

## 第2章 アントシアニン生合成遺伝子の単離および発現解析

花色育種を促進するためには、アントシアニン生合成遺伝子の単離・解析ばかりでなく、その発現制御に関する知見を蓄積することは極めて重要である。前章で述べたように、多くの植物種において、アントシアニン生合成に関与する構造遺伝子の特性解明やその発現を調節する制御遺伝子の同定に関する研究が進められている (Heller and Forkmann 1994、Davies and Schwinn 1997、Forkmann and Heller 1999、Springob *et al.* 2003、Tanaka and Brugliera 2006)。しかしながら、単子葉植物におけるアントシアニン生合成経路に関する分子遺伝学的研究は限られており、特にその観賞用植物種に関するものは極めて少ない。ラン (*Bromheadia finlaysonianas*) (Liew *et al.* 1998a、b) やユリ (Nakatsuka *et al.* 2003) では *DFR* と *CHS*、シンビジウム (*Cymbidium hybrida*) で *DFR* (Johnson *et al.* 1999) そして *Phalaenopsis* のフラボノイド 3',5'-ヒドロキシラーゼ (*F3'5'H*) (Su and Hsu 2003) と *CHS* (Han *et al.* 2006) が報告されている。また、ダッチアイリスでは、これまでに *CHI* cDNA 断片 (van Doorn *et al.* 2003)、および 5GT (Imayama *et al.* 2004) と 3AT (Yoshihara *et al.* 2006) をコードする cDNA が単離されているものの、本種におけるアントシアニン生合成遺伝子の多くは未だ単離されておらず、さらにその発現解析に関しては全く報告されていないのが現状である。

そこで、本章ではダッチアイリスのアントシアニン生合成酵素をコードする cDNA の単離・解析を行うとともに、その器官および花の発育時期特異的発現を解析することにより、花色発現およびアントシアニン生合成の分子遺伝学的知見の蓄積を目指した。

## 第1節 アントシアニン生合成に関与する酵素遺伝子の単離・解析

### 1. 緒言

Yabuya *et al.* (2001a, 2002) は、花蕾から抽出した 5GT や 3AT の粗酵素液を用いてその基質特異性を試験することにより、ハナショウブにおけるアントシアニン生合成の末端経路を提案した。しかしながら、これまでのところ、本種ではアントシアニン生合成遺伝子の単離・解析は全くなされていない。一方、先に述べたように、ダッチアイリスでは数種のアントシアニン生合成遺伝子しか単離されておらず (van Doorn *et al.* 2003、Imayama *et al.* 2004、Yoshihara *et al.* 2006)、さらにアントシアニン生合成遺伝子の発現解析に関する報告も見当たらないのが現状である。そのため、本種においてアントシアニン生合成遺伝子の網羅的な発現解析を行うためには、先ず、未だクローニングされていない多くのアントシアニン生合成遺伝子を単離・解析する必要がある。

そこで、本節ではアントシアニン生合成遺伝子に関する RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 用のプライマーを作製し、その発現解析をするために、ダッチアイリス花蕾より構築したライブラリーから CHS、CHI、F3H、DFR、ANS および 3GT をコードする cDNA の単離・解析を行った。

### 2. 材料および方法

#### 1) cDNA ライブラリーのスクリーニング

ダッチアイリス花蕾由来の cDNA ライブラリーは、Imayama *et al.* (2004) によって作成されたものを供試した。cDNA ライブラリーのスクリーニングは、プラークハイブリダイゼーション法により行い、プローブには以下の cDNA を用いた。*CHS*、*F3H*、*3GT* cDNA のスクリーニングにはキンギョソウ *CHS*、*F3H*、*UFGT* cDNA (Martin *et al.* 1991) の全長を、一方 *DFR* cDNA のスクリーニングには、ダッチアイリス *DFR* cDNA 断片 (Tanaka *et al.* 未発表) をプローブとした。

ダッチアイリスの cDNA ライブラリーを NZY プレート (7.5 × 12 cm 角型シャーレ、NZY 寒天培地 : 1 % NZ amine、0.5 % Yeast Extract、0.5 % NaCl、1.5 % Agar) 1 枚当たり約 2,500 pfu (plaque forming unit) の割合でプラークを形成させ、ポジティブチャージメンブレン (Hybond-N<sup>+</sup>, GE Healthcare UK Ltd.) へプロットした。メンブレン上へのファージ DNA の固定は、製品に添付されたプロトコールに従った。プレハイブリダイゼーションは、30 % ホルムアルデヒドハイブリダイゼーションバッファー [5 × standard saline citrate (SSC)、0.1 % (w/v) N-lauroylsarcosine、2 % (w/v) Blocking Reagent (Roche Diagnostics K.K.)、0.02 % (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)、30 % (v/v) Formamide] 中で 42 °C、1 時間、ハイブリダイゼーションは DIG で標識した 3GTcDNA (Martin *et al.* 1991) を含む 30 % ホルムアルデヒドハイブリダイゼーションバッファー中で 42 °C、一晩行った。ハイブリダイゼーション終了後のメンブレンの洗浄は、1 次洗浄液 (2 × SSC、0.01 % SDS) 中で 50 °C、20 分間 (10 分 × 2 回)、さらに 2 次洗浄液 (0.1 × SSC、0.01 % SDS) 中で 50 °C、30 分間 (15 分 × 2 回) 行った。なお、プローブの標識および検出は、DIG-DNA labeling and detection kit (Roche Diagnostics K.K.) を使用した。

このスクリーニングで得られたポジティブクローンを 500 µl の SM バッファー (0.1 M NaCl、0.2 % MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.05 M Tris-HCl、0.01 % Bacto-gelatin) 中で懸濁し、4 °C 一晩静置した後、その上清を用いて NZY プレート (2r = 90 丸型シャーレ、NZY 寒天培地) 1 枚当たり約 10~50 pfu の割合でプラークを形成させた。これをポジティブチャージメンブレンへプロットし、二次スクリーニングを一次スクリーニングの手順と同様に行った。得られたポジティブプラークを SM バッファー中で懸濁、4 °C、一晩静置後、Rapid Excision Kit (Stratagene Japan K.K.) を用いて、Uni-ZAP XR insertion vector から pBluescript® SK<sup>-</sup>へ切り出した。

ダッチアイリスの *CHI* cDNA は、van Doorn *et al.* (2003) によって報告された EST 配列データ (CF226948) をもとに *CHI* 特異的プライマー (Fw, 5'-CCA GTC CAA GTA TCT CAA G-5'、Rv, 5'-GAAAAT TCT CAT GGT GCT AC-3') を設計し、それを用いた RT-PCR

によって断片を獲得した。逆転写反応は、10  $\mu$ l の反応溶液中にダッチアイリス花蕾から抽出した 2  $\mu$ g total RNA、50  $\mu$ M oligo(dT)<sub>20</sub> プライマー、10 units Thermo-X™ Reverse Transcriptase (Invitrogen Japan K.K.) を混合し、50 °C で 1 時間インキュベーションすることによって行った。次いで、2  $\mu$ l の 10 倍希釈した逆転写反応溶液、5 units KOD-Plus-DNA polymerase (東洋紡績株式会社) を使用した PCR 反応を、最初の 2 分間の熱変性後、熱変性 94 °C、30 秒、アニーリング 43 °C、30 秒、伸長反応 68 °C、30 秒のプログラムを 30 サイクル行うことによって、ダッチアイリス *CHI* cDNA 断片を獲得した。PCR 産物は、Zero Blunt® TOPO® PCR cloning Kit (Invitrogen Japan K.K.) を用いてサブクローニングした。

CHS、CHI、F3H、DFR、ANS および 3GT それぞれをコードする cDNA が挿入されたプラスミドは、大腸菌 (*Escherichia coli*) から FrexiPrep Kit (GE Healthcare UK Ltd.) を用いて抽出し精製した。

## 2) 塩基配列および推定アミノ酸配列の解析

DNA 配列は、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit あるいは BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Japan Ltd.) および ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Japan Ltd.) を用いて決定した。

GENETIX WIN version 3.2 program (GENETYX Co.) は塩基配列およびアミノ酸配列の解析に用いた。推定アミノ酸配列のマルチプルアライメントは DNA Data Bank of Japan (DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) の CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) で行い、Swiss EMBnet node server (<http://www.ch.embnet.org/>) の BOXSHADE 3.21 を用いて表示した。また、分子系統樹解析は MEGA 3.1 (<http://www.megasoftware.net/>、Kumar *et al.* 2004) あるいは Treeview (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>、Page 1996) により行った。

### 3. 結果および考察

ダッチアイリスのアントシアニン生合成酵素遺伝子の発現を解析するため、品種「ブルーダイヤモンド」花蕾の cDNA ライブラリーから *CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS* および *3GT* cDNA をクローニングし、それぞれの塩基配列の解析を行った。以下、これらの cDNA を *IhCHS*、*IhCHI*、*IhF3H*、*IhDFR*、*IhANS* および *Ih3GT* と称する。各 cDNA の塩基配列および推定アミノ酸配列の特徴は、Table 2-1 に示した。単離した cDNA がコードする酵素タンパク質配列の解析は、推定アミノ酸配列を基礎としたマルチプルアライメントおよび分子系統樹解析により行った (Fig. 2-1A~2-6B)。

まず、*CHS* についてみると、この酵素は 3 分子のマロニル CoA と 1 分子の *p*-クマル酸 CoA の縮合反応を触媒し、ナリンゲニンカルコンを生成する。アルファルファ (*Medicago sativa*) *CHS* 結晶構造解析によって同定されている、*CHS* の活性中心を構成する触媒 3 アミノ酸残基 (catalytic triad、Cys-164、His-303 および Asn-336、Ferrer *et al.* 1999)、CoA 結合サイト、その他活性に重要な残基 (Critical active site、Thr-197、Gly-256 および Ser-338) およびゲートキーパー (gatekeeper、Phe215 および Phe 265) (Abe *et al.* 2006) として機能する残基は、アルファルファ *CHS* と 76.6 %の同一性を示す *IhCHS* においても保存されていた (Fig. 2-1A)。また、分子系統樹による解析では、*IhCHS* は PKS ファミリー内の *CHS* クレードに属し、さらにその中で単子葉植物 *CHS* の間でグループを構成した。*IhCHS* と最も高い同一性を示したのはトウモロコシ (*Zea mays*) *CHS* であったが、分子系統樹上で最も近接していたのは *Lillium* 属の *CHS* であった。以上のことから、*IhCHS* cDNA はカルコンシンターゼをコードすると見なされる (Fig. 2-1B)。さらに、大腸菌において異種発現させた組換え *IhCHS* タンパク質の解析により、*IhCHS* cDNA が *p*-クマル酸 CoA と 3 分子のマロニル CoA の縮合反応を触媒する機能を持ったタンパク質をコードしていることが明らかにされた (濱砂 2007)。

*CHI* はカルコンからフラバノンの環状化を触媒する酵素である。RT-PCR により獲得した *CHI* cDNA 断片は、C 末端側およそ 60 残基をコードしており、N 末端領域は欠いてい

Table 2-1. Characteristics of cDNA clones involved in anthocyanin biosynthesis of *Iris hollandica*

| Clone name<br>(Accession no.) | Full<br>length<br>(bp) | ORF<br>(bp) | Deduced        |         | MW<br>(Da) | pI                          | Species   | Accession<br>number | Identity (%)<br>(Overlapped<br>amino acids) |
|-------------------------------|------------------------|-------------|----------------|---------|------------|-----------------------------|-----------|---------------------|---|
|                               |                        |             | amino<br>acids | 397     |            |                             |           |                     |   |
| <i>IhCHS</i><br>(AB232914)    | 1,471                  | 1,191       | 397            | 43031.7 | 5.96       | <i>Zea mays</i>             | P24825    | 84 (326)            |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Lilium hybrida</i>       | BAB40807  | 83 (324)            |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Ruta graveolens</i>      | Q9FSB8    | 82 (320)            |   |
| <i>pIhCHI*</i><br>( - )       | -                      | -           | -              | -       | -          | <i>Oryza sativa</i>         | ABA91231  | 74 (50)             |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Arabidopsis thaliana</i> | BAB099070 | 65 (41)             |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Glycine max</i>          | AAT94362  | 58 (39)             |   |
| <i>IhF3H1</i><br>(AB183826)   | 1,313                  | 1,110       | 370            | 40995.7 | 5.47       | <i>Lilium speciosum</i>     | BAE79203  | 79 (295)            |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Eustoma grandiflorum</i> | BAD34459  | 77 (281)            |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Solanum tuberosum</i>    | AAM48289  | 80 (281)            |   |
| <i>IhDFR</i><br>(AB304917)    | 1,239                  | 1,086       | 361            | 40251.2 | 6.13       | <i>Lilium hybrida</i>       | AAQ83576  | 72 (239)            |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Triticum aestivum</i>    | BAD11019  | 64 (230)            |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Azapanthus praecox</i>   | BAE78769  | 68 (224)            |   |
| <i>IhANS</i><br>(AB284174)    | 1,341                  | 1,107       | 369            | 41295.2 | 5.37       | <i>Ipomoea nil</i>          | BAB71806  | 67 (239)            |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Malus domestica</i>      | P51091    | 68 (236)            |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Pyrus communis</i>       | AAB70119  | 68 (236)            |   |
| <i>Ih3GT</i><br>(AB161175)    | 1,665                  | 1,380       | 460            | 49557.9 | 5.54       | <i>Arabidopsis thaliana</i> | NP_197207 | 45 (207)            |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Vitis vinifera</i>       | BAB41020  | 44 (202)            |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Forsythia intermedia</i> | AAD21086  | 43 (197)            |   |
| <i>Ih5GT</i><br>(AB113664)    | 1,568                  | 1,389       | 463            | 50128.9 | 5.08       | <i>Petunia hybrida</i>      | BAA89009  | 37 (179)            |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Perilla frutescens</i>   | BAA36421  | 40 (195)            |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Verbena hybrida</i>      | BAA36423  | 38 (185)            |   |
| <i>Ih3AT2</i><br>(AB242298)   | 1,467                  | 1,287       | 429            | 47669.8 | 6.61       | <i>Salvia splendens</i>     | AAR28757  | 14(-)               |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Gentiana triflora</i>    | Q9ZWR8    | 13(-)               |   |
|                               |                        |             |                |         |            | <i>Salvia splendens</i>     | AAR26385  | 12(-)               |   |

\* A full length of *IhCHI cDNA* was not obtained

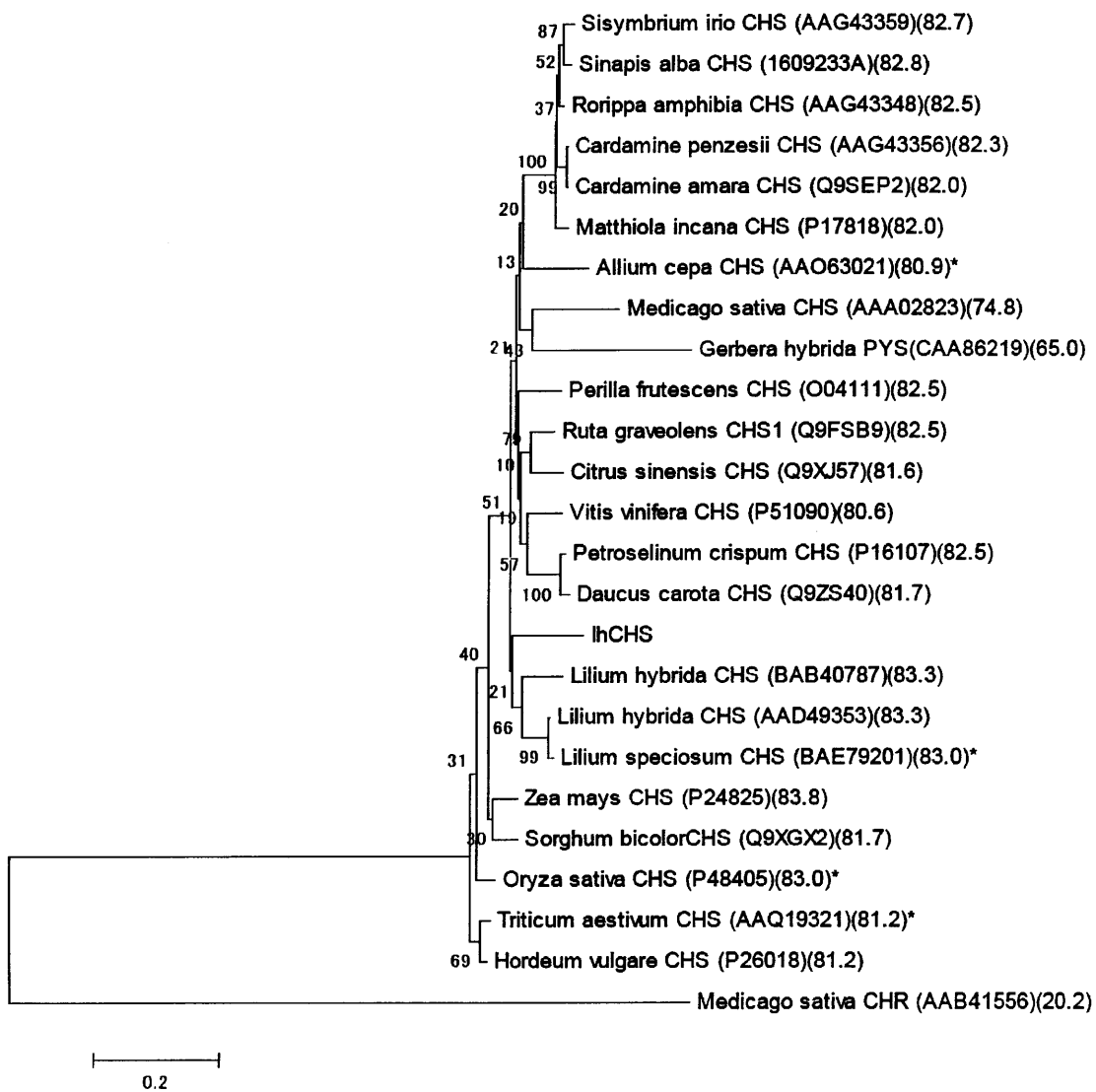


Fig. 2-1B. A molecular phylogenetic tree of the deduced amino sequences of lhCHS and other plant CHS. *Medicago sativa* CHR was added as outgroup. The tree was constructed by the neighbor-joining method. The numbers at the branches are the bootstrap values that indicate confidence level each branch based on 1000 repetitions of the analysis. The values in parentheses indicate percent identity of deduced amino acid sequences between lhCHS and each CHS(CHR).

*Zea mays* 1 MAGATVTVEEYRKAQRATGPATVLAIGTATPANCVYQADYPDYYFRI TKSEHLTDLKEKFKRMC DKSMIR  
*Lilium hybrida* 1 —MASITVEEYRC AQRAGPATVLAIGTATPSNYIQADYPDYYFRI TKSEHLSLKEKFKRMC DKSMIR  
 IhCHS 1 —MASITEEYRKAQRADGPAAVLAIGTATPSNYVYQSEYDPDYFRI TISEHLSLKEKFKRMC DKSMIR  
*Ruta graveolens* 1 —MAAVTVEAIRKAQRADGPAAVLAIGTATPANVYIQADYPDYYFRI TKSEHLSLKEKFKRMC DKSMIR  
*Medicago sativa* 1 —MVSVSEIRKAQRAGPATVLAIGTANPANCVYQSTYPDYYFRI TISEHLSLKEKFKRMC DKSMIR  
 \* \* \*

*Zea mays* 71 KRYMHLTEEFLAENPSMCAYMAPSLDARQDVVVVEVPKLGKAAACKA KEWGQPKS I THL VFC TTS GVD  
*Lilium hybrida* 69 KRYMHLNEE ILTENPNMCAYMAPSLDARQDVVVVEVPKLGKAAAKA KEWGQPKS I THL VFC TTS GVD  
 IhCHS 67 KRYMHLDEE ILKENPNMCAYMAPSLDARQDVVVVEVPKLGKAAASAA KEWGQPKS I THV VFC TTS GVD  
*Ruta graveolens* 69 KRYMHLTEE ILKENPNMCAYMAPSLDARQDVVVVEVPKLGKAAAKA KEWGQPKS I THL VFC TTS GVD  
*Medicago sativa* 67 KRYMHLTEE ILKENPNMCAYMAPSLDARQDVVVVEVPLGKAAAKA KEWGQPKS I THL VFC TTS GVD

*Zea mays* 141 MPGADYQ LTKLGLRPSVNRIMMYQQGCFAGGTVLRVAKDLAENNRGARVLVVGSEI TAVTFRG PSES HL  
*Lilium hybrida* 139 MPGADYQ LTKLGLRPSVNRIMMYQQGCFAGGTVLRVAKDLAENNRGARVLVVGSEI TAVTFRG PSES HL  
 IhCHS 137 MPGADYQ LTKLGLRPSVNRIMMYQQGCFAGGTVLRVAKDLAENNRGARVLVVGSEI TAVTFRG PSETHL  
*Ruta graveolens* 139 MPGADYQ LTKLGLRPSVNRIMMYQQGCFAGGTVLRVAKDLAENNRGARVLVVGSEI TAVTFRG PSETHL  
*Medicago sativa* 137 MPGADYQ LTKLGLRPSVNRIMMYQQGCFAGGTVLRVAKDLAENNRGARVLVVGSEI TAVTFRG PSETHL  
 ◇164 ◇197 \*

*Zea mays* 211 DSLVGOALFGDGAAAVVVGADPDDRVERPLFQLVSAAGT ILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLIS  
*Lilium hybrida* 209 DSLVGOALFGDGAAAVVVGSDPDNAVERPLFQLVSAAGT ILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLIS  
 IhCHS 207 DSLVGOALFGDGAAAVVVGSDPDVSVRPLFQLVYAGT ILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLIS  
*Ruta graveolens* 209 DSLVGOALFGDGAAAVVVGADPDES ERPLFQLVSAAGT ILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLIS  
*Medicago sativa* 207 DSLVGOALFGDGAAAVVVGSDPVPEERPLFENVWTAQT ILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLIS  
 \* \* \* Δ215 ◇256 265 Δ \* \* \*  
 DDDD M

*Zea mays* 281 KNIGALDIAFKPLGISDWNSIFWIAHPGGPAILDQVEAKLGLD KARMRATRI VLSYGNMSSACVLFIL  
*Lilium hybrida* 279 KNIEISLTGAFAPLGISDWNSIFWIAHPGGPAILDQVEAKLGLD KARMRATRI VLSYGNMSSACVLFIL  
 IhCHS 277 KNIEKSLVEAFAPLGISDWNSIFWIAHPGGPAILDQVEAKLGLD KARMRATRI VLSYGNMSSACVLFIL  
*Ruta graveolens* 279 KNIEKSLVEAFAPLGISDWNSIFWIAHPGGPAILDQVEAKLGLD KARMRATRI VLSYGNMSSACVLFIL  
*Medicago sativa* 277 KNITKALVEAFAPLGISDWNSIFWIAHPGGPAILDQVEAKLGLD KARMRATRI VLSYGNMSSACVLFIL  
 ◇303\* \* ◇336◇338

*Zea mays* 351 DEMRKRSAEDGGATTGEGLDWGVLF GFGPGLTVETVVLHSVPIT TGAATA—  
*Lilium hybrida* 349 DEMRKTSAKMGKATTGEGLDWGVLF GFGPGLTVETVVLHSLPNAAE—  
 IhCHS 347 DEMRKRSAEGGKATV GEGLDWGVLF GFGPGLTVECVVLKGPVAA PCVIHS  
*Ruta graveolens* 349 DEMRKNCAEGRATTGEGLDWGVLF GFGPGLTVETVVLHSVPIKA—  
*Medicago sativa* 347 DEMRKRSTQGLKTTGEGLDWGVLF GFGPGLTVETVVLHSAI—

Fig. 2-1A. Multiple alignment of deduced amino acid sequences of IhCHS and other plant CHSs. Black shading and gray boxes show identical and similar amino acids, respectively. The asterisks are CoA-binding site. The  $\diamond$ ,  $\diamond$ , and  $\Delta$  marks are catalytic triad, critical active site, and gatekeeper. Genbank accession numbers are as follows: *Zea mays* (P24825), *Lilium hybrida* (BAB40787), *Ruta graveolens* (Q9F5B9), *Medicago sativa* (AAB41556).



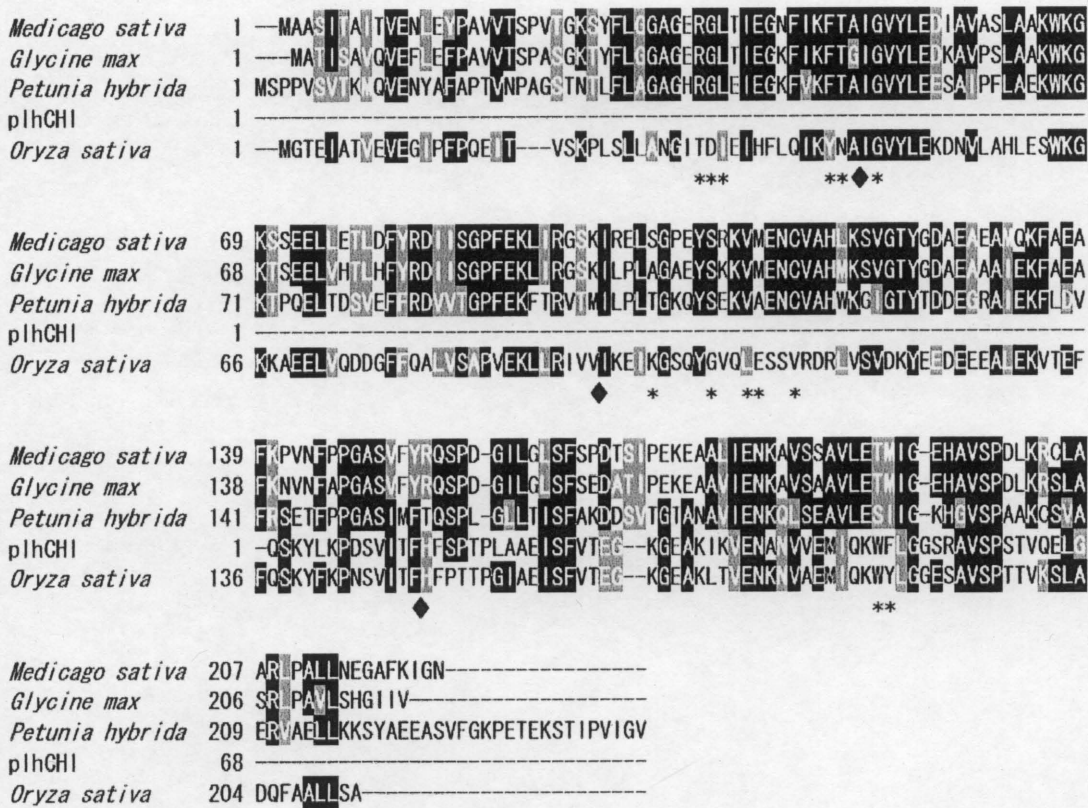


Fig. 2-2A. Multiple alignment of deduced amino acid sequences of pIhCHI and other plant CHIs. Black shading and gray boxes show identical and similar amino acids, respectively. The \* and ◆ marks are (2S)-naringenin binding creft and active site hydrogen bond network. Genbank accession numbers are as follows: *Medicago sativa* (P28012), *Glycine max* (AAK69432), *Petunia hybrida* (P11650), *Oryza sativa* (NP\_ABA91231).

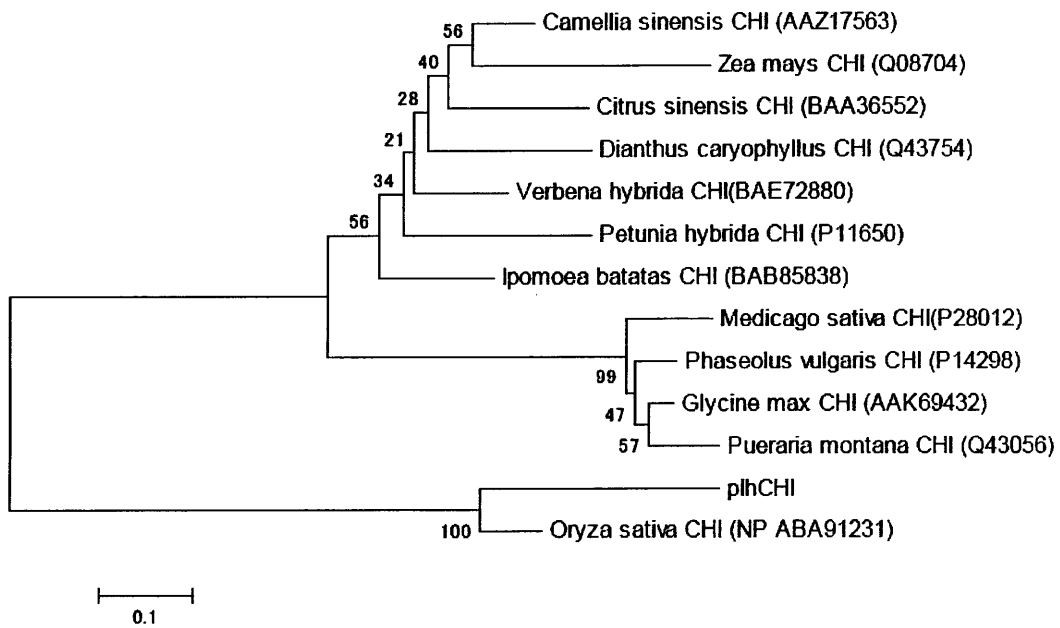


Fig. 2-2B. A molecular phylogenetic tree of the partial deduced amino sequences of pIhCHI and other plant CHIs. The tree was constructed by the neighbor-joining method. The numbers at the branches are the bootstrap values that indicate confidence level each branch based on 1000 repetitions of the analysis.

るものの、部分配列は他種植物の CHI と 58 - 74%の同一性を示した。さらに、アルファアルファ CHI の結晶構造解析によって明らかにされた (2S)-ナリングニン結合残基のひとつである Thr-152 (Jez *et al.* 2000) に対応するアミノ酸残基として、トウモロコシやペチュニア (*Petunia hybrida*) でも保存されている Phe-13 を有していたことから、この cDNA 断片は CHI ホモログであることを確認した (Fig. 2-2A, B)。

これまでの研究から、F3H は 2-オキソグルタル酸依存性オキシゲナーゼ (2-ODD) のファミリーに属することが明らかになっている (Heller and Forkmann 1994)。そこで、3 つの IhF3H、他種植物の F3H に加え、同じ 2-ODD のファミリーに属し、結晶構造が明らかにされているイソペニシリン *N*-シクターゼ (IPNS) を用いて、マルチプルアライメント解析を行った (Fig. 2-3A)。その結果、これら IhF3H おいて、触媒活性に大きな影響を及ぼす鉄イオン [Fe(II)] 結合サイトと推測される、2つのヒスチジン (His) 残基と1つのアスパラギン (Asp) 残基が確認された (His-224, Asp-226 および His-282) (Lukačín and Britsch 1997)。これらのアミノ酸は、Fe(II)-IPNS 複合体の結晶構造解析によっても、金属結合部位であると同定されている (Roach *et al.* 1995)。さらに二次構造では、このファミリーにおいて保存されている7つのストランドからなる double-stranded  $\beta$ -helix (DSBH) 構造が示され、IPNS と同様、5番目と6番目のストランドの間に短いヘリックス構造を有していることが示された (Aravind *et al.* 2001)。また、ペチュニア F3H において、2-オキソグルタル酸結合サイトと推定されるモチーフ配列 (Arg-x-Ser) (IhF3H, Arg-231 および Ser-235) も見出された (Lukačín *et al.* 2000a)。

フラボノイド生合成の研究により、フラボンシクターゼ I (FNS I)、フラボノールシクターゼ (FLS) およびアントシアニンシクターゼ (ANS) も F3H と同様、2-ODD ファミリーに属することが明らかにされている (Heller and Forkmann 1994, Forkmann and Heller 1999, Springob *et al.* 2003)。そこで、3つの IhF3H、他種植物 F3H、FNSI、FLS、および ANS とともに分子系統樹を作成し、系統解析を行った (Fig. 2-3B)。その結果、IhF3H は他種植物の F3H と同じクレードに属し、その中で単子葉植物種のグループに属

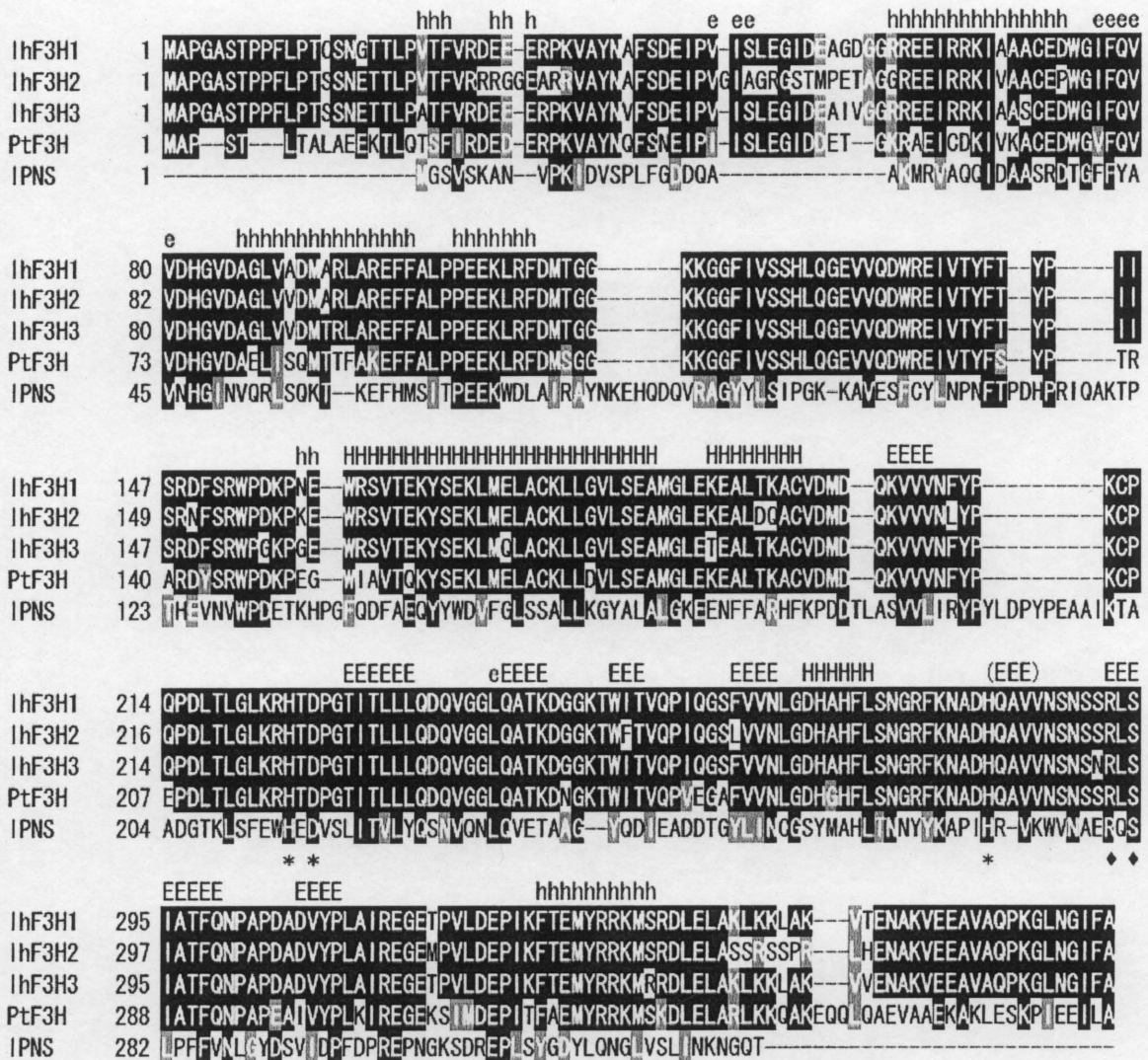
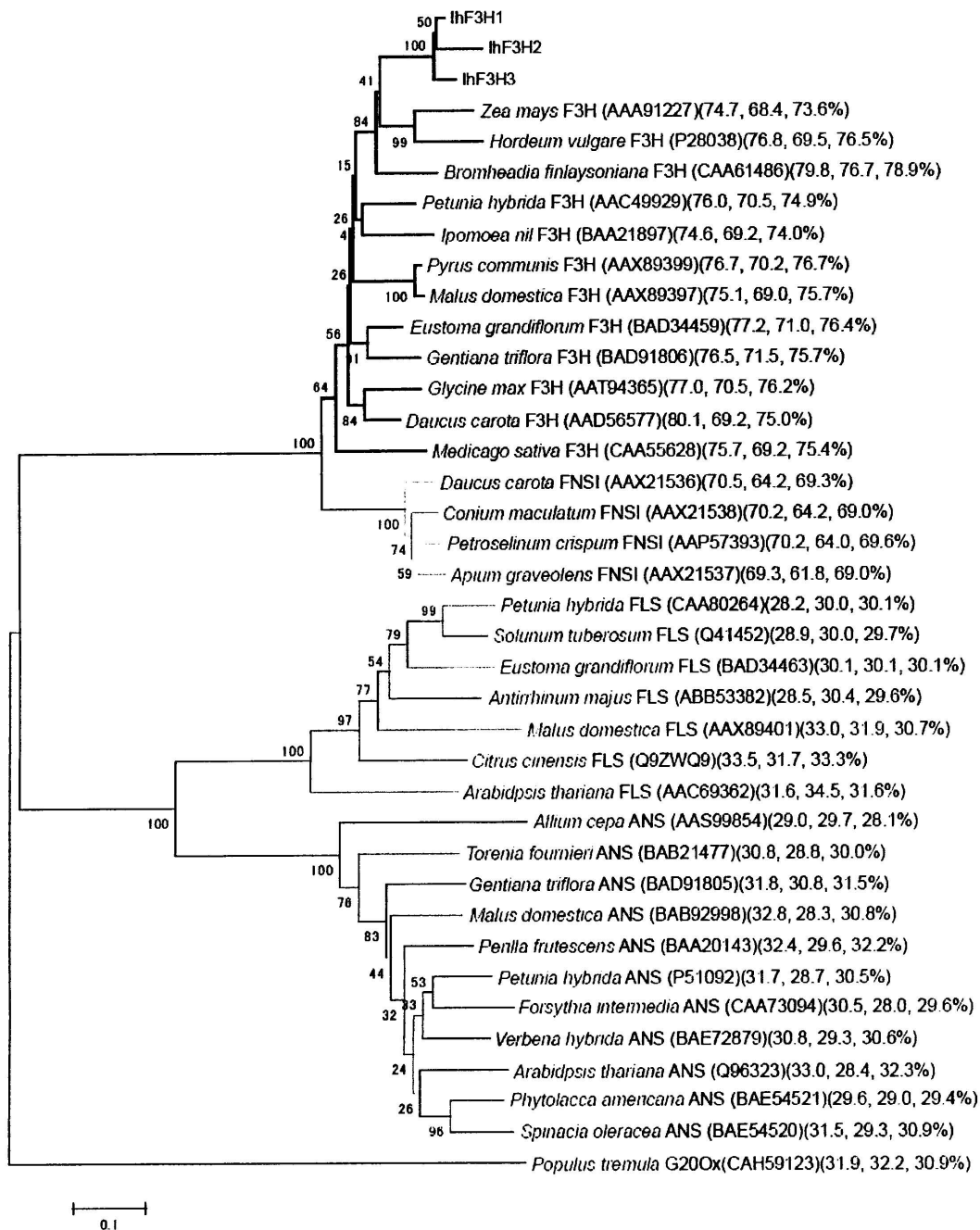


Fig. 2-3A. Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of IhF3Hs, *Petunia* F3H (PtF3H) and IPNS (Isopenicilline N-synthase). Black and gray shading boxes show identical and similar amino acids, respectively. The asterisks indicate the predicted catalytic residues, and black diamonds indicate the predicted 2-oxoglutarate binding site. The consensus secondary structure (DSBH) is shown above the alignment in uppercase letters; H indicates  $\alpha$ -helices and E indicates  $\beta$ -strands. The lowercase letters represent consensus secondary structure between IhF3Hs and PtF3H.



**Fig. 2-3B.** A molecular phylogenetic tree of the deduced amino sequences of F3Hs and other plant 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase family members. The tree was constructed by the neighbor-joining method. The numbers at the branches are the bootstrap values that indicate confidence level each branch based on 1000 repetitions of the analysis. The lengths of the lines indicate the relative distances between nodes.

していたことから、これら *IhF3H* cDNA クローンはフラバノン 3-ヒドロキシラーゼをコードしている可能性が極めて高いことが示された。このことは、次章・第 1 節の大腸菌による異種発現解析により確認された。

DFR は NADPH 依存性レダクターゼであり、フラバノンからジヒドロフラボノールへの反応を触媒する。最近、Petit *et al.* (2007) によってブドウ (*Vitis vinifera*) の DFR の結晶構造解析が行われ、NADP<sup>+</sup>結合サイト [glycine-rich motif (Gly-12, Ser-14, Gly-15, Phe-16, Ile-17 および Gly-18) を持つ  $\alpha 1$ - $\beta 1$  ループ、 $\alpha 2$ - $\beta 2$  ループの Arg-37, Asp-38, Lys-44,  $\alpha 3$ - $\beta 3$  ループの Asp-64, Lys-65,  $\alpha 4$ - $\beta 4$  ループの Ala-85, Thr-86, Pro-87 のアミノ酸残基、 $\alpha 6$  ヘリックスの Tyr-163, Lys-167,  $\beta 6$  および  $\beta 2'$  スtrand の Pro-190, Val-193 のアミノ酸残基、 $\alpha 7$  ヘリックスの Ser-205 アミノ酸残基]、および基質特異性に大きく影響するアミノ酸残基 (Asn あるいは Asp-133) を含む基質結合サイト (131-156 aa) が明らかにされている。これらのサイトは、ダッチアイリスの DFR ホモログ (*IhDFR*) においても見出された (Fig. 2-4A)。また、分子系統樹において、*IhDFR* は DFR のクレードに属しており、その中でもユリの DFR と最も近く、次いでタマネギ (*Allium cepa*)、ラン科 (Orchidaceae)、イネ科 (Gramineae) および双子葉植物種 DFR と配置されていた (Fig. 2-4B)。以上のことから、*IhDFR* cDNA はジヒドロフラボノール 4-レダクターゼをコードするものと見なされる。

F3H と同様、ANS は 2-ODD ファミリーに属し、F3H と同様のメカニズムでロイコアントシアニンからアントシアニンへの反応を触媒する。2002 年、Wilmouth *et al.* によって行われたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ANS の結晶構造解析により、2-ODD ファミリーで同定されている Fe(II) 結合残基 (His-232, Asp-234 および His-288)、2-オキシグルタル酸結合残基 (Tyr-217, Arg-298 および Ser-300)、ジヒドロケルセチン結合残基 (Ile-122, Tyr-142, Phe-144, Thr-233, Val-235, Phe-304, Glu-306, Phe-334, Ile-338, Lys-341 および Leu-345) およびアスコルビン酸結合残基 (Lys-128, Asn-131 および Glu-230) が同定されている。ダッチアイリス ANS (*IhANS*) の推定アミノ酸配列に

|                          |   |  |
|--------------------------|---|--|
| IhDFR                    | 1 | -----MMSPVVVTGASGYVGSWLVMKLLRDGYAVRATVRDPTNVEKTKPLLDLPADALLT IWKADLGO        |
| <i>Lilium hybrida</i>    | 1 | -----MENVKGPVVVTGASGYVGSWLVMKLLDYGYYAVRATVRDPRDRLRKTIKPLLDLPGADERLT IWKADLSE |
| <i>Triticum aestivum</i> | 1 | -----MDGSKGPVVVTGASGFVGSWLVMKLLQLGYTVRATVRDPANVEKNKPLLELPGAKERLS IWKADLSE    |
| <i>Petunia hybrida</i>   | 1 | MPLHLRGSATVGVCTGAAGF IGSWLVMLLLERGYVHATVRDPENKKVKKHLELPAKADNLT IWKADLTV      |
| <i>Vitis vinifera</i>    | 1 | -----MGSQSETVGVCTGASGF IGSWLVMLLLERGYTVRATVRDPTNVKVKKHLLDLPKAEHTL IWKADLAD   |

\*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*

|                          |    |  |
|--------------------------|----|--|
| IhDFR                    | 65 | DGSFDKAVAGCTAVFHVATPDMFESKDPENEVIKPTINGVLSIMRSCCKKAGTVKRVFTSSAGTV DVKEH  |
| <i>Lilium hybrida</i>    | 68 | DASFDKAVAGCTGVVHATPDMFDKDPENEVIQPTINGVLEIMKSCCKKAGTVKRVFTSSAGTVNVQEN     |
| <i>Triticum aestivum</i> | 68 | EGSFDKAVAGCTGVFHVATPDMFDKDPENEVIKPTVEGMLSIMRACKKAGTVKRVFTSSAGSVNIEER     |
| <i>Petunia hybrida</i>   | 71 | EGSFDKAVAGCTGVFHVATPDMFESKDPENEVIKPTVEGMLSITESCCKAAN TVKRVFTSSAGTV DVQEQ |
| <i>Vitis vinifera</i>    | 68 | EGSFDKAVKGGTGVFHVATPDMFESKDPENEVIKPTIEGMLGIMKSCAAAKTVRRLVFTSSAGTVNIEQH   |

\*\*\*

|                          |     |  |
|--------------------------|-----|--|
| IhDFR                    | 135 | QOTEYDESSWSDVDFCRRVKMTGWMYFVSKT LAERAIWEEFARENG IDFISI IPTLVVGPFIITTMPPSVV |
| <i>Lilium hybrida</i>    | 138 | QVPEYDESSWSDVDFCRRVKMTGWMYFVSKT LAEKAWEFAKEND IQLISI IPTLVVGPFIITSTMPPSL   |
| <i>Triticum aestivum</i> | 138 | QRFAVDQDNWSDVDFCRRVKMTGWMYFVSKT LAEKAWEYASENGDLISI IPTLVVGPFIISAGMPPSLV    |
| <i>Petunia hybrida</i>   | 141 | QKLFYDQTSWSDLDFIYAKKMTGWMYFASK LAEKAALVEAKKKN IDFISI IPFLVVGPFIITPTFPPSL   |
| <i>Vitis vinifera</i>    | 138 | QLFVYDESSWSDMEFCRAKKMTAWMYFVSKT LAECAAWYAKENN IDFITI IPTLVVGPFIISMPPSL     |

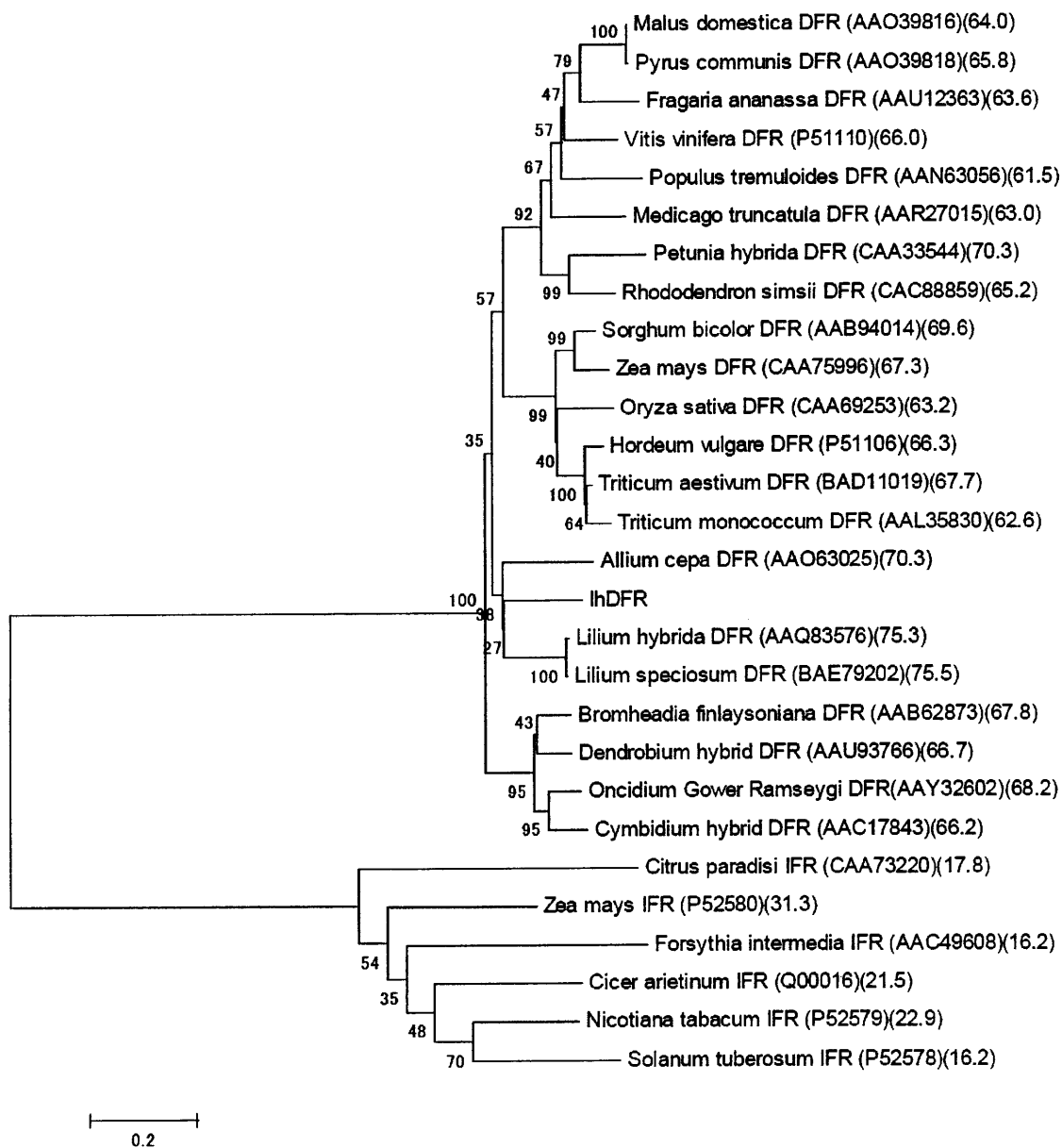
\*   \*   \*   \*   \*

|                          |     |  |
|--------------------------|-----|--|
| IhDFR                    | 205 | TALSFITGNEAHYLI I KLAQLVHLDDLCAAHYLLNRP EANGRYICSSHEAT IIDLARMVREKFWCGS I  |
| <i>Lilium hybrida</i>    | 208 | TALSLITGNEAHYSI I LKQQLVHLDDVCKAHYLFLENPEASGRYICSSVDAT IIDLARKIKDRYFCYAI   |
| <i>Triticum aestivum</i> | 208 | TALALITGNEAHYSI I LKQQLVHLDDLCDAMTFLFEHPEANGRYICSSH DATIHGLARMLRDRFPEYSI   |
| <i>Petunia hybrida</i>   | 211 | TALSLITGNEAHYCI I KQGQVHLDDLCEAHYLFYEHKADGRFCSSHAT IYDVAKMVREKWP EYIVV     |
| <i>Vitis vinifera</i>    | 208 | TALSPIITGNEAHYSI I RQGFVHLDDLCAAHYLFLENPKA EGRYICSSHDCIIDLAKMLREKWP EYIN I |

|                          |     |   |
|--------------------------|-----|---|
| IhDFR                    | 275 | PEKFDGI EKDVRTVHFSSKRLIDLGF EFKYTV EEMFDEAIRSCVEKKL IPLPENG----NVDAAAGAKD I |
| <i>Lilium hybrida</i>    | 277 | PKFEGIDDKIPVHFSSKRLIDLGFKYCYTF EEMFDEGIRSCIEKKLIPHQTQERYVVDL DLGCSKI        |
| <i>Triticum aestivum</i> | 277 | PKFAGVDLLOPIHFSSKRLIDGFGSFRTYADMFDAAIRTCREKGL IPLGDAP----PPAAGKGLG          |
| <i>Petunia hybrida</i>   | 280 | PTEFKGIDKOLPVVFSFKSLIDMGCFKYTL EDMYKGAIDTCROKQL I PFSTRS----AEINHNREA I     |
| <i>Vitis vinifera</i>    | 277 | PTEFKGVDENLKVCFSSKRLIDLGF EFKYSLEDMFTGAVDTCRAKGL I PPS-----                 |

|                          |     |                                   |
|--------------------------|-----|-----------------------------------|
| IhDFR                    | 341 | VH-----GAEHRKMELEPKKKVK-----      |
| <i>Lilium hybrida</i>    | 347 | TNDKLDLGGSKLNSMDENVRGHNEQY SVALQ  |
| <i>Triticum aestivum</i> | 341 | -----ALAAAGCGAIG AET-----         |
| <i>Petunia hybrida</i>   | 346 | AISAQNYASGKENAPVNHTEMLSNV EY----- |
| <i>Vitis vinifera</i>    | 329 | -----HEKPV DGKT-----              |

Fig. 2-4A. Multiple alignment of deduced amino acid sequences of IhDFR and other plant DFRs. Black shading and gray boxes show identical and similar amino acids, respectively. The NADP<sup>+</sup> binding site is marked with asterisks. The underline is the substrate recognition site, and black diamond is the remarkable residue as a substrate recognition residue. Genbank accession numbers are as follows: *Lilium hybrida* (AAQ83576), *Triticum aestivum* (BAD11019), *Vitis vinifera* (CAA72420), *Petunia hybrida* (CAA33544).



**Fig. 2-4B.** A molecular phylogenetic tree of the deduced amino sequences of IhDFR and other mammalian 3-β-hydroxysteroid dehydrogenase/DFR superfamily members. The tree was constructed by the neighbor-joining method. The numbers at the branches are the bootstrap values that indicate confidence level each branch based on 1000 repetitions of the analysis.



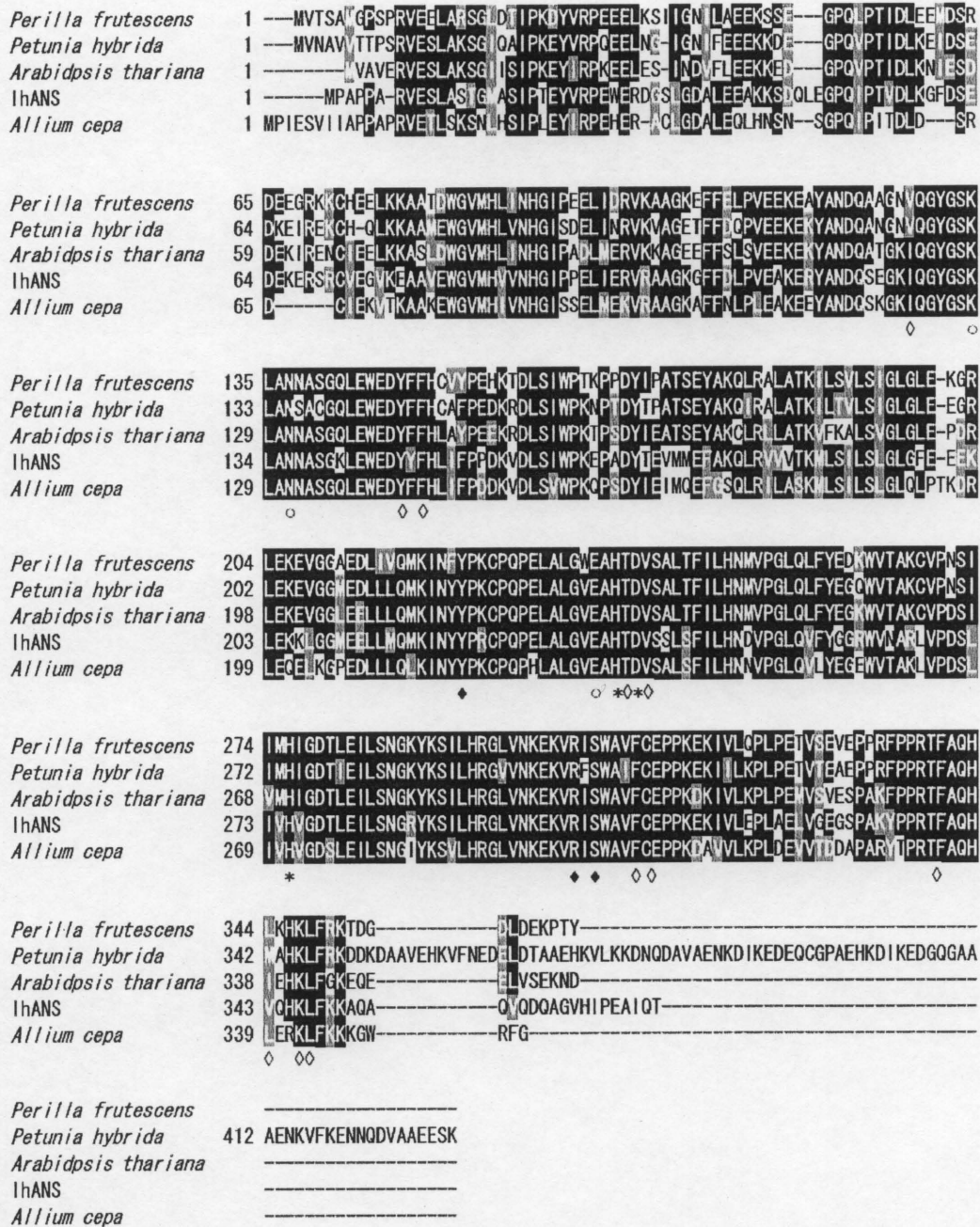


Fig. 2-5A. Multiple alignment of deduced amino acid sequences of IhANS and other plant ANSs. Black shading and gray boxes show identical and similar amino acids, respectively. The iron binding residues are indicated with asterisks, and those involved in binding 2-oxoglutarate, dihydroquercetin and ascorbate are shown with black diamonds, empty diamonds and empty circles, respectively. Genbank accession numbers are as follows: *Perilla frutescens* (BAA20143), *Petunia hybrida* (AAS99854), *Malus domestica* (BAB92998), *Allium cepa* (P51092).

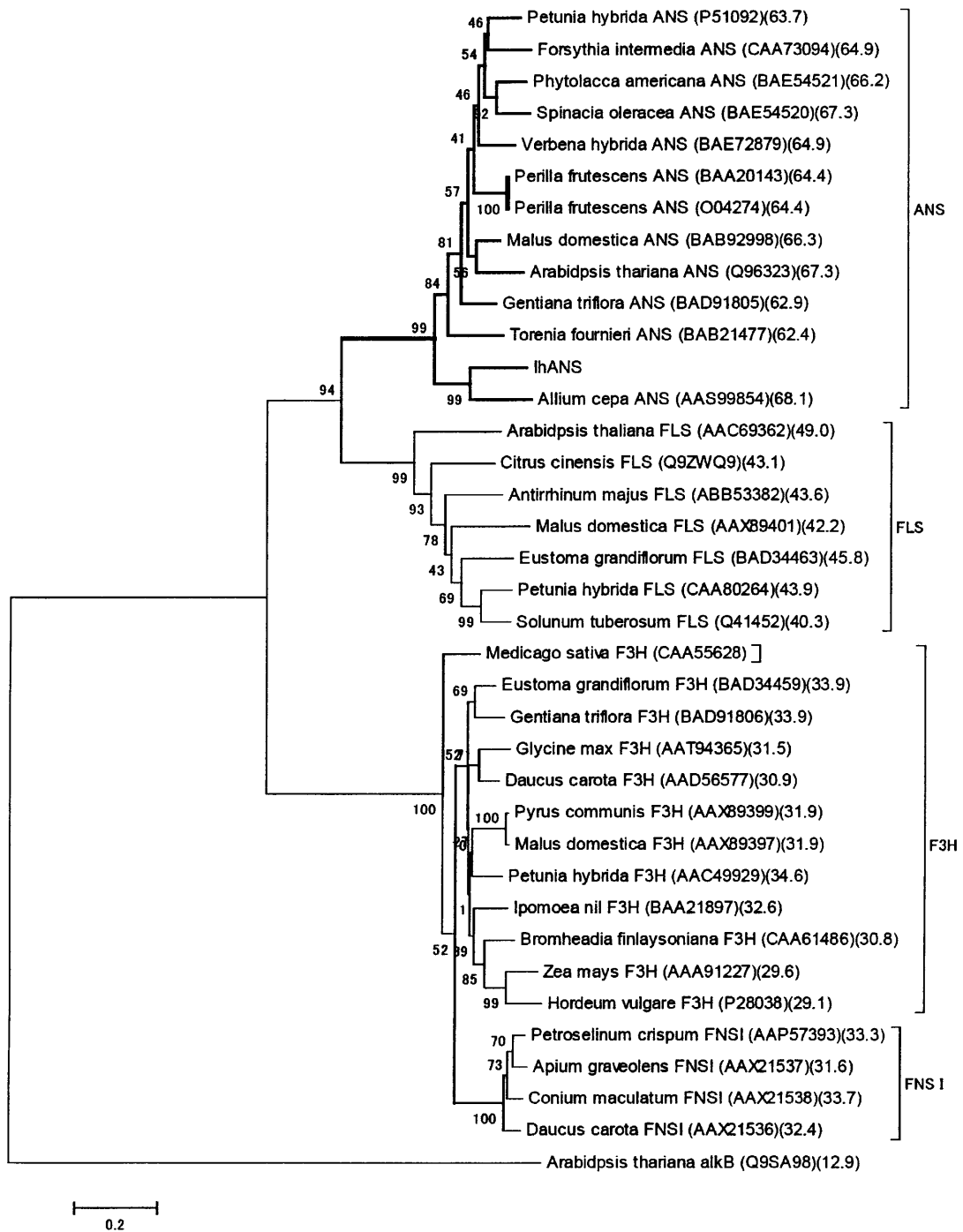
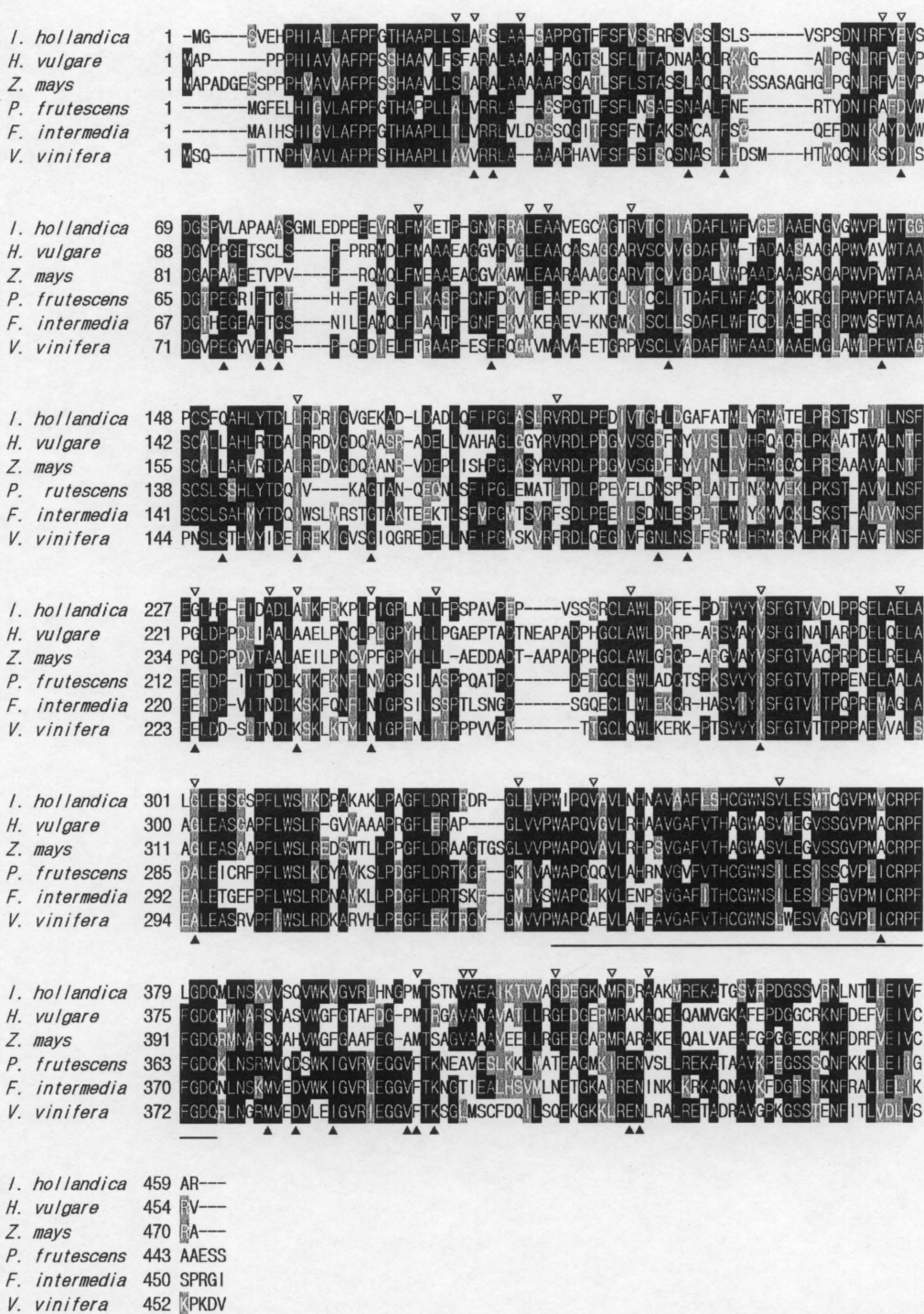


Fig. 2-5B. A molecular phylogenetic tree of the deduced amino sequences of IhANS and other 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily members. The tree was constructed by the neighbor-joining method. The numbers at the branches are the bootstrap values that indicate confidence level each branch based on 1000 repetitions of the analysis.

においても、これらに対応するアミノ酸残基が保存されていた (Fig. 2-5A)。また、IhANS と他種植物の ANS との同一性は 49 - 70 %、2-ODD ファミリー内での分子系統樹解析においても ANS のクレードに属し、その中でもタマネギ ANS と最も近接していた (Fig. 2-5B)。これらのことから、*IhANS* cDNA はアントシアニジンシンターゼをコードするものと考えられる。

3GT はアントシアニジンの 3 位へ UDP-グルコースからグルコースを転移する酵素である。Fig. 2-6B に示したように、Ih3GT の推定アミノ酸配列はシソ (Gong *et al.* 1997)、アイノコレンギョウ (*Forsythia intermedia*, AF127218) およびブドウ (Kobayashi *et al.* 2001) と 44.6 %、43.4 % および 43.4 % の同一性を示した。推定アミノ酸配列のマルチプルアライメントにおいて、Ih3GT は C 末端領域に他の 3GT と配列保存性の高いモチーフを持つこと、さらに単子葉および双子葉植物種の 3GT それぞれに特徴的なアミノ酸残基が存在することも見出された (Fig. 2-6A)。これらのことから、*Ih3GT* cDNA クロームはアントシアニジン 3-グルコシルトランスフェラーゼをコードしていることが指摘され、さらにこのことは、次章・第 2 節の大腸菌による異種発現解析により確認した。3GT 間で高度に保存されていたモチーフは、植物の二次代謝産物の生合成に関与する配糖化酵素に特徴的な配列 (plant secondary product glycosyltransferase signature sequence, PSPG box) である (Hughes and Hughes 1994)。この PSPG box は、3GT だけではなく、アントシアニン 5-O-グルコシルトランスフェラーゼ (5GT, Imayama *et al.* 2004) や 3'-O-グルコシルトランスフェラーゼ (3'GT) (Fukuchi-Mizutani *et al.* 2003) を含む、アントシアニンやフラボノイドなどに UDP-グリコシドからグリコシル基を転移する糖ヌクレオチド依存性グリコシルトランスフェラーゼに広く保存されていることが知られている。そこで、PSPG サブファミリーに属する酵素遺伝子群で分子系統樹による解析を行った (Fig. 2-6B)。その結果、Ih3GT は他種植物の 3GT とともに独立したクラスターを形成し、5GT、3'GT およびラムノシルトランスフェラーゼ (3RT) などの他のグリコシルトランスフェラーゼのクラスターとの分岐が明らかになった。また、3GT クラスターにはケツルアズキ (*Vigna*



**Fig. 2-6A. Multiple alignment of deduced amino acid sequences of 3GTs.** Black shading and gray boxes show identical and similar amino acids, respectively. The underline indicates the common motif found glycosyltransferases. Identical and/or similar amino acid residues for monocot species indicated with white whaded arrowheads, those for dicot species are black arrow heads. GenBank accession numbers of 3GTs: *Hordeum vulgare* (X15694), *Zea mays* (AY167672), *Perilla frutescens* (AB002818), *Forsythia intermedia* (AF127218), and *Vitis vinifera* (AB047092).

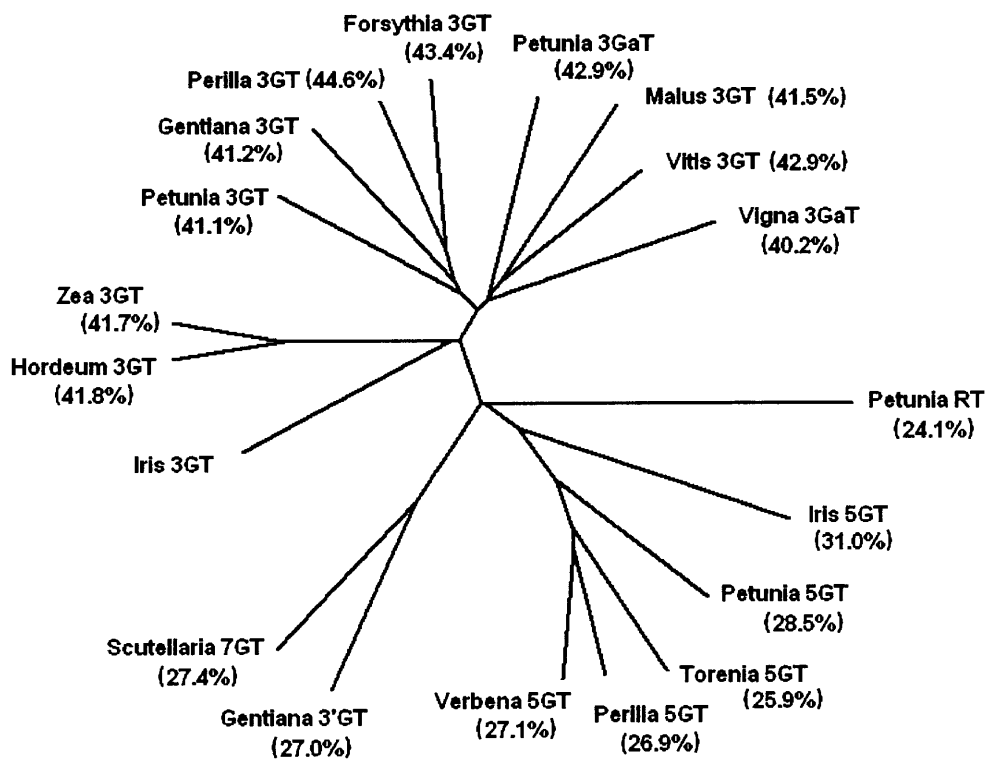


Fig. 2-6B. A molecular phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences of 3GTs, 5GTs and related glycosyltransferases. GenBank accession numbers of the 3GTs, 5GTs and related glycosyltransferases: *Iris* 3GT (AB161175) *Perilla* 3GT (AB002818), *Forsythia* 3GT (AF127218), *Vitis* 3GT (AF000372), *Hordeum* 3GT (X15694), *Zea* 3GT (AY167672), *Malus* 3GT (AF117267), *Gentiana* 3GT (D85186), *Petunia* 3GT (AB027454), *Iris* 5GT (AB113664), *Perilla* 5GT (AB013596), *Verbena* 5GT (AB013598), *Petunia* 5GT (AB027455), *Torenia* 5GT (AB076698), *Petunia* 3GaT (UDP-galactose: flavonol 3-*O*-galactosyltransferase, AF165148), *Vigna* 3GaT (flavonoid 3-*O*-galactosyltransferase, AB009370), *Petunia* RT (UDP-rhamnose: anthocyanidin 3-glucoside rhamnosyltransferase, X71059), *Gentiana* 3'GT (anthocyanin 3'-glucosyltransferase, AB076697), *Scutellaria* 7GT (UDP-glucose: flavonoid 7-*O*-glucosyltransferase, AB031274). The values in parentheses indicate percent identity of deduced amino acid sequences between *Iris* 3GT and each glycosyltransferase.

*mungo*) のフラボノイド 3-*O*-ガラクトシルトランスフェラーゼ (3GaT) (Mato *et al.* 1998) およびペチュニアのフラボノール 3GaT (Miller *et al.* 1999) も属していたことから、PSPG 内での分化は糖供与体特異性よりはむしろ、糖受容体あるいはグルコシル化位置特異性と関係していると考えられる。また、本実験の分子系統樹解析の結果は、単子葉と双子葉植物の種分化前に 5GT および 3GT が、それぞれ分岐していたことを指摘した Imayama *et al.* (2004) の報告を支持するものである。

以上のように、本節において単離した6つの cDNA クローンは、それぞれ CHS、CHI、DFR、F3H、ANS および 3GT をコードすると見なされ、また 5GT および 3AT cDNA クローンは既に単離されている (Imayama *et al.* 2004、Yoshihara *et al.* 2006)。このことは、アントシアニン 3-ラムノシルトランスフェラーゼ (3RT)、フラバノン 3'-ヒドロキシラーゼ (F3'H)、フラバノン 3'5'-ヒドロキシラーゼ (F3'5'H) およびフラボンシンターゼ (FNS II) をコードする cDNA のクローニングという課題は残るものの、ダッチアイリスにおけるアントシアニン生合成酵素遺伝子の大部分が獲得されたことを指摘している。これらのクローンは、ダッチアイリスにおけるアントシアニン生合成遺伝子の発現パターン解析、新規花色改変のための遺伝子導入などに有用なツールとして期待される。

#### 4. 摘要

キンギョソウの *CHS*、*F3H*、*UFGT* cDNA の全長、およびダッチアイリスの *DFR* cDNA 断片をプローブとして用いたダッチアイリス cDNA ライブラリーのスクリーニングにより、*CHS*、*F3H*、*DFR* および *3GT* をコードする cDNA を獲得した。また、ダッチアイリス EST 情報を基礎とした PCR およびライブラリーのランダムスクリーニングにより、*CHI* cDNA 断片および *ANS* cDNA のクローニングに成功した。それぞれの cDNA がコードするタンパク質は、マルチプルアライメント解析によって各酵素に特徴的なモチーフ配列とアミノ酸残基が検出され、分子系統樹解析においては他種植物の対応する酵素と同じクレードに配置された。以上のことから、本章で単離したダッチアイリスの *CHS*、*CHI*、*F3H*、

*DFR*、*ANS*および*3GT* ホモログはそれぞれが対応するアントシアニン生合成酵素をコードしていると思なされた。

## 第2節 アントシアニン生合成酵素遺伝子の発現解析

### 1. 緒言

アントシアニン生合成遺伝子の発現がアントシアニンやその中間産物であるフラボンおよびフラボノールの生成に及ぼす影響を調査することは、アントシアニン生合成機構を解明する上で重要である。ダッチアイリスにおいて、主要アントシアニンとして delphinidin 3*p*CRG5G が、またフラボン類として swertisin、*O*-xylosylswertisin、vitexin、iso-orientin および swertiajaponin が報告されている (Asen *et al.*, 1970)。*Iris* 属の花の発育とアントシアニンの蓄積量の経時的変化に関する研究は、ハナショウブにおいて行われているもの (神崎 1995)、フラボンの蓄積量に関する分析および両色素の蓄積量の経時的変化に関する比較調査はなされていない。また、*Iris* 属植物ではアントシアニン生合成遺伝子の発現解析に関する研究が全く行われていないのが現状である。

そこで本節では、アントシアニン生合成遺伝子がアントシアニンおよびフラボン化合物の蓄積量に及ぼす影響について調べるため、まず、ダッチアイリスのアントシアニンとフラボン蓄積量の花の発育時の経時的変化や器官間差異を調査し、次いで RT-PCR 法を用いて、前節で単離したアントシアニン生合成遺伝子、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS* および *3GT* に加え、当研究室で獲得された *5GT* (Imayama *et al.* 2004) および *3AT* (Yoshihara *et al.* 2006) の時期・器官特異的発現を解析した。さらに、本種の青紫色花、白色花および複色花の品種間でこれらアントシアニン生合成遺伝子の発現を比較解析することにより、白色花品種および複色花品種における花器官の白色化原因を明らかにした。

### 2. 材料および方法

#### 1) 植物材料

植物材料として、ダッチアイリスの青紫色花品種、「ブルーダイヤモンド」(内、外両花被および雌蕊とも青紫)、複色花品種「Surprise」(外花被および雌蕊は白、内花被は淡紫)



および白色花品種「White Wedgewood」(内・外両花被および雌蕊とも白)を供試した (Fig. 2-7A~C)。なお、括弧内に表示した品種の花色は、1品種当たり3個の花を試料として、開花当日の外花被、内花被および雌蕊中央部を簡易型分光色差計 (日本電色工業 NF333)により測定し、評価したものである (Table 2-2)。これら品種の球根は、「ブルーダイヤモンド」がタキイ種苗株式会社から、「White Wedgewood」が株式会社大和農園から購入したもの、また「Surprise」は市販のものを用い、宮崎大学農学部の実験圃場で栽培した。なお、「ブルーダイヤモンド」および「White Wedgewood」は、ともに品種「Wedgewood」の芽条変異により育成されたものであるが (Fig. 2-8)、「Surprise」の育成経歴については不明である。

花の発育段階におけるアントシアニンおよびフラボンの蓄積パターン、およびアントシアニン生合成遺伝子の時期特異的発現を調査するために、「ブルーダイヤモンド」の花蕾を5つの発育段階分けて採取し、それぞれの段階の外花被を試料として用いた (Fig. 2-9)。アントシアニンおよびフラボンの器官特異的蓄積の調査には、1品種当たり3個の花を試料として開花当日の内・外両花被および雌蕊の各器官を用いた。

アントシアニン生合成遺伝子の部位特異的発現解析には、各品種の葉、内・外両花被、雄蕊および雌蕊を用いた。また、経時的発現解析のための花の発達段階は、Fig. 2-9のように分類した。これらの器官は使用するまで-80℃で保存した。

## 2) アントシアニンおよびフラボンの抽出

供試植物1花分の各組織を1%塩酸性メタノールで24時間冷浸し、花卉を取り除いた抽出液を粗抽出液として、-20℃で保存した。粗抽出液は濾過し、ロータリーエバポレーター (40℃)で乾固後、超純水で溶解した。この色素溶液を Millipore Express Membrane Filter (0.22  $\mu$ m, 13mm, Nihon Millipore K.K.)で濾過し、不純物を取り除いた後、HPLCの試料として各発育段階および各器官当たり3花分の試料を用いた。

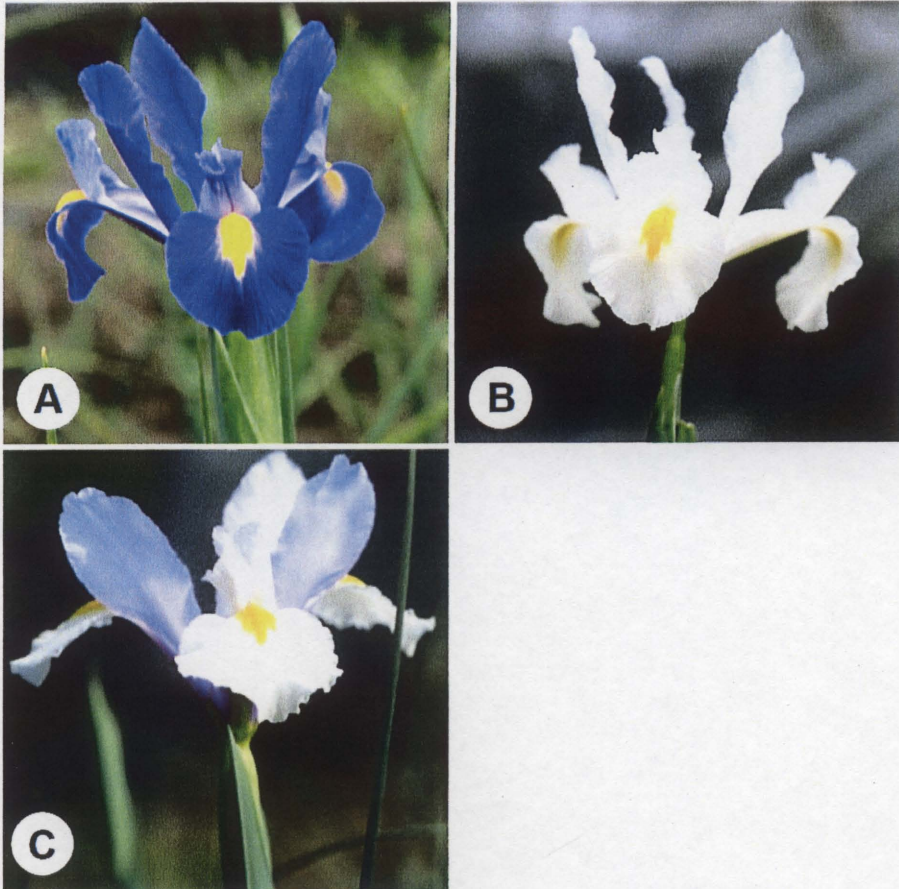
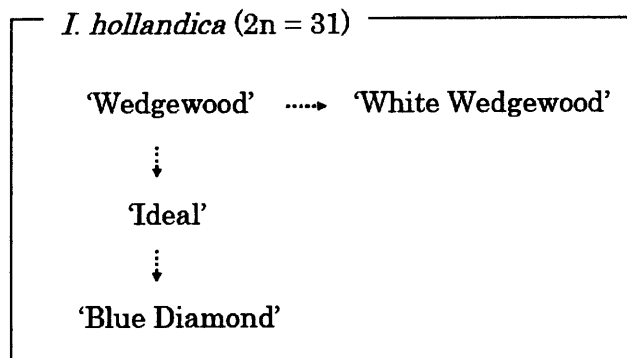


Fig. 2-7. Flowers of *Iris hollandica*. (A) cv. Blue Diamond, (B) cv. White Wedgewood and (C) cv. Surprise.

*I. tingitana* (2n = 28) × *I. xiphium* var *praecox* (2n = 34)



.....→ : Bud mutation

Fig. 2-8. The breeding of *Iris hollandica* cv. Blue Diamond and cv. White Wedgewood.

Table 2-2 The CIELAB<sup>a</sup> parameters values for flower organs of *Iris hollandica*

| Cultivar        | Flower organ | L*         | a*         | b*          | Color         |
|-----------------|--------------|------------|------------|-------------|---------------|
|                 |              | 100.00     | 0.00       | 0.00        |               |
| Blue Diamond    | Op           | 22.49±2.42 | 27.41±1.73 | -44.65±1.93 | Bluish purple |
|                 | Ip           | 28.02±2.36 | 24.42±0.88 | -37.28±2.45 | Bluish purple |
|                 | P            | 44.73±4.41 | 13.39±5.48 | -32.71±4.36 | Bluish purple |
| White Wedgewood | Op           | 87.24±0.99 | -6.86±0.19 | 14.08±0.96  | White         |
|                 | Ip           | 86.48±1.40 | -4.10±4.72 | 8.11±4.72   | White         |
|                 | P            | 86.02±1.40 | -3.82±0.71 | 8.92±1.37   | White         |
| Surprise        | Op           | 85.74±0.67 | -5.51±0.55 | 10.82±1.02  | White         |
|                 | Ip           | 69.09±1.56 | 5.30±1.21  | -15.54±2.11 | Pale purple   |
|                 | P            | 85.22±1.42 | -3.45±0.95 | 5.79±1.99   | White         |

<sup>a</sup>CIELAB (CIE L\* a\* b\*, CIE Lab). A mathematical derivative of CIE XYZ (1931) that describes colors using three synthetic primaries: L\* (which indicates Lightness), a\* (which indicates red-greenness), and b\* (which indicates yellow-blueness).

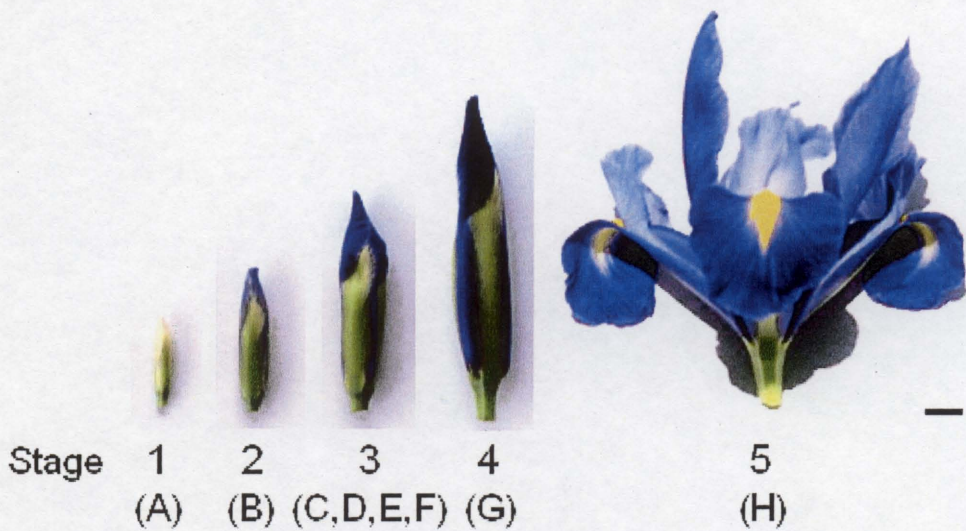


Fig. 2-9. Flower development in the *Iris hollandica* cv. Blue Diamond. Flower buds were classified into 4 stages by their bud sizes (lengths): stage 1 (A), 20 - 29 mm; stage 2 (B), 30 - 39 mm; stage 3 (C, D, E, F), 40 - 59 mm; stage 4 (G), 60 - 75 mm, and fully opened flower was stage 5 (H). Stage 3 were classified into 4 stages as follows: C, 40-44 mm; D, 45-49 mm; E, 50-54 mm; F, 55-59 mm (Scale bar = 10 mm).

Table 2-3 Primers used in the expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Iris hollandica*

| Gene          | Primer     | Sequence                            | Annealing temp.(°C) |
|---------------|------------|-------------------------------------|---------------------|
| <i>pIhCHI</i> | IhCHI.Fw   | 5'-CCA GTC CAA GTA TCT CAA G-3'     | 43                  |
|               | IhCHI.Rv   | 5'-GAA AAT TCT CAT GGT GCT AC-3'    |                     |
| <i>IhF3H1</i> | IhF3Hsp.Fw | 5'-GAA GCT GAG GTT CGA CAT GAC-3'   | 49                  |
|               | IhF3Hsp.Rv | 5'-GTG TGG CGC TTG AGA CCG A-3'     |                     |
| <i>IhDFR</i>  | IhDFRsp.Fw | 5'-CAT AAT CAA GCA CGC GCA GC-3'    | 49                  |
|               | IhDFR.P2-2 | 5'-CAA TTC GGG CAT GTT CCT CTG-3'   |                     |
| <i>IhANS</i>  | IhANSsp.Fw | 5'-CAA CTA CTA CCC CAG GTG C-3'     | 48                  |
|               | IhANS.P2-2 | 5'-CTG ATC CTG AAC CTG AGC CT-3'    |                     |
| <i>Ih3GT</i>  | Ih3GT.f2   | 5'-CGA CCT TGC CAC CAA GT-3'        | 49                  |
|               | Ih3GT.P2-2 | 5'-CAA GTT TCT GAC TGA GCT CCC-3'   |                     |
| <i>Ih5GT</i>  | Ih5GTsp.Fw | 5'-GTT TGG GGG TGA AGG TGG A-3'     | 48                  |
|               | Ih5GT.P2-2 | 5'-GAC GAA CGC CGC GAG ATT T-3'     |                     |
| <i>Ih3AT2</i> | Ih3ATsp.Fw | 5'-GGA TGA GCT TCT TCC TAA AG-3'    | 45                  |
|               | Ih3ATsp.Rv | 5'-CAC CGT CGA AGA TCG CAT-3'       |                     |
| <i>IhAQP</i>  | IhMIP.Fw   | 5'-GAG ATC GTC GGC ACC TTT GCT C-3' | 53                  |
|               | IhMIP.Rv   | 5'-GGC AGC AAG TGC AGC TCC AAT G-3' |                     |

### 3) 試料の HPLC 分析

HPLC 分析装置として、島津高速液体クロマトグラフ用送液ユニット (LC-10AD VP)、オンラインデガッサ (DGU-14A)、システムコントローラ (SCL-10A VP)、オートインジェクタ (SIL-10AD VP)、逆相カラム (STR ODS-II)、カラムオープン (CTO-10A) およびフォトダイオードアレイ紫外可視検出器 (SPD-M10A VP) を用いた。溶出システムは、移動相に A 液 [水 : 酢酸 : リン酸 = 89.9 : 10 : 0.1 (v/v)] および B 液 (50 % アセトニトリル水溶液) を用い、35 °C 下で流量 1 ml/min の A 液に 2 %/min の直線勾配をかけて B 液を流し、20 分間のグラジエント溶出を行った後、B 液を 40 % のまま 20 分間保持した。アントシアニンの検出は、フォトダイオードアレイ紫外可視検出器により 540 nm で計測し、各アントシアニン成分の  $\lambda_{\max}$ 、保持時間および面積の算出は LC ワークステーション CLASS-VP ver. 6.12 SP5 によった。

### 4) RT-PCR 分析

ダッチアイリスの total RNA は、Tanaka *et al.* (1995) の方法により各器官から調製した。total RNA からの逆転写反応は、本章・第 1 節で述べた方法により行った。アントシアニン生合成に関与する各遺伝子の発現の検出は、0.25  $\mu$ M 遺伝子特異的プライマー (Table 2-3)、および 5 units TaKaRa Ex Taq® (タカラバイオ株式会社) を用いた PCR 反応により行った。PCR プログラムは、初期変性 2 分間の後、変性 94°C、30 秒間、アニーリング 30 秒間、伸長 72 °C、30 秒間を 30 サイクルとした。アニーリングの温度は、各プライマーの  $T_m$  値により変更した (Table 2-3)。PCR 産物は 1.5% のアガロースゲル、100V で電気泳動し、分離した。

## 3. 結果および考察

### 1) 花の各発育ステージにおけるアントシアニンおよびフラボン蓄積とアントシアニン生合成遺伝子発現の経時的変化

ダッチアイリス「ブルーダイヤモンド」の外花被において、アントシアニンおよびフラボンの蓄積は蕾が最も小さいステージ1から確認された。ステージ1においてわずかであったアントシアニンは、花の発進が進むに従って濃度が上昇し、開花前（ステージ4）において花卉新鮮重当たりの蓄積量が最大になった（Fig. 2-10A）。一方、フラボン蓄積量はステージ1において最も高く、花の発進が進むに従って減少した（Fig. 2-10B）。

花の発進段階における各アントシアニン生合成酵素遺伝子の発現は、ステージ1から確認され、特に *IhCHI* はステージ1から3にかけて高い発現を示した（Fig. 2-11）。しかしながら、この遺伝子の発現は開花直前（ステージ4）および開花期（ステージ5）において、急激に減少した。次に、*IhF3H* および *IhANS* の発現は、花の発進期間中、ステージ1を除くすべての時期で高レベルに発現していた。また、*IhDFR* および *Ih3AT* の発現は、*IhF3H* および *IhANS* と比較すると低いものの、ステージ1を除くすべての段階で一定の発現量を保っていた。さらに、*Ih3GT* および *Ih5GT* の発現はステージ1からステージ3(E)にかけて上昇し、その後、減少した。特に、後者の遺伝子発現は開花時（ステージ5）においてさらに急激に減少した。以上のように、本節に用いた *IhCHI*、*IhF3H*、*IhDFR*、*IhANS*、*Ih3GT*、*Ih5GT* および *Ih3AT* 遺伝子は、いずれもステージ2から3にかけて高い発現が維持されていた。このことは、先に述べたアントシアニンの蓄積量がステージ2から4にかけて増加したこととよく対応していた。これらのことから、ダッチアイリス花蕾の各発進時期において、アントシアニンの蓄積量と遺伝子の発現レベルがよく対応していることが示された。このことはダッチアイリスのアントシアニン生合成が、それぞれの生合成を触媒する酵素遺伝子の転写レベルで制御されていることを指摘している。これに対して、フラボンの蓄積量はアントシアニン蓄積量が増加するとともに減少していた。

## 2) 各品種の器官におけるアントシアニンおよびフラボンの蓄積、アントシアニン生合成遺伝子および色の発現

供試したダッチアイリスの3品種、「ブルーダイヤモンド」、「Surprise」および「White



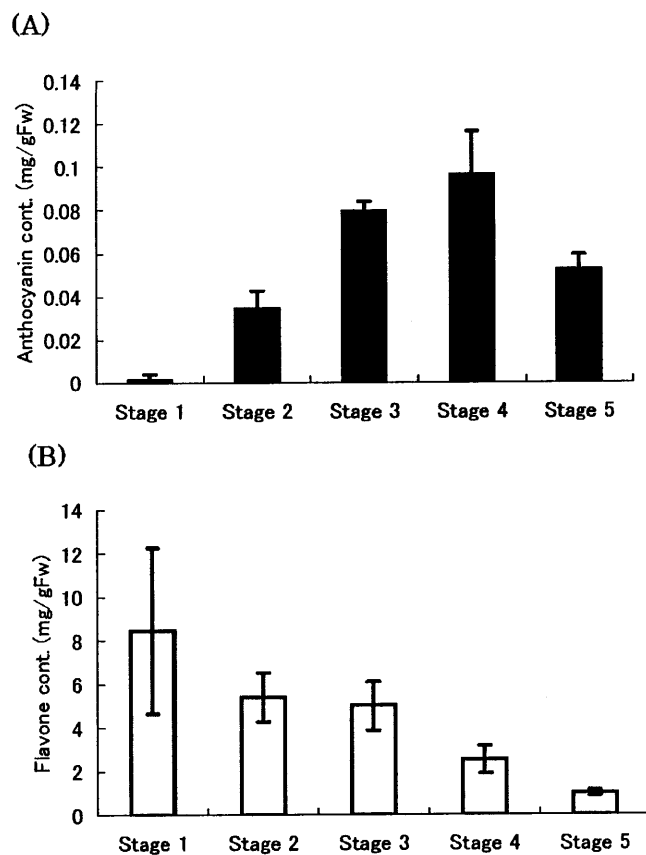


Fig. 2-10. Temporal accumulation of (A) anthocyanin and (B) flavone in developmental stages of the outer perianth in *Iris hollandica* cv. Blue Diamond. The division of developmental stages is similar with that of Fig. 2-9.

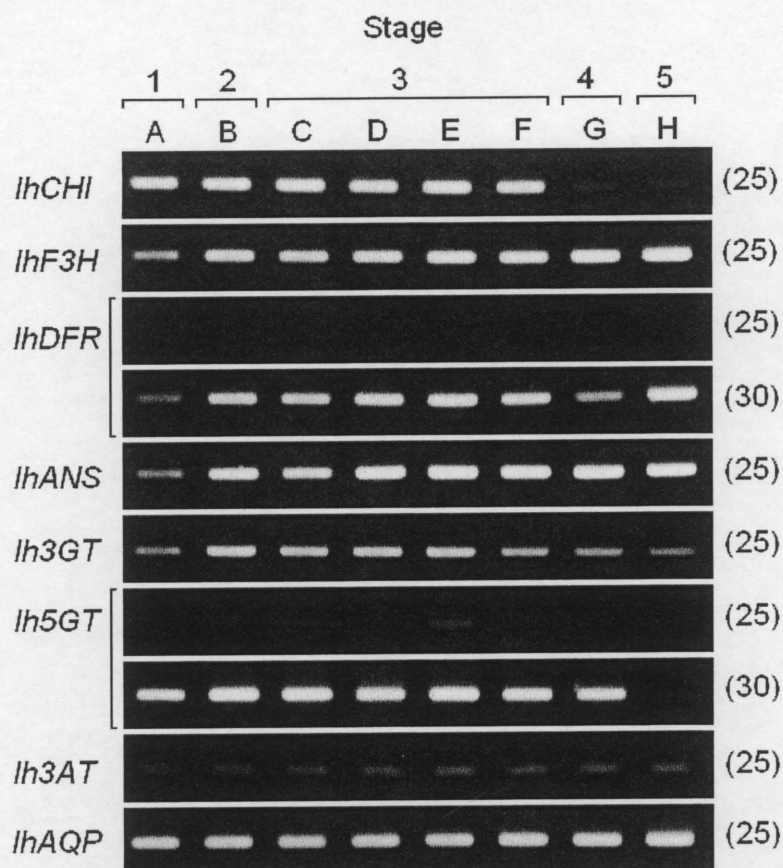


Fig. 2-11. Expression of anthocyanin biosynthetic genes in developmental stages of outer perianths in *Iris hollandica* cv. Blue Diamond. The values in parentheses indicate cycle numbers of PCR reaction. The division of developmental stages is similar with that of Fig. 2-9. *Iris hollandicaAQP* was used as a positive control.

Wedgewood」のうち、「ブルーダイヤモンド」の各花器官におけるアントシアニンおよびフラボン蓄積量は、他の2品種に比べて高い値を示し、また外花被が最も高く、内花被が最も低かった。また、「ブルーダイヤモンド」においてコピグメンテーション効果の強弱を左右するアントシアニンとフラボンの量比は、外花被(1:27.8)、内花被(1:9.6)および雌蕊(1:11.7)であり、外花被で最も高く、最も強い青みを発現していた(Table 2-2、Fig. 2-12)。遺伝子の発現解析では、「ブルーダイヤモンド」の葉において、*IhCHI*および*IhF3H*を除くアントシアニン生合成遺伝子の発現は確認されなかった。一方、花器官でのアントシアニン生合成遺伝子の発現は、雄蕊では低く、外花被、内花被および雌蕊の花弁状の器官において高かった。*IhF3H*、*IhANS*、*Ih3GT*および*Ih3AT*に関しては調査した葉以外の器官で高レベルの発現が確認され、その中でも*IhF3H*および*IhANS*は雄蕊においても強く発現していた(Fig. 2-13)。このことから、「ブルーダイヤモンド」では外花被、内花被および雌蕊の3器官と雄蕊とはアントシアニン生合成遺伝子発現の制御機構が異なるものと考えられる。

「Surprise」は、外花被が白、内花被が淡い青紫、雌蕊が白色の複色花品種である。各器官の色に対応して、外花被と雌蕊でアントシアニンの蓄積量が低く、内花被で高かった。一方、フラボンの濃度は外花被において最も高かった。アントシアニンとフラボンの量比は外花被(1:225.4)、内花被(1:26.7)および雌蕊(1:101.9)であり、「Surprise」の内花被は「ブルーダイヤモンド」の外花被と同程度の量比を示したが(Fig. 2-12)、青みの程度は後者の方が高かった(Table 2-2)。また、本品種のアントシアニン生合成遺伝子の発現は全体的に減少しているものの、*IhF3H*、*IhANS*および*IhCHI*がすべての器官で、*Ih3AT*および*Ih3GT*は外花被、内花被、雌蕊で発現していることが確認された(Fig. 2-13)。しかしながら、「ブルーダイヤモンド」と比較して、*IhDFR*および*Ih5GT*の発現は内花被でかなり減少し、外花被および雌蕊でより顕著な減少が観察された(Fig. 2-13)。これらのことから、「Surprise」外花被および雌蕊における*IhDFR*発現の顕著な減少が白色を、また内花被における*IhDFR*発現のかなりの減少が淡紫色をもたらしていると結論される。

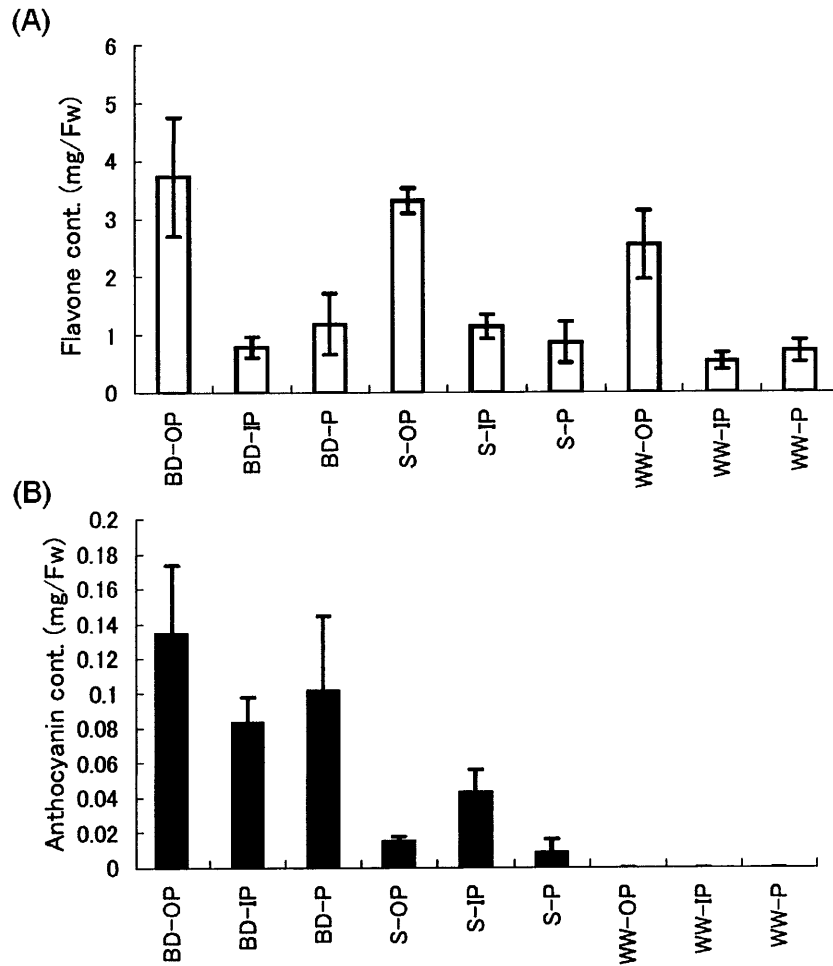


Fig. 2-12. Spatial accumulation of (A) flavone and (B) anthocyanin in *Iris hollandica* cv. Blue Diamond (BD), cv. Surprise (S) and cv. White Wedgewood (WW) open flowers. OP, outer perianths; IP, inner perianths; P, pistils.

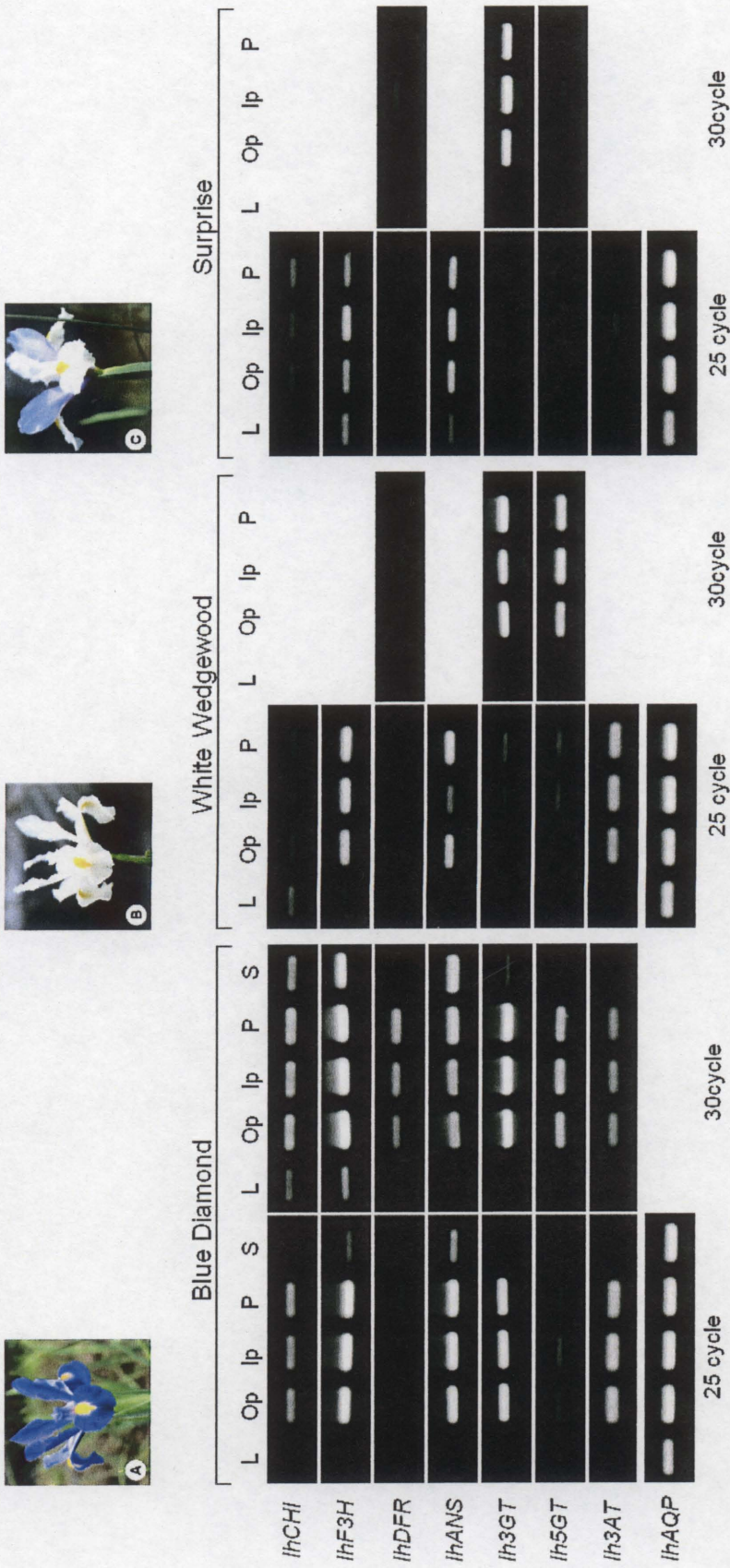


Fig. 2-13. Expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Iris hollandica* cv. Blue Diamond, cv. White Wedgewood and cv. Surprise. PCR amplification was carried out with gene specific primers using one of the following templates: total RNA extracted from leaves (L), open perianth (Op), inner perianth (Ip), pistils (P) and stamens (S). *Iris hollandica AQP* was used as a positive control.

「White Wedgewood」はその名のとおり、すべての花器官が白色の品種である。この品種において、アントシアニンは検出されず、フラボン蓄積量も他の2品種と比較して低い値を示した (Fig. 2-12)。*IhCHI*および*IhF3H*はすべての器官で正常に発現していた。また、*IhANS*、*Ih5GT*および*Ih3AT*の発現レベルに関しても外花被、内花被および雌蕊において「ブルーダイヤモンド」と同程度であり、*Ih3GT*の発現も弱いながら確認された (Fig. 2-13)。しかしながら、外花被および雌蕊において*IhDFR*の発現は認められず、また内花被においてその発現は顕著に減少し、内花被由来のRNAを用いたRT-PCRを30サイクル行うことで、わずかに検出される程度であった (Fig. 2-13)。このことから、「White Wedgewood」におけるアントシアニン生合成の欠失 (白色化) は、外花被および雌蕊での*IhDFR*発現の欠損、内花被で*IhDFR*発現の顕著な減少に起因するものと結論される。

興味深いことに、「White Wedgewood」では時折、白色の外花被および内花被に紫色のスポットが生じる。このスポットから色素を抽出し、HPLC分析を行ったところ、「ブルーダイヤモンド」と同様のアントシアニンが存在することが確認された。「White Wedgewood」は「ブルーダイヤモンド」と共通の有色の品種から芽条突然変異によって獲得された品種である。このことから、「White Wedgewood」における*IhDFR*発現の減少はトランスポゾンあるいはゲノムDNAのメチル化により引き起こされたことが示唆される。

以上のことから、複色花品種「Surprise」の外花被および雌蕊の白色化は*DFR*遺伝子発現の減少に、また白色花品種「White Wedgewood」の内花被、外花被および雌蕊の白色化は*DFR*遺伝子発現の顕著な減少に起因することが明らかにされた。遺伝子の発現は、構造遺伝子の5'上流領域に含まれるプロモーター領域および発現調節領域を含むシスエレメント、シスエレメントに結合するトランスエレメント (転写調節因子) によって制御されている。そのため、「White Wedgewood」と「Surprise」の*DFR*遺伝子発現の欠失や減少は、構造遺伝子そのものの変異、あるいはシスエレメントとトランスエレメントのいずれかの変異に起因するものと考えられ、この検証を第4章で試みた。

#### 4. 摘要

アントシアニン生合成遺伝子がアントシアニンおよびフラボン化合物の蓄積量に及ぼす影響について調査するため、ダッチアイリスのアントシアニン・フラボン蓄積量の花の発達における経時的変化や器官間差異を分析するとともに、アントシアニン生合成遺伝子、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS*、*3GT*、*5GT*および*3AT*の時期・器官特異的発現を解析した。さらに、本種の青紫色花品種「ブルーダイヤモンド」、複色花品種「Surprise」および白色花品種「White Wedgewood」の間でこれらアントシアニン生合成遺伝子の発現を比較解析することにより、「Surprise」および「White Wedgewood」における花器官の白色化の原因究明を試みた。その結果、花の時期および器官においてアントシアニンの蓄積量と生合成遺伝子の発現レベルはよく対応しており、アントシアニン生合成がそれぞれの反応を触媒する酵素遺伝子の転写レベルで制御されていることが示唆された。これに対して、フラボン蓄積量はアントシアニン蓄積量が増加するとともに減少した。さらに、「Surprise」の外花被および雌蕊の白色化は *DFR* 遺伝子発現の顕著な減少に、また「White Wedgewood」の内、外両花被および雌蕊の白色化は *DFR* 遺伝子発現の欠損または顕著な減少に起因することが明らかにされた。