

氏 名	Yohei Uwagaki 上垣 陽平
-----	------------------------

(論文内容の要旨)

**Construction of transformation system and expression of the astaxanthin biosynthesis genes in *Freesia hybrid* (フリージアにおける形質転換系の構築とアスタキサンチン生合成遺伝子の発現)**

*Freesia* (*Freesia* × *hybrida*) is a member of the subfamily Ixioideae, the family Iridaceae, and is originated in the Cape Province in South Africa. It is a popular cut flower, because of flower forms, floral fragrance and wide petal color variations. Ishikawa prefecture (Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, and the Ishikawa Agriculture and Forestry Research Center) has bred new varieties of freesia, 'Ishikawa f1~f11' of the series named 'Airy-Flora', which are already distributed in market. *Freesia* is also a promising edible flower. In order to confer new beneficial characters to 'Airy-Flora', we constructed the *Agrobacterium*-mediated transformation system of freesia. And we tried to produce transgenic plants of 'Airy-Flora' by introducing biosynthesis genes for astaxanthin, which is the famous antioxidative red carotenoid.

We utilized the plasmid pUTR-crtZWI(pZH2B) containing a binary vector pZH2B, in which three enzyme genes was inserted for  $\beta,\beta$ -carotenoid 3,3'-hydroxylase (CrtZ) and  $\beta,\beta$ -carotenoid 4,4'-ketolase (4,4'-oxygenase; CrtW) from a marine bacterium *Brevundimonas* sp. strain SD212, and isopentenyl diphosphate isomerase (type 2 Idi) from a marine bacterium *Paracoccus* sp. strain N81106, under the regulation of the CaMV 35S promoter and the transit peptide sequence of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) small subunit from pea. And the 5'-untranslated region (UTR) of the *Nicotiana tabacum* alcohol dehydrogenase gene (*NtADH*) was attached to the ATG of each gene, preceded with the transit peptide sequence.

The transformation method with the plasmid was a modification of that described (Uwagaki *et al*, *Plant Biotechnol* 32:165-168, 2015). The cormlets of freesia cultivar 'Ishikawa f6' were cut aseptically into ca. 5-mm cubes. The cubes were infected to *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 harboring pUTR-crtZWI(pZH2B), and co-cultured in the dark at 23°C. After five days of co-cultivation, they were transferred onto MS basal medium supplemented with 5,6-dichloro-1H-indole-3-acetic acid, thidiazuron (TDZ), hygromycin, meropenem, 3% sucrose, and gellan gum (selection medium). The cultures were carried out at 22°C in the dark. After around 9 weeks of cultivation, generated hygromycin-resistant calli were transferred onto regeneration medium, which was selection medium without 5,6-dichloro-1H-indole-3-acetic acid. The cultures were carried out at 22°C under a 16-h light/8-h dark photoperiod. After around 30 days of cultivation, these were subsequently cultured on PGR-free MS medium containing hygromycin. Consequently, three hygromycin-resistant plantlets, which exhibited orange color systemically, were regenerated from the totals of 584 cubes from the cormlets.

HPLC-PDA-MS/MS (HRMS) analysis was performed to determine carotenoid profiles of the wild-type and transgenic freesia. The introduced genes were functionally expressed especially in the callus, which produced large amounts of astaxanthin including its esterified forms [63% of total carotenoids (32.2  $\mu\text{g/g}$  fresh weight)] and free form (4.3%) in addition to other ketocarotenoids that contained fritschiellaxanthin (3%), 4-ketoantheraxanthin (1.6%), adonirubin (5.4%), adonixanthin (2%), and canthaxanthin (4.2%). The regenerated freesia plant exhibited bronze (reddish green) color, and its stems and (large) flower buds were found to accumulate astaxanthin esterified forms [50.3% and 35.3% of total carotenoids (83.1 and 21.6  $\mu\text{g/g}$  fresh weight)], respectively. Whereas, the petals contained trace amounts of carotenoids, presumably because of rapid reduction and/or degeneracy of the chloroplasts (plastids). Our study indicated that the carotenoid biosynthesis genes were efficiently functionally expressed in freesia plants, except for white color-base petals.

氏 名	上垣 陽平
-----	-------

(論文審査の結果の要旨)

上垣陽平氏は、平成23年から3年間、石川県農林総合研究センターから石川県立大学 生物資源工学研究所・植物細胞工学・濱田研究室に派遣された。そこで上垣氏は、石川県が開発した花卉植物であるエアリーフローラ（フリージア）の形質転換系の構築に取り組み、形質転換頻度は低いながらも、フリージア（エアリーフローラ・石川 f3号）の形質転換に世界で初めて成功した（論文目録の公表論文）。その後、上垣氏は本研究活動から離れ、石川県農林総合研究センター及び農林水産部の業務に携わった。

その一方で、上垣氏は本研究活動の再開を行うべく、平成29年10月に石川県立大学 生物機能開発科学専攻 博士後期課程（生物資源工学研究所・遺伝子機能学・三沢研究室）に社会人入学した。そして、令和4年9月に期間満了退学するまで 5年間在籍した。本課程で上垣氏は、形質転換可能なエアリーフローラの品種の拡大（石川 f6号と石川 f2号も可能になった）と形質転換頻度の向上を達成するとともに、赤色の機能性カロテノイド色素であるアスタキサンチン生合成遺伝子（海洋細菌由来）のエアリーフローラ（f6号と f2号）への導入と発現に成功した。そして、このアスタキサンチン生合成遺伝子は、フリージア、特にカルスで効率的に機能発現することを示した。この成果の一部（f6号を宿主として用いた成果）は、論文目録の公表予定論文（受理済み）、及び第33回カロテノイド研究談話会（2019年、千葉）で発表された。また、エアリーフローラ f2号（黄花品種）の花の色素の同定や利用法の検討に際して、彼は技術的な助言などで貢献した（論文目録の参考論文）。

なお、この博士後期課程の5年間における上記の研究成果は、上垣氏の石川県農林水産部の業務の時間外に行われた研究活動から得られたものであり、このことは、上垣氏の高い研究能力と熱意と勤勉性を表している。当研究室は、これらの研究成果により、フリージアのカロテノイド代謝工学・生物有機化学研究を大きく進めることができた。

1月23日に実施された公聴会においては、上垣氏のプレゼンテーションの内容はわかりやすく、聴衆を惹き付けるものであった。その後の質疑応答は活発になされ、質問やコメントに対する上垣氏の返答も的確であった。

よって、本論文は博士（生物資源環境学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和 5 年 2 月 1 2 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。