

論文審査の結果の要旨

報告番号	博（水・環）甲 第6号	氏 名	西城 隆憲
学位審査委員		主査	北村 美江
		副査	宮西 隆幸
		副査	西山 雅也
		副査	仲山 英樹
論文審査の結果の要旨 西城隆憲氏は、2012年4月に長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科博士後期課程に社会人学生として入学し、現在に至っている。同氏は、水産・環境科学総合研究科に入学以降、環境海洋資源学を専攻して所定の単位を修得するとともに、植物における銅イオン誘導性遺伝子発現システムの構築とその応用に関する研究に従事し、その成果を2014年12月に学位論文「Development of copper-inducible gene expression system for higher plants and its application study」として完成させ、参考論文として、学位論文の印刷公表論文2編（うち審査付き論文2編）、その他の論文2編（うち審査付き論文2編）を付して、博士（学術）の学位の申請をした。長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科教授会は、2014年12月17日の定例教授会において論文内容等を検討し、本論文を受理して差し支えないものと認め、上記の審査委員を選定した。委員は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会を実施するとともに、最終試験を行い、論文審査および最終試験の結果を2015年2月18日の水産・環境科学総合研究科教授会に報告した。 本論文は、重金属の銅イオンに応答して転写が活性化される銅イオン誘導性遺伝子発現調節ベクターの開発、およびこのベクターの有用性を高等植物への遺伝子導入により検証した応用研究から成る。 序論では生物にとっての銅の重要性と毒性の両面に触れると共に、バイオセンサーとしての銅イオンの潜在的可能性とこれまでの開発研究の現状から、高等植物における銅イオン誘導性遺伝子発現調節システムの開発に至った経緯に言及した。 第一章では、既報の銅イオンで誘導される酵母メタロチオネイン転写因子(ACE1)の発現ベクターに着目し、ACE1に新たにヘルペス由来の活性化ドメイン(VP16AD)を付加し、更に、レポーター（GFP）遺伝子上流にトマトモザイクウィルスの5'非翻訳領域(<i>Tb7d</i>)を挿入することで、高等植物用のベクターを開発した。本ベクターをシロイヌナズナへ導入し、GFPの発現を転写レベルで検定した結果、ベースの発現は無視できるレベルに抑えることができ、100 μM 銅イオンの投与時には非投与時に比較して、1,000			

倍程度の発現を誘導するなど、著しく誘導効率を上げることに成功した。しかも、このシステムは銅イオンに対する特異性が極めて高く、低用量 (1 μM) から高用量 (500 μM) まで用量依存的に発現が上昇すること、銅イオンに対する発現誘導は急速(数時間)で、しかも可逆的であることを示した。また、この発現調節ベクターがタバコ培養細胞でも働くことを確認し、多方面への応用研究への利用可能性を示した。

第二章では新たに開発したシステムを用いた応用例として、開花誘導に働くフロリゲン (FT) 遺伝子を調節遺伝子下に繋いだベクターを構築し、シロイヌナズナに導入した。得られた形質転換体は 100 μM 銅イオンで 2 日間処理することにより、抽苔し、花芽の誘導が確認できた。また、野生株と比較して形質転換体では 10 μM 銅イオン処理で展開するロゼット葉の数がおよそ半分で花芽をつけることを示した。このように、開発したシステムを用いることで銅イオンによる開花調節に成功した。

第三章では、植物が利用可能な土壌中の銅イオン濃度をモニタリングするツールとしての本システムの応用について検討した。第一章で確立したベクターと *GFP* 遺伝子の上流に挿入した *Tb71* を改変した 4 種のベクターの全 6 種のベクターを挿入した形質転換シロイヌナズナを得た。得られた植物系統間での *GFP* 転写活性を比較したところ、ベクターの種類によらず、100 μM 銅イオンに対する感受性には系統間での差が小さかったものの、銅イオン非投与時のベースとなる発現に、違いが見られた。この中で、ベースの *GFP* 発現量の違いを基に 4 系統を選び、これらの植物を既知濃度の硫酸銅および金属銅を添加した実験土壌で栽培し、土壌から植物体へ吸収される銅イオンの検出を試みた。その結果、ベースの *GFP* 発現量の違いに依存して、ベースの発現量の高いものほど感受性が高く、低濃度の銅イオンを検出できる (検出限界, 0.4 ppm) こと、金属銅に比較して、硫酸銅の吸収率が 50 倍高いことを示した。このように、植物が利用できる土壌中の可給態銅イオン濃度を、抽出等の操作を必要とせず、簡易に測定できることを示した。

最後に、得られた結果を基に、開発したシステムの特徴と有用性を結論付けた。

以上のように本論文は、高等植物での遺伝子発現を簡易で選択的に制御できる実用的なシステムの開発を示したことから、将来的に環境保全や農業に多大の寄与をするものと評価できる。

学位審査委員会は、植物生理学および植物バイオテクノロジーの分野において極めて有益な成果を得るとともに、環境科学および農学の進歩発展に貢献するところが大きく、博士 (学術) の学位に値するものとして合格と判定した。