

学 位 論 文 題 名

“Studies of rolC gene of Agrobacterium Ri plasmid in transgenic plants”

(形質転換植物体におけるアグロバクテリウム
Ri プラスミド rolC 遺伝子に関する研究)

学位論文内容の要旨

植物と微生物間の相互作用に起因する種々の現象は、基礎生物学的にたいへん興味深いものが多い。とくに土壌細菌 *Agrobacterium* に関してはその相互作用がDNAレベルに及ぶため、植物形質転換系の開発や植物ホルモン合成酵素遺伝子と植物の分化に関する研究等、近年の植物分子生物学の発展に大きく貢献している。

本研究では、アグロバクテリウム的一种 *A. rhizogenes* 遺伝子である *rolC* に注目し、形質転換植物中におけるその作用について解析及び考察したものである。

A. rhizogenes は植物の感染部位に毛状根と呼ばれる不定根を形成する病原菌である。生じた不定根からはホルモンを必要としないで、不定芽が分化し、完全な植物体が得られる。しかし、このような植物体は、①節間が詰まる、②葉が矮化して波打つ、③花柱が突出する、④頂芽優勢が弱まる等の通常のタバコ個体とは著しく異なる形態変化を生ずる。こうした変化は、本菌の保持するRiプラスミドの一部であるTL-DNAが植物ゲノム中に導入され発現することにより引き起こされる。このTL-DNA上には、突然変異体を用いた実験から、毛状根の形成に関与すると考えられる *rolA*、*B*、*C*、*D* の4つの遺伝子座が同定されている。さらにこれまでの研究でこれらの中で *rolC* に相当する転写物が最も発現量が多いことが明らかとなっている。

本研究ではこの *rolC* 遺伝子座が植物の形態変化になんらかの効果を及ぼしているものと予想し、はじめに TL-DNA の *rolC* とその上流域を含む DNA 断片をタバコ植物 (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SR1)へ導入することを試みた。その結果、

*rolC*の挿入が確認された個体は、マーカー遺伝子のみで形質転換したコントロールに比べ草丈が低く、また、頂芽優勢の減少、花が小型化し花柱が突出するなどの変化も認められた。つぎにこの様な外来遺伝子の導入による植物の形態変化が後代へも安定に伝達される否かを調べた。形質転換したタバコの自殖種子を得、これらの種子を形質転換マーカーであるカナマイシン含有培地で発芽させた。その結果、いずれの系統においても薬剤耐性と感受性のものが3:1に分離し、遺伝子が染色体の1カ所に導入されたことが示唆された。得られたカナマイシン耐性個体を育成しさらに自殖、選抜を重ね、遺伝子型がホモの個体を得て草丈を比較した。この世代では、*rolC*形質転換体の草丈はコントロールと比べいっそう低くなり遺伝子がホモ接合型になることにより矮化が強まることが明らかとなった。花器の構造も、後代へ安定に伝達されていた。また、*rolC*形質転換体ではコントロールに比べ開花時期が早まることが明らかになった。さらに根を切り出してMS-ホルモン無添加培養液中で振盪培養してみるとコントロールでは培養根の成長などはみられなかったが、*rolC*植物より切り出した根では、著しい分枝、成長がみられた。以上のように、*rolC*による変化は、根、茎、花でおこり、この遺伝子の作用が多くの現象に関わっていることが明らかにされた。そこで器官ごとの*rolC* RNAの量を、ノーザン法によって調べてみたところ、根で発現が強く、葉では弱いという器官特異性がみられた。

TL-DNAに関する報告は数多くあるにもかかわらず、その翻訳産物に関しては、ほとんど知見が得られていなかった。そこで形質転換体内にRolCタンパク質が存在することを明らかにし、細胞内での状態を調べるため抗RolC抗体の作成を行った。

*rolC*のORFを含むDNA断片を発現ベクターであるpEXに挿入することによりpEX3-*rolC*を構築した。このベクターにより*rolC*は β -ガラクトシダーゼ(Lac)との融合タンパク質の形で大腸菌中で発現される。pEX3-*rolC*を大腸菌pop2136に導入し、タンパク質の誘導を試みたところ、大腸菌の不溶性画分に138kDのタンパク質として誘導されてきた。様々な界面活性剤を用いて大腸菌の抽出物を分画することにより、Lac-RolC融合タンパク質は大腸菌内で封入体を形成していると考えられた。この画分のタンパク質をSDS-PAGEで分離し、Lac-RolCタンパク質のバンドをきりだし、ウサギに免疫した。得られた抗血清からRolC特異的抗体を精製し、これを用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、水耕栽培した植物の根や切り出して培養

した根の抽出物中に SDS-PAGE で 22kD のバンドが検出された。さらに、遠心による細胞分画から、*RolC* は可溶性画分に存在していることが示唆された。つぎに、*rolC* 遺伝子の発現部位と植物の形態変化との相関を明らかにするため *rolC* 遺伝子のプロモーターを他のプロモーター [カリフラワーモザイクウイルスの 35SRNA プロモーター (35S)、RubisCO 小サブユニットプロモーター (*rbcS*)、RIプラスミド *rolB* プロモーター] に取り換えて植物へ導入する事を試みた。その結果、*rbcS-rolC* や *rolB-rolC* 形質転換タバコではコントロールと比較して有意な形態変化は認められなかったが、35S-*rolC* 形質転換体において、草丈の低下、頂芽優勢の減少などの著しい変化がみられた。こうした変化は、先に示した *rolC-rolC* 形質転換体より激しいもので、緑性は完全に消失していた。また 35S-*rolC* 植物では、茎や花に加え葉においてもその形態が披針状になるという変化もみられた。葉から抽出した RNA をノーザン法により調べてみると、35S-*rolC* 形質転換体の葉において *rolC* RNA の著しい発現が認められ、*rolC* は葉の形態形成にも影響を及ぼすことが示された。

さらに 35S-*rolC* 形質転換体として再分化させた個体の中に、葉の周縁部と中央部で形態の異なるキメラ個体がみられた。このキメラ形質転換タバコは、葉の周縁部が中央部に比べて葉色が濃く、周縁部のみが激しく波をうっていた。ドットハイブリダイゼーション、PCR、NPTII アッセイの結果から中央部のみに遺伝子が導入されていることが示された。葉の切片を作成し観察したところ、遺伝子の導入された部分（中央部）は柵状組織が肥大していることが明らかとなった。水平面での観察から遺伝子の導入された領域は導入されていない部分に比べ、細胞の並び方が疎であった。両領域のこのような差が、空間的な歪みを生み、周縁部の歪曲が引き起こされるものと思われる。また葉形成過程で *rolC* 遺伝子が発現することにより、葉を構成する細胞の分裂の阻害や早期肥大が引き起こされることが示唆された。

以上のように *rolC* は細菌由来の遺伝子でありながらも単独で植物の形態形成に多大な影響を及ぼすことが示された。RIプラスミド TL-DNA 上の他の遺伝子もそれぞれ *rolC* とは異なる作用を持つことがわかってきており、その生理学的あるいは分子生物学的知見も急速に蓄積しつつある。こうした *rol* 遺伝子の研究の進展により植物発生生理学に関する多くの新しい概念がもたらされるものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 藤 茂 行

副 査 教 授 石 川 鑛

副 査 教 授 吉 川 正 明

副 査 教 授 内 宮 博 文 (東京大学分子細胞生物学研究所)

副 査 助 教 授 加 藤 敦 之

学 位 論 文 題 名

Studies of rolC gene of Agrobacterium Ri plasmid in transgenic plants

(形質転換植物体におけるアグロバクテリウムRiプラスミドrolC遺伝子に関する研究)

土壌細菌 Agrobacterium rhizogenes は双子葉植物に感染して不定根を誘導する。それは、その細菌に含まれるRiプラスミドの一部分であるT-DNA領域が植物の核DNA内に組み込まれる結果である。同様の現象は類縁のTiプラスミドでもみられ、両者は植物に外来遺伝子を導入するための技術として有効に利用されている。

申請者たちは、以前にRiプラスミドのTL-DNAの全領域を含んだタバコのトランスジェニック植物を育成し、取り込まれたRiプラスミドの遺伝子の発現を調査し報告しているが、本研究ではTL-DNA領域内にある18個の翻訳可能領域(ORF)のうちのORF12(rolC 遺伝子)のみをタバコに導入し、その遺伝子の発現状況や、それがタバコ植物の器官形成に及ぼす影響を調査した。得られた主な成果はつぎの通りである。

①B19ベクターを用い、リーフデスク法でrolC遺伝子のトランスジェニックのタバコ植物体を得た。それは対照の植物体に比較して草丈が低く、花は小型化していて、花柱が突出し、頂芽優勢が乱れて側芽形成が促進されるという顕著な変化を示した。

- ②その矮性個体の自家授粉で得られた後代(T1)について、rolC遺伝子と一緒にタバコの核ゲノムに取り込まれたNPTII遺伝子の働き(カナマイシン抵抗性)によって調べた結果、分離比は 3:1 となり、rolC遺伝子はタバコの核内でヘテロ接合型の状態で組み込まれたことが証明された。なお、rolC遺伝子を含む植物体は等しく矮性で、側芽形成も盛んであり、また開花迄の日数の短縮も認められた。
- ③T1世代植物の自殖後代(T2)では、rolC遺伝子のホモ接合型の個体も出現したが、その個体では草丈の短縮、花型の小型化、花粉の部分的不稔性などの変化がヘテロ型植物体よりも一層強まっていた。即ち、rolC遺伝子は安定して後代に遺伝した。
- ④大腸菌の発現ベクターを用いて、RolC- β -ガラクトシダーゼの融合タンパク質を合成し、分離、精製の後、RolCタンパク質に特異的な抗体を作成した。
- ⑤rolCの形質転換植物の根から抽出物を調製し、RolC融合タンパク質の抗体と反応する22Kdポリペプチドが可溶性画分に存在することを示し、RolCが細胞の細胞質か液胞、あるいは細胞間隙に分布することを明らかにした。
- ⑥導入するrolC遺伝子のプロモーターを別種の遺伝子、すなわち RiプラスミドのrolB遺伝子、エンドウのrbsS遺伝子、CaMVの35SRNA遺伝子のプロモーターに換えてそれぞれの形質転換植物を作成し、rolC遺伝子の発現と植物体の形態とを比較した。
rbsS や rolB のプロモーターをつけた rolC遺伝子の導入個体では植物体の形態変化は認められなかったが、35SRNAプロモーター付きrolC遺伝子の形質転換体では、そのmRNAの増加と、より顕著な矮性化や淡緑色の槍型の葉の出現等が観察された。
- ⑦35Sプロモーター付きrolC遺伝子の導入個体のなかで、2個体の周縁キメラ葉をもった個体を得られた。その成熟葉では、葉身の中央部は淡緑色で細胞数は減少し、個々の細胞は大型化しており、周縁部は濃緑色で細胞の数、大きさはほぼ正常であった。DNAとRNAの解析から、前者はrolC遺伝子を含む細胞、後者はそれを欠く細胞よりなることが判った。即ち、導入されたrolC遺伝子の産物、RolCが葉肉細胞の分裂を阻害して葉の奇形をもたらした事が強く示唆された。

本研究は、特定の遺伝子を植物に導入して植物の分化、成長に変化を誘起したものであり、植物の形態形成の分子機構を解明する上で重要な手掛かりとなるものである。国際的にも高い評価を得ており、10編の参考論文の質も高く、最終試験の結果も満足すべきものであった。審査員は申請者が学位(理学)を受ける資格を有すると認めた。