【2】

氏　名（本籍）	野中聡子（東京都）（の なか さと こ）
学位の種類	博　士（学　術）
学位記番号	博甲第 4816 号
学位授与年月日	平成 20 年 4 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	**Molecular Mechanism of Ethylene Effect in Plant Cells during *Agrobacterium*-mediated Gene Transfer** （アグロバクテリウムを介した遺伝子導入におけるエチレンによる制御の分子機構解析）

主　査	筑波大学教授	農学博士	江　面　　浩
副　査	筑波大学教授	農学博士	柿　嶌　　眞
副　査	筑波大学准教授	農学博士	半　田　　高
副　査	筑波大学教授	理学博士	鎌　田　　博

論文の内容の要旨

アグロバクテリウムを介した遺伝子導入は，植物分子育種や基礎生物学において重要な技術である。このため，その機構についてはこれまで数多くの研究がなされてきた。その結果，遺伝子導入機構について，多くの点が明らかになった。最近の研究の焦点は，遺伝子導入の機構解明から，植物ホルモンを介した遺伝子導入抑制機構へ移行しつつある。インドール酢酸やサリチル酸が直接的にアグロバクテリウムの *vir* 遺伝子の発現を抑制することが示されている。エチレンが遺伝子導入を抑制することも報告されているが，この機構は明らかにされていなかった。そこで，本研究では，この機構を明らかにすることを目的とした。

まず，アグロバクテリウム接種によるエチレン発生が，遺伝子導入を抑制することを示した。アグロバクテリウムに *Pseudomonas* sp. ACP の ACC デアミナーゼ活性を付与し，植物のエチレン発生を抑制する能力を付与したアグロバクテリウムを構築した。ACC デアミナーゼをもつバクテリアは，植物のエチレン前駆物質（ACC）を吸収し，α - ケト酪酸とアンモニアに分解し，エチレン発生を抑制した。ACC デアミナーゼ活性を示すアグロバクテリウム（ACDS）の接種は，メロンの子葉切片のエチレン発生を低下させ，遺伝子導入を促進した。さらに, 無傷のシロイヌナズナへの ACDS 接種は遺伝子導入を促進した。これらの結果は，アグロバクテリウムの接種により発生したエチレンが遺伝予導入を抑制することを示す。また，エチレン生合成阻害剤（AVG）投与と ACDS の接種では，エチレン発生抑制程度は同程度であったが，遺伝子導入は ACDS の接種でより促進された。これは，エチレン発生抑制機構が，AVG と ACDS の接種とで異なるためと考えられる。前者が植物切片全体でエチレン発生を抑制するのに対して，後者では接種部位の局所でエチレンを抑制する。従って，この結果は，エチレンを介した遺伝子導入の抑制がアグロバクテリウム接種部局所的に起きることを示す。

次に，エチレンが遺伝子導入を抑制する仕組みについて解析した。遺伝子導入の開始は，バクテリアの増殖と *vir* 遺伝子の発現である。そこでまず，エチレン感受性を示す植物への遺伝子導入とアグロバクテリウムの増殖を調査した。実験には，ACC やエチレン反応阻害剤（STS）などの投与やエチレン非感受変異体

（*etr-1, ein2-5, ein3-1*）を用いた。遺伝子導入は，エチレン感受性を示す植物で低下していたが，バクテリアの増殖は影響を受けなかった。次に，*vir* 遺伝子の発現にエチレン感受性が関連するか調査した。*vir* 遺伝子群は，*virA*，*virB*，*virC*，*virD*，*virE*，*virG* 等のオペロンを含む。植物から低分子化合物の受容後，*vir* オペロンが一斉に転写を開始する。特に，*virD2* は，T-DNA の Ti プラスミドからの切り出し，輸送，植物染色体への組込みに関与する重要な遺伝子である。*vir* 遺伝子の発現を観察するために，virD2-uidA リポーターシステムを構築し，アグロバクテリウムへ導入した。ACC や STS の投与により，エチレン感受性を調査したメロンの子葉から抽出液を得て（EIM），アグロバクテリウムへ投与した。メロンの抽出液（1M）の投与は，*vir* 遺伝子の発現を誘導したが，EIM の投与は，*vir* 遺伝子の発現を低下させた。従って，エチレン感受性による遺伝子導入の抑制は，*vir* 遺伝子の発現低下によるためであった。*vir* 遺伝子の発現は，シリノン酸やシナピン酸などにより誘導される。植物には，シナピン酸からシリノン酸を合成する経路とシナピン酸からリグニンを合成する経路とがある。シナピン酸は，4-coumarate CoA ligase（4-CL）の働きにより，リグニン合成経路に入る。4-CL の遺伝子の発現は，エチレンシグナル伝達系を介して誘導される。従って，エチレン感受性を示す植物では，4-CL によりシナピン酸からリグニン合成経路の方へ反応が進み，シナピン酸やシリノン酸の量が減少するので，*vir* 遺伝子の発現が低下すると考えられる。

以上の研究により，エチレンを介したアグロバクテリウムから植物への遺伝子導入の抑制機構の一端が明らかになった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では，アグロバクテリウムの接種により植物から発生したエチレンが，エチレンシグナル伝達系を介して，アグロバクテリウムの *vir* 遺伝子の発現を低下し，その結果としてアグロバクテリウムから植物細胞への遺伝子導入を抑制することを示し，エチレンを介する植物―アグロバクテリウム相互作用研究に新たな知見を与えた。一方，これらの知見の技術応用にも取り組み，アグロバクテリウムに ACC デアミナーゼ活性を付与することで，植物への遺伝子導入能力を向上したアグロバクテリウムの分子育種にも成功した。本研究の成果は，植物―アグロバクテリウムの相互作用に関する基礎的な知見を提供したばかりではなく，今後の農作物の分子育種への大きな貢献も期待でき，博士学位論文として高く評価することができる。

よって，著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。