

学位論文題名

イネ(*Oryza sativa* L.)ペルオキシダーゼ遺伝子の
発現に関する研究

学位論文内容の要旨

生体内における酵素の役割を明確に説明することは難しい場合がある。ペルオキシダーゼ (EC 1.11.1.7) は生物界に広く分布し、発見も早く、研究も多方面に亘って行なわれているにもかかわらず、その生理的役割はいまだ明確ではない。過酸化水素を一方の基質として、いろいろな化合物を酸化すること、特に高等植物では電気泳動により多くのペルオキシダーゼ分子が検出されることが複雑な要因となっている。本研究はイネを対象として、ペルオキシダーゼの生理的役割を明らかにすることを目的として、ペルオキシダーゼの多様性を分子レベルで明らかにし、一部の分子についてその遺伝子の器官および組織における特異的発現を調べ、さらにペルオキシダーゼを過剰に発現した形質転換植物の性質を解析することによって、その分子の生理的役割を明らかにした。

1. イネペルオキシダーゼの分離と性質

イネ苗条の抽出液が少なくとも25種のペルオキシダーゼ分子を含むことを電気泳動によって明らかにし、その内の4種を分離精製し、それらが異なる性質をもつペルオキシダーゼであることを示した。それらのN末端分析からは明らかに配列が異なる2つのグループに分けられ、その配列の中に、既知のペルオキシダーゼの全てに保存されている相同性の高い配列を確認した。相同性の高い配列とN末端の配列からプライマーを作製し、cDNAを鋳型としたPCR法によりDNA断片を調製し、その断片を用いてペルオキシダーゼ遺伝子のクローニングを試みたが、成功しなかった。

2. イネペルオキシダーゼ cDNA の構造と mRNA の分析

ペルオキシダーゼに保存されている相同性の高い2ヶ所の配列とPCR法とを用いて、イネ苗条のcDNAライブラリーからペルオキシダーゼをコードする2種のcDNAを分離して、prxRPAおよびprxRPNと名づけ、それらの塩基配列を決定した。これらの配列から導き出されるアミノ酸配列は互いに約70%の相同性を示し、他の高等植物から得られたペルオキシダーゼとは40~50%の相同性を示した。これら2種のcDNAを用いてイネmRNAをノーザンハイブリダイゼーションにより分析した。その結果、根には大量に検出され、また構成的に発現されていることが示されたが、葉身部や葉鞘部における発現は低レベルで、傷害やエテフォン処理や紫外線照射により顕著に誘導されることが明らかになった。

3. イネペルオキシダーゼ遺伝子の構造およびプロモーター領域の解析

イネ苗条のcDNAライブラリーから分離されたペルオキシダーゼ prxRPA cDNA および

prxRPN cDNA を用いて、イネゲノミックライブラリーからペルオキシダーゼ遺伝子を含む DNA 断片を分離し、遺伝子をそれぞれ poxA および poxN とした。分離した DNA 断片の塩基配列を決定して、2つの遺伝子はともに3イントロン-4エクソンからなること、エクソンの配列はそれぞれ対応する cDNA の配列に一致することを明らかにした。また poxA については転写開始部位も特定することができた。2つの遺伝子のプロモーター領域の配列には、他の遺伝子で検出されているエチレンや傷害や紫外線などに応答する因子が含まれていると解析された。そこで poxA と poxN のプロモーター領域の5'側を数段階の長さで削除した断片を調製し、それにβ-グルクロニダーゼ遺伝子を接続し、タバコに導入した。得られたタバコには、プロモーター領域の長さに関係なく、β-グルクロニダーゼ活性の増大は認められず、エテフォンや傷害の処理でも増大しなかった。紫外線照射した場合に、poxA の転写開始部位の上流 111 bp まで短くした断片を用いて得られた形質転換タバコでのみ、β-グルクロニダーゼ活性の増大が認められた。この現象は形質転換体の次世代でも観察され、また、紫外線照射後に可視光線を照射することによって更に活性は増大した。これらの結果から、イネペルオキシダーゼ遺伝子 poxA と poxN のプロモーター領域にはエテフォンや傷害に応答する因子が認められるが、タバコの中にあつてはその因子は活性を示さないことが示唆された。さらに、poxA のプロモーター領域の転写開始部位の上流 111 bp 以内にタバコで活性を示す紫外線照射応答因子が存在するか、あるいはタバコで活性を示すサイレンサー様の因子が 111 bp のさらに上流に存在することが推定された。

poxA および poxN のそれぞれのプロモーター領域を含む DNA 断片、約 2.2 kb および 1.4 kb をβ-グルクロニダーゼ遺伝子に接続したプラスミドをエレクトロポレーションによってイネに導入した。得られたイネのβ-グルクロニダーゼ活性の発現の様子や傷害、エテフォン、紫外線照射による活性誘導の様子は、cDNA を用いた mRNA の分析の結果と合致するものであった。このことはタバコでは活性を示さなかったプロモーター領域に認められた諸因子が、イネでは活性を示していることを示唆している。さらに、形質転換イネの切片に存在するβ-グルクロニダーゼ活性を染色して顕微鏡で観察した。イネの地上部では切片にするという傷害によって増加した活性が維管束木部柔組織に染色された。この組織はリグニン染色によっても陽性であり、染色の度合は傷害によって増強されたので、2種のペルオキシダーゼがリグニン代謝に関与していることが強く示唆された。また、根の切片の染色像から poxA、poxN とともに根の中心部に強く発現されることが認められた。

4. イネペルオキシダーゼ過剰発現の試み

イネペルオキシダーゼ cDNA をカリフラワーモザイクウイルス 35S mRNA プロモーターに接続してイネに導入した結果、prxRPA を用いて得られた形質転換イネの生育は著しく抑制されて、死滅した。また、prxRPA cDNA や prxRPN cDNA、遺伝子 poxA や poxN、さらにそれらからイントロンを一部削除したものなどをタバコに導入した場合には、幼少期に側芽の形成が観察された。これらの結果から2種のペルオキシダーゼが IAA オキシダーゼ活性を現わしていることが推定された。得られた形質転換タバコの葉を用いてタバコ野火病菌に対する抵抗性を調べた結果、全ての形質転換タバコで抵抗性の強化が認められたが、特に、cDNA を導入した場合の抵抗性が安定していた。また、これらの形質転換タバコではペルオキシダーゼ活性の上昇が観察された。

以上の結果から、1)イネペルオキシダーゼには少なくとも25種類の分子が存在し、多数のアイソザイムから構成されること、2) 2つのイネペルオキシダーゼ遺伝子 poxA、

poxN がイネの根では強く構成的に発現し、葉身部や葉鞘部では低レベルで傷害などのストレスによって誘導発現すること、3) 葉身部や葉鞘部における発現が維管束木部柔組織で特異的に起こっており、傷害によって高くなるリグニン合成に関係していること、4) ペルオキシダーゼ過剰発現植物で顕在化したペルオキシダーゼと IAA 代謝との関係などを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 本 間 守
副 査 教 授 千 葉 誠 哉
副 査 教 授 内 藤 哲

学位論文題名

イネ(*Oryza sativa* L.)ペルオキシダーゼ遺伝子の 発現に関する研究

本論文は、酵素が生体内で示す機能に関するものであり、序論と総合的討論を含んで6章で構成され、図58、表13、引用文献284を含む総頁数182の和文論文である。別に参考論文13編が添えられている。

植物に広く分布するペルオキシダーゼ (EC 1.11.1.7) は、一つの植物体が多様な分子種をもつこと、ペルオキシダーゼが過酸化水素を基質として、いろいろな化合物を酸化することなどの理由で、生理的な役割はいまだ明確になっていない。本論文はイネを対象とし、ペルオキシダーゼの生理的役割を明らかにすることを目的として、酵素分子の多様性、2種の遺伝子の分離、遺伝子の器官および組織特異的発現、傷害や紫外線などストレスの影響、酵素を過剰発現させた形質転換イネやタバコの観察を通して、リグニン代謝やIAA代謝との関係について述べたものである。

1. ペルオキシダーゼはイネ苗条の抽出液に少なくとも25種含まれることを明らかにし、その中の4種を分離精製し、それぞれが性質の異なるペルオキシダーゼであることを示した。それらは N末端分析から明らかに配列の異なる2つのグループに分けられ、その配列の中に、既知のペルオキシダーゼ全てに保存されている相同性の高い配列が認められた。
2. イネペルオキシダーゼ cDNA を分離するために、相同性の高い2ヶ所の配列と PCR 法とを用いて、イネ苗条の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、2種の cDNA を分離した。それぞれを prxRPA および prxRPN とし、塩基配列を決定した。得られた cDNA を用いたノーザンハイブリダイゼーションによってイネ mRNA を分析した結果、根には大量に検出され、構成的に発現されていること、地上部での発現は低レベルで、傷害やエテフォン処理や紫外線照射によって顕著に誘導されることが明らかになった。
3. イネゲノミックライブラリーから prxRPA cDNA および prxRPN cDNA を用いて、ペルオキシダーゼ遺伝子 poxA および poxN を分離し、塩基配列を決定した。2つの遺伝子はともに3イントロン-4エクソンからなり、エクソンの配列はそれぞれ対応する cDNA の配列に一致した。poxA および poxN のプロモーター領域を解析するために、5'側を数段階の長さで削除した断片を調製し、それにβ-グルクロニダーゼ遺伝子を接続し、タバコに導入した。得られた形質転換タバコには、プロモーター領域の長さに関係なく、β-グルクロニダーゼ活性の増大は認められず、エテフォンや傷害の処理でも増大しなかった。

プロモーター領域に見いだされる既知の因子は、タバコでは活性を示さないと推定された。

poxA および poxN のそれぞれのプロモーター領域を含む DNA 断片、約 2.2 kb および 1.4 kb を β -グルクロニダーゼ遺伝子に接続したプラスミドをエレクトロポレーションによってイネに導入した。得られた形質転換イネの β -グルクロニダーゼ活性の発現の様子、傷害やエテフォンや紫外線照射による活性誘導の様子は、cDNA を用いた mRNA の分析の結果と合致するものであった。これはプロモーター領域に見つけられた因子が、イネでは活性を示していることを示唆している。さらに、形質転換イネ地上部の切片では維管束木部柔組織に β -グルクロニダーゼ活性が染色された。この組織はリグニン染色によっても陽性であり、染色の度合は傷害によって増強されたので、2種のペルオキシダーゼがリグニン代謝に関与していることが強く示唆された。

4. prxRPA cDNA をカリフラワーモザイクウイルス 35S mRNA プロモーターに接続して導入した形質転換イネは生育が著しく抑制されて、死滅した。prxRPA cDNA、prxRPN cDNA、poxA、poxNなどをタバコに導入した場合には、幼少期に側芽の形成が観察された。これらの結果から2種のペルオキシダーゼが IAA オキシダーゼ活性を現わしていることが推定された。得られた形質転換タバコの葉を用いてタバコ野火病菌に対する抵抗性を調べた結果、全ての形質転換タバコで抵抗性の強化が認められ、同時に、ペルオキシダーゼ活性の上昇も観察された。

以上の成果は、主要な作物であるイネを対象として、多くのアイソザイムを含むペルオキシダーゼの生理的役割を解析する手法を開拓し、それによって、ペルオキシダーゼとリグニン代謝や IAA 代謝との関係に到達したものである。このことは学術的に高く評価されるのみならず、将来、イネの性質の評価に役立つものと考えられる。よって、審査員一同は、別に行なった学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者伊藤浩之は博士（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。