

博士論文番号:

オーロン生合成経路の解明、および黄色花の分子育種

2006 年

小埜 栄一郎

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 植物分子遺伝学講座
サントリー株式会社 先進コア技術研究所

平成 18 年 10 月 30 日提出

目次

第1章 緒言

| | |
|------------------------|-------|
| 1-1 花の色素 | ・・・3 |
| 1-2 フラボノイド生合成経路と分子育 | ・・・7 |
| 1-3 オーロンとオーロンを蓄積する植物 | ・・・10 |
| 1-4 キンギョソウの花色における遺伝学研究 | ・・・13 |
| 1-5 オーロン合成酵素遺伝子の解析 | ・・・17 |
| 1-6 本研究の目的 | ・・・18 |

第2章 オーロン合成酵素を発現するトランスジェニック植物の機能解析

| | |
|---------------------------------|-------|
| 2-1 序論 | ・・・20 |
| 2-2 材料および方法 | ・・・21 |
| 2-2-1 植物試料 | |
| 2-2-2 AmAS1 発現カセットの構築 (pSFP211) | |
| 2-2-3 トレニア形質転換 | |
| 2-2-4 発現解析 | |
| 2-3 結果および考察 | ・・・23 |

第3章 オーロン合成酵素の細胞内局在性解析

| | |
|----------------------------------|-------|
| 3-1 序論 | ・・・24 |
| 3-2 材料および方法 | ・・・27 |
| 3-2-1 ショ糖密度勾配遠心 | |
| 3-2-2 ディファレンシャル遠心分離 | |
| 3-2-3 SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング解析 | |
| 3-2-4 遺伝子材料 | |
| 3-2-5 一過的発現ベクターの構築 | |
| 3-2-6 共発現ベクターの構築 | |
| 3-2-7 パーティクルボンバードメント | |
| 3-3 結果 | ・・・32 |
| 3-3-1 細胞分画による AmAS1 の細胞内局在性解析 | |

| | | |
|---|----------------------------------|-------|
| 3-3-2 | 蛍光タンパク質を用いた AmAS1 の細胞内局在性解析 | |
| 3-3-3 | AmAS1 液胞輸送に関わる NTPP の解析 | |
| 3-3-4 | AmAS1 の液胞輸送経路の解析 | |
| 3-4 | 考察 | ・・・39 |
| 3-4-1 | AmAS1 タンパク質のプロセッシングと液胞局在性 | |
| 3-4-2 | AmAS1 の液胞輸送経路と液胞輸送シグナル解析 | |
| | | |
| 第4章 カルコン 4'位配糖化酵素遺伝子のクローニングと機能解析 | | |
| 4-1 | 序論 | ・・・41 |
| 4-2 | 材料および方法 | ・・・44 |
| 4-2-1 | cDNAライブラリースクリーニング | |
| 4-2-2 | 遺伝子発現解析 | |
| 4-2-3 | サザンブロット解析 | |
| 4-2-4 | 大腸菌による組み換え AmGT タンパク質の発現、および酵素反応 | |
| 4-2-5 | HPLC によるカルコン分析 | |
| 4-2-6 | UGT88D3 -sGFP 融合キメラ遺伝子の構築 | |
| 4-3 | 結果 | ・・・50 |
| 4-3-1 | キンギョソウ配糖化酵素様遺伝子の単離および構造解析 | |
| 4-3-2 | カルコン 4'位配糖化活性測定 | |
| 4-3-3 | キンギョソウ由来カルコン 4'位配糖化酵素の細胞内局在性解析 | |
| 4-4 | 考察 | ・・・56 |
| 4-4-1 | UGT88D サブファミリーの機能分化 | |
| 4-4-2 | UGT88D3 遺伝子の発現制御機構 | |
| 4-4-3 | AmGT 遺伝子群の機能推定 | |

| | |
|--|--------|
| 第5章 オーロン生合成経路の解明および黄色花の分子育種 | |
| 5-1 序論 | ・・・59 |
| 5-2 材料および方法 | ・・・61 |
| 5-2-1 Am4'CGT 発現カセットの構築 (pSFP209) | |
| 5-2-2 AmAS1 発現カセットの構築 (pSFP211) | |
| 5-2-3 Am4'CGT と AmAS1 の共発現コンストラクトの作製 (pSFP201) | |
| 5-2-4 Am4'CGT と AmAS1 の共発現ならびに ThDFR の抑制コンストラクトの作製 (pSFL307) | |
| 5-2-5 Am4'CGT と AmAS1 の共発現ならびに ThF3H の抑制コンストラクトの作製 (pSFL308) | |
| 5-2-6 ThF3H の抑制コンストラクトの作製 (pSFL210) | |
| 5-2-7 遺伝子発現解析 | |
| 5-2-8 顕微鏡観察 | |
| 5-2-9 色素分析 | |
| 5-3 結果 | ・・・64 |
| 5-3-1 キンギョソウ由来カルコン 4'位配糖化酵素の <i>in vivo</i> 機能解析。 | |
| 5-3-2 Am4'CGT および AmAS1 の共発現解析 | |
| 5-3-3 黄色花の分子育種 | |
| 5-4 考察 | ・・・68 |
| 5-4-1 カルコン 4'位配糖化酵素の生理的役割 | |
| 5-4-2 オーロンとアントシアニンの関係 | |
| 5-4-3 コスモスのオーロンによる黄色発現機構 | |
| 5-4-4 キンギョソウにおけるオーロン生合成の再考 | |
| 第6章 総括 | ・・・74 |
| 謝辞 | ・・・78 |
| 参考文献 | ・・・79 |
| 出版物 | ・・・96 |
| 参考資料 | ・・・98 |
| 原著論文 | ・・・103 |

第1章 序論

1-1 花の色素

高等植物は栄養生長期を経た後に生殖生長期に入り、花を形成する。一般的に高等植物の花は両性花であり、内側に雌雄生殖器官を、外側に花弁およびガク片を分化させる (Coen and Meyerowitz, 1991)。アジサイなどのようにガク片が色づく種もあるが、一般的に花色という場合は花弁の色を指す。花色は受粉媒介者である昆虫や鳥類を誘引するための主要な視覚シグナルであり、とりわけ受粉に媒介者を必要とする植物にとって花色発現は安定に子孫を残すための重要な形質である (バルト, 1997; Gandia-Herrero, *et al.*, 2005)。ゴマノハグサ科ミゾホオズキ (*Mimulus lewisii*, 和名: モンキーフラワー) において、*YELLOW UPPER (YUP)* 遺伝子座は花色発現を司っており、*YUP* 遺伝子座における遺伝子型の違いによってハチドリ (Hummingbird) からマルハナバチ (Bumblebee) へと花粉媒介者がシフトすることが明らかとなった (Bradshaw, *et al.*, 2003)。このような花粉媒介者のシフトは植物自身の花の形態、開花時期、および生息地域に大きな影響を与え、種分化を促すと考えられている (Zufall and Rausher, 2004)。従って花色はごく少数の変異により適応進化を推進させる大きな原動力になりえる重要な形質と言える。一般的に自家受粉をする花に比べて受粉に媒介者を必要とする植物種は多様な花色発現する。この多様な花色発現は花弁表皮細胞において生成される植物色素と総称される二次代謝産物によって決定される。また花色発現は色素を合成および蓄積する花弁表皮細胞の形によっても影響を受ける (Noda, *et al.*, 1994)。

花の色素は水溶性フラボノイド色素、ベタレイン色素と脂溶性カロテノイド色素、クロロフィル色素に大きく4つに分類される (Grotewold, 2006)。これらの植物色素のいずれかまたは共存によって多様な色調が花弁に付与される。フラボノイドとは、二つのベンゼン環が三つの炭素を隔てて結合した C6-C3-C6 という共通の基本構造を有する化合物 (カルコン、オーロン、アントシアニン、フラボン、フラボノール) の総称である (Harborne and Baxter, 1999)。フラボノイド系色素は高等植物に最も広く分布しており、これまでに 5000 種を超える分子種が同定されている (Harborne and Baxter, 1999)。その分布は植物進化や環境に非常に関係が深く、化学的分類 (Chemotaxonomy) の指標になっている。

アントシアニンは赤/桃/橙/紫/青色までの幅広い色相を呈する主要なフラボノイド色素であり、これまで 300 種以上が同定されている。アントシアニンの色調は pH 環境、アグリコン修飾、分子会合、金属錯体形成によって大きく変化する。アントシアニンは溶液の pH の影響を受けやすく、酸性条件で安定な赤色のフラビウムイオンは弱酸性から中性付近で素早く脱プロトン化し、紫色の不安定なキノイド塩基になる。これによりアントシアニンは連続的に色相が変化する (山村と長谷川, 2005)。最近単離されたヒルガオ科アサガオの *Purple* 遺伝子 (Fukuda-Tanaka, *et al.*, 2000) やナス科ペチュニアの *Anthocyanin I* 遺伝子 (Spelt, *et al.*, 2002;

Quattrocchio, *et al.*, 2006) はそれぞれ液胞膜局在型 Na/H アンチポーターおよび bHLH 型の転写因子をコードしており、花卉表皮細胞における液胞 pH の上昇に参与している。これらの機能欠損株では液胞 pH が低くなって花色が青/紫系色から赤/マゼンダ系色へシフトする。最終的にアントシアニンが植物種特異的に配糖化およびアシル化などの修飾を受けて後、最終的に液胞に蓄積するため、液胞の pH は花色の重要な決定因子である。

また、アントシアニンの多様な色調は B 環(ベンゼン環)の水酸基またはメキシ基の位置や数によっても大きく影響を受ける。B 環の水酸基が一つのペラルゴニジンは橙色、二つのシアニジンは赤色、三つのデルフィニジンは紫色を呈する(図 1-1)。フラボノイド 3' 位水酸化酵素 (F3'H) は B 環を 1 箇所水酸化し、シアニジン骨格のフラボノイドを形成することで花色を赤色へシフトさせる。また、フラボノイド 3',5' 水酸化酵素 (F3',5'H) は B 環を 2 箇所水酸化し、デルフィニジン骨格のフラボノイドを形成し、花色を紫色へシフトさせる。さらに、アントシアニン骨格合成後も、配糖化やアシル化により高度に修飾されることによって色調変化を伴う。これはアントシアニンのアグリコンと糖やアシル基との分子内および分子間会合による複合体化によって説明される。さらに、フラボンなどの補助色素(コピグメント)との異分子間会合(コピグメンテーション)は花色の青色効果 (Bluing effect) に影響を与える。ツククサ科ツククサ、ユキノシタ科アジサイやキク科ヤグルマギクの花弁やガク片は空色(青色)を呈するが、これらのアントシアニン色素は金属イオンとキレートを形成しており、メタロアントシアニンと呼ばれる(安田, 1993; 山村と長谷川, 2005)。この金属錯体形成は一般的に色調を青色方向へシフトさせることが古くから知られており、近年、結晶解析によっていくつかの複雑なメタロアントシアニンの構造が解かれている(Kondo, *et al.*, 1992; Shiono, *et al.*, 2005)。このようにアントシアニンは幅広い範囲の色調を花卉に付与するため、花卉産業において極めて重要な形質である。

カルコンとオーロンは共に黄色フラボノイドとして知られている(Bohm, 1989)。キク科ベニバナやナデシコ科カーネーションに代表される薄い黄色花はカルコンが主要色素である。カルコンは非常に不安定な色素であり、中性付近の pH で無色のフラバノンに非酵素的に代謝される。この反応はカルコン異性化酵素 (Chalcone isomerase; CHI) によっても触媒される。一方、オーロンは鮮やかな黄色を呈するフラボノイドであり、ゴマノハグサ科キンギョソウやキク科ダリアの黄色花弁の主要色素である(Bate-Smith and Geissman, 1951)。

フラボンやフラボノールは無色〜非常に薄い黄色を呈するフラボノイドであり、植物界に広く存在している。白〜クリーム(象牙)色の花弁に含まれることが多く、主に花卉細胞に共存するアントシアニンやオーロンのコピグメントとして花色発現に参与していることが知られている。フラボノイドは植物組織内においては糖や有機酸などの修飾を受けて安定化し、最終的には液胞に蓄積する。

フラボノイドは花色発現による受粉媒介者の誘因以外にも、紫外線による DNA 損傷の保護や、

防御反応時のファイトアレキシン作用、オーキシシン輸送制御、根粒菌相互作用、種子休眠および種子安定化などの生理機能があり、発現する領域やアグリコンの修飾によりその役割は多様である(Buchanan, *et al.*, 2000)。また、フラボノイド化合物には生体内酸化ストレスに体する抗酸化性、抗がん性、抗変異性、血圧降下作用、肝機能障害軽減効果、視覚改善、抗糖尿病効果、女性ホルモン様活性などの人類にとって有用な生理活性が見いだされており(大庭ら、2000)、例えばブドウやブルーベリーなどのアントシアニン、ダイズのイソフラボン、タマネギのケルセチン、ソバのルチン、アシタバのカルコン、チャのカテキンは天然の食用色素、化粧品素材や健康食品素材としても注目されており、一部は既に商品化されている。

1-2 フラボノイド生合成経路と分子育種

これまでの遺伝学および生化学的研究によりフラボノイド骨格の基本代謝経路およびその生合成に関わる酵素遺伝子についてはほとんど同定済みである(Holton and Cornish, 1995; Koes, *et al.*, 2005)。その結果、高等植物において基本代謝経路は概ね保存されていることが明らかとなっている(図 1-1)(足立と吉玉、2004)。

フラボノイド生合成経路はフェニルアラニンから派生し、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(Phenylalanin ammonia lyase; PAL)、桂皮酸4位水酸化酵素(cinnamate 4-hydroxylase; C4H)、4-クマル酸 CoA リガーゼ(4-coumarate: CoA ligase; 4CL)の酵素によって与えられる4-クマロイル CoA にカルコン合成酵素 Chalcone synthase; CHS)が3分子のマロニル CoA を縮合して最初のフラボノイド(C6-C3-C6)であるカルコノナリンゲン(カルコン)が生成される。4-クマロイル CoA まではフェニルプロパノイド生合成経路と呼ばれ、フラボノイドに限らずリグニン、リグナンおよびクロロゲン酸経路へと代謝される植物の主要な二次代謝経路である。

カルコンは薄い黄色を帯びたフラボノイドであるが、CHS と相互作用するカルコン異性化酵素(Chalcone isomerase; CHI)によってナリンゲニンに代表される無色のフラバノンに代謝される。ナリンゲニンはチトクローム P450 酵素であるフラボン合成酵素(Flavone synthase; FNS/CYP93B)やイソフラボン合成酵素(Isoflavone synthase; IFS/CYP93C)によってそれぞれフラボンとイソフラボンに代謝される。それとは別にフラバノン 3 位水酸化酵素(Flavanone 3-hydroxylase; F3H)によってジヒドロフラボノールであるジヒドロケンフェロールに代謝される。ジヒドロケンフェロールはフラボノール合成酵素(Flavonol synthase; FLS)によってケンフェロールと呼ばれるフラボノールへ代謝される。また、ジヒドロケンフェロールは P450 酵素であるフラボノイド3'位水酸化酵素(Flavonoid 3'-hydroxylase; F3'H/CYP75B)またはフラボノイド3', 5'位水酸化酵素(Flavonoid 3', 5'-hydroxylase; F3', 5'H/CYP75A)によってB環が水酸化され、ジヒドロケルセチンまたはジヒドロリセチンへ代謝される。次に、ジヒドロケンフェロール、ジヒドロケルセチンおよびジヒドロリセチンはジヒドロフラボノール4位還元酵素

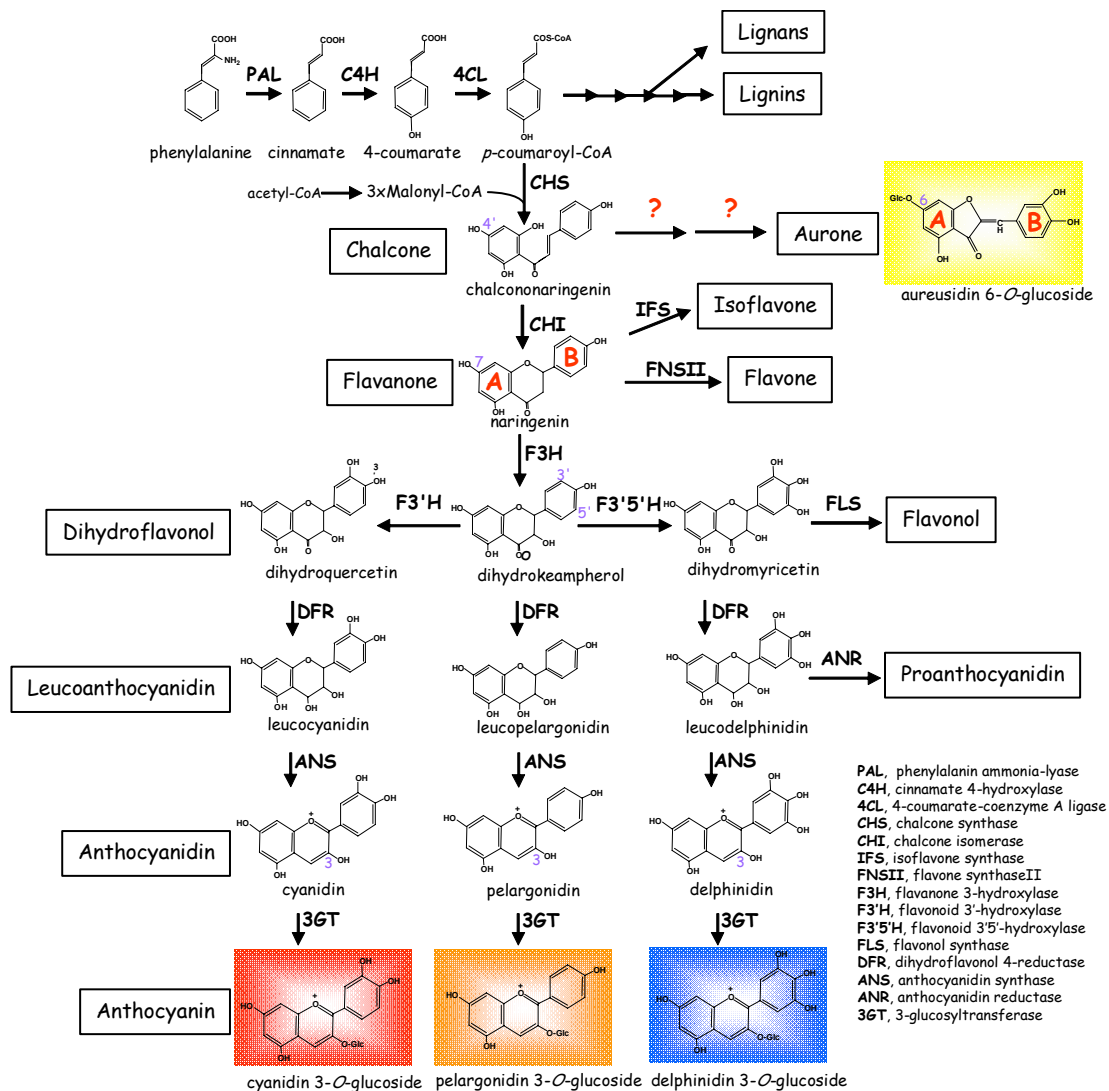


図1-1 フラボノイド生合成経路

フェニルアラニンから始まるフラボノイド生合成経路。赤、橙、青紫色のアントシアニンに至る経路、および代謝を触媒する酵素については単離されている。黄色フラボノイドであるオーロンの生合成経路と赤・橙・青紫色のアントシアニン生合成経路は初期フラボノイドであるカルコンから分岐する。

(Dihydroflavonol 4-reductase; DFR) によってロイコアントシアニンであるロイコペラルゴニジン、ロイコシアニンおよびロイコデルフィニジンに還元される。この還元反応においては、種特異的に DFR の基質特異性が異なることが知られている。引き続きアントシアニン合成酵素 (Anthocyanidin synthase; ANS) によってペラルゴニジン (橙)、シアニン (赤) およびデルフィニジン (紫) に代謝される。これらのアントシアニンは3位の水酸基がフラボノイド3位配糖化酵素 (UDP-glucose: Flavonoid 3-glucosyltransferase; UF3GT) によって配糖化されることでアントシアニン色素となる。一方、シロイヌナズナの *banyuls* 変異体の原因遺伝子として単離されたアントシアニン還元酵素 (Anthocyanidin reductase; ANR) によってアントシアニンは

重合タンニン合成経路に分岐することも知られている(Xie, *et al.*, 2003)。3位を配糖化されたアントシアニン色素までの経路は高等植物に高く保存されていることが知られている。現在ではアントシアニン骨格形成以降の種特異的な修飾に関わる酵素遺伝子の単離が精力的に進められている(Fukuchi-Mizutani, *et al.*, 2003; Morita, *et al.*, 2005; Ogata, *et al.*, 2005)。

単一の種で多様な花色をもつ種は稀であるが、これは花色として発現する色素の生合成が遺伝的に規定されていることによる。例えばバラ科バラ (*Rosa hybrida*) やナデシコ科カーネーション (*Dianthus caryophyllus*) においては青いアントシアニン色素であるデルフィニジンを作る $F3',5'H$ を遺伝的に欠損しているためアントシアニンによる花色発現はシアニジン系による赤色に限られる。交配育種では、利用できる遺伝子資源が交配可能な近縁種に限定されているため、交配によってこれらの植物種においてデルフィニジンを作らせることは不可能であった。近年の遺伝子工学技術の発展により、目的の色素を合成する酵素遺伝子のある植物から単離し、別の種で発現させることにより、花色を改変する分子育種が可能となった。分子育種は植物種の遺伝的背景に依存しない点と、目的の形質のみを改変する点において従来育種法とは決定的に異なる (Winkel-Shirley, 2001; Ray, *et al.*, 2003; Deavours and Dixon, 2005; Xie, *et al.*, 2006)。スマレ科パンジー (*Viola tricolor*)由来の $F3',5'H$ 遺伝子を異所発現することでデルフィニジンを生産し、花卉が赤色から青紫色に変化した遺伝子組換えカーネーション (商品名:ムーンダスト、サントリー(株))は既に国内外の市場に流通している (Tanaka, *et al.* 1998) (図 1-2)。また、同様に $F3',5'H$ 遺伝子を導入した青いバラの報告もある。さらにアントシアニン生合成経路の転写調節因子を構成的に発現させることで、色素合成量を強化することも可能であり、遺伝子工学技術が花色改変に非常に強力な育種ツールであることは認知されつつある (Lloyd, *et al.*, 1992)。花色ではないが、カロテノイド系色素であるβカロテン(プロビタミンA)を遺伝子組換え技術で生産させたゴールデンライスと呼ばれる遺伝子組み換えイネが作出されており、その種子は黄色を呈する (Ye, *et al.*, 2000; Paine, *et al.*, 2005)。

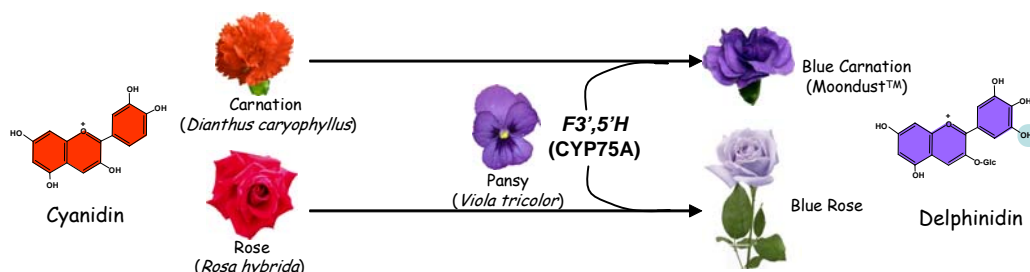


図1-2 青い花の分子育種

ナデシコ科カーネーションやバラ科バラは遺伝的に $F3',5'H$ を持たないため、B環に三つの水酸基を持つデルフィニジンタイプのアントシアニンを合成できない。スマレ科パンジーはデルフィニジンタイプのアントシアニンを持つ。パンジーの $F3',5'H$ 遺伝子を単離し、カーネーションやバラで構成発現させた。その結果、本来持っていないデルフィニジン骨格のアントシアニンを合成し、青紫の花色を呈した(注: 赤色カーネーション、赤色バラおよび青色パンジーは実際に実験に使われた品種とは異なる)。

1-3 オーロンとオーロンを蓄積する植物

自然界で最も多い花色は白色(32.0%)で、次に黄色(30.2%)が多い。青／紫色(23.2%)が続き、赤／ピンク系はさらに少ない。従って、我々が日常見かける赤系の花の多くは交配育種によって人為的に生み出された花色である。黄色を呈する植物色素としてはヒマワリやトマトの花弁に含まれるカロテノイド系色素と、フラボノイド系のカルコンおよびオーロンに分類される。カロテノイドの吸収極大は $\lambda_{\max}450\text{--}490\text{nm}$ であり、概して黄色～橙色を呈する。カルコンとオーロンはそれぞれ $\lambda_{\max}365\text{--}385\text{nm}$ と $\lambda_{\max}390\text{--}430\text{nm}$ 吸収極大を持っている。オーロン(Aurone)はラテン語の黄金という意味の aurum に由来しており、非常に明るい黄色を呈するフラボノイド色素である (Bate-Smith and Geissman, 1951)。最初のオーロンは 1942 年にキク科コレオプシス (*Coreopsis grandiflora*) から単離された (Bohm, 1989)。オーロンは UV 光に励起され、535nm 付近の光を発する蛍光特性を有しており、昆虫などの花粉媒介者の誘引に大きく影響を与えていると考えられる (Bohm, 1989)。このオーロンに由来する黄緑色の蛍光は蛍光顕微鏡下で容易に観察することができ、オーロンを蓄積する花が持つ特有の鮮やかなレモン色の発現に寄与している (図 1-3)。また、オーロンはフラボンの一種であるアピゲニン (Apigenin) とのコピグメント効果により 300-500nm の幅広い吸収波長を示す (Asen, *et al.*, 1972)。

オーロンは A 環と B 環の間に五員環を含む 2-benzylidenecoumaranone ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_2$) と呼ばれる特徴的な構造を持つフラボノイド色素である (図 1-4)。水酸基、メキシル基の数および位置によるアグリコン構造の違いによってオーレウシジン (aureusidin: 4,6,3',4'-tetrahydroxyaurone)、ブラクテアチン (bracteatin: 4,6,3',4',5'-pentahydroxyaurone)、スルフレチン (sulfretin: 6,3',4'-trihydroxyaurone)、トリヒドロキシオーロン (4,6,4'-trihydroxyaurone)、マリチメチン (maritimetin: 6,7,3',4'-tetrahydroxyaurone)、レンガシン (rengasin: 6,3',4'-trihydroxy-4-methoxyaurone)、ヒスピドール (hispidol: 6,4'-dihydroxyaurone)、およびレプトシジン (leptosidin: 6,3',4'-trihydroxy-7-methoxyaurone) などに分類される (Harborne and Baxter, 1999)。この他にもメチレンジオキシブリッジ構造を持つものや、プレニル基を持つ特殊なオーロンも見いだされている (図 1-4)。

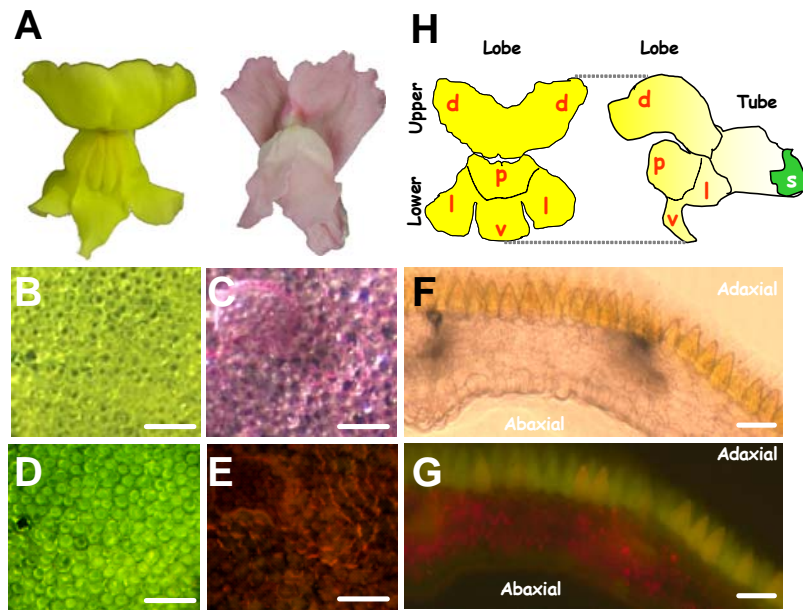


図1-3 オーロンによる蛍光特性

(A)オーロン蓄積する黄色キンギョソウ(左、スナップイエロー品種)とアントシアニン色素によるピンク系キンギョソウ(右、メリーランドピンク品種)。(B)スナップイエロー品種、および(C)メリーランドピンク品種の花弁表皮細胞。(D)スナップイエロー品種、および(E)メリーランドピンク品種の花弁表皮細胞の蛍光観察像。(F)スナップイエロー品種の花弁断面図の明視野像、および(G)蛍光観察像。スナップイエロー品種ではオーロンとその蛍光は花弁表皮細胞の向軸側に見られる。サイズバー:100 μ m。(H)キンギョソウ花弁構造。(左)正面から見て縦方向の中心線に対して対称形構造を有する。唇形花冠(Lobe)は上唇二枚の背側花弁(Dorsal:d)と下唇の二枚の側方花弁(Lateral:l)とそれに挟まれる一枚の腹側花弁(ventral:v)の計5枚の花弁で構成される(Coen, 1999)。生殖器官である雄蕊および雌蕊は上下唇に挟まれた空間の内部に形成される。(p)パレイトと呼ばれる中央の突出した部分。(右)側面から見た図。呈色するのは花冠が最も顕著で、花筒(tube)は一般に色が薄い。(s)ガク片。

オーロンを蓄積する植物としては鮮明な黄色い花を形成するゴマノハグサ科キンギョソウ(*Antirrhinum majus*)がよく知られているが、その主たる色素はオーレウシジン6位配糖体である(図1-5)。キンギョソウ以外にもゴマノハグサ科リナリア(*Linaria bipartite*)、キク科ダリア(*Dahlia variabilis*)、キク科コレオプシス(*Coreopsis grandiflora*)、キク科コスモス(*Cosmos sulphureus*)、キク科ビデンス(*Bidens pilosa*)、マメ科ダイズ(*Glycine max*)、カタバミ科オキザリス(*Oxalis cernua*)、イソマツ科スターチス(*Limonium sinuatum*)などがオーロンを蓄積する植物として知られている(図1-5)(Harborne and Baxter, 1999)。キク科コスモス(*Cosmos bipinnatus*)の野生種はアントシアニン系色素によりピンク色を呈するが、玉川大学で30年間かけて育種された黄色コスモス(品種名:イエローガーデン; 農林水産省品種登録 第1281号、販売 サカタのタネ)はカルコンの一種であるブテイン配糖体とオーロンの一種であるスルフレチン配糖体が蓄積しており、鮮やかな黄色を呈する(Shimokoriyama and Hattori, 1953; 斉藤, 1990; 稲津, 1993)。興味深いことに、ゼニゴケ(*Marchantia berteroana*)やヒメジャゴケ(*Conocephalum*

supradecompositum) などの蕨苔類においてもオーロンは蓄積しており (Harborne and Baxter, 1999)、オーロンは植物進化の過程で花が出現する以前に存在していたことが示唆されるが、花色以外の生理的な役割は定かでない。オーロンやカルコンなどのフラボノイドは UV 光を吸収する特徴を有するため、植物が陸上に進出した際に UV による DNA 損傷を防ぐ役割を果たしていたのではないかと推測されている。

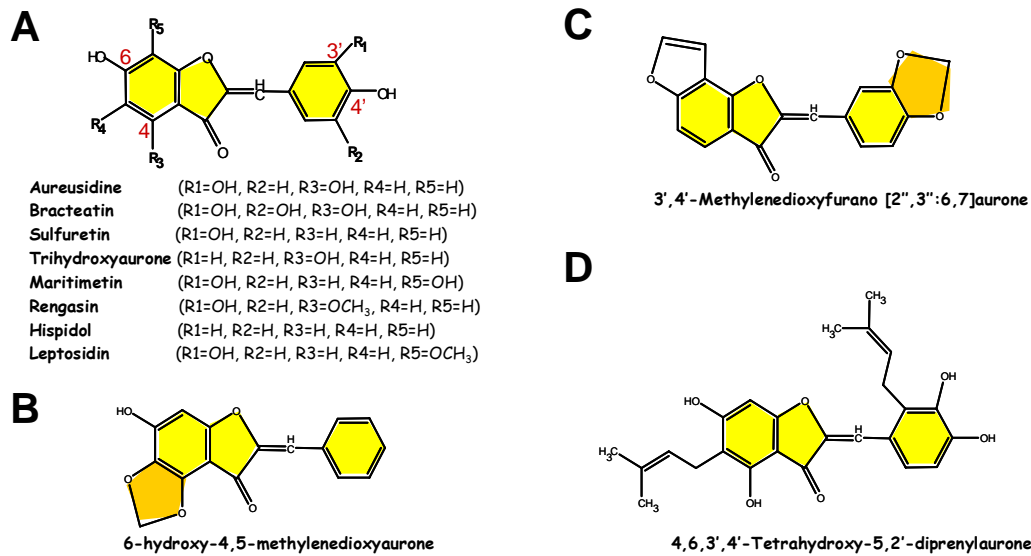


図1-4 オーロンの化学構造

オーロンはC6-C3-C6構造を持つ鮮やかな黄色フラボノイド色素である。中央に特徴的な5因環を持つ。水酸基の位置および数によりアグリコンに名前が付けられている(A)。3'、4'および6位は水酸基を持ち、一般的に、アグリコン構造を問わず6位の水酸基が配糖化されて蓄積している。(B,C)メチレンジオキシブリッジ構造(橙)や(D)プレニル基を持つユニークな構造のオーロンも見つかっている。

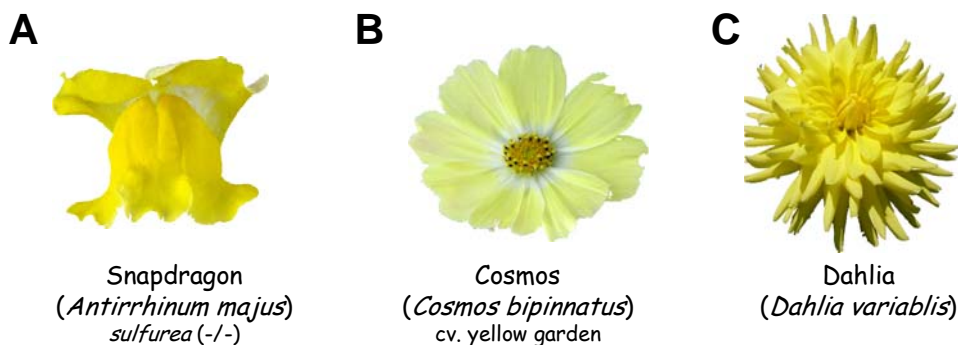


図1-5 オーロンによる黄色花

(A)オーロンによる黄色花の代表であるゴマノハグサ科キンギョソウ。花卉におけるオーロン発現には劣性 *sulf* 変異が必要であることが知られている。(B)玉川大学で30年間にも渡る交配育種により開発された黄色コスモスのイエローガーデン品種。一般的に知られている橙～山吹色を呈する黄花コスモス(*C. sulfureus*)とは別種である。(C)キク科の黄色ダリア。

ほとんどのアントシアニン色素はその3位の水酸基が配糖化されていることが知られているが、オーロンの場合はアグリコン構造に関わらず6位の水酸基が配糖化されているものが極めて多い (Harborne and Baxter, 1999; Zhang, *et al.*, 2003)。例えば黄色花で知られるコレオプシ

スはその花卉にレプトシン(leptosin: maritimetin 7-methyl ether (leptosidin) 6-*O*-glucoside)と呼ばれるオーロン6位配糖体が蓄積している。またダイズにおいては、ヒスピドール6位配糖体(6,4'-dihydroxyaurone (hispidol) 6-*O*-glucoside)と呼ばれるオーロン6位配糖体が存在する。さらに、コスモスにおいては、スルフレイン(sulfurein: 6,3',4'-trihydroxyaurone (sulfuretin) 6-*O*-glucoside)と呼ばれるオーロン6位配糖体が存在する(稲津、1993)。ほとんどのオーロンはグルコースの6位配糖体(Glucoside)であるが、苔類のオーロンはグルクロン酸の6位配糖体(Glucuronoside)であり、また一部の高等植物においては6位ラムノース配糖体(Rhamnoside)が存在することが知られている(Harborne and Baxter)。この6位配糖化はオーロンの水溶性および安定性に寄与していると考えられるが、その配糖化機構については不明である。

スレフレチンは元々キク科コスモスから単離されたオーロンであるが、近年アルドースレダクターゼの阻害活性が見いだされた(Martin-Calero, *et al.*, 1996)。アルドースレダクターゼ阻害剤は組織内のソルビトール蓄積を抑制することから糖尿病性の神経症、網膜症、腎症などの糖尿病合併症の予防に有効とされており、合成品が販売されている。B 環にメキシル基を持つオーロンはハスモヨトウ幼虫を用いた実験により昆虫の摂食阻害活性があることが知られている。また、抗がん作用やラジカル消去活性についても確認されている(Lawrence, *et al.*, 2003; Venkateswarlu, *et al.*, 2004)。

1-4 キンギョソウの花色における遺伝学研究

キンギョソウ (*Antirrhinum majus*, $2n=16$)は南ヨーロッパおよび北アフリカの地中海沿岸地方原産のゴマノハグサ科植物であり、ポルトガル、スペイン、フランス、イタリアにかけて 20 種もの野生種が分布している(Sutton, 1988)。野生種の花色はアントシアニンによるマゼンダ色とオーロンによる黄色に大別される(Whibley, *et al.*, 2006)。園芸品種のキンギョソウの花色は白、クリーム、黄、赤、桃、橙、紫色と多岐に渡るが、バラやカーネーションと同様に遺伝的にデルフィニジンタイプのアントシアニンがなく、青紫系の花色は存在しない(土岐、1990)。しかし、近縁種である *A. cornutum* や *A. nuttalianum* にデルフィニジンタイプのアントシアニンが蓄積することが知られており、交配育種による青色品種の開発が進められている。

キンギョソウの花序は総状花序(無限花序)であり、その花は5枚の花弁から構成される線対称形の合弁花であり、背側の2枚(上唇: Dorsals)と腹側の3枚(下唇: Laterals & Ventral)に分かれた唇形花冠になる(図 1-3)(小林、2001; Luo, *et al.*, 1999)。下唇の上部はパレイト(またはフェイス)と呼ばれる前方に突出した部分がある。その多様な花色発現から伺えるように虫媒(主にマルハナバチ)により受精が行われる(Niovi-Jones and Reithel, 2001)。下唇の3枚の花弁の真ん中の花弁(Ventral)は媒介者であるハチに着地する場を与える(Coen, 1999)。花の姿が金魚に見えることから和名が付けられたが、英名はスナップドラゴン(竜)と呼ばれる。日本に

においては半耐寒生一年草に分類されるが、園芸品種は宿根して年を越すことも多い。

キンギョソウは育成が容易であることに加え、低温誘導性の自立性トランスポゾン Tam3 による突然変異体および回復体が得られることから遺伝学研究のモデル植物としての一面を持つ (Coen, *et al.*, 1986; Luo, *et al.*, 1991; Kishima, *et al.*, 1999; Schwarz-Sommer, *et al.*, 2003)。Tam3 は低温 (15°C) で著しく活性化し、高温 (25°C) では殆ど転移しないという特徴を有している。1980 年代後半から 1990 年代初頭にかけて精力的に行われた花器官形態形成の分子機構の研究においてはアブラナ科シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) と共に ABC 遺伝モデルの確立に大きく貢献した (Coen and Meyerowitz, 1991; Bradley, *et al.*, 1993; Egea-Cortines, *et al.*, 1999; Coen, 1999; Keck, *et al.*, 2003)。しかしながらキンギョソウは現在においても形質転換系が確立されておらず、*Agrobacterium rhizogenes* を用いた毛状根による形質転換の報告があるものの (Minlong, *et al.*, 2000)、シロイヌナズナやイネなどのモデル植物と比べ、汎用的な技術まで至っていない。しかしながら花卉が白色のシロイヌナズナや穎花を形成するイネでは解析が困難だった花色突然変異体によるフラボノイド生合成経路に関する研究についてキンギョソウは先駆的な役割を果たしてきた (Almeida, *et al.*, 1989; Martin, *et al.*, 1991; Martin and Gerats, 1993)。

これまでの遺伝学研究によりアントシアニンおよびオーロン生合成に関わる遺伝子および遺伝子座がいくつか同定されている (Schwinn, *et al.*, 2006) (図 1-6)。アントシアニン色素の発現が減少または欠失する表現型を示す劣性突然変異体として単離された *nivea* (*niv*)、*incolorata* (*inc*)、*pallida* (*pal*)、*candica* (*candi*) の原因遺伝子はそれぞれ CHS, F3H, DFR, ANS をコードしていた (Martin, *et al.*, 1985)。また、花卉の色調が変化する突然変異体 *enosinea* (*eos*) の原因遺伝子は F3'H をコードしていた。またフラボノイド生合成経路の構造遺伝子の発現を調節する転写因子についても同定されており、*Delilla* (*Del*) 遺伝子はアントシアニン生合成経路を正に制御する bHLH 型の転写因子をコードしており、その欠損変異体 *del* では花冠の花色発現には影響を与えないが、花筒が白くなる (Goodrich, *et al.*, 1992)。*del* 変異体は *F3H*, *DFR*, *ANS* および *UF3GT* 遺伝子の発現が誘導できないためにアントシアニンが合成できず、その結果、花筒が白色化することが明らかとなった (Goodrich, *et al.*, 1992)。もう一つのアントシアニン生合成経路を正に制御する bHLH 型の転写因子としては *Mutabilis* (*Mut*) が知られている。アントシアニン生合成経路を正に制御する Myb 型の転写因子として *Rosea1* (*Ros1*)、*Rosea2* (*Ros2*) および *Venosa* (*Ve*) が同定されている (Schwinn, *et al.*, 2006)。*Ros1* 遺伝子と *Ros2* 遺伝子はゲノム上にタンデムに配置されおり、属あるいは種特異的な遺伝子重複により生じたと考えられる。両遺伝子は発現領域や標的遺伝子へ活性化の程度の差はあれ、基本的には *F3H*, *F3'H*, *DFR*, *ANS*, *UF3GT* 遺伝子の発現誘導を介してアントシアニン生合成を調節している。また、*Ve* は花卉の葉脈上部の表皮細胞においてのみアントシアニン生合成を調節するユニ

一クな myb 型転写因子である。Ros1, Ros2 および Ve はペチュニアの *Anthocyanin2* (An2)、シロイヌナズナの *Production of anthocyanin pigment1* (PAP1) および PAP2 あるいは *Transparent Testa2* (TT2) のカウンターパートにあたる (Quattrocchio, *et al.*, 1999; Borevitz, *et al.*, 2000; Nesi, *et al.*, 2001)。また、アントシアニン生合成を負に制御する *Eluta* (El) 遺伝子座が同定されているが原因遺伝子の単離には至っていない。

オーロン生合成および黄色発現においては *sulfurea* (*sulf*) 遺伝子座が重要な役割を果たすことが知られている (Spribille and Forkmann, 1982; 土岐, 1990; Whibley, *et al.*, 2006)。優性 *Sulf* 遺伝子座を持つ場合、オーロンの蓄積がパレイト部分にのみに限られるが、劣性 *sulf* の場合にのみオーロンが花卉全体に蓄積することが知られている。従って優性 *Sulf* 遺伝子座はオーロン生合成を負に制御していると考えられるが、原因遺伝子は単離されていない。単色の黄色を呈するためには劣性ホモの *sulf* によるオーロン生合成の脱抑制に加え、劣性 *inc* や劣性 *ros* のようなアントシアニン生合成が欠損した変異が必要であることが知られている。劣性 *niv* / *sulf* の花はオーロンができず、花卉は白色を呈する。また、劣性 *inc* / *sulf* ではオーロンが生成することから、オーロンがカルコンまたはその代謝物から生成されることが示唆されていた。さらに、優性 *Inc* 劣性ホモ *sulf* の場合はアントシアニンとオーロンが同じ細胞で合成され、その結果、橙色の花色となる (Spribille and Forkmann, 1982; Forkmann and Stotz, 1981)。興味深いことに市場に出回っている橙色の品種は意図的に交配育種によって開発されたもので、橙色の形質は自然界に存在するキンギョソウ野生種は存在しない。これは自然界において黄色や赤色の個体に比べ、橙色の個体が受粉媒介者の誘因などの環境適応力において劣っていると推察されている (Whibley, *et al.*, 2006)。

また劣性 *violacea* 変異体はパレイト部分のオーロンによる黄色発現が認められないため、この領域でのオーロン生合成を正に制御すると考えられている (Stubbe, 1974)。近年、劣性ホモ *sulf* / *inc* の遺伝背景の黄色花卉を形成する JI57 純系系統に ethylmethanesulfonate (EMS) による突然変異誘発処理が施され、その結果、花色がクリーム色を呈する CFR1011 系統が単離された (Davies, *et al.*, 2006)。CFR1011 系統は劣性一遺伝子変異であり、オーロンがほとんど蓄積せずフラボンが主色素になった為にクリーム色を呈することが示された (Davies, *et al.*, 2006)。上記の *violacea* および CFR1011 系統の原因遺伝子はいずれもオーロン生合成に正に関わる因子であると考えられるが、両原因遺伝子ともに未同定である。以上のように、オーロンによる黄色発現は極めて重要な形質であるにも関わらずオーロン生合成に司る構造遺伝子についての知見は得られていなかった。

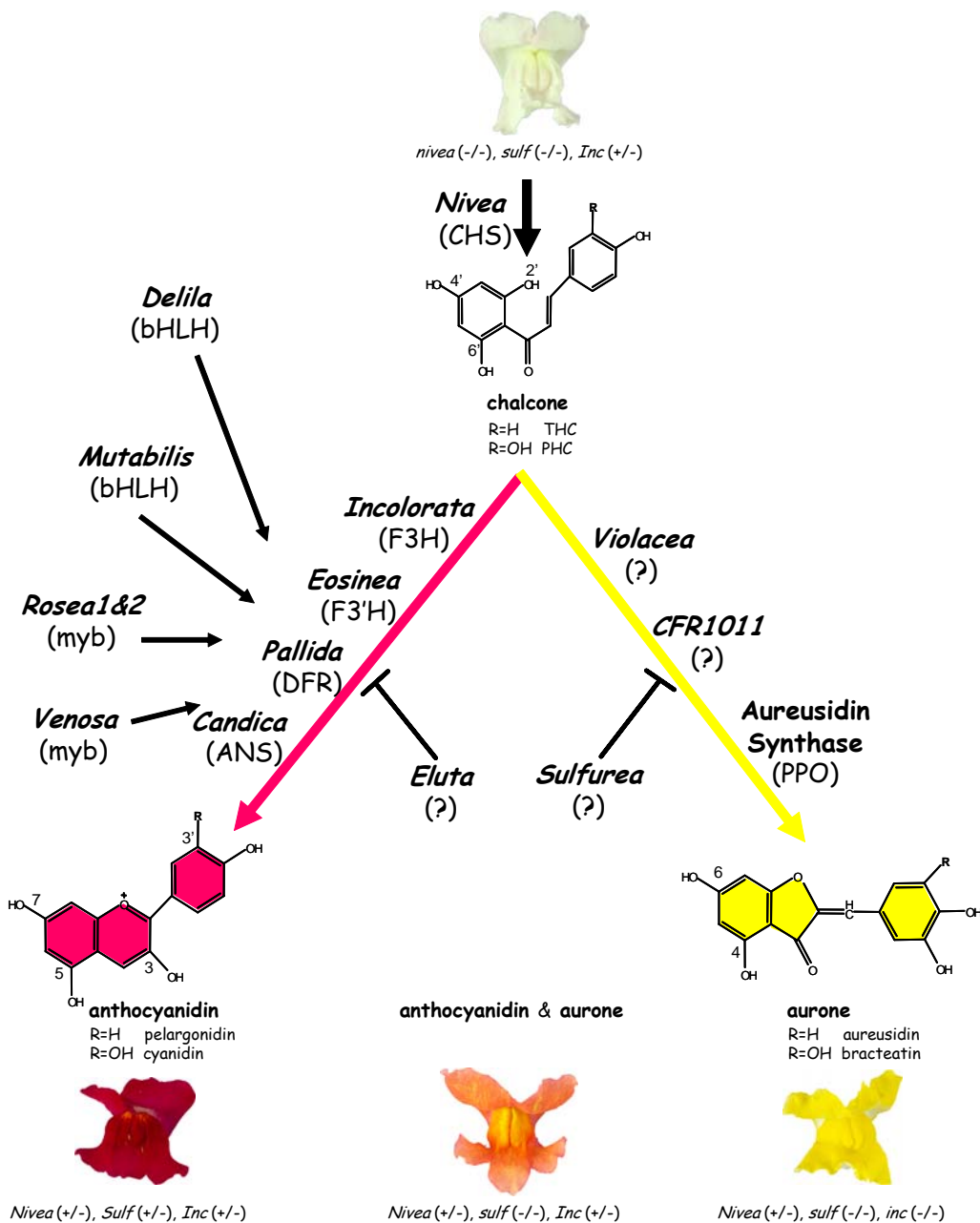


図1-6 キンギョソウのフラボノイド生合成経路

遺伝学的に同定された花色に関わる遺伝子座の多くはフラボノイド代謝経路に関わる構造遺伝子または正の調節因子であった(括弧内は遺伝子産物)。アントシアニンおよびオーロン生合成経路を不に制御する*Eluta*および*Sulfurea*遺伝子座は未同定である。シアニジンタイプのアントシアニンによりマゼンダ色を呈する系統(左)やオーロンによる黄色の系統(右)の他に中間的な表現型を示す橙色の系統がある。この系統ではオーロンとアントシアニンの両色素が花卉で蓄積している。従って、黄色単色発現には劣性*sulf*の他に劣性*inc*のようなアントシアニン生合成を抑制する変異が必要である。また、オーロンおよびアントシアニンの蓄積には*Nivea* (AmCHS1)が必要であり、劣性*nivea*変異体においては初期フラボノイドであるカルコンが生成できず、白色の花弁を呈する(上)。

1-5 オーロン合成酵素遺伝子の解析

オーロン生合成に関しては30年以上前にダイズの芽生えを用いた実験により H_2O_2 依存的な Two-step 経路が提唱されていた (Rathmell and Bendall, 1972)。カルコンが H_2O_2 依存型ペルオキシダーゼによって酸化され、2-(α -ヒドロキシベンジル)-クマラノンになり、引き続いて酵素的または非酵素的に脱水によりオーロンが生成するという経路である。しかしながらその後、本経路によるオーロン生合成についての研究は報告されなかった。

近年、黄色キンギョソウの花弁 32kg からカルコンを基質にオーレウシジンを生成する活性有するオーロン合成酵素 (*Antirrhinum majus* Aureusidin synthase1: AmAS1) が単一タンパク質として精製された (Nakayama, *et al.*, 2000)。興味深いことに AmAS1 は単独でカルコンの水酸化と酸化的な五員環形成反応を触媒することでオーロンを生成する活性を有していた。AmAS1 は以下の式で表される反応を触媒し、過去に提唱されていた two-step 経路とは異なる反応を経てオーロン合成が行われていることが明らかとなった。

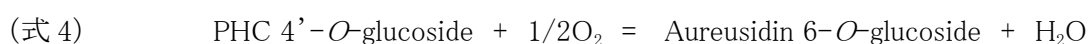
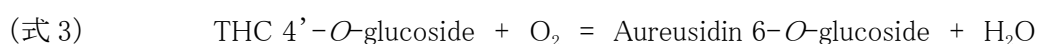


花弁から精製された AmAS1 は 39kDa の単量体の糖タンパク質であり、その部分アミノ酸配列を基に AmAS1 をコードする遺伝子が同定された。AmAS1 遺伝子は 1686bp からなるポリフェノール酸化酵素 (PPO) ホモログをコードしており、その推定分子量は 64kDa であった。植物の PPO は通常、前駆タンパク質として発現し、トランジットシグナル配列を含む約 10kDa の N 末と機能未知の約 15kDa の C 末のプロセッシングを受けて成熟タンパク質となることが知られている。従って精製された AmAS1 タンパク質は N 末および C 末がプロセッシングされた成熟型 AmAS1 タンパク質であった。AmAS1 内には 2 カ所の推定 Cu 結合領域が見つかり、原子吸光度計により精製 AmAS1 タンパク質から Cu が検出された。AmAS1 は花弁特異的に発現し、その花弁生長に伴う遺伝子発現パターンは花弁内のオーロン合成活性およびオーロン蓄積量と一致した (Sato, *et al.*, 2001)。従って、生長段階でのオーロン合成は AmAS1 遺伝子の転写レベルで調節されていると考えられる。AmAS1 の遺伝子発現はオーロン生合成の負の調節因子である優性 *Sulf* や劣性 *violacea* および CFR1011 変異によって影響を受けないことから、少なくともこれらの遺伝子座は AmAS1 の遺伝子発現を介してオーロン合成を制御していないことが示唆された (Davies, *et al.*, 2006)。

一般的に H_2O_2 は PPO による酸化反応を活性化することが知られているが、AmAS1 によるテトラヒドロキシカルコン (THC) からオーレウシジンを生成する反応においても同様に H_2O_2 によって活性化されることが分かった (Nakayama, *et al.*, 2000; 2001)。興味深いことに、AmAS1 は

ペンタヒドロキシカルコン (PHC) をも基質とし、オーレウシジンおよびブラクテアチン (Bracteatin) を 6:1 の割合で生成する活性を有していた。この反応は THC と比較して 22 倍もの比活性を示し、 H_2O_2 により阻害されることが分かった。また、AmAS1 の THC に体する至適 pH は 5.4 と顕著に低かった。

さらに以下の式で示すように、AmAS1 は THC 4' 位配糖体 (THC 4' - β -D-glucoside) および PHC 4' 位配糖体 (PHC 4' - β -D-glucoside) を基質として、THC と比べてそれぞれ 2.2 倍および 25 倍の比活性でオーロン 6 位配糖体を生成する活性を有することが明らかとなった。PHC 4' 位配糖体を基質にした場合は PHC を基質にした場合と同様に 6:1 の割合でオーレウシジン 6 位配糖体とブラクテアチン 6 位配糖体が生成された。



以上のように AmAS1 の同定は花色発現という PPO の生理的役割を初めて明らかにした画期的なものであると同時に、オーロンによる黄色花の分子育種の為の重要な分子ツールを提供した。

1-6 本研究の目的

先述のようにアントシアニンの生合成経路はよく研究されており、赤、橙、紫色を決定するアントシアニン色素の生成経路および代謝酵素については同定されている (Mol, *et al.*, 1999; Rausher, 2005)。今日では、これらの酵素遺伝子を利用して花色を人為的に制御することが可能となっている (Meyer, *et al.*, 1987; Tanaka, *et al.*, 2005)。

黄色は重要な花卉形質であるにも関わらずフクロウソウ科ゼラニウム (*Pelargonium graveolens*)、サクラソウ科シクラメン (*Cyclamen persicum*)、イワタバコ科セントポーリア (*Saintpaulia ionantha*)、マメ科スイートピー (*Lathyrus odoratus*)、ヒルガオ科アサガオ (*Ipomoea nil*) などの主要な園芸植物には黄色花がないために黄色品種の開発が切望されている (図 1-7)。セントポーリア (アフリカスミレ) において黄色花は夢の色として種苗会社はもとより熱心な個人育種家によって長年交配育種による開発が進められているが未だ夢の色である。ツバキ科ツバキも長年黄色花がなかったが、中国および東南アジアにおいて見いだされた黄色の原種 (*Camellia chrysantha*, *Camellia flava*) との交配育種によって待望の黄色品種が開発された (足立, 2004)。しかしながら交配育種による品種開発は目的形質を持つ遺伝資源が交配可能な場合に限られる。これまでに遺伝子組換え技術によってナス科ペチュニア (*Petunia hybrida*) にカルコンを蓄積させた例があるが、それは蕾みにおいて薄い黄色を呈したが開花した花卉はほとんど白色に終わっ

ている (Davies, *et al.*, 1998)。

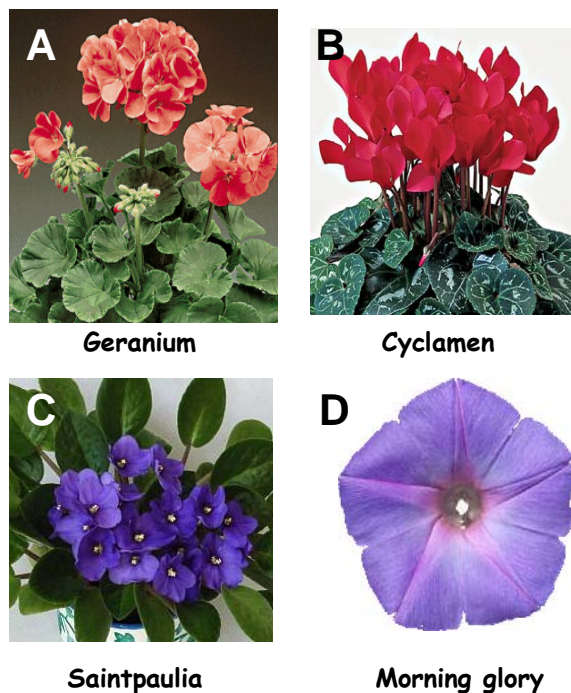


図1-7 黄色品種のない主要な園芸植物

(A)フクロウソウ科ゼラニウム(*Pelargonium graveolens*)、(B)サクラソウ科シクラメン(*Cyclamen persicum*)、(C)イワタバコ科セントポーリア(*Saintpaulia ionantha*)、(D)ヒルガオ科アサガオ(*Ipomoea nil*)。

本研究では、オーロン生合成経路を分子レベルで解明し、さらに遺伝子工学的手法によりオーロンによる黄色花を作出することを目的とする。まず第2章においてオーロン合成酵素を過剰発現するトレニアの解析を通じてオーロン合成酵素以外にオーロン生合成経路に必要な酵素を示した。第3章においてオーロン合成酵素の細胞内局在性解析を通じてオーロン生合成経路が液胞内腔にて行われることを示すと同時に、カルコン4'位配糖体こそが真のオーロン合成酵素の基質であると作業仮説を立てた。第4章においてカルコン4'位配糖化酵素遺伝子を単離し、その組み換えタンパク質の生化学的解析を行った。第5章において、カルコン4'位配糖化酵素とオーロン合成酵素を共発現させることによりオーロンを生成する遺伝子組換え植物を作出し、作業仮説を証明した。さらに内在性のアントシアニン生合成経路をRNA干渉(RNAi)法により阻害することで一層オーロン蓄積量の高い黄色い花の分子育種に成功した。この黄色花の分子育種法は基質が初期フラボノイドのカルコンであるために非常に汎用的な方法であり、黄色花が切望されている主要園芸植物に黄色品種を導入することができるために花卉園芸産業に大きく貢献できるものと考えられる。

第2章 オーロン合成酵素を発現するトランスジェニック植物の機能解析

2-1 序論

カルコン(THC)は可溶性タンパク質であるカルコン合成酵素(CHS)によって1分子の *p*-クマロイル CoA と3分子の *p*-マロニル CoA の重合反応により生成される(図 1-1)。CHS はタイプ III の Polyketide synthase (PKS) ファミリーに属する。近年、マメ科アルファルファ (*Medicago sativa*) の CHS2 の 結晶構造が解かれ、CHS の活性中心構造および反応機構の理解が深まった(Ferrer, *et al.*, 1999; Jez, *et al.*, 2002)。

これまでにキンギョソウからは二種類の CHS がクローニングされており、ひとつは花卉の色が白色になる劣性 *nivea* (*niv*) 変異体の原因遺伝子として単離された AmCHS1 であり、もう一方は cDNA ライブラリースクリーニングによって単離された AmCHS2 である(Hatayama, *et al.*, 2006)。AmCHS2 は AmCHS に対してアミノ酸レベルで 72% の配列同一性を示すが、葉、茎、ガク片、および花卉において非常に弱く発現するためその生理機能については不明である。一方、*Nivea* とはスペイン語で雪という意味で、その劣性変異体の表現型から示唆されるように、花卉では主に AmCHS1/NIVEA がカルコンの合成を担っている(図 1-5)(Bonas, *et al.*, 1984; Sommer and Saedler, 1986; Lister, *et al.*, 1993)。これまでフラボノイドの3'位への水酸化は *Eosinea* (*Eos* / F3'H) が司るとされていたが、AmCHS1 組換えタンパク質は THC 生成反応だけでなく、*p*-カフェロイル CoA と3分子の *p*-マロニル CoA の重合反応をも触媒し、PHC を生成する活性を有していた為、カルコン生成の時点で、水酸化されている可能性が浮上している(Hatayama, *et al.*, 2006)。

カルコンは花色主要色素であるオーロンやアントシアニンだけでなく、フラボン、イソフラボン、フラボノールなどの多様なフラボノイド化合物へ代謝される初期フラボノイドであり、蘚苔類から高等植物までのほとんどの植物において合成されている。カルコン自体は薄い黄色を帯びているが、花卉細胞内においてカルコン異性化酵素(CHI)によりナリンゲニンに代表される無色のフラバノンに速やかに代謝される。また、中性付近の pH では非酵素的自動閉環によっても異性化する不安定なフラボノイドである。従って安定的な黄色発現にはカルコンをオーロンに変換することが有効であると考えられる。オーロン合成酵素の基質はカルコンおよびカルコン配糖体であるため、アントシアニン/フラボン生合成経路の CHI と拮抗関係にある。AmAS1 遺伝子の過剰発現によって優先的にカルコンをオーロンへ変換し、黄色花が形成されるかどうかについて検討した。前述のようにキンギョソウにおいては未だに一般的な形質転換系は確立されていない。そこで、キンギョソウと同じゴマノハグサ科 (Scrophulariaceae) に属し、形質転換系が確立されているトレンシア (*Torenia hybrida*: 和名 ナツスミレ) を用いて *AmAS1* 遺伝子の構成発現システムを作製した。

2-2 材料および方法

2-2-1 植物試料

本研究にはマルビジン型のアントシアニンを蓄積し、青紫色の花弁を形成するトレニア (*Torenia hybrida*, サマーウェーブブルー (SWB) 品種, サントリーフラワーズ株式会社) を形質転換宿主およびコントロール植物とした。また、SWB 品種の花弁にはカルコン配糖体およびオーロン類は蓄積していない。

2-2-2 AmAS1 発現カセットの構築 (pSFP211)

cDNA ライブラリー (Nakayama, *et al.*, 2000) から切り出した AmAS1 cDNA (Accession number: AB044884) を含む pBluescript II SK-ベクター (Stratagene) を pSPB251 とした。一方、pUCAP (van Engelen, *et al.*, 1995) を PacI で消化し、平滑末端化後、AscI リンカーを挿入したプラスミドを pUCAA とした。pCGP1364 (Tanaka, *et al.*, 1995) を HindIII と SacII で消化して得られる約 1.3kb の DNA 断片と、pCGP1364 を PstI で消化し、平滑末端化した後 SacII で消化して得られる約 2.9kb の DNA 断片と、pUCAA を SacI で消化し、平滑末端化した後 HindIII で消化して得られる約 2.7kb の DNA 断片を連結することにより、pSPB184 を得た。この pSPB184 を、MacI プロモーター下流に存在する BamHI と mas ターミネーター上流に隣接する KpnI で切断し得られるプロモーター～ベクター～ターミネーターからなる DNA 断片と、前述の pSPB251 から BamHI と KpnI 切断によって切り出した AmAS1 cDNA 断片を連結した。得られたプラスミドを AscI で切断し、MacI プロモーター～AmAS1 cDNA～mas ターミネーターからなる断片を回収し、これを pBINPLUS (van Engelen, *et al.*, 1995) の AscI サイトに挿入した。得られた AmAS1 発現コンストラクトを pSFL211 とした。

2-2-3 トレニア形質転換

pSFL211 コンストラクトを常法に従ってアグロバクテリウム Agl0 株 (Lazo, *et al.*, 1991) に形質転換し、形質転換アグロバクテリウムをトレニア無菌苗の節間および葉に感染させた。形質転換および再分化の方法は Aida, *et al.*, 2000 に記載の方法にしたがった。選択マーカーであるカナマイシンに耐性を示した個体を選抜し、閉鎖系温室で馴化した。

2-2-4 発現解析

選抜により得られた形質転換トレニアにおいて AmAS1 遺伝子が構成的に発現しているかを確認する為に RT-PCR 解析を行った。花弁から 0.1g から RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。得られたトータル RNA 1 μ g を鋳型として逆転写反応を行い、cDNA を得た。cDNA 合成には SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (GIBCO BRL)

を利用し、合成条件は本システム製造業者が推奨する条件に従った。AmAS1 遺伝子の発現を検出するために、形質転換トレンニア cDNAを鋳型に AmAS1-Fw (5'-AAT TAT TTC CCA ATG TTC AAA AAT-3')および AmAS1-Rv (5'-TGG AGC TTT AGG TTT GTG AAA-3')プライマーを用いてPCR反応を行った。PCR反応液(25 μ l)は、cDNA 1 μ l, 1x Ex-Taq buffer (TakaRa), 0.2mM dNTPs, プライマー各 0.2 pmol/ μ l, Ex-Taq polymerase 1.25 Uからなる。反応は、94°Cで3分反応させた後、94°C、1分、55°C、1分、72°C、2分の反応を30サイクル行い、最後に72°Cで5分間処理した。PCR産物を1%アガロースゲル内で電気泳動により分離し、エチジウムブロマイド染色によって増幅産物を検出した。また、内部標準遺伝子としてトレンニアのグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)遺伝子 (Accession number: AB106523)を用い、本遺伝子増幅のために ThGAPDH-F(5'-GAT GAG AAG ACC CTT CTG TTT-3'), ThGAPDH-R(5'-CGA CAC AAG CTT CAC AAA CGT CTT-3')のプライマーを合成し用いた。

2-2-5 色素分析

非形質転換体 SWB および各形質転換体の花弁を0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を含む50%アセトニトリルに浸潤し、フラボノイドを抽出後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によりオーレウシジン 6 位配糖化物およびアントシアニジンの分析を行った。アントシアニン分析については花弁より抽出したフラボノイドを6NHClにて沸騰水中、20分間で加水分解後、アミルアルコールにてフラボノイドを再抽出したものを分析に供した。HPLC条件はそれぞれ以下のとおりである。まずオーレウシジン6位配糖化物の検出には、shim-pack FC-ODSカラム(50 \times 4.6mm、島津製作所)を用い、移動相にはA液として0.05%TFAを含むH₂O、B液として0.05%TFAを含むアセトニトリルを用いた。B液10%から23%の直線濃度勾配3分間の溶出後、B液23%で17分間維持し、さらにB液23%から80%の直線濃度勾配2分間の溶出後、B液80%で3分間維持した。さらにB液80%から10%の直線濃度勾配2分間で溶出した。流速は0.8ml/minで行った。検出は360、400nmにおける吸光度、およびPDA検出器SPD-M10AVP(島津製作所)による250-500nmの吸収スペクトルにより行った。本条件下で、THC 4位'配糖化物、オーレウシジン6位配糖化物標品はそれぞれ保持時間14.17分および6.19分に溶出される。

アントシアニン分析用のカラムはYMC-ODS-A A312(6 \times 150mm、株式会社ワイエムシー)を用いた。移動相には酢酸、メタノール、蒸留水をそれぞれ60:70:270に混合したものを、11分間維持した。検出は520nmにおける吸光度、およびPDA検出器SPD-M10AVP(島津製作所)による400-600nmの吸収スペクトルにより行った。本条件下で、マルビジンは保持時間9.12分に溶出される。

2-3 結果および考察

独立した 48 個体の形質転換体(SFL211 系統)を取得した。これらのゲノミック DNA を鋳型に PCR によって *AmAS1* 遺伝子を検出し、形質転換体であることを確認した(データ不示)。また、導入遺伝子の発現を RT-PCR により解析したところ、発現量の差はあれ、ほとんどの形質転換体において *AmAS1* 遺伝子が高発現していることを確認した(図 2-1)。しかしながら、いずれの個体も花卉が黄色に変化したものはなく、ホストである SWB 同様に青色花卉を呈した(図 2-1)。



図2-1 *AmAS1*遺伝子構成発現トレンニア(SFL211)の作出
(A)SFL211の表現型。非形質転換体(サマーウェーブブルー品種(SWB)、サントリーフラワーズ株式会社)の青紫色の花弁と比べ、花色に変化は認められなかった。
(B)RT-PCRによる遺伝子発現解析。MacIプロモーターにより*AmAS1*遺伝子は構成的に発現していることを確認した。内部標準遺伝子としてトレンニアglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 遺伝子(*ThGAPDH*)を用いた。

次に、高発現系統の花弁から色素を抽出し、HPLCによる色素分析に供した。その結果、いずれの系統もオーロンの生成は認められず、色素組成は非形質転換体と比較して差異は認められなかった(図 5-3)。

AmAS1 遺伝子が高発現しているにも関わらずオーロンの生成が認められなかったことから、*AmAS1* が生体内においてオーロン生合成の必要条件ではあるが十分条件でないことが示唆された。形質転換トレンニアの花弁には非形質転換体と同等のアントシアニン色素が蓄積しており(図 5-3)、*AmAS1* の基質であるカルコンは正常に生成していると考えられる。従って、オーロンが生成されなかった理由としては、トレンニア内在性の CHI タンパク質によりカルコンが速やかにフラバノンに異性化されている為、*AmAS1* が基質と反応できないことが考えられる。しかしながら、キンギョソウ品種の中にはオーロンとアントシアニンやフラボンが共存している品種もあり(Spribille and Forkmann, 1982; 土岐, 1990)、CHIの機能欠損は必ずしもオーロン合成に必須でないと考えられる。したがって、同一細胞に基質であるカルコンとオーロン合成酵素が発現しているが、両者の細胞内コンパートメントが異なるためオーロンが合成されない可能性が示唆される。あるいは、トレンニア花卉細胞内において *AmAS1* タンパク質のプロセッシングや活性化機構に問題があり、*AmAS1* が機能していない可能性がされた。

第3章 オーロン合成酵素の細胞内局在性解析

3-1 序論

CHS、CHI および DFR は可溶性タンパク質であり、酵母 Two-Hybrid 法を用いた研究によって両者は相互作用していることが明らかにされている (Burbulis and Winkel-Shirley, 1999)。さらにシロイヌナズナの芽生えを用いた免疫沈降実験により、CHS、CHI および F3H は物理的に相互作用していることが知られている (Burbulis and Winkel-Shirley, 1999)。これらのフラボノイド合成酵素は細胞質内に点在するのではなく、小胞体膜に局在する P450 タンパク質である F3'H(CYP75B)、F3'5'H(CYP75A) あるいは C4H(CYP73A) を足場に小胞体膜上の細胞質側において酵素複合体 (Metabolon) を形成することで効率的に代謝を行っていると考えられている (Jorgensen, *et al.*, 2005)。

AmAS1 はカルコン類を基質とするが、カルコンは細胞質タンパク質である CHS によって細胞質で合成される。また、これまでに知られている PPO はすべてプラスチド局在性であり、N 末ペプチド (N-terminal polypeptide sequence; NTPP) にプラスチド輸送の為にトランジット配列を有する。この領域には負電荷のアミノ酸が少なく、水酸化アミノ酸が多いのが特徴である (Joy, *et al.*, 1995; Emannelsson and von heijne, 2001)。このプラスチドへのトランジットシグナルの下流にはチラコイドトランスファー領域と呼ばれるチラコイドタンパク質で高く保存されている配列が存在している。PPO タンパク質のアミノ酸配列のアライメントからわかるように、AmAS1 の NTPP はプラスチドへのトランジット配列と顕著な相同性を示さない (図 3-1)。また、AmAS1 は糖タンパク質であることが明らかになっているが (Nakayama, *et al.*, 2000)、これまでにプラスチド局在タンパク質で糖タンパク質のものは見つかっていない。従って、AmAS1 がプラスチドに局在してオーロンを生成していると考えるのは不自然である。AmAS1 の THC に対する至適 pH は 5.4 と低いことに加え、カルコンが酸性条件下では異性化せずに安定して存在できるため、酸性細胞小器官においてオーロン合成が行われる可能性が高い。

任意のタンパク質の細胞内局在性を解析するために、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来の Green Fluorescent Protein (GFP) あるいは *Anthozoa* 属の造礁サンゴ由来の monomeric Red Fluorescent Protein (mRFP) と任意タンパク質とを融合し、その融合キメラタンパク質の局在性を蛍光顕微鏡を用いて解析する方法が一般的である (Niwa, *et al.*, 1999; Campbell, *et al.*, 2002; Tamura, *et al.*, 2003)。GFP はそれ自身で長波長 UV もしくは青色光を吸収し、緑色の蛍光を発するタンパク質である。植物研究用に開発された sGFP は、高等植物の最適コドンが使用され、さらに S65T 点変異により野生型に比べて発色団形成が 4 倍早く、蛍光が 6 倍増加した変異型 GFP である。この蛍光タンパク質の検出には試料の固定あるいは基質の添加は必要としないため、リアルタイムでの生体観察が可能となり、タンパク質の輸送や細胞小器官の動的な活動を観察することが可能となった。

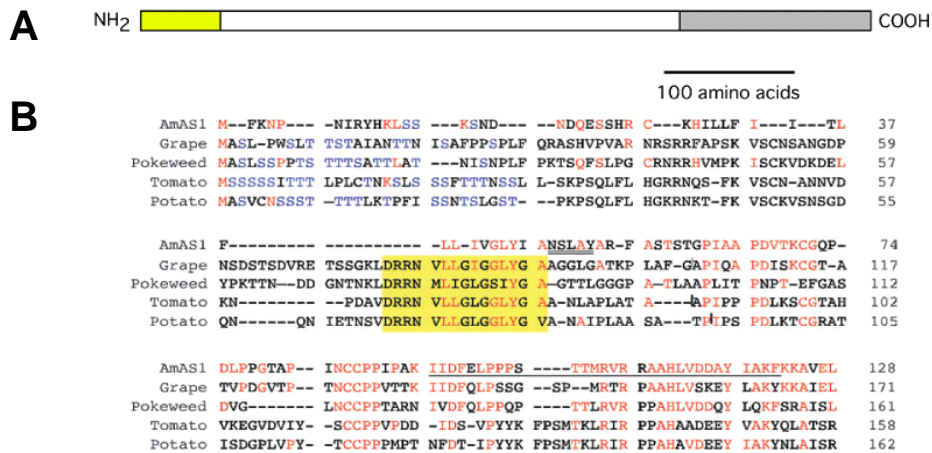


図3-1 PPOのN-terminal polypeptide (NTPP)の構造解析

(A)典型的なPPOの一次構造模式図。N末(黄色)とC末(灰色)がプロセッシングを受けて成熟タンパク質になる(中央白抜き部分)。

(B)PPOタンパク質のアライメント。赤字; AmAS1と同一アミノ酸残基、青字; N末30アミノ酸配列内に見られる水酸化アミノ酸、黄色ボックス; 色素体局在性PPOに見られるチラコイドトランスファー領域、二重下線; 推定ssVSD配列、下線; 精製AmAS1成熟タンパク質で同定されたアミノ酸配列部分。

Grape PPO (*Vitis vinifera*, accession S52629); Pokeweed PPO (*Phytolacca americana*, PAP1, accession BAA08234); Tomato PPO (*Lycopersicon esculentum*, accession JQ1672); Potato PPO (*Solanum tuberosum*, accession AAA85122)。

植物細胞への遺伝子導入方法の代表としては土壌細菌を用いたアグロバクテリウム法、プロトプラストを用いたエレクトロポレーション法、パーティクルガンによるボンバードメント法などがある。ボンバードメントは金粒子に導入する遺伝子またはプラスミドをコーティングし、細胞に物理的に打ち込む方法である。偶然、核に入った遺伝子が一過的に転写され、導入遺伝子産物が発現する。この方法は他の方法に比べ操作が簡便であり、動物細胞の形質転換にも利用されている(福田ら、1997, Noji, *et al.*, 1998)。

植物の栄養生長細胞での液胞タンパク質は、リボゾームで合成された後、または合成と同時に小胞体内腔へ輸送される。その後、酵母の液胞や動物のリソソームへタンパク質の輸送経路と同様に、ゴルジ体に輸送され、ここで液胞輸送シグナルによって分泌性タンパク質として仕分けられ、特異的な小胞に取り込まれた後に出芽し、液胞へ輸送される。これとは異なり、植物種子の登熟細胞内の貯蔵タンパク質の液胞への輸送経路は種特異的であり、ゴルジ体を経由する経路とゴルジ体を介さずに小胞体から直接液胞へ向かう経路が存在する。一般的に液胞タンパク質の多くはゴルジ体に輸送され、そこで液胞への選抜を受けており、この機構は真核生物において保存されていると考えられている(Neuhaus and Rogers, 1998)。種子発芽期の液胞貯蔵タンパク質の分解に際して大量のプロテアーゼが液胞へ輸送されることが知られているが、その場合はゴルジ体を経由しない経路で輸送される。

タンパク質がゴルジ体を経由して輸送されているかについては小胞体からゴルジ体への輸送に必須な分子スイッチを利用した実験によって調べることができる (Takeuchi, *et al.*, 2000)。酵母において小胞体から小胞の出芽に必須の因子として単離された小胞体膜上に局在する GTPase である Sar1 は、シロイヌナズナ (AtSar1) やタバコ (NtSar1) においても保存されており、小胞体膜状の COPII コート複合体をリクルートし、小胞形成を促進することで小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送を制御している。Sar1-GTPase はアミノ酸配列 47 位の His 残基を Leu へ置換した点変異体はドミナントネガティブ変異であり、小胞体からゴルジ体への輸送を阻害できる。このドミナントネガティブ型 Sar1 と、蛍光タンパク質を融合させた目的の遺伝子を共発現させることで、目的の遺伝子産物がゴルジ体を経由しているかどうかを解析することが可能である (Takeuchi, *et al.*, 2000)。

植物細胞を用いたこれまでの液胞輸送に関わるシグナルの研究から、液胞輸送の情報が①タンパク質の N 末ペプチド(sequence specific vacuolar sorting determinants; ssVSD)、②C 末端ペプチド (C-terminal vacuolar sorting determinants; ctVSD)、および③成熟タンパク質のアミノ酸配列中に存在するケースが知られている (Neuhaus and Rogers, 1998)。これ以外にも立体構造が重要で成熟型ペプチド中に液胞輸送因子(Physical structure vacuolar sorting determinants, psVSD)が存在するタンパク質もある。

オーロンが生成される細胞内小器官を明らかにするために、①ショ糖密度勾配遠心分離による細胞小器官の分画後のウェスタンブロット解析、および ②AmAS1 と蛍光タンパク質とのキメラタンパク質の一過的発現解析を行い、AmAS1 タンパク質の細胞内局在性を検討した。

3-2 材料および方法

3-2-1 ショ糖密度勾配遠心

オーレウシジン6位配糖体を主要色素とする黄色キンギョソウ(スナップイエロー品種)のステージ3から5に対応する花卉(Sato *et al.*, 2001)を氷冷した buffer A (150 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 13% (w/v) sucrose、サンプル 1 g あたり 2 ml の buffer の割合)の中でメスにより小さくした。引き続き、テフロン-ガラス製のホモジナイザーを用いて4°Cで10分間粉碎した。粉碎したサンプルを 500 x g で遠心し、得られた上清を 180 μm filter (Millipore) でフィルター濾過し、さらに 100 μm filter (Millipore)で濾過したサンプルをショ糖密度勾配遠心に供した。

1 mM EDTA を含む 9.0 ml のショ糖勾配液(55~6%(w/v) sucrose)を超遠心チューブ(14 x 89 mm, Beckman)に入れ、その上に調整したサンプル(0.5 ml)を重層し、Beckman SW41Ti ローターで 31,000 rpm、4°C で 4 時間 遠心した。チューブの底に穴をあけて、ペリスタポンプで 0.5ml ずつに分画した。ショ糖濃度の最も低い最上層の分画をフラクション 1 とした。色素体、ミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体および液胞はそれぞれクロロフィルおよびカロテノイドを含む分画 (Hurkman, *et al.*, 1979)、cytochrome c oxidase 活性、nucleoside diphosphatase 活性 (Ray, *et al.*, 1969)、NADPH-cytochrome c reductase 活性 (Lord, *et al.*, 1973; Saunders, *et al.*, 1977)、およびフラボノイド色素を指標にした。AmAS1 の活性は Sato *et al.*, 2001 に記載の方法に従い PHC を基質に酵素反応を行い、逆層HPLCで分析した。

3-2-2 ディファレンシャル遠心分離

黄色キンギョソウ(スナップイエロー品種)の花弁を氷冷した buffer B (150 mM Tris-HCl pH7.5, 0.5 M sucrose, 1 mM DTT, and 1 mM MgCl₂, and 13% (w/v) sucrose、サンプル 1 g あたり 2 ml の buffer の割合)の中で粉碎した (Lord, *et al.*, 1973; Saunders, *et al.*, 1977)。また、MgCl₂ を含まない buffer B には代わりに 1mM の EDTA を加えた。粉碎サンプルは 500 x g で遠心し、得られた上清を 180 μm フィルター (Millipore)でフィルター濾過し、さらに 100 μm フィルター (Millipore)で濾過した。このサンプルを順に 5000 x g で 10 分間、20,000 x g で 30 分間、100,000 x g で 2 時間遠心した。

3-2-3 SDS-PAGE およびウエスタンブロットリング解析

成熟 AmAS1 抗原(G61~K415 残基)に対するウサギ由来抗 AmAS1 抗血清 300 μl をアフィニティアズラクトンカラム(Empore)に 10 μl/分の流速でアプライした後、500 μl の PBS (0.1M リ

ン酸バッファー, 0.15M NaCl, pH7.2)で2回洗浄した(400 x g で2分間)。カラムを 500 μ l のクエンチング溶液(3M エタノールアミン, pH 9.5)で 10 μ l/分の流速でクエンチングし、再度 PBS で4回洗浄した。500 μ l のブロッキング剤(Empore)を流速 10 μ l/分で加えた後に再度 PBS で5回洗浄した。最後に溶出液(0.1M グリシン, 2%酢酸, pH 2.0)で抗 AmAS1 抗体を溶出し、300mM リン酸バッファーで中和した。

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) は Laemmli, 1970 の方法に従った。タンパク質は Coomassie Brilliant Blue (PAGE Blue 83, 第一化学薬品) で染色し、可視化した。PAGE ゲルを Immobilon-P membrane (Millipore) に転写し、ブロッキングリージェント (Amersham Bioscience) を用いて室温で二時間ブロッキングした。AmAS1 タンパク質は 1/1000 希釈した一次抗体(成熟 AmAS1 IgG (ウサギ))、および 1/5000 希釈した二次抗体 (donkey anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate)と反応させ、ECL Western blotting キット(Amersham Bioscience)を用いて ペルオキシダーゼによる化学蛍光を検出した。

3-2-4 遺伝子材料

オワンクラゲ由来の Green Fluorescent Protein (sGFP/S65T) (Niwa, *et al.*, 1999)を含む CaM35S-sGFP(S65T)-NOS3 は静岡県質大学の丹羽康夫博士から分与していただいた。野生型 (WT)AtSar1 およびドミナントネガティブ型 (DN)AtSar1 (plasmid 1, P35S-sporamin-GFP-Tnos-P35S-(WT)AtSar1-Tnos in pUC18; plasmid 2, P35S-sporamin-GFP-Tnos-P35S-(DN)AtSar1-Tnos in pUC18; Takeuchi *et al.*, 2000)については東京大学大学院理学研究科の中野明彦教授に分与していただいた。mRFP (Campbell, *et al.*, 2002) はカリフォルニア大学の R. Y. Tsien 教授に分与していただいた。AVP2-mRFP (Mitsuda, *et al.*, 2001) は京都大学人間・環境学研究科の佐藤博士に分与していただいた。液胞染色マーカーである BCECF-AM (2',7'-bis-(carboxyethyl)-5-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester) は市販のものを用いた (Molecular Probes)。

3-2-5 一過的発現ベクターの構築

図 3-2 に示すエンタリー番号2~6 の GFP-AmAS1 キメラ遺伝子は PCR によって増幅した AmAS1 の NTPP 断片を sGFP/pUC18 ベクター(エンタリー1)の sGFPの 5'側上流の *Sa*I と *Nco*I サイトに挿入することで作製した。具体的には、AmAS1 の cDNA を鋳型に *Fsa*II プライマー (5'-GGG TCG ACC ATG TTC AAA AAT CCT AAT ATC-3') とそれぞれのエンタリーに対応するリバースプライマー (RncoA92-ENTRY2 (5'-TAG GAC CAT GG TAG CGG GGA TTG GGG-3'), RncoA60-ENTRY3 (5'-ATA GCC ATG GTT GAG GTC GAG GC-3'), RncoA53-ENTRY4 (5'-GG ACC CAT GGC ATA GGC GAG AGA G-3'), Rnco47-ENTRY5

(5'-GGA CCC ATG GCG ATG TAC AGG CCA AC-3'), Rnc036-ENTRY6(5'-GGA CCC ATG GTT ATT ATA AAT AAT AGA ATG-3'), R160-L53F(5'-GGA CCC ATG GCA TAG GCG AAA GAG-3'), または R160-Y52S (5'-GGA CCC ATG GCA TAG GCG AGG GAG-3')) を用いて PCR を行い、増幅した断片を *Sal*I と *Nco*I で制限酵素消化した。消化した PCR 断片を sGFP/pUC18 ベクターの *Sal*I と *Nco*I サイトにライゲーションした。PCR 産物は変異が導入されていないことをシーケンス解析により確認した(Beckman Coulter)。エントリー 8 の P109-GFP は、PAP1 cDNA (Joy, *et al.*, 1995)を鋳型に *Npf*I プライマー(5'-GGG TCG ACG ATG GCT TCT CTT TCT TCT C-3') と *Npr*I (5'-GGG AAT TCC ATG GCT GCC AAG GTG G-3') プライマーを用いて PAP1 の NTPP を増幅した。

エントリー7の pGFP-AC は、AmAS1 の CTPP 領域を *Fbsrg*1 プライマー(5'-GTC TCT GTA CAA GAA ATT TCA TAG AAC-3') と *Rgcr*g1 プライマー(5'-TCA ATG TAC AAG CCA TCA AGC TCA ATC-3')によって増幅し、*Bsr*G1 により消化した。得られた断片を sGFP/pUC18 ベクターの *Bsr*G1 サイトに挿入し、シーケンスによって挿入方向と PCR によるエラーがないことを確認した。エントリー10の GFP-A60 についても *Fnc*01 プライマー(5'-AAG CCC ATG GTC AAA AAT CCT AAT ATC-3') と *Rnc*01 プライマー(5'-ATA GCC ATG GTT GAG GTC GAG GC-3') を用いて同様の方法で構築した。

エントリー9の A60-mRFP は AmAS1 を *Sal*I-AmAS1-FW プライマー(5'-TTT GTC ATG TTC AAA AAT CCT AAT ATC CGC TAT-3') と *Bgl*II-AmAS1-RV プライマー(5'-TTT AGA TCT GGT TGA GGT CGA GGC AAA CCG GGC ATA-3')で増幅した NTPP 断片(1-60 残基)を *Sal*I と *Bgl*II で消化し、また mRFP1/pRSETB ベクター (Invitrogen; Campbell, *et al.*, 2002)を *Bam*HI-mRFP-FW プライマー(5'-GTT GAA TTC GCC TCC TCC GAG GAC GTC ATC AAG GAG TTC AT-3')と *Not*I-mRFP-RV プライマー(5'-TGC GGC CGC TCA AGC TTC GAA TTC TTA GGC GCC GGT-3')で増幅した mRFP断片を *Bam*HI と *Not*I で消化し、両断片を sGFP/pUC18 ベクターの *Sal*I と *Nco*I サイトに3点ライゲーションして得た。以上のコンストラクトは全てカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター(CaMV 35S promoter)に制御されており、植物細胞内で構成的に発現するようデザインされている。

3-2-6 共発現ベクターの構築

A60-GFP/pUC18(エントリー3)または P109-GFP/pUC18 ベクター(エントリー8)を *Hind*III と *Not*I で消化して CaMV35S プロモーターとキメラ遺伝子を含む断片を得た。一方、上記の AtSar1 plasmid 1 (Takeuchi *et al.*, 2000)の CaMV35S promoter-sporamin-GFP 領域を *Hind*III と *Not*I で切り出し、先ほどのエントリー3またはエントリー8由来の CaMV35S プロモーターとキメラ遺伝子を含む断片を挿入し、AtSar1 と A60-GFP、および AtSar1 と P109-GFP の共発現ベ

クターを得た。ドミナントネガティブ型 AtSar1 との共発現ベクターは AtSar1 plasmid 2 を用いて同様の手順で作製した。

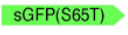









| Entry | Structure | Designation | Assay results |
|-------|---|------------------------------|---------------|
| 1 |  | GFP | C/N |
| 2 |  | N _{AmAS1-92} -GFP | V |
| 3 |  | N _{AmAS1-60} -GFP | V |
| 4 |  | N _{AmAS1-53} -GFP | V |
| 5 |  | N _{AmAS1-47} -GFP | C/N |
| 6 |  | N _{AmAS1-36} -GFP | C/N |
| 7 |  | GFP-C _{AmAS401-562} | C/N |
| 8 |  | N _{PAP1-109} -GFP | P |
| 9 |  | N _{AmAS1-60} -RFP | V |
| 10 |  | GFP-N _{AmAS1-53} | V |

図3-2 トランジェントアッセイ用コンストラクト

左から右にN末からC末方向を示す。緑色矢印; sGFP(S65変異)、黄色矢印; AmAS1のNTPP、灰色矢印; AmAS1のCTPP、紫色矢印; ヨウシュヤマゴボウのPPO (PAP1)、赤色矢印; mRFP。各エントリーの細胞内局在性の結果をコンストラクトの名称右部に示す。C/N; 細胞質および核、V; 液胞、P; 色素体。

3-2-7 パーティクルボンバードメント

市販のタマネギ(*Allium cepa*)と園芸種のキンギョソウ(*A. majus*)の花弁を実験に供した。蛍光顕微鏡観察の際に、オーロン由来の蛍光が蛍光タンパク質の観察を阻害するのを回避するために花弁が白い品種を実験に用いた。

パーティクルガンは Helios Gene Gun System (Bio-Rad)を用いた。基本的な操作は Noji, *et al.*, 1998 に従った。25 mg 金粒子 (直径 1.0 μ m)あたりにそれぞれのエントリーのプラスミド 50 μ g をコーティングし、120 p.s.i./shot で植物組織に撃ち込んだ。AmAS1-GFP キメラタンパク質と AVP2-mRFP キメラタンパク質の共発現に際しては、エントリー3と AVP2-mRFP のプラスミドを等量混ぜ合わせ、金粒子にコーティングした。

シロイヌナズナを用いた細胞生物学的研究によって光誘導性のパpain(Papain)タイプの液胞システインプロテアーゼが酸性条件下で GFP を容易に分解する機構が明らかとなっている (Tamura, *et al.*, 2003)。さらに、液胞性 GFP は観察時の励起青色光によって著しく分解することから、励起されコンフォメーション変化した GFP に対してこのシステインプロテアーゼが働くことが明らかとなっている。したがって、液胞局在性 GFP の光条件化でのタンパク質分解を避けるため、遺伝子導入後、表皮細胞を滅菌シャーレ(90 mm)に入れて 22°Cの暗黒下条件で 48

時間培養した。培養後のタマネギからピンセットで表皮細胞をはがしてスライドガラス(Micro slide glass SUPERFROST, 76 x 26mm, thickness 0.9-1.2mm, Matsunami)に乗せた。花卉表皮細胞はそのままスライドガラスに乗せた。乾燥を防ぐために蒸留水を滴下し、その上にカバーガラス (NEO microcover glass, 50 x 24mm, Thickness 0.12-0.17mm, Matsunami) をかぶせた。遺伝子導入細胞は共焦点蛍光顕微鏡(LSM510, Carl Zeiss,)を用いて観察した(Matsushima, *et al.*, 2004)。

3-3 結果

3-3-1 細胞分画による AmAS1 の細胞内局在性解析

AmAS1 の細胞内局在を明らかにするためにキンギョウソウ花卉細胞をシヨ糖密度勾配遠心法により分画し、ウエスタンブロットによる AmAS1 の検出を試みた。その結果、67kDa と 39kDa の二種類バンドが検出され、それぞれプロセッシングを受ける前の前駆タンパク質とプロセッシングを受けた成熟 AmAS1 タンパク質と考えられた (図 3-3)。AmAS1 活性は概ね 39kDa のバンドと一致しており、このサイズはキンギョウソウ花卉から精製された AmAS1 と一致したため、このバンドが活性型 AmAS1 と結論付けた。AmAS1 活性および 39kDa のバンドは液胞マーカーであるフラボノイドとよく一致した。したがって、活性型 AmAS1 は液胞に局在することが強く示唆された。

ミトコンドリアおよび色素体マーカーであるクロロフィル/カロチノイドおよびチトクローム C 酸化酵素活性はいずれも単一ピークとして得られた (図 3-3)。しかしながら、両マーカーとも AmAS1 活性および 39kDa のバンドと一致しなかったため、活性型 AmAS1 はミトコンドリアおよび色素体には局在しないと考えられた。一方、小胞体およびゴルジ体マーカーであるヌクレオシド脱リン酸化酵素活性および NADPH/チトクローム C 還元酵素活性は類似した分画パターンを示し、大小二つのピークに分かれた。そのうち大きなピークは AmAS1 活性および 39kDa のバンドと一致した。一方、小さなピークは 67kDa のバンドと一致した。

さらに詳細に解析するためにディファレンシャル遠心分離を行った。バッファーに Mg イオンを添加する膜とリボゾームの解離を抑制し、ミクロソームに局在する酵素タンパク質を安定化させる効果があることが知られている (Lord, *et al.*, 1973; Saunders, *et al.*, 1977)。その結果、Mg イオン存在下では NADPH/チトクローム C 還元酵素活性は 5000 および 20,000 x g の沈殿のみ見られるのに対して、Mg を添加しない場合は全体の 1/3 が 100,000 x g の沈殿に見られた。一方、AmAS1 活性は Mg の添加に関わらず、その全体の活性の 95% は 100,000 x g の沈殿に見られた (データ不示)。以上の結果から、活性型 AmAS1 と思われる 39kDa のバンドは ER、ミトコンドリア、色素体ではなく、主に液胞に存在することが示された。

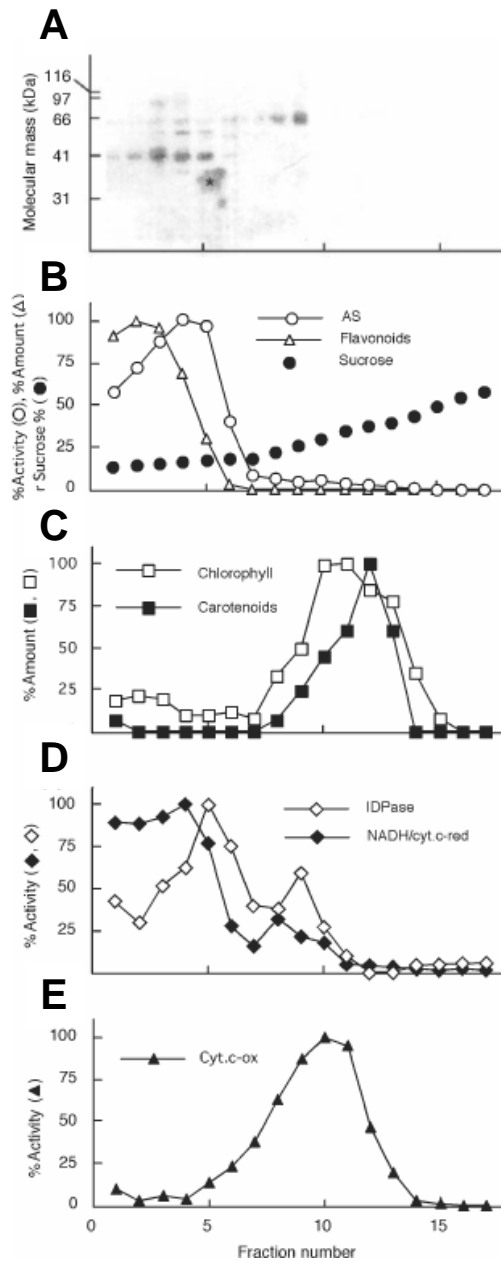


図3-3 ショ糖密度勾配遠心分離による細胞小器官分画とAmAS1の挙動
 (A) 細胞分画サンプルに対するウエスタンブロット解析。AmAS1抗体によって39kDaと67kDaの二種類のサイズにバンドが検出された。*は擬似シグナル。(B)AmAS1活性と液胞マーカーのフラボノイドの分画パターン。(C)色素体マーカーのクロロフィルおよびカロチノイドの分画パターン。(D)小胞体(ER)マーカーであるNADH/cytochrome c reductase (NADH/cyt c-red) 活性と、ゴルジ体マーカーのnucleoside diphosphatase (IDPase)活性の分画パターン。両オルガネラマーカー共に大小二つのピークに分かれた。(E)ミトコンドリアマーカーであるcytochrome c oxidase活性。いずれのマーカーもその活性または含量が最大値の値を100%とした。AmAS1の活性とプロセッシングを受けた39kDaのバンドおよび液胞マーカーは同様のパターンに分画された。

3-3-2 蛍光タンパク質を用いた AmAS1 の細胞内局在性解析

視覚的に AmAS1 の細胞内輸送経路を明らかにする為に、AmAS1 と蛍光タンパク質である sGFP またはサンゴ由来 mRFP との融合したキメラタンパク質を用いた解析を検討した。AmAS1 前駆タンパク質の細胞内輸送に関わる領域を決定するために、AmAS1 前駆タンパク質の推定 NTPP(1-92 残基、エントリー2)および推定 CTPP(400-562 残基、エントリー7)の C 末および N 末に GFP をインフレームで繋いだコンストラクトをタマネギ表皮細胞に発現させた (図 3-4)。

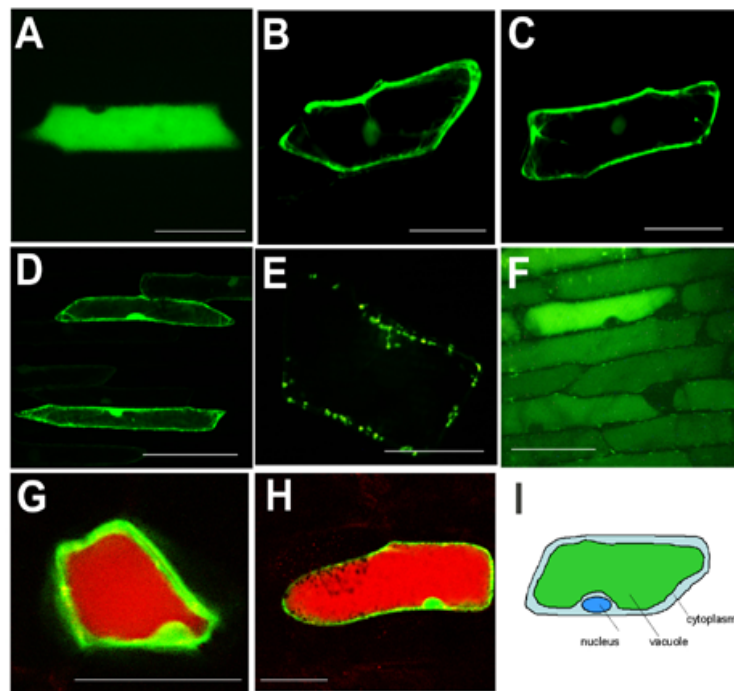


図3-4 AmAS1-sGFPキメラタンパク質の細胞内局在性解析

パーティクルボンバードメントによる遺伝子導入後、暗黒化で48時間培養した後に蛍光顕微鏡で細胞観察を行った。(A) エントリー3 (A_{1-60} -GFP)は液胞内腔に局在した。(B)エントリー5 (A_{1-47} -GFP)は液胞ではなく細胞質および核に局在した。(C)エントリー7 (GFP- $AC_{401-562}$)は(D)エントリー1(sGFP)と同じ細胞質および核に局在した。(E)エントリー8(P_{1-109} -GFP)は色素体に局在する。(F)タマネギ表皮細胞の BCECF-AM(2',7'-bis-(carboxylethyl)-5-carboxyfluorescence)による液胞染色。表皮細胞の多くの部分を液胞が占める。(G)キンギョソウ花弁表皮細胞におけるエントリー9(A_{1-60} -mRFP)とエントリー1(sGFP)の共発現パターン。エントリー9はエントリー3同様に液胞内腔へ輸送される。(H)タマネギ表皮細胞におけるエントリー9(A_{1-60} -mRFP)とエントリー1(sGFP)の共発現パターン。キンギョソウ花弁表皮細胞と同様の局在パターンが観察された。(I)タマネギ表皮細胞の模式図。液胞は中央緑色で表される最も大きなオルガネラである。細胞質(水色)および核(青色)は液胞により細胞の外側に押し付けられて存在する。パネルGのサイズバーは20 μ m、それ以外のパネルは全てサイズバーは100 μ mである。

共焦点蛍光顕微鏡による観察の結果、表皮細胞の液胞内腔においてエントリー2 由来の蛍光シグナルが観察された。これは液胞マーカーである BCECF-AM によるタマネギ表皮細胞の染色パターンと類似していた。さらに GFP 部分を mRFP タンパク質に置換したコンストラクト(エントリー9)においても液胞局在性が確認された。また、比較実験として典型的な色素体輸送シグナルを持つヤマゴボウ科ヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) 由来プラスチド局在性

PPO (PAP1) の NTPP(1-109 残基、エントリー8)を作製した。エントリー8 は細胞質内の顆粒状細胞小器官に局在を示した。このエントリー2 の GFP 部分を mRFP に置き換えたエントリー9 をキンギョソウ花卉に一過的発現させたところ、タマネギ表皮細胞で見られるように液胞内腔に局在した。従ってタマネギ表皮細胞を用いた細胞内局在性はキンギョソウ花卉内の細胞内局在性を反映していることを確認した。細胞観察の利便性から以後、タマネギ表皮細胞を用いて実験を行った。GFP の C 末に AmAS1 の推定 CTPP を融合したエントリー7 は細胞質に局在し、コントロールの GFP タンパク質(エントリー1)を単独で発現させた局在性と非常に類似していた。以上の結果から、AmAS1 は液胞に輸送される PPO タンパク質であり、その輸送シグナルは NTPP に存在することが示された。

さらに AmAS1 の液胞輸送に関わる NTPP 内領域を同定する為に、AmAS1 NTPP の 1-60 残基(エントリー3)、1-53 残基(エントリー4)、1-47 残基(エントリー5)、1-36 残基(エントリー6)の段階的欠失コンストラクトを作成し、それらの細胞内局在性を検討した。その結果、エントリー3 および4 はエントリー2 同様に液胞局在性を示すのに対してエントリー5 および6 については細胞質に局在した。従って、AmAS1 の液胞輸送には NTPP 内の 48-53 残基にわたる領域が必要であることが明らかとなった。

3-3-3 AmAS1 液胞輸送に関わる NTPP の解析

一般的に液胞輸送に関与する N 末ペプチドには、疎水性アミノ酸 12~30 残基からなる ER 内腔に入るためのシグナルが存在することが知られている。貯蔵タンパク質であるサツマイモ由来スポラミンやオオムギ由来のプロテアーゼであるアリュレーインなどといった液胞に局在するタンパク質の N 末端に液胞輸送に重要な役割を果たす保存配列が見つかっている。この配列は、NPIRL、NPIVL、NPIRP、NPIDL などのように五つのアミノ酸から構成されており、アミノ酸置換解析を通じて、液胞輸送に重要な X1-X2-I/L-X3-X4 からなる特異的液胞輸送決定領域(ssVSD)の存在が提唱されている(Matsuoka and Nakamura, 1999; Matsuoka and Neuhaus, 1999; Koide, *et al.*, 1999)。ここで X1 は Asn の場合が多く、X2 は Glu もしくは Asp 以外のアミノ酸、X3 は全てのアミノ酸、X4 は側鎖が大きく疎水性のアミノ酸である。最も重要な点は中央に配置されるアミノ酸が Ile または Leu であることである。興味深いことに、AmAS1 の NTPP には N48-S-L-A-Y52 という ssVSD と弱い相同性を示す配列が存在する。さらに、この配列の N 末側には 30-47 位には ER に入る際に重要と考えられる疎水性アミノ酸残基が連続する領域が存在する。この NSLAY 配列と AmAS1 の液胞局在性との関連性を明らかにする為にエントリー3 の L50F および Y52S 点変異を導入したコンストラクトを構築し、一過発現解析を行った。フェニルアラニンおよびセリン残基への置換はサツマイモ由来液胞タンパク質であるスポラミンの実験に倣った。

その結果、両点変異タンパク質は液胞へ輸送されず、細胞質および核に局在した(図 3-5)。また、ssVSD は輸送されるカーゴタンパク質の N 末または C 末いずれに配置した場合でも機能することが知られている。これに倣って、AmAS1NTPP(1-60 残基)の N 末側に GFP を配置したエンタリー10 を構築し、その発現タンパク質の細胞内局在を観察した。その結果、エンタリー3 同様に液胞内腔に局在を確認した。以上の結果から、AmAS1 の NTPP に存在する NSLAY 配列は ssVSD として機能することが強く支持された。

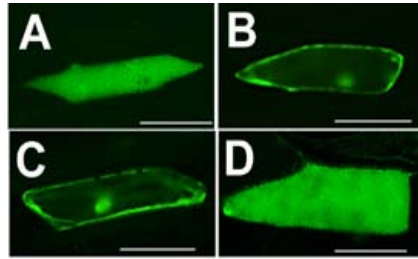


図3-5 AmAS1のsequence specific-vacuolar sorting determinant (ssVSD)様配列の解析
 パーティクルボンバードメントによる遺伝子導入後、暗黒化で48時間培養した後に蛍光顕微鏡で細胞観察を行った。(A) エンタリー4(A₁₋₅₄-GFP)は液胞内腔に輸送される。(B) A₁₋₅₃(L50F)-GFP点変異エンタリーは液胞へ輸送されない。(C) A₁₋₅₃(Y52S)-GFP点変異エンタリーは液胞へ輸送されない。(D) エンタリー10(GFP-A₁₋₆₀)は液胞内腔に輸送される。サイズバーは50 μmである。

3-3-4 AmAS1 の液胞輸送経路の解析

次に AmAS1 が液胞に輸送されるまでの経路について詳細に検討した。エンタリー3 およびエンタリー10 を導入後 24 時間後においては、小さな顆粒状のオルガネラに蛍光シグナルが得られた。このオルガネラは形態、細胞あたりの個数、動きの全てにおいて、先ほどの PAPI(エンタリー8)の局在した色素体と思われるオルガネラとは異なっていた (図 3-6)。48 時間後には完全に液胞内腔にシグナルが得られたことから、AmAS1 はこのオルガネラを経由して液胞へ輸送されることが示された。

このオルガネラを同定する為にゴルジ体マーカーであるシロイヌナズナ由来 H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase (AVP2)とmRFP 融合タンパク質をエンタリー3 またはエンタリー10 と同時にボンバードメントし、同一細胞において共発現させ、導入 24 時間後に蛍光観察をした。AVP2-mRFP 由来の赤色蛍光はエンタリー3 またはエンタリー10 由来の緑色蛍光と重なった(図 3-6)。従って、この顆粒状細胞小器官はゴルジ体であることが示された。

次に、シロイヌナズナ Sar1(AtSar1)に H74L のドミナントネガティブ変異を導入した DN-AtSar1 と AmAS1(エンタリー3)を共発現させたところ、遺伝子導入後 24 時間に観察される顆粒状のシグナルが消失し、小胞体と思われる網の目状の蛍光パターンが観察された(図 3-7)。野生型の Sar1 を共発現させた場合は AmAS1 のシグナルは液胞内腔に観察された。一方、PAPI(エンタリー8)のプラスチド輸送は DN-Sar1 によって阻害されなかった。以上の共発

現解析の結果から、AmAS1 は小胞体からゴルジ体を経て、最終的に液胞に輸送される液胞タンパク質であることが示された。

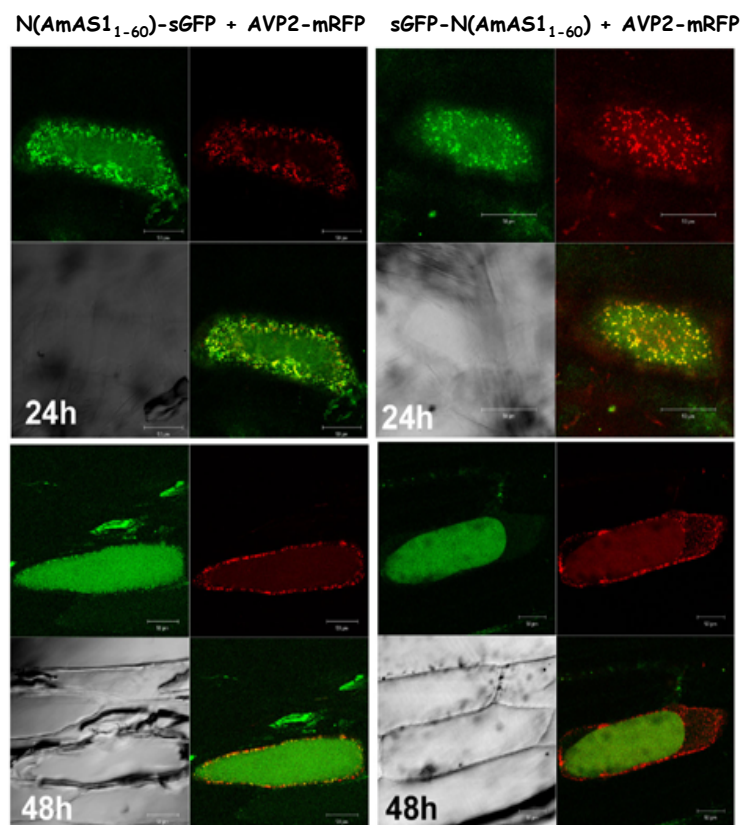


図3-6 AmAS1の液胞輸送経路の解析(1)

パーティクルボンバードメントによる遺伝子導入後、暗黒化で24時間または48時間培養した後に蛍光顕微鏡で細胞観察を行った。(左) エントリー3(A₁₋₆₀-GFP)は遺伝子導入後4時間後では小さなオルガネラに局在し、導入後48時間で液胞内腔に輸送される。このオルガネラはAVP2-mRFPの局在するオルガネラと一致したためゴルジ体と示された。(右) エントリー10(GFP-A₁₋₅₃)とAVP2-mRFPの共発現パターン。エントリー3と同様に液胞に輸送される前にゴルジ体を経由することが示された。サイズバーは50 μmである。

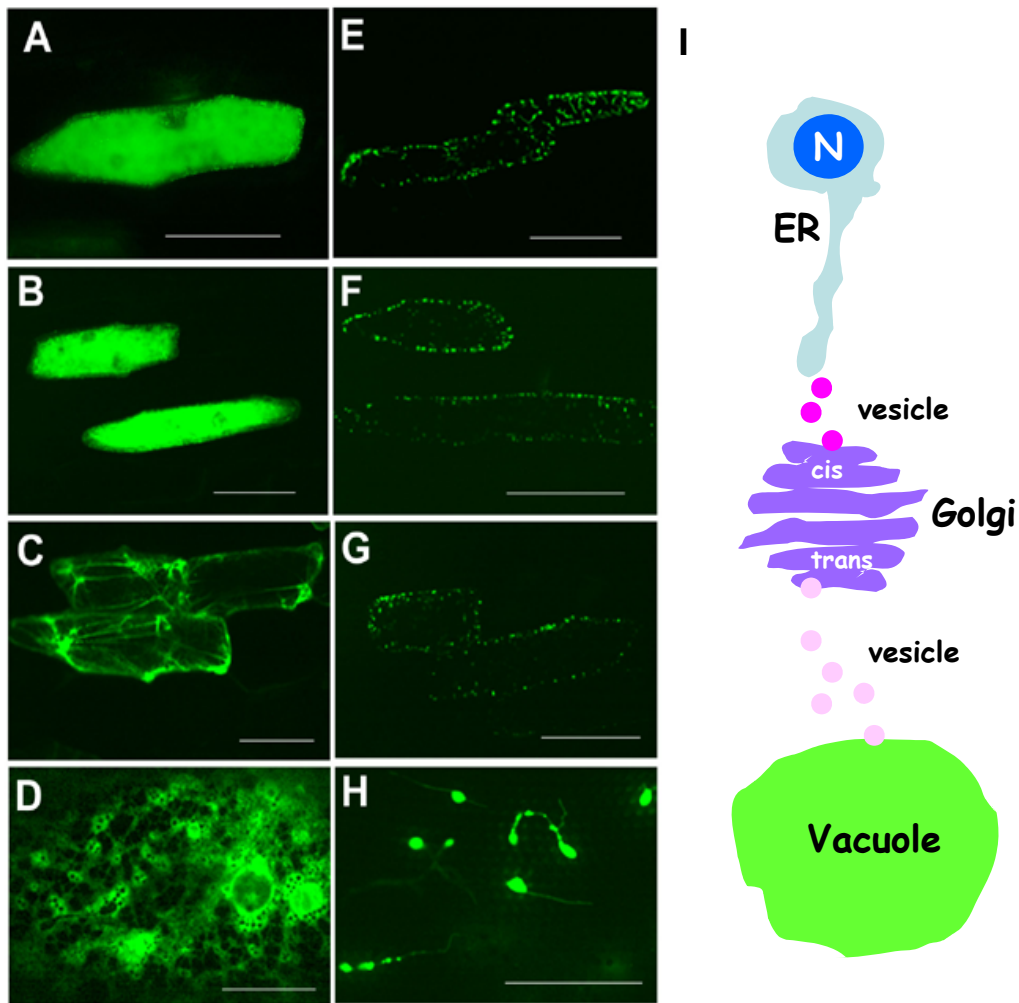


図3-7 AmAS1の液胞輸送経路の解析(2)

パーティクルボンバードメントによる遺伝子導入後、暗黒化で48時間培養した後に蛍光顕微鏡で細胞観察を行った。(A) エントリー3(A₁₋₆₀-GFP)は液胞内腔に局在する。(B) エントリー3(A₁₋₆₀-GFP)と野生型AtSar1の共発現によってエントリー3の液胞局在に影響は認められなかったが、(C) ドミナントネガティブ型AtSar1との共発現により液胞局在が阻害され、(D) その結果、小胞体と思われるネットワーク状のシグナルが得られた。(E) エントリー8(P₁₋₁₀₉-GFP)の色素体局在は、(F) 野生型、および(G) ドミナントネガティブ型AtSar1の共発現により影響を受けなかった。(H) エントリー8の発現により得られる色素体の鞭毛状構造。パネル(D)および(H)のサイズバーは20 μm、それ以外のパネルは100 μm。(I) AmAS1の輸送経路の模式図。AmAS1は小胞体(ER)からゴルジ体を経て、最終的に液胞内腔へ輸送される新規なポリフェノール酸化酵素(PPO)である。

3-4 考察

3-4-1 AmAS1 タンパク質のプロセッシングと液胞局在性

ウエスタンブロットにより検出された AmAS1 タンパク質および AmAS1 活性はいずれもキンギョソウ花弁細胞由来の液胞分画中に検出された。活性型 AmAS1 である 39kDa のバンドは液胞マーカーであるフラボノイドと共存したため、AmAS1 はプロセッシングを受けて成熟タンパク質 (39kDa) として液胞に局在し、液胞内で機能すると考えられる。AmAS1 の液胞局在性は AmAS の NTPP と GFP のキメラタンパク質の一過的発現解析によっても支持された。液胞は典型的な酸性細胞小器官であるために、低い至適 pH (5.4) を持つ AmAS1 の酵素活性に適切な環境だと言える。さらに、AmAS1 の基質であるカルコンは非常に不安定なフラボノイドであり、細胞質のような中性付近では非酵素的に異性化してしまう。あるいは細胞質タンパク質の CHI によって容易に異性化され無色のフラバノンに代謝される。したがってカルコンにとって液胞は CHI が存在せず、また安定して存在できる環境であることから、液胞内腔がオーロン合成の場と考えるのが妥当である。

AmAS1 活性は、プロセッシング前の前駆タンパク質と思われる 67kDa のバンドとは共存しなかった。したがって 67kDa の前駆タンパク質は活性がなく、プロセッシングが AmAS1 の酵素活性に関与していることが考えられる。AmAS1 の CTPP には AmAS1 の液胞局在性には関与しなかったが、AmAS1 の活性化機構に関与しているかについては今後明らかにされるべき興味深い点である。小胞体およびゴルジ体はともに大小二つのピークとして検出され、それぞれ 39kDa および 67kDa の両バンドと一致していた。ディファレンシャル遠心分離の結果、小胞体と AmAS1 活性が分離したことから少なくとも AmAS1 は、分泌小胞を含む小胞体～ゴルジ体間でプロセッシングを受け、ゴルジ体以降で活性のあるタンパク質になると示唆される。また、AmAS1 は銅を含む糖タンパク質として精製されているが、これらのタンパク質修飾の AmAS1 活性に与える影響については今後の課題である。

3-4-2 AmAS1 の液胞輸送経路と液胞輸送シグナル解析

AmAS1 の液胞輸送シグナルはその NTPP に存在することが明らかとなった。さらにエントリー 2 の段階的欠失コンストラクト (エントリー 3 から 6) の解析結果から AmAS1 の液胞輸送には NTPP 内の 48-53 残基にわたる領域が必要であることが明らかとなった。この領域は NSLAY というアミノ酸配列を含み、既知の ssVSD と弱い相同性を示した。これまでの ssVSD シグナル解析により重要とされている 50 位の Leu 残基を Phe に置換した点変異体と、側差が大きく疎水性のアミノ酸である Tyr 残基を親水性アミノ酸である Ser に置換した点変異体は液胞へ輸送されず、細胞質および核に局在したことから、この NSLAY が NTPP としての機能を有しており、液胞輸送において重要な働きをしていることが明らかとなった。また、AmAS1 の NTPP を GFP

の C 末に配置したコンストラクト 10 においても液胞局在が確認された。したがって、AmAS1 の NTPP は位置に依存しない配列特異的なシグナルであることが示された。

AmAS1 の液胞局在は DN 型 AtSar1 との共発現により阻害された。その結果得られたネットワーク上の GFP シグナルはおそらく小胞体に局在する AmAS1-GFP キメラタンパク質であると考えられる。したがって、AmAS1 タンパク質は小胞体からゴルジ体へ輸送されている。また、AmAS1 は液胞へ輸送される前に、多数の小さな細胞小器官において観察されたが、この細胞小器官がゴルジ体であることが AVP2-mRFP との共発現解析により明らかとなった。AmAS1 は糖タンパク質として精製されたが、小胞体からゴルジ体を經由する間に糖修飾を受けているものと考えられる。

一方、DN 型 AtSar1 は PAP1 の色素体への輸送には影響を与えなかった。したがってタマネギ表皮細胞においても Sar1-GTPase は小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送を特異的に制御している。PAP1 の局在したタマネギ表皮細胞の色素体はゴルジ体と比べ大きな細胞小器官であった。興味深いことにこの小器官は鞭毛のような細い部分を有していた(図 3-7)。しばしばこの鞭毛用部分の中にも小さな蛍光の強い球状部分が認められた。タマネギの地下組織部分での色素体の構造および機能は不明な部分が多いが、この鞭毛が特徴的な色素体の構造は興味深く、今後の色素体研究の進展が待たれる。

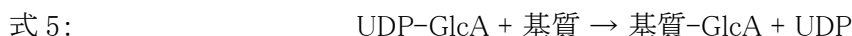
以上の結果は初めて PPO タンパク質が小胞体、ゴルジ体を経て液胞に輸送されることを明らかにした。それと同時に、AmAS1 によるオーロン生合成は液胞で行われることを強く支持する。これまで一般的なフラボノイド色素は細胞質で合成された後、液胞に運ばれて貯蔵されることが考えられてきたが、ここで得られた結果は、液胞内腔においてもフラボノイド骨格の合成が行われているという極めて新しい知見である。また、AmAS1 過剰発現トレニアにおいてオーロンが生成されなかった理由は、基質であるカルコンと酵素である AmAS1 の細胞内コンパートメントが異なることに起因する考えられる。

第4章 カルコン 4'位配糖化酵素遺伝子のクローニングと機能解析

4-1 序論

フラボノイド色素は最終的に配糖体として液胞に蓄積しており、配糖化はフラボノイド色素の易溶化に関わっていると考えられている。また、配糖化は膜局在性の輸送体タンパク質の認識部位やアシル基の転移部位を色素に提供し、また、分子内およびコピグメントとの分子間複合体形成にも必要とされるため、花色発現に直接関わる重要なフラボノイド修飾である。実際に、多くのアントシアニン色素はその 3 位の水酸基が配糖化されており、一方でオーロンは 6 位の水酸基が配糖化された形で液胞内に蓄積していることが知られている。オーロンの 6 位はカルコンの 4'位およびアントシアニンの 7 位に対応する (Harborne and Baxter, 1999)。

一般に配糖化反応は配糖化酵素 (Uridine diphosphate(UDP)-glucuronosyltransferases ; UGTs) と呼ばれるヒトから植物まで幅広く保存されている酵素に触媒される (Ross, *et al.*, 2001; Sawada *et al.*, 2005)。ヒトゲノム解析により、27 種の UGT が見つかった。UGAT は以下の反応式で表されるように、UDP-グルクロン酸 (UDP-GlcA)を糖供与体として基質分子にグルクロン酸(GlcA)を転移し、GlcA との複合体 (glucuronoside) を形成する反応(グルクロン酸抱合)を触媒する。植物細胞においては多くの場合、UDP-グルコースが糖供与体として利用されることが多く、それらは UDP-glycosyltransferases (UGTs)と呼ばれる。



植物は、基質、糖供与体、および転移する部位に対応した多種多様な UGT 遺伝子を備えている(Lim and Bowles, 2003)。これまでにフラボノイドの配糖化に関わる UGT 遺伝子も数多く報告されている。二次代謝産物に限らず、内因性植物ホルモンや外来毒性化合物に対して働く配糖化酵素遺伝子についても同定されており、配糖化酵素は二次代謝経路のみならず生長制御や生体防御に関わっていることが明らかになっている(Lim and Bowles, 2003)。ゲノムが解読されたシロイヌナズナには 107 個の配糖化酵素様遺伝子が同定されているが、それらのほとんどの基質特異性および生理機能は不明である (Ross, *et al.*, 2001; Li, *et al.*, 2001)。このように大きなファミリーを形成し、生物界に幅広く分布する UGT 遺伝子を管理するために国際チームが発足し、個々の UGT に対して、それが由来する種や生化学的な機能に関わらず、遺伝子の一次配列を元に UGT 番号が割り振られる(Ross, *et al.*, 2001)。

F3'H および F3',5'H,IFS, FNS, C4H などのフラボノイド生合成経路の酵素が属するチトクローム P450 スーパーファミリーと同様に UGT 遺伝子にもスーパーファミリーを形成していることが知られている。一般的に UGT の方が P450 よりも幅広い基質特異性を持ち、同じ基質に対

して複数の UGT 分子種が作用することが知られているため、真の基質を同定することは容易ではない。しかしながら、これまでに蓄積された配糖化酵素の生化学的な知見と系統解析から、基質特異性と一次配列の保存性の間に種を超えて一定の相関があることが知られている (Tukey and Strassburg, 2000)。例えばアントシアニジンの 3 位に配糖化する 3GT と呼ばれる UGT とアントシアニンの 5 位に配糖化する 5GT と呼ばれる UGT は種を超えて保存されている。すなわち、UGT スーパーファミリーにおいては基質特異性と一次構造の間に相関がある。このことは配糖化酵素遺伝子の基質特異性は種分化の前に獲得され、保存されていると考えられる。従って、機能既知の配糖化酵素遺伝子のホモロジーを利用して目的の種から単離することは現在の分子生物学の技術水準を持ってすれば困難ではない。

哺乳類の配糖化酵素には膜貫通ドメインおよび粗面小胞体局在シグナルが存在するのに対して、植物の配糖化酵素には膜結合や膜貫通ドメインは見つかっていない。従って植物の配糖化酵素は細胞質に局在する可溶性タンパク質であると考えられている (Lim and Bowles, 2004)。UGT 遺伝子構造は大きく N 末と C 末のユニットに分けられる。ブドウ科ブドウ由来フラボノイド 3 位配糖化酵素 (*Vitis vinifera* L., cv. Shiraz, UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase; VvGT1) の結晶構造解析から、VvGT1 構造は GT-B フォールドと呼ばれる N 末ユニット(7-250 残基)および C 末ユニット(260-437 残基)の二つの Rossmann-like ($\beta/\alpha/\beta$)ドメイン構造から構成されることが知られている (Offen, *et al.*, 2006)。糖供与体である UDP-グルコースおよび糖受容体であるフラボノイドは、この二つの Rossmann-like ドメインの間に形成される基質ポケット内に取り込まれる。これまでに知られている植物二次代謝経路に関わる配糖化酵素の C 末付近には Plant Secondary Product GT consensus sequence (PSPG)-box と呼ばれる高く保存された約 45 アミノ酸残基からなるドメインがある (Vogt and Jones, 2000)。PSPG-box のコンセンサス配列は [WF]-2X-Q-2X- [LIVMYA]- [LIMV]-6X-[LVGAC]-[LVFYA]-[LIVMF]-[STAGCM]-[HNQ]-[STAGC]-G-2X-[STAG]-3X-[STAGL]-[LIVMFA]-4X-[PQR]-[LIVMT]-3X-[PA]-3X-[DES]-[QEHN] で表される。VvGT1 の結晶構造解析から、PSPG-box を構成するほとんどのアミノ酸残基は C 末の構造の保持に関与しているだけだが、PSPG の C 末側の D374 や Q375 など一部のアミノ酸が糖供与体の認識に関わる重要な残基であり、D374A 点変異体はその配糖化活性を失う (Offen, *et al.*, 2006)。

黄色キンギョソウ花卉の主要黄色色素はオーレウシジンの 6 位配糖体である。AmAS1 が液胞タンパク質であることからオーロン合成は液胞内で行われると考えられる (磯野 2002; 渡辺 2006)。したがって、オーロン合成には細胞質で合成されたカルコンを液胞へ輸送する機構が関与しているはずである。AmAS1 はカルコンのアグリコンのみならず、その 4' 位配糖体を基質にオーロン 6 位配糖体を生成する活性を有している (佐藤 2000; Nakayama, *et al.*, 2000)。また、そのオーロン合成活性はアグリコンを基質にした場合と比べ二倍以上高い。さらに、オ

オーロン 6 位配糖体の蓄積に先立って、キンギョソウ花卉内ではカルコン 4' 位配糖体の蓄積が確認されている (Sato, *et al.*, 2001; Nakayama, *et al.*, 2001)。以上の状況証拠から、①生体内における AmAS1 の基質はカルコンのアグリコンではなく、4' 位配糖体である、また、②カルコンの配糖化はカルコンの安定化および液胞への輸送に関与し、オーロン合成に必要であるという作業仮説を立てた (図 4-1)。しかしながら、これまでにカルコン 4' 位配糖化酵素 (4'-*O*-chalcone glucosyltransferase; 4' CGT) の活性が確認されたり、4' CGT をコードする遺伝子が単離されたりした報告はないため、その一次配列を類推することはできない。

そこで、植物のフラボノイド配糖化酵素遺伝子の PSPG-box ドメインを含む高い保存配列をプローブとして黄色キンギョソウ花卉由来 cDNA ライブラリーからキンギョソウ配糖化酵素様遺伝子 (*Antirrhinum majus* UGT; AmGT) を網羅的に取得した。UGT タンパク質の発現系には大腸菌、酵母、リンパ芽球、バキュロウイルス系などが利用されるが、植物 UGT の場合は可溶性タンパク質であるため、簡便で大量の組み換えタンパク質が得られる大腸菌発現系を用いて発現させた。カルコン中性付近の pH の水溶液中では容易に異性化してしまうため、樹脂に固定化する反応系を新たに開発した。樹脂に固定化したカルコンと組換え AmGT タンパク質とを反応させ、その反応物を HPLC 分析することで Am4' CGT 遺伝子の同定を試みた。

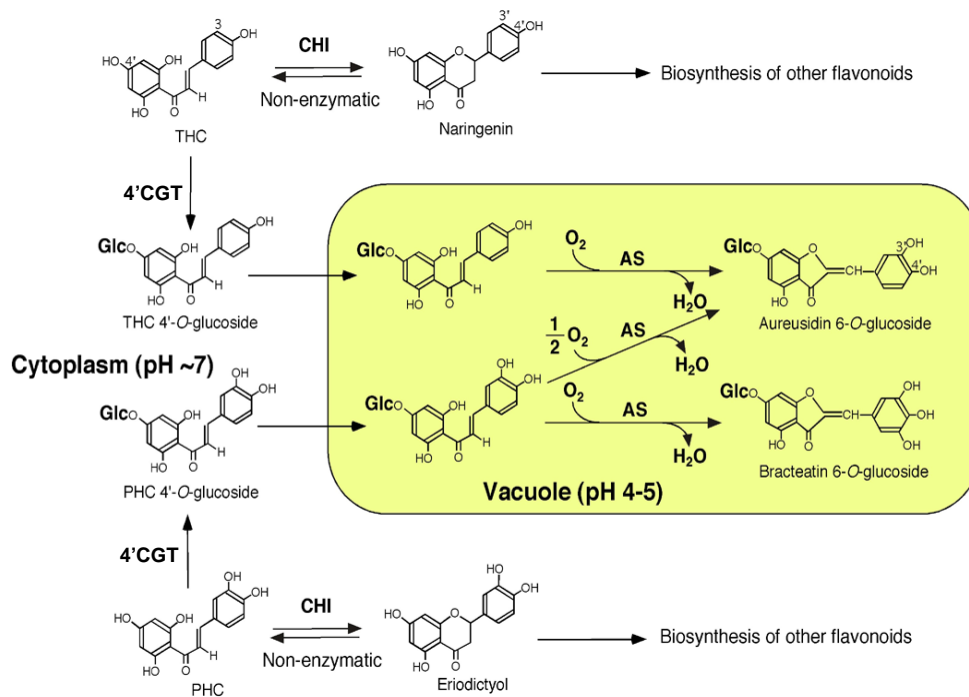


図4-1 オーロン生合成経路の作業仮説

①AmAS1の至適pHは5.4と低い。②カルコンは中性付近のpHで非酵素的に異性化される。③AmAS1-GFPキメラタンパク質は液胞内腔へ輸送される。④液胞にはCHIは存在しない。⑤AmAS1はカルコン4'位配糖体を基質にオーロン6位配糖体を生成し、その活性はアグリコンよりもむしろ高い。以上の結果から、オーロン合成は液胞内腔で行われ、AmAS1の真の基質はカルコン4'位配糖体であるという作業仮説を立てた。

4-2 材料および方法

4-2-1 cDNAライブラリースクリーニング

市販の黄色キンギョソウ品種であるバタフライイエローの新鮮な花卉由来から RNeasy for Plant kit (QIAGEN)を用いて製造業者が推薦する方法でトータル RNA を抽出し、引き続き、Oligotex dT-Mag kit (TaKaRa Bio) を用いて mRNA を精製した。この mRNA 5 μ g を用いて、 λ ZAP Express-cDNA synthesis kit (Stratagene) を用いて製造業者が推薦する方法で cDNA ライブラリーを構築した。得られた cDNA ライブラリーは、 1.6×10^5 plaque forming unit (pfu) からなっていた。既知の UGT のアミノ酸配列を比較し、これらのアミノ酸配列の保存領域に相当する塩基配列を増幅し、これをプローブとしてキンギョソウ cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングした。フラボノイド生合成経路に AmGT をより網羅的に取得するため、異なるサブファミリーに属する 5 種の UGT をプローブとして採用した。プローブに用いた UGT はヒルガオ科アサガオ (*Ipomoea nil*) 由来の UDP-グルコース:アントシアニン 3-グルコシド糖転移酵素 (3GGT) (Accession No. AB192314, Morita, *et al.*, 2005)、ナス科ペチュニア (*Petunia hybrida*) 由来フラボノイド 3GT (Accession No. AB027454)、クマツヅラ科バーベナ (*Verbena hybrida*)

由来フラボノイド 5GT (Accession No. AB013598)、シソ科コガネバナ(*Scutellaria baicalensis*)由来 7GT (Accession No. AB031274)、リンドウ科リンドウ (*Gentiana triflora*) 由来の UDP-グルコース:アントシアニン 3'-糖転移酵素(3'GT)(Accession No. AB 076697, Fukuchi-Misutani, *et al.*, 2003) の 5 種である。それぞれ UGT について、PSPG-box を含む C 末の保存された領域の配列を増幅できるように以下に示す一組のオリゴヌクレオチドを合成した。

アサガオ 3GGT(In3GGT-Fw: 5'-GAA ATG GTC GGA TTG GCT GGG-3'; In3GGT-Rv: 5'-ACC TCC ACC CCA ACT TTC AGG-3'), ペチュニア 3GT(Ph3GT-Fw:: 5'-GAT GCA TAA TTT GGC TAG AAA AGC-3'; Ph3GT-Rv: 5'-CCA ATT TGC CAA ACA CTT TCC-3'), バーベナ 5GT(Vh5GT-Fw: 5'-TGC CTC GAA TGG TTG AGC ACG-3'; Vh5GT-Rv: 5'-CTC TCA CTC TCA CAC CCG-3'), コガネバナ GT(Sb7GT-Fw: 5'-CAC GAA TGC TTA GCA TGG CTC-3'; Sb7GT-Rv: 5'-CTT ATT GCC CAC TGA AAC CCC-3'), リンドウ 3'GT (Gt3'GT-Fw:5'-TGT CTG AAT TGG CTT GAT TCC-3'; Gt3'GT-Rv:5'-AAC CCA CAG AAA CCC CTG TTC-3')

プローブはノンラジオアイソトープ DIG-核酸検出システム(Roche)を用いて、製造者が推奨する条件に従い PCR によりラベルした。PCR 反応液(25 μ l)は、それぞれの UGT の cDNA を含むプラスミド 1ng, 1x ExTaq buffer (TaKaRa Bio), 0.2mM dNTPs, 上記の UGT 特異的プライマー各 0.2 pmol/ μ l, ExTaq polymerase 1.25 U からなる。95°C1 分、55°C1 分、72°C2 分からなる反応を 1 サイクルとし、これを 25 サイクル行った。各遺伝子の PCR 増幅産物は、Sephadex G-50 Quick Spin Columns for radiolabeled DNA Purification(Roche)を用いて未反応の DIG およびプライマーを除去した後、これら 5 種の PCR 産物を等量ずつ混合したものをハイブリダイゼーションのプローブとして、前述の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。

ハイブリダイゼーションは、30%ホルムアミドを含む 5XSSC 中、37°Cで一晩行い、フィルター
の洗浄は 5x SSC, 1%SDSを用いて 55°Cで 30 分間行った。約 30 万プラークをスクリーニングし、
一次スクリーニングで少なくとも計 500 個以上の陽性プラークを単離した。これらのクローンに
対して二次スクリーニングを行い、陽性のシングルプラークとして単離した。これらシングルプラ
ークを鋳型に PCR 反応を行い、増幅されたインサートをダイレクトシーケンシングすることで部分
塩基配列を得た。得られた塩基配列を Assembly LIGNx プログラム(Accelrys)でアライメントした
結果、18 種類の AmGT に集約された。DNA Sequencer model 3100 (Applied Biosystems) を用
い、合成オリゴヌクレオチドプライマーによるプライマーウォーキング法によってこれら 18 種の
cDNA の全塩基配列を決定した。なお、クラスター解析に使用したソフトウェアは MacVector
ver.7.2.2 (Accelrys)に含まれる ClustalW で、条件は、Matrix Blosum 30、ketuple:1、Gap
penalty:3、Topdiagonals :5、Windows Size:5 で行った。

4-2-2 遺伝子発現解析

黄色キンギョソウ花卉および後に述べる形質転換トレニアにおける遺伝子発現を Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法 によって解析した。オーロンを蓄積する黄色キンギョソウ(バタフライイエロー品種)の花弁を成長段階に沿って 6 ステージに分離した(Sato, *et al.*, 2001)。分離した各花卉 1gからRNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNAを抽出した。得られた RNA 1 μ g を鋳型として逆転写反応を行い、cDNA を得た。cDNA 合成にはSuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen社)を製造業者が推奨する条件に従って使用して、総RNA 1 μ g からcDNAを合成した。PCR反応液(50 μ l)は、各cDNA 1 μ l、1 \times Taq buffer(TaKaRa)、0.2mM dNTPs、下記の遺伝子特異的プライマー各0.4pmol/ μ l、rTaq polymerase 2.5Uからなる。PCR反応は94°Cで5分間反応させた後、94°Cで1分間、53°Cで1分間、72°Cで2分間の反応を 30 サイクル行った。PCR産物を0.8%アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し増幅断片を検出した。キンギョソウおよびトレニアのグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)遺伝子を内部標準遺伝子として用いた。以下に本研究に用いた遺伝子発現解析に合成したプライマーを示す。

キンギョソウ由来 GAPDH(Accession No. X58517)(AmGAPDH-F: 5'-TGT TGC TGT TAA CGA TCC AT-3'; AmGAPDH-R: 5'-AGC TCT TCC ACC TCT CCA-3')、キンギョソウ由来オーレウシジン合成酵素(Accession No. AB044884)(AmAS-F: 5'-AAT TAT TTC CCA ATG TTC AAA AAT-3'; AmAS-R: 5'-TGG AGC TTT AGG TTT GTG AAA-3')、キンギョソウ由来カルコン合成酵素(Accession No. CAA27338) (AmCHS-Fw: 5'-GGC GGA AAA CAA TGC C-3'; AmCHS-Rv: 5'-CCA ATA TGA CTC ACA T-3')、キンギョソウ由来カルコン異性化酵素(Accession No. M68326) (AmCHI-Fw: 5'-GGG GGA TCC ATG GCT GAG ATC ACC CAA ATT CAG GTC GAA T-3'; AmCHI-Rv: 5'-GAA AGG TAC CTC GAG TCA CAT CCT AGT TGT GTT CTC TAC TTT ACA TGG TTT-3')、キンギョソウ由来カルコン4'位配糖化酵素 (Accession No. AB198665) (AmGTcg12-Fw: 5'-ATG GGA GAA GAA TAC AAG AAA AC-3'; AmGTcg12-Rv: 5'-TCT TAC GAT AAA ACA AAC TCA-3')、キンギョソウ由来ジハイドロフラボノール還元酵素(Accession No. P14721) (AmDFR-Fw: 5'-ACT CTA ATT ATG AGT CCC ACT TCA-3'; AmDFR-Rv: 5'-ACT CTA ATT ATG AGT CCC ACT TCA-3')、キンギョソウ由来フラボノイド 3 位配糖化酵素(Martin, *et al.*, 1991) (Am3GT-Fw: 5'-GTT CCT AAT CCT TAA TCT AAC-3'; Am3GT-Rv: 5'-CCG AGT TCC ACC CGC AGT GCG-3')。

4-2-3 サザンブロット解析

半定量的な RT-PCR 解析に際しては、前述の PCR のサイクルを 12 サイクルとし、PCR 産物を 0.8% アガロースゲルで電気泳動し、メンブレンに転写してハイブリダイゼーションによる検出を行った。また、ゲノミックサザン解析においては、キンギョソウおよび形質転換トレンシアの葉、約 1g から Phytopure Plant DNA Extraction kit(Amersham)を用い、製造業者推奨の方法によってゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA 各 20 μ g を制限酵素 EcoRI, XbaI, HindIII, KpnI あるいは NcoI(TOYOBO)で 37°C で一晩完全消化した後、0.7% アガロースゲル電気泳動にて分離し、メンブレンに転写してハイブリダイゼーションによって検出した。

PCR 産物または制限酵素処理済みのゲノミック DNA を電気泳動したアガロースゲルを 0.25M HCl を用いて 15 分間加水分解した後、1.5M NaCl/0.5M NaOH の溶液を用いて 30 分間変性させ、1.5M NaCl を含む Tris-HCl (pH7.5) によって 20 分間中和した。次いで、アガロースゲル内の DNA を、20×SSC 溶液中にて Hybribond-N メンブレン (Amersham) に転写した。メンブレンに転写したゲノム DNA を UV 照射によりメンブレンに結合させ、7% SDS、50% ホルムアミド、5×SSC、2% ブロッキング試薬、0.1% ラウロイルサルコシン、50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) からなる高 SDS ハイブリダイゼーション緩衝液 (Roche) を用いて、42°C で 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションに用いるプローブは上記の遺伝子特異的プライマーを用いて PCR による DIG 標識化した PCR 産物を用いた。Am4'CGT および AmAS1 遺伝子のゲノミックサザン解析にはそれぞれ Am4'CGT-probe-Fw (5'-ATG GGA GAA GAA TAC AAG AAA AC-3') と Am4'CGT-probe-Rv (5'-TCT TAC GAT AAA ACA AAC TCA-3') のプライマーの組み合わせと、AmAS1-probe-Fw (5'-AAT TAT TTC CCA ATG TTC AAA AAT-3') と AmAS1-probe-Rv (5'-TGG AGC TTT AGG TTT GTG AAA-3') のプライマー組み合わせをプローブのラベリングに用いた。

DIG ラベルのための PCR 反応液は、目的遺伝子を含むプラスミド 1ng、1×PCR 緩衝液 (TaKaRa Bio)、2.5mM DIG-dNTP mixture (PCR DIG labeling Mix, Roche)、0.2pmol の各プライマー、1U rTaq polymerase (TaKaRa Bio) からなる。PCR 反応を、95°C で 30 秒間、53°C で 30 秒間、72°C で 2 分間の反応を 30 サイクル行った。Sephadex G-50 カラム-Fine (Roche) を用いて精製した PCR 産物をハイブリダイゼーションプローブとして用いた。このプローブを熱変性した後、プレハイブリダイゼーション液に 15 μ l 添加して、42°C で一晩インキュベートした。メンブレンの洗浄は高ストリンジェントな条件 (0.2×SSC および 0.1% SDS を含む溶液を用いて 65°C で 30 分間を 2 回) によってメンブレンを洗浄した。DIG ラベリング & デテクションキット (Roche) を製造業者の推奨する方法で、ハイブリダイズしたシグナルを検出した。

4-2-4 大腸菌による組み換え AmGT タンパク質の発現、および酵素反応

スクリーニングによって得られた AmGT 遺伝子は、大腸菌発現系を用い各 cDNA にコードされるタンパク質の酵素活性の測定を調べた。まず、各 cDNA の推定開始メチオニンコドンに重なる様に NcoI(CCATGG)サイトを PCR で導入し、開始メチオニンから終止コドンに至る領域を大腸菌発現ベクター pQE61(QIAGEN)の NcoI および KpnI サイトに連結した。開始メチオニンに重なる NcoI サイト導入のための PCR 反応液 (25 μ l) は、各 AmGTcDNA を含むプラスミド (pBluescript SK-)を鋳型とし、開始メチオニン部位に重なる NcoI 認識配列を導入したプライマー、及び逆向きの KpnI サイトを付加したプライマー各 0.2 pmol/ μ l, 1x ExTaq buffer (TaKaRa Bio), 0.2mM dNTPs, ExTaq polymerase 1.25 U からなる。反応は、94°C で 5 分反応させた後、94°C、1 分、55°C、1 分、72°C、2 分の反応を 28 サイクル行い、最後に 72°C で 5 分間保持した。AmGTcg12(UGT88D3)にコードされる cDNA については NcoI-AmUGT12-Fw (5'-TCC ATG GGA GAA GAA TAC AAG AAA ACA-3') ならびに KpnI-AmUGT12-Rv (5'-TGG TAC CTA AAA TTT GGT AGT TAA ACC GAT GTA-3') の二種のプライマーを用いて PCR を行い、開始メチオニン部位に重なる NcoI サイトと、終始コドンの 3' 側下流に KpnI サイトを導入した。増幅された DNA 断片 (約 1.5Kb) を pCR2.1 TOPO vector (INVITROGEN) にサブクローニングし、PCR 反応によるエラーがないことをシーケンス解析により確認した。その後サブクローニングした cDNA を NcoI と KpnI で切り出し、pQE61 の NcoI および KpnI サイトに挿入し、大腸菌発現ベクターを構築した。

大腸菌発現ベクターを大腸菌 JM109 株 (TOYOBO) に常法に従って形質転換し、組換え大腸菌を 37°C で終濃度 20ug/ml のアンピシリンを含む LB 培地で一晩前培養した。前培養液の一部をアンピシリン 50 μ g/ml, カザミノ酸 0.5% を含む M9 培地、10ml に加え A600=0.6-1.0 に達するまで培養した後、IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) を終濃度 0.1mM になるよう加え、さらに 27°C で一晩振とう培養し、3000rpm, 10 分間、4 で遠心し、集菌した。菌体を 10ml の緩衝液 (30mM Tris-HCl pH7.5, 30mM NaCl) に懸濁し、超音波処理により大腸菌を破碎した後、15,000rpm, 10 分、4°C で遠心分離を行い、得られた上清を粗酵素液とし、以下の活性測定に用いた。

基質であるカルコンは中性付近の pH の溶液中では非常に不安定であり、速やかに異性化してしまい。そこでカルコンを樹脂に固定化することで異性化防ぐアッセイ系を構築した。蒸留水で平衡化済みの逆相樹脂、TOYOPEARL HW-40F (TOSOH) 1ml に THC (500 μ g/ml エタノール溶液) を蒸留水で希釈しながら負荷した後、水洗することにより、樹脂固定された基質 THC を得た。この樹脂固定された THC 100 μ l に大腸菌由来の粗酵素液 200 μ l および 5mM 糖供与体である UDP-glucose 10 μ l を加え、30°C で 30 分間反応させた。

4-2-5 HPLC によるカルコン分析

酵素反応液を遠心して上清を除去後、反応済みの樹脂を水洗し、0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)を含む 50%アセトニトリル 300 μ lを加え反応停止させ、超音波処理によりフラボノイドを樹脂より遊離した。15,000 rpm、5分、4°Cで遠心分離し、得られた上清をMillex-LHフィルター(ポアサイズ 0.45mm、4mm、Millipore)を用いて不溶物を除去して、上清を逆相液体高速クロマトグラフィー(HPLC)分析に供した。カラムは YMC-ODS-A312(6mm ϕ x150mm、株式会社ワイエムシー)を用いて、移動相にはA液として2%酢酸を含むH₂O、B液としてメタノールを用い、B液15%からB液40%の直線濃度勾配22分間の溶出後、B液40%で5分間維持し、さらにB液40%からB液62%の直線濃度勾配14分間の溶出の後、B液62%で2分間維持した。流速は1.0 ml/min.で行った。検出はカルコンの吸収極大である360 nmにおける吸光度、及びPDA検出器SPD-M10A VP(島津製作所)による250-600nmの吸収スペクトルにより行った。この条件で、標品であるTHCは保持時間38.2分、PHCは32.4分、THC 4'位配糖体は30.0分、THC 2'位配糖体は27.7分、PHC 4'位配糖体は24.3分に溶出される。

4-2-6 UGT88D3 -sGFP 融合キメラ遺伝子の構築

UGT88D3のcDNAを鋳型にSalI-Am4'CGT-Fw(5'-TTT **GTC GAC** ATG GGA GAA GAA TAC AAG AAA-3')と、NcoI-Am4'CGT-Rv(5'-CAC **CAT GGA** CAG AGT GAC CGA GTT GAT GAA CTT CTC CAA AGA-3')を用いてPCR増幅し、5'および3'末端にそれぞれSalIとNcoIのサイトを導入した。プライマー各0.2 pmol/ μ l, 1x KOD buffer (TOYOBO), 0.2mM dNTPs, KOD plus polymerase 1.0 Uからなる。反応は、95°Cで3分反応させた後、95°C、30秒、54°C、30秒、68°C、1分30秒の反応を28サイクル行った。増幅されたDNA断片(約1.5Kb)をpCR-Zero Blunt II TOPO vector (INVITROGEN)にサブクローニングし、PCR反応によるエラーがないことをシーケンス解析により確認した。その後サブクローニングしたcDNAをSalIとNcoIで切り出し、sGFP/pUC18ベクター(エンター1)のSalIおよびNcoIサイトに挿入し、N-Am4'CGT-sGFP-Cキメラ遺伝子を得た。第三章の3-2-6および3-2-7の方法に倣って本キメラ遺伝子とエンター9をキンギョソウ花弁表皮細胞に一過的に共発現させた。

4-3 結果

4-3-1 キンギョソウ配糖化酵素様遺伝子の単離および構造解析

500 超の陽性プラークの二次スクリーニングの結果、最終的に 18 種類のキンギョソウ由来配糖化酵素遺伝子ホモログ(AmGT)を取得した(図 4-2)。各クローンの完全長塩基配列を決定した結果、このうちの一つは既知のアントシアニン 3 位配糖化酵素遺伝子(Am3GT / UGT78B2)であったが(Martin, *et al.*, 1991)、それ以外は新規配糖化酵素遺伝子であった。

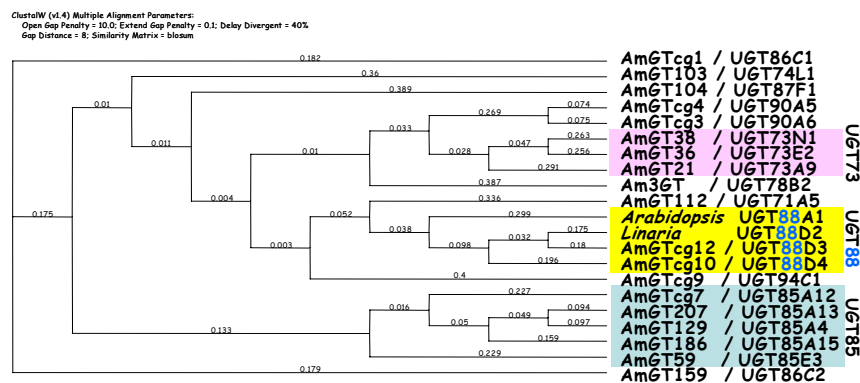


図4-2 キンギョソウ由来配糖化酵素遺伝子(AmGT)の系統樹

cDNAライブラリースクリーニングにより18種の新規AmGT遺伝子を単離し、Clustal-Wプログラムにより系統樹を構築した(Thompson, *et al.*, 1994)。Am4'CGT/UGT88D3を含むUGT88ファミリーを黄色で示す。各枝に示される数値はアミノ酸配列の違いを表す(例えば0.05は5%のアミノ酸の違い)。

これらの AmGT 遺伝子群のキンギョソウ花卉における発現パターンを半定量的 RT-PCR/サザンブロット法により解析を行った。その結果、AmAS1 と非常に類似した遺伝子発現パターンを示す AmGTcg12 を同定した。AmGTcg12 および AmAS1 は花卉生長に伴って徐々に発現量が上昇し、花卉ステージ 5 においてピークを迎え、成熟した花であるステージ 6 においては発現がやや減少した(図 4-3)。この遺伝子発現パターンはキンギョソウ花卉生長に伴うカルコン 4'位配糖体およびオーロン 6 位配糖体の蓄積パターンと一致した(Sato, *et al.*, 2001)。一方、フラボノイド生合成初期の酵素遺伝子である AmCHS/*Nivea* は花卉成長初期(ステージ 1)において既に高い発現を示し、花卉形態形成時において構成的に発現していた。AmCHI は花卉ステージ 3 には既に発現のピークを迎え、その後減少していた。一方、アントシアニン生合成酵素遺伝子である AmDFR/*Pallida* や 3GT 遺伝子は成熟花卉であるステージ 6 において強く発現した。また AmANS/*Candica* についても同様の発現パターンを示した(データ不示)。

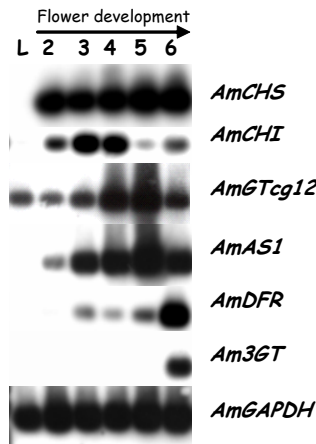


図4-3 キンギョソウ花弁生長におけるフラボノイド構造遺伝子の発現解析
各組織から調整したRNAを用いて半定量的なRT-PCR/サザンブロット解析によりキンギョソウフラボノイド合成酵素遺伝子の発現量を検出した。L; 成熟葉、花弁ステージはSato, *et al.*, 2001において規定されている。キンギョソウ配糖化酵素遺伝子ホモログAmGTcg12 / UGT88D3 はAmAS1遺伝子と協調的な発現パターンを示した。

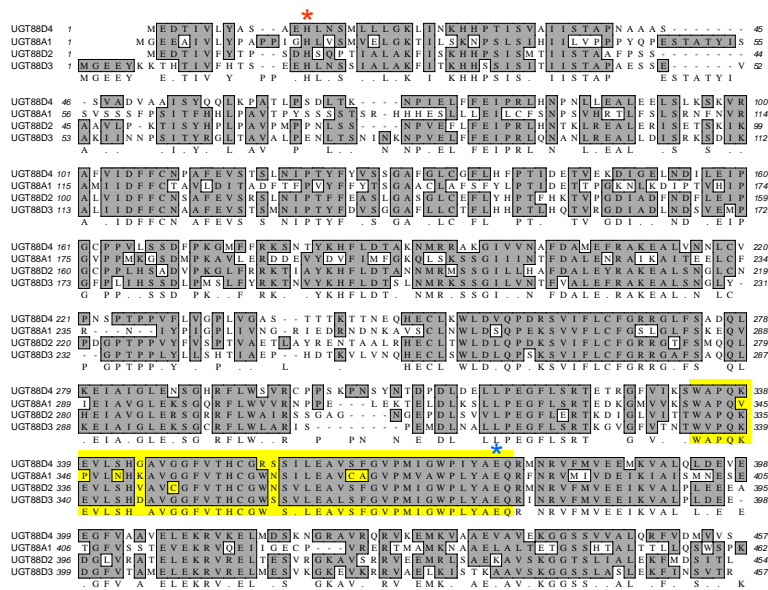


図4-4 UGT88Dサブファミリー遺伝子の構造解析
キンギョソウ由来配糖化酵素遺伝子であるUGT88D3/AmGTcg12、およびUGT88D4/AmGTcg10に加え、リナリアUGT88D3ホモログとして単離したUGT88D2、シロイヌナズナにおいてUGT88D3と最も高い相同性を示す機能未知のUGT88A1の4種のUGTをアライメントした。Plant Secondary Product GT Consensus Sequence (PSPG-box)は黄色で示す ([WF]-2X-Q-2X-[LIVMYA]-[LIMV]-6X-[LVGAC]-[LVFYA]-[LIVMF]-[STAGCM]-[HNQ]-[STAGC]-G-2X-[STAG]-3X-[STAGL]-[LIVMFA]-4X-[PQR]-[LIVMT]-3X-[PA]-3X-[DES]-[QEHN])。Xは全てのアミノ酸が当てはまる。下線部はUGT88D3におけるアミノ酸を示す。N末付近の赤色アスタリスクは基質の標的水酸基の脱プロトン化を触媒すると考えられているHis残基 (Offen, *et al.*, 2006)。PSPG-boxのC末側に位置する青色アスタリスクはUDP-glucoseと結合し、配糖化活性に必須と考えられているGlu残基 (Offen, *et al.*, 2006)。

Blastx 解析の結果、AmGTcg12 はこれまでに知られているフラボノイド配糖化酵素遺伝子とは顕著な相同性を示さず、シロイヌナズナの機能未知の配糖化酵素遺伝子 UGT88A1 と最も高い 40% の配列同一性を示し、UGT88D3 と分類された。UGT88D3 は植物二次代謝に関わる UGT において保存されている PSPG ドメインを有していた (図 4-4) (Vogt and Jones, 2000)。cDNA から推定された UGT88D3 タンパク質は 457 アミノ酸から構成され、推定 pI は 6.82 とこれまで知られている植物 UGT の中では顕著に高かった。ヒト UGT 遺伝子は複数のエクソンから構成されているが、シロイヌナズナ UGT の半数以上はイントロンを持たない。キンギョソウのゲノム DNA から PCR によって単離した UGT88D3 のゲノミッククローンはイントロンを有していなかった。一方、シロイヌナズナ由来 UGT88A1 はイントロンを一つ有していた。サザンブロット解析により UGT88D3 は複数のバンドとして検出されたため、キンギョソウゲノムにおいて UGT88D3 と相同性の高い複数の遺伝子の存在が示唆された (図 4-5)。一方、AmAS1 はシングルコピーの遺伝子であった。

これまでに黄色キンギョソウ花弁から抽出した粗酵素内にカルコン 4' 位配糖化活性を検出している。この活性が 25mM リン酸カリウム緩衝液中 (pH7.0) において、通常の UGT が吸着する Hi-Trap Q カラムに吸着しないことから、カルコン 4' 位配糖化酵素が比較的高い等電点 (isoelectric point : pI) を有していることを予想していた (データ不示)。クローン化した他の AmGT は全て 4.73 から 5.89 の範囲の推定 pI を示すのに対して、UGT88D3 の推定 pI は 6.8 と顕著に高く、吸着カラム内での挙動と一致する。このことから UGT88D3 遺伝子がカルコン 4' 位配糖化酵素をコードしていると期待された。

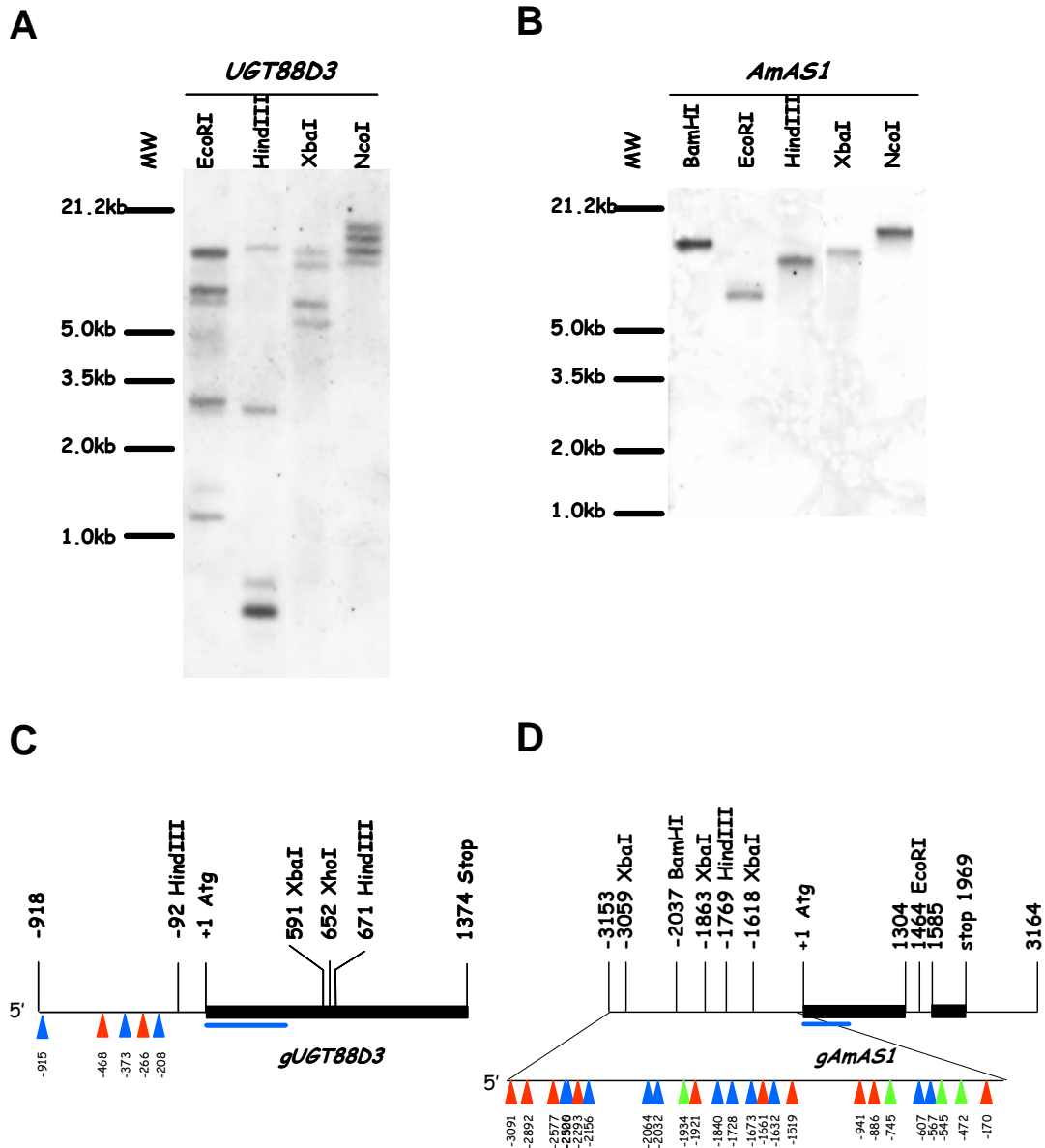


図4-5 UGT88D3およびAmAS1のゲノミックサザン解析

キンギョソウゲノミックDNA20 μ gを制限酵素消化し、PCRでDIGラベルしたプローブ(青色下線部; CおよびD)を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。(A) UGT88D3は少なくとも4本のバンドとして検出された。(B) 一方、AmAS1はいずれの制限酵素で消化した場合においても単一バンドとして検出された。(C) ゲノミックUGT88D3遺伝子の制限酵素マップ。(D) ゲノミックAmAS1遺伝子の制限酵素マップ。青 Δ 、赤 Δ および緑 Δ はPlant Cis-acting Regulatory DNA Elements(PLACE)プログラムにより予測されたmyc(bHLH)型、myb型、およびMADS box型転写因子の推定結合ドメインを示す。

4-3-2 カルコン 4'位配糖化活性測定

次に UGT88D3 の酵素活性について検討した。UGT88D3 をコードする cDNAを大腸菌において発現させた。組み換えタンパク質を発現した大腸菌を破碎し、その粗酵素液を樹脂に固定化した THC と反応させた。反応生成物を樹脂から溶出し、HPLC 分析に供した。その結果、反応液中に保持時間 38.2 分の THC の他に保持時間 30.0 分の 360nm のカルコンの吸収スペクトルを持つ生成物が得られた(図 4-6)。本生成物は反応液中の糖供与体である UDP-グルコースを除くと得られなかったためにカルコン配糖体であることが示された。THC4'位配糖体および THC2'位配糖体の標品はそれぞれ保持時間 30.0 および保持時間 27.7 分に溶出されたため、生成物は THC4'位配糖体であった。従って、*in vitro* において UGT88D3 はカルコン 4'位配糖化酵素(4'CGT)活性を有することが示された。

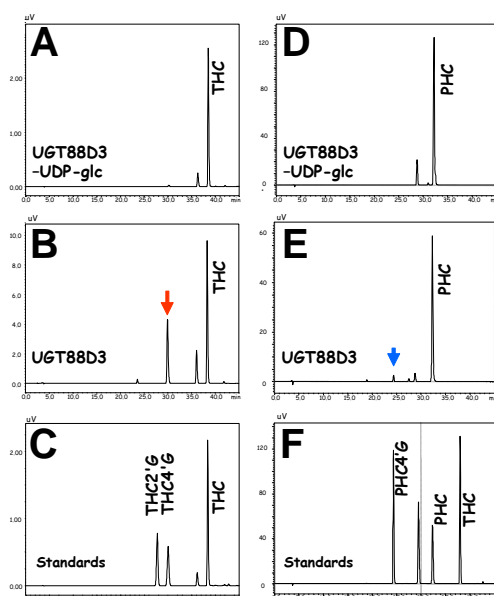


図4-6 組換えUGT88D3タンパク質の生化学的解析

大腸菌において発現させたUGT88D3組換えタンパク質とカルコンとの反応液中のクロマトグラム

(A:360nm)。 (A)UGT88D3とTHCと反応液中にはTHC(保持時間38.2分)が検出される。

(B)UGT88D3とTHCおよびUDPグルコースとの反応液中に保持時間30.0分の360nmに吸収を持つ

カルコン配糖体が検出された(赤矢印)。(C)30.0分に溶出されたカルコン配糖体はTHC4'位配糖体の標

品と保持時間が一致した。THC2'位配糖体は保持時間27.7分に検出された。

(D) UGT88D3とPHCと反応液中にはPHC(保持時間32.4分)が検出される。

(E) UGT88D3とPHCおよびUDPグルコースとの反応液中に保持時間24.3分の360nmに吸収を持つ

カルコン配糖体が検出された(青矢印)。(C)24.3

分に溶出されたカルコン配糖体はPHC4'位配糖体の標品と保持時間が一致したため、UGT88D3は

THCおよびPHCの4位に配糖化する活性を有するキンギョソウ由来カルコン4'位配糖化酵素

(*Antirrhinum majus* chalcone 4'-O-glucosyltransferase; Am4'CGT)であることが示された。

黄色キンギョソウ花卉において THC4'位配糖体以外に、PHC4'位配糖体が存在することが知られている (Sato, *et al.*, 2001)。AmAS1 にとって PHC4'位配糖体はブラクテアチン 6 位配糖体を生成する為の基質であるため、THC4'配糖体同様に花卉の黄色発現に重要なフラボノイドと言える。UGT88D3 タンパク質と PHC と反応させたところ、保持時間 32.4 分の PHC 以外に保持時間 24.3 分の 360nm のカルコンの吸収スペクトルを持つ生成物が得られ、保持時間から PHC4'位配糖体と同定された。また、この反応は反応液中の UDP-グルコースに依存した。このように UGT88D3 は THC だけでなく PHC を基質とし、THC4'位配糖体および PHC4'位配糖体を生成する活性を有するキンギョソウ由来 4'CGT であることが明らかとなった。

姫金魚草の名で知られているゴマノハグサ科リナリア (*Linaria bipartite*) の黄色花はカルコン 4'位配糖体およびオーロン 6 位配糖体が蓄積していることが知られている (Harborne and Baxter, 1999)。従って、リナリアにおいてもカルコン 4'位配糖化酵素が存在していることが示唆される。Am4'CGT の配列を基に単離したリナリア 4'CGT ホモログは UGT88D2 と分類され、その配列は UGT88D3/Am4'CGT とアミノ酸レベルで 65% の配列同一性を示し、その pI は 6.2 と高かった (図 4-3)。リナリア由来 UGT88D2 の組換えタンパク質を大腸菌において発現させ、その組換えタンパク質カルコン配糖化活性を分析したところ、PHC および THC に対する 4'位配糖化活性を有していたため (データ不示)、UGT88D2 は Am4'CGT のカウンターパート遺伝子であることが明らかとなった。

4-3-3 キンギョソウ由来カルコン 4'位配糖化酵素の細胞内局在性解析

一般的に植物の配糖化酵素は膜貫通領域や膜局在シグナルがなく、可溶性細胞質性タンパク質とされている。同じく可溶性タンパク質である CHS によってカルコンは細胞質で生成されると考えられているが、カルコンが配糖化される細胞内領域およびカルコン配糖体が蓄積する細胞内小器官についての知見はない。細胞内局在予測プログラム WoLF PSORT (<http://wolfpsort.seq.cbrc.jp/>) により Am4'CGT タンパク質のアミノ酸配列を基に細胞内局在を予測した結果、細胞質局在性の可能性が最も高いと予想された (データ不示)。

実験的にカルコン配糖化が行われる細胞内領域を同定する為に、完全長 Am4'CGT の C 末に GFP を融合した Am4'CGT-sGFP キメラ遺伝子を構築し、AmAS1(1-60)-mRFP(エンター9)と一過的にキンギョソウ花卉表皮細胞へ共発現させた。48 時間の暗所培養後、両キメラタンパク質を蛍光顕微鏡で観察した結果、Am4'CGT-GFP は細胞質に局在し、一方の AmAS1-mRFP は液胞内腔に局在した (図 4-7)。Am4'CGT-GFP の細胞質局在は GFP 単独発現細胞の蛍光パターンと比較して確認した。以上より、Am4'CGT は細胞質タンパク質であり、カルコンは細胞質で配糖化されることが示された。

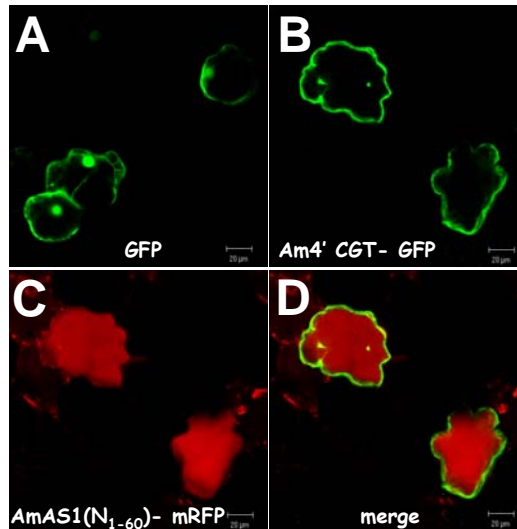


図4-7 Am4'CGT-sGFPとAmAS1(N₁₋₆₀-mRFP)の細胞内局在性解析
 完全長Am4'CGTのC末にsGFPを融合したキメラ遺伝子と、前述のAmAS1(N₁₋₆₀-mRFP)をキンギョソウ花弁表皮細胞に一過的に共発現させ、共焦点蛍光顕微鏡にて観察を行った。(A)エントリー1(sGFP)は細胞質と核に局在した。(B) Am4'CGT-sGFPは細胞質に局在した。(C) エントリー9 AmAS1(N₁₋₆₀-mRFP)は液胞内腔に局在した。(D)は(B)と(C)を重ねた像。サイズバーは20 μm。

4-4 考察

4-4-1 UGT88D サブファミリーの機能分化

キンギョソウからカルコンの4'位を配糖化酵素をコードする新規なUGT88D3 遺伝子の単離に成功した。キンギョソウ UGT88D3 は THC の4'位のみならず PHC の4'位を配糖化する活性を有していたため、キンギョソウ花弁においても THC4'位配糖体および PHC4'位配糖体の生成に関与していることが示唆される。また、リナリア属から単離した UGT88D2 においても4'CGT 活性が確認できた為、カルコン配糖化酵素の構造および機能が進化的に保存されていることが示された。

Am4'CGT 遺伝子はゲノミックサザン解析により複数のバンドとして検出されたことから、キンギョソウゲノム中において Am4'CGT と相同性の高い UGT 遺伝子が存在する可能性が示唆された。Clustal-W 系統分析の結果(Thompson, *et al.*, 1994)、スクリーニングで得られた AmGT の中に UGT88D3/Am4'CGT と相同性の高い AmGTcg10 が同定された。AmGTcg10 は UGT88D3 とアミノ酸配列レベルで 60%の配列同一性を示し、UGT88D4 と命名された(図4-3)。この高い相同性から、UGT88D4 タンパク質も4'CGT 活性を有していると期待されたが、UGT88D4 の推定pIは5.8と一般的なフラボノイド UGTと変わらない。また、UGT88D4 遺伝子は花弁特異的な遺伝子発現をするものの、キンギョソウ花弁生長に伴って AmAS1 および

Am4'CGT/UGT88D3と強調的な遺伝子発現パターンを示さず、むしろAmCHSと同様に花卉成長初期から強く発現する(データ不示)。これまでのところ大腸菌の発現系では本クローンから4'CGT活性を確認できておらず、UGT88D4がカルコン4'CGTである可能性は低いものと考えられる。また、シロイヌナズナにおいてはこれまでカルコン4'位配糖体の蓄積に関する報告はなく、最もUGT88D3/Am4'CGTと高い相同性を示す機能未知のUGT88A1はpIが5.5と平均的な値を示す。従って今のところ、高い等電点はUGT88Dサブファミリーの中でもカルコン4'位配糖化酵素に見られるユニークな特徴である。

カルコンの4'位の水酸基はフラボノール/アントシアニンの7位の水酸基と化学的には等価である。しかしながらUGT88D3/Am4'CGTはシロイヌナズナから単離されたUDP-グルコース・フラボノール7位配糖化酵素(UGT73C6)とはアミノ酸レベルで25%の配列同一性しかなく、構造的類似性を示さない(Jones, *et al.*, 2003)。従ってUGT88DサブファミリーとUGT76Cサブファミリーはカルコンの4'位とフラボノールの7位の配糖化酵素として独立して進化してきたと考えられる。

4-4-2 UGT88D3 遺伝子の発現制御機構

花卉生長に伴ってAm4'CGTとAmAS1は協調的な遺伝子発現パターンを示した。一般的に共通した上流トランス因子によって発現制御を受ける遺伝子群の発現プロファイルは類似する。フラボノイドやアントシアニン生合成経路に関わる酵素遺伝子群は共通のMYB型のマスター転写因子により転写誘導を受けるため、標的の構造遺伝子群は協調的な遺伝子発現パターンを示すことが知られている(Harmer, S. L., *et al.*, 2000)。

キンギョソウ花卉においてフラボノイド生合成酵素遺伝子の発現は以下の3つに大別できる(図4-3)。(1)花卉形態形成初期から高発現するフラボノイド生合成上流に位置するCHSやCHI、そしてAmGTcg10に見られるタイプ、(2)オーロン合成に沿ったAmAS1およびAm4'CGTに見られるように花卉形態形成初期から中期にかけて発現が上昇し、成熟花卉において発現が減少するタイプ、(3)フラボノイド生合成経路の下流(アントシアニン生合成)に関わるAmDFR、AmANS、およびAm3GTに見られる花卉形成後期に最も強く発現するタイプ。このAm4'CGTおよびAmAS1の協調的な発現パターンは、両遺伝子発現を調節する共通のトランス因子の存在が示唆される。Am4'CGTおよびAmAS1の開始メチオニン上流約1Kbの領域をPlant Cis-acting Regulatory DNA Elements (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)プログラムを用いてシスエレメント解析を行った結果、両遺伝子の上流に複数のMYBおよびMYC結合配列が同定された(図4-5)。これらのシスエレメントの両遺伝子の発現に与える影響については今後検討する必要があるが、協調的な遺伝子発現はAm4'CGTのオーロン生合成への関与を示唆する。

4-4-3 AmGT 遺伝子群の機能推定

cDNA ライブラリースクリーニングで得られたクローンの中で機能が同定済みの UGT はアントシアニン 3 位配糖化酵素である UGT78B2 だけであった (Martin, *et al.*, 1991)。興味深いことに UGT85 ファミリーに属する AmGT が最多の 5 種同定された。イネ科ソルガム (*Sorghum bicolor*) の UGT85B1 はシアノジェニック グルコシド合成の最終ステップを触媒し (Jones, *et al.*, 1999)、キク科ステビア (*Stevia rebaudiana*) の UGT85C2 は甘味料としてしられるステビオールの配糖化に関与していることが知られている (Richiman, *et al.*, 2005)。さらにシロイヌナズナの UGT85A1 はサイトカイニン (*trans*-zeatin, hydrozeatin) を配糖化する活性を有していることが知られている (Hou, *et al.*, 2004)。このように UGT85 ファミリーの配糖化酵素の機能は多岐に分化している。少なくともこれまでキンギョソウ花弁においてシアノジェニックグルコシドやステビオール配糖体の蓄積に関する報告はない。キンギョソウ UGT85 ファミリーの酵素もおそらく低分子化合物の配糖化に関わっていると類推されるが、これらの機能解明は今後の課題である。

また、UGT73 ファミリーに属する AmGT が 3 種同定された。シロイヌナズナ UGT73C5 がフラノステロイドの配糖化による不活性化に関与しているという報告がある一方で、シロイヌナズナ UGT73C1 および UGT73C5 がサイトカイニン (*trans*-zeatin, hydrozeatin) を配糖化する活性を有していることが知られている (Hou, *et al.*, 2004; Poppenberger, *et al.*, 2005)。またシロイヌナズナ UGT73C6 (At2g36790) および UGT73B1 (At4g34138) はフラボノールの 7 位配糖化活性を有することが知られており、UGT85 同様に UGT73 ファミリーの構造と機能性の相関については不確定な部分が多い (Jones, *et al.*, 2003; Bowles, *et al.*, 2005; Kim, *et al.*, 2006)。また、シソ科コガネバナ (*Scutellaria baicalensis*) の UGT73C6 ホモログである UDP-glucuronate: baicalein 7-*O*-glucuronosyltransferase (UBGAT) もバйкаレインと呼ばれるフラボンの 7 位を配糖化する活性を有していることが知られている (Hirofani, *et al.*, 2000; Nagashima, *et al.*, 2000)。黄色キンギョソウ花弁においてもフラボン 7 位配糖体が蓄積していることが知られている (Asen, *et al.*, 1972)。従って、花弁で発現するキンギョソウ UGT73 遺伝子 (群) はフラボノイド、特にフラボンの 7 位配糖化に関わっている可能性が高い。今後、キンギョソウ UGT73 ファミリーの組換え酵素の活性測定を通じて、生理的機能を解明していこうと考えている。

第5章 オーロン生合成経路の解明および黄色花の分子育種

5-1 序論

花卉園芸産業において黄色は重要な形質である。フクロソウ科ゼラニウム、サクラソウ科シクラメン、イワタバコ科セントポーリア、マメ科スイートピー、ヒルガオ科アサガオなどの主要な園芸植物には黄色花がないために黄色品種の開発が切望されている。これまでに遺伝子工学的に黄色花を作成する試みがなされてきたが(Davies, *et al* 1998)、実質的に花卉が黄色くなったものはない。水溶性色素であるフラボノイドによる黄色発現を担うオーロンの生合成経路は長い間不明であった。オーロンはカルコンと呼ばれるほとんど植物で生成される初期フラボノイドから派生することから、その生合成経路の解明は、幅広い黄色品種の開発に貢献できると期待されている。

キンギョソウ花卉からオーロン合成酵素が精製され、その遺伝子が単離されたにより(Nakayama, *et al.*, 2002)、オーロンによる黄色花の分子育種は実現間近と思われた。しかしながら第2章で記載したように AmAS1 遺伝子を過剰発現するトレニアはオーロンを生成せず、花色に変化は認められなかった。この結果はオーロン生合成に AmAS1 は必要条件ではあるが十分条件得ないことを示唆した。

その後、オーロンによる黄色発現の分子機構を解明する為に、(1)細胞質タンパク質 Am4'CGT がカルコンの 4'位を配糖化することと、(2)AmAS1 が液胞タンパク質であること、(3)AmAS1 がカルコン 4'配糖体を基質にオーロン 6位配糖体を生成することを明らかにしてきた(Nakayama, *et al.*, 2000; 佐藤, 2000; 磯野, 2002; 渡辺, 2006)。以上の結果から、オーロン合成酵素の真の基質がカルコン 4'位配糖体であるという作業仮説を立てた。この仮説を検証するため、キンギョソウ花卉 cDNAライブラリーからカルコンの4'位を配糖化する酵素, Am4'CGT/UGT88D3 を単離した。

過去のキンギョソウの遺伝学実験からオーロンによる黄色発現にはアントシアニン欠損変異が必要であることが示唆されていた(Forkmann and Stotz, 1981; Spribille and Forkmann, 1982; 土岐, 1990)。そこで、オーロンによる黄色い花を作出する為に、遺伝子組換えトレニアにおいて Am4'CGT と AmAS1 遺伝子の共発現する形質転換用コンストラクト, pSFL210 を構築した(図 5-1)。さらに共発現に加え、内在性のアントシアニン生合成酵素を RNA 干渉(RNA interference; RNAi)法により抑制する三重形質転換用コンストラクト, pSFL307 および pSFL308 を構築した。カルコンをよりオーロン生合成へ利用するためには、カルコンを無色のフラバノンに異性化する CHI を RNAi の標的とすることが適切だと思われるが、この反応は細胞質などの中性付近の pH では非酵素的に反応が進む。従って、CHI の RNAi によってアントシアニン生合成を完全には抑制することができない可能性が高い。CHI の下流に位置する F3H および

DFR が触媒する反応は非酵素的には進まないため、トレニア F3H(pSFL308)および DFR(pSFL307)を RNAi の標的とした。RNAi によるこれらの酵素遺伝子機能の抑制は、キンギョソウの劣性 *incolorata* 変異体(AmF3H 機能欠損)および *pallida* 変異体(AmDFR 機能欠損)と同等の効果をもたらすと期待される (Forkmann and Stotz, 1981;土岐、1990)。

導入遺伝子はトレニアにおいて構成的に発現するように E12-CaMV35S プロモーターまたは MacI プロモーターにドライブした (Mitsuhara, *et al.*, 1996)。pSFL211 は第 2 章で記載したコンストラクトである。下記のコンストラクト(図 5-1)を青紫色の花弁を呈するゴマノハグサ科トレニア (SWB 品種)にアグロバクテリウム法により形質転換を行い(Aida, *et al.*, 2000)、形質転換体の表現型および色素組成について検討した。

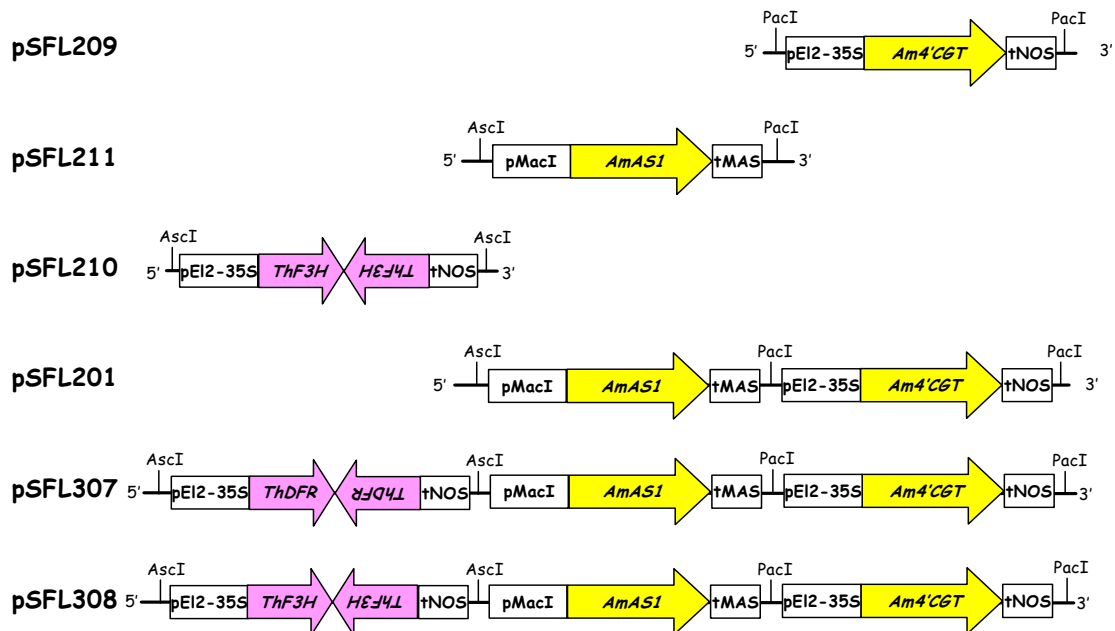


図5-1 トレニア形質転換用バイナリーベクター
 全てのコンストラクトはpBIN plusバイナリーベクター(van Engelen, *et al.*, 1995)上に構築した。
 AmAS1はMacIプロモーター、それ以外の遺伝子はE12-CaMV35Sプロモーターにより植物細胞内において構成的に発現するようデザインした。

5-2 材料および方法

5-2-1 Am4'CGT 発現カセットの構築 (pSFP209)

pBE2113-GUS ベクター (Mitsuhara, *et al.*, 1996) を SnaBI で消化し、プロモーター下流に存在する omega 配列から GUS 遺伝子の 5' 側に相当する部分を除去し、ここに BamHI リンカー (TakaRa Bio) を挿入した。得られたプラスミドを pUE6 とした。一方、pUCAP (van Engelen, *et al.*, 1995) を AscI で消化し、平滑末端化後、PacI リンカーを挿入したプラスミドを pUCPP とした。pUE6 を HindIII と EcoRI で消化して得られる DNA 断片のうち、E12-35S プロモーターから NOS ターミナーまでを有する断片を、pUCPP の HindIII と EcoRI サイトに挿入し pSPB540 を得た。よって pSPB540 は、E12-35S プロモーターと NOS ターミナーの間に、BamHI と SacI で連結された GUS 遺伝子 (5' 側一部欠く) を有する。この pSPB540 を BamHI と SacI で切断し GUS 遺伝子部分を除き、そこに、ペチュニア由来のラムノース転移酵素 (3RT) の cDNA (Brugliera, *et al.*, 1994) に由来する BamHI-EcoRV 断片と SacI-SnaBI 断片の 2 断片を EcoRV と SnaBI サイトが連結する向きに挿入し、pSPB542 を得た。EcoRV および SnaBI はともに平滑末端を生じる制限酵素である。pSPB542 を E12-35S プロモーター下流に存在する KpnI と、NOS ターミナーに隣接する BamHI サイトで切断することで得られるベクターと、cDNA ライブラリーから切り出した Am4'CGT cDNA を含む pBluescriptII SK-ベクター (Stratagene; pSPB1725) を KpnI と BamHI で消化し得られる約 1.6kb の 4'CGT cDNA 断片を連結し、得られたプラスミドを pSFL203 とした。pSFL203 は pUCPP をベクターとし、E12-35S プロモーターと NOS ターミナーで制御される 4'CGT 発現カセットを有する。pSFL203 を PacI で切断し、得られる E12-35S プロモーター~Am4'CGT~NOS ターミナーからなる断片を pBINPLUS (van Engelen, *et al.*, 1995) の PacI サイトに挿入したものを pSFL209 とした。

5-2-2 AmAS1 発現カセットの構築 (pSFP211)

2-2-2 に記載のコンストラクトと同一。

5-2-3 Am4'CGT と AmAS1 の共発現コンストラクトの作製 (pSFP201)

pSFL203 を PacI で切断し、Am4'CGT 発現カセットを切り出し、これを pSFL211 の PacI サイトに挿入した。得られたコンストラクトを pSFL201 とした。従って pSFL201 は植物細胞に導入された場合、Am4'CGT 遺伝子と AmAS1 遺伝子をともに構成的に転写されるよう設計されている。

5-2-4 Am4' CGT と AmAS1 の共発現ならびに ThDFR の抑制コンストラクトの作製 (pSFL307)

pUE6 を HindIII と EcoRI で切断し、GUS 発現カセットを有するフラグメントを回収した。これを pUCAA の HindIII と EcoRI サイトに挿入し、得られたプラスミドを pSPB541 とした。トレニアのジヒドロフラボノール還元酵素 (ThDFR) cDNA については (Aida, *et al.*, 2000) に従って取得した。ThDFR cDNA を含む pBluescript II SK-ベクター (pTDFR10) を鋳型とし、ベクター配列に由来する M13RV プライマー (5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3') と ThDFR cDNA 配列に塩基置換で NcoI 認識部位を導入した ThDFR-NcoI プライマー (5'-GCT TTA CCA TGG AGT AAT GAG CTT-3') を用いて、4-2-4 に記載の方法に従って PCR を行った。得られた約 0.75kb の断片を pCR2.1-TOPO (Invitrogen) にサブクローニングし、塩基配列を確認した。これを SacI と NcoI で切断し、0.75kb の ThDFR 配列を有するフラグメントを回収した。また pTDFR10 を BamHI と NcoI で切断し、ThDFR cDNA の 5' 末端から 1.1kb を含む断片を回収した。pSPB541 を BamHI と SacI で切断し、GUS 遺伝子部分を除き、ここに、前述の 0.75kb の断片と、pTDFR10 から切り出した 1.1kb の断片を、両断片の NcoI 部位が連結する方向に挿入した。このようにして得られたプラスミド pSFL314 は、植物体内の導入された場合、E12-35S プロモーターの制御下、ThDFR 遺伝子配列に由来する二本鎖 RNA を発現し、RNAi 法によって ThDFR 遺伝子発現を抑制することができる。

pUE6 を、NOS ターミネーター上流に位置する SacI サイトで切断し、末端平滑化したのち、XhoI リンカーを挿入した。このプラスミドを BamHI と XhoI で消化して得られる E12-35S プロモーター～ベクター～NOS ターミネーターからなる断片と pSPB251 を BamHI と XhoI で切断して得られる AmAS1 cDNA 断片を連結し pSPB211 を得た。pSPB211 から HindIII と EcoRI で AmAS1 発現カセットを切り出し、これを pBINPLUS の HindIII と EcoRI サイトに挿入した。このようにして得られたプラスミドの PacI サイトに、pSFL203 を PacI で切断して得られる Am4' CGT 発現カセットを挿入し、Am4' CGT と AmAS1 の発現カセットがタンデムに連結した pSFL304 を得た。さらに pSFL304 を AscI で切断して得られる ThDFR 二本鎖 RNA 発現カセットを pSFL304 の AscI サイトに挿入し、**pSFL307** を得た。このように pSFL307 は Am4' CGT と AmAS1 の発現ならびに ThDFR 抑制のための3つのカセットを有するバイナリーベクターである。

5-2-5 Am4' CGT と AmAS1 の共発現ならびに ThF3H の抑制コンストラクトの作製 (pSFL308)

シソから得られた F3H cDNA (Gong, *et al.*, 1997) をプローブとして、トレニアの同酵素をコードする cDNA を取得した。トレニア cDNA ライブラリー (Aida, *et al.*, 2000) 約 20 万のファージを 4-2-1 の方法に倣ってスクリーニングした結果、ThF3H cDNA を得た (Accession No. AB211958)。cDNA ライブラリー由来の ThF3H cDNA を含む pBluescript II SK-ベクターを pSPB266 とした。これを鋳型とし、ベクター配列に由来する前述の M13RV プライマーと ThF3H

cDNA 配列に塩基置換で SalI 認識部位を挿入した ThF3H-SalI-1 プライマー(5'-ttc tct gtc gac gcc cat tgc c-3')を用いて、4-2-4と同様に PCR を行った。得られた約 0.9kb のフラグメントを pCR2.1-TOPO (Invitrogen) にサブクローニングし、塩基配列を確認した。同様にして、ThF3H cDNA 配列に塩基置換で SalI 認識部位を挿入した ThF3H-SalI-2 プライマー(5'-cgc cgt gtc gac tcg ctt gaa g-3')と M13 リバースプライマーを用いて、約 0.75kb の DNA 断片を調整し、pCR2.1-TOPO にクローニングし、塩基配列を確認した。pSPB541 を BamHI と SacI で切断し、GUS 遺伝子部分を除き、ここに pCR2.1-TOPO から BamHI と SalI 切断で切り出した 0.9kb の断片と、pCR2.1-TOPO から SacI と SalI 切断で切り出した 0.7kb の断片を両断片の SalI 部位が連結するように挿入した。このようにして得られたプラスミド pSFL313 は、植物体内に導入された場合、E12-35S プロモーターの制御下、ThF3H 遺伝子配列に由来する二本鎖 RNA を発現し、RNAi 法によって ThF3H 遺伝子発現を抑制するものである。

前述の pSFL313 を AscI で切断して得られる ThF3H RNAi 抑制カセットを pSFL304 の AscI サイトに挿入し、**pSFL308** を得た。pSFL308 は Am4'CGT と AmAS1 の発現ならびに ThF3H 抑制のための3つのカセットを有する。

5-2-6 ThF3H の抑制コンストラクトの作製(pSFL210)

pSFL313 を AscI で切断して得られる ThF3H RNAi 抑制カセットを pBINPLUS (van Engelen, *et al.*, 1995) の AscI サイトに挿入した。得られた ThF3H 抑制コンストラクトを **pSFL210** とした。

5-2-7 遺伝子発現解析

トレニア由来フラバノン 3 位水酸化酵素(Accession No.AB211958) (ThF3H-Fw: 5'-TAT GGC ACG AGC AGG ACC ACT AAC-3'; ThF3H-Rv: 5'-CGC CGT GTC GAC TCG-3'), トレニア由来ジハイドロフラボノール還元酵素(Accession No.AB012924) (ThDFR-Fw: TAA GTA TGA GCA TGG AAG TA-3'; ThDFR-Rv: 5'-GGT ATG TCC TTG TCA ATT-3'), トレニア由来 GAPDH(Accession No.AB106523) (ThGAPDH-Fw: 5'-GAT GAG AAG ACC CTT CTG TTT-3'; ThGAPDH-Rv: 5'-CGA CAC AAG CTT CAC AAA CGT CTT-3')のプライマーセットを用いて 2-2-3、4-2-2、および 4-2-3 の方法と同様に RT-PCR を行った。

5-2-8 顕微鏡観察

非形質転換体および形質転換体の花卉表皮細胞は、スライドガラス (Micro slide glass SUPERFROST, 76 x 26mm, thickness 0.9-1.2mm, Matsunami)に乗せ、その上から蒸留水を滴下した。その上にカバーガラス (NEO microcover glass, 50 x 24mm, Thickness 0.12-0.17mm, Matsunami) をかぶせ、蛍光顕微鏡(Eclipse E600 system, Nikon)で観察した。オーロンによる

蛍光の検出には GFP 観察に用いられる B-2A フィルター(Ex450-490nm, DM505, BA520)を用いた観察を行った。

5-2-9 色素分析

pSFL209, pSFL210, pSFL201, pSFL307 および pSFL308 を Aida, *et al.*, 2000 の方法に倣ってトレニア (SWB 品種(サントリーフラワーズ株式会社)) に導入した。選択マーカーであるカナマイシンに耐性を示した個体を選抜し、それぞれの花色を観察した。花色変化が比較的顕著であったものについて色素分析を行った。HPLC 条件は 2-2-4 の方法と同様である。

5-3 結果

5-3-1 キンギョソウ由来カルコン 4'位配糖化酵素の *in vivo* 機能解析。

Am4'CGT を構成発現させるコンストラクト pSFL209 を導入したトランスジェニック SFL209 系統を最終的に 40 個体取得した。本系統の花弁は青紫色を呈し、非形質転換体と顕著な花色の違いは認められなかった (図 5-2)。本形質転換体系統から調製した cDNA を用いて RT-PCR を行った結果、導入遺伝子である Am4'CGT 遺伝子の構成的な発現が確認された (図 5-2)。次に、形質転換体の花弁から色素を抽出し、HPLC 分析に供した。その結果、非形質転換体である SWB においては検出されない THC4'位配糖体の蓄積が確認された (図 5-3)。以上の結果から Am4'CGT は *in vivo* においてカルコン 4'位配糖化活性を有することが示された。

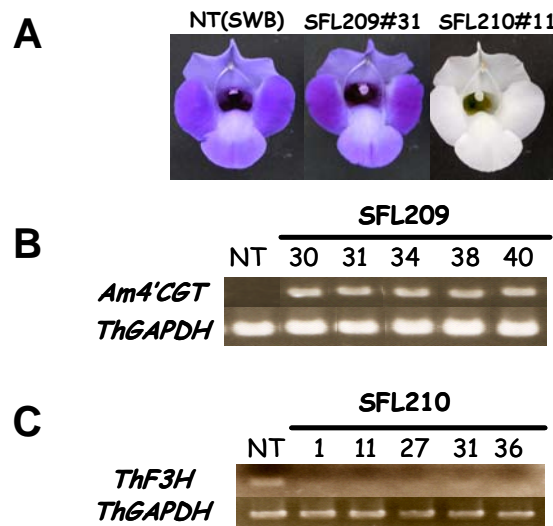


図5-2 形質転換トレニアの表現型解析(1)

(A)形質転換系統SFL209の花弁は非形質転換体(NT: Nontransformant)のSWBと同様に青紫色を呈した。一方、形質転換系統SFL210は色素合成が抑制された結果、白色を呈した。(B)RT-PCRによってSFL209系統におけるAm4'CGT遺伝子の構成発現を確認した。(C)RT-PCRによりSFL210系統における内在性F3H遺伝子の発現抑制を確認した。F3Hのノックダウンによりアントシアニン生合成経路を効率よく抑制できることが示された。









| Line (n) | Genotype | Flavonoid content (mg/g fresh petal weight) | | | | Phenotype |
|---------------------|---|---|--------------------------------------|----------------|-------------|--|
| | | THC 4'- <i>O</i> -glucoside | Aureusidin 6- <i>O</i> -glucoside | Anthocyanidins | Flavones | |
| NT (3) | cv. Summer Wave Blue | n.d. | n.d. | 0.656±0.178 | 4.416±1.687 |  |
| SFL211 (5) | AmAS1 _{OX} | n.d. | n.d. | 0.639±0.030 | 5.051±0.175 |  |
| SFL209 (3) | Am4'CGT _{OX} | 0.467±0.261 | n.d. | 0.727±0.112 | 4.999±0.174 |  |
| SFL210 (5) | ThF3H _{RNAi} | n.d. | n.d. | 0.014±0.008 | 5.194±0.475 |  |
| SFL201 (3) | Am4'CGT _{OX} + AmAS1 _{OX} | 0.200±0.129 | 0.422±0.161 | 0.581±0.330 | 3.007±0.869 |  |
| SFL307 (3) | Am4'CGT _{OX} + AmAS1 _{OX} + ThDFR _{RNAi} | n.d. | 0.749±0.157 | 0.065±0.021 | 2.287±0.625 |  |
| SFL308 (10) | Am4'CGT _{OX} + AmAS1 _{OX} + ThF3H _{RNAi} | n.d. | 0.757±0.157 | 0.032±0.010 | 3.172±0.453 |  |
| <i>A. majus</i> (4) | cv. Snap Yellow (Endogenous Am4'CGT and AmAS1) | 0.030±0.001 | 0.411±0.003 | n.d. | 6.767±0.101 |  |

図5-3 形質転換トレニアの色素分析

トレニアおよびキンギョソウ花弁からフラボノイド色素を抽出し、HPLC分析に供した。n.d.は検出限界以下、_{OX}は過剰発現系統、_{RNAi}はRNA干渉によるトレニア内在性フラボノイド生合成酵素遺伝子のノックダウン系統、NTは非形質転換体 (Nontransformant) を示す。キンギョソウはスナップイエロー品種の成熟花弁(ステージ6)を用いた。アントシアニン色素(Anthocyanidins)はデルフィニジン(delphinidin)、シアニジン(cyanidin)、ペチュニジン(petunidin)、ペオニジン(peonidin)、およびマルビジン(malvidin)で構成され、その総計として示した。フラボン(Flavones)はアピゲニン(apigenin)とルテオリン(luteolin)で構成され、その総計を示した。SFL211系統に見られるように、AmAS1の構成発現によりフラボノイド構成に影響は認められなかった。一方、SFL209系統に見られるようにAm4'CGTの構成発現によりカルコン4'位配糖体の蓄積が確認された。SFL201系統で示されるようにAm4'CGTとAmAS1の共発現はオーロン6位配糖体の生成に必要な十分であったが、花弁は完全な黄色を呈さなかった。SFL307およびSFL308により示されるように、花弁が黄色単色発現するためには内在性アントシアニン生合成経路を抑制する必要がある。SFL210系統に見られるように内在性アントシアニン生合成経路の抑制により花は白色を呈した。

5-3-2 Am4'CGT および AmAS1 の共発現解析

Am4'CGT および AmAS1 を共発現させるコンストラクトであるpSFL201を導入したトランスジェニック SFL201 系統においては、得られた 35 系統の形質転換体のうち、22 系統において宿主と比べて花色変化が見られ、黄色味を帯びた青、もしくは薄いグレーを示した(図 5-4)。特に生殖器官である雄蕊および雌蕊、そして花冠と花筒の境界部分の組織において黄色を呈した。しかし、花全体としてはアントシアニンによる青紫色が優勢であり、完全に黄色になったものはなかった。しかしながら、本系統の花弁を蛍光顕微鏡下で観察したところ、非形質転換体および SFL209 系統においては見られなかった黄緑色の蛍光が観察された。この蛍光は黄色を呈した部分にかきらず、花弁全体から観察された。蛍光を発した形質転換体において、導入した Am4'CGT および AmAS1 遺伝子の共発現を RT-PCR によって確認した(図 5-4)。

形質転換体の花卉を色素分析に供した結果、THC 4'位配糖化体ならびにオーレウシジン 6 位配糖化体と保持時間および吸収スペクトルが一致する生成物が、それぞれ花卉中に 0.02%および0.04% (花卉新鮮重量中のw/w)生成していることが確認された(図5-3)。また宿主が本来含有するアントシアニン類も検出された。従ってSFL201 形質転換体系統で観察された黄味がかかった青または薄いグレーの花色は、THC 4'位配糖化体ならびにオーレウシジン 6 位配糖化体と、マルビジンタイプのアントシアニン類が混在した花色であった。以上のように、Am4'CGT および AmAS1 を花卉細胞内で共発現させることでオーレウシジン6位配糖体が生成したため、作業仮説は証明された。

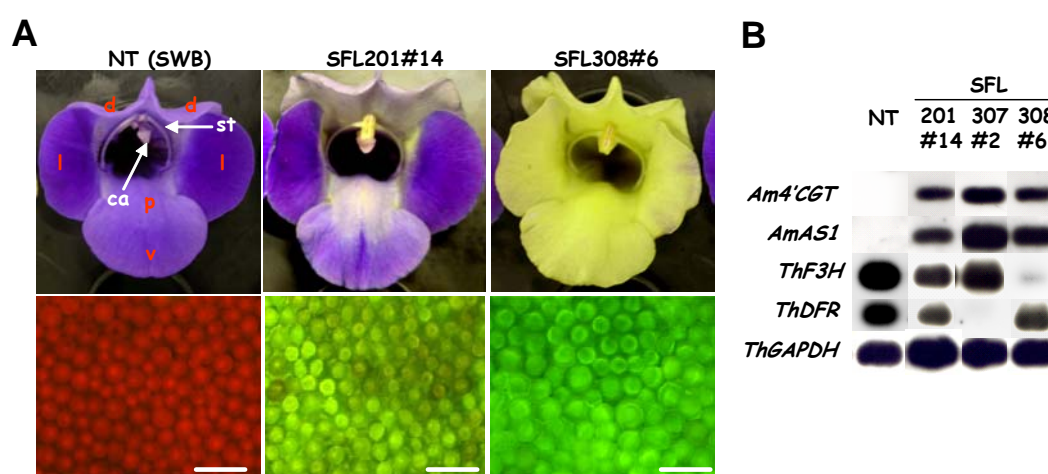


図5-4 形質転換トレンアの表現型解析(2)

(A)トレンアの花はキンギョソウと同様の線対称形の合弁花であり、2枚の背側花弁(d: dorsals)、2枚の側方花弁(l: laterals)および1枚の腹側花弁(v: ventral)の計5枚の花弁で構成される。stは雄蕊(stamen)、caは雌蕊(carpels)、pはパレイト、NTは非形質転換体、サイズバーは100 μ mを示す。非形質転換体(左上)と比べ、形質転換系統SFL201の花は雄蕊および雌蕊、花冠の基部において黄色を呈した。背側花弁およびパレイト部分においてアントシアニンによる紫色が退色した(中央上)。花卉全体からオーロンと思われる黄緑色の蛍光が観察された(中央下と左下)。形質転換系統SFL308の花は鮮やかな黄色を呈し(右上)、その花卉からは強い蛍光が観察された(右下)。(B)半定量的RT-PCR/サザンブロット解析による遺伝子発現解析。SFL201系統ではNTに見られないAm4'CGTとAmAS1遺伝子が共発現し、SFL307およびSFL308系統においてはそれぞれトレンア内在性のDFRおよびF3H遺伝子の発現が著しく抑制されていた。

5-3-3 黄色花の分子育種

トランスジェニック系統SFL201 ではオーロンができていながらも関わらず共存するアントシアニン色素により単色の黄色を呈さなかったが、この結果は過去のキンギョソウの遺伝学実験から想定されていた(Forkmann and Stotz, 1981; Spribille and Forkmann, 1982; 土岐, 1990)。そこでアントシアニンによる青紫色を花卉から除くために、Am4'CGT と AmAS1 の共発現に加え、内在性アントシアニン生合成経路を RNA i 法により抑制した三重形質転換体を作成した。

まず、内在性の ThF3H のみ RNAi 法により抑制した形質転換系統 SFL210 を作成した。

RT-PCR により、ほとんどの形質転換体において内在性 ThF3H の発現が抑制されていた(図 5-2)。その結果、アントシアニンが特異的に激減し、フラボン量が微増し、花卉は劣性 *inc* 変異体の表現型と同様の白色を呈した(図 5-2 および図 5-3)。従って、F3H の RNAi によって効率よくアントシアニン生合成を阻害できることを確認した。

次に SFL307 三重形質転換体を作出した。得られた 36 系統の形質転換体のうち、19 系統において宿主と比べて花色変化が見られた。さらに、花色が変化した 19 系統のうち 6 系統については宿主本来の青い色がほとんど混在せず、ほぼ完全な黄色花色を呈していた(図 5-4 および図 5-5)。また SFL308 三重形質転換体では、39 系統の形質転換体のうち、24 系統において宿主と比べて花色変化が見られた。さらに、花色が変化した 24 系統のうち 17 系統については宿主本来の青い色がほとんど混在せず、ほぼ完全な黄色花色を呈していた(図 5-4 および図 5-5)。両三重形質転換体系統の花弁からは強い蛍光が観察された(図 5-4)。また、RT-PCR により導入遺伝子発現および内在性アントシアニン生合成酵素遺伝子の発現抑制を確認した(図 5-4 および図 5-5)。いずれのアントシアニン生合成酵素遺伝子を抑制した場合にも表現型に顕著な違いはなく、黄色花が形成された。

色素分析の結果、pSFL307 および pSFL308 を導入した形質転換体の黄色花弁内には、オーレウシジン 6 位配糖体が、ともに花弁中に 0.08% (花弁新鮮重量中の w/w)程度生成していることが確認された(図 5-3)。また pSFL201 を導入した系統と比較して、pSFL307 または pSFL308 が導入された系統では、宿主が本来有するアントシアニン類が宿主花弁に含まれる量の 10%程度にまで激減し、フラボンに関しても微減していることが確認された。また、SFL308 三重形質転換系統 26 番の個体は AmAS1 の発現および内在性 F3H の遺伝子発現抑制は行われているが Am4' CGT の遺伝子発現がほとんど認められず、その花弁は白色を呈した(図 5-5)。これにより、Am4' CGT がオーロン生合成による黄色単色発現に必須であることが再確認された。

以上のトランスジェニック解析により Am4' CGT と AmAS1 の共発現に加え、アントシアニン生合成阻害によって黄色花を分子育種できることを証明した。内在性アントシアニン経路の抑制は単に、花弁からアントシアニン色素に由来する色を除くのみならず、オーロン合成酵素へ基質をより多く供給するという効果をもたらした。

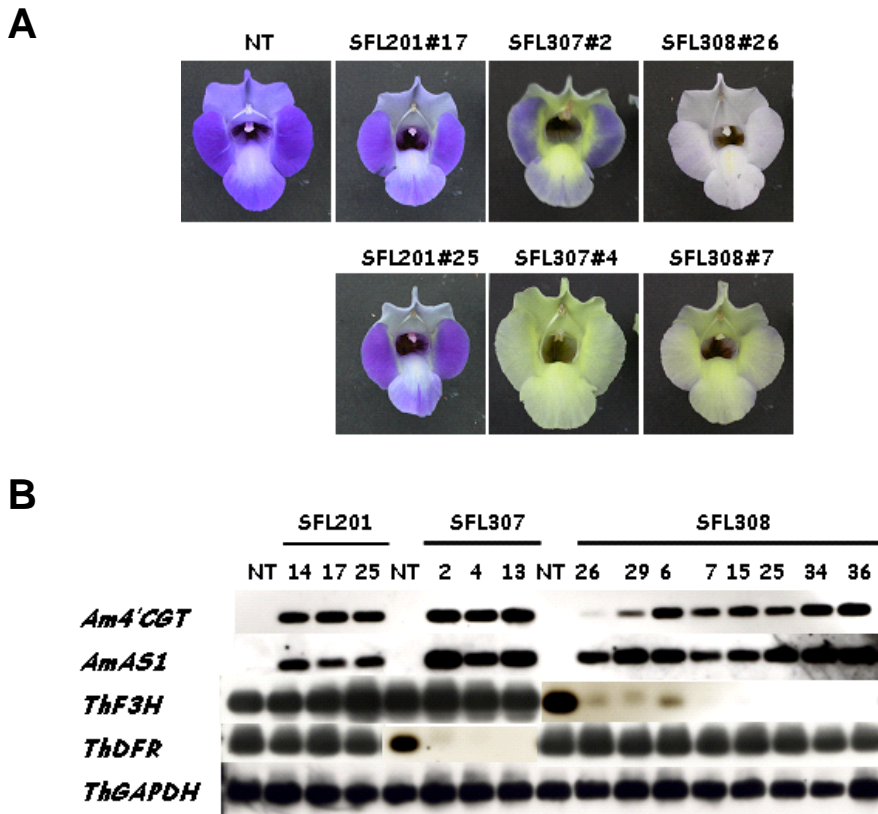


図5-5 形質転換トレニアの表現型解析(3)

(A) SFL201系統の花は背側花弁およびパレイト部分においてアントシアニンによる紫色が退色したが、側方花弁は非形質転換体と同様に青紫色を呈した。SFL307系統#2に見られるように不完全な黄色花においても特に側方花弁のアントシアニンによる青紫色が顕著であった。従って側方花弁は背側および腹側花弁と比べてアントシアニンの形質が強く発現する領域であると言える。また、SFL308系統#26は白色花弁を呈した。(B)半定量的RT-PCR/サザンブロット解析による遺伝子発現解析の結果、SFL308系統#26においては内在性F3Hの発現抑制およびAmAS1の構成発現は確認されたが、Am4'CGTの発現がほとんど認められなかった。

5-4 考察

5-4-1 カルコン 4'位配糖化酵素の生理的役割

Am4'CGT を発現させた SFL209 形質転換系統において THC4' 位配糖体の蓄積を確認した。従って、内在性 CHI の存在に関わらず Am4'CGT は *in vivo* においてカルコンの 4'位を配糖化することが証明された。シロイヌナズナの CHI は CHS と相互作用していることが知られている (Burbulis and Winkel-Shirley, 1999)。したがって、効率よくカルコンと反応するために細胞質酵素である Am4'CGT は CHS-CHI 複合体に含まれているか、あるいは非常に近い場所で機能していると考えられる。また、キンギョソウ花弁において観察される PHC4' 位配糖体はいずれの形質転換トレニアにおいても検出されなかったが、これはトレニア SWB 品種が遺伝的に PHC を生成しないことに起因すると思われる。組換え AmCHS1/Niv タンパク質はカフェオ

イル CoA と 3 分子のマロニル CoA を基質に PHC を生成する活性を有することが知られているが(Hatayama, *et al.*, 2006)、トレニア CHS はカフェオイル CoA を基質として利用できないのかもしれない。カルコン配糖体は薄黄色を呈するフラボノイド色素であるが、SFL201 系統の花弁は非形質転換体と同様の青紫色を呈した。これはカルコン4'位配糖体とアントシアニンが共存した場合、アントシアニンが視覚的に優勢であることを意味している。このことはカルコン2'位配糖体が蓄積する薄黄色のカーネーションの花弁において、その黄色発現に CHI の機能欠損が必要であることと矛盾しない(Forkmann and Dangelmayr, 1980; Ogata, *et al.*, 2004)。

Am4' CGT および AmAS1 の共発現により植物細胞内でオーロン6位配糖体を生成させることができた。黄色フラボノイドであるオーロン生合成はカルコンからこの二つの細胞内機能領域の異なる UGT 酵素と PPO 酵素によって触媒されることが明らかとなった。自然界に見られる多くのオーロンを生産する植物種において、オーロンは 6 位配糖体として同定されているが、同時にそのオーロン6位配糖体に対応するアグリコン構造を有するカルコンの4'位配糖体も同定されている(Harborne and Baxter, 1999)。キンギョソウの場合はオーレウシジン6位配糖体であるオウレウシン(Aureusin)に対して、THC4'位配糖体がオーロン合成酵素の基質であるが、コスモスにはスルフレチン(Sulfuretin: 6,3',4'-trihydroxyaurone)の6位配糖体であるスルフレイン(Sulfurein)に対してブテイン(Butein: 3,4,2',4'-tetrahydroxychalcone)の4'位配糖体のコレオプシン(Coreopsin)と呼ばれるカルコン4'位配糖体が存在する(Shimokoriyama and Hattori, 1952; 稲津, 1993)。ビデンスにはマリチメチン(Maritimetin: 6,7,3',4'-tetrahydroxyaurone)の6位配糖体であるマリチメイン(Maritimein)に対してオカニン(Okanin: 3,4,2',3',4'-pentahydroxychalcone)の4'位配糖体であるマレイン(Marein)と呼ばれるカルコン4'位配糖体が存在する。さらにコレオプシスにはレプトシジン(Leptosidin: maritimetin 7-methyl ether)の6位配糖体であるレプトシン(Leptosin)に対してランセオレチン(lanceoletin: 3,4,2',4'-tetrahydroxy-3'-methoxychalcone)の4'位配糖体であるランセオリン(Lanceolin)と呼ばれるカルコン4'位配糖体が存在する。また、ダイズにおいては、ヒスピドール(Hispidol: 6,4'-dihydroxyaurone)の6位配糖体(Hispidol 6-O-glucoside)に対してイソリクイリチゲニン(Isoliquiritigenin: 4,2',4'-trihydroxychalcone)の4'位配糖体であるネオイソリキリチン(Neoisoliquiritin)と呼ばれるカルコン4'位配糖体が存在する(図 5-6)。以上に見られるカルコン4'位配糖体とオーロン6位配糖体の構造的相関は、カルコンの4'位配糖化と、それに引き続く酸化的な環形成反応は自然界に普遍的に存在する一般的なオーロン生合成機構であることを強く支持する。

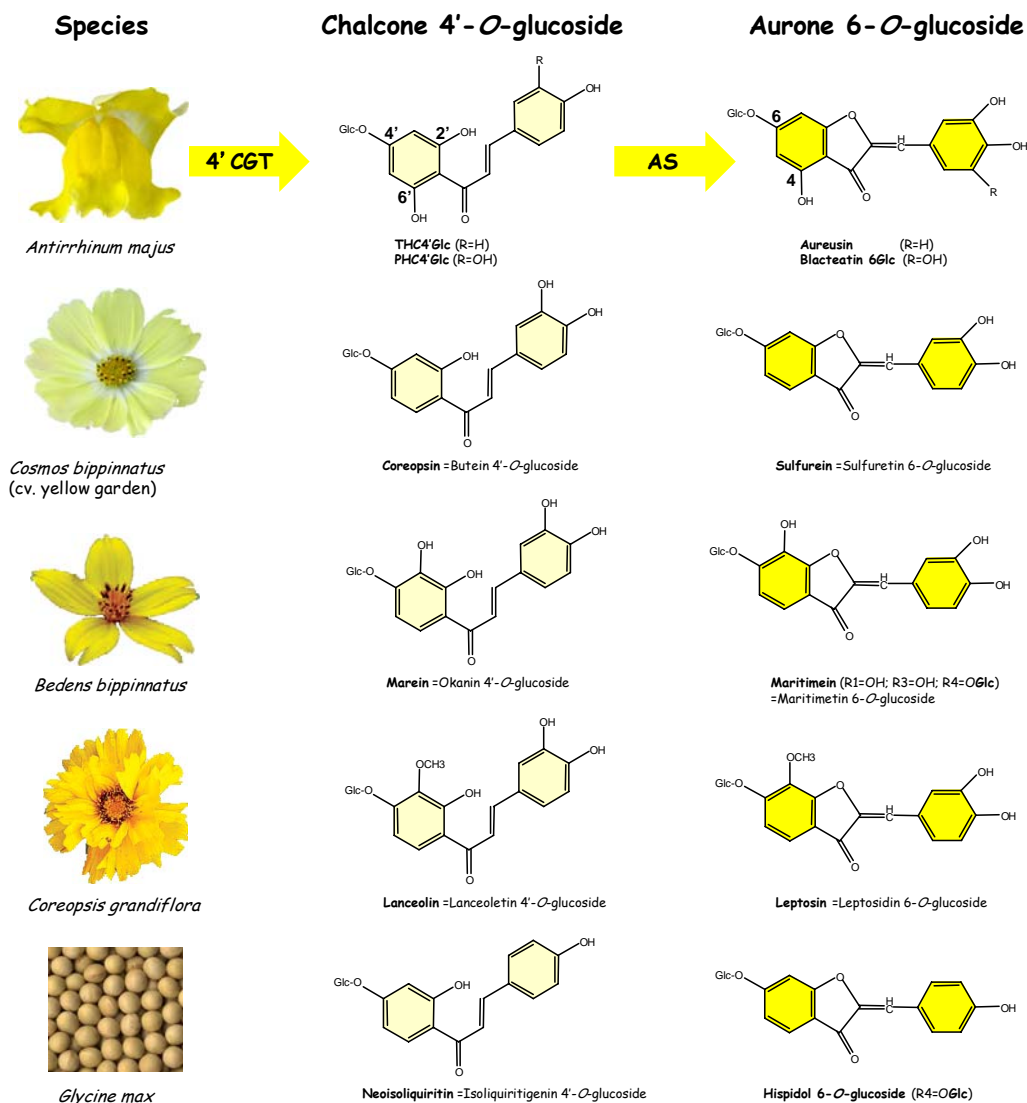


図5-6 カルコン4'配糖体とオーロン6位配糖体の構造相関

カルコンの4'位はオーロンの6位に対応し、カルコンの2'位の水酸基はオーロンの骨格に取り込まれる。キク科コスモス、ビデンス、コレオプシスとマメ科ダイズのカルコンおよびオーロンは6'位および4位デオキシ型であり、それらの生合成にはカルコン還元酵素が関与している。いずれのカルコンおよびオーロンも4'位配糖体および6位配糖体が報告されている(Harborne and Baxter, 1999)。

Am4' CGT が細胞質局在であることと、AmAS1 が液胞局在であることから、カルコンの配糖化はカルコンの液胞輸送に関わっていることが示唆される。オーロンやアントシアニンの配糖体が液胞に蓄積していることから考えて、フラボノイドの配糖化は普遍的に液胞輸送に関与していると推察される。また、カルコンは配糖化の有無に関わらず、中性付近の pHにおいて非酵素的に異性化し、無色のフラバノンに変換されるが、酸性の液胞内腔に輸送されることによって安定して蓄積できるものと考えられる。マメ科アルファルファ(*Medicago sativa*)由来の CHI 結晶構造解析から、CHIの基質ポケット内においてナリンゲニン(フラバノン)の7位、すなわちカルコンの4'位の水酸基はアルファルファ CHIの190番目のスレオニン残基と水素結合して

いることが明らかとなっている (Jez, *et al.*, 2000)。したがって、カルコンの 4' 位の配糖化は CHI とカルコンとの相互作用を物理的に阻害すると推察することができる。これにより 4'CGT は細胞質内での CHI による異性化からカルコンを保護し、安定的にオーロン合成酵素の存在する液胞に基質を供給しているのだろう。

液胞膜上には多種多様な輸送体タンパク質が存在している。花色または種皮色に異常を示す突然変異体の原因遺伝子として Multidrug and toxic compound extrusion (MATE) 型トランスポーター、Multidrug resistance-associated proteins (MRP) 型トランスポーターや Glutathion *S*-transferase (GST) が単離されており、これらは特定のフラボノイドの液胞輸送に関わっていることが示されている (Marrs, *et al.*, 1995; Alfenito, *et al.*, 1998; Debeaujon, *et al.*, 2001; Kitamura, *et al.*, 2004; Goodman, *et al.*, 2004)。カルコン配糖体がどんな輸送体を介して液胞内腔へ取り込まれるかについては今後の重要な課題である。

5-4-2 オーロンとアントシアニンの関係

自然界ではキンギョソウの花色はアントシアニンによるマゼンダ色とオーロンによる黄色に大別される (Whinbley, *et al.*, 2006)。この花色の二極化からオーロン合成経路とアントシアニン経路は排他的な関係であるかのように見える。しかしながら、交配育種で作られたキンギョソウやコスモスの中にはオーロンとアントシアニン両色素を生産し、橙色を呈する品種が存在する (Forkmann and Stotz, 1981; 稲津, 1993)。また、トレニア形質転換体 SFL201 系統においてもオーロンとアントシアニンが共に蓄積した。これらの結果は、4'CGT と CHI はお互いに基質を共有する拮抗関係であるが、両経路が生化学的に排他的でないことを示している。従って、この自然界に見られるキンギョソウの花色の二極化は自然淘汰によるものであろう。

オシロイバナ科オシロイバナ (*Mirabilis jalapa*) の黄色色素であるベタレイン色素の一種であるベタキササンチンも 450nm 付近の光に励起されて 500nm 付近の蛍光を発する蛍光特性があることが知られているが、その蛍光は同じベタレイン色素である紫色のベタシアニンが共存することによって吸収されることが知られている (Gandia-Herrero, *et al.*, 2005)。また、フラボノール 3 位または 7 位配糖体は紫外線吸収によって蜜標 (ネクターガイド) と呼ばれる紋様を形成することで花粉媒介者を誘引していることが知られている (Thompson and Meinwald, 1972)。オーロンとアントシアニンが共存した SFL201 系統の花弁ではヒトの視覚的にはアントシアニンによる花色が優性であったが、蛍光顕微鏡下ではオーロンに由来する強い蛍光が観察された。従ってオーロンを生産する花はアントシアニンの有無に関わらず蛍光を発することで花粉媒介者に何らかの影響を与えていると思われる。

SFL201 系統においてオーロンの生成に伴って、フラボンおよびアントシアニンの量が減少する傾向が認められた。また、SFL307 および SFL308 系統において RNAi によるアントシアニ

ンの減少に伴ってオーロン蓄積量が増加した。この色素量の相対変化はフラボノイド代謝におけるアントシアニン、フラボン、およびオーロン生合成経路が共通のカルコンの基質プールから由来していることを意味している。従って、効率良くカルコンをオーロン合成酵素経路に利用するためには、アントシアニン経路を抑制することで、①花卉からアントシアニンによる色を除くことに加え、②オーロン色素量を増加させる効果がある。おそらく自然界に存在するオーロンによる黄色花においてもアントシアニン生合成経路のどこかに欠損があると類推される。また、CHSの活性を増強することでカルコンのプールを大きくすることはオーロンの基質の供給量を増やす効果が期待され、黄色花の分子育種に効果的かもしれない。フラボンに関しては、それ自身の色による花色への影響は弱い、キンギョソウの主要フラボンであるアピゲニン7位配糖体はオーロンのコピグメントとして機能することが知られている (Asen, *et al.*, 1972)。したがって、フラボン類は黄色の色幅に何らかの影響を与えるものと考えられる。黄色花の分子育種においては少なくともアントシアニン生合成経路の抑制が重要であると言える。

5-4-3 コスモスのオーロンによる黄色発現機構

キク科コスモス(*Cosmos bipinnatus*)の花色に関する生化学的および遺伝解析から、コスモスの黄色発現はカルコンの一種であるブテイン 4'位配糖体(コレオブシン)とオーロンの一種であるスルフレチン6位配糖体(スルフレイン)の蓄積によるものであることが知られている (Shimokoriyama and Hattori, 1952; 稲津, 1993)。コスモスの舌状周辺花におけるこれらの両黄色フラボノイドの生合成は野生型 Y 遺伝子群によって抑制されており、y遺伝子群により脱抑制を受け、筒状中心花で見られるような黄色を呈する(稲津, 1993)。この野生型Y遺伝子群によるオーロン合成の領域的な抑制機構はキンギョソウの優性 *Sulf* 遺伝子座の作用機構に類似しており、オーロン生合成の抑制機構は植物種に幅広く存在する機構なのかもしれない。

コレオブシンおよびスルフレインはそれぞれアントシアニンの5位に相当する 6'位および 4'位の水酸基がないデオキシ型のカルコンおよびオーロンである(図5-6)。ダイズにおいて見出されたカルコン還元酵素(Chalcone reductase; CHR)は、ケシ科ケシ(*Papaver somniferum*)のモルヒネ系アルカロイド生合成に関わるコデイン還元酵素(Codeinone reductase; COR)と相同性が高く、Aldo-Keto Reductase (AKR)スーパーファミリーに属する(船山, 1998; Bomati., *et al.*, 2005)。CHRは6'位の水酸基のないイソリキリチゲニンやブテインに代表されるデオキシカルコンの生成に関わっており、デオキシ型のカルコンはダイゼイン(Daidzein)に代表されるデオキシ型イソフラボンやヒスピドールに代表されるデオキシ型オーロンに供給されると考えられる (Bomati., *et al.*, 2005)。従って、コスモスにおいても CHS と 4' CGT を媒介する CHR がオーロンによる黄色発現に重要な役割を果たしていると言われる。

また、舌状周辺花における黄色発現に関しては、ANS に対応する C 遺伝子座の劣性ホモc

対立遺伝子座が必要であり、C/(y)の遺伝子型を持つコスモスはデオキシオーロンとアントシアニンを共に蓄積するものの表現型としてはアントシアニンの効果が強く出たピンク色の花色を呈する(稲津、1993)。さらにコスモスにおいても劣性ホモc遺伝子座がオーロン量を増強する効果が認められ、キンギョソウやトランスジェニックトレニアと同様にアントシアニン生合成の抑制がオーロンによる黄色発現に重要であると言える。

5-4-4 キンギョソウにおけるオーロン生合成の再考

遺伝学のモデル植物であるゴマノハグサ科キンギョソウは未だに汎用的な形質転換系が確立されていない (Minlong, 2000)。そこで本研究では同じゴマノハグサ科の形質転換の容易なトレニア (Aida, 2000) を用いて遺伝子機能獲得型の表現型解析を行った。それにより、オーロン生合成が細胞質タンパク質であるカルコン 4'位配糖化酵素と液胞タンパク質であるオーロン合成酵素の二つの酵素によって触媒されることを示してきた。一方、キンギョソウにおけるこれらの二つの遺伝子の機能欠損型の表現型については不明である。第4章で示したように、ゲノミックサザンブロット解析の結果、AmAS1 遺伝子はシングルコピーの遺伝子であった。従って、AmAS1 遺伝子の機能欠損はすなわちオーロン合成欠損を伴い、花色が変化するはずである。一方の Am4' CGT/UGT88D3 についてはゲノミックサザン解析によりマルチコピー遺伝子であることが示されたが、スクリーニングによって得られた AmGT の中で最も Am4' CGT/UGT88D3 と相同性が高かった AmGTcg10/UGT88D4 の大腸菌発現タンパク質については 4' CGT 活性を示さなかった。このことから両者は機能的に重複関係になく、従って AmAS1 と同様に Am4' CGT の遺伝子機能欠損はオーロン合成欠損を引き起こし、花色に変化を与える可能性は否定できない。

これまでにオーロン合成を正に制御する遺伝子座として *Violacea* および *CFR1011* が同定されている。これらの遺伝子座が AmAS1 の遺伝子発現に影響を与えないことが示されている (Davies, *et al.*, 2006)。*Violacea* 遺伝子座に関してはパレイト部分に限られたオーロン発現に関わっているため、その原因遺伝子は酵素本体ではなく、オーロン合成酵素遺伝子の発現調節や発現領域を調節する因子であると考えられる。一方の *CFR1011* についてはその表現型はリーキーではあるものの、花卉全体のオーロン合成に関わっている。従って、その原因遺伝子が Am4' CGT である可能性は否定できない。また、オーロン生合成を負に制御する *Sulfurea* はこれまで AmAS1 遺伝子の発現に影響を与えないことが示されている (Davies, *et al.*, 2006)。しかしながら第3章で述べたように AmAS1 が液胞タンパク質であることから、*Sulfurea* は AmAS1 の液胞輸送を含む酵素活性化機構に関与しているか、あるいは Am4' CGT の機能を抑制することでオーロン合成を抑制しているのかもしれない。オーロン生合成の全貌を明らかにするためにはこれらの遺伝子座の原因遺伝子の同定が不可欠である。

第6章 総括

オーロンは古くから知られている黄色フラボノイドであるが、その鮮やかな黄色は昆虫や鳥などの花粉媒介者だけでなく、多くの人をも魅了してきた。ゴマノハグサ科キンギョソウは代表的なオーロンによる黄色花であり、これまで多様な品種が開発されてきた。長い間、オーロンの生合成経路は不明であったが、近年黄色キンギョソウから PPO ホモログであるオーレウシジン合成酵素 (AmAS1) が単離され、分子レベルでのオーロン生合成の理解は飛躍的に進んだ。

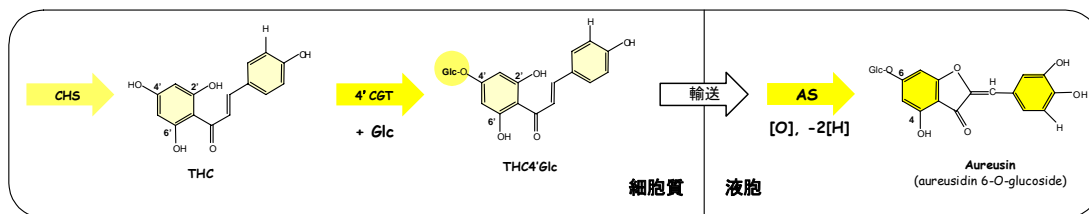
本研究ではオーロン合成酵素は ER、ゴルジを経て液胞内腔に輸送される液胞型 PPO であることを明らかにした。酸性の細胞小器官である液胞はオーロン合成酵素の触媒活性だけでなく、カルコンが安定化する環境を提供する。これまでに知られていた PPO ファミリーの酵素の研究から PPO は色素体に局在する酵素であると考えられていたため、オーロン合成酵素は液胞で働く PPO の初めての例である。今後、少なくとも植物 PPO はその機能する細胞小器官によって二つに区分されるべきである。これまでに配糖化やアシル化を含めたフラボノイド代謝経路は小胞体膜上の細胞質で完了し、液胞は代謝物を蓄積するための細胞内小器官と位置づけられていたが、この従来の定説を覆しフラボノイド骨格形成が液胞内で行われているという極めて新しい知見をもたらした。また、AmAS1 の液胞局在性と AmAS1 遺伝子の構成発現トレニア (pSFL211 系統) の表現型は酵素と基質が同一細胞に存在しても、両者の細胞内コンパートメントが異なるとその酵素機能は発現しないという事を改めて認識させてくれた。

オーロン生合成経路は、細胞質で CHS により生成されたカルコンが、カルコン 4' 位配糖化酵素によってカルコン 4' 位配糖体になり、それが液胞へ運ばれて、オーロン合成酵素によってオーロン 6 位配糖体に変換されるという領域が異なる二つの触媒反応から構成される。カルコンの 4' 位配糖化は酵素的および非酵素的なカルコンの異性化を防ぎ、液胞輸送を介してカルコンの安定化に大きく寄与していると考えられる。カルコン 4' 位配糖化酵素とオーロン合成酵素は構造や細胞内局在性は異なるものの、非常に同調した遺伝子発現パターンを示す。このことから、花卉形態形成の後期に効率よくオーロン生合成を行うために、両遺伝子の上流に共通の転写調節因子が存在すると考えられる。両酵素も黄色花形成という共通の形質発現に関わるため、同じ自然選択圧下の中、共に進化してきたのであろう。

オーロンが 6 位配糖体を有する植物種の多くには、オーロン 6 位配糖体に対応するカルコン 4' 位配糖体が同定されている (Harborne and Baxter, 1999)。この構造的な相関から、自然界のオーロン 6 位配糖体による黄色花を形成する植物種においても UGT88D サブファミリーのカルコン 4' 位配糖化酵素と液胞型 PPO であるオーロン合成酵素は共に保存されていると考えられる。すなわち、このカルコンの 4' 位配糖化はアントシアニジンの 3 位配糖化に対応する一般的な配糖化とみなすことができる。実際にリナリアからカルコンの 4' 位配糖化活性を有する UGT88D2 遺伝子を単離し、種を超えてその構造および機能が保存されていることを確認する

ことができた。

マメ科ビルマカリン (*Pterocarpus macrocarpus*) において、オーロンは 6 位ラムノース配糖体として存在していることが知られている (Harborne and Baxter, 1999)。シロイヌナズナのフラボノール 7 位配糖化酵素は糖供与体の違いによってサブファミリーが異なる UGT73C6 と UGT78D1 がそれぞれ 7 位へのグルコース転移とラムノース転移反応を触媒する。従って、ビルマカリンのカルコン 4' 位配糖化が UGT88D サブファミリーに触媒されているかどうかについては UGT の基質特異性という点で非常に興味深い。また例外的ではあるが、稀にオーロンは 4 位配糖体として存在している。例えばイソマツ科スターチス (*Limonium bonduellii*)、キク科ムギワラギク (*Helichrysum bracteatum*)、マメ科ビルマカリン (*Pterocarpus macrocarpus*) はそれぞれオーレウシジン 4 位配糖体 (Cernuoside)、ブラクテアチンの 4 位配糖体 (Bractein)、ジヒドロキシオーロン 4 位ルチノシドが含まれていることが知られている (Harborne and Baxter, 1999; Kesari, *et al.*, 2004)。これらのオーロン 4 位配糖体は、これらの種においてカルコン 6' 位配糖化酵素と、それを基質として利用できるオーロン合成酵素が存在することを示唆すると同時に、配糖化される水酸基の位置よりも、配糖体という構造自体がカルコンの液胞輸送にとって重要であることを暗にほのめかしている。



キンギョソウやコスモスの遺伝学研究から、黄色の単色発現はアントシアニン生合成欠損変異と強く関係していることが古くから知られていた (Spribille and Forkmann, 1982, 土岐, 1990; 稲津, 1993)。本研究で行われたトランスジェニック解析においても黄色単色発現を実現するためにはオーロン生合成に加え、内在性アントシアニン生合成経路を RNAi 法で抑制する必要があった (図 6-1)。アントシアニン生合成阻害は、①花卉からアントシアニン系の色を除く効果と、②オーロン色素量を増加させるという二つの重要な効果があり、従って自然界のオーロンによる黄色花においてもアントシアニン生合成のどこかに欠損があると考えられる。またキンギョソウの *Sulf* 遺伝子座およびコスモスの (*Y*) 遺伝子座群は共に領域的なオーロン合成の負の制御因子であり、高等植物における共通したオーロン調節機構の存在を示唆する。

遺伝子組換え技術に基づいた分子育種は、交配による従来育種と異なり、導入したい遺伝資源が交配可能な種かどうかは問題としない。その点で非常に汎用性が高い。しかし問題となるのは形質を導入したい植物に汎用的な形質転換法が開発されているかどうかである。シロイヌナズナやイネのようなモデル植物には簡便な形質転換法が開発されているが、多くの園芸植物には未だ汎用的な形質転換が確立されておらず、分子育種の律速となっている場合が少なくない。従って、有用な形質を植物に付与する為には、有用形質を司る遺伝子の単離に平行して標的植物種の形質転換系を開発していくことが不可欠である。

近年、遺伝子組換え植物の利用に関して世界的な関心が寄せられている。その原因のひとつは人為的に組み込んだ遺伝子が自然界へ拡散することに対する懸念である (Ortiz-Garcia, *et al.*, 2005)。事実、今日の科学技術をもってしても一度自然界に拡散した遺伝子の回収はほぼ不可能であろう。本研究により分子育種されたオーロンを生産する黄色のトレニアの宿主植物であるサマーウェーブブルー(SWB; サントリーフラワーズ株式会社)品種は雄性不稔系統であり花粉の拡散の危険性はないが、雌蕊側の稔性が残っており、開放系に出すにはまだ課題が残されている。しかしながら遺伝子組換え技術自体は地球レベルの食糧問題、人口問題、ひいては環境問題を解決できる可能性を秘めたテクノロジーであることは間違いない。従って遺伝子組換え技術は種々の懸念を真摯に受け止めながらも、今後も改良され、将来に渡って応用されてゆくべきであると考え(参考資料)。

以上のようにカルコン 4'位配糖化酵素とオーロン合成酵素遺伝子の共発現に加え、アントシアニン生合成の抑制することでオーロンによる黄色花の分子育種に成功した。黄色フラボノイドであるオーロンの生合成経路は長い間不明であったが、本研究により紫/青～赤/橙～黄色に渡るフラボノイド生合成による花色発現は基本的に理解されたと言える。カルコンはフラボノイド初期化合物であるため、この方法はフラボノイドを生産する全ての植物種において応用可能な非常に汎用的な分子育種法と思われる。主要な園芸植物であるゼラニウム、シクラメン、セントポーリア、インパチェンス、スイートピー、アサガオなどには黄色品種がないため花卉産業において黄色は待望の形質であった。本研究により得られた知見を利用し、将来的にこれらの園芸植物に黄色品種が導入され、花卉園芸産業が活性化することを期待して止まない。

2006年10月29日 小椋栄一郎

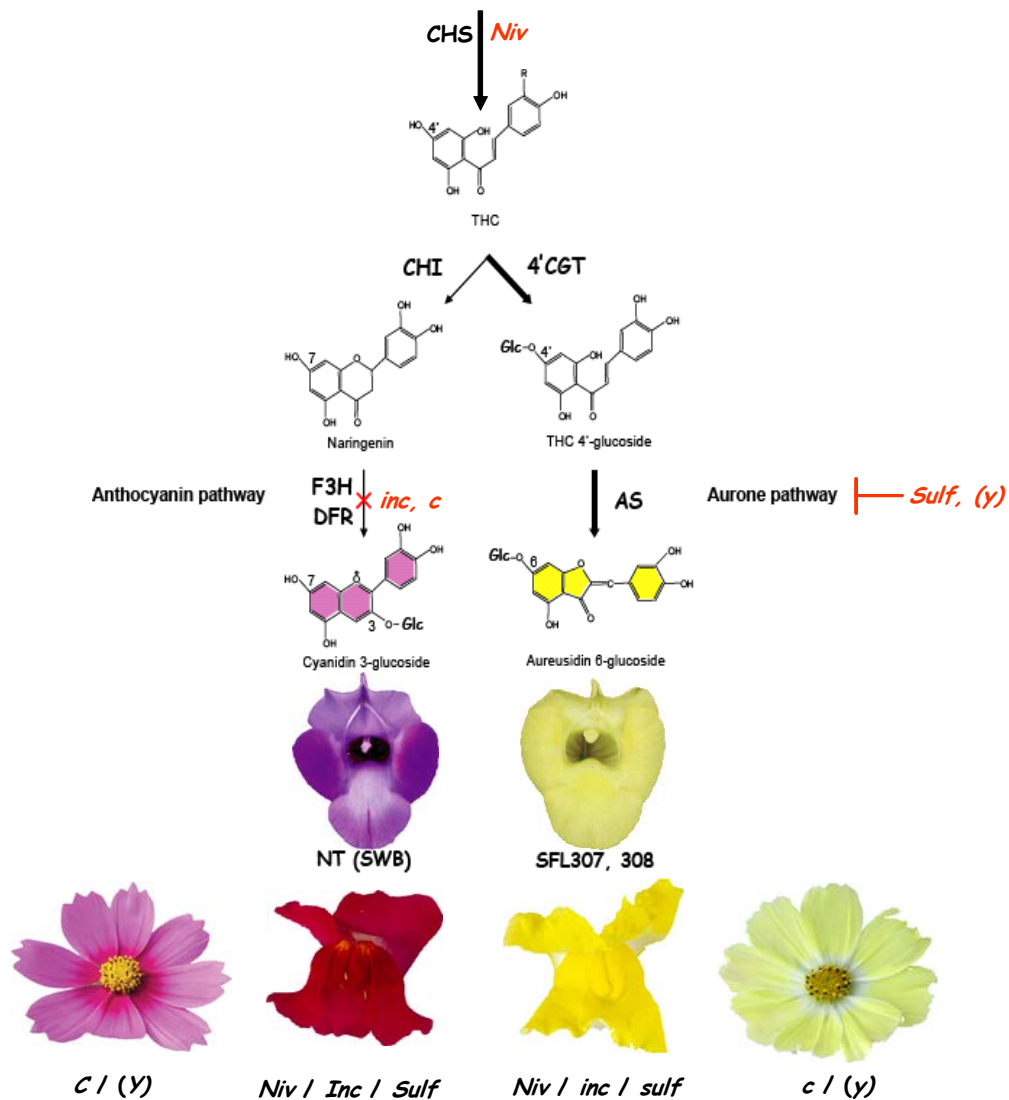


図6-1 オーロン生合成経路のまとめ

本研究においてフラボノイド系色素の最後の謎であった黄色発現を司るオーロン生合成経路が明らかとなった。オーロン経路は初期フラボノイドであるカルコンからアントシアニンおよびフラボン経路と分岐する。カルコンはカルコン4'位配糖化酵素(4'CGT)によって配糖化されて液胞へ輸送されることで、CHIによる異性化および中性付近での非酵素的異性化を逃れることができると考えられる。カルコン4'位配糖体は液胞タンパク質であるオーロン合成酵素(AS)によって酸化的環形成反応を受けてオーロン6位配糖体となる。ほとんどのオーロンが6位配糖体として存在していることから、この経路はアントシアニンの3位配糖体同様に非常に一般的な生合成経路であると考えられる。さらに黄色花を形成するためには*inc*変異のような内在性アントシアニン生合成を抑制する必要がある、それにより黄色の単色発現に加え、黄色色素量を増加させることができる。

謝辞

在学中から直接ご指導ご鞭撻を賜り、研究の楽しさと厳しさを教えていただいた奈良先端科学技術大学院大学の島本功教授に心より感謝申し上げます。また、本研究に携わる機会を与えていただきましたサントリー株式会社基礎研究所の田中隆治博士、久住高章博士、田中良和博士に御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり御高配を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 山田康之学長、同バイオサイエンス研究科 小笠原直毅教授、田坂昌生教授、橋本隆教授、高山誠司教授、川崎努助教授、相田光弘博士、Wong Hann Ling 博士、京都大学生存圏研究所の梅澤俊明教授、京都大学化学研究所の水谷正治博士、岡山大学農学部の故 山田哲治教授、田原誠教授、ならびに東京大学大学院農学研究科の経塚淳子助教授に厚く御礼申し上げます。

オーレウシジン合成酵素の細胞内局在性解析を遂行するにあたり多大なご尽力を賜った東北大学大学院工学研究科 中山亨教授、西野徳三教授、畑山正美君、磯野有理さん、佐藤拓也君、渡辺涼子さんに心より感謝申し上げます。また、寛大にも共焦点光学顕微鏡を使用させていただき、技術のご指導を賜りました京都大学大学院理学研究科の西村いくこ教授、嶋田知生博士、田村健太郎博士に感謝申し上げます。また、mRFP を快く供与していただいた財団法人サントリー生物有機科学研究所の佐竹炎博士およびカリフォルニア大学の Roger Tsien 博士に感謝申し上げます。また、sGFPを供与していただいた静岡県立大学の丹羽康夫博士に御礼申し上げます。ER-Golgi 輸送阻害実験にあたり、野生型およびドミナントネガティブ型シロイヌナズナ SarI を分与していただいた東京大学大学院理学研究科の中野明彦教授に感謝申し上げます。また、mRFP-AVP2 を分与していただいた京都大学人間環境学研究科の佐藤博士に感謝申し上げます。

カルコン 4'位配糖化酵素の活性測定にあたり、技術的なご助言を賜りました南九州大学園芸学部の山口雅篤教授、サントリー基礎研究所の福井祐子博士ならびに奥原宏明博士に心から感謝申し上げます。

トランスジェニック植物の作製と解析にあたってご尽力頂いたサントリー株式会社基礎研究所の水谷正子博士、中村典子さん、小林由美子さん、水谷千代子さん、竹内より代さん、谷口ますみさん、北居直子さん、赤木美紗子さん、松尾朋美さん、豊永宏美さんに心から感謝申し上げます。6年にわたる長い期間、本研究を支えて下さった中尾正宏博士、鈴木賢一博士、榊原圭子博士、勝元幸久さん、衛藤晋一博士、守口由紀子博士、工藤美紀子さんをはじめとするサントリー株式会社基礎研究所員の皆様に御礼申し上げます。

最後に研究活動に理解し、協力してくれた両親 利武と説子、弟 俊郎、ならびに妻 裕子に感謝します。

参考文献

- Aida, R., Kishimoto, S., Tanaka, Y., and Shibata, M. (2000) Modification of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation. *Plant Sci.* **153**, 33–42.
- Alfenito, M. R., Souer, E., Goodman, C. D., Buell, R., Mol. J., Koes, R., and Walbot, V. (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione *S*-transferases. *Plant Cell* **10**, 1135–49.
- Almeida, J., Carpenter, R., Robbins, T. P., Martin, C., and Coen, E. S. (1989) Genetic interactions underlying flower color patterns in *Antirrhinum majus*. *Genes Dev.* **11**, 1758–67.
- Asen, S., Norris, K. H., and Stewart, R. N. (1972) Copigmentation of aurone and flavone from petals of *Antirrhinum majus*. *Phytochemistry* **11**, 2739–2741.
- Baldwin, T.C., Handford, M.G., Yuseff, M.I., Orellana, A. and Dupree, P. (2001) Identification and characterization of GONST1, a golgi-localized GDP-mannose transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 2283–2295.
- Bate-Smith, E. C., and Geissman, T. A. (1951) Benzalcoumaranones. *Nature* **167**, 688.
- Bohm, B. A. (1989) Methods in Plant Biochemistry, Plant Phenolics, **1**, Academic Press (UK) 237–282.
- Bomati, E. K., Austin, M. B., Bowman, M., Dixon, R. A., and Noel, J. P. (2005) Structural elucidation of chalcone reductase and implications for deoxychalcone biosynthesis *J. Biol. Chem.* **280**, 30496–30503.
- Bonas, U., Sommer, H., and Seadler, H. (1984) The 17bp Tam1 element of *Antirrhinum majus* induces a 3bp duplication upon integration into chalcone synthase gene. *EMBO J.* **3**, 1015–1019.
- Borevitz, J. O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R. A., and Lamb, C. (2000) Activation tagging

identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12**, 2383–2394.

Bowles, D., Isayenkova, J., Lim, E-K., and POppernberger, B. (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr. Opi. Plant Biol.* **8**, 254–263.

Bradley, D., Carpenter, R., Sommer, H., Hartley, N., and Coen, E. (1993) Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *plena* locus of *Antirrhinum*. *Cell* **72**, 85–95.

Bradshaw, H. D., and Schemske, D. W. (2003) Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature* **426**, 176–178.

Brugliera, F., Holton, T. H., Stevenson, T. W., Farcy, E., Lu, C-Y., Cornish, E. C. (1994) Isolation and characterization of a cDNA clone corresponding to the *Rt* locus of *Petunia hybrida*. *Plant J.* **5**, 81–92.

Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jones, R. L. (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants, chapter 24, Natural Products (Secondary metabolites), American Society of Plant Physiologists (USA).

Burbulis, I. E., and Winkel-Shirley, B. (1999) Interactions among enzymes of *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 12929–12934.

Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., Tien, R. Y. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 7877–7882.

Chiu, W-L., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., and Sheen, J. (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biol.* **6**, 325–330.

Coen, E. S., Carpenter, R., and Martin, C. (1986) Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum majus*. *Cell* **47**, 285–296.

Coen, E. S., and Meyerowitz, E. M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31–37.

Coen, E (1999) *The Art of Genes*. Oxford University Press (UK).

Davies, K. M., Bloor, S. J., Spiller, G. B., and Deroles, S. C. (1998) Production of yellow colour in flowers: redirection of flavonoid biosynthesis in *Petunia*. *Plant J.* **13**, 259–266.

Davies, K. M., Marshall, G. B., Bradley, J. M., Schwinn, K. E., Bloor, S. J., Winefield, C. S., and Martin, C. R. (2006) Characterisation of aurone biosynthesis in *Antirrhinum majus*. *Physiol. Plant.* **128**, 593–603.

Deavours, B. E., and Dixon, R. A. (2005) Metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. *Plant Physiol.* **138**, 2245–2259.

Debeaujon, I., Peeters, A. J., Leon-Kloosterziel, K. M., and Koornneef, M. (2001) The *TRANSPARENT TESTA12* gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell* **13**, 853–871.

Egea-Cortines, M., Saedler, H., and Sommer, H. (1999) Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* **18**, 5370–5379.

Ferrer, J. L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A., and Noel, J. P. (1999) Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Struct. Biol.* **6**, 775 – 784.

Forkmann, G., and Dangelmayr, B. (1980) Genetic control of chalcone isomerase activity in flowers of *Dianthus caryophyllus*. *Biochem Genet.* **18**, 519–527.

Forkmann, G., and Stotz, G. (1981) Genetic control of flavanone 3-hydroxylase activity and

flavonoid 3'-hydroxylase activity in *Antirrhinum majus* (snapdragon). *Z. Naturforsch.* **36c**, 411-416.

Fukuchi-Mizutani, M., Okuhara, H., Fukui, Y., Nakao, M., Katsumoto, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Kusumi, T., Hase, T., and Tanaka, Y. (2003) Biochemical and molecular characterization of a novel UDP-glucose: anthocyanin 3'-glucosylation, a key enzyme for blue anthocyanin biosynthesis, from Gentian. *Plant Physiol.* **132**, 1652-1663.

Fukada-Tanaka, S., Inagaki, Y., Yamaguchi, T., Saito, N., and Iida, S. (2000) Colour-enhancing protein in blue petals. *Nature* **407**, 581.

Gandia-Herrero, F., Garcia-Carmona, F., and Escribano, J. (2005) Floral fluorescence effect. *Nature* **437**, 334.

Gong, Z., Yamazaki, M., Sugiyama, M., Tanaka, Y., and Saito, K. (1997) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a form-specific manner in *Perilla frutescens*. *Plant Mol. Biol.* **35**, 915-927.

Goodman, C. D., Casati, P., and Walbot, V. (2004) A multigrud resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell* **16**, 1812-1826.

Goodrich, J., Carpenter, R., and Coen, E. S. (1992) A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species. *Cell* **68**, 955-964.

Grotewold, E. (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **57**, 761-780.

Harborne, J. B., and Baxter, H. (1999) *The Handbook of Natural Flavonoids* **2**, John Wiley and Sons Inc. (UK), 196-201.

Harmer, S. L., Hogenesch, J. B., Straume, M., Chang, H-S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J. A., and Kay, S. A. (2000) Orchestrated Transcription of Key Pathways in *Arabidopsis* by the Circadian Clock. *Science* **290**, 2110-2113.

- Hatayama, M., Ono, E., Yonekura-Sakakibara, K., Tanaka, Y., Nishino, T., and Nakayama, T. (2006) Biochemical characterization and mutational studies of a chalcone synthase from yellow snapdragon (*Antirrhinum majus*) flowers. *Plant Biotech.* **23**, 373–378.
- Hirotsani, M., Kuroda, R., Suzuki, H., and Yoshikawa, T. (2000) Cloning and expression of UDP-glucose flavonoid 7-*O*-glucosyltransferase from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Planta* **210**, 1006–1013.
- Holm, M., Ma, L. G., Qu, L. J. and Deng, X. W. (2002) Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **16**, 1247–1259.
- Holton, T. A., and Cornish, E. C. (1995) Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1071–1083.
- Hou, B., Lim, E. K., Higgins, G. S., and Bowles, D. J. (2004) N-glucosylation of cytokinins by glucosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**, 47822–47832.
- Hurkman, W. J., Morr , D. J., Bracker, C. E. and Mollenhauer, H. H. (1979) Identification of etioplast membranes in fractions from soybean hypocotyls. *Plant Physiol.* **64**, 398–403.
- Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A., and Noel, J. P. (2000) Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nature Structural Biol.* **7**, 786–791.
- Jez, J. M., Bowman, M. E., and Noel, J. P. (2002) Expanding the biosynthetic repertoire of plant type III polyketide synthases by altering starter molecule specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 5319–5324.
- Jones, P. R., Moller, B. L., and Hoj, P. B. (1999) The UDP-glucose:p-hydroxymandelonitrile -*O*-glucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor*. Isolation, cloning, heterologous expression, and substrate

specificity. *J. Biol. Chem.* **274**, 35483–35491.

Jones, P., Messner, B., Nakajima, J., Schaffner, A. R., and Saito, K. (2003) UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **278**, 43910–43918.

Joy, R. W. IV., Sugiyama, M., Fukuda, H. and Komamine, A. (1995) Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiol.* **107**, 1083–1089.

Keck, E., McSteen, P., Carpenter, R., and Coen, E. (2003) Separation of genetic functions controlling organ identity in flowers. *EMBO J.* **22**, 1058–1066.

Kesari, A. N., Gupta, R. K., and Watal, G. (2004) Two aurone glycosides from heartwood of *Pterocarpus santalinus*. *Phytochemistry* **65**, 3125–3129.

Kim, J. H., Kim, B. G., Park, Y., Ko, J. H., Lim, C. E., Lim, J., Lim, Y., and Ahn, J-H. (2006) Characterization of flavonoid 7-*O*-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1471–1477.

Kishima, Y., Yamashita, S., Martin, C., and Mikami, T. (1999) Structural conservation of the transposon Tam3 family in *Antirrhinum majus* and estimation of the number of copies able to transpose. *Plant Mol Biol.* **39**, 299–308.

Kitamura, S., Shikazono, N., and Tanaka, A. (2004) *TRANSPARENT TESTA 19* is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *Plant J.* **37**, 104–114.

Koes, R., Verweij, W., and Quattrocchio, F. (2005) Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci.* **10**, 236–242.

Koide, Y., Matsuoka, K., Ohto, M., and Nakamura, K. (1999) The N-Terminal Propeptide and the C Terminus of the Precursor to 20-kilo-dalton Potato Tuber Protein Can Function as

Different Types of Vacuolar Sorting Signals. *Plant Cell Physiol.* **40**, 1152–1159.

Kondo, T., Yoshida, K., Nakagawa, A., Kawai, T., Tamura, H., and Goto, T. (1992) Structural basis of blue-colour development in flower petals from *Commelina communis*. *Nature* **358**, 515–518.

Lawrence, N. J., Rennison, D., McGown, A. T., and Hadfield, J. A. (2003) The total synthesis of an aurone isolated from *Uvaria hamiltonii*: aurones and flavones as anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3759–3763.

Lazo, G. R., Pascal, A. S., and Ludwig, R. A. (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Bio/Technology* **9**, 963–967.

Li, Y., Baldauf, S., Lim, E-K., and Bowles, D. J. (2000) Phylogenetic Analysis of the UDP-glycosyltransferase Multigene Family of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**, 4338–4343.

Lim, E-K., and Bowles, D. J. (2003) A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO J.* **23**, 2915–2922.

Lloyd, A. M., Walbot, V., and Davis R. W. (1992) *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators R and C1. *Science* **258**, 1773–1775

Lord, J. M., Kagawa, T., Moore, T. S. and Beevers, H. (1973) Endoplasmic reticulum as the site of lecithin formation in castor bean endosperm. *J. Cell Biol.* **57**, 659–667.

Luo, D., Coen, E. S., Doyle, S., and Carpenter, R. (1991) Pigmentation mutants produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Plant J.* **1**, 59–69.

Luo, D., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Clark, J., and Coen, E. (1999) Control of organ asymmetry in flowers of *Antirrhinum*. *Cell* **99**, 367–376.

Marrs, K. A., Alfenito, M. R., Lloyd, A. M., and Walbot, V. (1995) A glutathione

S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* **375**, 397–400.

Martin, C., Carpenter, R., Sommer, H., Saedler, H., and Coen, E. S. (1985) Molecular analysis of instability in flower pigmentation of *Antirrhinum majus*, following isolation of the *pallida* locus by transposon tagging. *EMBO J.* **4**, 1625–1630.

Martin, C., Prescott, A., Mackay, S., Bartlett, J., and Vrijlandt, E. (1991) Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J.* **1**, 37–49.

Martin, C., and Gerats, T. (1993) Control of pigment biosynthesis genes during petal development. *Plant Cell* **5**, 1253–1264.

Martin-Calero, M., La Casa, C., Motilva, V., Lopez, A., Alarcon, de la., and Lastra, C. (1996) Healing process induced by a flavonic fraction of *Bidens aurea* on chronic gastric lesion in rat. Role of angiogenesis and neutrophil inhibition. *Z. Naturforsch [C]*. **51**, 570–577.

Matsuoka, K. and Neuhaus, J. M. (1999) Cis-elements of protein transport to the plant vacuoles. *J. Exp. Bot.* **50**, 165–174.

Matsushima, R., Fukao, Y., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2004) NAI gene encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of an endoplasmic reticulum-derived structure, the ER body. *Plant Cell* **16**, 1536–1549.

Meyer, P., Heidmann, I., Forkmann, G., and Saedler, H. (1987) A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* **330**, 677–678.

Minlong, C., Takayanagi, K., Kamada, H., Nishimura, S., and Handa, T. (2000) Transformation of *Antirrhinum majus* L. by a rol-type multi-auto-transformation (MAT) vector system. *Plant Sci.* **159**, 273–280.

Mitsuda, N., Enami, K., Nakata, M., Takeyasu, K., Masa, H. and Sato, M. H. (2001) Novel type Arabidopsis thaliana H⁺-PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* **488**,

29–33.

Mitsuhara, I., Ugaki, K., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishimiya, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y., and Ohashi, Y. (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* **37**, 49–59.

Mol, J., Cornish, E., Mason, J., and Koes, R. (1999) Novel coloured flowers. *Curr Opin Biotechnol.* **10**, 198–201.

Morita, Y., Hoshino, A., Kikuchi, Y., Okuhara, H., Ono, E., Tanaka, Y., Fukui, Y., Saito, N., Nitasaka, E., Noguchi, H., and Iida, S. (2005) Japanese morning glory *dusky* mutants displaying reddish–brown or purplish–gray flowers are deficient in a novel glycosylation enzyme for anthocyanin biosynthesis, UDP–glucose:anthocyanidin 3-*O*-glucoside-2'-*O*-glucosyltransferase, due to 4-bp insertions in the gene. *Plant J.* **42**, 353–363.

Mulichak, A. M., Losey, H. C., Lu, W., Walsh, C. T., Garavito, R. M. (2001) Structure of the UDP–glucosyltransferase Gtf that modifies the heptapeptide aglycone in the biosynthesis of vancomycin group antibiotics. *Structure* **9**, 547–557.

Nagashima, S., Hirotani, M., and Yoshikawa, T. (2000) Purification and characterization of UDP–glucuronate: baicalein 7-*O*-glucuronosyltransferase from *Scutellaria baicalensis* Georgi. Cell suspension cultures. *Phytochemistry* **53**, 533–538.

Nakayama, T., Yonekura–Sakakibara, K., Sato, T., Kikuchi, S., Fukui, Y., Fukuchi–Mizutani, M., Ueda, T., Nakao, M., Tanaka, Y., Kusumi, T. and Nishino, T. (2000) Aureusidin synthase: A polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science* **290**, 1163–1166.

Nakayama, T., Sato, T., Fukui, Y., Yonakura–Sakakibara, K., Hayashi, H., Tanaka, Y., Kusumi, T. and Nishino, T. (2001) Specificity analysis and mechanism of aurone synthesis catalyzed by aureusidin synthase, a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *FEBS Lett.* **499**, 107–111.

- Nakayama, T. (2002) Enzymology of aurone biosynthesis. *J. Biosci. Bioengin.* **94**, 487–491.
- Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M., and Lepiniec, L. (2001) The *Arabidopsis TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* **13**, 2099–2114.
- Neuhaus, J. M., and Rogers, J. C. (1998) Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol. Biol.*, **38**, 127–144.
- Niovi-Jones, K., and Reithel, J. S. (2001) Pollinator-mediated selection on a flower color polymorphism in experimental populations of *Antirrhinum* (Scrophulariaceae). *Am. J. Bot.* **88**, 447–454.
- Niwa, Y., Hirano, T., Yoshimoto, K., Shimizu, M. and Kobayashi, H. (1999) Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T-type green fluorescent protein in living plants. *Plant J.* **18**, 455–463.
- Noda, K., Glover, B. J., Linstead, P., and Martin, C. (1994) Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. *Nature* **369**, 661–664.
- Noji, M., Inoue, K., Kimura, N., Gouda, A., and Saito, K. (1998) Isoform-dependent differences in feedback regulation and subcellular localization of serine acetyltransferase involved in cystein biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 32739–32745.
- Offen, W., Martinez-Fleites, C., Yang, M., Kiat-Lim, E., Davis, B. G., Tarling, C. A., Ford, C. M., Bowles, D. J., and Davies, G. J. (2006) Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *EMBO J.* **25**, 1396–1405
- Ogata, J., Kanno, Y., Itoh, Y., Tsugawa, H., and Suzuki, M. (2005) Anthocyanin biosynthesis in roses. *Nature* **435**, 757–756.

Ogata, J., Itoh, Y., Ishida, M., Yoshida, H., and Ozeki, Y. (2004) Cloning and heterologous expression of cDNAs encoding flavonoid glucosyltransferases from *Dianthus caryophyllus*. *Plant Biotech.* **21**, 367–375.

Ogawa, J., Itoh, Y., Ishida, M., Yoshida, H., and Ozeki, Y. (2004) Cloning and heterologous expression of cDNAs encoding flavonoid glucosyltransferases from *Dianthus caryophyllus*. *Plant Biotech.* **21**, 367–375.

Ortiz-Garcia, S., Ezcurra, E., Schoel, B., Acevedo, F., Soberon, J., and Snow, A. A. (2005) Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003–2004). *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**, 12338–12343.

Paine, J. A., Shipton, C. A., Chaggar, S., Howells, R. M., Kennedy, M. J., Vernon, G., Wright, S. Y., Hinchliffe, E., Adams, J. L., Silverstone, A. L., and Drake, R. (2005) Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat Biotechnol.* **23**, 482–487.

Poppenberger, B., Fujioka, S., Soeno, K., George, G. L., Vaistij, F. E., Hiranuma, S., Seto, H., Takatsuto, S., Adam, G., Yoshida, S., and Bowles, D. (2005) The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 15253–15258.

Quattrocchio, F., Wing, J., van der Woude, K., Souer, E., de Vetten, N., Mol, J., and Koes, R. (1999) Molecular analysis of the *anthocyanin2* gene of petunia and its role in the evolution of flower color. *Plant Cell* **11**, 1433–1444.

Quattrocchio, F., Verweij, W., Kroon, A., Spelt, C., Mol, J., and Koes, R. (2006) PH4 of *Petunia* is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *Plant Cell* **18**, 1274–1291.

Rathmell, W. G., and Bendall, D. S. (1972) The peroxidase-catalysed oxidation of a chalcone and its possible physiological significance. *Biochem J.* **127**, 125–132.

- Rausher, M. D.** (2005) The Science of Flavonoids: The evolution of flavonoids and their genes, in *The Science of Flavonoids*, edited by E. Grotewold, Springer-Verlag (US) Inc. 175-211.
- Ray, P. M., Shininger, T. L. and Ray, M. M.** (1969) Isolation of β -glucan synthetase particles from plant cells and identification with Golgi membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **64**, 605-612.
- Ray, H., Yu, M., Auser, P., Blahut-Beatty, L., McKersie, B., Bowley, S., Westcott, N., Coulman, B., Lloyd, A., and Gruber, M. Y.** (2003) Expression of anthocyanins and proanthocyanidins after transformation of alfalfa with maize Lc. *Plant Physiol.* **132**, 1448-1463.
- Richman, A. , Swanson, A., Humphrey, T., Chapman, R., McGarvey, B., Pocs, R., and Brandle, J.** (2005) Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *Plant J.* **41**, 56-67.
- Ross, J., Li, Y., Lim, E-K., and Bowles, D. J.** (2001) Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol.* **2**, 3004.1-3004.6.
- Sato, T., Nakayama, T., Kikuchi, S., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Ueda, T., Nishino, T., Tanaka, Y. and Kusumi, T.** (2001) Enzymatic formation of aurones in the extracts of yellow snapdragon flowers. *Plant Sci.* **160**, 229-236.
- Sawada, S., Suzuki, H., Ichimaida, F., Yamaguchi, M., Iwashita, T., Fukui, Y., Hemmi, H., Nshino, T., and Nakayama, T.** (2005) UDP-glucuronic acid:anthocyanin glucuronosyltransferase from red daisy (*Bellis perennis*) flowers. *J. Biol. Chem.* **280**, 899-905.
- Saunders, J. A., Conn, E. E., Lin, C. H. and Shimada, M.** (1977) Localization of cinnamic acid 4-monooxygenase and the membrane-bound enzyme system for dhurrin biosynthesis in Sorghum seedlings. *Plant Physiol.* **60**, 629-634.
- Schwarz-Sommer, Z., Davies, B., and Hudson, A.** (2003) An everlasting pioneer: the story of *Antirrhinum* research. *Nature Rev. Genet.* **4**, 655-664.

- Schwinn, K., Venail, J., Shang, Y., Mackay, S., Alm, V., Butelli, E., Oyama, R., Bailey, P., Davies, K., and Martin, C. (2006) A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *Plant Cell* **18**, 831–851.
- Shimokoriyama, M., and Hattori, S. (1952) Anthochlor pigments of *Cosmos sulphureus*, *Coreopsis lanceolata* and *C. saizicola*. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1900–1904.
- Shiono, M., Matsugaki, N., and Takeda, K. (2005) Structure of the blue cornflower pigment. *Nature* **436**, 791.
- Sommer, H., and Saedler, H. (1986) Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*. *Mol. Gen. Gen.* **202**, 429–434.
- Spelt, C., Quattrocchio, F., Mol, J., and Koes, R. (2002) *ANTHOCYANINI* of petunia controls pigment synthesis, vacuolar pH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms. *Plant Cell* **14**, 2121–2135.
- Spelt, C., Quattrocchio, F., Mol, J. N., and Koes, R. (2000) *Anthocyanin1* of petunia encodes a basic helix–loop–helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell* **12**, 1619–1632.
- Spribille, R., and Forkmann, G. (1982) Genetic control of chalcone synthase activity in flowers of *Antirrhinum majus*. *Phytochemistry* **21**, 2231–2234.
- Strack, D. and Schliemann, W. (2001) Biofunctional polyphenol oxidases: new functions in plant pigment biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **40**, 3791–3794.
- Stubbe, H. (1974) New mutants of *Antirrhinum majus*. *Kulturpflanze* **22**, 376.
- Sutton, D. (1988) A Revision of the Tribe *Antihhineae*. Oxford Univ. Press, Oxford (UK).
- Takeuchi, M., Ueda, T., Sato, K., Abe, H., Nagata, T. and Nakano, A. (2000) A dominant

negative mutant of Sar1 GTPase inhibits protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi body in tobacco and *Arabidopsis* cultures cells. *Plant J.* **23**, 517–525.

Tamura, K., Shimada, T., Ono, E., Tanaka, Y., Nagatani, A., Higashi, S., Watanabe, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2003) Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. *Plant J.* **35**, 545–555.

Tamura, K., Shimada, T., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2005) KATAMARI1 is a novel Golgi membrane protein that is required for endomembrane organization in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 1764–1776.

Tanaka, Y., Fukui, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Holton, T. A., Higgins, E., and Kusumi, T. (1995) Molecular Cloning and Characterization of *Rosa hybrida* Dihydroflavonol 4-reductase Gene. *Plant Cell Physiol* **36**, 1023–1031.

Tanaka, Y., Tsuda, S., and Kusumi, T. (1998) Metabolic Engineering to Modify Flower Color *Plant Cell Physiol.* **39**, 1119–1126.

Tanaka, Y., Katsumoto, Y., Brugliera, F., and Mason, J. (2005) Genetic engineering in floriculture. *Plant Cell Tissue. Org. Cult.* **80**, 1–24.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680.

Thompson, W. R., and Meinwald, J. (1972) Flavonoids: Pigments responsible for ultraviolet absorption in nectar guide of flower. *Science* **177**, 528–530.

Tukey, R. H. and Strassburg, C. P. (2000) Human UDP-Glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 581–616.

van Engelen, F. A., Molthoff, J. W., Conner, A. J., Nap, J. P., Pereira, A., and Stiekema, W. J. (1995) pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic*

Res. **4**, 288–290.

Vaughn, K. C., Lax, A. R. and Duke, S. O. (1988) Polyphenol oxidase: the chloroplast enzyme with no established function. *Physiol. Plant.* **72**, 659–665.

Venkateswarlu, S., Panchagnula, G. K., and Subbaraju, G. V. (2004) Synthesis and antioxidative activity of 3',4',6,7-tetrahydroxyaurone, a metabolite of *Bidens frondosa*. *Biosci Biotech. Biochem.* **68**, 183–185.

Vogt, T., and Jones, P. (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a super gene family. *Trends Plant Sci.* **5**, 380–386.

Whibley, A. C., Langlade, N. B., Andalo, C., Hanna, A. I., Bangham, A., Thebaud, C., and Coen, E. (2006) Evolutionary paths underlying flower color variation in *Antirrhinum*. *Science.* **313**, 963–966.

Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **126**, 485–493.

Xie, D-Y., Sharma, S. B., Wright, E., Wang, Z. Y., and Dixon, R. A. (2006) Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expression of anthocyanidin reductase and the PAP1 MYB transcription factor. *Plant J.* **45**, 895–907.

Xie, D. Y., Sharma, S. B., Paiva, N. L., Ferreira, D., and Dixon, R. A. (2003) Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. *Science* **299**, 396–399.

Ye, X., Al-Babili, S., Klott, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., and Potrykus, I. (2000) Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* **287**, 303–305.

Yonekura-Sakakibara, Tanaka, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Fujiwara, H., Fukui, Y., Ashikari, T., Murakami, Y., Yamaguchi, M., and Kusumi, T. (2000) Molecular and biochemical

characterization of a novel hydroxycinnamoyl-CoA: anthocyanin 3-*O*-glucoside-6''-*O*-Acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant Cell Physiol.* **41**, 495-502.

Zhang, S. X., Tani, T., Yamaji, S., Ma, C. M., Wang, M. C., Cai, S. Q., and Zhao, Y. Y. (2003) Glycosyl flavonoids from the roots and rhizomes of *Asarum longerhizomatosum*. *J. Asian. Nat. Prod. Res.* **5**, 25-30.

Zufall, R. A., and Rausher, M. D. (2004) Genetic changes associated with floral adaptation restrict future evolutionary potential. *Nature* **428**, 847-850.

足立泰二、吉玉國二郎 (2004) 植物色素研究法、大阪公立大学共同出版会

磯野友理 (2002) 修士論文

稲津厚生 (1993) コスモス(*Cosmos bipinnatus* Cav.)におけるイエロー花色品種の成立に関する生化遺伝学的研究、玉川大学農学部研究報告、33 巻

大庭理一郎、五十嵐善治、津久井紀夫 (2000) アントシアニン、建帛社

小林正明 (2001) 身近な植物から花の進化を考える、東海大学出版会

斉藤規夫 (1990) バイオホルティ: 実用化した胚培養 黄色花の育種 **1**、誠文堂新光社

佐藤拓也 (2000) 修士論文

武田幸作 (1996) アジサイはなぜ七色に変わるのか、PHP 研究所出版

土岐健次郎 (1990) バイオホルティ: 培養と変異 白色花の育種 **4**、誠文堂新光社

バルト フリードッヒ (1997) 昆虫と花—共生と共進化、渋谷達明訳、八坂書房

福田裕穂、西村幹夫、中村研三 (1997) 植物の細胞を観る実験プロトコール、植物細胞工学シリーズ **6**、秀潤社

船山信次 (1998) アルカロイド-毒と薬の宝庫-、共立出版

安田薺 (1993) 花色の生理／生化学、内田老鶴圃

山村庄亮、長谷川宏司 (2005) 植物の知恵—化学と生物学からのアプローチ、大学教育出版

渡辺涼子 (2006) 修士論文

出版物

小椋 栄一郎、中山 亨 (2007) 黄色フラボノイド、オーロンによる黄色花の分子育種。

BRAIN テクノ ニュース 119 号、印刷中

Ono, E., Fukuchi-Mizutani, M., Nakamura, N., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Yamaguchi, M., Nakayama, T., Tanaka, T., Kusumi, T., and Tanaka, Y. (2006)

Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**, 11075-11080.

Ono, E., Hatayama, M., Isono, Y., Sato, T., Watanabe, R., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Tanaka, Y., Kusumi, T., Nishino, T., and Nakayama, T. (2006)

Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuole.

Plant J. **45**, 133-143.

Ono, E., Nakai, M., Fukui, Y., Tomimori, N., Fukuchi-Mizutani, M., Saito, M., Satake, H., Tanaka, T., Katsuta, M., Umezawa, T., and Tanaka, Y. (2006)

Formation of two methylenedioxy bridges by a *Sesamum* CYP81Q protein yielding a furofuran lignan, (+)-sesamin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**, 10116-10121.

Hatayama, M., Ono, E., Yonekura-Sakakibara, K., Tanaka, Y., Nishino, T., and Nakayama, T. (2006) Biochemical characterization and mutational studies of a chalcone synthase from yellow snapdragon (*Antirrhinum majus*) flowers.

Plant Biotech. **23**, 373-378.

Tarui, Y., Iida, H., Ono, E., Miki, W., Hirasawa, E., Fujita, K., Tanaka, T., and Taniguchi, M. (2005) Biosynthesis of poly- γ -glutamic acid in plants: Transient expression of poly- γ -glutamate complex in tobacco leaves.

J. Biosci. Bioeng. **100**, 443-448.

Morita, Y., Hoshino, A., Kikuchi, Y., Okuhara, H., Ono, E., Tanaka, Y., Fukui, Y., Saito, N., Nitasaka, E., Noguchi, H., and Iida, S. (2005)

Japanese morning glory *dusky* mutants displaying reddish-brown or purplish-gray flowers are deficient in a novel glycosylation enzyme for anthocyanin biosynthesis, UDP-glucose:anthocyanidin 3-*O*-glucoside-2''-*O*-glucosyltransferase, due to 4-bp insertions in the gene.

Plant J. **42**, 353-363.

Tamura, K., Shimada, T., Ono, E., Tanaka, Y., Nagatani, A., Higashi, S., Watanabe, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2003)

Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants.

Plant J. **35**, 545-555.

Ono, E., Wong, H-L., Kawasaki, T., Hasegawa, M., Kodama, O., and Shimamoto, K. (2001)

Essential role of the small GTPase rac in disease resistance of rice

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 759-764.

Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H., and Shimamoto, K.

(1999) The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants.

Proc Natl Acad Sci USA **96**, 10922-10926.

參考資料

UGT88D3: 1374bp

```
ATGGGAGAAGAATAACAAGAAAACACACACAATAGTCTTTACACTTCAGAAGAACACCTCAACTCTTCAATAGCCCTTGCAAAGTTGATAACCAAACACC 100
M G E E Y K K T H T I V F H T S E E H L N S S I A L A K F I T K H>
ACTTCTCAATCTCCATCACTATCATCAGCACTGCCCCGCGCAATCTTCTGAAGTGGCCAAAATTATTAATAATCCGTCAATAACTACCGCGGCCTCAC 200
H S S I S I T I I S T A P A E S S E V A K I I N N P S I T Y R G L T>
CGCGGTAGCGCTCCCTGAAAAATCTCACCAGTAACATTAATAAAAACCCCGTCGAACCTTTCTCGAAATCCCTCGTCTACAAAACGCCAACCTTCGAGAG 300
A V A L P E N L T S N I N K N P V E L F F E I P R L Q N A N L R E>
GCTTTACTAGATATTTTCGCGAAAAATCCGATATCAAAGCATTAATCATCGATTTCTTCTGCAATGCGGCATTTGAAGTATCCACCAGCATGAACATACCCA 400
A L L D I S R K S D I K A L I I D F F C N A A F E V S T S M N I P>
CTTACTTCGAGCTCAGTGGCGGCGCTTTTCTCCTCTGCACGTTTCTCCACCACCCGACACTACACAAACTGTTCTGGAGACATTGCGGATTTGAACGA 500
T Y F D V S G G A F L L C T F L H H P T L H Q T V R G D I A D L N D>
TTCTGTTGAGATGCCCGGTTCCCATGATTCACTCCTCTGATTTACCAATGAGTTTGTGTTTATCGTAAGACTAATGTTTACAAAACACTTTCTAGACACT 600
S V E M P G F P L I H S S D L P M S L F Y R K T N V Y K H F L D T>
TCCTTAAACATGCGCAAAATCGAGTGGGATACTCGTGAACACGTTTGTTCGCTCGAGTTTCGAGCTAAGGAAGCTTTGTCCAACGGTTGTACGGTCCAA 700
S L N M R K S S G I L V N T F V A L E F R A K E A L S N G L Y G P>
CTCCGCTCTTTATTTACTTTACATACAATTGCCGAACCCACGACACTAAAGTGTGGTAAACCAACACGAATGCCTATCATGGCTTGATTTGCAGCC 800
T P P L Y L L S H T I A E P H D T K V L V N Q H E C L S W L D L Q P>
TAGTAAAAGCGTGATTTTCCCTTTGTTTCGGAAAGAGGAGCGTTCTCAGCACAAACAGTTGAAAGAAATTCGGATAGGGTTGGAGAAGAGTGGATGTCGA 900
S K S V I F L C F G R R G A F S A Q Q L K E I A I G L E K S G C R>
TTTCTTTGTTGGCCCGCATTTTACCCGGAGATGGACTTAAATGCGCTTCTGCCGAGGGTTTTCTATCGAGAATAAAGGAGTAGGGTTTGTGACAAAACA 1000
F L W L A R I S P E M D L N A L L P E G F L S R T K G V G F V T N>
CATGGGTGCCGAAAAAGAGGTGTTGAGTCATGATGCAGTGGGGGGTTTTGACTCATTGCGGGTGGAGTTCGGTTCTTGAAGCGCTGTCGTTCCGGTGT 1100
T W V P Q K E V L S H D A V G G F V T H C G W S S V L E A L S F G V>
CCCATGATTGGTTGGCCGTTGTACGCAGACGAGGATCAATAGGGTGTTCATGGTGGAGGAAATAAAGGTGGCGCTGCCATTGGATGAGGAAGATGGA 1200
P M I G W P L Y A E Q R I N R V F M V E E I K V A L P L D E E D G>
TTTGATGCGGCGATGGAGTTGGAGAAGCGCGTCAGGGAGTTGATGGAGTCGGTAAAGGGGAAAGAGTGAAGCGCGGTGGCGGAATTGAAAATCTCTA 1300
F V T A M E L E K R V R E L M E S V K G K E V K R R V A E L K I S>
CAAAGCGACCGTGAGTAAAGGTGATCGTCTTGGCTTCTTTGGAGAAGTTCATCAACTCGGTCACTCGTTAA
T K A A V S K G G S S L A S L E K F I N S V T R *
```


科学



遺伝子操作

花びらの色、青から黄へ サントリー研究者ら成功

植物の色素を作る遺伝子の組み換えで、花びらの色を青から黄色に変えた花を咲かせることにサントリー先進コア技術研究所の小笠栄一郎研究員と東北大学の中山亨教授らのグループが成功した。黄色の花がないゼラニウムやセントポーリアでも、黄

色の花を咲かせる品種の開発につながるという。青い色素「アントシアニン」をつくる遺伝子を働かせないよう、遺伝子操作で、黄色の色素が作られることを解明、それぞれの遺伝子も特定した。そこでこの二つの遺伝子を組み換えて、花びらの色を青から黄色に変えた花を咲かせることに成功した。同社は「様々な植物にも共通するアントニン合成の遺伝子操作で止めれば、他の植物でも花の色を変えることができる可能性がある」としている。(林義明)

朝日新聞 2006年7月29日

青でも赤でも黄色い花にできます
黄色い花の色素の遺伝子を青い花に組み込み、花の色を黄色に変えることに、サントリーや東北大学などの共同研究チームが成功した。11面NEWSLINEに専載。この技術を活用すれば、赤やピンクの花で有名なゼラニウムやセントポーリアなどに鮮やかな黄

サントリーなど成功

色の花を咲かせることも可能になるという。10日付の米科学アカデミー紀要(電子版)に発表された。研究チームは、キンギョソウの花を黄色にする色素「オロロン」ができる過程で働く種類の遺伝子を特定した。これらの遺伝子の作用で、色素の量になる物質が化

遺伝子組み換えで

新しい新品種作りにも有効とされる。サントリーはこれまで青いカーネーションを商品化。4年には「青いバゴ」を開発した。サントリー先進コア技術研究所の小笠栄一郎研究員は「花の色にかかわらず、多くの植物がオロロンのもとになる物質を持っており、広い応用が期待できると話している。」(元村有希子)

毎日新聞 2006年7月11日

29 社会3

遺伝子操作で黄色の花を咲かせたトレニア(サントリー提供)



遺伝子操作で黄色のトレニア
サントリーは、現在のところ品種化の予定はないとしているが、研究グループは「ゼラニウムやセントポーリアなど黄色の品種がない植物でも、トリー先進コア技術研究所の小笠栄一郎研究員らと東北大学が10日、米科学アカデミー紀要(電子版)に発表した。小笠研

京都新聞 2006年7月12日

MAINICHI
新毎日
新聞日

発行所: 東京都千代田区一ツ橋1-1-1 〒100-8051 電話: 03(3212-0321)
郵便振替口座: 00180-3-2000
©毎日新聞社 2006

mini C series
CAT
www.scm.co.jp
新キャタヒラ-三菱

NEWSLINE (11)

今度は黄色 鮮やかに 3

遺伝子組み換え技術で、青い花「トレニア」を黄色に変えることにサントリーなどが成功した。一社提供。応用すれば、黄色い花のゼラニウムやセントポーリアも作れるという。



Identification of the biosynthetic pathway of yellow flavonoid, aurone in snapdragon (*Antirrhinum majus*), could open the way to engineering yellow flowers for ornamental plants lacking this color, such as gerar

PNAS

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

Yellow flowers to order

Any well-stocked florist has no dearth of colors to pick from when putting together a bright bouquet. But for some of the most common ornamental flowers, such as geraniums, cyclamens and morning glories, yellow color varieties remain conspicuous by their absence. This situation has been rectified by Ono *et al.*, who have succeeded in characterizing the final enzyme step in the biosynthesis of a class of flavonoids, the aurones, that confer a bright yellow hue to, among others, snapdragon flowers (*Antirrhinum majus*). Coexpression of this enzyme, a chalcone 4'-O-glucosyltransferase, and a previously described enzyme, aureusidin synthase, dramatically increases levels of aurones in the wishbone flower (*Torenia hybrida*). When the biosynthesis of anthocyanins, a class of flavonoids responsible for blue coloration, is simultaneously downregulated by RNA interference, bright yellow flowers result (see inset picture). The authors propose that the use of water-soluble aurones adds a new dimension to engineering the color of ornamental flowers, complementing what can be achieved using more traditional, hydrophobic carotenoid pigments. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11075–11080, 2006) GTO



NATURE BIOTECHNOLOGY VOLUME 24 NUMBER 8 AUGUST 2006



多様な花色発現をするキンギョソウ（京都府立植物園にて(2006年)）

原著論文



NAIST 駐車場に咲く姫金魚草 (*Linaria* spp.)。