



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Analyses of anthocyanin modification pathway and glycosyltransferase genes involved in flower coloration in <i>Lobelia erinus</i> [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	許, 揚昕
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第12704号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65873
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hsu_Yanghsin_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名：Yang-hsin Hsu（許 揚昕）

学 位 論 文 題 名

Analyses of anthocyanin modification pathway and glycosyltransferase genes involved in flower coloration in *Lobelia erinus*

（ロベリアの花色に関わるアントシアニン修飾経路および配糖化酵素の解析）

フラボノイドの一種であるアントシアニンは、赤から青までの幅広い色を示す植物色素であり、基本骨格であるアントシアニジンに糖や有機酸が修飾した状態で存在する。アントシアニジンの種類は 6 種類だが、付加する糖や有機酸の数および種類の違いによって、これまで約 700 種の多様なアントシアニンが見つかっている。アントシアニンの修飾は、アントシアニンの安定性や可溶性の向上、細胞内局在などに関わるとされる。また、複数の配糖化および有機酸修飾（アシル化）は、最大吸収波長の長波長側へのシフト、すなわち青色化に関わるとされている。これまで、アントシアニンの分子生物学的研究はアントシアニジンの生合成に関わるものが多かった。しかし最近では、配糖化やアシル化修飾が及ぼすアントシアニンの機能への影響が注目され、植物生理学的また園芸学的に重要な修飾酵素が見出されてきている。本研究では、ポリアシル化アントシアニンを蓄積するロベリア（*Lobelia erinus*）のアントシアニン修飾メカニズムに注目し、アントシアニンの修飾反応の制御や花卉の青色化に重要な配糖化酵素について解析を行った。

1. ロベリアにおけるアントシアニン修飾経路の解明

濃青色花の‘アクアブルー’（AB）および藤色花の‘アクアラベンダー’（AL）の 2 品種を材料に用いて、花卉に蓄積しているアントシアニンを分析した。その結果、AB には delphinidin 3-*O*-*p*-coumaroylrutinoside-5-*O*-malonylglucoside-3'5'-*O*-dihydroxycinnamoylglucoside (Lobelinin) が検出された。一方、AL ではデルフィニジン (Dp) が 1 個 glucosyl 化した delphinidin 3-*O*-glucoside (Dp3G) が蓄積していた。このことから、Dp の 3、5、3'、5'位の修飾の有無が花色の違いに関わると考えた。次に、両品種の蕾から粗タンパク質を抽出し、Dp から Lobelinin 合成までの修飾反応の酵素活性を比較した。粗タンパク質は、糖またはアシル donor や acceptor と反応させ、反応産物を HPLC および MALDI-TOF MS により特定した。AB 由来の粗タンパク質を用いた解析の結果、Dp と UDP-glucose によって Dp3G が合成された後、さらに glucosyl 化が進むのではなく、Dp3G は UDP-rhamnose と反応して Delphinidin 3-*O*-rutinoside (Dp3RG) となることが分かった。次に続く修飾反応を調べたところ、rhamnosyl 化の次は 5、3'や 5'位の glucosyl 化ではなく、3 位の *p*-coumaroyl 化であった。5 位の glucosyl 化は delphinidin 3-*O*-*p*-coumaroylrutinoside を acceptor とした場合のみ、また、3'、5'位の glucosyl 化は delphinidin 3-*O*-*p*-coumaroylrutinoside-5-*O*-malonylglucoside を acceptor とした場合にのみに活性が検出された。アントシアニン修飾酵素の基質特異性は植物によって様々であり、このことが植物ごとに異なるアントシアニン組成をもたらすとされる。粗タンパク質を用いた酵素活性の解析により、Lobelinin の修飾経路に関わる酵素群は高い基質特異性を持ち、一方向の反応経路で修飾が進むことが分かった。一方、AL 由来の粗タンパク質を用いた解析では、Dp3G と UDP-rhamnose で反応させた場合の rhamnosyl 化のみが検出されず、3 位の *p*-coumaroyl 化および 5 位や 3'、5'位の修飾は AB と同じく活性が検出された。このことから、AL

における Lobelinin 修飾経路では、rhamnosyltransferase のみを変異していることが示唆された。そして、Lobelinin 修飾経路の各酵素の基質特異性が高いために、AL では Dp3G 以後の修飾反応が中断されてしまい花色が藤色となったと考えられた。

2. Rhamnosyltransferase (RT) の単離と *in vitro* および *in vivo* における機能解析

これまでにロベリアにおける RT の知見がなかったことから、AB および AL の蕾由来の RNA から cDNA を合成し、アントシアニンの修飾に関わる RT 遺伝子の単離を試みた。他の植物のフラボノイド類を基質とする UDP-sugar-dependent glycosyltransferase (UGT) や RT 遺伝子の塩基配列を参考にプライマーを作製して PCR を行い、AB からは ORF 1419 bp (472 アミノ酸) をコードする 2 種類の RT (*ABRT2*、*ABRT4*) を単離した。一方、AL の RT 相同遺伝子 (*ALRT1*、ORF 1414 bp) は *ABRT2/4* と比べて 5 bp の欠失があり、このことにより、UDP-sugar の結合部位とされる PSPG box を欠く 280 アミノ酸をコードしていた。系統解析の結果、*ABRT2/4* はフラボノイド配糖体の glycosylation に関わる branch forming GT クラスターに属していた。また、*ABRT2/4* は、葉などの栄養器官よりも花器官で高く発現していることが qRT-PCR により確認され、*ABRT2/4* が花卉に蓄積するアントシアニンの修飾に関与することが示唆された。

さらに、大腸菌を用いた組換え酵素を作製し、*ABRT2/4* の *in vitro* における基質特異性について調べた。その結果、*ABRT2* および *ABRT4* のどちらも UDP-rhamnose に依存してアントシアニン 3 位配糖体の rhamnosyl 化を触媒することが示された。続いて、*ABRT2/4* の *in vivo* での活性を評価するため、*Agrobacterium* を用いた形質転換を行い *ABRT2* または *ABRT4* を AL へ導入した。*ABRT2* または *ABRT4* を発現した組換え AL は、AB と同じ青色の花を咲かせ、また Lobelinin の蓄積も確認された。以上のことから、*ABRT2* と *ABRT4* は Lobelinin 修飾経路において rhamnosyl 化を触媒する酵素遺伝子であり、この遺伝子欠失のみで花卉の青色化が損なわれたことが判明した。また、*ABRT2/4* の細胞内局在性調べるため、*ABRT*-GFP 融合タンパク質を発現する組換え AL を作製し、組換え体の花卉を共焦点顕微鏡で観察した。*ABRT*-GFP は主に細胞質に局在していたが、蛍光が vesicle で確認できるものもあり、アントシアニン合成がこの vesicle で行われ液胞に輸送されるのではないかと考えられた。

植物のフラボノイドは複雑に修飾されているものが多く存在するが、この修飾がどのような生理的役割を持つかわかっているものは多くない。本研究により、ロベリアのアントシアニンにおける rhamnosylation は青色化に重要であることが示された。本研究では、*ABRT* 以外にも、アントシアニンの発色に関わる可能性をもつ別の UGT も単離しており、これらのフラボノイド修飾酵素の機能解析は、園芸学や食品科学に有用なフラボノイド合成に応用できる有用な知見となることが期待できる。