学位論文題名

バレイショの塊茎形成過程に伴うクニッツ型

プロテアーゼインヒビター遺伝子の発現制御に関する研究

学位論文内容の要旨

バレイショは食糧生産上世界的に重要な作物に位置づけられる。その塊茎は匍枝(ストロン)の茎頂次長部分裂組織細胞の分裂、膨大生長により形成され、同時に澱粉、蛋白質の蓄積を伴って肥大する。塊茎形成は季節学的には低温短日条件で誘導されるが、この情報伝達に塊茎形成誘導因子としてジャスモン酸誘導体の関与が提起されている。また、塊茎形成過程の指標蛋白質としてパタチンとプロテアーゼインヒビターI、IIが報告されている。本研究は新たな生化学的指標蛋白質の検索のため、バレイショ塊茎に特異的に発現するmRNAのcDNAの単離を目的とした。

バレイショ植物の培養および塊茎形成誘導を組織培養の手法を用いておこなった。塊茎の生重は誘導後10日~2週間の間に急増し、¹⁴C標識アミノ酸の取り込みは2~3週間後に極大値を示した。可溶性蛋白質の電気泳動法による分析では、塊茎特異的蛋白質が40、24、23、22 kDaに存在した。¹⁴C標識蛋白質およびポリ(A)⁺RNAの翻訳産物の組成は塊茎の可溶性蛋白質組成と多少異なり、前駆蛋白質の存在とmRNA発現時期の違いが推測された。

無菌培養したバレイショに形成した塊茎のmRNAから作製したcDNAライブラリーをディファレンシャルハイブリダイゼーション法により選抜し、pT1とpT2の2つのcDNAクローンを得た。pT1のcDNAと相補的なmRNAは約900塩基で、塊茎に特異的な発現が確認された。塩基配列の解析により、pT1 cDNAは796塩基対(ポリA鎖を除く)で、222残基のアミノ酸配列から成る24.7 kDaの蛋白質を完全にコードする領域を含むと判定された。ポリA鎖付加シグナル(AATAAA)が、ポリA鎖の上流26塩基と86塩基に存在した。特に前者は、2つの付加シグナルが重なっていた。推定されるアミノ酸配列はバレイショ塊茎のKunitz型プロテアーゼインヒビター(PKPI)のN末端配列と一致した。PKPIは20~24kDaの多型性を有し、塊茎主要貯蔵蛋白質の10%を構成する。cDNAのN末端領域は精製蛋白質には存在せず、かつ高い疎水性を示すことからシグナルペプチドを含むと予想された。蛋白質のプロセッシングの通例ではアラニン(22)とアルギニン(23)の間に切断が予想されたが、精製蛋白質のN末端アミノ酸はロイシン(43)であり、2段階のプロセッシングが予想される。ゲノムDNAのサザンブロットハイブリダイゼーション解析から、PKPI(即ちpT1)は少数多重遺伝子族を構成すると示唆された。

pT2に相補的なmRNAは約1.6kbで、塊茎と葉身で多少高い発現を示した。このcDNAは857bpで、120アミノ酸残基のコードが可能であったが、相補的mRNA

長の半分であった。塩基配列の相同性検索で類似した遺伝子は存在しなかった。ゲノムDNAにはハプロイド当たり1コピー存在すると予想された。

塊茎に特異的発現を示したPKPI (pT1) は、無菌培養法で形成される塊茎のmRNA蓄積が塊茎形成誘導後5日目から認められ、塊茎の肥大に伴い増加した。このことはPKPIが塊茎形成誘導の生化学指標として適当であると考察される。圃場に栽培されたバレイショを収穫後、4°Cに1ヶ月貯蔵した塊茎にもmRNAは存在し、1年貯蔵した塊茎では著しく減少していたが存在した。また、収穫後25°Cに貯蔵した場合は1ヶ月で既に消失した。一方、貯蔵塊茎中のパタチンmRNA蓄積量は痕跡程度であった。さらに面白いことは、4°Cに貯蔵した塊茎を25°Cで48時間処理すると、PKPIおよびパタチンmRNAの発現量が増加した。低温貯蔵塊茎は塊茎形成の誘導過程での生合成活性を維持しており、低温抑制状態からの温度条件の解放により一時的に転写活性を回復したと推測される。さらに、塊茎形成過程の貯蔵蛋白質の蓄積は低温からの温度上昇時、つまり夜間から日中へかけての温度較差が大きい時に促進されると考えられる。

4°Cに2ヶ月あるいは1年2ヶ月貯蔵した塊茎のPKPI mRNAは組織切片の調製時の傷害により消失した。原因は傷害によって誘導されるRNase活性の増加と考察されるが、2ヶ月貯蔵塊茎でも傷害48時間後に再び発現したmRNA蓄積は、PKPI遺伝子の構成発現を暗示する。PKPIは塊茎に常時存在し、静的抵抗性の役割を担うと考えられる。一方、貯蔵塊茎で痕跡程度であったパタチンmRNAは、4°C2ヶ月貯蔵した塊茎の組織切片を25°C6時間保温後に蓄積量の増加が認められた。この現象は4°Cに貯蔵した塊茎に限られ、前述の温度誘導の影響が示唆される。

PKPIとパタチンmRNAの蓄積に及ぼす生長調節物質の影響を検討した。供試化合物中、塊茎切片にPKPI mRNAを誘導したのはジャスモン酸だけであった。誘導に要する濃度および時間は1 μM、24時間で、100 μMでは阻害された。葉組織切片では12時間で誘導が確認された。一方、パタチンmRNAの誘導は観察されなかった。塊茎形成物質とされるジャスモン酸は、塊茎貯蔵蛋白質遺伝子の一部を誘導する可能性が示唆された。

転流同化産物のショ糖は塊茎の貯蔵澱粉合成に必須で、さらに茎節片培養による側芽の塊茎形成を誘導する作用も有する。トランスジェニックタバコ植物でのPKPIプロモーターの発現は維管束組織に特異的で、葉身組織切片での発現はショ糖濃度に依存した。PKPI遺伝子の発現はプロモーター上のショ糖刺激感受領域により制御される可能性が高い。

バレイショ塊茎の蛋白質集積機構の解明は同化産物の効率的利用および遺伝子発現の器官特異性の理解に有益である。本研究では、新たな塊茎指標蛋白質PKPIの遺伝子構造および発現特性を明らかにした。塊茎誘導に影響する低温、ジャスモン酸およびショ糖が、PKPI遺伝子の発現誘導に密接に関係する事実は、両者に共通な制御機構を示唆する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜久田 嘉 郎
副 査 教 授 木 村 郁 夫
副 査 教 授 生 越 明
副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

バレイショの塊茎形成過程に伴うクニッツ型 プロテアーゼインヒビター遺伝子の発現制御に関する研究

バレイショは食糧生産上世界的に重要な作物に位置づけられる。その塊茎は匍枝（ストロン）の茎頂次長部分裂組織細胞の分裂、膨大生長により形成され、同時に澱粉、蛋白質の蓄積を伴って肥大する。塊茎形成は季節学的には低温短日条件で誘導されるが、この情報伝達に塊茎形成誘導因子としてジャスモン酸誘導体の関与が提起されている。また、塊茎形成においてパタチンとプロテアーゼインヒビターⅠ、Ⅱの貯蔵蛋白質が、報告されている。本研究は新たな生化学的指標蛋白質の検索のため、バレイショ塊茎に特異的に発現するmRNAのcDNAの単離を目的とした。

バレイショ植物の培養および塊茎形成誘導を組織培養の手法を用いておこなった。塊茎の生重は誘導後10日～2週間の間に急増し、¹⁴C標識アミノ酸の取り込みは2～3週間後に極大値を示した。可溶性蛋白質の電気泳動法による分析では、塊茎特異的蛋白質が 40、24、23、22 kDa に存在した。

無菌培養した塊茎のmRNAから作製したcDNAライブラリーをディファレンシャルハイブリダイゼーション法により選抜し、pT1とpT2の2つのcDNAクローンを得た。pT1のcDNAと相補的なmRNAは約900塩基で、塊茎に特異的な蓄積が塊茎形成誘導後5日目から確認され、塊茎の肥大に伴い増加した。塩基配列の解析により、このcDNAは796塩基対で、222残基のアミノ酸配列から成る24.7kDa蛋白質を完全にコードする領域を含み、ポリA鎖付加シグナル(AATAAA)が、ポリA鎖の上流26塩基と86塩基に存在した。このアミノ酸配列はバレイショのKunitz型プロテアーゼインヒビター(PKPI)のN末端配列と一致した。PKPIは20～24kDaの多型性を有し、塊茎主要貯蔵蛋白質の10%を構成する。しかしこのcDNAのN末端領域は精製蛋白質には存在せず、かつ高い疎水性を示すことからシグナルペプチドを含むと予想された。

圃場に栽培されたバレイショを収穫後、4°Cに1ヶ月貯蔵した塊茎にもmRNAは存在し、1年貯蔵した塊茎では著しく減少していたが存在した。また、収穫後25°C

に貯蔵した場合は1ヶ月で消失した。一方、貯蔵塊茎中のパタチンmRNA蓄積量は痕跡程度であった。さらに面白いことは、4°Cに貯蔵した塊茎を25°Cで48時間保温すると、PKPIおよびパタチンmRNAの発現量が増加した。低温貯蔵塊茎は塊茎形成の誘導過程での生合成活性を維持しており、低温抑制状態からの温度条件の解放により一時的に転写活性を回復したと推測される。さらに、塊茎形成過程の貯蔵蛋白質の蓄積は低温からの温度上昇時、つまり夜間から日中へかけての温度較差が大きい時に促進されると考えられる。

低温に2ヶ月あるいは1年2ヶ月貯蔵した塊茎のPKPI mRNAは組織切片の調製時の傷害により消失した。原因は傷害によって誘導されるRNase活性の増加と考察されるが、傷害48時間後に再び発現したmRNA蓄積は、PKPI遺伝子の構成発現を暗示する。PKPIは塊茎に常時存在し、静的抵抗性の役割を担うと考えられる。

PKPIとパタチンmRNAの蓄積に及ぼす生長調節物質の影響を検討した。供試化合物中、塊茎切片にPKPI mRNAを誘導したのはジャスモン酸だけであった。塊茎形成物質とされるジャスモン酸は、塊茎貯蔵蛋白質遺伝子の一部を誘導する可能性が示唆された。

転流同化産物のショ糖は塊茎の貯蔵澱粉合成に必須で、さらに茎節片培養による側芽の塊茎形成を誘導する作用も有する。トランスジェニックタバコ植物でのPKPIプロモーターの発現は維管束組織に特異的で、葉身組織切片での発現はショ糖濃度に依存した。PKPI遺伝子の発現はプロモーター上のショ糖刺激感受領域により制御される可能性が高い。

バレイショ塊茎の蛋白質集積機構の解明は同化産物の効率的利用および遺伝子発現の器官特異性の理解に有益である。本研究では、新たな塊茎指標蛋白質PKPIの遺伝子構造および発現特性を明らかにした。塊茎誘導に影響する低温、ジャスモン酸およびショ糖が、PKPI遺伝子の発現誘導に密接に関係する事実は、両者に共通な制御機構を示唆する。

よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者 山岸和敏は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。