

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 西山 泰孝

甘藷 (*Ipomoea batatas*) の一品種である Ayamurasaki は、塊根中に多量のアントシアニンを含む。このアントシアニンは他のアントシアニン色素と比較して安定性が優れているだけでなく、抗酸化作用や抗変異原作用等を持つ。また、紫味が強く鮮やかな特徴のある赤色を呈するため、生活習慣病の予防に効果のある食品着色料としての利用が期待されている。本研究においては、Ayamurasaki にアントシアニン生合成に関与する酵素である phenylalanine ammonia-lyase (PAL) 及び anthocyanidin synthase (ANS) の遺伝子を導入し、塊根中に蓄積するアントシアニン量が増加した形質転換植物体を取得することを目標とし、研究を行った。一方、過剰なアントシアニンの蓄積は植物体の生長を阻害することが予想されるため、本研究においては導入遺伝子の発現を制御するプロモーターとして維管束で発現する g2b プロモーター、およびシンク組織において発現する SD221 プロモーターを接続した。これら 2 種のプロモーターの下流に、パセリ (*Petroselinum crispum*) 由来 *pal2* cDNA (*PcPAL2*)、*I. batatas* cv Beniazuma 由来の *pal02* cDNA (*IbPAL02*)、アサガオ (*Ipomoea nil*) 由来 *ans* cDNA (*InANS*) をそれぞれ接続し、Ayamurasaki への導入を行った。

第 1 章では、目的遺伝子を導入した毛状根のアントシアニン生合成に関する性質の解析を行った。

*Agrobacterium rhizogenes* A13 株の感染により、g2bPcPAL2、g2bIbPAL02、g2bInANS、SDInANS が導入された Ayamurasaki 毛状根を取得した。取得した形質転換毛状根は、白色光の連続照射下で培養を行うことにより、アントシアニンの蓄積が見られるようになった。LS 培地に加え 1/4 LS 培地および PRL-4C 培地を用いて培養を行い、これら 3 種の培地上で培養した毛状根からアントシアニンを抽出し、色価の算出を行った。その結果、色価は PRL-4C 培地が最も高かったが、同種の遺伝子を導入したライン間での平均値に明確な差異は見られなかった。PRL-4C 培地中のショ糖濃度を改変した培地を用いて培養を行ったところ、導入遺伝子の種類に関わらずショ糖濃度の上昇に伴い色価が上昇する傾向が見られた。また、毛状根におけるアントシアニンの蓄積は表皮に限定されており、その組成は Ayamurasaki 塊根の外部組織のものに近い組成であった。導入遺伝子による色価の差が見られない要因の検討を行うため、液体培地で培養した毛状根を用いて導入遺伝子からの転写産物量およびタンパク質量の解析を行った。PAL 及び ANS の mRNA の検出を行ったところ、色価と mRNA 量に明確な相関関係は見られなかった。また、RT-PCR により導入遺伝子からの転写産物の検出を行ったところ、PAL 遺伝子を導入したラインでは転写が確認されないものがほとんどであり、転写レベルでのジーンサイレンシングが起きていることが示唆された。PAL 活性の測定を行うと、PAL 活性と mRNA 量に明確な相関関係が見られず、また、PAL 活性が低いラインにおいて色価が高い傾向が見られ、PAL 活性の制御によるアントシアニン含量の制御は困難であることが示唆された。ANS 遺伝子

を導入したラインでは全てのラインで導入遺伝子からの転写産物が確認されたが、ANS タンパク質はウェスタンブロットィングの検出限界以下の量であった。

以上で述べたように、毛状根培養によりアントシアニンを合成することに成功し、毛状根を用いたアントシアニン合成の初めての例を示した。導入遺伝子からの転写産物が確認され、代謝に関与する遺伝子の導入の基礎が示された。毛状根の培養では導入遺伝子の明確な効果が確認されなかったが、塊根と毛状根は異なった器官であることが原因として考えられる。このため、導入遺伝子の効果を確認するためには、目的遺伝子の導入された塊根を取得する必要があると考えられた。

第2章では、導入遺伝子を保持した形質転換 *Ayamurasaki* 植物体を取得することを目標として実験を行った。

*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 の感染による再分化個体、及び毛状根からの再分化個体を取得することを目的に実験を行い、既報に従って再分化個体の取得を試みたところ、脱分化したカルスは取得されたがカルスからの再分化は観察されなかった。しかし、毛状根からの再分化個体取得の試みでは、2ラインの毛状根より各1個体の再分化個体が取得された。今後の課題として目的遺伝子が導入された毛状根からの再分化個体取得がなされれば、遺伝子導入によるアントシアニンの増産への研究が大きく進展することを述べている。

以上、本論文は遺伝子導入による甘藷のアントシアニン増産に向けて、毛状根によるアントシアニンの合成を行ない、その生合成遺伝子導入とその発現解析を行なうと共に、アントシアニンを多量に蓄積させるために毛状根という培養形態から、毛状根の塊根化の誘導、あるいは再分化植物体を経た塊根形成の誘導などの方向性が必要であることを示したもので、学問上応用上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。