

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 スギ花粉症対策を目的とした木本植物遺伝子組換え技術の開発と花成関連遺伝子の研究

氏名 伊ヶ崎 知弘

論文内容の要旨

木本植物を対象とした遺伝子組換え実験は、特定の少数種でのみ可能で、花粉症を引き起こすスギ (*Cryptomeria japonica*) などでは、その前段階のカルス経由の個体再生技術すら確立されていなかった。また、花粉症対策として、花成関連遺伝子の利用が考えられるが、木本植物の花成制御機構はほとんど不明であった。したがって、スギ花粉症対策として花成の制御を目的とした遺伝子組換え体を作成する上で、スギの安定な個体再生技術の開発や効率的な遺伝子導入法の確立、さらには、遺伝子操作の標的遺伝子候補としての木本植物の花成関連遺伝子の単離と機能解析が必要である。そこで、本研究では、スギの安定なカルス経由の個体再生技術の確立、木本植物の遺伝子組換え技術に関する基礎的研究及び木本植物の花成関連遺伝子の解析を行った。

1. 遺伝子組換え木本植物の作出のための安定かつ効率的な植物体再生技術の開発

木本植物においては、遺伝子組換え実験を行う以前に、その作出に必要な安定かつ効率的な植物体再生技術が確立されていない種が多くある。その1種で、日本固有種であるスギについて、カルス経由の再現性のある植物体再生技術を世界で初めて確立した。また、アスパラガス (*Asparagus officinalis*) のペプチド性生長因子ファイトスルフォカイン (PSK) が植物体再生効率を顕著に上昇させることを発見するとともに、PSK 遺伝子は裸子植物にも保存されていることを示唆する結果を得た。

1) 不定胚を経由したスギの安定な植物体再生技術

スギ未熟種子胚由来の培養細胞から不定胚を作成し、植物体を再生した。効率よく不定胚誘導細胞を得るために、N⁶-ベンジルアデニンや2,4-ジクロロフェノキシ酢酸を含む様々な培地条件を検討した。その結果、6月終わりに収穫した未熟種子胚から、もっとも高い頻度で不定胚誘導細胞が誘導されることが分かった。液体培養された不定胚誘導細胞には、小さく集合した細胞と、伸長中や伸長した細胞が存在した。最適

な不定胚誘導条件を決めるため、10系統の不定胚誘導細胞を用いた。Smith (1996) の培地にポリエチレングリコールやアブシジン酸、ゲランガムを加えた固形培地条件下で効率よく不定胚が誘導された。誘導された不定胚は、同調的に発芽し、子葉、胚軸と根を出した。発芽培地にジベレリン A₃ (GA₃) を添加すると、胚軸の伸長が顕著で、幼植物体の生存率も向上した。不定胚の誘導効率や発芽効率は試験した細胞の系統ごとに異なったが、多くの不定胚由来の幼植物は正常に生育した。この方法では、未熟種子胚から新たな植物体を得られるのに4～5ヶ月を要した。

2) PSKによるスギの不定胚誘導効率の上昇

アスパラガス由来のペプチド性植物生長因子である PSK は、ポリエチレングリコール存在下で、スギの不定胚形成を顕著に促進した。得られた不定胚は、子葉、胚軸及び根が同調的に展開する発芽様式を示し、ほとんどの幼植物体が正常に生育した。スギの形成層由来の発現遺伝子のデータベースに、PSK 前駆体タンパク質と予見できる部分配列が存在したため、全長の塩基配列を決定したところ、既知の PSK 前駆体タンパク質と共通の構造や特徴が確認できた。これらの結果は、PSK とそのシグナル伝達経路が、裸子植物であるスギにも保存されていることを示唆する。

2. *Agrobacterium tumefaciens* を用いた遺伝子組換え木本植物の作出技術の開発

様々な植物種において *A. tumefaciens* を用いた遺伝子組換え体作出法が主流となってきており、マメ科木本植物のニセアカシア (*Robinia pseudoacacia*) 及びヤナギ科木本植物のギンドロ (*Populus alba*) を用いて、*A. tumefaciens* を用いた遺伝子組換え木本植物作成技術の確立に取り組んだ。ニセアカシアの *A. tumefaciens* を介した遺伝子組換え体の作出は世界で初めてであり、除草剤ビアラホスで組換え体を直接選抜する方法は木本植物では初めての試みであった。

1) *A. tumefaciens* を用いたニセアカシアの遺伝子組換え体作出技術

ニセアカシアの茎及び葉の切片を、 β -グルクロニダーゼレポーター遺伝子 (*GUS*) とハイグロマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子 (*hpt*) を持つバイナリーベクターを保持した *A. tumefaciens*、GV3101 (pMP90) と共存培養し、切片に形成されたカルスから遺伝子組換え個体を再生させることに成功した。再生個体の形質転換は、ハイグロマイシン存在下でのカルス形成、サザンブロット解析による導入 DNA の検出、導入した *GUS* 遺伝子の発現の組織化学的染色や抽出液中の活性の測定による検出から確認され、遺伝子組換え植物個体の生長や形態は非形質転換体と同様であった。この遺伝子導入方法では、茎切片を用いた場合、遺伝子組換え体を得られる効率は約 24% と高かったが、遺伝子組換え植物体が再生するまでに約 2ヶ月を要した。

2) ギンドロの遺伝子組換え及び除草剤ビアラホスによる遺伝子組換え体の直接選抜法

除草剤ビアラホス耐性遺伝子 (*bar*) と *GUS* 遺伝子を持つバイナリーベクターを保持した *A. tumefaciens*、GV3101 (pMP90) と共存培養したギンドロの茎切片に由来するカルスから、遺伝子組換え体の再生に成功した。この実験では、ノパリン合成酵素遺伝子

のプロモーターとシロイヌナズナのリブローズ-1,5-二リン酸脱炭酸酵素小サブユニット遺伝子である *RbcS-2B* のポリ A 付加領域により制御された *bar* 遺伝子が有効であった。ビアラホス存在下でのカルスの生長、再生植物個体での導入した GUS 遺伝子の発現の組織化学的染色による検出、ゲノム DNA からの PCR による導入遺伝子の解析により形質転換を確認した。この遺伝子組換え実験系では、ビアラホス耐性選抜の条件を厳しく設定することで、形質転換をエスケープした個体やキメラ個体の得られる頻度が抑えられた。組換え個体の生長や形態は、非形質転換植物と変わらなかった。

3. ポプラの *FLOWERING LOCUS T (FT)/TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* ファミリー遺伝子の単離及びその機能の解析

モデル植物を使った研究から、*FT* や *TFL1* ファミリーに属する遺伝子が栄養生長と生殖生長を区別するスイッチとして重要であることが示されている。セイヨウハコヤナギ (*P. nigra* var. *italica* Koehne) から、9 種類の *FT/TFL1* ファミリー遺伝子を単離した。これらの遺伝子の配列を解析した結果、コード領域の配列はすべてのメンバーにおいて高度に類似しているだけでなく、シロイヌナズナ、トマト、ブドウの遺伝子のコード領域とも類似していた。さらに、これら *FT/TFL1* ファミリー遺伝子は、共通のエクソン・イントロン構造を持っていた。系統学的な解析から、この 9 つの遺伝子の 2 つは *TFL1* 遺伝子群に、5 つの遺伝子は *FT* 遺伝子群に、そして残る 2 つの遺伝子のそれぞれは *MOTHER OF FT AND TFL1* と *BROTHER OF FT AND TFL1* の遺伝子群に属していた。*TFL1* 遺伝子群の 1 つ *PnTFL1* は、セイヨウハコヤナギの栄養生長分裂組織で発現しており、異所的に *PnTFL1* を過剰発現したシロイヌナズナは、花成遅延の表現型を示した。これらのことから *PnTFL1* は、草本植物で知られているのと同様に、栄養生長のための分裂組織の機能を維持する役割をもつことが示唆された。また *PnTFL1* は、栄養生長分裂組織での発現に加え、生殖成長期においてもめったに花をつけない徒長枝での発現が花成期に上昇するという興味深い結果を得た。一方、*FT* 遺伝子群に属する *PnFT1* と *PnFT2* の 2 つの遺伝子は、生殖成長期個体の花成誘導時期に特異的な発現パターンを示し開花の始動に関与することを予測させた。実際、*PnFT1* 及び *PnFT2* のどちらかを異所的に過剰発現したシロイヌナズナは早期開花の表現型を示したことからこのことは裏付けられた。

以上、本研究では、種々の条件検討の末に日本固有種であるスギの再現性の高いカルス経由の植物体再生技術を初めて確立し、またニセアカシアとギンドロを使い、アグロバクテリア感染を用いた遺伝子導入木本植物の効率よい作成方法の開発に成功した。更に、モデル植物で花成制御に重要な役割を担うことが知られている *FT/TFL1* ファミリー遺伝子をセイヨウハコヤナギにおいて網羅的に解析し、木本植物における花成制御メカニズムの一旦を明らかにした。