

Characterization of LhMYB12 regulating anthocyanin biosynthesis in lily flowers

(ユリの花器官においてアントシアニン生合成を制御しているLhMYB12の解析)

学位論文内容の要旨

Anthocyanin is one of the major pigments in Asiatic and Oriental hybrid lilies (*Lilium* spp.). Anthocyanin biosynthesis is usually regulated by R2R3-MYB transcription factors, which are classified into AN2 and C1 subgroups due to their sequence homology. In the anthocyanin biosynthesis pathway, the AN2 subgroup MYBs isolated in eudicot species usually regulate the late biosynthesis genes (LBGs), but the C1 subgroup MYBs obtained in monocot species control both the early biosynthesis genes (EBGs) and LBGs. In Asiatic and Oriental hybrid lilies, LhMYB12 has been identified to control the anthocyanin biosynthesis in their tepals. As LhMYB12 belongs to AN2 subgroup, the first question arises: does LhMYB12 regulate only LBGs like AN2 subgroup MYBs in eudicots or the whole pathway like C1 subgroup MYBs in monocots. High temperatures often reduce the quality of anthocyanin color in flowers, which is a problem in the commercial production of ornamental plants. The transcriptions of MYBs that control anthocyanin biosynthesis in fruits are suppressed under high temperature. The second question is whether high temperatures also suppress LhMYB12 transcription in lily flowers.

In the first part, the accumulation profiles of pigments and cinnamic acid derivatives, and the transcription profiles of *LhMYB12*, phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) and anthocyanin biosynthesis genes during flower bud development were evaluated in Asiatic hybrid lilies to determine the target genes of LhMYB12. *LhMYB12* and anthocyanin biosynthesis genes showed the same transcription profiles, and LhMYB12 directly activated the promoters of *chalcone synthase* (*CHS*) and *dihydroflavonol 4-reductase* (*DFR*), indicating that *LhMYB12* regulates both the EBGs and LBGs although LhMYB12 belongs to AN2 subgroup. Cultivar Montreux accumulated anthocyanin, and cultivar Landini accumulated

anthocyanin and flavonol. The contents of these pigments increased at late stages of flower bud development, which coincided with the change of transcription levels of *LhMYB12* and anthocyanin biosynthesis genes. At early developmental stages, tepals contained neither anthocyanins nor flavonols, but accumulated high amounts of cinnamic acid derivatives. These results indicate that the profiles of pigment accumulation and gene transcription in the lily tepals are different from those in flowers of other species.

In the second part, I investigated the effects of elevated temperature on anthocyanin accumulation in the tepals of an Oriental hybrid lily cultivar Marrero (pink-flowered). To clarify the flower stage most susceptible to elevated temperature, the flowers were divided into seven developmental stages. Potted plants with flowers at these stages were incubated at 35°C or 20°C for 2 days. The elevated temperature at 35°C caused poor coloration in the tepals at stage (St) 3-1 and St 3-2. At 20°C, anthocyanin accumulation began at St 3-1 and anthocyanin content increased at St 3-2. The elevated temperature did not affect anthocyanin coloration at other stages. To clarify the mechanism for the poor coloration at St 3-1 and 3-2 at 35°C, the transcription of *LhMYB12*, *CHS*, *flavanone 3-hydroxylase (F3H)*, and *DFR* as well as endogenous sugar content was evaluated in tepals. The transcription of *LhMYB12*, *CHS*, *F3H*, and *DFR* was suppressed at St 3-1 and 3-2 under the elevated temperature. The change in sugar content in the tepals at 35°C was not correlated with the reduced anthocyanin accumulation. Thus, I conclude that elevated temperatures inhibit anthocyanin biosynthesis at St 3-1 and 3-2 via the suppression of *LhMYB12* transcription.

Lily *LhMYB12* regulated all the anthocyanin biosynthesis genes resulting in that both anthocyanin and flavonol accumulated at later tepal developmental stages; this profile of pigment accumulation is unique. Because such a precise examination has not been done in flowers of other monocots, the most intriguing question is whether such profiles of gene transcription and pigment accumulation are common in monocot flowers or observed only in lily flowers. The elevated temperature caused poor coloration in tepals via the suppression of *LhMYB12* transcription. This is the first report demonstrating that high temperatures suppress the transcription of *R2R3-MYB* gene that controls anthocyanin biosynthesis in an ornamental plant species. Such knowledge will be valuable for improving the cultivation conditions of lilies and screening for genetic resources that are not strongly influenced by elevated temperatures in *Lilium* species and cultivars.

学位論文審査の要旨

主査	准教授	山岸真澄
副査	教授	増田清
副査	特任教授	鈴木正彦

学位論文題名

Characterization of LhMYB12 regulating anthocyanin biosynthesis in lily flowers

(ユリの花器官においてアントシアニン生合成を制御しているLhMYB12の解析)

本論文は図 17、表 3 を含む総ページ数 78 からなる英文論文であり、他に参考論文 1 編が添えられている。その内容は以下に要約される。

ユリ (*Lilium* spp.) は生産量の多い重要な花きである。花色は花きにおいて最も重要な形質の一つであるが、ユリは栄養繁殖性でかつゲノムサイズが大きいなどの理由から、花色形質がどのように制御されているのかほとんど解明されてこなかった。2010 年になって、アントシアニン色素の生合成を花卉で制御している転写因子である MYB12 がユリより単離され、ようやくアントシアニン色素発色の制御メカニズムが遺伝子のレベルで解析できるようになった。本研究はこの MYB12 の機能を詳細に検討したものである。

1 スカシユリの花の発達に伴う MYB12 とアントシアニン生合成遺伝子の転写と色素蓄積の変化

アントシアニン生合成を制御している MYB は大きく 2 つのサブグループに分けられる。AN2 サブグループは真正双子葉で機能している MYB で、おもにアントシアニン生合成系の後半の遺伝子 (late biosynthesis genes: LBGs) の制御にあずかる。C1 サブグループは単子葉から単離されており、アントシアニン生合成系の前半の遺伝子 (early biosynthesis genes: EBGs) と LBGs の両方を制御している。ユリから単離された MYB12 は AN2 サブグループに属する MYB で、単子葉から単離された最初の AN2 サブグループの遺伝子である。この章ではユリの MYB12 が他の AN2 サブグループの MYB 同様、LBGs のみを制御しているのか、それとも EBGs と LEBs の両方を制御しているのか検討した。スカシユリよりアントシアニン生合成遺伝子を単離して転写様式を調査したところ、MYB12 も生合成遺伝子も、花卉の発達の後半に転写量が上昇

し、MYB12はEBGsとLEBsの両方を制御していると考えられた。そこでMYB12が両方を直接制御していることを証明するために、EBGsの一つであるCHSとLEBsの一つであるDFRからプロモーター領域を単離し、MYB12がこれらのプロモーターを直接活性化することをdual luciferase assayで調査した。その結果、MYB12はbHLHタンパク質が共存する条件でこれらのプロモーターを直接活性化し、MYB12は他のAN2サブグループのMYBとは異なり、EBGsとLEBsの両方を制御していることが確かめられた。一般に真正双子葉では、花卉の発達の初期にはEBGsのみが発現してフラボノールが合成され、発達の後期にはEBGsとLEBsの両方が発現してアントシアニンが生合成されることが知られている。スカシユリの品種で、アントシアニンとフラボノールの両方を生合成する品種を用いてこれらの色素の蓄積を調査したところ、いずれの色素も発達の後半に蓄積することが分かった。この色素蓄積の様式は、MYB12がEBGsとLEBsの両方を制御していることに依ると考えられた。このようにユリ花卉における遺伝子発現と色素蓄積の様式は真正双子葉のそれとずいぶん異なっていることが明らかになった。なおC1サブグループが働いている単子葉の花弁で、色素の蓄積を詳細に検討した例はない。

2 高温で発生するオリエンタルハイブリッドユリ花卉の色あせ現象はMYB12遺伝子の発現抑制によって起こる

アントシアニン色素の蓄積はしばしば高温によって阻害され、施設栽培における切り花生産で問題になっている。ユリにおいても高温で色あせが起こることが知られているが、そのメカニズムについては調査されてこなかった。この章では高温によるアントシアニン色素の蓄積阻害を詳しく調査するとともに、それがMYB12の発現抑制に起因することを明らかにした。まずオリエンタルハイブリッドユリの花弁をいろいろなステージにわけて2日間35℃の高温にさらすと、特定のステージでのみ高温の影響を受けて色あせが起こることが分かった。この高温の影響を受けやすいステージは、ちょうどMYB12と生合成遺伝子の発現が上昇する頃に当たる。そこでこれらの遺伝子の転写を調査したところ、高温でMYB12と生合成遺伝子の転写が抑制されていた。また、この特定のステージさえ回避すれば、高温の影響は全く受けないことも明らかとなった。これらの結果は切り花生産における栽培方法の改良や、高温の影響を受けにくい遺伝子資源の探索に役立つ。

以上のように本研究は、ユリの花弁における遺伝子発現と色素蓄積の様式が真正双子葉の花弁と比べて大きく異なっており、この違いは主にMYB12の特性に依ること明らかにするとともに、高温による色あせ現象にMYB12が関与していることを示した。これらの知見は生理学的にも園芸学的にも高く評価できる。よって審査員一同は、頼云松が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。