

【論文内容の要旨】

申請者氏名 長 屋 進 吾

【研究題目】植物細胞における外来遺伝子の有用発現系の構築

【要 旨】

本論文では、高等植物において効率良く外来遺伝子を発現させる技術の確立を目指し、有用プロモーターの単離とposition effectの抑制について、タバコ培養細胞BY2を宿主として、解析を行った結果を記載した。

第1章では、タバコ培養細胞から有用プロモーターの単離について述べた。2種類の遺伝子 (*Nt108*: 機能未知、*NtATPD*: ATPase δ) のプロモーターを単離し、 β -グルクロニダーゼ (GUS) をレポーター遺伝子としてBY2細胞で解析に行った結果、特に *NtATPD* プロモーターは *CaMV35S* プロモーターの数倍の安定した転写活性を示した。細胞増殖停止期に高い転写活性を示すプロモーターとして、*NtADH* (alcohol dehydrogenase) および *NtPES* (pectin esterase) 遺伝子のプロモーターを取得した。上と同様の解析により、両者が *CaMV35S* プロモーターの数十倍の転写活性を培養後期に発揮することを示した。

第2章では、植物への外来遺伝子導入に際し、しばしば観察される position effect の抑制を試みた結果を記載した。ウニ、ショウジョウバエにおいてエンハンサー機能を遮断することが知られている、ウニの *Ars* インスレーターに *CaMV35S* core プロモーター/GUS を連結しタバコ培養細胞の染色体に導入した。インスレーターを付加しない対照の形質転換細胞では独立に選んだ50クローンの約60%はGUS活性極めて低い値であったが、インスレーターを付加したものでは全てが顕著なGUS活性を示した。インスレーターの挿入位置はプロモーターの5'上流が有効であった。これは *Ars* インスレーターが植物の position effect を抑制する最初の知見であり、貴重な成果である。

第3章では、第1章に述べた *NtADH* 遺伝子のプロモーターがやはり position effect を抑制することを述べた。抑制に有効な断片をTATA Boxの上流200 bpに限定した。この断片はウニの細胞でもエンハンサー効果を遮断したが、酵母のサイレンサー機能を遮断しなかった。この200 bp断片は転写活性やコピー数の増大には無効であること、染色体への特定の位置に外来遺伝子を導入するものではないこと、から position effect を抑制するものと結論した。

以上、有用プロモーターによる発現制御およびインスレーターや *NtADH* プロモーター領域に同定された機能領域による position effect の抑制が、外来遺伝子発現系の構築における貴重なツールになることを述べた。

【論文審査結果の要旨】

遺伝子組換え技術により植物にストレス耐性を付与すること、代謝工学により新規代謝産物を蓄積させることが、植物バイオテクノロジーの主たる課題である。これを実用化するには解決しなければならない多くの問題点があるが、導入した外来遺伝子を効率的に安定して発現させる技術も、その一つである。

本論文では、高等植物において効率良く外来遺伝子を発現させるために、有用プロモーターを数種類、単離・評価し、さらに、導入遺伝子の発現を不活性化するposition effectを回避する貴重な成果を述べている。

1) タバコ培養細胞から対数増殖期に高発現する2種類のプロモーター (*Nt108*: 機能未知、*NtATPD*: ATPase δ) を単離し、特に*NtATPD*プロモーターはCaMV35Sプロモーターの数倍の安定した転写活性があることを示した。

2) タバコ培養細胞の増殖停止期に高い転写活性を示すプロモーターとして、*NtADH* (alcohol dehydrogenase) および*NtPES* (pectin esterase) 遺伝子のプロモーターを取得した。両者がCaMV35Sプロモーターの数十倍の転写活性を培養後期に発揮することを示している。

3) CaMV35S core プロモーター/GUSをタバコ培養細胞の染色体に導入し、独立に選んだ50クローンのGUS活性を調べると、約60%はGUS活性が極めて低い値であった。ウニ、ショウジョウバエにおいてエンハンサー機能を遮断することが知られているウニの*Ars*インスレーターを、このプロモーターの上流に付加すると50クローン全てが顕著なGUS活性を示した。インスレーターの挿入位置はプロモーターの5'上流が有効であった。これは*Ars*インスレーターが植物のposition effectを抑制する最初の例であり、貴重な成果である。

4) *NtADH*遺伝子のプロモーターがやはりposition effectを抑制することを発見した。抑制に有効な断片をTATA Boxの上流200 bpに限定した。この断片はウニの細胞でもエンハンサー効果を遮断したが、酵母のサイレンサー機能を遮断しなかった。*NtADH*の200 bp断片は転写活性やコピー数の増大には無効であること、染色体への特定の位置に外来遺伝子を導入するものではないこと、からposition effectを抑制するものと結論した。

以上、本論文は、タバコ細胞から取得した有用プロモーターによる発現制御およびインスレーターや*NtADH*プロモーター領域に同定された機能領域によるposition effectの抑制が、外来遺伝子発現系の構築における貴重なツールになることを明らかにした。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。