

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 東 未 来

論 文 題 目

花きの分子育種への応用に向けた

アサガオ由来 *InMYB1* プロモーターの

花卉特異的作動機構の解明

論文審査担当者

主 査	名古屋大学准教授	白 武	勝 裕
委 員	名古屋大学教授	森	仁 志
委 員	名古屋大学教授	松 本	省 吾
委 員	名古屋大学准教授	吉 岡	博 文
委 員	名古屋大学助教	太 田 垣	駿 吾

## 論文審査の結果の要旨

日本国内の花きの消費量は、近年低迷し続けており、国内の花き産業の維持あるいは活性化のためには、消費者のニーズに合った花きを生産し、消費者の購買意欲を増加させる必要がある。消費者に求められる花きの特性として、花持ち性や、美しい色、形などが挙げられる。これらの有用な形質を持つ花き品種は、長い時間と労力をかけて交配と選抜を繰り返す交配育種で作出されてきた。しかしながら近年は遺伝子組換え技術を活用した、新しい花き品種が作出されつつある。その代表例として、サントリーホールディングス株式会社が作出した青いバラ‘アプローズ’が挙げられる。青いバラは交配育種では作出が不可能とされてきたが、遺伝子組換え技術によって作出され、その珍しさから一般消費者に広く認知され話題となった。遺伝子組換え技術の利点は、同種異種由来に関わらず有用な形質を司る外来遺伝子を、直接、従来品種に導入することができるため、新品種作出にかかる時間を大幅に短縮できる点にある。遺伝子組換え技術によって花きの有用品種を作出するためには、美しい色や形、花持ち性などを司る有用遺伝子の特定に加え、導入遺伝子の発現を花卉で作動させるプロモーターが求められる。そこで本研究では、花きの分子育種において必要とされる、花卉特異的プロモーターの開発を試みた。本研究で着目したのは、アサガオの花卉特異的に発現し、アントシアニン合成を制御する転写因子 *InMYB1* をコードする遺伝子のプロモーターである。

まず、*InMYB1* 上流領域がアサガオ以外の植物において花卉特異的プロモーターとして機能するのかを検証するため、*InMYB1* 上流約 3 kb または 1 kb に *GUS* レポーター遺伝子を結合してシロイヌナズナに形質転換し、*GUS* 染色を行った。その結果、両領域とも明確な *GUS* 染色が花卉においてのみ確認され、花卉特異的に作動することが明らかとなった。その後の解析には、*InMYB1* 上流約 1 kb を *InMYB1* プロモーターとして用いた。*InMYB1* プロモーターが機能する花の発達ステージを調べたところ、若い蕾から開花後までのステージの花卉において作動することが明らかとなった。*InMYB1* プロモーターが花卉以外の器官において、特定の環境条件下で作動しないかを検証するために、光ストレス下や高濃度の糖を含む培地上での栽培を行い、*GUS* 染色を行った。その結果、*InMYB1* プロモーターはこれらの栽培条件下においても花卉以外で作動することはなく、*InMYB1* プロモーターは環境要因に左右されず、花卉特異性が非常に厳密であることが示された。

次に *InMYB1* プロモーターが実用花きにおいて機能するのかを検証するために、*InMYB1pro::GUS* をトルコギキョウに形質転換し、*GUS* 染色を行った。その結果、*InMYB1* プロモーターがトルコギキョウにおいても花卉特異的に作動することが明らかになった。さらに、*InMYB1* プロモーターが作動する植物種の範囲を検証するために、*InMYB1pro::GUS* をボンバードメント法によって多様な花きの花卉・花被に打ち

込み, *InMYB1* プロモーターの作動を検証した. その結果, キク, カーネーション, リンドウ, ストックなど多くの双子葉植物の花弁で *InMYB1* プロモーターが作動することが示された. 一方, ラン (デンドロビウムファレノプシス) においては GUS 染色のスポットが不明瞭であり, ユリにおいては GUS 染色のスポットが全く確認できなかった. 以上のことから, *InMYB1* プロモーターは双子葉植物で機能するが, 単子葉植物においては機能しない,あるいは機能したとして弱いということが推測された.

以上の結果から *InMYB1* プロモーターが花きの分子育種において使用可能な実用的な花弁特異的プロモーターである可能性が示唆された. そこで, 実際に *InMYB1* プロモーターを用いて花弁の形質の改変を試みた. ここでは花弁の質感 (表皮細胞の形状) に着目した. 表皮細胞の形状には *MIXTA* 遺伝子が関与しており, シロイヌナズナにおいては *MIXTA-like* 遺伝子として *AtMYB106* が報告されている. そこで, シロイヌナズナにおいて, *InMYB1* プロモーター下で *AtMYB106* (リプレッサードメイン SRDX またはアクティベーションドメイン VP16 を付与) を発現することによって, *AtMYB106* の機能を抑制あるいは促進させた. *AtMYB106* の機能を抑制したシロイヌナズナにおいては, 表皮細胞の伸長が抑制され, 花弁がしわになる表現型となった. 一方で, *AtMYB106* の機能を促進したシロイヌナズナにおいては, 表皮細胞の伸長が促進され, 花弁が内巻きになるという表現型が得られた. これらの表現型は花弁以外の器官・組織では一切見られないことから, *InMYB1* プロモーターを活用することにより, 花弁特異的に形質を改変できることが示された.

上記のように *InMYB1* プロモーターが花弁特異的プロモーターとして機能することが示されたが, この花弁特異性がどのように制御されているのかに興味を持たれる. 花の形態形成は, 4つの whorl (whorl 1, 2, 3, 4) において3クラスの MADS-box 遺伝子 (クラス A, B, C 遺伝子) が機能することによって, がく, 花弁, 雄ずい, 心皮の分化が決定するという ABC モデルによって説明されている. 花弁は whorl 2 において, クラス A 遺伝子と B 遺伝子が機能することによって発生する. そこで, *InMYB1* プロモーターが, 花弁が発生する位置情報 (whorl 2) を認識して機能しているのか, それとも位置情報には関係せず花弁的な組織が発生すれば機能するのかを検証した. まず, クラス C 遺伝子の機能抑制シロイヌナズナ (*CaMV35S pro::AG-SRDX*) において whorl 3 で発生した花弁における *InMYB1* プロモーターの作動を検証した. その結果 *InMYB1* プロモーターが whorl 2 だけでなく whorl 3 に発生した花弁においても機能することが示された. 次にクラス B 遺伝子の温度異存性変異シロイヌナズナ (*ap3-1*) において whorl 2 で発生したがあくにおける *InMYB1* プロモーターの作動を検証した. その結果, 発生位置が whorl 2 であっても組織があく化した場合には *InMYB1* プロモーターが機能しないことが示された. クラス A 遺伝子と B 遺伝子に加えて, 花器官形成に必須であるクラス E 遺伝子を異所発現させたシロ

イヌナズナにおいては、がくの一部が花弁化した花が得られた。この一部が花弁化したがくにおいて *InMYB1* プロモーターの作動を検証した結果、周縁部の白く花弁的部位では機能するのに対し、中心部の緑色のがくの部位では機能しないことが示された。以上の結果から、*InMYB1* プロモーターは花弁が発生する位置情報 (whorl) に関わらず、細胞レベルで花弁のアイデンティティを認識して機能することが明らかとなった。この結果は *InMYB1* プロモーターが花弁アイデンティティを持つ細胞を認識するマーカーとして利用できることを示しており、その活用が期待される。

*InMYB1* プロモーターは多様な植物種で花弁特異的に機能し、この花弁特異性は細胞レベルで制御されていることが明らかとなった。そこで次に、この花弁特異性を決定しているプロモーター領域 (シス配列) の特定を試みた。これまでは *InMYB1* 上流 1023 bp をプロモーターとして用いていたが、さらに領域を狭め、花弁特異的に機能する領域を特定した。その結果 *InMYB1* 上流 332-121 bp が花弁特異的作動に必要であることが示された。さらに、この 332-121 bp の領域を 3 連結し、TATA 配列 (転写活性化に関与する配列) と  $\Omega$  配列 (転写のエンハンサーに関与する配列) を結合しキメラプロモーターを構築したところ、*InMYB1* 上流 1023 bp よりもプロモーター活性値が強いことが明らかとなった。このキメラプロモーターを用いることにより、より強力な花弁特異的遺伝子発現が可能であり、花きの分子育種における活用が期待される。

以上のように、本研究によって見出されたアサガオ由来 *InMYB1* プロモーターは植物種を超えて花弁特異的に機能することが示された。この花弁特異的な作動は細胞レベルで制御されており、発生する位置に依存せず、花弁的組織に分化すれば作動するため、八重咲きの花など、特殊な形態の花においても利用できる可能性が考えられる。また、この花弁特異性を制御しているプロモーター領域は、*InMYB1* 上流 332-121 bp であり、この領域にエンハンサー配列を付加することによって、プロモーター活性を強化することにも成功した。今後 *InMYB1* プロモーターを活用し、これまでになかった花色や形の花き品種の作出や花持ち性の向上といったことが可能となるであろう。また、*InMYB1* プロモーターが花弁アイデンティティを持つ細胞を認識するマーカーとして活用できることを利用し、花弁の形態形成などの研究に応用されることも期待される。このように本研究の結果は、花弁の形態形成といった基礎研究と、花きの分子育種といった実用研究の両方に大きく貢献するものであり、審査委員会は本論文が博士 (農学) の学位論文として十分な価値があると認め、論文審査に合格と判定した。