

# スカシユリ植物体へのアントシアニン色素の蓄積を制御する R2R3-MYB 転写因子 LhMYB6 および LhMYB12 の機能解析

作物生産生物学講座 植物機能開発学分野  
下山田善裕

【背景と目的】一般に、アントシアニンの蓄積は生合成遺伝子の転写の段階で調節されており、この転写は2種類の転写因子 R2R3-MYB と bHLH の相互作用により制御されている。スカシユリ品種‘モンレー’から単離された R2R3-MYB 転写因子 LhMYB6 と LhMYB12 は、系統解析の結果や発現パターンから花被片へのアントシアニンの蓄積を制御する因子であると予想された。そこで本研究では、これらの R2R3-MYB 転写因子がアントシアニン生合成遺伝子の発現を誘導する機能を持つことを検証した。

【方法】一過性発現解析: LhMYB6 や LhMYB12 がアントシアニン生合成遺伝子である *DFR* や *CHS* の発現を誘導することを、一過性発現解析により調べた。CaMV35Sプロモーターに *LhMYB6* と *LhMYB12* およびスカシユリの *bHLH* 遺伝子 *LhbHLH2* をそれぞれ連結したコンストラクトを、単独または bHLH と MYB の組み合わせで‘モンレー’の鱗片にパーティクルボンバードメント法で導入した。導入から 48 時間後に鱗片から表皮部分を切り出し、全 RNA を抽出して RT-PCR 法により *LhDFR* 及び *LhCHSa*, *LhCHSb* の発現を調査した。レポーターアッセイ: LhMYB12 がアントシアニン生合成遺伝子のプロモーターに直接作用して転写を誘導することを、レポーターアッセイで調べた。‘モンレー’からアントシアニン生合成遺伝子 *LhDFR*, *LhCHSa*, *LhF3H*, *LhPAL4* のプロモーター配列を新たに単離し、それらにホタルルシフェラーゼ (Fluc) の ORF 配列を繋げたコンストラクトをレポーターとして、CaMV35Sプロモーターにそれぞれ連結した *LhMYB12* および *LhbHLH2* と併せてタバコ BY2 細胞にポリエチレングリコール法で導入した。導入から 36 時間後に細胞を溶解し、そのライセートに発光基質を加えて Fluc による発光の強度を測定しレポーターの活性を評価した。

【結果と考察】一過性発現解析: *LhbHLH2*, *LhMYB6*, *LhMYB12* のいずれかを単独で発現させた鱗片の表皮細胞では *DFR* や *CHS* の発現は確認できず、2 つの *LhMYB* のうち的一方と *LhbHLH2* を同時に発現させた鱗片では *LhDFR*, *LhCHSa*, *LhCHSb* の全てが発現していた。この結果より、LhMYB6 と LhMYB12 が *LhbHLH2* と相互作用することで *DFR* や *CHS* の転写を誘導することが分かった。レポーターアッセイ: *LhDFR* や *LhCHSa* のプロモーター配列をレポーターに使用した場合、*LhMYB12* と *LhbHLH2* を同時に発現させたサンプルにおけるレポーターの活性が、どちらか一方のみを発現させたサンプルやどちらも発現させなかったサンプルより有意に高くなった。このことから、LhMYB12 は *LhbHLH2* と相互作用して *DFR* や *CHS* のプロモーター配列に直接結合し発現を誘導することが示唆された。また *LhPAL4* と *LhF3H* のプロモーター配列を使用したレポーターの活性は *LhMYB12* と *LhbHLH2* の発現に影響を受けなかったことから、これら 2 つの生合成遺伝子の発現は LhMYB12 と *LhbHLH2* の直接的な制御下に無いことが分かった。以上の結果より、スカシユリの R2R3-MYB 転写因子 LhMYB6 および LhMYB12 が bHLH 転写因子 *LhbHLH2* との相互作用を通してアントシアニン生合成遺伝子 *CHS* と *DFR* の発現を(少なくとも LhMYB12 の場合は直接的に)誘導する機能を有することが明らかとなった。