

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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、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。

本論文は一時的に発現するプロモーターとして高温処理により誘導される温度感受性プロモーターに着目した。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く、温室等を利用してその発現を微調整できる可能性がある。

そこで第1章では *Arabidopsis* の熱ショックタンパク質のプロモーター(HSP18.2 promoter)と β -D-Glucuronidase (GUS) の融合遺伝子を導入した *Nicotiana plumbaginifolia* を使用して、熱ショックで誘導される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オン、オフで選択的に、プロモーターが効率的に発現するということが判った。

第2章ではその発現レベルについて述べているが、植物の生長度、器官・組織及び温度条件等で異なった発現を示すことが判った。たとえば再分化後5-7ヶ月の形質転換株から5-8 cmの長さの葉を使用した実験では、熱誘導GUS活性が42℃・2時間で効率的に発現した。しかもその発現レベルは、葉長と相関があり、かつ再分化後の期間に影響された。そしてほとんどの組織・器官の最適GUS誘導活性は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、他の組織よりも低かった。また完熟種子では48℃でさえ熱誘導活性を示すことが判った。これらの結果より、*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された。

第3章では熱ショックを利用した二次代謝産物の生産制御を試みた。フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) は、フェニルプロパノイド代謝への最初のステップとなる重要な植物の代謝酵素である。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、育成チャンバー等で熱処理を行い、PAL活性を変化させ、二次代謝系へのスイッチオン、オフを調整することで、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 *Arabidopsis* HSP18.2

プロモーターにパセリ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。しかし予想とは逆に、熱処理後、パセリPALmRNAが発現した際にその転写が引き金になり、内在性PAL活性が抑制され、その減少に呼応して組織中のフェニルプロパノイド系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、一過的にコサプレッションが起きてい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、逆の結果となった。しかしこれらの結果から、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応用の可能性も考えられた。

本研究ではHSP18.2-GUS融合遺伝子を導入した形質転換株の実験で、その発現レベルは各組織、生長度およびその熱処理条件により大きく異なり、プロモーターを制御する多くの要因があることを浮き彫りにした。そしてHSP18.2-PAL融合遺伝子を導入した形質転換株の実験で、その発現がきっかけになり、内在するPAL遺伝子の発現に干渉し、その発現が抑制されたことから、外来遺伝子を融合して発現させるには更に多くの制御する因子のあることをはっきりさせた。

本実験は熱ショックにより二次代謝産物の生合成の流れを人為的に変えた事例であり、将来的にはこれら制御機構を更に明らかにすることにより二次代謝系の遺伝子発現を促進あるいは抑制して望まれる代謝産物の生産、あるいは抑制へ応用することが考えられ、学術上、応用上貢献するところが少なくな。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。