

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380024

研究課題名(和文) リンドウ属植物における花色発色機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms regulating flower l pigmentaion in gentian plants

研究代表者

西原 昌宏 (NISHIHARA, MASAHIRO)

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・研究部長

研究者番号：20390883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：リンドウの花色発色機構の解明を目指して、花卉におけるフラボノイド生合成遺伝子の制御に関わる転写制御因子遺伝子の単離を行い、4種類の新規MYB遺伝子(GtMYBP3, GtMYBP4, GtMYBR1R1, GtMYB1R9)の機能を解明した。GtMYBP3とGtMYBP4は生合成経路の初期を正に制御し、GtMYBR1R1とGtMYB1R9は後半を負に制御する転写因子と同定された。また、フラボン色素の構造決定を行い、配糖化酵素遺伝子(GtUF6CGT1)を単離し、酵素諸特性を決定した。花色変異体においてトランスポゾン配列を複数決定した。これらのことよりリンドウの花色発色に関する新たな知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：We attempted to elucidate the molecular mechanisms that control flower pigmentation in Japanese cultivated gentians (*Gentiana triflora*, *G. scabra* and their hybrids). Four novel MYB transcription factor genes (GtMYBP3, GtMYBP4, GtMYBR1R1 and GtMYB1R9) were newly identified and their functions on the transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in flowers were investigated. Furthermore, we determined the structures of flavone pigments accumulated in gentian leaves and flower petals and also first identified a novel glucosyltransferase gene (GtUF6CGT1) involved in C-glucosylflavone formation. We also determined several transposon-like sequences inserted into the flavonoid biosynthesis-related genes that might cause flower color mutation such as pink and white. These data provide basic information to understand flower pigmentation in gentian plants.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：リンドウ 花色 転写因子 フラボノイド フラボン トランスポゾン アントシアニン MYB

1. 研究開始当初の背景

日本で花き園芸作物として用いられているリンドウは、フラボノイド色素であるゲンチオデルフィン(デルフィニジン 3-グルコシド 5,3'-ビス-カフェオイルグルコシド)を花卉に蓄積することにより鮮青色を呈する。ゲンチオデルフィンはデルフィニジンが高次に修飾されたポリアシルアントシアニンであり、その生合成については構造遺伝子のほとんどが特定されている。他方、リンドウ花卉には無色のフラボノイド色素としてフラボン類も存在するが、その構造・生合成経路は明らかとなっておらず、補助色素としての花色発色への関与や存在意義は不明である。また、花色の生合成を制御する機構についても一部の転写因子遺伝子が同定されているのみで、その内容は明らかとなっていない。さらに、ピンクや白花色の花色突然変異体の原因解明が進められ、トランスポゾンの関与等が報告されているが、未だ、原因不明の花色変異も多く残されている。

2. 研究の目的

ゲンチオデルフィンの生合成経路は明らかである一方、その生合成関連遺伝子の発現制御については未だ未解明である。また、アントシアニン色素と共存するフラボン色素の構造、生合成に関わる酵素遺伝子も明らかとなっていない。そこで、本研究ではリンドウで未同定のフラボノイド生合成経路について解明を進めるために、次世代シーケンシングと網羅的発現解析手法を用いて遺伝子情報を獲得する。特に、花色発色に関わる転写制御因子遺伝子を探索し、機能解析を進める。また、フラボンの構造決定を行い、その生合成に関わる新規酵素遺伝子を同定する。花色変異を示すリンドウ系統を用いて、その変異原因の解明を進めることにより、新規転移因子(トランスポゾン)を探索する。これらることにより、リンドウにおける花色発色機構の分子レベルでの統合的理解を深めることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 花卉で発現する遺伝子配列の獲得と転写制御因子遺伝子の解析

リンドウ花卉で発現する遺伝子を網羅的に探索するためにリンドウ花卉の均一化 cDNA ライブラリーを構築し、次世代シーケンシングによる解析を行った。さらに、葉、茎、根等の器官の混合 RNA より完全長 cDNA ライブラリーを構築し解析に供試した。それらの中から、相同遺伝子解析等のバイオインフォマティクス解析により、*MYB*, *bHLH*, *WDR* 等のフラボノイド生合成制御に関与することが知られている転写因子遺伝子の探索を行い、系統解析により、候補遺伝子を同定した。また、酵母 2 ハイブリッド解析やレポーター遺伝子を用いたプロモーターの活性化解析を行った。さらに、タバコ、シロイヌナズナの

形質転換体を作成し、植物体でのフラボノイド生合成への影響を調査することにより、転写因子遺伝子の機能同定を行った。

(2) フラボン生合成経路の解明

リンドウが持つフラボンを同定するために、リンドウ葉からの抽出液を液体クロマトグラフ装置を用いて精製を行った。精製されたフラボン類について質量分析ならびに¹H, ¹³C NMR, H-HCOSY, HMQC, HMBC, NOESY 解析を行なって分子構造を決定した。これらの化合物の C-配糖化に関わる遺伝子を同定するために、上記 EST ライブラリー情報から、配糖化酵素候補遺伝子を探索し、大腸菌発現ベクターを用いて組換え酵素により配糖化活性を評価した。

さらに得られた配糖化酵素遺伝子をトリアに導入し、LC-MS 解析によるメタボローム解析に供試し、花卉におけるフラボン組成を調査した。

(3) 花色変異体の解析

リンドウの新規トランスポゾンの単離を目指して、ピンク及び白系統の変異原因の解明を試みた。ピンク花色変異については、フラボノイド 3' 5' 水酸化酵素遺伝子(*F3 5 H*)を PCR により増幅し、シーケンシングによりゲノム構造の解析を実施した。白色変異体については、フラボノイド生合成遺伝子の発現解析を行い、変化が見られた遺伝子のゲノム構造の解析をピンク花と同様に行った。*3GT* 遺伝子については、インバース PCR により、プロモーター領域のシーケンシング解析も実施した。

4. 研究成果

(1) 花卉で発現する遺伝子配列の獲得と新規遺伝子の探索、機能解析

次世代シーケンサーにより、得られた配列情報を用いて、これまで未同定であった *PAL*, *C4H*, *4CL* 等のフラボノイド生合成の上流遺伝子を特定した。さらに、*P450*, *GT*, *MYB* 等の花色発色に関わると推定される遺伝子群の情報を取得した。

特に、花卉で特異的に発現している *MYB* 遺伝子に着目し、詳細な解析を行った結果、本研究により、4 種類の新規遺伝子 (*GtMYBP3*, *GtMYBP4*, *GtMYB1R1*, *GtMYB1R9*) が同定された。系統樹解析の結果を図 1 に示す。

GtMYBP3 及び *GtMYBP4* はトウモロコシの P1 オルソログである R2R3-MYB 転写因子遺伝子であり、アラビドプシスのフラボノールの生合成を制御する *MYB12* 遺伝子とも高い相同性が認められた。P1 や *MYB12* は *bHLH* タンパク質とは相互作用せずに働くことが知られている。そこで、一過的発現系によるプロモーター活性化能を解析した結果、フラボン合成酵素 (*FNS11*) やフラボノイド 3' 水酸化酵素 (*F3 H*) 等のフラボン生合成に関与する遺伝子プロモーターの活性化が認められたが、

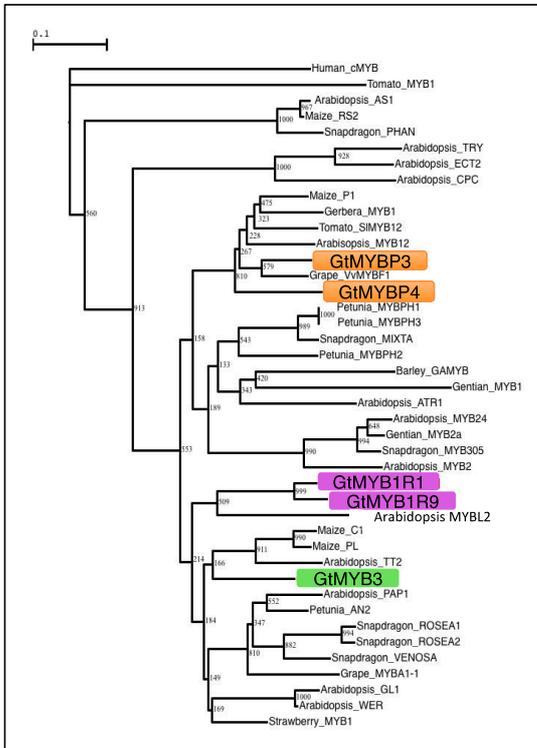


図1 植物MYB遺伝子の系統解析

アントシアニン生合成関連酵素遺伝子のプロモーターには影響しなかった。また、タバコ及びシロイヌナズナでこれら遺伝子を過剰発現させた組換え植物を用いた解析を進めた結果、*GtMYBP3*あるいは*GtMYBP4*遺伝子を過剰発現したシロイヌナズナの実生においてフラボノールの増加が確認された。これら形質転換体では *PAL*, *4CL*, *CHS*, *FLS* 等の転写が活性化されていたが、両遺伝子では影響する遺伝子が若干異なっていた。タバコ形質転換体ではアントシアニンの減少による花弁の薄色化が観察され(図2)、シロイヌナズナと同様に *CHS*, *F3H*, *FLS* 等の転写の活性化が認められた。これらのことより、*GtMYBP3* 及び *GtMYBP4* 遺伝子はリンドウ花弁におけるフラボノイド生合成の初期段階の制御に関与することが示唆された。



Wild Type *GtMYBP3* *GtMYB1R1*

図2 代表的な形質転換タバコの花の写真
過剰発現により薄色化、白色化が認められる。

また、*GtMYB1R1* 及び *GtMYB1R9* 遺伝子は Single repeat R3 MYB 転写因子遺伝子であり、シロイヌナズナのアントシアニン生合成の抑制転写因子遺伝子 (*AtMYB12*) と高い相同性が認められた。酵母2-ハイブリッド解析の結果、両タンパク質は GtbHLH1 とタンパク質

間相互作用を示したが、その強さは $GtMYB3 > GtMYB1R1 > GtMYB1R9$ の順であった(図2)。

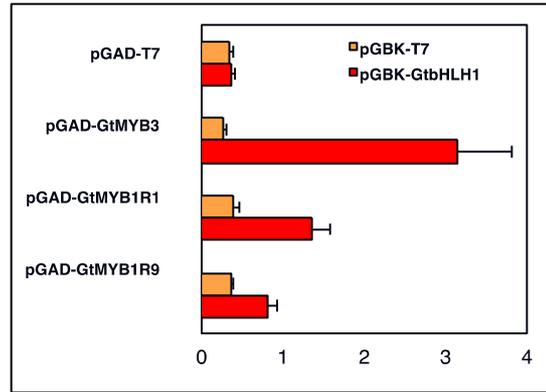


図3 酵母2-ハイブリッド解析による GtbHLH1 との相互作用

また、一過的発現解析により、両遺伝子は *GtMYB3* と *GtbHLH1* の共導入によるリンドウのジヒドロフラボノール 4-還元酵素遺伝子 (*DFR*) プロモーターの活性化を顕著に抑制することが示された。さらに、両遺伝子を過剰発現するタバコを作出した結果、花弁においてアントシアニンの減少が認められ、花弁着色の抑制(白花化)が観察された(図2)。これら形質転換体ではカルコン異性化酵素 (*CHI*)、*DFR*、アントシアニン合成酵素 (*ANS*) 遺伝子の有意な発現抑制が認められた。以上の結果から、*GtMYB1R1* 及び *GtMYB1R9* 遺伝子はリンドウ花弁においてアントシアニン生合成を負に制御する転写因子遺伝子であり、花弁の着色程度や色調を制御している可能性が示された。

本研究により得られた結果とこれまでの解析結果のまとめを図4示す。

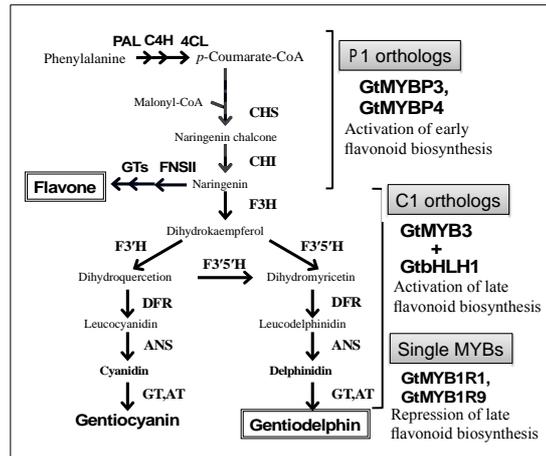


図4 リンドウ花弁におけるフラボノイド生合成経路と転写制御機構

(2) フラボン生合成経路の解明

リンドウの葉や花に含まれるフラボンの構造を解析した結果、*C*-配糖体フラボンである isoorientin (luteolin 6-*C*-glucoside) とその 4-*O*-glucoside が主要フラボンとし

が含まれることが判明した。EST データベースの情報からフラボノイド配糖化酵素相同遺伝子を探索し、開始コドンを含んでいた cDNA 配列 8 種類について大腸菌組換え酵素を用いて配糖化酵素活性を検討したところ、フラボンに対する配糖化酵素活性を有する遺伝子 (*GtUF6CGT1*) が単離された。大腸菌組換えタンパク質を用いて酵素特性の詳細な解析を行ったところ、本酵素はフラボン (apigenin と luteolin) に対する特異的な活性を有しており、その他のフラボノイド類 (フラバノン、アントシアニン、フラボノール等) に対する活性は認められなかった。さらに、本酵素遺伝子で過剰発現させたトリアニアを出し、LC-MS 解析により、花卉におけるフラボン組成を調査した結果、花卉で isoorientin の蓄積が認められ、*GtUF6CGT1* は生体内においても活性を有することが示された。このことからリンドウのフラボン合成においては、フラボン骨格が直接配糖化される経路 (図 5 Route 2) を有することが示唆された。コピグメント効果については検証中である。

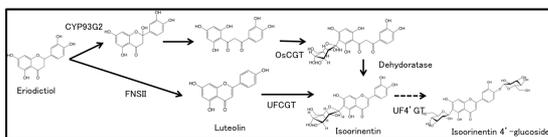


図 5 isoorientin (luteolin 6-*C*-glucoside) と isoorientin 4'-*O*-glucoside の構造と推定生成経路

(3) 花色変異体の解析

ピンク花リンドウを用いて花色変異の解析を行った結果、新規のトランスポゾン様配列が複数同定された。1つは *F3 5 H* 遺伝子の exon1 に挿入された *Ty1-copia* タイプのレトロトランスポゾンであった。本配列は両端に 160bp の LTR 配列を有し、Gag-pol タンパク質をコードしていた。また別系等では同様に *F3 5 H* 遺伝子の exon1 に 7kbp の挿入配列が同定された。構造から En/Spm タイプのトランスポゾンと推定された。白花系統についても解析を進め、*GtMYB3* 遺伝子のコーディング領域、*3GT* 遺伝子のプロモーター領域にそれぞれトランスポゾン様配列 (リピートを多数含む) の挿入が認められた。これらが転移活性を有する自立型トランスポゾンであるかどうかについては解明には至らなかった。

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 4 件)

Sasaki, N., Nishizaki, Y., Yamada, E., Tatsuzawa, F., Nakatsuka, T., Takahashi, H., Nishihara, M. (2015) Identification

of the glucosyltransferase that mediates direct flavone *C*-glucosylation in *Gentiana triflora*. FEBS Letters 589: 182-187. (査読あり)

DOI: 10.1016/j.febslet.2014.11.045.

Nakatsuka, T., Sasaki, N., Nishihara, M. (2014) Transcriptional regulators of flavonoid biosynthesis and their application to flower color modification in Japanese gentians. Plant Biotechnology 31:389-399. (査読あり)

DOI: 10.5511/plantbiotechnology.14.0731a

Nakatsuka, T., Yamada, E., Saito, M., Fujita, K., Nishihara, M. (2013) Suppression of anthocyanin pigmentation by single MYB transcription factors from gentian. Plant Cell Reports 32: 1925-1937. (査読あり)

DOI: 10.1007/s00299-013-1504-4

Nakatsuka, T., Saito, M., Yamada, E., Fujita, K., Kakizaki, Y., Nishihara, M. (2012) Isolation and characterisation of *GtMYBP3* and *GtMYBP4*, orthologues of *R2R3-MYB* transcription factors that regulate early flavonoid biosynthesis, in gentian flowers. Journal of Experimental Botany 63: 6505-6517 (査読あり)

DOI: 10.1093/jxb/ers306

[学会発表] (計 8 件)

佐々木 伸大, 山田 恵理, 西崎 雄三, 中塚 貴司, 立澤 文見, 樋口 敦美, 藤田 晃平, 高橋 秀行, 西原 昌宏 (2015) エゾリンドウからのフラボン配糖化酵素遺伝子群の単離 日本植物生理学会第 56 回年会 東京農業大学世田谷キャンパス 2015 年 3 月 16 日~18 日 (東京都)

佐々木伸大, 山田恵理, 西崎雄三, 中塚貴司, 立澤文見, 樋口敦美, 藤田晃平, 高橋秀行, 西原昌宏 日本のリンドウ園芸品種に含まれるポリフェノール類の解析 日本植物学会 第 78 回大会 2014 年 9 月 12 日~14 日 (川崎市)

佐々木伸大, 山田恵理, 西崎雄三, 中塚貴司, 立澤文見, 樋口敦美, 藤田晃平, 高橋秀行, 西原昌宏 リンドウからのフラボン *C*-配糖化酵素の単離 日本植物細胞分子生物学会第 32 回大会・シンポジウム 2014 年 8 月 21 日~22 日 いわて県情報交流センター (盛岡市)

西原昌宏 リンドウの花色発色に関わる転写調節因子の解析 第 2 回植物二次代謝フロンティア研究会 奈良県新公会堂 2013 年 11 月 23 日 (奈良市)

西原昌宏 DNA マーカーを利用したリンドウの品種識別と育種の効率化 園芸学会平成 25 年度秋季大会 小集会 「園芸作物における DNA マーカー開発と利用」岩手大学 2014 年 9 月 19 日 (盛岡市)

リンドウ花卉で発現する Single-repeat MYB 転写因子遺伝子の機能解析 中塚貴司、山田恵理、齋藤美沙、藤田晃平、佐々木伸大、西原昌宏 日本植物細胞分子生物学会第 31 回大会シンポジウム 北海道大学札幌キャンパス 2013 年 9 月 10 日～12 日 (札幌市)

中塚貴司、齋藤美沙、山田恵理、藤田晃平、柿崎裕子、西原昌宏リンドウ花卉のフラボノイド生合成の初期経路を制御する P1 型 MYB 転写因子の解析 日本植物生理学会第 54 回年会 岡山大学津島キャンパス 2013 年 3 月 21 日～23 日 (岡山市)

中塚貴司、山田恵理、今村智弘、高橋秀行、齋藤美沙、藤田晃平、西原昌宏リンドウ cDNA ライブラリーの構築 日本植物生理学会第 54 回年会 岡山大学津島キャンパス 2013 年 3 月 21 日～23 日 (岡山市)

〔図書〕(計 2 件)

Nishihara, M., Mishiba, K., Imamura, T., Takahashi, H. and Nakatsuka, T. Molecular breeding of Japanese gentians - Applications of genetic transformation, metabolome analyses, and genetic markers. The Gentianaceae : Volume 2 - Biotechnology and Applications, Springer (2015 年 8 月 出版予定)

下田武志、西原昌宏、有村源一郎 (2014) 植物の香りと色の代謝工学が拓く新時代 B&I バイオサイエンスとインダストリー 72: 197-202

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ibrc.or.jp/>

<http://gentian.ibrc.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西原 昌宏 (NISHIHARA, Masahiro)
(公財) 岩手生物工学研究センター
園芸資源研究部 研究部長
研究者番号: 2 4 3 8 0 0 2 4

(2) 研究分担者

佐々木伸大 (SASAKI, Nobuhiro)
(公財) 岩手生物工学研究センター
園芸資源研究部 主任研究員
研究者番号: 8 0 4 2 2 0 8 8

高橋秀行 (TAKAHASHI, Hideyuki)
(公財) 岩手生物工学研究センター
園芸資源研究部 主任研究員
研究者番号: 0 0 4 5 5 2 4 7

中塚貴司 (NAKATSUKA, Takashi)
静岡大学農学部 助教
研究者番号: 6 0 4 3 5 5 7 6
H25 年度より連携研究者

(3) 研究協力者

山田恵理 (YAMADA, Eri)
藤田晃平 (FUJITA, Kohei)