

審査の結果の要旨

氏名 本間 洋平

本論文は、遺伝子組換え植物による条件特異的な有用物質の生産に着目して、異種タンパク質を大量に蓄積する植物の開発について基礎的な研究を行ったものである。本論文は5章からなる。第1章は序論である。植物に有用物質を生産させる第2世代の *genetically modified organisms* (GMO) として、ワクチン抗原タンパク質などの有用物質を蓄積する作物を作成して食しても、有用物質の蓄積量が少量では免疫応答の誘導は認められないと予想される。その解決策として、目的物質の条件特異的な生産や貯蔵器官への蓄積などが挙げられる。本研究で著者は目的物質の条件特異的な生産に着目して、糖誘導性プロモーターを利用してタンパク質を大量に蓄積する植物の開発を行ったことを述べている。

第2章は糖誘導性プロモーターを用いたタバコによる GUS の高発現について述べる。第2世代の GMO の開発において、宿主植物に導入する遺伝子の発現コンストラクトの設計が重要である。植物用の発現コンストラクトによく用いられる CaMV35SRNA プロモーター (35S) は導入した遺伝子を宿主植物全体に常時発現させるが、宿主植物への負担が大きいと考えられている。一方、条件特異的に発現誘導するプロモーターは宿主植物への負担が少なく、植物を用いたタンパク質生産系の開発に適していると考えられる。そこで著者は糖濃度に応じて発現誘導が可能なサツマイモ由来のプロモーター Spo^{min} を用いて、糖処理によってタンパク質を大量に生産する植物の開発を目的とした。

まず著者は Spo^{min} の下流にレポータータンパク質 (GUS) の遺伝子を連結した GUS 発現コンストラクトを作成した。次に Spo^{min} が植物体内において糖処理によって遺伝子発現を誘導するか確認するため、組換え体の作成が容易であるタバコに GUS 発現コンストラクトを導入し、糖処理による GUS の発現パターンを解析した。その結果、糖処理によって Spo^{min} はタバコの各器官 (葉、茎、根) において GUS の発現を誘導した。最大生産量は 6%スクロースを葉に処理したときであり (約 44.9 μg GUS/g leaf fresh weight)、35S による GUS 生産量の最大約 18.0 倍であった。従って、Spo^{min} は植物を用いたタンパク質生産系の開発に有用ではないかと考えられる。

第3章では糖誘導性プロモーターを用いたタバコ毛状根による GUS の高発現について述べる。毛状根は、*Agrobacterium rhizogenes* の感染によって誘導される、分枝が著しく生育が旺盛な根である。そこで著者は GUS 発現コンストラクト導入タバコの毛状根を誘導し、糖処理による GUS の発現パターンを解析した。その結果、糖処理によって Spo^{min} は毛状根においても GUS の発現を誘導した。最大生産量は 10%スクロースを処理したと

きであり (約 10.2 $\mu\text{g/g}$ root fresh weight)、35S による GUS 生産量の約 82.5 倍であった。また、 Spo^{min} によって発現誘導された GUS の毛状根から培地中への漏出も認められ、最大漏出量は約 10 ng/ml culture medium であった。従って、 Spo^{min} は毛状根を用いたタンパク質生産系の開発においても有用ではないかと考えられる。

第 4 章では糖誘導性プロモーターを用いたサツマイモによる GUS の高発現について述べる。サツマイモは、①熱帯を中心に栽培可能地域が広い、②単位面積当たりの収量がイネの約 3 倍 (13.4 t/ha FAO, 2013)、③デンプンやタンパク質などを蓄積する塊根を形成する、などの特徴があり、組換え体作成用の作物として優れている。しかし、サツマイモ組換え体の作成には、用いる品種や組織などを検討した知見に加えて、実験者の技術や経験が必要である。大谷らの方法に従い、著者はサツマイモの高系 14 号の茎頂を用いて組換え体を作成しているが、組換え体取得率は約 1.5% であった。そこで、まず組換え体取得率の向上を検討した。組換え体作成には第 2 章で作成した GUS 発現コンストラクトを用いた。その結果、組換え体取得率が約 6.67% まで向上した。

次に、作成した組換えサツマイモを用いて糖処理による GUS の発現パターンを解析した。その結果、糖処理によって GUS の発現誘導が認められたが、塊根において糖処理無しの条件における GUS の発現量の方が高かった。糖処理無しにおける最大生産量は約 52.8 $\mu\text{g GUS/g}$ tuberous root fresh weight であり、35S による GUS 生産量の最大約 1177.6 倍であった。サツマイモは塊根内における糖濃度が高いため、外部からの糖処理が無くても塊根形成の際に葉から転流された糖によって GUS の発現が既に誘導されていたと考えられる。従って、 Spo^{min} によるタンパク質生産系は、サツマイモの塊根の様な糖濃度が高い器官を用いる場合、糖処理無しでタンパク質の大量生産が可能だと考えられる。

第 5 章は、以上をまとめて考察したものである。本研究は Spo^{min} を用いたタンパク質の高発現に関する世界初の報告である。他の糖誘導性プロモーター、例えばジャガイモ由来のパタチンプロモーターによる GUS の発現量は本研究の 0.1% 未満である。 Spo^{min} 以外にもサツマイモ由来の複数の糖誘導性プロモーターの報告があるが、物質生産系の開発に用いられた報告は無く、 Spo^{min} に比べてタンパク質の発現量は低い。糖誘導性プロモーターの遺伝子発現には糖が必要であるが、用いる作物内の糖濃度が高い場合、外部からの糖処理が無くても器官形成の間に十分なタンパク質の生産を行うことができると考えられる。

以上本研究によって得られた知見は、第 2 世代の GMO の開発に大きく貢献できると予想されるもので、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。