赤タマネギにおける色素発現メカニズムに関する研究

誌名	神奈川県農業総合研究所研究報告 = Bulletin of the Agricultural Research Institute of Kanagawa Prefecture
ISSN	03888231
著者名	大矢,武志 野村,研 上西,愛子 北,宜裕
発行元	神奈川県農業総合研究所
巻/号	143号
巻号補足	
掲載ページ	p. 13-28
発行年月	2003年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

赤タマネギにおける色素発現メカニズムに関する研究

大矢武志[1)]・野村　研・上西愛子・北　宜裕

Anthocyanin Pigmentation in Red Onion: Its Anthocyanin Biosynthetic Reserch on the Biochemical and Molecular Characterization

Takeshi OHYA[1)], Ken NOMURA, Aiko KAMINISHI and Nobuhiro KITA

摘　要

神奈川県で育成した赤タマネギ品種‘湘南レッド’及びその改良種である‘早生湘南レッド’は，わが国でサラダ用に利用される生食用赤タマネギの代表的な品種である．これら2品種は，いずれも食味が良いのが特徴ではあるが，生産現場では栽培条件による色素発現の変動が「色むら」として問題となっている．

そこで本研究では，赤タマネギの商品性に関与する最も大切な因子としてのアントシアニン色素合成の発現メカニズムについて，品種と生育ステージによるアントシアニンの種類と発現量の違い及び色素合成・発現に関与する遺伝子群の単離及びそれらの発現パターン等について解析した．

まず，‘早生湘南レッド’を含む国内外の赤タマネギ6品種のアントシアニン構成を調べた．その結果，量的な違いはあるものの，すべての品種に共通する6種のアントシアニン配糖体が含まれていた．これらのうち，主要色素のシアニジン3-マロニルグルコシド(Cy3MG)の含有量が多い品種ほど鮮やかな赤色を示すことが明らかになった．この品種間における6種のアントシアニン配糖体の構成比率の差は幼苗段階ですでに認められることから，アントシアニン色素構成の幼苗検定によって優良な赤色色素個体を早期に選抜できる可能性が示唆された．

次に，アントシアニン合成の発現に関与する環境要因とその発現調節機構について，幼苗及びほう芽苗を用いて検討した．その結果，アントシアニン合成の発現は鱗茎上葉の光刺激だけでなく，傷害応答物質であるメチルジャスモン酸によっても誘導されることが明らかになった．アントシアニン色素合成系関連酵素遺伝子群(*acb*)，特にカルコン合成酵素(*chs*)，ジヒドロフラボノール4-リダクターゼ(*dfr*)及びアントシアニジン合成酵素(*ans*)の3つの遺伝子についてのノーザン解析及びリアルタイムRT-PCR解析では，いずれの遺伝子とも外部刺激に反応して同調的に発現した．また，遺伝子発現調節因子であるMYBタンパクのcDNA断片を‘早生湘南レッド’から単離し，その発現パターンを解析したところ，同様に上記3種類の*acb*と同調して発現することが明らかとなり，MYBがこれら*acb*の発現制御に関与していることが示唆された．

以上の結果から，タマネギ鱗茎に含まれるアントシアニン構成パターンは品種により異なること及び色素合成は光刺激を含む負傷刺激等に応答する普遍的調節因子により同調的に発現する酵素群により誘導されていることが明らかになった．

謝　辞

本報告を作成するにあたっては，明治学院大学斉藤規夫教授には貴重なご意見をいただくとともに，ご校閲の労をとっていただいた．南九州大学の寺原助教授には色素分析に用いる標準サンプルを譲っていただいた．株式会社トキタ種苗には，実験サンプルとして赤タマネギの鱗茎を分譲いただいた．ここに記して感謝の意を表する．

キーワード：タマネギ，アントシアニン生合成，光，メチルジャスモン酸，MYB

[1)]神奈川県環境農政部農業振興課

Summary

Red onion cultivars, "Shonan Red" and "Wase-shonan Red"(*Allium cepa* L.), both of which have been bred by Kanagawa Horticultural Experiment Station, are representative red onion cultivars suitable for fresh salad because of their crispy taste. Though both cultivars show attractive, brilliant red-purple color, unstable pigmentation which often ocurrs in the growing field is one of gorwer's major concern. In the present study, mechanism of anthocyanin biosynthesis and pigmentation was investigated through the biochemical and moleculor genetic analysis over structural genes for the anthocyanin biosynthesis and some of the regulatory genes as well. By anthocyanin analysis, it was demonstrated that cyanidin 3-malonyl-glucoside (Cy3MG) was identified as the main anthocyanin molecule among seven cyanidin glycosides found in the red-purple bulbs. In addition, as Cy3MG content in the seedlings of red onion cultivars was closely related to that of the ripened bulbs. Thus, red-purple pigmentation was suggested to be responsible for the high content of Cy3MG in the bulbs and the Cy3MG content in the seedling stage can be used as a reliable biochemical marker for the selection of desirable red onion strains. When anthocyanin biosynthesis inducers were screened using light irradiation to the leaves of red onion seedlings and jasmonate treatment on the whole plantlets, both treatments strongly induced anthocyanin pigmentation. This suggested that injuriurious simulation elicited anthocyanin pigmentationon followed by the induction of gene expression for anthocyanin biosynthesis(*acb*)genes. Northern blot and realtime RT-PCR analysis confirmed that all the *abc* genes in red onion seedlings were synchronously expressed in response to the light irradiation and jasmonate treatment. *myb*-like genes, which are known to encode regulatory proteins in the oncogene expression, were cloned from "Wase-shonan Red" using RT-PCR and the behavior of their expression was analyzed. As a result, expression of three *myb*-like genes were induced in the same manner with *acb* genes, suggesting that these *myb*-like genes cloned are involved in the regulation of *acb* gene expression. These results indicate that, though the anthocyanin constituents in the red onion cultivars are rather irregular among the cultivars, the *acb* genes are regulated by the factors relating to MYB proteins in response to the outer injurious stimulation such as light irradiation and jasmonate treatment.

Key words: Onion, anthocyanin, irradiation, methyljasmonate, MYB

緒　言

神奈川県で育成した赤タマネギ品種‘湘南レッド’及びその改良種である‘早生湘南レッド’は，わが国でサラダ用に利用される生食用赤タマネギの代表的な品種として親しまれている．これら2品種は，いずれも食味が良いのが特徴ではあるが，その商品性に最も影響する赤色色素の発現メカニズムに関してはほとんど研究されていない．本県では都市農業のメリットを生かした直売が進む中で，消費者からはより赤色の鮮やかな品種の育成が求められ，生産現場からは収穫後の球色のばらつき(色むら)が解決すべき課題として提起されている．

植物では，二次代謝産物としてフラボノイド化合物類が合成される．アントシアニンはこのフラボノイドを構成する最大のサブクラスで，植物の赤色ないし青色系の基本色素として花弁や果実等に存在する(林 1980)．自然界では，受粉や種の飛散を助ける鳥や昆虫を誘因するための視覚的信号として機能するばかりでなく，病原微生物に対する抗菌作用や紫外線の防御等，植物の生存に欠くことのできない多様な機能を果している(Holton and Crnish 1995)．アントシアニンは，これまで種々の植物種を材料に，光(Ahmad and Cashmore 1993)，低温や障害(Richardら 2000)によって誘導されることが明らかにされている．

赤タマネギにおいてアントシアニンは，赤紫色を構成する主要色素であることは明らかにされているが(Brandwin 1965, Teraharaら 1994, Duら 1974, Foosenら 1996, Fuleki 1971, Mooreら 1998)，赤タマネギにおける色素の生合成やその発現メカニズムについての生化学的及び分子生物学的な解析はほとんどなされていない．本研究では，より色鮮やかな新品種の育成を進めるため，選抜に有効な色素構成及び色むらを解消するための技術開発の基礎となるアントシアニン系色素の生合成とその

発現機構についての生化学的及び分子生物学的解析を行った．研究では，赤タマネギの商品性に関与する最も大切な因子としてのアントシアニン色素合成の発現メカニズムに注目し，品種と生育ステージによるアントシアニン合成の種類と発現量の品種間差異及び色素発現に関与する遺伝子群の単離と発現解析を行った．その結果，赤タマネギにおけるアントシアニン系の色素合成は，品種によって色素構成パターンが異なること及び関連する一連の合成系酵素群が光刺激あるいは負傷刺激等に応答してユニバーサルな制御系の下で誘導されることが明らかになった．本研究により，今後，赤色鮮やかで商品性の高い品種の育成が進むとともに，生産現場においては収穫後，一定期間太陽光にさらす等により色むらを解消することなどの新しい技術開発の知見を与えるものと期待される．

材料及び方法

1．供試材料

試験には，神奈川県農業総合研究所育成赤タマネギ(*Allium cepa*)品種‘早生湘南レッド’の他，‘くれない’，‘猩々赤’，‘Red Grano’，‘Red Creole’，‘Southport Red Globe’，及び‘Rouge D'Amposta’の7品種を用いた．なお，特に記述のない場合，試験材料には‘早生湘南レッド’を用い，また，実験に応じて成熟した鱗茎部，3～4葉期の幼苗及び鱗茎部からのほう芽した葉しょう部を材料に用いた．

鱗茎部は‘早生湘南レッド’及び‘猩々赤’については当所の試験圃場において1998年9月14日に播種し，育苗後，11月25日に定植した．翌1999年6月に地上部の倒伏を待って収穫し，実験に供試した．他の品種については株式会社トキタ種苗から分譲いただいた．

幼苗については，オートクレーブで1.2気圧，1時間高圧滅菌した黒ぼく土を入れたガーデンパンに播種し，ガラス温室内で育成した．発芽後，実験に供試するまでは，1000倍に希釈したハイポネックス水溶液を1週間に2回与えた．

2．アントシアニンの抽出

Teraharaら(1994)の方法に従い，各実験材料から切片を切り出し，切片の大きさを測定後，酢酸メタノール溶液(酢酸：メタノール=1:1)中で4℃一晩抽出した．

3．アントシアニンの定量

タマネギのアントシアニンを構成するアグリコンとして，寺原・山口(1984)が報告しているシアニジン(フナコシ)を標準試料とし，酢酸メタノール溶液を用いて既知濃度に設定した標準アントシアニジン溶液を作成した．これを用いて，分光光度計によりアントシアニンの吸収極大である530nmにおける吸光度を測定し，アントシアニン濃度と吸光度の検量線を作成した．この検量線をもとに，各実験材料から得られたアントシアニン抽出溶液の濃度を推定した．同一個体から3試料ずつ抽出し，各試料について3回530nmの吸光度を測定して得られた数値からそれぞれの品種についての平均値及び標準偏差を算出した．

4．アントシアニン構成検定HPLC条件

機種は‘SMART system’を，カラムはμRPC C2/C18 SC2.1/10(φ2.1mm×100mm)カラム(いずれもアマシャムファルマシアバイオテク)を使用した．溶出液はA液として，1.5%リン酸を含む超純水，B液として1.5%リン酸，20%酢酸，及び25%アセトニトリルを含む超純水とし，流速200μL・min^{-1}，溶出に用いたB%変化を20%～80%・40min^{-1}に設定した．なお，標準色素サンプルとして，シアニジン3-グルコシド(cyanidin 3-glucoside:Cy3G)，シアニジン3-ラミナリオビオシド(cyanidin 3-laminariobioside:Cy3L)，シアニジン3-マロニルグルコシド(cyanidin 3-6-malonyl glucoside: Cy3MG)及びシアニジン3-マロニルラミナリオビオシド(cyanidin 3-malonyl-laminariobioside:Cy3ML)を1%酢酸を含む脱イオン水に溶解して用いた．

5．鱗茎部の色調

鱗茎部の色調については，カラーチャート(日本園芸植物標準色票；農林水産省編)を使用し目測した．また，同じ試料について分光式色差計SZ-Σ90-OF(日本電子)を用いてCIE L*a*b*(L*は明度，a*及びb*は色度を表す)を測定した．

6．光照射処理

幼苗については，第1～2葉を剥離し，葉しょう部が無着色の植物体を材料に用いた．光照射部位は，アルミ箔を用いて遮光することにより限定し，45μmol・m^{-2}・s^{-1}の白色光を1日当り16時間，5日間にわたって照射した．鱗茎からのほう芽苗を用いた実験では，25℃の暗所で鱗茎からほう芽させ，葉鞘部が無着色の植物体(ほう芽苗)に45μmol・m^{-2}・s^{-1}の白色光を0，6，12，24，48，72及び144時間の連続照射した．

7．メチルジャスモン酸処理

グリセロールに溶解させた100μMのメチルジャスモン酸(methyljasmonate：MeJ，東京化成)500μLを含ませた脱脂綿を暗所で育成させたほう芽苗とともに5Lの密閉容器に入れ，暗所で25℃，24，48，72及び168時

第1表　本研究で使用したプライマーの塩基配列

名称	塩基配列	塩基数	参照配列
myb-F	GGACCTTGGACTGCTGAAGA	20	シロイヌナズナ由来snapdragon *myb* protein 305 homolog(U62743[z])
myb-R	TGTCTGTTCTTCCCGGTAAA	20	
M223L365	ACCACCTTATAACATCATCA	20	本研究で単離した*myb-wsr223*
M37L309	TGAGTAAGGCTACACACTTT	20	本研究で単離した*myb-wsr37*
M229L288	TTGAGTAAGGCTACACAAATAA	22	本研究で単離した*myb-wsr229*
M34L317	TGACTATAAAATCAAAAGAATCAG	24	本研究で単離した*myb-wsr34*
CHS319U	ACGATACTGCCGGATTC	17	赤タマネギカルコン合成酵素(*chs-wsr*;AF267173[z])
CHS548L	TCGCCCTCATCCTCTCTG	18	
ANS72U	GCGGTTTGGTTAATAAGGAG	20	赤タマネギアントシアニジン合成酵素(*ans-wsr*;未登録)
ANS214L	ACAACTTCCGTTCCAGATGC	20	

[z]カスタムプライマーを作成するときに相同性解析等で参照した塩基配列のGenbank登録番号

間静置することによりMeJに暴露した．対照は，グリセロールのみで暴露した．

8．RNAの抽出

全RNAについては，Chirgwinら(1979)の方法に従い，鱗茎部4 gを材料に水で飽和したフェノール溶液を加え遠心分離し，水系画分を回収，エタノールでRNAを沈殿させることにより精製した．mRNAについては，Quick Prep Micro mRNA Purification Kit(アマシャムファルマシアバイオテク)を用い，組織100mgからKitのプロトコルに従って抽出した．

9．RT-PCR

遺伝子のクローニングに用いたRT-PCRは，RNA PCR kit(AMV)ver.2.1(宝酒造)を用い，kitのプロトコルに従って，GeneAmp™ PCR9600システム(PEアプライドバイオシステム)を用いて行った．RT-PCRで用いる特異的プライマーは，Genbankに登録されているDNA配列情報データベースを用いて目的遺伝子のホモローグ検索し，GENETYX™を用いて保存領域を抽出した後，解析ソフトOLIGO™を用いて設計した(第1表)．リアルタイムRT-PCRで用いる特異的プライマーは，クローン間あるいはGenbankに登録されているホモローグの保存領域を含まず，かつ特異性の高い部分にOLIGO™を用いて設計した(第1表)．いずれのプライマーとも，アマシャムファルマシアバイオテク社にカスタムプライマーとして合成委託した．

リアルタイムRT-PCRにおける逆転写反応は，Taq Man Gold RT-PCR kit(PEアプライドバイオシステム)を用い，kitのプロトコルに従いGeneAmp™PCR9600システムもしくはGeneAmp5700シーケンスディテクションシステム(いずれもPEアプライドバイオシステム)で行った．ユニバーサルプライマーにはkit付属のOligo d(T)16プライマーを用い，25℃，10分プレインキュベーションした後，48℃，30分の逆転写反応を行い，最後に95℃で5分間処理することにより逆転写酵素を不活化した．cDNAの相対量を定量するためのリアルタイムPCRには，SYBR Green PCR Regent(PEバイオシステム)を用い，kitのプロトコルに従いGeneAmp5700シーケンスディテクションシステム(PEアプライドバイオシステム)を用いて行った．PCR条件は，上記いずれも熱変性95℃，15秒，アニーリング及び伸長反応は57℃，1分とし，40サイクル反応させた．

10．cDNAの単離と塩基配列の決定

RT-PCRにより増幅されたcDNA断片を定法に従ってpT7Blue(ノバジェン)に連結・挿入後，大腸菌DH5α(宝酒造)に形質転換した(Sambrookら1989)．pT7BlueにクローニングされたcDNA断片の塩基配列は，ダイデオキシサイクルシーケンス法によりDNAシーケンサABI373S(エービーアイ)を用いて決定した．

11．ノーザンブロット解析

MOPS緩衝液中で，1サンプル当り全RNA30μg を18%ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲル電気泳動により分画後，ナイロンメンブレン(Hybond N+；アマシャムファルマシアバイオテク)に転写し，UVトランスイルミネーターを用いてメンブレンを固定した．ハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションシグナルの検出にはAlkPhos DIRECT kit(アマシャムファルマシアバイオテク)を用い，kitのプロトコルに従って実施した．プローブには，*chs-wsr*(‘早生湘南レッド’由来カルコン合成酵素cDNA断片，AF267173)，*dfr-wsr*(‘早生湘南レッド’由来ジヒドロフラボノール4-リダクターゼcDNA断片，AF268382)及び*ans-dgr*(*D.gratianopolitanus*由来アントシアニジン合成酵素cDNA断片，未登録)を用い(北ら 2002)，55℃でハイブリダイズさせた．

第２表‘早生湘南レッド’及び‘猩々赤’における CIE L*, a*及びb*値[z]の比較

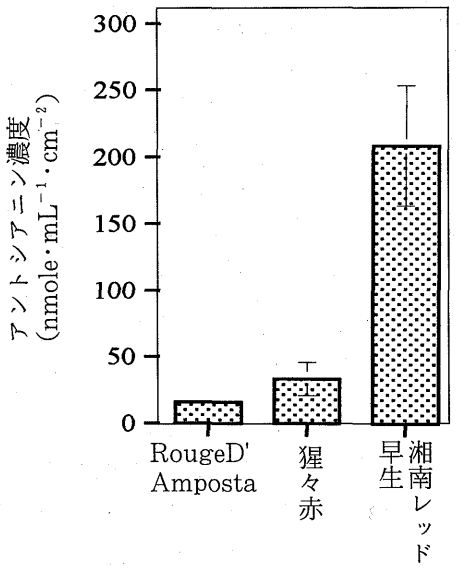
パラメータ	早生湘南レッド	猩々赤
L*	17.82±1.31	38.55±2.49
a*	21.14±1.16	6.74±3.20
b*	-5.75±0.82	-1.80±2.06

[z]±以下の数値はいずれも標準偏差を示す.

結　果

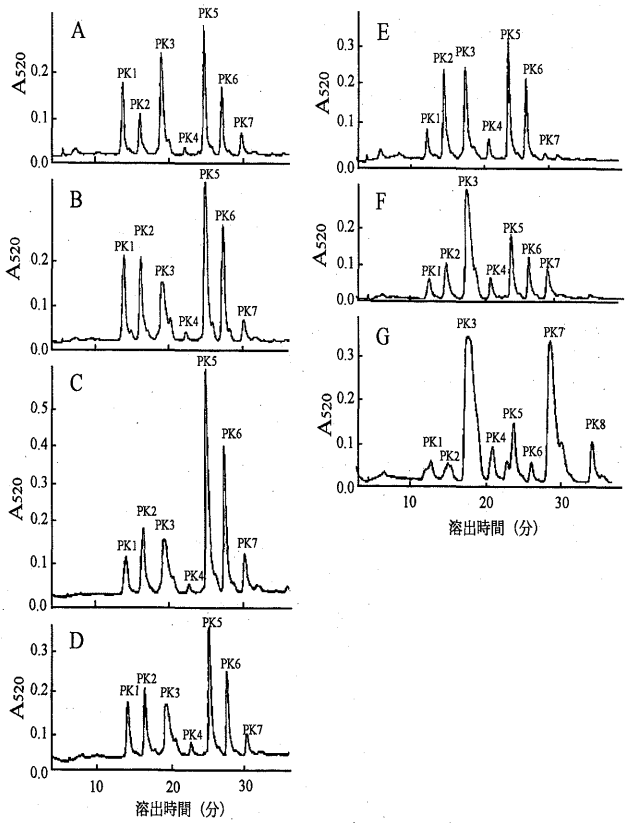
１．アントシアニン構成と色調の品種間差異

供試品種７品種について成熟肥大した鱗茎部を材料にカラーチャートにより色調を調査したところ，‘早生湘南レッド’の他，‘くれない’，‘Red Grano’，‘Red Creole’，‘Southport Red Globe’の５品種については暗赤紫から濃赤紫(それぞれカラーチャート番号9510，及び9509)であったのに対し，‘猩々赤’では鮮紫ピンク(同9505)，‘Rouge D'Amposta’では紫ピンク(同9503)を示した．そこで，‘早生湘南レッド’及び‘猩々赤’について色差計によりCIE L*a*b*を測定したところ，‘早生湘南レッド’は‘猩々赤’に比べL*及びb*で1/2～1/3，a*で３倍の値を示した(第2表)．また，‘早生湘南レッド’，‘猩々赤’及び‘Rouge D'Amposta’の3種について，鱗茎部における単位面積当りのアントシアニン含量について比較した結果，



第１図　赤タマネギの鱗茎部に含まれるアントシアニン含量の品種間差異

図の縦軸は，鱗茎部表皮１㎠中に含まれるアントシアニン濃度(nmole・mL^{-1}・cm^{-2})で，バーは標準偏差を示す.



第２図　赤タマネギから抽出したアントシアニンのHPLC分析による品種別のアントシアニン誘導体の分画状況

アントシアニンの抽出法及びHPLC条件は本文を参照．PK１～７はいずれもHPLC分画をアントシアニン溶液の最大吸収波長である520nmにおける吸光度(A520)により検出したときのピーク画分を示す．A:早生湘南レッド，B:くれない，C:Red Grano，D:Red Creole，E:Southport Red Grobe，F:猩々赤，G:Rouge D'Amposta.

‘早生湘南レッド’は‘猩々赤’の６倍以上，‘Rouge D'Amposta’の13倍以上のアントシアニンを含んでいることが明らかになった(第1図).

次に，供試6品種についてHPLCによるアントシアニンの構成成分を比較した．その結果，‘Rouge D'Amposta’を除いた6品種では，同じリテンションタイムを示す7つのピークが認められたことから(第2図A-F)，これらの品種には少なくとも同一の7種のアントシアニンが含まれていることが明らかになった．一方，‘Rouge D'Amposta’では，同じ7つのピークの他にもう1つのピークが認められたことから，本品種はさらに別のアントシアニンを含んでいることも明らかになった(第2図G).

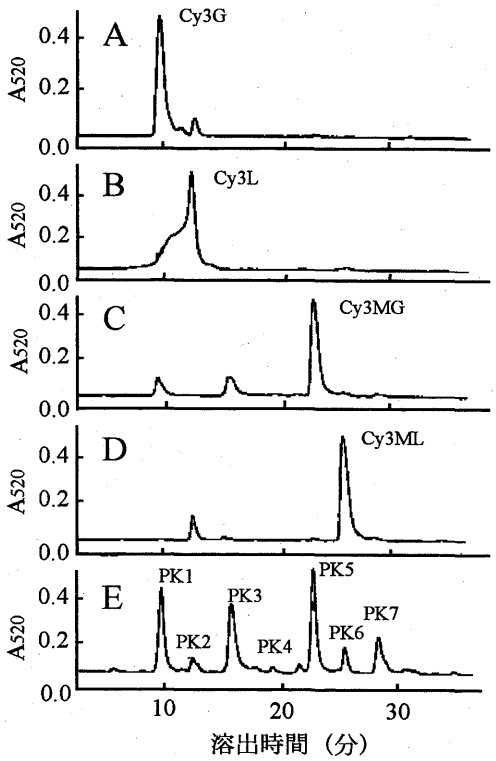
上記の8つのピークについて，各タマネギ色素サンプルと既知の標準サンプルを混合してHPLC分析を行ったところ，ピーク1がCy3G，ピーク2がCy3L，ピーク5が

第3表　異なる赤タマネギ品種から抽出したアントシアニンのHPLC分析による溶出ピーク別面積構成比(%)[z]

品　種	Cy-3G (PK1)	Cy-3L (PK2)	PK3	PK4	Cy-3MG (PK5)	Cy-3ML (PK6)	PK7	PK8[y]	Cy-3G+Cy-3MG	Cy-3L+Cy-3ML
鱗茎部										
早生湘南レッド	24.3	5.0	22.5	−	29.8	6.8	11.6	−	54.1	11.8
くれない	14.2	15.5	16.9	1.3	29.4	18.7	4.0	−	43.6	34.2
Red Grano	7.1	12.0	16.7	1.0	36.5	20.2	6.5	−	43.6	32.2
Red Creole	12.6	15.2	20.5	3.0	27.6	16.3	4.8	−	40.2	31.5
Southport Red Globe	6.9	20.6	28.3	4.5	24.1	15.8	−	−	31.0	36.4
猩々赤	5.6	10.5	47.9	4.6	14.7	8.8	7.9	−	20.3	19.3
Rouge D' Amposta	4.4	4.3	42.6	5.3	8.1	2.3	28.2	4.8	19.1	6.6
幼苗表皮										
早生湘南レッド	−	−	24.1	−	30.7	5.7	25.9	8.8	30.7	5.7
猩々赤	−	−	30.0	−	5.9		40.4	23.4	5.9	−

[z]表中の数字は，各品種含まれる1から8までの溶出ピーク面積(第2図参照)の総和を100としたときの各ピーク面積の100分比を示す．[y]Cy-3G：シアニジン3-グルコシド，Cy-3L：シアニジン3-ラミナリオリボシド，Cy-3MG：シアニジン3-マロニルグルコシド，Cy-3ML：シアニジン3-マロニルラミナリオビオシド，　PK3，PK7及びPK8：未同定色素．

Cy3MG及びピーク5がCy3MLのリテンションタイムと一致し(第3図)，各ピークを構成するアントシアニンを

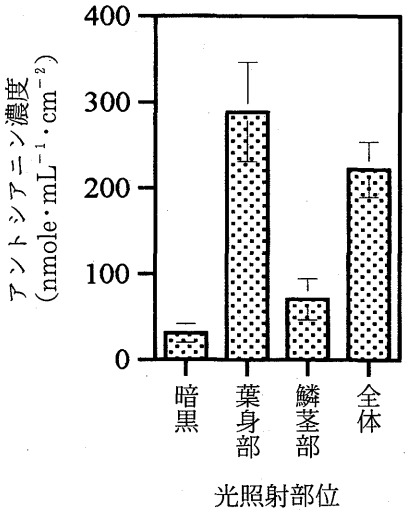


第3図　‘早生湘南レッド’から抽出したアントシアニンをHPLC分析した時に分画される各ピークの構成成分の同定

A−D はアントシニアニン誘導体の標準試料で，Aはcyanidine 3-glucoside(Cy-3G)，Bはcyanidine 3-laminariobioside(Cy-3L)，Cはcyanidine3-malonyl glucoside(Cy3-MG)及びDはcyanidine 3-malonyl laminariobioside(Cy-3ML)の溶出パターンを示す．縦軸のA520は，アントシアニン溶液の最大吸収波長である520nmにおける吸光度を示す．

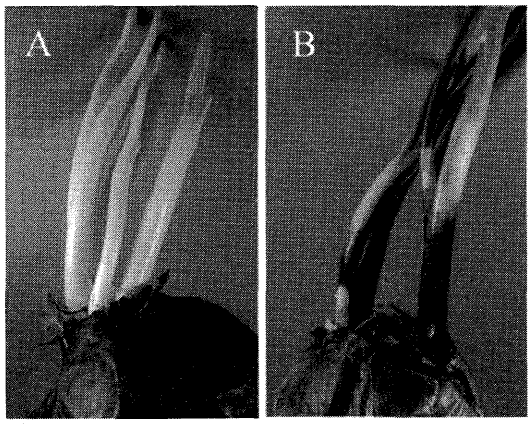
それぞれ同定することができた．一方，ピーク3，4及び7については，いずれもリテンションタイムが一致する既知の標準サンプルがなく，同定はできなかった．

一方，色調分析では，‘猩々赤’及び‘Rouge D'Amposta’を除く他の品種はすべて濃赤紫系の色調を示す品種群に分類された．しかし，HPLC分析によっていずれの赤タマネギ品種にも共通して含まれるアントシアニンが明らかになったことから，上記7品種のアントシアニン種別含量を比較した(第3表上段)．その結果，‘猩々赤’及び‘Rouge D'Amposta’を除くすべての濃赤紫系品種では，いずれもCy3MG含量が顕著に多く，Cy3Gとの合計では両者の含量が最も少ない‘Southport Red Globe’でも全色素量の30%以上を占めるとともに，他の品種では40%を越えることが明らかになった．一方，‘猩々赤’及び‘Rouge D'Amposta’では未同定色素のピーク3が主要色素を構成し，これが全体の40%以上を占めるなど，上記の濃赤紫系品種とは明らかに異なるアントシアニン構成パターンを示した．そこで，両品種群を代表する‘早生湘南レッド’と‘猩々赤’の幼苗を用いて，その葉しょう表皮に含まれるアントシアニンの構成成分を比較した．その結果，両品種とも成熟した鱗茎部から抽出したアントシアニン構成とは明らかに異なる構成パターンを示したが，Cy3MGに注目すると，鱗茎部におけるCy3MG含量比をそのまま反映していることが明らかになった(第3表下段)．すなわち，‘早生湘南レッド’幼苗の葉しょうにおけるCy3MG含量は鱗茎同様に全体の30%を越えていたのに対し，‘猩々赤’ではそれぞれ8.1及び5.9%と全体の10%にも達していなかった．これは，鱗茎の色調における品種間差異を決定しているアントシアニン構成比は，幼苗段階からすでに同じ



第４図‘早生湘南レッド’幼苗に対する光照射部位の違いが葉鞘部におけるアントシアニンの生成・蓄積に及ぼす影響

図の縦軸は，鱗茎部表皮1cm²中に含まれるアントシアニン濃度(nmole・mL⁻¹・cm⁻²)で，バーは標準偏差を示す．



第５図‘早生湘南レッド’の鱗茎ほう芽黄化葉鞘部に対する光照射処理効果

暗所で葉鞘部が未着色状態のままほう芽させた鱗茎(A)に，45μmol・m⁻²・S⁻¹の白色光を１日16時間，３日間にわたり照射したときの葉鞘部におけるアントシアニンの発現状況を示す．

パターンとなっていることを示しており，これによって赤タマネギ育種における色調選抜が幼苗段階のアントシアニン色素の構成比のHPLC分析により可能であることが明らかになった．

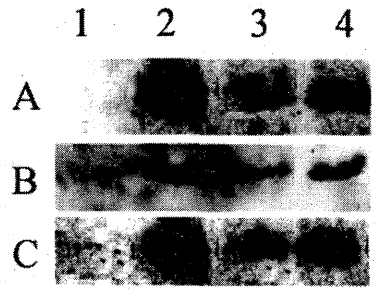
以上の結果から，赤タマネギにおいて品種間による色調の違いは，アントシアニンの量とその構成要素の違いによって起因すること及びその差は幼苗段階ですでに発現していることが示された．

２．光によるアントシアニン合成の発現調節

葉しょう部が未着色状態になるまで外葉を取り除いた幼苗を用い，アルミ箔で植物体全体，鱗茎部及び葉身部の各部位を覆うことにより部位を限定して光を照射した．その結果，いずれの部位に光を照射してもアントシアニン合成は発現してくるものの，葉身部が光刺激を受けたときに顕著な高レベル発現を示した．同様に，ほう芽苗を用いても，葉身部に光刺激を与えるとアントシアニン合成が高レベルで発現した(第５図)．

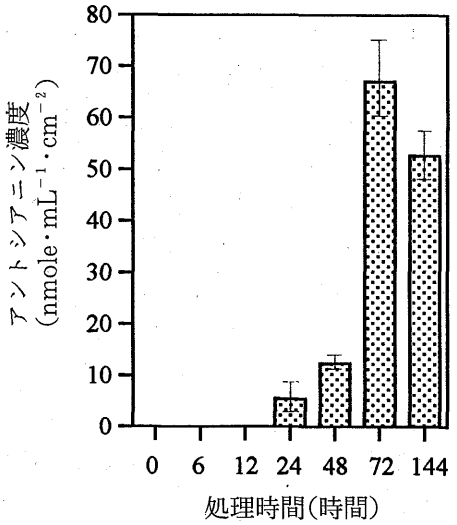
そこで，アントシアニン合成酵素群が光によってどのようなる発現調節を受けているのかを明らかにするため，鱗茎部が未着色状態の幼苗の葉しょう部に光を照射した後，mRNAを抽出し，アントシアニン合成系関連酵素遺伝子として*chs-wsr*，*dfr-wsr*及び*ans-dgr*の各々のクローンをプローブとして用いたノーザン解析を行った．その結果，いずれの遺伝子ともアントシアニン合成の発現と同じ発現パターン，すなわち葉しょう上葉に光が照射されたときに強く発現した(第6図)．

次に，アントシアニン及びアントシアニン合成系関連酵素群遺伝子の光照射に対する発現消長を，暗所でほう芽させた黄化葉しょう部を用いて経時的に調査した．アントシアニンは，光照射24時間後から合成し蓄積しはじ



第６図‘早生湘南レッド’幼苗における光照射部位の違いがアントシアニン合成系関連遺伝子の発現に及ぼすノーザンブロット解析

葉鞘が未着色状態になるまで外葉を取り除いた幼苗に対して，光照射なし(レーン１)を対照に，その葉部(レーン２)，葉鞘部(レーン３)及び植物全体(レーン４)に，45μmol・m⁻²・s⁻¹の白色光を１日当り16時間，５日間にわたり照射した．処理後，それぞれの葉鞘部からmRNAを抽出し，‘早生湘南レッド’由来カルコン合成酵素(A)及びジヒドロハイドロキシ３-リダクターゼ(B)及び*Dianthus gratianopolitanus* 由来アントシアニジン合成酵素(C)の部分cDNAから調製したプローブを用いて，55℃でハイブリダイズさせた．



第7図 ‘早生湘南レッド’鱗茎ほう芽苗に対する光照射処理により誘導されるアントシアニン発現量の経時的変化

図の縦軸は，鱗茎部表皮組織中に含まれるアントシアニン濃度(nmole・mL^{-1}・cm^{-2})で，バーは標準偏差を示す．

め，72時間後に最大値に達し，以後量的な変化は認められなかった(第7図)．そこで，リアルタイムRT-PCR を用いてカルコン合成酵素(*chs-wsr*)及びアントシアニジン合成酵素(*ans-dgr*)遺伝子の光照射による発現消長について検討した．その結果，*chs-wsr*については未照射時点でもわずかに発現が認められたが，*chs-wsr*及び*ans-dgr*はいずれも光照射によりその発現が強く誘導され，24時間後にその発現のピークが認められた後，急激に発現量が低下することが明らかになった(第8図)．

以上の結果から，赤タマネギの鱗茎部におけるアントシアニンの発現は，葉に光が当ることで誘導されることが明らかになった．また，アントシアニン合成の発現そのものはアントシアニン合成系遺伝子の活性化とパラレルな現象として認められることから，遺伝子レベルでも光に反応して発現調節されていること及びこれらの発現調節には同一の調節因子が関与していることが示唆された．

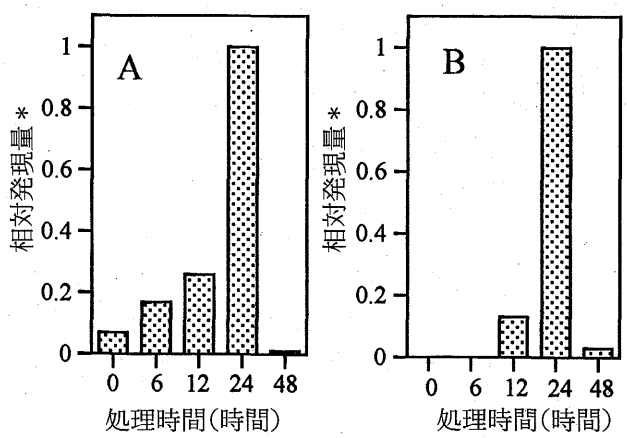
3．MYBタンパク遺伝子の単離と光照射による発現制御

はじめに，アントシアニン合成酵素遺伝子群の発現制御に関連しているMYBタンパク質遺伝子のクローニングを試みた．光曝露24時間後の黄化葉しょう部から得たmRNA を基質とし，MYBタンパク質遺伝子において相同性が高い部位を基に設計したプライマー組合せmyb-F/myb-R(第1表)を用いてRT-PCRを行った．その結果，MYBタンパク質遺伝子と高い相同性を示す5種類の遺伝子断片が得られた．さらにそれらの塩基配列について解析を進めたところ，*myb-wsr221*，*myb-wsr229*及び*myb-wsr37*の3クローンについては，キンギョソウ(*Antirrhinum majus*)においてアントシアニンの発現調節に関与する*myb305*(Sablowskiら 1994)と高い相同性を示し(第9図)，*myb-wsr223*及び*myb-wsr34*の2クローンは，シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)において細胞周期及び赤色光受容体であるフィトクロムと関連するR2R3 mybの*myb92*(Strackeら 2001)と高い相同性を示した(第10図)．

そこで，*myb-wsr229*，*myb-wsr37*，*myb-wsr223*及び*myb-wsr34*の配列の中で高い特異性を示す部位にリバースプライマーを設計し(第1表)，光照射時間の異なるほう芽苗葉しょう部から抽出したmRNAを鋳型にリアルタイムRT-PCRを行った．その結果，*myb-wsr229*，*myb-wsr37*及び*myb-wsr223*については光による発現応答が認められなかったが(データ省略)，*myb-wsr34*の発現は光照射12時間後に最大となり，その後すみやかに減少した(第11図)．

4．メチルジャスモン酸(MeJ)処理とアントシアニン合成の発現誘導

未着色のほう芽葉しょう部に，暗所，密閉容器中でMeJ処理したところ，処理72時間後から葉しょう部にアントシアニンによる合成着色が認められ，7日(168時間)後には，アントシアニンの蓄積が光照射処理条件下での飽和状態である72時間後の蓄積状態と同レベルの蓄積が認められた(第12図)．そこで，MeJ処理によるア



第8図 ‘早生湘南レッド’鱗茎ほう芽苗に対する光照射処理により誘導されるアントシアニン合成系関連遺伝子のリアルタイムPCRによる経時的発現解析

カルコン合成酵素(A)及びアントシアニジン合成酵素(B)遺伝子について，リアルタイムPCRにより，光照射後24時間の発現量を1とした時の相対発現量の経時的変化を示す．

```
myb221     1:----GGACCATGGACTGCTGAAGAAGA-CGTCTATTGATCGATTATGTGC-GGCTTCACG 54
myb229     1:----GGACCTTGGACTGCTGAAGAAGACCGTCTTTTGATCGATTATGTGC-GTCTTCACG 55
myb37      1:----GGACCTTGGACTGCTGAAGAAGACCGTCTTTTGATCGATTATGTGC-GGCTTCACG 55
myb305   101:AAAAGGACCTTGGACTGCTGAAGAAGACCGCCTTTTGATCGATTATGTGCAG-CTTCACG 159
                 ***** ***************** ** ** **************** * *******

myb221    55:GTGAAAGGTCGATGG-ACTCTGTGGCG-AGGCT-CGCAGGATTGAAGAGAAATGGCAAAA 111
myb229    56:GTGGAAGGCCGATGGAACTCTGTGGCGAA-GCT-CGCAGGATTGAAGAGAAATGGCAAAA 113
myb37     56:GTGAAAGGCCGATGGAACTCTGTGGC-AAGGCT-CGCAGGGTTGAAGAGAAATGGCAAAA 113
myb305   160:GTG-AAGGGCGATGGAACTCTGTTGCG-AGGCTCCG-GGGGTTGAAGAGAAATGGGAAAA 216
             *** **** ****** ******* **  * *** **  ** ************** ****

myb221   112:GCTGTAGGTTAAGATGGGTTAATTACTTAAGACCAGACCTCAAGAGAGGACAAATCACTC 171
myb229   114:GCTGTAGGTTAAGATGGGTTAATTACTTAAGACCAGACCTCAAGAGAGGACAAATCACTC 173
myb37.   114:GCTGTAGGTTAAGATGGGTTAATTACTTGAGACCAGACCTCAAGAGAGGACAAATCACTC 173
myb305   217:GCTGCAGGTTAAGATGGGTTAACTACCTAAGACCAGACCTCAAGAGAGGACAAATCACTC 276
             **** ***************** *** * ******************************

myb221   172:CTCATGAAGAAACCATTATCCTTGAGTTACATGCTAAGTGGGGCAACAGGTAATT--A-- 227
myb229   174:CTCATGAAGAAACCATTATCCTTGAGTTGCATGCTAAGTGGGGCAACAGGTAACT--A-- 229
myb37    174:CTCATGAAGAAAAAATTATCCTCGAGTTACATGCTAAGTGGGGAAACAGGTAATT--A-- 229
myb305   277:CTCATGAAGAAACCATTATCCTTGAGTTACATGCTAAGTGGGGCAATAGGT-GGTCCACG 335
             ************  ******** ***** ************** ** ****   *  *

myb221   228:ATT-----TAAGCTTT-----GA-TTG-TTATTCAT--C-TTGTAAT--A-AA--A-T-G 265
myb229   230:ATT-----TAAGTTTT------ATTTGTTTATT--TG-C--GGT--T----------T-G 260
myb37    230:ATT-----TAAGCTTT------ACTTGTTTATT--TG-C---GT--T----------T-G 259
myb305   336:ATTGCACGT-AG-TTTACCGGGA--AG---A-ACA-GACAACGAAATCAAGAACTATTGG 386
             ***     * ** ***      *   *   *       *   *   *          * *

myb221   266:TG----TTTCTTCAA-AATAA-A-TTAGCT--TTTTAA-A-T---G-TAATTC------T 304
myb229   261:-------CT-TT-----A-----------------T---A-------T--TT-------G 271
myb37.   260:T-----TTT-TT-----AT-----TTGGC------T---A-------T--TT-------G 278
myb305   387:CGAACCCAT-TTCAAGAAGAAGACGAAGCTCCAACTAACAGTGCGGAGAAGACAAAGAAC 445
                     * **     *                  *   *

myb221   305:CTTTTCTTCAA-ACGTT-T--TT--TCATCAAG-ATTGAAGTTTA-AACAAT-TGTAGCC 355
myb229   272:C--AT-TT-AA-ATGTTATAATT-AT--T----------------------TGTGTAGCC 301
myb37    279:C--AT-TT-AAGATGTTATAATTGTT--TCCA--A---AA----A-AA-AGTGTGTAGCC 321
myb305   446:CGAATCTTGAAGAGGCAACAATT--TCAGC-AGCA---AAG---ACAA-A-TG-G-AG-- 490
             *   * ** ** * *      **  *                          *  * **

myb221   356:TT--A-CTTGA-ATAAGTATC---TGGAGTC------TT---TTTTTTCC--CTATG--- 394
myb229   302:TT--A-C-TCAAATAAGTAGC--TTT-TG-CCTT---TT-AATTTTTTT----TATG--- 342
myb37    322:TT--A-C-TCAGATAAGTAG---TTTGTGTCTTT---TT-ATTTTTTTTC--CTATG--- 365
myb305   491:TTGCAGC---A-AGAA-CAACAGTT---G-C-TTCAATTCAATCAAAT-CGAC-ATGAAA 538
             **  * *   * * **  *     *   * *      **   *    *      ***

myb221   395:-ATTTAT--T--T-CTGA-T-GATTTTGT---A-A-CTTCA-GGTGGTCAACAATCGCTC 440
myb229   343:-GTTTA-CGTC-TCATAA-T-GATTTT-TAC-A-ACCTT-A-GGTGGTCAACAATTGCTC 392
myb37    366:-GTTTATTGTC-TGAT---T--ATTTTGT---A-ATTTT-A-GGTGGTCAACAATCGCTC 412
myb305   539:AGATCAT-GTCGT--T-ACTAGA---TG-ACGACAACAACATGGTGAT-AAC-A---C-C 584
                 * *   *  *  *   *  *   *     * *     * **** * *** *   * *

myb221   441:GTAGTTTACCGGGAAG-AACAGACA                                    464
myb229   393:GTAGTTTACCGGGAAG----A-AC-                                    411
myb37    413:GTAGTTTACCGGGAAG-AACAGACA                                    436
myb305   585:-----TT--C-AGCAGTAGCAG-TA                                    600
                  **  *  * **    *
```

第9図　'早生湘南レッド' からRT－PCRにより単離した3種類の*myb*様cDNA断片の塩基配列及び既知の*myb305*遺伝子の塩基配列との相同性解析

*myb305*遺伝子はシロイヌナズナ由来のキンギョソウ*myb*タンパク質遺伝子305(*myb305*)相同cDNAの塩基配列を示す(U62743).

ントシアニン合成系酵素群の発現・消長を検討するため，リアルタイムRT-PCRにより，カルコン合成酵素(*chs-wsr*)及びアントシアニジン合成酵素(*ans-wsr*)遺伝子の消長について検討した．その結果，MeJ処理と光照射処理時のアントシアニン合成の発現時期には差があるものの，光を照射したときと同様，いずれの遺伝子とも，処理24時間後にその発現量が最大となり，以後速やかに減少した(第13図).

以上の結果から，少なくとも赤タマネギの葉しょう部においては，MeJ処理によってもアントシアニン及びその合成系関連酵素群の遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった．この場合，光照射と同様，カルコン合成酵素及びアントシアニジン合成酵素等アントシアニン合成系関連遺伝子がいずれも同一パターンで発現してきたことから，これらの遺伝子は同一の調節因子により発現調節を受けていることが示唆された.

```
myb223   1:---------------G-GACC-TTG--GA-CT-GCTGA-AGAAGATGAGAA-A-C-TTGTG 36
myb34    1:---G----G--ATTG-GACC-TTG--GA-CT-GCTGA-AGAAGATGAGAA-A-C-TCGTG 41
MYB92  201:AAAGAAAAGAAAAAGAAACCGTTGTTGATTTAGAT-ACAG-AGAAGAGAAGATCAT-CT- 25
                            *  *** ***  **  * * * * ** *** ***** * * *  *

myb223  37:AACTATGTCCAAAAACATGGCCATAGTGTAGCTGGA-GAGCTCT--TC-C---TAA-G-- 86
myb34   42:AACTATGTCCAAAAACATGGTCATA--GTAGCTGGA-GAGCTCT--TC-C---TAA-G-- 89
MYB92  257:AAC-ATG-GGAAGATC-T---CCTA-TCT--CT-GATGA-CTCTGGTCTCAAGAAAGGTC 30
           *** ***   ** * * *   * **   *  ** ** ** ****  ** *    ** *

myb223. 87:CTTGCTG-GTACCT--T-TAG---A-T-T-TTGTTATAAGC-CTAT-TT----CA-A--G 12
myb34   90:CTTGCTG-GTACCT--T-T-G-TTA-TATCTTGTTAAAAGCTTTAT-TT----AA-A--G 13
MYB92  306:CTTG--GACT-CCTGATGAAGATGAGAAACTTG-T-CAA-C--TATGTTCAAAAACATGG 35
           ****  *  * ***  *   *   *     *** *  ** *  *** **     * *  *

myb223 128:TTTTATTGAGTCT----A-------A-G---C-TTCTC--TCTCTGCAGGTCTTAACAGG 16
myb34  135:TTATATTGAGTCT--A-ACCTTCTCATGTCTCTTTATC--TCTCTTCAGGTCTTAACAGG 18
MYB92  358:TCATAGT-AG-CTGGAGAGC--C-C-T-TC-C-----CAAACTC-GCTGGTCTTAACAGG 40
           *  ** * ** **    *             *     *   ***  * ************

myb223 170:TGTGGGAAGAGTTGTAGGCTAAGATGGACGAACTACTTGAGACCTGACATCAAGAGAGGG 22
myb34  190:TGTGGGAAGAGTTGTAGGCTAAGATGGRCGAACTACTTGAGACCTGACATCAAGAGAGGG 24
MYB92  404:TGTGGGAAGAGTTGCAGGCTAAGATGGACGAACTACTTGAGACCAGACATCAAGAGAGGG 46
           ************** ************ **************** ***************

myb223 230:A-ATTTTTCTCCAGACGAGGAACAAACTATCTTGAACCTTCATGCAGTTCTTGGAAACAA 28
myb34  250:AGA-TTCTCTCCAGACGAGGAACAGACTATCTTGAACCTTCATGCAGTTCTTGGAAACAA 30
MYB92  464:AGA-TTCTCTCCGGACGAGGAACAGACTATCTTGAATCTTCATTCAGTTCTTGGAAACAA 52
           * * ** ***** *********** *********** ****** ****************

myb223 289:---GT--A--ATT---AAT--TTT--C--TGATTTTTATTTTTATTTTTAA-TAG-TCAA 33
myb34  309:---G--------T---AAT--CTT--C--TGA---TTCTTTTGA-TTTT-A-TAG-TCAA 34
MYB92  523:GTGGTCAACGATTGCGAATCAGTTACCAGGGA---------GAACAGATAACGAGATCAA 57
              *        *   ***   **  *   **          *    * *  ** ****

myb223 331:CG---TTTTGTGTTCTTGTAC-TGATTACTTATG-A--TG----ATGATGATGTTATAAG 37
myb34  342:CG--TTTTTGTGTTCTTGTGC-TTCTTGCTTATG-A--TGATT-ATGATGATGTTATAAG 39
MYB92  574:-GAATTTCTG-GAAC-ACT-CAT--TTGAAGAAGAAGCTGATTCA-GATG-GGTT-T--- 62
            *   ** ** *  *   * * *  **    * * *  **    * ****  *** *

myb223 380:GTGGT-CAACGATTGCAAACCATTTACCGGGAAGAACAGAC-                   41
myb34  395:GTGGT-CAACGATTGCAAACCATTTACCGGGAAGAACAGACA                  43
MYB92  622:-TGATCCAATGACT-C--ACC--GT-CC---AAGAAC---CG                  65
            ** * *** ** * *  ***   * **   ******   *
```

第10図‘早生湘南レッド’からRT－PCRにより単離した2種類の*myb*様cDNA断片の塩基配列及び既知の*myb92*遺伝子の塩基配列との相同性解析

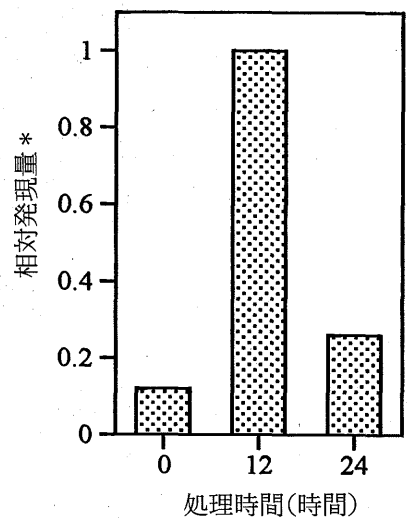
*myb92*遺伝子はシロイヌナズナ由来のmybタンパク質遺伝子9(*myb92*)相同cDNAの塩基配列を示す(AF062916).

また，光照射による遺伝子群の発現からアントシアニン合成の発現までの期間とMeJ処理による遺伝子群の発現からアントシアニン合成の発現までの期間にはタイムラグが認められた．このことから，アントシアニンの合成機構には合成系関連遺伝子の発現調節以外にも制御機構があることが示された．

考　察

赤タマネギが備えるべき商品性としては，一般に鮮やかな濃い赤色で，鱗茎中心部まで同心円上に均一に着色していることが大きな条件となる．今回の研究により，一見みな同じように赤色に見える赤タマネギでも，品種間により単位面積当りに含まれる鱗茎部の色素量が違うこと，あるいは色素構成に差があることが明らかになった．このことは，色素合成の発現には遺伝的な要素が関与しており，通常の栽培管理だけではこれを充分に補えないことを示している．つまり，赤タマネギを育種する場合，他の形質にとらわれて色素に対する選抜をなおざりにすると，最終的には目的の色調を有する系統選抜ができない可能性があるのである．

アントシアニンは，フラボノイド系統の色素であり，A環と呼ばれるベンゾイル系の環状構造及びB環と呼ばれるケイ皮酸系由来の環状構造の2つの環状構造を基本骨格とし，A環の側鎖が酸化することで閉環し，フラボノイド骨格が形成されるとともに，B環がヒドロキシル化されることで赤～青・紫に呈色する(林 1980)．これ

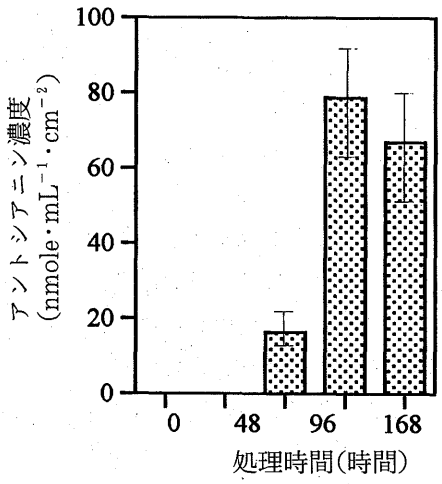


第11図‘早生湘南レッド’からRT－PCRにより単離した*myb－wsr34*の光照射による発現誘導

リアルタイムPCRにより光照射後24時間の発現量を1とした時の相対発現量の経時的変化を示す.

らの色素は，同じフラボノイド系色素同士で直接，あるいは金属イオン等を介して複合体を形成し，いわゆるコピグメンテーションやメタルコンプレックスと呼ばれる特異的な立体構造をとることによって，色調が大きく変化，調節されていることが知られている(安田ら1973，Kondoら 1991，Tanakaら 1998)．さらに，アントシアニンは細胞内の液胞に局在するので，その液胞に含まれるその他の無機イオン等の違いによっても色調が変化することが知られている(Kondoら 1988)．これは，色の発現にはアントシアニン色素の合成だけでなく，色素の存在する液胞の生理状態にも深く関係しており，色の濃い系統で交配を続けても，その後代に希望する色の濃い系統が必ずしも生じてくるとは限らないことを意味している．したがって，色調に着目して育種に取り組む場合には，単純な色素構成からの組合せ交配だけでは目的とする色調の個体を得ることができないケースも頻繁に起きる可能性があるので，実際の選抜に際しては，各世代ごとに色調確認をする必要がある．赤タマネギの場合，今回の結果から，赤タマネギにおいては幼苗におけるCy3-MGの含有割合が成熟した鱗茎部の色調と対応しているので，幼苗を調べることにより，鱗茎の色調を推測することが可能であることが明らかになった．これは幼苗段階でのアントシアニンのHPLC分析により，優良個体選抜が可能なことを示しており，今後の赤タマネギ育種への応用が期待できる．

本研究において，赤タマネギにおけるアントシアニン合成の発現誘導因子として光が極めて有効であることが明らかになった．同様の現象は花弁における色素発現でもすでに認められているが(安田ら 1973，van Houelingenら 1998)，シロイヌナズナでは，青色光及び紫外線が色素発現に有効である(Fuglevandら 1996)とともに，青色光受容体CRYの本体が解明されるなど(Ahmad and Cashmore 1993)分子レベルでも極めて多くの解析がなされている(Jacsonら 1995，Molら 1998，Taylor and Brigge 1990)．今回の赤タマネギにおけるアントシアニン合成の光による発現誘導解析の結果，その鱗茎部あるいは葉しょう部におけるアントシアニンの発現誘導には，その組織への直接的な光照射のみならず，その上葉への光刺激も極めて有効であることが明らかになった．これは新しい知見であるとともに，光刺激がどのように植物体全体に伝達されていくかというシグナル伝達機構を明らかにする上でも非常に興味深い結果でもる．今回得られた結果から，少なくとも上葉の光受容体に光が当ることにより何らかのシグナル伝達物質が生成され，これが通導組織を介して他の組織に伝達されるか，あるいは葉自体の細胞が光ファイバーのような働きをし，結果として光粒子がアントシアニン合成を発現する組織の光受容体に届くことでアントシアニンの発現誘導が引き起こされるという可能性も考えられる．いずれにしても，赤タマネギのアントシアニン合成の発現誘導には光照射



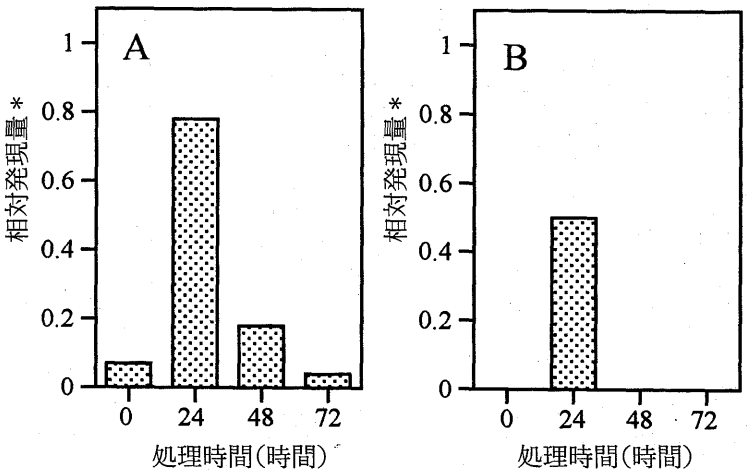
第12図‘早生湘南レッド’ほう芽苗に対するメチルジャスモン酸処理によるアントシアニン発現量の経時的変化

図の縦軸は，鱗茎部表皮組織に含まれるアントシアニン濃度(nmole・mL^{-1}・cm^{-2})で，バーは標準偏差を示す.

が極めて有効であることから，いわゆる「色のりの悪さ」あるいは「色むら」といった現象が，遺伝的背景のみならず，光環境にも強く影響されることがわかった．このことから，少なくとも栽培時あるいは収穫調製時における光環境を整えることによって，安定してアントシアニンを発現させることができるものと考えらる．今後，これらのメカニズムがさらに詳細に明らかになれば，鱗茎収穫後の乾燥方法等，生産現場にも応用できる技術開発にもつなげることができるものと期待される．

MYBタンパク質は，癌遺伝子産物として同定されたヘリックス－ターン－ヘリックス型のDNA結合ドメインを持つ転写調節因子として発見され，その後，類似した構造をもつDNA結合タンパク質が植物にも多数存在することが明らかとなった(飯 1995，Paz-Aresら 1987)．Mybタンパク質は，転写活性化因子として働き，まず転写開始点の上流にあるプロモータ領域に結合し，その後他の転写因子群及びRNAポリメラーゼが複合的に結合することにより転写を開始させる機能を有する（石井 1996)．Mybタンパク質は動物では少数の種類しか存在しないのに対し(Williams and Grotewold 1997)，植物においては各種プロモータ領域に高頻度でその結合領域が存在するなど，多様な生命現象に複数のMYB様タンパク質が関与していることが明らかになっている．とくに，アントシアニンの生合成酵素のうち，CHSやDFR等のキーエンザイムについては，トウモロコシ(*Zea mays*)，ペチュニア(*Petunia hybrida*)，キンギョソウ等において，1つの遺伝子座にしか変異がないのに，生合成経路上の複数の酵素の活性が同時に低下してくる変異株の解析から，これらの酵素の制御遺伝子の同定が進められた．その結果，*myb*遺伝子のホモローグとして，トウモロコシ，ペチュニア及びキンギョソウからそれぞれ*c1*，*myb305*と*myb340*及び*myb.ph3*遺伝子が，また，最近ではアカジソ(*Perilla frutescens*)からも*myb-p1*が単離された(Paz-Aresら 1987，Coneら 1993，Jacksonら1991，Solanoら 1995，Gongら1999，Moyanoら1996，Nodaら1994，Quattrocchioら 1998，Sablowskiら 1994，1995，Sainzら 1997)．植物ゲノム中には，*myb*様遺伝子が多数存在しており，それぞれが遺伝子ファミリーを形成している(Grotewoldら 1991，Oppenheimerら 1991)．これは，異なる組織で生合成酵素遺伝子の発現を制御しているためと考えられ，実際に*c1*はトウモロコシ穀粒のデンプン層と胚における*chs*及び*dfr*遺伝子等の，また，ペチュニアの花弁における特異的な転写を制御していることが報告されている(Paz-Aresら 1987，Grotewoldら 1994，Solanoら1995)．

これまでに，アントシアニン合成の発現誘導は光により遺伝子レベルで制御されていることが他の材料を用いた研究ですでに報告されている(Tunenら 1988，Gongら 1999，Procissiら 1997)．今回，赤タマネギにおいても複数のアントシアニン合成系関連酵素遺伝子群が光により発現してくることが明らかとなり，赤タマネギでも他の植物と同じアントシアニン合成の発現メカニズムが機能していることが明らかになった．また，光応答性



第13図‘早生湘南レッド’ほう芽苗に対するメチルジャスモン酸処理により誘導されるアントシアニン合成系関連遺伝子のリアルタイムPCRによる経時的発現解析

カルコン合成酵素(A)及びアントシアニジン合成酵素(B)遺伝子について，リアルタイムPCRによりメチルジャスモン酸処理後24時間の発現量を1とした時の相対発現量の経時的変化を示す．

の制御因子であるMYBタンパク質をコードする複数のcDNA断片を単離することができ，かつ上記のアントシアニン生合成酵素遺伝子群が単離した*myb*様遺伝子と同調的に発現していることが明らかになったことから，いずれの遺伝子とも*myb*様遺伝子の発現制御下にあることが示唆された．今回は，サンプリング開始時期が遅かったため，*myb*様遺伝子の発現状況を正確に判断できなかったが，より早い時期の発現パターンについて検討することにより，*myb*様遺伝子のアントシアニン合成系関連遺伝子の詳細な発現制御機構を明らかにできるものと思われる．現段階では，今回単離した*myb*様遺伝子がアントシアニン生合成酵素の発現調節に関与していることを示す直接的なデータは得られていないが，今回単離した*myb*様遺伝子cDNA断片を用いたリアルタイムRT-PCR解析により，*myb*様遺伝子はアントシアニン合成系関連遺伝子であるカルコン合成酵素(*chs-wsr*)及びアントシアニジン合成酵素(*ans-wsr*)遺伝子等の発現と同じ発現消長を示した．したがって，アントシアニン色素生合成関連酵素遺伝子群はMYB関連タンパクにより発現制御を受けている可能性が極めて高いものと考えられる．今後，ツーハイブリッドシステム(Chienら 1991)等を用いて，直接的な結合タンパクのスクリーニングを行い，今回単離した*myb*様遺伝子群がアントシアニン合成酵素群のプロモータ領域と結合するMYB様タンパクとして機能することなどを明らかにするための遺伝子発現解析が必要となろう．このアントシアニン合成酵素群を制御するMYBタンパクが同定できれば，その発現条件を制御することによって，トランス因子の同定，ひいては成長調節剤の開発へと実用的な展開が期待されるところである．

植物が傷害を受けると，生体内の伝達物質としてMeJが誘導され，その結果多くの生体防御反応に関わる遺伝子が発現してくる(Suzukiら 1996，Koda 1992，Xuら 1994)．フラボノイド系物質は，このような生体防御に関わる主要物質の1つであり，アントシアニンそのものもフラボノイド系物質として生体防御にも強く関与している(Suzukiら 1996，Holton and Crnish 1995，Tsao and Zhou 2000)．今回，赤タマネギにおけるアントシアニン合成誘導物質として，光以外にもMeJが効果があることを示した．このような例はトウヒ(*Picea glauca*)やダイズ(*Glycine max*)においても報告されている(Franceschi and Grimes 1991，Richardら 2000)．赤タマネギの鱗茎は生殖器官ではなく栄養器官であるため，アントシアニン合成を発現するという生理機能は，花弁の色素発現のように昆虫を誘引するためにあるのではなく，紫外線等の物理的傷害から自身を防御するための生理機能として存在すると考える方が自然であろう．

これまで，アントシアニン色素合成は，色素本体であるアントシアニジン骨格ができる初期合成系に引き続いて，糖あるいは有機酸による修飾が行われる後期合成系の二つが存在するとともに，初期合成系と後期合成系とは別の制御機構により制御を受けていることが報告されている(Fujiwaraら 1998)．今回，アントシアニン合成の発現誘導物質として，光のみならずメチルジャスモン酸(MeJ)も同様な発現誘導機能を有することを示した．ジャスモン酸は，不飽和脂肪酸であるリノレイン酸からリポキシゲナーゼによりオクタデカノイド経路を介して合成され，傷害応答のシグナル伝達の誘導因子として知られている(瀬尾ら 1999)．ジャスモン酸とその類縁化合物は植物一般に広く存在することと，その多様な生理機能から(Perezら 1993，Sembdner and Parthier 1993)，植物ホルモンの一種として認識されるようになってきている(Saniewskiら 1987)．また，このようなことから，防腐剤等，生理機能物質として利用できるか検討が進められている(Tsao and Zhou 2000)．したがって，本研究において，未着色のほう芽苗に対する光照射では発現誘導3日後にはすでにアントシアニン合成量が飽和状態に達するのに対し，MeJ処理ではそれが7日後と遅くなった．一方，遺伝子レベルでは，*chs-wsr*及び*ans-wsr*いずれも，光照射及びMeJ誘導のどちらでも処理後24時間でその発現は最大となり，それ以降はすみやかに低下した．このアントシアニン合成とその合成に関与する遺伝子群の発現誘導においてタイムラグが存在することは，上記のアントシアニン合成における後期合成系の発現レベル，発現パターンあるいは基質の量に差がある可能性を示唆している．いずれにしても，このタイムラグがアントシアニン合成の品種間差に起因するなら，アントシアニジン合成まではすでに完了していることから，表現型としてはアントシアニン色素構成の差として現れるはずである．しかし，実際には両者の間の色素構成には差が認められないことから，この仮説では色素合成とそれに関与する遺伝子発現のタイムラグについて説明できない．一方，このタイムラグがアントシアニン合成に関わる基質の量的な差により生ずるなら，光とMeJとで発現が誘導された時点でのアントシアニン後期合成系に必要な基質の量に差が存在するはずである．実際に観察されるアントシアニンの発現パターンを考慮すると，後者の仮説の方がより今回の結果を説明できる．いずれ

にしても，今回の結果から，アントシアニン合成には，アントシアニン合成酵素遺伝子レベルでの制御のみならず，後期合成系に関わる基質合成レベルでの制御も関与している可能性が高く，かつこれらの制御系は互いに独立して機能している可能性が示唆される．

今回の研究ではMeJの処理濃度は一定であったが，MeJの処理濃度を変えることによって光によるアントシアニン発現のタイムラグが埋まるのか非常に興味深いところである．また，今回はMeJ処理によって光照射で誘導されるMYBがアントシアニン合成の発現誘導をできるのか，あるいは実際に「色むら」あるいは「色のり」の悪い鱗茎にMeJ処理することによってアントシアニン合成発現が促進されるのか等については検討していない．今後，MeJ処理を実用化する上では，赤タマネギにおけるアントシアニン合成の発現誘導との関係をより明確化する必要がある．

今回，アントシアニン合成系関連遺伝子群及びそれらの発現調節に関与する*myb*様cDNAの発現解析をリアルタイムRT-PCRにより検討した結果，リアルタイムRT-PCRは特定遺伝子の発現解析には極めて有効な手法であることを明らかにした．一般に，ノーザン解析では1サンプル当り30μgもの全RNA を用いて検出までに数日間かかるのに対し，リアルタイムRT-PCRではサンプルがmRNAとはいえ，1サンプル当り50～100ngあれば十分で，mRNAの調製が済んでいれば，その日のうちに結果を出すことができる．シグナルの検出については，ノーザン解析ではある一定以上の大きさの遺伝子断片をプローブとし，これと結合するmRNA を検出するため，マルチジーンファミリーを構成する遺伝子等，その塩基配列が類似したmRNAについても検出してしまう可能性が常に付きまとう．一方，リアルタイムRT-PCRでは，対象とするクローン特異的な領域にプライマーを設計すれば，類似遺伝子が検出されることはまずない．したがって，リアルタイムRT-PCRは，特定のmRNAの発現量，すなわち目的遺伝子の発現状況を把握するためには非常に有効な手段となるのである．しかしながら，ノーザン解析では材料にかかわらずプローブとして使用する目的遺伝子のクローンがあれば解析できるのに対し，リアルタイムRT-PCRでは，使用する目的遺伝子のクローンとその塩基配列が明らかにされていないとPCR段階での増幅遺伝子断片は得られない．ジヒドロフラボノール4－レダクターゼ(DFR)遺伝子及び今回単離した*myb-wsr221*についてもリアルタイムRT-PCRによる発現解析を試みたが，特異的プライマーの設計ができず解析はできなかった．このようにリアルタイムRT-PCRを行うに当っては，特異性の高いプライマーをいかに設計するかが極めて重要であることが改めて明らかになった．

今回データには示さなかったが，発現誘導を示す光の波長域についても現在検討している．一般にはアントシアニン合成の光照射による発現誘導は，植物体が紫外線あるいは青色光により外的な刺激を受け，これにより各光受容体から何らかのシグナル伝達物質が放出され，これに反応した細胞がアントシアニン合成を開始するというシグナル伝達経路が想定されている(蓮沼ら 1999)．赤タマネギに関して，アントシアニン合成を誘導する光波長域を同定できれば，栽培時に起こる「色のりの悪さ」あるいは「色むら」の原因の一端が明らかになるものと期待される．

本研究では，外葉を除いた幼苗及び暗所でほう芽した黄化葉しょう部を使い分けしたが，成熟過程における鱗茎部の着色に関する研究であれば幼苗を用いるのが適している．しかしながら，幼苗を生育させるためには光の存在は不可欠であることから，本研究では光に対する詳細なデータを得るためには黄化葉しょう部を使わざるをえなかった．今後，アントシアニン誘導波長域をカットした条件で育成し，アントシアニン合成が発現していない鱗茎を作成するとともに，これを材料にして，光，MeJあるいは他の外的刺激を処理することにより，アントシアニン合成の発現誘導過程を明らかにすることが可能となろう．

今回は赤タマネギを材料にしてアントシアニン合成の発現に関する研究を進めたが，これらの結果は赤タマネギのみならず花きを含む園芸作物全体にも応用可能である．実際，カーネーション(*Dianthus caryophyllus*)やトレニア(*Trenia fournieri*)では遺伝子組換えによりこれまでにない花色をもった組換え体が作出され，新規な商品として市場に流通するようになっている(Aidaら2000)．赤タマネギは生鮮野菜であることから，現在の社会状況下では遺伝子組換えによる実用的な新品種の作出は難しい状況にある．しかし，今回得られた知見は花き等の鑑賞作物に遺伝子組換え技術を適用する際に新しい情報となり，また，これまでの交雑を中心とした従来の育種では制御・対処できなかった色調の変異の問題も考慮できる手段の助けとして新品種の作出に応用され，これらの領域がさらに進むものと期待される．

引用文献

Aida,R., K.Yoshida, T.Kondo, S.Kishimoto and M.Shibata.2000. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisence dihydroflavonol 4-reductase gene. Plant Sci. 160:49-56.

Ahmad,M. and A.R.Cashmore. 1993. HY4 genes of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. NATURE. 366:162-166.

Brandwein, B.J. 1965. The pigmentation in three cultivars of the common onion (*Allium cepa*). J.Food.Sci. 40:101-1102.

Chien,C., P.L.Bartel, R.Sternglanz and S.Fields. 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 88:9578-9582.

Chirgwin,J.M., A.E.Przybyla, R.J.Macdonald and W.J.Rutter. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 18:5294-5299.

Cone,K., S.M.Cocciolone, F.A.Burr and B.Burr.1993. Maize anthocyanin regulatory gene pl is a duplicate of c1 that functions in the plant. Plant Cell 5:1795-1805.

Du,C.T., P.L.Wang and F.J.Francis. 1974. Cyanidin 3-laminariobioside in spanish red onion (*Allium cepa* L.) J.Food.Sci. 39:1265-1266.

Foosen,T., O.M.Andersen, D.O.Ovstedal, A.T.Pedersen and A.Raknes. 1996. Characteristic anthocyanin pattern from onions and other *Allium* spp. J.Food Sci. 61:703-706.

Franceschi,V.R. and H.D.Grimes. 1991. Introduction of soybean vegetative storange proteins and anthocyanins by low-level atomosheric metyl jasmonate. Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 88:6745-6749

Fuglevand,G., J.A.Jackson and G.I.Jenkins. 1996. UV-A, UV-B, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. Plant Cell 8:2347-2357

Fujiwara,H., Y.Tanaka, K.Y.Sakakibara, M.F.Mizutani, M.Nakao, Y.Fukui, M.Yamaguchi, T.Ashikari and T.Kusumi. 1998. cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5- aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. Plant J. 4:412-424.

Fuleki,T. 1971. Anthocyanins in red onion, *Allium cepa*. J.Food.Sci. 36:101-104.

Gong,Z.Z., M.Yamazaki and K.Saito. 1999.A light-inducible *myb*-like gene that is specifically expressed in red *Perilla frutescens* and presumably acts as a determining factor of the anthocyanin forma. Mol.Gen.Gent. 262:65-72

Grotewold,E., P.Athma and T.Peterson. 1991. Alternative spliced products of the maize P gene encode proteins with homology to the DNA biding domain of MYB-like transcription factors. Proc.Natl.Acad. Sci.USA 88:4587-4591.

Grotewold,E., B.J.Drummond, B.Bowen and T.Preston. 1994. The myb-homologous p gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthesis gene subset. Cell 76:543-553.

蓮沼仰嗣・木村成道・徳永史生. 1999. 光トランスダクション. p10-29. シュプリンガー・フェアラーク東京. 東京. 林孝三. 1980. 植物色素. p.1-267. 養賢堂. 東京

Holton,T.A. and E.D.Crnish. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. Plant Cell. 17:1071-1083.

石井俊輔. 1996.Mybの構造と制御. 蛋白質・核酸・酵素. 41:1320-1327.

Jackson,D., F.Culianez-Macia, A.G.Prescott, K.Roberts and C.Martin. 1991. Expression patterns of MYB genes from *Antirrhinum* flowers. Plant Cell 3:115-125.

Jackson,J.A., G.Fuglevand, B.A.Brown, M.J.Shaw and G.I.Jenkins. 1995. Isolation of Arabidopsis mutants altered in the light-regulation of chalcone synthase gene expression using a transgenic screening approach. Plant J. 8:369-380.

北宜裕・柳下良美・大矢武志・道券秀雄・河田隆弘・上西愛子・野村研. 2002. RT-PCRによる植物有用遺伝子のcDNAクローニングと育種への応用. 神奈川農総研報142:37-48

Koda,Y. 1992. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. Intl.Rev.Cytol. 135:155-199.

Kondo,T., K.Yoshida, M.Yoshikane and T.Goto. 1991. Mechanism for color development in purple flower of *Commumelina communis*. Agric.biol.chem. 55:2919-2921.

Kondo,T., M.Yoshikane and T.Goto. 1988. Abstracts of papers,16th Internatinal Symposium on the Chemistry of Natural Products, Kyoto, Japan. p.142.

Mol,J., E.Growtewold and R.Koes. 1998. How genes paint flowers and seeds. 6:212-217.

Moore,A.B., F.J.Francis and M.E.Jason. 1982. Acylated anthocyanins in red onions. J.Food Protection 45:590-593.

Moyano,E., J.F.Mart'nez-Garcia and C.Martin.1996. Apparent redundancy in myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in Antirrhinum flowers. Plant Cell 5: 1519-1532.

Noda,K., B.J.Glover, P.Linstead and C.Martin. 1994. Flower color intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. Nature 369:661-664.

Oppenheimer,D.G., P.L.Herman, S.Suvakumaran, J.Esch and M.D.Marks. 1991. A myb gene required for leaf

trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules. Cell 67:438-493.

飯哲夫. 1995. 転写を制御する因子. 長田敏行・内宮博文編. 植物の遺伝子発現. 講談社サイエンティフィク. p.11-25.東京.

Paz-Ares,J., D.Ghosal, U.Wienand, P.A.Peterson and H.Saedler. 1987. The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. EMBO J. 6:3553-3558.

Perez,A.G., C.Sanz, D.G.Richardson and J.M.Olias. 1993. Methyl jasmonate vapor promotes β-carotene synthesis and chlorophyl degradation in Golden Delicious apple peel. J.Plant Growth Regulat. 12:163- 167.

Procissi,A., S.Dolfini,A. and C.Tonelli. 1997. Light-dependent spatial and temporal expression of pigment regulatory genes in developing maize seeds. Plant Cell 9:1547-1557.

Quattrocchio,F., J.F.Wing, K.van der Woude, J.N.Mol and R.Koes. 1998. Analysis of bHLH and MYB-domain proteins:species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin promoters. Plant J. 13:475-488.

Richard,S., G.Lapointe, R.G.Rutledge and A.Seguin. 2000. Induction of chalcone synthase expression in white spruce by wounding and jasmonate. Plant Cell Physiol. 41:982-987

Sablowski,R.W.M., E.Moyano, F.A.Culianez-Macia, W.Schuch, C.Martin and M.Bevan. 1994. A flower- specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. EMBO J. 13:128-137.

Sablowski,R.W.M., D.C.Baulcomb and M.Bevan. 1995. Expression of a flower-specific Myb protein in leaf cells using a viral vector causes ectopic activation of a target promoter. Pro.Natl.Acad.Sci.USA 92:6901-6905.

Saniewski,M., H.Urbanec and J.Czapski. 1987. Effect of methyl jasmonate on ethylene production, chlorophyll degradation, and polygalacturonase activity in tomatoes. J.Plant Physiol. 127:177-181.

Sainz,M.B., E.Grotewold and V.L.Chandler. 1997. Evidence for direct activation of an anthocyanin promoter by the maize C1 protein and comparison of DNA binding by related Myb domain proteins. Plant Cell 9:611-625.

Sambrook,J., E.F.Fitsch, and T.Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Habor, NY. Cold Spring Habor Press.

Sembdner,G. and B.Parthier. 1993. The biochemistry and the physiology and molecular actions of jasmonates. Ann.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol. 44:569-589.

瀬尾茂美・伊藤直子・大橋祐子. 1999. 傷害応答におけるシグナル伝達. 蛋白質核酸酵素44:2347-2352.

Solano,R., C.Nieto, J.Avila, L.Canas, I.Diaz and J.Paz-Ares. 1995. Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor(MYB.Ph3) from *Petunia hydrida*. EMBO J. 14:1773-1784.

Stracke,R., M.Werber and B.Weisshaar. 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. Curr.Opin. Plant Biol. 4:447-456.

Suzuki,G., H.Ohta, T.Kato, T.Igarashi, F.Sakai, D.Shibata, A.Takano, T.Masuda, Y.Shioi and K.Takamiya. 1996. Introduction of novel cytochrome P450(CYP93 family) by methyl jasmonate in soybean suspension-cultured cells. FEBS Letters. 383:83-86.

Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T. 1998. Metabolic engineering to modify flower color. Plant Cell Physiol. 39:1119-1126.

Taylor,LP. and W.R.Briggs. 1990. Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings. Plant Cell 2:115-127.

寺原典彦・山口雅篤. 1984. 赤タマネギのアントシアニン. 南九州大学園芸学部研究報告 15:59-64

Terahara,N., M.Yamaguchi and T.Honda. 1994. Malonylated anthocyanins from bulbs of red onion, *Allium cepa* L. Bio.Biotech.Biochem. 58:1324-1325.

Tunen, van A.J., R.E.Koes, C.E.Spelt, A.R.van der Krol, A.R.Stuitje and J.M.N.Mol. 1988. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light regulated and differential expression of flavonoid genes. EMBO J. 7:1257-1263.

安田齋. 1973. 花色の生理・生化学. p60-218. 内田老鶴圃. 東京.

van Houelingen,A., E.Souer, K.Spelt, D.Kloos, J.Mol and R.Koes. 1998. Analysis of flower pigmentation mutants generated by random transposon mutagenesis in *Petunia hybrida*. Plant J. 13:39-50.

Williams,C.E. and Grotewold,E. 1997. Differences between plant and animal Myb domains are fundamental for DNA binding activity and chimeric Myb domains have novel DNA-binding specificities. J.Biol.Chem. 272:563-571.

Xu,Y., P.F.L.Chang, D.Liu, M.L.Narasimhan, K.G.Raghothama, P.M.Hasegawa and R.A.Bressan.1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate.Plant Cell 6:1077-1085

Tsao,R. and T.Zhou.2000. Interaction of monoterpenoids, methy Jasmonate, and Ca^{2+} in controlling postharvest Brown Rot of Sweet Cherry.Hort Science 35:1304-1307