

氏名	さかもとまさひろ 坂本正弘
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第2142号
学位授与の日付	平成9年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	高等植物におけるショ糖合成能力の遺伝子工学的強化に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 酒井富久美 教授 柴原正章 教授 島田幹夫

論文内容の要旨

近年のめざましい遺伝子工学の発展により、植物から多くの遺伝子がクローニングされ、その構造および機能が明らかになってきた。これらの遺伝子を植物の品種改良などに利用する試みが行われるようになってきている。本論文は、植物機能の向上、とくに植物の生産性に関与する遺伝子のクローニングと解析並びに生産性の向上への糸口をつけるものである。その主な内容は以下のとおりである。

第1章では、植物の重要な機能である光合成に関与する遺伝子について論述している。光合成には多くの遺伝子が関与するが、ここでは集光性クロロフィル a/b 結合タンパク質遺伝子 (*Lhcb2*) について、そのクローニングと解析および *Lhcb2* 遺伝子の発現特性の分析を行った。この遺伝子は核ゲノムにコードされているが、イネゲノムからクローニングしてその全構造を明らかにした。クローニングした *Lhcb2* 遺伝子のプロモーター領域である 5' 領域を切りだし、大腸菌由来の β -グルクロニダーゼ (GUS) と接続し、アグロバクテリウムの Ti プラスミドバイナリーベクター (pLHG-GUS) を構築した。この pLHG-GUS をタバコに導入して形質転換植物を作成した。得られた形質転換タバコでの GUS 遺伝子の発現を調べ、葉肉細胞で発現が認められる以外に、生長点組織や維管束系細胞でも発現していることが明らかとなった。これは、イネの *Lhcb2* 遺伝子のプロモーターがタバコでは組織特異的に発現しなかったことを示唆した。つぎに、ベクター pLHG-GUS をイネプロトプラストへ電気穿孔法によって導入して形質転換イネを作成し、その発現を調べた。イネでは、葉をはじめとする葉緑体を細胞内に保持する器官に特異的に発現することが明らかとなった。また、明条件下によって遺伝子発現が誘導されることを確認した。植物の遺伝子発現系で、プロモーター活性が強いことから利用されているカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターよりも、イネの形質転換系では数倍から10倍のプロモーター活性を示した。

第2章では、光合成によってつくられる炭酸同化産物に関わる遺伝子のショ糖リン酸合成酵素 (SPS) 遺伝子について論述している。SPS は炭酸同化産物を最終的にショ糖に変換する酵素で細胞質中でのショ糖合成の律速酵素と考えられており、ソース器官に特徴的な酵素である。この SPS 遺伝子をイネから単離し、その全構造を明らかにするとともに、ゲノム分析を行い第1染色体上に存在することを明らかに

した。

イネ SPS 遺伝子は11のイントロンによって分断され、プロモーター領域には典型的な TATA ボックスや CAAT ボックスが認められなかった。これは SPS の mRNA 量が多くないこととの関連性を示唆し、また、SPS 遺伝子の発現は成長した葉に特異的であり、未成熟種子や根では発現していなかった。すなわち、SPS 遺伝子の発現はソース器官に特異的であり、シンク器官では発現していないことを分子レベルで明らかにした。

SPS 遺伝子 5' 領域を削除して、*Lhcb2* のプロモーターにつけかえた光誘導プラスミド pLHG-SPS をイネへ導入し、形質転換植物を作成した。得られた形質転換イネの中には非形質転換イネの約 5 倍の SPS 活性を有するものがあつた。この形質転換体の葉における SPS 量は通常の葉の数倍量あることがわかつた。酵素量の増加にもかかわらず、葉におけるショ糖濃度は逆に少なくなつていた。また、デンプン量も通常のイネの半分になつていた。これらの結果は SPS 遺伝子の発現量を制御することによって植物の葉におけるショ糖/デンプンの分配を変更できる可能性を示唆するものであり、さらには植物の炭酸ガス固定能力の増強への糸口となる。

第3章では、ミトコンドリア ATP 合成酵素の β サブユニットの *atpb* 遺伝子の構造について論述する。この遺伝子をイネおよびトマトより単離した。その塩基配列は他の生物のものと相同性がきわめて高く、アミノ酸レベルでも相同性が高いが、細胞質内輸送に関するトランジットペプチドの領域での相同性は低かつた。また、*atpb* 遺伝子の発現は組織非特異的であり、いずれの器官においても発現していることが判明した。このことは生命活動の維持に必要な基本的なエネルギー産生はいずれの細胞器官においても必要であることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

高等植物の光合成の効率はソース器官の能力が大きく関与しているが、シンク器官の能力およびソース器官からシンク器官への光合成産物の転流能力も大きな影響を及ぼす。すなわち、葉緑体内にデンプンが蓄積すると光合成効率が低下することが知られている。本論文は、炭酸同化産物の分配を制御していると考えられるショ糖合成能の向上を目的として、遺伝子工学的手法により行つた研究をまとめたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1) イネから集光性クロロフィル a/b 結合タンパク質遺伝子 (*Lhcb2*) を単離し、その全一次構造を明らかにするとともに、その 5' 上流領域の解析により *Lhcb2* のプロモーター断片を得た。

2) このイネプロモーターはタバコ植物では組織特異的発現能を示さないが、イネでは、葉緑体を有する器官に対する特異的発現性を有し、さらに、光誘導性であることを明らかにした。また、プロモーター活性が 35S プロモーターより高く、イネ形質転換体の作成に有効なプロモーターになることを示した。

3) ショ糖合成の律速酵素であり、炭酸同化産物の分配の制御に関与するショ糖リン酸合成酵素 (SPS) 遺伝子をイネから単離し、その全一次構造をはじめて明らかにした。また、ゲノム分析からその染色体上の位置を示した。SPS 遺伝子のプロモーター領域には TATA や CAAT ボックスがないことと、その転写量が多くないこととの関連性を推論した。さらに、この遺伝子の発現の器官特異性を分子レベルで

明らかにした。

4) この遺伝子に上述の *Lhcb2* プロモーターを組換えた光誘導型プラスミドを構築し、これを導入した形質転換イネの作出に成功した。形質転換体のソース器官である葉の SPS 酵素量、活性、ショ糖濃度およびデンプン量を非形質転換イネのそれらと詳細に比較し、SPS 遺伝子の発現量を制御することによって植物の葉におけるショ糖とデンプンの分配を変え得る可能性を示した。

5) ミトコンドリアの ATP 合成酵素遺伝子 (*atpb*) の一次構造は生物間で極めて相同性が高く、その発現は器官非特異的であることから、植物にとって基本的なエネルギー産生がどの器官においても必要であることを示した。

以上のように、本論文は遺伝子の改変・制御によるショ糖合成能の強化を図り植物の炭酸固定能を増強する方策に重要な手掛かりを与えたものであり、植物の分子生物学並びに遺伝子工学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成9年2月20日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。