

バレイショの芽の休眠に関与する

遺伝子の分子生物学的研究

学位論文内容の要旨

バレイショはトウモロコシ、イネ、コムギに並ぶ世界四大作物の一つである。バレイショ塊茎の長期間貯蔵には低温が用いられているが、塊茎は大量の水分を保持しているため塊茎の芽の休眠期間が終了すると低温下でも萌芽が始まり、塊茎の利用価値が失われてしまう。したがって農業上は、塊茎休眠の人為的な制御技術の確立が急務であるが、塊茎休眠のメカニズムは未だ明らかにされていない。本研究では遺伝子を同定する手法の一つであるジーントラップ法を用いて塊茎の芽の休眠に関与する遺伝子の単離を行い、この遺伝子の機能について解析を行なった。

1. ジーントラップ法を用いたバレイショ形質転換体 (BD022 株) の作出

ジーントラップ法は、アグロバクテリウムを用いてランダムにレポーター遺伝子 (*GUS*) を導入し、*GUS* 遺伝子を発現する多数の形質転換体から特異性を示す個体を選別することから始まる。得られた形質転換体では、その特異性に沿って発現する遺伝子の内部に *GUS* が導入されているはずであり、*GUS* の塩基配列を利用してその遺伝子をつり上げることができる。本法をバレイショに用いたところ、腋芽の基部に特異的に *GUS* を発現する形質転換体 (BD022 株) が得られた。この株に小型塊茎を形成させたところ頂芽基部に *GUS* 発現が認められた。腋芽は頂芽優勢により休眠状態に置かれており、また塊茎頂芽も休眠中であることから、*GUS* 遺伝子が挿入された遺伝子 (*NDL* 遺伝子と名付けた) は休眠に関与しているものと思われた。BD022 株の腋芽に見られる *GUS* 発現は、頂芽を切除し頂芽優勢を打破すると消失した。また、頂芽優勢を引き起こす原因ホルモンである IAA を与えると *GUS* 発現が誘導された。これらの結果は BD022 株の腋芽で観察された *GUS* 発現は、頂芽より供給された IAA により誘導されたものであることを示唆している。

2. *NDL* 遺伝子の単離およびその発現解析

BD022 株において *GUS* 遺伝子の挿入を受けた遺伝子 (*NDL* 遺伝子) を単離した。*NDL* 遺伝子は、全長 875bp の塩基配列を持ち最も長い ORF は 102 個のアミノ酸をコードしていると予想された。BD022 において *GUS* の挿入を受けた遺伝子が *NDL* 遺伝子であることを確認するために、単離した *NDL* 遺伝子上流から *NDL* プロモーター領域を切り出し、これに *GUS* 遺伝子を繋いで *Nicotiana benthamiana* に導入した。この形質転換植物体内で *NDL* プロモーターにより誘導される *GUS* 発現のパターンは、BD022 の *GUS* 発現と同様であった。したがって、*NDL* は、BD022 において *GUS* 遺

伝子が挿入された遺伝子であると結論した。

NDL 遺伝子から予測されるアミノ酸配列は、シロイヌナズナ 26S プロテオソームのサブユニットの一つである *RPN1a* の一部分と高い相同性を示した。*RPN1a* はオーキシンのシグナル伝達に関わっていることが知られている。*NDL* の予想分子量は *RPN1a* の約 1/9 であり、*NDL* は *RPN1a* のホモログ（相同性遺伝子）ではないと考えられた。

NDL 遺伝子のバレイショ植物体での発現をノーザンブロット法で解析した。*NDL* 遺伝子は腋芽で特に強い発現を示した。また花および塊茎形成期のストロン頂芽基部においても発現していた。茎切片に IAA を与えると発現が誘導された。これらの結果は GUS 活性測定の結果と一致した。

3. バレイショゲノムからの *StRPN1a* 遺伝子の単離およびその発現解析

NDL 遺伝子とシロイヌナズナの *RPN1a* 遺伝子は部分的にきわめて類似していた。そこでバレイショゲノムから、新たに *RPN1a* のホモログの単離を試みた。その結果、全長 3327bp で明確な ORF を持つ *StRPN1a* が単離された。この遺伝子の予想されるアミノ酸配列とシロイヌナズナ *RPN1a* のアミノ酸配列は 80% の相同性を示した。ノーザンブロット解析により *StRPN1a* 遺伝子はバレイショ植物体のどの器官でも恒常的に発現していることが認められた。*NDL* 遺伝子にコードされている 102 個のアミノ酸のうち 57 個は *StRPN1a* と共通であった。この結果は *NDL* 遺伝子が *StRPN1a* 遺伝子から派生した遺伝子であることを示唆している。

4. *NDL* 遺伝子および *StRPN1a* 遺伝子の過剰発現が形質転換植物の形態におよぼす影響

NDL 遺伝子と *StRPN1a* 遺伝子の機能を検討するため、それぞれの遺伝子を *N. benthamiana* 葉片に導入して植物体を再生させ、それらの過剰発現が形態におよぼす影響を観察した。恒常的な発現を誘導する 35S プロモーターにこれらの遺伝子を繋いで導入した場合、正常な再分化は起こらず形質転換体は得られなかった。そこで化学物質 (dexamethasone 以下 DEX と略) 発現誘導プロモーターの下流に *NDL* 遺伝子あるいは *StRPN1a* 遺伝子を配置したベクターを用いて形質転換体を作成した。得られた形質転換植物体に DEX を投与しこれらの遺伝子を過剰発現させると、いずれの遺伝子においても植物体の矮化、導管の発達異常、維管束間形成層の発達、皮層細胞の肥大などがみられた。これらの遺伝子の働きが同一方向であった事実は、*NDL* 遺伝子は *StRPN1a* 遺伝子の働きを抑制するのではなく、*StRPN1a* 遺伝子を補助していることを示唆している。またこれらの形態変化は、IAA の受容やそのシグナル伝達に異常を示す突然変異体に多くみられることから、*NDL* 遺伝子ならびに *StRPN1a* 遺伝子は IAA のシグナル伝達に関与していると考えられる。

本研究で得られた結果は、*NDL* 遺伝子は進化の過程で *StRPN1a* 遺伝子から派生的に生じ、腋芽基部や塊茎頂芽基部において IAA により特異的に発現することにより、恒常的に発現している *StRPN1a* 遺伝子を補助し、オーキシン (IAA) のシグナル伝達を局所的に増幅することにより塊茎頂芽や腋芽の休眠維持に働いていると考えられる。

本研究は植物の機能タンパク質をコードする遺伝子の一部から小型の遺伝子が派生し、それがもとの遺伝子の制御に関わっている可能性を示したが、そのような例はほとんど報告されていない。本研究が遺伝子研究の新しい側面を拓くきっかけとなることを期待したい。また常法で遺伝子の単離を行った場合、本研究で得られた *NDL* 遺伝

子のような派生遺伝子を単離できる確率は非常に低いものと思われる。現在積極的に研究が行われている RNA 干渉、偽遺伝子あるいはペプチドホルモンなどの研究においてもジーントラップ法は有効であるものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 幸 田 泰 則
副 査 教 授 内 藤 繁 男
副 査 教 授 増 田 清
副 査 講 師 藤 野 介 延

学 位 論 文 題 名

バレイショの芽の休眠に関与する

遺伝子の分子生物学的研究

本論文は7章からなり、図33、表9を含む113頁の和文論文である。

バレイショ塊茎の貯蔵には低温条件が用いられている。しかし塊茎は大量の水分を持つため、休眠期間が終了すると低温下でも萌芽が始まり、塊茎の利用価値は失われてしまう。したがって農業上、塊茎休眠の人為的制御技術の確立が急務であるが、塊茎休眠のメカニズムは未だ明らかにされていない。本研究は遺伝子同定法の一つであるジーントラップ法を用いて塊茎休眠に関与する遺伝子の単離を行い、この遺伝子の機能について解析を行なった。

ジーントラップ法は、アグロバクテリウムを用いてランダムにレポーター遺伝子 (*GUS*) を導入し、*GUS* 遺伝子を発現する多数の形質転換体から特異性を示す個体を選別することから始まる。本法をバレイショに用いたところ、腋芽の基部に特異的に *GUS* を発現する形質転換体 (BD022 株) が得られた。この株に小型塊茎を形成させたところ塊茎頂芽基部に *GUS* 発現が認められた。腋芽は頂芽優勢により休眠状態にあり、また塊茎頂芽も休眠中であることから、*GUS* 遺伝子が挿入された遺伝子 (*NDL* 遺伝子と名付けた) は休眠に関与しているものと思われた。BD022 株の腋芽に見られる *GUS* 発現は、頂芽を切除して頂芽優勢を打破すると消失した。また、頂芽優勢を引き起こす原因ホルモンである IAA を与えると *GUS* 発現が誘導された。これらの結果は BD022 株の腋芽で観察された *GUS* 発現は、頂芽から供給される IAA により誘導されたものであることを示唆している。

次に *NDL* 遺伝子の塩基配列を決定した。その上流からプロモーター領域を切り出し、下流に *GUS* 遺伝子を繋いだものを *Nicotiana benthamiana* に導入し形質転換体を得た。この植物は BD022 株と同様な *GUS* 発現を示した。

NDL 遺伝子から予測されるアミノ酸配列は、シロイヌナズナ 26S プロテオソームのサブユニットの一つである RPN1a の一部分と高い相同性を示した。しかし *NDL* の予想分子量は RPN1a の約 1/9 であり、*NDL* 遺伝子と *RPN1a* 遺伝

子は相同ではないと考えられた。そこでバレイショゲノムから、*RPN1a* 遺伝子に相当する遺伝子を単離し *StRPN1a* と名付けた。この塩基配列から予想されるアミノ酸配列とシロイヌナズナ *RPN1a* のアミノ酸配列の相同性は約 80% であった。

バレイショ植物体における *NDL* 遺伝子ならびに *StRPN1a* 遺伝子の発現パターンをノーザンブロット法で解析した。*NDL* 遺伝子は腋芽で特に強い発現を示した。また花や塊茎形成初期のストロン頂芽基部においても発現していた。さらに茎切片に IAA を与えると発現が誘導された。これらの結果は BD022 株における GUS 発現の結果と一致した。一方 *StRPN1a* 遺伝子には部位特異的な発現は見られず、どの器官でも恒常的に発現していた。

NDL 遺伝子と *StRPN1a* 遺伝子の機能を検討するため、それぞれの遺伝子を *N. benthamiana* 葉片に導入して植物体を再生させ、それらの過剰発現が形態におよぼす影響を観察した。恒常的な発現を誘導する 35S プロモーターにこれらの遺伝子を繋いで導入した場合、正常な再分化は起こらず形質転換体は得られなかった。そこで化学物質 (dexamethasone 以下 DEX と略) 発現誘導プロモーターの下流に *NDL* 遺伝子あるいは *StRPN1a* 遺伝子を配置したベクターを用いて形質転換体を作成した。得られた形質転換植物体に DEX を投与しこれらの遺伝子を過剰発現させると、いずれの場合も植物体の矮化と頂芽の生長停止が見られた。これと同様な形態変化は、IAA の受容やそのシグナル伝達に異常を示す多くの突然変異体において共通に認められている。*NDL* 遺伝子は、*StRPN1a* 遺伝子などが関与する IAA のシグナル伝達を、腋芽基部や塊茎頂芽基部において局所的に増幅し、その結果として生長停止を伴う塊茎頂芽や腋芽の休眠が生ずる可能性が考えられる。

本研究で得られた結果は、*NDL* 遺伝子は進化の過程で *StRPN1a* 遺伝子から派生的に生じたことを示唆している。このように植物の機能タンパク質をコードする遺伝子から断片化した遺伝子が、元の遺伝子の制御に関わっている可能性を示した例はほとんど報告されておらず、本研究の成果は遺伝子研究の新しい側面を拓くきっかけとなるものと期待される。

よって審査員一同は、小川佳奈が博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。