

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658035

研究課題名(和文) 新たな花色制御技術の開発を目指したアシル化キナ酸合成に関わる遺伝子の解析

研究課題名(英文) Study of genes involved in acylquinic acid biosynthesis toward development of novel method for flower color modification

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、花の青色発現機構の1つである、アントシアニンとコピグメントとの分子間会合(コピグメンテーション)を人為的に制御するため、花色に関するアシル化キナ酸合成遺伝子の単離と解析を行った。まずチコリ、アーティチョーク、アジサイおよびキクを材料に用いて、アントシアニン色素と分子会合することにより発色を担う、アシル化キナ酸やフラボノイド類を明らかにした。また、アーティチョーク、キク、アジサイからアシル化キナ酸合成に関与すると考えられるシキミ酸/キナ酸ヒドロキシシナモイル基転移酵素(HCT)遺伝子およびキナ酸ヒドロキシシナモイル基転移酵素(HQT)遺伝子のホモログを単離した。

研究成果の概要(英文)：In this study, to regulate co-pigmentation of anthocyanin and co-pigment in the flower, acylquinic acid biosynthetic genes were isolated and characterized. Acylquinic acids, flavonoids and anthocyanins responsible for the flower coloration of chicory, artichoke, hydrangea, and chrysanthemum were identified. The cDNA homologs encoding hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase (HCT) and hydroxycinnamoyl-CoA: quinate hydroxycinnamoyltransferase (HQT) were cloned from artichoke, chrysanthemum and hydrangea.

研究分野：花き園芸学

キーワード：花色 コピグメント アシル化キナ酸 アントシアニン フラボノイド

### 1. 研究開始当初の背景

花色は、アントシアニン色素と共存する様々な助色素（コピグメント）や金属イオンとの分子間会合によっても大きく変化する。代表的なコピグメントは、フラボンやフラボノール、そして有機酸エステルである。アントシアニンと共存することで、花卉の吸収スペクトルは長波長側へシフトし、花色は青色になる。この現象はコピグメンテーションとよばれ、多くの花きにおいて青色の発現に関与する（図1）。例えば、アジサイの萼片に含まれるアントシアニン、デルフィニジン3-グルコシドと単純な構造で、液胞 pH も 4 とやや酸性側という、赤色を発現する条件であるが、実際には美しい青色を発現する。これは、アルミニウムと有機酸エステルであるアシル化キナ酸が、アントシアニンと分子間会合した結果である（Yoshida ら, 2009）。アシル化キナ酸などの有機酸エステル類の生合成や遺伝子は、赤クローバー (*Trifolium pratense*) やタバコなどから、リグニン生合成やキナ酸エステル生合成に関与する遺伝子としての報告があるが、花きの花色形質を決定する遺伝子としては、これまで全く解析されていなかった。

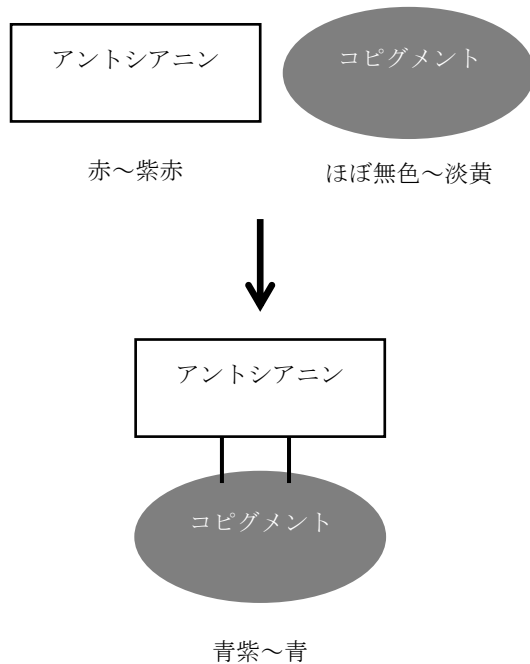


図1 本研究が対象としたコピグメントについての概略図

### 2. 研究の目的

花の青色発現機構の1つである、アントシアニンとコピグメントとの分子間会合（コピグメンテーション）を人為的に制御することで、色素本体の構造を改変することでは成し得なかった花色の改変、例えば青色の花色発現を可能にするための基礎的な知見を得る。花色を決定するアシル化キナ酸生合成遺伝

子を特定することができれば、遺伝子組換えなどによる花色改変にも、新たな方法を加えることができる。また、コピグメンテーションによる紫や青といった花色の発現機構を遺伝子レベルで解析できると考えられる。

### 3. 研究の方法

本研究ではコピグメント物質の1つであるアシル化キナ酸の生合成に関わる遺伝子の単離と解析する。アントシアニンの構造は単純であるにもかかわらず、アシル化キナ酸を花卉に蓄積することにより青や紫色を発色している植物であるアジサイ、アーティチョーク、チコリを植物材料として用いた。

また、将来的に得られたアシル化キナ酸生合成遺伝子を導入してアシル化キナ酸類の花弁での生合成への影響や、花色への影響を解析する材料としてキクを用いた（図2）。

まず、花卉または着色している花器官の色の測定を CD100 分光測色計および英国王立園芸協会（RHS）カラーチャートを用いて行った。

次に、青色発現に有効と考えられる花器官含有アントシアニン色素とアシル化キナ酸類などのコピグメント物質を薄層クロマトグラフィー（TLC）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、および質量分析計（LC-MS/MS）で分析した。

また、コピグメント物質として花色の発現に影響を及ぼすと考えられるアシル化キナ酸類の生合成を担うシキミ酸/キナ酸ヒドロキシシナモイル基転移酵素（HCT）およびキナ酸ヒドロキシシナモイル基転移酵素（HQT）をコードすると考えられる遺伝子クローンの単離を行い解析に用いた。



図2 植物材料として用いたアシル化キナ酸を花卉に蓄積する植物  
アジサイ（青色花）、チコリ（青紫色花）はデルフィニジン型アントシアニンを、アーテ

イチョーク（紫色花）、キク（桃色花）はシアニジン型アントシアニンを主要色素にもつ

#### 4. 研究成果

##### (1) チコリ

チコリの花卉の測色値は、L\* : 64.0, a\* : 15.2, b\* : -31.1, 色相角 : 296° , 彩度 : 65.8であった。

この青紫色の花弁に蓄積している主要アントシアニン LC-MS/MS などで解析した結果、デルフィニジン 3,5-ジ-マロニルグルコシドであることを確認した。3-パラ-クマロイルキナ酸が蓄積すると報告されていたアシル化キナ酸は、分析の結果検出されなかった。一方で、エスクリン (6,7-ジヒドロクマリン 6-グルコシド) と考えられるクマリン配糖体が大量に蓄積していることが明らかになった。従って、チコリの青色発現には、このクマリン配糖体の関与が示唆された。そこでチコリからのアシル化キナ酸生成遺伝子のクローン化は中止した。

##### (2) アーティチョーク

アーティチョークの頭状花は、RHSカラーチャートでViolet-Blueグループの96B-Cであり、測色値は、L\* : 49.1, a\* : 7.8, b\* : -22.6, 色相角 : 289° , 彩度 : 71.4 であった。

この紫色花に蓄積するアントシアニンは、LC-MS/MS による分析の結果、シアニジン 3-マロニルグルコシド 5-グルコシドで、主要コピグメントは、フラボン配糖体であるアピゲニン 7-ルチノシドとアピゲニン 7-グルクロン酸であると推定された。また、アシル化キナ酸類としてクロロゲン酸 (3-カフェイルキナ酸) の蓄積が認められた。

アントシアニンとの相互作用により花色に影響を与えるとされるクロロゲン酸類などのアシル化キナ酸生合成に関与する酵素遺伝子を解析するために、アーティチョークの花弁で発現している、HCT (ヒドロキシ桂皮酸-CoA : シキミ酸/キナ酸 ヒドロキシシナモイル基転移酵素) 遺伝子を1クローン、HQT (ヒドロキシ桂皮酸-CoA : キナ酸 ヒドロキシシナモイル基転移酵素) を3クローンを得て、クローンの解析と異種植物種導入プラスミドの構築に用いた。

##### (3) キク

品種「大平」の花色は、RHS カラーチャートでRed-PurpleグループのN74Cで、測色値は、L\* : 71.4, a\* : 18.1, b\* : -6.8, 色相角 : 340° , 彩度 : 19.3であった。

この桃色の舌状花弁を LC-MS/MS により解析した結果、主要アントシアニンは、シアニジン 3-マロニルグルコシドであり、主要コピグメントは、フラボン配糖体であるアピゲニンとルテオリンとアカセチンの7-マロニルグルコシドであった。また、アシル化キナ

酸類としてクロロゲン酸 (3-カフェイルキナ酸)、3,5-ジカフェオイルキナ酸の蓄積が確認された (表1)。

様々なクロロゲン酸類を蓄積することから、舌状花弁にてアシル化キナ酸生合成遺伝子が発現していると考えられた。そこで RNA seq 解析で得られたコンティグの中から HCT 遺伝子ホモログ (CmHCT1 と命名) を1つ (CmHCT1 と命名)、HQT2 遺伝子ホモログを1つ (CmHQT1 と命名) クローン化して、クローンの解析と異種植物種導入プラスミドの構築に用いた。

表1 キク舌状花弁で蓄積するヒドロキシキナ酸エステルとフラボン配糖体類

Rt (分)	コピグメント化合物	m/z [M+H]	$\lambda_{max}$ (nm)
12.05	クロロゲン酸*	355	242, 300, 324
12.55	カフェオイルキナ酸類*	355	236, 300, 327
16.52	ルテオリン7-グルコシド	449	236, 284, 340
17.56	3,5-ジカフェオイルキナ酸*	517	246, 292, 300, 308
18.03	ルテオリン7-マロニルグルコシド	535	254, 271, 329, 349
19.55	アピゲニン7-マロニルグルコシド	519	240, 268, 333
20.12	デオスメチン7-マロニルグルコシド	549	236, 346
23.66	アカセチン7-マロニルグルコシド	533	236, 269, 333

\* : アシル化キナ酸エステル類

##### (4) アジサイ

アジサイ赤色花品種「キヨスミサワ」「トキメキ」などがく弁で発色を担うアントシアニンを解析し、これまで青、紫、赤色のアジサイで報告されているデルフィニジン 3-グルコシドとは異なる、シアニジン 3-グルコシドおよびシアニジン 3-サンブピオシドの蓄積により、赤色発現が起きていることを明らかにした。このシアニジン型アントシアニン色素の蓄積による赤色発色は土壌条件により左右されない。

RHS カラーチャートの Blue グループ 101B-C の花色 (分光測色計測定値 : L\* : 54.8, a\* : 2.6, b\* : -37.0, 色相角 : 274° , 彩度 : 86.0) を示した、アジサイ青色花品種「マリンプルー」のがく片では、既知のデルフィニジン 3-グルコシドと 5-カフェオイルキナ酸 (ネオクロロゲン酸) が検出された。

このがく片で発現しているアシル基転移酵素をコードすると考えられる遺伝子のクローン化を行い、HCT/HQT と相同性の高い cDNA クローン (HmAT1) が得られた。

##### (5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

これまで、花色に関与するアシル化キナ酸の生合成に関与する酵素遺伝子については解析されてこなかった。本研究では、チコリ、アーティチョーク、アジサイおよびキクを材料に用いて、アントシアニン色素と分子会合することにより発色を担う、アシル化キナ酸やフラボノイド類を明らかにした。また、初めてキク、アジサイからアシル化キナ酸生合成に関与すると考えられる HCT/HQT 遺伝子のホモログを単離することができた。

##### (6) 今後の展望

当初予定していた、アシル化キナ酸生合成遺伝子を異種発現させて、その機能を明らかにすることと花色への影響を解析することについては達成できなかったため、今後、アーティチョークやアジサイの遺伝子をキクに導入したり、キク内在性のアシル化キナ酸生合成酵素遺伝子 (HmHQT1 と HmHCT1) の発現を抑制することによる花色への影響について解析することで、アントシアニンとコピグメントとの分子間会合 (コピグメンテーション) を人為的に制御することによる花色の改変、例えば青色の花色発現を可能にする、といった技術の確立につながるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計1件)

Hiramoto T, Honjo E, Noda N, Tamada T, Kazuma K, Suzuki M, Blaber M, Kuroki R, Structural basis for acceptor-substrate recognition of UDP-glucose: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase from *Clitoria ternatea*, *Protein Science*, 査読有、24、2015、395-407  
DOI: 10.1002/pro.2630

〔学会発表〕 (計3件)

- ① 小玉雅晴、田邊雄太、野田尚信、中山真義、アジサイの赤色覆輪品種の色素構成と遺伝特性、園芸学会平成27年度春季大会、2015年3月28日、千葉大学・西千葉キャンパス (千葉)
- ② 小玉雅晴、田邊雄太、野田尚信、中山真義、青色あるいは赤色を安定に発色するアジサイ品種の色素関連成分の特徴、園芸学会平成26年度秋季大会、2014年9月28日、佐賀大学・本庄キャンパス (佐賀)
- ③ Naonobu Noda, Noriko Nakamura, Satoshi Yoshioka, Sanae Kishimoto, Yoshikazu Tanaka, Ryutaro Aida, Metabolic engineering for methylated anthocyanins production in chrysanthemums, XXVIIth International Conference on Polyphenols & 8th Tannin Conference, 2014年9月3日、名古屋大学・東山キャンパス (名古屋)

## 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