

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	吉原 法子
題 目	ダッチアイリスのアントシアニン生合成に関する分子遺伝学的研究 (A molecular genetic study on anthocyanin biosynthesis of <i>Iris hollandica</i>)
<p>代表的な花色色素であるアントシアニンの生合成に関する分子遺伝学的知見を蓄積することは、効率的な花色育種を進める上で極めて重要である。そこで、<i>Iris</i> 属の代表的な園芸種であるダッチアイリスのアントシアニン生合成を分子遺伝学的に解析し、花色育種を促進するために本研究を遂行した。</p> <p>まず、ダッチアイリスの青紫色花品種「ブルーダイヤモンド」(BD)のアントシアニン生合成酵素、カルコンシンターゼ(<i>IhCHS</i>)、カルコンイソメラーゼ(<i>IhCHI</i>)、フラバノン3-ヒドロキシラーゼ(<i>IhF3H1~3</i>)、ジヒドロフラボノール4-レダクターゼ(<i>IhDFR</i>)、アントシアニンシンターゼ(<i>IhANS</i>)およびアントシアニン3-グルコシルトランスフェラーゼ(<i>Ih3GT</i>)をコードする6種類のcDNAクローンを単離し、その特性を明らかにした。次に、<i>IhCHI</i>、<i>IhF3H</i>、<i>IhDFR</i>、<i>IhANS</i>、<i>Ih3GT</i>、<i>Ih5GT</i>(アントシアニン5-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子)および <i>Ih3AT</i>(アントシアニン3-アシルトランスフェラーゼ遺伝子)の7つの遺伝子発現が、BDのアントシアニンおよびフラボン蓄積量に及ぼす影響をRT-PCRにより分析した。その結果、外花被の発育時期ごとのアントシアニン蓄積量と各生合成遺伝子の発現レベルがよく対応していた。また、外花被の発育に伴ってアントシアニン蓄積量は増加したが、フラボン蓄積量は減少した。さらに、BD、白色花品種「White Wedgewood」(WW)および複色花品種「Surprise」(Su)間で上記遺伝子の発現を比較解析した結果、Suの外花被および雌蕊の白色化は <i>DFR</i> 遺伝子発現の顕著な減少に、またWWの内、外両花被および雌蕊の白色化は <i>DFR</i> 遺伝子発現の欠損または顕著な減少に起因することを明らかにした。</p> <p>先の実験で単離したcDNAのうち、<i>F3H</i>および <i>3GT</i> cDNAを大腸菌で異種発現させることによって酵素機能の確認に成功するとともに、その特性を明らかにした。次いで、アントシアニンのメチル化に関与するOメチルトランスフェラーゼ(OMT)をコードするcDNAの単離・解析を試みたところ、単離された2つのcDNAクローンのうち、<i>IhOMT1</i> cDNAが、SAMからカフェ酸3位へのメチル基の転移を触媒し、フェルラ酸をもたらす、SAM依存性COMTをコードすることが示された。</p> <p>WWおよびSuにおける <i>DFR</i> 遺伝子発現の欠損または減少の原因を解明するために、WW、SuおよびBDの <i>DFR</i> gDNAとその5'上流領域を単離・解析した。その結果、各品種の5'上流領域配列をコードするクローン(<i>gDFR-BD5f2~4</i>、<i>gDFR-WW5f1~4</i>、<i>gDFR-Su5f1~3</i>)間の比較により、<i>gDFR</i>配列の開始コドンから513 bp(BD、WW)および488 bp(Su)上流に <i>Ty1-copia</i>様LTRレトロトランスポゾンと推定される挿入配列(<i>rTih1</i>)の存在が認められた。このことから、WWやSuはプロモーター領域に <i>rTih1</i>が挿入した <i>DFR</i> 遺伝子のみを有するため、その遺伝子発現が欠損あるいは顕著に減少したことが指摘された。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Noriko YOSHIHARA
題 目	A molecular genetic study on anthocyanin biosynthesis of <i>Iris hollandica</i> (ダッチアイリスのアントシアニン生合成に関する分子遺伝学的研究)
<p>As anthocyanins express a wide range of flower colors such as pink, red, orange, scarlet, purple, blue and so on, detailed knowledge of anthocyanin biosynthesis is needed to promote flower color breeding. In this study, molecular characterization of anthocyanin biosynthesis in <i>Iris hollandica</i> was conducted, and the results obtained are summarized as follows.</p> <p>1. Chalcone synthase (<i>IhCHS</i>), chalcone isomerase (<i>IhCHI</i>), flavanone 3-hydroxylase (<i>IhF3H1~3</i>), dihydroflavonol 4-reductase (<i>IhDFR</i>), anthocyanidin synthase (<i>IhANS</i>) and anthocyanidin 3-glucosyltransferase (<i>Ih3GT</i>) cDNAs were isolated from the bluish purple cultivar, 'Blue Diamond' (BD) of <i>I. hollandica</i>. At different developmental stages of outer perianths in BD, the expression of 7 genes such as <i>IhCHI</i>, <i>IhF3H</i>, <i>IhDFR</i>, <i>IhANS</i>, <i>Ih3GT</i>, <i>Ih5GT</i>(anthocyanin 5-glucosyltransferase gene) and <i>Ih3AT</i>(anthocyanin 3-acyltransferase gene) were analyzed by RT-PCR methods and were compared with accumulation of anthocyanins and flavones. The expression patterns of these genes corresponded to accumulation of anthocyanins in different developmental stages of outer perianths. On the contrary, accumulation of flavones decreased with increasing accumulation of anthocyanins. In addition, the gene expression analyses showed that white pistils, inner and outer perianths of 'White Wedgewood' (WW) and white pistils and outer perianths of 'Surprise' (Su) were caused by the defect or remarkable reduction of expression of <i>DFR</i> genes.</p> <p>2. Heterologous expression of <i>IhF3H1~3</i> and <i>Ih3GT</i> cDNAs in <i>Escherichia coli</i> was examined. The recombinant proteins of <i>IhF3H1~3</i> demonstrated that <i>IhF3H1~3</i> encodes functional F3H which catalyzed 3-hydroxylation from naringenin to dihydroflavonol. In addition, <i>IhF3H1</i> and <i>IhF3H2</i> exhibited broad substrate specificity for various flavanones. The molecular mass of recombinant <i>Ih3GT</i> protein was estimated to be ca. 50 kDa by Western blotting. Characterization of the enzymatic properties of recombinant <i>Ih3GT</i> showed that <i>Ih3GT</i> cDNA encodes 3GT and accepted anthocyanidins such as delphinidin, malvidin, peonidin, cyanidin and pelargonidin as substrates at different ratios. Furthermore, <i>IhOMT1</i> and <i>IhOMT2</i> encoding <i>O</i>-methyltransferase (OMT) were isolated from BD. Characterization of the enzymatic properties using the recombinant <i>IhOMT1</i> confirmed that <i>IhOMT1</i> cDNA encodes a <i>S</i>-adenosyl-<i>L</i>-methionine(SAM)-dependent COMT which catalyzes the transfer of the methyl moiety from SAM to caffeic acid to form ferulic acid. On the other hand, <i>IhOMT2</i> showed no activity for various phenylpropanoids.</p> <p>3. To clarify the cause of the defect or remarkable reduction of expression of <i>DFR</i> genes in WW and Su, <i>DFR</i> gDNAs and their 5' flanking region sequences of these cultivars and BD were cloned by nested-PCR and inverse PCR methods. <i>DFR</i> gDNA clones obtained comprised 5 exons encoding an open reading frame of 1,086 bp and 4 introns. Based on comparison among these sequences of the cultivars, it was found that <i>gDFR</i>-BD5f2~4, <i>gDFR</i>-WW5f1~4 and <i>gDFR</i>-Su5f1~3 contained insertion sequences (<i>rTih1</i>) of putative <i>Ty1-copia</i> like LTR retrotransposons at 513 bp (BD and WW) or 488 bp (Su) upstream (promoter region) from the initiation codon. This indicated that the defect or remarkable reduction of expression of <i>DFR</i> genes in WW and Su were caused by insertions of <i>rTih1</i> into promoter regions of their <i>DFR</i> genes.</p>	

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	吉 原 法 子
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 藪 谷 勤
	副査 宮崎 大学 教授 國 武 久 登
	副査 鹿児島 大学 教授 坂 田 祐 介
	副査 佐賀 大学 教授 谷 本 静 史
	副査 佐賀 大学 准教授 石 丸 幹 二
審査協力者	
題 目	<p>ダッチアイリスのアントシアニン生合成に関する分子遺伝学的研究 (A molecular genetic study on anthocyanin biosynthesis of <i>Iris hollandica</i>)</p>
<p>代表的な花色色素であるアントシアニンの生合成に関する分子遺伝学的知見を蓄積することは、効率的な花色育種を進める上で極めて重要である。そこで、<i>Iris</i>属の代表的な園芸種であるダッチアイリスのアントシアニン生合成を分子遺伝学的に解析し、花色育種を促進するために本研究を実施した。本研究で得られた成果を要約すれば以下の通りである。</p> <p>まず、ダッチアイリスの青紫色花品種「ブルーダイヤモンド」(BD)のアントシアニン生合成酵素、カルコンシンターゼ(<i>IhCHS</i>)、カルコンイソメラーゼ(<i>IhCHI</i>)、フラバノン3-ヒドロキシラーゼ(<i>IhF3H1~3</i>)、ジヒドロフラボノール4-レダクターゼ(<i>IhDFR</i>)、アントシアニンシンターゼ(<i>IhANS</i>)およびアントシアニン3-グルコシルトランスフェラーゼ(<i>Ih3GT</i>)をコードする6種類のcDNAクローンを単離し、その特性を明らかにした。次に、<i>IhCHI</i>、<i>IhF3H</i>、<i>IhDFR</i>、<i>IhANS</i>、<i>Ih3GT</i>、<i>Ih5GT</i>(アントシアニン5-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子)および<i>Ih3AT</i>(アントシアニン3-アシルトランスフェラーゼ遺伝子)の7つの遺伝子発現が、BDのアントシアニンおよびフラボン蓄積量に及ぼす影響</p>	

を RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)により分析した。その結果、外花被の発育時期ごとのアントシアニン蓄積量と各生合成遺伝子の発現レベルがよく対応していた。また、外花被の発育に伴ってアントシアニン蓄積量は増加したが、フラボン蓄積量は減少した。さらに、BD、白色花品種「White Wedgewood」(WW)および複色花品種「Surprise」(Su)間で各遺伝子の発現を比較解析した結果、Suの外花被および雌蕊の白色化は *DFR* 遺伝子発現の顕著な減少に、また WW の内、外両花被および雌蕊の白色化は *DFR* 遺伝子発現の欠損または顕著な減少に起因することを明らかにした。

先の実験で単離した cDNA のうち、*F3H* および *3GT* cDNA を大腸菌で異種発現させ酵素機能を確認するとともに、その特性を明らかにした。次いで、アントシアニンのメチル化に関与する *O*-メチルトランスフェラーゼ(OMT) をコードする cDNA の単離・解析を試みたところ、単離された 2 つの cDNA クローンのうち、*IhOMT1* cDNA が、SAM からカフェ酸 3 位へのメチル基の転移を触媒し、フェルラ酸をもたらす、SAM 依存性 COMT(カフェ酸 OMT)をコードすることが示された。

WW および Su における *DFR* 遺伝子発現の欠損または減少の原因を解明するために、両品種に BD を加えた 3 品種を供試し、nested PCR および inverse PCR によって *DFR* 構造遺伝子とその 5' 上流領域配列を単離・解析した。その結果、単離された *DFR* gDNA クローンは 1,086 bp の ORF(open reading frame)をコードする 5 つのエクソンと 4 つのイントロンを有していた。BD の *DFR* cDNA 配列との比較により、*DFR* 構造遺伝子内に発現の欠損、または減少につながるナンセンスおよびフレームシフト突然変異は存在しないことが示された。そこで、各品種の 5' 上流領域配列をコードするクローンを比較したところ、*gDFR* 配列の開始コドンから 513 bp (BD、WW) および 488 bp (Su) 上流に *Ty1-copia* 様 LTR レトロトランスポゾンと推定される挿入配列(*rTih1*)の存在が認められた。すなわち、BD はプロモーター領域にレトロトランスポゾンの挿入を有するものと、挿入を持たないものの 2 種類が、一方、他の 2 品種はレトロトランスポゾンの挿入を持つもののみが検出された。このことから、WW および Su はプロモーター領域に *rTih1* が挿入した *DFR* 遺伝子のみを有するため、その遺伝子発現が欠損あるいは顕著に減少したことが指摘された。

以上のように、本研究は、ダッチアイリスのアントシアニン生合成遺伝子およびその機能発現に関して新たな知見を提供するものとして評価される。従って、本論文は博士(農学)の学位論文として十分に価値のあるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	吉原法子
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 藪谷 勤
	副査 宮崎 大学 教授 國武 久登
	副査 鹿兒島 大学 教授 坂田 祐介
	副査 佐賀 大学 教授 谷本 静史
	副査 佐賀 大学 准教授 石丸 幹二
審査協力者	
実施年月日	平成19年7月7日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成19年7月7日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	吉 原 法 子
[質問 1]	本研究ではダッチアイリスを使用しているが、分子遺伝学的研究を行う上で扱いやすい材料として選ばれたのか？
[回答 1]	ダッチアイリスは種間交雑由来の園芸種で、不稔であるが、純度の高いDNAやRNAを抽出でき、「遺伝子を単離しやすい」という点で優れた材料と思われる。
[質問 2]	花の発育ステージを追うごとにフラボン量が減っているが、これは <i>FNS</i> 遺伝子の発現が低下したことによるものか？
[回答 2]	指摘されたように、 <i>FNS</i> 遺伝子の発現はフラボンの蓄積量に大きく影響していると思われる。しかしながら、本研究では <i>FNS</i> cDNA を単離できなかったため、その発現解析をするまでには至らなかった。今後、 <i>FNS</i> cDNA を単離し、その発現解析を試みる予定である。
[質問 3]	「ブルーダイヤモンド」では、外花被、内花被、雌蕊の3器官と雄蕊とではアントシアニンの生合成遺伝子発現の制御機構が異なると推測されているが、花の器官特異的な発現として、このような事例はあるか？
[回答 3]	アントシアニンの生合成遺伝子発現の制御機構に関して、雄蕊のみが異なるという事例は、これまで報告されていない。「ブルーダイヤモンド」では、外花被、内花被および雌蕊と比較して、雄蕊ではアントシアニン生合成遺伝子の発現が弱く、アントシアニン蓄積量も低かったため、これら3器官と雄蕊とではアントシアニンの生合成遺伝子発現の制御機構が異なるものと推測した。また、 <i>Iris</i> 属種では六英や八重咲品種では花色が同調しており、さらに複色花品種も存在することから各器官でのアントシアニンの生合成遺伝子発現の制御機構は異なるものと思われる。
[質問 4]	IhOMT1 については活性が測定されているが、IhOMT2 のデータは？
[回答 4]	IhOMT2 についても、種々のフラボノイド、フェニルプロパノイドを基質として供試したが、活性が確認できなかった。今後、その機能を確認するためにはタンパク質の発現条件を変更する、アッセイに用いる基質の種類を増やす、反応産物の分析方法を変更するなどの検討が必要であると考えている。
[質問 5]	実際の植物では、メチル化酵素がどの程度働いているのか？
[回答 5]	メチル化酵素は、植物体内でリグニンやリグナンあるいはフラボノイドなどの合成、DNAメチル化など、多くの反応に関与していると思われる。

【質問 6】 植物中のメチル化フラボノイドの量はどの程度か？

【回答 6】 ダッチアイリスでは、メチル化フラボノイドとして swertidin、*O*-xylosyl-swertidin、swertiajaponin が検出されている。ダッチアイリスの品種「ブルーダイヤモンド」において、swertidin のみが同定でき、その含有量は総フラボン量の約 5%であった。

【質問 7】 「ブルーダイヤモンド」には *DFR* 遺伝子にレトロトランスポゾンを持つものと持たないものがあるが、ヘテロで持っているということか？

【回答 7】 指摘の通りである。この品種は種間交雑(*Iris tingitana* x *I. xiphium*)により育成されているが、*DFR* 遺伝子のヘテロ性の由来については不明である。

【質問 8】 「White Wedgewood」と「Surprise」の *DFR* 遺伝子は同じものか？

【回答 8】 「Surprise」の由来が明らかでないので、両品種の *DFR* 遺伝子が同じものであるのか否かは不明である。また、ダッチアイリスのゲノムサイズからサザンブロット分析を行うことが難しく、*DFR* 遺伝子のコピー数も判明していないのが現状である。

【質問 9】 「ブルーダイヤモンド」や「White Wedgewood」の親である「Wedgewood」にも同様のレトロトランスポゾンが挿入されているのか？

【回答 9】 その可能性は高いが、「Wedgewood」を実験材料として得られなかったので、レトロトランスポゾンの挿入を確認できなかった。

【質問 10】 Kentner ら (2003) に確認されたレトロトランスポゾンと今回解明された *Ty1-copia* 様レトロトランスポゾンと推定される挿入配列 (*rTih1*) は同じような遺伝子を持っているか？ また、その発現時の特徴はどのようになっていたのか？

【回答 10】 Kentner らにより報告されたチャショウブのレトロトランスポゾンは、*Ty1-copia* と同じクラスに属する LTR レトロトランスポゾンの *Ty3-gypsy* 型である。これら 2 つのレトロトランスポゾンは、*pol* 領域にコードされている酵素タンパク質の順序およびアミノ酸配列の類似性により分類される。*Ty1-copia* の *pol* 領域は、5'側から DNA 挿入酵素 (Int)、逆転写酵素 (RT)、RNA 分解酵素 (RNaseH) の順で酵素タンパク質がコードされているのに対し、*Ty3-gypsy* の *pol* 領域は、5'側から RT、RNaseH、Int となっている。また、LTR レトロトランスポゾンの転移は、レトロウイルスの複製様式に類似している。レトロトランスポゾンの LTR 上に位置するエンハンサーおよびプロモーターにより RNA 合成が開始され、合成された RNA は逆転写酵素によって DNA に変換された後、

DNA 挿入酵素により核ゲノムに挿入される。

[質問 11] 挿入されていたレトロトランスポゾンのサイズはどのくらいか？ また、レトロトランスポゾンの挿入部位よりも遺伝子側に転写因子があるが、それでもプロモーターは機能しないのか？

[回答 11] PCR により、挿入されていたレトロトランスポゾンのサイズは約 2 kb であると推測された。また、レトロトランスポゾンの挿入より遺伝子側にも MYB の結合ドメインおよび、TATA box などが検出された。そのため、レトロトランスポゾンの挿入によって転写因子結合部位が壊されたというよりも、レトロトランスポゾンの挿入によって *DFR* 遺伝子周辺のメチル化パターンが変化し、それが遺伝子の転写に影響を及ぼしているという可能性が高いと考えられる。どの程度プロモーター活性に影響を及ぼすのかについては、今後の解析が必要である。

[質問 12] レトロトランスポゾンの挿入が「White Wedgewood」や「Surprise」における *DFR* 遺伝子発現の欠損または減少の決定的な要因であるのか否かを実証するためには、更なる実験が必要とあるが、どのような要因が考えられ、どのような手法で解明できるのか？

[回答 12] レトロトランスポゾンがプロモーター領域へ挿入されたことにより生じる遺伝子発現への影響としては、プロモーター領域への挿入によって転写因子結合部位の破壊が生じたこと、および挿入領域周辺のメチル化パターンの変化による転写異常が考えられる。まず、転写結合部位の破壊を確認するためには、プロモーターと *GUS* あるいは *GFP* などのレポーター遺伝子を組み合わせたベクターを構築し、植物体に形質転換、その発現を観察することにより、転写に必要な領域を特定することが挙げられる。一方、挿入領域周辺のメチル化パターンを解析する手法としては、CD-PCR を行うことにより、メチル化された部位を特定することを考えている。

[質問 13] レトロトランスポゾンは新品種育成や遺伝子解析に有望と記載されているが、レトロトランスポゾンを転移させる、人為的な手法はあるのか？ 私の知る限りでは、環境ストレスや組織培養によってもその頻度が高まるとの情報もあるが、いかななものか？

[回答 13] 指摘されたように、組織培養や環境ストレスなどにより植物のレトロトランスポゾンが転移することが報告されているが、レトロトランスポゾンの転移を人為的にコントロールできるまでには至っていないのが現状である。