学位論文題名

Molecular studies of transcriptional regulation
of the *rolC* gene in higher plants

(高等植物における *rolC* 遺伝子の転写制御に関する分子的研究)

学位論文内容の要旨

*Agrobacterium rhizogenes*が植物に感染すると、その感染部位から毛状根と呼ばれる不定根が形成される。これは *A. rhizogenes* のもつ T-DNA が、植物のゲノムに組み込まれ T-DNA 中の遺伝子が発現することによって起きる現象である。*rolC* 遺伝子はこの毛状根形成に関与する遺伝子の一つであるが、単独で植物に導入すると草丈の低下や頂芽優勢の減少等の形態的变化を示すことが知られている。最近の研究から、*rolC* 遺伝子産物はサイトカニン及びジベレリン合成の代謝に阻害的に作用し、その結果形態的な変化が起きることが示唆されている。本研究では *rolC* 遺伝子の転写制御に注目し、*rolC* 遺伝子の発現およびそのプロモーター領域における DNA 結合因子の解析を行った。

第一章 形質転換イネにおける *rolC* 遺伝子の発現解析

アグロバクテリアは一般に単子葉植物には感染しない。*rolC* 遺伝子は *A. rhizogenes* の遺伝子であり、単子葉植物での発現に関して何の知見も得られていなかった。そこで単子葉植物での *rolC* 遺伝子発現を解析するために、再分化系の確立しているイネにエレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入を試みた。*rolC* 遺伝子の発現を解析するために *rolC* プロモーター領域に β -glucuronidase (GUS) 遺伝子を連結したキメラ遺伝子を作成した。このキメラ遺伝子をハイグロマイシン耐性遺伝子 (hph) をもつプラスミドと同時にエレクトロポレーション法によってイネに導入した。26 個体のハイグロマイシン耐性の形質転換植物体を得られ、このうち 2 個体のもので *rolC*-GUS キメラ遺伝子の発現が認められた。GUS 活性を器官別に測定した結果、葉および根で強い活性がみられたが、カルスではほとんど活性を検出できなかった。組織化学的解析により *rolC* 遺伝子の発現は、双子葉植物と同様に維管束組織に局在していることが示された。

イネにおける *rolC* 遺伝子産物の発現を解析するために *rolC* 構造遺伝子をもつプラスミドをエレクトロポレーション法によって導入した。PCR 法を用いた解析から 4 個体の

の再分化イネに *roIC* 遺伝子が導入されていることが確認された。しかしこのうち *roIC* 遺伝子の発現が認められたのは 3 個体だけであった。*roIC* 遺伝子産物のイネの形態に与える影響を T₁ 世代の幼苗を用いて解析した。発芽後 3 週間の T₁ 世代の草丈を比較したところ、*roIC* 形質転換イネでは *roIC* をもたない形質転換イネとくらべ、約 15—20% の草丈の低下がみられた。*roIC* 形質転換タバコにおいても草丈の低下が報告されており、*roIC* 遺伝子産物は単子葉植物においても生理的に作用することが示された。

第二章 イネ核タンパク質と *roIC* 遺伝子 5' 上流域との相互作用

真核生物の遺伝子は、主にプロモーター上の調節配列とそれらの配列を特異的に認識する転写因子とが相互作用し、発現調節がなされている。第二章では、*roIC* 遺伝子のプロモーター領域と特異的に結合する因子を検出することを目的に解析を行った。

葉、およびカルスより抽出した核タンパク質と RC94+23 断片とを用いてゲルシフト分析を行った。葉、カルスともに RC94+23 断片と特異的に複合体を形成する因子が検出された。次にこの DNA 結合タンパク質の認識配列を決定するために、DNaseI フットプリント法を行った。その結果、葉とカルス双方の核タンパク質中に -76 から -66 の領域 (ATATTTTAT) を DNaseI の分解から保護する因子が存在することが明らかになった。

さらに上流域の RC203-92 断片についてゲルシフト分析を行ったところ、葉の核タンパク質からは結合因子が検出されたが、カルスでは検出されなかった。葉の核タンパク質を用いて DNaseI フットプリント法をおこなった結果、-203 から -164 の AT 含量の高い領域が DNaseI の分解から保護されることが示された。タバコにおける *roIC* プロモーター中間欠失実験の結果から -196 から -135 までの領域に正の転写調節配列が存在することが示されており、また *roIC* 遺伝子の発現が葉で強くカルスではほとんどみられないことから、この領域に結合する核タンパク質が正の転写因子であることが示唆された。

第 3 章 塩基配列特異的な一本鎖 DNA 結合タンパク質の検出

roIC 遺伝子はショ糖によってその発現が活性化され、プロモーター解析から -136 から -94 の領域がその活性化に重要であることが示されている。そこでこの DNA 領域に注目し、相互作用する因子の検出を試みた。

タバコの芽生え核抽出物を用い、-136 から -111 を含むオリゴヌクレオチドをプローブとしてゲルシフト分析を行った。その結果、二本鎖 DNA プローブとは特異的な結合がみられず、一本鎖 DNA プローブとのみ複合体形成がみられた。この結合因子は一本

鎖DNAのトップストランドに特異的な結合がみられ、その相補鎖とは結合しなかった。また一本鎖DNAとの結合には、この領域内に存在するGCATCの繰り返し配列が重要であることが変異プローブを用いた競合実験の結果から明らかになった。サウスウエスタン法による解析により、この一本鎖DNA結合因子は、約43 kDaの蛋白質(RCS2; *rolC* ssDNA binding protein 2)であることが示された。

第4章 イネ G-box結合タンパク質の単離

近年、多くのDNA結合モチーフが植物遺伝子のプロモーター内に同定されている。そのモチーフの一つG-boxは、CCACGTGGの回文配列構造をもち、いくつかの植物の遺伝子で様々な刺激に反応する *cis*配列として同定されている。*rolC*遺伝子のプロモーター内にも3つのG-box様配列が存在する。*rolC*遺伝子の発現とG-box様配列との関係について解析することを目的に、イネのG-box結合タンパク質を単離した。

G-box結合因子として単離されたパセリCPRF3を用いて、G-box様配列を含む *rolC*遺伝子5'上流域の断片をプローブにゲルシフト分析を行った。その結果、*rolC*のG-box様配列もCPRF3に認識されることが示された。次に、このCPRF3をプローブにイネの根由来のcDNAライブラリーからG-box結合因子のクローニングを行った。4つのクローンが得られたが、みな同一のmRNA由来であると推測された。そのうちで最長のcDNAについて塩基配列を決定したところ、他のGBF(G-box binding protein)と高い相同性がみられた。推測されるタンパク質の一次構造から、C末側にb-ZIP構造(塩基性領域-ロイシンジッパー)をもち、N末側にプロリン残基の多い酸性領域を有するタンパク質であることが示された。これらはGBFsに共通の構造であることから、単離したクローンをRGBF1(rice G-box binding protein)と命名した。近年GBFが遺伝子の転写を活性化させるという報告がなされており、このRGBF1あるいはCPRF3が、植物内で *rolC*遺伝子の発現に重要な役割を果たしているということが推測される。

*rolC*遺伝子は原核生物由来の遺伝子であるが、そのプロモーター構造は真核生物型であり、感染宿主になる双子葉植物のみならず単子葉植物においても発現することが明らかになった。本研究ではそのプロモーター上に結合する因子をいくつか同定した。これらの因子のさらなる研究は、*rolC*遺伝子のみならず植物遺伝子の転写制御の研究に大きく貢献するだろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 藤 茂 行
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)

学 位 論 文 題 名

Molecular studies of transcriptional regulation of the *rolC* gene in higher plants

(高等植物における *rolC* 遺伝子の転写制御に関する分子的研究)

土壌細菌 *Agrobacterium rhizogenes* が双子葉植物に感染すると毛状根が生ずる。それは、その細菌が保有する Riプラスミドの一部分、すなわち T-DNAが植物のゲノム内に組み込まれ、T-DNAに含まれる遺伝子が発現した結果である。特に *rolC* 遺伝子は植物の形態形成に大きな影響を及ぼす。申請者は従来導入が困難とされていた単子葉植物のイネに *rolC* 遺伝子をエレクトロポレーション法で導入することに成功し、その遺伝子の発現機構を研究して次のような諸知見を得た。

rolC 遺伝子のプロモーターを大腸菌由来のβ-グルクロニダーゼ (GUS) の構造遺伝子につなぎ、それを薬剤耐性遺伝子との同時エレクトロポレーション法によってイネのプロトプラストに導入し、再分化させて形質転換植物を得た。GUS活性によって示される *rolC* プロモーターの活性は、双子葉植物のタバコでみられたように、葉や根の維管束内の篩部細胞に局在化していた。

次に、*rolC* 遺伝子を組み込んだイネの植物体を育成し、自花授粉によって得た後代植

物を調査して、rolC遺伝子の発現が単子葉植物のイネでも丈を短くすることを示した。

rolCプロモーターのDNA断片と、イネの葉、あるいはカルス細胞からの核抽出物を用いたゲルシフト解析法によって、このプラスミドの遺伝子のプロモーターに植物の核蛋白質が結合することを示した。さらに、DNaseIフットプリント法で酵素分解から保護される領域を調べた。その結果、AT含量の高い-76~-66 bp領域をDNaseIによる分解から保護する核蛋白質が葉とカルスの両方の細胞に存在することがわかった。また、葉の核抽出物の方には、-203~-164 bp領域をDNaseIによる分解から保護する蛋白質が含まれていた。rolC遺伝子はカルスではほとんど発現せず、葉において顕著に発現するので、葉の核内に存在するこの核蛋白質が正の転写制御因子であると推定された。

多くの植物遺伝子のプロモーターにはG-ボックスと呼ばれる共通配列があり、それが外界からの種々の刺激に应答するシス配列であると言われている。このG-ボックス類似配列がrolCプロモーターにも3個含まれているので、それがシス配列として機能しているか否かを調べた。まず、パセリのG-ボックス結合蛋白質(GBF)のcDNAを発現ベクターにつなぎ、大腸菌で発現させてGBFを合成した。rolCプロモーターはこのGBFと結合することがゲルシフト法で証明された。他方、パセリのGBFのcDNAをプローブとして、イネのcDNAライブラリーからイネのGBFのcDNAを選び出した。RBF1と名づけられたそのcDNAクローンの一次構造の解析から、イネのGBFはダイズやシロイヌナズナのそれらに相同性を有することが示され、rolC遺伝子の植物細胞内での発現においてG-ボックス類似配列とそれに結合するGBF蛋白質との相互作用が関連することが示唆された。

また、-136~-111 bp領域については、それが単鎖に変性された時だけ特異的に核蛋白質と結合できることがわかった。この研究は若いタバコの芽生えの核抽出物を用いているが、その特異的結合はトップ鎖との間だけに認められた。この結合には、その領域内に含まれる2個のGCATC配列が重要なことを塩基置換の変異を導入したDNA鎖との競合実験によって証明した。また、タバコのこの単鎖DNA結合蛋白質の分子量はSouth-Western法で43KDaであることもわかり、それはRCS2と名づけられた。

上記の知見は、植物に導入されたプラスミド遺伝子の発現機構のみならず、植物遺伝子全般の転写制御の分子機構を理解しようとする時にも大きく貢献するもので高い評価を受けている。最終試験の結果も満足すべきものであり、参考論文(4編)の質も高く、審査員一同は申請者が博士(理学)の学位を受ける十分な資格を有すと認めた。