

シロイヌナズナ ADP-glucose pyrophosphorylase サブユニット
Apl3 および *Aps1* のプロモーター解析

食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学講座
田村 祥雄

【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 は大サブユニットと小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 4 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 大サブユニット, *Apl1~Apl4*; 小サブユニット, *Aps1~Aps2*)。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。*Aps1* は器官恒常的に発現し、*Apl3* は種子特異的に発現することが知られている。また、*Apl3* の発現はスクロース、グルコースおよびアブシジン酸によって誘導されることが報告されているが、その他の誘導因子あるいはシス因子等の詳細は不明である。本研究では、*Aps1* および *Apl3* プロモーターの活性化因子の探索を目的とし、各種糖およびジベレリンによる *Aps1* および *Apl3* のプロモーター活性を調べた。

【方法】3.1 kb の *Aps1* および 2.3 kb の *Apl3* プロモーター領域に、 β -glucuronidase (GUS) レポーター遺伝子を連結させた融合遺伝子を導入した形質転換体 (*Tap1* and *Tap13*) を糖無添加 MS プレート培地で 20 日間生育させた。その後、各種糖およびジベレリンによる影響を調べるために 3 日間 100 mM スクロース、グルコース、フルクトース、マンニトールおよび 0.01 ~ 100 μ M ジベレリン添加 MS プレート培地、コントロールとして糖無添加 MS プレート培地で処理し、各植物体の GUS 活性を測定した。さらに、ジベレリンに応答する *Apl3* プロモーター領域を特定するために、1.4 および 0.4 kb に削り込み、同様に GUS 遺伝子と連結した融合遺伝子を導入した形質転換体をジベレリン処理し、GUS 活性を測定した。

【結果および考察】GUS 活性の測定結果から、*Aps1* はほとんど糖による影響を受けないことがわかった。一方、*Tap13* はフルクトース処理によりコントロールの 15 倍の GUS 活性を示したことから、*Apl3* はフルクトースで発現が誘導されることがわかった。さらにこのフルクトースによる発現誘導に対する、ジベレリンの影響を調べた。その結果、フルクトースにより誘導された GUS 活性は 0.01 ~ 100 μ M とジベレリン濃度を上昇させるにつれて減少した。このことから、*Apl3* はジベレリンにより発現が抑制されることがわかった。また、詳細な *Apl3* プロモーター解析を行うため、*Apl3* プロモーターを 1.4 および 0.4 kb まで削り込んだ変異体をジベレリン処理し、GUS 活性を測定した。その結果、ジベレリン処理により 2.3 kb および 1.4 kb プロモーター活性はフルクトース処理時に比べて 40% まで低下したが、0.4 kb プロモーターでは活性が 90% 保持された。このことから、-1359 ~ -413 の領域にジベレリン応答因子が存在すると予想された。そのため、データベースによりこの領域に存在するシス因子の解析を行った。その結果、ジベレリンにより負に制御される因子 GADOWNAT が存在していた。-1359 ~ -413 の領域がジベレリンによる *Apl3* 発現抑制に関与していることが示唆された。