

【論文内容の要旨】

申請者氏名 Pulla Kaothien

【研究題目】 西洋ワサビのペルオキシダーゼ遺伝子における傷害誘導発現の分子機構

【要 旨】

本論文は西洋ワサビのペルオキシダーゼ遺伝子、*prxC2* が傷害により発現が誘導される機構をタバコを材料に、分子レベルで解析したものである。

第 1 章では植物が物理的傷害を受けると一群の遺伝子の発現が誘導される現象の解明の現状を、傷害信号の伝達経路、信号を受けて遺伝子の転写が起こる機構、傷害で発現誘導が起こる植物のペルオキシダーゼ遺伝子についてレビューし、本研究の背景を説明した。

第 2 章では *prxC2* 遺伝子の 5' 上流に傷害に応答して転写を誘導する領域を翻訳開始点の上流、-177~-134bp の 43 bp に限定した。手法はまず、種々の 5' 上流断片をレポーター遺伝子である、 β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子に連結し、タバコに導入して得られた、形質転換タバコの葉に傷害を与えた後の GUS 転写物と GUS 活性の測定により行った。この 43 bp 内には既知の傷害応答のシス配列、PAL box に類似の配列 (POP) が存在した。POP に欠失あるいは変異を与えると、形質転換タバコにおける傷害応答が消失した。さらに POP には傷害を受けたタバコの葉の核タンパク質が特異的に結合することをゲルシフト解析で示した。

第 3 章では、まず POP に結合するタンパク質の cDNA のサウスウエスタン法による単離を述べた。10⁶ のタバコ cDNA ライブラリーよりポジティブクローンを 1 個得た。これは *NtLim1* と名付けた 200 アミノ酸残基より成るタンパク質をコードする。*NtLim1* は LIM ドメインと呼ばれる Zn フィンガー構造を 2 個有し、C 末端側に酸性に富むドメインを持つ。*NtLim1* はタバコにおいて構成的に発現すること、および GFP 融合タンパクを用いた解析により、核に局在することを示した。*NtLim1* 全長および 2 個の LIM ドメインをそれぞれコードする DNA 領域を GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させ、それぞれの精製タンパク質を得た。これらはいずれも POP と特異的に結合することを示した。また C 末端側の酸性領域は転写活性化能を有することを、タバコプロトプラストでのレポーター遺伝子の一過性発現で示した。*prxC2* プロモーター/*GUS* 融合遺伝子を持つタバコに *NtLim1* のアンチセンス DNA を導入すると、*GUS* の傷害発現誘導が消失したことから、*NtLim1* タンパク質は *in vivo* においても傷害誘導の転写因子として機能すると結論した。

以上は植物遺伝子の傷害による発現誘導の機構に新たな知見を加える価値ある成果である。

移動できない植物は物理的傷害も含め、環境からのストレスに対応する巧妙な防御系を備えており、その機構の解明は植物の基礎および応用研究に重要である。本論文は西洋ワサビに多く存在するペルオキシダーゼ遺伝子の中で、傷害により発現誘導が起こる *prxC2* 遺伝子を対象に、その誘導機構に関わるシス配列と転写因子をモデル植物のタバコを材料に解析したもので、以下の明瞭な結果を得ており、優れた成果を収めている。

1) *prxC2* 遺伝子の 5' 上流領域の種々欠失断片を β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子に連結し、タバコ植物体に導入後、傷害に応答して GUS 遺伝子の転写および翻訳を解析することにより、翻訳開始点の上流、-177~-134bp の 43 bp に重要なシス配列があると限定している。

2) この 43 bp 内には既知の傷害応答のシス配列、PAL box に類似の配列 (POP) が存在し、POP には傷害を受けたタバコの葉の核に存在するタンパク質が結合すること、その結合は過剰の POP 添加により消滅するが、塩基置換した変異 POP では消滅せず、結合が配列特異的であることをゲルシフト解析により証明している。

3) POP に結合するタンパク質の cDNA を 10^6 のタバコ cDNA ライブラリーより一つ単離し、*NtLim1* と名付けた。*NtLim1* は 200 アミノ酸残基より成るタンパク質をコードし、タンパク質/タンパク質および DNA/タンパク質の会合に寄与する LIM ドメインと呼ばれる Zn フィンガー構造を 2 個、転写活性化に寄与する酸性領域を持つことを示している。

4) *NtLim1* は核に局在することを GFP 融合タンパクの GFP の蛍光から明らかにしている。*NtLim1* 全長および 2 個の LIM ドメインを単独にコードする DNA を大腸菌で発現させ、それぞれの精製タンパク質を得た。この組換えタンパク質はいずれも POP と特異的に結合することを *in vitro* 実験で示している。

5) *NtLim1* のアンチセンス DNA を、*prxC2* プロモーター/GUS 融合遺伝子を持つタバコ植物体に導入し、葉に傷害を与えると、対照の葉とは異なり、GUS 遺伝子の発現が誘導されないことから、*in vivo* においても *NtLim1* が傷害に応答して遺伝子発現を誘導することを示している。

6) C 末端側の酸性領域は転写活性化能を有することを、タバコプロトプラストでのレポーター遺伝子の一過性発現で示している。

以上、本論文は *prxC2* 遺伝子の傷害による誘導発現に必要なシス配列、それに結合する転写因子の同定と機能解析を示しており、植物遺伝子の環境ストレス応答機構の一部を明確にし、植物生理学、植物分子生物学の発展に顕著な貢献がある。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) 学位論文として価値あるものと認めた。