

シロイヌナズナ ADP-glucose pyrophosphorylase サブユニット *Apl3* 遺伝子の 種子特異的発現機構の解析

生命分子化学講座 生物化学分野
山本 真希

【背景および目的】 ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) はデンプン生合成における唯一の基質である ADP-グルコースの生成反応を触媒する酵素であり、デンプン合成量を決定する因子の一つとされている。高等植物の AGPase は調節サブユニットと触媒サブユニットと呼ばれる 2 種のサブユニットが会合したヘテロ四量体タンパク質であり、シロイヌナズナをはじめ、多くの植物は各サブユニットをコードする遺伝子を複数有している (シロイヌナズナでは大サブユニット, *Apl1*–*Apl4*; 小サブユニット, *Aps1*)。これらのサブユニット遺伝子は、それぞれ時期および器官特異的な発現特性をもち、植物はその発現を調節することによって、内外環境に応じた基質供給を制御していると考えられている。リアルタイム PCR による発現解析の結果、シロイヌナズナでは *Aps1* および *Apl1* が種々の器官で恒常的に発現するのに対し、*Apl3* は種子特異的に発現することが明らかにされている。また、*Apl3* は糖によりロゼット葉でその発現が誘導されることも知られているが、詳細は不明である。そこで本研究では、*Apl3* のプロモーター解析を行い、糖による発現誘導機構を解明することを目的とした。

【方法】 Northern blot 解析を用いて、シロイヌナズナ野生型株およびデンプン蓄積変異株 (TL46 株, TL25 株) のロゼット葉と種子における *Apl3* mRNA の発現量を比較した。また、約 2.3 kb の *Apl3* プロモーター領域下流に、 β -glucuronidase (GUS) レポーター遺伝子を連結させた融合遺伝子をバイナリーベクターに挿入し、植物発現用プラスミドを構築した。これをシロイヌナズナ野生型株にアグロバクテリウムを介して遺伝子導入した。形質転換体のロゼット葉を糖溶液に浸潤することにより糖誘導処理を施し、GUS 活性測定を行った。さらに、糖に応答するプロモーター領域を特定するために、プロモーター領域を削り込み、同様に形質転換体を作製し GUS 活性測定に供した。

【結果】 葉と比較して種子では、2–3 倍量 (g fresh 当たり) の *Apl3* mRNA が蓄積していることが明らかとなった。GUS 活性測定の結果、グルコースおよびスクロースにより *Apl3* 2.3 kb プロモーター活性の上昇が観察された。プロモーター領域を 1.4 および 0.4 kb に削り込んだ形質転換体ではいずれもグルコース処理によりプロモーター活性が上昇したが、スクロース処理による 0.4 kb プロモーター活性の上昇は認められなかった。また、0.1 kb プロモーターでは、いずれの糖についても GUS 活性は検出されなかった。

【結論および考察】 シロイヌナズナ野生型株の葉および種子における *Apl3* mRNA 発現量から種子のデンプン生合成においては *Apl3* が主たる役割を果たすことが示唆された。さらに、*Apl3* の発現誘導はグルコースとスクロースでは異なり、グルコースに応答するプロモーター領域はより下流にあることが示唆された。また、0.1 kb プロモーター形質転換体が GUS 活性を示さなかったことから、糖に応答するシス因子は 0.1 kb プロモーターより上流に存在すると考えられる。今後、さらに詳細な削り込み解析を行い、糖応答シス因子の同定を目指す必要がある。