

氏 名 星 野 敦

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第338号

学位授与の日付 平成10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 絞り花アサガオの易変性変異とトランスポゾン

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 西村 幹夫
教 授 飯田 滋
教 授 堀内 嵩
教 授 中村 研三（名古屋大学）

論文内容の要旨

高等植物の花弁や葉などに見られる斑入り模様は、観賞用の植物などで商業的な価値を生むだけでなく、形態学や遺伝学などの観点から植物学者の興味を引いてきた。このうち遺伝的に異なる2つ以上の細胞群で構成されるキメラ (chimera) 斑が斑入り模様として現れる場合も多く、キメラが生じる原因の一つに易変性 (mutability) 変異が知られている。易変性変異は自然突然変異を高頻度で生じる変異で、そのような変異を持った遺伝子は易変性遺伝子 (mutable gene) と呼ばれている。易変性遺伝子の体細胞変異が可視的な表現型の変異をもたらすことで、斑入り模様 (キメラ斑) として認識される。このような易変性遺伝子は、これまでにトウモロコシ、キンギョソウ、ペチュニア、アサガオで単離・同定され、その多くにトランスポゾン (transposon) の関与することが知られている。

アサガオ (*Pharbitis nil* または *Ipomoea nil*) は、我が国で広く親しまれる観賞用植物であり、花の色や模様だけでなく、各器官の形などの変異体が数多く園芸品種として分離されている。これら多くの変異体を用いた古典遺伝学的解析も行われ、10の連鎖群からなる連鎖地図も作製されている。また、およそ20種の易変性遺伝子が知られており、その多くでトランスポゾンの関与する可能性が指摘されている。

本論文の目的は、易変性変異により生じるアサガオ花弁の絞り (斑入り) 模様と、易変性を賦与するトランスポゾンとの関連を分子生物学的に明らかにすることである。省斑 ($a-3^{flecked}$) と、吹掛け絞り (*speckled*) の2つの易変性遺伝子を取り上げ、その単離・同定、遺伝子の発現や機能の解析を行った。また、アサガオの花色を決定する色素であるフラボノイド系色素の生合成に関わる遺伝子群についても同定し、その cDNA やゲノム上の構造を解析し、花色変異体での発現様式を調べた。

省斑変異は、白色地に体細胞分裂の方向に沿った有色のキメラ斑が生じ、第V連鎖群にマップされている。これまでに、 $a-3^{flecked}$ 遺伝子座はフラボノイド色素生合成系の DFR (dihydroflavonol 4-reductase) をコードする *DFR-B* 遺伝子内に、トウモロコシの *En/Spm* 類縁のトランスポゾン *Tpn1* が挿入した構造であることが明らかにされている。そこで本論文ではまず、*Tpn1* の構造解析を行い、*Tpn1* が類縁のトランスポゾンに比べて特徴的な転移酵素の結合領域を有することや、転移酵素をコードしない非自律性の因子であることを明らかにした。つづいて転移活性との関連が議論されている、トランスポゾンのメチル化の状態と転移頻度 (キメラ斑の出現頻度) の関連を検討した。*Tpn1* の転移頻度が極端に低下した系統と、一般的な頻度で転移する複数の個体とを比較したところ、転移酵素の結合すると思われる領域では、シトシン残基のメチル化と転移活性の関連が見られなかった。このことは、転移活性は *Tpn1* のメチル化の状態よりも、*Tpn1* ファミリーの自律性因子の活性など他の要因がより重要であることを示唆する。

次に、本論文の中核である吹掛け絞り変異の解析を行った。吹掛け絞り変異は、クリーム色の地色の花弁に、有色のスプレーを吹き付けたような斑点模様を持つ。その一方で、省斑変異体と同様に体細胞分裂の方向に沿った絞り模様が観察される。また、自殖後代では生殖細胞復帰変異体を得られることから、*speckled* は易変性遺伝子であるとされ、その遺伝子座は第III連鎖群にマップされている。斑点模様はその形状から、体細胞変異によらない遺伝子発現の変化により生じると捉えられてきた。すなわち *speckled* は、2つの異

なる遺伝子発現機構により「斑点」と「キメラ斑」の形成を支配すると解釈できる。そこで、この斑点模様形成機構を明らかにするために、*speckled* 遺伝子座の単離・同定を試みた。

まず、日本大学・経済学部教授・安部幸穎博士が行った交配実験の結果を分子生物学的観点から再解釈し、相補性テストにより博士の用いた変異と園芸品種の吹掛け絞り変異が allelic であることを証明した。その結果、吹掛け絞りは劣性の *speckled* 遺伝子座と、優性の *Speckled-activator* の 2 因子系により生じると結論した。次に、変異体の花卉に含まれる色素の分析結果から、*speckled* 遺伝子座の最有力候補と指摘されていた *F3H* (*flavanone 3-hydroxylase*) が、模様形成に関わる可能性を検討した。その結果、予想に反して変異体の *F3H* 遺伝子は花卉で正常に発現しており、模様形成に関与しないことを明らかにした。そこで *F3H* 遺伝子に次いで候補にあげられる、*CHI* (*chalcone isomerase*) 遺伝子の解析を行った。変異体の *CHI* 遺伝子領域の構造を解析したところ、その第 2 インtron 内に *Tpn1* ファミリーに属する新規トランスポゾン、*Tpn2* を見出した。また、*CHI* 遺伝子内の *Tpn2* の挿入は、表現型および花卉での *CHI* mRNA の蓄積量の低下と連鎖した。さらに、生殖細胞復帰変異体を分離して *Tpn2* の脱離した痕跡であるフットプリントの塩基配列を決定し、このフットプリントを持つ *CHI* 遺伝子の構造と表現型が、復帰変異体とその自殖後代で連鎖することから、*Tpn2* の脱離が *CHI* の再活性化を引き起こすことを確認した。以上の結果から、*speckled* 遺伝子座の本体は、*CHI* 遺伝子に *Tpn2* が挿入した構造であり、*Tpn2* の脱離が「キメラ斑」を形成すると結論した。また、*Tpn2* が *Tpn1* 同様に非自律性の因子であるだけでなく、アサガオゲノムの一部を取り込んだ特異な「入れ子」構造を持つことも同時に明らかにした。しかし、「斑点」の形成機構を変異体の *CHI* 遺伝子の構造だけから説明することは困難であると思われる。今後、吹掛け絞り変異の解析が進めば、これまでの知見からだけでは説明の付かない斑点模様の形成機構の解明につながるであろう。

さらに、吹掛け絞り変異の解析に用いた有色茎に白色花を咲かせる劣性の白変異 (*c-1*) は、フラボノイド系色素合成系の *CHI*、*F3H*、*DFR* 遺伝子を転写レベルで調節する遺伝子の変異であることも示唆された。そこで新たに、色素合成系の *CHS* (*chalcone synthase*) と、*ANS* (*anthocyanidin synthase*) 遺伝子 cDNA をアサガオより単離し、*c-1* 変異体における発現を検討した。その結果、解析した全ての遺伝子の mRNA の蓄積量低下が変異体で確認された。フラボノイド色素合成系遺伝子では、複数の遺伝子が同調した発現を調節遺伝子に支配されることが知られる。ここで得た結果は、これまでに単離・同定されているキンギョソウやペチュニアの調節遺伝子とアサガオの *C-1* 遺伝子では、同調した発現を促す遺伝子群が異なることを示唆する。

論文の審査結果の要旨

アサガオ (*Pharbitis nil* または *Ipomoea nil*) には、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絞り模様の花を咲かせる系統が存在する。このような易変性変異による体細胞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2つの易変性変異「雀斑」 *flecked* と「吹掛け絞り」 *speckled* の解明を試み、以下の諸点を明らかにした。

(1) アサガオの「雀斑」変異は、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ることが既に明らかにされてきたが、6.4kbの *Tpn1* の全塩基配列を決定し、その構造上の特徴から非自律性因子であると結論した。(2) 易変性「雀斑」変異体の絞り模様の激しさを決める分子機構の解明を試み、*Tpn1* のDNA メチル化よりも自律性因子の活性により絞り模様の激しさが決まると推定した。(3) アサガオの「吹掛け絞り」変異による斑点模様には劣性の *speckled* 変異以外に優性の *Speckled-activator* の2因子が関与することを明示し、劣性の *speckled* 変異は色素の化学分析の結果から従来考えられていた色素生合成系の *F3H* 遺伝子とは何ら関連性が見出せないと結論した。(4) さらに、*speckled* 変異は実は色素生合成系の *CHI* 遺伝子のイントロン内に *Tpn1* 類縁の6.5kbの DNA 型トランスポゾン *Tpn2* が挿入した構造であることを明らかにし、*Tpn2* もやはり非自律性因子であると結論した。このことは、優性の *Speckled-activator* は *Tpn1* と *Tpn2* に共通に働く自律性因子であることを強く示唆するものである。(5) 上記の実験に付随して、アサガオゲノムから初めて分離された *Mu* 類縁の DNA型トランスポゾンの構造解析や転写制御因子の変異体と思われる *c-1* 変異体における種々のアントシアニン色素生合成系遺伝子 mRNA の減少などにも言及している。

本研究は、アサガオの易変性「吹掛け絞り」変異を同定し、易変性の「雀斑」変異や「吹掛け絞り」変異を引き起こしている非自律性 DNA 型トランスポゾンの構造上の特徴とこれらの変異による絞り模様の激しさを決める分子機構について論じたもので、審査委員会は学位論文として十分な内容を持つものと判定した。

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答発表後、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持つと判定した。

英語の能力に関しても、発表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。