

氏 名 山 口 利 男

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第539号

学位授与の日付 平成13年3月23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 Identification and characterization of the *P<sub>r</sub>* gene that is responsible for blue flower pigmentation in the Japanese morning glory

論 文 審 査 委 員	主 査 教授	大隅 良典
	教授	飯田 滋
	教授	堀内 嵩
	教授	西村 幹夫

The coloration of blue flowers depends on the production of the appropriate anthocyanin pigments, the presence of metal ions and co-pigments, and vacuolar pH. An increase in vacuolar pH enhances blue coloration, however, little is known about the proteins that are responsible for raising the vacuolar pH. The Japanese morning glory (*Ipomoea nil*) normally displays bright blue flower. One of the mutable allele, named *purple-mutable* (*pr-m*) confers purple flowers with blue sectors owing to recurrent somatic mutation from recessive *pr-m* allele to the blue *Pr-r* (*Purple-revertant*) allele. In this study, He described detail of the identification and characterization of the *Pr* gene, that is necessary for displaying blue flower in the *I. nil*, and discussed the observations with regard to the blue flower coloration. Germinal revertant carrying *Pr-r* allele homozygously that displays blue flower was successfully obtained from *pr-m* line, and compared with *pr-m* line. No alterations were found in the anthocyanin pigment compositions between the *pr-m* and *Pr-r* lines whereas the vacuolar pH in the *pr-m* was significantly lower than that in *Pr-r*. These results indicate that the function of the *Pr* gene is to raise vacuolar pH. By comparing the *pr-m* and *Pr-r* with simplified transposon display methods (STDM), the *Pr* gene also cDNA were successfully isolated. A *Tpn1*-related transposon, *Tpn4* insertion was found within the exon 1 of the *Pr* gene in *pr-m* plant. This gene contained an open reading frame that is similar to the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger found in yeast, *Arabidopsis*, and rice. The *Pr* gene cDNA was able to complement the *nhx1* mutation for vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). A second copy for *Pr* gene was found in *I. nil* genome, but this copy was found to be pseudogene. The *Pr* gene was the most abundantly expressed in flower petals, and extensively found at around 12 h before flower opening, whereas no such increased expression was

observed in the flower of *Petunia hybrida*. This result indicates the abundant expression of *NHX1* genes before flower blooming was not common in all flowering plants. Since the *NHX1* genes that promote the transport of  $\text{Na}^+$  into the vacuoles has been known to be involved in salt tolerance, they can add another important role for blue flower coloration in the Japanese morning glory by the vacuolar alkalization.

## 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色に関わる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、紫色地に青色のセクターの花を咲かせるアサガオの易変性「紫」(purple) 変異の解明を試み、以下の諸点を明らかにした。(1) アサガオの易変性「紫」変異体と青色花を咲かせる復帰変異体を比較したところ、両者のアントシアニン色素の構成成分には変化は見られなかったが、花卉表層の搾汁の pH は復帰変異体の青色花の方が易変性変異体の紫花よりも高いので、易変性「紫」変異は花卉液胞の pH を上昇させて花を青色化させる遺伝子が易変性変異を起こしたものと推定した。(2) アサガオの自然突然変異体はほとんどが Tpn1 ファミリーと呼ばれる1群のトランスポゾンの挿入変異であることが明らかにされているので、易変性「紫」変異も Tpn1 ファミリーのトランスポゾンによる挿入変異であろうと想定し、このトランスポゾンを指標に易変性「紫」変異体と青色花を咲かせる復帰変異体のゲノム構造を比較して、易変性「紫」変異の原因遺伝子を同定を試みた。その結果、同定された遺伝子は、酵母の前液胞膜に存在する  $H^+/Na^+$  交換輸送体 NHX 遺伝子のホモログであることが判明した。(3) アサガオ NHX 遺伝子は酵母の *nhx1* 変異の示す高塩感受性を相補することから確かに輸送活性を持つことが確認された。(4) アサガオゲノム中には他にもう1コピーホモログが存在するが、これは不活性な偽遺伝子であることが解析の結果明らかとなった。従って NHX 遺伝子 mRNA は全て NHX 遺伝子由来であると考えられた。さらに NHX 遺伝子 mRNA は特に花卉で発現しており、約12時間に多量に蓄積することを見出し、このような NHX 遺伝子の発現様式は開花に伴う花卉の青色化に重要であろうと推測した。

本研究は、アサガオの易変性「紫」変異を同定し、開花に伴って花卉液胞の pH を上昇させ、花卉が青色化する際の液胞の  $H^+/Na^+$  交換輸送体の役割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的確な応答を行った。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、英文で書かれた学位論文と現在投稿中の論文から判断して十分な能力を有するものと判定した。