

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24年 6月 8日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780033

研究課題名（和文） 花色の多様性を担うアントシアニンの修飾酵素遺伝子の機能解明と制御技術の開発

研究課題名（英文） Study of anthocyanin modification genes that cause flower color diversity and development of techniques for the gene regulation

研究代表者 野田 尚信 (NODA NAONOBU)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所花き研究領域・主任研究員

研究者番号：10455313

研究成果の概要（和文）：アントシアニン生合成の糖転移酵素（GT）やアシル基転移酵素（AT）遺伝子の単離と、それらのキク植物への導入による発現制御技術の開発を行った。ロベリアよりアシル CoA を基質としてアントシアニン3位または5位のアシル化を担うと考えられる AT クローンを得た。キク花卉においてアントシアニンの3位を芳香族アシル基により修飾する場合、シソ由来 3AT ゲノミッククローンを導入することが有効であることが見いだされた。花卉特異的プロモーターと翻訳エンハンサーを用いてチョウマメ由来の 3'5'GT 遺伝子を発現させた形質転換キク花卉において、B 環が配糖化されたアントシアニンが合成・蓄積されていた。さらに、B 環の水酸化、配糖化、アシル化を同時にさせる遺伝子コンストラクトを導入した形質転換キクの作出に成功した。今後、得られた組換え体の解析を行う。

研究成果の概要（英文）：The glycosyltransferase (GT) and acyltransferase (AT) genes involved in anthocyanin biosynthesis were cloned and transformed into chrysanthemums to development of techniques for the gene regulation. We cloned genes that probably encode acyl-CoA:anthocyanin 3- or 5- acyltransferase from *Lobelia. Perilla* anthocyanin 3AT was suitable for aromatic acylation to the glucose of anthocyanin position 3 in chrysanthemum flowers. The petals of transgenic chrysanthemums that introduced petal specific promoter driven and translational enhancer fused *Clitoria 3'5'GT* were synthesized and accumulated B-ring glycosylated anthocyanins. We also generated transgenic chrysanthemum plants co-expressing genes for B-ring hydroxylation, glycosylation and acylation. In the near future, we will characterize these transgenic chrysanthemum lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：花色、遺伝子組換え、アントシアニン、糖転移酵素、アシル基転移酵素

1. 研究開始当初の背景

花の発色を担う植物色素のアントシアニンは、アントシアニンジンと呼ばれる基本骨格の違いにより発色が異なる。代表的なアントシアニンジンは3種類に大別され、ペラルゴニン系、シアニン系、デルフィニン系と呼ばれており、それぞれ緋色、赤色、桃色を発現する。しかし、アントシアニンによる花色はより多彩で、緋色から赤色・桃色そして紫色・青色・青碧色までを発現する。この花色の多様性を担う要因の一つが、アントシアニンへの配糖化、アシル化などによる修飾である。これらの修飾反応は、それぞれの植物種に特有であり、花卉に蓄積するアントシアニンの種類やその組成を決定している。従って、アントシアニン生合成における修飾反応を担う酵素遺伝子の働きを人為的に制御できれば、自然界の花色の多様性を、産業上有用な花き類において再現することが可能になる。

2. 研究の目的

アントシアニン修飾において未だ不明な点が多い糖転移酵素 (GT)、そしてアシル基転移酵素(AT)の遺伝子の単離を行う。また、それらの異種植物種への形質転換実験を行い、*in planta* での機能解析及び目的とする色を発現しうる構造をもつアントシアニンを花卉にて合成・蓄積させる。

以上のように、本研究の目的は修飾遺伝子の基礎的知見を得て、遺伝子組換えによる花色の改変を行うための基盤技術を開発することにある。

3. 研究の方法

(1) ロベリア由来アシル基転移酵素遺伝子の単離

ロベリア青色花卉由来の cDNA を用い、RT-PCR, RACE などにより、アントシアニンの修飾を担うと考えられる遺伝子のクローニングを行った。

(2) シソ由来アントシアニン 3 位芳香族アシル基転移酵素遺伝子 (3AT) の導入と解析

シソ 3AT ゲノミッククローン (3AT プロモーター及び 3AT ターミネーターを用いた 3AT 発現カセット) を組み込んだバイナリーベクターを作製し、アグロバクテリウム EHA105 に形質転換した。このアグロバクテリウムを用いてキクに遺伝子導入を行った。得られた形質転換体の舌状花卉における色素組成と導入遺伝子の発現を解析した。

(3) チョウマメ由来 B 環修飾酵素遺伝子の導入と解析

アントシアニン B 環修飾には、配糖化を担うチョウマメ由来の遺伝子 (アントシアニン 3',5'位糖転移酵素遺伝子: *Ct3'5'GT*)、及びアシル化を担う遺伝子 (アントシアニン 3',5'位アシル基転移酵素遺伝子: *Ct3'5'AT*)、及びアシルグルコース合成酵素遺伝子: *CtAGS*) を用いた。これらの遺伝子に翻訳エンハンサーを連結し、花卉特異的プロモーターで発現させるベクターを構築して、キクへの遺伝子導入を行い、得られた形質転換体の解析を行った。

(4) アントシアニン B 環の水酸化、配糖化、アシル化の同時制御を目指した形質転換体の作出

Ct3'5'AT を、*Ct3'5'GT*、*CtAGS*、及び B 環の水酸化を担う *F3'5'H* と同時に発現させるコンストラクトを 9 種類構築し、キクへの遺伝子導入に用いた。

4. 研究成果

(1) ロベリア由来アシル基転移酵素遺伝子の単離

分子系統樹解析よりアントシアニンの 3 位または 5 位のアシル基転移酵素をコードすると考えられる cDNA を単離し、大腸菌発現ベクターにクローニングした (図 1)。遺伝子導入による花色改変の遺伝子ツールの一つに用いることができる。

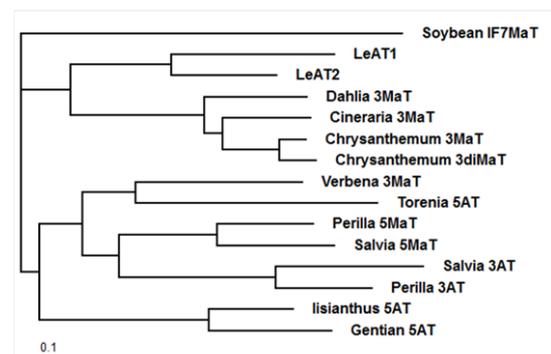


図 1 ロベリア由来のアントシアニン AT と相同性を示すクローン (*LeAT1*, *LeAT2*) と異種植物種由来 AT との分子系統樹

(2) シソのアントシアニン 3AT を導入した形質転換体を解析した結果、導入遺伝子が発現している個体において、花卉に含まれるアントシアニンのうち、最大で約 50% が芳香族有機酸でアシル化されたアントシアニンに

変化した形質転換体を得られた (図2)。このように、シソ *3AT* を用いることで、キク花卉のアントシアニンを芳香族アシル基により修飾することができる。また、シソ *3AT* プロモーター及びターミネーターが、キク花卉において外来遺伝子を発現させるのに有効であることが示唆された。

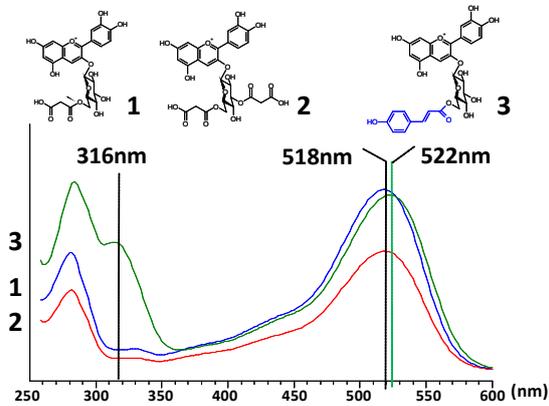


図2 形質転換体の花卉抽出物で特異的に検出された芳香族アシル化シアニジン配糖体 (3) の吸収スペクトル

3には、芳香族アシル基で修飾されたアントシアニンに見られる320nm付近の吸収極大がある。マロニル化された1や2と比べ、可視光吸収極大が4~5nmほど長波長にシフトしている。

(3) B環修飾を担う *Ct3'5'GT* を導入して得られた形質転換体では、花卉に蓄積しているシアニジン配糖体がさらに配糖化されていた (図3)。このことから、*Ct3'5'GT* の発現に用いたプロモーター及び翻訳エンハンサーがキク花卉において外来遺伝子の発現に有用であることが示された。一方、*Ct3'5'GT*、*Ct3'5'AT* 及び *CtAGS* を同時に遺伝子導入して得られた形質転換体では、配糖化されたアントシアニンの蓄積は認められたが、さらにアシル化されたアントシアニンを蓄積した形質転換体は得られなかった。

(4) これまでに、5種類のコンストラクトで形質転換キクが60個体得られた。そのうち21系統が開花した。今後、導入遺伝子の発現解析やアントシアニンの解析を行う。

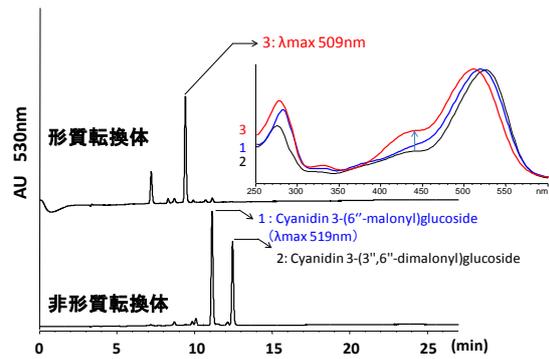


図3 *Ct3'5'GT* を発現させたキク形質転換体の花卉に含まれるアントシアニンのHPLCクロマトグラム

形質転換体では、新たなピークが主要色素として検出された。それらは逆相クロマトグラフィーで非形質転換体のアントシアニンよりも早く溶出した。また、主要色素の吸収スペクトルは、短波長側へ10nmシフトするとともに、440nmの吸収が上昇するなど、3'位に糖が結合したアントシアニンの特徴を示した。

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2件)

① Yamamizo C, Noda N, Ohmiya A. (2012) Anthocyanin and carotenoid pigmentation in flowers of section *Mina*, subgenus *Quamoclit*, genus *Ipomoea*. *Euphytica*, 査読有, 184: 429-440
DOI: 10.1007/s10681-011-0618-4

② 野田尚信 (2011) 遺伝子組換えによる新たな花色のキクの作出, 農林水産技術研究ジャーナル, 査読無, 33: 9-14.
<http://www.afftis.or.jp/books/order/journal/yousi/3306.htm>

[学会発表] (計1件)

野田尚信, 間竜太郎, 水谷正子, 岸本早苗, 田中良和, 大宮あけみ, シソ由来アントシアニン3-アシル基転移酵素遺伝子のキクでの発現, 日本植物細胞分子生物学会第28回大会, 2010年9月3日, 講演要旨集: 100, 東北大学.

[図書] (計1件)

野田尚信 (分担執筆), 講談社, 植物の分子育種学 (第7章1節 色素の生合成制御によ

る花色の改変), 2012, 69-80.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 修飾したアントシアニンを花卉に含有するキク植物を生産する方法

発明者: 野田尚信, 間竜太郎, 岸本早苗, 大宮あけみ, 田中良和

権利者: 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構, サントリーHD株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2009-107055

出願年月日: 2009年4月24日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

野田 尚信 (NODA NAONOBU)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所花き研究領域・主任研究員
研究者番号: 10455313