

氏 名 ^{きた}北 ^{じま}島 ^{さき}佐 ^{ひと}紀 人
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学位記番号 論 農 博 第 2234 号
 学位授与の日付 平成 11 年 3 月 23 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 Molecular analysis of gene expression of tobacco osmotin-like protein and its transcription factor ERF
 (タバコオスモチン様タンパク質遺伝子ならびに転写因子 ERF 遺伝子の発現制御機構の解析)

(主査)

論文調査委員 教授 佐藤文彦 教授 関谷次郎 教授 大山莞爾

論 文 内 容 の 要 旨

高等植物は、細菌、カビあるいはウィルスなどさまざまな病原体の感染に应答して、特異的な生体防御系を発現する。そのひとつにPR (pathogenesis-related) タンパク質とよばれる抗菌性タンパク質の発現誘導がある。PRタンパク質のうち塩基性の等電点を示す一群のタンパク質は、健全な葉ではほとんど蓄積しないが、病原菌感染あるいはそのシグナル分子であるエチレンにより強く発現誘導される。また、根および培養細胞においては病原菌感染非依存的に恒常的な発現が認められる。これら塩基性PR遺伝子の発現調節機構の解明は、植物の環境応答の分子機構を理解し、耐病性植物を分子育種する上において極めて重要であるが、その知見は限られたものである。本論文では塩基性PRタンパク質のモデルとして、PR-5グループに属するOLP (osmotin-like protein ; PR-5d) 遺伝子の発現制御機構を形質転換植物等を持ちいて解明するとともに、さらにその転写因子であるERF遺伝子の構造と発現制御の観点より検討した成果をとりまとめたものであり、主な内容は以下のとおりである。

1. タバコの祖先種のひとつである *N. sylvestris* より OLPゲノム遺伝子をクローニングし、その全塩基配列を決定した。その結果、OLP遺伝子のプロモーター領域内に、エチレン応答性PR遺伝子の保存配列GCC box (AGCCGCC) が2コピー存在することを明らかにした。次いで、このGCC boxを部位特異的突然変異により破壊した変異OLP遺伝子プロモーターとGUS (β -glucuronidase) リポータ遺伝子の融合遺伝子を作成し、野生型のプロモーターと比較することにより、その遺伝子発現に影響を及ぼす機能を解析した。その結果、OLP遺伝子の葉におけるエチレン応答性はGCC boxによるものであることを明らかにした。

2. 野生型OLP遺伝子プロモーター::GUS融合遺伝子を用いて細胞・組織特異的発現様式を解析した。OLP遺伝子は培養細胞および根で強く発現していた。根での発現は、芽生え、成熟個体のいずれにおいても維管束ならびに皮層で強く、表皮および根毛での発現は芽生えの一部を除いて認められなかった。さらに、変異型プロモーターをもつ形質転換植物を持ちいた解析により、GCC boxはエチレン応答性のみならず根における発現をも支配していることをはじめて明らかにした。一方、*in vitro* 実験により、転写因子ERFがOLP遺伝子プロモーター配列のGCC boxに特異的に結合することを明らかにし、GCC boxならびにERFが、OLP遺伝子のエチレン応答性および細胞・組織特異的発現の両方を制御する因子であると結論した。

3. ERFが、OLPを含む塩基性PR遺伝子の発現において重要と考えられたことより、ERF遺伝子の構造と発現制御機構を解析した。*N. sylvestris* より3種類のERFゲノム遺伝子 (*NsERF2*, *NsERF3*, *NsERF4*) をクローニングした。各遺伝子の塩基配列より推定されるアミノ酸配列をタバコERFのそれらと比較し、これら遺伝子がタバコERF1/2, 3, 4のサブグループに属することを明らかとした。ノザン解析と、各プロモーター::GUS融合遺伝子を導入した形質転換植物を持ちいた解析の結果、植物個体、特に根ではいずれのERF遺伝子も強い発現を示すものの、その細胞レベルでの発現様式は互い

に異なり、異なる役割を持つ可能性を示唆した。さらに塩基配列の解析から、もっともエチレンに高い応答性を示す*NsERF3*のプロモーター中にはそれ自身の認識配列GCC boxが存在するが、他の*NsERF*分子種には存在しないこと、一方、*NsERF2*プロモーターには別の転写因子EIN 3の認識配列が存在することを認め、ERFにいたるエチレンシグナル伝達のモデルを提案した。なお、OLP遺伝子が発現していない一部の細胞においても、ERF遺伝子が発現していたことから、ERFと協調してOLPあるいはPR遺伝子の発現を制御する未知の因子の存在を示唆した。

論文審査の結果の要旨

高等植物は、細菌、カビあるいはウィルスなどさまざまな病原体の感染に応答して、特異的な生体防御系を発現する。これら生体防御系の発現制御機構の解明は未だ不十分である。本論文は、病害菌感染によって誘導される塩基性PR (pathogenesis-related) タンパク質の1つであるOLP (osmotin-like protein ; PR-5d) 遺伝子ならびにその転写因子ERFの発現制御機構を分子生物学的に研究した成果をとり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. タバコの祖先種のひとつ*N. sylvestris*よりOLPゲノム遺伝子をクローニングし、その全塩基配列を決定した。その結果、プロモーター領域に、エチレン応答性PR遺伝子の保存配列GCC box (AGCGGCC) が2コピー存在することを明らかにするとともに、このGCC boxがOLP遺伝子の葉におけるエチレン応答性を支配するシス配列であることを部位特異的突然変異OLP遺伝子プロモーター::*GUS*リポータ融合遺伝子を導入した形質転換タバコをもちいて明らかにしている。

2. 野生型のOLP遺伝子プロモーター::*GUS*融合遺伝子をもつ形質転換植物をもちいて細胞・組織的発現を解析し、OLP遺伝子の発現は転写レベルで制御されており、根の維管束と皮層、ならびに培養細胞で強く発現することを明らかにしている。また、これら細胞・組織特異的発現もGCC boxにより支配されていることをはじめて明らかにしている。さらに*in vitro*実験により、転写因子ERFがOLP遺伝子プロモーター配列中のGCC box特異的に結合することを明らかにし、これらの因子がOLP遺伝子のエチレン応答性および細胞・組織特異的発現の両方を制御することを明らかにしている。

3. 塩基性PR遺伝子の発現制御に重要と考えられた転写因子ERFのゲノム遺伝子を*N. sylvestris*より3種類 (*NsERF2*, *NsERF3*, *NsERF4*) クローニングし、各遺伝子の塩基配列を決定している。さらに、ノザン解析と、各プロモーター::*GUS*融合遺伝子を導入した形質転換植物をもちいた解析から、各ERF遺伝子は互いに異なる発現様式を示し、異なる役割を持つ可能性を示唆している。また、それぞれのプロモーター領域の塩基配列の解析より、エチレンの受容からERFに至るシグナル伝達のモデルを提案している。

以上のように、本論文は、塩基性PRタンパク質遺伝子の発現制御機構を解明するために、OLP遺伝子ならびに転写因子ERF遺伝子の発現制御機構を分子生物学的に研究したものであり、植物分子生物学、分子細胞生物学ならびに植物の耐病性の分子育種の発展に寄与するところが大である。

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11年2月16日、論文なら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。