

氏 名	リャン ヤー ジー 梁 亜 杰
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2369 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	Genome Structure of the Hairy-Root-Inducing Plasmid pRiA4b (毛根誘発プラスミド pRiA4b の全ゲノム構造解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 岡 穆 宏 教 授 井 口 八 郎 教 授 宮 田 隆

論 文 内 容 の 要 旨

土壌細菌 *Agrobacterium rhizogenes* が双子葉植物に感染すると毛根を誘発する。この病原性はバクテリアがもっている巨大プラスミドに依存しており、毛根誘発プラスミド (pRi) と呼ばれている。このバクテリアが植物に感染すると、pRi 上の特定の領域 (T-DNA) が植物細胞核に伝達された後、核染色体に挿入され、T-DNA 上に存在する植物ホルモンの合成や配糖体からの遊離に関与した遺伝子が構成的に発現され、植物細胞内のホルモンバランスが崩れることによって植物癌が生じる。この T-DNA の伝達・挿入には T-DNA 上の遺伝子は必要ではなく、両端に存在する同方向繰り返し構造がシスにあれば充分である。T-DNA の伝達・挿入に必要なトランス因子はプラスミド上の T-DNA の外側に存在する毒性遺伝子群 (*virABCDE*) とバクテリア染色体上に散在する *chv* 遺伝子群によって供給される。この特性のため *Agrobacterium* の系は植物へ外来遺伝子を導入する最も有効な道具として利用されている。また、この巨大プラスミドは T-DNA をはじめ種々の機能的に全く異なった DNA 断片の組み合わせから成っており、進化の面からも興味をもたれてきた。このような巨大プラスミドの基礎・応用研究にとって最も重要な課題である全ゲノム構造の解明が待たれていた。

種々の毛根誘発プラスミドがこれまでに同定されているが、pRiA4b は世界で広く用いられているこの分野では標準のプラスミドである。申請者がこのゲノム研究を開始した頃までに、TL-DNA をはじめ約 45 kb 領域の塩基配列が報告されていた。残りの領域について、コスミドライブラリーを出発材料にして、サブ DNA 断片のクローニング、クロモソームウォーキング、PCRなどを組み合わせて両鎖について塩基配列を決定した。重複する異なった DNA 断片をもシーケンシングすることによって integrity を確認した。その結果、pRiA4b は 250,345 bp から成る環状分子であることが分かった。主な機能単位 DNA 断片は、TL-DNA, *occ* (オクトピン代謝遺伝子群), TR-DNA, *agc* (アグロピン代謝遺伝子群), VAR (アミノ酸・糖代謝遺伝子群), *tra/trb* (接合伝達遺伝子群), *rep/oriV* (複製遺伝子群), *vir* (毒性遺伝子群), *acc* (アグロシロピン代謝遺伝子群) であった。これらのうち *tra/trb* および *vir* 領域は非常に密に遺伝子が配置されており、かなりの数の遺伝子重複も見いだされた。さらにこれら機能単位はそれぞれ独立に進化を遂げ、巨大プラスミド間で shuffle された痕跡を随所に見いだした。例えば *rep/oriV* 領域は pRi のグループ内で高度に保存されているにも関わらず *vir* 領域は他の pRi よりも pTi (他の巨大プラスミドグループ) とより相同性が高いことや、TR-DNA が pTi の TL-DNA と相同性が高いことなど。

以上のように、申請論文は pRiA4b の全ゲノムの塩基配列を明らかにし、含まれる遺伝子群をカタログ化し、ポストゲノムサイエンスのための基礎データを提供するとともに、巨大プラスミドの進化過程について論じたものである。

なお、主論文の基礎となる論文 1 編は申請論文の研究成果の一部を共著者とともに公表したものである。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

毛根誘発プラスミド (pRi) は *Agrobacterium* が植物に腫瘍を起こす病原性因子で、類似のクラウンゴール誘発プラスミ

ド (pTi) とともに植物細胞へ外来遺伝子を導入する道具として植物科学の分野で広く利用されている。またこれら巨大プラスミドは真核生物由来の DNA 断片 (T-DNA) を抱え込んでいる点でユニークであるのみならず、種々の機能単位 DNA 断片を組み込んでおり進化の面でも極めて興味ある材料である。

本申請論文では毛根誘発プラスミド pRiA4b の全ゲノムの塩基配列を決定し、種々の重複 DNA 断片などをも利用して、決定された塩基配列の integrity を確認している。その結果、pRiA4b は 250,345 bp から成る環状分子で、主な機能単位 DNA 断片は、TL-DNA, *occ* (オクトピン代謝遺伝子群), TR-DNA, *agc* (アグロビン代謝遺伝子群), VAR (アミノ酸・糖代謝遺伝子群), *tra/trb* (接合伝達遺伝子群), *rep/oriV* (複製遺伝子群), *vir* (毒性遺伝子群), *acc* (アグロシノピン代謝遺伝子群) であった。これらのうち *tra/trb* および *vir* 領域は複数のオペロンを含んでおり、各遺伝子が非常に密に配置されている。またオペロン内では遺伝子重複もいくつか見いだされたが、これらは主にタンパク質複合体のサブユニットの構造遺伝子であり、翻訳産物の分子数の比を一定に保つ役割りを担っていることが示唆された。また、類似の巨大プラスミド間での各機能単位 DNA 断片の相同性の解析から、各機能単位は独立に進化を遂げ、巨大プラスミド間で shuffle されて現在に至っていることを示した。さらに、pRi は一般に pTi よりサイズが大きいとその主な原因が VAR 領域の存在の有無によるもので、この DNA 断片はバクテリアの染色体断片が由来であることが示唆された。

本申請論文は毛根誘発プラスミドの標準株ともいえる pRiA4b の全ゲノムの塩基配列を決定し、含まれる構成遺伝子をカタログ化し、さらに各機能単位 DNA 断片は異なった先祖プラスミドに由来し、それらが巨大プラスミド間で shuffle されつつ進化してきたことを示したものであり、プラスミドの基礎研究のみならず今後の遺伝子導入技術の改良に多大の恩恵をもたらす点においても高く評価される。よって本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年2月2日、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。