

## 第5章 総合考察

花色育種を促進する上で、主要な花色素であるアントシアニン生合成の知見を蓄積することは非常に重要である。本研究の第1章で述べたように、これまでに多くの植物種でアントシアニンやフラボン、フラボノールの分子的性質や、生合成経路に関与する酵素および遺伝子の研究が進められてきた。しかしながら、単子葉植物のアントシアニン生合成酵素や遺伝子に関する知見は限定されており、特に *Iris* 属植物における研究はほとんど進展していない。

そこで、ダッチアイリスにおける花色発現機構の解明を進め、花色の多彩化育種を促進する有用な知見を得るために、本研究ではアントシアニン生合成に関する分子遺伝学的解析を実施した。本章では、本研究から得られた成果を基にして、花色の育種戦略について論じる。

第2章・第1節で単離したアントシアニン生合成遺伝子、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS*、および *3GT* のうち、アントシアニンとフラボン生合成の分岐に当たる *F3H* およびアントシアニンの安定性に重要な *3GT* を大腸菌において異種発現させ、機能解析を行った。まず *F3H* 遺伝子についてみると、His-tag との融合タンパク質として発現させた IhF3H は、アッセイに用いたフラバノンのほぼすべてに活性を示した。しかしながら、4'位のメチル化および7位のメチル化は F3H の活性を大きく減少させることが明らかになった。これまでに F3H の基質特異性が調査されている植物はペチュニアのみである。そこで、ペチュニア F3H (PtF3H) と本研究において調査した IhF3H の基質特異性を比較し、その結果を Table 5-1 に示した。IhF3H および PtF3H はともに様々なフラバノンに対して幅広い基質認識を行っており、またこの2つの酵素に共通する特徴として、フラバノン4'位および7位のメチル化が活性を大きく減少させることである。これに対して、両者の異なる点としては、IhF3H は naringenin よりも3'位がメチル化されたフラバノンである hesperetin に対して高い活性を示し、一方、PtF3H は homoeriodictyol に低い活性を示したことである。推定

Table 5-1. Comparison of substrate specificities of F3Hs between *Iris hollandica* (Ih) and *Petunia hybrida* (Ph)

	IhF3H1	IhF3H2	PhF3H	PhF3H
Naringenin	100	100	100	100
Sakuranetin	<1	<1	—	—
Isosakuranetin	100	81	—	—
Eriodictyol	98	95	95	95
Homoeriodictyol	194	133	—	65
Hesperetin	22	28	—	34
5,7-Dihydroxy-3'4'5'- <i>O</i> -trimethyl-flavanone	—	—	—	<1
Pinocebrin	39	27	38	38
7- <i>O</i> -methylpinocebrin	—	—	—	<1
5- <i>O</i> -methylpinocebrin	—	—	—	9
5,7- <i>O</i> -methylpinocebrin	—	—	—	<1
Liquiliginin	282	183	—	—
2,3-dihydroflavone	n.d.	n.d.	—	—
Reference	This study	This study	Wellmann <i>et al.</i> 2004	Schroder <i>et al.</i> 2004

Table 5-2. Comparison of substrate specificities of 3GTs among *Iris hollandica* (Ih), *Gentiana triflora* (Gt), *Vitis vinifera* (Vv) and *Petunia hybrida* (Ph)

		Ih3GT	Gt3GT	Vv3GT	Ph3GT
Anthocyanidins	Delphinidin	100	100	100	100
	Malvidin	206	—	14	—
	Cyanidin	102	61	128	78
	Peonidin	123	—	87	—
	Pelargonidin	51	39	50	88
Flavonols	Kaempferol	—	4	1	107
	Quercetin	—	6	4	93
	Myricetin	—	7	3	44
	Mortin	—	—	<1	—
	Isorhamnetin	—	—	2	—
	Fisetin	—	—	2	—
Dihydroflavonols	Dyhydrokaempferol	—	n.d.	—	n.d.
	Dyhydroquercetin	—	n.d.	—	n.d.
	Dyhydromyricetin	—	n.d.	—	n.d.
Anthocyanins	Cyanidin 3-glucoside	—	n.d.	—	n.d.
Reference		This study	Tanaka <i>et al.</i> 1996	Ford <i>et al.</i> 1998	Yamazaki <i>et al.</i> 2002

アミノ配列が類似し、ほとんど同一の基質認識を示す両種の酵素特性が、両種間でこのように機能分化している点は興味深い。

次に、Ih3GTの基質特異性に関しても他種植物の3GTと比較した結果をTable 5-2に示した。Ih3GTは、調査したすべてのアントシアニンに対して3位のグルコシル化を触媒したが、アントシアニン種によっては活性が2倍、もしくは半減するものも存在した。このようなアントシアニン種に依存した活性の差異は、リンドウおよびブドウでも報告されている。リンドウの3GT (Gt3GT)の活性はdelphinidinで最も高く、pelargonidinに対しては半減し、ブドウの3GT (Vv3GT)活性はcyanidinで最も高く、malvidinでは1/7以下に減少していた。一方、ペチュニアの3GT (Pt3GT)活性はIh3GT、Gt3GTおよびVv3GTよりもアントシアニンB環の修飾に左右されにくいようである。このことは、3GTの基質認識機構が植物種間で分化していることを示す。このように、IhF3HおよびIh3GTが、他種植物の対応する酵素との間で幾分、機能分化していることが明らかになった。アントシアニン生合成酵素に関するこのような基質特異性に関する種間変異の知見を蓄積していくことは、花色の分子育種を進める上で有用となろう。

第1章で述べたように、アントシアニンはフラボンやフラボノールなどのコピグメントと一定の比で共存することで、吸収波長が長波長側へシフトし、青色化を起こす。そのため、アントシアニンの蓄積量を抑制し、アントシアニンに対するコピグメントの割合を高くすることによって、花色の青みを増すことが期待される。これに関して、ペチュニアやトルコギキョウでのフラボノール合成酵素 (FLS) の発現を抑制した形質転換個体で花卉の赤色化が (Holton and Keam 1994, Nielsen *et al.* 2002)、トレニアではDFR遺伝子の発現を抑制した形質転換個体で花卉の青色化が報告されている (Aida *et al.* 2000、田中・勝元 2002)。Iris属植物はコピグメントとして青色発現効果が高いフラボン配糖体 (Cグルコシルフラボン) を持つことから、アントシアニン合成量を調節することによってコピグメント効果を発現させ、青色花を作出する手法は有効であると考えられる。事実、ダッチアイリス品種「Prof. Blaauw」の青色花は、delphinidin 3pCRG5Gとswertisinやvitexin

などの *C*-グルコシルフラボンとの、またハナショウブの青紫色花は malvidin 3*p*CRG5G および petunidin 3*p*CRG5G と isovitexin (*C*-グルコシルフラボン)とのコピグメンテーションにより発現していた (Asen *et al.* 1970、Yabuya *et al.* 1997)。本研究 (第2章・第1節、第3章・第1節) では、アントシアニンとフラボンの生合成の分岐点に位置している遺伝子の *F3H* cDNA の単離・解析に成功しており、今後、この *F3H* cDNA を利用してプロモーター領域を単離し、*F3H* 遺伝子の発現量を調節する配列や転写因子を解析することで、アントシアニンおよびフラボンの蓄積量の制御に関して新たな知見が得られるであろう。

さらに、コピグメンテーション分子機構を解明するためには、アントシアニンとコピグメントであるフラボンの生合成の分岐点に位置し、*F3H* と基質が共通であるフラボンシンターゼ (FNS、Fig. 1-2)、またフラボンの配糖化を触媒するフラボン 6-*C*-グルコシルトランスフェラーゼ (F6GT) やメチル化に関与する遺伝子の単離が必要である。FNS や F6GT に関する情報は少なく、特に F6GT ではソバ (*Fagopyrum esculentum*) の実生で酵素活性の解析が報告されているのみである (Kersher and Franz 1987)。一方、FNS については、パセリの懸濁培養細胞 (Britsch *et al.* 1981)、キンギョソウの花 (Stotz and Forkmann 1981)、ダイズの培養細胞 (Kochs and Grisebach 1987) およびガーベラ (Martens and Forkmann 1998) 由来の抽出物においてフラボン生成活性が確認されており、生化学的特性も明らかにされている。さらに、ガーベラ (Martens and Forkmann 1999)、キンギョソウおよびトレニア (Akashi *et al.* 1999)、カンゾウ (*Glycyrrhiza echinata*) (Akashi 1998)、シソ (Kitada *et al.* 2001) およびパセリ (Martens *et al.*, 2001) においては *FNS* 遺伝子の単離が報告されているものの、単子葉植物では全く報告されていないのが現状である。

このように、ダッチアイリスにおけるアントシアニンとフラボンによるコピグメンテーション分子機構を解明するためには、様々な問題が残されている。しかしながら、コピグメンテーション分子機構の解明は、最近、遺伝子組換え技術により誕生した青バラの青さを磨くために (勝元・田中 2005)、また青色花を発現するのに鍵となる delphinidin 型アン

トシアニンを有するにも拘らず青色花品種のないハナショウブ、ユリ、チューリップなどの花色育種のために貢献するものである。

青紫色花品種、「ブルーダイヤモンド」(内、外両花被および雌蕊とも青紫)、白色花品種「White Wedgewood」(内、外両花被および雌蕊とも白) および複色花品種「Surprise」(外花被および雌蕊が白、内花被が薄紫)を用いた各アントシアニン生合成遺伝子の発現解析において(第2章・第2節)、「White Wedgewood」では *DFR* 遺伝子発現が外花被と雌蕊で欠損し、内花被で顕著に減少していた。一方、「Surprise」ではアントシアニン生合成遺伝子全体の発現が減少しており、特に *DFR* 遺伝子発現の減少が外花被と雌蕊で顕著であった。さらに、第4章でこれらの品種の *DFR* のゲノム構造を調査したところ、構造遺伝子内に発現の欠損につながる重要な変異は検出されなかったが、プロモーター領域に *Ty1-copia* 型 LTR レトロトランスポゾンの挿入が見出された。「ブルーダイヤモンド」ではプロモーター領域にレトロトランスポゾンの挿入があるものと、挿入を持たないもののが存在していたが、他の2品種はレトロトランスポゾンの挿入があるもののみが検出され、そのために *DFR* 遺伝子の発現が欠損または顕著な減少をもたらしたものと結論された。また、プロモーター領域への転移因子の挿入によって遺伝子発現が欠損もしくは減少したという報告は、トウモロコシの *A1 (DFR)* 遺伝子 (O'Reilly *et al.* 1985、Chomet *et al.* 1991、Lisch *et al.* 1995) およびアサガオの *ivs-mwt* 変異体の (*bHLH2*) 遺伝子でなされている (Park *et al.* 2007)。さらに、プロモーター領域への転移因子の挿入は、転写因子結合部位を破壊しなくても、挿入領域周辺で DNA メチル化パターンの変化をもたらし、転写異常を引き起こすことも報告されている (Han *et al.* 2004、Iida *et al.* 2004)。

レトロトランスポゾンの挿入が、「White Wedgewood」および「Surprise」における *DFR* 遺伝子発現の欠損または減少の決定的な要因であるのか否かを実証するためには更なる実験が必要である。今後、*DFR* 構造遺伝子の5'上流がプロモーター活性を持つために必要な領域を特定することで、本研究で見出されたレトロトランスポゾンの挿入部位が転写に与える影響が明らかにされるであろう。

アントシアニン生合成の制御要因として、構造遺伝子のプロモーター領域に加えて転写因子の働きも重要である。単子葉植物のアントシアニン生合成に関する知見は、主としてトウモロコシなどの花卉を形成しない植物で得られてきた。その研究を基にして、単子葉植物種と双子葉植物種ではアントシアニン生合成の制御機構が異なることが示されている (Martin and Gerats 1993、Mol *et al.* 1998、Schwin and Devies 2004)。しかしながら、上記の知見は、種子や果実などの貯蔵器官と花器官という異なる部位での遺伝子発現を比較しているため、それをそのままダッチアイリス、ユリ、ランなどの観賞用単子葉植物種に適用できるかは疑問である。今後、ダッチアイリスのアントシアニン生合成に関する研究を転写因子まで拡大することにより、観賞用単子葉植物種でのアントシアニン生合成制御機構の新たな知見が得られるであろう。

LTR レトロトランスポゾン、DNA トランスポゾンとは異なり、RNA 中間体を介して転移するため、転移に伴ってコピー数が増加する。そのため、コピーの段階でエラーを蓄積し、転移能を失ったものが多く存在する。LTR レトロトランスポゾンは *Ty1-copia* と *Ty3-gypsy* の 2 つのグループに分類され (Xiong *et al.* 1990)、両グループとも高等植物のゲノムに偏在している (Flavell *et al.* 1992、Levin 2002)。ルイジアナアイリスの *I. brevicaulis* およびチャショウブ (*I. fulva*) でも、*Ty3-gypsy* 様レトロトランスポゾンがゲノム内に多コピー数存在し、両種やその F<sub>1</sub> 雑種および戻し交雑種において転写活性を示すことが報告されている (Kentner *et al.* 2003)。一方、本研究で単離された *Ty1-copia* 型 LTR レトロトランスポゾンは逆転写酵素コード領域内にナンセンス変異が数多く蓄積し、転移能が失われているものと考えられる。第 2 章・第 2 節で述べたように、「ブルーダイヤモンド」と「White Wedgewood」はともに「Wedgewood」からの芽条変異により育成されたものであるが、「ブルーダイヤモンド」はレトロトランスポゾンが挿入していない *DFR* 遺伝子を有しており、ダッチアイリスではいくつかのレトロトランスポゾンは転移能を維持したまま活動を停止しているものと推測される。

このように活動を停止しているレトロトランスポゾンは、ストレスを与えることで活性

化することが報告されており (Pouteau *et al.* 1994、Hirochika *et al.* 1996)、この現象を利用して、イネでは *Tbs17LTR* 型レトロトランスポゾンを用いたミュータントパネルの作出が行われている (Miyao *et al.* 2003)。このミュータントパネルの解析は、レトロトランスポゾンの挿入により破壊された遺伝子機能を知るために非常に有効手段であり (Hirochika 1997、2001、Hirochika *et al.* 2004)、農業上重要な形質を支配する遺伝子も多数単離されている (Miyao *et al.* 2007)。

ダッチアイリスにおいても、本研究やルイジアナアイリス (Kentner *et al.* 2003) で得られた情報を基に転移能をもつレトロトランスポゾンを獲得し、転移条件を明らかにすることで、多くの変異体を作成することが期待される。このようなレトロトランスポゾンによる変異体作出は、新品種を育成するための有用な変異を提供するだけでなく、先に述べたように遺伝子機能を解析する上でも重要である。しかしながら、レトロトランスポゾンが活性化されても、プロモーターを含めた遺伝子内に転移しなければ突然変異にはつながらない。レトロトランスポゾンによっては遺伝子以外の領域に転移する傾向を持つものも存在することから (Devine and Boeke 1996、Zou *et al.* 1996)、レトロトランスポゾンを遺伝子機能解析に用いるためには転移能を持つレトロトランスポゾンの探索とともに、その挿入部位の配列を解析していくことが求められる。

以上のように、本研究ではダッチアイリスのアントシアニン生合成遺伝子およびその機能発現に関して新たな知見を獲得することができた。今後とも更なる知見の獲得に努め、本種における花色発現機構の解明とともに、花色の分子育種の発展にも貢献したい。