

氏名	渡邊 健太		
学位の種類	博 士 ( 生物工学 )		
学位記番号	博 甲 第 8 6 1 5 号		
学位授与年月日	平成 3 0 年 3 月 2 3 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on Genetic Engineering of Carotenoid Metabolism for Novel Flower Colour ( 新規花色のためのカロテノイド代謝の遺伝子工学に関する研究 )		
主査	筑波大学准教授	博士 ( 理学 )	小野 道之
副査	筑波大学教授	Ph.D.	渡邊 和男
副査	筑波大学教授	博士 ( 理学 )	菊池 彰
副査	筑波大学准教授	博士 ( 理学 )	山田 小須弥

## 論 文 の 要 旨

審査対象論文で著者は、現存するアサガオには無い黄色の花を再現するために、カロテノイドの合成経路遺伝子を導入、あるいは分解経路遺伝子をゲノム編集で失活する、遺伝子工学的・代謝工学的研究を行った。日本では花色の分子育種が盛んであるが、カロテノイドをほぼ含まない花卉を持つ植物に対して、著者は、カロテノイドを合成・蓄積させる道筋を示し、その有効性を検証している。

第 1 章で著者は、アサガオが花きのモデル植物であり、ナショナルバイオリソースの植物 9 種の 1 つであること、基本色は青色であるが、黄色、緑色、黒色以外の全ての色があること、黄色については江戸時代に多くの図版が残されていること、黄花の作出は多くの育種家の夢であり多くの研究があることをまとめた。その上で、花に含まれる黄色を示す 3 種の構造が異なる色素 ( フラボノイド、カロテノイド、ベタレイン ) の合成経路について総覧し、これらを遺伝子工学的に、他種の花きに対して、形質転換体を用いて行った研究の現状についてまとめた。3 種の色素の中から、著者はカロテノイドの色彩の鮮やかな点に注目し、カロテノイド合成系と分解系を代謝工学的に改変することを提案し、実験によってその有効性を検証することを述べている。

第 2 章で著者は、アサガオ (*Ipomoea nil*) に遠縁種のキバナイポメア (*Ipomoea obscura var. lutea*) の花のカロテノイドによる黄色を、アサガオの花弁に移植することを試みた。両者が遠縁であり交配による交雑育種ができないため、合成酵素遺伝子を形質転換により導入した。著者は、5 つのキバナイポメアのカロテノイド合成酵素遺伝子群を共同研究者より譲り受け、アサガオの白花系統 ( cv. AK77 ) に形質転換により導入した。その結果、mRNA のレベルは 10 倍から 1000 倍にまで高まったことを確認した。しかし、全カロテノイドの開花時の花弁における蓄積量は、元品種の 10 倍程度に留まり、視覚的に黄色くは見えなかった。しかしながら、著者はカロテノイドの定性分析を行い、いわゆる花卉タイプのカロテノイドである、zeaxanthin、neoxanthin をアサガオの花弁において新たに検出した。著者は、遺伝子工学によりカロテノイド合成経路を増強することで、化学的に黄花となることを明らかにした。同時に著者は、花弁においてカロテノイド分解経路の活性が高い可能性を考察している。

第 3 章で著者は、第 3 章で用いる基盤的技術であるゲノム編集法をアサガオに初めて適応した。本実験の目的は、効率良く、正確なジーンノックアウト法を確立することであり、著者は CRISPR/Cas9 を選択した。対象とした遺伝子は、花弁と茎を着色するアントシアニンの合成経路の中心的な酵素である dihydroflavonol-4-reductase ( DFR ) をコードする *DFR-B* である。*DFR-B* をノックアウトするとアント

シアニンを合成できなくなり、野生型の赤花と赤茎が、白花と緑茎の表現型となる。アグロバクテリウムの T-DNA 領域に、CRISPR/Cas9 の酵素遺伝子と、*DFR-B* の 20 bp のターゲット配列含む gRNA を発現する遺伝子カセットを載せて形質転換した結果、75% (24/36) の高い効率で白花の個体を作成することに成功した。著者が心配した体細胞キメラ及び、成長過程におけるノックアウト個体出現は観察されず、安定した周縁キメラ (L1 及び L2) が得られたのみであった。また、gRNA のターゲット配列との相同性から心配されたオフターゲットも塩基配列を調べた限り無かった。筆者は次章で用いるジーンノックアウト法をアサガオにおいて確立した。

第4章で著者は、花卉においてカロテノイドの分解に関する酵素遺伝子を探索し、そのノックアウトを行った。カロテノイドの分解は、carotenoid cleavage dioxygenase (CCD)により行われることが知られる。2016年に公開されたアサガオの全ゲノム塩基配列の中から、著者は、相同性検索等により CCD family の 7 遺伝子を同定し、定量 PCR 解析により、*InCCD4* が花卉でカロテノイドの分解に関わると推測した。次に著者は、*InCCD4* を第3章で適応した CRISPR/Cas9 法を用いてノックアウトし、花卉におけるカロテノイドの分解の抑制を試みた。その結果、得られたノックアウト個体は、全カロテノイドの花弁における蓄積量が 30 倍に増加し、視覚的にも黄色と判る花を咲かせた。これは、アサガオの花弁に対してのみならず、カロテノイドを含まない花卉について、世界で初めてのカロテノイドによる着色の成功である。

第5章で著者は、総合考察し、さらなるカロテノイド蓄積量の増加のためには、*InCCD4* の単独のノックアウトに加えて、色素体の発達促進因子やカロテノイド結合タンパク質の追加など、他の要素を追加・改変していくことの必要性について多方面から考察した。当該研究分野の将来を見通した優れた考察である。

## 審 査 の 要 旨

著者はアサガオを用いて花卉における遺伝子工学・代謝工学によるカロテノイドの合成と分解抑制を追求し、視覚的には黄色を呈する花卉を生じるまでに至った。これは、カロテノイドを含まない花卉を持つ植物を用いて行った初めての研究であり、高く評価できる。また、本研究で確立したゲノム編集法については、植物の花の色素をゲノム編集で改変した初めての結果にもなり、ゲノム編集法の植物分野における重要性を検証した結果として、高く評価できる。本研究で作出された *InCCD4* のノックアウト系統は、アサガオとして初めてのカロテノイドによる黄花であり、これは今後、総合的な育種により数十倍にカロテノイドの蓄積量を増やすことが期待できる始まりとして、高く評価できる。

平成 30 年 1 月 17 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (生物工学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。