

氏 名	加 藤 嘉 博
授 与 学 位	博 士 (工 学)
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 3 月 26 日
学 位 授 与 の 根 拠 法 規	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項
研 究 科, 専 攻 の 名 称	東 北 大 学 大 学 院 工 学 研 究 科 (博 士 課 程) 生 物 工 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	シロイヌナズナを用いた植物の生長制御に関する研究
指 導 教 官	東 北 大 学 教 授 野 澤 庸 則
論 文 審 査 委 員	東 北 大 学 教 授 野 澤 庸 則 東 北 大 学 教 授 西 野 徳 三 東 北 大 学 教 授 熊 谷 泉

論 文 内 容 要 旨

本論文においては、植物生長の制御技術の確立を目的として、特に栄養生長期において鍵を握る物質または遺伝子の探索を行った。植物材料としてはアブラナ科植物のシロイヌナズナを用い、物質探索（化学的アプローチ）においては新たな評価系を構築し、38種の植物生長調節物質を評価した。その結果、11化合物がシロイヌナズナの生長に対して促進的に作用することを見出し、特にオリゴ糖の効果が顕著であった。オリゴ糖のスタキオースは1 μ Mという低濃度で最大の生育促進効果を示したことから、単純な炭素源の効果ではなく、シグナル様の作用が示唆された。遺伝子探索（分子生物学的アプローチ）においては同様にシロイヌナズナを用い、エンハンサータギング法によった。エンハンサータギング用のベクターを新規に構築し、これを用いてエンハンサーユニットを導入した変異株を700株以上作成した。これより生長に関する変異株を10株取得し、植物の生長に関与する遺伝子探索の基礎を確立した。

第 1 章 緒 論

本章では、本論文の背景、植物生長の制御技術に関する現在の研究状況及び我々のとるべき研究方針と植物材料の選定について述べた。

第 2 章 植物の生長制御に対する化学的アプローチ(1)

—シロイヌナズナを用いた植物生長調節物質の探索—

本章では植物生長において鍵を握る物質の検索のため、栄養生長期の植物生長を評価する新たなシロイヌナズナの評価系を構築し、これを用いて38種の植物生長調節物質を評価したことについて述べた。

シロイヌナズナの評価系は栄養生長期間全体をカバーするため3週間とし、発芽率や生育状態の均一化を考慮して、環境調節が容易な寒天シャーレ培地による無菌的な培養条件とした。生長の評価項目は植物体の乾燥重量と本葉枚数によった。

植物生長調節物質38種を評価した結果、メチルピラゾール、エピネフリン、シンコメロン酸、アミノレブリン酸、キシロオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ラフィノース、スタキオース、メタノール、トリアコンタノールの11物質にシロイヌナズナに対して1.5倍以上の生育促進作用を見出すことができた。

第3章 植物の生長制御に対する化学的アプローチ(2)

—オリゴ糖の生長促進作用—

本章では前章でシロイヌナズナに対する顕著な生長促進作用が示されたオリゴ糖について、その効果がオリゴ糖に由来することを確認した。

キシロオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ラフィノース、スタキオースの4種のオリゴ糖についてその添加量とシロイヌナズナの乾燥重量とを比較したところ、イソマルトオリゴ糖は乾燥重量よりも過大な量を添加した時に効果を示したため、炭素源としての効果であると判断され、残りの3種については植物体の乾燥重量に対して微量で効果を有することから、単純な炭素源としての作用ではないことが確認された。

キシロオリゴ糖、ラフィノース、スタキオースの3種のオリゴ糖についてそれらの分解物の作用を調べたところ、単糖のガラクトースが比較的生長促進の効果が高いことが明らかとなったが、オリゴ糖のラフィノース、スタキオースの方がより効果が高かったことから、この作用がオリゴ糖に由来することが示された。

第4章 植物の生長制御に対する化学的アプローチ(3)

—オリゴ糖の作用機作—

本章ではオリゴ糖のラフィノース、スタキオースについて添加時期、光合成速度、各種代謝系の酵素活性を調べることにより、その作用機作を考察した。

オリゴ糖の作用は生育1週間以内の特に発芽直後に働いていることが明らかとなった。次に光合成速度や各種酵素活性を調べたところ、直接生長に関与すると考えられる代謝系は対照区に対して有意な差は見られなかった。オリゴ糖による影響は培養7日以降にペルオキシダーゼと酸性フォスファターゼの酵素活性に変動が見られたのみであった。これらの結果からオリゴ糖の作用は特定の代謝の活性化によるものではなく、それらよりも高次での調節領域に働いていることが推察された。また、ラフィノース、スタキオースは転流糖として植物体に微量存在することが知られているため、シンク・ソースの調節機構に作用したと推測され、オリゴ糖の新たな作用を見出したものと考えられる。

第5章 植物の生長制御に体する分子生物学的アプローチ(1)

—形質転換用ベクターの構築—

本章では植物体レベルにエンハンサータギング法を適用するための新規なインテグレーションタイプのベクターの構築を以下に従って述べた。

- (1) 入手した Hyg^R 遺伝子の upstream には 35S プロモーターがあり、これによる不要なリコンビネーションを避けるため NOS プロモーターに置換した。35S プロモーターを切り出す適当な制限酵素サイトがなかったため、 Hyg^R 内の Pst I サイトと Hind III (カット後ランティング) サイトで 35S プロモーターと Hyg^R の前半部を除去し、これに NOS プロモーターと Hyg^R の前半部を Pst I, Xba I (ランティング) サイトに連結した。
- (2) レフトボーダー (LB) とライトボーダー (RB) を pBLUSCRIPT (pBS) に組み込み、Bgl II, Xho I で処理後ランティングし、セルフライゲーションにより RB を除き、LB のみとした。この LB 下流の Sal I, EcoR I サイトに NOSP/ Hyg^R /NOST を組み込んだ。
- (3) エンハンサーは市販の 35S プロモーターのエンハンサー部を狭むように両端のプライマーを合成し、PCR にて増幅した。この際プライマーの両端に Hinc II と EcoR V サイトができるように塩基を余分につけた。この断片を pBS の Hinc II サイトもしくは EcoR V サイトに導入した。EcoR V サイトに導入したプラスミドからエンハンサー断片を Hinc II と EcoR V で切り出して、もう片方のベクターの Hind III/EcoR V サイトに導入した。エンハンサーが 2 つつながった断片を Hinc II/EcoR V で切り出し、これをベクターの EcoR V サイトに組み込むことによって 4 個エンハンサーがタンデムに並んだプラスミドを作った。
- (4) pBS 中の LB/RB 下流の BamH I, Xba I (ランティング) サイトに、pACYC177 中の Km^R を BamH I/Nhe (ランティング) で切り出し導入した。得られた LB/RB/ Km^R から RB/ Km^R を Bgl II (ランティング)/Sst I で切り出して、エンハンサーユニット下流の BamH I (ランティング)/Sst I に導入することによって Ex 4/RB/ Km^R を作成した。

(15) Ex 4/RB/Km^Rを Asp (ブランディング) /Sst I サイトを用いて切り出した後に, LB/NOSP/Hyg^R/NOSTを Not I /Sst I カットライゲーションした。次に全インサートを Asp/Sst I サイトを利用して pBR322 の Pvu II (平滑末端) サイトに組み込んだ。これをエレクトロポレーションによって Ti プラスミド pGV2260 及び EHA101 に組み込んだ。

また, アグロバクテリウム中のエンハンサーユニットを PCR を用いて確認した。

第 6 章 植物の生長制御に対する分子生物学的アプローチ(2)

—形質転換法の検討—

本章ではアグロバクテリウムによるシロイヌナズナへの形質転換に対して, バキューム浸透法と種子感染法を用いて行った検討結果について述べた。

バキューム浸透法では真空度, アグロバクテリウムの菌体濃度, シロイヌナズナの生育期間などについて検討し, 真空度 70mmHg, 菌体濃度 OD₆₀₀=0.8, シロイヌナズナ 18日培養を好適な条件として設定した。また, 形質転換株の大量作成を目的として, 苗床に滅菌ガーゼを使用し, 移植の不要なシステムを考案した。

種子感染法ではフェルドマンらの方法を追試し, この方法による形質転換が可能であることを確認することに成功した。更に, 改良法として共存培養の工程を省き, 減圧や超音波処理などの工程を加えることにより効率の高い方法を開発した。

第 7 章 植物の生長制御に対する分子生物学的アプローチ(3)

—エンハンサー導入株の作成—

本章では第 5, 6 章で構築したベクター及び形質転換法を用いて, エンハンサー導入変異株の大量作成を行い, 候補となる変異株を取得したことについて述べた。

抗生物質ハイグロマイシンへの耐性を指標にエンハンサーの導入された形質転換株を 746株取得した。これらの中に野生株よりも生育の速い株を 10株確認することができた。また, 形質転換株中の50株について PCR を用いて導入したエンハンサーユニットの確認を行ったところ, 全ての株がエンハンサーユニットを保持していることが示された。

第 8 章 総 括

本章では本研究を通じて得られた結果の総括をおこなった。

審査結果の要旨

人口の大幅な増加が予想される今日、食料生産を維持し増大させることは我々に課せられた重要な課題の一つである。食料が本質的に植物生産によること、そして近年の水資源の消耗、土地の劣化、化学肥料の効果の頭打ちを考えると、何か今までにない新しい方法で食料生産の増加に寄与する技術の開発が望まれる。本論文はこのような背景を踏まえ、植物の生長過程においてその栄養生長期に対し鍵を握る物質または遺伝子を見出し、これを用いた植物の生長技術（生長促進技術）を確立することを目的とした基礎研究であり、全編8章からなる。

第1章は緒論であり、本研究の背景および目的について述べている。

第2章から第4章は植物の生長制御に対する化学的アプローチ、そして第5章から第7章は植物の生長制御に対する分子生物学的アプローチについて述べ第8章が総括である。

第2章においては植物の生長調節物質の検索のための評価系について述べ、モデル植物としてシロイヌナズナを用いて寒天シャーレ培養を用いることにした経過を述べている。そしてこれを用いて文献ならびに特許を参考にして選択した38種の化合物について評価を行い11種の生長促進作用を示す物質を見出した。

第3章においては特に生長促進作用の著しかった4種のオリゴ糖に対し、それが単に炭素源としての作用ではなく真に生長促進に効果を示すことをオリゴ糖の添加濃度の効果から示し、またこの効果が培養初期に特に著しいことを見出した。そして、オリゴ糖の添加効果がそれが加水分解することにより生じる構成糖の効果ではなく本質的にオリゴ糖の効果であることを実験により示した。

第4章においては貯蔵物質分解酵素、光合成、活性酸素消去、細胞伸長、情報伝達などに関連する代謝系の酵素活性を調べた。その結果オリゴ糖添加による酵素活性の差は活性酸素消去作用を持つペルオキシダーゼと細胞伸長作用に効果をもつ酸性フォスファターゼに見られたのみであることから、オリゴ糖の効果は個々の代謝系への作用による生長促進効果よりもむしろこれらより上位にあるシンク・ソース作用を制御している高次の代謝調節に働いているのではないかと考察した。

第5章では植物の生長制御に対する分子生物学的アプローチの序章として生長制御遺伝子の取得法について考察し、ポジティブな変異を利用するエンハンサータギング法が適すること、すなわちエンハンサーを含む既知遺伝子を植物ゲノム中にアグロバクテリウムなどを用いてランダムに挿入し変異体群を作成し、この中の生長促進作用を持つ変異体から目的の遺伝子を得る方法が良いと考えた過程について述べ、このためのベクター作成結果について述べた。

第6章においては前章で得たベクターを用いた形質転換法について検討し、従来の方法の約2倍の感染効率を示す新規な種子感染法を確立した過程について述べた。

第7章では第6章の方法を用いてエンハンサー導入株を作成した結果について述べ、この方法により目的の変異導入株を700株取得しその10株は生長を促進する株を得た結果について述べた。

以上の研究により植物の生長制御遺伝子取得のための基礎を完成することができた。

第8章では以上の研究を総括した。

以上要するに本論文では、食料生産増大のために植物の生長制御を行うための化学物質、遺伝子の検索を行い、化学物質としてはオリゴ糖が極めて効果的であることを見出し、遺伝子取得法としてはエンハンサータギング法が良いことを述べ、このための新しいベクターの作製、新しい感染法の開発をとおして生長促進効果を示す変異体を得ることに成功したもので、生物工学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（工学）の学位論文として合格と認める。