

# アントシアニン合成系遺伝子 DFR の系統解析

大岡久子\* 浦部健気\* 古川一実\*\* 高原美規\*\*\*

(2019年1月7日受理)

## 1. はじめに

植物は多種多様な色を持つが、これらの色の発色団となる色素は、クロロフィル類、カロテノイド類、フラボノイド類に大別することができる。多くの植物の緑葉に含まれるクロロフィルやカロテノイドは、光合成色素として植物のみならず生態系全体において重要な役割を果たしている。一方で、花や果実、葉や茎に含まれるフラボノイド色素は、2つの芳香環が3つの炭素で結合した基本構造をもつフェノール性化合物であり、種類によってさまざまな色調を示す。フラボノイド色素としてもっとも広く存在しているのがアントシアニンである<sup>1)</sup>。

果実や花に含まれるアントシアニンは、動物との相互作用において重要な役割を果たしている。植物は生産者であり、動物にとって摂食の対象となる一方で、植物も花粉の媒介や種子の散布に動物を利用している。アントシアニンの色素は、視覚的に動物を誘引する役割を担う色素である<sup>1)</sup>。さらに、アントシアニンの種類は、園芸的価値において重要な花色を左右し、青いバラを代表としてその色調の改変が近年産業的にも重要となっている<sup>2)</sup>。

アントシアニンのアグリコンはアントシアニンと呼ばれ、3分子のマロン酸由来のA環とフェニルアラニン由来のB環から構成されている。B環の水酸化やメチル化などの修飾パターン、糖や有機酸の付加、蓄積している液胞のpHなどによって、アントシアニンの色調は影響を受ける<sup>1)3)</sup>。一般的に、ペラルゴニン系アントシアニンは橙色～赤色、シアニン系アントシアニンは赤色～深紅、デルフィニン系アントシアニンは赤紫色～藤色～青色を呈する<sup>3)4)</sup>。このようにアントシアニンの色調には、その

基本となるアントシアニンの構造が大きく影響している。この3種類のアントシアニンの合成経路を図1に示す。それぞれの反応を触媒する酵素を略号で示し (CHS; カルコン合成酵素, CHI; カルコンイソメラーゼ, F3H; フラバノン 3-ヒドロキシラーゼ, F3'H; フラボノイド 3'-ヒドロキシラーゼ, F3'5'H; フラボノイド 3',5'-ヒドロキシラーゼ, DFR; ジヒドロフラボノール 4-レダクターゼ, ANS; アントシアニン合成酵素, FGT; フラボノイドグルコシルトランスフェラーゼ。) <sup>3)4)5)</sup>, 点線の四角で囲んだ。3種類のアントシアニンは、クマロイル CoA と3分子のマロニル CoA からいくつかの段階を経て合成されるが、どの種類のアントシアニンが合成されるかは、DFR がどのジヒドロフラボノールに対して高い基質特異性を示すかによる<sup>6)</sup>。この DFR の基質特異性についてはいくつかの知見があるもののその分子生物学的メカニズムは明らかにされていない<sup>5)7)</sup>。しかし、最終的なアントシアニンの色調を決定する因子として、アントシアニン合成系における DFR の役割は非常に大きいと考えられる。

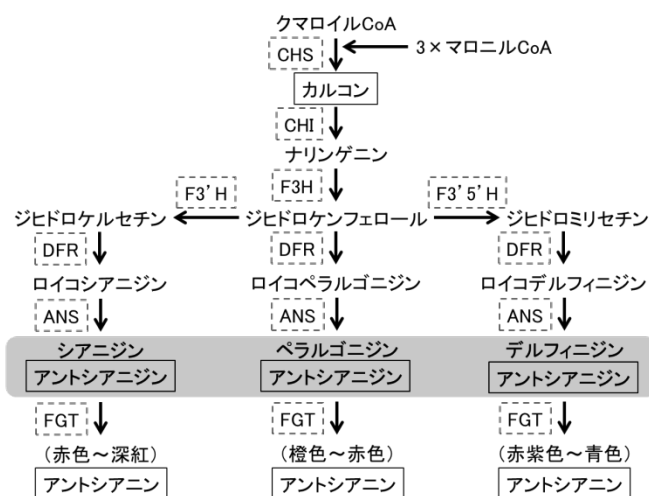


図1 アントシアニン合成経路

そこで本研究では、植物の色素合成系の鍵となる酵素の1つである DFR について、多くの植物種から単離された既知遺伝子のアミノ酸配列をもとに系統解析を行った。

## 2. 研究方法

### 2.1 DFR の配列情報の収集

DFR のアミノ酸配列情報は NCBI<sup>8)</sup> より収集した。これまでに花色に関する研究が進められている品種を中心に 62 種類の植物から、170 クロンのアミノ酸配列を収集し解析に用いた。収集したクロンは植物種名に従いクロン名をつけた。クロン数などの情報を表 1 に示した。収集したクロンのうち、エキソン-イントロン情報があるものには、クロン名の最後に “+” を表記した。また表 1 の LOCUS と SOURCE は NCBI に登録されている情報である。

### 2.2 アライメント解析と系統解析

アライメント解析と系統解析は、CLUSTAL X (ver. 2.1)<sup>9)</sup> を用いて行った。系統解析は、近隣結合 (Neighbor Joining ; NJ) 法を用いて、ブートストラップ解析は 1000 回のサンプリングにより行った。また、平均距離 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean ; UPGMA) 法でも解析を行った。系統樹の描画は、NJplot (ver. 2.3) を用いた。

CLUSTAL X によるアライメント解析後、GeneDoc (ver. 2.7.000) の Conserved モードを用いて、共通配列を示した。

## 3. 結果と考察

収集したクロンのアミノ酸配列をアライメント解析した結果、収集した 170 クロンのうち、アミノ酸配列が同じものがあることが分かった。これらを整理して 1 つのアミノ酸配列とし、重複がない 139 のアミノ酸配列について再度アライメント解析を行った。この結果から得られた NJ 法による系統

樹を図 2 に示した。重複のあるクロンはスラッシュにより区切り並列して示した。図 2 の系統樹より、各クロンの結合距離が近く、多くの植物で DFR の相同性が高いことが明らかにされた。これらの DFR のクロンを、相同性の高さ、ブートストラップ値、UPGMA 法による系統解析を考慮して、10 のグループに分類し、Group I~Group X と名付けた (図 2)。

Group I と V に属する DFR は、*Fragaria* 属のみからなるグループであることが分かった。また、Group II は *Rosa* 属のみからなり、Group III は *Prunus* 属のみからなることが分かった。このようにいくつかのグループは同属のみからなり、それぞれの属の特徴を示していることが推測される。しかし、その他のグループは、いくつかの植物種からなるグループであり、属を超えて DFR の保存性が高いことが示された。

次に、グループごとにアライメント解析を行い、GeneDoc をもとに保存性の高いアミノ酸配列を選抜し、各グループの共通配列とした。各グループの共通配列を用いてアライメント解析を行い、その結果を GeneDoc を用いて示した (図 3)。図 3 では、それぞれのグループの共通配列において保存性の高いアミノ酸を、アライメント配列の下に示した。さらに、それぞれのグループごとにエキソン-イントロン情報があるクロンのアミノ酸配列におけるイントロンサイトを確認し、図 3 の配列内に線で示し、さらに保存性の高いイントロンサイトをアライメント配列の上部に矢印で示した。Group VII においては、イントロンサイトが分かるクロンがなくイントロンサイトを示していないが、アライメント解析の結果から矢印で示した部分にイントロンサイトがあると考えられる。図 3 の 2 段目中央付近の点線の四角で囲まれた部分は、DFR の基質特異性に関与すると推測される範囲であり、三角で示したアライメント配列で 157 番目のアミノ酸は特に発色に関して重要なアミノ酸であるとされている<sup>7)</sup>。

図 3 に示した共通配列のアライメント解析では、すべてのグループにおいて共通にみられるアミノ

表1 収集したDFRの情報

クローン名	LOCUS	SOURCE	クローン数	クローン名	LOCUS	SOURCE	クローン数
AcDFR001	KF157393	Actinidia chinensis	1	PnDFR001	KM388826	Penstemon neomexicanus	1
AaDFR001	KF285561	Angelonia angustifolia	2	PfDFR001	AB002817	Perilla frutescens	1
AaDFR002	KJ817183	Angelonia angustifolia		PhyDfDR001	AB070932	Persicaria hydropiper	1
AtDFR001	AK221622	Arabidopsis thaliana (thale cress)	13	PhybDFR001	EU189078	Petunia x hybrida	4
AtDFR002	NM_001203924	Arabidopsis thaliana (thale cress)		PhybDFR002	KC464483	Petunia x hybrida	
AtDFR003	NM_001343878	Arabidopsis thaliana (thale cress)		PhybDFR003	KC464484	Petunia x hybrida	
AtDFR004	NM_104854	Arabidopsis thaliana (thale cress)		PhybDFR004	KC464485	Petunia x hybrida	
AtDFR005	NM_117050	Arabidopsis thaliana (thale cress)		PamDFR001	AB128768	Phytolacca americana (American pokeweed)	1
AtDFR006	NM_118859	Arabidopsis thaliana (thale cress)		ParDFR001	JQ622229	Prunus armeniaca (apricot)	1
AtDFR007	NM_119708	Arabidopsis thaliana (thale cress)		PavDFR001	GU990528	Prunus avium (sweet cherry)	6
AtDFR008	NM_122360	Arabidopsis thaliana (thale cress)		PavDFR002	JF740093	Prunus avium (sweet cherry)	
AtDFR009+	NM_123645	Arabidopsis thaliana (thale cress)		PavDFR003	KP347504	Prunus avium (sweet cherry)	
AtDFR010	NM_130102	Arabidopsis thaliana (thale cress)		PavDFR004	KP347505	Prunus avium (sweet cherry)	
AtDFR011	NM_130314	Arabidopsis thaliana (thale cress)		PavDFR005+	XM_021964510	Prunus avium (sweet cherry)	
AtDFR012	NM_180738	Arabidopsis thaliana (thale cress)		PavDFR006+	XM_021975874	Prunus avium (sweet cherry)	
AtDFR013	NM_180739	Arabidopsis thaliana (thale cress)		PceDFR001	KP772277	Prunus cerasifera (cherry plum)	1
BvDFR001+	XM_010674949	Beta vulgaris subsp. Vulgaris	3	PmDFR001+	XM_016792478	Prunus mume (Japanese apricot)	1
BvDFR002+	XM_010675370	Beta vulgaris subsp. Vulgaris		PpbDFR001	HM543571	Prunus persica (blood flesh peach)	1
BvDFR003+	XM_010685621	Beta vulgaris subsp. Vulgaris		PppDFR001	JQ622239	Prunus persica (peach)	7
CjDFR001	AB524885	Camellia japonica	1	PppDFR002	JQ717268	Prunus persica (peach)	
CsDFR001	AB018685	Camellia sinensis	4	PppDFR003	KJ484545	Prunus persica (peach)	
CsDFR002	AB018686	Camellia sinensis		PppDFR004	KJ484550	Prunus persica (peach)	
CsDFR003	AY574920	Camellia sinensis		PppDFR005+	XM_007211452	Prunus persica (peach)	
CsDFR004	AY648027	Camellia sinensis		PppDFR006+	XM_007222255	Prunus persica (peach)	
CqDFR001+	XM_021873902	Chenopodium quinoa (quinoa)	5	PppDFR007+	XM_020567318	Prunus persica (peach)	
CqDFR002+	XM_021873903	Chenopodium quinoa (quinoa)		PsDFR001	KP266869	Prunus salicina	
CqDFR003+	XM_021887285	Chenopodium quinoa (quinoa)		PsDFR002	KT597918	Prunus salicina	
CqDFR004+	XM_021887296	Chenopodium quinoa (quinoa)		PcoDFR001	AY227730	Pyrus communis (pear)	6
CqDFR005+	XM_021887297	Chenopodium quinoa (quinoa)		PcoDFR002	AY227731	Pyrus communis (pear)	
CmDFR001	AY786995	Crataegus monogyna	1	PcoDFR003	AY227732	Pyrus communis (pear)	
CgDFR001	AB517921	Cyclamen graecum	2	PcoDFR004	JX403952	Pyrus communis (pear)	
CgDFR002	AB517922	Cyclamen graecum		PcoDFR005	JX403953	Pyrus communis (pear)	
DcDFR001	LC377195	Dianthus caryophyllus (clove pink)	2	PcoDFR006	KC460395	Pyrus communis (pear)	
DcDFR002	Z67983	Dianthus caryophyllus (clove pink)		PpyDFR001	JN870840	Pyrus pyrifolia	
DgDFR001	AF291097	Dianthus gratianopolitanus	1	PbrDFR001	KF387514	Pyrus x bretschneideri (Chinese white pear)	3
DpDFR001	AF267172	Dianthus plumarius	1	PbrDFR002	KF387515	Pyrus x bretschneideri (Chinese white pear)	
DkDFR001	AB472371	Diospyros kaki (kaki persimmon)	3	PbrDFR003+	XM_009366816	Pyrus x bretschneideri (Chinese white pear)	
DkDFR002	AB472373	Diospyros kaki (kaki persimmon)		RcDFR001	KF34592	Rosa chinensis	6
DkDFR003	AB472374	Diospyros kaki (kaki persimmon)		RcDFR002+	XM_024311351	Rosa chinensis	
EeDFR001	AB078958	Eustoma exaltatum subsp. Russellianum	1	RcDFR003+	XM_024311994	Rosa chinensis	
FcyDFR001	EF522145	Fagopyrum cymosum	1	RcDFR004+	XM_024311995	Rosa chinensis	
FeDFR001	LC216398	Fagopyrum esculentum subsp. Esculentum	2	RcDFR005+	XM_024312234	Rosa chinensis	
FeDFR002	LC216399	Fagopyrum esculentum subsp. Esculentum		RcDFR006+	XM_024312235	Rosa chinensis	
FiDFR001	X97131	Forsythia x intermedia	2	RpDFR001	AB289559	Rhododendron x pulchrum	1
FiDFR002	Y09127	Forsythia x intermedia		RhDFR001	AB239785	Rosa hybrid cultivar	5
FchDFR001	HMO26184	Fragaria chiloensis	1	RhDFR002	AB239796	Rosa hybrid cultivar	
FvDFR001	KC894042	Fragaria vesca (wild strawberry)	16	RhDFR003	AB490072	Rosa hybrid cultivar	
FvDFR002	KC894043	Fragaria vesca (wild strawberry)		RhDFR004	AY780885	Rosa hybrid cultivar	
FvDFR003	KC894044	Fragaria vesca (wild strawberry)		RhDFR005	ROZD4R	Rosa hybrid cultivar	
FvDFR004	KC894045	Fragaria vesca (wild strawberry)		RmDFR001	KP137549	Rosa multiflora	1
FvDFR005	KC894046	Fragaria vesca (wild strawberry)		RrDFR001	KM203111	Rosa rugosa	2
FvDFR006	KC894049	Fragaria vesca (wild strawberry)		RrDFR002	KT809350	Rosa rugosa	
FvDFR007	KC894050	Fragaria vesca (wild strawberry)		ShDFR001	LC269960	[Saintpaulia] hybrid cultivar	1
FvDFR008	KC894051	Fragaria vesca (wild strawberry)		SvDFR001	FJ605512	Scutellaria viscidula	1
FvDFR009	KC894052	Fragaria vesca (wild strawberry)		SiDFR001+	XM_011084901	Sesamum indicum (sesame)	3
FvDFR010	KC894053	Fragaria vesca (wild strawberry)		SiDFR002+	XM_011085563	Sesamum indicum (sesame)	
FvDFR011	KC894056	Fragaria vesca (wild strawberry)		SiDFR003+	XM_011085564	Sesamum indicum (sesame)	
FvDFR012	KC894057	Fragaria vesca (wild strawberry)		SiDFR001	KT954905	Silene littorea	1
FvDFR013	KC894058	Fragaria vesca (wild strawberry)		SlyDFR001+	NM_001247479	Solanum lycopersicum (Lycopersicon esculentum)	7
FvDFR014	KC894059	Fragaria vesca (wild strawberry)		SlyDFR002+	XM_004251441	Solanum lycopersicum (Lycopersicon esculentum)	
FvDFR015+	NM_001305268	Fragaria vesca (wild strawberry)		SlyDFR003+	XM_004252721	Solanum lycopersicum (Lycopersicon esculentum)	
FvDFR016+	NM_001305270	Fragaria vesca (wild strawberry)		SlyDFR004+	XM_010315353	Solanum lycopersicum (Lycopersicon esculentum)	
FaDFR001	AB201759	Fragaria x ananassa (strawberry)	SlyDFR005+	XM_010316315	Solanum lycopersicum (Lycopersicon esculentum)		
FaDFR002	AF029685	Fragaria x ananassa (strawberry)	SlyDFR006+	XM_010317577	Solanum lycopersicum (Lycopersicon esculentum)		
FaDFR003	AY695812	Fragaria x ananassa (strawberry)	SlyDFR007	Z18277	Solanum lycopersicum (Lycopersicon esculentum)		
FaDFR004	AY780884	Fragaria x ananassa (strawberry)	SmDFR001	AB269920	Solanum melongena (eggplant)	2	
FaDFR005	JX134094	Fragaria x ananassa (strawberry)	SmDFR002	KT119429	Solanum melongena (eggplant)		
FaDFR006	KC894047	Fragaria x ananassa (strawberry)	SoDFR001	AY954031	Solanum pinnatisectum (tansyleaf nightshade)	2	
FaDFR007	KC894048	Fragaria x ananassa (strawberry)	SoDFR002	AY954035	Solanum pinnatisectum (tansyleaf nightshade)		
FaDFR008	KC894054	Fragaria x ananassa (strawberry)	StDFR001	AY289921	Solanum tuberosum (potato)	6	
FaDFR009	KC894055	Fragaria x ananassa (strawberry)	StDFR002	AY289922	Solanum tuberosum (potato)		
GvDFR001	AY256381	Gypsophila elegans	StDFR003	JF754579	Solanum tuberosum (potato)		
HIDFR001	AB290349	Humulus lupulus (European hop)	StDFR004	JQ581654	Solanum tuberosum (potato)		
lhDFR001	AB304917	Iris x hollandica	StDFR005	NM_001288059	Solanum tuberosum (potato)		
lhDFR002	AB332098	Iris x hollandica	StDFR006	NM_001288480	Solanum tuberosum (potato)		
MdDFR001	AY227728	Malus domestica (apple)	3	SsDFR001	EF522155	Solenostemon scutellarioides	1
MdDFR002	AY227729	Malus domestica (apple)		SoDFR001	AB109016	Spinacia oleracea (spinach)	3
MdDFR003+	NM_001293939	Malus domestica (apple)		SoDFR002+	XM_021981251	Spinacia oleracea (spinach)	
MnDFR001+	XM_010093760	Morus notabilis	SoDFR003+	XM_021999632	Spinacia oleracea (spinach)		
MnDFR002+	XM_010099329	Morus notabilis	4	ThDFR001	AB012924	Torenia hybrid cultivar	1
MnDFR003+	XM_010111750	Morus notabilis		VaDFR001	AB610763	Vaccinium ashei	1
MnDFR004+	XM_024174542	Morus notabilis		VcDFR001	KF960989	Vaccinium corymbosum	1
OeDFR001+	XM_023024096	Olea europaea var. sylvestris		VmaDFR001	AY780883	Vaccinium macrocarpon	1
OeDFR002+	XM_023024097	Olea europaea var. sylvestris	3	VmyDFR001	AY123767	Vaccinium myrtillus	1
OeDFR003+	XM_023039626	Olea europaea var. sylvestris					
PbaDFR001	KM388827	Penstemon barbatus	1		合計	170	

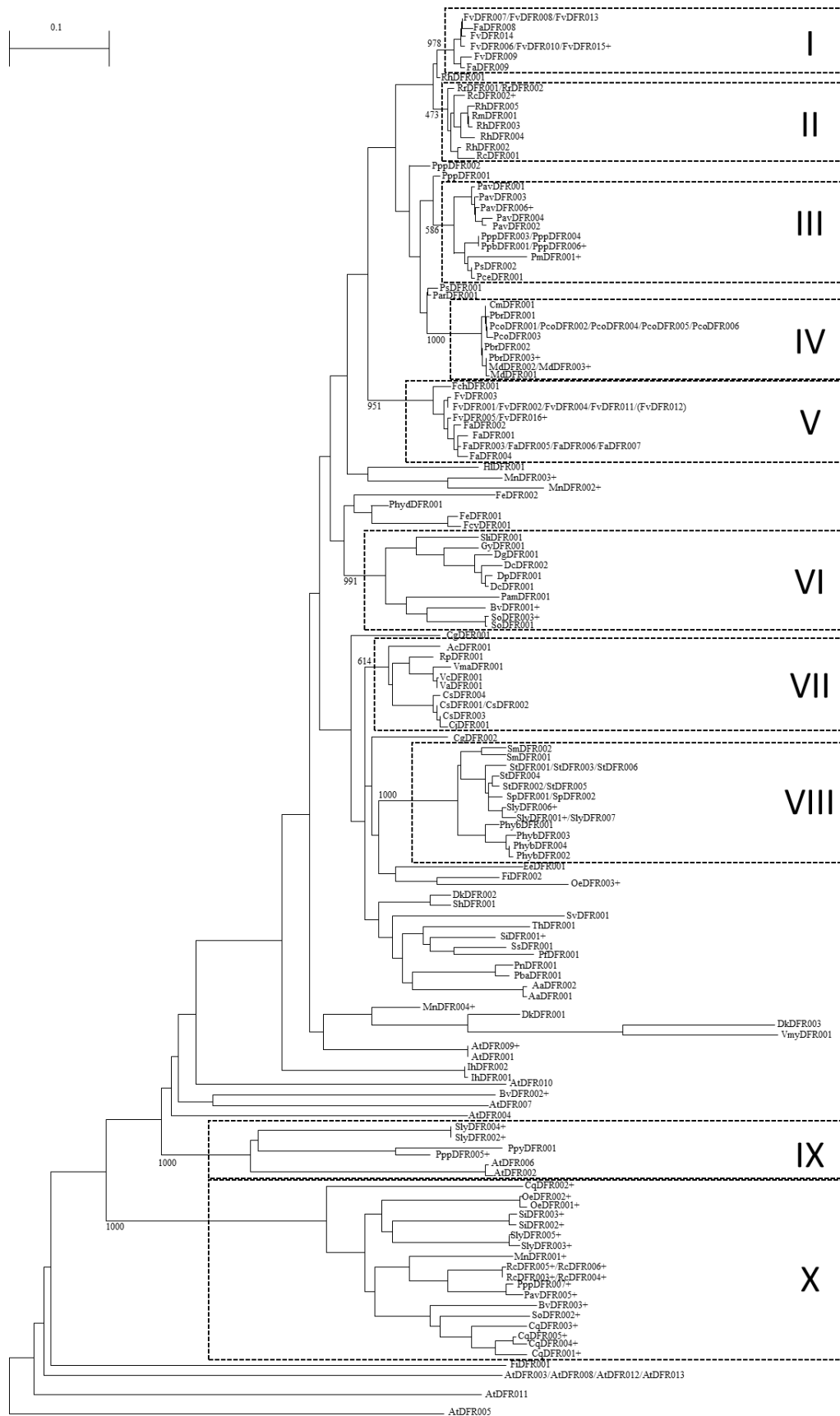


図2 収集した DFR のアミノ酸配列に基づく系統樹

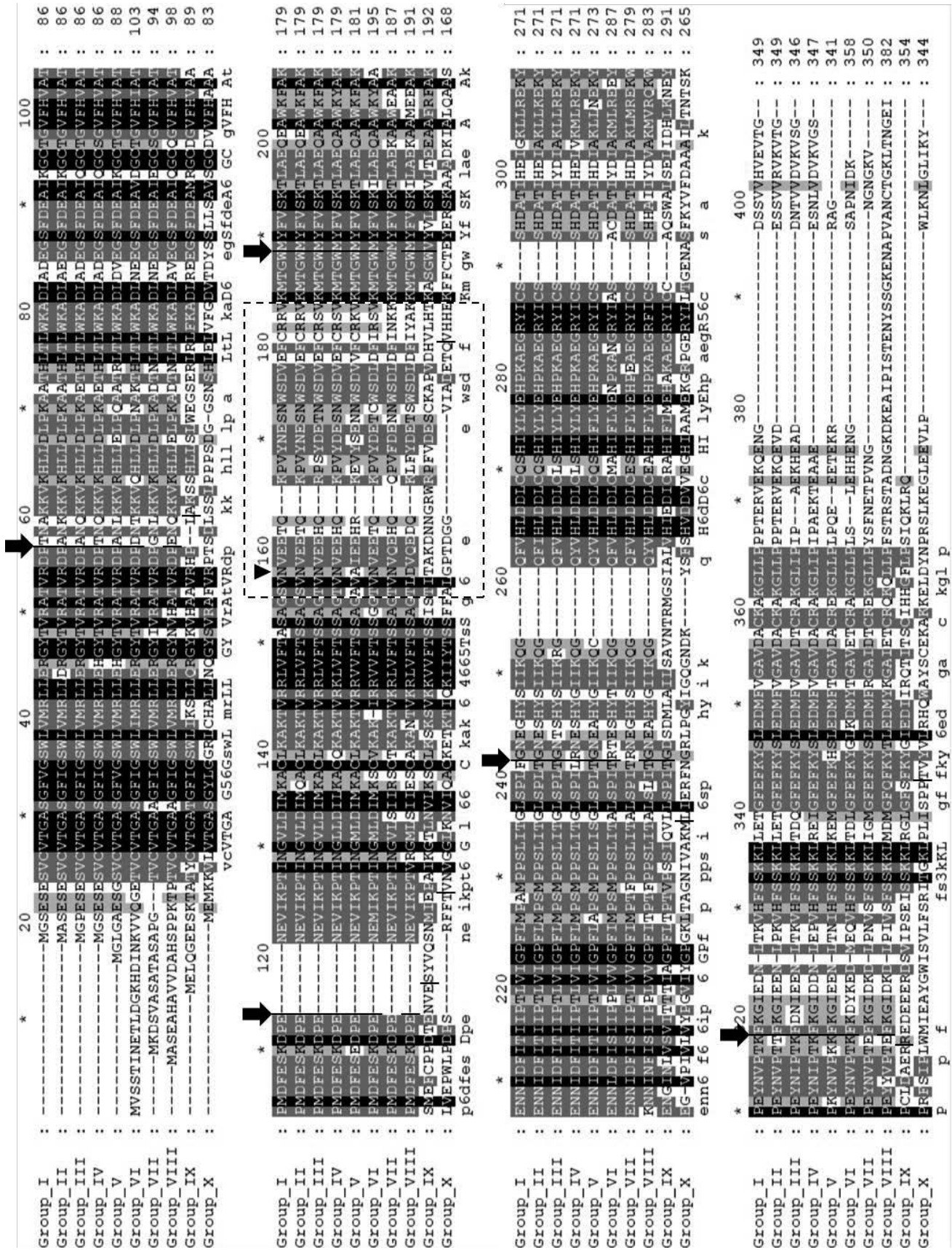


図3 グループごとのDFR共通配列を用いたアライメント解析結果

酸がいくつか確認された。Group IX と X の共通配列の相同性は他のグループと比較すると低い、**図 2** の系統樹においてもこの 2 つのグループは離れており、この差がアミノ酸配列レベルで示されたものであると考えられる。さらにイントロンサイトにおいても、Group I~VIII においては高い保存性が示されたが、Group IX と X においては数アミノ酸ほどのズレが生じていた。DFR の基質特異性の決定に関与するとされている領域は、第 3 エキソンの C 末端側に存在することが分かった。Eric ら (2001) の研究においては、この領域は 6 種類の植物の DFR のアライメント解析を行うことで相同性の高さが示されていたが、本研究で行ったさらに多くの植物種を用いた網羅的な解析においては、この領域の保存性はそれほど高くないことが明らかにされた。言い換えると、この領域の多様性が DFR の基質特異性に影響を与えていると考えられる。

さらに Eric らの研究において、**図 3** の三角で示したアライメント配列における 157 番目のアミノ酸を疎水性アミノ酸で置き換えることによって、発色が変わることが明らかにされている (文献<sup>7)</sup> のクローンでは 134 番目のアミノ酸)。本研究における Group V と X においては、他の多くのグループではアスパラギン (N) となっている 157 番目のアミノ酸残基が、疎水性のアラニン (A) とグリシン (G) であり、このグループ V と X に属する DFR が基質とするジヒドロフラボノールが何であるか、またその後どのような色調を示すのか興味深い。

#### 4. まとめ

本研究において、多くの植物種における DFR のアミノ酸配列の相同性が高いことが示され、多くの植物間で保存性が高いことが明らかにされた。アントシアニンの生合成経路は多くの植物でほぼ共通していることが知られていることから、今後、今回明らかにされた DFR の保存性の高い部分をもとに、これまでに DFR のクローニングになされていない多

くの植物においても DFR 遺伝子のクローニングが可能になると考えられる。さらに多くの植物種で DFR の解析が進むことによって、DFR の基質特異性とアントシアニン合成、発色や色調の関係が明らかにされると期待できる。

#### 謝辞

本研究は、平成 30 年度高専-長岡技術科学大学共同研究助成を受けたものである。

#### 参考文献

- 1) L. テイツ, E. ザイガー : 植物生理学第 3 版, 培風館, pp.290-298, 2010.
- 2) Yukihiisa Katsumoto, Masako Fukuchi-Mizutani, Yuko Fukui, Filippa Brugliera, Timothy A. Holton, Mirko Karan, Noriko Nakamura, Keiko Yonekura-Sakakibara, Junichi Togami, Alix Pigeaire, Guo-Qing Tao, Narender S. Nehra, Chin-Yi Lu, Barry K. Dyson, Shinzo Tsuda, Toshihiko Ashikari, Takaaki Kusumi, John G. Mason and Yoshikazu Tanaka : Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin, *Plant Cell Physiol.*, 48(11), pp.1589-1600, 2007.
- 3) 芦田坦, 作田正明 : 植物分子細胞生物学, オーム社, pp.147-152, 2004.
- 4) Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem, Russell L. Jones : 植物の生化学・分子生物学, 学会出版センター, pp.1180-1185, 2005.
- 5) 中山亨, 兪東燦, 高橋征司 : メタボロン...植物二次代謝工学におけるインパクト, *生物工程*, 第 90 巻, 第 9 号, pp.576-581, 2012.
- 6) 大庭理一郎, 五十嵐喜治, 津久井重紀夫 : アントシアニン-食品の色と健康-, 建帛社, pp.27-28, 2000.
- 7) Eric T. Johson, Sunhyo Ryu, Hankuil Yi, Byongc Shin, Hyeonsook Cheong and Giltsu Choi : Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of

- dihydroflavonol 4-reductase , The Plant Journal, 25(3), pp.325-333, 2001.
- 8) NCBI ( National Center for Biotechnology Information), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 9) M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins : Clustal W and Clustal X version 2.0, Bioinformatics, 23(21), pp.2947-48, 2007.

## Phylogenetic Analysis of DFR Genes Involved in Anthocyanidin Synthesis Pathway

Hisako OOKA, Tatsuki URABE, Kazumi FURUKAWA and Yoshinori TAKAHARA

Plants have various color pigments. Many plants have fruits and flowers of vivid colors such as orange, red, purple and blue. Anthocyanins with anthocyanidins as aglycone are one group of plant pigments. Each type of anthocyanidins is determined by the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) in its biosynthetic pathway and has a major influence on the determination of plant color. We performed a phylogenetic analysis of DFR genes, which are key enzymes of this anthocyanidin biosynthesis pathway. We collected 170 DFR clones in various plants by browsing database (NCBI). The collected DFRs were classified into ten groups according to sequence similarity. The consensus sequences within each group were aligned, and amino acids involved in the responsible region for determination of the substrate specificity of DFR have been shown. In addition, DFR's intron sites were highly conserved. These results would be useful to unveil the relationship between DFR and plant pigments.

