

要 約

花色の多彩化育種を促進するためには、花色素、特にアントシアニンの有用変異の探索や生合成酵素・遺伝子に関する知見の蓄積は極めて重要である。*Iris* 属植物においてもアントシアニンなど色素の特性解明については精力的に行われてきたが、十分な知見が蓄積するまでには至っていない。また、本属植物におけるアントシアニン生合成酵素・遺伝子に関する知見は全く得られていないのが現状である。そこで、*Iris* 属植物におけるアントシアニンの新たな有用変異を探索するとともに、その生合成酵素・遺伝子の特性を解明するために本研究を実施した。まず、ハナショウブを中心とした *Iris* 属植物の外花被含有アントシアニンについて HPLC 分析を行い、その新たな有用変異を探索するとともに、赤色花品種を育成するためにアントシアニンと花色の評価を行った。次に、ハナショウブの花蕾より調製したアントシアニン 5-グルコシルトランスフェラーゼ(5GT)およびアントシアニン 3-アシルトランスフェラーゼ(3AT)の特性を調査し、本種におけるアントシアニン生合成系路の末端部を提案した。さらに、5GT および 3AT をコードする cDNA の単離とその機能解析を行うため、ダッチアイリス花卉の cDNA ライブラリーから両遺伝子のクローニングを試みた。本研究で得られた成果について要約すると、以下のとおりである。

1. ハナショウブおよびノハナショウブの 262 品種(系統)は外花被に含有される主要アントシアニンの型により 29 種類に分類された。これらの型のうち、petunidin 3pCRG5G – delphinidin 3pCRG5G、delphinidin 3pCRG5G – petunidin 3pCRG5G、cyanidin 3pCRG5G – peonidin 3pCRG5G、delphinidin 3RG –

petunidin 3pCRG5G、delphinidin 3pCRG5G—delphinidin 3RG、petunidin 3pCRG—petunidin 3RG、delphinidin 3RG—delphinidin 3pCRG、petunidin 3RG5G—malvidin 3RG5G、malvidin 3RG5G—peonidin 3RG5G、peonidin 3RG5G—cyanidin 3RG5G、peonidin 3RG5G—cyanidin 3G、petunidin 3RG—malvidin 3RG、petunidin 3RG—delphinidin 3RG、peonidin 3RG—cyanidin 3RG、petunidin 3G—delphinidin 3G、petunidin 3pCRG、peonidin 3RG5G、cyanidin 3RG5G、petunidin 3RG、delphinidin 3RG および malvidin 3pCRG5G—peonidin 3pCRG5G—petunidin 3pCRG5G の 21 種類の型は本研究で最初に発見されたものであり、その中でも特に peonidin 3RG5G—cyanidin 3RG5G、peonidin 3RG5G および cyanidin 3RG5G の 3 つの型に属する系統は赤色花の育種を行う上で重要な遺伝資源として注目された。さらに、これら主要アントシアニンのうち、分光色差計による花色の評価および λ_{\max} の比較により、cyanidin 3RG5G が赤色花を育種する上で最も重要なアントシアニンであると結論された。

ハナショウブ以外の 13 種についてみると、アヤメおよびジャーマンアイリスからは delphinidin 3CRG5G が、*I. milesii* からは delphinidin 3-cis-pCRG5G が推定された。これらのアントシアニンが *Iris* 属植物から推定されたのは本研究が最初である。また、これらのアントシアニンは青色花品種を育成するための有用な色素としても期待された。

2. ハナショウブのシアニック(有色)系 5 品種およびアシアニック(白色)系 5 品種を植物材料として供試し、各品種の花蕾から調製した粗酵素抽出液を用いて 5GT の特性を解明した。その結果、シアニック品種「花籬」から調製した 5GT は、UDP-グルコースからアントシアニジン 3RG へのグルコースの転移を触媒し、アントシアニジン

3RG5G を生成した。しかし、糖供与体として ADP-グルコースおよび UDP-ガラクトース、糖受容体としてアントシアニジン 3G および 3pCRG を用いた場合には糖転移反応は起きなかった。

シアニック品種間において 5GT 活性の強弱と花色との間に明確な関連性は認められなかった。一方、アジアニック 5 品種のうち 3 品種は比較的高い 5GT 活性を示し、特に、品種「浮寝鳥」および「鶴の毛衣」の活性はシアニック品種「座間の美」のものより高かった。このように、5GT をコードする遺伝子が他のアントシアニン生合成遺伝子とは独立して発現していることが明らかになった。

3. ハナショウブのシアニック(有色)系 6 品種およびアジアニック(白色)系 5 品種を植物材料として供試し、各品種の花蕾から調製した粗酵素抽出液を用いて 3AT の特性を解明した。その結果、シアニック品種間において 3AT 活性の強弱と花色との間に明確な関連性は認められなかった。一方、アジアニック 5 品種のうち 2 品種は 3AT 活性に関しても比較的高い値を示した。5GT 遺伝子と同様、3AT 遺伝子も他のアントシアニン生合成遺伝子とは独立に発現していた。

シアニック品種「花籬」から調製した 3AT は *p*-クマロイル CoA からアントシアニジン 3RG および 3RG5G への *p*-クマロイル基転移を触媒し、アントシアニジン 3pCRG 及び 3pCRG5G を生成したが、アントシアニジン 3G をアシル基受容体として利用することはできなかった。5GT と 3AT の基質特異性に基づき、ハナショウブにおけるアントシアニン生合成経路の末端部を提案した。

4. 5GT をコードする cDNA の単離とその特性解明を行うため、ダッチアイリス花蕾の cDNA ライブラリーからスクリーニングした 5GT 遺伝子のクローニングと機能発現解析

を行った。得られたダッチアイリスの *5GT* cDNA (*Ih5GT*) は 1,568bp の塩基からなり、その ORF は 463 のアミノ酸をコードしていた。*Ih5GT* の推定アミノ酸配列は他植物種の *5GT* と高い相同性を示し、推定アミノ酸配列から算出される分子質量 (50,128Da) もこれまでの報告と良く合致していた。さらに、大腸菌において異種発現させた組換え *Ih5GT* は UDP-グルコースから cyanidin 3RG の 5 位へのグルコース転移を触媒し、cyanidin 3RG5G を生成した。これに対して、コントロール区ではこのような反応は認められなかったことから、ダッチアイリスにおいて *Ih5GT* が UDP-グルコース: アントシアニン 5-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確認された。様々な植物種のグリコシルトランスフェラーゼの推定アミノ酸配列に基づく分子系統樹においても、*Ih5GT* は双子葉植物のサブグループとは隔たりがあるものの、*5GT* のグループに属していることが示された。本研究は、単子葉植物において *5GT* 遺伝子の単離に成功した初めての報告である。

5. *3AT* をコードする cDNA の単離と特性解明を行うため、ダッチアイリス花蕾から構築した cDNA ライブラリーをスクリーニングし、*3AT* 遺伝子のクローニングと機能発現解析を行った。得られたダッチアイリスの *3AT* cDNA (*Ih3AT*) は 1,475bp の塩基対からなり、その ORF は 429 のアミノ酸をコードしていた。BLAST 検索の結果、*Ih3AT* 推定アミノ酸配列は他植物種のアシルトランスフェラーゼのものと一定の相同性を示したが、既知の AAT との相同性は低かった。また、*Ih3AT* の推定分子質量 (47,677Da) は既知の AAT のものとはほぼ一致していた。植物の BAHD ファミリーを対象とした推定アミノ酸配列による分子系統樹分析では、*Ih3AT* は既知の AAT のグループではなく、タキソール合成遺伝子のグループに属していることが示された。組換え *Ih3AT* 粗酵素抽出液、*p*-クマロイル-CoA および petunidin 3RG5G を用いた酵素アッセイの結果、

反応産物として **petunidin 3pCRG5G** が合成されることを確認した。一方、コントロール区では **petunidin 3pCRG5G** の生成は認められなかったことから、**1h3AT** が **3AT** 活性を有することが示された。単子葉植物において **3AT** 遺伝子の単離に成功したのは、本研究が最初である。

最後に、本研究で得られた知見を基にして、ハナショウブを中心とする花色の多彩化育種に関する論議を行った。