

園・本館

報告番号 ※ 甲 第 **2530**号

# 主論文の要旨

題名 オーキシンによる  
植物遺伝子発現制御機構の解析



氏名 丹羽康夫

## 主論文の要旨

報告番号	※甲第	号	氏名	丹羽康夫
------	-----	---	----	------

*par* (protoplast auxin-regulated) 遺伝子は、タバコ葉肉細胞プロトプラストを、オーキシンを含む培地で培養したときにその発現量が増大する。タバコ個体における *par* 遺伝子の発現を mRNA レベルで調べた結果、根で強く発現していること、さらに弱いながら種子でも発現していることがわかった。*par* 遺伝子の植物体での発現様式をより詳細に解明し、さらにその発現制御領域を特定する目的で *par* 遺伝子の 5' 上流領域をタバコ染色体ライブラリーより単離し、転写開始点より -1679 塩基までの配列を決定した。その結果、cDNA と塩基配列が一致する *par1* 遺伝子に加え、cDNA の塩基配列と一部一致しない *par2* 遺伝子 (129 アミノ酸中 4 アミノ酸の置換) の 5' 上流領域も同時に単離された。*par1*、*par2* 両遺伝子の 5' 上流領域を比較したところ、転写開始点より -400 塩基前後までは、高い相同性がみられた。

*par1*、*par2* 両遺伝子の発現をより簡便に検出するために、両遺伝子の 6 アミノ酸残基以下を大腸菌由来の  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子におきかえたキメラ遺伝子を作製した。このキメラ遺伝子を、*Agrobacterium* を用い、タバコ染色体上へと導入し、形質転換植物体を得た。

*par1*-GUS キメラ遺伝子を導入した形質転換植物体からプロトプラストを調整し、人工オーキシンの 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) に対する応答を検討したところ、培地中に 2,4-D を添加したプロトプラストの方が無添加で培養したプロトプラストより約 4 倍高い GUS 活性値を示した。また、形質転換体における GUS 活性を測定したところ、葉、茎と比較して根で、高い GUS 活性が検出された。また、種子において比較的高い GUS 活性がみられた。以上の結果は、前述した RNA レベルでの *par* 遺伝子の発現とよく一致することから、転写開始位置より -1679 塩基までに、*par1* 遺伝子の発現を制御している配列が存在していると考えられる。種子における GUS 活性は、種子形成の後期になって検出されることがわかった。発芽に伴うキメラ遺伝子の発現は、*par1*、*par2* 両遺伝子とも発芽初期より根においてみられた。発芽時に限らず、根におけるキメラ遺伝子の発現を組織レベルで観察すると、根毛と根端で特に強い発現が認められた。

*par1* 遺伝子の 5' 上流域を順に欠失させたキメラ遺伝子を導入した形質

## 〔主論文の要旨の続き〕

転換植物体を解析した結果、*par1* 遺伝子は根および種子において、-138 の *Sph*I 部位までに含まれる配列によってその発現の特異性は制御されており、-328 の *Xba*I から -1679 の *Eco*RI 部位までの配列によって発現量が制御されていると考えられる。すでに、カリフラワーモザイクウイルス 35S RNA プロモーターが、タバコの根端で機能することが知られており、その発現制御には、TGA1a タンパク質が関与していることが報告されている。今回、ゲル移動度シフト法により、*par1* 遺伝子の +53 から -138 までの領域に TGA1a タンパク質が、配列特異的に結合することが明らかになった。したがって、TGA1a は、*par1* 遺伝子の根端における発現の制御因子の一つであろうと推測される。一方、プロトプラストの培地中に 2,4-D を添加しないで培養したものと、2,4-D を添加して培養したものにおけるキメラ遺伝子の発現量の差を比較した実験から、-138 より下流に 2,4-D に応答する配列が存在していると考えられる。

*par1*-GUS キメラ遺伝子は、形質転換タバコから単離したプロトプラスト以外にも、芽生えの時期に、外部から添加した 2,4-D に応答し、その発現が増大することが明かとなった。2,4-D による増大効率は、無添加時でも発現レベルが高い根では、2 倍程度であったが、2,4-D 無添加時に発現レベルが極めて低い子葉では、40 倍以上も発現量が上昇した。このように、子葉中の *par* 遺伝子は、外生のオーキシンに対して鋭敏に応答して発現することがわかった。したがって子葉は、オーキシンによる *par* 遺伝子の発現制御機構を研究する優れた材料であると考えられる。