

博士論文

体細胞変異に寄与するトランスポゾンに関する研究

百瀬 眞幸

目 次

	頁
第1章 序論	3
第2章 カーネーションの枝変わり変異を誘発する <i>hAT</i> トランスポゾン	6
2.1 緒言	7
2.2 材料および方法	9
2.2.1 植物材料	
2.2.2 色素分析	
2.2.3 PCR および塩基配列決定	
2.2.4 cDNA 解析	
2.2.5 <i>F3'H</i> 遺伝子の解析	
2.2.6 <i>Tdic101</i> の塩基配列決定とトランスポゾンディスプレイ	
2.2.7 <i>dTdic102</i> の塩基配列決定とトランスポゾンディスプレイ	
2.2.8 <i>Tdic101</i> の分布	
2.3 結果	14
2.3.1 枝変わりの分子レベルでの解析	
2.3.2 先祖返りの解析	
2.3.3 トランスポゾン <i>Tdic101</i> と <i>dTdic102</i>	
2.3.4 <i>Tdic101</i> の分布	
2.4 考察	27
第3章 トランスポゾン脱離により復帰したカーネーション花色の濃淡を決める遺伝子の解析	30
3.1 緒言	31
3.2 材料および方法	33
3.2.1 植物材料	
3.2.2 色素分析	
3.2.3 <i>GST</i> 遺伝子の解析	
3.3 結果	36
3.3.1 濃色変異体の <i>GST</i> 遺伝子	

3.3.2 <i>dTac1</i> 脱離により復帰した <i>GST</i> 遺伝子	
3.3.3 品種における各 <i>GST</i> 遺伝子の分布	
3.4 考察	44
第4章 ばれいしょ体細胞変異を誘発する <i>Stowaway</i> MITE	46
4.1 緒言	47
4.2 材料および方法	48
4.2.1 植物材料	
4.2.2 色素分析	
4.2.3 サザンブロットハイブリダイゼーション	
4.2.4 PCR 条件	
4.2.5 cDNA 解析	
4.2.6 ゲノム DNA 解析	
4.2.7 <i>dTstu1-2</i> とその挿入部位の解析	
4.2.8 MITE ディスプレイ	
4.3 結果	53
4.3.1 体細胞変異の原因酵素	
4.3.2 <i>F3'5'H</i> 遺伝子の解析	
4.3.3 可動な <i>Stowaway</i> MITE、 <i>dTstu1</i>	
4.4.4 <i>dTstu1</i> に類似した可動な MITE、 <i>dTstu1-2</i>	
4.4 考察	63
第5章 総合考察	65
5.1. 遺伝子の変異とトランスポゾン	66
5.2. 育種におけるトランスポゾンの利用	67
5.3. トランスポゾンと作物の進化	68
第6章 摘要	69
参考文献	73
謝辞	83

第1章 序論

作物の育種における遺伝変異の創出には、交配などによる種外を含めた遺伝資源からの遺伝情報の取り込みおよびそれら遺伝情報の組換えと、自然発生あるいは人為的な誘発による遺伝情報の機能破壊を含む機能改変が利用される。栄養繁殖性の作物、特に花卉や果樹において、体細胞変異による遺伝情報の機能改変は有用な育種的手段として用いられてきた。そして、体細胞変異の効率上昇を目的に、X線、 γ 線やイオンビームなどの放射線照射やエチルメタンサルホン酸やニトロソ化合物などDNA損傷を引き起こす化学物質の使用、ソマクローナル変異を引き起こす組織培養などが利用されてきた。体細胞変異の原因として、DNAレベルでは塩基置換、挿入、欠失、メチル化、脱メチル化、染色体レベルでは挿入、欠失、転座などがあげられる。このような遺伝情報の変化を引き起こすひとつの要因としてトランスポゾンの関与が考えられる。McCLINTOCK (1951)によりゲノム内を転移する因子として *Ac/Ds* が発見されて以来、各種のトランスポゾンが同定されてきた。特に、穀粒、花卉、果皮などに見られる色の変異や斑入りは、可視的に遺伝子の機能を把握できることから、色素合成に関与する遺伝子およびトランスポゾンの同定に貢献してきた(CLEGG and DURBIN 2000; KOBAYASHI *et al.* 2004; WINKEL-SHIRLEY 2001)。また、遺伝子同定的手段として、トランスポゾンを積極的に利用しトランスポゾンの挿入による遺伝子機能破壊を誘発するトランスポゾンタギングが用いられるようになり、モデル植物であるイネやシロイヌナズナでトランスポゾンタグラインが変異体遺伝資源として整備されている。

各種生物のゲノムが解読され、植物、動物を問わず真核生物ゲノムの大きな部分を多数のトランスポゾンが占めていることが明らかとなった。転移活性はみられないもののヒトゲノム(3Gb)の45%は、300万コピー以上のトランスポゾン由来の塩基配列からなる(INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM 2001)。0.4 Gbとゲノムサイズの小さい植物であるイネもゲノム塩基配列の2~4割がトランスポゾンに由来する(GOFF *et al.* 2002; INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT 2005; TURCOTTE *et al.* 2001; YU *et al.* 2002)。なぜこのように多くのトランスポゾンに由来する塩基配列がゲノムを構成しているのかは明らかになってはいない。トランスポゾンは、クラス1、クラス2のふたつのクラスに大別される。クラス1は、RNAへの転写を介しコピー & ペーストによりゲノム内を移動する。したがって、トランスポゾンは元の位置に挿入したまま新たな位置に挿入が生まれる。long terminal repeat (LTR) および非LTRの long interspersed nuclear element (LINE)、short interspersed nuclear element (SINE)と呼ばれるレトロトランスポゾンがクラス1に属する。これに対しクラス2はDNA型トランスポゾンとも呼ばれ、元の位置から新たな挿入位置へトランスポゼースと呼ばれる酵素を利用しカット & ペーストによりゲノム内を移動する(CHARLESWORTH *et al.* 1994; FINNEGAN 1992)。これらのトランスポゾンは、移動に際してトランスポゾンの切り出しに必要な酵素であるトランスポゼースを自らコードする自律性因子と、トランスポゼースをコードしない非自律性因子に二別される。非自律性因子の転移には、その因子外にコードされるトランスポゼースの供給が必要となる。クラス2トランスポゾンは、塩基配列の特徴やトランスポゼースの類似性から *hAT* (*Ac/Ds*)、*CACTA* (*Enl/Spm*)、*Mu*、*Mariner*、*MITE* (miniature inverted-repeat

transposable elements) などに分類される。これらほとんどすべてのトランスポゾン様配列はゲノム中を転移する能力を失っていると考えられるが、ゲノムや個々の遺伝子の進化に影響を与えてきたと示唆されている。このようなトランスポゾンの影響は単一の遺伝子の機能改変にとどまらず、挿入、脱離、染色体切断、過度の組換えなどを介したゲノムの再構成にもおよぶと考えられている(BENNETZEN 2000)。また、ゲノム中に数多く存在し 600 bp 以下と小さいトランスポゾンである MITE の転移に伴い、ポリ A シグナル、転写開始点、TATA ボックス、スプライシング部位、イントロンが運ばれ、新たな遺伝子が出現することも報告されている(Oki *et al.* 2008)。MITE の転移は分子系統学的にゲノムを比較することによる挿入位置の相違から予想されるが、実際に転移の能力を有する MITE はイネで最初に発見されたものの(JIANG *et al.* 2003; KIKUCHI *et al.* 2003; NAKAZAKI *et al.* 2003)ごく限られた報告があるにすぎない。

このようにトランスポゾン様配列は様々な真核生物種に数多く存在するが、実際に転移活性をもち体細胞変異に寄与するトランスポゾンは限られていると考えられる。また、どのようなトランスポゾンが育種の場面で利用されてきたのかについて議論するには知見が少ない。そこで本研究では、栄養繁殖性作物で実際に品種育成に用いられた色素に関する枝変わり、変異遺伝子および培養変異を解析することにより体細胞変異に関わる転移能を有するトランスポゾンを同定し、トランスポゾンが遺伝情報の破壊に関与することの検証を試みた。第2章ではカーネーションの枝変わりによる花色変異、第3章ではカーネーションの花色の濃淡を決める遺伝子、第4章ではプロトプラスト培養によるばれいしょの塊茎皮色の培養変異について、それぞれの変異の原因遺伝子を同定するとともに変異の原因を明らかにし、トランスポゾンが各々の変異に関与することを例証した。

第2章 カーネーションの枝変わり変異を誘発する *hAT*トランスポゾン

2.1 緒言

枝変わりは体細胞変異に由来する枝や個体が生じる事象であり、柑橘のような果樹や花きなど栄養繁殖性作物の育種において重要な変異創出の手段である(LIU *et al.* 2009; VAN HARTEN 2002)。品種育成上の重要性に関わらず、分子レベルで枝変わりを解析した例はあまり報告がない。たとえひとつの体細胞に遺伝的な変異が生じて、細胞分裂を経ない限り枝変わりは生じない。また細胞分裂した場合でも変異が葉や花卉の一部にとどまる場合も多い。クローン化を可能とする枝変わりが生じるためには、茎頂などの分裂組織に体細胞変異が起こる必要がある。茎頂分裂組織の表皮あるいは内層で独立に起こった体細胞変異は、垂層分裂により層内に維持され周縁キメラとなる(DAWE and FREELING 1991)。実際にキクとカーネーションでそれぞれ枝変わり系統間で表層と内層が遺伝的に異なること(SHIBATA *et al.* 1998; WOLFF 1996)、DNA のメチル化に相違があること(YOSHIDA *et al.* 2004)が報告されている。このような周縁キメラは、通常は独立に維持されている各層間がときとして入れ換わることにより不安定であることが知られている。例えば、表層と内層で異なる花色の遺伝情報を有する周縁キメラで、表層の細胞に傷害がおこり内層の細胞が表層を構成するようになると、色の異なる花が着生する。この場合、既に内在している遺伝的変異が、層の入れ換えによって表現型に現れる事象である。

このような体細胞に生じる遺伝的変異に、トランスポゾンの脱離が直接関与し枝変わりを起こすという知見もいくつか報告されている。白から赤へのブドウの果皮の枝変わりは、*Gret1* というレトロトランスポゾンがアントシアニン生合成を制御する遺伝子から抜け出ることにより、遺伝子機能が復帰した結果である(AZUMA *et al.* 2009; KOBAYASHI *et al.* 2004)。また、アサガオで、アントシアニン生合成に関わる *dihydroflavonol-4-reductase* (DFR) 遺伝子に挿入している *En/Spm* に属する *Tpn1* というトランスポゾンが抜け出ることにより、元来は斑入りの花をつける個体から単色の花を着生する枝が生じることが報告されている(INAGAKI *et al.* 1996)。トランスポゾンの直接的な関与以外の枝変わりの要因としては、*Gentiana* 属植物での 1 塩基置換(NISHIHARA *et al.* 2011)、ブドウでの大きな欠失(WALKER *et al.* 2006; YAKUSHIJI *et al.* 2006)の報告などがある。

カーネーション(*Dianthus caryophyllus*)は、世界的に重要な花きであり多数の品種が枝変わりにより育成されている。例えばシム系と呼ばれる約 400 の枝変わり品種は William Sim という 1 つの品種に由来する(MATO *et al.* 2000)。生育性や草型が同一で花の色のみ異なる品種群は、生産者がさまざまな花色の生産物を同一の栽培管理により効率よく生産することが可能であるために花きでは重要である。これまでにカーネーションの花色素やそれらの生合成に関わる遺伝子について多くの知見が得られている。カーネーションは花色素としてアントシアニンとカルコンの誘導体をもつが、アントシアニンとしてはペラルゴニンとシアニジンのみの存在が明らかとなっている(FUKUI *et al.* 2003)。また、カーネーションのアントシアニンとして濃いピンクで 3,5-di-O-(β -glucopyranosyl) pelargonidin 6"-O-4,6"-O-1-cyclic malate

(Pg3,5cyclicmalyldG)、紫色で 3,5-di-O-(β -glucopyranosyl) cyanidin 6''-O-4,6'''-O-1-cyclic malate (Cy3,5cyclicmalyldG)が同定されている(BLOOR 1998; NAKAYAMA *et al.* 2000)。

古典的な遺伝学的研究によりカーネーションの花色に関わるいくつかの遺伝子座が報告されているが、*R* 座がアントシアニン B 環の水酸基数を制御し、ペラルゴニジンの代わりにシアニンを合成するのに必要であることが報告されている(GEISSMAN and MEHLQUIST 1947)。その後、*R* 座と flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*)の酵素活性が密接な関係にあることが明らかとなった(SPRIBILLE and FORKMANN 1982)。*F3'H* はペラルゴニジンの前駆体であるジヒドロケンフェロールの B 環に水酸基を導入しシアニンの前駆体であるジヒドロケルセチンを生成する酵素である。*F3'H* 遺伝子はペチュニアから最初に単離されたが(BRUGLIERA *et al.* 1999)、カーネーションの *F3'H* 遺伝子は GenBank に可能性のある配列として DQ371290 が登録されているにすぎない。

カーネーションの花色に関わる遺伝子の多くが明らかとなっているが(ABE *et al.* 2008; BRITSCH *et al.* 1993; ITOH *et al.* 2002; MATO *et al.* 2000; MATSUBA *et al.* 2010; OGATA *et al.* 2004; YOSHIMOTO *et al.* 2000)、この中でアントシアニンの 5 位を配糖化する酵素である 5-O-glucosyltransferase の機能喪失遺伝子の原因が、LTR (long terminal repeat)レトロトランスポゾン *Ty1dic1* と LINE (long interspersed nuclear element-like sequence)である *Retdic1* のいずれかあるいは両配列の挿入によることが報告されている(NISHIZAKI *et al.* 2011)。また、*hAT*に属する非自律性のトランスポゾン *dTdic1* を遺伝子内部にもつ *DFR* 遺伝子と *chalcone isomerase (CHI)*遺伝子は、それぞれ花の斑の原因であることが報告された(ITOH *et al.* 2002)。*DFR* から *dTdic1* が脱離することにより、遺伝子機能が復帰しアントシアニンが合成されることにより、白地に赤の斑やセクターが現れると考えられた。また、*CHI* 遺伝子の場合、遺伝子の復帰により黄色地に白の斑やセクターが出現した。このように *dTdic1* の転移により可視的な変化が花卉に現れるが、枝変わりへの関与については記載がない。また、*dTdic1* は非自律性因子であるがこのトランスポゾンの転移に関与するトランスポゼースは同定されていない。

このような花色の斑や枝成りはカーネーションでしばしば観察される事象である。本研究では、紫色の品種ミセスパープルから得られた濃ピンクの枝成り品種ミセスピンクを材料に、紫から濃ピンクへの花色の枝成りについて、その原因を明らかにすることを目的に遺伝子レベルでの解析を行なった。

2.2 材料および方法

2.2.1 植物材料

濃ピンク花色であるポットカーネーション品種ミセスピンク(MPi)は、紫花色の品種ミセスパープル(MPu)の枝変わりとして得られた品種である(キリンビール株式会社)。その他のカーネーション品種は Barberet & Blanc, S.A.から入手した。*Dianthus chinensis*、*D. barbatus* および *Gypsophila elegans* の種子および品種男爵薯のタネイモ(*Solanum tuberosum*)は種苗店より購入した。すべての材料は温室で育成し、葉あるいは花卉より DNA および RNA を抽出し用いた。

2.2.2 色素分析

花卉から 10%酢酸により(10% w/v) 抽出した色素 10 μ l を、フォトダイオードアレイ検出器を装備した HP1100 システム(Agilent Technologies-Yokokawa Analytical Systems)により分析した。カラムは Inertsil ODS-2 (4.6 mm \times 250 mm, GL Sciences) を用い、カラム温度は 40°C とした。移動相には、A 液 (1.5% H_3PO_4)、B 液(1.5% H_3PO_4 , 40% 酢酸, 50% アセトニトリル)を用い、グラジエント条件を 0 \rightarrow 40 分(A:B=90:10 \rightarrow A:B=50:50)、流量を 0.8 ml/分とし、200-600 nm の吸収スペクトルを検出した。

2.2.3 PCR および塩基配列決定

本章で用いた PCR は、特に記載がない場合は以下の条件で行なった。95°C; 3 分の変性を行なったのちに、95°C; 30 秒、56°C; 30 秒、72°C; 2 分のサイクルを 30 回行い、最後に 72°C で 3 分伸長反応を行なった。本章の実験で用いた PCR 用のプライマー塩基配列を Table 2.1 に、また、それらのおよその位置を Fig. 2.1 に示す。塩基配列決定は、電気泳動により分離した DNA をゲル片から MagExtractor (Toyobo)を用いて回収し、直接あるいは TOPO TA cloning kit (Invitrogen)を用い pCR 4-TOPO ヘクローニングしたのちに、ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems)により行なった。

2.2.4 cDNA 解析

約 100 mg の色づき始めたつぼみの花卉あるいは葉から RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いてトータル RNA を抽出した。抽出した RNA を材料に GeneRacer kit (Invitrogen)により cDNA を合成した。*F3'H* 遺伝子の内部配列を明らかにするために 4 種の植物の *F3'H* 遺伝子、*Torenia hybrida*, GenBank accession no. AB057672 (UEYAMA *et al.* 2002)、*Glycine max*, GenBank accession no. AB061212 (TODA *et al.* 2002)、*Arabidopsis thaliana*, GenBank accession no. AF155171 および *Petunia hybrida*, GenBank accession no. AF155332 (BRUGLIERA *et al.* 1999)、に見出された 4 箇所の保存された領域に 2 組のプライマーを設計した。これらのプライマーを用いたネステッド PCR(1 回目増幅; プライマー1 とプラ

プライマー2、2回目増幅;プライマー3とプライマー4)により得られた増幅産物の塩基配列を決定した。次に得られた塩基配列からプライマーを設計し、GeneRacer kit (Invitrogen)を用いた5' RACE および3' RACEを行った。キットに添付のプライマーと明らかとなった塩基配列を基に設計した *F3'H* 遺伝子特異的プライマー(5'RACE1回目増幅;プライマー5、2回目増幅;プライマー6、3' RACE1回目増幅;プライマー7、2回目増幅;プライマー8)を用い、得られた産物をクローニングしたのち塩基配列を決定した。この配列からプライマー9と10を設計し *F3'H* cDNA 全長を増幅し塩基配列を決定した。

F3'H 遺伝子の転写解析のコントロールとして実施した、*chalcone isomerase (CHI)* 部分長の増幅は、GenBank accession no. AF250367 の配列を参考に設計したプライマー、DcCHIF と DcCHIR を用いた。

Tdic101 のトランスポゼース遺伝子の転写解析は、伸長反応を 72°C; 30 秒、25 サイクルとした RT-PCR により行なった。用いたプライマー組は以下である。*Tdic101* トランスポゼース; プライマー11 と 12、アクチン; DcActinF と DcActinR (MATSUBA *et al.* 2010)、*F3'H*; プライマー8 と 13。

2.2.5 *F3'H* 遺伝子の解析

DNA は約 100 mg の葉あるいは花弁から WALBOT and WARREN (1988)の方法を参考に抽出した。2種のプライマー組を用い(1回目増幅;プライマー9と14、2回目増幅;プライマー15と10)、ネステッドPCR(伸長反応5分)により *F3'H* 遺伝子の増幅を行なった。増幅産物は電気泳動の後ゲル片から回収し直接塩基配列を決定したが、MPu の第2エクソンだけは、プライマー16と17によるPCR(伸長反応30秒)により得られた増幅産物をクローニングした後に決定した。

MPi に現れた先祖返りした紫色の花弁から DNA を上述と同様に抽出し、プライマー18と19を使用したPCRによって得られた増幅産物の塩基配列を直接決定することによりフットプリント塩基配列を調査した。

2.2.6 *Tdic101* の塩基配列決定とトランスポゾンディスプレイ

F3'H 遺伝子上に設計した2組のプライマーを用いた(1回目の増幅;プライマー20と21、2回目の増幅;プライマー19と8)インバースPCR(伸長反応5分)により、MPi 特異的な1.7 kb産物を得、*Tdic101* を含む塩基配列を決定した。なお鑄型には *HindIII* で消化した後、4°Cでセルフライゲーションを一晩行なったMPiのDNAを用いた。得られた配列からプライマー22を合成し、*F3'H* 遺伝子の第2イントロン上のプライマー23との組み合わせで伸長反応5分のPCRを行い、MPi から3.2 kbの断片を得、*Tdic101* の残りの部分の塩基配列を決定した。

Tdic101 末端に外向きに設計したプライマー24およびトランスポゼース遺伝子に外向きに設計したプライマー25を用い、*HindIII* 消化後セルフライゲーションしたDNAを鑄型にしたインバースPCR(伸長反応

5分)により、*Tdic101* のトランスポゾンディスプレイを行なった。

2.2.7 *dTdic102* の塩基配列決定とトランスポゾンディスプレイ

Tdic101 の両末端の塩基配列にそれぞれ *Bgl*II 認識配列を 5'末に付加したプライマー 26 と 27 を用い伸長反応 5 分の PCR により、MPi の DNA から *Tdic101* 様断片を増幅した。増幅産物のうち比較的増幅量が多いと考えられた 0.7 kb の断片について塩基配列を決定し *dTdic102* 塩基配列とした。

dTdic102 のトランスポゾンディスプレイは、*Tdic101* の場合と同様に *Hind*III 消化後セルフライゲーションした DNA を鋳型に、インバース PCR(伸長反応 5 分)を利用し以下のプライマーを用いて行なった。上述の 0.7 kb の塩基配列上に外向きに設計したプライマー 28 と 29(1 回目増幅)、プライマー 30 と 31(2 回目増幅)。トランスポゾンディスプレイにおいて検出された MPi 特異的なバンドをゲルから回収し塩基配列を決定した。この配列からプライマー(プライマー 32 と 33)を作成し、*dTdic102* を含む配列を増幅した。また、このプライマー組により *dTdic102* 挿入のない対立遺伝子と考えられる断片および *dTdic102* 挿入がおこる前の対応する箇所を増幅し、塩基配列を決定した。

2.2.8 *Tdic101* の分布

Tdic101 のトランスポゼース遺伝子に設計したプライマー 12 と 25 を用い、各種植物での *Tdic101* の存在を評価した。ゲノム DNA は、各種植物の葉約 100 mg から WALBOT and WARREN (1988)の方法を用い抽出した。

Table 2.1 Primer sequences used in this study

No.	Primer	Sequence (5' to 3')
1	F3'HF1	GGNTTCGTNSAYGTNGTNGT
2	F3'HR1	GCCCKTTGNARNGTNAGNCCRTA
3	F3'HF2	AATTCNANNAGYMGNCCACC
4	F3'HR2	CGNCCNGCNCRCRAANGGDAT
5	F3'H5'GSP1	AAGTCGGAACCTCTTTGAT
6	F3'H5'GSP2	TAGCAAGGCCTTAATTTCTGTG
7	F3'H3'GSP1	AGCAGGAACAAAGCCAGTACA
8	F3'H3'GSP2	TAAACGGGTACCACATTCCCA
9	DcF3'HF1	CTCACATTACACCTCACTTAC
10	DcF3'HR2	CTGGTCTAATGCCTCACATTAT
CHI	DcCHIF ^a	TCTTGTCAATATGGCTACATCG
CHI	DcCHIR ^a	TGGAACACACTGGTTTACGAG
11	101F4	GGTCTAGTTAGTCAGCTACGG
12	101R2	CGGCATCCATCCAATCTTTGT
Actin	DcActinF ^b	CCGACCACCTCATGAAGATT
Actin	DcActinR ^b	AGCAATGTACGCCAGCTTCT
13	DcF3'HR3	GTAAGGTAAGCCCATAAGCCTCATCCA
14	DcF3'HR1	ACGACCCTTAGATGCACATCA
15	DcF3'HF2	TTCCTACCCACCAAAACAAAAC
16	DcF3'HF3	AGACGCGTGAATAATCATTCGA
17	DcF3'HR6	AGAAATGACTGAATCGAACTGC
18	DcF3'HF4	CCAGTACAAGTAGGACAAGTAC
19	DcF3'HR5	GTTTGAATAGTTATTGATTTGTAGAACGTC
20	DcF3'HR4	GTTAACAATTCAATACTCAGTACA
21	DcF3'HF7	TGAGACCATAGAGTAAATTTTATC
22	101R3	GAGACTCATAGTGGTTATATACA
23	DcF3'HF5	TCAGTAGAGCTGAATTAAGCCA
24	101R6	TCGTGCCGTGCACCGGTTT
25	101F3	TGATCCGGATTTGTATAAAGATG
26	101F1	AGATCTAGAGCTGGCAAACCGGTGC
27	101R1	AGATCTAGAGCTGGCAAAAAACGGGC
28	102R1	CCGTAACTTGCAGGAGAATG
29	102F1	CGAATACCGTGCTTTGGACG
30	102R2	GCACCGGTTTGCCAGCTCTA
31	102F2	CCCGTTTTTTTGCCAGCTCTA
32	102siteF	TACGTAGAGCTATATTATCATAAC
33	102siteR	ACTCACAGCTTATATGGTGTGT

a; The primer was used in Fig. 2.3a.

b; The primer was used in Fig. 2.3b.

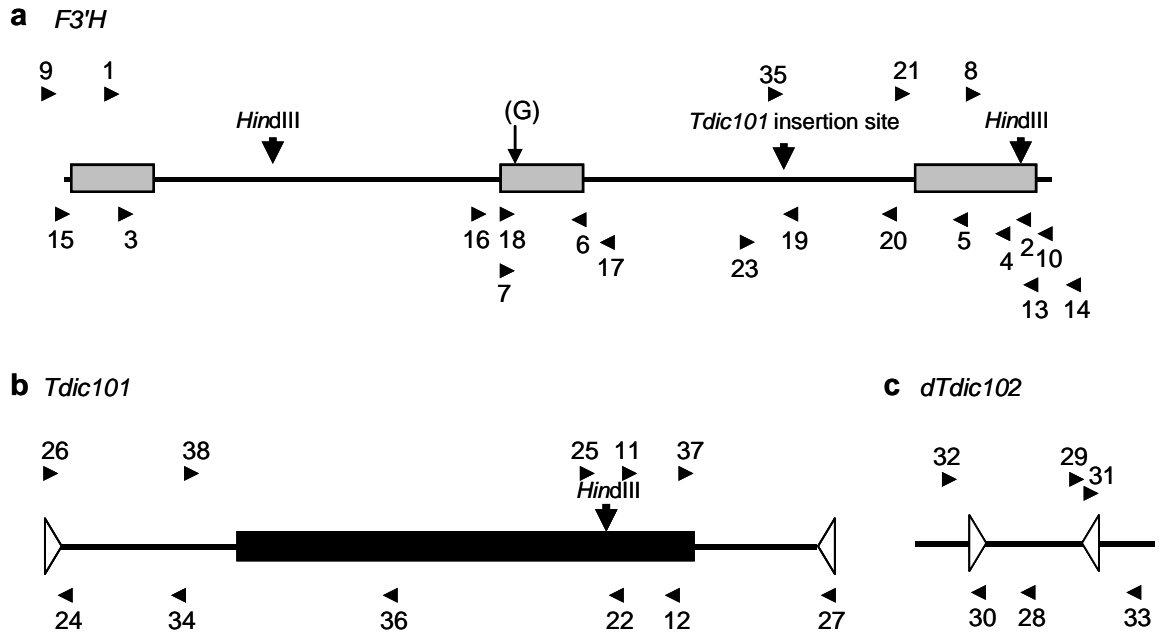


Fig. 2.1 Approximate positions of primers listed in Table 2.1 for *F3'H* (a), *Tdic101* (b) and *dTdic102* (c). Black arrow heads show primers and their orientation. Coding regions (shaded boxes) in *F3'H*, the transposase (black bar) in *Tdic101* and the TIRs (terminal inverted repeats, open triangles) are indicated.

2.3 結果

2.3.1 枝変わりの分子レベルでの解析

濃ピンク花色であるポットカーネーション品種ミセスピンク(MPi)は、紫花色であるミセスパープル(MPu)の枝変わりにより得られた品種であるが、時に紫色のセクターや紫花などの先祖返りがみられる(Fig. 2.2a-d)。両品種の花弁色素を分析したところ、MPi は 3,5-di-O-(β -glucopyranosyl) pelargonidin 6"-O-4,6"-O-1-cyclic malate (Pg3,5cyclicmalydG)、MPu は 3,5-di-O-(β -glucopyranosyl) cyanidin 6"-O-4,6"-O-1-cyclic malate (Cy3,5cyclicmalydG)を有することが明らかとなった。Fig. 2.2e に示すとおり、これら 2 つのアントシアニンの相違はアグリコン B 環 3'位の水酸基の有無のみである。このことから、紫から濃ピンクへの枝変わりに、ペラルゴニジンの前駆体であるジヒドロケルセチンの B 環へ水酸基を導入しシアニジンの前駆体であるジヒドロケルセチンを生成する酵素である flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H)が関与することが明らかである。F3'H の機能喪失により紫(MPu)から濃ピンク(MPi)への枝変わりが生じ、機能の復帰により紫への先祖返りが起こると考えられた。

そこで、RT-PCR により F3'H 遺伝子の転写を解析したところ、MPi 花卉では MPu に比べて顕著に転写物の量が少なかった。一方、色素合成において F3'H の上流の酵素である *chalcone isomerase (CHI)* 遺伝子の転写量は両品種で相違がなかった(Fig. 2.3a)。これら F3'H 増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンシングにより決定したところ、MPu の転写物は 514 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。一方、MPi の転写物は 1 塩基(G)の挿入によりフレームシフトしており 193 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。前者は機能を有すると考えられたが、後者は P450 のコンセンサス配列をもたない不完全なタンパク質であることから酵素活性をもたないと考えられた。ダイレクトシーケンシングではなく転写物をクローニングした場合、MPi に存在する 1 塩基挿入の転写物(フレームシフト遺伝子)は、MPu から頻度は少ないが検出された(8 クローン中 1 個)。このように、MPu 花卉からは正常な遺伝子と少量のフレームシフト遺伝子の 2 つの転写物が、MPi からはフレームシフト遺伝子のみが検出された。フレームシフト遺伝子の転写物量が少ない原因としては、真核生物で異常な mRNA を分解する仕組みである nonsense-mediated mRNA decay (MÉRAI *et al.* 2013)によることが考えられる。以上のとおり、MPu では機能すると考えられる F3'H 遺伝子が転写されているが、MPi では機能する F3'H 遺伝子転写物がなく、このことが F3'H 遺伝子の機能喪失の原因であった。

次に、なぜ MPi で正常な F3'H 遺伝子が転写されないのかを調べるために、F3'H ゲノム遺伝子の解析を行なった。F3'H は 3 つのエクソンと 2 つのイントロンからなっていた。MPu からは、上記転写物に対応する、正常な遺伝子(DDBJ accession no. AB731559)とフレームシフト遺伝子(DDBJ accession no. AB731560)が同定された。後者の 1 塩基の挿入(G)は第 2 エクソンに存在した。これら 2 種の遺伝子は第 2 エクソンの 1 塩基挿入以外は同一であり、MPu は F3'H をコードする R 座についてヘテロであると考え

られる。一方、MPiからは フレームシフト遺伝子のほかに、正常遺伝子の第2イントロンに4.3 kbの挿入配列をもつ遺伝子が存在することが明らかとなった (Fig. 2.4a, DDBJ accession no. AB731561)。MPiとMPuの *F3'H* 遺伝子の違いは、正常遺伝子に存在する挿入配列の有無のみであった。*F3'H* 遺伝子に外向きに設計したプライマーによるインバース PCR を行なうと、挿入配列が存在することにより予想される1.7 kbの断片がMPiにのみ増幅することにより、*F3'H* への挿入配列がMPi 特異的であることが確認された(Fig. 2.4b)。この4.3 kbの挿入配列が正常な *F3'H* 遺伝子転写物の存在を阻害していると考えられた。

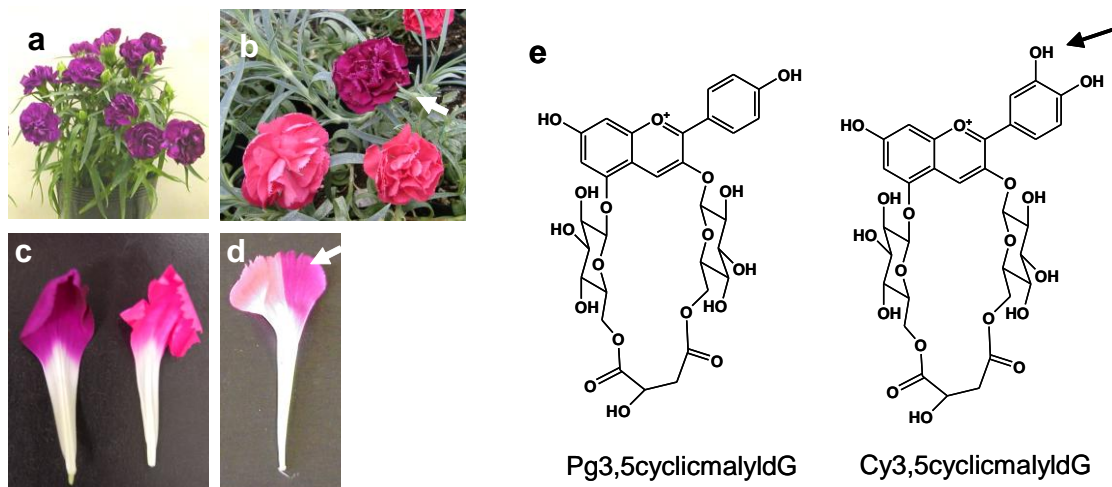


Fig. 2.2 Flower appearance in plants used in this study and anthocyanins detected in the petals. **a** Original purple-flowered cultivar, MPu **b** MPi, a bud mutant with deep pink flowers derived from MPu with a reverted purple flower (arrow) **c** Purple petal of the reverted flower from MPi (left) and the pink petal of normal MPi (right) **d** A variegated petal appearing in MPi with the reverted purple sector indicated by an arrow. **e** Anthocyanins present in petals of a pink-flowered bud mutant (MPi) and the original purple-flowered cultivar (MPu). MPi has 3,5-di-O-(β -glucopyranosyl) pelargonidin 6''-O-4,6'''-O-1-cyclic malate (Pg3,5cyclicmalyldG) while MPu has 3,5-di-O-(β -glucopyranosyl) cyanidin 6''-O-4,6'''-O-1-cyclic malate (Cy3,5cyclicmalyldG). An arrow indicates the difference between these two molecules.

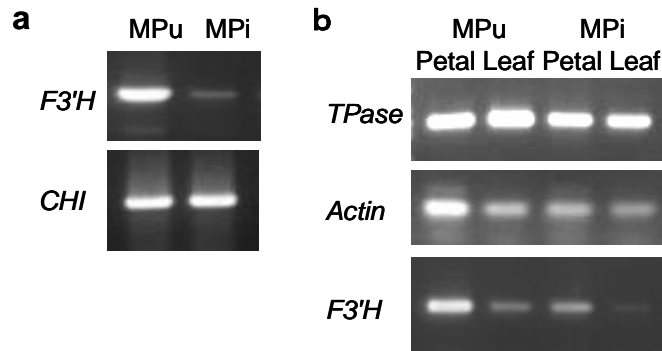


Fig. 2.3 RT-PCR analysis of *F3'H*, *CHI* and the transposase gene of *Tdic101*. **a** *F3'H* and *CHI* expression in petals. **b** Expression of the transposase gene of *Tdic101* in petals and leaves. *F3'H*; flavonoid 3'-hydroxylase, *CHI*; chalcone isomerase, *Tpase*; putative transposase encoded in *Tdic101*.

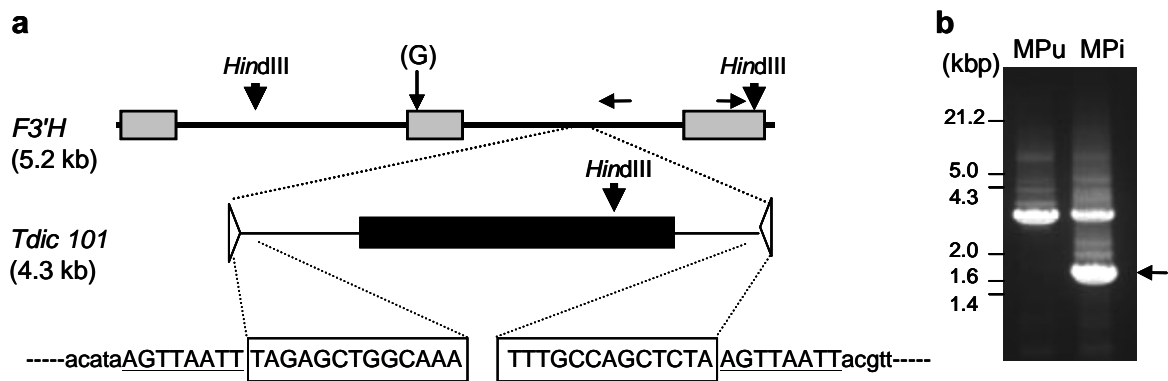


Fig. 2.4 Flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*) genes present in MPi **a** Schematic structure of copies of the *F3'H* gene. An extra nucleotide (G, vertical thin arrow) in the second exon causes a frameshift in one copy. Coding regions (gray boxes) are separated by two introns (lines). *Tdic101*, inserted into the second intron of the normal gene, contains an open reading frame encoding a transposase (black box) and is flanked by terminal inverted repeats (TIRs; triangles) the sequences of which are boxed, the target site duplication (TSD) of 8 bp (underlined) and the *F3'H* sequences proximal to the insertion site (lower case). *Hind*III recognition sites (vertical thick arrows) and primer positions (horizontal arrows) are indicated. **b** Inverse-PCR products, incl. the MPi-specific 1.7 kb fragment (arrow), amplified from self-ligated *Hind*III digested genomic DNA with outward primers as indicated in panel a. The migration of molecular weight markers is shown on the left.

2.3.2 先祖返りの解析

M_{Pi}に現れるピンクから紫への先祖返りは(Fig. 2.2b-d)、F_{3H}活性の復帰によると考えられる。そこで、先祖返りをおこした紫色花卉から DNA を抽出し、挿入配列周辺の F_{3H} 遺伝子塩基配列を確認することとした。先祖返りをおこした花卉の DNA では、正常遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR により挿入配列を持たないと考えられる大きさの断片が増幅した。用いた正常遺伝子特異的プライマー18(Table 2.1, Fig. 2.1)は、3'末がフレームシフト遺伝子と相違する塩基となるよう設計した。M_{Pi}に現れた6つの独立した紫色花卉(先祖返り)から抽出した DNA すべてで、M_{Pu}と同等の増幅がみられた。一方 M_{Pi} および紫色への先祖返りを起こした M_{Pi} のピンク部分から抽出した DNA からはほとんど増幅が観察されなかった(Fig. 2.5)。このように、紫色への先祖返りは 4.3 kb の挿入配列がなくなることに密接に関連していた。増幅産物の塩基配列を正常遺伝子と比較すると、先祖返りにより濃ピンクから紫色になった花卉では、挿入配列が消失した箇所に、正常遺伝子にはない数塩基のフットプリントが残っていることが明らかとなった。(Table 2.2)。これらのフットプリントは F_{3H} 遺伝子のエクソンではなくイントロンに存在することから、挿入配列がなくなることにより正常な F_{3H} 遺伝子の転写物から機能する酵素が産生され、紫色素が合成されたと考えられた。ここまでの知見から、紫色品種 M_{Pu} の正常な F_{3H} 遺伝子に 4.3 kb の配列が挿入することにより遺伝子機能が喪失し濃ピンクの枝変わり品種 M_{Pi} が生じ、時として起こる紫色への先祖返りはこの挿入配列の消失に起因することが明らかとなった。

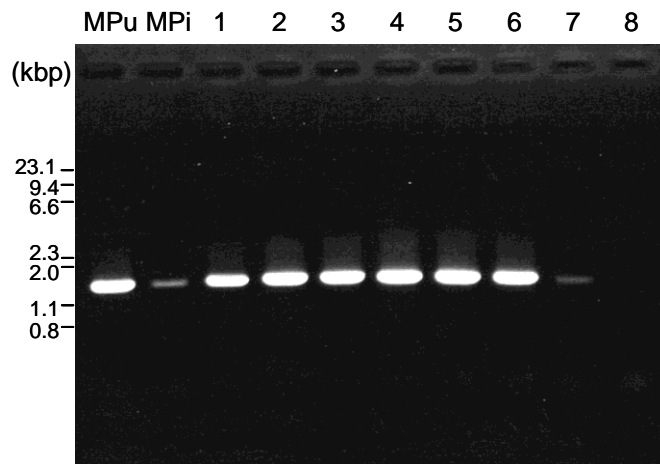


Fig. 2.5 Analysis of the vacated site of the 4.3 kb (*Tdic101*) insertion in the *F3'H* gene. PCR products are shown that are obtained with gene-specific primers on DNAs isolated from six different reverted, purple regions emerging in MPi flowers (1-6) or from pink regions in partly reverted variegated MPi flowers (7-8). Analysis by PCR of DNA isolated from MPu and MPi is shown and the migration of molecular weight markers is indicated on the left.

Table 2.2 Footprint sequences at the insertion site in *F3'H* after excision of *Tdic101* in six reverting purple petals independently emerging in MPi

	TSD[§]	TSD-derived sequence[‡]	TSD
MPu	----acataAGTTAATT		acggt----
MPi	----acataAGTTAATT	<i>TAGAGCTGGCAA-----TTTGCCAGCTCTA[†]</i>	AGTTAATT acggt----
1	----acataAGTTAAT	ACT	GTTAATT acggt----
2	----acataAGTTAAT	ACT	GTTAATT acggt----
3	----acataAGTTAAT	AA	GTTAATT acggt----
4	----acataAGTTAAT	AA	GTTAATT acggt----
5	----acataAGTTAAT	CT	GTTAATT acggt----
6	----acataAGTTAA	CT	GTTAATT acggt----

§ TSD = target site duplication (in upper case). Proximal *F3'H* intron sequences are in lower case.

‡ *hAT* element excision leads to TSD-derived inversions within the center of the footprint (Coen et. al 1986).

† The sequence of the terminal inverted-repeats of *Tdic101* (in italics) is presented for reference.

2.3.3 トランスポゾン *Tdic101* と *dTdic102*

カーネーションの *hAT* トランスポゾンである *dTdic1* が脱離する際にフットプリントを残すように (ITO *et al.* 2002)、クラス 2 トランスポゾンが脱離する際にはフットプリントが観察される。MPi の *F3'H* 遺伝子に存在する 4.3 kb の挿入配列は、*dTdic1* とは塩基配列の類似性はないが、*hAT* に属するトランスポゾンの特徴 (Rubin *et al.* 2001) を有しており、*Tdic101* と命名した。*Tdic101* に存在する 13 bp の末端逆位反復配列 (terminal inverted repeats; TIRs) は *hAT* に特徴的な配列からなり、挿入位置の両側に 8 塩基からなる target site duplication (TSD) が存在した (Fig. 2.4a)。また、内部に 814 アミノ酸からなるひとつのタンパク質をコードしていた。このタンパク質は *hAT* のトランスポゼースの特徴として報告されている 6 つの保存されたブロックを有し (Fig. 2.6)、キンギョソウの転移活性を持つ自律性トランスポゾンとして報告されている *Tam3* のトランスポゼースなど *hAT* トランスポゾンのトランスポゼースと相同性があった。そして、この *Tdic101* トランスポゼースは MPu、MPi いずれの品種でも花卉のみならず葉でも転写されていた (Fig. 2.3b)。このように *Tdic101* は自律性 *hAT* トランスポゾンの特徴を有している。

次に、*Tdic101* の末端とトランスポゼース内部にそれぞれ外向きに設計したプライマーを用いたインバース PCR によりトランスポゾンディスプレイを試みた。その結果、MPu、MPi いずれの品種にも *Tdic101* 様の挿入が少なからず存在すると考えられた (Fig. 2.7a)。また、両品種間に多型が観察されることから、挿入や脱離が MPu から MPi が出現するときあるいはその後に行っていることが示唆された。この実験では、*F3'H* 遺伝子に挿入する *Tdic101* は 2.8 kb の断片として検出されるはずだが、同様の大きさの異なる増幅産物があることにより判然としなかった。

Tdic101 の末端に設計したプライマーを用い PCR を行なうと、MPu、MPi いずれからも様々な大きさの増幅産物が得られた (Fig. 2.7b)。このうち比較的増幅量の多かった 0.7 kb の断片を MPi 増幅産物から回収、塩基配列を決定し *dTdic102* と命名した。*dTdic102* は 732 bp で *Tdic101* と同一の 13 bp からなる TIRs をもっていたが、トランスポゼースはコードしていなかった (DDBJ accession no. AB731562)。また、*dTdic102* の両端約 250 bp は *Tdic101* に類似していた (Fig. 2.7e)。

dTdic102 配列に外向きに設計したプライマーを用いたインバース PCR によるトランスポゾンディスプレイを行なったところ、少なくとも 1 つの MPi 特異的断片が検出され、*dTdic102* が転移能をもつトランスポゾンである可能性が示唆された (Fig. 2.7c)。Fig. 2.7c で矢印をつけた MPi に特異的なバンドを回収し塩基配列を決定し *dTdic102* の外側に設計したプライマーを用い PCR を行なったところ、MPu と MPi に共通なバンドのほかに、それよりもサイズの大きい MPi 特異的なバンドが増幅した (Fig. 2.7d)。これらのバンドの塩基配列を決定したところ、共通に増幅したバンドにはトランスポゾンは存在しなかったが、MPi 特異的バンドは *dTdic102* を含んでおり挿入位置の両側には 8 bp (CTAGGTAT) からなる TSD が存在した。以上のように、*dTdic102* は転移活性のある *Tdic101* 様の非自律性トランスポゾンであることが明らかとなった。

2.3.4 *Tdic101* の分布

Tdic101 トランスポゼースの一部を PCR により増幅し、*Tdic101* の有無を各種植物で評価した。用いたカーネーション品種すべておよび *Dianthus chinensis*、*D. barbatus* で期待されるサイズに強い増幅が観察された。一方同じナデシコ科に属するカスミソウ(*Gypsophila elegans*)や関連のないナス科作物であるばれいしょ(*Solanum tuberosum*)からは増幅産物は検出されなかった(Fig. 2.8)。このように、*Tdic101* はナデシコ属(*Dianthus*)に広く分布するトランスポゾンであると考えられた。

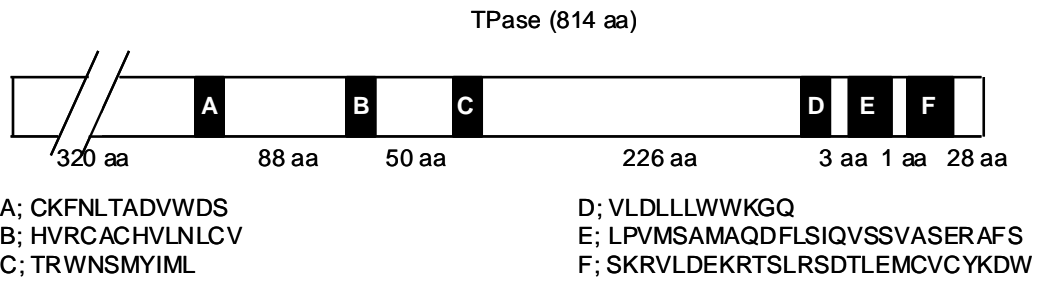


Fig. 2.6 Schematic structure of the putative *Tdic101* transposase (TPase). Black boxes represent the six conserved *hAT*-transposase motifs reported by Rubin *et al.* (2001). The number of amino acids (aa) separating these motifs in the *Tdic101* TPase are indicated.

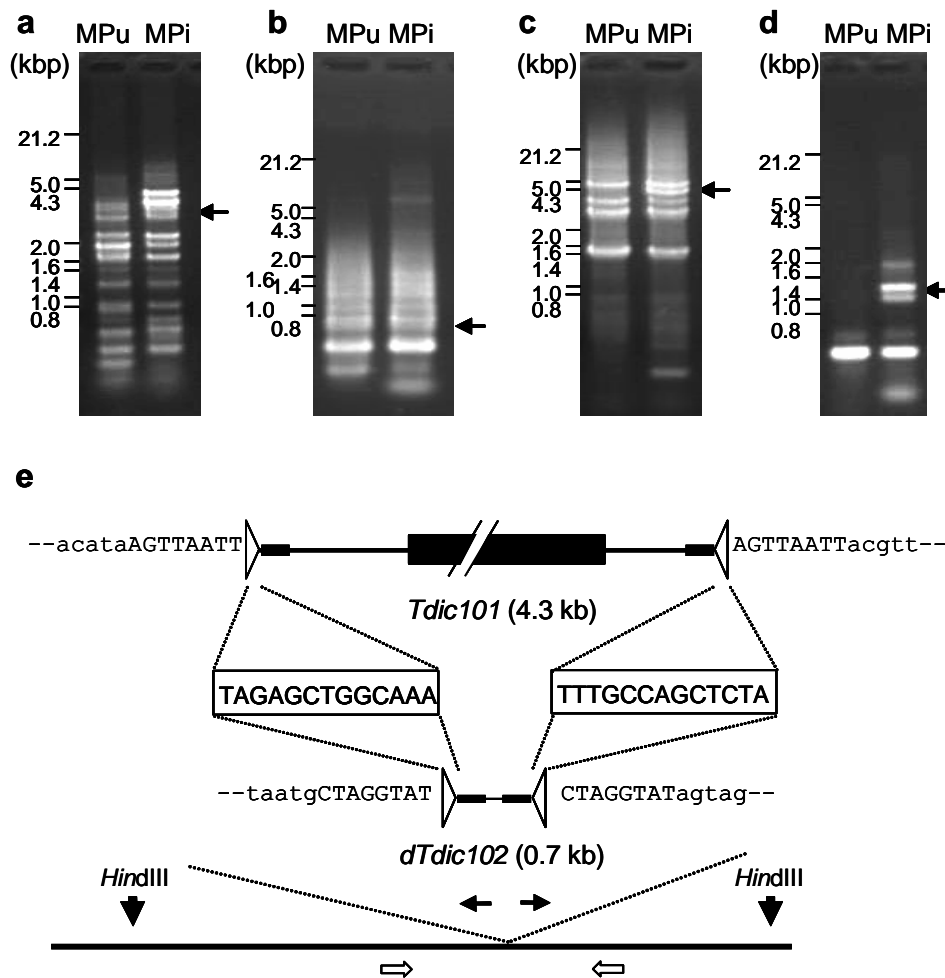


Fig. 2.7 Analyses of *Tdic101* related elements **a** Transposon display by inverse-PCR on self-ligated *HindIII* digested DNA with outward primers annealing to *Tdic101*. PCR products of 2.8 kb, the size expected for the fragment derived from *F3'H* containing *Tdic101* (in lane MPI), is indicated by an arrow. **b** PCR products obtained by primers annealing to the termini of *Tdic101*. The 0.7 kb fragment containing *dTdic102* is indicated by an arrow. **c** Transposon display by inverse-PCR on self-ligated *HindIII* digested DNA with outward primers annealing to *dTdic102*. The MPI-specific band analyzed in this report and used to design the primers for the experiment in panel d, is indicated by an arrow. **d** PCR products of *dTdic102* insertion sites. The arrow indicates the product containing *dTdic102* while lower bands correspond to sites without *dTdic102*. The migration of molecular weight markers is shown on the left. **e** Schematic comparison between *dTdic102* and *Tdic101* with indicated the regions of similar sequence (thick lines), the ORF for the TPase present in *Tdic101* (disrupted black bar), the terminal inverted repeats (TIRs; triangles) and their sequence (boxed), the target site duplication (TSD) of 8 bp (underlined) and the sequence proximal to the insertion site (lower case). Also shown is the MPI-specific genomic locus of *dTdic102* (black bar below) including *HindIII* sites (vertical arrows) and the position and orientation of the primers used for the experiments shown in panel c (black arrows) and panel d (open arrows).

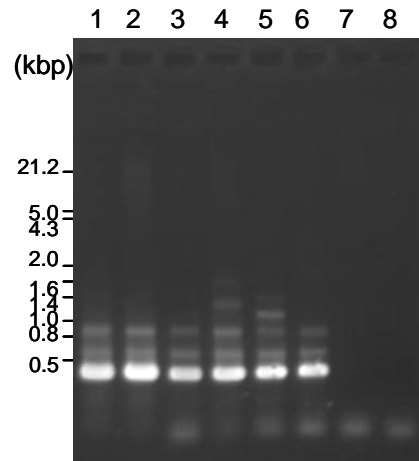


Fig. 2.8 Presence of the putative transposase-ORF of *Tdic101* in plant species. PCR products were obtained by amplification of a part of the putative transposase. 1; MPu, 2; MPi, 3; a carnation cultivar Tanga, 4; a carnation cultivar Vital, 5; *Dianthus chinensis*, 6; *D. barbatus*, 7; *Gypsophila elegans*, 8; *Solanum tuberosum*. The migration of molecular weight markers is shown on the left.

2.4 考察

転移活性のある *hAT* トランスポゾンである *Tdic101* が、本研究により同定されたカーネーションの色素合成遺伝子 *F3'H* に挿入することで遺伝子機能を破壊し、紫から濃ピンク花色への枝変わりの原因となったことが明らかとなった。変異元である紫品種(MPu)が持つ2つの *F3'H* 遺伝子のうちひとつは1塩基挿入によるフレームシフト遺伝子であり、この品種がヘテロであることがこのような枝変わり変異を起こしやすい主要な原因である。一般に体細胞変異は片方の対立遺伝子で劣性の方向に起こるので、標的の遺伝子座についてヘテロであることが、枝変わり変異の起こりやすさの大きな要因となる。

植物は、L1、L2、L3の3層からなるとされ、基本的にL1とL2層は垂層分裂により維持されるので遺伝的に独立している(SATINA *et al.* 1940; SUSSEX 1989)。配偶子はL2層の細胞から生じるので実生の場合、層独立に体細胞変異がおこるまでは遺伝的に均一である(HUALA and SUSSEX 1993)。栄養繁殖性の作物でしばしば観察される周縁キメラは、ある層におこった体細胞変異が基本的にはその層にとどまることにより生じる(DAWE and FREELING 1991)。このような周縁キメラはカーネーションでも観察され、層の入れ換えにより花色などの表現型に変化が生じ、時として不安定さの要因になる。カーネーションの花弁ではアントシアニンはL1層(外層)の細胞のみに蓄積するのでカーネーションの花色の変異の原因は以下の二つの可能性が考えられる。(1)L1層におこった体細胞変異による花色変異、(2)既に存在した体細胞変異により周縁キメラであった個体で層の入れ換えがおこり、L2あるいはL3層(内層)の細胞がL1層にでてくることによる内層の遺伝子型による花色変異。本研究のMPuからMPiへの変異は、内層を含むDNAを用いた実験においてもMPuに*Tdic101*をもつ*F3'H*遺伝子が存在しなかったことから、層の変換による花色変異ではなく、トランスポゾン*Tdic101*の挿入が花色変異の直接の原因である。同様に、MPiにみられる紫色の先祖返りも*Tdic101*脱離部分にMPiに存在しなかったフットプリントがみられることから、層の変換ではなく*Tdic101*の脱離が直接の原因である。なお、*Tdic101*の脱離がL1層の細胞でのみ起こる可能性は十分に考え得る。

トランスポゾンの転移による体細胞変異から枝変わりが生じるためには、トランスポゾンの転移が葉や花の分化の早いステージに生長点でおこる必要がある(IIDA *et al.* 1999)。そうでないと変異部分は一部分に限られてしまう。MPiにおいて時として出現する紫への先祖返りは、花弁に現れるセクターのみ、一部の花弁のみ、花全体などで観察された(Fig. 2.2b-d)。このことから*Tdic101*は、少なくとも*F3'H*への挿入箇所からは、分化の様々なステージの分裂細胞で転移する能力をもっていると考えられる。また、*Tdic101*のトランスポゼースが葉と花弁いずれでも転写されていることから(Fig. 2.3b)、栄養組織、生殖組織いずれでも転移する可能性があると考えられる。

新品種育成の道具としてのトランスポゾンによる体細胞変異を考えると、頻度高い先祖返りは品種の安定性の面から問題である。このような観点からは、効率よく転移を促すことが可能であり変異体が得られ

るのであれば、コピー&ペーストで転移し脱離することが稀であるクラス 1 トランスポゾンのほうが有利であると考えられる。*Tdic101* が属するクラス 2 トランスポゾンはカット&ペーストで転移するため抜け出る可能性がある。遺伝子のエクソンに挿入することで変異が誘発された場合には、抜け出るときに残すフットプリントによりフレームシフトや終始コドンの生成などの変異が期待されるので、再転移により変異形質を安定化することが可能である。しかし、本研究の場合のようにイントロンへ挿入することにより創出された変異の場合は、抜け出ることにより遺伝子機能が復帰する可能性が高い。このような場合、品種育成にトランスポゾンを利用するためには、トランスポゾンを活性化および安定化する要因を見出し制御することが重要となる。キンギョソウ(*Antirrhinum majus*)の自律性 *hAT* トランスポゾン *Tam3* は低温により転移活性が顕著に増大することが知られている(CARPENTER *et al.* 1987; HARRISON and FINCHAM 1968)。この低温での活性化は、温度に依存した *Tam3* DNA のメチル化程度の変化により、トランスポゼースとの親和性が変化することによると報告されている(HASHIDA *et al.* 2006)。さらに低温での転移活性化に、トランスポゼースの核への局在が関与していることが報告された(FUJINO *et al.* 2011)。*Tdic101* も *Tam3* と同様に低温で転移活性が高い傾向が観察された。MPi を最高温度 20°C、最低気温 10°C で栽培した場合、51 花のうち 35 個に紫のセクターが観察された(69%)。一方、25-30°C 一定で栽培した場合には 45 花のうち 3 個で紫色セクターが観察されたに過ぎなかった(6.7%)。このように低温で約 10 倍の頻度で紫への先祖返りが観察された。このような *Tdic101* の低温での転移活性の上昇が、*Tam3* と同じようなメカニズムで生じるのか否かはたいへん興味深い。しかし、*F3'H* 遺伝子に挿入している *Tdic101* のみが低温で活性化されるのか(*Tdic101* が挿入している遺伝子自身の転写などが温度により変化するからなのか)、多くの *Tdic101* 様トランスポゾンが低温で活性化されるのかについては注意して検討する必要があると考えられる。トランスポゾンの活性化、安定化のメカニズム解明は、トランスポゾンによる枝変わりを効率よく品種育成へ利用するために重要である。

Tdic101 様の非自律性トランスポゾンとして発見された転移活性をもつ *dTdic102* の TIRs は *Tdic101* と同一であった。また、*dTdic102* はその両側 0.25 kb の配列が *Tdic101* と類似しているが、トランスポゼースはコードしていなかった。この *dTdic102* の転移にはトランスポゼースが必要であるが、TIRs の同一性や両端の塩基配列相同性から *Tdic101* にコードされるトランスポゼースが *dTdic102* の転移に関与する可能性は高いと考えられる。*in vitro* あるいは、類似のトランスポゾンを持たない異種生物内で *Tdic101* のトランスポゼースを発現させ検証する必要がある。

2013 年末になって、赤花色のカーネーション品種 Francesco のゲノム塩基配列の 91% (569 Mb) が明らかとなった(YAGI *et al.* 2013)。この報告によれば、Francesco の *F3'H* 遺伝子は本研究で明らかとなったフレームシフト遺伝子と同じである。また、ゲノム内には 16,000 強の DNA トランスポゾンが存在し、*Tdic101* と 99% 相同であるコピーが見出されたと報告されている。このコピーのトランスポゼース遺伝子は ORF の途中で終始コドンがあり、転移活性は期待できないと考察されている。

本研究により、トランスポゾンの挿入が枝変わりの一要因であることが示されるとともに、転移活性を有しトランスポゼースをコードするトランスポゾンと転移活性を有するトランスポゼースを持たない非自律性トランスポゾンが同定された。カーネーションのように枝変わりを利用して多くの品種が育成される作物では、転移活性のあるトランスポゾンが頻度高く存在するのかもしれない。そのようなトランスポゾンの性状を活性化と安定化の面から研究することは、品種開発に利用される枝変わり変異の効率向上に寄与するものと考えられる。

第3章 トランスポゾン脱離により復帰したカーネーション花色の 濃淡を決める遺伝子の解析

3.1 緒言

第2章で述べたとおり、カーネーション(*Dianthus caryophyllus*)は世界で主要な花きであり多様な花色の品種が育成されてきた。カーネーションの花色素は主にアントシアニンとカルコンの誘導体であり、その合成に関わる種々の遺伝子が同定されている(ABE *et al.* 2008; BRITSCH *et al.* 1993; ITOH *et al.* 2002; MATO *et al.* 2000; MATSUBA *et al.* 2010; OGATA *et al.* 2004; YOSHIMOTO *et al.* 2000)。

カーネーションの花色の濃淡については、半世紀以上前に行われた遺伝的な解析によりS座が花卉のアントシアニン量を規定するとされている。優性対立遺伝子Sにより赤、濃ピンク、クリムゾン、紫などの濃花色、劣性対立遺伝子sによりサーモン、ライトピンク、ラベンダーなどのうすい花色となる(MEHLQUIST and GEISSMAN 1947)。また、この報告ではs^{var}対立遺伝子が、サーモン色のバックグラウンドに赤いストライプが現れるなど、淡色のバックグラウンドに濃色の模様を引き起こすことが報告されている。

花色の濃淡は、花卉細胞内の色素量に大きく影響される。そして、色素がアントシアニンの場合、その量は生合成の能力と色素が蓄積する液胞への輸送の能力により規定されると考えられる。液胞への隔離にはトランスポーターとグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)が必要であることが明らかとなっているが、グルタチオン化されたアントシアニンが検出されていないことからGSTの酵素活性が輸送に必要なかどうかは明らかとなっていない(KOES *et al.* 2005)。GSTによるグルタチオン化ではなくGSTタンパク質そのものの必要性が示唆されているが、アントシアニンの輸送についてはいまだ未解明な部分が多い(ZHAO and DIXON 2010)。

アントシアニンの輸送に関与するGST遺伝子は、トウモロコシの穀粒でアントシアニンの液胞への蓄積に必要であるBZ2遺伝子がGSTをコードすることが明らかとなって以来(MARRS *et al.* 1995)、様々な植物種から単離されている。これまでに、ペチュニアのAN9(ALFENITO *et al.* 1998)、シロイヌナズナのTT19(KITAMURA *et al.* 2004)、シソのPfGST1(YAMAZAKI *et al.* 2008)、ブドウのVvGST1およびVvGST4(CONN *et al.* 2008)、シクラメンのCkmGST3(KITAMURA *et al.* 2012)などが報告されている。カーネーションでは、花卉のアントシアニン量が少ない淡色変異fl3において、トウモロコシのGST遺伝子であるBZ2あるいはペチュニアのGST遺伝子であるAN9を一過的に花卉細胞で発現させることによりアントシアニン蓄積がおこることが報告されており(LARSEN *et al.* 2003)、アントシアニン輸送にGSTが関与することが明らかとなっている。また、この報告でも、淡色地に濃色の斑点やセクターを示す易変な対立遺伝子fl3-mが記述されており、fl3-mがトランスポゾンをもつことおよび易変性を活性化する遺伝子座として見出されたRfl3-mがこのトランスポゾンの転移に必要なトランスポゼースをコードすることが考察されている。しかしながら、S座とfl3座の関係は明らかにされておらず、fl3座の遺伝子および易変性の原因と考えられるトランスポゾンも明らかとなっていない。

近年、カーネーション花色の濃淡に関与する217アミノ酸をコードする遺伝子DcGSTF2が同定された

(SASAKI *et al.* 2012)。この遺伝子産物は Phi クラスに属する GST タンパクで、系統樹解析によると *An9* や *TT19* と同じクレードに属する。また、この報告では、うすいピンク花色の品種 *Daisy* とうすいピンクのバックグラウンドに濃いピンクのストライプが入る変異体 *Daisy-VP* に機能を喪失した2つの遺伝子 *DcGSTF2mu* および *DcGSTF2-dTac1* (GenBank accession no. AB688111) が存在することが報告されている。前者は、第 3 エクソンにある塩基置換により終止コドンが生成し 101 アミノ酸からなる不完全なタンパク質をコードしている。後者は、正常な遺伝子の第 1 イントロンに CACTA タイプの非自律性トランスポゾンである *dTac1* が挿入している。さらに、*Daisy-VP* の濃ピンクのストライプ部分から抽出したゲノム DNA を解析すると、*dTac1* が脱離し挿入していた部分にフットプリントをもつ配列が検出されることが報告されている。このことから、*dTac1* が *DcGSTF2-dTac1* から抜け出すことにより遺伝子機能が回復し、濃いピンクの部分ができることが示唆された。

本研究では、*DcGSTF2-dTac1* に存在するトランスポゾン *dTac1* が転移能を有すること、転移が遺伝子復帰の原因であることを確認するとともに、複数品種の *DcGSTF2* 遺伝子を調査した。

3.2 材料および方法

3.2.1 植物材料

カーネーション品種 Daisy(安定な淡ピンク花色)とその花色変異体 Daisy-VP(淡ピンク地に濃ピンクのストライプ)および Daisy-VPR(安定な濃ピンク花色)は温室で栽培し、DNA 抽出の材料とした(Fig. 3.1a-c)。品種 Spectrum (Fig. 3.1e)は農業生物資源ジーンバンクから入手した。育種系統である 06-LA (Fig. 3.1d)に Spectrum の花粉をかけ 8 個体の後代が得られた。これら後代は温室で開花に至るまで栽培し花色を確認するとともに DNA 抽出の材料とした。他の品種の DNA は生産者の温室でサンプリングした葉から抽出した。

3.2.2 色素分析

Daisy-VP の花弁を淡ピンクと濃ピンクの部分に切り分け、10%酢酸により(10% w/v) 抽出した色素 10 μ l を、フォトダイオードアレイ検出器を装備した HP1100 システム(Agilent Technologies-Yokokawa Analytical Systems)により分析した。カラムは Inertsil ODS-2 (4.6 mm \times 250 mm, GL Sciences) を用い、カラム温度は 40°C とした。移動相には、A 液(1.5% H_3PO_4)、B 液(1.5% H_3PO_4 , 40% 酢酸, 50% アセトニトリル)を用い、グラジエント条件を 0 \rightarrow 40 分(A:B=90:10 \rightarrow A:B=50:50)、流量を 0.8 ml/分とし、220-600 nm の吸収スペクトルを検出した。アントシアニン、フラボノールおよび桂皮酸は吸光スペクトルにより確認し、それぞれ 530 nm、360 nm、330 nm の吸光度により定量した。3 回の独立した実験により平均および標準誤差を算出した。

3.2.3 GST 遺伝子の解析

DNA は約 100 mg の葉から DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用い抽出した。本研究で用いた PCR プライマーの配列を Table 3.1 におよその位置を Fig. 3.2 に示す。GST 遺伝子は 2 つの断片に分け、プライマー P1 と P3 (fragment 1)および P2 と P4 (fragment 2)を用い PCR により増幅した(Fig. 3.2)。PCR は、95 °C; 3 分の変性のあと、95 °C; 30 秒、56°C; 30 秒、72°C; 5 分のサイクルを 30 回行い、最後に 72°C; 3 分の伸長反応を行った。PCR 増幅産物は、電気泳動の後 MagExtractor (Toyobo)を用いゲル片から精製し、そのままあるいは pCR4-TOPO \rightarrow TOPO TA cloning kit (Invitrogen)を用いクローニングした後に、ABI PRISM310 (Applied Biosystems)により塩基配列を決定した。*DcGSTF2mu* の存在は、fragment 2 の塩基配列における第 3 エクソンの終止コドンの有無により確認した。*dTac1* が抜け出た後に残るフットプリントも fragment 2 の塩基配列から確認した。プライマー P2 と P5 を用いた PCR および P3 と P6 による PCR により *DcGSTF2-dTac1* の存在を確認した。これらの PCR は、95 °C; 3 分の変性ののち、95 °C; 30 秒、56°C; 30 秒、72°C; 30 秒のサイクルを 30 回行い最後に 72°C; 3 分の伸長反応を付加し実施した。

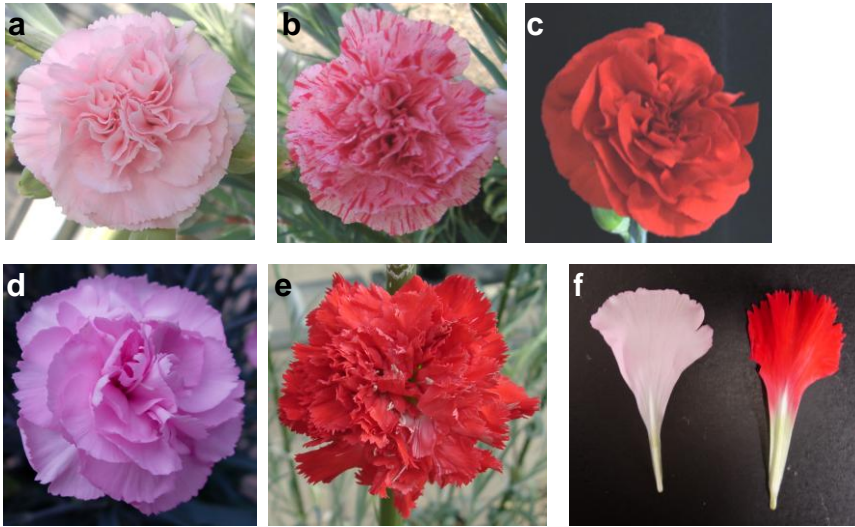


Fig. 3.1 Flower appearance of genetic material used in this study.
a Daisy, **b** Daisy-VP, **c** Daisy-VPR, **d** 06-LA, **e** Spectrum, **f** petal appearance of 06-LA (left) and Spectrum (right).

Table 3.1 Primer sequences used in this study

No.	Sequence (5' to 3')	Note
P1	TAATCAAGTAAGAAAAATGGGAGT	<i>DcGSTF2</i> 5' UTR forward
P2	GTGCAACCAACCAATGAGAA	<i>DcGSTF2</i> 1 st intron forward
P3	TCTGCCGTTGTCTACCAGTG	<i>DcGSTF2</i> 1 st intron reverse
P4	GTCTGCTCAAACCTGCACGAG	<i>DcGSTF2</i> 3' UTR reverse
P5	TACCGCTGTCTGGCGACTA	<i>dTac1</i> upstream reverse
P6	GAAGTTAGGGGGAGAAGCTG	<i>dTac1</i> downstream forward

3.3 結果

3.3.1 濃色変異体の GST 遺伝子

濃ピンク花をつける Daisy-VPR (Fig. 3.1c)は、淡ピンクに濃ピンクのストライプが入る Daisy-VP (Fig. 3.1b)から偶発的に得られた個体である。Daisy-VPR の花卉および Daisy-VP の花卉の淡ピンク部分と濃い部分の色素を分析したところ、いずれも同じ色素 3,5-di-O-(β -glucopyranosyl) pelargonidin 6"-O-4,6"-O-1-cyclic malate を持つことが明らかとなった。アントシアニン量は生育環境や花の生育ステージにより大きな影響を受けるので、Daisy-VP を用い同じ花の淡ピンク部分と濃ピンク部分のアントシアニン量を比較することにした。その結果、アントシアニンの量が淡ピンクに比べ濃ピンクで 7 倍ほど多いことが明らかとなった(淡ピンク; $0.52 \pm 0.03 \mu\text{mol/g f.w.}$ 、濃ピンク; $3.63 \pm 0.32 \mu\text{mol/g f.w.}$)。また、フラボノールの構成や量には両者で大きな相違はなかった。色素に相違がなくアントシアニン量のみが異なることから、両部分の色の相違はアントシアニン量によることが明らかである。これらの結果より、アントシアニン量に關与する *DcGSTF2* の機能復歸が色の变化を引き起こしていることが予想された。

Daisy-VP は 2 つの機能しない遺伝子、*DcGSTF2mu* と *DcGSTF2-dTac1* を持つことが報告されている。そこで濃色への変異が *dTac1* の転移に起因するか否かを検証するために Daisy-VPR の GST 遺伝子を調査した。Fig. 3.3a に示すとおり Daisy-VPR では、*dTac1* と GST 遺伝子に設計したプライマーを用いた PCR で増幅産物がみられず、*DcGSTF2-dTac1* から *dTac1* が消失していると考えられた。GST 遺伝子塩基配列を決定したところ、Daisy-VPR は 2 種の遺伝子、*DcGSTF2mu* と、*DcGSTF2-dTac1* から *dTac1* が消失したあとにフットプリントが残っている *DcGSTF2rev1* を有していることが明らかとなった。Daisy および Daisy-VP で、*dTac1* は GST 遺伝子の第 1 イントロンに TGG の 3 塩基からなる target site duplication (TSD) の間に挿入しているが、Daisy-VPR では、その部分の配列が TGGTGG ではなく TGCATGG となっていた(Fig. 3.2)。このようなフットプリント配列を残すのはトランスポゼースを介したトランスポゾン転移の特徴であることから、*dTac1* が転移活性のあるトランスポゾンであることが明らかとなった。以上、元となった品種と濃色変異体の GST 遺伝子の相違は *dTac1* の有無とフットプリント配列のみであった。*dTac1* はイントロンに存在するので、*DcGSTF2rev1* はフットプリント配列が存在するものの正常に機能する遺伝子であると考えられる。可動な非自律性のトランスポゾン *dTac1* が *DcGSTF2-dTac1* から抜け出ることにより GST 遺伝子が復歸し、淡ピンクから濃ピンクへの花色変異が起こったと結論した。

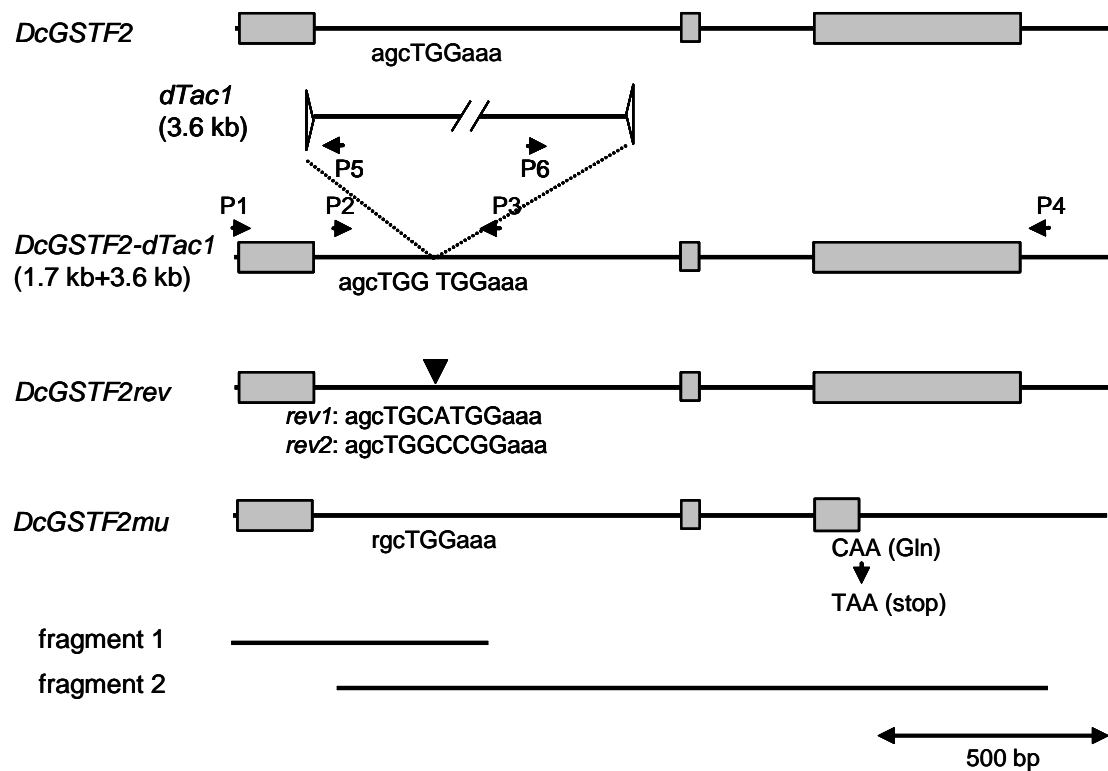


Fig. 3.2 Schematic structure of the *GST* genes. Coding regions (gray boxes) are separated by two introns (lines). *DcGSTF2* (top) is the wild type gene. In a defective gene named *DcGSTF2-dTac1* a transposable element, *dTac1*, is inserted into the first intron between the duplicated target sequences, TGG. The element is flanked by terminal inverted repeats (open triangles). In the reverted genes, *DcGSTF2rev1* and 2, footprint sequences, TGCATGG and TGGCCGG, respectively are present at the site where *dTac1* was inserted (arrowhead). Another defective gene, *DcGSTF2mu*, has an incomplete third exon due to a nucleotide substitution from CAA to TAA resulting in a stop codon. Primer positions for primers P1-P6 used in this study are indicated by horizontal arrows. Sequences of the *GST* genes were analyzed using PCR-amplified fragment 1 (with primers P1 and P3) and fragment 2 (with primers P2 and P4).

3.3.2 *dTac1* 脱離により復帰した *GST* 遺伝子

MEHLQUIST and GEISSMAN (1947)により、古い赤花色の品種 Spectrum(赤、Fig. 3.1e, f 右)は、S 座についてヘテロであることが報告されている。fragment 1 および 2 の塩基配列から、Spectrum が、フットプリントをもつ *DcGSTF2* (*DcGSTF2rev2*) および *DcGSTF2-dTac1* を有することが明らかとなった。*DcGSTF2rev2* は *DcGSTF2rev1* と異なる TGGCCGG からなるフットプリントが *dTac1* 挿入位置にあり (Fig. 3.2)、*DcGSTF2-dTac1* から *dTac1* が脱離することにより生じたと考えられた。Spectrum は濃花色の品種であり機能する *DcGSTF2* が必要であることから、Daisy-VPR と同様の理由により *DcGSTF2rev2* は機能する遺伝子であり、脱離は Spectrum が育成される以前に起こったと考えられた。

育種系統 06LA (ラベンダー、Fig. 3.1d, f 左)は淡花色であることから S 座について劣性ホモであると考えられる。fragment 1 および 2 の塩基配列から 06-LA が第 3 エクソンにストップコドンのある機能しない *DcGSTF2mu* のみをもつことを確認した。ここで、*GST* 遺伝子と *dTac1* それぞれに設計したプライマーを用いた PCR により *DcGSTF2-dTac1* が Spectrum のみに存在することが確認された (Fig. 3.3b)。

06-LA と Spectrum の交雑後代は、濃花色(ヘテロ、Ss)と淡花色(劣性ホモ、ss)が 1:1 に分離すると予想された。得られた後代は濃花色 5 個体(紫あるいはクリムゾン)、淡花色 (ラベンダーあるいは淡ピンク) 3 個体であった。両親および交雑後代の *GST* 遺伝子についてゲノム DNA を解析した結果を Table 3.2 に示す。淡花色の交雑後代はすべて、それぞれ種子親、花粉親に由来する *DcGSTF2mu* と *DcGSTF2-dTac1* の 2 つの機能しない遺伝子を有することが明らかとなった。また、濃花色(紫、クリムゾン)の交雑後代は、種子親由来の機能しない *DcGSTF2mu* と機能すると考えられる花粉親由来の *DcGSTF2rev2* を有していた。このように *DcGSTF2rev2* は濃花色後代にのみ存在したことから *DcGSTF2rev2* が濃花色に必要な機能する *DcGSTF2* 遺伝子であることが示された。また、S 座が *DcGSTF2* をコードし、*DcGSTF2rev2* が優性の S 遺伝子、*DcGSTF2mu* および *DcGSTF2-dTac1* が劣性の s 遺伝子であるという仮説に矛盾がない結果が得られた。また、後代に *DcGSTF2rev2* 以外のフットプリントが検出されなかったことから、Spectrum の *dTac1* は転移に関して安定であり、このことが検定交雑の解析を容易にしたと考えられた。

Table 3.2 GST genes present in the pale-colored parent 06-LA (lavender), deep-colored parent Spectrum (red) and their progeny

Line	<i>DcGSTF2rev2</i>	<i>DcGSTF2mu</i>	<i>DcGSTF2-dTac1</i>
06LA	-	+	-
Spectrum	+	-	+
Deep ^a	+	+	-
Pale ^b	-	+	+

a; progeny with deep-colored flowers, purple or crimson

b; progeny with pale-colored flowers, lavender or pale pink

+: present, -: absent

3.3.3 品種における各 GST 遺伝子の分布

次に、濃花色(赤および濃ピンク)と淡花色(淡ピンク)のカーネーション 6 品種を用い GST 遺伝子を調査した(Table 3.3)。調査した 4 つの淡花色品種すべてで、機能しない *DcGSTF2-dTac1* が検出された(Fig. 3.3c)。Lucia、Opal、Toja ではもう一方の遺伝子は *DcGSTF2mu* であった。Fantasia では、*dTac1* と GST 遺伝子に設計したプライマーによる PCR により *dTac1* を含む fragment 2 の大きさから予想される断片のみが増幅したことから(Fig. 3.4)、*DcGSTF2-dTac1* のみを持っていると考えられ、*DcGSTF2-dTac1* のホモであると示唆された。濃花色品種である Tanga (赤)と Vital (濃ピンク)は、*DcGSTF2mu* と、それぞれ *DcGSTF2rev1* あるいは *DcGSTF2rev2* を有することが明らかとなった。*DcGSTF2rev1* および *DcGSTF2rev2* は、フットプリントが *dTac1* 挿入位置に存在することから、*DcGSTF2-dTac1* に由来すると考えられる。このように *DcGSTF2* に加え、*DcGSTF2-dTac1* から *dTac1* が脱離することにより生ずる *DcGSTF2rev1* あるいは *DcGSTF2rev2* が、カーネーションの育種に利用されてきたことが示された。また、機能しない遺伝子として *DcGSTF2mu*、*DcGSTF2-dTac1* が広く利用されていると考えられた。*DcGSTF2rev2* と *DcGSTF2-dTac1* は半世紀以上前に育成された古い品種である Spectrum に存在したことから、少なくとも両遺伝子は長期にわたりカーネーション育種に利用されてきたといえる。

Table 3.3 GST genes present in the cultivars

Cultivar	Flower color	<i>DcGSTF2rev1</i>	<i>DcGSTF2rev2</i>	<i>DcGSTF2mu</i>	<i>DcGSTF2-dTac1</i>
Lucia	pale pink	-	-	+	+
Opal	pale pink	-	-	+	+
Toja	pale pink	-	-	+	+
Fantasia	pale pink	-	-	-	+
Tanga	red	+	-	+	-
Vital	deep pink	-	+	+	-

+: present, -: absent

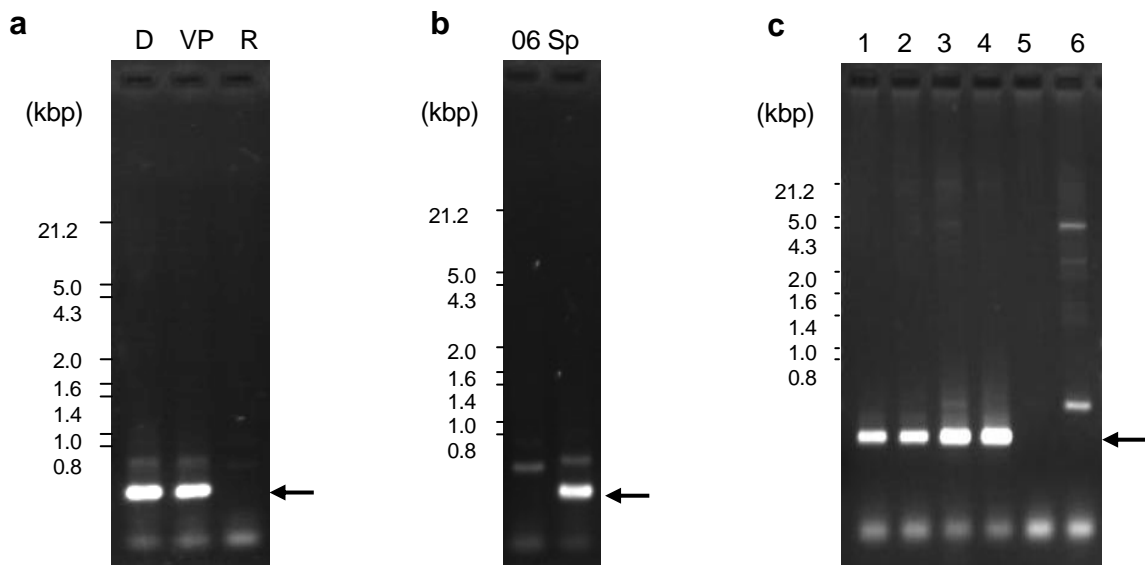


Fig. 3.3 Presence of *DcGSTF2-dTac1* in cultivars. Primers P3 and P6 were used to amplify a part of *DcGSTF2-dTac1* by PCR. **a** Daisy (D), Daisy-VP (VP) and Daisy-VPR (R). **b** 06-LA (06), Spectrum (Sp), **c** Pale-colored cultivars, Lucia (1), Opal (2), Toja (3), Fantasia (4) and dark-colored cultivars, Tanga (5), Vital (6). Arrows indicate the expected fragment size from *DcGSTF2-dTac1* amplified with primers P3 and P6. The migration of molecular weight markers is shown on the left.

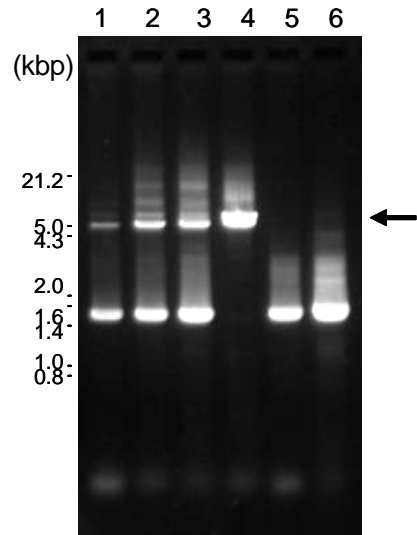


Fig. 3.4 Analysis of fragment 2 of the *GST* gene in cultivars. Primers P2 and P4 were used for PCR amplifications. Pale-colored cultivars, Lucia (1), Opal (2), Toja (3), Fantasia (4) and dark-colored cultivars, Tanga (5), Vital (6). The arrow indicates the expected fragment size of *DcGSTF2-dTac1*. The migration of molecular weight markers is shown on the left.

3.4 考察

本研究により、2つの優性遺伝子 *DcGSTF2rev1* と *DcGSTF2rev2* には *dTac1* の挿入位置にフットプリント配列があるので、両遺伝子が *DcGSTF2-dTac1* から *dTac1* が脱離することにより生じた復帰遺伝子であることが示された。そして、この CACTA ファミリーに属する非自律性トランスポゾンが、濃色への変異体である Daisy-VPR でフットプリントを残し脱離していたことから可動なトランスポゾンであることが明らかとなった。*dTac1* はトランスポゼースをコードしていない非自律性因子であるので、転移には他の遺伝子座にコードされるトランスポゼースの供給が必要である。

MEHLQUIST and GEISSMAN (1947)により報告された *S* 座と LARSEN *et al.* (2003)により報告された *FL3* 座の関係は明らかにされていないが、これら2つの独立した報告は少ないアントシアニン量による淡花色という同じ表現型を研究している。前者では *s^{var}* が斑の入る易変性を規定する対立遺伝子として記載されており、後者では易変性を規定する対立遺伝子として *fl3-m* が報告されている。さらに *fl3-m* がトランスポゾンを含むことおよび易変性を活性化する因子 *Rfl3-m* がトランスポゼースをコードすることが考察されている。しかし現在のところ、この易変性に関与するトランスポゾンもトランスポゼースも明らかにはなっていない。Daisy-VP の花に現れる濃色のストライプは *DcGSTF2-dTac1* から *dTac1* が脱離することにより生じると考えられるので、易変性を示す対立遺伝子である *s^{var}* および *fl3-m* が *DcGSTF2-dTac1* をコードしている可能性は高いと思われる。Spectrum は *DcGSTF2-dTac1* を持つにも関わらず *s^{var}* ではなく劣性の遺伝子として *s* をもつと記載されている(MEHLQUIST and GEISSMAN 1947)。このことは Spectrum が花色の濃淡について安定であることを意味している。一方、Daisy-VP は濃色のストライプが入る不安定な花色を示し、濃色変異体 Daisy-VPR が生じた。Daisy とその変異体 Daisy-VP のゲノムには、機能するトランスポゼース遺伝子が存在するはずである。Daisy は安定した淡ピンク花色であるのに対し、なぜ Daisy-VP では *dTac1* の脱離による濃色のストライプが生じるのか興味深い。栄養繁殖のあいだに偶発的な *dTac1* の活性化がおこり Daisy から Daisy-VP が生じたと考えられる。Daisy では *dTac1* の転移は抑制されているのに対し、Daisy-VP では少なくとも花卉の細胞ではそれらの抑制が解放されていると考えられる。トランスポゼース遺伝子あるいは *dTac1* そのものあるいは両者に、エピジェネティックな変化も含めた何かしらの変化が起こったと考えられる。この Daisy と Daisy-VP の相違のメカニズムを理解するためには *dTac1* の転移を司るトランスポゼースの同定が必要である。2章の考察で述べたとおり2013年末に赤花色のカーネーション品種 Francesco のゲノム塩基配列の91%が明らかとなった(YAGI *et al.* 2013)。しかし、*dTac1* のトランスポゼース遺伝子と推定される配列は品種 Francesco には見出されていない。トランスポゼースの同定には、Daisy-VP などのように *dTac1* の転移が確認されている品種を材料とした研究が必要である。

GST 遺伝子に関しては、その機能欠損がなぜ白色ではなく淡色を示すかについて明らかになっていない。機能不全の GST 遺伝子によりアントシアニンの量は減少するがなくなるわけではなく、アントシアニン

の蓄積の効率が著しく悪くなるにすぎない。色素が細胞質に蓄積するのでないならば以下の3つの理由が考えられる。(1)機能不全遺伝子が液胞への輸送機能を完全には失っていない可能性、(2)*DcGSTF2* 遺伝子以外の *GST* 遺伝子も液胞への輸送に関与できる可能性、(3)*GST* 遺伝子に関与しない液胞へのアントシアニン輸送の仕組みが関与する可能性。*GST* 遺伝子のアントシアニン輸送については不明な点も残されており今後の研究の進展が待たれる。

花色変異の分子遺伝学的研究により、色素合成遺伝子のみならず転移活性のあるトランスポゾンもみつかってきている。カーネーションでは *hAT* (*Ac/Ds*) に属する2つのトランスポゾンが同定されそれぞれ花の模様、枝変わり変異の原因であることが示されている(Itoh et al. 2002; 第2章)。本研究により、*CACTA* (*En/Spm*) に属する非自律性トランスポゾン *dTac1* が、花色の濃淡による模様と枝変わりいずれにも関与することが明らかとなった。非自律性因子は、活性化および安定化をトランスポゾンとは別の遺伝子座にあるトランスポゼース遺伝子により制御できることから、自律性因子に比べ品種改良の面からは有利であると考えられる。本章の結果も、第2章で考察したように、カーネーションに代表される花き作物や果樹など体細胞変異が品種改良に重要な作物では、効率的に遺伝子を破壊することができる転移能のあるトランスポゾンが内生の変異原としてゲノム内に確率高く存在する可能性を支持するものと考えられる。

第4章 ばれいしょ体細胞変異を誘発する *Stowaway* MITE

4.1 緒言

組織培養による体細胞変異はソマクローナル変異と呼ばれ品種育成にも利用されている。ソマクローナル変異のひとつの原因としてトランスポゾンの活性化があげられる(KAEPLER *et al.* 2000; LEE and PHILLIPS 1988)。例えば、カット&ペーストで転移するクラス2トランスポゾンである *Ac* や *En/Spm* に属するトランスポゾンが組織培養により活性化されることや(PESCHKE and PHILLIPS 1991; PESCHKE *et al.* 1987)、コピー&ペーストで転移するクラス1トランスポゾンであるレトロトランスポゾンのコピー数が組織培養により顕著に増加することが報告されている(HIROCHIKA 1993)。

クラス2トランスポゾンの中でも MITE (miniature inverted-repeat transposable element)は、ゲノム中のコピー数が非常に多いことから興味深いトランスポゾンである。MITE は、バイオインフォマティクスを利用し植物のゲノム塩基配列データを解析することにより発見された 600 bp 以下の小さな非自律性トランスポゾンであり(BUREAU and WESSLER 1992; BUREAU and WESSLER 1994)、ゲノム中に数千コピー以上が存在する(FESCHOTTE *et al.* 2002)。植物ゲノム中存在する多くの MITE は、terminal inverted repeats (TIRs)の塩基配列と挿入箇所の両端に存在する target site duplication (TSD)の塩基配列により、*Tourist* と *Stowaway* の2種に大別される。前者はイネ科植物に、後者は単子葉、双子葉いずれの植物にも存在することが明らかとなっている(BUREAU and WESSLER 1992; BUREAU and WESSLER 1994; FESCHOTTE *et al.* 2002)。非常に数多くの MITE がゲノム中に見出されるにも関わらず、転移活性のある MITE の報告は限られている。*Tourist* に属するイネの *mPing* が転移活性を有する MITE として始めて報告された。*mPing* が長期の細胞培養(JIANG *et al.* 2003)や薬培養(KIKUCHI *et al.* 2003)により活性化されること、穀粒が細粒となる変異の復帰原因が、*rice ubiquitin-related modifier-1 (Rurm1)*に挿入する *mPing* の脱離によること(NAKAZAKI *et al.* 2003)が明らかとなった。その後、*mPing*に転移のためのトランスポゼースを供給するトランスポゾンとして *Ping* と *Pong* が同定された(YANG *et al.* 2007)。一方、*Stowaway* については、植物細胞内での転移ではないが、イネのコピーをイネの *Mariner* 様トランスポゾンのトランスポゼース遺伝子とともに酵母に導入することにより、酵母中で可動であることが見出されている(YANG *et al.* 2009)。しかし、双子葉植物での MITE の転移については報告がなく、系統や品種間に挿入位置の多型があることからその可能性が推察されているに過ぎない(MACAS *et al.* 2005; MENZEL *et al.* 2006)。

本研究ではプロトプラスト培養により育成されたばれいしょ品種の体細胞変異の原因を探求し、可動な *Stowaway* に属する MITE を発見した。この MITE は双子葉植物で転移活性の有る MITE として始めて同定されたものである。

4.2 材料および方法

4.2.1 植物材料

ジャガキッズパープル'90 (JKP)およびジャガキッズレッド'90 (JKR)は、プロトプラスト培養による変異を利用し、キリンビール株式会社により育成されたそれぞれ紫皮、赤皮の三倍体バレイショ品種である (OKAMURA 1991; OKAMURA 1994)。これらの品種は、四倍体品種である Early Rose (*Solanum tuberosum*)と二倍体近縁種である *Solanum phureja* との交配により得られた三倍体赤皮系統 72218 (TOMIDA and KAWAKAMI 1989)の葉肉プロトプラストからの再生植物体である。なお、72218 はネオデリシヤスあるいはアカダケと呼ばれることがある。72218 は神戸大学の保坂和良教授より分譲いただいた。

4.2.2 色素分析

塊茎の皮から 50 mL の 50% (V/V)酢酸で色素を抽出した。抽出液をろ過した後、200 mL の水を加え、10% (v/v)酢酸で平衡化した ODS カラム(Wakosil 25C18, i.d. 15 x 100 mm; 和光純薬)を通した。カラムを 10% 酢酸で洗った後に、アントシアニン画分を 0.1%塩酸を含むメタノールで溶出した。溶出液を乾固し、TBA (t-butanol:acetic acid:water = 3:1:1)を展開溶媒に用い mass TLC (TLC Cellulose (10 x 10 cm); Merck KGaA)により分離した。着色したバンドとして得られるアントシアニンを切り出し、0.1%塩酸を含むメタノールで抽出した。溶媒を蒸発させたのち、アントシアニンを 1 ml の 1%塩酸に溶解した。等量の濃塩酸を加え 100°C で 20 分加熱しアントシアニジンをイソアミルアルコールで抽出した。得られたアントシアニジンを Synergi 4 m Fusion-RP 80 Å column (4.6 x 100 mm, Phenomenex)を装着した HPLC/MS (1525 Binary HPLC Pump, 996 Photodiode Array Detector, 2767 Sample Manager, Micromass ZQ; Waters Co.) によりカラム温度 30°C で分析した。移動相は A 液を 1% ギ酸、B 液をメタノールとし、20% B から 70% B (20 min) の後 100% B isocratic (10 min) 、流速は 1 ml/min で分析した。

4.2.3 サザンブロットハイブリダイゼーション

DNA は葉から Nucleon Phytpure Genomic DNA extraction kit (GE Healthcare)を用い抽出した。約 10 µg の DNA を *EcoRV* で消化し、1% アガロースゲル電気泳動で分離した。DNA を Hybond N+ (GE Healthcare)に写し、PCR により増幅した *F3'5'H::rev* の cDNA をプローブとして 65°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行なった。プローブのラベルと検出には、AlkPhosDIRECT (GE Healthcare)を用いた。

4.2.4 PCR 条件

本章で用いた PCR プライマーを Table 4.1 に、プライマーのおよその位置を Fig. 4.1 に記載した。特異

性と収量をあげるためにほとんどの PCR は 2 組のプライマーを用いネステッドで行なった。PCR の条件は以下のとおりである。95°C; 3 分の変性を行なったのちに、95°C; 30 秒、56°C; 30 秒、72°C; 2 分あるいは 5 分のサイクルを 30 回行い、最後に 72°C で 3 分伸長反応を行なった。塩基配列決定は、電気泳動により分離した DNA をゲル片から MagExtractor (Toyobo)を用いて回収し、直接あるいは TOPO TA cloning kit (Invitrogen)を用い pCR 4-TOPO ヘクローニングしたのちに、ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems)により行なった。

4.2.5 cDNA 解析

トータル RNA は約 100 mg の塊茎皮から RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用い抽出した。*flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H)*の cDNA 塩基配列を明らかにすべく、JKP を材料として GeneRacer kit (Invitrogen) を用い 5' RACE を行ない、クローニングの後に塩基配列を決定した。プライマーはキットに付属のプライマーと 1 回目の増幅にプライマー1、2 回目の増幅にプライマー2 を用いた。これら遺伝子特異的プライマーは、P450 あるいは *F3'5'H* 遺伝子(*Solanum melongena*; GenBank accession X70824 (TOGURI *et al.* 1993b)、*Petunia hybrida*; GenBank accession Z22544, Z22545, X71130 (HOLTON *et al.* 1993; TOGURI *et al.* 1993a))でよく保存されている 2 ヶ所に設計した。次に、キットに付属のプライマーと 5' RACE で明らかとなった塩基配列を基に設計したプライマーを用い(1 回目増幅; プライマー3、2 回目増幅; プライマー4) 3' RACE を実施し、クローニングの後に塩基配列を決定した。これら RACE 実験により明らかとなった塩基配列から、プライマー組み合わせプライマー5と6(1 回目増幅用)およびプライマー3と6(2 回目増幅用)を作成し、*F3'5'H* 遺伝子 cDNA の全長を RT-PCR(伸長反応 2 分)により増幅した。

4.2.6 ゲノム DNA 解析

DNA は約 100 mg の葉から WALBOT and WARREN (1988)に記載の方法を参考に抽出した。*F3'5'H* 遺伝子は、プライマー5と6を用い伸長反応 5 分の PCR により増幅した。

機能しない *F3'5'H* 遺伝子である *f3'5'h2* と *f3'5'h3* については以下のとおり同定した。*Mbol* により消化した JKP の DNA を 4°Cで一晩セルフライゲーションしたものを鋳型に、インバース PCR を行なった(1 回目増幅; プライマー1と7、2 回目増幅; プライマー2と8)。ここで、プライマー7および8は P450と *F3'5'H* 遺伝子で高度に保存されている部分に設計した。増幅産物をクローニングののち塩基配列を決定し、プライマー9、10および11を作成した。次に、*XbaI* により消化した JKP の DNA をセルフライゲーションした DNA を鋳型に、1 回目増幅; プライマー2と9、2 回目増幅; プライマー10 と11を用いインバース PCR を行ない、得られた 5 kb の断片の塩基配列を決定しプライマー12と13を作成した。これらのプライマーを用い、JKP、72218 より *f3'5'h2* を増幅し塩基配列を決定した(1 回目増幅; プライマー5と12、2 回目増幅; プライマー5と13)。3 つ目のコピー *f3'5'h3* は、以下のインバース PCR により同定した。*HincII* で消化した

JKP の DNA をセルフライゲーションした DNA を鋳型に、プライマー14と15 を用い増幅した断片の塩基配列を決定した。次に明らかとなった塩基配列より作成したプライマーを用い、セルフライゲーションした *EcoRI* 消化 DNA を鋳型にインバース PCR を行ない、増幅産物の塩基配列を決定した(1 回目増幅; プライマー16と17、2 回目増幅; プライマー17と18)。さらに、セルフライゲーションした *HindIII* 消化 DNA を鋳型にインバース PCR を行ない増幅産物の塩基配列を決定した(1 回目増幅; プライマー18と19、2 回目増幅; プライマー20と21)。ここで明らかとなった塩基配列上にプライマーを作成し、*f3'5'h3* を JKP および 72218 から増幅し塩基配列を決定した(1 回目増幅; プライマー22と23、2 回目増幅; プライマー18と24)。これら機能しない *F3'5'H* 遺伝子の PCR 増幅も伸長反応 5 分で行なった。

4.2.7 *dTstu1-2* とその挿入部位の解析

dTstu1 上に設計したプライマー25 を用い PCR を行うことにより *dTstu1* 様配列間が増幅することが期待された。実際、この PCR により JKP 特異的な 2.5 kb の断片が増幅した。この塩基配列を決定し、インバース PCR 用プライマー26 および 27 を作成した。*Mbol* で消化した JKP の DNA を 4°C で一晩セルフライゲーションしたのちに、これらプライマーを用い 1 回目増幅を行い、プライマー26と *dTstu1* 上のプライマー28 による 2 回目増幅により、JKP 特異的な 1 kb の断片が得られた。この断片は *dTstu1-2* の周辺配列を含む断片である。この断片の塩基配列から作成したプライマー29 および 30 により *dTstu1-2* 挿入部を増幅し塩基配列を決定した。*dTstu1-2* 同定に用いた PCR はすべて伸長反応 5 分で行なった。

4.2.8 MITE ディスプレイ

トランスポゾンディスプレイは、*dTstu1* および *dTstu1-2* に共通のプライマーを用い、CASA *et al.* (2000) に記載されている方法で行なった。約 250 ng の DNA を *MseI* で消化しアダプターをつないだ。溶液を 0.1 x TE を用い 4 倍に希釈し、アダプターと相補的なプライマーMse+0 と 31 を用いプレセレクトティブ増幅を行なった。PCR は、94°C; 30 秒、56°C; 30 秒、72°C; 1 分のサイクルを 25 回の後に 72°C で 5 分伸長反応を行なった。増幅産物を 0.1 x TE で 20 倍に希釈し、プライマーMse+N と *dTstu1* と *dTstu1-2* の TIR および TSD に特異的かつ 5'末に 6-FAM によるラベルを入れたプライマー32 を用いセレクトティブ増幅を実施した。PCR は、94°C; 5 分の後に、10 回のタッチダウンサイクル(94°C; 30 秒、66°C; 30 秒(各サイクル -1°C)、72°C; 1 分)、25 回の通常サイクル(94°C; 30 秒、56°C; 30 秒、72°C; 1 分)、最後に 72°C; 5 分の伸長反応という条件で実施した。増幅産物は ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems)を用い解析した。

Table 4.1 Primer sequences used in this study

No.	Sequence (5' to 3')
1	AACATTTTTGTCAATAAAKCATCAAA
2	CCTTGAAATCCATCCAAGCTA-
3	CCGAATCAAGCTTTATATTATATCTTCGATTTT
4	GGCATTACGTATTAGTGAGTTG
5	CCTTCTACTTCATTCTCACTCT
6	AGCAAATATGTTGCACTATAAATG
7	CCTGATTTTCTTGATKTRTTATGG
8	GGGATAATTCTGAAGGAGAAAG
9	TATTCCAAGTTGTTGACACCCA
10	ACTGAAGTAGCCATCCAAAGAC
11	TCAACGAACACTCTTACTTAA
12	GCTCACTACACAATGCACATG
13	TCATGAAATGCATCGACAATTTAT
14	GCTAATCCAAAAGATTCCTCCA
15	TGCAAAAAGCTGTCCCTCTTG
16	TTACGTTACGGTCTTCAACAG
17	AGAGGAGGATAACAACTTGTAT
18	AACAGATACGTTGCACTATAACT
19	CCTAGTCCCCATTTCACTACA
20	GAACATGAGTTTACGTGAACCC
21	AGGCATCCTTCGAAATCCACA
22	TTGTAAAGTGCACCCATCATCT
23	CATTCGTCCTAACGATGGACA
24	ATTCAGATCCTCCCGATGAATT
25	ATTCATTTTGGACCACAAGTTTTA
26	TGTTTTTGCAGTTATCTTATTTCA
27	CAAGGGGAGACATTTAGG
28	AGACATTTCATAGGCAAATTGTTA
29	AGCTGAAATATGAGATTGAAATTAG
30	ATTTTGCTATATCCACAATGACTT
31	CATTCTTTTTGGGACTGACTA
32	ATAAAWTGGGACRGAGGGAGTA
Mse+0	GACGATGAGTCCTGAGTAA
Mse+N	GACGATGAGTCCTGAGTAAN

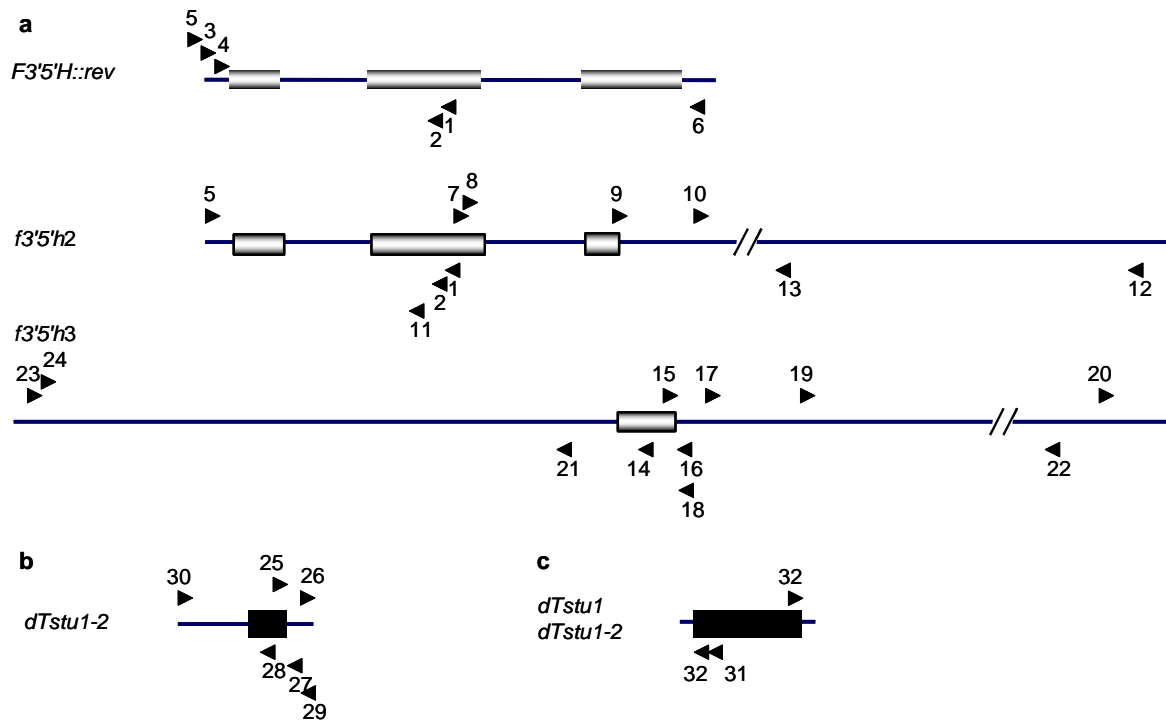


Fig. 4.1 Approximate positions of primers used in this study. Arrow heads show primers and their directions used for the analysis of *F3'5'H* genes (**a**), the insertion locus of *dTstu1-2* (**b**) and MITE display (**c**). Coding regions are marked by shaded boxes and the *Stowaway* MITE is indicated by a black bar.

4.3 結果

4.3.1 体細胞変異の原因酵素

紫皮のジャガキッズパープル'90 (JKP)は、赤皮の 72218 の葉肉プロトプラストを培養することにより体細胞変異を利用し育成された品種である(Fig. 4.2a, OKAMURA 1991; OKAMURA 1994)。塊茎皮の色素を分析したところ、紫皮品種 JKP の主要アントシアニンのアグリコンはペチュニジンであり、赤皮の 72218 ではペラルゴニジンであった。これら 2 つのアントシアニンは、B 環の水酸基およびメトキシ基の数に相違がある。ペチュニジンの前駆体であるジヒドロミリセチンは、ペラルゴニジンの前駆体であるジヒドロケンフェロールに 2 つの水酸基が導入されることにより生合成される。また、この反応は flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) による(Fig. 4.2b)。これらのことから、赤皮(72218)から紫皮(JKP)への体細胞変異の原因が F3'5'H 機能の復帰によることが明らかである。ばれいしょの紫色発現はひとつの遺伝因子 *P* 座により決まることが知られており、紫色を発現する優性の対立遺伝子が F3'5'H をコードすることが明らかとなっている(JUNG *et al.* 2005)。よって、JKP での F3'5'H 機能の復帰は、*F3'5'H* 遺伝子自身の機能復帰によると考えられた。

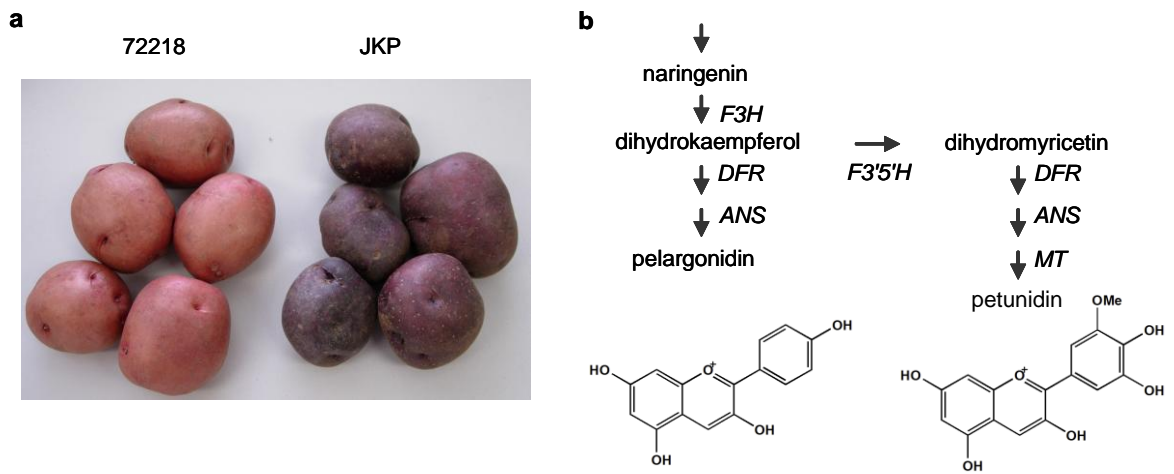


Fig. 4.2 Tuber pigmentation of 72218 and Jaga kids purple (JKP). **a** Tuber appearance of 72218 and JKP. **b** Schematic pathway of anthocyanidin biosynthesis. Enzyme abbreviations are as follows: F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3',5'- hydroxylase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; ANS, anthocyanidin synthase; MT, anthocyanin 3'-methyltransferase.

4.3.2 *F3'5'H* 遺伝子の解析

F3'5'H 遺伝子自身の機能復帰の可能性を調べるためにまず発現の解析を行った。紫皮の JKP および赤皮である 72218 と JKP 同様に 72218 のプロトプラスト培養で得られた赤皮のジャガキッズレッド[®]90 (JKR)について、塊茎皮での *F3'5'H* 遺伝子の転写を RT-PCR により比較したところ、赤皮品種では転写量が JKP に比べ少なく、RT-PCR 産物のサイズが大きいことが明らかとなった(Fig. 4.3a)。これら cDNA の塩基配列を比較したところ、赤皮品種には *Stowaway* MITE (miniature inverted-repeat transposable element)が挿入しており、この MITE を *dTstu1* と命名した(Fig. 4.3b)。両者の塩基配列はこの挿入以外全く同一であった。JKP の cDNA は 510 アミノ酸をコードしており機能する *F3'5'H* 遺伝子と考えられたが、72218 の cDNA は *dTstu1* 内の終止コドンにより 24 アミノ酸しかコードしておらず機能をもたない遺伝子と考えられた。JKP の cDNA は JUNG *et al.* (2005)により報告された機能する *F3'5'H* 遺伝子(GenBank accession no. AY675558)に比べ 1 アミノ酸長いことが明らかとなった。

次に JKP の *F3'5'H* cDNA をプローブとしたゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った。*EcoRV* でゲノミック DNA を消化した場合には 4 本のバンドが検出されたが、このうち約 5 kb のバンドは JKP でのみ小さかった(Fig. 4.4a)。また、4 本のバンドのシグナル強度に大きな差がないことから、これら 3 つの品種の *F3'5'H* 遺伝子は最大で 4 コピー存在すると考えられた。次に 72218 と JKP の *F3'5'H* 遺伝子の塩基配列の決定を試みたところ、それぞれの品種から 3 コピーの *F3'5'H* 遺伝子が見出された。それらのうち上述の cDNA に対応する 1 コピーのみ内部に *EcoRV* による認識配列をもっていたことから、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションで 4 本のシグナルが観察されたが、三倍体であるこれらの品種は 3 コピーの *F3'5'H* 遺伝子をもつものと考えられた。72218 からは、*dTstu1* を持つコピー(*f3'5'h1*; *dTstu1*, DDBJ accession no. AB496977)、第 3 エクソンが短いコピー(*f3'5'h2*, DDBJ accession no. AB496978)、第 3 エクソン後半のみのコピー(*f3'5'h3*, DDBJ accession no. AB496979)の 3 種が同定された。一方、JKP からは *dTstu1* を持たないコピー(*F3'5'H::rev*, DDBJ accession no. AB496976)、*f3'5'h2*、*f3'5'h3* の 3 種が同定された。72218 と JKP それぞれ 3 種の *F3'5'H* 遺伝子の中に見出された唯一の相違は *dTstu1* の存在であった(Fig. 4.4b)。また、塩基配列から前述の cDNA はそれぞれ 72218 が *f3'5'h1::dTstu1*、JKP が *F3'5'H::rev*に対応する。なお *f3'5'h2* は、植物で知られている P450 すべてに保存されているシグネチャーモチーフをもたないことから機能しないと考えられた。また、*f3'5'h3* は第 3 エクソン後半のみしか持たないことからやはり機能しないと考えられた。

以上、赤皮の 72218 では 3 つの *F3'5'H* 遺伝子すべてが機能せず、紫皮の JKP は 3 つの *F3'5'H* 遺伝子のうち *F3'5'H::rev* のみが機能すると考えられる。72218 から JKP への変異、すなわち赤から紫への体細胞変異は、*f3'5'h1::dTstu1* から *dTstu1* が抜け出ることによる *F3'5'H* 遺伝子の復帰が原因であると結論した。

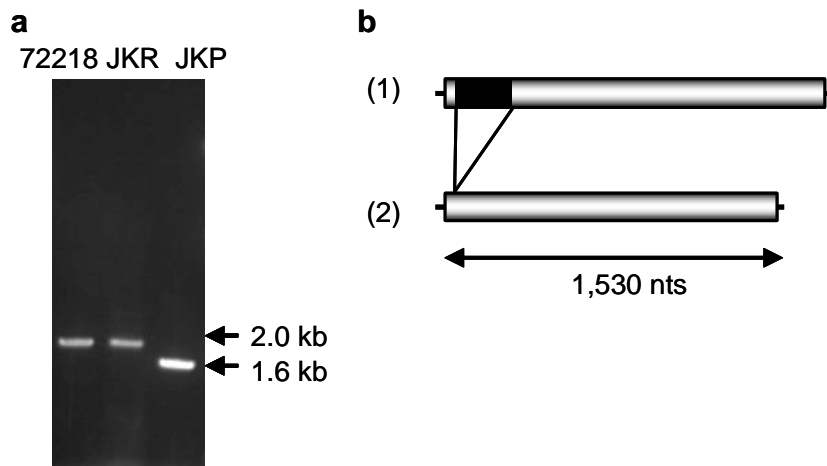


Fig. 4.3 *Flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H)* transcripts in 72218, JKR and JKP. **a** RT-PCR products specific for *F3'5'H* gene using cDNAs synthesized from RNAs prepared from tuber skins of 72218, JKR and JKP as templates. The migration of molecular weight markers are shown on the right. **b** Schematic structure of cDNAs for *F3'5'H* gene in 72218, JKR (1) and JKP (2). Shaded boxes indicate the coding regions of *F3'5'H* cDNAs, thin lines the non-coding regions. The black box depicts the insertion of *dTstu1*.

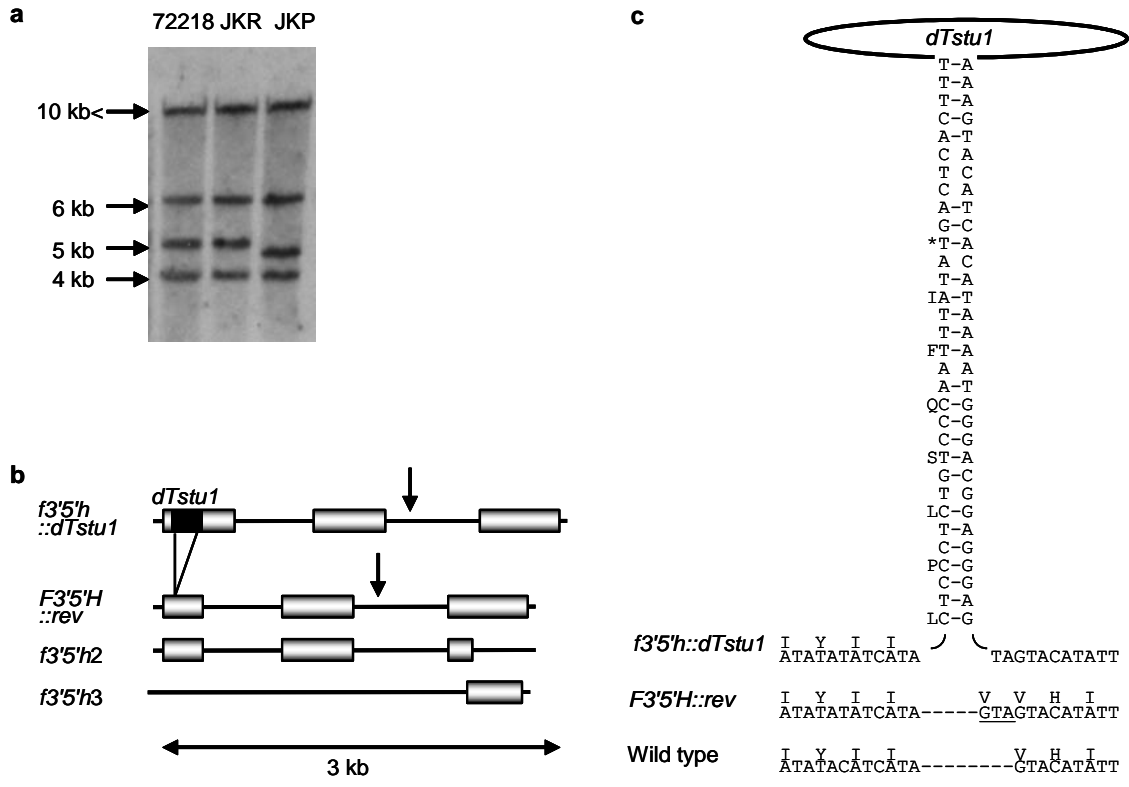


Fig. 4.4 Flavonoid 3',5'-hydroxylase (*F3'5'H*) genes in 72218 and JKP. **a** Southern blot analysis of genomic DNA digested with *EcoRV* and probed with a labeled RT-PCR product of *F3'5'H::rev*. Approximate sizes are given on the left. The largest band represents *f3'5'h2* since the *EcoRV* recognition site is absent in 7.8kb of determined sequence. The 6.3 kb fragment is derived from *f3'5'h3*. The rest of the bands represent *f3'5'h::dTstu1* or *F3'5'H::rev* since both *f3'5'h::dTstu1* and *F3'5'H::rev* have an *EcoRV* recognition site at the middle of the gene. **b** Structure comparison of *F3'5'H* genes. Both *f3'5'h2* and *f3'5'h3* are incomplete genes, *f3'5'h2* lacks the latter half of the third exon and *f3'5'h3* contains only the latter half of the third exon. Triploid red 72218 has only pseudo genes, *f3'5'h::dTstu1*, *f3'5'h2* and *f3'5'h3*. Triploid purple JKP, somaclonal variant of 72218, has *F3'5'H::rev*, *f3'5'h2* and *f3'5'h3*. Coding regions (shaded boxes) are separated by introns (lines) with the *dTstu1* insertion depicted by a black bar. Arrows indicate the *EcoRV* recognition site in *f3'5'h::dTstu1* and *F3'5'H::rev*. **c** Structure of *dTstu1* and the nucleotide and amino acid sequences of *F3'5'H* genes proximal to the *dTstu1* insertion site. Wild type is the previously reported functional *F3'5'H* gene (Jung *et al.* 2005). A pair of vertical sequences shows the TIRs where complementary sequences are hyphenated. An asterisk indicates a stop codon present in *f3'5'h::dTstu1*. The footprint remaining after *dTstu1* excision (including the duplicated TA target site) is underlined.

4.3.3 可動な *Stowaway* MITE、*dTstu1*

dTstu1 は、239 bp と短く、A/T リッチ(67%)であること、挿入箇所の両端にある target site duplication (TSD)が TA であること、二次構造をとることおよび terminal inverted repeats (TIRs)の塩基配列 (CTCCCTCYGTC)から、BUREAU and WESSLER (1994)により報告された *Stowaway* MITE に属するトランスポゾンであるといえる(Fig. 4.4c)。*dTstu1* に類似した配列は *Solanum* のみならず他のナス科植物、*Capsicum*、*Petunia*、*Nicotiana* (GenBank accession nos. DQ309518, AY136628, AF277455)にも存在することが確認された。

JKP の *F3'5'H::rev*を既報の *F3'5'H* 遺伝子(JUNG *et al.* 2005, GenBank accession no. AY675558)と比較すると前述のとおり第 1 エクソンに 1 アミノ酸の挿入(バリン)がある。これは 3 塩基(GTA)の挿入によるが、*dTstu1* からの G、TSD の TA からなる *dTstu1* の脱離によるフットプリントであると考えられる。フットプリントは、トランスポゾン脱離に伴い観察される事象であるので、*dTstu1* は活性のある可動なトランスポゾンと考えられる。イネの *Stwoaway* MITE と *Mariner* 様トランスポゾンのトランスポゼースを酵母に導入することにより酵母細胞中で可動であることが報告されているが(YANG *et al.* 2009)、可動な MITE はイネでしか報告がなかった。*dTstu1* は双子葉植物の可動な MITE の最初の知見である。

以上、72218 が持っている *f3'5'h::dTstu1* は機能する *F3'5'H* 遺伝子に *dTstu1* が挿入することにより機能を失い、JKP が育成される過程で *dTstu1* が脱離することにより機能する *F3'5'H::rev* が生成し紫色素を合成できるようになったと結論された。

4.3.4 *dTstu1* に類似した可動な MITE、*dTstu1-2*

72218 から JKP が育成される過程で *dTstu1* が脱離したのなら、同時に他の *dTstu1* 様トランスポゾンが転移する可能性が考えられる。そこで、トランスポゾンディスプレイによる 72218 と JKP の比較により *dTstu1* 様トランスポゾンの転移を検出することを試みた。DNA フィンガープリント法として報告された inter-MITE polymorphism 検出(CHANG *et al.* 2001)を参考に、*dTstu1* に外向きにアニールするプライマーを用いた PCR により *dTstu1* 様配列間の長さ多型を 72218 と JKP で比較し、JKP 特異的な約 2.5 kb のバンドの塩基配列を決定した。この配列の周辺をインバース PCR により明らかにし、プライマー対を作成し PCR を行なったところ 72218 では 1 本のバンドのみ増幅するのに対し、JKP ではこのバンドの他に約 0.2 kb 大きなバンドが増幅した(Fig. 4.5a)。両バンドの塩基配列を決定したところ、大きいバンドに *dTstu1* とほぼ同じ塩基配列をもつ挿入が確認され、*dTstu1-2* と命名した。*dTstu1-2* は JKP が育成される過程あるいはその後に 2 塩基の TSD (TA)の間に挿入したと考えられた(Fig. 4.5b)。*dTstu1* と *dTstu1-2* は、どちらも長さは 239 bp であり、4 塩基の相違がみられた。このうち 2 塩基は TIRs に存在した(Fig. 4.6)。このように 72218 には転移活性のある *Stowaway* MITE が複数存在し、脱離と挿入のいずれも観察されることが明らかとなった。

次に、どの程度の *dTstu1* 様トランスポゾンが転移しているのかを調査するために、より検出感度の高いトランスポゾンディスプレイを試みた。*dTstu1* と *dTstu1-2* に共通の外向きプライマーと *MseI* アダプター配列にアニールし 1 塩基の selective 塩基(T)をもつプライマーを用い PCR を行ったところ、72218、JKR、JKP いずれの品種からも 50 以上のピークシグナルが得られた。ほとんどのピークは 3 品種間で同一であったが、72218 を基準として、JKR では 3 つの新たなピークが、JKP では 3 つの新たなピークと 1 つのピークの消失が検出された(Fig. 4.7)。このうち JKP の新たなピーク 1 つは、前述した *dTstu1-2* の挿入により予想される 315 bp の位置に観察された。一方、*F3'5'H* 遺伝子からの *dTstu1* の脱離は、50 bp の位置に予想されたが、判然としなかった。このようにほとんどのピークは 3 品種で保存されていたが、いくつかのピーク多型が観察されたことから *dTstu1* 様トランスポゾンの転移が示唆された。

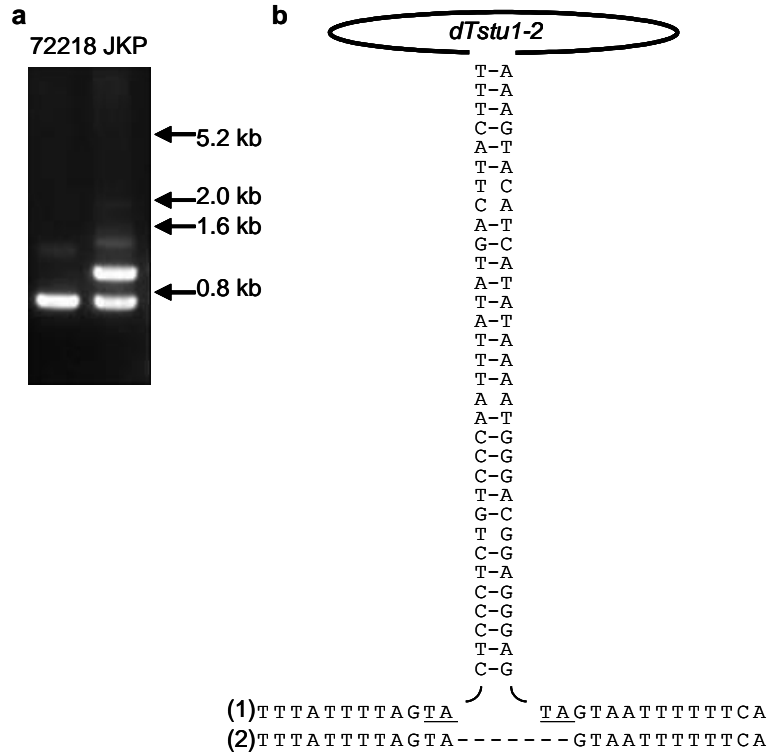



Fig. 4.5 Insertion of *dTstu1-2* in JKP occurring as a somaclonal variation. **a** PCR-amplified genomic region proximal to the *dTstu1-2* target site in JKP in comparison with 72218. Insertion of *dTstu1-2* yielded the larger amplified fragment in JKP. The migration of molecular weight markers is shown on the right. **b** Nucleotide sequences around the *dTstu1-2* insertion site in JKP (1) and 72218 (2). The pair of vertical sequences represents the TIRs where hyphens connect complementary nucleotides. The target sequence TA and its duplication are underlined.



dTstu1 CTCCCTCTGTCCCAATTTATGACTCACTTTCCTTTTTAGTCAGTCCCAAAAAG
dTstu1-2 CTCCCTCTGTCCCAATTTATGACTTACTTTCCTTTTTAGTCAGTCCCAAAAAG

*

AATGACACATTTCTATTTTAAGTAACAATTGCCTATGAAATGTCTTTTTTACCCTTAATGAAAT
 AATGACACATTTCTATTTTAAGTAACAATTGCCTATAAAATGTCTTTTTTACCCTTAATGAAAT

*

GATTACAACCACACAAAATTTCTATCATTCAATTTGGACCACAAGTTTAAAAGTCTTCCATTT
 GATTACAACCACACAAAATTTCTATCATTCAATTTGGACCACAAGTTTAAAAGTCTTCCATTT

*

TTCTTAAAGTTTGTGCCAAATCAAAGTACATCACATAAAATGGGACGGAGGGAG
 TTCTTAAAGTTTGTGCCAAATCAAAGTACATCATATAAAATGGGACGGAGGGAG

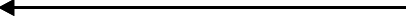


Fig. 4.6 Sequence comparison between *dTstu1* and *dTstu1-2*. Arrows indicate the sequences of TIRs. Nucleotide differences are marked by asterisks.

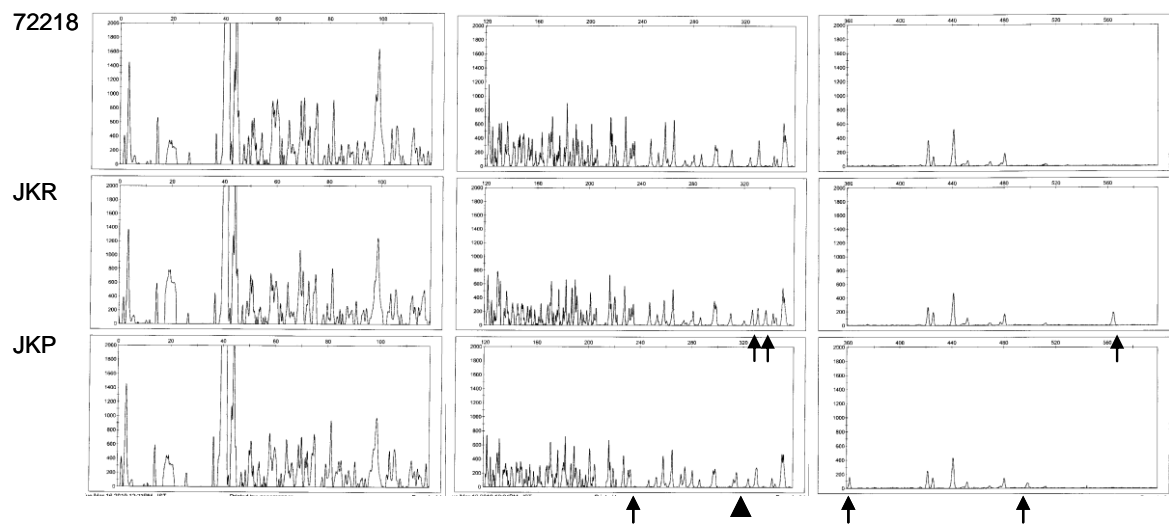


Fig. 4.7 Transposon display using primers designed from sequences of *dTstu1* and *dTstu1-2*. Mse+T was used as a selective primer. The left panels show peaks from 0 base to 120 bases, the middle from 120 to 360 bases and the right from 360 to 600 bases. Differences of JKR and JKP as compared with 72218 are indicated by arrows. An arrowhead shows a new peak of 315 bases in size.

4.4 考察

MITE は遺伝子以外に挿入していることがほとんどで転移が表現型に現れにくいこと(OKI *et al.* 2008)、およびコピー数の多さが個々の転移の検出を困難にしていることから転移についての知見は少なく、転移の報告はイネの MITE のみであった。本研究で発見された *dTstu1* および *dTstu1-2* は双子葉植物で転移することが明らかとなった初めての MITE であり、実際に動くことにより体細胞変異に関与することが示された。また、これまで植物細胞中での MITE の転移は *Tourist* で報告されているだけであったが、*Stowaway* にも植物中で転移活性をもつコピーがあることが明らかとなった。MITE は潜在的な変異原であるとともに、新しい遺伝子の創出に関与することが示唆されており、転移にどのような要件が必要なのか興味深い。*Stowaway* は TIRs の相同性から *Mariner* 様トランスポゾンがコードするトランスポゼースにより転移すると考えられており(FESCHOTTE *et al.* 2005.)、イネの *Stowaway* がイネの *Mariner* 様トランスポゾンのトランスポゼースにより酵母中で転移することが報告された(YANG *et al.* 2009)。*dTstu1* および *dTstu1-2* はトランスポゼースをコードしておらず転移には、トランスポゼースが供給される必要がある。これらのトランスポゾンの転移に必要なトランスポゼースの同定が次の課題となる。真核生物に広く見出される *Mariner* 様トランスポゾンは、トランスポゼース供給の第一候補と考えられる。また、MITE ディスプレイの結果からは少数のコピーで転移が示唆されたものの、多くのコピーは調査した 3 品種間で維持されていた。転移活性のないコピーを同定し塩基配列を比較することおよび挿入箇所の特性を調査することにより、どのような要件が転移に必要なのかが明らかになるものと考えられる。

緒言に記載したとおり、組織培養がトランスポゾンの転移を促すことが各種のトランスポゾンで報告されている(GRANDBASTIEN *et al.* 1989; HIROCHIKA 1993; JIANG *et al.* 2003; KIKUCHI *et al.* 2003; PESCHKE and PHILLIPS 1991; PESCHKE *et al.* 1987)。JKP が育成されたのと同じプロトプラスト培養の条件で、赤い塊茎の 72218 から 7%の頻度で紫塊茎をもつ再生植物体が得られた(OKAMURA 1991)。また、いくつかの再生植物体の赤い塊茎に Fig. 4.8 に示すような紫色のセクターが観察された。通常の塊茎増殖では紫塊茎への変異は観察されないことから、プロトプラスト培養による植物体再生の過程で、*dTstu1* の脱離が引き起こされたと考えられる。組織培養におけるどのような要因が *dTstu1* の転移を誘発するのかは今後の課題である。組織培養中におこるトランスポゾンおよびトランスポゼース遺伝子の DNA 脱メチル化が、トランスポゾンの転移を活性化するとの知見が報告されており(CHENG *et al.* 2006; KAEPLER *et al.* 2000; LISCH 2009)、MITE の転移にも関与することが予想される。

さらに、MITE がどうして真核生物に広くかつコピー数多く存在するのかについて現在明らかな解答はないが、真核生物ゲノムの構成や進化を理解する上で重要な解明すべき課題と考えられる。



Fig. 4.8 Tuber appearance of one of the plants regenerated from protoplasts of 72218. Arrows indicate purple variegation (which appear as a dark line in the picture) present against the red background.

第5章 総合考察

5.1 遺伝子の変異とトランスポゾン

育種において遺伝情報を改変することがどのように達成されてきたのだろうか。本研究により、栄養繁殖性作物で実際に育種に利用された変異のひとつの原因がトランスポゾンであることが示された。栄養繁殖性作物では固定を行わないのでそれぞれの遺伝子座がヘテロである場合が多いことから、劣性方向への体細胞変異が見出されやすいと考えられる。第2章のカーネーションの枝変わりでは、先祖返りが頻繁に観察されたことから、第3章のカーネーション遺伝子では花卉に色の異なるセクターが多数現れることから予想されたとおり、いずれもトランスポゾンが変異の原因であった。第4章のばれいしよの培養変異ではどのような理由で変異がおこったのか予見できなかったが、トランスポゾンの関与による変異であることが明らかとなった。このように変異遺伝子の生成にトランスポゾンが一定の役割を果たしてきたことは本研究の結果からも明らかであるが、今後さまざまな作物で複数品種のゲノム塩基配列が解読されれば、どのような原因による変異が育種に利用されやすいのか議論できるようになるとと思われる。

本研究により、品種育成に利用された枝変わり変異、変異遺伝子、ソマクローナル変異の原因として、転移活性のあるそれぞれ *hAT*、*CACTA*、*Stowaway MITE* に属するクラス2トランスポゾンの関与が明らかとなった。本研究で用いたカーネーションとばれいしよはいずれも栄養繁殖性の作物であり、少なくとも栄養繁殖性作物において遺伝子機能を破壊する変異にトランスポゾンが関与してきたことが示された。3例の原因となったトランスポゾンはすべてクラス2 (DNA型) に属していたが、それぞれ異なるタイプのトランスポゾンであった。これまでに、クラス1トランスポゾン (RNA型) であるレトロトランスポゾンが、ブドウのアントシアニン生合成を制御する遺伝子の機能破壊や (AZUMA *et al.* 2009; KOBAYASHI *et al.* 2004)、カーネーションの色素を配糖化する酵素の機能喪失 (NISHIZAKI *et al.* 2011) の原因であることが報告されており、遺伝子機能の改変にはクラスを問わずトランスポゾンが少なからず寄与していると考えられる。また、イネ、トウモロコシやキンギョソウなど各種の植物で報告されているトランスポゾンによる機能喪失遺伝子の報告を合わせて考えてみても、トランスポゾンの種類により遺伝子の機能改変を引き起こしやすい、あるいは育種に利用されやすいトランスポゾンがあるとは考えにくい。MITE は他のクラス2トランスポゾンに比べこのほかゲノム内のコピー数が多いが、可動なコピーが限られていることから特に変異を生じやすい因子とはなっていないと考えられる。*Stowaway MITE* は単子葉、双子葉を問わず広くかつコピー数多く存在するが、*dTstu1* は世界で初めて同定された双子葉植物で可動な MITE である (第4章)。また、植物ゲノム内で可動な *Stowaway MITE* としても世界で初めて同定されたコピーである。各種のトランスポゾンに遺伝子改変を引き起こす場所への挿入指向性に相違がないならば、可動なコピーと転移しないコピーの相違を明らかにしゲノム内に存在する可動なトランスポゾンのコピー数を推定することにより、それぞれのトランスポゾンの変異原因への寄与を見積もることが可能になると考えられる。

5.2 育種におけるトランスポゾンの利用

トランスポゾンにより遺伝子機能を改変しようとする、遺伝子のプロモーター等を含む遺伝子部分やその近傍に挿入し得るトランスポゾンでなければならない。また、品種が成立するには変異遺伝子が安定であることが重要であり、安定性の観点からはコピー&ペーストにより転移し一度挿入すると抜け出る可能性の低いクラス 1 のトランスポゾンが有利であると考えられる。一方、カット&ペーストにより転移するクラス 2 トランスポゾンは、転移活性化および不活性化を制御し効率的な遺伝子機能破壊を可能とすることができれば重要な育種ツールとなり得る。

クラス 2 トランスポゾンでは、転移に必要な酵素であるトランスポゼース遺伝子を内部にコードする自律性因子より他の遺伝子座にトランスポゼース遺伝子をもつ非自律性因子のほうが転移を制御しやすく育種上扱いやすいと考えられる。つまり、転移を誘発したいときにトランスポゼース遺伝子をもつ系統と交雑しトランスポゼースを供給し、安定化を図りたいときにトランスポゼース遺伝子座を持たない後代を選抜することにより転移の活性化および安定化が可能となる。しかし、栄養繁殖性作物ではひとつあるいは少数の形質のみの改変を目指す場合が多く、交雑せずに変異を誘発することが求められる。このような場合、トランスポゼース遺伝子の一過的発現で転移の一時的な活性化を実現することは有効な手段になり得る。トランスポゾンが遺伝子プロモーター、エクソンあるいはエクソン-イントロン境界に挿入し変異が誘発された場合には、トランスポゾン挿入箇所からさらに他の場所に転移させることにより変異の安定化を図ることが可能である。脱離に際しフットプリント塩基配列が後に残り、フレームシフト、ナンセンス変異、アミノ酸置換、アミノ酸挿入などがおこるので、このような変異個体を選抜することによりトランスポゾンの挿入によらない安定した変異体を得ることができる。同じ表現型を示すトランスポゾン挿入変異体の中から、より安定化が容易な変異個体さらにはトランスポゾン脱離により安定化した変異個体を選抜することは、育種上重要な観点と考えられる。しかし、第 2 章や第 3 章の例のようにトランスポゾンがイントロンに挿入した場合、安定した変異体を育成するためにはトランスポゾン自身の転移制御が必要となる。トランスポゾンの活性化要因として各種のストレスが示唆されているが、未だその機構は解明されておらず今後の研究課題である。本研究で同定された 3 種のトランスポゾンのうち *Tdic101* のみトランスポゼース遺伝子と考えられるオープンリーディングフレーム(ORF)を含んでいたが、この ORF が *Tdic101* の転移を司ることの証明には至っていない。転移の制御について明らかにしていくためにはそれぞれのトランスポゼースの同定が次の課題となる。

以上、育種への利用についてトランスポゾン挿入変異を考えると、同じ表現型であってもどのようなトランスポゾンが遺伝子のどの部分に挿入しているかは重要な相違点である。扱いやすい変異遺伝子を把握し利用していくことで育種の効率が向上するものと考えられる。

5.3 トランスポゾンと作物の進化

作物の育種では短期間にゲノムが変化していく。人為的な力とそれによる大きなバイアスがかかっているが、作物育種は進化のモデルとして解析の価値があると考えられる。育種における変異創出の重要な要素である遺伝情報の機能改変要因としてトランスポゾンが果たしてきた役割は小さくなく、栽培化を含めた作物進化にも大きな役割を果たしてきたと考えられている。(LISCH 2013)。

近年、ゲノム塩基配列が容易に解読できるようになりつつあり、モデル植物に限らず作物でもゲノム塩基配列が明らかとなってきている。育種の手を経っていないシロイヌナズナでは、ゲノム配列の 2 割弱がトランスポゾンとされており(THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE 2000)、イネでは 2~4 割がトランスポゾン由来配列とされている(GOFF *et al.* 2002; INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT 2005; TURCOTTE *et al.* 2001; YU *et al.* 2002)。また、本研究の材料としたカーネーションおよびばれいしよいずれの作物でもゲノム塩基配列が近年明らかとなり、カーネーションゲノムの約 3 割、ばれいしよゲノムの約 6 割がトランスポゾン配列であると報告されている(THE POTATO GENOME SEQUENCING CONSORTIUM 2011; YAGI *et al.* 2013)。育種の過程で遺伝子の改変にトランスポゾンを利用してきたならば、作物には変異を誘発することができる転移活性のあるトランスポゾンが集積していると考察される。今後、野生植物と作物で転移活性を有するトランスポゾンと比較することにより、作物の進化に果たしてきたトランスポゾンの役割の大きさを評価することが可能になると考えられる。

また、ゲノム塩基配列とともに各種遺伝子の機能やその調節機構が次々に明らかとなっている。今後、遺伝子変異の誘発は ZFN、TALEN (TALE nuclease)などの人工ヌクレアーゼ(CURTIN *et al.* 2012; JOUNG and SANDER 2013; PODEVIN *et al.* 2013)を用い目的的に変異を作り出す手法が効率的な育種を実現するために主要なツールとなっていくと予想され、トランスポゾンを用いた変異誘発の育種技術としての必要性は徐々に小さくなっていくと考えられる。しかし、これまでにどのような変異が育種に利用されそれらがどのように誘発されたのかを知ることは、育種の標的となる遺伝子およびその改変の機構を把握する上で重要と考えられる。さらに、栽培化や作物の進化、植物の進化あるいはゲノムの進化のメカニズムを知り、トランスポゾンの果たした役割を正確に把握し評価することには大きな意義があると考えられる。現存生物のゲノムの大きな部分がトランスポゾン由来配列により構成されていることは、トランスポゾンが少なくともゲノムの進化に寄与してきたことを物語っている。

第6章 摘要

作物の育種における遺伝変異の創出には、交配などによる遺伝情報の取り込みおよび組換えと、遺伝情報の機能破壊を含む機能改変が利用される。栄養繁殖性の作物では、体細胞変異による遺伝情報の機能改変は有用な育種的手段として用いられてきた。体細胞変異の原因として、DNA レベルでは塩基置換、挿入、欠失、メチル化、脱メチル化、染色体レベルでは挿入、欠失、転座などがあげられる。このような遺伝情報の変化を引き起こす要因のひとつとしてトランスポゾンの関与が考えられる。

各種生物のゲノムが解読され、植物、動物を問わず真核生物ゲノムの大きな部分を多数のトランスポゾンが占めていることが明らかとなり、トランスポゾンはゲノムの構成要素としても着目されている。なぜこのように多くのトランスポゾンに由来する塩基配列がゲノムを構成しているのかは明らかになってはいないが、ゲノムや個々の遺伝子の進化や新たな遺伝子の創出に影響を与えてきたと示唆されている。このようにトランスポゾン様配列は真核生物種に広くかつ数多く存在するが、ほとんどのトランスポゾン様配列はゲノム中での転移能力を失っており、転移活性をもち体細胞変異に寄与するトランスポゾンは限られていると考えられる。また、どのようなトランスポゾンが育種の場面で利用されてきたのかについて議論するには知見が少ない。

そこで本研究では、栄養繁殖性作物で実際に品種育成に用いられた体細胞変異(枝変わり、培養変異)および変異遺伝子を解析することにより転移能を有するトランスポゾンをそれぞれ同定し、トランスポゾンの遺伝情報破壊への関与を検証した。

1. カーネーションの枝変わり変異を誘発する *hAT*トランスポゾン

栄養繁殖性作物の品種育成において重要である枝わりの原因について、カーネーションでは頻りに枝変わり利用されるにも関わらず、ほとんど知見がない。本研究では、紫から濃ピンクへの花色の枝わりを解析することにより、*Tdic101*と命名した可動な *hAT*トランスポゾンの転移が枝わりを誘発することを見出した。花色の変異は、紫色色素の生合成を司る *flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H)*遺伝子の第2イントロンに *Tdic101* が挿入することに起因していた。そして、変異体に部分的に起こる紫花色への先祖返りでは、このトランスポゾンがフットプリント配列を残し脱離していた。フットプリント配列は残っているがイントロンであるため *Tdic101* の脱離により *F3'H* が復帰し、紫色への先祖返りが起こったと結論した。*Tdic101*はその塩基配列からトランスポゼースをコードする自律性因子と考えられた。また、*Tdic101*に類似するがトランスポゼースを内部にコードしない非自律性トランスポゾンである *dTdic102*も変異体では転移していることが明らかとなった。*dTdic102*の転移は、例えば *Tdic101* など他のゲノム上の位置に存在するトランスポゼースにより引き起こされたと考えられる。以上、カーネーションの枝変わり変異の一因としてトランスポゾンが関与することが明らかとなった。

2. トランスポゾン脱離により復帰したカーネーション花色の濃淡を決める遺伝子の解析

カーネーションのグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子 *DcGSTF2* が花色の濃淡に関わり、ナンセンス変異を持つ *DcGSTF2mu* とトランスポゾン *dTac1* が第1イントロンに挿入した *DcGSTF2-dTac1* の2つの機能しない遺伝子が明らかとなっている。本研究では、*dTac1* には転移活性があり、これが脱離することにより *DcGSTF2* 遺伝子が復帰することを示した。淡ピンク花色の品種 Daisy は機能しない2種の遺伝子を持ち、Daisy から偶発的に得られた濃花色の変異体 Daisy-VPR では、*DcGSTF2-dTac1* から *dTac1* が消失していた。*dTac1* の脱離により復帰した *DcGSTF2rev1* が生じ、濃色への花色変化がおこったことが示された。次に、淡花色の系統 06-LA と濃花色の品種 Spectrum の交雑後代について *DcGSTF2* 遺伝子の分離を解析した。濃色の後代のみが Spectrum 由来の機能する *DcGSTF2rev2* を持ち、淡色の後代では両親由来の機能のない *DcGSTF2mu* と *DcGSTF2-dTac1* を有していたことから、*DcGSTF2rev2* が機能する遺伝子であることが示された。*DcGSTF2rev2* には *dTac1* が挿入していた場所にフットプリント配列が存在することから、*dTac1* の脱離により生じたと考えられた。さらに、6品種の *DcGSTF2* 遺伝子を調査したところ、*DcGSTF2rev1* および *DcGSTF2rev2* はカーネーションの育種に利用され、後者は半世紀以上にわたり利用されてきたことが明らかとなった。

3. ばれいしょ体細胞変異を誘発する Stowaway MITE

Miniature inverted-repeat transposable element (MITE)は真核生物のゲノムに数多く存在するが、ほとんどが転移する活性をもたないと考えられている。植物には、*Tourist* と *Stowaway* と呼ばれる2つの主要な MITE が存在する。MITE がイネで可動であることは報告されているが、双子葉植物で可動な MITE の報告はない。本研究により、ばれいしょで *Stowaway* に属する MITE が可動であり、塊茎皮色の変異を引き起こすことが明らかとなった。赤皮のばれいしょ品種では、*dTstu1* と命名した *Stowaway* に属する MITE が紫色素の生合成に関与する *flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H)* 遺伝子の第1エクソンに挿入することで遺伝子の機能を喪失させていた。この赤皮品種の葉肉プロトプラスト由来の紫皮体細胞変異体では、*F3'5'H* から *dTstu1* がフットプリントを残して消失していた。このことから赤から紫への塊茎色の変異が、*F3'5'H* に挿入する *dTstu1* の脱離によることが示された。変異体では *dTstu1* と塩基配列がほぼ同じ *dTstu1-2* が新たなゲノム上の位置に挿入していることも明らかとなった。これらのことから *Stowaway* MITE が少なくとも組織培養という条件下で転移能を有することが示され、双子葉植物でも MITE が可動であることが明らかとなった。

本研究により、栄養繁殖性作物で実際に育種に利用された枝変わり変異、変異遺伝子、プロトプラスト培養によるソマクローナル変異がクラス 2 (DNA 型) のそれぞれ *hAT*、*CACTA*、*Stowaway MITE* に属する転移活性のあるトランスポゾンにより引き起こされたことが示された。これまでに、クラス 1 トランスポゾン (RNA 型) が、ブドウやカーネーションの遺伝子機能喪失の原因であることが報告されており、育種における遺伝子機能の改変にはクラスあるいは種類を問わずトランスポゾンが寄与してきたと考えられる。

トランスポゾンによる変異を育種に利用する場合、遺伝子あるいはその近傍への挿入しやすさおよび変異遺伝子が安定であることが重要である。コピー&ペーストにより転移するクラス 1 のトランスポゾンは、転移の促進が可能であれば安定性の観点からは有利であると考えられる。カット&ペーストにより転移するクラス 2 トランスポゾンでは、転移の活性化および不活性化の制御が重要となる。クラス 2 トランスポゾンでは、トランスポゼース遺伝子を内部にコードする自律性因子より他の遺伝子座にトランスポゼース遺伝子をもつ非自律性因子のほうが交雑によりトランスポゾンとトランスポゼース遺伝子を分離することができるので転移を制御しやすいと考えられる。しかし、栄養繁殖性作物では交雑せずに変異を誘発することが求められるので、トランスポゼース遺伝子の一過的発現は有効な手段になり得る。トランスポゾンが遺伝子プロモーター、エクソンやエクソン-イントロン境界に挿入し変異が誘発された場合には、脱離の際にフットプリント配列を残すことを利用し自律性、非自律性を問わず挿入箇所からさらに脱離を促すことにより変異の安定化を図ることが可能である。しかし、イントロンにトランスポゾンが挿入した変異体では、安定変異体を育成するためにはトランスポゾン自体の転移制御が必要となる。転移の制御について明らかにしていくためにはそれぞれのトランスポゼースの同定が次の課題となる。

人為的な力とそれによる大きなバイアスがかかっているが、作物育種は進化のモデルになり得る。栽培化を含めた作物進化にトランスポゾンは大きな役割を果たしてきたと考えられている。育種の過程で遺伝子の機能改変にトランスポゾンが利用されてきたならば、作物には変異を誘発するトランスポゾンが集積していると考察される。

近年開発された人工ヌクレアーゼは、目的的な遺伝子変異誘発手法として効率的な育種を実現するための主要なツールとなっていくと予想され、トランスポゾンをういた変異誘発は育種技術としての有用性は小さくなるかもしれない。しかし、これまでにどのような変異が育種に利用されそれらがどのように誘発されたのかを知ることは、育種の標的となる遺伝子およびその改変の機構を把握する上で重要であると考えられる。また、栽培化や作物の進化、植物の進化あるいはゲノムの進化のメカニズムを知るためには、トランスポゾンの果たした役割を正確に把握し評価することが必要であると考えられる。現存生物のゲノムの大きな部分がトランスポゾン由来配列により構成されていることは、トランスポゾンが少なくともゲノムの進化に寄与してきたことを物語っている。

参考文献

- ABE, Y., M. TERA, N. SASAKI, M. OKAMURA, N. UMEMOTO, M. MOMOSE, N. KAWAHARA, H. KAMAKURA, Y. GODA, K. NAGASAWA and Y. OZEKI, 2008 Detection of 1-O-malylglucose: pelargonidin 3-O-glucose-6"-O-malyltransferase activity in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Biochem Biophys Res Commun* **373**: 473-477.
- ALFENITO, M. R., E. SOUER, C. D. GOODMAN, R. BUELL, J. MOL, R. KOES and V. WALBOT, 1998 Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *The Plant Cell* **10**: 1135-1150.
- AZUMA, A., S. KOBAYASHI, N. GOTO-YAMAMOTO, M. SHIRAISHI, N. MITANI, H. YAKUSHIJI and Y. KOSHITA, 2009 Color recovery in berries of grape (*Vitis vinifera* L.) 'Benitaka', a bud sport of 'Italia', is caused by a novel allele at the *VvmybA1* locus. *Plant Science* **176**: 470-478.
- BENNETZEN, J. L., 2000 Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology* **42**: 251-269.
- BLOOR, S. J., 1998 A macrocyclic anthocyanin from red mauve carnation flowers. *Phytochemistry* **49**: 225-228.
- BRITSCH, L., J. DEDIO, H. SAEDLER and G. FORKMANN, 1993 Molecular characterization of flavanone 3 β -hydroxylases. *European Journal of Biochemistry* **217**: 745-754.
- BRUGLIERA, F., G. BARRI-REWELL, T. A. HOLTON and J. G. MASON, 1999 Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the *Ht1* locus of *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* **19**: 441-451.
- BUREAU, T. E., and S. R. WESSLER, 1992 *Tourist*: a large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes. *The Plant Cell* **4**: 1283-1294.
- BUREAU, T. E., and S. R. WESSLER, 1994 *Stowaway*: a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *The Plant Cell* **6**: 907-916.
- CARPENTER, R., C. MARTIN and E. S. COEN, 1987 Comparison of genetic behaviour of the transposable element Tam3 at two unlinked pigment loci in *Antirrhinum majus*. *Molecular and General Genetics* **207**: 82-89.
- CASA, A. M., C. BROUWER, A. NAGEL, L. WANG, Q. ZHANG, S. KRESOVICH and S. R. WESSLER, 2000 The MITE family *Heartbreaker* (*Hbr*): Molecular markers in maize. *Proc Natl*

- Acad Sci USA **97**: 10083-10089.
- CHANG, R. Y., L. S. O'DONOUGHUE and T. E. BUREAU, 2001 Inter-MITE polymorphisms (IMP): a high throughput transposon-based genome mapping and fingerprinting approach. *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 773-781.
- CHARLESWORTH, B., P. SNIEGOWSKI and W. STEPHAN, 1994 The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* **371**: 215-220.
- CHENG, C., M. DAIGEN and H. HIROCHIKA, 2006 Epigenetic regulation of the rice retrotransposon *Tos17*. *Molecular Genetics and Genomics* **276**: 378-390.
- CLEGG, M. T., and M. L. DURBIN, 2000 Flower color variation: a model for the experimental study of evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7016-7023.
- COEN, E. S., R. CARPENTER and C. Martin, 1986 Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum majus*. *Cell* **47**: 285-296.
- CONN, S., C. CURTIN, A. BÉZIER, C. FRANCO and W. ZHANG, 2008 Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3621-3634.
- CURTIN, S. J., D. F. VOYTAS and R. M. STUPAR, 2012 Genome engineering of crops with designer nucleases. *Plant Gen.* **5**: 42-50.
- DAWE, R. K., and M. FREELING, 1991 Cell lineage and its consequences in higher plants. *The Plant Journal* **1**: 3-8.
- FESCHOTTE, C., N. JIANG and S. R. WESSLER, 2002 Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat Rev Genet* **3**: 329-341.
- FESCHOTTE, C., M. T. OSTERLUND, R. PEELER and S. R. WESSLER, 2005 DNA-binding specificity of rice *mariner*-like transposases and interactions with *Stowaway* MITEs. *Nucleic Acids Research* **33**: 2153-2165.
- FINNEGAN, D. J., 1992 Transposable elements. *Current Opinion in Genetics and Development* **2**: 861-867.
- FUJINO, K., S.-N. HASHIDA, T. OGAWA, T. NATSUME, T. UCHIYAMA, T. MIKAMI and Y. KISHIMA, 2011 Temperature controls nuclear import of Tam3 transposase in *Antirrhinum*. *The Plant Journal* **65**: 146-155.
- FUKUI, Y., Y. TANAKA, T. KUSUMI, T. IWASHITA and K. NOMOTO, 2003 A rationale for the shift in colour towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid

- 3',5'-hydroxylase gene. *Phytochemistry* **63**: 15-23.
- GEISSMAN, T. A., and G. A. MEHLQUIST, 1947 Inheritance in the carnation, *Dianthus caryophyllus*: the chemistry of flower color variation. *Genetics* **32**: 410-433.
- GOFF, S. A., D. RICKE, T.-H. LAN, G. PRESTING, R. WANG, M. DUNN, J. GLAZEBROOK, A. SESSIONS, P. OELLER, H. VARMA, D. HADLEY, D. HUTCHISON, C. MARTIN, F. KATAGIRI, B. M. LANGE, Y. MOUGHAMER, Y. XIA, P. BUDWORTH, J. ZHONG, T. MIGUEL, U. PASZKOWSKI, S. ZHANG, M. COLBERT, W. SUN, L. CHEN, B. COOPER, S. PARK, T. C. WOOD, L. MAO, P. QUAIL, R. WING, R. DEAN, Y. YU, A. ZHARKIKH, R. SHEN, S. SAHASRABUDHE, A. THOMAS, R. CANNINGS, A. GUTIN, D. PRUSS, J. REID, S. TAVTIGIAN, J. MITCHELL, G. ELDREDGE, T. SCHOLL. R. M. MILLER, S. BHATNAGAR, N. ADEY, T. RUBANO, N. TUSNEEM, R. ROBINSON, J. FELDHAUS, T. MACALMA, A. OLIPHANT and S. BRIGGS, 2002 A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* **296**: 92-100.
- GRANDBASTIEN, M.-A., A. SPIELMANN and M. CABOCHE, 1989 Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature* **337**: 376-380.
- HARRISON, B. J., and J. R. S. FINCHAM, 1968 Instability at the Pal locus in *Antirrhinum majus* 3. A gene controlling mutation frequency. *Heredity* **23**: 67-72.
- HASHIDA, S.-N., T. UCHIYAMA, C. MARTIN, Y. KISHIMA, Y. SANO and T. MIKAMI, 2006 The temperature-dependent change in methylation of the *Antirrhinum* transposon Tam3 is controlled by the activity of its transposase. *The Plant Cell* **18**: 104-118.
- HIROCHIKA, H., 1993 Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. *EMBO J* **12**: 2521-2528.
- HOLTON, T. A., F. BRUGLIERA, D. R. LESTER, Y. TANAKA, C. D. HYLAND, J.G. MENTING, C. Y. LU, E. FARCY, T. W. STEVENSON and E. C. CORNISH, 1993 Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* **366**: 276-279.
- HUALA, E., and I. M. SUSSEX, 1993 Determination and cell interactions in reproductive meristems. *The Plant Cell* **5**: 1157-1165.
- IIDA, S., A. HOSHINO, Y. JOHZUKA-HISATOMI, Y. HABU and Y. INAGAKI, 1999 Floricultural traits and transposable elements in the Japanese and common morning glories. *Annals of the New York Academy of Sciences* **870**: 265-274.
- INAGAKI, Y., Y. HISATOMI and S. IIDA, 1996 Somatic mutations caused by excision of the

- transposable element, *Tpn1*, from the *DFR* gene for pigmentation in sub-epidermal layer of periclinally chimeric flowers of Japanese morning glory and their germinal transmission to their progeny. *Theoretical and Applied Genetics* **92**: 499-504.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2001 Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.
- INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT, 2005 The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**: 793-800
- ITOH, Y., D. HIGETA, A. SUZUKI, H. YOSHIDA and Y. OZEKI, 2002 Excision of transposable elements from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Cell Physiol* **43**: 578-585.
- JIANG, N., Z. BAO, X. ZHANG, H. HIROCHIKA, S. R. EDDY, S. R. MCCOUCH and S. R. WESSLER, 2003 An active DNA transposon family in rice. *Nature* **421**: 163-167.
- JOUNG, J. K., and J. D. SANDER, 2013 TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 49-55.
- JUNG, C. S., H. M. GRIFFITHS, D. M. DE JONG, S. CHENG, M. BODIS and W. S. DE JONG, 2005 The potato *P* locus codes for flavonoid 3',5'-hydroxylase. *Theoretical and Applied Genetics* **110**: 269-275.
- KAEPLER, S. M., H. F. KAEPLER and Y. RHEE, 2000 Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* **43**: 179-188.
- KIKUCHI, K., K. TERAUCHI, M. WADA and H.-Y. HIRANO, 2003 The plant MITE *mPing* is mobilized in anther culture. *Nature* **421**: 167-170.
- KITAMURA, S., Y. AKITA, H. ISHIZAKA, I. NARUMI and A. TANAKA, 2012 Molecular characterization of an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in cyclamen. *Journal of Plant Physiology* **169**: 636-642.
- KITAMURA, S., N. SHIKAZONO and A. TANAKA, 2004 *TRANSPARENT TESTA 19* is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **37**: 104-114.
- KOBAYASHI, S., N. GOTO-YAMAMOTO and H. HIROCHIKA, 2004 Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* **304**: 982.
- KOES, R., W. VERWEIJ and F. QUATTROCCHIO, 2005 Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science* **10**:

236-242.

- LARSEN, E. S., M. R. ALFENITO, W. R. BRIGGS and V. WALBOT, 2003 A carnation anthocyanin mutant is complemented by the glutathione S-transferases encoded by maize *Bz2* and petunia *An9*. *Plant Cell Reports* **21**: 900-904.
- LEE, M., and R. L. PHILLIPS, 1988 The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**: 413-437.
- LISCH, D., 2009 Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 43-66.
- LISCH, D., 2013 How important are transposons for plant evolution? *Nat Rev Genet* **14**: 49-61.
- LIU, Q., A. ZHU, L. CHAI, W. ZHOU, K. YU, J. DING, J. XU and X. DENG, 2009 Transcriptome analysis of a spontaneous mutant in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] during fruit development. *Journal of Experimental Botany* **60**: 801-813.
- MACAS, J., KOBL, KOV, ANDREA and P. NEUMANN, 2005 Characterization of *Stowaway* MITEs in pea (*Pisum sativum* L.) and identification of their potential master elements. *Genome* **48**: 831-839.
- MARRS, K. A., M. R. ALFENITO, A. M. LLOYD and V. WALBOT, 1995 A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* **375**: 397-400.
- MATO, M., T. ONOZAKI, Y. OZEKI, D. HIGETA, Y. ITOH, Y. YOSHIMOTO, H. IKEDA, H. YOSHIDA and M. SHIBATA, 2000 Flavonoid biosynthesis in white-flowered Sim carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Scientia Horticulturae* **84**: 333-347.
- MATSUBA, Y., N. SASAKI, M. TERA, M. OKAMURA, Y. ABE, E. OKAMOTO, H. NAKAMURA, H. FUNABASHI, M. TAKATSU, M. SAITO, H. MATSUOKA, K. NAGASAWA and Y. OZEKI, 2010 A novel glucosylation reaction on anthocyanins catalyzed by acyl-glucose-dependent glucosyltransferase in the petals of carnation and delphinium. *The Plant Cell* **22**: 3374-3389.
- MCCCLINTOCK, B., 1951 Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **16**: 13-47.
- MEHLQUIST, G. A. L., and T. A. GEISSMAN, 1947 Inheritance in the carnation (*Dianthus caryophyllus*). III. Inheritance of flower color. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **34**: 39-74.

- MENZEL, G., D. DECHYEVA, H. KELLER, C. LANGE, H. HIMMELBAUER and T. SCHMIDT, 2006 Mobilization and evolutionary history of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in *Beta vulgaris* L. *Chromosome Research* **14**: 831-844.
- MÉRAI, Z., A. H. BENKOVICS, T. NYIKÓ, M. DEBRECZENY, L. HIRIPI, Z. KERÉNYI, E. KONDOROSI and D. SILHAVY, 2013 The late steps of plant nonsense-mediated mRNA decay. *The Plant Journal* **73**: 50-62.
- NAKAYAMA, M., M. KOSHIOKA, H. YOSHIDA, Y. KAN, Y. FUKUI, A. KOIKE and M. YAMAGUCHI, 2000 Cyclic malyl anthocyanins in *Dianthus caryophyllus*. *Phytochemistry* **55**: 937-939.
- NAKAZAKI, T., Y. OKUMOTO, A. HORIBATA, S. YAMAHIRA, M. TERAISHI, H. NISHIDA, H. INOUE and T. TANISAKA, 2003 Mobilization of a transposon in the rice genome. *Nature* **421**: 170-172.
- NISHIHARA, M., T. HIKAGE, E. YAMADA and T. NAKATSUKA, 2011 A single-base substitution suppresses flower color mutation caused by a novel miniature inverted-repeat transposable element in gentian. *Molecular Genetics and Genomics* **286**: 371-382.
- NISHIZAKI, Y., Y. MATSUBA, E. OKAMOTO, M. OKAMURA, Y. OZEKI and N. SASAKI, 2011 Structure of the acyl-glucose-dependent anthocyanin 5-O-glucosyltransferase gene in carnations and its disruption by transposable elements in some varieties. *Molecular Genetics and Genomics* **286**: 383-394.
- OGATA, J., Y. ITOH, M. ISHIDA, H. YOSHIDA and Y. OZEKI, 2004 Cloning and heterologous expression of cDNAs encoding flavonoid glucosyltransferases from *Dianthus caryophyllus*. *Plant biotechnology* **21**: 367-375.
- OKAMURA, M., 1991 Somaclonal variation and variety improvement: Development of potato new variety "JAGA KIDS". *組織培養* **17**: 207-212.
- OKAMURA, M., 1994 Pomato: potato protoplast system and somatic hybridization between potato and a wild tomato, pp. 209-223 in *Biotechnology in Agriculture and Forestry 27, Somatic Hybridization in Crop Improvement I*, edited by Y. P. S. BAJAJ. Springer-Verlag, Heidelberg.
- OKI, N., K. YANO, Y. OKUMOTO, T. TSUKIYAMA, M. TERAISHI and T. TANISAKA, 2008 A genome-wide view of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in rice, *Oryza sativa* ssp. *japonica*. *Genes & genetic systems* **83**: 321-329.
- PESCHKE, V. M., and R. L. PHILLIPS, 1991 Activation of the maize transposable element

- Suppressor-mutator (Spm)* in tissue culture. *Theoretical and Applied Genetics* **81**: 90-97.
- PESCHKE, V. M., R. L. PHILLIPS and B. G. GENGENBACH, 1987 Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture-derived maize plants. *Science* **238**: 804-807.
- PODEVIN, N., H. V. DAVIES, F. HARTUNG, F. NOGUÉ and J. M. CASACUBERTA, 2013 Site-directed nucleases: a paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. *Trends in Biotechnology* **31**: 375-383.
- RUBIN E., G. LITHWICK and A. A. LEVY (2001) Structure and evolution of the *hAT* transposon superfamily. *Genetics* **158**: 949-957
- SASAKI, N., Y. NISHIZAKI, Y. UCHIDA, E. WAKAMATSU, N. UMEMOTO, M. MOMOSE, M. OKAMURA, H. YOSHIDA, M. YAMAGUCHI, M. NAKAYAMA, Y. OZEKI and Y. ITOH, 2012 Identification of the *glutathione S-transferase* gene responsible for flower color intensity in carnations. *Plant Biotechnology* **29**: 223-227.
- SATINA, S., A. F. BLAKESLEE and A. G. AVERY, 1940 Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of datura by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *American Journal of Botany* **27**: 895-905.
- SHIBATA, M., S. KISHIMOTO, M. HIRAI, R. AIDA and I. IKEDA, 1998 Analysis of the periclinal chimeric structure of chrysanthemum sports by random amplified polymorphic DNA. *Acta Horticulturae* **454**: 347-353.
- SPRIBILLE, R., and G. FORKMANN, 1982 Chalcone synthesis and hydroxylation of flavonoids in 3'-position with enzyme preparations from flowers of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). *Planta* **155**: 176-182.
- SUSSEX, I. M., 1989 Developmental programming of the shoot meristem. *Cell* **56**: 225-229.
- THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000 Analysis of the genome of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- THE POTATO GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2011 Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* **475**: 189-195
- TODA, K., D. YANG, N. YAMANAKA, S. WATANABE, K. HARADA and R. TAKAHASHI, 2002 A single-base deletion in soybean flavonoid 3'-hydroxylase gene is associated with gray pubescence color. *Plant Molecular Biology* **50**: 187-196.
- TOGURI, T., M. AZUMA and T. OHTANI, 1993a The cloning and characterization of a cDNA

- encoding a cytochrome P450 from the flowers of *Petunia hybrida*. *Plant Science* **94**: 119-126.
- TOGURI, T., N. UMEMOTO, O. KOBAYASHI and T. OHTANI, 1993b Activation of anthocyanin synthesis genes by white light in eggplant hypocotyl tissues, and identification of an inducible P-450 cDNA. *Plant Molecular Biology* **23**: 933-946.
- TOMIDA, Y., and K. KAWAKAMI, 1989 On the species hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. phureja* 253. *Potato Science* **9**: 71-78.
- TURCOTTE, K., S. SRINIVASAN and T. BUREAU, 2001 Survey of transposable elements from rice genomic sequences. *The Plant Journal* **25**: 169-179.
- UEYAMA, Y., K.-I. SUZUKI, M. FUKUCHI-MIZUTANI, Y. FUKUI, K. MIYAZAKI, H. OHKAWA, T. KUSUMI and Y. TANAKA, 2002 Molecular and biochemical characterization of torenia flavonoid 3'-hydroxylase and flavone synthase II and modification of flower color by modulating the expression of these genes. *Plant Science* **163**: 253-263.
- VAN HARTEN, A., 2002 Mutation breeding of vegetatively propagated ornamentals., pp. 105-128 in *Breeding for ornamentals: Classical and molecular approaches.*, edited by A. VAINSTEIN. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- WALBOT, V., and C. WARREN, 1988 Regulation of *Mu* element copy number in maize lines with an active or inactive Mutator transposable element system. *Molecular and General Genetics* **211**: 27-34.
- WALKER, A., E. LEE and S. ROBINSON, 2006 Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus. *Plant Molecular Biology* **62**: 623-635.
- WINKEL-SHIRLEY, B., 2001 It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiology* **127**: 1399-1404.
- WOLFF, K., 1996 RAPD analysis of sporting and chimerism in chrysanthemum. *Euphytica* **89**: 159-164.
- YAGI, M., S. KOSUGI, J. HIRAKAWA, A. OHMIYA, K. TANASE, T. HARADA, K. KISHIMOTO, M. NAKAYAMA, K. ICHIMURA, T. ONOZAKI, H. YAMAGUCHI, N. SASAKI, T. MIYAHARA, Y. NISHIZAKI, Y. OZEKI, N. NAKAMURA, T. SUZUKI, Y. TANAKA, S. SATO, K. SHIRASAWA, S. ISOBE, Y. MIYAMURA, A. WATANABE, S. NAKAYAMA, Y. KISHIDA, M. KOHARA and S. TABATA, 2013 Sequence analysis of the genome of carnation (*Dianthus*

- caryophyllus* L.). DNA Research 2013 Dec 17. Epub ahead of print.
- YAKUSHIJI, H., S. KOBAYASHI, N. GOTO-YAMAMOTO, S. TAE JEONG, T. SUETA, N. MITANI and A. AZUMA, 2006 A skin color mutation of grapevine, from black-skinned Pinot Noir to white-skinned Pinot Blanc, is caused by deletion of the functional *VvmybA1* allele. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **70**: 1506-1508.
- YAMAZAKI, M., M. SHIBATA, Y. NISHIYAMA, K. SPRINGOB, M. KITAYAMA, N. SHIMADA, T. AOKI, S. AYABE and K. SAITO, 2008 Differential gene expression profiles of red and green forms of *Perilla frutescens* leading to comprehensive identification of anthocyanin biosynthetic genes. FEBS Journal **275**: 3494-3502.
- YANG, G., D. H. NAGEL, C. FESCHOTTE, C. N. HANCOCK and S. R. WESSLER, 2009 Tuned for transposition: Molecular determinants underlying the hyperactivity of a *Stowaway* MITE. Science **325**: 1391-1394.
- YANG, G., F. ZHANG, C. N. HANCOCK and S. R. WESSLER, 2007 Transposition of the rice miniature inverted repeat transposable element *mPing* in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA **104**: 10962-10967.
- YOSHIDA, H., H. AKIMOTO, M. YAMAGUCHI, M. SHIBATA, Y. HABU, S. IIDA and Y. OZEKI, 2004 Alteration of methylation profiles in distinct cell lineages of the layers during vegetative propagation in carnations (*Dianthus caryophyllus*). Euphytica **135**: 247-253.
- YOSHIMOTO, Y., D. HIGETA, Y. ITO, H. YOSHIDA, M. HASEBE and Y. OZEKI, 2000 Isolation and characterization of a cDNA for phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from *Dianthus caryophyllus* (carnation). Plant biotechnology **17**: 325-329.
- YU, J., S. HU, J. WANG, G. K.-S. WONG, S. LI, B. LIU, Y. DENG, L. DAI, Y. ZHOU, X. ZHANG, M. CAO, J. LIU, J. SUN, J. TANG, Y. CHEN, X. HUANG, W. LIN, C. YE, W. TONG, L. CONG, J. GENG, Y. HAN, L. LI, W. LI, G. HU, X. HUANG, W. LI, J. LI, Z. LIU, L. LI, J. LIU, Q. QI, J. LIU, L. LI, T. LI, X. WANG, H. LU, T. WU, M. ZHU, P. NI, H. HAN, W. DONG, X. REN, X. FENG, P. CUI, X. LI, H. WANG, X. XU, W. ZHAI, Z. XU, J. ZHANG, S. HE, J. ZHANG, J. XU, K. ZHANG, X. ZHENG, J. DONG, W. ZENG, L. TAO, J. YE, J. TAN, X. REN, X. CHEN, J. HE, D. LIU, W. TIAN, C. TIAN, H. XIA, Q. BAO, G. LI, H. GAO, T. CAO, J. WANG, W. ZHAO, P. LI, W. CHEN, X. WANG, Y. ZHANG, J. HU, J. WANG, S. LIU, J. YANG, G. ZHANG, Y. XIONG, Z. LI, L. MAO, C. ZHOU, Z. ZHU, R. CHEN, B. HAO, W. ZHENG, S. CHEN, W. GUO, G. LI, S. LIU, M. TAO, J. WANG, L. ZHU, L. YUAN and H. YANG, 2002 A draft sequence of the

rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* **296**: 79-92.

ZHAO, J., and R. A. DIXON, 2010 The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. *Trends in Plant Science* **15**: 72-80.

謝辞

本研究を行なうにあたり、御指導を賜った東京農工大学 小関良宏教授につつしんで感謝の意を表する。また、本研究をまとめるにあたり御指導を賜った東京大学 堤伸浩教授に深く感謝する。研究を進める上で材料の提供をいただいた神戸大学(当時) 保坂和良教授、有益な助言と御指導をいただいた農業・食品産業技術総合研究機構花き研究所 中山真義博士、社団法人 農林水産・食品産業技術振興協会 廣澤孝保理事、大西昇主幹研究員をはじめとするキリン株式会社基盤技術研究所のみなさま、伊藤佳央博士、佐々木伸大博士をはじめとする東京農工大学のみなさまに心よりお礼申し上げます。ここに記して深謝の意を表する。

本論文の第2章、第3章、第4章の図表は、それぞれ以下の雑誌に印刷公表したものを含んでいる。各出版社には、本論文への利用およびインターネット公開について許諾いただいた。ここに記して感謝申し上げます。

1. An active *hAT* transposable element causing bud mutation of carnation by insertion into the *flavonoid 3'-hydroxylase* gene. 2013 *Molecular Genetics and Genomics* **288**: 175–184.
2. Reverted glutathione S-transferase-like genes that influence flower color intensity of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) originated from excision of a transposable element. 2013 *Breeding Science* **63**: 435-440
3. Miniature inverted-repeat transposable elements of *Stowaway* are active in potato. 2010 *Genetics* **186**: 59-66.