

樹木の分子育種とその基礎的研究

Molecular Breeding of Woody Plants and its Fundamental Study

(研究プロジェクト番号：JSPS-RFTF 96L00605)

プロジェクトリーダー

諸星 紀幸 東京農工大学大学院生物システム応用科学研究所・教授

コアメンバー

福田 裕穂 東京大学大学院理学系研究科・教授

伊東 隆夫 京都大学木質科学研究所・教授

古在 豊樹 千葉大学園芸学部・教授



1. 研究目的

本プロジェクトでは、樹木における特異的な維管束形成の分子生物学的解析、セルロース及びリグニンの生合成に関する遺伝子解析、細胞壁構築の機構、さらには樹木の遺伝子組換え技術、分化・再生及び、組織大量培養技術の確立を行い、最終的には有用樹木を作成することを目的とする。

- (1) 維管束形成の機構 (福田裕穂)
- (2) セルロース生合成と細胞壁形成 (伊東隆夫)
- (3) リグニン生合成と遺伝子組換え体の作出 (諸量紀幸)
- (4) 分化・再生と大量組織培養 (古在豊樹)

2. 研究成果概要

2.1 維管束形成の分子生物学^{1,4)}

遺伝子工学を利用した樹木の改良を目指し、応用可能な様々な遺伝子、タンパク質、及びその他の因子の同定を行った(図1)。同定に際しては、すでに我々が開発していた試験管内木部分化系を用いた。1) 最初に、フェージディスプレイ法を用いて、維管束細胞特異的抗体 CN8 抗体と XD3 抗体の単離に成功した。これらの抗体は、異なる維管束細胞のマーカーとして使用できるものと考えられた。2) 次に、内生プラシノステロイドが管状要素分化の最終段階の誘導因子であることを明らかにした。プラシノステロイド合成酵素遺伝子の解析の結果、*DWF4*、*CPD* 遺伝子が分化特異的に発現することが明らかになった。3) 新たなバイオアッセイ系を開発して、新規の道管細胞誘導因子の探索を行った、その結果、ザイロジェンと名付けた高分子のアラビノガラクトタンパク質が単離された。これにより、道管細胞を選択的に誘導する道が拓かれた。4) 道管前駆細胞に発現する *TED3* と分化中の道管細胞に発現するプロモーターを単離し、その発現解析を行った。その結果、これらのプロモーターはそれぞれ予想された細胞に特異的な発現を賦与するプロモーターであることが分かり、道管特異的な発現を誘導するプロモーターとして非常に有望であることが明らかになった。さらに、ポプラに導入したところ、*TED3* は、ポプラの二次維管束

の形成層様の細胞層に発現し、木材においても有効なマーカーとなることが明らかとなった。5) ホメオボックス HD-Zip クラス 3 遺伝子のヒャクニチソウホモローク、*ZeHB10-ZeHB12* を単離し、その発現を解析したところ、いずれの遺伝子も維管束細胞特異的な発現を示したが、異なる維管束細胞に発現することが明らかになった。

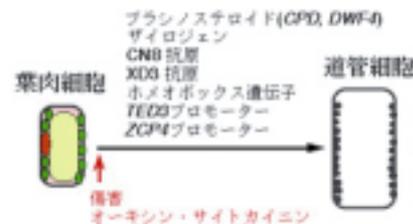


図1 細胞培養系を用いた木部分化関連因子の単離・同定

2.2 セルロース生合成の膜顆粒体(TC)の可視化^{2,4)}

ワタの cDNA から酢酸菌のセルロース合成酵素遺伝子に相同な塩基配列を探すことにより、ワタのセルロース合成酵素遺伝子 (*GhCesA*) をクローニングし、そのタンパク質に対するポリクローナル抗体を調製した。そして、SDS-FRL を使い、セルロース合成酵素の抗体が原形質膜上のロゼット TC に特異的

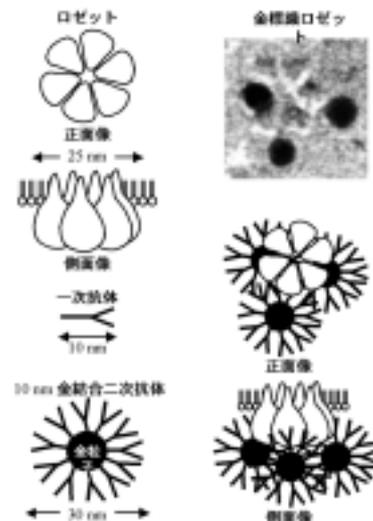


図2 原形質膜上でのセルロース合成酵素の可視化

に標識されるのを可視化した。こうして、ロゼットがセルロース合成を触媒するサブユニットを含むとする直接的な証拠を得た。

2.3 リグニン合成遺伝子の解析と有用樹木の作出⁴⁾

有用樹木の作出は、将来豊富なバイオマス資源の確保すると同時に、環境、資源・エネルギー問題などに重要な役割を持つ。リグニンの少ない樹木はバイオマスの有効変換に大変有効であるため、リグニン合成遺伝子であるペルオキシダーゼ遺伝子の発現を抑制し、リグニン含量を 25-45% 減少させ、パルプ化しやすい形質転換ポプラを作出することに成功した。他方、現在スギ花粉症の蔓延は社会問題化しつつある。そこで、スギの分化、再生系の確立、遺伝子導入系の確立、スギ LEAFY 遺伝子（花芽形成に関与する遺伝子）、CryII（スギ花粉症アレルゲン遺伝子）の単離と機能解析に成功し、これらの成果に基づき花芽抑制スギの遺伝子組換え体の作出に成功した。



図3. ペルオキシダーゼが発現抑制された形質転換ポプラ (POX 27)

2.4 優良樹木の大量培養と育成^{3,4)}

日本産針葉樹 5 種、スギ、ヒノキ、サワラ、クロマツ、アカマツ及び、熱帯樹マホガニーについて、不定胚経由の植物体の再生に成功した。さらに、マイクロプロパゲーションの有用性について検討し、最適条件を決定すると同時に、閉鎖型光独立栄養大型培養システムを確立した。

3. 結論

試験管内木部細胞分化系を用いた実験で、樹木の様々な維管束系遺伝子、タンパク質、及びその他の因子の単離・同定に成功した。さらにセルロース合成遺伝子群と TC との関係が明らかにされると同時に、リグニン合成遺伝子群も単離、同定され、有用な遺伝子抑制形質転換樹木が作出された。それら植物の大量培養技術も開発された。

主な発表論文

- (1) N. Shinohara, T. Demura, and H. Fukuda: "Isolation of a vascular cell wall-specific monoclonal antibody

recognizing a cell polarity by using a phage display subtraction method," Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97 (2000) 2585-2590.

- (2) S. Kimura, W. Laosinchai, T. Itoh, X.Cui and R. M. Brown, Jr.: "Immunogold labeling of rosette terminal cellulose synthesizing complexes in a vascular plant (*Vigna angularis*)," Plant Cell, 11(11) (1999) 2075-2085.
- (3) S.M.A. Zobayed, F. Afreen, C. Kubota and T. Kozai: "Water control and survival of *Ipomoea batatas* grown photoautotrophically under forced ventilation and photomixotrophically under natural ventilation," Annals of Botany, 86 (2000) 603-610.
- (4) In Progress in Biotechnology - "Molecular Breeding of Woody Plants" (Volume 18), N. Morohoshi and A.Komamine eds, Elsevier, The Netherlands, (2001) 1-390