

学 位 論 文 題 名

ポプラ懸濁培養系におけるサイトカイニン処理に
応答する遺伝子の単離と解析

学位論文内容の要旨

本論文は、図 33、表 7、引用文献 82 を含む総頁数 105 の和文論文である。別に参考論文 4 編が添えられている。

木材に対する膨大な需要を満たしつつ、森林を保全していくためには生産性の高い品種を作出することが必要である。しかしながら、精英樹の選抜を主とした従来の育種方法では、樹木特有の長い世代交代時間が問題となり効率が低い。この点を改善するため、マイクロプロパゲーションに期待がかけられている。しかしながら、マイクロプロパゲーションが不可能な樹種も多く存在する。

本研究では、ポプラのカルスよりサイトカイニン処理により不定芽が誘導されることに注目し、不定芽分化の分子メカニズムを明らかにすることを目的として、ポプラ懸濁培養細胞におけるサイトカイニン処理に応答する遺伝子の単離と解析を行った。

本研究では以下の成果が得られている。

[1]

ポプラ剥皮枝条を 2,4-D 1ppm を含む MS 培地で 2 ヶ月間静置培養し、その後同条件の培地で振とう培養を行うことで良好な増殖を示す懸濁培養を作出することが出来た。懸濁培養細胞は、ゼアチン 1ppm の添加により増殖率が低下し、ゼアチンに対し感受性を有することが確認された。増殖率の低下は、処理開始 24 時間で現れており cDNA ライブラリー作成には、ゼアチン処理 24 時間の細胞を試料に用いることとした。

[2]

最初に、RNA の抽出方法を検討した。SDS-Phenol 法と AGPC 法を検討した。AGPC 法では、RNA が得られなかった。SDS-Phenol 法では、RNA は得られたものの A230 が高く、mRNA 単離の時点で多糖類と思われる寒天状の物質が oligo(dT) cellulose カラム上に残り、得られた mRNA からは cDNA が合成されなかった。さらに RNA 精製条件を検討した結果、SDS-Phenol 法と QIAGEN カラムを組み合わせることで純度の高い RNA が得られ、mRNA 単離が可能となった。

cDNA ライブラリーの作製には 2,4-D 1ppm + ゼアチン 1ppm で 24 時間培養を行ったポプラ懸濁培養細胞を用いた。14 μ g の mRNA より、oligo(dT) primer を用いて cDNA を合成し、 λ gt10 の EcoRI サイトに挿入した。ライブラリーは 2.3×10^6 個のクローンを含んでいた。挿入された cDNA の平均鎖長は 1060 bp であった。

[3]

ゼアチン 1 ppm 24 時間処理と無処理の RNA 間でディファレンシャルスクリーニングを行った。1 次スクリーニング、2 次スクリーニングを行い 108 クローンを単離した。ノーザンおよびクロスハイブリダイゼーションの結果、ゼアチン処理に特異的なグループが 5 グループ、無処理に特異的なグループが 1 グループ、双方において同等に発現しているグループが 1 グループ、に分類された。

[4]

Zeatin 処理 1、2、4、6、12、24 時間及び、無処理の細胞より得た RNA に対してノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、クローン 2-6 および 3-15 においてゼアチン処理における顕著な発現量の増加が認められた。クローン 2-6 は、ゼアチン処理 4 時間で発現量が最大となり、無処理の細胞に対し 3 倍の発現量があった。3-15 は、ゼアチン処理 1 時間で発現量が最大となり、無処理の細胞に対し 4 倍の発現量であった。それぞれのクローンを PCY2-6、PCY3-15 と名づけた。

[5]

PCY2-6 は 1160 bp の cDNA であった。343 アミノ酸残基をコードする 1035 bp の ORF を持つと推定された。*Populus kitakamiensis* の peroxidase mRNA と塩基配列で 95.8 %、アミノ酸配列で 94.4 % の相同性が見られ、酸性ペルオキシダーゼをコードしているものと思われる。推定されるアミノ酸配列と、他のペルオキシダーゼの比較の結果、シグナルペプチド 24 アミノ酸残基を含む全長の ORF がコードされていると予想された。

PCY3-15 は 680 bp の cDNA であった。141 アミノ酸残基をコードする 423 bp の ORF を持つと推定された。ロイシンとプロリンに富み、Pro-Lys の繰り返し配列を含んでいた。pI は 9.19 と計算された。*Catharanthus roseus* の 14 kDa polypeptide の mRNA と塩基配列で 66.6 %、*Daucus carota* の 14 kD Protein と 62.3 %、*Brassica napus* の proline-rich mRNA と 60.5 % の相同性が見られた。Pro-Lys の繰り返し配列はこれら全てのタンパク質に含まれていた。この配列は、Gly 又は Pro に富む多くの細胞壁タンパク質に見られ、エクステンシン様タンパク質のモチーフとされている。しかしながらこれらのタンパク質は、一般的にエクステンシンとされるタンパク質とはかなり構造が異なっており、新しいエクステンシン様タンパク質として分類されている。*D. carota* の 14 kD Protein は不定胚形成時に発現する遺伝子として単離されている。相同性の高い配列が、同様の条件で発現していることから、これらの配列が植物体再生の初期段階で重要な役割を果たしていることが示唆される。

[6]

PCY3-15 については、cDNA の上流 1013 bp、下流 1117 bp を含む 2791 bp のゲノム DNA の塩基配列を決定した。PCY3-15 にはイントロンが含まれていなかった。PCY3-15 の転写開始点は、開始コドンの 45 bp 上流であった。転写開始点の 21 bp、72 bp、125 bp 上流に TATA box と思われる配列が存在した。光誘導性のシスエレメントである、box I と GT-I box に相当する配列が存在した。また、'ATTTT' および 'TAAAA' 配列が、5'、3' 非転写領域に頻繁に存在していた。

PCY2-6 について、cDNA の上流 62 bp、下流 199 bp を含む 1863 bp のゲノム DNA の塩基配列の決定を行なった。8.1 x 10⁶ クローン (1.62 x 10⁶ Mbp) のゲノムライブラリーに対してスクリーニングを行なったが、さらに上流域を含む断片は得られなかった。塩基配列を決定した結果、このゲノム断片と cDNA の塩基配列は 27 塩基で異なっており、ペルオキシダーゼ遺伝子ファミリーに属する異なった遺伝子と思われる。ゲノミックサザン解析の結果もこのペルオキシダーゼがサブファミリーを構成していることを示唆した。cDNA とゲノムクローンに見られる構造は、3' 末端非コード領域に至るまで非常によく保存されており興味深いところである。cDNA との比較により予想される、転写領域は 4 つのイントロンを含んでいた。

以上、本研究は、ポプラ懸濁培養細胞におけるゼアチン処理に応答する遺伝子を単離、解析し、これらがペルオキシダーゼをコードする遺伝子、およびエクステンシン様タンパク質をコードする遺伝子であることを明らかにし、木本性植物を用いた分子生物学的基礎研究において新知見をもたらした。

よって、審査員一同は、最終試験の結果と合わせ、本論文の提出者 佐久間 洋は、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。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 寺 澤 実

副 査 教 授 三 上 哲 夫

副 査 助教授 三 浦 清

学 位 論 文 題 名

ポプラ懸濁培養系におけるサイトカイニン処理に 応答する遺伝子の単離と解析

本論文は、図 33、表 7、引用文献 82 を含む総頁数 105 の和文論文である。別に参考論文 4 編が添えられている。

木材に対する膨大な需要を満たしつつ、森林を保全していくためには生産性の高い品種を作出することが必要である。しかしながら、精英樹の選抜を主とした従来の育種方法では、樹木特有の長い世代交代時間が問題となり効率が低い。この点を改善するため、マイクロプロパゲーションに期待がかけられている。しかしながら、マイクロプロパゲーションが不可能な樹種も多く存在する。

本研究では、ポプラのカルスよりサイトカイニン処理により不定芽が誘導されることに注目し、不定芽分化の分子メカニズムを明らかにすることを目的として、ポプラ懸濁培養細胞におけるサイトカイニン処理に応答する遺伝子の単離と解析を行った。

本研究では以下の成果が得られている。

[1] ポプラ懸濁培養の作出

ポプラ剥皮枝条を 2,4-D 1ppm を含む MS 液体培地で 2 ヶ月間静置培養し、その後同条件の培地で振とう培養を行うことで懸濁培養を作出することが出来た。懸濁培養細胞は、ゼアチンに対する感受性と、器官分化能を有していた。

[2] cDNA ライブラリーの作成

RNA の抽出方法を検討した結果、SDS-Phenol 法と QIAGEN カラムを組み合わせることで cDNA 合成可能な RNA が得られた。2,4-D 1ppm + ゼアチン 1ppm で 24 時間培養を行ったポプラ懸濁培養細胞より、この方法で調製した RNA を用いて cDNA ライブラリーを作製した。

[3] サイトカイニン処理に応答する遺伝子(PCY)の単離

ゼアチン 1ppm 24 時間処理と無処理の RNA 間でディファレンシャルスクリーニングを行った。ゼアチン処理に特異的なグループを 5 グループ、無処理に特異的なグループを 1 グループ、双方にお

いて同等に発現しているグループを1グループを得た。

[4] PCY mRNA 量の経時変化解析

ノーザンハイブリダイゼーションを行い、各クローンに相当する mRNA 量の経時変化を明らかにした。クローン 2-6 は、ゼアチン処理4時間で発現量が最大となり、無処理の細胞に対し3倍の発現量があった。3-15 は、ゼアチン処理1時間で発現量が最大となり、無処理の細胞に対し4倍の発現量であった。それぞれのクローンを PCY2-6、PCY3-15 と名づけた。

[5] PCY cDNA の構造解析

PCY2-6 と PCY3-15 の挿入断片の塩基配列を決定した。

PCY2-6 cDNA は *Populus kitakamiensis* の peroxidase mRNA と相同性が見られ、ペルオキシダーゼをコードしているものと思われた。他のペルオキシダーゼとの比較の結果、シグナルペプチドを含む全長の ORF がコードされていると予想された。

PCY3-15 cDNA はロイシンとプロリンに富み、Pro-Lys の繰り返し配列を含んでいた。また塩基配列、アミノ酸配列の双方で、*Catharanthus roseus* の 14 kDa polypeptide の mRNA 等との間に高い相同性が見られた。これらのタンパク質は、一般的なエクステンシンとはかなり構造が異なっており、新しいエクステンシン様タンパク質として分類されている。

[6] PCY ゲノム構造の解析

ゲノムライブラリーを作成し、PCY2-6、3-15 に相当するゲノム DNA の塩基配列を決定した。

PCY3-15 については、cDNA の上流 1013 bp、下流 1117 bp を含む 2791 bp のゲノム DNA の塩基配列を決定した。PCY3-15 にはイントロンが含まれていなかった。PCY3-15 の転写開始点は、開始コドンの 45 bp 上流であった。転写開始点の 21 bp、72 bp、125 bp 上流に TATA box と思われる配列が存在した。また、'ATTTT' および 'TAAAA' 配列が、5'、3' 非転写領域に頻繁に存在していた。

PCY2-6 については、cDNA の上流 62 bp を含む 1863 bp のゲノム DNA の塩基配列の決定を行った。このゲノム断片と cDNA の塩基配列は 27 塩基で異なっており、ペルオキシダーゼ遺伝子ファミリーに属する異なった遺伝子と思われる。ゲノミックサザン解析の結果も遺伝子ファミリーを構成していることを示した。cDNA との比較により予想される、転写領域は4つのイントロンを含んでいた。

以上、本研究は、ポプラ懸濁培養細胞におけるゼアチン処理に応答する遺伝子を単離、解析し、これらがペルオキシダーゼをコードする遺伝子、およびエクステンシン様タンパク質をコードする遺伝子であることを明らかにし、木本性植物を用いた分子生物学的基礎研究において新知見をもたらした。

よって、審査員一同は、最終試験の結果と合わせ、本論文の提出者 佐久間 洋は、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。