

RNA-seq を用いたアジアティックハイブリッドユリにおいて

バイカラーの花被片を生じさせる遺伝子機構の解析

生物資源科学専攻 作物生産生物学講座 植物機能開発学 鈴木 一眞

[目的] アジアティックハイブリッドユリ (*Lilium spp.*) は様々な着色パターンの花被片を持つ品種が存在しており, その形成は特定の場所にアントシアニン色素が蓄積することによって起こる。一般にアントシアニン生合成は生合成遺伝子の転写レベルにより制御されており, 生合成遺伝子の転写を制御する転写因子として R2R3-MYB, bHLH, WD40 が知られている。アジアティックハイブリッドユリでは, 花被片のアントシアニン生合成を制御している LhMYB12, LhbHLH2 の機能が明らかになっている。また, アントシアニン生合成遺伝子の一部も単離されているものの着色機構の全貌は分かっていないことが多い。本研究では花被片の先端部 (赤) と基部 (白) で色の異なるバイカラーの花被片を持つ品種を使用し, その先端部と基部の間で発現の異なる遺伝子を RNA-seq を用いたトランスクリプトーム解析により網羅的に検出した。特定した配列を基に, アントシアニン生合成に関わる遺伝子の機能や発現量を測定し, バイカラーの花被片を生じさせている遺伝的機構を評価した。

[方法] バイカラーの花被片を持つアジアティックハイブリッド品種 ‘ロリポップ’ の着色開始期の花被片を着色のある先端部と着色のない基部に分けた。抽出した Total RNA から cDNA ライブラリを作成して, 次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina) による網羅的なシーケンスを行った。シーケンスで得られた断片的な塩基配列 (リード) を *de novo* アセンブラを用いて元の配列へとアセンブルした。Swiss-Prot, Pfam, eggNOG, Gene Ontology の4つのデータベースを使用して, アセンブリで得られた配列群 (コンティグ) に遺伝子機能の情報を付加 (アノテーション) した。また, リードマッピングプログラムを用いて, 先端部と基部毎のリードをコンティグにはりつけ, 発現量計算プログラムを用いて各コンティグの FPKM (Fragments Per Kilobase per Million reads) 値を求めた。それらの発現量の値をもとに発現差解析プログラムを用いて花被片の先端部と基部の間で発現の異なる遺伝子 (DEGs, p -value < 0.05) を特定した。アントシアニン及びシナモン酸生合成に関連する DEGs について qRT-PCR によって花被片の発達ステージごとの発現変動を評価した。

[結果と考察] 花被片の先端部には cyanidin-3-O- β -rutinoside を多く含んでいたが基部では痕跡程度しか含んでいなかった。一方で, 基部ではシナモン酸誘導体を先端部のおよそ2倍蓄積していた。RNA-seq によりクリーンデータとして合計 3.67 Gb の塩基配列を決定し, 39,426 の推定遺伝子 (unigene) からなる 49,239 のコンティグを *de novo* アセンブリで得た。unigene のうち 24,836 (63%) がいずれかのデータベースにアノテーションされた。その配列中からユリではまだ単離されていない *Arabidopsis* のアントシアニン生合成に関与する AtTTG1 と同一性を持つ WD40 タンパク質 (LhWD40A), アントシアニンに糖鎖を付加する配糖化酵素 (3GT, 3RT, 7RT), アントシアニンを液胞に輸送するトランスポーター (MATE, GST) の配列を新規に単離した。また, 44 の R2R3-MYB を含む 51 の MYB ドメインを持つ配列を特定した。花被片の先端部と基部の間で発現の異なる unigene を検出したところ, 34 が先端部で, 91 が基部で有意に高い発現を示した。先端部で発現の高かった DEGs にはアントシアニン生合成遺伝子である LhCHS, LhF3H, LhF3'H, LhDFR, LhANS のホモログが含まれており, 基部で発現の高かった DEGs にはシナモン酸生合成遺伝子である HCT のホモログ (LhHCT) が含まれていたことより, アントシアニン生合成遺伝子の発現が基部で抑えられることでバイカラーが生じていることが示唆された。一方で花被片におけるアントシアニン生合成を制御している LhMYB12, LhbHLH2, LhWD40A は DEGs に含まれていなかった。花被片の発達ステージごとにこれらの発現量を測定したところ, アントシアニン生合成遺伝子の発現は花被片の発達ステージと一致して先端部で有意に上昇していたが, LhHCT の発現変動は発達ステージと一致しなかった。LhMYB12 の発現量は先端部で高かったものの基部でも発現が認められ, LhbHLH2, LhWD40A の発現量に差は認められなかった。これらの結果から LhMYB12 が花被片の先端部におけるアントシアニン生合成遺伝子の発現を促進することに加えてまだ明らかになっていない複数の制御機構によって, バイカラーが生じていることが示唆された。いくつかの植物で, 抑制型の R2R3-MYB やリピートを1つしか持たない R3-MYB がアントシアニン生合成を抑制することやアントシアニン生合成に関与する転写因子の転写後調節が報告されている。‘ロリポップ’ の配列データベースに含まれるこれらの転写因子と相同する遺伝子の機能を調べることでバイカラーを生じさせている機構がより詳細に明らかになるだろう。今回の解析でユリの更なるゲノム研究が可能になり, 新しい着色パターンを持つユリ品種育成の知見になることが期待される。