

氏 名(本籍)	もり 森	ぐち 口	りょう 亮
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	農 博 第 8 8 5 号		
学位授与年月日	平 成 19 年 3 月 27 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科専攻	農学研究科資源生物科学専攻 (博士課程)		
学位論文題目	園芸植物におけるテロメア長とテロメア結合タンパク質 の機能に関する研究		
論文審査委員	(主 査)	教 授	金 濱 耕 基
	(副 査)	教 授	鳥 山 欽 哉
		教 授	池 上 正 人
		助教授	金 山 喜 則

論文内容要旨

まえがき

テロメアとは真核生物の染色体末端領域のことであり、染色体の安定的な維持に貢献している。ヒト、酵母、および植物のいずれにおいても、テロメアは大きく分けると二つの要素—テロメア DNA とテロメア結合タンパク質—から構成されている（第1図）。

テロメア DNA は数塩基からなる単純な繰り返し配列であり、単にテロメアと言う場合はこのテロメア DNA を指す。ヒトの体細胞においては、テロメア DNA の長さ（テロメア長）は細胞分裂を経るに従って減少するため、テロメア長は細胞分裂回数をカウントする「分裂時計」として捉えられている。一方、植物には種子が発芽してから一定期間栄養成長を続け、花芽を形成しない幼若性と呼ばれる性質があり、この期間を幼若期と呼ぶ。幼若性には成長点の細胞分裂回数に関係しているという説があることから、植物のテロメア長もヒトと同様に細胞分裂回数を数える「分裂時計」として機能するならば、テロメア長と幼若性に関連が見出せる可能性がある。以上のことから第1章では、バラ科樹木の各部位におけるテロメア長の解析を行った。

テロメアを構成するもう一つの要素であるテロメア結合タンパク質は、テロメアのもつ様々な機能を担う重要な因子であり、ヒト・酵母を中心にその機能解析が進展している。植物のテロメア結合タンパク質は、これまでモデル実験植物であるシロイヌナズナを中心にいくつか報告されてはいるが、園芸学的な機能に関わる知見はみられない。そこで第2章では、果菜類のモデル園芸作物としてトマトを用い、テロメア結合タンパク質の機能を調べた。

第1章. バラ科樹木の幼若性とテロメア長との関連の検証.

幼若期の長さは、特に木本植物である果樹では数年にも及ぶため、育種上の大きな障害になっている。幼若性の分子機構を明らかにすることを目的として、第1章では果樹の中でも幼若期が長いリンゴ、および比較対照として推定樹齢40年のサクラ樹を用いて、樹木各部位におけるテロメア長の解析を行い、テロメア長と幼若性との関連を検証した。

まず初めにリンゴの自然交雑実生における幼若相および成熟相の組織のテロメア長解析を行ったが、各部位においてテロメア長に明確な差はみられず、テロメア長と幼若性との関係は認められなかった(第2図)。比較対象としてリンゴと同じバラ科のサクラ樹におけるテロメア長解析を行ったが、リンゴと同様、主幹基部の組織と長年の細胞分裂を経た先端部の組織との間のテロメア長に差が認められず、数十年間の細胞分裂を経てもテロメア長は一定の範囲内に保たれていることが明らかとなった(第3図)。また本研究を進める中で、リンゴの品種間の交雑後代においてテロメア長が複雑に分離したことから(第4図)、リンゴのテロメア長は複数の遺伝子によって制御されていると考えられた。

第2章. トマトテロメア結合タンパク質 LeTBP1 の機能解析.

ヒト、酵母、および線虫において、テロメア結合タンパク質はテロメア長の制御や染色体末端防御、減数分裂やストレス耐性など、幅広い生理機構に関与することが報告されている。木本植物であるリンゴおよびサクラでは、数十年に渡ってテロメア長が安定的に維持されていた(第1章)ことから、植物のテロメア長の制御機構に興味をもたれる。また、減数分裂は配偶子の形成に関わる重要なステップであり、種子の形成ならびに果実の着果や発達にも影響を及ぼす。したがって、植物のテロメア結合タンパク質と減数分裂の関係を明らかにすることは園芸学的に有意義である。そこで、第2章ではテロメア結合タンパク質の機能を明らかにすることを目的として、トマトのテロメア結合タンパ

ク質 LeTBP1 の cDNA クローニングを行い、タバコ BY-2 細胞への遺伝子導入による影響を解析した (第 1 節)。続いて、トマトへの *LeTBP1* アンチセンス遺伝子の導入を行い、トマトの成長における *LeTBP1* の機能を解析した (第 2 節)。

第 1 節. *LeTBP1* の cDNA クローニングとタバコ BY-2 細胞への導入.

イネとシロイヌナズナのテロメア結合タンパク質の cDNA 配列を参考にしてトマト EST データベースを検索し、推定上のトマトテロメア結合タンパク質 *LeTBP1* の cDNA クローニングを行った。シーケンス解析の結果、*LeTBP1* は 2067bp の ORF を含み、689 アミノ酸からなるタンパク質 (推定分子量 77.0kDa) をコードしていることが明らかとなった。また *LeTBP1* には推定上の核内保留配列が 2 カ所、および C 末端領域には幅広い生物種の二本鎖テロメア結合タンパク質に共通して見られる Myb 型 DNA 結合モチーフ、ならびにテロメア配列への結合に必須な Myb-extension モチーフが確認され、これらのモチーフにおいては他の植物テロメア結合タンパク質と高い相同性を示した (第 5 図)。サザンおよびノーザン解析の結果、*LeTBP1* はゲノム中にシングルコピーとして存在し (第 6 図)、各栄養器官と花のいずれにおいても発現していることが明らかとなった (第 7 図)。

LeTBP1 がテロメア配列に結合するかどうかを調べることを目的として、Myb 型 DNA 結合モチーフと Myb-extension モチーフを含む部分タンパク質 *LeTBP1*⁵⁸⁹⁻⁶⁸⁹ を大腸菌で合成し、第 1 表に記したオリゴヌクレオチドを用いてゲルシフト解析を行った。その結果、*LeTBP1*⁵⁸⁹⁻⁶⁸⁹ は二本鎖テロメア DNA に特異的に結合したことから (第 8 図)、*LeTBP1* は二本鎖テロメア結合タンパク質であることが明らかとなった。

次に、*LeTBP1* の生体内でのテロメアに対する機能を解析することを目的として、均一で増殖が盛んなことから効率的な解析が可能なタバコ培養細胞に *LeTBP1* 遺伝子の導入を行った。遺伝子導入の結果得られた系統 (B1, B2) では *LeTBP1* の強い発現が確認された (第 9 図)。次にテロメア長解析を行ったと

ころ、*LeTBPI* 導入系統のテロメア長は対照系統に比べて大幅に減少していることが判明した（第 10 図）。このことから、*LeTBPI* はテロメア長の制御機能を有していると考えられた。

第 2 節. *LeTBPI* アンチセンス遺伝子を導入した形質転換トマトの作出と解析.

植物個体の成長における *LeTBPI* の役割を明らかにすることを目的として、*LeTBPI* アンチセンス遺伝子を導入したトマト LA1, LA3, および LA10 を得た。各個体において *LeTBPI* の発現解析を行ったところ、LA1, LA10 における発現は大幅に減少し、LA3 における発現は中程度に減少した（第 11 図）。形質転換体の果実を調査したところ、*LeTBPI* アンチセンス個体では、いずれも果実径、果実重が減少し、なかでも種子数は大幅に減少した（第 12 図, 第 2 表）。種子数減少の要因を明らかにすることを目的として花粉の調査を行ったところ、*LeTBPI* アンチセンス個体では稔性ならびに発芽率が対照個体に比べて低下していることが明らかとなった（第 13 図）。各形質転換体の *LeTBPI* の発現量の抑制（第 11 図）と果実重や種子数の減少の程度（第 2 表）が対応していたことから、*LeTBPI* アンチセンス個体の果実における表現型の要因は *LeTBPI* の発現抑制であると考えられた。

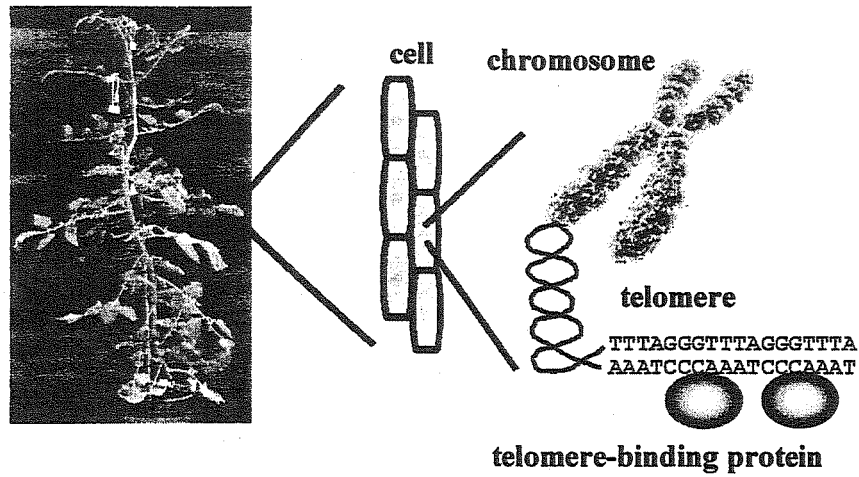
花粉稔性が低下した要因としては、栄養成長の抑制、もしくは減数分裂などの花粉形成過程における異常等が考えられる。T2 世代を用いて生育調査を行った結果、*LeTBPI* アンチセンス系統では草丈が少し低くなったものの、葉重、花房着生節位、花房あたりの花の数には大きな差はみられなかった（第 3 表, 第 14 図, 第 15 図）。したがって *LeTBPI* アンチセンス系統では生殖成長を顕著に抑制するような栄養成長の低下はないと考えられた。次に花粉母細胞の減数分裂の観察を行ったところ、*LeTBPI* アンチセンス個体では、第 1 分裂後期に、両極に分離して行く染色体が通常より多く観察され、形成された小孢子も明らかに多くの染色体を有していた（第 16 図）。したがって、この染色体数の異常が

花粉稔性低下の原因であると考えられた。染色体数異常の要因を明らかにすることを目的として体細胞分裂の観察を行った結果、対照個体では正常な 24 本の染色体が観察されたが、*LeTBP1* アンチセンス個体では 30 本から 40 本前後の多数の染色体を有する細胞が多く観察された（第 17 図）。また、体細胞分裂後期には異常な染色体形態であり、染色体末端融合を示唆する chromosome bridge が観察された（第 18 図）。ヒト、マウスにおいて、テロメア結合タンパク質の欠損は染色体末端融合と異数化を引き起こすことが報告されていることから、アンチセンス個体では *LeTBP1* の減少により染色体末端融合が発生し、それによって異数化が進行したと考えられた。

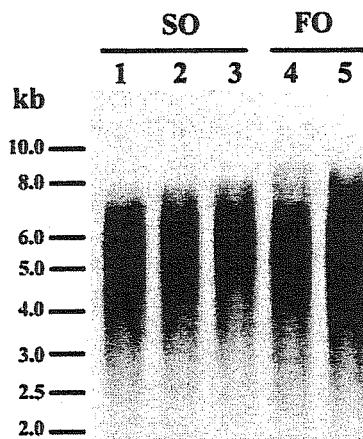
以上のように、*LeTBP1* アンチセンス個体では栄養成長に大きな異常は認められなかったが、染色体の異数化によって花粉稔性が大きく低下し、それによって種子数や果実重が減少したと考えられ、*LeTBP1* は正常な果実の発達に必要な因子であることが明らかとなった。

ま と め

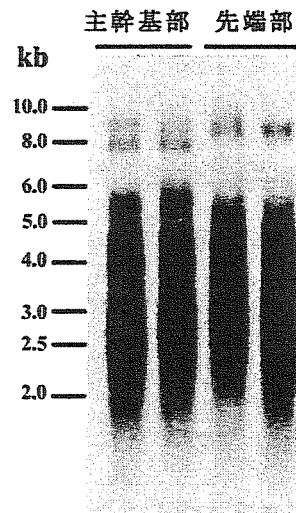
本研究において解析に用いたリンゴおよびサクラでは、数年～数十年間の細胞分裂を経てもテロメア長が変化しないことが明らかとなった。したがって、植物にはヒト体細胞とは異なり、テロメア長を一定に維持する機構が存在していると考えられた。本研究で得られた知見は木本植物における初めての解析例であるが、植物には数百年以上の長寿命をもつものも多く、このようなテロメア長の維持が長寿命の一因であると考えられる。次に、トマトテロメア結合タンパク質 *LeTBP1* の機能解析を行ったところ、*LeTBP1* はテロメア長の制御機能を有するとともに、正常な花粉の形成を通じて種子形成や果実の発達に影響を及ぼす重要な因子であることが明らかとなった。今後は、*LeTBP1* の発現に及ぼす環境要因を明らかにして、ストレス環境下における稔性や着果との関係を明らかにする必要がある。



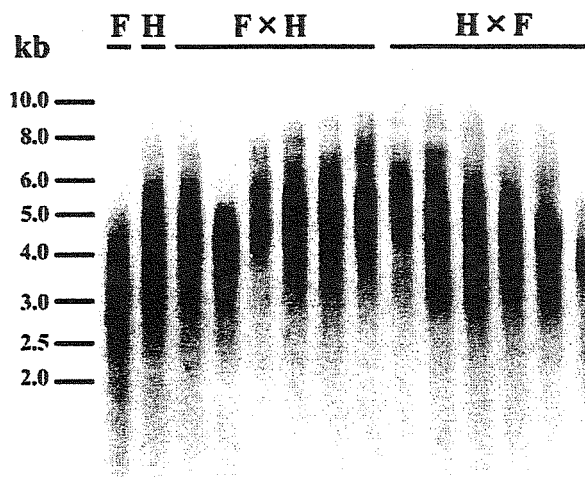
第1図 植物のテロメアの模式図。



第2図 リンゴ7年生実生の各部位におけるテロメア長解析。SO, ‘さんさ’の自然交雑実生; FO, ‘ふじ’の自然交雑実生。レーン1と4, ひこばえの葉; レーン2, 幼若相の枝の葉; レーン3と5, 成熟相の枝の葉。



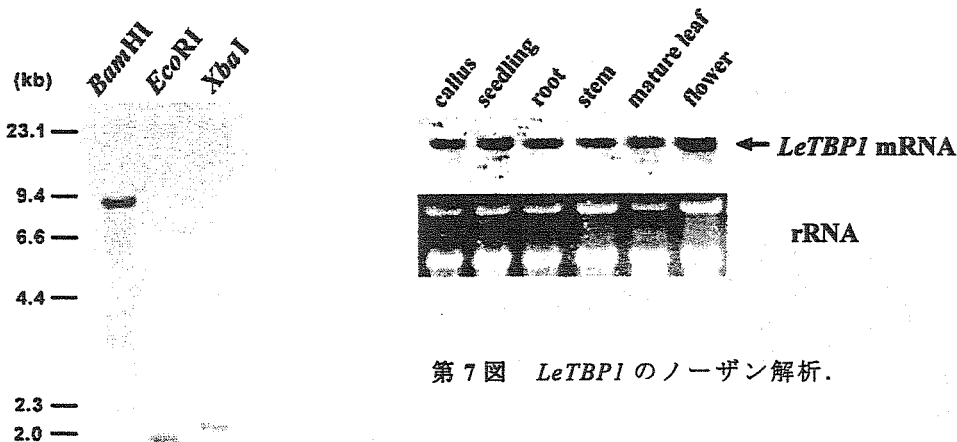
第3図 サクラ‘ソメイヨシノ’の主幹基部の葉および先端部の枝の葉におけるテロメア長解析。



第4図 ‘ふじ’および‘ひめかみ’の7年生樹およびそれらの交雑実生(1-2年生)におけるテロメア長解析。F, ‘ふじ’; H, ‘ひめかみ’; FxH, HxH, 交雑実生。

LeTBP1	1	MVYKRLDFG	-FNGQVFFVI	FRAPRSVRR	RSCKE--LDG	D-QICAFELL	AAVAGHLLLE	SE--SSTSSH	AAECKRIAD
NgTRF1	1	MVSKRLDFG	-FNGQVFFVI	FRAPRSVRR	GTCKE--FDD	D-QICAFELL	AAVAGHLLLE	SE--SSTSSH	AAECKYKLS
AtTBP1	1	MVYKRLDFG	GSSEDFFFVI	FRAPRSVRR	VSGR--SDP	ESSEICADLL	ASLAGHLLLE	SE--SSTSTP	YASADMLDH
AtTRP1	1	MVSRKCVDF	GVASYLFFSH	ARAPRSARR	RSTKRLSKK	DMKICADLL	ATVAGHLLFF	SG--SSLMTI	DELTEKTRK
RTBP1	1	MVLGRKLDYD	-SNGRRAPIK	FRVATLAFVK	RSTRIR----	KRQVVALDLI	ATAKELIAD	QDHLSSPHI	NETPEGVIS
LeTBP1	75	CRDGIKCFV	E--EKAVYS	ECLDQSSVE	SDYLPDTAV	DQNLKHFDR	FNAEEN--YF	LEHTSTVIGS	DADLKLHCK
NgTRF1	75	CRDGIKCFV	E--EKAVYS	ECLDQSSVE	SAVPEPAVR	EQLKEDLDR	PYZAENSSIL	EHTSTVIGS	DSKHTLHCK
AtTBP1	77	LGGLIKGLE	DGYTTPCPS	EFTDPRPAS	KSTSEHTSYT	CLPSSSEFD	CILEQTFVSD	CKRASGLSL	VQSITESTV
AtTRP1	79	EEFFEEKFL	MFVALSPYD	SLSPCFSSV	INQVREVD	GFSTSGSDA	CQVHFS----	-----	-----
RTBP1	76	KRFVAFQFD	MAPLRSNAV	KSDQCRGTV	GCAGICQELR	QANNCLAENS	STQHLADSVL	ESLAKRPDL	AGGFVSSK
LeTBP1	152	EVNITDQKH	MKIEGSSSL	EDPCD-SKIR	TGTQKLDLD	SKQIEPVTV	HTSVAREIK	ECVHNSLPH	SDGSYQLPLY
NgTRF1	153	EVNITDQKH	ARVEDFDSKI	SG-----	---TQKLDLD	SKQIDMLTV	MAKRVKRIE	KVYHHALFH	SESSVQLSLY
AtTBP1	157	VH-----	-----	-----	-----	EDAGSEQGA	HTPSLEDPSQ	LNSQSPESVL	LDGKWLKAPC
AtTRP1	135	-----	-----	-----	-----	-----	Q-----	QVREIDGDA	VFLDARFHV
RTBP1	156	SCHLGFLLGT	IPEYGVGVC	QVWSTRSAEV	RQVHARPTA	IRSQEDSAA	ALCALVETRD	LDTKPLAAS	SGSSGVHIC
LeTBP1	231	EDSVPSASPV	KQNSVFLGV	DDDDHSEFD	CYRYSALRA	FRITSR-LGY	KRIRKLSR	NVAVAPLKE	YERSTYHGGI
NgTRF1	223	EDVPSASPV	KQNSVFLGV	DDDDHSEFD	CYRYSALRA	FRITSR-LGY	KRIRKLSR	NVAVAPLKE	YERSTYHGGI
AtTBP1	198	TQVPSASPV	KQNSVFLGV	DDDDHSEFD	CYRYSALRA	FRITSR-LGY	KRIRKLSR	NVAVAPLKE	YERSTYHGGI
AtTRP1	167	VPSIGCVSH	GVADVHLP	DDDDHSEFD	CYRYSALRA	FRITSR-LGY	KRIRKLSR	NVAVAPLKE	YERSTYHGGI
RTBP1	236	QVPSASPV	KQNSVFLGV	DDDDHSEFD	CYRYSALRA	FRITSR-LGY	KRIRKLSR	NVAVAPLKE	YERSTYHGGI
LeTBP1	309	ESFVLSRHSV	RARKRCQPV	SKRRLSKH	GFVAVYQEA	SESSTVHSD	KIKRDIKTS	MAIPPROTAD	PASVNHMKK
NgTRF1	301	ESFVLSRHSV	RARKRCQPV	SKRRLSKH	GFVAVYQEA	SESSTVHSD	KIKRDIKTS	MAIPPROTAD	PASVNHMKK
AtTBP1	271	KALYRRLK	YVHFWKST	IRKRLSKH	GLVVDYDGL	SESSTVHSD	KIKRDIKTS	MAIPPROTAD	PASVNHMKK
AtTRP1	240	-----	-YLLHQVRSY	IRKRLSKH	ISDSVDDYR	MRTEGDRSR	KQGS-----	-----	-FVAS
RTBP1	313	-----	-KSLKRRH	IRKRLSKH	TLKRLKLAQL	YERKSD----	-----	-----	-----
LeTBP1	389	DFVVKFSIKS	FRVPELVIV	PEIATVGLK	HTVREAVTAL	LESGLVGVV	LQKAVRQDM	RTLEQALISQ	-NGLDHLEP
NgTRF1	381	DFVVKFSIKS	FRVPELVIV	PEIATVGLK	HTVREAVTAL	LESGLVGVV	LQKAVRQDM	RTLEQALISQ	-NGLDHLEP
AtTBP1	340	DSVVKFSIKS	LRVPELVIV	PEIATVGLK	HTVREAVTAL	LESGLVGVV	LQKAVRQDM	RTLEQALISQ	-NGLDHLEP
AtTRP1	290	DSVVKFSIKS	FRVPELVIV	PEIATVGLK	HTVREAVTAL	LESGLVGVV	LQKAVRQDM	RTLEQALISQ	-NGLDHLEP
RTBP1	349	-----	FRVPELVIV	PEIATVGLK	HTVREAVTAL	LESGLVGVV	LQKAVRQDM	RTLEQALISQ	-NGLDHLEP
LeTBP1	468	VLEPRTQV	PSSPHKLEA	ESTVADQL	TREPTPINE	FELTRASADP	LETNCKYSE	HEPSELSTP	HFIDSSDVS
NgTRF1	460	VLEPRTQV	PSSPHKLEA	ESTVADQL	TREPTPINE	FELTRASADP	LETNCKYSE	HEPSELSTP	HFIDSSDVS
AtTBP1	419	VLEPRTQV	PSSPHKLEA	ESTVADQL	TREPTPINE	FELTRASADP	LETNCKYSE	HEPSELSTP	HFIDSSDVS
AtTRP1	370	SLEP-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RTBP1	427	VLEPRTQV	PSSPHKLEA	ESTVADQL	TREPTPINE	FELTRASADP	LETNCKYSE	HEPSELSTP	HFIDSSDVS
LeTBP1	548	IPDSALVIV	PSVRAEALH	VPLH----K	SKSESLQRR	IRPPTVAVY	EALVAVYEL	GTGHWVYEL	RAFEDADRT
NgTRF1	540	IPDSALVIV	PSVRAEALH	VPLH----K	SKSESLQRR	IRPPTVAVY	EALVAVYEL	GTGHWVYEL	RAFEDADRT
AtTBP1	498	SSDRAVIV	LALESALAL	VPLH----K	SKSESLQRR	IRPPTVAVY	EALVAVYEL	GTGHWVYEL	RAFEDADRT
AtTRP1	427	TEPRAHISV	ALRELSSQSQ	PSRSKRSE	QQQQAAER	IRPPTVAVY	EALVAVYEL	GTGHWVYEL	RAFEDADRT
RTBP1	498	SASSQAVIV	ADPNSIALH	VPLH----K	SKSESLQRR	IRPPTVAVY	EALVAVYEL	GTGHWVYEL	RAFEDADRT
LeTBP1	624	VYDLKRWRT	LVTIASIAPQ	QRREPTVQ	LLDVLAAH	YTSQGGKH	AELLKTPDAK	AQRVSA----	-----
NgTRF1	616	VYDLKRWRT	LVTIASIAPQ	QRREPTVQ	LLDVLAAH	YTSQGGKH	VEPLKTPDAK	AQRVSA----	-----
AtTBP1	574	VYDLKRWRT	LVTIASIAPQ	QRREPTVQ	LLDVLAAH	YTSQGGKH	GKQVATTV	VEAGSSH----	-----
AtTRP1	507	VYDLKRWRT	LVTIASIAPQ	QRREPTVQ	LLDVLAAH	YTSQGGKH	QGVHLEGE	YTSQTTGLL	LL-----
RTBP1	573	VYDLKRWRT	LVTIASIAPQ	QRREPTVQ	LLDVLAAH	YTSQGGKH	EDPVEICEP	T-----	-----

第 5 図 LeTBP1 と他の植物テロメア結合タンパク質のアミノ酸配列の比較。LeTBP1, トマトのテロメア結合タンパク質; NgTRF1, *Nicotiana glutinosa* のテロメア結合タンパク質; AtTBP1, AtTRP1, シロイヌナズナのテロメア結合タンパク質; RTBP1, イネのテロメア結合タンパク質。Myb 型 DNA 結合モチーフ (Myb-like), ならびに Myb-extension モチーフ (Myb-ext) を図中に示した。また LeTBP1 における推定上の核内保留配列を四角で囲んだ。



第 7 図 LeTBP1 のノーザン解析。

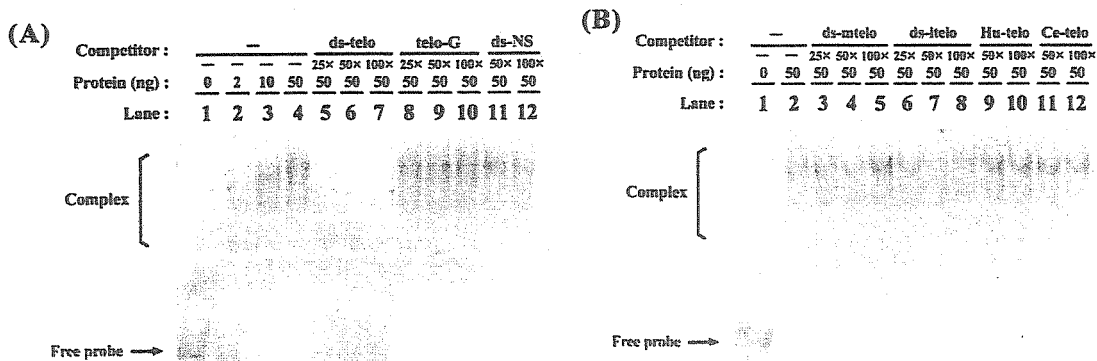
第 6 図 LeTBP1 のサザン解析。

第1表 ゲルシフト解析に用いたオリゴヌクレオチドの名称と配列.

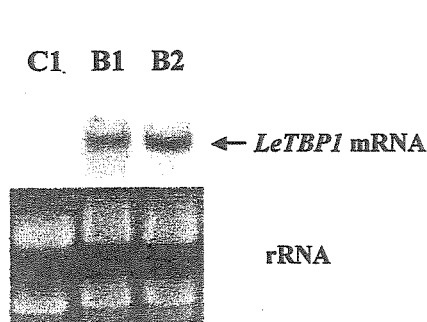
Oligonucleotides ^a	Sequence ^b
ds-telo	5' -ACGTTACAGACCTTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 3' -TGCAAGTGCTGGAATCCCAAATCCCAAATCCCAAATCC
telo-G	5' -ACGTTACAGACCTTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
ds-NS	5' -ACGTTACAGACCTCGATATCTGCAATCGATGTCAGAGTAG 3' -TGCAAGTGCTGGAGCTATAGACGTTAGCTACAGTCTCATC
ds-mtelo	5' -ACGTTACAGACCTGTGTAGTGTGTAGTGTGTAGTGTGTAG 3' -TGCAAGTGCTGGACACATCACACATCACACATCACACATC
ds-itelo	5' -ACGTTACAGACCGGGATTTGGGATTTGGGATTTGGGATTT 3' -TGCAAGTGCTGGCCCTAAACCCTAAACCCTAAACCCTAA
Hu-telo	5' -ACGTTACAGACCTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 3' -TGCAAGTGCTGGAATCCCAAATCCCAAATCCCAAATCC
Ce-telo	5' -ACGTTACAGACCTTAGGCTTAGGCTTAGGCTTAGGCTTAGG 3' -TGCAAGTGCTGGAATCCGAATCCGAATCCGAATCCG

^ads-telo, 二本鎖テロメア配列; telo-G, 一本鎖テロメア配列; ds-NS, 二本鎖非特異的配列; ds-mtelo, 二本鎖改変テロメア配列; ds-itelo, 二本鎖逆向きテロメア配列; Hu-telo; ヒト型テロメア配列; Ce-telo, 線虫型テロメア配列.

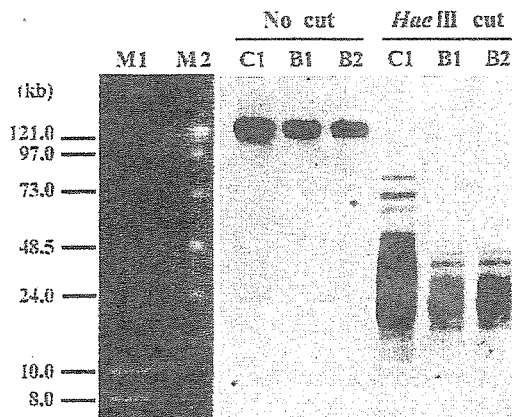
^bテロメア配列を太字で表記した.



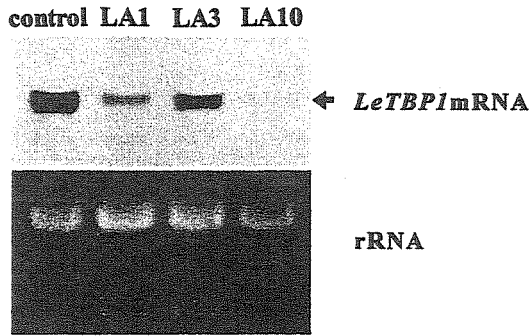
第8図 *LeTBP1*⁵⁰⁹⁻⁶⁸⁹を用いたゲルシフト解析(A,B).プローブには末端標識をした50fmolの ds-telo を用い, 表記した量の *LeTBP1*⁵⁰⁹⁻⁶⁸⁹ とともにインキュベートしてゲルシフト解析を行った. また, 競合反応に用いたオリゴヌクレオチドの名称と量を各レーンの上方に記した. なお, 反応に加えた競合オリゴヌクレオチドの量は, ds-telo プローブ量 (50fmol) に対する倍数で示してある. Complex, 形成された *LeTBP1*⁵⁰⁹⁻⁶⁸⁹ と ds-telo プローブとの複合体; Free probe, *LeTBP1*⁵⁰⁹⁻⁶⁸⁹ と結合していない ds-telo プローブ.



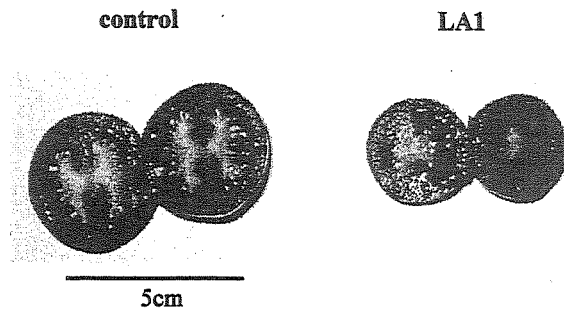
第9図 形質転換 BY-2 細胞における *LeTBP1* の発現. C1, 対照系統; B1, B2, *LeTBP1* 導入系統.



第10図 形質転換 BY-2 細胞におけるテロメア長解析. C1, 対照系統; B1, B2, *LeTBP1* 導入系統; M1, M2, DNA サイズマーカー.



第11図 対照個体 (control) とアンチセンス個体 (LA1, LA3, LA10) における *LeTBP1* の発現.

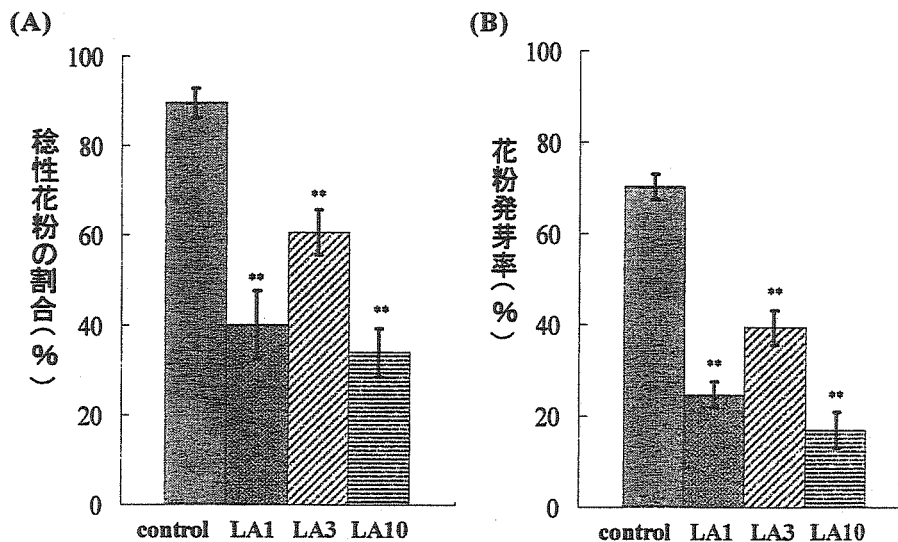


第12図 対照個体 (control) および *LeTBP1* アンチセンス個体(LA1)の成熟果実の写真.

第2表 対照個体 (control) とアンチセンス個体 (LA1, LA3, LA10) における成熟果実の形質.

個体番号	果実径(mm)		果実重 (g)	種子数
	縦径	横径		
control	36.1	35.4	28.6	58.0
LA1	21.1**	24.2**	8.6**	1.7**
LA3	25.7**	29.1**	14.7**	4.7**
LA10	23.5**	28.0**	11.5**	1.1**

**は t 検定により対照個体と 1%水準で有意差があることを示す.

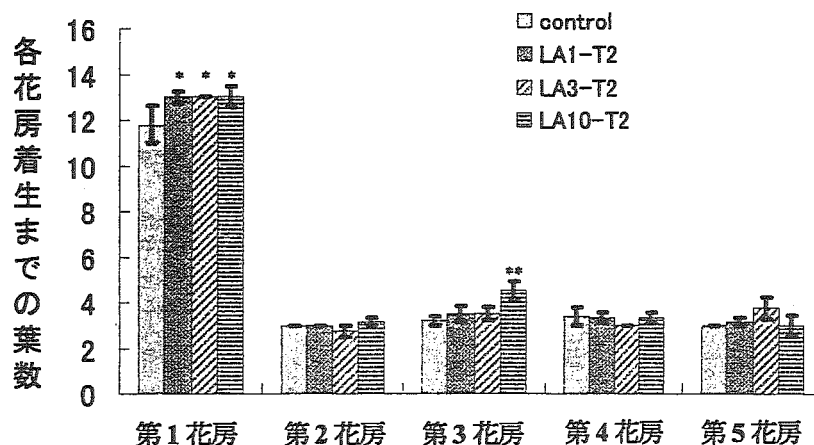


第13図 対照個体 (control) およびアンチセンス個体 (LA1, LA3, LA10) における花粉の稔性. (A)アレクサンダー染色によって調査した稔性花粉の割合. (B)培地上で発芽した花粉の割合. バーは標準誤差(n=4)を表す. **は t 検定により対照個体と 1%水準で有意差があることを示す.

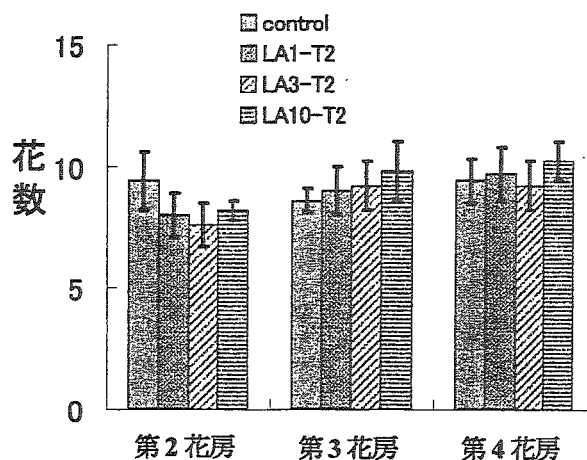
第3表 対照系統 (control) とアンチセンス系統 (LA1-T2, LA3-T2, LA10-T2) の移植後第11週における生育状況.

形質転換系統	草丈 (cm)	展開葉数 (枚)	葉重(g)	
			第12葉	第20葉
control	119.6	31.0	12.6	4.9
LA1-T1	87.5**	31.8	8.5	7.6
LA3-T2	103.1**	31.7	13.2	6.9
LA10-T2	96.7**	32.8*	8.3	7.4**

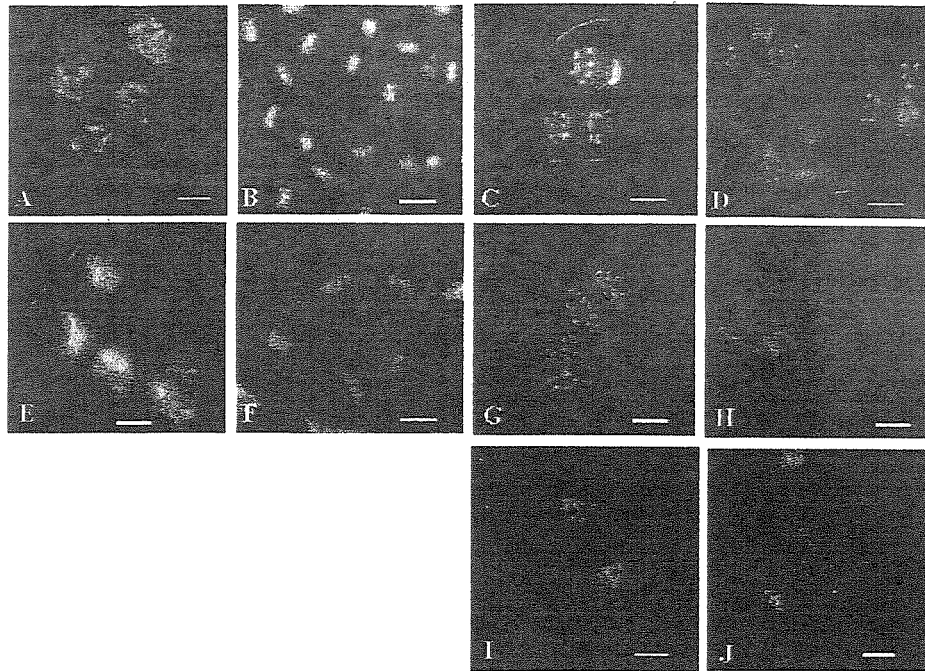
*および**は t 検定によりそれぞれ 5%, 1%水準で control と有意差があることを示す.



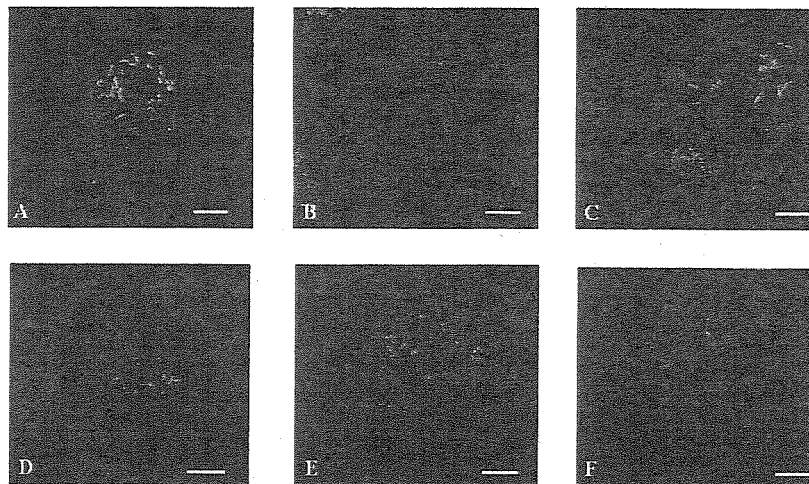
第14図 対照系統 (control) とアンチセンス系統 (LA1-T2, LA3-T2, LA10-T2) における花房の着生節位. 第1花房は第1葉からの葉数, 第2花房以降は直前の花房からの葉数で表した. バーは標準誤差(n=5-6)を表す. *および**は t 検定により対照系統と 5%, 1%水準で有意差があることを示す.



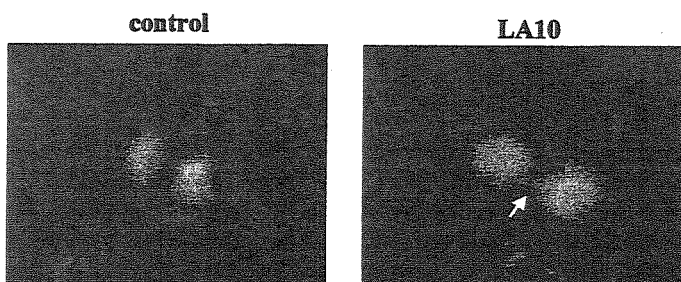
第15図 対照系統 (control) とアンチセンス系統 (LA1-T2, LA3-T2, LA10-T2) における第2, 3, 4花房における花数. バーは標準誤差(n=5-6)を表す.



第16図 対照個体とアンチセンス個体の花粉母細胞の減数分裂. A-D, 対照個体; E-H, LA1; I-J, LA10. A,E,第1分裂前期; B,F,第1分裂中期; C,G,I,第1分裂後期; D,H,J,第2分裂後期. 葯から花粉母細胞を取り出し、DAPIで染色した後に蛍光顕微鏡で観察した. スケールバーは10 μ mを表す.



第17図 対照個体とアンチセンス個体における根端細胞の染色体観察. A, 対照個体; B,C,LA1; D-F, LA10. スケールバーは10 μ mを表す.



第18図 対照個体 (control) とアンチセンス個体 (LA10) における体細胞分裂後期の染色体観察. chromosome bridge を矢印で示した.

論文審査結果要旨

テロメアとは真核生物の染色体末端領域を指し、テロメア DNA とテロメア結合タンパク質から構成されている。ヒトの体細胞において、テロメア長は細胞分裂を経るに従って減少するため、細胞分裂回数の指標として捉えられている。一方、植物には一定期間花芽形成を行わない幼若性と呼ばれる性質があるが、これにも細胞の分裂回数に関連しているという説がある。そこで本研究では、はじめにバラ科樹木のテロメア長と幼若性との関連について調べた。また、テロメア結合タンパク質はテロメアのもつ様々な機能を担う重要な因子として知られているが、植物体における機能解析はなされていない。そこで、次の実験として、モデル園芸作物として利用されているトマトを用いてテロメア結合タンパク質の機能を解析した。

その結果、リンゴにおいてテロメア長と幼若性との関連はみられなかった。しかし、サクラにおいては長期間の細胞分裂を経てもテロメア長が減少しないことが示された。次に、トマトを用いてテロメア結合タンパク質 *LeTBP1* の cDNA がクローニングされ、ゲルシフト解析の結果、*LeTBP1* がテロメア結合タンパク質であることが証明された。また、タバコ BY-2 細胞に *LeTBP1* を導入した結果、テロメア長が減少したことから、*LeTBP1* はテロメア長制御の機能を有していることが示された。次に、トマトに *LeTBP1* アンチセンス遺伝子を導入したところ、染色体異常が発生し、花粉の稔性と種子数が大幅に減少し、着果率と果実重が減少した。したがって、*LeTBP1* は果実の着果や発達に必須の因子であることが明らかとなった。

以上のように、植物には、ヒトの体細胞と異なって、テロメア長を維持する機構が存在することが示唆された。今回得られた知見は永年生植物における初めての解析例であるだけでなく、動物と植物のエージングの違いを示す興味深いものである。また、テロメア結合タンパク質が果実の発達に必須であるという、園芸学的にも植物生理学的にも特筆すべき役割を明らかにした。テロメア結合タンパク質の植物体における機能の解明は、植物では初めての成果である。テロメア結合タンパク質には多面的な機能が想定されており、植物の成長の様々な段階に寄与している可能性があるが、これまで植物での成果は希少であった。したがって本研究の成果によって、植物科学における新しい展開が期待できる。

本研究は植物のテロメア研究に新たな道を開いたと言え、今後の当該分野の研究発展に十分寄与できるものである。よって審査員一同は、本論文提出者に対して博士（農学）の学位を授与するに値するものと認定した。