

氏名(本籍)	いのぐちまさひこ 猪口雅彦(鳥取県)		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	博 乙 第 702 号		
学位授与年月日	平成 3 年 7 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
審査研究科	生物科学研究科		
学位論文題目	Changes in expression of a foreign gene are accompanied by morphological changes in a transgenic tobacco line (タバコ形質転換体の形態変化に伴う導入遺伝子の発現変動について)		
主査	筑波大学教授	理学博士	原 田 宏
副査	筑波大学教授	理学博士	岡 田 益 吉
副査	筑波大学教授	理学博士	柳 澤 嘉 一 郎
副査	筑波大学助教授	理学博士	鎌 田 博

論 文 の 要 旨

土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* は、多くの双子葉植物に感染し、TiプラスミドのT-DNA領域を宿主植物ゲノム中に導入する。T-DNA上の遺伝子は植物細胞内で発現し、感染部位に腫瘍を誘導すると共に、腫瘍組織内で「オパイン (opine)」と総称される特殊なアミノ酸の生合成を行う。筆者はT-DNA上のオパイン合成酵素遺伝子の一種、アグロピン合成酵素遺伝子 (*ags*) をモデル遺伝子として用い、植物組織内での発現調節を、主に植物組織培養における形態変化との関係において解析した。

実験には、腫瘍誘導遺伝子の内のオーキシン合成酵素遺伝子 (*aux*) を欠くために感染部位に多数の不定芽からなる奇形種 (teratoma) を誘導する突然変異型Tiプラスミド pTiA66 を保持する *A. tumefaciens* A66株を用いた。pTiA66には2つのT-DNA領域 (TLおよびTR-DNA) が存在し、腫瘍誘導性はTL-DNAにコードされている。TR-DNAにはアグロピン合成能がコードされているが腫瘍誘導性はない。

まず、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin #38) に *A. tumefaciens* A66株を感染させ、感染部位に形成された多数の不定芽から、TR-DNAのみが導入され、アグロピン産生能を示す形質転換系統1系統 (A66-20) を分離した。次に、A66-20系統を用い、植物体とカルスを交互に誘導できる培養系を確立した。この培養系において、植物体とカルス組織内でのアグロピン含量を比較したところ、アグロピン含量はカルス組織内において常に高かった。放射性標識した前駆物質からアグロピンへの放射活性の取り込みを調べ、アグロピン合成活性もカルスにおいて高いことを明らか

にした。この関係は、数度にわたりカルス・植物体誘導を繰り返しても観察され、A66-20系統におけるアグロピン合成能の変動は可逆的なものであることが明らかとなった。

アグロピン合成能が組織形態に伴って可逆的に変動することが観察されたので、植物体及びカルス組織内でのTR-DNAの構造が検討された。その結果、A66-20は1コピーの完全なTR-DNAが導入されており、形態変化に伴う構造変化（欠失、重複等）は起こっていなかった。さらに、遺伝子発現を抑制することが知られているシトシン残基のメチル化による修飾についても検討したが、TR-DNA内部のメチル化状態に変化は検出されなかった。これらのことから、一般的に非可逆的過程であるDNAの組み換えやメチル化修飾とは異なった機構により、アグロピン合成能の変動が起こっていることが示唆された。

可逆的かつ組織状態に特異的な調節系として、遺伝子プロモーター領域による発現調節の可能性が検討された。A66-20系統の誘導に用いられたものと同様のTiプラスミドよりアグロピン合成酵素遺伝子のプロモーター領域（Pags, 260 bp）が単離され、高等植物における発現解析用ベクターpBI101のレポーター遺伝子である β -glucuronidase（GUS）構造遺伝子の5'上流に導入された。作成された融合遺伝子（Pags-GUS）を再びタバコに導入し、得られた形質転換体からカルスを誘導した上で、植物体各組織とカルス組織でのGUS活性を測定した。その結果、*ags*プロモーターにより発現したGUSはカルス組織において高い活性を示し、A66-20系統において観察されたアグロピン合成能の変動は*ags*プロモーターの発現特性により説明された。GUS活性の組織化学的検出により、植物体においても頂端分裂組織においては活性が検出され、*ags*プロモーターは分裂組織特異的な発現調節を行なうことが示唆された。

本論文では、以上のことより、外来遺伝子であってもプロモーター領域のDNA配列及びそこにトランスに働く因子によって発現が制御されることを示唆しており、T-DNA上の遺伝子が高等植物の遺伝子発現調節を研究する上で良いモデル系となり得ることを示している。

審 査 の 要 旨

本研究において筆者は植物の組織培養及び分子生物学に関する豊富な知識と経験を生かし、高等植物における遺伝子発現調節について解析した。そして、TiプラスミドのT-DNA上の遺伝子をモデル系として活用し、主に培養組織の形態変化に伴う発現変動を解析した。その結果、外来遺伝子であっても遺伝子プロモーター領域によって発現が制御されていることを明らかにした。そして、従来構成的に発現すると考えられていたT-DNA上の遺伝子が、高等植物内生の遺伝子発現調節機構により認識される物理的構造を有することを示しており、今後の研究の発展の基礎となる示唆に富むもので、高く評価される。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。