

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02122

研究課題名(和文) 複数のフラボノイド系化合物合成を同時に制御する因子の同定

研究課題名(英文) Identification of factors that simultaneously regulate the synthesis of several flavonoid compounds

研究代表者

松井 勝弘 (Matsui, Katsuhiko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究部門・上級研究員

研究者番号：30343974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,080,000円

研究成果の概要(和文)：各種フラボノイドはフラボノイド合成系と呼ばれる連続する一連の酵素反応によって合成される。合成されるフラボノイドは、基本的にその植物が有する酵素に依存し、合成系の途中の酵素が機能を失えば、下流で合成される化合物は合成されなくなる。今回合成系の中盤で合成されるフラボノール以外のフラボノイドが合成されないソバの変異体を見出し、その遺伝的解析を行った結果、下流で働く酵素遺伝子の変異が、上流や下流で合成される化合物合成に影響を与えることが明らかとなった。その原因として、変異遺伝子が直接合成系の遺伝子を制御しているのではなく、フィードバック現象等により、上流の合成が抑えられたことが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物が産生するフラボノイド系化合物は、その抗酸化作用などが人間の健康増進に寄与することが知られている。しかし、フラボノイド系化合物の中には、品質に悪影響を与えるものがあり、さらに、必要とするフラボノイドが可食部になかったりする。もし、さまざまなフラボノイドのうち人間にとって有用なフラボノイドだけを必要な器官に蓄積させることが可能になれば、高齢化社会に大変有意義なものとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Various flavonoids are synthesized by a sequential enzymatic reactions called the flavonoid biosynthetic pathway. The flavonoids synthesized are basically dependent on the enzymes possessed by the plant, and if an enzyme in the middle of the synthetic system loses its function, the compounds synthesized downstream would not be synthesized. Genetic analysis of a buckwheat mutant that does not synthesize flavonoids other than flavonols, which are synthesized in the middle of the synthetic system, revealed that mutations in enzyme genes that work downstream affect the synthesis of compounds synthesized upstream and downstream. The reason for this could be that the mutant gene did not directly control the genes in the synthetic system, but rather suppressed upstream synthesis due to feedback phenomena or other factors.

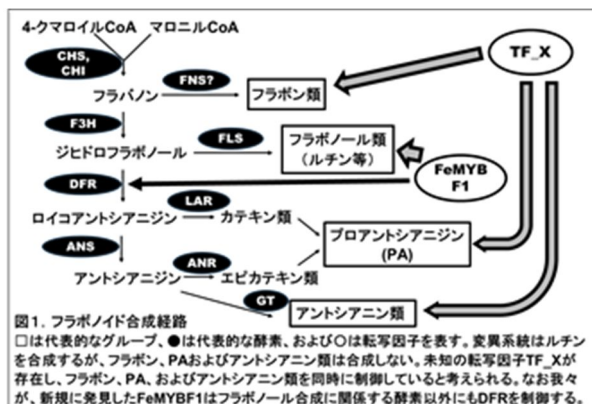
研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：フラボノイド ソバ 合成制御

## 1. 研究開始当初の背景

植物が産生するフラボノイド系化合物は、紫外線や害虫などの外的ストレスから植物体を防御するために産生されること以外にも、花の色や、花粉の稔性などにも関係していることが知られ、さらに、人に対しては、抗酸化作用をはじめとする薬理的効果が確認されている。フラボノイド系化合物は、その骨格となる化合物(アグリコン)の化学的構造の違いから、大きく、フラボン類、フラボノール類、アントシアニン類、プロアントシアニジン(PA)類などのグループに分けられる。また、それぞれのグループにはアグリコンに糖が付加された多くの種類(配糖体)が存在する。これらフラボノイド系化合物は、フラボノイド合成経路と呼ばれる代謝経路で合成される(図1)が、その合成経路で働く酵素やその酵素遺伝子の働きを制御する転写因子により、植物種や個体内の異なる部位においてさまざまな特徴が生み出される。しかし、その合成制御系、特に、フラボンとフラボノール合成制御機構には、依然多くの未解明な点が存在する。

ソバはフラボノールであるルチンを唯一穀類では合成し、葉や子実をはじめとするほぼすべての器官に多く蓄積する。これまでに、代表者らはソバのフラボノール合成を制御する転写因子(FeMYBF1)を明らかにした(Matsui et al. 2016)。FeMYBF1はフラボノール合成に関わる遺伝子のプロモーターを想定通り活性化し、さらに特筆すべきことに、FeMYBF1はフラボノール合成とは関係ないと考えられているDFRを活性化させた(Katsu et al.)。さらに、昨年、代表者らは自殖性のソバ育成集団中にフラボン合成が著しく抑制された変異体(Flavone-less 変異体)を見出した。ソバは、子葉にフラボン(オリエンチン、イソオリエンチン、ピテキシンおよびイソピテキシン)を多く蓄えるが、この変異系統では、フラボンのみならず、アントシアニンやPAの合成も阻止(抑制)されていた。そして、非常に興味深いことにこの変異系統はルチンを合成した。さらに、野生型と変異型の交配集団(F<sub>2</sub>)を用いた解析から、このルチンのみを特異的に合成する形質は1遺伝子支配であることがわかった。この現象をこれまで分かっている合成系(図1)から考えると、フラボノール以外のフラボノイド合成に関わる遺伝子を同時に制御する転写因子が存在し、その機能喪失により、フラボノール以外のフラボノイドが合成されなくなったと考えられる(図1)。



## 2. 研究の目的

本研究期間内においては、「Flavone-less 変異体の原因遺伝子の推定」、「普通ソバのフラボン合成に関わる遺伝子群の解明」および、上記研究で推定された遺伝子を証明するため、「候補遺伝子の遺伝的および分子生物学的機能証明」の3つを実施する。

## 3. 研究の方法

### Flavone-less 変異体の原因遺伝子の推定

候補遺伝子の推定は、NGS-Bulked Segregant Analysis (NGS-BSA)法とRNA-Seq解析により行う。具体的には、既に作成済みの、フラボンを合成する個体としない個体が分離する集団を利用し、フラボンを合成するグループと合成しないグループの2つのバルクDNAを作り、それぞれのバルクDNAについてNGS解析を実施する。合成するバルクDNA特異的に存在する領域には、候補遺伝子が座上していると考えられる。

また、フラボンを合成する個体と合成しない個体からRNAを抽出し、それぞれの個体の遺伝子発現を網羅的に解析(RNA-Seq解析)し、合成する個体としない個体間で、発現に差が見られた遺伝子が、NGS-BSA解析で特定した領域に存在するかを明らかにする。

### 種間雑種後代を利用したフラボン合成に関わる遺伝子群の解明

これまでに作出したソバとシャクチリソバとの雑種個体は自家不和合性であるため、自殖種子が採種できない。そこで、これまでに代表者らが開発し、また全ゲノム解読を終了した自家和合性系統(中間母本農1号)を雑種個体に交配し、自殖種子の採種が可能な個体を作成する。それらを利用し、と同様の方法で、NGS解析およびRNA-Seq解析を実施する。

### 候補遺伝子の遺伝的および分子生物学的機能証明

上記 と で見出した候補遺伝子が真にソバのフラボノイド合成制御に関わっているかを遺伝学および分子生物学的に証明する。遺伝学的証明には、候補遺伝子が連鎖しているかの連鎖解析に加え、候補遺伝子が変異を起こした個体を変異集団から NGS-TILLING 法により見出す。

#### 4. 研究成果

##### Flavone-less 変異体の原因遺伝子の推定

代表者らが作出した、ルチン合成は正常であるが、その他の多くのフラボノイド化合物の合成が抑制された変異体の原因遺伝子を解明するため、自家和合性系統を利用した F2 分離集団を作出した。F2 集団における各フラボノイド合成の可否や形態形質の分離を調査し、原因遺伝子数をまず推定した。その結果、これまでの推定通り、1 遺伝子支配であることが確認された。さらに、変異型と野生型のバルク DNA 集団を作成して次世代シーケンス解析を実施し、第一染色体上の 3400Mb から 14020Mb の範囲に 16620Mb の範囲に候補遺伝子が座すると推定できたとすることができた。(図 1)

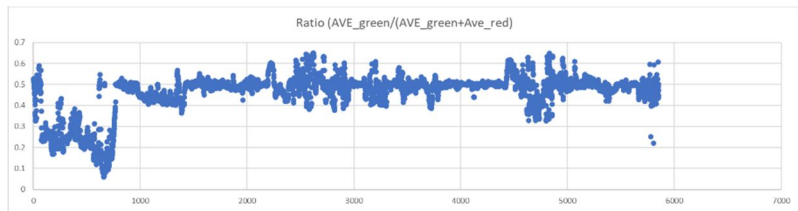


図 1 . BSA-NGS 解析による原因遺伝子領域の推定

候補領域中には 655 の候補遺伝子が存在していたため、RNA-seq 解析を行い、その領域で発現している遺伝子および変異体と

野生型間のシーケンスで差があるものを調査したところ、フラボノイド合成系で働く DFR 遺伝子が原因遺伝子であることを特定できた。変異型の原因遺伝子には大きな DNA 断片の挿入がエクソン領域に見られ、その遺伝子の機能が失っていることが考えられた。

続いて、その原因遺伝子の変異により、なぜルチン合成が正常であるのに、他のフラボノイド系化合物の合成が抑制されるかを明らかにするため、分離集団中の野生型および変異型の複数個体を用いて、RNA-seq 解析を実施した。その結果、今回見出した変異型の原因遺伝子が、他のフラボノイド合成で働くフラボノイド合成の制御および輸送に関する遺伝子の発現を抑えていることが考えられた。

さらに、原因遺伝子の変異と輸送等の発現抑制に miRNA が関係しているのではないかと推測し、miRNA-seq を実施した。その結果、原因遺伝子から作り出される miRNA が輸送等の発現を抑えているというデータは得られなかった。しかし、野生型特異的に作出される miRNA の存在が明らかとなったことから、図 2 のような仮説を考えて、それを証明する の実験を行った。

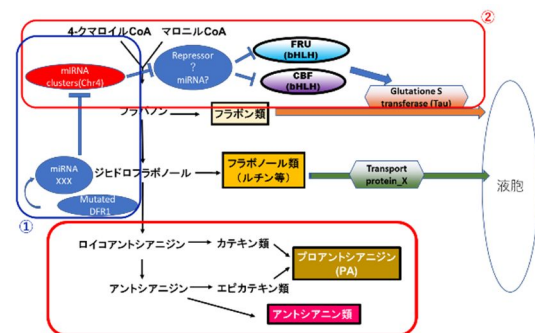


図 2 . 原因遺伝子が複数の異なるフラボノイド合成を制御する機構の仮説

##### 種間雑種後代を利用したフラボン合成に関わる遺伝子群の解明

フラボンの合成制御の詳細を解析するために開発した普通ソバとシャクチリソバの種間雑種に関しては、それを用いた分離集団の作出がうまく行かず、遺伝解析に利用できなかった。後代作出がうまく行かない理由を明らかにするため、種間雑種の花粉における染色体の分離を調査した結果、各花粉によって染色体数が異なることが分かり、それが花粉稔性を下げていることが考えられた (Sugiyama et al. 2023)。

##### 候補遺伝子の遺伝的および分子生物学的機能証明

特定できた原因遺伝子が、真に原因であることを確かめるため、普通ソバに変異を起こした変異誘導集団を作成し、この集団の中から、NGS-TILLING 法を用いて原因遺伝子に変異が生じている個体を探した。その結果、原因遺伝子に変異が生じている個体を見出すことができた。この変異体は、スプライスジャンクションの 1 塩基に変異が生じ、スプライシングが正常に行われなくなることにより、この酵素機能が正常に働かなくなっていることが考えられた。その変異型遺伝子がホモ型となった個体を作成した結果、表現型がこれまでと同じように、ルチンは合成されるが、その他のフラボノイド合成が抑制されるという同じ表現型を示した。このことから、これまで推定してきた原因遺伝子が間違いなく真の原因遺伝子であることが確認できた。さらに、この新し

い変異個体を野生型と交配して新たに F2 分離集団を作出し、野生型とホモ型個体それぞれについて、RNA-seq と miRNA-seq を行った。その結果、新しく作出した変異集団では、フラボノイドの輸送に関わる遺伝子に関しては、有意な発現量の差は確認できず、異なる遺伝子が有意に異なっていた。さらに、同じ植物材料を用いて、miRNA-seq を行った結果、有意に発現量が異なる miRNA は検出できなかった。

このことから、フラボノイド合成系の下流で働く酵素遺伝子の変異が合成系の上流で合成される化合物の合成を制御する機構は、遺伝子発現の制御ではなく、酵素の機能喪失により、フラボノイド合成系の化合物の流れが変わり、フィードバックなどの影響で変わった可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mari Sugiyama, Miyu Norizuki, Shinji Kikuchi, Yasuo Yasui, Katsuhiko Matsui	4. 巻 -
2. 論文標題 Development and chromosomal characterization of interspecific hybrids between common buckwheat ( <i>Fagopyrum esculentum</i> ) and a related perennial species ( <i>F. cymosum</i> )	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbs.22063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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 分 担 者	安井 康夫  (Yasui Yasuo)  (70293917)	京都大学・農学研究科・助教    (14301)	

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
---------	---------