

氏名(本籍)	小 ^こ 杉 ^{すぎ} 俊 ^{しゆん} 一 ^{いち} (栃木県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第927号		
学位授与年月日	平成3年9月30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	農学研究科		
学位論文題目	Structure and regulatory expression of rice proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene. (イネ増殖性細胞核抗原遺伝子の構造とその発現調節)		
主査	筑波大学教授	理学博士	新井勇治
副査	筑波大学教授	農学博士	村上和雄
副査	筑波大学教授	農学博士	菊池文雄
副査	筑波大学教授	工学博士	田中秀夫

論文の要旨

本研究は、イネPCNA遺伝子の5'上流配列を含む完全な構造の解析とその5'上流域の塩基配列の情報を基にイネPCNA遺伝子の発現調節をトランスジェニック植物体を用いて明らかにすることを目的としたものである。

PCNAは、真核生物のDNA複製において重要な役割を果たすタンパク質である。このタンパク質は、全身性エリテマトーデスという自己免疫性疾患の患者に検出される抗体が増殖細胞の核に特異的に結合することから見出された。この抗体に対する増殖細胞の核に存在する抗原がPCNAと名づけられた。この発見とは別に、DNAポリメラーゼ δ の活性を促進する補助タンパク因子が見出されていたが、それがPCNAと同一タンパク質であることが1987年に同定された。このことから、真核生物におけるDNA複製は、Lagging鎖の合成を担うDNAポリメラーゼ α とLeading鎖の合成を担うDNAポリメラーゼ δ のふたつポリメラーゼの分担作業によって行われるというモデルが提案された。PCNAのcDNAは、初めラットより単離され、後にラットPCNA cDNAをプローブとしたSouthern分析により高等植物に存在することが示された。

イネゲノムPCNA遺伝子をプローブとし、イネ培養細胞およびダイズ根粒より調製したcDNAライブラリーよりPCNAのcDNAを含むクローンを単離した。イネPCNA cDNAおよびそのゲノムDNAの塩基配列は、dideoxy法により決定した。その5'上流領域は、真核生物における遺伝子発現に重要と考えられているいくつかの共通配列を含んでいた。遺伝子をコードするmRNAは1,073ヌクレオチド長をもち、263のアミノ酸をコードしていた。ラットとイネのPCNA遺伝子を比較する

と、アミノ酸レベルで約62%の相同性をもっていた。また、イネとダイズPCNA遺伝子では約88%の相同性をもっていた。このように、進化上遠縁の動植物間においてPCNA遺伝子がよく保存されていることは、PCNAの機能や発現調節においても広く保存されていることが考えられ、真核生物全般にわたって共通したDNA複製機構が存在することが推測される。

イネPCNA遺伝子の発現は、イネの根端やシュートなどの細胞分裂の活発な部位で起こっていることがNorthern分析による転写レベルでの解析で明らかとなった。イネPCNA遺伝子の5'上流域の機能を調べるために、イネPCNA遺伝子の5'上流域をレポーター遺伝子である β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子に連結させた融合遺伝子を構築し、植物細胞内でのGUS遺伝子発現の測定を行った。

このGUS遺伝子は、近年植物の遺伝子発現制御の解析において最もよく用いられているレポーター遺伝子である。その理由は、GUSの活性測定が容易であることと組織化学的な活性測定が可能であることによる。しかし、一つの欠点として植物細胞内に内生的なGUS様の活性が認められることで、ある種の細胞ではかなり高い活性が観察されている。このような植物内生GUS様活性は、GUS遺伝子から発現されるGUSの測定を不正確なものにし、特に導入する融合GUS遺伝子のプロモーター活性が低い場合に顕著であった。そこで、この植物内生GUS様活性を抑制するために種々の試みを行った結果、水溶性有機溶媒が有効であることを明らかにした。特にメタノールが有効であり、GUS活性測定反応液中に20%の濃度で加えて反応させると、細胞由来の内生GUS様活性は90%以上抑えられた。しかも20%濃度でのメタノール添加により、GUSレポーター遺伝子によるGUSの発現が1.4倍高められた。このメタノールを用いた測定法は、組織化学的測定においても有効であることが実証された。

PCNA-GUS遺伝子を細胞へ導入するために、イネとタバコのプロトプラストを材料としてelectroporationによる外来遺伝子導入の至適条件について検討し、パルス強度と溶液中の塩が導入効率を大きく左右することを明らかにした。確率した至適条件下において、electroporationによりPCNA-GUS融合遺伝子をプロトプラストに導入した結果、イネだけでなくタバコにおいてもGUSの発現が認められた。この結果から、植物間で共通したシス領域が機能していると推測された。

イネPCNA遺伝子の発現制御について解析を行うために、作成および解析の容易なタバコを宿主として、いくつかに削り込んだイネPCNA遺伝子5'上流断片とGUSの融合遺伝子をTiプラスミドを介して、アグロバクテリウム感染法により導入した。導入した各construct当たり6~8のトランスジェニックタバコ植物体が得られた。一つの植物体について各発育段階の葉で発現されているGUSを定量した結果、成熟葉は未熟葉に比してGUS発現量が少なかった。葉長が1~2cmの未熟葉と20cm以上の成熟葉のGUS活性を、各constructの導入された形質転換体について比較すると、GUS活性は5'上流の削り込みにつれて低下し、転写開始点から上流263bpまで削り込んだものではfull length (2kbp)のものに比べて14%に低下した。また、未熟葉でのGUS発現量が成熟葉の約20倍高いという特性は、263bpまでのconstructにおいても保存されていた。しかし、転写開始点から上流82bpまで削り込むと、GUS活性は成熟葉、未熟葉のいずれにおいてもほぼバックグランドレベルまで低

下した。一方、対照として用いた恒常的発現を行うCaMV35S-GUS形質転換体では、GUSの発現量は成熟葉の方が高い値を示した。

イネPCNAプロモーターによる発現は、カルスやシュートの形成を促す植物ホルモンによって誘導された。この発現誘導は、転写開始点から上流263bpのプロモーター断片で充分であることがわかった。また、組織学的な解析により、誘導されたGUSの発現とDNA合成の場が一致することが明らかとなり、イネPCNAプロモーターによる発現はDNA複製の盛んな細胞で起っていることが示唆された。

イネPCNA遺伝子の発現調節領域として同定された5'上流263bpの領域内には、CAAT boxやSp-1 binding siteなどの他に、哺乳類の熱ショックタンパク質の血清調節因子が存在する。PCNA遺伝子が動植物間でよく保存されていることと考えあわせると、PCNA遺伝子の分裂細胞特異的発現を調節している因子が動植物間に共通して存在していることが予測され、今後の研究の発展が期待される。

審 査 の 要 旨

著者は、イネPCNA遺伝子の解析と発現調節に関する一連の研究において、レポーターGUSの新しい測定法の確立、組織化学的測定の安定化、融合遺伝子導入の条件の確立、PCNA遺伝子構造の解明、発現調節とくにシス制御領域の解析など多くの独創的成果をあげている。将来、農学分野で応用される可能性が高い。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。