

## 論文内容の要旨

申請者氏名 小埜 栄一郎

多様な花色発現は主としてアントシアニンと呼ばれる水溶性のフラボノイド色素によって決定される。アントシアニンは橙～赤～紫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、生合成酵素遺伝子については概ね明らかとなっている。一般的にアントシアニンは3位の水酸基が配糖化されており、色素の安定性や分子会合に寄与しているとされている。アントシアニン色素は骨格形成後に配糖化やアシル化などの修飾受け、液胞に輸送されて蓄積する。黄色のフラボノイド色素であるオーロンは蛍光特性を有する鮮やかな黄色を呈するフラボノイドであり、オーロン的一种であるオーレウシジンの6位配糖体はゴマノハグサ科キンギョソウの黄色花卉の主要色素である。これ以外にもリナリア、ダリア、ダイズ、オキザリス、スターチスなど植物界に幅広く存在するフラボノイド色素である。また、ゼニゴケなどの苔類においてもオーロンの蓄積が報告されている。オーロンの多くは6位が配糖化されている。花卉産業では花色は重要な形質であるが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、アサガオなどには黄色がないため黄色品種の開発が切望されている。

黄色キンギョソウ花卉から、カルコンからオーレウシジンを生成する活性を指標にオーロン合成酵素 (AmAS1) が精製された。単離された AmAS1 は銅を含む 39kDa の糖タンパク質であった。アミノ酸配列を基に単離された AmAS1 遺伝子は推定 64kDa のポリフェノール酸化酵素 ホモログであった。しかしながら AmAS1 を過剰発現する形質転換トレニアはオーロンの蓄積は認められず、花色は変化しなかった。

本研究では AmAS1 タンパク質の細胞内局在性を細胞小器官分画サンプルのウェスタンブロット解析と、AmAS1 と GFP とを融合したキメラタンパク質を用いた一過的発現解析によって検討した。活性型と思われる 39kDa のバンドと AmAS1 活性は液胞マーカーと共存した。AmAS1 の N 末 60 アミノ酸と GFP を融合した遺伝子をタマネギおよびキンギョソウ花卉に発現させた結果、いずれも遺伝子導入 48 時間後に液胞に局在した。この液胞局在性は小胞体からゴルジ体への小胞輸送を抑制するドミナントネガティブ型の AtSar1 との共発現により阻害されたため、AmAS1 は小胞体からゴルジ体を経て液胞へ輸送されることが考えられた。

カルコンは中性付近の pH で自動閉環する不安定なフラボノイドであるが、酸性条件下では安定である。AmAS1 はカルコン 4' 位配糖体を基質にオーロン 6 位配糖体を生成できることから、オーロン合成の場合は液胞で、AmAS1 の真の基質はカルコン 4' 位配糖体であると考え、キンギョソウ花卉由来 cDNA ライブラリーからカルコン 4' 位配糖化酵素遺伝子の単離を試みた。二次代謝に関わる配糖化酵素 (UGT) に高く保存されている PSPG ボックスを含む領域をプローブにスクリーニングした結果、18 種のキンギョソウ由来 UGT 遺伝子を同定した。この中で AmAS1 と協調的な遺伝子発現パターンを示す UGT88D3 を同定した。Blast 解析の結果、UGT88D3 はシロイヌナズナの機能未知の UGT88A1 と弱い相同性を示し、その一次配列から機能は推定できなかった。大腸菌において発現させた UGT88D3 をカルコンと反応させたところ 4' 位に特異的に配糖化活性を有していた。UGT88D3 を過剰発現させたトレニアにおいてカルコン 4' 位配糖体の蓄積を確認した。さらに UGT88D3 と AmAS1 とを共発現したトレニアにおいてオーロン 6 位配糖体の蓄積を確認した。共発現に加え、内在性アントシアニン経路を抑制したトレニアにおいて黄色い花卉が形成された。以上のようにカルコンの 4' 位配糖化と、それに引き続く酸化的な環形成反応がオーロン 6 位配糖体に至る分子機構であることを明らかにした。本研究での黄色花の分子育種法は初期フラボノイドであるカルコンを基質とするため、極めて汎用的な方法であり、将来的に花卉園芸産業に大きく貢献できるものと期待される。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 小 埜 栄 一 郎

本研究は、これまで明らかにされていなかった黄色のフラボノイド色素であるオーロンの生合成機構を明らかにするとともに、分子育種的な手法により黄色花を作ることに成功した。

黄色キンギョソウ花卉から、カルコンからオーレウシジンを生合成する活性を指標にオーロン合成酵素 (AmAS1) の遺伝子が単離された。しかしながら AmAS1 を過剰発現する形質転換トレニアはオーロンの蓄積は認められず、花色は変化しなかった。そこで、本研究では AmAS1 タンパク質の細胞内局在性を細胞小器官分画サンプルのウェスタンブロット解析により解析したところ、AmAS1 は液胞に局在することが明らかになった。この液胞局在性は小胞体からゴルジ体への小胞輸送を抑制するドミナントネガティブ型の AtSar1 との共発現により阻害されたため、AmAS1 は小胞体からゴルジ体を経て液胞へ輸送されると考えられた。

カルコンは中性付近の pH で自動閉環する不安定なフラボノイドであるが、酸性条件下では安定である。AmAS1 はカルコン 4' 位配糖体を基質にオーロン 6 位配糖体を生成できることから、オーロン合成の場合は液胞で、AmAS1 の真の基質はカルコン 4' 位配糖体であると考え、キンギョソウ花卉由来 cDNA ライブラリーからカルコン 4' 位配糖化酵素遺伝子の単離を試みた。二次代謝に関わる配糖化酵素 (UGT) に高く保存されている PSPG ボックスを含む領域をプローブにスクリーニングした結果、18 種のキンギョソウ由来 UGT 遺伝子を同定した。この中で AmAS1 と協調的な遺伝子発現パターンを示す UGT88D3 を同定した。Blast 解析の結果、UGT88D3 はシロイヌナズナの機能未知の UGT88A1 と弱い相同性を示し、その一次配列から機能は推定できなかった。大腸菌において発現させた UGT88D3 をカルコンと反応させたところ 4' 位に特異的に配糖化活性を有していた。UGT88D3 を過剰発現させたトレニアにおいてカルコン 4' 位配糖体の蓄積を確認した。さらに UGT88D3 と AmAS1 とを共発現したトレニアにおいてオーロン 6 位配糖体の蓄積を確認した。共発現に加え、内在性アントシアニン経路を抑制したトレニアにおいて黄色い花卉が形成された。以上のようにカルコンの 4' 位配糖化と、それに引き続く酸化的な環形成反応がオーロン 6 位配糖体に至る分子機構であることを明らかにした。本研究での黄色花の分子育種法は初期フラボノイドであるカルコンを基質とするため、極めて汎用的な方法であり、将来的に花卉園芸産業に大きく貢献できるものと期待される。

以上のように、本論文は黄色のフラボノイド色素であるオーロンの生合成機構を初めて明らかにし、その機構を利用した分子育種により黄色花卉をもたない園芸植物に黄色花を付与することに成功したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。