



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 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）

審査担当者	主 査	准教授	鈴木 卓
	副 査	特任教授	増田 清
	副 査	教 授	増田 税
	副 査	助 教	志村華子

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）

本論文は図 38 および表 9 を含む 5 章からなる総頁数 103 の英語論文であり、別に参考論文 1 編が添えられている。植物色素であるアントシアニンは、基本骨格に糖や有機酸（アシル基）が修飾した状態で細胞内に存在する。このような修飾はアントシアニンの発色、安定性、局在さらには機能性成分の活性などに関わるとされる。本研究では、多くの修飾をもつ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

濃青色の‘アクアブルー’（AB）および薄紫色の‘アクアラベンダー’（AL）の 2 品種を用いて、花卉に蓄積す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) が検出されたが、AL では delphinidin 3-*O*-glucoside (Dp3G) が蓄積していた。このことから、delphinidin (Dp) の 3 位以外の修飾がないことが AL の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 までの修飾反応の酵素活性を比較した。Lobelinin 合成までの修飾経路は複数あることが想定されたが、粗タンパク質を用いた酵素活性の結果、実際の修飾反応は単一経路であることが分かった。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 化活性のみが検出されず、それ以外の修飾反応は AB と同じく活性が検出された。このことから、AL の Lobelinin 修飾経路では rhamnosyl 化活性のみが変異しており、そして、Lobelinin 修飾経路が一種類であるために、AL では Dp3G 以後の修飾反応が中断されてしまい花色が薄紫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。その結果、AB か

ら2種類のRT (ABRT2、ABRT4) を単離した。一方、ALのRT相同遺伝子はABRT2/4と比べて5bpの欠失があり、フレームシフト変異によってUDP-sugarの結合部位とされるPSPG boxを欠くことが分かった。ABRT2、ABRT4の*in vitro*の活性を評価するため、大腸菌を用いて組換え酵素を作製した。ABRT2およびABRT4組換え酵素は、どちらもUDP-rhamnoseに依存してアントシアニン3位配糖体を含むフラボノイド配糖体のrhamnosyl化活性を示した。また、ABRT2/4の*in vivo*での活性評価のために、*Agrobacterium*を用いた形質転換を行いABRT2またはABRT4をALへ導入した。その結果、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、ABRT-GFP融合タンパク質を発現する組換えALも作製し、組換え体の花卉を共焦点顕微鏡で観察してABRT2/4の細胞内局在を調べた。その結果、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可能性や、液胞内の局在に修飾の有無に関わる可能性を示唆することができた。

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、これらの修飾がどのような生理的役割を持つか分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も複数単離しており、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と期待される。

以上のことより、審査員一同は、許揚昕が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。