

氏名	たけだ さとみ 竹田 恵美
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第1839号
学位授与の日付	平成5年5月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Studies on Regulation of Gene Expression in Cultured Green Cells of Tobacco (タバコ緑色培養細胞における遺伝子発現調節に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 山田康之 教授 大山莞爾 教授 關谷次郎

### 論文内容の要旨

本研究において材料としたタバコ緑色培養細胞は、発達した葉緑体を有し、培地中に炭素源を添加しなくても、光合成による炭酸同化作用によって増殖が可能である。このように植物葉肉細胞に類似した機能を示すことから、植物体との直接的な比較が可能である。本研究は、このような観点から、このタバコ緑色培養細胞と葉肉細胞の機能発現を比較、検討することによって、植物培養細胞における遺伝子発現の調節機構を解析することを目的として行った研究結果をまとめたものである。主な内容は次の通りである。

1. タバコ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN) の光独立栄養培養細胞 (PA 細胞)、すなわち明所下、糖を含まない培地中で光合成のみにより生育している緑色培養細胞の微細構造とタバコ緑葉のそれを電子顕微鏡観察し、比較した結果、PA 細胞では葉肉細胞と比較して、プラストグロビュールや包膜周辺の小胞構造などが多数存在すること、グラナ構造の発達度が低いこと、また培養初期において分裂しつつある葉緑体が多数存在することを初めて明らかにした。一方、両細胞のクロロフィル含量と葉緑体数の変化を追跡し、培養細胞と緑葉における生重量当りのクロロフィル含量の違いは細胞の大きさの違いによるものであり、葉緑体数や葉緑体当りのクロロフィル含量の違いではないことを初めて明らかにした。次いで両細胞の光合成機能を光化学系活性を指標に検討した結果、培養細胞の光合成活性は緑葉の約 1/2 で安定していることを明らかにした。これらの結果により、PA 細胞が緑葉のモデル細胞として非常によい素材であることを明白にした。

2. 除草剤作用を有する種々の化合物に対する反応性を、タバコ PA 細胞、明所下で糖を添加して培養している光混合栄養細胞、暗所下で糖を添加して培養している従属栄養細胞の 3 種の栄養状態にある培養細胞並びにタバコの幼植物を用いて測定した。その結果、光合成阻害型の除草剤に対して、PA 細胞は他の培養細胞より感受性が高く、また幼植物の示す反応性と最も高い相関があることを明らかにした。以上の結果、PA 細胞を用いて除草剤作用を有する化合物のスクリーニングが効率的に行い得ることを初めて示した。

3. タバコ光独立栄養細胞における特徴的な遺伝子発現を明らかにするため、二次元電気泳動法により

蓄積タンパク質を分離・分析し、さらに特徴的なタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定した。その結果、タバコ光独立栄養細胞において、NaCl耐性のタバコ培養細胞に蓄積するタンパク質オスモチンと高い相同性を持つ3種のタンパク質（P1, P4, P7）及び、塩基性エンドキチナーゼと高い相同性を持つタンパク質（P2）が存在することを明らかにした。さらにP1-P7はタバコ培養細胞においては定期的に発現していたが、緑葉においてはストレスにより誘導されたことから、タバコ培養細胞は常にストレス条件下にあることが明らかになった。

4. オスモチンと高い相同性を有するタンパク質P4（オスモチン様タンパク質）は培養細胞に著量蓄積する新規なタンパク質であった。そこで、このcDNAをクローニングし、塩基配列の決定を行い、全アミノ酸配列を明らかにした。その結果、本タンパク質は、N末端に21アミノ酸残基からなるシグナルペプチドを有し、翻訳後、プロセシングされて成熟タンパク質になることを明らかにした。また、そのアミノ酸配列を他のタンパク質と比較したところ、オスモチン（76%）、タバコ感染特異的タンパク質PR-S（60%）、トマトのNaCl誘導性タンパク質NP24（77%）、トウモロコシの $\alpha$ -アミラーゼ/トリプシンインヒビター（54%）、甘味タンパク質ソーマチン（51%）と高い相同性を示すこと、またこれら6つのタンパク質中のシステイン残基16個は完全に保存されていることを明らかにした。また、ノーザンブロット解析により、本タンパク質は、アブシジン酸により誘導されるオスモチンと極めて高い相同性を有しているが、その発現はアブシジン酸ではなく、エチレンによって誘導されることを初めて明らかにした。以上の結果並びに培養に伴うエチレン発生の定量より、タバコ培養細胞の遺伝子発現の調節にはエチレンが関与していることを示唆した。

## 論文審査の結果の要旨

植物培養細胞は、植物育種の新しい手段として、また有用物質生産の素材として、注目されているが、その一方、植物培養細胞における遺伝子発現の調節機構の解析は、ほとんど行われていない。その理由の一つは、植物個体における遺伝子発現と比較しうる適当な培養細胞系がなかったためである。本研究において、著者が材料としたタバコ緑色培養細胞は、細胞選抜を繰り返すことによって確立された光合成活性を有する培養細胞で、光独立栄養的生育が可能であることから、植物体と機能発現を比較するための好適な素材である。本研究において、著者はこの緑色培養細胞を緑葉と比較することによって、植物培養細胞における遺伝子発現の調節機構を解析した。

本研究において、著者はまず、タバコ（*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN）の光独立栄養細胞（PA細胞）における葉緑体の分化をその微細構造ならびに光合成機能の両面より解析した。その結果、PA細胞における葉緑体の機能分化は緑葉の細胞に比べやや劣るが、質的構成に関して差はなく、1）緑葉のモデル細胞となり得ること、2）除草剤スクリーニングの効率的なシステムを提供し得ること、また、3）遺伝子発現の調節機構の解析に有効な素材となり得ることを示した。

さらに著者は、タバコ光独立栄養細胞に蓄積するタンパク質を緑葉のタンパク質と比較・分析し、次いで特徴的な蓄積を示すタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定することにより、光独立栄養培養細胞における特徴的な遺伝子発現を明らかにした。すなわち光独立栄養細胞には一群のストレス誘導性タンパク質

が著量蓄積していること、さらにタバコ培養細胞は常にストレス条件下にあることを初めて明白にした。

また著者は、タバコ培養細胞に著量蓄積していたストレスタンパク質のうち新規のタンパク質であるP4（オスモチン様タンパク質）のcDNAをクローニングし、その塩基配列並びに全アミノ酸配列を初めて明らかにした。また、遺伝子発現量をノーザンブロット分析することによって、本タンパク質は植物ホルモンのエチレンによって誘導されていることを明らかにし、タバコ培養細胞における遺伝子発現の調節にエチレンが関与していることを示した。

以上のように本論文は、植物培養細胞における葉緑体の機能発現が植物体のそれと質的に類似していること、緑葉のモデルシステムとして利用し得ること、一方、植物培養細胞は常にストレス条件下にあり、そのことが培養細胞における遺伝子発現の調節に深く関わっていることを明白に示したものであり、植物細胞育種学、植物細胞生理学、植物分子生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成5年3月22日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。