

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657026

研究課題名(和文)ベタレイン合成酵素遺伝子の探索と非ナデシコ属植物での発現解析

研究課題名(英文) Identification of genes for enzymes involved in betalain biosynthesis and expression analysis in non-Dianthus plants.

研究代表者

小関 良宏 (Ozeki, Yoshihiro)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50185592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：未解明のベタレイン生合成系に関わる酵素遺伝子を明らかにするため、オシロイバナ花被について RNA-seq 解析を行なった。特に生合成系の初発の酵素であるチロシンからL-DOPAを合成するステップに注目し、9つの候補酵素cDNAを得た。その中でも赤ヒートにおいてL-DOPAからcyclo-DOPAを合成する酵素として報告されたCYP76AD1のホモログであるCYP76AD3について、そのゲノム構造を決定した。さらに黄色地に赤色の斑が入る品種においてCYP76AD3遺伝子にトランスポゾンdTmj1が挿入されていること、これが離脱することによって斑入り模様が生じることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the unidentified enzymes including betalain synthesis, the sepals of four o'clock were analyzed by RNA-seq. Nine candidate cDNAs for the enzyme catalyzing tyrosine to L-DOPA, which was the first key step enzyme of betalain synthesis, were identified. The genomic structure of one of them, CYP76AD3, which was homolog of CYP76AD1 derived from red beet, was revealed. In the CYP76AD3 gene of variegated sepals with red sectors or dots on a yellow background, CACTA transposable element, dTmj1, was inserted in the intron of CYP76AD3 gene to disturb its transcription, resulting to prevent the expression of CYP76AD3 activity or red betacyanin synthesis, but to synthesize yellow betaxanthins. The movement of dTmj1 in this variegated sepals caused to revert the gene activity and the synthesis of betacyanin revived to generate red sectors or dots on a yellow background.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：ベタレイン オシロイバナ *Mirabilis jalapa* L-DOPA cyclo-DOPA CYP76AD3 トランスポゾン

### 1. 研究開始当初の背景

ベタレインの代謝系についてはトレーサー実験等から図1のように推定され、この中で当申請者は DOPA 4,5-dioxygenase (DOD) および *cyclo*-DOPA glucosyltransferase 遺伝子 cDNA をクローニングしてその酵素活性を大腸菌発現系において世界で初めて実証したが、一次代謝系からの分岐点にあるチロシンを水酸化する鍵酵素である L-DOPA 合成酵素については、数多くの研究者が挑戦してきたにもかかわらず、未知のままである。

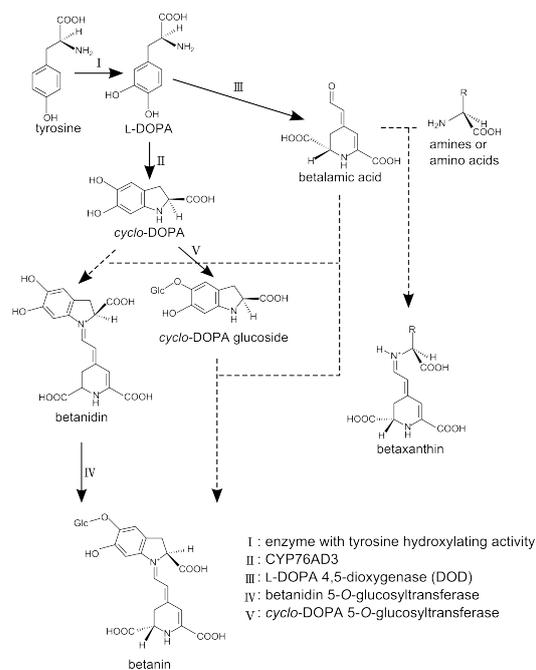


図1. ベタレイン合成系

その後、当該挑戦的萌芽研究をスタートさせた2012年にL-DOPAから*cyclo*-DOPAを合成する酵素としてCYP76AD1が報告された(Hatlestad et al. (2012) Nature Genetics 44:816-820)。しかし未だチロシンからL-DOPAを合成する酵素は明らかにされていない。これまで当研究者はこの代謝系の解明のために斑入り模様のオシロイバナ変異体からトランスポゾン単離し、2003年～2004年萌芽的研究においてトランスポゾン・ディスプレイによるこれら酵素遺伝子のクローニングにチャレンジしたが、もともとが野生種であって株間のトランスポゾンの挿入箇所があまりにも違いすぎたため、これら酵素遺伝子を同定できなかった。同様にディファレンシャル・ディスプレイ法やmRNA directed AFLP法も行なったが、野生種株間のSNPsの大きな違いからこれらチャレンジも失敗に終わり、残された手は大量シーケンス解析しかない状態となっていた。

### 2. 研究の目的

近年、次世代シーケンサーの委託解析につき、性能アップによるリード数の増加とともに価格の低下が起こり、挑戦的萌芽研究の研究

費内において十分な解析が行なえるようになってきた。特にこれまで多くの研究者は次世代シーケンサーを用いたRNA-seqにおいて、植物体のすべての組織・器官で発現している遺伝子を網羅的に解析することを目指して研究を行ってきたが、花においてのみ特異的に発現している遺伝子に注目すると、花弁は受粉後、プログラム死を引き起こす器官であり、そこで発現している一次代謝系の遺伝子は少なく、花弁特異的に発現している花色合成酵素遺伝子およびその転写調節因子遺伝子がクローズアップされてくることが期待された。そこで、次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析によって、長年の謎であったこれらチロシンからL-DOPAを合成する酵素遺伝子および赤ビートで発見されたCYP76AD1ホモログの同定を行なうこととした。

### 3. 研究の方法

本実験で用いたオシロイバナは主に東京農工大学工学部(東京都小金井市)および東京農工大学農学部(東京都府中市)で採集したものをを用いた。赤色花被オシロイバナを'R'、黄色地に赤い斑の入った花被のオシロイバナを'R/Y'、黄色花被オシロイバナを'Y'と名付け、採集後は液体窒素で凍結させ、-80℃で保存した。

(1) 次世代シーケンサーによるRNA-seq解析と全長cDNAの獲得

花被0.1gをサンプリングし、液体窒素で凍結後、使用するまで-80℃で保存した。RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出した。このRNAをタカラバイオ株式会社ドラゴオンジェノミクスセンターに送付し、ロシュ社Genome Sequencer FLXシステム(GS FLX+)を用いてRNA-seq解析を行なった。

得られたRNA-seq解析データをもとに相同性検索を行ない、L-DOPA合成酵素候補遺伝子cDNAと推定された塩基配列についてプライマーを合成し、同上的方法で'R'花被より得たtotal RNA 1 μgをテンプレートに、oligo-dT primer、Prime Script Reverse Transcriptase (Takara)を使用し、cDNAを合成し、3' RACEによるcDNAの獲得を行なった。また、各コンティグの5'末端配列獲得のため、'R'の花被(stage 5)より得られたtotal RNA 1 μgをテンプレートにSMARTer<sup>®</sup> RACE cDNA Amplification Kit (Takara)を用いて5' RACEを行ない、全長cDNA塩基配列の決定を試みた。

さらに各候補遺伝子の発現部位を明らかにするために、'R'の花被、葉、茎から同上的方法でRNAを抽出し、cDNAを合成した。これをテンプレートとし、各々の候補遺伝子特異的塩基配列領域に対してプライマーを設計し、SapphireAmp Fast PCR Master Mix (Takara Bio)を用いて、98℃ 5秒、55℃ 5秒、72℃ 15秒を32サイクルで半定量PCR

反応を行った。なお発現のコントロールとしては *actin* 遺伝子を用いた。

(2) *CYP76AD3* 遺伝子の発現解析とベタレイン合成量の解析

‘R’、‘R/Y’、‘Y’の植物個体の花被の発達段階を5つのstageに分けてサンプリングした。また若い葉および茎についてもサンプリングを行なった。これらから上述(1)の方法でRNAを抽出し、oligo-dTプライマーとPrime Script Reverse Transcriptaseを用いて1st strand cDNAを合成した。このcDNAをテンプレートとして、DNA Engine Opticon 2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を使用し、定量リアルタイムPCRを行った。

また合成・蓄積されているベタレインについては‘R’ ‘R/Y’ ‘Y’の植物体について、ステージ別の花被、および茎、葉0.1gをそれぞれ1mlの0.1%トリフルオロ酢酸:80%メタノール中で4℃で一晩静置し、色素抽出を行った。その抽出液の10μlをHandy ODSカラムによる高速液体クロマトグラフィーで分析し、標品と照合することで主要ベタシアニン、ベタキササンチンの同定を行った。

(3) *CYP76AD3* 正常型ゲノム塩基配列およびトランスポゾン解析

‘R’、‘R/Y’、‘Y’の植物個体より葉を切り出し、これを液体窒素で凍結させ-80℃で保存した。この葉を液体窒素中で乳鉢・乳棒を用いて粉状になるまで破碎し、ここからDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いて核DNAを単離した。*CYP76AD3* 正常型ゲノム塩基配列の獲得のためにRNA-seqによって得られた塩基配列情報と*CYP76AD3* cDNA配列情報(HQ656026)を元に1st methionineおよびstopコドンが含まれるようにプライマーを設計し、‘R’葉由来の核DNAをテンプレートとして*CYP76AD3* 正常型DNA領域断片をPCRによって増幅し、その塩基配列を決定した。

ここで得られた*CYP76AD3* ゲノム塩基配列をもとに、そのイントロン部分にプライマーを設計し、‘R’、‘R/Y’、‘Y’の葉から抽出したゲノムDNAをテンプレートとしてPCRを行なった。‘R/Y’ゲノムDNAより得られたトランスポゾンが挿入されていると考えられる約18kbの増幅断片について、これを制限酵素処理して断片化してプラスミドにクローニングし、その塩基配列を決定した。また‘R’、‘R/Y’、‘Y’それぞれのゲノムDNAをテンプレートとして上記イントロン部分に対するプライマーによって増幅されてきた約900bpのDNA断片につき、これらをプラスミドにクローニングして大腸菌に形質転換し、得られた49個の独立したクローンからプラスミドを抽出して、個々の塩基配列を決定した。

#### 4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーによるRNA-seq解析とL-DOPA合成酵素候補遺伝子全長cDNAの獲得

ベタレイン合成系の全酵素遺伝子を同定するため、赤色花のオシロイバナ花弁において発現している遺伝子を次世代シーケンサーを用いて解析を行なった。まず予備実験として野生の赤色花オシロイバナからRNAを抽出してcDNAを合成し、これをプラスミドに導入して約1,000の独立クローンをランダムにピックアップして、その塩基配列を決定した。その結果、約30%のcDNAがウイロイドRNA由来であることが明らかになり、ウイロイド感染している個体を網羅的解析に用いると、このウイロイド由来のRNAが大きなノイズとなって、ベタレイン合成系酵素遺伝子由来のRNAに対するリード数が少なくなってしまうことが明らかになった。そこでウイロイドに感染していない野生のオシロイバナ個体のスクリーニングを行なった。その結果、ウイロイドに感染していない赤色花個体を見いだすことができたので、これからRNAを抽出し、次世代シーケンサーGenome Sequencer FLXシステム(GS FLX+)による網羅的塩基配列決定を委託した。その結果、平均リード長が約550bp、670,000リード、40,800コンティグが得られた。この中には、すでに当研究者が見いだした4,5-DOPA dioxygenase 遺伝子および*cyclo*-DOPA 配糖化酵素遺伝子が含まれていることが明らかになった。

次に*CYP76AD1*にアミノ酸配列の上で同性的のあるものとして17のコンティグが候補として見いだされた。このうち、重複していると考えられるコンティグを排除し、9つのコンティグを候補とした(*CYP76AD3*、12282、1073、396、24900、3887、376、49799、A7HVD)(図2)。これらの遺伝子について、5’RACE、および3’RACEを行ったが、現在までに、3887と12282については全長配列が獲得できた。3887については580アミノ酸をコードする1,740bpの配列が得られ、

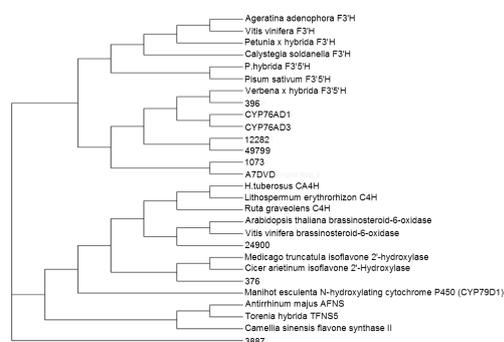


図2. オシロイバナ RNA-seq 解析によって得られた *CYP76AD3* 相同遺伝子群と既報の P450 タンパク質アミノ酸配列との系統樹解析。

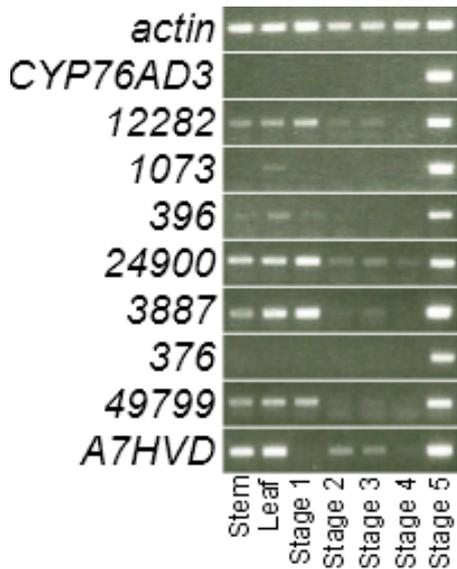


図 3. オシロイバナ RNA-seq 解析によって得られた CYP76AD3 相同遺伝子群の茎、葉および花被の発達ステージにおける半定量 RT-PCR による発現解析。

CYP76AD3 アミノ酸配列と 35% の相同性、77% の類似性を示した。12282 については、567 アミノ酸をコードする 1,703 bp の配列が得られ、CYP76AD3 と 50% の相同性、88% の類似性を示した。

さらに候補としたコンティグについて、半定量 RT-PCR により行った (図 3)。その結果、12282、24900、3887、49799、A7HVD は茎や葉でも発現量が多いことが分かった。しかし、全てのコンティグにおいて、stage 5 の花被において、最も発現量が多いことが明らかとなった。特に 376 においては茎や葉での発現はほとんど見られず、stage 5 で高い発現が見られた。以上のように、2012 年に赤ビートより報告された L-DOPA から *cyclo*-DOPA への反応を触媒する酵素遺伝子である CYP76AD1 と相同性のあるコンティグを 9 種見いだすことができた。その中から CYP76AD3 遺伝子に注目して以下の研究を進めた。

### (2) CYP76AD3 遺伝子の発現解析とベタレン合成量の解析

リアルタイム PCR の結果、‘R’において CYP76AD3 はステージ 3 において発現量が最大となり、ステージ 4 では発現量が減少

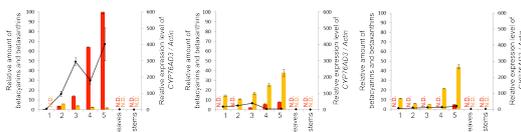


図 4. R (赤色全色)、R/Y (黄色地に赤色斑入り)、Y (黄色全色) におけるベタシアンニンおよびベタキサニン合成量および CYP76AD3 遺伝子発現量の葉、茎および花被のステージごとの変化

するが再びステージ 5 において発現が上昇することが明らかとなった。dTmj1 が挿入されていた ‘R/Y’ については、ステージ 3 で発現量が最大となることが分かった。また、‘Y’ についてわずかではあるが、CYP76AD3 の発現が見られた。さらにどの品種においても CYP76AD3 は葉や茎ではなく花被において高い発現が見られた (図 4)。

### (3) CYP76AD3 正常型ゲノム塩基配列およびトランスポゾンの解析

‘R’の葉から抽出したゲノム DNA から増幅された DNA 断片の塩基配列を決定したところ、CYP76AD3 は 3,948 bp のイントロンに分断された 880 bp の第一エクソンと 611 bp の第二エクソンから成る 497 アミノ酸をコードする構造をしていることが明らかとなった (図 5)。このゲノム構造を正常型とした。

次に各オシロイバナのゲノム DNA をテンプレートに、イントロン領域に設計したプライマーを用いて long PCR を行ったところ、‘R’では見られなかった長いバンドが ‘R/Y’ で見られた。この長いバンドについて、配列を解析したところ、正常型 CYP76AD3 のイントロン部分に、16,865 bp の挿入配列が確認できた。その挿入配列の両末端には、CACTACTACAAA からなる 12 bp の terminal inverted repeat が、また挿入位置には TAC の 3 bp からなる target site duplication (TSD) が見いだされた。このことから、この挿入配列は *En/Spm* スーパーファミリーに属する DNA 型転位因子であることが明らかとなり、これを *dTmj1* と命名した (図 5)。その末端近傍配列には (A/G)ATGGCGGT (T/G/C) の subterminal repeats (STR) が左末端に 4 ヶ所、右末端に 15 ヶ所見られた。また、その内部配列には、いくつかのオープンリーディングフレーム (ORF) が見いだされたが、全ての ORF はトランスポゼースに相同を示す ORF は見られなかったことから、*dTmj1* は非自律性の転位因子であることが明らかとなった。また ‘Y’ および ‘R/Y’ のゲノム DNA をテンプレートとして挿入領域であるイントロン部分をターゲットにして PCR を行なったところ、*dTmj1* を含まない長さの DNA 断片が得られ、その

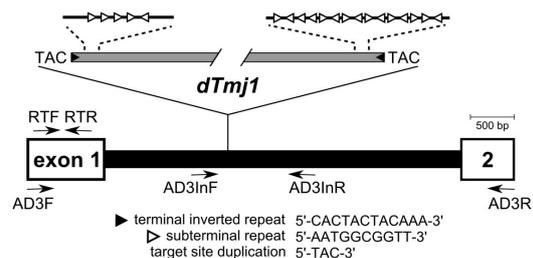


図 5. CYP76AD3 遺伝子の構造と ‘R/Y’ において挿入されているトランスポゾン *dTmj1* の構造。

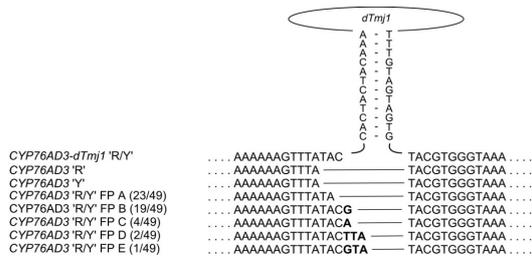


図 6. ‘R/Y’ における *CYP76AD3* 遺伝子 *dTmj1* 挿入領域に見られた footprints の塩基配列。

塩基配列を決定したところ、挿入していた *dTmj1* が脱離した痕跡である footprints 配列が見いだされた。‘R/Y’ の footprints のパターンについて、TSD の C が欠損しているパターンが 49 クローン中 23 クローン、G が挿入されているパターンが 49 クローン中 19 クローン、A が挿入されているパターンが 49 クローン中 4 クローン、TTA が挿入されているクローンは 49 クローン中 2 クローン、GTA が挿入されているクローンは 49 クローン中 1 クローンであった (図 6)。すなわち、ここで用いた ‘R/Y’ 個体は、*CYP76AD3::dTmj1* のホモ個体であると考えられた。これに対し、‘R’ および ‘Y’ において、この *dTmj1* が挿入された DNA 領域について同様に独立クローンの塩基配列決定を行なったところ、footprint 配列は見られなかった。さらに ‘Y’ の 2 つのエキソンおよびその間のイントロン領域について塩基配列を決定したところ、‘R’ における塩基配列と 99% の相同性があり、ORF の途中にストップコドンは入っていなかった。このことから ‘Y’ において *CYP76AD3* 遺伝子の発現が抑制されているのは、プロモーターあるいはターミネーター領域、あるいはその発現制御を司る転写調節因子遺伝子に変異が入っていると考えられた。

なお、*CYP76AD3* についての研究成果は論文としてまとめて J. Plant Physiol. に投稿しており、平成 24 年 4 月 16 日時点において minor revision となっている。

## 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 1 件)

(1) Nakatsuka, T., Yamada, E., Takahashi, H., Imamura, T., Suzuki, M., Ozeki, Y., Tsujimura, I., Saito, M., Sakamoto, Y., Sasaki, N. and Nishihara, M. Genetic engineering of yellow betalain pigments beyond the species barrier. Scientific Reports, 査読有、Vol. 3、2013、1970  
DOI: 10.1038/srep01970.

[学会発表] (計 4 件)

(1) 鈴木万理子、徳本廣子、宮原 平、佐々

木伸大、小関良宏：オシロイバナにおけるベタレイン生合成に関わる *CYP76AD3* 遺伝子のゲノム構造解析、第 55 回日本植物生理学会年会 (2014. 3. 18、富山大学五福キャンパス)

(2) 鈴木万里子、小関良宏、佐々木伸大：オシロイバナのベタレイン合成変異体におけるシトクロム P450 遺伝子のゲノム構造解析、日本植物学会第 77 回大会 (2013. 13、北海道大学高等教育推進機構)

(3) 鈴木万里子、小関良宏、佐々木伸大：オシロイバナにおけるベタレイン色素合成に関わる *CYP76AD3* 遺伝子のゲノム構造解析、第 30 回日本植物細胞分子生物学会 (札幌) 大会・シンポジウム (2013. 9. 10、北海道大学高等教育推進機構)

(4) 中塚貴司、佐々木伸大、山田恵理、藤田晃平、高橋秀行、今村智弘、鈴木万里子、小関良宏、辻村郁子、齋藤美沙、坂本裕一、西原昌宏：タバコ培養細胞 BY-2 を用いたベタレイン色素合成系の確立、第 30 回日本植物細胞分子生物学会 (札幌) 大会・シンポジウム (2013. 9. 10、北海道大学高等教育推進機構)

[図書] (計 0 件)

[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.tuat.ac.jp/~ozeky/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小関 良宏 (OZEKI, Yoshihiro)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：50185592

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし