

氏 名 各 務 孝

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第605号

学位授与の日付 平成14年3月22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 Spontaneous mutants having *Tpn1* -related
transposable elements inserted into the gene encoding
anthocyanidin synthase in the Japanese morning glory

論 文 審 査 委 員	主 査 教授	西村 幹夫
	教授	長谷部 光泰
	教授	飯田 滋
	教授	堀内 嵩

論文内容の要旨

The *ANS* gene encoding anthocyanidin synthase catalyzes 2-oxoglutarate-dependent oxidation of leucoanthocyanidins to yield anthocyanidins in the biosynthesis pathway of anthocyanin pigments. The *ANS* gene was first isolated from maize and snapdragon, mutants of which are deficient in pigmentation: the mutations in the *A2* (*ANS*) gene caused by insertion of transposons in maize control coloration in the aleurone layer of the kernel and a large deletion mutation including the *candi* (*ANS*) gene in snapdragon confers completely acyanic flowers. Although several *ANS* cDNAs were isolated from various tissues of plants including flowers of petunia and torenia subsequently, no insertion mutations in the *ANS* genes affecting flower pigmentation have been reported.

The wild-type Japanese morning glory (*Ipomoea nil* or *Pharbitis nil*) bears blue flowers, and a number of mutants related to the color and shape of its flowers have been isolated since the 17th century in Japan. All of the mutants available are spontaneous mutants and most of them were isolated more than 60 years ago. Several lines of evidence indicate that an *En/Spm*-related transposable element *Tpn1* and its relatives are common spontaneous mutagens in the plant. Here he describe that three spontaneous mutants displaying stable white flowers and a newly isolated mutable line exhibiting white flowers with red sectors are caused by insertion of *Tpn1*-related transposable elements into the *ANS* gene of the Japanese morning glory.

Three stable white flower mutants, *r-3*, Carol White and Waisei-asagao-hakushoku, were found to carry an identical insertion of the 6.6-kb *Tpn1*-related transposable element, *Tpn8*, at the promoter of the *ANS* gene. No excision of *Tpn8* could be detected by PCR analysis, indicating that the insertion mutation appeared to be quite stable. While Carol White and Waisei-asagao-hakushoku showed stable null mutant phenotype, *r-3* displayed a leaky phenotype since pale red pigmentation was observed when its flowers were wilting. In consistent with this notion, reduced but significant amount of the *ANS* mRNA accumulation was detected by RT-PCR analysis in the floral organs of the *r-3* mutant.

Another newly isolated mutable line, Shibori-chidori, that exhibits white flowers with red spots and sectors, was isolated about three years ago from a red flower cultivar Beni-chidori. Molecular analysis showed that the 6.4-kb *Tpn1*-variant, *Tpn9*, inserted into the unique intron of the *ANS* gene. The flower variegation is due to the somatic excision of *Tpn9* from the *ANS* gene. *Tpn9* and *Tpn1* are 6422 bp and 6412 bp, respectively, and their size differences are mainly due to the lengths of a particular A-stretch within the elements. Compared with *Tpn1*, *Tpn9* contains 13 single nucleotide alterations.

To their knowledge, the mutants described here are the first *ANS* insertion mutants deficient in flower pigmentation. Since the mutable line Shibori-chidori was isolated recently, *Tpn1*-related elements still act as an active spontaneous mutagen that would generate new interesting traits in the Japanese morning glory.

論文の審査結果の要旨

多くの花の色を決めるアントシアニン色素の生合成経路に関する分子遺伝学的研究は精力的に行なわれ、多くの知見が蓄積しつつある。しかしながら、色素の発色段階である無色のロイコアントシアニンから有色のアントシアニンへの変換に関わるアントシアニン合成酵素[Anthocyanidin synthase (ANS)]をコードする遺伝子については、幾つかの植物種より cDNA が分離されてその構造が報告されてはいるが、ANS 遺伝子の変異に関してはトウモロコシの *AN2(ANS)* 遺伝子内にトランスポゾンが入り込んだために穀粒の呈色が欠損した挿入変異と白色花を咲かせるキンギョソウの ANS 遺伝子を含む大きな欠失変異が報告されているだけであった。

申請者は花の色や形に関する多種多様な自然突然変異体が分離され、かつて詳細な古典遺伝学的解析が行われたアサガオの多数の白色花を咲かせる自然突然変異体を解析し、それらの中の3変異体が何れも ANS 遺伝子のプロモーター領域内の同一部位に約 6.6 kb の *Tpn8* と名付けた *En/Spm* 系のトランスポゾンによる挿入変異であることを明らかにした。これら変異体は一見すると純白の花を咲かせているように見えるが、実際は極く少量の ANS 遺伝子の発現によるアントシアニン色素の生合成も起こっており、それが萎れた花卉が薄紅色になる原因であることも明らかにした。次いで、約3年程前に自然突然変異体として分離された白色地に赤いスポットやセクターを生じる易変性 (mutable) 変異もやはり *Tpn9* と名付けた *Tpn8* 類縁の *En/Spm* 系のトランスポゾンが ANS 遺伝子のイントロン内に挿入した変異であることを明らかにした。得られたトランスポゾン *Tpn9* の配列は最初に同定されたアサガオの易変性“雀斑”変異において分離されたトランスポゾン *Tpn1* の配列と全領域にわたって非常に高い相同性を示した。これらの結果は *Tpn8* も含めて *Tpn1* とその類縁因子がアサガオの主要突然変異原であろうとの従来の仮説を強く支持するものであった。なお、ここで同定された白色花自然突然変異は、花で発現する ANS 遺伝子の最初の挿入変異であり、また ANS 遺伝子イントロン内に *Tpn9* が挿入した変異は、最初に解析された ANS 遺伝子の易変性変異である。

本研究は、従来分離されていなかった ANS 遺伝子の挿入変異を同定して遺伝形質を解析し、さらにアサガオの自然突然変異原としての *Tpn1* 類縁のトランスポゾンの園芸的に重要な変異体の生成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もつものと判定した。

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、審査委員が論文の内容、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。これらの試問に対し申請者は相応の応答を行った。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足り得る学識と研究遂行能力を持つものと判定した。

英語の能力に関しても、英文で書かれた論文などから博士の学位に足る能力を有するものと判定した。