

報告番号

※ 甲 第 1862 号

主論文の要旨

題名 CHLOROPLAST GENOMES
IN NICOTIANA SPECIES :
REGULATION OF GENE EXPRESSION
AND SEPARATION OF DIFFERENT
TYPES OF CHLOROPLASTS
IN SOMATIC HYBRIDS

(タバコ属植物の葉緑体ゲノム :

遺伝子発現調節および体細胞雑種に
おける異種葉緑体の分離性)

氏名 赤田 辰治

主論文の要旨

報告番号

※甲第

号

氏名

赤田辰治

細胞内小器官、葉緑体は光合成を行なう場として知られている。葉緑体内にはそれ独自の遺伝情報が存在し、それと核由来の遺伝情報との協同的発現により葉緑体が組織される。この葉緑体ゲノムには光合成機能の発現に重要な遺伝子が数多くコードされている。従って、葉緑体ゲノムを改変し得るならば、葉緑体の光合成機能を有効に改良することが可能となろう。しかしながら現在の技術ではこの計画を遂行することは非常に難しい。障害の一つは、ほぼ全ての高等植物で葉緑体が母方からのみ伝わる母性遺伝をすることにある。細胞融合はこの傷害を取り除く為の一法と考えられる。この方法によれば、二種の両親から由来する異種葉緑体が一融合細胞内で会合するため、このような細胞内において、二種の葉緑体間の融合による雑種葉緑体の形成や葉緑体ゲノムの組換えのおこる可能性が出てくる。従って細胞融合は細胞質の育種に新しい道を開くものとして期待されている。

1977年、Chenらは *Nicotiana glauca* と *N. langsdorffii* の体細胞雑種の葉緑体遺伝子マーカー、Fraction I タンパク質 (Rubisco:FIP) を調べた。FIP は核ゲノムにコードされた小サブユニット (SS) と葉緑体ゲノムにコードされた大サブユニット (LS) からなり、各サブユニットは種に特異的な等電点電気泳動パターンを示すことから核および葉緑体の遺伝子マーカーとして広く応用されている。彼らの結果によれば、調べた18個体中、両親由来のLSが見つかったのは一個体だけで残り全てにおいて片親由来のLSしか検出されなかった。これは二種の葉緑体の存在する融合細胞が植物体に再生される途中で片方の種の葉緑体を失ったことを意味する。本研究ではその原因を探る為、融合細胞から植物体の再生に至る途中で形成される未分化細胞の集塊であるカルスの葉緑体ゲノムをFIPのLSを遺伝子マーカーに用いて調べた。

N.glauca(G)、N.langsdorffii(L) 間の細胞融合により体細胞雑種カルスを得た。融合細胞から増殖により生じた全ての細胞を含む未分割なカルス全体のFIPを調べたところ、多くのカルスから両親由来のLSが検出された。これは、カルス全体としては二種の葉緑体の存在するものが多いことを示している。しかしながら植物体はカルスのごく一部分から再生されることが知られており、その一部分毎にはどうなっているのが問題となる。そこでカルス全体を8分割し、各部分におけるFIPをしらべた。その結果、部分毎に二種のLSの比率が大きく異なることがわかった。これから考えられることは、融合細胞が分裂増殖する間に二種の葉緑体の分離が起こり、Gの葉緑体を多く持つ細胞とLの葉緑体を多く持つ細胞とが出現しているということである。従ってカルスを形成する一細胞毎のFIPを調べる必要が生じた。そこで、カルスからプロトプラストを単離、培養し、5個の単細胞由来カルスを再生させた。FIP分析の結果、LのLSだけを持つカルスが2個、GのLSだけを持つカルスが1個、二種のLSをもつカルスが2個であった。この結果はそれぞれの細胞を単離した元のカルスは、Lの葉緑体だけを持つ細胞と、Gの葉緑体だけを持つ細胞と、二種の葉緑体を持つ細胞とがキメラを形成していたということを示している。

この研究上の一つの問題点は、GのLSとLのLSの間には等電点電気泳動による泳動パターンの差異があまり大きく出ないために両種の区別があまり明瞭でないということであった。この欠点を改善するためには、LSの泳動パターンの差異の大きいもの同士で細胞融合する必要がある。N.gosseiiのLSはN.langsdorffiiのLSとの泳動パターンの差異が大きい。しかしながらN.gosseiiとN.langsdorffiiを融合する場合には、融合細胞選抜の系を新たに確立する必要がある。N.glauca と N.langsdorffii の場合には両種の核遺伝子の相補性により生じるホルモン非依存的なカルスの成長能が融合細胞の指標としてもちいられた。この選抜の系を利用するためにN.gosseiiを母親、N.glaucaを父親とした交配によ

り得られた F_1 雑種に N. glauca を戻し交配し B_1F_1 を得た。この B_1F_1 (G') は N. gossei の葉緑体を持ち、N. glauca の核ゲノムの大部分をもつ。そこで G' と L との間で細胞融合を行ないホルモン非依存性のカルスを選抜し、その FIP を調べた。その結果 SS のパターンから選抜されたカルスは体細胞雑種であることがわかり、 LS の区別も明瞭であることが確認され、体細胞雑種における異種葉緑体の分離を研究するうえで非常に有用な系が確立された。この系を用いてさらに詳細な分析をおこなった結果、二種の葉緑体は体細胞雑種カルス内で無作為な分離をおこなっていることが明かとなった。この無作為な分離を遅延させ、二種の葉緑体の雑種形成の可能性を増すためには、細胞あたりの葉緑体総数を増大させることが有効であることがこの結果より考察された。

一方、葉緑体ゲノムの改良にはその遺伝子の発現調節を知っておく必要がある。遺伝子の発現調節は鋳型 DNA から RNA を転写する段階で制御されている場合が多い。転写はタンパク質をコードする塩基配列の上流に位置する転写開始部位から始まりコード領域を経てその下流に位置する転写終結部位にて終わる。この転写終結部位における制御に関しては大腸菌ゲノムやファージでの研究が急速に進行しつつあり、これが遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしていることがわかってきた。葉緑体ゲノムに関しては葉緑体自身を宿主として遺伝子操作を行なう技術が開発されていない為に発現調節に関してはあまり研究が進んでいない。そこで、この研究では大腸菌ゲノムの為に開発された大腸菌を宿主とする系を用いて葉緑体ゲノムの転写終結部位の機能の解析を行なった。

Nicotiana otophora の葉緑体 DNA から転写終結部位をショットガン法でクローニングした。用いたベクターにはアンピシリン耐性遺伝子と大腸菌で働く複製開始点が組み込まれており、さらにガラクトースキナーゼ遺伝子 ($GalK$) のコード領域とその上流に転写開始部位が存在する。この転写開始部位と $GalK$ の間に制限酵素で切断した N. otophora

の葉緑体DNA断片を繋ぎ込み、その組換えプラスミドDNAをGal K欠損株の大腸菌N100にトランスフェクトした。トランスフォームされた大腸菌の内、Gal Kの発現している大腸菌は赤いコロニーを形成する。一方、転写終結機能を持つDNA断片の繋ぎ込まれたプラスミドによりトランスフォームされたものは、白いコロニーを形成する。従って白いコロニーから抽出されたプラスミドには、転写終結機能を持つDNA断片がクローニングされていると考えられる。実際に白いコロニーを幾つか拾い、プラスミドの解析を行なったところ、ほぼ全てのプラスミドに様々な大きさのDNA断片が挿入されていた。その内の一つには429bpのDNA断片が挿入されており、その全塩基配列をDideoxy法で調べたところ、先頭から60bp~100bp付近に二次構造としてStem-loop構造を形成すると考えられる逆位反復配列が見つかった。このStem-loop構造は大腸菌の転写終結部位で見られる典型的な構造である。

以上の実験は、機能の面から追求し構造に達した例であるが、次に、塩基配列の既に明らかにされている、葉緑体ゲノムにコードされたRubiscoのLSの遺伝子に焦点をあて、その転写終結部位が大腸菌の系でどのように機能するかを調べた。この遺伝子は葉緑体内で最も多量に発現するタンパク質であり、その発現調節の機構が解明されれば将来的には他の遺伝子への応用価値も高くなるものと思われる。この転写終結部位を同様の方法で調べたところ、大腸菌内では両方向の転写を止めることがわかった。またこの転写終結部位は、二つのStem-loop構造を持つことがわかっている。この2つのStem-loop構造の内、どちらのStem-loopが転写終結機能を示すかどうかを調べる為に、大Stem-loop(L)と小Stem-loop(S)を制限酵素により分離した。そして、それぞれの断片をCAT(Chloramphenicol acetyl transferase)遺伝子のコード領域及びその上流に転写開始部位を持つプラスミドに繋ぎその組換え体によりトランスフォームされた大腸菌におけるCAT酵素の活性を挿入断

片を持たないコントロールプラスミドによるトランスフォーマントのC
A T活性との比率で表わし、その抑制の度合いを終結機能の指標とした。
その結果、Sの方だけでも強い終結機能を示すことがわかった。以上の
ように、この大腸菌の系は葉緑体の転写終結部位を調べるためにも有用
であることが確かめられた。