

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

伊ヶ崎 知弘

2015 年 10 月

目次

| | | |
|--|-------|----|
| 1 章 緒言 | ----- | 1 |
| 2 章 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スギ再生技術の開発 | | |
| 1 節 序論 | ----- | 4 |
| 2 節 不定胚を経由したスギの安定な植物体再生技術の確立 | ----- | 4 |
| 3 節 ファイトスルフォカインによるスギの不定胚誘導の高効率化 | ----- | 10 |
| 4 節 総合討論 | ----- | 16 |
| 3 章 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> を用いた遺伝子組換え木本植物の作出技術の開発 | | |
| 1 節 序論 | ----- | 18 |
| 2 節 <i>A. tumefaciens</i> を用いたニセアカシアの遺伝子組換え技術の開発 | ---- | 18 |
| 3 節 ギンドロの遺伝子組換え及び除草剤ピアラホスによる 遺伝子組換え体の直接選抜法の確立 | ----- | 25 |
| 4 節 総合討論 | ----- | 30 |
| 4 章 ポプラ <i>FLOWERING LOCUS T (FT) / TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)</i> ファミリー遺伝子の 単離及びその機能解析 | | |
| 1 節 序論 | ----- | 32 |
| 2 節 材料と方法 | ----- | 33 |
| 3 節 結果 | ----- | 36 |
| 4 節 考察 | ----- | 45 |
| 5 章 総合考察 | ----- | 48 |
| 引用文献 | ----- | 50 |

略語表

| | |
|-----------------|--|
| ABA | Absciscic acid |
| ATC | ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS HOMOLOG |
| BA | N ⁶ -Benzyladenine |
| BFT | BROTHER OF FT AND TFL1 |
| 2, 4-D | 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid |
| EST | Expressed sequence tag |
| FT | FLOWERING LOCUS T |
| GA | Gibberellic acid |
| GA ₃ | Gibberellin A ₃ |
| GUS | β -Glucuronidase |
| HPT | Hygromycin phosphotransferase |
| MFT | MOTHER OF FT AND TFL1 |
| 4-MU | 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide |
| NPTII | Neomycin phosphotransferase |
| ORF | Open reading frame |
| P35S | 35S promoter of cauliflower mosaic virus |
| PEG | Polyethylene glycol 4000 |
| PSK | Phytosulfokine |
| TFL1 | TERMINAL FLOWER 1 |
| TSF | TWIN SISTER OF FT |
| X-Gluc | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide |

1 章 緒言

日本ではスギ (*Cryptomeria japonica*) 花粉症患者が急増し、大きな社会問題になっている。スギ花粉症はスギの花粉によって生じるアレルギー症状である。1963 年に栃木県日光地方の住民が初めてスギ花粉症と診断され (堀口・齋藤 1964)、その後、全国に広がり、現在では国民の 15% 以上が発症している (奥田 2002)。患者急増の原因は、スギ花粉が急激に大量に飛散するようになったことである。第二次世界大戦後、建材及び治水・治山目的の大量植林が全国規模で行われた。スギは加工が比較的容易であること、生育する土地の制限が少ないこと等、建材利用等に適しており、古くから人工植栽が行われてきた日本の主要林業樹種であったため、優先的に植林された。スギ林の面積は、現在、日本の森林の 18%、国土の 12% を占めると言われている。スギが花を咲かせ花粉を飛ばすようになるまでには、通常 20~30 年程度の期間がかかる (橋詰 1980, Nagao et al. 1989)。第二次世界大戦後に人工造林したスギの多くは、1960 年代頃から着花年齢に達し、それ以降毎年飛散させる花粉の生産量を増加させている。また、日本国内に外国材が多く流通するようになり、スギ材の需要が激減したため、スギの伐採量が低迷し、着花量の多いスギ成木個体数が増大していることも花粉量増加の一因と言える (家原 2000)。

スギ花粉症の対策として林業分野が行うことができるのは、スギ花粉の発生源を抑制することである。具体的には、林業的手法、化学的手法、育種的手法及び遺伝子工学的手法が考えられる。林業的手法は、都市部へ飛散するスギ花粉の発生源となる森林を特定し、間伐や枝打ちを応用した樹幹量調節を施すことで飛散する花粉量を調節しようとするものである。スギ個体の遺伝的特性や林分の立地環境条件等は多様であるため、モデルによる予測と現地実験を踏まえた検証を十分に行う必要がある。最近の調査結果では、間伐には積極的な花粉抑制効果が無いので (清野ら 2002)、都市部へ飛散するスギ花粉の発生源となる森林は伐採し、その後に植林する樹種を花粉発生量が少ないスギ品種や広葉樹に転換することが現実的である。

化学的手法は、薬剤処理により花粉発生量を劇的に減少させる方法である。スギの着花には、植物ホルモンのジベレリン酸 (Gibberellic acid; GA) が有効である。若齢木に対しても、GA 処理により着花を誘導することができる (Nagao et al. 1989)。これに対し、GA の合成阻害剤であるユニコナゾール-P やトリネキサパックエチル等や、GA と拮抗する植物ホルモンのアブシジン酸 (Abscissic acid; ABA) 等で処理することで着花が抑制できる (篠原ら 2003)。森林での花粉発生量を劇的に減少させるにはこれらの薬剤をヘリコプター等を使用して大量に散布する必要がある。しかしながら、実行するには森林の動植物や周辺の環境に対する影響等を十分に考慮する必要がある。

育種的手法は、前述の GA 処理による着花の促進を利用したスギの交配や、得られた後代実生の花粉生産の有無等を判定する方法を利用したものである。スギの雄花生産量は、品種・系統間で差があり、林野庁を中心に各県が選抜したスギ精英樹の中にもアレルギー生産量が少ない系統が存在する (後藤ら 1999)。林野庁の調査事業「雄花着花性に関する調査」(平成 8~13 年度) において、雄花が着かない、もしくは雄花量が非常に少ない精英樹として 267 品種が選抜された。そこからさらに選抜された 57 品種が 2001 年より希望する県に配布されている。また、精英樹では

ないが、花粉を飛散させない無花粉スギが単離されている（平ら 1993）。現在、無花粉スギと精英樹とを交配し、得られた実生の生育や花粉生産の有無の判定が推進されている。富山県では20年がかりでやっと一つの系統が植栽され始めたが、まだ県内の植え替えだけで手一杯であり、県外へは出荷できていない。他県でも同様の作業が実施されてきているが、現実的には木材として優良な系等が得られるようになるまでには、まだまだ、多くの年月を必要とすると考えられる。

遺伝子工学的手法は、元になる植物個体の性質を保持させたまま、単一の形質のみを選択的に改変するという特長を持つ。スギ等の木本植物では、生殖活動を開始するまでの時間が長く、交配により新たな優良新品種を生み出すことが困難である。このような植物に対しては、この手法は最も有効である（伊ヶ崎・篠原 2001）。しかしながら、本研究に着手した時点において、遺伝子組換えが可能な植物種は限定的であり、効率の高い組換え実験系が存在する木本植物種は僅かであった。特にスギにおいては培養細胞等から植物体を再生する手法が開発されておらず、遺伝子組換え体を作出できる基盤はこれまでなかった。さらに、木本植物の花芽形成のメカニズムもほとんど研究がなされておらず、花粉症対策としてスギ組換え体を作出するのには、着手すべき課題が山積されていた。

このような背景のもと本論文では、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木本植物の花成関連遺伝子について研究を行った。まず、2章では、効率的なスギ再生技術の開発について記載する。これまでに開発されてきたマツ属 (*Pinus* spp) やトウヒ属 (*Picea* spp) 等の他の針葉樹での実験例を参考に、スギの培養細胞の誘導条件やそこから不定胚を経由した植物体再生条件について詳細に検討した（2章、2節）。この段階において再現性の高い植物体再生条件は得られたが（Igasaki et al. 2003b）、遺伝子の機能評価や実用に耐えるスギの組換え実験系の構築を考えると、十分な再分化効率ではなかった。植物体の再生能力向上に関する知見を探したところ、ファイトスルフォカイン（Phytosulfokine; PSK）というペプチド性の植物細胞増殖因子がニンジン (*Daucus carota*) の不定胚形成を促進するという報告がなされていた（Kobayashi et al. 1999a）。そこで、PSK によりスギの不定胚誘導効率を上昇させられるのかということに着目して研究を進めた（2章、3節）。同時にスギにも PSK が存在するか否かについても検討した。

3章では、*Agrobacterium tumefaciens* を用いた遺伝子組換え木本植物の作出技術の開発について記載する。実験材料は、既に個体再生技術の確立が報告されていた木本植物ニセアカシア (*Robinia pseudoacacia*)（Han et al. 1993a）とモデル実験木本植物として着目される *Populus* 属の一種ギンドロ (*P. alba*) の2種を用いた。まず、形態異常を生じないニセアカシア遺伝子組換え手法として、*A. tumefaciens* を用いた技術を開発することを検討した（3章、2節）。また、屋外で普及的に使用できる除草剤ビアラホスを直接的な選抜薬剤として使用する組換え木本植物の作出手法を開発するため、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を開発を進めた（3章、3節）。

4章では、花成制御によるスギ花粉症対策を念頭においたポプラ *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解析を行った。ここでは、木本植物の花成誘導遺伝子や抑制遺伝子として、すでに草本植物等で単離解析されている *FT/TFL1*

ファミリー遺伝子に着目し、*Populus* 属の一種セイヨウハコヤナギ (*P. nigra*) を実験材料として、遺伝子の単離及び機能の解析を行った。

2 章 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スギ再生技術の開発

1 節 序論

森林総合研究所では、スギの花粉アレルゲン遺伝子 (Futamura et al. 2002) や雄花の形態形成を支配する遺伝子 (Fukui et al. 2001) などを単離している。また、パーティクルガン法によるスギへの遺伝子導入技術も開発されている (Mohri et al. 2000)。これらの研究成果と組み合わせることにより花粉症対策用スギ遺伝子組換え体を実現させるためには培養系におけるスギ個体再生法の確立が急務である。すなわち、最初に着手すべき研究は、カルス等の培養細胞から安定に植物個体を再生させる技術の開発であった。スギは挿し木による増殖や、多芽体の作出技術を利用した試験管内挿し木による大量増殖が可能である。しかし、培養細胞等を経由した個体再生系は存在せず、さらに細胞培養法等の利用可能な基礎データの蓄積もなかった。植物の個体再生系は2つに大別される。一つは、芽や根など植物の器官を誘導し、そこから不足する器官を再生し植物体にする系で、もう一つは、種子中の胚に相当する器官 (不定胚) をつくりだし、それを発芽させ、植物体にする系である。スギと同じ裸子植物であるマツ属やトウヒ属の一部の針葉樹では、既に不定胚誘導の実験系が確立されていたので、スギについても、それらを参考に培地の成分や植物ホルモンの種類・濃度などの諸条件を詳細に検討することで不定胚誘導が可能になるのではないかと考えた。

本章では、簡単で再現性のある不定胚経由のスギ個体再生法の条件を確立するために、培養細胞を誘導するための材料の採取時期、誘導する培地組成や植物ホルモン濃度、不定胚を誘導する培地条件等を検討した。さらに、合成の PSK をスギの培養細胞の増殖培地や不定胚誘導培地に加えることで、スギの不定胚形成の効率に影響するかについて検討した。また、スギの PSK 前駆体遺伝子について、存在やその発現について調査した。

2 節 不定胚を経由したスギの安定な植物体再生技術の確立

遺伝子組換え技術は、目的とする形質を他の形質を変えることなく選択的に変えることを可能にする。この技術により、後代を得るのに必要な長大な育種年限を劇的に短縮することができる。針葉樹の遺伝子組換えは、パーティクルガン法 (Ellis et al. 1993, Charest et al. 1996, Klimaszewski et al. 1997, Walter et al. 1998) と *Agrobacterium* 法 (Shin et al. 1994, Tzfira et al. 1996, Levée et al. 1997, Wenck et al. 1999) の両方で成功している。しかしながら、木本植物の組換え体再生に様々な困難が存在しており、多くの場合、適切な個体再生法が確立されていない。

スギは日本において経済上もっとも重要な針葉樹である。一方で、日本ではスギ花粉症がもっとも深刻なアレルギー病であることも事実である。遺伝子組換え技術を利用することでアレルゲン生産をしないスギを作出することが問題解決のひとつと考えられる。スギを含む日本産針葉樹

の胚に物理的に DNA を導入する方法は確立されている (Mohri et al. 2000) ことから、培養細胞からの安定な個体再生法を確立することができれば、スギ組換え体の作出を効率的に行うことができると考えられた。しかし、スギに関しては、不定胚形成の初期段階の細胞の誘導や (Ogita et al. 1999)、一度のみの不定胚形成の成功で再現性の無いもしくは再現頻度が極端に低い例しか存在していない (Maruyama et al. 2000)。範囲を日本産の針葉樹に広げて活用できる個体再生法はきわめて限定的であった (Kim et al. 1999, Maruyama et al. 2002)。

本節では、新たに簡単で再現性のある不定胚経由のスギ個体再生法の条件を確立するために、培養細胞を誘導するための材料の採取時期、誘導する培地組成や植物ホルモン濃度、さらに、不定胚を誘導する培地条件等を検討した。

(1) 実験方法

・植物組織

森林総合研究所内に植栽されている 15 系統のスギを使用した。花成は、前年の 7 月下旬と 8 月中旬にジベレリン処理することで誘導した (Nagao et al. 1989)。天然受粉した未熟種子は、翌年の 6 月中旬から 8 月初旬まで、1 週間間隔で採取した。得られた未熟種子は、次亜塩素酸及びエタノールで滅菌した。種皮を取り除いた後、未熟種子胚を含むメガガメトファイトや未熟種子胚を不定胚形成細胞の誘導に使用した。

・不定胚形成細胞の誘導及び維持

胚の外植体は SMSG 培地で培養した。SMSG 培地は、MSG 培地 (Becwar et al. 1988) の塩類及びビタミンに 0.01% (w/v) *myo*-イノシトール、0.15% (w/v) グルタミン、 $3.2 \mu\text{M}$ 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4- dichlorophenoxyacetic acid; 2,4-D), $1.8 \mu\text{M}$ N⁶-ベンジルアデニン (N⁶-benzyladenine; BA) と 3% (w/v) ショ糖を含む培地を 0.4% (w/v) ゲランガムで固めた培地である。培養物は、暗黒下 25℃で培養した。最初の 4 週間で誘導された不定胚形成細胞は、3 週間ごとに SMSG 培地に継代した。

・不定胚形成細胞の増殖

不定胚形成細胞は、SMSG 培地からゲランガムを除いた液体の LMSG 培地 (50ml フラスコに 10ml) で、暗黒下、25℃で 110 回転/分で振盪培養し、増殖させた。増殖した細胞は、2 週間ごとに新しい培地に移植した。

・不定胚誘導

増殖後の細胞は 100 μm 径のセルストレイナー (Falcon 2360; Becton Dickinson Labware, NJ) で回収し、EMM 培地 (Smith 1996) の無機塩類、ビタミン、アミノ酸に、5% (w/v) のポリエチレン・グリコール 4,000 (Polyethylene glycol 4000; PEG; 和光純薬工業, 大阪, 日本), 3% (w/v) の麦芽糖、および 100 μM MABA を添加した培地 (LEMM 培地) で 2 回洗浄した。細胞数が約 1×10^5 から 2×10^5 となるように 1 ml の LEMM 培地に懸濁し、LEMM 培地に 0.2% (w/v) の活性炭と 0.3% (w/v)

のゲランガムを加えた培地（SEMM 培地）を 50 ml 含むシャーレ上のろ紙（Advantec no. 2, 直径 70 mm; アドバンテック東洋, 東京, 日本）の上に展開した。シャーレはパラフィルム M (American National Can, IL) で封をし, 暗黒下で 24°C/16°C (昼/夜=12 時間/12 時間) で培養した。

・発芽

不定胚は SEMM 培地から回収し, GGA 発芽培地 (3/5 濃度の EMM 無機塩類とビタミンに 400 mg/l グルタミン, 260 mg/l アルギニン, 20 mg/l プロリン, 0.2% (w/v) 活性炭と 10 μ M ジベレリン A₃ (Gibberellin A₃; GA₃) を 0.4% (w/v) ゲランガムで固めた培地) に移植し, 暗黒化で 24°C/16°C (昼/夜=12 時間/12 時間) で培養した。発芽後, GA₃ を除いた培地 (G 培地) に移植し, 植物体再生のため, 25°C 白色蛍光灯下 (30 μ mol/m²/s, 16 時間日長), 25°C で培養した。

(2) 結果と考察

不定胚形成細胞を誘導する至適条件を得るために, 6 月中旬から 8 月上旬までの 1 週間ごとの異なる発達段階にある自然受粉した種子を集めた (Fig. 1)。発達段階ごとに 800 以上の未熟種子胚を用いて誘導実験を行った。スギから誘導された組織 (Fig. 2A) は, テーダマツ (*Pinus taeda*) で報告されている典型的な不定胚形成細胞 (Gupta and Durzan 1987) と外見上類似していた。6 月下旬から 7 月上旬までの未熟種子胚は, 他時期のサンプルより高い頻度 (>4%) で不定胚形成細胞が誘導された (Fig. 1)。この時期の種子胚は, 子葉形成前の初期胚に相当する (Yokoyama 1975)。この時期の平均的なスギ未熟種子胚の長さは, 0.5~1.0mm 程度であった。しかし, 誘導頻度は標本抽出の年や, 母樹の系統により若干異なった (データ省略)。

不定胚形成細胞の誘導に至適な培地についても検討した。3 種類の基礎的な培地無機塩類, MSG (Becwar et al. 1988), GP (Gupta and Pullman 1991, Li and Huang 1996) 及び EMM (Smith 1996) に様々な濃度の 2,4-D 及び BA を加えた培地を用いた。MSG 無機塩類をもとに作出した SMSG 培地 が最も高い不定胚形成細胞の誘導頻度を示した。

増殖のため, 液体培地 (LMSG) に不定胚形成細胞を移し, 暗黒条件下で回転式振盪培養機により培養した。LMSG 培地中で 2 週間培養することにより, 細胞重量は 8 倍から 10 倍に増加した。光学顕微鏡下で培養した細胞を調査すると, 小さな緩く密集した細胞と伸長中あるいは伸長した細長い細胞 (Fig. 2B) が観察されるが, テーダマツで報告された大きく, 濃い胚形成領域と長い胚柄細胞 (Gupta and Durzan 1987) といった典型的な不定胚形成細胞は観察されなかった。このような培養細胞は, 成熟した不定胚を形成し (Fig. 2L), 構成をみると, 球状の細胞と伸長中あるいは伸長後の細胞の割合は, おおよそ, 2:1 であった (Fig. 2B)。さらに, 典型的な細胞塊 (Gupta and Durzan 1987, Maruyama et al. 2000) を誘導できる系統の細胞では, 不定胚形成がみられなかった。この結果は緩く密集した細胞と伸長した細長い細胞から不定胚が形成できるドイツトウヒ (*Picea abies*) での観察結果と部分的に一致するものであった (Bellarosa et al. 1992)。このようにして誘導したスギ不定胚形成細胞は, SMSG 培地や LMSG 培地で培養することで, 2 年間以上不定胚分化能力を維持した。

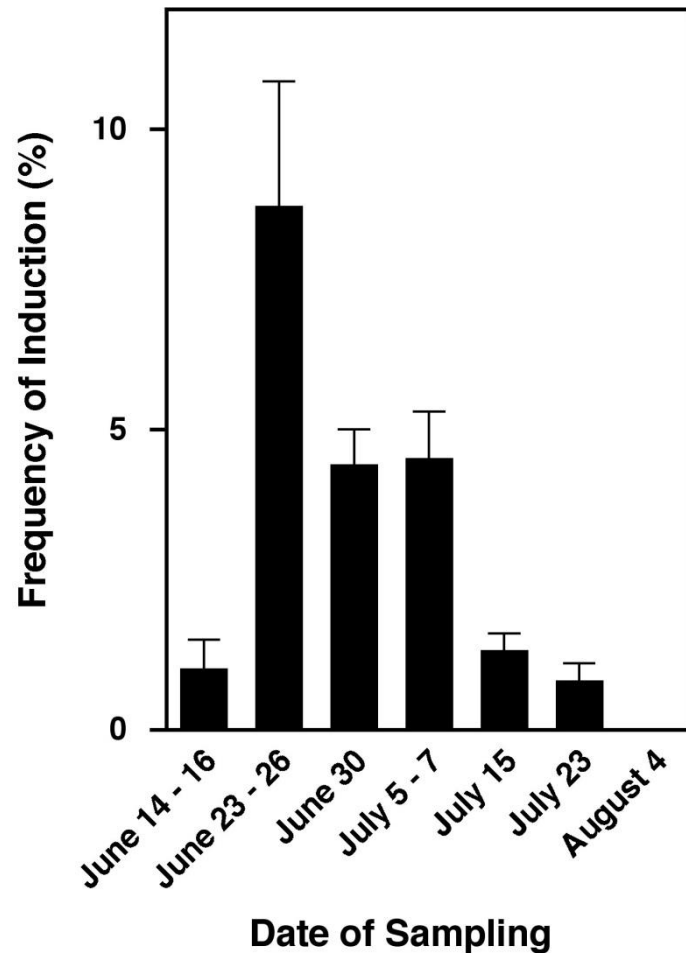


Fig. 1. Frequency of induction of embryogenic tissues from immature zygotic embryos of *C. japonica* that were harvested from the middle of June to the beginning of August. Average frequencies were determined from an analysis of more than 800 immature zygotic embryos from four mother trees at each stage for four years (1998-2001) . Values are means \pm S.E. of results.

それぞれ異なる未熟種子胚から誘導した 10 系統の培養細胞 (Table 1) を使用し、不定胚形成に至適な培地、3 種類の基礎的な培地、MSG、GP 及び EMM を用いて検討した。EMM 培地から作成した SEMM 培地は最も高い不定胚誘導効率を示した。SEMM 培地には、アミノ酸、活性炭と PEG が不可欠であった。5% (w/v) の PEG の添加は不定胚形成を加速したが、5% (w/v) より濃度を高くしても顕著な効果は観察されなかった。この結果は、PEG の濃度を高くするほど不定胚の形成が加速されるサワラの報告 (Maruyama et al. 2002) とは若干異なっていた。

シャーレ上の培地に展開する細胞の数、温度条件やシャーレのシール剤等の培養条件についても調査した。形成された不定胚の数は、1 シャーレあたり約 10^5 個の細胞を展開した場合で、1 シャーレあたり約 10^6 個以上の細胞を展開すると減少した。26°C/18°C (昼/夜=12 時間/12 時間) と 24°C/16°C (昼/夜=12 時間/12 時間) や 22°C では同程度に不定胚形成が観察されたが、26°C では不定胚が観察されなかった。対照的に、26°C/18°C では、非不定胚形成細胞の増殖が観察されたが、24°C/16°C や 22°C では顕著な増殖は観察されなかった。シャーレのシール剤としては、通気性の

低いパラフィルム M が、より高い通気性を持つ外科用テープ（21N；ニチバン，東京，日本）よりはるかに良好だった。

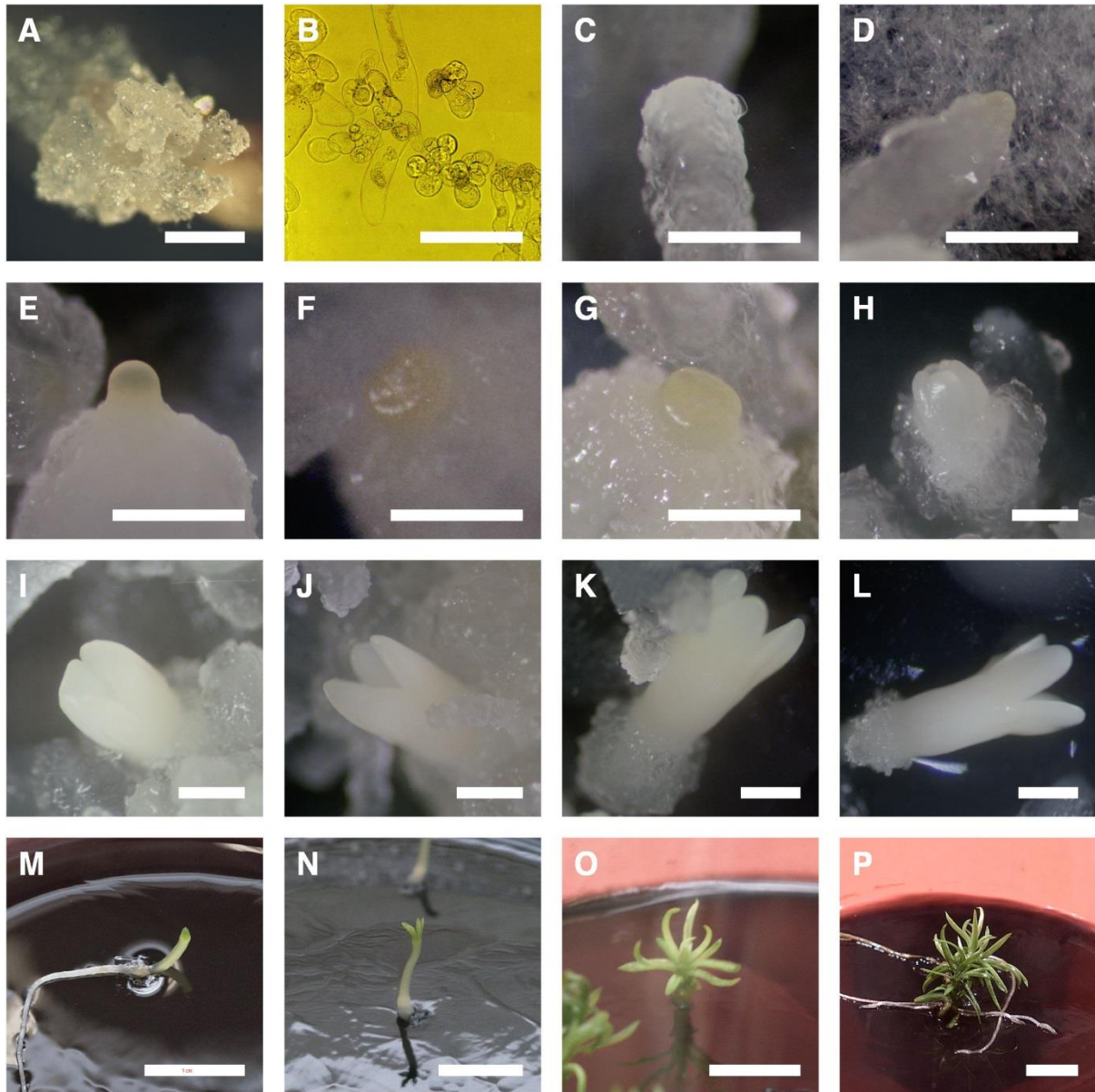


Fig. 2. Somatic embryogenesis of *C. japonica*. (A) Induced embryogenic tissue. (B) Cells proliferating in liquid medium. (C-L) Somatic embryos at various stages of development. (M, N) Germination of somatic embryos. (O, P) Growth of seedlings *in vitro*. Bars in (A) and (C) through (P) represent 1 mm, and those in (B) represent 250 μm .

上述のように、最適条件下では、早期から成熟した段階までの不定胚形成が観察され（Fig. 2C-L），約 4 週間で成熟胚（Fig. 2L）が得られた。不定胚形成能力は培養細胞の系統間で異なり（Table 1），すべてのシャーレで不定胚形成が観察されるわけではなかった。しかしながら，L-4

やL-1の細胞系統のように1シャーレあたりそれぞれ約35個および約27個の不定胚を形成する再生能力の高い系統もみられた (Table 1)。得られた多くの不定胚は、種子胚の発芽と同様に、子葉、胚軸及び根を同時に伸長させた (Fig. 2M)。また、発芽培地での GA_3 の存在は不定胚の発芽の頻度に影響しなかったが、 GA_3 は胚軸の伸張と実生の生存に顕著な効果を示した (Fig. 2M, N)。不定胚の発芽率は培養細胞の系統間で異なり、最も高いものは57% (L-10系統) に迫り、最も低いものでは約12% (L-1系統) であった (Table 1)。発芽した実生の大部分は正常に生長した (Fig. 2 O, P)。

Table 1. Frequency of formation of embryos and of germination in ten cell lines.

| Cell line | Total number of petri dishes | Number of petri dishes with embryos (A) | Total number of embryos (B) | Number of embryos per petri dish (B/A) ^a | Frequency of germination ^b (%) |
|-----------|------------------------------|---|-----------------------------|---|---|
| L-1 | 83 | 49 | 1,324 | 27 ± 6 | 12 (9/ 78) |
| L-2 | 27 | 7 | 19 | 3 ± 1 | 37 (7/ 19) |
| L-3 | 33 | 5 | 12 | 2 ± 1 | 50 (6/ 12) |
| L-4 | 30 | 11 | 384 | 35 ± 11 | 26 (51/ 195) |
| L-5 | 38 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| L-6 | 205 | 20 | 195 | 10 ± 4 | 45 (44/ 97) |
| L-7 | 32 | 3 | 7 | 2 ± 1 | 43 (3/ 7) |
| L-8 | 42 | 4 | 7 | 2 ± 1 | 29 (2/ 7) |
| L-9 | 42 | 6 | 16 | 3 ± 1 | 36 (5/ 14) |
| L-10 | 40 | 10 | 18 | 2 ± 0 | 57 (8/ 14) |

^a Values are means ± S.E. of results.

^b Values in parentheses indicate number of embryos germinated/ total number of embryos tested.
See text for full details.

以上のように、本節ではスギの不定胚形成と個体再生のための簡単で信頼できる手順を確立した。この実験系の確立には7年以上を要したが、これは再現可能なスギの不定胚経由の個体再生法の最初の報告であった。以前の Maruyama et al. (2000) の報告では、1度だけの不定胚形成であったが、その後は、スギの不定胚と個体再生は誘導できなかった。しかし、本節の研究では、その実験系を発展させることで、新たに開発した手順は様々な遺伝子型のスギに適用でき、かつ継代によって維持された培養細胞からの不定胚形成は季節に関係なく良好に機能するものであった。さらに、形成した不定胚から、再び不定胚形成細胞を誘導し、不定胚の形成を繰り返すことができた。スギの遺伝子組換えには、このような再現性のある不定胚形成細胞からの個体再生技術が不可欠である。しかし、スギ遺伝子組換え体作出を考えた場合、個体再生効率を高めるためのさらなる技術開発が必要であると考えられた。

日本産の広葉樹については、組換え体作出の信頼できる手順が著者らにより確立されてきた (Mohri et al. 1996, 1997, 1999, Igasaki et al. 2000)。日本産の針葉樹に対しては、本節の研究に着手した時点では、遺伝子組換えの研究報告はないものの、著者らは、スギを含む 3 種の日本の針葉樹の種子胚にパーティクルガンにより DNA を導入することには成功している (Mohri et al. 2000)。また、スギのアレルゲンの遺伝子についても、主要なものは既に単離されており (Sone et al. 1994, Namba et al. 1994, Komiyama et al. 1994, Futamura et al. 2002)、花芽の形成に関与する可能性のある遺伝子として、スギの MADS-box 遺伝子も、一部単離されている (Fukui et al. 2001)。したがって、本節の研究結果は、このスギの個体再生技術を利用して、アレルゲンを含まない花粉粒を持つ遺伝子組換えスギや正常な花が咲かない遺伝子組換えスギの作出に利用できる基盤技術として期待されるものである。

3 節 ファイトスルフォカインによるスギの不定胚誘導の高効率化

スギは日本における最も商業的に重要な針葉樹である。一方で、スギ花粉症は日本で最も重大なアレルギー性疾患である。アレルゲンを含まない花粉粒を生産する組換えスギの作出は興味深い研究課題である。著者らは、スギを含む 3 種の日本産の針葉樹の成熟種子胚に DNA を導入するための簡単で信頼できる手順を確立した (Mohri et al. 2000)、また、上述のように再現性のあるスギの不定胚経由の再生のシステムを本研究において確立した (Igasaki et al. 2003b)。しかしながら、実際に組換えスギに応用するためには、不定胚経由の再生システムの効率を高める必要がある。

硫酸化小ペプチドであるファイトスルフォカイン (PSK) は細胞の脱分化、増殖、及び再分化の初期段階にかかわる細胞外リガンドとして機能することが知られている。PSK は分子内の 2 つのチロシン残基が硫酸化の修飾を受けており、アスパラガス (*Asparagus officinalis*)、イネ (*Oryza sativa*)、ニンジン、及びシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 等の単子葉植物と双子葉植物で発見されている (Matsubayashi and Sakagami 1996, Matsubayashi et al. 1996, 1997, Yang et al. 1999, 2000, Hanai et al. 2000, Yang et al. 2001)。また、PSK はニンジンの不定胚形成を促進することが報告されている (Kobayashi et al. 1999a)。そこで本節では、スギの不定胚形成への PSK の効果を調べた。その結果、合成 PSK をスギの培養細胞の増殖培地や不定胚誘導培地に加えることで、スギの不定胚形成の効率が劇的に増加することをみいだした。また、スギにも PSK 前駆体遺伝子が発現している証拠も明らかにした。

(1) 実験方法

・不定胚形成細胞の増殖

前述の 10 系統の不定胚形成細胞 (Igasaki et al. 2003b) をこの研究で使用した。すべての不定胚形成細胞は MSG (Becwar et al. 1988) の無機塩類及びビタミンを含む培地に 0.01% (w/v) の *myo*-イノシトール、0.15% (w/v) の L-グルタミン、3% (w/v) のショ糖、3.2 μ M 2,4-D, 1.8 μ M BA に 32nM PSK を加えた培地 (LMSGP 培地; 50 ml フラスコに 10 ml) 中で、暗黒下 25°C、回転

式振盪培養機を用いて 110rpm で培養した。不定胚形成細胞は 2 週間間隔で同じ組成の培地で継代培養した。

・不定胚誘導

増殖後の培養細胞は、100 μ m 径のセルストレイナーで回収し、LEMM 培地 (Igasaki et al. 2003b) で 2 回洗浄した。約 1×10^5 から 2×10^5 の細胞を 1 ml の LEMM 培地に懸濁し、LEMM 培地に 32nM の PSK, 0.2% (w/v) の活性炭と 0.3% (w/v) のゲランガムを加えた培地 (SEMMP 培地) を 50 ml 含むシャーレ上のろ紙の上に展開した。シャーレはパラフィルム M で封をし、暗黒下で 24°C/16°C (昼/夜=12 時間/12 時間) で 4~8 週間培養した。

・発芽

植物体再生のため、不定胚は SEMMP 培地から回収し、GGA 発芽培地に移植後、暗黒化で 24°C/16°C (昼/夜=12 時間/12 時間) で培養した。発芽後、GA₃を除いた培地 (G 培地) に移植し、白色蛍光灯下 (30 μ mol/m²/s, 16 時間日長), 25°C で培養した。

(2) 結果及び考察

不定胚形成能力を確認したスギ培養細胞 10 系統を用いて PSK の不定胚形成に対する効果を調べた (Table 2)。多くの場合、標準的な培養液で維持されたスギ不定胚形成細胞は、継代を繰り返すことによって、増殖能力の減少や、不定胚形成能力の喪失がみられ、しばしば茶色に変色するようになった。しかし、PSK を加えた培地では、スギ培養細胞の増殖能力や、不定胚形成能力は維持され、細胞も明るい黄色を維持した (Fig. 3A, B)。この観察結果から、PSK はスギ不定胚形成細胞の細胞分裂能力の維持及び幼若性の維持に重要な役割を果たしていることが示された。

PEG はカナダトウヒ (*Picea glauca*), サワラ (*Chamaecyparis pisifera*), 及びスギの不定胚形成に対し促進作用を持つ (Attree et al. 1995, Maruyama et al. 2002, Igasaki et al. 2003b)。そこで、スギの不定胚形成における PSK の効果を PEG の存在条件下と非存在条件下で調べた (Fig. 4A-D, Table 2)。PSK 及び PEG は、それぞれ単独で不定胚形成効率の増加作用を示した。さらに、PSK と PEG の両方が添加されている場合、劇的に不定胚形成が促進された (Fig. 4D)。その上、L-5 細胞株は PEG 存在下でも不定胚を形成しなかったが、PEG 非存在条件下、PSK 添加により不定胚を形成するようになった (Table 2)。スギの培養細胞は、PEG だけの添加で容易に不定胚形成を引き起こすカナダトウヒやサワラの培養細胞と比較して、少量の PSK しか生産できないのかもしれない。

約 4 週間の培養で早期から成熟期のスギ不定胚が得られる (Fig. 4E, F)。スギ不定胚形成に要する時間は、PSK の影響を受けなかった (データ省略)。本研究を進めるなかで、スギ不定胚形成に必要な PSK の至適濃度は 32nM であることを経験的に導いているが、1nM においても既に顕著な効果を示すことを確認している。しかし、32nM より高い濃度では 32nM ほどの効果を観察していない。この結果は Kobayashi et al. (1999a) のニンジンでの結果、つまり、100nM PSK (32nM でテストしてはいないが) がニンジンで不定胚形成に最も効果的であるというものと大きく違わな

い。誘導された不定胚の約 80%は子葉，胚軸，及び根が同調して発芽し，発芽した苗は正常に生育した（Fig. 4G, H）。このように，PSK は明確に不定胚の分化に効果を示した。すなわち，Matsubayashi et al. (2002) によって被子植物で特定された PSK の信号伝達経路と同様のものが裸子植物であるスギにも存在する可能性を示唆した。

Table 2. Effects of PSK on the frequency of formation of embryos, in the presence and absence of PEG, in ten lines of embryogenic cells.

| Cell line | Number of embryos per Petri dish | | | |
|-----------|----------------------------------|----------------|---------------|---------------|
| | +PEG | | -PEG | |
| | +PSK | -PSK | +PSK | -PSK |
| L-1 | 26.3 \pm 4.7 | 15.4 \pm 2.8 | 4.6 \pm 1.0 | 3.7 \pm 1.5 |
| L-2 | 2.3 \pm 0.3 | 1.1 \pm 0.5 | 0.3 \pm 0.2 | 0.1 \pm 0.1 |
| L-3 | 4.2 \pm 1.9 | 0.8 \pm 0.4 | 0.3 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.2 |
| L-4 | 32.3 \pm 6.4 | 16.3 \pm 5.1 | 0.7 \pm 0.3 | 0 |
| L-5 | 8.3 \pm 3.9 | 0 | 4.6 \pm 1.5 | 0 |
| L-6 | 11.3 \pm 2.0 | 1.5 \pm 0.5 | 1.2 \pm 0.3 | 0 |
| L-7 | 0.8 \pm 0.1 | 0.4 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | 0 |
| L-8 | 1.3 \pm 0.2 | 0.8 \pm 0.3 | 0.7 \pm 0.2 | 0 |
| L-9 | 6.7 \pm 1.4 | 1.9 \pm 0.4 | 2.9 \pm 0.6 | 0 |
| L-10 | 5.5 \pm 1.9 | 1.1 \pm 0.4 | 1.9 \pm 0.9 | 0.1 \pm 0.1 |

Values are means \pm SE of results (n = 3 to 6) .

See text for full details.

スギで PSK の前駆体遺伝子が存在し発現しているかを調査するため，PSK のアミノ酸配列 (YIYTQ) をクエリーにしてスギ発現遺伝子配列 (Expressed sequence tag; EST) のデータベースを検索した。EST, CC4124 (accession no. BP176104 及び AB105536) が，推定される Open reading frame (ORF) 中に PSK をコードしていることがわかった。特定した ORF は，306bp の長さで，102 のアミノ酸をコードしていた (Fig. 5A)。von Heijne (1986) の提起した規則を適用すると，推定 ORF には 28 アミノ酸からなる疎水性のアミノ末端シグナル配列がコードされていると予測された。YIYTQ の配列は 93 から 97 番目のアミノ酸に位置し，直前の Asp 残基も保存されていた (Fig. 5A, B)。これらの 3 つの特徴は，被子植物の PSK 前駆体の特長と一致していた (Yang et al. 1999, 2000)。したがって，PSK 前駆体の遺伝子はスギに存在し発現しており，外性の PSK が生理作用を引き起こすことから，その信号伝達経路もこの針葉樹にも存在するものと考えられた。

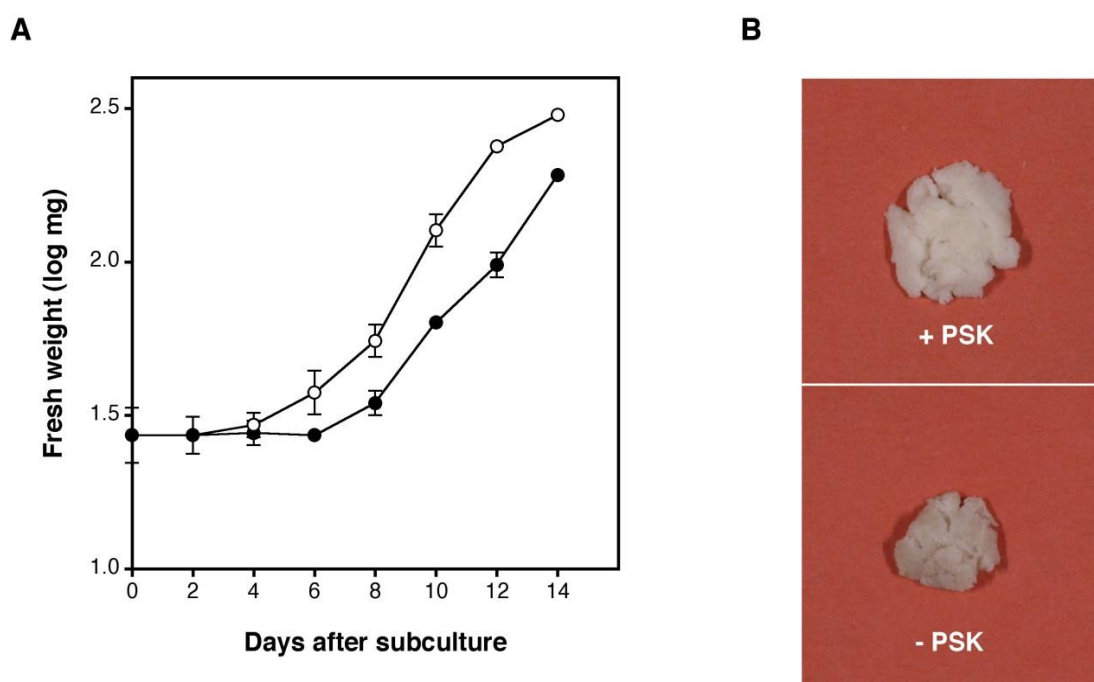


Fig. 3. Effects of PSK on the proliferation and maintenance of embryogenic cells of *C. japonica*. (A) Growth profiles of embryogenic cells with 32 nM PSK (open circles) or without PSK (closed circle) during culture for 2 weeks. Fresh weight of embryogenic cells collected from 10 ml of suspension culture was determined. Values are means \pm SE of results of five replicates. The symbols without bars indicate that SE fell within symbols. (B) Two-week cultured embryogenic cells in LEMM medium with 32 nM PSK (upper) or without PSK (lower) . Cell line L-6 that had been subcultured for more than two year in the presence of 32 nM PSK was used.

このように、著者らは被子植物と同様に裸子植物にも PSK が存在していること (Fig. 5)を示すとともに、PSK がスギ不定胚形成細胞の増殖や維持、そして、不定胚形成に対し明白な効果 (Fig. 3, 4, Table 2) を持っていることを明らかにした。一連の研究で、スギの不定胚形成及び再生に関する簡単に信頼できる手順を確立し、スギの様々な遺伝子型から不定胚誘導細胞を形成でき (Igasaki et al. 2003b), PSK を添加することで 1 年中いつでも容易に不定胚を生産できるようになった。

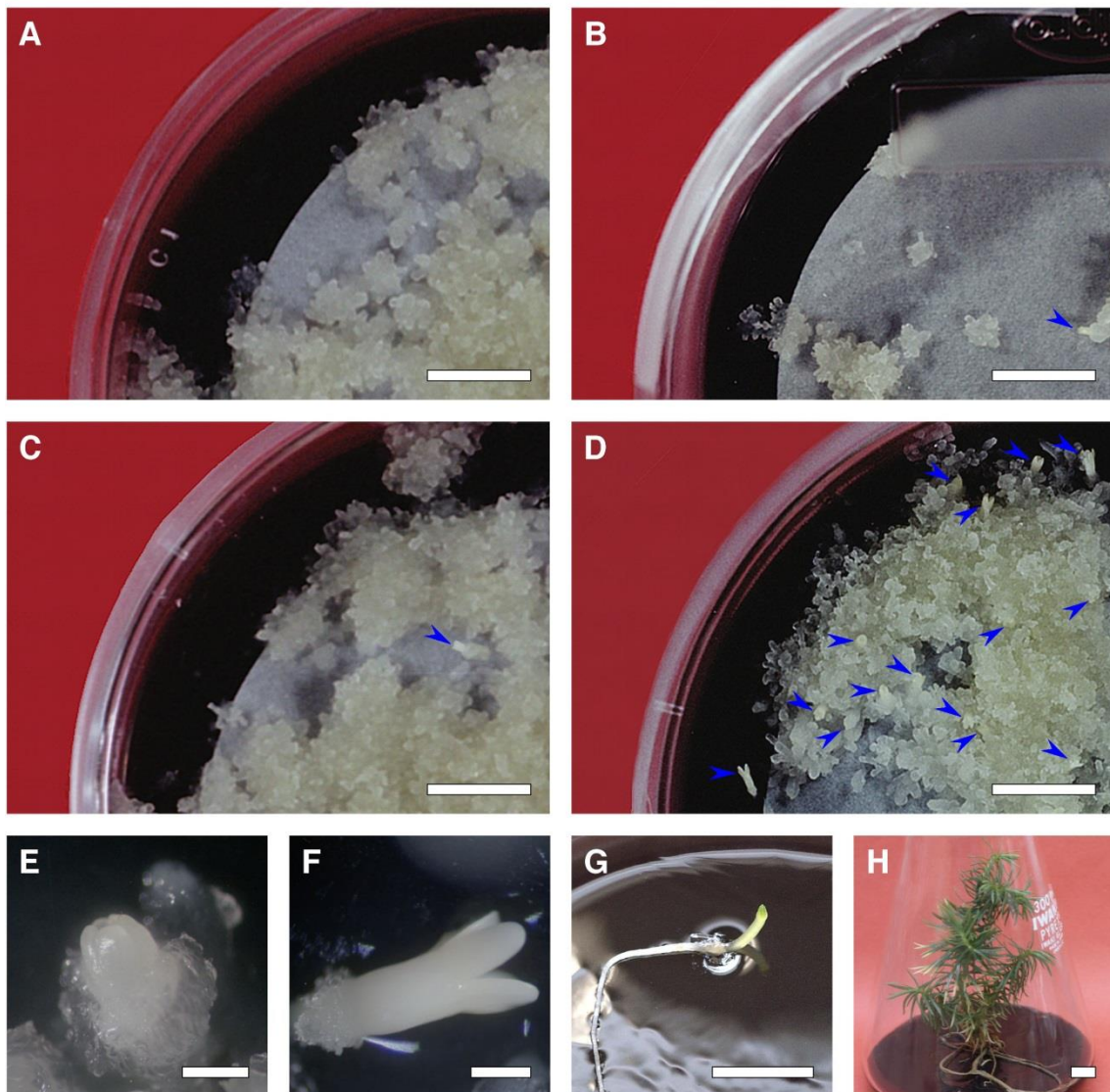


Fig. 4. Effects of PSK on somatic embryogenesis in *C. japonica*. SEMM medium containing neither PEG nor 32 nM PSK (A) , only 5% (w/v) PEG (B) , only 32 nM PSK (C) , or both 5% (w/v) PEG and 32 nM PSK (D) was used for the induction of somatic embryos. The arrowheads indicate somatic embryos at the mature stage (B-D). Somatic embryos at the early stage (E) and the mature stage (F). Germination of a somatic embryo (G). Growth of a seedling *in vitro* (H). Bars in A-D, and G and H represent 1 cm and those in E and F represent 1 mm.

A

```

atggcgaatatctctggaagaagtccttacacccttgcataattatgtgtcattctctctctgtactgaccactgcaatggcaaccgc 90
M A N I S G R S P Y T L C I L C V I L L V L T T A M A T R
                                     Δ
ccacttaaacagatttgctccacagaggatctgctcaaaccagtacagaagacaactgcaggaatctttcaacagggtgctcttaaa 180
P L K T D L L H R G S A Q T S T E D N L Q E S F Q Q G A L K

gctgacctgttgaggagagtagacaggaattaagctgtgaaggtctagaggaagaagaatgtctgaaccgtcgctctctggctgctcac 270
A D L L E E S T E E L S C E G L E E E E C L N R R S L A A H

actgattacatctatacacagcaccacaacacccatag 309
T D Y I Y T Q H H K H P *

```

B

| | | | | | | | |
|---------------|----|----------------------------|---|-------------------|---|-------------------|-----|
| CjPSK1 | 59 | LKADLLEESTEELSCEGLEEEEC | • | LNRR | • | SLAAHTDYIYTOHHKHP | 102 |
| AtPSK1 | 43 | EKASTKGDRDGVCKNSDSEEEC | • | LVKK | • | TVAHTDYIYTODLNLSP | 87 |
| AtPSK2 | 44 | KIEGKLDDMHVDENCGADDEDC | • | LMRR | • | TLVAHTDYIYTOKKKHP | 87 |
| AtPSK3 | 38 | SVEEDSVNKLGMMEYCGEGDEEC | • | LRRRMMTESHL | • | DYIYTQHHKH | 81 |
| AtPSK4 | 37 | SVKEIEGDKVEEESCNGIGEEEC | • | LIIR | • | SLVLHTDYIYTQNHKP | 79 |
| AtPSK5 | 34 | EENSFKKLEQGEVICGVGEEECFL | • | LIIR | • | TLVAHTDYIYTQNHNP | 77 |
| AtPSK6 | 44 | EMIESKLHEVAGESCDKEDDEDC | • | LVRR | • | TLTAHLDYIYTHKNNHH | 87 |
| PtPSK1 | 61 | ALNKVQRIDGEETCQKSEDEEEC | • | LNRR | • | SLAAHTDYIYTQNHNSP | 104 |
| ZePSK1 | 33 | TTAPHKDVEVQEGCEGTISEDEC | • | LMRR | • | TLVAHLDYIYTQKKNP | 75 |
| OsPSK1 | 45 | TTTQEPSRENGGSTGSNNNGLOFDSA | • | WEEFHTDYIYTQDVKNP | | | 89 |

Fig. 5. Presence of a gene for the precursor to PSK in *C. japonica*. (A) Nucleotide sequence of the cDNA for the putative precursor to PSK of *C. japonica* (taken from the data base, as indicated in the text) and the deduced amino acid sequence (CjPSK1) . Amino acids in black and white boxes are those of the PSK peptide and the conserved aspartate residue, respectively. A putative processing site is indicated by an open triangle. (B) Alignment of the deduced amino acid sequence of CjPSK1 with other precursors to PSK. The amino acid sequence of CjPSK1 is compared with the deduced amino acid sequences of peptide precursors to PSK from *Arabidopsis thaliana* [AtPSK1, AGI (*Arabidopsis* Genome Initiative; <http://www.arabidopsis.org>) code At1g13590; AtPSK2, AGI code At2g22860; AtPSK3, AGI code At3g44735; AtPSK4, AGI code At3g49780; AtPSK5, AGI code At5g65870; AtPSK6, AGI code At4g37720], *Pinus taeda* (PtPSK1, accession number BK000125) , *Zinnia elegans* (ZePSK1, accession number AB089283) and *Oryza sativa* (OsPSK1, accession number AB020505) . Amino acids in black boxes and in gray boxes are identical and similar, respectively, in at least six of the ten precursors to PSK. Dots indicate gaps introduced to maximize the extent of homology among sequences. The Arabic numerals in the sequences represent the positions of amino acid residues from the beginning of signal peptides.

これ以前に、著者らは日本の広葉樹の再生や遺伝子組換えの簡単で信頼できる手法を確立している (Mohri et al. 1996, 1997, 1999, Igasaki et al. 2000)。しかしながら、著者が知る限りでは、日本の針葉樹に対する組換え手法の研究は全く報告が無かった。著者らは、スギを含む日本の針葉樹の 3 種の成熟種子胚に DNA を挿入する効率的な手法を確立している (Mohri et al. 2000)。また、スギから様々なアレルゲン遺伝子や (Sone et al. 1994, Namba et al. 1994, Komiyama et al. 1994, Futamura et al. 2002), いわゆる MADS-box タンパク質遺伝子 (Fukui et al. 2001)

も単離している。したがって、近い将来、このスギの個体再生系を用いて、アレルゲンを含まない花粉粒を形成する遺伝子組換えスギの作出が可能になるものと期待される。

4 節 総合討論

本章では、不定胚経由のスギの個体再生系の確立と、植物ホルモン様の作用を持つペプチド PSK に関して、スギの不定胚形成効率に関する実験結果及び、それまで被子植物でしか確認されていなかった PSK 前駆体遺伝子について、裸子植物にも存在することの証明を行った。

また、新たに簡単で再現性のある不定胚経由のスギ個体再生法の条件を確立するために、不定胚形成細胞を誘導するための材料の採取時期、誘導する培地組成や植物ホルモン濃度、さらに、不定胚を誘導する培地条件等を検討した。

6 月下旬から 7 月上旬までに採取した自然受粉の未熟種子胚は、他時期のサンプルより高い頻度 (>4%) で不定胚形成細胞を誘導することがわかった。この時期の平均的なスギ未熟種子胚は長さ 0.5~1.0mm 程度で、子葉形成前の初期胚に相当していた。また、不定胚形成細胞を誘導する培地組成は、MSG 無機塩類をもとに作製した SMSG 培地が最も高い不定胚形成細胞の誘導頻度を示し、これは植物ホルモン 2,4-D $3.2\mu\text{M}$ 及び BA $1.8\mu\text{M}$ を含むものであった。今回誘導した不定胚形成細胞は、小さな緩く密集した細胞と伸長中及び伸長した細胞からなっていて、他の針葉樹に多く見られるような大きな不定胚形成領域と長いサスペンダー細胞 (Gupta and Durzan 1987) からなる細胞ではなかった。ただ、Bellarosa et al. (1992) が報告したドイツトウヒでの観察結果とは類似点もみられた。このようなスギ不定胚形成細胞は SMSG 培地や LMSG 培地での継代培養により、不定胚分化能力を維持することができた。これは安定的に遺伝子組換え操作を行うための有用な結果と言える。

不定胚誘導の培地組成は、EMM 培地 (Smith 1996) から作成した SEMM 培地が最も高い不定胚誘導効率を示した。SEMM 培地の成分のうち、アミノ酸、活性炭と PEG が不可欠であり、5% (w/v) の PEG の添加は不定胚形成を加速することがわかった。また、培地に植える細胞の数、温度条件やシャーレのシール剤等の培養条件についても調査し、形成された不定胚の数は、1 シャーレあたり 10^5 の細胞を植えた時が最も多く、温度は $26^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$ (昼/夜=12 時間/12 時間) と $24^\circ\text{C}/16^\circ\text{C}$ (昼/夜=12 時間/12 時間) や 22°C では同程度に不定胚形成が観察されることがわかった。シャーレのシール剤は、低い通気性のパラフィルム M が良好だった。また、発芽培地での GA_3 の存在は不定胚の発芽の頻度に影響しなかったが、 GA_3 は胚軸の伸張と実生の生存に顕著な効果を示すことがわかった。

3 節では、細胞の脱分化、増殖、及び再分化の初期段階にかかわる細胞外リガンドとして機能している小さな硫酸化ペプチドである PSK について、スギの不定胚形成へ効果を及ぼすかを調べた。増殖培地や不定胚誘導培地に加え、スギの不定胚形成の効率の変化を調べた。通常条件では、長期間培養したスギ不定胚形成細胞では、増殖能力の減少や、不定胚形成能力の喪失、細胞色の変色が確認されたが、PSK を加えることで、増殖能力や不定胚形成能力は維持され、細胞も明るい黄色を維持することができた。このように、PSK は、スギ不定胚形成細胞の細胞分裂能力の維

持及び幼若性の維持に重要な役割を果たすことがわかった。また、PSK と PEG の両方が添加した不定胚誘導培地では不定胚形成が顕著に促進され、スギ不定胚形成に必要な PSK の至適濃度は 32nM であることがわかった。

さらに、PSK のアミノ酸配列をもとにスギ発現遺伝子配列 (EST) のデータベースを調査することにより、PSK の前駆体遺伝子がスギにおいて存在し発現していることが示唆された。コンピューター上の解析の結果、この PSK 前駆体の特徴は、被子植物のそれと一致した。また、PSK が培養系において生理作用を示したことから PSK 信号伝達経路もこの針葉樹に存在すると考えられた。

上述のように、本章では、スギの不定胚形成と個体再生のための簡単で信頼できる手順を確立した。この実験系の確立には 7 年以上を要したが、これは再現可能なスギの不定胚経由の個体再生法の最初の報告であり、かつスギの様々な遺伝子型に適合しており、維持された培養細胞からの不定胚形成は季節に関係なく良好に機能することを示すことができた。スギの遺伝子組換えには、このような再現性のある不定胚形成細胞からの個体再生技術が不可欠であり、近い将来、アレルゲンを含まない花粉粒を持つ遺伝子組換えスギが作出される際の基盤技術となると考えられる。

3章 *Agrobacterium tumefaciens* を用いた遺伝子組換え木本植物の作出技術の開発

1節 序論

一般に樹木は永年性で、生殖活動を開始するまでの期間がきわめて長く、しかも、遺伝的に不均一で、交雑育種による品種改良には不向きである。スギをはじめとする樹木で交雑育種を行うには、広大な敷地と長大な年月が必要となることは言うまでもない。遺伝子工学は、親系統の有効な特色の損失を伴わずに個々の特色を選択的に改良する特性があり、付加価値の高い新形質を持つ個体を比較的容易に短期間で作出できるという特長がある。そうした技術を利用し、著者らは子孫を作るのに何年もの長期間を必要とする木本植物の繁殖に関連した困難を克服できると考えている。しかしながら、遺伝子導入には、導入する目的遺伝子の他に、*Agrobacterium* 法やパーティクルガン法といった手法による安定的な遺伝子導入技術やカルス等からの個体再生技術が必要である。

本章では、木本においてすでに個体再生技術の確立が報告されているマメ科ハリエンジュ属のニセアカシア (Han et al. 1993a) 及びモデル実験木本植物として着目されるヤナギ科 *Populus* (ハコヤナギ) 属の一種ギンドロの 2 種について、*Agrobacterium* を介した遺伝子組換え技術の改良を行った。遺伝子導入法として *Agrobacterium* 法に着目したのは、木本植物を含む様々な植物種が *Agrobacterium* に感染しやすいとされることがあげられる (De Cleen and Deley 1976)。本章での研究においてスギを対象としていないのは、本研究に着手した時点で、適切な個体再生システムが確立されていなかったためである。また、ニセアカシアや *Populus* 属の樹種では、既に組換え体作出の報告もあったが (Han et al. 1993a, Fillatti et al. 1987, De Block 1990, Klopfenstein et al. 1991, Confalonieri et al. 1994, Mohri et al. 1996)、ニセアカシアでは、Han et al. (1993a) の報告で問題となっていた形態異常が生じない遺伝子組換え体を得ることを、ギンドロでは、樹木においてこれまで試みがなかった除草剤ビアラホスを直接的な選抜薬剤として使用する手法を開発することを目的とした。

2節 *A. tumefaciens* を用いたニセアカシアの遺伝子組換え技術の開発

遺伝子工学は、親系統の期待される特色を損なわずに個々の形質を選択的に向上させることができる技術である。それにより、著者らは子孫を生産するのに長い時間を必要とする長命の木本植物の繁殖上の特徴に由来する育種上の困難を克服できると考えている。*A. tumefaciens* を介した遺伝子組換えは、植物への外来遺伝子の導入に適した手法である。*Agrobacterium* 属の細菌は木本植物を含む様々な植物種に感染できるとされている (De Cleen and Deley 1976)。しかしながら、組換え木本植物の作出には、種々の困難があり、多くの場合で、適切な個体再生システムが確立されていないのが現実である。果樹を除く広葉樹での成功例は、いわゆるポプラと呼ばれる *Populus* 属の一部の樹種 (Fillatti et al. 1987, De Block 1990, Klopfenstein et al. 1991, Confalonieri et al. 1994, Mohri et al. 1996)、モミジバフウ (*Liquidambar styraciflua*)

(Sullivan and Lagrimini 1993), ニセアカシア (Han et al. 1993a), シラカンバ(*Betula platyphylla*) (Mohri et al. 1997) やユーカリ(*Eucalyptus camaldulensis*) (Mullins et al. 1997) 等に属する一部の樹種に限定されている。

ニセアカシアは、世界中に植栽されているマメ科の樹種である。日本では、主に緑化木や、はちみつの生産に使用されている。ニセアカシアの *in vitro* での個体再生については、多くの報告がある (Chalupa 1983, Davis and Keathley 1987, Merkle and Wiecko 1989, Arrillaga and Merkle 1993, Han et al. 1993b)。しかしながら、私たちが知る限り、ニセアカシアの組換え手法については、*A. rhizogenes* を用いた方法しか報告されていない (Han et al. 1993b)。しかも、報告されたニセアカシア組換え体は葉の形態等に異常を示していた。

本節では、新たに簡単に信頼できるニセアカシア組換え体作出方法確立するため、*A. tumefaciens* を用いた遺伝子導入法について検討した。また、*hygromycin phosphotransferase* (*HPT*) 遺伝子を選抜マーカーとして用いる方法がニセアカシアへの外来遺伝子の導入に最も有効であった。この方法で作成されたニセアカシア組換え体は、葉等に形態学的異常を生じなかった。

(1) 実験方法

・植物材料

A. tumefaciens の感染に用いるニセアカシアの組織片は、Murashige and Skoog (1962) の基礎塩類、Gamborg et al. (1968) のB5ビタミンと2% (w/v) のショ糖に0.3% (w/v) のゲランガムを加えた培地 (MSB5S培地) で維持した単一種子由来の培養体から得た。培養植物体は25℃、白色蛍光灯下 ($30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 16時間日長) で培養し、2週間ごとに植え次いだ。

・バイナリーベクターと菌の系統

T-DNA領域に*GUS*遺伝子と*HPT*遺伝子を持つ市川博士より供与していただいたバイナリーベクターpSMAH621 (旧名pSMAH704) を使用した (Igasaki et al. 2000)。3種類の改変*A. tumefaciens* の系統、LBA4404 (pAL4404) (Hoekema et al. 1983), EHA101 (pEHA101) (Hood et al. 1986) とGV3101 (pMP90) (Koncz and Schell 1986) にバイナリーベクターを保持させ、組換え実験に用いた。*A. tumefaciens* は、100 mg/l のスペクチノマイシンを含むLuria-Bertani液体培地 (Sambrook et al. 1989) 中で、28℃一晩培養した。ニセアカシア組織への遺伝子導入には、培養物を液体ニセアカシア再生培地 (RPR培地: 0.05 mg/l の2,4-D, 2.5 mg/l のtrans-zeatinと2.5 mg/l のBAを含むMSB5S培地) に20mMのアセトシリンゴン (3',5'-dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone; Aldrich, Milwaukee, WI) を加えた培地をもちい、細胞塊は 5×10^8 細胞に希釈した。

・遺伝子組換えと植物体再生

ニセアカシア培養体から単離した葉や茎切片は上述の*A. tumefaciens* 培養液中で20分減圧下においた (Horsch et al. 1985)。組織は0.3% (w/v) のゲランガムと20mMのアセトシリンゴンが入ったRPR培地を含んだろ紙上で2日間培養した。各組織をRPR培地で3回洗浄し、その後、500 mg/l のカルベニシリン (二ナトリウム塩; Sigma, St. Louis, MO) 及び500 mg/l のセフトキシム (ナ

トリウム塩; Sigma) を含むRPR培地で洗浄した。そして、20 mg/lハイグロマイシンB, 500 mg/lのカルベニシリン及び500 mg/lのセフトキシムを含むRPR培地を0.3% (w/v) のゲランガムで固化した培地上に滅菌ろ紙を置き、その上に組織を置いた。組織から誘導されたカルスから形成された芽を切断し、20mg/lハイグロマイシンB, 500 mg/lのカルベニシリン及び500 mg/lのセフトキシムを含む0.3% (w/v) のゲランガムで固化したMSB5S培地に移植した。

・GUS活性の組織化学的、蛍光学的解析

ニセアカシア組換え体でのGUS活性の組織化学的及び組織抽出液の蛍光学的な分析は、Jefferson et al. (1987) の方法で行った。組織化学的分析では、ニセアカシア組換え体の葉は37°Cで50mMリン酸ナトリウムバッファ (pH7.0) 中の0.1mg/mlの5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) の溶液で一晩反応させた。GUS活性の分布はエタノールによる葉緑素の脱色後に調べた。蛍光分析では、ニセアカシア組換え体の葉を微量遠心管に入れ、ガラス製の乳棒でホモジナイズし、遠心後、上清を4mMの4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (4-MU) を基質とする反応に用いた。タンパク質濃度はウシ血清アルブミンを標準とし、Bradford (1976) の手法により決定した。

・DNAの単離とサザンブロット解析

Murray and Thompson (1980) の手法により組換えニセアカシアから、ゲノムDNAは単離した。ゲノムDNAは、*Bam*HI または *Hind*III で切断し、0.7% (w/v) のアガロース・ゲルで電気泳動した。DNA断片はアルカリ転写法 (Reed and Mann 1985) でバイオダイン B ナイロン膜 (Pall, East Hills, N. Y.) に転写した。サザンブロット法は、Mohri et al. (1996) の方法で行った。Amersham Pharmacia Biotech 社の Multiprime DNA labeling system によって α -³²P-dCTP (110 TBq/mmol; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) で標識された 1-kb *Bam*HI 断片と pSMAH621 の 1.8-kb *Xba*I-*Sac*I 断片はDNAプローブとして、それぞれ、*HPT* 遺伝子及び *GUS* 遺伝子の検出に使用した。

(2) 結果及び考察

遺伝子組換え実験を行う前に、光条件下でのニセアカシアの葉切片に対する抗生物質カナマイシンとハイグロマイシンBの効果を調べた。生死判定は葉切片のクロロシスの広がりを基準に判定した。ハイグロマイシンBは、低濃度においても、同程度の濃度のカナマイシンと比較して顕著に葉切片を死滅させた (Fig. 6)。ジェネティシンは生存率においてこれらの中間的な影響を示した (データ省略)。これらの結果から、ニセアカシアの組換えにおいては、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子 *HPT* が選抜マーカー遺伝子として最も適切であることが示唆された。*Neomycin phosphotransferase* (*NPTII*) 遺伝子と *GUS* 遺伝子を含むバイナリーベクター pBI121 を使用し、ニセアカシア組換え実験を行ったところ、カナマイシンで選抜された多くのカルスは非組換え体であった (データ省略)。したがって、その後の研究には、T-DNA 領域に *HPT* 遺伝子と *GUS* 遺伝子をもつ pSMAH621 を使用することとした。

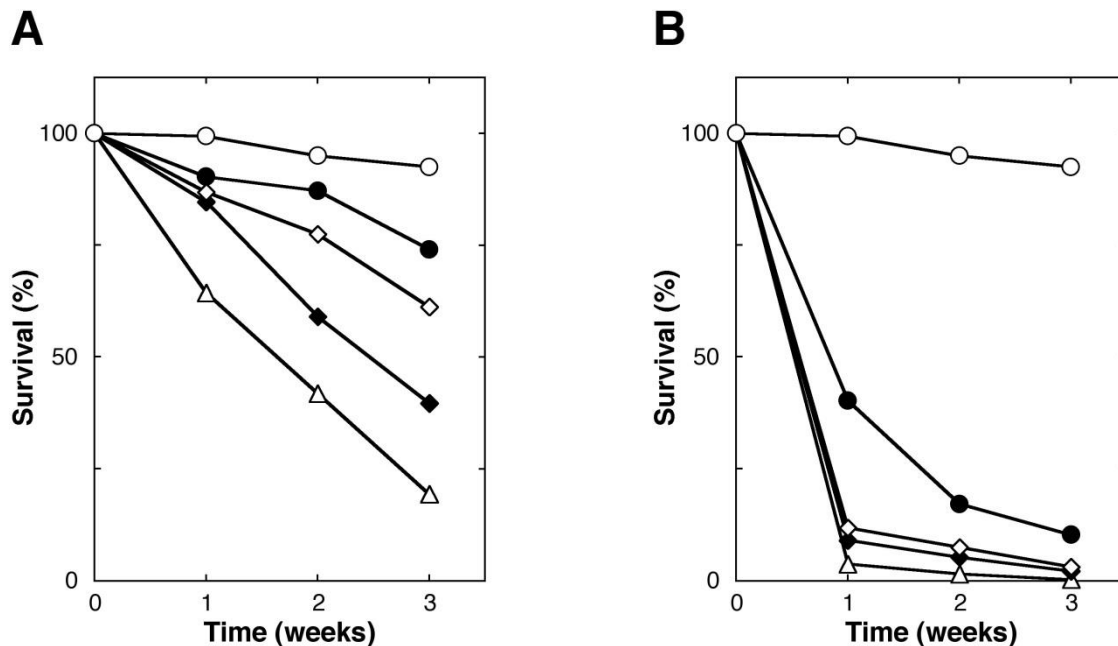


Fig. 6. Effects of kanamycin and hygromycin B on the survival of leaf discs of *R. pseudoacacia*. **A.** A total of 430 leaf discs was treated with kanamycin at 0 (open circles) , 25 (closed circles) , 50 (open diamonds) , 100 (closed diamonds) and 200 (open triangles) mg/l. **B.** A total of 457 leaf discs was treated with hygromycin B at 0 (open circles) , 5 (closed circles) , 10 (open diamonds) , 20 (closed diamonds) and 40 (open triangles) mg/l. Survival was examined at weekly intervals.

遺伝子組換えの頻度はしばしば使用する *A. tumefaciens* の系統に依存することが報告されている (Bechtold et al. 1993, Hood et al. 1993, Katavic et al. 1994, Wenck et al. 1999)。そこで、3種の異なる系統の *A. tumefaciens* を用いてニセアカシアの組換え実験を行った (Table 3)。GV3101 (pMP90) の系統を用いた場合に高い効率で形質転換体を得られた。その形質転換体出現頻度はLBA4404 (pAL4404) 系統やEHA101 (pEHA101) 系統で得られるものよりはるかに高かった。また、*A. tumefaciens* を介した形質転換に対するニセアカシアの様々な組織の感受性を調べたところ、茎が最良の組織であることが示唆された (Table 3)。形質転換後にカルスを得られるパーセンテージは葉や茎切片を用いた場合は胚軸や根を用いた場合と比較してあきらかに高く、ハイグロマイシン耐性カルスは、感染後の選抜培地上で2週間以内に得られた。ランダムに選抜したハイグロマイシン耐性の8つのカルスすべてが、組織化学的に強いGUS活性を示した (データ省略)。

Han ら (1993b) はニセアカシア形成層から、カルスを経由した植物体再生法を報告している。そのシステムに若干の変更を加え、ハイグロマイシン耐性の組換えニセアカシアを作出することができた (Fig. 7A, C)。この方法で、ほとんどのハイグロマイシン耐性カルスからの遺伝子導入植物を再生することができた。ハイグロマイシン耐性カルスを選択的 RPR 培地に移植することで4週間以内に形質転換芽を得ることができた。これらの形質転換芽は、選択的な MSB5S 培地上で4

週間以内に根を形成した。茎切片からの形質転換ニセアカシア植物体の再生の頻度は約 24%だった (Table 3)。非形質転換植物と比較して形質転換植物体に形態学的異常は見いだせなかった (Fig. 7B, C)。その後の解析のため、異なる 3 系統のカルス由来の植物 (L-1, L-2, および L-3) を無作為に抽出した。これらについて組織化学的 GUS 染色を行ったところ、組換え植物の葉において強い GUS 活性が検出された (Fig. 7D)。このように得られた形質転換体では導入された *GUS* 遺伝子が、35S promoter of cauliflower mosaic virus (P35S) により高いレベルで発現していることが確認できた。

Table 3. Frequency of transformation of *R. pseudoacacia* with different strains of *A. tumefaciens*.

| <i>Agrobacterium</i> strain | Opine type | Type of explant | Number of segments | Number of transgenic plants | Frequency of transformation (%) |
|--------------------------------|---------------|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| LBA4404 (pAL4404) | Octopine | Leaf | 110 | 0 | 0 |
| | | Stem | 111 | 1 | 0.9 |
| EHA101 (pEHA101) | Succinamopine | Leaf | 186 | 2 | 1.1 |
| | | Stem | 157 | 5 | 3.2 |
| GV3101 (pMP90) | Nopaline | Leaf | 165 | 24 | 14.6 |
| | | Stem | 166 | 40 | 24.1 |

さらに GUS 活性の発現は葉の抽出液を用いた蛍光法によっても確認した (Table 4)。コントロールの葉では、低いバックグラウンドの活性しかみられず、3 つの組換え植物の GUS 活性はその 38 倍から 110 倍だった。組換え系統は、経代後も高い GUS 活性を維持していた (データ省略)。さらに、サザンブロット解析によってもニセアカシアゲノムに *GUS* と *HPT* 遺伝子が導入されたことを確認した (Fig. 8)。導入遺伝子内部に由来する制限酵素断片のシグナル強度から、3 つの形質転換体の間で導入された *HPT* 遺伝子のコピー数に違いはないと考えられた (Fig. 8B, C, D)。導入境界をまたぐと考えられる制限酵素断片は単一のバンドとして現れ、それぞれ異なる位置にみられたことから、ニセアカシアゲノムの無作為な位置に T-DNA が挿入されたことと、*HPT* や *GUS* 遺伝子がディプロイドゲノムあたり 1 コピー挿入されたものと考えられた (Fig. 8C, D)。遺伝子導入植物間の GUS 活性の違いは、導入コピー数の違いではなく、T-DNA の無作為挿入による隣接配列の効果であると思われる。

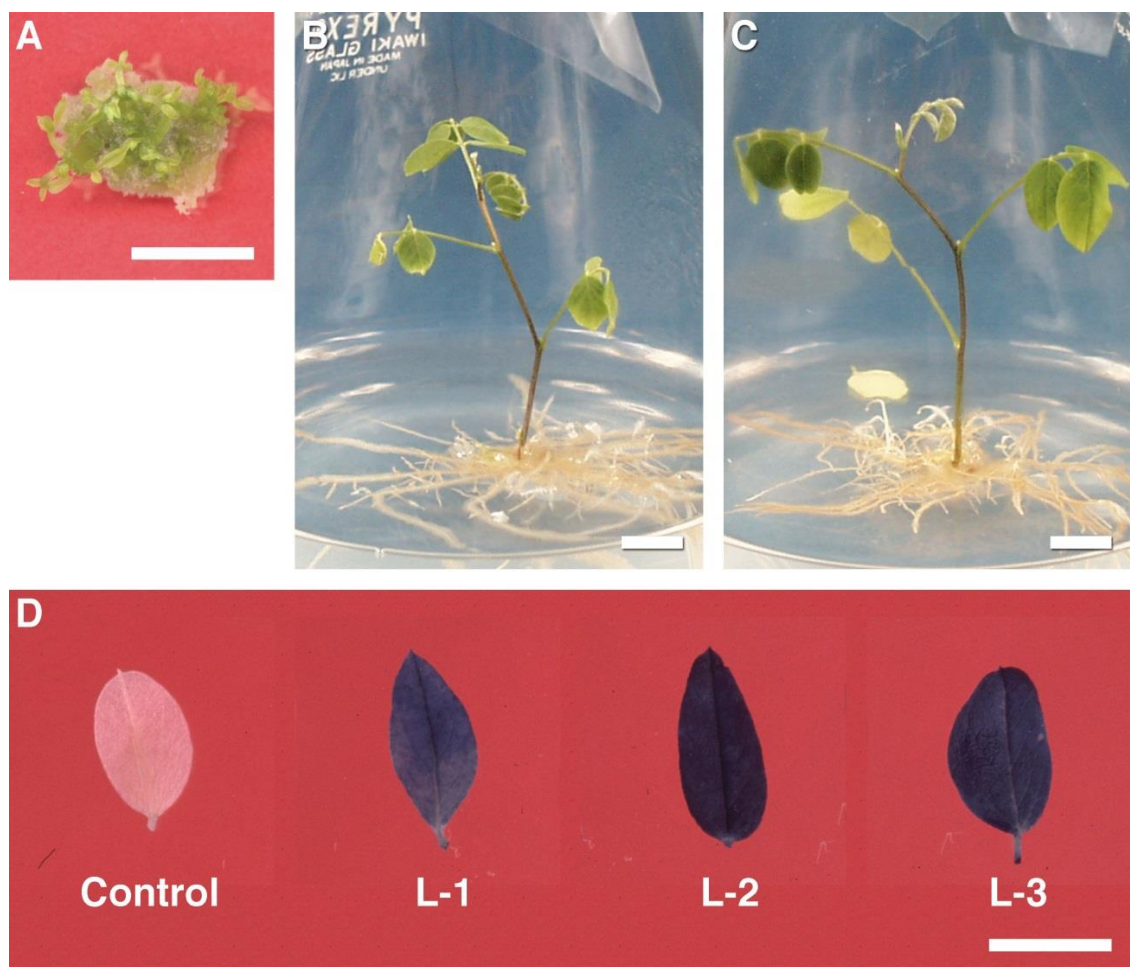


Fig. 7. Regeneration of transgenic *R. pseudoacacia*. A. Shoot organogenesis from transgenic callus. B. A control plantlet. C. A transgenic plantlet. D. Results of a histochemical assay of GUS activity in transgenic *R. pseudoacacia*. A control leaf and three leaves of randomly selected transgenic plants (L-1 through L-3) were subjected to histochemical staining with X-Gluc. Bars: 1cm.

Table 4. Expression of GUS activity in leaves of transgenic *R. pseudoacacia* plants

| Plant | | GUS activity (nmol 4-MU·mg protein ⁻¹ ·min ⁻¹) |
|------------------|-----|--|
| Control | | 0.17 ± 0.01 |
| Transgenic plant | L-1 | 6.50 ± 0.87 |
| | L-2 | 18.86 ± 1.05 |
| | L-3 | 12.79 ± 1.04 |

Values are means ± S.E. of results of six determinations.

4-MU, 4-Methylumbelliferone.

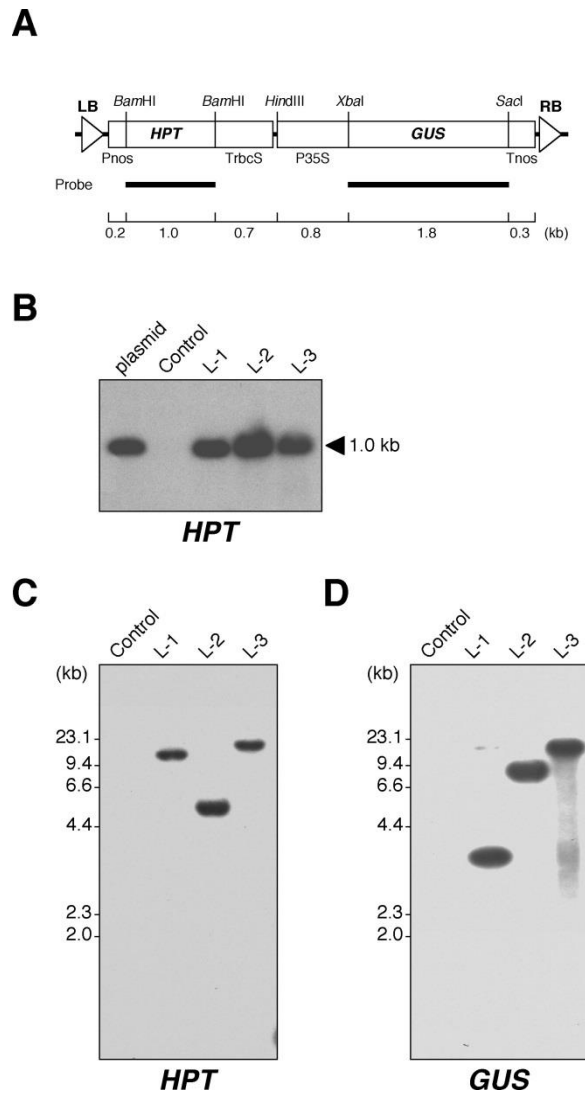


Fig. 8. Detection by Southern blotting analysis of integrated *HPT* and *GUS* genes in the genome of transgenic *R. pseudoacacia* plants. **A.** The *HPT* gene, a 1.0-kb *Bam*HI fragment, and the *GUS* gene, a 1.8-kb *Xba*I-*Sac*I fragment, of pSMAH621 were used as probes as indicated. Only the T-DNA region of the plasmid is shown. LB, Left border of T-DNA; RB, right border of T-DNA; Pnos, promoter of the gene for nopaline synthase; TrbcS, terminator of the gene for the small subunit 2B of RuBisCO of *Arabidopsis thaliana*; Tnos, terminator of the gene for nopaline synthase. **B.** Results obtained with the *Bam*HI fragment of pSMAH621 (4 pg) and one microgram of DNA from control and transgenic *R. pseudoacacia* plants (L-1, L-2 and L-3) that had been digested with *Bam*HI. **C** and **D.** Results obtained with one microgram of DNA from control and transgenic *R. pseudoacacia* plants (L-1, L-2 and L-3) that had been digested with *Hind*III.

組換えニセアカシアの再生のための簡単で信頼できる手法を確立した。著者が知る限り、ニセアカシアの *A. tumefaciens* を用いた形質転換の最初の報告である。

本研究において、ハイグロマイシンがこの実験系における最適な形質転換体選抜用の抗生物質であることがわかった (Fig. 6)。ハイグロマイシンは、遺伝子導入細胞を独占的に選択し、キメラや非組換え細胞を排除することを可能とした。この結果は、*A. rhizogenes* を用い、選抜にカナマイシンを用いた Han らの報告 (1993b) と比べて進歩したものといえる。*A. rhizogenes* を用いた形質転換では、結果として、葉に形態異常が生じる (Han et al. 1993b)。それに対し、*A. tumefaciens* を用いた形質転換では、得られた植物に形態異常は生じなかった (Fig. 7C)。ポプラを含む限られた種の広葉樹では、効率的で再現可能な遺伝子導入システムが報告され、除草剤抵抗性 (De Block 1990)、病害抵抗性 (McCown et al. 1991)、そして、水銀抵抗性 (Rugh et al. 1998) 等のようにこれらのシステムを利用して選択的に形質を改良することに成功している。*A. tumefaciens* T-DNA 由来のインドール酢酸の生合成遺伝子の恒常的発現によりポプラの成長パターンの改変も行われている (Tuominen et al. 1995)。また、赤い木部や高いリグニン抽出性がシナミルアルコール脱水素酵素 (Baucher et al. 1996) や、コーヒー酸/5-hydroxyferulic 酸 O-メチルトランスフェラーゼ (Van Doorselaere et al. 1995; Tsai et al. 1998) の抑制によって改変された組換えポプラも報告されている。Weigel and Nilsson (1995) はシロイヌナズナの *LEAFY* 遺伝子を恒常的に発現させることによって、早咲きの組換えポプラを作出した。この戦略は非常に早期開花を引き起こすことで木本の世代更新を短縮させることに役に立つ。本研究で開発されたニセアカシアの効率的組換え系は形態学的特性や病虫害に対する抵抗性といった産業上有用な形質をもつ系統の作出をニセアカシアにおいて効率的に行うことを可能とするものである。また、ここで得られた知見がスギをはじめとする針葉樹の形質転換方法開発の基礎的知見として役立つことも期待している。

3 節. ギンドロの遺伝子組換え及び除草剤ピアラホスによる遺伝子組換え体の直接選抜法の確立

ピアラホスは、*Streptomyces hygroscopicus* SF1293 によって作り出されるトリペプチド抗生物質で、L-グルタミン酸残基及び2つのL-アラニン残基からなるフォスフィノスリシンからできている。植物細胞中の内生のペプチダーゼによるアラニン残基の取り外しの時、フォスフィノスリシンはグルタミン合成酵素を阻害し、結果として植物細胞に死をもたらすアンモニアの急激な蓄積をもたらす (Tachibana et al. 1986a, b)。ピアラホスは、土壌中では、急速に失活し、土を介して、作物の発芽や生長に影響を及ぼすことは無い。したがって、ピアラホスは耕地に普及的に使用できるという大きな潜在的可能性を持っている。*S. hygroscopicus* から単離された *bar* 遺伝子は phosphinothricin acetyltransferase をコードしており、フォスフィノスリシンのアミノ基をアセチル化することで除草剤としての機能を喪失させる (Murakami et al. 1986, Tompson et al. 1987)。*bar* 遺伝子を保有する遺伝子組換え植物は、ピアラホスとフォスフィノスリシンの両方に抵抗性を示すことが多くの例で報告されている (Toki et al. 1992)。

Populus 属の除草剤耐性の遺伝子組換え植物としては、フォスフィノスリシン耐性 (De Block et al. 1990, Devillard 1992, Confalonieri et al. 2000)、グリホセート耐性 (Fillatti et al. 1987)、及びクロルスルフロン耐性 (Brasileiro et al. 1992) の報告がある。私たちが知る限り、除草

剤耐性の遺伝子組換え *Populus* 属の作出では、形質転換体選抜自体には、抗生物質のカナマイシンが使用されている。しかしながら、カナマイシンを組換えポプラの選抜で使用すると、非組換え体「エスケープ」やキメラといった不完全な培養細胞や再生植物が頻繁に出現するという問題点が指摘されている (Mohri et al. 1999)。

本節では、*A. tumefaciens* を介したギンドロの形質転換において、ビアラホスを用いた新たな選抜方法の開発を行った。その結果、この系を使用した遺伝子組換え手法では、ビアラホスの厳しい選択圧のため「エスケープ」やキメラといった問題点を生じないことがわかった。また、得られた遺伝子組換え植物が、形態学的異常を示すこともなかった。

(1) 実験方法

・植物材料

ギンドロのシュート培養は、野外の植物の小枝の表皮をむき、1/2MSB5SC 培地で行った。1/2MSB5SC 培地組成は、Murashige and Skoog (1962) の 2 分の 1 強度の無機塩類、Gamborg et al. (1968) の B5 ビタミン、3% (w/v) のショ糖、0.2% (w/v) の活性炭及び 0.4% (w/v) のジェランガムである。シュートは 25℃、白色蛍光灯下 ($30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 16 時間日長) で無菌的に培養し、2 ヶ月ごとに植え継いだ。

・バイナリーベクターと菌の系統

この研究で使用した市川博士より供与していただいたバイナリーベクター pSMAB704 (Fig. 9) は、T-DNA 領域に *GUS* 遺伝子と *bar* 遺伝子を保持している。pSMAB704 プラスミドはエレクトロポレーション法により *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) (Koncz and Shell 1986) に導入した。

A. tumefaciens は、100mg/l のスペクチノマイシンを含む Luria-Bertani 液体培地 (Sambrook et al. 1989) 中で、28℃一晩培養した。ギンドロの形質転換には、培養物を MSS 培地で 5×10^8 細胞に希釈したものをを用いた。MSS 培地は、Murashige and Skoog (1962) の無機塩類、5% (w/v) のショ糖、 $20 \mu\text{M}$ のアセトシリンゴン (3', 5'-dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone) を加えたものである。

・遺伝子組換えと個体再生

ギンドロのシュート培養から作製した茎切片を、減圧法で 1 回 5 分、計 3 回、前述の *A. tumefaciens* 懸濁液に浸透した (Horsch et al. 1985)。その後組織を、滅菌したろ紙上に置き、MSB5SA 培地にそのろ紙を移したのち 3 日間培養した。MSB5SA 培地は、Murashige and Skoog (1962) の無機塩類、Gamborg et al. (1968) の B5 ビタミン、3% (w/v) のショ糖及び 0.4% (w/v) のジェランガムに $20 \mu\text{M}$ のアセトシリンゴンを加えた培地である。3 日間培養した組織は MSS 培地で 3 回洗浄し、最後の洗浄のみ、500 mg/l のカルベニシリン (二ナトリウム塩; Sigma)、500 mg/l のセフトキシム (ナトリウム塩; Sigma) 及び 500 mg/l の塩酸バンコマイシン (塩野義製薬、大阪、日本) を含む培地を用いた。その後、組織を新しい滅菌ろ紙上に移し、そのろ紙を 10 mg/l のビアラホス (明治製菓、東京、日本)、500 mg/l のカルベニシリン、500 mg/l のセフトキシ

ム及び 500 mg/l の塩酸バンコマイシンを添加した MSB5SA 培地に置いて培養した。約 4 週間でカルスが充分な大きさに生長した。このように成長したカルスをもとの茎組織から切り取り、選択的シュート再生培地（MSB5SA 培地に 10 mg/l のピアラホス、500 mg/l のカルベニシリン、500 mg/l のセフトキシム、500 mg/l の塩酸バンコマイシン、0.25 mg/l チジアズロン（Sigma）及び 0.05 mg/l BA を加えたもの）に移植した。再生したシュートの発根には、選択的シュート培養培地を用いた。選択的シュート培養培地は 1/2MSB5SC に 10 mg/l のピアラホス、500 mg/l のカルベニシリン、500 mg/l のセフトキシム及び 500 mg/l の塩酸バンコマイシンを添加した培地である。組換えギンドロの組織化学的解析及び PCR 解析は選択的シュート培養培地での 2 ヶ月の育成後に実行した。

・ GUS 活性の組織化学的解析

組換えギンドロの GUS 活性の組織化学的解析は、Jefferson et al. (1987) の方法で行った。組換えギンドロの葉を、0.1 mg/ml x-gluc と 50mM リン酸ナトリウムバッファ（pH 7.0）中、37℃で一晩反応させ、葉緑素をエタノールで脱色した後、観察を行った。

・ ゲノム DNA の抽出と PCR による解析

Murray and Thompson (1980) の記述に従い、組換えギンドロのゲノム DNA を単離した。*bar* 遺伝子と *GUS* 遺伝子の PCR 検出には、それぞれ、5'-ATGAGCCCAGAACGACGCCC-3' と 5'-TCAGATCTCGGTGACGGGCA-3'、5'-ATGTTACGTCCTGTAGAAAC-3' と 5'-TCATTGTTTGCCTCCCTGCT-3' の合成プライマーを用いた。増幅条件は PCR 酵素に Ex Taq（タカラバイオ、東京、日本）を用い、94℃で 30 秒、56℃で 30 秒、72℃で 120 秒の 30 サイクルで、最後に 72℃、300 秒の延長を行った。

(2) 結果と考察

ギンドロの組換え実験を行う前に、ギンドロの培養個体から得られた茎切片の生存にカナマイシンとピアラホスがどのような効果を持つのか予備的に調査した。生存は茎切片のクロロシスの広がりを基準に評価した。ピアラホスは、10 mg/l で有効に茎切片を死滅させ、「エスケープ」の増殖細胞も観察されなかった。対照的に、高い濃度のカナマイシン(150 mg/l)培地上でも「エスケープ」とみられる増殖細胞が出現した。したがって、*bar* 遺伝子がギンドロの組換え実験において選択能力があると考えた。様々なタイプのバイナリーベクターと *A. tumefaciens* の系統を調査した予備実験では、バイナリーベクター pSMAH621 を保持する *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) が有効であった。この pSMAH621 は *A. tumefaciens* 中で高い安定性を示す pVS1 複製開始領域を持つことが知られている (Igasaki et al. 2000)。これらの知見に基づき本研究では、pSMAH621 の *HPT* 遺伝子を *bar* 遺伝子に置き換えた pSMAB704 (Fig. 9) を保持する *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) を使用した。

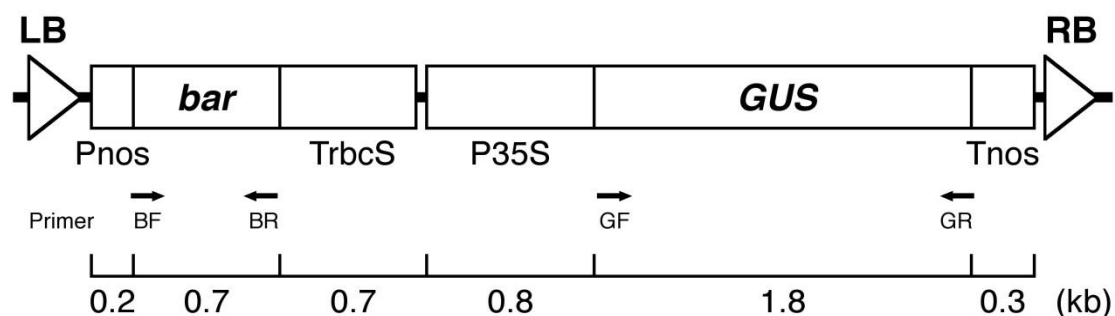


Fig. 9. Schematic representation of the binary vector pSMAB704. Arrows (BF, BR, GF and GR) indicate the primers for PCR analysis. LB, Left border of T-DNA; RB, right border of T-DNA; Pnos, promoter of the gene for nopaline synthase; TrbcS, terminator of the gene for small subunit 2B of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of *Arabidopsis thaliana*; P35S, promoter of the gene for 35S rRNA of cauliflower mosaic virus; Tnos, terminator of the gene for nopaline synthase.

予備実験において茎切片を用いた場合の方が葉切片を用いた場合より *A. tumefaciens* 感染後にビアラホス耐性のカルスを生じた割合が顕著に高かったことから茎切片を用いて実験を行うことにした。感染後 4 週間以内に選択培地上で茎切片からビアラホス耐性のカルスが得られた (589 切片中 18 個)。1 切片から得られたカルスを 1 遺伝子型と仮定した場合、組換え頻度が約 3%であった。それぞれのビアラホス耐性のカルスは選択能力があるシュート形成培地で 20 以上の芽を作り出した。ビアラホス耐性のカルスからの遺伝子組換えギンドロの再生頻度は、ほぼ 100%であった。組換えギンドロの形態学的な特徴は非組換えギンドロと区別ができなかった (Fig. 10A, B)。異なる系統のカルスから再生した 3 つの遺伝子導入植物 (L-1, L-2, 及び L-3) をその後の解析のために無作為に抽出した。

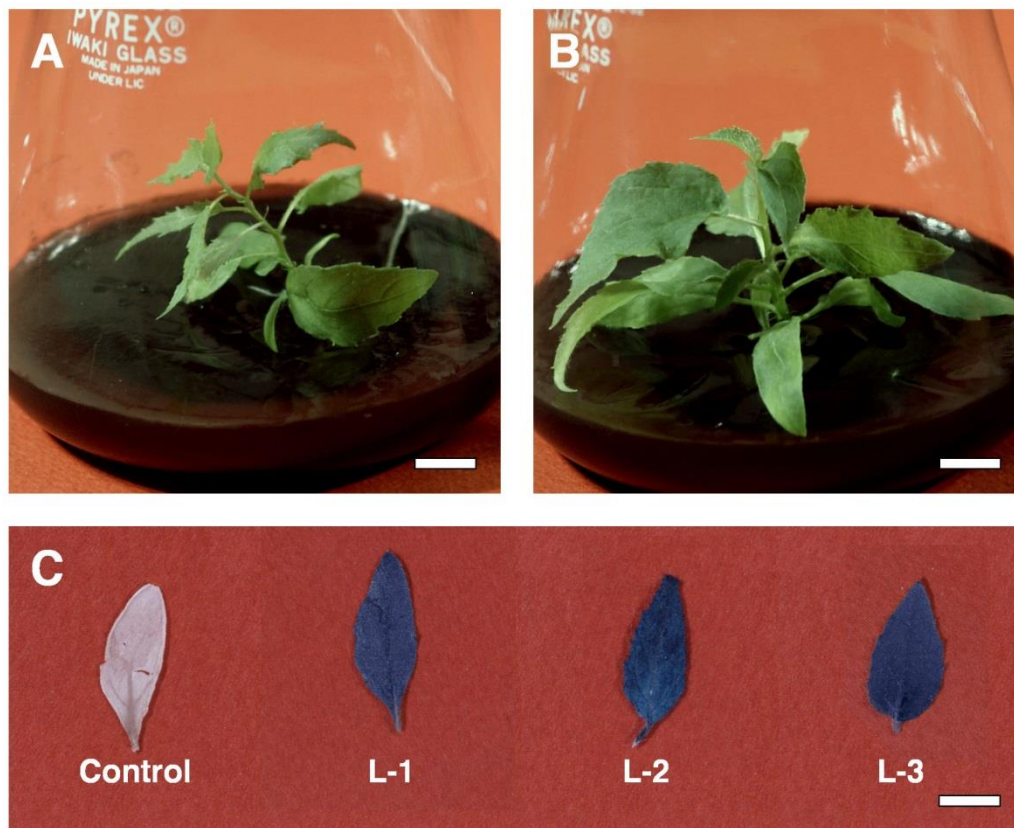


Fig. 10. Regeneration of transgenic *P. alba*. A. A control plantlet. B. A transgenic plantlet. C. Results of histochemical analysis of GUS activity in leaves of transgenic *P. alba*. A leaf of control plant and three leaves of randomly selected transgenic plants (L-1 through L-3) were subjected to histochemical staining for GUS activity. Bars: 1 cm.

組織化学的染色では、3 系統の遺伝子組換えギンドロいずれの葉においても強い GUS 活性が観察された (Fig. 10C)、これは、プロモーターP35S 下流で *GUS* 遺伝子が高レベルで発現していることを示している。また、ギンドロゲノムへの遺伝子導入は、PCR 分析によっても確認した (Fig. 11)。

以上のように、ギンドロの形質転換において除草剤を直接選抜に用いることに成功した。これは、著者が知る限り *Populus* 属における最初の報告である。これにより組換えギンドロ作出がより簡単で信頼できるものとなった。以前の除草剤耐性の組換え *Populus* 属の研究では、カナマイシンが組換えカルスと植物の選抜に使用されていた (Fillatti et al. 1987, De Block 1990, Devillard 1992, Brasileiro et al. 1992, Confalonieri et al. 2000)。著者らは、組換えポプラの選抜にカナマイシンを使用すると、「エスケープ」やキメラカルスあるいはキメラ植物が頻繁に出現することを報告している (Mohri et al. 1999)。作物の場合と同様に、組換え木本植物の選抜にも除草剤耐性を使用する利点が明確になったといえる (Potrykus 1990, Toki et al. 1992)。

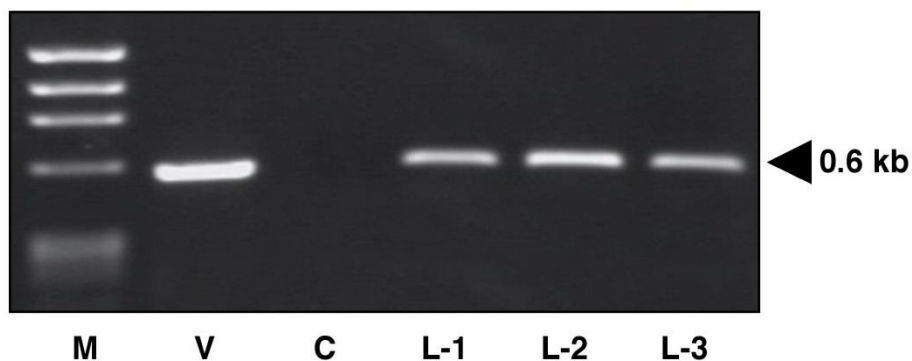
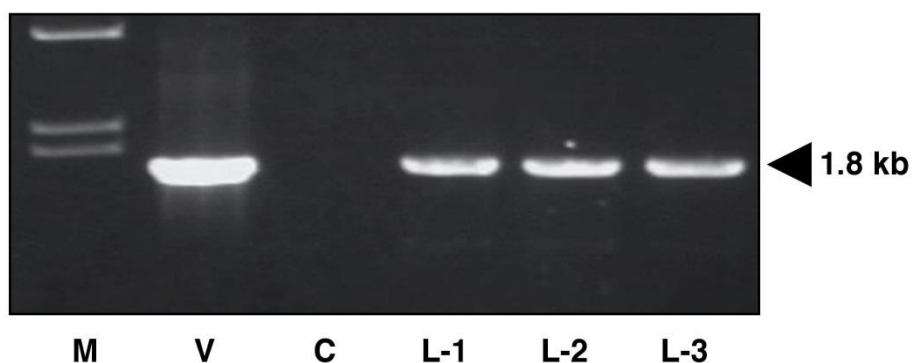
A**B**

Fig. 11. Detection by PCR of integrated *bar* and *GUS* genes in the genome of transgenic *P. alba*. **A.** PCR amplification of the *bar* gene by a set of primers BF and BR as shown in Fig. 9. **B.** PCR amplification of the *GUS* gene by a set of primers GF and GR. The arrowheads indicate the *bar* gene and the *GUS* gene. M, DNA markers; V, vector; C, control plant; L-1 through L-3, bialaphos-resistant transformants of *P. alba*.

A. tumefaciens を介した組換え *Populus* 属に関する以前の研究と同様に (Mohri et al. 1996, Confalonieri et al. 2000), 茎切片がビアラホス選抜による遺伝子組換えギンドロ作出のための最適な組織であることを確認した。しかしながら、この結果は葉切片が最良の材料と認識した他の *Populus* 属の研究のものと矛盾している (Fillatti et al. 1987, De Block 1990, Klopfenstein et al. 1991, Confalonieri et al. 1994)。したがって、組換えのための最適な組織は同じ *Populus* 属であっても、木本植物の種ごとに異なる可能性が考えられた。

4 節 総合討論

本章では、*A. tumefaciens* を用いたマメ科木本植物のニセアカシア及びヤナギ科木本植物のギ

ンドロの遺伝子組換え体作出技術の開発を行った。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も木本植物では初めての報告である。

2節では、組換えニセアカシアの選抜に使用する抗生物質の検討、感染させる *A. tumefaciens* の系統について検討した。抗生物質としては、カナマイシン、ハイグロマイシン及びジェネティシンを用いて、非組換えのニセアカシアの葉切片を効率的に死滅させる条件を予備的に検討した結果、選抜薬剤としてハイグロマイシンを用いることにし、遺伝子組換えに用いるバイナリーベクターとしては、*GUS* レポーター遺伝子と *HPT* 遺伝子を持つ pSMAH621 を用いた。形質転換体をハイグロマイシンで選抜した場合、導入した *GUS* 遺伝子の発現の組織化学的染色の結果から、「エスケープ」やキメラの個体はほとんど存在しないことがわかった。ニセアカシアに感染させる *A. tumefaciens* の系統については、opine のタイプが異なる 3 系統を試した。Nopaline タイプの GV3101 (pMP90) が最も高い感染効率を示し、Succinamopin タイプの EHA101 (pEHA101) の 10 倍近い効率を示した。また、Octopine タイプの LBA4404 (pAL4404) では、ほとんど組換え体が得られなかった。GV3101 (pMP90) /pSMAH621 を用いた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。サザンブロット解析による導入 DNA の検出から、遺伝子はゲノム中に無作為に導入されたと考えられる。本項の実験で得られた組換えニセアカシアは、外見は非組換え体と変わらなかった。これは、Han et al. (1993a) の *A. rhizogenes* を用いた組換えで、葉に形態異常が生じるというものから大きく進歩したといえ、将来の遺伝子工学的手法による品種改良の可能性を前進させる成果と考えられる。

3節では、ギンドロの遺伝子組換えを行う上で、除草剤ビアラホスが直接選抜薬剤として使用できることを示した。形質転換ポプラの選択にカナマイシンを使用すると、「エスケープ」やキメラなカルス及び植物が頻繁に出現するため (Mohri et al. 1999)、より効果的な選抜薬剤が求められていたこと、ビアラホスが土壌中では急速に失活し、土を介して作物の発芽や生長に影響を及ぼすことが無く (Toki et al. 1992)、除草剤耐性を使用する利点は作物と同様に明確であることを踏まえ、組換え実験系におけるビアラホス選抜の可能性を検証した。組換え体作出には、ニセアカシアの実験に用いた pSMAH621 の *HPT* 遺伝子を *bar* 遺伝子と置き換えたバイナリーベクター pSMAB704 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、効率よく遺伝子組換え体を再生することに成功した。導入した *GUS* 遺伝子の発現の組織化学的染色の結果から、「エスケープ」やキメラの個体はほとんど存在しないこともわかった。また、この系を使用した遺伝子組換え手法では、ニセアカシアの場合と同様に、得られた遺伝子組換え植物が形態学的異常を示すことはなかった。本節の成果は、ギンドロについて環境汚染等の可能性の低い除草剤ビアラホスを選抜薬剤として使用できる組換え実験系を初めて示したもので、野外への植栽を考えた遺伝子工学的手法による品種改良を前進させる成果と考えられる。

4章 ポプラ *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解析

1節 序論

木本植物の生長の特徴はシロイヌナズナなどのような一年生草本のものとは異なっている。特に、木本植物には、非常に長い幼若期間がある。いくつかの種では、初めて開花が起こるまでに40年という長い幼若期間を持つものもある (Hacket 1985, Greenwood 1987)。この長い幼若期間は、果樹を含む木本植物にとって、繁殖の障害となっている。開花を促進するため、植物ホルモンの塗布等の努力が行われてきたが (Mullins et al. 1989, Meilan 1997), それらの技術は特定の木本樹種だけに適合するものであったり、そのメカニズムに関する知見も乏しい。したがって、木本植物で開花の分子機構を明らかにし、遺伝子工学により開花を促進する新しい繁殖技術を開発することの重要性は明白である。

Populus 属は、パルプ、紙、板及び材木製品の原料の供給源として、重要な資源である (Mitchell et al. 1992)。この重要性のため、合衆国エネルギー省の研究費を受けた国際研究チームは *Populus* 属の1種であるブラックコottonウッド (*P. trichocarpa*) の全ゲノムの塩基配列を決定した (Tuskan et al. 2006)。セイヨウハコヤナギ (*P. nigra*) は同属で最も一般的な種の1つで、世界中に植栽されているが、この種では遺伝子組換え実験手法と完全長の expressed sequence tags (ESTs) ライブラリが整備されている (Mohri et al. 1996, Nanjo et al. 2004, Nishiguchi et al. 2006)。このような背景から、*Populus* 属は木本植物のモデル種として研究材料に用いられている。本研究でも、セイヨウハコヤナギを材料とした。

シロイヌナズナでは開花期を制御するさまざまな遺伝子が同定され、性質が調べられている (Mouradov et al. 2002, Komeda 2004)。その中でも、木本植物の長い幼若期間を理解するための取り組みとして、本研究では、開花プロモーター遺伝子 *FLOWERING LOCUS T (FT)* 現在では、その遺伝子産物の実体が開花ホルモン、フロリゲンであることが確立している (Corbesier et al. 2007, Tamaki et al. 2007) とリプレッサー遺伝子 *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* を含む遺伝子ファミリーに着目した。シロイヌナズナでは、このファミリーは *FT*, *TFL1*, *MOTHER OF FT AND TFL1 (MFT)*, *ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALISHOMOLOG (ATC)*, *TWIN SISTER OF FT (TSF)*, *BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT)* の6種の遺伝子で構成されている (Kobayashi et al. 1999b)。 *FT* と *TFL1* の遺伝子は開花期に関して拮抗作用を持っている (Kardailsky et al. 1999, Kobayashi et al. 1999b), そして、それらの効果は、遺伝子産物中にある重要なアミノ酸残基、すなわち *FT* の Tyr85/Gln140 及び *TFL1* の His88/Asp144 と深く関連している (Hanzawa et al. 2005, Ahn et al. 2006)。木本植物のいくつかの種におけるゲノム配列の比較及び機能解析から、木本植物と草本植物の両方に共通の開花制御経路が保存されていることが明らかになりつつある (Brunner and Nilsson 2004, Böhlenius et al. 2006, Hsu et al. 2006, Kotoda et al. 2006, Carmona et al. 2007)。Böhlenius et al. (2006) 及び Hsu et al. (2006) は、それぞれがブラックコottonウッドの全ゲノム配列情報に基づいて *Populus* 属の他種から *FT* の相同遺伝子を単離し、それらの相同遺伝子が開花の誘導で同様に機能することを示した。しかし、シロイヌナズナ同様に *Populus*

属においても *FT/TFL1* ファミリーには、多くのメンバーが存在していると考えられる。*Populus* 属の開花の分子機構の十分な理解のためには、そのような遺伝子の単離と機能解析が必要である。

このような背景に基づき本章では、セイヨウハコヤナギの *FT/TFL1* ファミリーの 9 遺伝子について、その単離と機能解析を行った。具体的には、ゲノム構造、系統学的関係、*FT/TFL1* ファミリーメンバーの発現パターンの解析、ならびにセイヨウハコヤナギの *FT/TFL1* ファミリー遺伝子を異所発現する組換えシロイヌナズナの表現型の解析を行った。

2 節 材料と方法

(1) 植物材料

北海道大学（札幌，日本）に植栽されているセイヨウハコヤナギ雌株を使用した。挿し木により増殖したセイヨウハコヤナギクローンを 25℃，70%相対湿度，水銀灯下（500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ，16 時間日長）のファイトトロンで育成した。

シロイヌナズナ種子は、固形培地上に播種し 4℃で 3 日間から 4 日間保冷した後、22℃，蛍光灯下（50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ，16 時間日長）のグロースチャンバに移し植物を生育させた。固形培地（MSB5 培地）の組成は、Murashige and Skoog (1962) の無機塩類，Gamborg et al. (1968) の B5 ビタミン，1% (w/v) のショ糖及び 0.4% (w/v) のジェランガムである。播種後 7 から 10 日後に苗を土に移植し，同じ条件下で育成した。

(2) Total RNA の単離

Total RNA は、セイヨウハコヤナギの様々な器官と組織から臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウムを用いて抽出し（Shinohara and Murakami 1996），Wizard® SV Total RNA Isolation kit（Promega, Madison, WI）により精製した。First strand cDNA は 5 μg の total RNA から ReverTra Ace®（東洋紡，東京，日本）及び合成（dT）₂₀ プライマーを用いた逆転写反応により合成した。

(3) セイヨウハコヤナギ *FT/TFL1* 遺伝子の単離及び配列決定

Table 5 に示すプライマーの組み合わせを使用して PCR を行った。*PnFTL* 遺伝子の部分配列は植物 *FT/TFL1* の遺伝子の保存領域に基づいた縮重プライマーにより増幅した。ORF の両端は 3' と 5' の RACE-PCR (Frohman et al. 1988) や inverse PCR (Ochman et al. 1988) により決定した。PCR 産物は、サブクローニングし、塩基配列を決定した（ABI Prism3100 及び 3100-Avant DNA シーケンサ；Applied Biosystems, Foster City, CA）。単一の雌株クローン由来の first-strand cDNA やゲノム DNA に対して増幅し、サブクローニングした PCR 産物の配列決定により、完全長の ORF やゲノム配列を決定した。PCR による乗り換わりや変異の可能性を除くため、3 回の独立した実験を行い、1 遺伝子あたり 100 クローン以上の配列を決定した。

(4) 配列の整理と系統樹の構築

ClustalW ソフトウェアを用いてアライメントを行い、N-J 法による系統樹を作成した（Saitoh and Nei 1987, Thompson et al. 1994）。1,000 回のブートストラップにより構築した系統樹を MEGA4 ソフトウェアにて表示した（Tamura et al. 2007）。

Table 5. Primers for amplification of *PnFTL* genes by RT-PCR.

| Gene | Direction ^a | Position ^b | Sequence of primer (5'-3') |
|----------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------|
| <i>PnFTL</i> -Degenerate | F | Exon II | WNMRWGARYRBBTSCAYTGG* |
| | R | Exon IV | WABAYRWHNCKRTGDATBCC* |
| <i>PnFTL1</i> | F | 5'NCR | CGTTTTTCGTTTCCTTAACCACTACAAA |
| | R | 3'NCR | GGAAAACCCACAACACTCTCTTAATCA |
| <i>PnFTL1</i> (<i>PnFTL2</i>) | F | 5'NCR | TATAGTATACAAATATTTATAGATATC |
| | R | 3'NCR | CATTCTGATTCCTGTATTATCTTCTCC |
| <i>PnFTL3</i> | F | 5'NCR | CTATATATATATATATATATACTTGTT |
| | R | 3'NCR | CTTCTTCTTGGAAGTACCCTTTAGATC |
| <i>PnFTL4</i> | F | 5'NCR | TTAGCTTTGATCTTGCTTTCGTTTTCC |
| | R | 3'NCR | ACGAGCATGCACAGAGTATTTAATAAC |
| <i>PnFT1</i> (<i>PnFTL5</i>) / | F | 5'NCR | ACACAGGTTGATCAGTGCTGAGCAAGA |
| <i>PnFT2</i> (<i>PnFTL6</i>) / | R | 3'NCR | CCATCGGGATTGAAGGGAATCTTTCTC |
| <i>PnFTL9</i> | | | |
| <i>PnFT3</i> (<i>PnFTL7</i>) / | F | 5'NCR | GCTTACGAGTGGATTTACTGTGAAAAA |
| <i>PnFT4</i> (<i>PnFTL8</i>) | R | 3'NCR | GGGAATATTTAAAGGGATATCTTCCTG |

^a F and R represent forward and reverse primers, respectively.

^b NCR represents a non-coding region.

* Mixed bases are indicated as following; M, A/C; R, A/G; W, A/T; S, C/G; Y, C/T; K, G/T; H, A/C/T; D, A/G/T; B, C/G/T; and N, A/C/G/T.

(5) 遺伝子の発現解析

セイヨウハコヤナギの *FT/TFL1* ファミリー遺伝子の発現を検出するため、' LightCycler™ FastStart DNA Master SYBR Green I' キット (Roche, Penzberg, Germany) を使用し、LightCycler™ system (Roche) で real-time PCR を行った。セイヨウハコヤナギの *FT/TFL1* ファミリー遺伝子それぞれに特異的な転写産物を増幅するため、Table 6 に示した遺伝子特異的プライマーを用いた。*polyubiquitin* (*PnUB1*) を発現の内部標準として使用し、測定値は *PnUB1* で得られる値を用いて標準化した。

Table 6. Gene-specific primers for analysis by real-time PCR

| Gene | Direction ^a | Position ^b | Sequence of primer (5'-3') |
|---------------------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| <i>PnFTL1</i> | F | CDS 287-316 | CAACTGATGTTTCCTTTGGAAAGGAAATTG |
| | R | 3'NCR | GGAAAACCCACAACACTCTCTTAATCATCA |
| <i>PnFTL1</i> (<i>PnFTL2</i>) | F | CDS 290-319 | CAACAGATGCCACATTTGGAAGGGAAGTG |
| | R | 3'NCR | CATTCTGATTCCTGTATTATCTTCTCCTCA |
| <i>PnFTL3</i> | F | CDS 287-316 | CTACAGATGCCACATTCGGAAGGGAAGTGG |
| | R | 3'NCR | CTTCTTCTTGGAAGTACCCTTTAGATCTCA |
| <i>PnFTL4</i> | F | CDS 281-310 | GCACAAACCCTACTCGAGGGAAAGAGATCC |
| | R | 3'NCR | ACGAGCATGCACAGAGTATTTAATAACTTA |
| <i>PnFT1</i> (<i>PnFTL5</i>) | F | CDS 284-313 | CTACCGGGGCAAACCTTTGGGCAAGAGGTTA |
| | R | 3'NCR | CCATCGGGATTGAAGGGAATCTTTCTCTCA* |
| <i>PnFT2</i> (<i>PnFTL6</i>) | F | CDS 284-313 | CTACCGGGGCAAACCTTTGGGCAAGAGGTTG |
| | R | 3'NCR | CCATCGGGATTGAAGGGAATCTTTCTCTCA* |
| <i>PnFT3/4</i> (<i>PnFTL7/8</i>) | F | CDS 284-313 | CAACTGGGGCAAGCTTTGGCCATGAAACTG |
| | R | 3'NCR | GGGAATATTTAAAGGGATATCTTCCTGTTA |
| <i>PnUB1</i> (control) | F | CDS 886-915 | CACTTGTTCTCCGCCTCCGTGGTGGTATG |
| | R | 3'NCR | AACCACAAATACTAGCATCATCACTGTTTA |

^a F and R represent forward and reverse primers, respectively.

* The same reverse primer was used in both cases.

(6) 遺伝子組換えシロイヌナズナの作出

Floral dip 法 (Clough and Bent 1998) により, バイナリーベクターを保持する *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) をシロイヌナズナに感染させ, 組換え体を作出した。この研究で使用したすべての遺伝子導入用バイナリーベクターは, ハイグロマイシンによる選抜を行うバイナリーベクター pSMAH621 (Igasaki et al. 2000) に *FT/TFL1* ファミリー遺伝子 cDNA を導入することによって作成した。組換えシロイヌナズナ選抜のため, 滅菌した種子を 20 mg/1 のハイグロマイシンを含む MSB5 培地に播種し, グロースチャンバで発芽させた。播種後 10 日目にハイグロマイシン耐性の

組換えシロイヌナズナを土に移植した。組換えシロイヌナズナにおける導入遺伝子の発現は、RT-PCR によって確認した。形態の分析には形質転換第 3 世代の組換えシロイヌナズナを用いた。

3節 結果

(1) セイヨウハコヤナギ *FT/TFL1* ファミリー遺伝子のクローニング

予備的なサザンブロット解析からセイヨウハコヤナギには、*FT/TFL1* ファミリー遺伝子が複数存在していることが明らかになったため、既知の *FT/TFL1* ファミリー間で高い相同性を持つ領域のアミノ酸配列に対して縮重プライマーを設計し、逆転写 PCR (RT-PCR) を行った (Fig. 12)。その結果、7 種類の異なる配列を持つ部分 cDNA が得られ、それぞれを *PnFTL1* から *PnFTL7* (*P. nigra FT/TFL1-like*) と命名した。これらの配列に続く ORF の 5' 末端と 3' 末端は、RACE-PCR ならびに、部分配列とそれに特異的なプライマーセットを用いた inverse PCR により取得した。使用したプライマーの配列は Table 5 に示した。これにより、セイヨウハコヤナギ雌株単一クローンから、9 種類の全長 ORF を含む cDNA 配列と 17 種類のゲノム DNA 配列を決定した。これらがコードするタンパク質のアミノ酸配列を Fig. 12 に示す。詳細な解析結果から、いくつかの遺伝子配列は対立遺伝子と予測されたが、セイヨウハコヤナギのゲノムには、少なくとも 9 種類の遺伝子座が存在していると予測された。cDNA 配列とゲノム遺伝子配列との比較の結果、*PnFTL7* mRNA は 2 遺伝子座から発生していることが予測された。そこで、便宜的に、より長いゲノム遺伝子配列を持つ遺伝子を *PnFTL8* と命名した。さらに、ゲノム DNA からは、*PnFTL5/PnFTL6* を増幅するのに使用するプライマーセットで、新奇遺伝子 *PnFTL9* を増幅することに成功した。しかし、複数の特異的なプライマーセットを設計し、セイヨウハコヤナギの様々な器官由来の cDNA を精力的に分析したが、*PnFTL9* の cDNA クローンを獲得することはできなかった。

(2) *PnFTL* の遺伝子の識別

塩基配列及びアミノ酸配列レベルにおいて、*PnFTL* ファミリーの遺伝子メンバーは互いにその全長にわたって高い相同性を示した (Fig. 12)。*PnFTL2* 及び *PnFTL3* は *TFL1* と非常に高い相同性を示し、一方、*PnFTL5*, *PnFTL6*, *PnFTL7*, *PnFTL8* 及び *PnFTL9* の遺伝子は *FT* と非常に高い相同性を示した (Fig. 12, Table 7)。

FT/TFL1 ファミリー遺伝子の進化的関係を理解するため、セイヨウハコヤナギ、シロイヌナズナ、トマト (*Solanum lycopersicum*)、リンゴ (*Malus x domestica*)、カンキツ (*Citrus sinensis* 及び *C. unshiu*) 及びブドウ (*Vitis vinifera*) のこのファミリーの系統発生解析を行った。全体のアミノ酸配列を整列した Neighbor-Joining (N-J) 法による解析では、4 つの主要分岐群を持つ系統樹が作成された。*PnFTL2* 及び *PnFTL3* は *TFL1* クレードに、*PnFTL5*, *PnFTL6*, *PnFTL7*, *PnFTL8* 及び *PnFTL9* は *FT* クレードに、*PnFTL1* が *BFT* クレードに、そして、*PnFTL4* が *MFT* クレードに分類された (Fig. 13)。

系統発生解析結果やその後の解析結果を踏まえ、上記のいくつかの遺伝子について以下の通りの機能的な名称、つまり、*PnFTL2*, *PnFTL5*, *PnFTL6*, *PnFTL7* 及び *PnFTL8* の遺伝子に対し、それぞれ *PnTFL1*, *PnFT1*, *PnFT2*, *PnFT3* 及び *PnFT4* と命名した (Fig. 12, Table 8 等を参照)。

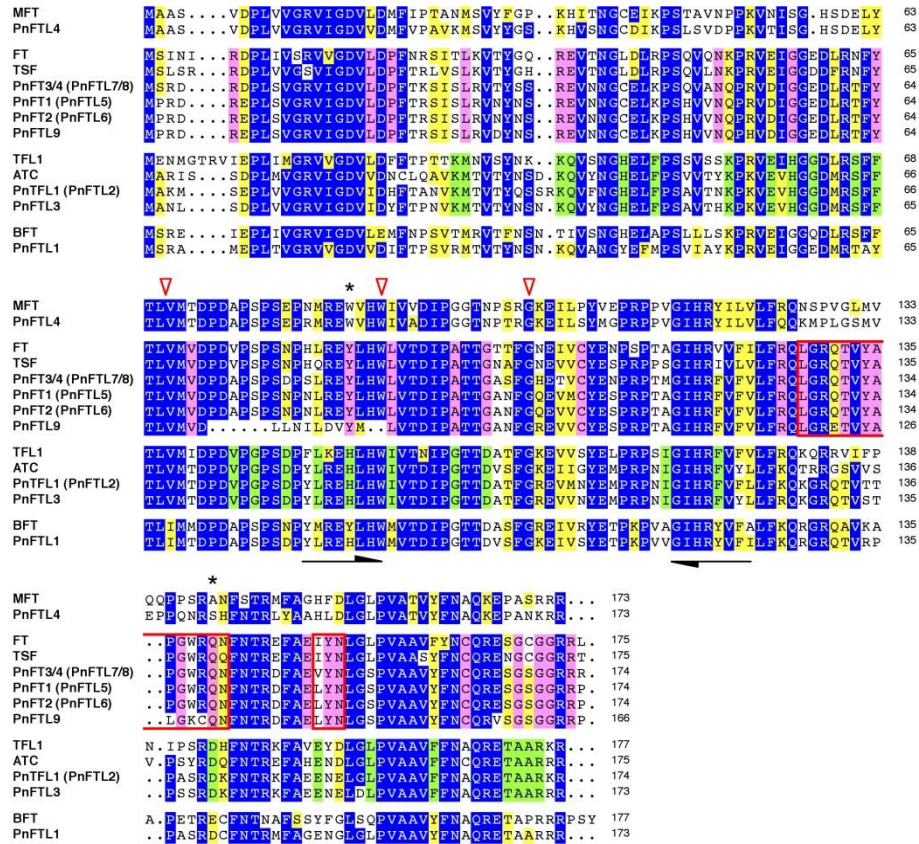


Fig. 12. Alignment of the deduced amino acid sequences of the products of the *FT/TFL1* family in Lombardy poplar and *Arabidopsis thaliana* [*FT*, AGI (Arabidopsis Genome Initiative; <http://www.arabidopsis.org>) code At1g65480; *TFL1*, AGI code At5g03840; *MFT*, AGI code At1g18100; *ATC*, AGI code At2g27550; *TSF*, AGI code At4g20370; and *BFT*, AGI code At5g62040]. All poplar sequences were derived from an individual female clone of Lombardy poplar (PnF-1). Amino acids in blue and in yellow are identical and similar, respectively, in at least ten of the fourteen members of the *FT/TFL1* family. Amino acids common to genes in the *FT* clade are shown in pink and those in the *TFL1* clade are shown in green. Dots indicate gaps introduced to maximize the extent of homology among sequences. The Arabic numerals in the sequences represent the positions of amino acid residues from the site of initiation of translation site. The multiple alignments were generated with ClustalW software. Half-arrows indicate the positions of degenerate primers for PCR that we used for the first cloning of the partial cDNAs. Arrowheads indicate the positions of introns. Asterisks indicate amino acids that are critical to the definition of proteins in the *FT* and *TFL1* clade. Two red boxes indicate the regions that are essential for FT-like activity in exon IV.

Table 7. Comparison of the deduced amino acid sequences encoded by *PnFTL* genes with those encoded by *FT* and *TFL1*.

| Gene | Homology to TFL1 | Homology to FT |
|--|--------------------------|--------------------------|
| | Identity/ Similarity (%) | Identity/ Similarity (%) |
| <i>PnFTL1</i> | 62.4/ 76.4 | 58.5/ 68.9 |
| <i>PnTFL1 (PnFTL2)</i> | 70.9/ 82.1 | 56.5/ 68.9 |
| <i>PnFTL3</i> | 71.3/ 83.7 | 56.8/ 67.6 |
| <i>PnFTL4</i> | 48.9/ 62.4 | 44.6/ 58.2 |
| <i>PnFT1 (PnFTL5)</i> | 55.9/ 66.5 | 76.6/ 85.1 |
| <i>PnFT2 (PnFTL6)</i> | 56.4/ 66.5 | 77.1/ 85.1 |
| <i>PnFT3 (PnFTL7) / PnFT4 (PnFTL8)</i> | 55.3/ 68.2 | 78.3/ 85.7 |
| <i>PnFTL9</i> | 48.6/ 59.2 | 65.7/ 74.3 |

Identity and Similarity were calculated by ClustalW software (Thompson et al. 1994) .

PnFTL 遺伝子のゲノムクローンの配列からは、4つのエキソンと3つのイントロンが予測された (Fig. 14A)。すべての遺伝子について、このゲノム構造が保存されており、シロイヌナズナ *FT/TFL1* ファミリー遺伝子のメンバーのアミノ酸配列と相同の位置にエキソンがあった (Fig. 12, Fig. 14A)。セイヨウハコヤナギでは、エキソン I と IV の長さはそれぞれ、195 から 204bp 及び 218 から 224bp の範囲でバリエーションがあった。エキソン II は、*PnFTL9* が 38 bp であったが、他の遺伝子はすべて 62bp であった。エキソン III はすべての遺伝子において 41bp で保存されていた。一方、イントロンの長さは多様であった。シロイヌナズナのように、*TFL1* と *BFT* クレードの遺伝子である *PnFTL1*, *PnTFL1* 及び *PnFTL3* は、短いイントロンで、81 から 353bp であったが、*FT* と *MFT* クレードの遺伝子である *PnFTL4*, *PnFT1*, *PnFT2*, *PnFT3*, *PnFT4* 及び *PnFTL9* は、112 から 1,603bp という長いイントロンを保持していた (Fig. 14A)。

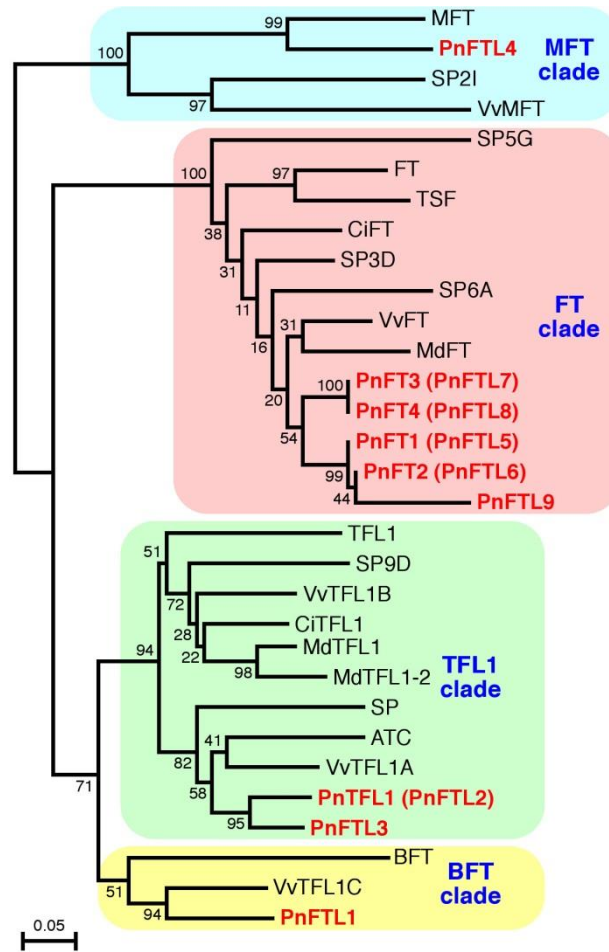


Fig. 13. Phylogenetic analysis of the members in the *FT/TFL1* family. The tree was constructed by the Neighbor-Joining (N-J) method for members of the *FT/TFL1* family in Lombardy poplar (*PnFTL1*, *PnTFL1*, *PnFTL3*, *PnFTL4*, *PnFT15*, *PnFT2*, *PnFT3*, *PnFT4*, *PnFTL9*), *A. thaliana* (*FT*, *TFL1*, *MFT*, *ATC*, *FT*, *TSF*, *BFT*), tomato (*SP*, accession no. U84140; *SP2I*, accession no. AY186734; *SP3D*, accession no. AY186735; *SP5G*, accession no. AY186736; *SP6A*, accession no. AY186737; and *SP9D*, accession no. AY186738), grape vine (*VvFT*, accession no. DQ871590; *VvTFL1A*, accession no. DQ871591; *VvTFL1B*, accession no. DQ871592; *VvTFL1C*, accession no. DQ871593; and *VvMFT*, accession no. DQ871594), apple (*MdTFL1*, accession no. AB162040; *MdTFL1-2*, accession no. AB162046; and *MdFT*, accession no. AB161112) and citrus (*CiFT*, accession no. AB027456; and *CiTFL1*, accession no. AY344244). The N-J unrooted dendrograms were generated from alignment of deduced amino acids with the ClustalW program and the phylogenetic tree was displayed by the MEGA4 software package (Tamura et al. 2007). Bootstrap values for 100 resamplings are shown on each branch. The scale indicates the average number of substitutions per site. Genes in Lombardy poplar are in red.

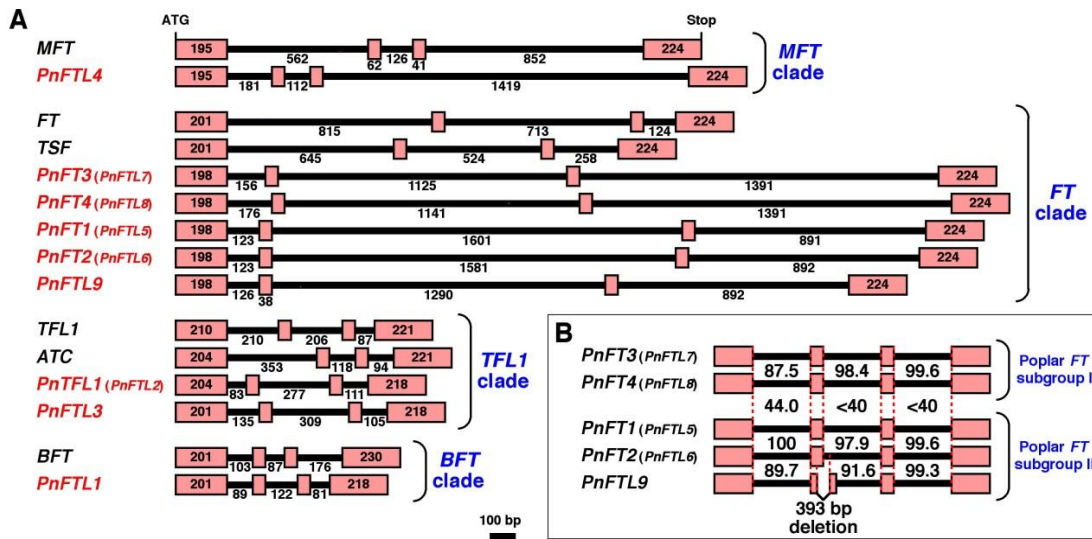


Fig. 14. (A) Genomic organization of members of the *FT/TFL1* family in Lombardy poplar and *Arabidopsis*. Boxes represent exons and lines represent introns. Numbers indicate the lengths of exons and introns (bp). (B) Comparison of the introns in genes in the *FT* clade. The similarities between introns (as percentages) are shown.

セイヨウハコヤナギの *FT* クレード遺伝子はさらに2つのサブグループに分類できる。サブグループ I は *PnFT3* と *PnFT4* から成り、サブグループ II は *PnFT1*, *PnFT2* 及び *PnFTL9* から成る (Fig. 13, Fig. 14B)。イントロンの配列は各サブグループ内では、85%以上の相同性を示したが、サブグループ間では50%未満であった。また、*PnFTL9* は *PnFT2* のエキソン II とイントロン II に対応する領域に393bpの欠失があった (Fig. 14B)。

全配列が解読されているブラックコottonウツドのゲノム中の *PnFTL/FT* 相同遺伝子を探索した (<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>)。非 *FT* クレードのそれぞれの遺伝子のすなわち、*PnFTL1*, *PnTFL1*, *PnFTL3* 及び *PnFTL4* について、ブラックコottonウツドの対応するゲノム配列を見つけた (Table 8)。 *FT* クレードについては、セイヨウハコヤナギのサブグループ I の2つの遺伝子に対応する遺伝子は、ブラックコottonウツドにおいては1遺伝子座しか見つからなかった (Table 8)。対照的に、サブグループ II の3つの遺伝子については、それぞれ対応する遺伝子が存在していた (Table 8)。

FT の機能を示すのに不可欠な領域での欠損や大規模な置換が存在すること、さらには遺伝子発現が検出されないことから、*PnFTL9* は機能していないと判断したので、その後の研究から *PnFTL9* を除外した (Fig. 12, 14B)。

(3) *PnFTL* 遺伝子の器官特異的発現パターン

セイヨウハコヤナギ *PnFTL* 遺伝子の発現を、各遺伝子に特異的なプライマーを用いてリアルタイム RT-PCR によって調べた (Table 6)。 *TFL1* クレードでは、*PnTFL1* は下胚軸部、上胚軸及び幼若期と生殖期の両方の冬芽で発現し (Fig. 15B), *PnFTL3* は主に種子で発現していた (Fig. 15C)。

また、*PnFTL3*は冬芽においても発現が検出されたが、発現レベルは、*PnFTL1*の1/1000程度であった (Fig. 15C)。

Table 8. Comparison of *PnFTL* genes with those in the genome of black cottonwood.

| Lombardy poplar | Black cottonwood |
|---------------------------------|--|
| Gene | Location of counterpart |
| <i>PnFTL1</i> | chromosome XV |
| <i>PnFTL1</i> (<i>PnFTL2</i>) | Scaffold_66* |
| <i>PnFTL3</i> | chromosome IX |
| <i>PnFTL4</i> | chromosome XV |
| <i>PnFT1</i> (<i>PnFTL5</i>) | <div> <div>chromosome X</div> <div>Scaffold_1409*</div> <div>Scaffold_1444*</div> </div> |
| <i>PnFT2</i> (<i>PnFTL6</i>) | |
| <i>PnFTL9</i> | |
| <i>PnFT3</i> (<i>PnFTL7</i>) | chromosome VIII |
| <i>PnFT4</i> (<i>PnFTL8</i>) | |

* A scaffold is a portion of the genomic sequence that has been reconstructed from end-sequenced whole-genome shotgun clones; the actual location of each scaffold within the genome is unknown.

FT クレードでは、*PnFT1* はほとんどすべての器官で発現し、生殖期の初夏の葉やさく果でとりわけ高いレベルであった (Fig. 15E)。同様に、生殖期の初夏の葉やさく果で *PnFT2* の強い発現を検出したが、根、茎、冬芽などの栄養生長器官での発現レベルは、*PnFT1* のものと比較して非常に低かった (Fig. 15F)。*PnFT3/4* の発現パターンはかなり異なっていた。*PnFT3/4* は、茎と冬芽で強い発現が検出され、生殖期の初夏の葉での発現はほとんど検出できなかった (Fig. 15G)。

BFT の相同遺伝子の *PnFTL1* 遺伝子は主に幼若期の器官で発現しており (Fig. 15A)、そして、*MFT* の相同遺伝子の *PnFTL4* は種子においてほぼ特異的に発現していた (Fig. 15D)。

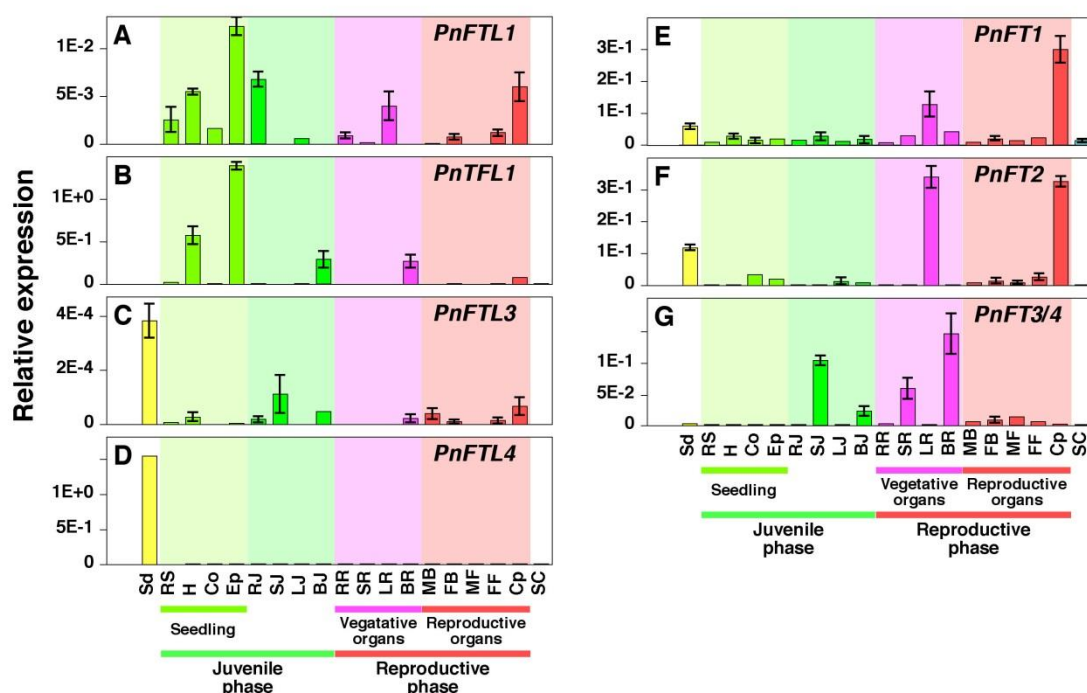


Fig. 15. Expression of genes in the *FT/TFL1* family in various organs and cells of Lombardy poplar. An aliquot of first-strand cDNA mixture, corresponding to 50 ng of total RNA, was amplified by PCR with gene-specific primers, as listed in Table 6. Levels of detected amplicons were normalized by reference to amplified products that corresponded to the gene for polyubiquitin in Lombardy poplar (*PnUB1*; accession no. AB182939). Values are means \pm SE from results of three to six replicates. Sd, Seeds; RS, H, Co and Ep, roots, hypocotyls, cotyledons and epicotyls of two-week-old seedlings; RJ, SJ, LJ and BJ, roots, stems, early-summer leaves and winter lateral buds of juvenile-phase plants; RR, SR, LR, BR, MB, FB, MF, FF and Cp, roots, stems, early-summer leaves, winter lateral buds, male flower buds, female flower buds, male flowers, female flowers and capsules of reproductive phase plants; and SC, cells of Lombardy poplar in suspension culture.

(4) *PnFTL* 遺伝子発現の季節変動

FT クレード遺伝子, *PnFT1*, *PnFT2* 及び *PnFT3/4* 遺伝子の発現の詳細なパターンを調べるため, 葉や側芽を幼若期の徒長枝や生殖期の徒長枝及び果枝から別々に集めた。果枝の将来花芽になるであろう領域から単離した側芽は, 約 86%の確率で花芽に分化した (データは示していない)。5月の終わりに, 生殖期の徒長枝及び果枝の葉で *PnFT1* と *PnFT2* の強い発現が検出され, その発現レベルは幼若期の徒長枝の葉における発現レベルの約 1,000 倍になった (Fig. 16A, B)。この発現は 8 月中旬までに, もとのレベルにまで下がった (Fig. 16A, B)。幼若期のセイヨウハコヤナギについては, この期間, 葉での発現レベルに顕著な変化は観察されなかった (Fig. 16A, B)。しかし, *PnFT1* と *PnFT2* の発現レベルはすべての枝の側芽においては極めて低く, 季節変動を観

測することはできなかった（データは示していない）。

PnFT3/4 の発現パターンは *PnFT1* や *PnFT2* のものと異なっていた (Fig. 16C)。セネッセンスが始まる11月初旬の各枝の葉では, *PnFT3/4* の発現が20から100倍程度に上昇していた (Fig. 16C)。同様に, 各枝の側芽でも, *PnFT3/4* の発現レベルは11月初旬に約10倍に上昇していた (Fig. 16D)。

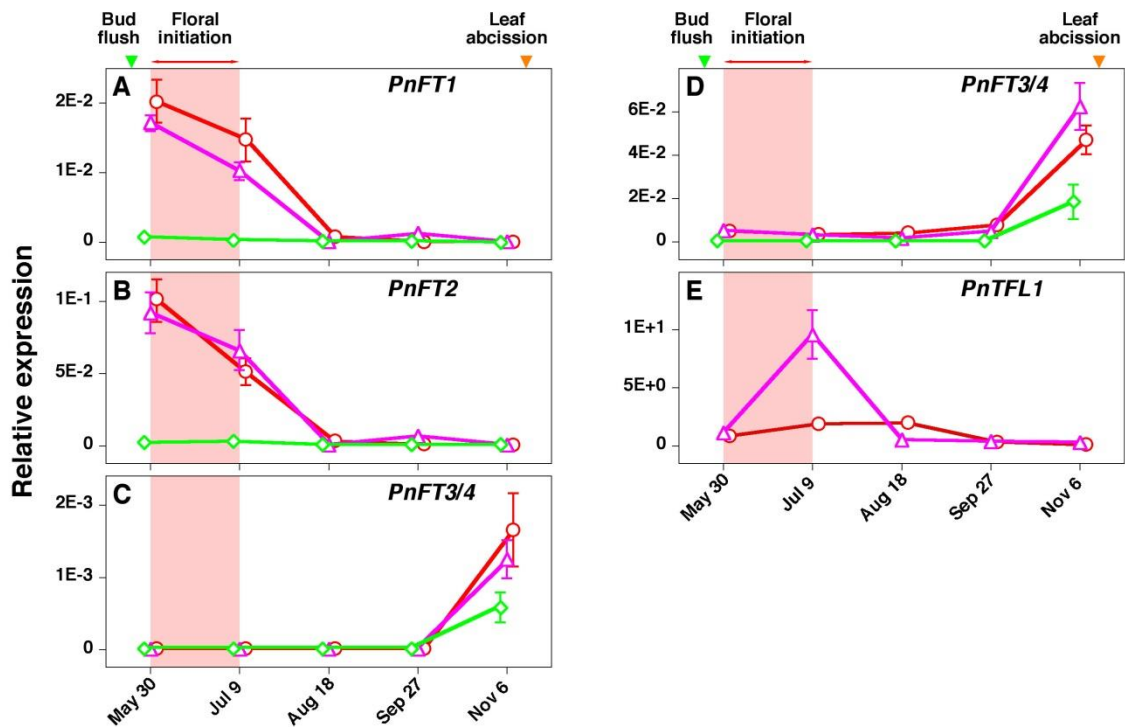


Fig. 16. Seasonal variations in the expression of genes in the *FT/TFL1* family of Lombardy poplar. (A) through (E) show the expression of *PnFT1* (A), *PnFT2* (B) and *PnFT3/4* (C) in the leaves and the expression of *PnFT3/4* (D) and *PnTFL1* (E) in the lateral buds of Lombardy poplar trees at the juvenile phase (5 years old; diamonds) and on healthy branches (triangles) and fruit-bearing branches (circles) of trees in the reproductive phase (more than 30 years old). Shaded areas indicate the probable period for initiation of flowers, and arrowheads indicate the periods of bud flush and leaf abscission. Five mature leaves and three sets of lateral buds (approximately 200 mg each) were collected and pooled at 2 p.m. on the date indicated. An aliquot of first-strand cDNA mixture, corresponding to 0.5 μ g of total RNA, was amplified by PCR with gene-specific primers. Levels of detected amplicons were normalized by reference to amplified products that corresponded to the *PnUB1*. Values are means \pm SE of results from five replicates. Each symbol without a bar indicates that the SE fell within the symbol.

各枝の側芽での *PnTFL1* の発現パターンの解析も行った。*PnTFL1* の発現レベルは, 徒長枝の側芽で7月初旬に10倍に上昇し, 8月中旬までには基礎レベルにまで下降した (Fig. 16E)。同様のパターンは幼若期の側芽においても観測された (データは示していない)。しかし, 果枝の側芽

では、*PnTFL1* の発現レベルは7月初旬でも約2倍程度までしか上昇しなかった (Fig. 16E)。

(5) 異所的に *PnFTL* 遺伝子を発現する組換えシロイヌナズナの表現型

PnFTL 遺伝子の機能を決定するため、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (P35S) 制御下においたそれぞれの遺伝子の ORF をシロイヌナズナに導入した組換え体を作出した。そして、各々の遺伝子についてその表現型を観察するため、12 の独立した形質転換第3世代ホモ接合型の組換え体を選択した (すなわち、以下のすべての記述は $n=12$)。

長日条件下 (LD; 昼/夜=16時間/8時間) では野生型のシロイヌナズナの花成が 22.7 ± 0.5 日であるのに対し、*TFL1* クレードの遺伝子を異所発現する P35S::*PnTFL1* 及び P35S::*PnFTL3* の組換えシロイヌナズナでは、それぞれ 40.3 ± 5.7 日及び 36.8 ± 4.4 日を必要とした (Fig. 17A-C, Table 9)。さらに、P35S::*PnTFL1* あるいは P35S::*PnFTL3* を導入した組換えシロイヌナズナの形質転換第1世代には、5ヶ月以上開花せず、種子が得られなかった系統がそれぞれ2系統ずつあった (データは示していない)。抽だい前のロゼット葉数の増加でわかるように、それぞれの遺伝子はシロイヌナズナの幼若期間や早期の花序形成に影響を及ぼした。LD 条件下では、幼若期間中に野生型シロイヌナズナは、 6.7 ± 0.5 枚のロゼット葉を形成するが、P35S::*PnTFL1* 及び P35S::*PnFTL3* の組換えシロイヌナズナは、それぞれ 10.6 ± 0.4 枚及び 10.0 ± 0.6 枚のロゼット葉を形成した (Table 9)。また、どちらの組換えシロイヌナズナにおいても、抽だい後の茎生葉の数が、野生型シロイヌナズナと比較して多かった (データは示していない)。さらに、葉様のがく片を持つ異常な花が頻繁に観測され (Fig. 17J-L)、時折、花自体に新たな花序が形成した。

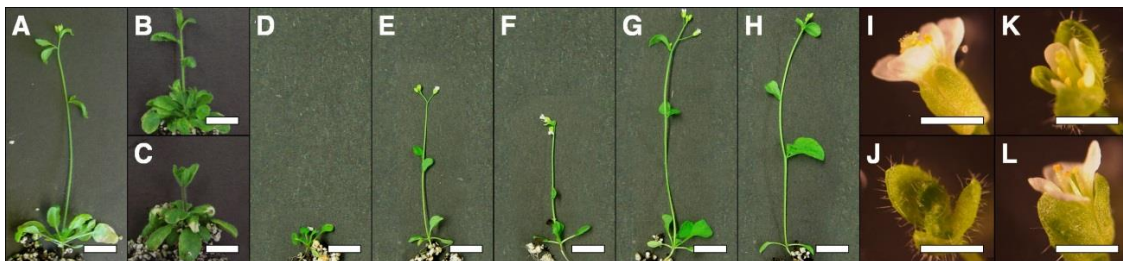


Fig. 17 Phenotypes of transgenic *Arabidopsis* ectopically expressed genes in the *FT/TFL1* family from Lombardy poplar under long-day condition. Photographs (A) through (H) show a 21-day-old wild-type plant (A; control) , 35-day-old transgenic plants that harbored P35S::*PnTFL1* (B) and P35S::*PnFTL3* (C) , a 14-day-old wild-type plant (D; control) , and 14-day-old transgenic plants that harbored P35S::*FT* (E) , P35S::*PnFT1* (F) , P35S::*PnFT2* (G) and P35S::*PnFT3/4* (H) . Photographs (I) through (L) show flowers of wild-type (I) and transgenic P35S::*PnTFL1* plants (J-L) . Bars in (A) through (H) represent 1 cm and those in (I) through (L) represent 1 mm.

対照的に、*FT* クレードの遺伝子を異所発現する P35S::*PnFT1* や P35S::*PnFT2* 及び P35S::*PnFT3/4* の組換えシロイヌナズナでは、劇的な早期開花を示した (Fig. 17F-H, Table 9)。P35S::*PnFT1*

や P35S::*PnFT2* 及び P35S::*PnFT3/4* の組換えシロイヌナズナは、それぞれ、 12.0 ± 0.4 日、 11.7 ± 0.5 日及び 13.0 ± 0.5 日後に開花し、また、それぞれの植物には、 2.1 ± 0.1 枚、 2.4 ± 0.2 枚及び 2.9 ± 0.2 枚のロゼット葉しか形成しなかった (Table 9)。

Table 9. Phenotypes of *Arabidopsis* plants that ectopically expressed individual *PnFTL* genes.

| Construct | Day to flowering | Number of rosette leaves |
|---|------------------|--------------------------|
| WS (Control) | 22.7 ± 0.5^b | 6.7 ± 0.5^b |
| P35S:: <i>FT</i> | 14.5 ± 0.5^a | 3.5 ± 0.4^a |
| P35S:: <i>PnFT1</i> (<i>PnFTL5</i>) | 12.0 ± 0.4^a | 2.1 ± 0.1^a |
| P35S:: <i>PnFT2</i> (<i>PnFTL6</i>) | 11.7 ± 0.5^a | 2.4 ± 0.2^a |
| P35S:: <i>PnFT3/4</i> (<i>PnFTL7/8</i>) | 13.0 ± 0.5^a | 2.9 ± 0.2^a |
| P35S:: <i>TFL1</i> | 31.7 ± 1.9^c | 8.5 ± 0.6^c |
| P35S:: <i>PnTFL1</i> (<i>PnFTL2</i>) | 40.3 ± 5.7^c | 10.6 ± 0.4^c |
| P35S:: <i>PnFTL3</i> | 36.8 ± 4.4^c | 10.0 ± 0.6^c |
| P35S:: <i>PnFTL1</i> | 20.3 ± 0.4^b | 6.4 ± 0.1^b |
| P35S:: <i>PnFTL4</i> | 22.8 ± 0.4^b | 6.8 ± 0.4^b |

Plants were grown under LD. Values are means \pm S.E. of results from twelve independent lines of transgenic plants. Scheffé's multiple-comparison test was used to compare the effects of treatments. Letters, as superscripts, indicate a statistically significant difference from results with other letters in the same column ($p < 0.05$).

PnFTL1 と *PnFTL4* は LD 条件下では、花の形態や開花時期に影響しなかった。P35S::*PnFTL1* 及び P35S::*PnFTL4* の組換えシロイヌナズナは、それぞれ、 20.3 ± 0.4 日及び 22.8 ± 0.4 日後に開花し、それぞれの植物は、 6.4 ± 0.1 枚及び 6.8 ± 0.4 枚のロゼット葉を形成した (Table 9)。

4節 考察

本章では、塩基配列やゲノム構造の比較によって、9 種類の *PnFTL* 遺伝子ファミリーを同定した (Table 7, Fig. 14)。著者は、シロイヌナズナ、トマト、イネ (*Oryza sativa*) 及びブドウで単離された数と比較して十分な数の遺伝子が単離できていることや (Kobayashi et al. 1999b, Carmel-Goren et al. 2003, Chardon and Damerval 2005, Carmona 2007)、同属のブラックコッ

トンウッドのゲノムとの比較結果から (Table 8), セイヨウハコヤナギの *FT/TFL1* 遺伝子ファミリーのすべてのメンバーを単離し, 同定したと考えている。系統発生解析により, 9 種類の遺伝子は 4 つのクレードにわかれた。*TFL1* クレードには 2 種, *FT* クレードには 5 種, そして, *MFT* と *BFT* クレードにはそれぞれ 1 種ずつ遺伝子が存在した (Fig. 13)。これらの結果は著者が知る限り, *Populus* 属における, *FT/TFL1* ファミリーの最初の包括的記述であり, *Populus* 属の *TFL1* クレード遺伝子の機能を示した初めての例である。

PnTFL1 の発現パターンからは, この遺伝子の機能が側芽のような分裂組織の性質をもつ領域に関連していることが観察され (Fig. 15B), この遺伝子の発現レベルは, 花芽形成時期の側芽で顕著に増加した (Fig. 16E)。*PnFTL3* の発現パターンは完全には一致しないものの, *PnTFL1* の発現パターンに類似しており (Fig. 15B, C), 両方の遺伝子はともに組換えシロイヌナズナにおいて花成を抑制した (Fig. 17B, C, Table 9)。そのうえ, P35S::*PnTFL1* 及び P35S::*PnFTL3* の組換えシロイヌナズナでは, 葉様のがく片が観察された (Fig. 17J-L)。シロイヌナズナの *TFL1* (Ratcliffe et al. 1998), ホソムギの *LpTFL1* (Jensen et al. 2001) 及びブドウの *VvTFL1A* (Carmona et al. 2007) など, 他植物の *TFL1* クレード遺伝子を異所発現する組換えシロイヌナズナでも同様の表現型の観察が知られている。したがって, 本研究の結果は, これらの遺伝子が, 他の植物の場合と同様に, セイヨウハコヤナギにおいても栄養生長のための分裂組織の機能を維持する役割を持つことを示している。他の木本植物, カンキツ及びリンゴでは, *TFL1* 様遺伝子が, 幼若期間の制御に関与することが示唆されている (Pillitteri et al. 2004, Kotoda et al. 2006)。今後, *PnTFL1* の発現を抑制することで, セイヨウハコヤナギの幼若期間の長さを減少させるかどうか調べたいと考えている。組換えセイヨウハコヤナギを用いてこれらの遺伝子のさらなる解析をすることで, 幼若期から生殖期への変遷にこれらの遺伝子がどのように関与しているのかについての知見が得られるものと期待できる。

FT クレードのそれぞれの遺伝子の発現パターンは, サブグループ I (*PnFT3* 及び *PnFT4*) とサブグループ II (*PnFT1* 及び *PnFT2*) の間で異なったが, 組換えシロイヌナズナにおいては, よく似た *FT* 様の活性を示した (Fig. 17F-H, Table 9)。*PnFT1* と *PnFT2* の発現パターンは完全に一致しないが (Fig. 16A, B), サブグループ II の遺伝子は, 主に生殖期のセイヨウハコヤナギの初夏の葉で発現し, 幼若期の葉では発現していなかった。この観察は, Hsu et al. (2006) が報告したイースタンコットンウッド (*P. deltoides*) の *FT* 遺伝子の結果と類似しており, ポプラの幼若期から生殖期へのステージの発達に, この遺伝子の発現の増加が重要である可能性を示唆している。したがって, ポプラにおいても, シロイヌナズナやイネのように, 葉で作られ出された *FT* タンパク質が分裂組織に移動し, 開花を促進している可能性がある (Corbesier et al. 2007, Tamaki et al. 2007)。しかしながら, これらの遺伝子の発現パターンと発現レベルに関して, 果枝とめったに花をつけない徒長枝との間での違いをみいだすことはできなかった (Fig. 16A, B)。栄養成長期か生殖成長期かという枝の状態は, *FT* 及び関連遺伝子の発現パターンや発現レベルに加え, 別の因子によっても制御されている可能性が考えられる。花芽形成期の果枝と徒長枝では葉での *FT* クレード遺伝子の発現に差は観察されないが, 同時期の側芽で *PnTFL1* 遺伝子が顕著に発現している徒長枝では側芽が翌年の葉芽に, 発現の低い果枝では側芽の多くが翌年の花芽になることから,

PnTFL1 の発現パターンや発現レベルが花成開始の因子の候補の一つである可能性も考えられる。対照的に、別のサブグループである *PnFT3/4* の発現は、幼若期及び生殖期の両方で1年の終わりのセネッセンス時期の葉で上昇する (Fig. 16C)。これらの結果は、ヨーロッパポプラ (*P. tremula*) における *PnFT3/4* の対応遺伝子の発現の増加が、短日誘導的な生長の停止に重要であるとする Böhlenius et al. (2006) による提案と一致する。しかしながら、この遺伝子はヨーロッパポプラの初夏の葉でも発現が上昇し、同じ遺伝子によって花成も制御されている (Böhlenius et al. 2006)。ヨーロッパポプラはこの点でセイヨウハコヤナギと非常に異なっているが、*Populus* 属内の種間あるいは節間差であるのかは判断できない。一方で、それぞれのサブグループの *FT* 遺伝子を過剰に発現した組換えのヨーロッパポプラの解析により、花成の促進は単に内生の機能的な *FT* タンパク質の量の増加に依存するという報告がなされている (Böhlenius et al. 2006; Hsu et al. 2006)。

PnFTL1 遺伝子も *PnFTL4* 遺伝子も異所発現する組換えシロイヌナズナにおいて、開花期に影響を及ぼさなかった (Table 9)。しかしながら、両方の遺伝子ともに、制限された発現パターンとそれぞれのクレードにおいて他種から単離されたものと同様の保存されたアミノ酸配列を保持していることから、これらの遺伝子は機能していると考えられる。さらなる解析が、この仮定を有効にするのには必要である。

セイヨウハコヤナギとブラックコットンウッドでは、*FT* クレード遺伝子がそれぞれ5種と4種であった (Table 8)。他の種では、*FT* クレード遺伝子は、1から3種で、すなわち、シロイヌナズナ、トマト、イネ及びブドウでは、それぞれ2種、3種、2種及び1種である (Kobayashi et al. 1999b, Carmel-Goren et al. 2003, Chardon and Damerval 2005, Carmona et al. 2007)。*FT* クレード遺伝子の冗長性が高いことは、これらの遺伝子が *Populus* 属のライフサイクルでのとくに重要な役割を担っていることを示しているのかもしれない。

要約すると、本研究では、セイヨウハコヤナギから9種類の *FT/TFL1* ファミリー遺伝子を単離し、その産物についての機能解析を行った。今後の目標は、単に開花のメカニズムを明らかにすることのみならず、木本植物において開花を制御する現象を解明することにより、その知見を育種目的につなげることである。

5章 総合考察

本研究では、スギ花粉症対策として、将来、花成の制御を目的としたスギの遺伝子組換え体の作出の足掛かりとなるように、スギの安定な個体再生技術の開発や木本植物の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を行った。

スギの安定なカルス経由の個体再生技術として、不定胚形成とそれを発芽させることによる個体再生法を確立したことや (Igasaki et al. 2003b)、その過程で PSK を利用することで植物体再生効率が顕著に上昇すること、被子植物で発見された PSK 遺伝子がスギ等裸子植物にも保存されていること (Igasaki et al. 2003a) が第2章で示した本研究の成果である。これらの成果により、スギの遺伝子組換え体の作出は現実味をおびたといえる。当時は十分な数の不定胚形成細胞を誘導するのに数多くの未熟種子胚を処理する必要がある、その未熟種子胚自体が自然交配によって生じた形質が不明なスギであったため、実用的なスギの遺伝子組換え体の作出には不向きであると考えられていた。この対処方法として、不定胚形成細胞から個体再生したスギを十分に生育させ、その形質を判断してから、遺伝子導入を行うということが考えられるが、現状では不定胚形成細胞の個体再生能力は、PSK を用いた場合においても、時間とともに減少する。したがって、不定胚形成細胞の有効な凍結保存法や個体再生能力維持のための手法の開発がその解決方法の一つである。一方、不定胚形成細胞を既に形質がはっきりしているスギ精英樹の葉等の体細胞組織から誘導するという手法が考えられるが、成功例はない。ただ、スギ精英樹同志を人工交配させ、形質は不明であるが良いものである確率が高い不定胚形成細胞を作成し、それを利用したスギの遺伝子組換え体の作出は可能となっている (Konagaya et al. 2013)。

研究着手の時点ではスギの個体再生技術が存在していなかったこともあり、木本植物への *A. tumefaciens* を用いた遺伝子組換え体作出技術の効率化を試み、マメ科木本植物のニセアカシア及びヤナギ科木本植物ギンドロへの安定な組換え遺伝子の導入法を確立したこと (Igasaki et al. 2000, 2002) が第3章で示した本研究の成果である。ニセアカシアへの *A. tumefaciens* を用いた遺伝子組換え体の作出は世界で初めての報告であり、除草剤ピアラホスで組換え体を直接選抜する方法も木本植物では世界で初めての試みであった。ニセアカシアに関しては、これ以前に開発された遺伝子組換え手法を用いた場合葉の形態異常が生じていたが (Han et al. 1993b)、本研究の成果により形態異常を生じない遺伝子組換え木本植物の作製技術が確立できた。また、ギンドロの *A. tumefaciens* を用いた遺伝子組換えに関しては、抗生物質ではなく、安全性が確認されている一般的な除草剤を直接選抜薬剤として用いることで、将来の遺伝子組換え木本植物の野外植栽を視野に入れた手法が開発できたと考えている。いずれの木本植物の組換え手法においても、得られた組換え個体の生長や形態は、非形質転換植物のものと変わらなかった。これらの成果を、スギへ応用する場合には、*A. tumefaciens* の系統や導入遺伝子を目的に従って発現させるためのプロモーター等もスギに適したものを選定する必要がある。現在、本研究において開発されたスギ個体再生技術に基づいて開発された *A. tumefaciens* を用いた遺伝子組換え体作出法 (Konagaya et al. 2013) では、トウモロコシ (*Zea mays*) のプロモーターを利用する等の発現系の

改良が進められている。

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。ヤナギ科木本植物セイヨウハコヤナギから *FT/TFL1* ファミリー遺伝子を網羅的に単離し、その 9 種類の遺伝子の機能を同定したこと (Igasaki et al. 2008) が第 4 章で示した本研究の成果である。シロイヌナズナ、トマト、ブドウの相同遺伝子との比較から、これら *FT/TFL1* ファミリー遺伝子は、種を越えて共通のエクソン・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 つの遺伝子は *MOTHER OF FT AND TFL1* と *BROTHER OF FT AND TFL1* の遺伝子群に 1 つずつ属していた。*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すことが明らかになった。また、*FT* 遺伝子群に属する *PnFT1* 及び *PnFT2* の 2 つの遺伝子は、開花の始動に関与することを予測させる生殖生長期の個体の花成誘導時期に特異的な発現パターンを示し、*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。これらのことから、木本類の *FT/TFL1* 遺伝子ファミリー遺伝子も花成制御に関与することが示された。スギにおいても、既に完全長の cDNA の大量収集が進められており (Futamura et al. 2008)、*FT/TFL1* 遺伝子ファミリー遺伝子の存在をみとめることができる。本研究はセイヨウハコヤナギを研究対象としたが、このように、草本植物のシロイヌナズナ等と共通の遺伝子が発見されたことや遺伝子の機能が共通であったことから、植物の花成に関して、広く共通のメカニズムが存在することが結論できた。スギの *FT/TFL1* 遺伝子ファミリー遺伝子については、まだ十分に解析されていないが、全ゲノム配列の解読がなされたオウシュウトウヒ (*Picea abies*) では裸子植物由来の *FT/TFL1* 遺伝子ファミリー遺伝子が単離・解析されており、シロイヌナズナを用いた実験では、花成を促進させる機能は確認できていない (Klintenäs et al. 2012)。しかし、裸子植物の *FT/TFL1* 遺伝子ファミリー遺伝子が花成に関する機能を全く持っていないのか、それとも、被子植物の花成の経路上でうまくシグナル伝達をしないのかは不明であり、今後の裸子植物を用いた形質転換による解析により詳細に解明され则认为している。

本研究の推進により、優良な形質で無花粉のスギ遺伝子組換え体を作成する技術基盤は、確実に進歩したと言える。将来、こうした技術を応用し、さらに進展させて作出されたスギ組換え体が日本の山林に植栽され、スギ花粉症問題が解決されることを切に願っている。

引用文献

- 後藤陽子, 近藤禎二, 安枝浩 (1999) 関東地区周辺のスギ精英樹花粉における Cry j 1 含量の変異. *日本花粉学会誌* **45**: 149-152.
- 橋詰隼人 (1980) スギの開花と結実. *遺伝* **34**: 4-10.
- 堀口申作, 齋藤洋三 (1964) 栃木県日光地方におけるスギ花粉症 Japanese Cedar Pollinosis の発見. *アレルギー* **13**: 16-18.
- 家原敏郎 (2000) 森林資源調査による花粉発生源分布の把握とその推移予想. 「スギ花粉症克服に向けた総合研究」第 I 期成果報告書 pp. 279-292. 科学技術庁研究開発局.
- 伊ヶ崎知弘, 篠原健司 (2001) 樹木の遺伝子組換え技術: スギのアレルゲン生産量の抑制に向けて. *TechnoInnovation* **11**: 31-35.
- 奥田稔 (2002) スギ花粉症の疫学—全国調査の問題点—. *日本醫事新報* **4093**: 17-24.
- 清野嘉之, 長尾精文, 篠原健司 (2002) 林学からみたスギ花粉症問題. *医学のあゆみ* **200**: 447-451.
- 篠原健司, 伊ヶ崎知弘, 長尾精文, 清野嘉之 (2003) スギ花粉生産量の抑制. *内科* **91**: 318-321.
- 平英彰, 寺西英豊, 劔田幸子 (1993) スギの雄性不稔個体について. *日林誌* **75**: 377-379.
- Ahn, J.H., Miller, D., Winter, V.J., Banfield, M.J., Lee, J.H., Yoo, S.Y. Henz S. R., Brady R. L. and Weigel D., (2006) A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators *FT* and *TFL1*. *EMBO J.* **25**: 605-614.
- Arrillaga, I. and Merkle, S.A. (1993) Regenerating plants from in vitro culture of black locust cotyledon and leaf explants. *HortScience* **28**: 942-945.
- Attree, S.M., Pomeroy, M.K. and Fowke, L.C. (1995) Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage. *J. Exp. Bot.* **46**: 433-439.
- Baucher, M., Chabbert, B., Pilate, G., Van Doorselaere, J., Tollier, M.-T., Petit-Conil, M., Cornu, D., Monties, B., Van Montagu, M., InzØ, D., Jouanin, L. and Boerjan, W. (1996) Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. *Plant Physiol.* **112**: 1479-1490.
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993) In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris* **316**: 1194-1199.
- Becwar, M.R., Wann, S.R., Johnson, M.A., Verhagen, S.A., Feirer, R.P. and Nagmani, R. (1988) Development and characterization of in vitro embryogenic systems in conifers. *In* Somatic Cell Genetics of Woody Plants. Ed. Ahuja MR. pp. 1-18. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Bellarosa, R., Mo, L.H. and von Arnold, S. (1992) The influence of auxin and cytokinin on

- proliferation and morphology of somatic embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Ann. Bot.* **70**: 199–206.
- Böhlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A.M., Jansson, S., Strauss, S.H. and Nilsson, O. (2006) *CO/FT* regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* **312**: 1040–1043.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Brasileiro, A.C.M., Tourneur, C., Leplé, J.C., Combes, V. and Jouanin, L. (1992) Expression of the mutant *Arabidopsis thaliana* acetolactate synthase gene confers chlorsulfuron resistance to transgenic poplar plants. *Transgenic Res.* **1**: 133–141.
- Brunner, A.M. and Nilsson, O. (2004) Revisiting tree maturation and floral initiation in the poplar functional genomic era. *New Phytol.* **164**: 43–51.
- Carmel-Goren, L., Liu, Y.S., Lifschitz, E. and Zamir, D. (2003) The *SELF-PRUNING* gene family in tomato. *Plant Mol. Biol.* **52**: 1215–1222.
- Carmona, M.J., Calonje, M. and Martínez-Zapater, J.M. (2007) The *FT/TFL1* gene family in grapevine. *Plant Mol. Biol.* **63**: 637–650.
- Chalupa, V. (1983) In vitro propagation of willows (*Salix* spp.), European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.) and black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Biol. Plant* **25**: 305–307.
- Chardon, F. and Damerval, C. (2005) Phylogenomic analysis of the *PEBP* gene family in cereals. *J. Mol. Evol.* **61**: 579–590.
- Charest, P.J., Devantier, Y. and Lachance, D. (1996) Stable genetic transformation of *Picea mariana* (black spruce) via particle bombardment. *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant* **32**: 91–99.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–743.
- Confalonieri, M., Balestrazzi, A. and Bisoffi, S. (1994) Genetic transformation of *Populus nigra* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* **13**: 256–261.
- Confalonieri, M., Belenghi, B., Balestrazzi, A., Negri, S., Facciotto, G., Schenone, G. and Delledonne, M. (2000) Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. ‘Villafranca’ and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Rep.* **19**: 978–982.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Turnbull, C. and Coupland, G. (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* **316**: 1030–1033.
- Davis, J.M. and Keathley, D.E. (1987) Differential responses to in vitro bud culture in mature *Robinia pseudoacacia* L. (black locust). *Plant Cell Rep.* **6**: 431–434.

- De Block, M. (1990) Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. *Plant Physiol.* **93**: 1110-1116.
- De Cleen, M. and Deley, J. (1976) The host range of crown gall. *Bot. Rev.* **42**: 389-466.
- Devillard, C. (1992) Transformation in vitro du tremble (*Populus tremula* x *Populus alba*) par *Agrobacterium rhizogenes* et régénération de plantules tolérantes au Basta, *C. R. Acad. Sci.* **314**: 291-298.
- Ellis, D.D., McCabe, D.E., McInnis, S., Ramachandran, R., Russell, D.R., Wallace, K.M., Martinell, B.J., Robert, D.R., Raffa, K.F. and McCown, B.H. (1993) Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *Bio/Technology* **11**: 84-89.
- Fillatti, J.J., Sellmer, J., McCown, B., Haissig, B. and Comai, L. (1987) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 192-199.
- Frohman, M.A., Dush, M.K. and Martin, G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8998-9002.
- Fukui, M., Futamura, N., Mukai, Y., Wang, Y., Nagao, A. and Shinohara, K. (2001) Ancestral MADS box genes in sugi, *Cryptomeria japonica* D. Don (Toxodiaceae), homologous to the B function genes in angiosperms. *Plant Cell Physiol.* **42**: 566-575.
- Futamura, N., Mukai, Y., Sakaguchi, M., Yasueda, H., Inouye, S., Midoro-Horiuchi, T., Goldblum, R.M. and Shinohara, K. (2002) Isolation and characterization of cDNAs that encode homologs of a pathogenesis-related protein allergen from *Cryptomeria japonica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 2495-2500.
- Futamura, N., Totoki, Y., Toyoda, A., Igasaki, T., Nanjo, T., Seki, M., Sakaki, Y., Mari, A., Shinozaki, K. and Shinohara, K. (2008) Characterization of expressed sequence tags from a full-length enriched cDNA library of *Cryptomeria japonica* male strobili. *BMC Genomics* **9**: 383.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**: 151-158.
- Greenwood, M.S. (1987) Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation* **6**: 1-12.
- Gupta, P.K. and Durzan, D.J. (1987) Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Bio/Technology* **5**: 147-151.
- Gupta, P.K. and Pullman, G.S. (1991) Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and somatic potential variation. U.S. Patent no. 5,036,007.
- Hackett, W.P. (1985) Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. *Hort. Rev.* **7**: 109-155.
- Han, K.H., Keathley, D.E. and Gordon, M.P. (1993a) Cambial tissue culture and subsequent

- shoot regeneration from mature blacklocust (*Robinia pseudoacacia* L.) . *Plant Cell Rep.* **12**: 185-188.
- Han, K.H., Keathley, D.E., Davis, J.M. and Gordon, M.P. (1993b) Regeneration of transgenic woody legume (*Robinia pseudoacacia* L., black locust) and morphological alterations induced by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Plant Sci.* **88**: 149-157.
- Hanai, H., Matsuno, T., Yamamoto, M., Matsubayashi, Y., Kobayashi, T., Kamada, H. and Sakagami, Y. (2000) A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant Cell Physiol.* **41**: 27-32.
- Hanzawa, Y., Money, T. and Bradley, D. (2005) A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 7748-7753.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Shilperoort, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-regions of the *Agrobacterium tumefaciens* T-plasmid. *Nature* **303**: 179-180.
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* **2**: 208-218.
- Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, M.D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* **168**: 1291-1301.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. and Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**: 1229-1231.
- Hsu, C.-Y., Liu, Y., Luthe, D.S. and Yuceer, C. (2006) Poplar FT2 shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering. *Plant Cell* **18**: 1846-1861.
- Igasaki, T., Akashi, N., Ujino-Ihara, T., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y. and Shinohara, K. (2003a) Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. *Plant Cell Physiol.* **44**: 1412-1416.
- Igasaki, T., Ishida, Y., Mohri, T., Ichikawa, H. and Shinohara, K. (2002) Transformation of *Populus alba* and direct selection of transformants with the herbicide bialaphos. *Bulletin of the Forestry and Forest Products Research Institute* **1**: 235-240.
- Igasaki, T., Mohri, T., Ichikawa, H. and Shinohara, K. (2000) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Robinia pseudoacacia*. *Plant Cell Rep.* **19**: 448-453.
- Igasaki, T., Sato, T., Akashi, N., Mohri, T., Maruyama, E., Kinoshita, I., Walter, C. and Shinohara, K. (2003b) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Cryptomeria japonica* D. Don. *Plant Cell Rep.* **22**: 239-243.
- Igasaki, T., Watanabe, Y., Nishiguchi, M. and Kotoda, N. (2008) The *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* family in Lombardy poplar. *Plant Cell Physiol.* **49**: 291-300.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a

- sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901-3907.
- Jensen, C.S., Salchert, K. and Nielsen, K.K. (2001) A *TERMINAL FLOWER 1*-like gene from perennial ryegrass involved in floral transition and axillary meristem identity. *Plant Physiol.* **125**: 1517-1528.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T. Chory, J., Harrison, M.J. and Weigel, D. (1999) Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* **286**:1962-1965.
- Katavic, V., Haughn, G.W., Reed, D., Martin, M. and Kunst, L. (1994) In planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 363-370.
- Kim, Y.W., Youn, Y., Noh, E.R. and Kim, J.C. (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*) . *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **55**: 95-101.
- Klimaszewska, K., Devantier, Y., Lachance, D., Lelu, M.A. and Charest, P.J. (1997) *Larix laricina* (tamarack) : somatic embryogenesis and genetic transformation. *Can. J. For. Res.* **27**: 538-550.
- Klintonäs, M., Pin, P.A., Benlloch, R., Ingvarsson, P.K. and Nilsson, O (2012) Analysis of conifer *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER1-like* genes provides evidence for dramatic biochemical evolution in the angiosperm FT lineage. *New Phytol.* **196**: 1260-1273.
- Klopfenstein, N.B., Shi, N.Q., Kernan, A., McNabb Jr., H.S., Hall, R.B., Hart, E.R. and Thornburg, R.W. (1991) Transgenic *Populus* hybrid expresses a wound-inducible potato proteinase inhibitor II-*CAT* gene fusion. *Can. J. For. Res.* **21**: 1321-1328.
- Kobayashi, T., Eun, C.-H., Hanai, H., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y. and Kamada, H. (1999a) Phytosulfokine- α , a peptidyl plant growth factor, stimulates somatic embryogenesis in carrot. *J. Exp. Bot.* **50**: 1123-1128.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. and Araki, T. (1999b) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **286**: 1960-1962.
- Komeda, Y. (2004) Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 521-535.
- Komiyama, N., Sone, T., Shimizu, K., Morikubo, K. and Kino, K. (1994) cDNA cloning and expression of Cry j II, the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**: 1021-1028.
- Konagaya, K., Kurita, M. and Taniguchi, T. (2013) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Cryptomeria japonica* D. Don by co-cultivation on filter paper wicks followed by meropenem treatment to eliminate *Agrobacterium*. *Plant Biotech.* **30**: 523-528.
- Koncz, C. and Shell, J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector.

- Mol. Gen. Genet.* **204**: 383–396.
- Kotoda, N., Iwanami, H., Takahashi, S. and Abe, K. (2006) Antisense expression of *MdTFL1*, a *TFL1*-like gene, reduces the juvenile phase in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **131**: 74–81.
- Levéé, V., Lelu, M.-A., Jouanin, L., Cornu, D. and Pilate, G. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi* x *L. decidua*) and transgenic plant regeneration. *Plant Cell Rep.* **16**: 680–685.
- Li, X.Y. and Huang, F.H. (1996) Induction of somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) . *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant* **32**: 129–135.
- Maruyama, E., Hosoi, Y. and Ishii, K. (2002) Somatic embryogenesis in sawara cypress (*Chamaecyparis pisifera* Sieb. et Zucc.) for stable and efficient plant regeneration, propagation and protoplast culture. *J. For. Res.* **7**: 23–34.
- Maruyama, E., Tanaka, T., Hosoi, Y., Ishii, K. and Morohoshi, N. (2000) Embryogenic cell culture, protoplast regeneration, cryopreservation, biolistic gene transfer and plant regeneration in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don) . *Plant Biotechnology* **17**: 281–296.
- Matsubayashi, Y. and Sakagami, Y. (1996) Pytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7623–7627.
- Matsubayashi, Y., Hanai, H., Hara, O. and Sakagami, Y. (1996) Active fragments and analogs of the plant growth factor, pytosulfokine: structure–activity relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**: 209–214.
- Matsubayashi, Y., Ogawa, M., Morita, A. and Sakagami, Y. (2002) An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, pytosulfokine. *Science* **296**: 1470–1472.
- Matsubayashi, Y., Takagi, L. and Sakagami, Y. (1997) Pytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 13357–13362.
- McCown, B.H., McCabe, D.E., Russell, D.R., Robinson, D.J., Barton, K.A. and Raffa, K.F. (1991) Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Rep.* **9**: 590–594.
- Meilan, R. (1997) Floral induction in woody angiosperms. *New For.* **14**: 179–202.
- Merkle, S.A. and Wiecko, A.T. (1989) Regeneration of *Robinia pseudoacacia* via somatic embryogenesis. *Can. J. For. Res.* **19**: 285–288.
- Mitchell, C.P., Ford-Robertson, J.B., Hinckley, T.M. and Sennerby-Forsse, L. (1992) *Ecophysiology of Short Rotation Forest Crops*. p. 308. Elsevier Applied Science, London.
- Mohri, T., Igasaki, T., Futamura, N. and Shinohara, K. (1999) Morphological changes in

- transgenic poplar by expression of the rice homeobox gene *OSHI*. *Plant Cell Rep.* **18**: 816-819.
- Mohri, T., Igasaki, T., Sato, T. and Shinohara, K. (2000) Expression of genes for β -glucuronidase and luciferase in three species of Japanese conifer (*Pinus thunbergii*, *P. densiflora* and *Cryptomeria japonica*) after transfer of DNA by microprojectile bombardment. *Plant Biotech.* **17**: 49-54.
- Mohri, T., Mukai, Y. and Shinohara, K. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) . *Plant Sci.* **123**: 53-60.
- Mohri, T., Yamamoto, N. and Shinohara, K. (1996) *Agrobacterium*-mediated transformation of Lombardy poplar (*Populus nigra* L. var. *italica* Koehne) using stem segments. *J. For. Res.* **1**: 13-16.
- Mouradov, A., Cremer, F. and Coupland, G. (2002) Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell* **14** (suppl.) : S111-130.
- Mullins, K. V., Llewellyn, D. J., Hartney, V. J., Strauss, S. and Dennis, E. S. (1997) Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Rep.* **16**: 787-791.
- Mullins, M.G., Plummer, J.A. and Snowball, A.M. (1989) Flower initiation: new approaches to the study of flowering in perennial plants. *In* Manipulation of Fruiting. Edited by Wright, C.J. pp 65-77. Butterworth & Co Publishers Ltd., London.
- Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Satoh, A., Nagaoka, K. and Thompson, C.J. (1986) The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 42-50.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**: 4321-4325.
- Nagao, A., Sasaki, S. and Pharis, R.P. (1989) *Cryptomeria japonica*, *In* CRC Handbook of Flowering, Vol. VI. Ed. Halevy AH. pp. 247-269. CRC Press, Boca Raton, FL
- Namba, M., Kurose, M., Torigoe, K., Hino, K., Taniguchi, Y., Fukuda, S., Usui, M. and Kurimoto, M. (1994) Molecular cloning of the second major allergen, Cry j II, from Japanese cedar pollen. *FEBS Lett.* **353**: 124-128.
- Nanjo, T., Futamura, N., Nishiguchi, M., Igasaki, T., Shinozaki, K. and Shinohara, K. (2004) Characterization of full-length enriched expressed sequence tags of stress-treated poplar leaves. *Plant cell Physiol.* **45**: 1738-1748.
- Nishiguchi, M., Yoshida, K., Mohri, T., Igasaki, T. and Shinohara, K. (2006) An improved transformation system for Lombardy poplar (*Populus nigra* var. *italica*) . *J. For. Res.*

11: 175-180.

- Ochman, H., Gerber, A.S. and Hartl, D.L. (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**: 621-625.
- Ogita, S., Ishikawa, H., Kubo, T. and Sasamoto, H. (1999) Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of *Cryptomeria japonica* I: Embryogenic cell induction and its morphological characteristics. *J. Wood Sci.* **45**: 87-91.
- Pillitteri, L.J., Lovatt, C.J. and Walling, L.L. (2004) Isolation and characterization of a *TERMINAL FLOWER 1* homolog and its correlation with juvenility in *Citrus*. *Plant Physiol.* **135**: 1540-1551.
- Potrykus, I. (1990) Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 205-225.
- Ratcliffe, O.J., Amaya, I., Vincent, C.A., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E.S. and Bradley, D.J. (1998) A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development* **125**: 1609-1615.
- Reed, K.C., Mann, D.A. (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res.* **13**: 7207-7221.
- Rugh, C.L., Senecoff, J.F., Meagher, R.B. and Merkle, S.A. (1998) Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nat. Biotechnol.* **16**: 925-928.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Shin, D.-I., Podila, G.K., Huang, Y.H. and Karnosky, D.F. (1994) Transgenic larch expressing genes for herbicide and insect resistance. *Can. J. For. Res.* **24**: 2059-2067.
- Shinohara, K. and Murakami, A. (1996) Changes in levels of thylakoid components in chloroplasts of pine needles of different ages. *Plant Cell Physiol.* **37**: 1102-1107.
- Smith, D.R. (1996) Growth medium. U.S. Patent no. 5,565,355.
- Sone, T., Komiyama, N., Shimizu, K., Kusakabe, T., Morikubo, K. and Kino, K. (1994) Cloning and sequencing of cDNA coding for Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**: 619-625.
- Sullivan, J. and Lagrimini, L. M. (1993) Transformation of *Liquidambar styraciflua* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* **12**: 303-306.
- Tachibana, K., Watanabe, T., Sekizawa, Y. and Takematsu, T. (1986a) Inhibition of glutamine synthetase and quantitative changes of free amino acids in shoots of bialaphos-treated Japanese barnyard millet. *J. Pestic. Sci.* **11**: 27-31.
- Tachibana, K., Watanabe, T., Sekizawa, Y. and Takematsu, T. (1986b) Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *J. Pestic. Sci.* **11**: 33-37.

- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H.L., Yokoi, S. and Shimamoto, K. (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* **316**: 1033–1036.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetic analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evo.* **24**: 1596–1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4673–4680.
- Toki, S., Takamatsu, S., Nojiri, C., Ooba, S., Anzai, H., Iwata, M., Christensen, A. H., Quail, P. H. and Uchimiya, H. (1992) Expression of a maize ubiquitin gene promoter-bar chimeric gene in transgenic rice plants. *Plant Physiol.* **100**: 1503–1507.
- Tsai, C.J., Popko, J.L., Mielke, M.R., Hu, W.J., Podila, G.K. and Chiang, V.L. (1998) Suppression of O-methyltransferase gene by homologous sense transgene in quaking aspen causes red-brownwood phenotypes. *Plant Physiol.* **117**: 101–112.
- Tuominen, H., Sitbon, H., Jacobsson, C., Sandberg, G., Olsson, O. and Sundburg, B. (1995) Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes. *Plant Physiol.* **109**: 1179–1189.
- Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R. R., Bhalerao, R. P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G. L., Cooper, D., Coutinho, P. M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroove, S., Dejardin, A., Depamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehrling, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjarvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leple, J. C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D. R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouze, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C. J., Uberbacher, E. and Unneberg, P. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**: 1596–604.
- Tzfira, T., Yarnitzky, O., Vainstein, A. and Altman, A. (1996) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated DNA transfer in *Pinus halepensis* Mill. *Plant Cell Rep.* **16**: 26–31.

- Van Doorselaere, J., Baucher, M., Chognot, E., Chabbert, B., Tollier, M.T., Petit-Conil, M., Leple, J.-C., Pilate, G., Cornu, D., Monties, B., Van Montagu, M., Inze, D., Boerjan, W. and Jouanin, L. (1995) A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity. *Plant J.* **8**: 855-864.
- von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* **14**: 4683-4690.
- Walter, C., Grace, L.J., Wagner, A., White, D.W.R., Walden, A.R., Donaldson, S.S., Hinson, H., Gardner, R.C. and Smith, D.R. (1998) Stable transformation and regeneration of transgenic plants of *Pinus radiata* D. Don. *Plant Cell Rep.* **17**: 460-468.
- Weigel, D. and Nilsson, O. (1995) A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* **377**: 495-500.
- Wenck, A.R., Quinn, M., Whetten, R.W., Pullman, G. and Sederoff, R. (1999) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). *Plant Mol. Biol.* **39**: 407-416.
- Yang, H., Matsubayashi, Y., Hanai, H., Nakamura, K. and Sakagami, Y. (2000) Molecular cloning and characterization of OsPSK, a gene encoding a precursor for phytosulfokine- α , required for rice cell proliferation. *Plant Mol. Biol.* **635**: 635-647.
- Yang, H., Matsubayashi, Y., Nakamura, K. and Sakagami, Y. (1999) *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 13560-13565.
- Yang, H., Matsubayashi, Y., Nakamura, K. and Sakagami, Y. (2001) Diversity of *Arabidopsis* genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor. *Plant Physiol.* **127**: 842-851.
- Yokoyama, T. (1975) Embryogenesis and cone growth in *Cryptomeria japonica*. *Bull. Gov. For. Exp. Sta.* **277**, 1-20 (in Japanese with English summary)

謝辞

本研究を行い、また博士学位論文としてまとめるに当たりご指導、ご鞭撻いただきました名古屋大学生物機能開発利用研究センター植物細胞機能研究分野教授服部東穂博士、同准教授武田真博士、同大学院生命農学研究科生物機構・機能科学専攻資源生物機能学講座教授松本省吾博士、同分子細胞機構学講座前教授中村研三博士、同助教前尾健一郎博士、同バイオダイナミクス講座教授前島正義博士及び同助教中西洋一博士に深く感謝いたします。研究遂行及び投稿論文の作成において指導いただきました国立研究開発法人理化学研究所環境資源科学研究センター篠原健司博士、名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命科学専攻生命機能化学講座前教授故坂神洋次博士、国立研究開発法人生物資源研究所植物科学研究領域植物生産生理機能研究ユニット市川裕章博士及び名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻細胞間シグナル研究グループ教授松林嘉克博士に深く感謝いたします。

この他、本研究推進上必要な有益な指導や技術提供等をしていただいた九州大学農学部植物栄養学研究分野教授松岡健博士、佐賀大学農学部応用生物科学科生物資源開発学講座准教授古藤田信博博士、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所カンキツ研究領域遠藤朋子博士、山形県農業総合研究センター前研究員高品善博士並びに研究の推進に貢献していただいた多くの共同研究者、研究補助員の方々に心より最上級のお礼を申し上げます。

私が脳出血による生命の危機に瀕した際に適切な判断と処置により救命してくださった東京慈恵会医科大学付属柏病院救急部の亀岡佳彦医師並びに医療スタッフの皆様、運動障害からの復帰を支援してくださいました同リハビリテーション科の辰濃尚医師、村松正史理学療法士、福島結光作業療法士及び、会田記念リハビリテーション病院の赤沼順医師、新保大輔理学療法士、鈴木早苗作業療法士、坂本英世言語聴覚士、日々の治療及び健康維持を支援してくださるすこやかクリニック嘉藤邦彦医師に深く感謝いたします。

最後に、本稿完成まで私を支え励ましてくれた父・伊ヶ崎泰宏、母・伊ヶ崎智世枝、姉・井上典子、兄・伊ヶ崎泰則、妻・伊ヶ崎（武田）亜希子、長男・伊ヶ崎瑞希、長女・伊ヶ崎玲希及び伯父故伊ヶ崎佳弘並びに親戚の方々に心より感謝します。

本研究は、多くの研究助成、補助金、資金負担等により実施されたものです。ここに記して感謝の意を表します。

- ① 平成12年度～14年度 科学技術振興調整費生活者ニーズ対応研究「スギ花粉症克服に向けた総合研究」 遺伝子工学によるアレルゲン生産量の抑制に関する研究（2章）
- ② 平成14年度～16年度 文部科学省科学研究費補助金 基盤研究（B）ジベレリン生合成系酵素遺伝子を利用した樹木の成長制御に関する研究（3章）
- ③ 平成15年度～19年度 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センター「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」 果樹等における花成制御技術の開発（4章）
- ④ 平成18年度～20年度 文部科学省科学研究費補助金 若手研究（B）組換え遺伝子拡散防止のための樹木の開花制御（4章）