

1. はじめに

被子植物の花は色や形に関してバリエーションに富んでおり、しばしば我々を魅了する。特にバラやカーネーションといった植物の花弁はアントシアニン色素に由来する赤色や紫色を呈するものが多く、様々な園芸品種が作出されている。また、花弁は一部が周りとは異なった色になって独特の模様を示す場合があり、その色の違いをもたらす遺伝的機構の 1 つとしてトランスポゾンと呼ばれる DNA 配列の移動が知られている。本稿では、花の「絞り模様」(図 1)に関与するトランスポゾンに着目し、カーネーションなどの花でアントシアニン生合成を担う酵素の遺伝子に挿入されたトランスポゾンを PCR&電気泳動によって確認する実験を行った結果について記す。



図 1 絞り模様の椿

2. アントシアニンについて

(1) アントシアニンとは

一般に色素は特定の波長の光を吸収し、それらの波長の光を除いた反射光が色を構成する。植物の色素は主にフラボノイド、カロテノイド、ベタレイン、クロロフィルの 4 グループに分類され、例えばトマトの赤色や人参の橙色はカロテノイドに、葉の緑色はクロロフィルに起因する。アントシアニンが属するフラボノイドはフラバン(図 2)を基本骨格に持つ植物由来のフェノール性化合物のグループであり、紫外線をよく吸収し太陽光に含まれる紫外線から植物細胞の DNA を保護することで植物の陸上化に寄与していると考えられている。さらにフラボノイドは抗酸化作用や他の生物に影響を及ぼすアレロパシー活性などの効果を有することが知られており、多くの植物にとって重要な二次代謝産物となっている。フラボノイドにはお茶の苦味成分であるカテキンも含まれるが、フラボノイドのうちのアントシアニンに糖鎖が結合した配糖体をアントシアニンと呼び、植物細胞内で赤色や紫色や青色を示す水溶性の色素として液胞内に貯蔵されている。

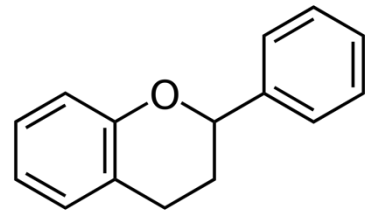


図 2 フラボノイドの基本骨格であるフラバン
[出典 1]

(2) アントシアニンの生合成系・発色

アントシアニン生合成経路の一部を図3と図4に示す。アミノ酸の一種であるフェニルアラニンは、黄色色素のカルコン(テトラヒドロキシカルコン)を経て3種類のジヒドロフラボノールに変換され、そのそれぞれからアントシアニジンが合成される。アントシアニジンにメチル基や糖やアミノ酸が結合するとアントシアニンと呼ばれる。

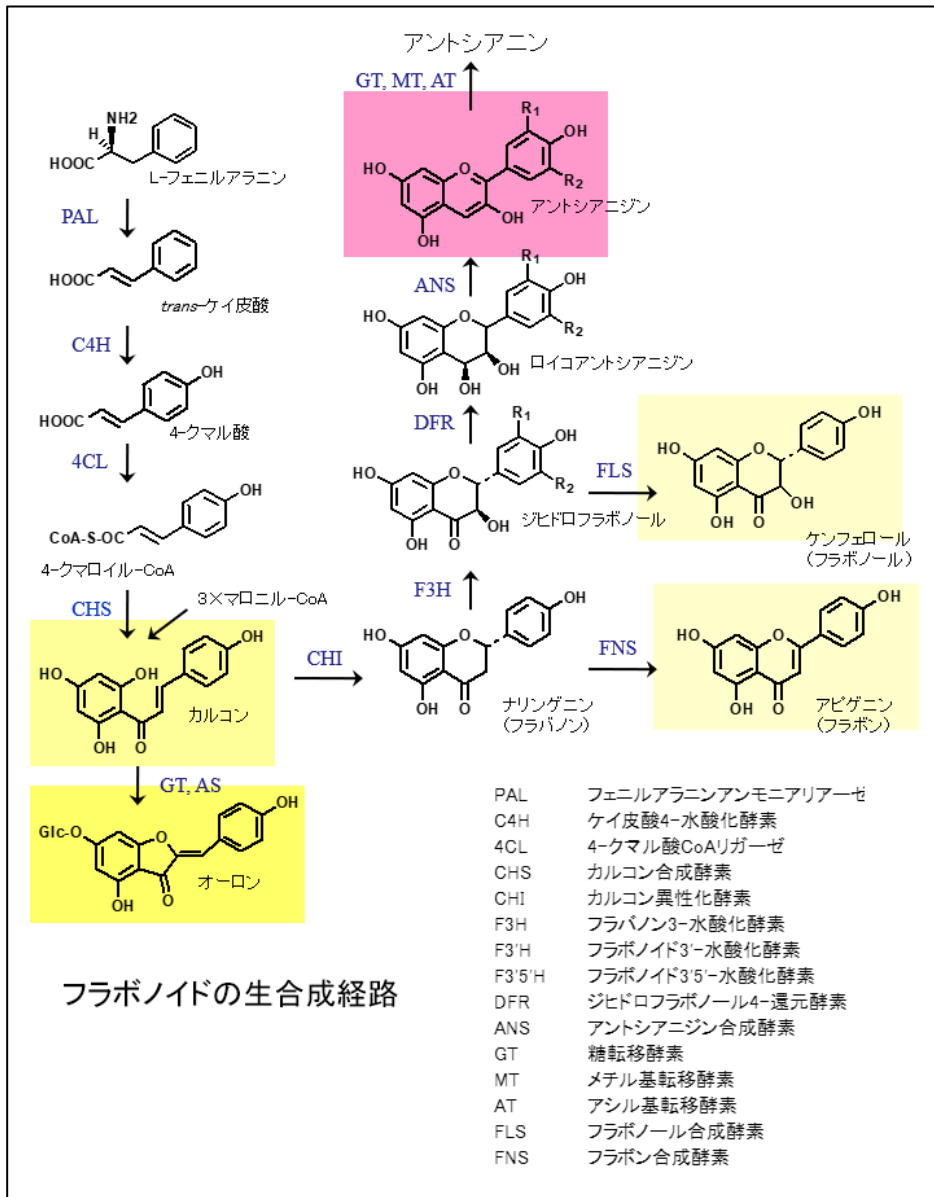


図3 フェニルアラニンからアントシアニンまでの生合成経路[出典2より抜粋]

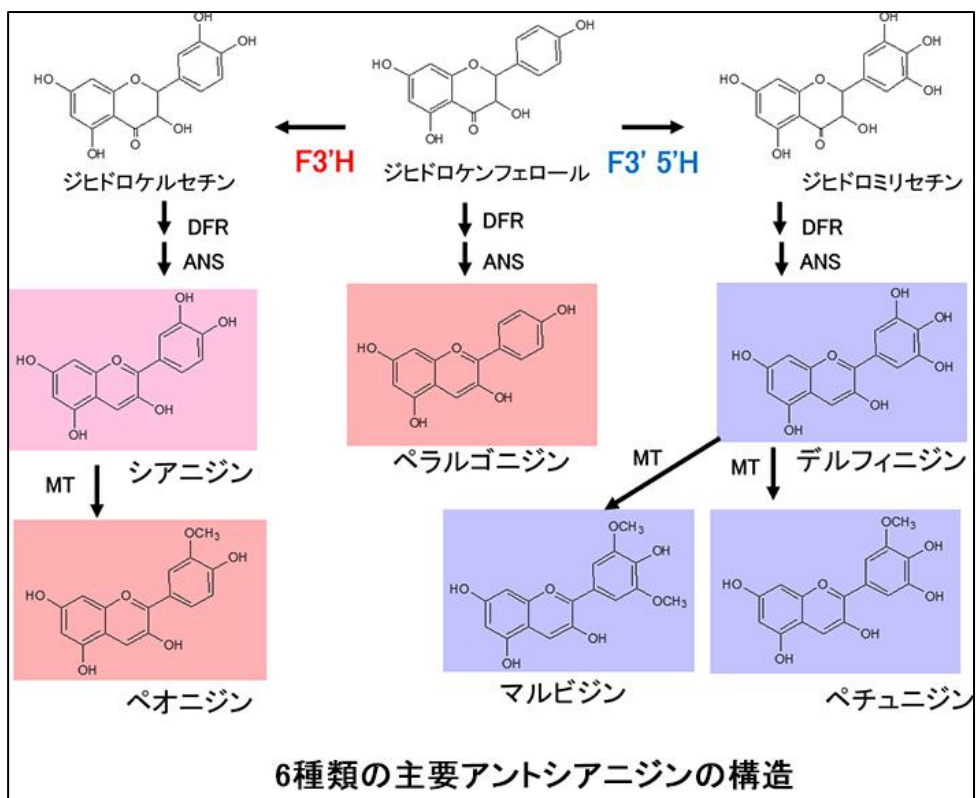


図 4 ジヒドロケンフェノールから各種アントシアニンまでの生合成経路。ジヒドロケンフェノールはナリンゲニンから合成される(図 3 のジヒドロフラボノールに該当)。アントシアニジンの中央の環を構成する O 原子はオキソニウムイオンで正に帯電している。酵素名は図 3 を参照。[出典 2 より抜粋]

アントシアニンの発色はアントシアニン部分の構造に大きく影響されるため、アントシアニンの発色から紹介していく。炭素同士の単結合と二重結合が交互に連なった「共役二重結合」という構造がアントシアニンの呈色の基本的な要因となっており、共役二重結合が長く連なるほど吸収する光の波長が紫外線領域から長波長

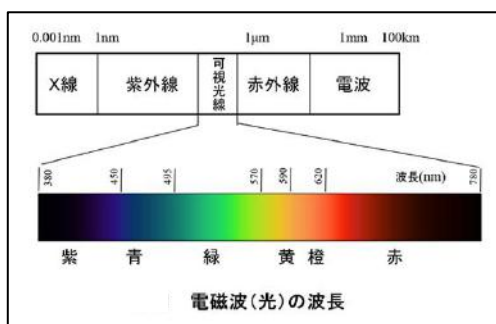


図 5 光の波長と色の関係
[出典 3 より抜粋]

側にシフトする(図 5)。また-OH 基が多いほど青みが増す傾向にあり、ペラルゴニジンは橙赤色、シアニジンは赤紫色、デルフィニジンは

青紫色を呈する。アントシアニンの発色はこの他、pH や金属イオンや分子の会合状態によって変化する。紫キャベツの色素(シアニジン由来)の色が pH によって変化することはよく知られているだろう。

バラやカーネーションに含まれるアントシアニジンとしてはペラルゴニジンとシアニジンが知られている。これらの植物は青系の色を示すデルフィニジンの合成に必要なフラボノイド 3'5'-水酸化酵素(F3'5'H、図 4 参照)を持たないため、花で青色を表現することができない。そのような理由で“blue rose”は英語圏で不可能の象徴とされてきたが、近年は F3'5'H の遺伝子を導入することで青いバラやカーネーションの作出が可能になっている。

3. トランスポゾンについて

(1) トランスポゾンとは

生物を構成するための遺伝情報は細胞内の DNA 分子に塩基配列として保存されている。このように全ての遺伝情報をコードした DNA 全体をゲノム DNA と呼ぶ(ここでは核内 DNA に限定する)。DNA の塩基配列は同一個体の細胞間では生殖細胞を除き基本的に一定であるが、驚くべきことに一部の DNA 領域はゲノム DNA 上の位置を変えることが知られている。こうした DNA 領域を転移因子(広義のトランスポゾン)という。

転移因子は主に 2 種類に分けることができる。1 つは DNA トランスポゾン(狭義のトランスポゾン)と呼ばれ、トランスポザーゼという酵素の働きによって切り取られゲノム DNA の他の部位に挿入される。すなわち「カット&ペースト」の様式でゲノム DNA 上での位置を変える。もう 1 つはレトロトランスポゾンと呼ばれ、自身にコードされた逆転写酵素の働きによって、自身から転写された RNA 鎖から DNA 鎖(cDNA)が逆転写され、この DNA 鎖がゲノム DNA の他の部位に挿入される。つまり「コピー&ペースト」の様式でコピーを増やしていく DNA 領域である。転移因子やそれに関連する反復配列はヒトゲノム DNA の中でも大部分を占めている(図 6)。

これ以降、「トランスポゾン」は DNA トランスポゾンを指すものとする。

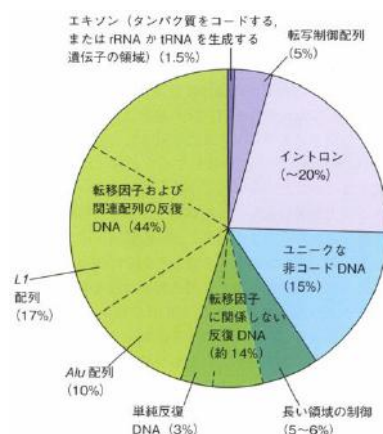


図 6 ヒトゲノム DNA の構成[出典 4]

(2) トランスポゾンと花色の関係

トランスポゾンは前述の通りゲノム DNA 上の位置を変えて移動するが、その移動先が遺伝子となればトランスポゾンの挿入によって遺伝子が破壊されて機能しなくなってしまう。逆にトランスポゾンが挿入されている遺伝子からトランスポゾンが抜けると遺伝子の機能が復活する。

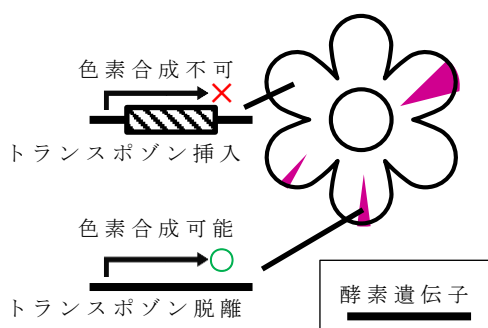


図 7 トランスポゾン挿入の有無と色素合成や花卉の発色の関係

いくつかの花の模様はトランスポゾンの転移によって形成されることが知られている。例えばアサガオやカーネーションのある品種では、特定のアントシアニン色素の合成に必要な酵素遺伝子にトランスポゾンが挿入されておりその色素が合成できない。しかし、花卉の細胞が細胞分裂を繰り返す中で、トランスポゾンが酵素遺伝子から脱離し色素を合成できるようになった細胞が出現し分裂することで、周りとは異なる色を持った部分が花卉に顕現する(図 7)。結果として「扇状模様」や「絞り模様」と呼ばれる複色の模様が形成される。

4. 本実験計画について

この章では本実験に至った経緯について簡単に説明させていただく。個人的な反省も含まれるが何卒ご了承ください。

PCR(詳しい説明は他の文献に委ねる)でとある遺伝子を増幅する場合、トランスポゾンがその遺伝子に挿入されると増幅される DNA 領域の長さが長くなることが期待されるため、PCR の増幅断片の長さを電気泳動で確認することで転移因子の挿入を示唆できるのではないかと考えたことが本実験のきっかけだった。その後調べるうちに、第 3 章(2)で述べたようなトランスポゾンと花の模様に関連性に興味を持ち、アントシアニンの生合成に関する遺伝子をテーマにした実験を計画し始めた。

アントシアニン生合成経路の酵素の遺伝子をいくつか選択し、絞り模様を持つ何種類かの花から抽出した DNA を対象として、選択した遺伝子の DNA 領域を PCR で増幅し増幅断片の長さを電気泳動で確認するというのが当初予定していた実験の概要であり、また花に加えて葉から抽出した DNA も用いて PCR を行うことで葉でのトランスポゾン転移

についても調べることを考えていた。比較的早期の段階から絞り模様の花を集めていたが、計画していた実験は(少なくとも私にとって)想定より難しいことが明らかになっていった。というより、私の想定が甘かったという方が正確かもしれない。

第一に、対象とする植物には互いに遠縁な種が含まれており、それらの種間で DNA 配列の差が大きくなってしまふ。集めた全ての植物で同じプライマーを使うことを考えていたが、こうなると保存された DNA 配列が見られにくくなり適切なプライマーも設計できなくなる。何種類ものバリエーションを有する縮重プライマーであれば遠縁な植物種を対象とした PCR を一括で行えるだろうが、私自身は縮重プライマーの設計に関する知識に乏しく、有識者に教えていただくには時期が遅すぎた。

そして第二に、遺伝子中のどこに挿入されているかも分からないトランスポゾンが存在を捉えるためには遺伝子のなるべく両端に結合するプライマーを設計する必要があるが、そうすると増幅長が長くなり PCR の難易度が上がってしまう。本稿と同じテーマを扱っている研究論文の 1 つには、アントシアニン生合成関連酵素遺伝子と挿入配列合わせて 10kbp 弱にも達するカーネーションの例が研究されていた。増幅長が分からない条件下で適切な PCR を見出すのは難しいと思われ、ましてやその長さが十分長くなってくるとさらに厳しくなるだろう。いくつかの論文では酵素遺伝子に対する縮重プライマーが記載されていたが、当然ではあるものの、遺伝子の一部のみを増幅するように設計されたものがほとんどであった。

以上で述べた点や自らの実験技術・知識や実験スケジュールなどを考慮した結果、対象とする植物はそのままで花を利用し、1 つの論文に記載されていた F3'H 遺伝子(図 4 参照)の縮重プライマーを用いた PCR 実験のみを実施することにした。実験時期が遅くなってしまったこと及び私自身の浅慮を反省したい。

5. 実験内容

(1) 概要

絞り模様や斑入りの花の花弁から抽出した DNA を鋳型 DNA とし、縮重プライマーを用いた F3'H 遺伝子の DNA 領域を PCR で増幅し、アガロースゲル電気泳動によって増幅断片の長さを推定する。

(2) 対象とした植物種

各地の花屋で購入した絞り模様・斑入りの花を用いた(図 8)。「？」

のついた品種名は、正確な品種を知ることができずインターネットの情報から推定した品種名である。

①スプレーマム *Chrysanthemum sp.*(ピップ?)

花弁は白に赤紫の差しが高頻度で観察される。

②黄カーネーション *Dianthus caryophyllus*(フィエスタコマチ?)

花弁は淡黄に赤みがかったピンクの差しが花弁の端部を中心に観察される。

③桃カーネーション *Dianthus caryophyllus*(ジュビリー?)

花弁は淡ピンクに赤紫の差しが観察される。

④ラナンキュラス *Ranunculus asiaticus*(オルレアン?)

花弁は白に紫の点が散在しており、花の中心の方に位置する花弁に紫の斑が観察される。

⑤バラ *Rosa sp.*(マジックダンス+? フラッシング?)

花弁は白にピンクの斑が観察される。

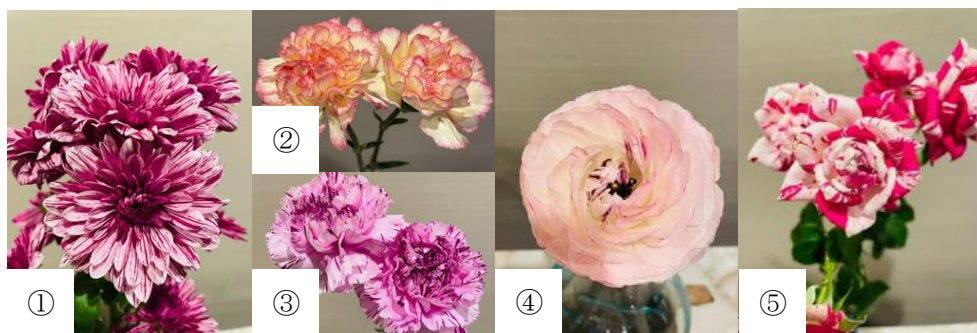


図 8 実験に用いた花

(3) 手順

①DNA 抽出

DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN 社)を用いて、各植物の花弁の一部から DNA を抽出した。抽出した 10 種類の DNA サンプルはそれぞれ、(a)スプレーマム花弁の白+赤紫の部分(b)黄カーネーション花弁の淡黄の部分(c)黄カーネーション花弁の淡黄+ピンクの部分(d)桃カーネーション花弁の淡ピンクの部分(e)桃カーネーション花弁の淡ピンク+赤紫の部分(f)ラナンキュラス花弁の白の部分(g)ラナンキュラス花弁の白+紫(散在する点)の部分(h)ラナンキュラス花弁の紫(斑)の部分(i)バラ花弁の白の部分(j)バラ花弁のピンクの部分に由来する。

②nested PCR

4種類の縮重プライマーを用いて nested PCR*1を行った(表1)。PCR反応液に加える鋳型DNAの割合は3パターン試し、また2nd PCRでは1st PCR産物をそのまま用いる場合と、100倍希釈した1st PCR産物を用いる場合の2パターン試した。PCR反応液に鋳型DNAを5 μ l、3 μ l、1 μ l加えて行った実験条件をそれぞれ(I)、(II)、(III)とし、さらに2nd PCRで1st PCR産物をそのまま用いたか希釈したかで実験条件を(I \times 1)、(I \times 1/100)のように識別することにする。なお①で得た10サンプル以外に、純水を鋳型DNAの代わりに加えてPCRを行ったネガティブコントロール(NC)も用意した。

*1) nested PCRは、PCRで増幅したい領域を挟むように2組のプライマーを設計し、増幅領域からみてより外側のプライマーセットを用いて1st PCRを行い、1st PCR産物とより内側のプライマーセットを用いて2nd PCRを行うことで、増幅の特異性を高める方法である。

A	F1(1st PCR)	5'-GGNTTCGTNSAYGTNGTNGT-3'						
	R1(1st PCR)	5'-GCCCKTTGNARNGTNAGNCCR-3'						
	F2(2nd PCR)	5'-AATTCNNNAGYMGNCCACC-3'						
	R2(2nd PCR)	5'-CGNCCNGCNCRCRAANGGDAT-3'						
B	鋳型DNA	5 μ l or 3 μ l or 1 μ l						
	dNTP	10 μ l						
	PCRバッファー	25 μ l						
	フォワードプライマー	3 μ l						
	リバースプライマー	3 μ l						
	PCR酵素(KOD FX)	1 μ l						
	滅菌水	up to 50 μ l						
	合計	50 μ l						
C	1st PCR	94 $^{\circ}$ C	2min	\times 35	2nd PCR	94 $^{\circ}$ C	2min	\times 35
		98 $^{\circ}$ C	10sec			98 $^{\circ}$ C	10sec	
		44 $^{\circ}$ C	30sec			43 $^{\circ}$ C	30sec	
		68 $^{\circ}$ C	10min			68 $^{\circ}$ C	10min	
		68 $^{\circ}$ C	3min			68 $^{\circ}$ C	3min	

表1 nested PCRの詳細。(A)実験で用いたプライマー。参考文献1に記載されていたものを利用させていただいた。A・T・G・C以外の塩基は縮重塩基を示す。(B)PCR反応液の組成。各実験条件での鋳型DNAの量は1st PCRと2nd PCRで共通である。(C)PCR条件。

③アガロースゲル電気泳動

0.8%アガロースゲルを担体として PCR の増幅産物を電気泳動する。泳動後ゲルを核酸染色試薬(GelGreen)で染色して青色光の下で撮影する。

6. 実験結果

電気泳動の結果を図 9 に示す。ここでは DNA マーカーを M、(I × 1)の実験条件で増幅した(a)の DNA を(a_{I × 1})のように表すことにする。A のゲルでは左から M、(e_{I × 1})、(e_{II × 1})、(e_{III × 1})、.....、(e_{III × 1/100})、(j_{I × 1})、.....、(j_{III × 1/100})とロードした。B~E のゲルではそれぞれ(I × 1)、(II × 1)、(III × 1)、(I × 1/100)の実験条件で PCR を行ったサンプルをロードしており、例えば B のゲルでは左から M、(a_{I ×}

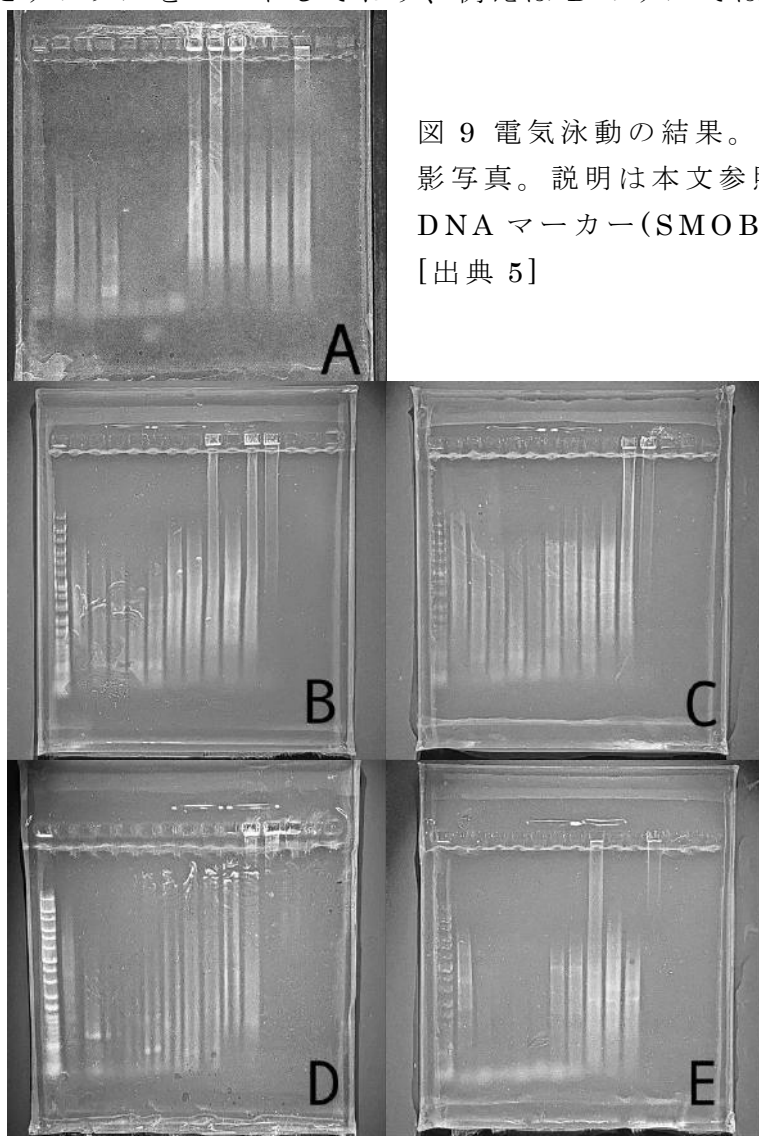
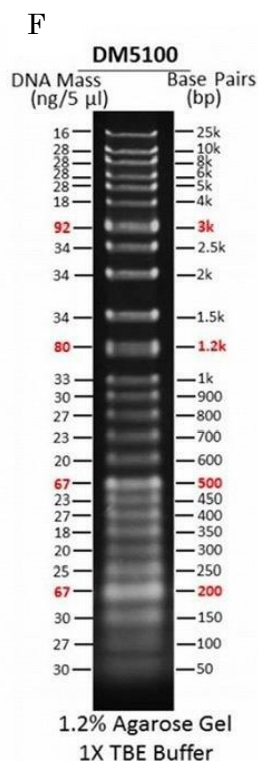


図 9 電気泳動の結果。(A)~(E)ゲルの撮影写真。説明は本文参照。(F)使用した DNA マーカー(SMOBIO DM5100)。
[出典 5]



i)、(b_{I×1})、.....、(j_{I×1})、(NC_{I×1})とロードした。(Ⅱ×1/100)と(Ⅲ×1/100)の条件で PCR を行ったサンプルの電気泳動結果は目立った増幅が観察されなかったので掲載していない。

7. 分析・考察

電気泳動の結果は全てスメア(縦にべったり塗られたような跡)が観察されてしまったが、そのなかでもバンドらしきものを見出すことができるため、そうした泳動パターンに着目してみることにする。

まずは実験条件について検討する。A や E のゲルの様子からカーネーション DNA (b)~(e)は 1st PCR 産物を 100 倍希釈した条件では十分に増幅されていないと考えられる。D のゲルではカーネーション DNA のスメアが減ってバンドが観察しやすくなっており、一方 E のゲルではカーネーション DNA のバンドは観察されないがそれ以外の DNA でバンドらしきものがよく観察される。今回のプライマーセットでは(Ⅲ×1)や(I×1/100)の条件での PCR がバンドの観察に適切と思われる。

次にバンドの位置に着目していく。スプレーナム DNA(a)に関しては E のゲルで約 2500bp、約 1500bp、約 1000 bp のバンドが見出せる。NCBI データベースに登録されていた *Chrysanthemum x morifolium* の F3'H 遺伝子(Accession No. GU249549)でのプライマー F2 及び R2 による推定増幅長は 3194bp で、また 3 つもバンドが見られることからスプレーナムでは主に非特異的増幅が起きたと考えられる。黄カーネーション DNA(b)(c)に関しては D のゲルで約 700bp のバンドが見出せ、桃カーネーション DNA(e)に関しては A や D のゲルで約 1000bp、約 400bp のバンドが見出せる。プライマー引用元の参考文献 1 によると今回のプライマーセットではカーネーション F3'H 遺伝子から 4000~5000bp の増幅が期待されるため、カーネーションでも望んだ増幅は見られないと考えられる。やはり遺伝子の増幅長が長くなってしまい上手く増幅されなかったのだろう。ラナンキュラス DNA について、(f)と(g)では E のゲルで約 3000bp のバンドが見出せるが、(h)では代わりに約 2000bp のバンドが見出せる。NCBI データベースに登録されていたキンポウゲ科 *Delphinium grandiflorum* の F3'H 遺伝子(Accession No. LC441150)でのプライマー F2 及び R2 による推定増幅長は 2794bp であり、(h)の約 2000bp のバンドとはややずれる。しかし、ラナンキュラス花卉の白い部分(f)(g)では約 1000bp のトランスポゾンが挿入した約 3000bp

の F3'H 遺伝子が増幅され、花卉の紫斑(h)ではトランスポゾンが脱離した約 2000bp の F3'H 遺伝子が増幅された可能性が示唆される。バラ DNA(i)(j)については E のゲルで約 2000bp、約 2500bp のバンドが見出せ、花卉の色による差は見られなかった。

8. おわりに

今回は花の色素合成に関与するトランスポゾンの挿入に着目して実験を行ったが、縮重プライマーのみを用いたこともあり示唆できたことはごく僅かに限られてしまった。対象とする植物を限定して、mRNA を逆転写した cDNA を鋳型として PCR を行い配列を決定した上で種特異的なプライマーを設計するなど、より本格的な実験計画を立てるべきだったと反省している。絞り模様の花は多くの種で知られており、トランスポゾンの関与は興味深いトピックであるため、機会があれば今後もトランスポゾン挿入遺伝子の増幅を試したい。

9. 謝辞

今回試したような分子生物学実験が行えたのは、サーマルサイクラー(PCR を行う機械)や諸々の器具及び試薬の弊部への導入が昨年実現したおかげです。弊部の将来を見据えて機材等の購入を思い切って認め、進めてくださった生物研究部顧問の先生や本校理科実習助手の先生、そして弊部に寄付をしてくださった OB の方々に感謝を申し上げます。また蔓延防止等重点措置の影響で放課後が短縮される中、サンプル数も少なくない実験を行うのは厳しかったのですが、そのような状況下で実験の手伝いをしてくれた部員 4 人にも感謝します。最後に、実験対象の花探しに協力してくれた母親に感謝します。ありがとうございました。

10. 画像出典・参考文献

(1)画像出典

① Calvero., Public domain, ウィキメディア・コモンズ経由,
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flavan_acsv.svg,
最終閲覧日 2022-4-1.

② “フラボノイド”. 農研機構, 野菜花き研究部門,
https://www.naro.go.jp/laboratory/nivfs/kiso/color_shikiso/contents/flavonoid.html, 最終閲覧日 2022-4-1.

③ “色素の基礎知識”. 農研機構, 野菜花き研究部門,
https://www.naro.go.jp/laboratory/nivfs/kiso/color_shikiso/index.html, 最終閲覧日 2022-4-1.

④Campbell, N. A. ほか. キャンベル生物学. 池内昌彦・伊藤元己・
箸本春樹・道上達男 監訳, 原書 11 版, 丸善出版, 2018, p519.

⑤SMOBIO Super Range DNA Ladder (50 bp-25 kb).

<http://docs.smobio.com/document/doc/PV/DM5100.pdf>.

(2)参考文献

①百瀬眞幸(2014). 体細胞変異に寄与するトランスポゾンに関する研
究, 東京大学博士論文.

②“花色の基礎知識”. 農研機構, 野菜花き研究部門,

<https://www.naro.go.jp/laboratory/nivfs/kiso/index.html>,
最終閲覧日 2022-4-1.

③“光合成辞典”. 日本光合成学会, <https://photosyn.jp/pwiki/>, 最
最終閲覧日 2022-4-1.

④“アカキャベツ色素”. キリヤ化学, [http://www.kiriya-
chem.co.jp/tennen/kyabetu.html](http://www.kiriya-chem.co.jp/tennen/kyabetu.html), 最終閲覧日 2022-4-1.

⑤“世界初! 「青いバラ」への挑戦 誕生の秘密”. SUNTORY, サント
リーグローバルイノベーションセンター,

https://www.suntory.co.jp/sic/research/s_bluerose/secret/,
最終閲覧日 2022-4-1.