

学 位 論 文 題 名

酵母の人工染色体を用いた植物細胞形質転換系の開発

学位論文内容の要旨

植物の染色体を分子レベルで研究することは、基礎研究のみならず育種技術の発展に大きく寄与すると考えられる。染色体として安定に維持・分配させるための主要構成要素として、DNA複製起点、動原体（セントロメア）、末端構造（テロメア）が少なくとも必要である。酵母においてはこれらの要素を用いて人工染色体(Yeast Artificial Chromosome, YAC)が構築されている。特に、*Saccharomyces cerevisiae* においては、数十kb～数百kbの大きさの外来DNAを酵母本来の染色体とは独立に保持させることが可能となり、高等動植物のゲノムライブラリーの作成に用いられ、染色体歩行による遺伝子のクローニングが行われている。

将来的には、植物においても酵母におけるような人工染色体を構築することが可能になると期待される。そのためには植物からセントロメア等の機能領域をクローニングすることが必要であるが、これまでのところそのような報告はシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のテロメア配列のみである。高等動植物のセントロメアの機能領域は、数百kbにも及ぶ可能性が考えられ、機能領域の検索のためには巨大DNAを植物細胞に導入する方法の確立が必要となる。

そこで、植物に導入するための巨大DNAとして酵母の人工染色体(YAC)を用いることが適当であるという考えに基づき、高等植物における遺伝学的あるいは分子生物学的実験材料として有用なシロイヌナズナのYACライブラリーを *S. cerevisiae* において作製し、そのYACを植物細胞に導入する方法の開発と、導入されたYACを安定保持する細胞の解析を目的とした研究を行った。

(1) 植物細胞への導入を目的としたシロイヌナズナのYACライブラリーの構築

YACベクターは酵母細胞への導入を前提として構築されており、植物細胞への導入を目的としたベクターの開発は行われていない。YACが導入された

植物細胞を選択できるようにするため、YACライブラリーの作製に一般的に用いられているYACベクターに、植物で機能する2つの抗生物質耐性遺伝子（ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ(HPT)遺伝子とネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II (NPT II) 遺伝子）をクローニング部位をはさむように挿入し、改変YACベクターを作製した。

一方、シロイヌナズナより数百kbの挿入DNAを持つYACを作製できるような巨大DNAを調製する方法について検討した。シロイヌナズナの培養細胞のプロトプラストをアガロースに埋め込んだ状態で細胞の破壊とタンパク質の分解を行う方法によって、1,000 kb以上の大きさのDNAが調製可能となった。

次に制限酵素 *EcoRI* でブロック内のDNAを部分分解し、改変YACベクターと連結して酵母に形質転換した。得られた形質転換体を検索した結果、それらの酵母の多数に新しい染色体が認められた。サザンハイブリダイゼーション法による解析を行った結果、新たに認められた染色体にベクターの持つHPT遺伝子が存在していることが確認された。以上により、植物細胞での選択マーカーを持った新たなYACライブラリーが作製できた。

（2）酵母から植物細胞への直接的DNA導入法の確立

YAC DNAを植物細胞に導入する方法の開発を行った。酵母の保持する大きなYAC DNAを完全な形で効率良く導入する方法として、ポリエチレングリコール(PEG)を用いた細胞融合を応用することを考えた。酵母相互間、酵母と大腸菌間、あるいは酵母と動物培養細胞間の細胞融合は報告されているが、酵母と植物細胞間の細胞融合は報告されていない。DNA導入の系を構築するため、モデル系として、酵母で発現せず植物細胞に導入されて初めて発現できるようなレポーター遺伝子を利用することを考案した。構造遺伝子内に植物由来のイントロンを挿入した β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子（イントロン-GUS遺伝子）を酵母の多コピープラスミドに連結したモデルプラスミドを作製した。このプラスミド上のイントロン-GUS遺伝子は、期待通り酵母内での発現が抑制され、植物細胞に導入された場合は高発現することが確認された。このモデルプラスミドを使うことにより、酵母から植物細胞へのDNA導入をGUS活性によってモニターすることができる。

この系を用いて種々の条件を検討した結果、酵母のスフェロプラストとシロイヌナズナのプロトプラストをPEGと高pHかつ高 Ca^{2+} 濃度の溶液を用いて融合処理する方法によって再現性よく高いGUS活性の検出される条件が得られた。この方法で得られるGUS活性は酵母細胞のすべてのプラスミドDNAが

反応液中に漏出した後、PEGによるDNA導入が起こったと仮定した場合のGUS活性よりも高かった。さらに、この反応系にマイクロカルヌクレアーゼを添加して細胞外にあるDNAを分解した条件においても得られるGUS活性には影響がなかった。これらのことは、酵母から細胞外に漏出したプラスミドがシロイヌナズナのプロトプラストに取り込まれたのではなく、酵母からシロイヌナズナに直接的に導入されていることを示しており、酵母スフェロプラストとシロイヌナズナプロトプラストの細胞融合により酵母のDNAが導入されたものと判断された。ここで開発したDNA導入方法は酵母内のYAC DNAを植物細胞に導入することにも応用できると考えられる。

(3) 酵母との融合によりDNAを導入した植物プロトプラストの再生と増殖の系の開発

細胞融合によるDNA導入法によって処理した細胞を長期間培養し、増殖維持する方法の開発を行った。導入されたYAC DNAを保持する植物細胞を判別するには、細胞の増殖が必要条件である。

DNA導入法の改良を行い、細胞に与える損傷を軽減できるPEG濃度、および高pH-高Ca²⁺溶液等による処理の条件が得られた。さらに、DNA導入処理を行った植物プロトプラストをアルギン酸ナトリウムで固定して培養することによって増殖させることが可能となった。また、シロイヌナズナとタバコの細胞について比較実験を行った結果、植物細胞へのYAC導入実験は、シロイヌナズナよりも増殖能にすぐれたタバコ BY-2細胞を用いて行うことが適当である判断された。

本研究により、酵母スフェロプラストと植物プロトプラストとの融合処理により酵母細胞から植物細胞にDNAを直接的に導入し、融合処理後の植物プロトプラストを増殖させる方法が開発された。今後、YAC DNAを植物細胞に導入する系が確立すれば、YACライブラリーからセントロメア機能領域を持つクローンを探索する実験に発展させることが可能となる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 内 藤 哲

学 位 論 文 題 名

酵母の人工染色体を用いた植物細胞形質転換系の開発

本論文は、和文95頁、図25、表4、3章からなり、ほかに参考論文2編が付されている。

酵母においては人工染色体（Yeast Artificial Chromosome, YAC）が構築されており、数十kb～数百kbの大きさの巨大な外来DNAを酵母本来の染色体とは独立に保持させることが可能となっている。YACは高等動植物のゲノムライブラリーの作成に用いられ、遺伝子のクローニングに応用されている。こうしたYACを植物細胞に導入することが可能となれば、基礎研究のみならず育種技術の発展にも大きく寄与するものと考えられる。

本研究は、高等植物における遺伝学的研究材料として有用なシロイヌナズナのゲノムDNAのYACライブラリーを酵母において作製し、これを植物細胞に導入する方法の開発、および導入されたYACを保持する植物細胞の解析を目的として行ったものである。研究の結果は以下のように要約される。

1. 植物細胞への導入を目的としたシロイヌナズナのYACライブラリーの構築

YACベクターは酵母細胞への導入を前提として構築されており、植物細胞への導入を目的としたベクターの開発は行われていない。YACが導入された植物細胞を選択可能にするため、一般に用いられているYACベクターに植物で機能する2つの抗生物質耐性遺伝子（ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子とネオマイシンホスホトランスフェラーゼII遺伝子）を、クローニング部位をはさむように挿入し、改変YACベクターを構築した。

シロイヌナズナより巨大DNAを調製する方法について検討し、シロイヌナズナ培養細胞のプロトプラストをアガロースに埋め込んだ状態で細胞の破壊と除タンパクを行うことによって、1,000 kb以上の大きさのDNAが調製可能となった。このDNA

を制限酵素で部分分解し、改変YACベクターと連結して酵母に形質転換した。これにより、植物細胞での選択マーカーを持った新たなYACライブラリーが構築された。

2. 酵母から植物細胞への直接的DNA導入法の確立

YAC DNAを植物細胞に導入する方法の開発を行った。DNA導入の系を構築するためのモデル系として、酵母では発現せず、植物細胞に導入されて初めて発現できるようなレポーター遺伝子を利用することを考案した。構造遺伝子内に植物由来のイントロンを挿入した β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を酵母の多コピープラスミドに連結したモデルプラスミドを作製した。このイントロンを持つGUS遺伝子は、酵母内での発現が抑制され、植物細胞内では高発現することが確認され、酵母から植物細胞へのDNA導入をGUS活性によって調べる事が可能となった。

このモデルプラスミドを持つ酵母を用いて種々の条件を検討した結果、酵母のスフェロプラストとシロイヌナズナのプロトプラストをポリエチレングリコールと高pHかつ高 Ca^{2+} 濃度の溶液を用いて融合処理する方法によって、再現性よく高いGUS活性の検出される条件が得られた。この反応系では反応液にヌクレアーゼを添加した条件においても得られるGUS活性は影響されない。このことは酵母から細胞外に漏出したプラスミドがシロイヌナズナのプロトプラストに取り込まれたのではなく、酵母からシロイヌナズナに直接的にDNAが導入されていることを示しており、酵母スフェロプラストとシロイヌナズナ プロトプラストの細胞融合が行われたものと判断された。

3. 融合反応を行った植物プロトプラストの再生と増殖の系の開発

細胞融合によるDNA導入を行った細胞を長期間培養し、増殖させる系の開発を行った。DNA導入法の改良を行い、植物細胞に与える損傷を軽減するポリエチレングリコール濃度、および高pH-高 Ca^{2+} 溶液等の条件を設定した。さらに、DNA導入処理を行った植物プロトプラストをアルギン酸ナトリウムで固定して培養することによって、再生・増殖させることが可能となった。

以上のように本研究は、酵母スフェロプラストと植物プロトプラストとの融合処理により酵母細胞から植物細胞にDNAを直接的に導入し、融合処理後の植物プロトプラストを増殖させる方法を開発したものであり学術的に重要な方法論を確立した。

よって審査員一同は、別に行った最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者初山慶道は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。