

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	INTHIMA PHITHAK
学位	博士 ( 学術 )
学位記番号	新大院博 (学) 第 206 号
学位授与の日付	平成 26 年 9 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	The effect of <sup>12</sup> C-ion beam irradiation and overexpression of the gibberellin biosynthetic and metabolic genes on morphology and artemisinin content of <i>Artemisia annua</i> L. (炭素イオンビーム照射およびジベレリン生合成・代謝経路関連遺伝子の過剰発現がクソニンジンの形態およびアルテミシニン含量に及ぼす影響)
論文審査委員	主査 准教授・中野 優 副査 教授・岡崎 桂一 副査 教授・末吉 邦 副査 教授・山田 宜永 副査 准教授・佐野 義孝

博士論文の要旨

本研究では、クソニンジン (*Artemisia annua* L.) において、マラリアの特効薬であるアルテミシニン高生産性の新系統の育成を目的として、以下のような検討を行った。

1. 炭素イオンビーム照射による突然変異の誘導

培養個体から調製した節切片にさまざまな吸収線量の炭素イオンビームを照射したところ、2.5 Gy 照射区ではわずかな、また、5 および 10 Gy 照射区では顕著な致死効果がみられた。さらに高い線量 (20 および 50 Gy) の照射区では、激的な致死効果が観察された。腋芽由来のシュートについて RAPD 分析による DNA レベルでの変異調査を行ったところ、10 Gy 照射区における変異発生頻度は、2.5 および 5 Gy 照射区のそれぞれ 1.7 および 2.1 倍であった。72 個体の炭素イオンビーム照射由来変異体についてアルテミシニン生産を調査したところ、約 14 および 7% の変異体において、アルテミシニン含量およびアルテミシニン収量がそれぞれ野生型の個体よりも高かった。変異体における最も高いアルテミシニン含量は 1.43% DW であり、この値は野生型の 3.2 倍に相当した。一方、変異体における最も高いアルテミシニン収量は個体あたり 3.68 mg であり、この値は野生型の約 1.4 倍に相当した。さらに、変異体は黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) に対する抗菌活性を示したが、野生型では抗菌活性はみられなかった。GC-MS 分析により、変異体と野生型間で代謝プロファイルに明らかな差異が検出された。

2. ジベレリン生合成・代謝経路関連遺伝子を過剰発現する形質転換体の作出

アグロバクテリウム法により、トレニア由来のジベレリン生合成 (*TfGA3ox* および *TfGA20ox2*)・代謝 (*GA2ox2*) 経路関連遺伝子が導入された形質転換体の作出を試みたところ、*TfGA20ox2* を過剰発現する形質転換体のみが得られた。すべての形質転換体は、非形質転換体と比較して、有意に高い草丈および有意に高いアルテミシニン含量を示した。形質転換体における最も高いアルテミシニン含量は 0.72% DW であり、この値は非形質転換

体の約 2 倍に相当した。一方、変異体における最も高いアルテミシニン収量は個体あたり 1.16 mg であり、この値は非形質転換体の 1.9 倍に相当した。

本研究により、重イオンビーム照射およびアグロバクテリウム法によるジベレリン生合成経路関連遺伝子導入が、クソニンジンにおけるアルテミシニン生産の改善に有効であることが示された。また、本研究において作出された突然変異体および形質転換体は、クソニンジンにおける機能遺伝学および育種 material として有用であると考えられた。

#### 審査結果の要旨

本論文は、マラリア治療に関して重要な薬用植物であるクソニンジン材料を用い、有効成分アルテミシニンの高生産株の育成を目的として、突然変異の誘導および形質転換を検討したものである。突然変異誘導に関しては、突然変異原として炭素イオンビームを用い、まず、突然変異誘導に有効な線量を明らかにした。また、突然変異体の形態およびアルテミシニン生産を調査し、アルテミシニン生産が野生型よりも向上した変異体を複数系統見いだした。形質転換に関しては、ジベレリン生合成に関する遺伝子を過剰発現させた際に、草丈およびアルテミシニン含量が向上することを見いだした。このように、本研究により、クソニンジンにおけるアルテミシニン高生産株の育成に対して、炭素イオンビームによる突然変異誘導およびジベレリン生合成経路関連遺伝子を用いた形質転換が有効であることが示された。

本研究において得られた知見は、クソニンジンの育種はもちろん、アルテミシニン生合成に関する基礎研究に大きく貢献するものであると審査委員会は評価した。なお、本論文の成果の一部は、申請者を筆頭著者として、国際誌「Plant Cell, Tissue and Organ Culture」に掲載されている。

よって、本論文は博士 (学術) の博士論文として十分であると認定した。