

氏名(本籍)	かな 金	や 谷	きよし 潔	(東京都)
学位の種類	理 学 博 士			
学位記番号	博 甲 第 845 号			
学位授与年月日	平成 3 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
審査研究科	生物科学研究科			
学位論文題目	Transcriptional regulation of the foreign gene <i>rol C</i> in higher plants. -Detection of promoter binding proteins 高等植物における外来遺伝子 <i>rol C</i> の発現調節 (プロモーター結合タンパク質の検出)			
主 査	筑波大学教授	理学博士	藤 伊	正
副 査	筑波大学教授	理学博士	山 根	國 男
副 査	筑波大学助教授	薬学博士	岡 田	典 弘
副 査	北海道大学助教授	Ph. D.	内 宮	博 文

論 文 の 要 旨

土壌細菌 *Agrobacterium rhizogenes* が植物に感染すると、その感染部位に毛状根と呼ばれる不定根が形成され、さらに毛状根から再分化させた形質転換体では、植物体の矮化等の形態変化を示す。この現象は、本細菌中に存在する Ri プラスミドの一部である T-DNA が植物ゲノムに組み込まれ、T-DNA 上に存在する遺伝子が発現した結果である。Ri プラスミドを保持する形質転換タバコ (*Nicotiana tabacum* L.) では、転写サイズ約 850 b の *rol C* が根で最も強い発現をしていることが明らかにされている。また、*rol C* プロモーターは、維管束等の分化した特定の組織の細胞でのみ発現する。本来原核型遺伝子である *rol C* 遺伝子が、高等植物細胞中で発現し得るという事実は、T-DNA が真核生物における遺伝子発現に必要な構造を進化の過程で得てきたことを示しており、植物の遺伝子発現調節機構を研究する上で、極めて興味深い問題である。本論文では、*rol C* 遺伝子の転写制御の機構を研究し、そのプロモーター領域の特性と植物起源遺伝子のプロモーターとの相同性を比較・検討することを目的としたもので、次の 3 章からなっている。

1) 第 1 章では、*rol C* 遺伝子の転写開始点の決定を行っている。タバコ毛状根の全 RNA を用いて S1 mapping を行い、翻訳開始点から 27bp 上流のアデニン残基から転写が始まっている事を示し、その上流域には TATAA box (-35), CAAT box (-57) を見だし、植物の RNA polymerase II により転写される基本的プロモーター構造が存在する事を確認している。

2) 第 2 章では、タバコ毛状根の *rol C* プロモーター結合タンパク質の検出を行っている。一般に、遺伝子の転写スイッチの on, off は、プロモーター領域の特定の DNA 配列にタンパク質が結合、解離

することにより行われる。まず結合タンパク質を検出するために gel-retardation assay を行っている。タバコ毛状根から核タンパク質を抽出し、-95bp から +23bp までを含む DNA (AvaS) をプローブとして結合反応を行い、プローブに結合する因子の存在を確認し、競合実験から、この因子が AvaS 領域内の特異的な DNA 配列を認識して結合している事を示している。また、*rol C* の発現の極めて弱い葉から核タンパク質を抽出した場合、因子の量は毛状根に比べて極めて少ないことなどを示し、この結合タンパク質が *rol C* の遺伝子の正の転写制御因子である可能性を示唆している。

3) 第3章では、*rol C* プロモーターの植物核タンパク質結合領域を明らかにしている。特異的に結合するタンパク質が認識する DNA 塩基配列を決定する目的で DNase I footprinting を行い、-83bp から -60bp までの領域と、-55bp から -50bp までの領域に因子との結合部位が存在することを明らかにしている。また、タバコ以外の植物 (ニンジン, コムギ) の核タンパク中にも *rol C* プロモーター領域に結合する因子が存在し、それらは共通して共通塩基配列 (-80bp から -60bp まで, TCAAATATTTTTATTATTTGC) に結合する因子であることを明らかにしている。この結果に基づきこの塩基配列が *rol C* 遺伝子の転写に重要な役割をはたしていることを示唆している。この配列は、光制御を受ける遺伝子から見いだされた DNA 配列である AT-1 box やレグヘモグロビン遺伝子プロモーターに認められる配列と共通性があり、この共通配列の存在が Ri プラスミドの遺伝子が形質転換体内で発現が可能にしていることを示唆している。

審 査 の 要 旨

植物遺伝子の転写制御機構や形態形成を司る遺伝子の研究は、植物や微生物に比べて、その進展が遅れている。その原因の一つはこれらの研究に優れた実験系が開発されていなかったことにあると考えられる。本研究では、土壌細菌 *Agrobacterium rhizogenes* の Ri プラスミドに保持される *rol C* 遺伝子を外来遺伝子として利用し、高等植物の転写制御の機構を研究する実験系を作り上げた点で、高く評価される。また、近年、生物の形態形成と、DNA 結合タンパク質である転写制御因子との関連が注目されてきているなかにあって、手法に工夫を加え、方法を開発しながらその基礎を作り上げた本研究は、今後植物の転写制御の研究に大きく寄与するものと思われ、本研究の今後の発展が大いに期待される。

よって、著者は理学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。