

論文内容要旨

緒言

有用な遺伝子組換え植物を作出するためには、導入遺伝子の発現を適切にコントロールするプロモーターの開発が必要不可欠である。植物の形質転換用に開発された代表的なプロモーターとして、カリフラワーモザイクウイルス由来 35S RNA プロモーター (*P35S*) があげられる。*P35S* は、構成的で強力な発現を示し、最も広く用いられているが、目的や導入する植物の種類によっては発現が不十分である場合が知られている。*P35S* を改良し、通常の *P35S* に比較して数十倍の発現量を示すプロモーターが作出されているが、予期しないジーンサイレンシングが高頻度に起こることが知られている。

また、植物の形質転換を行うに際しては、同一のベクターに目的遺伝子と選抜マーカー遺伝子を含む複数の遺伝子を組み込むことが現在のところ一般的だが、利用できるプロモーターに限られるため、*P35S* が繰り返し使用される場合が多い。しかしながら、同一核内に相同性を持つプロモーター配列が反復して存在すると、転写抑制型ジーンサイレンシング (TGS) が起こる可能性がある。したがって、複数の遺伝子を導入して安定的に発現させるためには、それぞれ異なる配列のプロモーターを使用することが必要と考えられる。

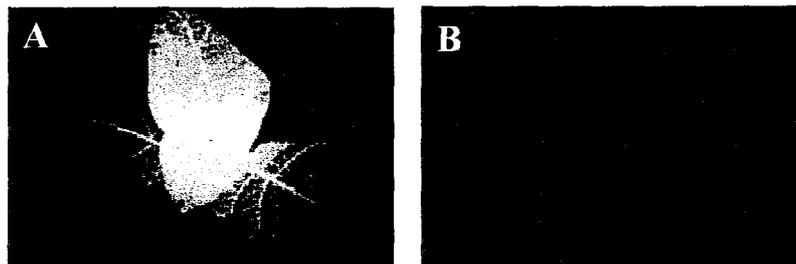
しかしながら、植物形質転換用プロモーターとして、特許に拘束されず使用できるものは限られており、*P35S* に匹敵する実用的なプロモーターの開発が求められている。

本研究においては、*P35S* 改変高発現プロモーターによる導入遺伝子の発現抑制について解析を行った。また、*P35S* と代替可能な植物形質転換用プロモーターの開発を目的とし、候補となるプロモーターについて発現特性を解析・評価した。

1. 高発現プロモーターによる導入遺伝子の発現

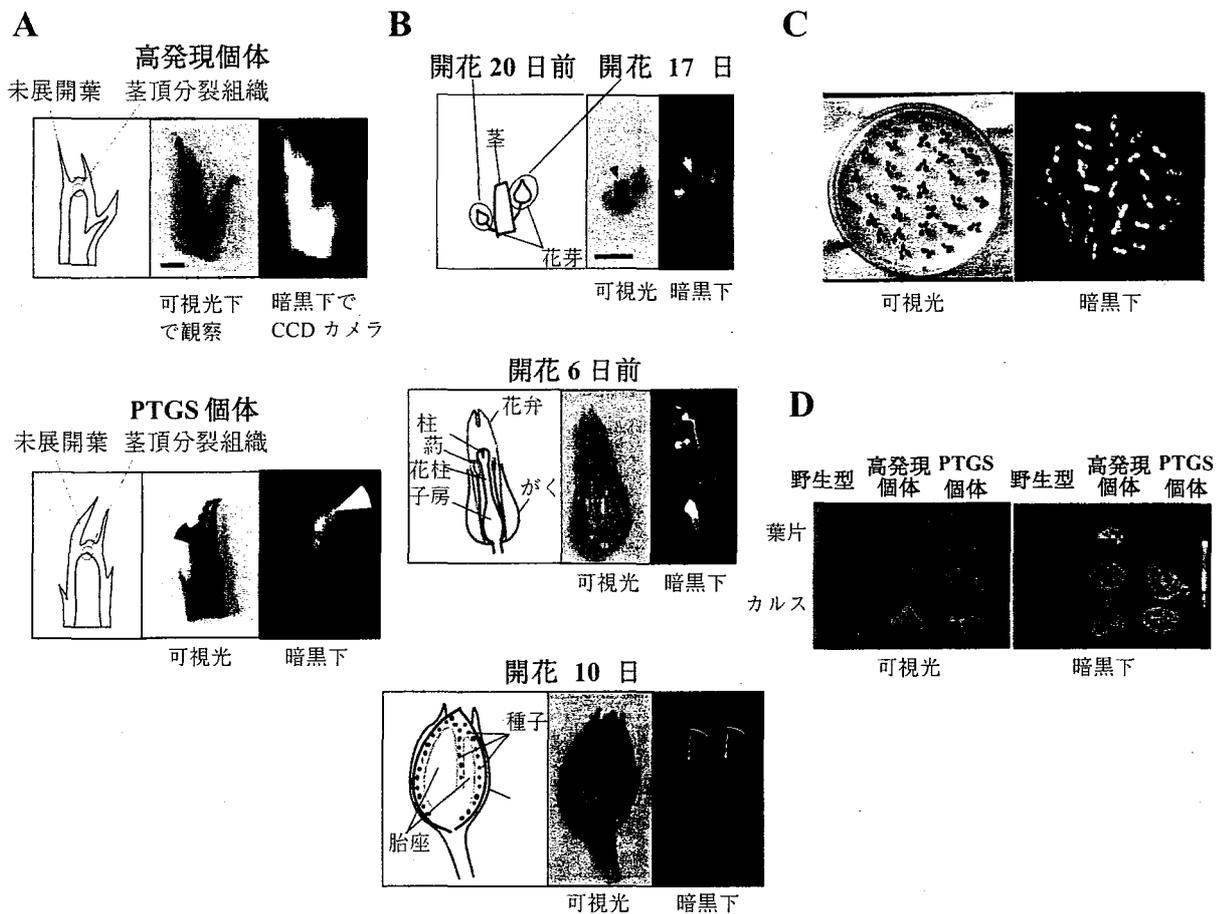
1. ルシフェラーゼ遺伝子を高発現させたタバコにおける転写後型ジーンサイレンシングの解析

P35S 改変高発現プロモーター *pEl2.Ω* を用いてホタル由来ルシフェラーゼ遺伝子を高発現させたタバコでは、高頻度で転写後抑制型ジーンサイレンシング (PTGS) が起こる (第 1 図)。この系では、暗所でルシフェラーゼの発光を検出することにより、非破壊的に継続して PTGS の様相を観察できる。



第 1 図 導入したホタル由来ルシフェラーゼ遺伝子の不活性化
A: 高発現個体, B: PTGS 個体

PTGS 個体におけるルシフェラーゼの発光を CCD カメラにより詳細に観察したところ (第 2 図), 茎頂および発達中の花芽などの分裂組織において発光が検出された。花器官の中でも細胞分裂が終了したとみられる組織では PTGS が起こるが, 種子は発生の最終段階まで, 発光が確認された。PTGS 植物から得られた種子を播種するとすべての芽生えで強い発光が検出された。次に, PTGS を起こしている葉の切片を培養してその切り口からカルスを誘導させると, 新生カルスにおいて PTGS を起こしていないものと同程度の強い発光が認められ, DNA 合成の阻害剤であるアフィディコリンを処理すると, 発光は弱くなった。これらの結果より, PTGS は細胞分裂の盛んな細胞では解除されること, 細胞分裂が終了した細胞では, 植物の他の部分から伝えられる PTGS シグナルのため, 新たに PTGS が起こると考えられた。発達中の種子では活発な細胞分裂のために PTGS が阻害されており, 親植物から PTGS が伝えられる前に物理的に隔離されるため, 次世代には PTGS が伝えられないと考えられた。

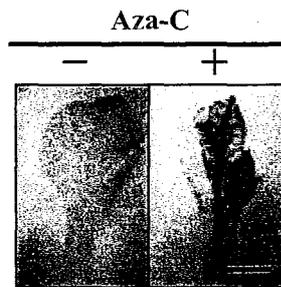


第 2 図 細胞増殖が活発な組織における PTGS の解除

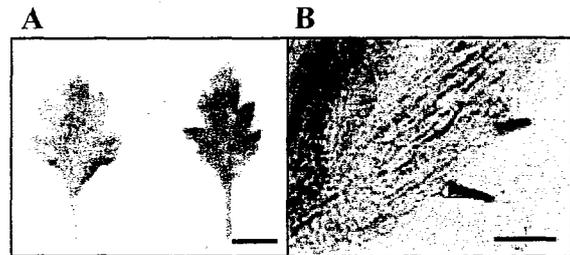
- A 茎頂の切片におけるルシフェラーゼ遺伝子の発現。赤矢頭: 茎頂分裂組織, 黄矢頭: 未展開葉, Bar = 2mm
 B PTGS 植物の花におけるルシフェラーゼ遺伝子の発現。青矢頭: 茎, 赤矢頭: 半切された種子, Bar = 5mm
 C PTGS 植物の種子由来の芽生えにおけるルシフェラーゼ遺伝子の発現
 D カルスにおけるルシフェラーゼ遺伝子の発現

2. キク形質転換体の作出と導入遺伝子の発現

P35S 改変高発現プロモーター (*pE12 Ω* , *pE7 Ω*) に *GUS* 遺伝子およびエンバク由来抗菌性タンパク質チオニン遺伝子を連結し、アグロバクテリウム法によりキク [*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] (品種‘寒精雪’, 6倍体) に導入したところ、形質転換体が42個体得られた。しかしながら、すべての個体において導入遺伝子の発現は認められなかった。*GUS* 遺伝子導入個体に脱メチル化剤である5'-アザシチジンを処理すると、*GUS* 遺伝子の発現が一部で回復することから、この導入遺伝子の不活化にはメチル化が関与していると考えられた(第3図)。また、*pE12 Ω ::GUS* を同様の方法により野生種であるキクタニギク [*Dendranthema boreale* (Makino) Ling] (2倍体) に導入したところ、形質転換体が2個体得られた。これら形質転換体においては恒常的に *GUS* 遺伝子の発現が認められたが、発現部位は毛状突起および維管束の一部に限られた(第4図)。これらの結果から、*P35S* 改変高発現プロモーターは、キクにおいて発現抑制が起きやすく、導入遺伝子の発現には適していないと考えられた。



第3図 5'-アザシチジンを処理した *pE7 Ω ::GUS* 導入キクにおける *GUS* 遺伝子の発現 (Bar = 5mm)



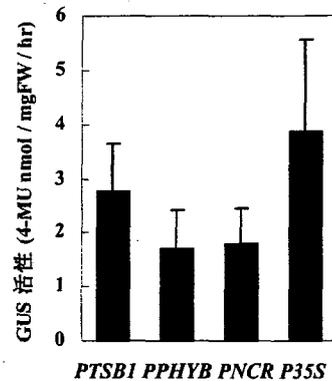
第4図 *pE12 Ω ::GUS* 導入キクタニギクにおける *GUS* 遺伝子の発現

A 葉 (Bar = 10mm)
B 茎の縦断切片 (Bar = 200 μ m)

II. 植物由来既知配列の有用遺伝子発現プロモーターとしての利用

1. 既知配列を利用した有用プロモーターの単離と発現解析

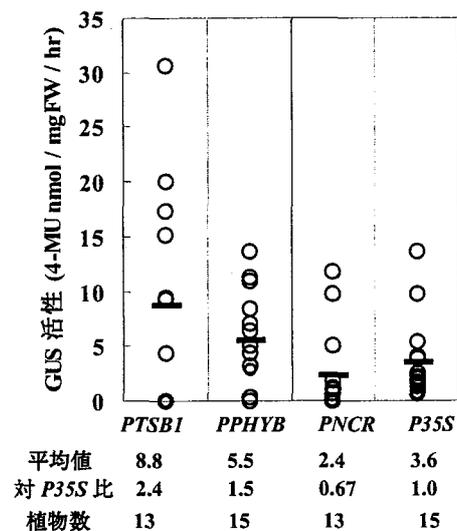
既に遺伝子の解析を目的として単離・解析された植物プロモーターのなかから、構成的に発現するプロモーターとして有用遺伝子の導入に利用可能と考えられたアラビドプシス由来トリプトファン合成酵素 β サブユニット (*TSB1*) およびフィトクロームB (*PHYB*) 遺伝子のプロモーターを選出し、実用性があるか評価した。PCRによって増幅した各プロモーター領域 (*PTSB1*, 1.5kb; *PPHYB*, 2.1kb) および対象のダイズ退緑斑紋ウイ



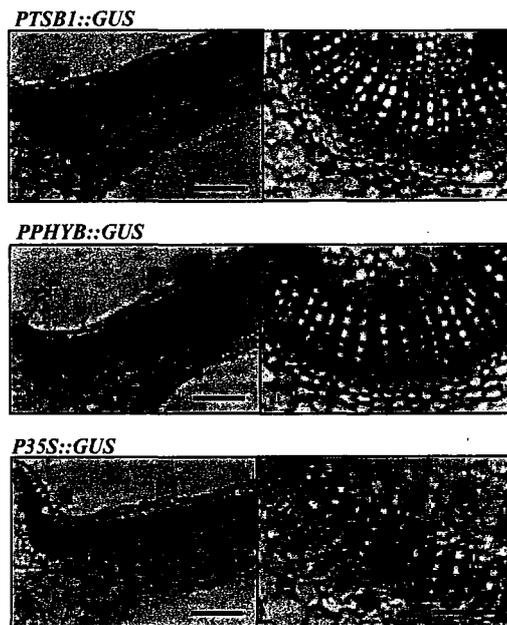
対 *P35S* 比 0.72 0.44 0.46 1.00

第5図 形質転換カルスにおける *GUS* 活性値 (8試料の平均値)

ルス由来 NCR プロモーター (*PNCR*) に *GUS* 遺伝子を連結し、アグロバクテリウム法によりタバコに導入した。対象として、*pBI121* (*P35S::GUS* を含む) を同時に導入した。得られた形質転換タバコにおける *GUS* 活性を調査したところ、*PTSBI::GUS*, *PPHYB::GUS*, *PNCR::GUS* は、カルスで各々 *P35S::GUS* の 0.72, 0.44, 0.46 倍 (第 5 図)、葉で 2.4, 1.5, 0.67 倍の活性を示した (第 6 図)。*PTSBI::GUS* および *PPHYB::GUS* 導入タバコの自殖次世代植物 (播種 2 か月後) を用いて器官別の *GUS* 活性を測定したところ、葉だけでなく、花卉の有色部、がく、葉柄、根においても活性が検出された。葉位別の *GUS* 活性は、*PTSBI::GUS* 導入タバコでは上位葉で低く、下位になるほど増加する傾向がみられたが、*PPHYB::GUS* 導入タバコでは葉位による活性の差は判然としなかった。成熟葉の横断切片を組織化学的に *GUS* 活性染色したところ、*PTSBI*, *PPHYB*, *P35S* の組織特異性はやや異なっていた (第 7 図)。さらに、*PTSBI*, *PPHYB*, *PNCR*, *P35S* に選抜マーカー遺伝子 *NPTII* を連結し、アグロバクテリウム法によりタバコに導入した後、カナマイシンで選抜すると、4 種ともほぼ同等の形質転換効率を示した。しかしながら、*PTSBI::GUS* および *PPHYB::GUS* をイネに導入して発現を調査すると、*GUS* 活性は検出限界以下であった。これらの結果より、*PTSBI* および *PPHYB* は双子葉植物であるタバコにおいて構成的に発現するプロモーターとして有用であることが示された。



第 6 図 形質転換タバコ葉における *GUS* 活性値

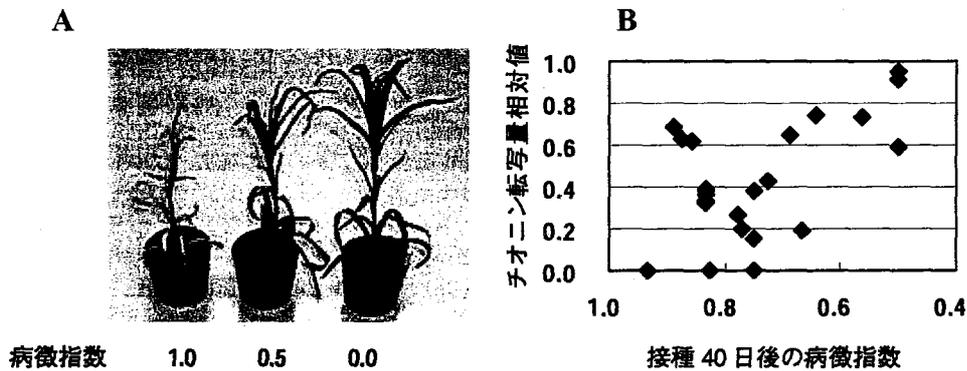


第 7 図 形質転換タバコ葉・中肋における組織化学的 *GUS* 染色 Bar = 250 μ m

2. トリプトファン合成酵素 β サブユニット遺伝子プロモーターを用いたカーネーションに対する抗菌性タンパク質遺伝子の導入

PTSBI にエンバク由来の抗菌性タンパク質であるチオニン遺伝子 (*AsthiI*) を連結してカーネーションに導入し、病害抵抗性を付与することを試みた。品種 'Scania', 'Percian Pink-Sim', 'U. Conn. White Sim' の多芽体葉片を用いて、アグロバクテリウム法により

PTSBI::Asthil を導入したところ、形質転換体が 11 個体得られた。RNA ゲルブロット解析を行ったところ、調査したすべての形質転換体においてチオニン RNA が検出された。さらに最もチオニン RNA の発現量が多かった形質転換系統 (S3-11-12) について、タンパク質ゲルブロット解析を行ったところ、生葉 1g 当たり約 $2.5 \mu\text{g}$ のチオニンタンパク質が検出された。形質転換体にカーネーション萎凋細菌病菌 (*Burkholderia caryophylli*) を接種し、抵抗性の程度を調査した。その結果、抵抗性の程度とチオニン RNA 発現量には相関が認められた (第 8 図)。したがって、*PTSBI::Asthil* の導入により、カーネーション萎凋細菌病抵抗性が付与されることが示された。



第 8 図 *Burkholderia caryophylli* を接種した *PTSBI::Asthil* 導入カーネーション

A 接種 40 日後の病徴

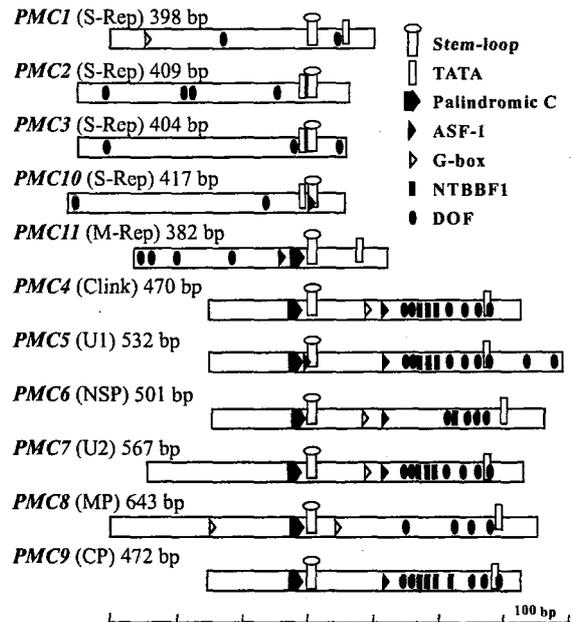
B チオニン転写量相対値と接種 40 日後の病徴指数の相関

チオニン転写量相対値は *PE7QI::Asthil* 導入タバコ系統 5 のチオニン転写量を 1 として算出、病徴指数は 6 または 7 穂の平均値

III. 植物 DNA ウイルス由来の有用なプロモーターの探索

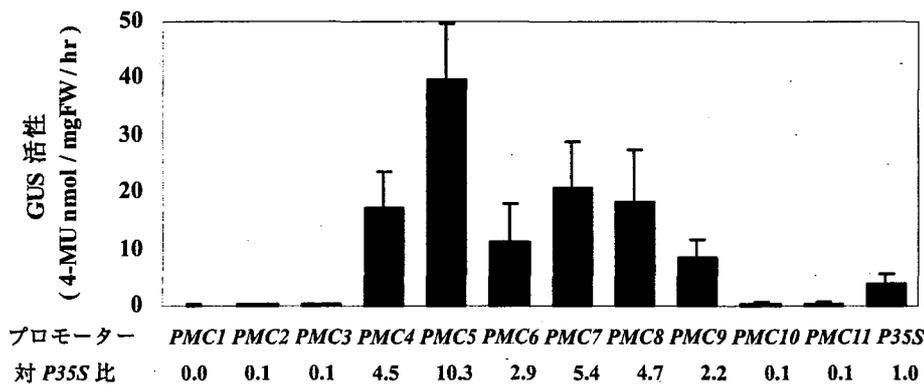
1. レンゲ萎縮ウイルス由来プロモーターの単離と発現解析

レンゲ萎縮ウイルス (*Milk vetch dwarf virus*, MDV) は、*Nanoviridae* 科 *Nanovirus* 属に属する植物ウイルスで、多粒子性の環状 1 本鎖 DNA ゲノムを持つ。MDV のゲノムとして、大きさが約 1 kb で配列の異なる 11 種類のコンポーネント (C1~C11) が見出されている。各コンポーネントは単一の ORF, TATA 配列およびポリ A シグナル様配列を含んでおり、C4 (DNA-C) は細胞周期関連タンパク質 (Clink), C8 (DNA-M) は移行タンパク質 (MP), C9 (DNA-S) は外被タンパク質 (CP), C11 (DNA-R) は複製関連タンパク質 (M-Rep),

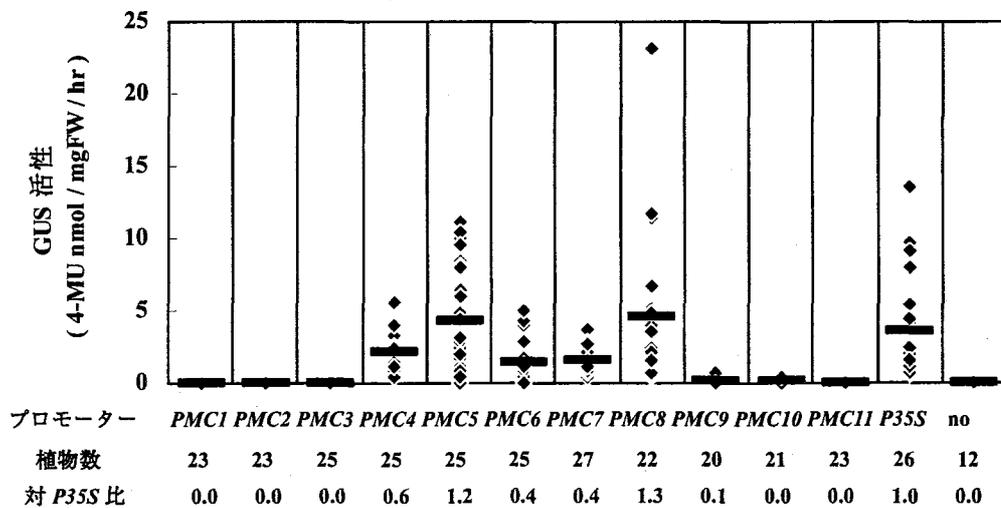


第 9 図 MDV に由来する 11 種類のコンポーネントにおける推定プロモーター領域

C1～C3およびC10は付屬的な複製関連タンパク質(S-Rep)をコードすると考えられている。C5 (DNA-U1) および C7 (DNA-U2) がコードする遺伝子の機能は不明である。ウイルス遺伝子の発現特性を明らかにするために、PCRで増幅したすべてのコンポーネントにおける推定プロモーター領域 (PMC1～PMC11, 第9図) に、各々GUS遺伝子を連結し、アグロバクテリウム法によりタバコに導入した。形質転換タバコにおけるGUS活性を測定したところ、5種のRep遺伝子プロモーター (PMC1～PMC3, PMC10, PMC11) の活性は、カルスおよび葉においてごく低レベルであった。PMC4～PMC9の活性は、各々カルスにおいてP35Sの2～10倍 (第10図)、葉において0.1～1.3倍であった (第11図)。組織化学的にGUS活性染色を行ったところ、分裂組織およびウイルスが増殖する篩部組織において強いGUS活性が確認された (第12図)。PMC8は他のプロモーターとは異なり、葉肉細胞および根の皮層細胞においてもGUS活性が確認された。これらの結果より、MDV由来プロモーターのうちPMC4～PMC9は形質転換タバコにおいて強い活性を示し、導入遺伝子発現用プロモーターとして利用できる可能性が示された。



第10図 MDV由来プロモーターの形質転換タバコカルスにおける発現



第11図 MDV由来プロモーターの形質転換タバコ葉における発現



第 12 図 形質転換タバコの組織化学的染色 Bar = 200 μ m

- A *PMC5::GUS* 導入タバコ茎頂縦断切片 (100 μ m 厚, 染色 2 時間)
 B *PMC10::GUS* 導入タバコ茎頂縦断切片 (100 μ m 厚, 染色 18 時間)
 C *PMC5::GUS* 導入タバコ成熟葉中肋部の横断切片 (80 μ m 厚, 染色 2 時間)
 D *PMC5::GUS* 導入タバコ成熟葉の横断切片 (80 μ m 厚, 染色 2 時間)
 E *PMC5::GUS* 導入タバコの根 (80 μ m 厚, 染色 2 時間)
 F *PMC8::GUS* 導入タバコ成熟葉の横断切片 (80 μ m 厚, 染色 2 時間)
 G *PMC8::GUS* 導入タバコの根 (80 μ m 厚, 染色 2 時間)

2. レンゲ萎縮ウイルス由来プロモーター *PMC8* の特性解析

MDV 由来プロモーターのうち、最も構成的に近い発現特性を示し、かつ活性が強かった *PMC8* について、導入遺伝子発現用プロモーターとしての特性を詳細に解析した。*PMC8::GUS* 導入タバコの自殖次世代植物 (播種 2 か月後) を用いて器官別の GUS 活性を測定したところ、葉だけでなく、花卉の有色部、がく、茎、根においても強い活性が確認された。葉位別では、上位展開葉の GUS 活性が最も高かった。また、*PMC8* に選抜マーカー遺伝子 *NPTII* を連結し、アグロバクテリウム法によりタバコを形質転換し、カナマイシンによる選抜を行ったところ、*P35S::NPTII* と同等以上の形質転換効率 (第 1 表) を示した。さらに *PMC8::GUS* をイネに導入し、発現を調査したところ、組織特異性はやや異なるが、*P35S* と同等の活性を示した。これらの結果から、*PMC8* は *P35S* と代替可能な導入遺伝子発現用プロモーターとして遺伝子組換え植物作出に有用であると考えられた。

第 1 表 アグロバクテリウム感染 60 日後の形質転換効率

実験	Km 濃度	選抜マーカー 遺伝子	感染 切片数 (A)	Km 耐性 個体数 (B)	形質転換 個体数 (C)	C/B	C/A
1	100 mg/l	<i>PMC8::NPTII</i>	36	40	29	0.73	0.81
		<i>P35S::NPTII</i>	36	24	13	0.54	0.36
	200 mg/l	<i>PMC8::NPTII</i>	36	32	30	0.94	0.83
		<i>P35S::NPTII</i>	36	19	15	0.79	0.42
2	100 mg/l	<i>PMC8::NPTII</i>	36	33	24	0.72	0.67
		<i>P35S::NPTII</i>	36	23	11	0.48	0.31
	200 mg/l	<i>PMC8::NPTII</i>	36	24	22	0.92	0.61
		<i>P35S::NPTII</i>	36	15	13	0.87	0.36
計		<i>PMC8::NPTII</i>	144	129	105	0.81	0.73
		<i>P35S::NPTII</i>	144	81	52	0.64	0.36

IV. まとめ

本研究では、導入遺伝子発現用プロモーターの特性調査および開発を目的とし、*P35S* 改変高発現プロモーターの形質転換植物における発現抑制の解析および *P35S* と代替可能と考えられるプロモーターについて発現特性の解析・評価を行った。その結果、1) *P35S* 改変高発現プロモーターによるルシフェラーゼ遺伝子の PTGS は、細胞増殖によって解除されることが明らかにされ、2) *P35S* 改変高発現プロモーターは、キクにおいてメチル化を一因とする発現抑制を受けやすく、キクの形質転換用プロモーターとしては適していないと考えられた。また、3) アラビドプシス由来 *PTSBI* および *PPHYB* は、双子葉植物であるタバコにおいて構成的に発現するプロモーターとして有用であることを示した。さらに、4) MDV 由来の 11 種類のプロモーターについて形質転換タバコにおける発現特性を明らかにし、5) このうち *PMC8* についてさらに詳細な発現特性を調査し、タバコだけでなくイネでも発現する *P35S* と代替可能な植物形質転換用プロモーターとして有用であることを示した。

まとめ

1. P35S を改変した高発現プロモーターの特性解析

PE2Ω

予期しない導入遺伝子の発現抑制

PE7Ω1

・PE2Ω::luc 導入タバコにおけるPTGSの解析

(分裂細胞では発現
次世代には親植物の PTGS が移行しない

PTGS を起こしやすいプロモーターとして積極的に利用

・キク (6 倍体) 形質転換体の作出 → 導入遺伝子の発現抑制

(メチル化が関与
野生ギク (2 倍体) 形質転換体 → 一部の組織でのみ発現

キクには不適

2. P35S に匹敵するプロモーターの開発

利用できる導入遺伝子発現用プロモーターが数少ない

P35S を同一ベクター内に反復して使用 → 導入遺伝子の発現抑制

植物由来既知配列を利用

Arabidopsis 由来プロモーターの特性解析

PTSB1

(形質転換タバコ ≒ P35S
形質転換イネ ×

PPHYB

双子葉植物における構成的発現用プロモーターとして利用

・PTSB1::Asth1 導入カーネーション → 萎凋細菌病抵抗性付与

植物DNAウイルス由来プロモーターの利用

MDV由来プロモーター (1種) の特性解析

PMC4 ~ PMC9

(形質転換タバコカルス ≧ P35S 分裂細胞で強い
形質転換タバコ葉 ≒ P35S 篩部で強い

最も構成的な発現に近かった

PMC8

(形質転換タバコ ≧ P35S
形質転換イネ ≒ P35S

双子葉および単子葉植物におけるプロモーターとして利用

導入遺伝子発現用プロモーター選択の幅を拡大

論文審査結果要旨

有用な遺伝子組換え植物を作出するためには、導入遺伝子の発現を適切に制御するプロモーターの開発が必要不可欠である。代表的な植物形質転換用プロモーターとしては、カリフラワーモザイクウイルス由来 35SRNA プロモーター (*P35S*) が広く用いられており、また *P35S* をさらに改変し、高発現を可能にしたプロモーターが開発されている。しかしながら、これらのプロモーターを用いて作出された遺伝子組換え植物においては予期しないジーンサイレンシングが起こることがある。そこで、本研究では、*P35S* 改変高発現プロモーターの特性解析を行うとともに、*P35S* と代替可能なプロモーターの開発を目的として、候補となるプロモーターについて発現特性を解析した。

P35S 改変高発現プロモーターに連結したホタル由来ルシフェラーゼ遺伝子を導入したタバコにおいては、高頻度に転写後型ジーンサイレンシング (PTGS) が起き、その様相を詳細に解析したところ、PTGS は細胞分裂により解除されることが明らかとなった。また *P35S* 改変高発現プロモーターは、キクにおいてメチル化を一因とする発現抑制を受けやすく、キクの形質転換用プロモーターとしては適していないと考えられた。

予期しない導入遺伝子の発現抑制を回避するための手段の一つとして、同一のベクター内において、配列に相同性のあるプロモーターを反復して使用しないことが望ましい。しかしながら、利用可能なプロモーターが限られているため、*P35S* と代替可能である新たなプロモーターを得る必要がある。そこで、既に遺伝子の解析を目的として単離・解析された植物プロモーターのなかから、候補としてアラビドプシス由来のトリプトファン合成酵素 β サブユニット遺伝子のプロモーター (*PTSBI*) およびフィトクローム B 遺伝子のプロモーター (*PPHYB*) を選出し、タバコおよびイネにおける発現特性を解析して実用性を評価した。その結果、これら 2 種類のプロモーターはタバコにおいて *P35S* に匹敵する発現を示し、植物形質転換用プロモーターとして有用であると考えられた。さらに、*PTSBI* にエンバク由来チオニン遺伝子を連結し、カーネーションに導入したところ、得られた形質転換体においてカーネーション萎凋細菌病抵抗性が付与された。

また、1 本鎖 DNA ウイルスであるレンゲ萎縮ウイルス由来のプロモーター 11 種類 (*PMC1* ~ *PMC11*) について、タバコにおける発現特性を解析したところ、*PMC4* ~ *PMC9* は、葉では *P35S* の 0.1 ~ 1.3 倍、カルスでは *P35S* の 2 ~ 10 倍の発現量を示した。これらのうち、最も構成的に近い発現を示した *PMC8* の発現特性をさらに詳細に解析し、実用性を評価したところ、*PMC8* はタバコだけでなくイネでも発現する *P35S* と代替可能な植物形質転換用プロモーターとして有用であることが示された。

本研究は、遺伝子組換え植物における導入遺伝子の発現抑制機構の一端を解明し、また、これまで未知であったレンゲ萎縮ウイルス由来プロモーターの発現様式を明らかにするとともに、新たに *P35S* に匹敵する有用な植物形質転換用プロモーターを開発した。

以上のことから、本論文は博士 (農学) の論文に値するものであり、審査員一同は、本論文提出者が博士 (農学) の学位を授与するに値するものと認定した。