

氏 名 久 富 恵 世

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第280号

学位授与の日付 平成9年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 絞り花を咲かせるアサガオとマルバアサガオの色素生合成系遺伝  
子と可動遺伝因子

論文審査委員 主 査 教 授 長濱 嘉孝  
教 授 飯田 滋  
教 授 西村 幹夫  
教 授 中村 研三(名古屋大学)

## 論文内容の要旨

アサガオ (*Pharbitis nil* または *Ipomoea nil*) やマルバアサガオ (*Ipomoea purpurea* または *Pharbitis purpurea*) の花卉の色素であるアントシアニン (anthocyanin) は、植物の二次代謝産物で、この色素の生合成に関する遺伝子に変異が起きても植物の生育には大きな影響を与えないため、花卉の色の変異は、遺伝学的マーカーとして適しており、数多くの色素生合成の変異体が分離されている。これら多数の変異体の中には易変性 (mutable) 変異も含まれている。易変性変異とは変異が高頻度で生じる変異のことであり、そのような変異をもつ遺伝子を易変性遺伝子 (mutable gene) という。多くの場合、易変性変異は体細胞変異の結果であるキメラ (chimera) 斑もしくは遺伝的斑入りを生じさせる変異として検出されている。トウモロコシやキンギョソウでは、色や形の易変性変異の原因となる遺伝子が単離、同定されているが、その多くにトランスポゾン (transposable element) もしくは転移調節因子が関与していることが知られている。

アジア原産のアサガオには花卉に絞り模様を持つ雀斑 (*flecked*) と呼ばれる系統が存在し、白色の地に体細胞分裂の方向に沿った有色のスポットやセクターが生じる。この雀斑系統の絞り花を咲かせる易変性遺伝子  $a-3'^{flecked}$  (もしくは  $a-3'$ ) は古典遺伝学的にも詳細に研究され、第 V 染色体上にマップされている。

中央アメリカ原産のマルバアサガオはその名の通り、葉が丸みを帯びたハート型をしており、アサガオよりも小さな花を咲かせる。マルバアサガオにも条斑 (*flaked*) と呼ばれ、白地に有色のセクターやスポットの絞り模様の花を咲かせる系統が存在する。条斑系統の花で見られる絞り模様はアントシアニン色素生合成を司る A 遺伝子座に座乗する易変性  $a'^{flaked}$  (もしくは  $a'$ ) 変異が花卉の器官形成時に高頻度で体細胞復帰変異を起こし色素生合成能を回復することによって生じると考えられている。しかしながら、アサガオの易変性雀斑遺伝子  $a-3'$  と異なり、易変性条斑  $a'$  遺伝子は不完全優性 (incomplete dominance) を示し、野生型である全色ホモ個体 (A/A) と条斑ホモ個体 ( $a'/a'$ ) を交雑して得られたヘテロ F1 個体 (A/ $a'$ ) は薄い有色の地色に濃い有色のキメラ斑をもつ花を咲かせる。それ故に、マルバアサガオではホモやヘテロの遺伝子型を花の表現型から区別することができる。

アサガオ  $a-3'$  遺伝子とマルバアサガオ  $a'$  遺伝子は共に易変性であるため、花卉にキメラ斑をもつ個体から全色花ばかりを咲かせるようになった生殖細胞復帰変異体 (germinal revertant) を分離できる。それ故、これらの易変性変異にはトランスポゾンなどの可動遺伝因子が関与している可能性が高いと考え、全色花と絞り花のアントシアニン色素生合成系遺伝子の構造を比較し、可動遺伝因子の挿入による DNA 再編成が起こっているか否かを検討し、アサガオの雀斑  $a-3'$  遺伝子とマルバアサガオの条斑  $a'$  遺伝子の解明を試みた。

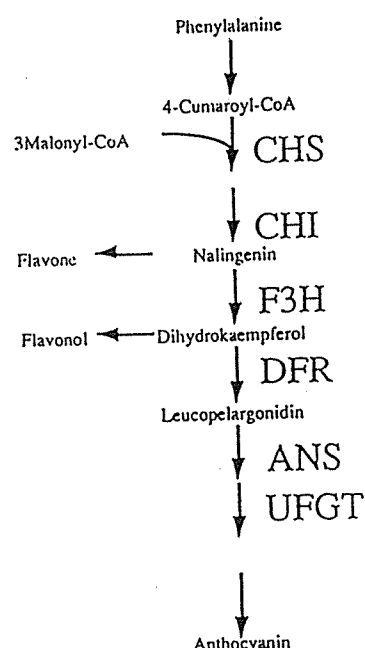
まず、彼女は、稲垣善茂博士 (現、予防衛生研究所) が開始した絞り花アサガオの易変性雀斑  $a-3'$  変異遺伝子解析の研究を引き継ぎ、アサガオの雀斑  $a-3'$  遺伝子の本体がアントシアニン色素生合成系遺伝子の一つであり DFR (dihydroflavonol 4-reductase) をコードしている DFR-B 遺伝子内に新しい DNA 型トランスポゾン *Tpn1* (*Transposable element Pharbitis nil one*) が挿入した構造であり、DFR-B 遺伝子内から *Tpn1* が脱離することによって、白色の花卉に有色のキメラ斑が形成されることを、*Tpn1* が脱離するたびに DFR-B 遺伝子内に生ずるフットプリントの配列を指標にして、分子遺伝学的に証明した。

次いで、マルバアサガオの条斑 $a'$ 遺伝子の単離、同定を試みた。条斑花の色素の化学分析から、白色部分の花弁からフラボノールが検出されたので、*F3H*遺伝子までは活性であろうと考えられ、*DFR*遺伝子以降の遺伝子の構造を全色系統と条斑系統で比較したところ、*DFR*遺伝子およびその次のステップで働く*ANS*遺伝子領域において条斑系統ではDNA再編成が生じていることが判明した。そこで、条斑系統の*DFR*遺伝子領域で見いだされたDNA再編成について解析し、この領域に極最近になって注目されだしたMITEに属する新しいトランスポゾン*MELSIP2*(*Mobile element like sequence Ipomoea purpurea two*)を含む2種のトランスポゾン様配列を単離した。また、この*DFR*遺伝子領域で見いだされたDNA再編成が易変性変異 $a'$ に関与するか否かを検定するために、*DFR*遺伝子が*Tpn1*の挿入によって不活性化されている雀斑花アサガオと条斑花マルバアサガオを交雑することにより、相補性テストを行い、条斑花マルバアサガオの*DFR*遺伝子領域で見いだされたDNA再編成は条斑 $a'$ 変異には関与していないことを明らかにした。

一方、色素合成経路の*DFR*遺伝子の次のステップである*ANS*(*anthocyanidin synthase*)遺伝子領域に見いだされたDNA再編成は2種の可動遺伝因子の挿入によるものであった。一つはミニサテライト様配列である*MiniSip1*(*Minisatellite sequence Ipomoea purpurea one*)であり、もう一つの因子はレトロトランスポゾン*RTip1*(*Retrotransposon Ipomoea purpurea one*)であった。しかもこの*RTip1*は*MiniSip1*内に挿入していた。さらにレトロトランスポゾン*RTip1*の内部には新規のミニサテライト配列*MiniSip2*も組み込まれていた。しかし、生殖細胞復帰変異体を分離して*ANS*遺伝子領域の構造を比較したところ、依然としてこれらの可動遺伝因子が挿入していたので、*ANS*遺伝子領域のDNA再編成も条斑 $a'$ 変異には関与しないと考えられた。

*DFR*および*ANS*遺伝子領域でのDNA再編成が条斑形成に関与しないことが明らかとなったので、その他のアントシアニン色素合成系の遺伝子の構造を全色および条斑系統を各々複数系統ずつ用いてサザン法により比較した。驚くべきことに、比較した多くの領域でDNA再編成によるRFLPが見いだされた。しかし、これらのDNA再編成も生殖細胞復帰変異体を用いて検討した結果、条斑変異には無関係であると考えられる結果を得た。

これまでのトランスポゾンの挿入によるDNA再編成を検出するという試みでは条斑遺伝子を同定することは出来なかった。そこで、トランスポゾンの挿入によって、条斑 $a'$ 遺伝子のmRNAの構造が発現量に差が生じているのではないかと考え、条斑系統とその生殖細胞復帰変異体のつぼみよりmRNAを抽出してディファレンシャルディスプレイ法による遺伝子の単離を試みた。その結果、条斑 $a'$ 遺伝子の最有力候補として*CHS-D*遺伝子を単離した。この結果は予想外であったが、マルバアサガオの花では数種類の*CHS*遺伝子が発現していることが明らかになりつつあるので、フラボノールが生合成されているにもかかわらず



わらず、*CHS-D*遺伝子が易変性遺伝子と関与しているとしても、それほど不可思議ではない。今後さらに、*CHS-D*遺伝子の構造と機能の解明が進めば、易変性条斑変異だけでなく、不完全優性をはじめ、未解決の現象の解明にもつながるものと思われる。

## 審査結果の要旨

アサガオ (*Pharbitis nil* または *Ipomoea nil*) やマルバアサガオ (*Ipomoea purpurea* または *Pharbitis purpurea*) には白地に有色のスポットやセクターの花を咲かせる系統が存在する。これらの紋模様は、易変性変異により花卉の色素であるアントシアニン色素の生合成系遺伝子が花卉の器官形成時に高頻度で体細胞変異を起こしてキメラとなったためと考えられ、キメラ斑とも呼ばれる。このような易変性変異にはトランスポゾンなどの可動遺伝因子が関与するものと考えられている。

申請者は、かつて古典遺伝学的に詳細な解析が行われたアサガオの雀斑系易変性変異  $a-3^{'le'ked}$  とマルバアサガオの条斑系易変性変異  $a^{'lak'ed}$  の実体の解明を試み、以下の譜点を明らかにした。(1) アサガオの雀斑系易変性変異  $a-3^{'le'ked}$  はアントシアニン色素生合成系の *DFR-B* 遺伝子内にDNA型トランスポゾン *Tpn1* が挿入した構造であり、*Tpn1* の *DFR-B* 遺伝子からの脱離による体細胞変異がキメラ斑形成の要因であることを、*Tpn1* の脱離により体細胞で生ずるフットプリントの配列の次世代への伝達を指標として明らかにした。(2) マルバアサガオの条斑系易変性変異  $a^{'lak'ed}$  の同定を試み、アントシアニン色素生合成系の *DFR* および *ANS* 遺伝子内にDNA再編成を検出した。(3) *DFR* 遺伝子内のDNA再編成は *MELSIP1* および *MELSIP2* と名付けた可動遺伝因子の挿入によるものであり、後者は最近注目されているMITE系因子である。(4) *MELSIP2* とその類縁因子は *Ipomoea* 属のゲノム上でファミリーを構成している。(5) 雀斑系アサガオと条斑系マルバアサガオを交雑して相補性テストを行った結果、条斑系変異と *DFR* 遺伝子との関連性を見い出せなかったが、条斑系易変性変異の関与する興味ある対立遺伝子相互作用を見出した。(6) *ANS* 遺伝子領域のDNA再編成は、新しいミニサテライト配列 *MiniSip1* が挿入し、さらにその内部に新規のミニサテライト配列 *MiniSip2* を組み込んだレトロトランスポゾン *RTip1* が挿入された構造であった。(7) 生殖細胞復帰変異体を分離して *ANS* 遺伝子領域の構造を比較した結果、*ANS* 遺伝子領域のDNA再編成も条斑系変異との関連性は見出せなかった。(8) アントシアニン色素生合成系の *DFR* および *ANS* 遺伝子以外のアントシアニン色素生合成系遺伝子でも系統によるRFLPの違いを見出したが、条斑系変異との関連性は見出せなかった。(9) ディフェレンシャルディスプレイ法により条斑系統とその生殖細胞復帰変異体を比較して、未知遺伝子 *CHS-D* を単離した。得られた結果は、条斑系易変性変異と *CHS-D* 遺伝子との関連性を強く示唆している。

本研究は、アサガオの雀斑系易変性変異を同定すると共に1917年に最初の古典遺伝学的研究が公表されて以来、種々の研究が行われたマルバアサガオの条斑系易変性変異を初めて分子遺伝学的手法を駆使して多面的解明し、多数の新規可動遺伝因子を同定し、さらに条斑系易変性変異との関連性を強く示唆している *CHS-D* 遺伝子を初めて同定単離したもので、審査委員会は学位論文として十分な内容をもつものと判定した。

また、学位論文として提出された研究結果について申請者による口頭発表後、審査員が論文の内容、次いで関連研究分野の一般的知識とその背景となる基礎的知識について口頭試問により審査を行った。これらの試問に対する申請者の応答はいずれも明解かつ的確であった。これらの結果をもとに、審査委員会は申請者が学位取得に十分な学識と研究遂行能力をもつものと判定した。

英語の能力に関しても、投稿論文などから博士の学位に足る十分な能力を有するものと判定した。