

論文内容の要旨

論文題目 *Nicotiana plumbaginifolia*における *Arabidopsis* 由来の温度感受性プロモーターの発現とその応用に関する研究

氏名 森脇 将光

遺伝子組換え植物の基礎研究及び応用研究において、Cauliflower Mosaic Virus 35S (CaMV35S) プロモーターは、殆どの器官で常時、強く発現することから、最も多くの形質転換植物に使用されてきた。しかしその反面、強い発現力を有するプロモーターであることから、オーバープロダクションによる障害や内在性遺伝子のコサプレションによる抑制等様々な問題点も報告されてきた。そこで一時的に発現するプロモーターを使用すれば、その発現を調整することにより、CaMV35S プロモーター使用時に生じる様々な問題点が改善される部分もあるのではないかと考えられた。

植物では一時的に発現するプロモーターとして、傷害誘導性、エリシター感受性、光感受性、化学物質感受性及び組織特異的プロモーター等が知られており、それらは限定された条件下で効率的に発現する為、特に応用上の利点が考えられている。しかし、例えば、テトラサイクリン感受性プロモーター遺伝子はタバコで開発されたものであるが、シロイヌナズナ及びトマト等では発現しないと報告されており、また組織特異的プロモーターの多くは、使用できる植物が限定される上に、かつ目的の組織以外でも発現するという報告がある。更に化学物質感受性プロモーターでは、化学物質の組織への浸透性等の原因で、

発現を微調整することが困難なことが予想される。

そこで本研究では、一時的に発現するプロモーターとして温度感受性プロモーターに着目した。その理由として、以下のような点を研究上また応用上長所として考えた。

1. 温度感受性プロモーター遺伝子は、多くの植物に共通の配列を持つものが存在するので、汎用性が広いと考えられる。
2. 温室等を利用して、その発現を調節できる可能性がある。

また今までに、温度感受性プロモーター遺伝子の発現を調べる為に、レポーター遺伝子として β -D-Glucuronidase (GUS) 遺伝子を導入した形質転換植物で報告されているが、温度条件、生長度、組織特異性等を含めて総合的に熱ショックによる GUS 発現を報告しているものはない。また温度感受性プロモーターと有用遺伝子の融合した遺伝子を植物に導入し有効活用しようとする試みがなされた例もない。

フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 酵素はシキミ酸経路で作られたフェニルアラニンから桂皮酸とアンモニアを生成する酵素であり、PAL 酵素は、フェニルプロパノイド代謝の最初のステップになる重要な植物の代謝酵素である。そしてそのフェニルプロパノイド系代謝産物として、フラボノイド、リグニン、クマリン等があるが、それらは植物にとって、昆虫からの防御、UV 防御、抗微生物作用等の役割を担う有用な代謝産物である。またそれら代謝産物であるアントシアニンは色素、フラボノイドは抗酸化剤、カプサイシンは香辛料として使用されており、人の生活においてもなくてはならないものとなっている。

従って、PAL 遺伝子を植物に導入し、二次代謝産物を効率的に産生させることは非常に重要なことと考えられた。しかし PAL 遺伝子の植物への導入を考えた場合、常時強く発現する CaMV35S プロモーターを使用すると、逆に PAL の発現が抑制される報告があることから、温度感受性プロモーターと PAL 遺伝子との融合遺伝子を導入した形質転換植物を作成し、温室等で熱処理を行い、PAL 活性を外部から制御し、二次代謝系へのスイッチの on, off を調整することで、目的の代謝産物含量を変化させることが可能になるのではないかと推察された。

そこでまず *Arabidopsis* の熱ショックタンパク質 (HSP18.2) のプロモーターと GUS の融合遺伝子を導入した *Nicotiana plumbaginifolia* を作成して熱誘導 GUS 活性の変化を比較検討した。その結果、温度という処理条件のスイッチ on, off で選択的に、プロモーターが効

率的に発現するということが判った。しかし、その発現レベルは、植物の生長度、器官・組織及び温度条件等で異なった現象を示すことが判った。

すなわち形質転換体の再分化後 5-7 ヶ月で 5-8cm の長さの葉を使用した実験で、熱誘導 GUS 活性が 42℃・2 時間の熱処理で効率的に発現した。しかしその発現レベルは、葉長と相関が有り、かつ再分化後の栽培期間に影響された。

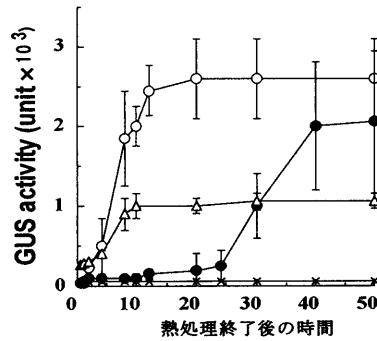


図1 形質転換株葉の熱誘導GUS活性
 △37℃・2時間 ○42℃・2時間 ●44℃・2時間 ×45℃・2時間

また特に致死温度に近い 44℃・2 時間の熱処理を行った時は、他の熱処理条件の時とは大きく異なり、熱処理終了後約 24 時間はほとんど活性を示さず、その後徐々に活性が上昇するという GUS 発現パターンを示した (図 1)。

これら結果より形質転換株葉の発現は、熱処理条件、植物の栽培期間及び生長度が導入遺伝子の発現に関わる重要な因子であることが判った。

また形質転換株組織による発現誘導温度条件を検討した。ほとんどの組織・器官の最適 GUS 活性誘導条件は 42℃・2 時間で、45℃・2 時間処理では発現がほとんど観察されなかった。しかし果実の未熟種子及び胎座は、それぞれ 36℃及び 39℃が最適熱誘導温度で、他の

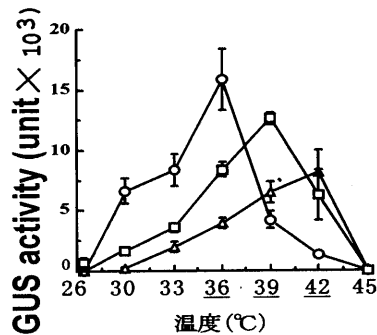


図2 中サイズ緑色果実組織における熱誘導GUS活性
 ○未熟種子 □胎座 △果皮

組織よりも低かった (図 2)。また完熟種子では 48°C でさえ熱誘導活性を示すことが判った。これら結果より、*N. plumbaginifolia* の果実組織及び種子は、他の組織と比較して、耐熱性に大きな違いがあるということが示唆された。また、HSP プロモーターを他の遺伝子を融合して利用する場合、ターゲットとした組織に応じて、それぞれの効率的な条件で検討する必要があることが示めされた。

更に *Arabidopsis* HSP18.2 プロモーターに parsley PAL 遺伝子との融合遺伝子を導入した *N. plumbaginifolia* の葉及び花芽を使用して、熱処理後の PAL 発現を検討した。すなわちそれらの組織は、HSP18.2-GUS 遺伝子を導入した形質転換株で熱処理後、GUS の高い発現を示したことから、HSP18.2-PAL 遺伝子を導入した形質転換株組織でも、PAL 活性が一過的に上昇するであろうと予想し実験を行った。

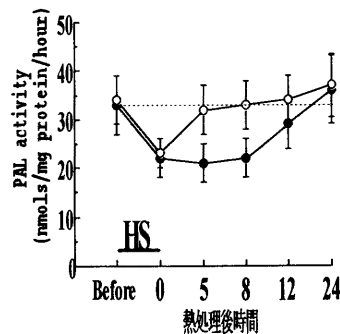


図3 花芽における熱処理後のPAL活性
44°C・5時間処理後の花芽のPAL活性を分析した。
● 形質転換株 ○ 野生株

しかし予想とは逆に、熱処理後 parsley PAL mRNA が発現すると、その転写が引き金になり、内在性 PAL 活性が抑制され (図 3)、その減少に呼応して、下流の代謝産物であるクロロゲン酸含量も減少する結果となり、一過的に Co-suppression が見られることが示唆された。

このことは熱処理により植物組織内のクロロゲン酸含量を増加させて、病害抵抗性を上昇させる、あるいは抗酸化剤として利用しようとした考えからいうと、目的とは逆の結果となった。

しかしこれら結果から、植物に内在する遺伝子に影響しない外来遺伝子を導入する、あるいは外来遺伝子を導入した形質転換植物で、内在遺伝子に影響しないで高発現する line を選択できれば、効率的に発現する可能性が考えられ、逆に内在する遺伝子に影響する遺伝子であれば、必要な時にその発現を抑制することにより、実用可能な遺伝子組換え植物への可能性も考えられた。