、赤紫色、ピンク色、淡い藤色の花色表現型を確認できた。

計画段階において各種プロモーターの効率を検討する予定だったが、CaMV35Sp とそれ以外の効率に大きな違いが認められなかったため、先行していた CaMV35Sp を採用した。選抜に用いたピアラフォスの濃度は 1mg/L で良好な結果を示した。変異導入効率およびノックアウト効率を算出する計画だったが、同じ遺伝子でもターゲット配列により変異導入効率が大きく異なることがわかったため各種効率の算出は行わなかった。しかし、少なくとも dual guideRNA 用ベクターの利用はターゲットを増やすために有効と考えられた。また 2 つのターゲット間が大きく欠損した変異も確認している。ターゲット配列に編集が生じない場合は選抜を中止し、ターゲット配列を変更したベクターを構築し直した。概算ではあるが、最終的に変異系統が得られる効率は、葉切片から切り出したカルス系統を母数とした場合およそ 5~20%であった。

本研究ではリンドウで新規に見つかったアントシアニンの液胞輸送への関与が示唆される GST の変異系統が得られ、アントシアニン蓄積への関与を示す重要な証拠が得られた。このように、ゲノム編集技術はリンドウにおける遺伝子機能解析技術として有効であることも示された。一方で、CHS、CHI、ANS および UF6CGT の変異系統は現在まで得られていない。そのため、フラボンのコピグメント効果の検証については今後の課題となった。

修飾酵素遺伝子の変異系統、5gt、3'gt、5/3'at はターゲット配列の編集と花色改変が認められた。これらの系統個体の変異型細胞と正常型細胞から構成されるキメラである可能性を検証するために、当初の計画にはなかったアンプリコンシーケンスも実施した。各系統の葉から DNA を抽出し、花卉から RNA を抽出・逆転写し、それらを鋳型にターゲット配列の近傍を PCR 増幅して Illumina MiSeq を用いた次世代シーケンス解析を行った。その結果、通常型の未編集の DNA 配列あるいは転写産物はいずれの変異系統に

も含まれていないことが確認された。これにより、5gt、3'gt、5/3'at は完全な変異型個体であると考えられた。

次に、分光測色計を用いて各変異系統の生花卉背軸面の吸収スペクトルを 10nm 間隔で測定した。その結果、正常型はポリアシル化アントシアニンを蓄積する生花卉の特徴とされる複数 (580nm および 620nm の 2 つ) の吸収極大を示したのに対し、5gt、3'gt、5/3'at はそれぞれ 570nm、540nm、580nm で正常型よりも低い 1 つの吸収極大を示した。各変異系統の生花卉背軸面の明度 (L*) は正常型と比較して高い値を、彩度 (Chroma) は低い値を示した。続いて、各変異系統の花弁の色素抽出物を HPLC で分析した。その結果、5gt、3'gt、5/3'at はそれぞれデルフィニジン 3-グルコシド、デルフィニジン 3-グルコシド 5-カフェオイルグルコシド、デルフィニジン 3-5-3'-トリグルコシドを主に蓄積しており、いずれの系統もゲンチオデルフィンの蓄積は認められなかった。

ここまでの結果から、デルフィニジンの 3 位へのグルコースの結合、デルフィニジン 3-グルコシドの 5 位へのグルコースとカフェ酸の結合、あるいはデルフィニジンの 3、5、3'位へのグルコースの結合だけではリンドウ花弁の青の発色に至らないことがわかった。一方、デルフィニジン 3-5-3'トリグルコシドの 5 位および 3'位、あるいは少なくとも 3'位へのカフェ酸の結合は分子内コピグメンテーションを誘導し、それによりリンドウ花弁はより青く、濃く、そして鮮やかに発色していることが示唆された。

このように、リンドウにおけるゲノム編集技術を確立したことで、これまで調べることのできなかった修飾関連遺伝子の完全な変異系統を作出することに成功した。そして、それらの生花卉を用いた解析により、リンドウ花弁生体内における青の発色機構に関する直接的な知見が得られた。

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 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者
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
研究員 田崎啓介

研究者番号：80733419

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()