

米国科学アカデミー紀要電子版に発表

<http://www.nasonline.org/site/PageServer>

解禁日時（日本日時 平成18年10月17日AM7:00）

（米国日時 平成18年10月16日PM5:00）

平成18年10月12日

国立大学法人 筑波大学

ペクチン合成遺伝子による植物の生殖機能の調節に成功

[ポイント]

- 1) ホウ素と結合するペクチンの合成に関連する遺伝子を用いて、植物の生殖組織の機能と発達の調節を行うことに成功。
- 2) 植物の雄性不稔化や遺伝子組換え作物の遺伝子拡散防止など、品種改良への応用。

[概要]

植物の受精と生殖組織の発達に、ホウ素と結合する細胞壁糖鎖の一種であるペクチンの合成に関わる遺伝子が必須であることを、筑波大生命環境科学研究科の岩井宏暁講師、佐藤忍教授の研究チームが世界で初めて明らかにした。この遺伝子の発現を抑制することで、植物の雄性不稔化を自由に行うことが出来るため、様々な植物育種に利用できることが期待される。16日の米国科学アカデミー紀要電子版に発表した。

研究チームは、ホウ素とペクチンとの架橋形成に必須な *NpGUT1* 遺伝子がタバコの生殖組織で強く発現することから、誘導性プロモータを用いてこの遺伝子の発現を抑制できるタバコを作成した。若いつぼみにおいて *NpGUT1* の発現を抑制したところ、雄しべでは花粉が全く作られず、また雌しべでは、花粉管の通り道に異常が生じ、受精することが出来なくなった。また花粉管の発芽・伸長も阻害された。

ホウ素とペクチンが植物の発達に重要であることは知られていたが、今回の研究成果により、この遺伝子を用いて植物の生殖機能の調節を行えることが示され、遺伝子組換え作物の遺伝子拡散防止など、今後の品種改良に大きく役立つものと考えられる。

[研究の背景及び目的]

植物の微量必須元素ホウ素は、植物の個体発生や生殖過程において重要な働きを持つことが知られており、極めて微量で効果があることから、無機ホルモンと呼ばれている。

また、その作用部位は、細胞壁糖鎖の一つであるペクチンであり、ホウ素-ペクチン架橋が形成されることがわかっている。しかし、ホウ素は植物体中で、極めて微量にしか存在しないことから、その働きを人為的に調節することが非常に困難であった。

近年、我々は、新規ペクチングルクロン酸転移酵素遺伝子 (*NpGUT1*; glucuronyltransferase 1) を同定した (図1)。この遺伝子は、植物のペクチン合成に関わる初めての糖転移酵素遺伝子で、ホウ素の作用点であるペクチン-ホウ素架橋の形成に必須であることが判明している (図2)。そこで我々は、この遺伝子の発現を調節することにより、ホウ素-ペクチン架橋の生殖機能、特に生殖組織の形成と受精における役割の解明を行った。

[成果]

我々は、タバコの仲間ですべてのゲノムサイズを有する *Nicotiana plumbaginifolia* の半数体植物を用いて、細胞接着に異常をきたした変異培養細胞の作出に成功し (Iwai et al, *Planta*, 2001)、その原因遺伝子として新規糖転移酵素遺伝子であるペクチン・グルクロン酸転移酵素 (ペクチン多糖にグルクロン酸を転移する酵素) の遺伝子 *NpGUT1* を世界に先駆けて発見した (図1)。

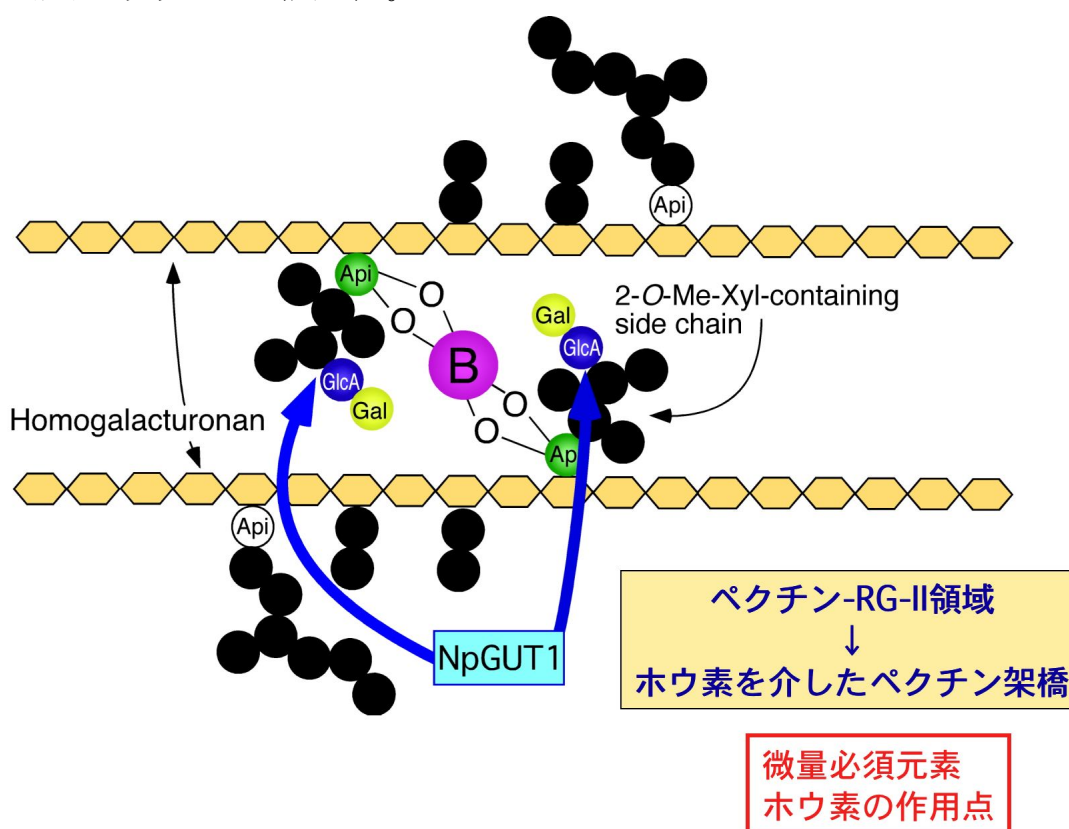


図1 *NpGUT1* (pectin-glucuronyltransferase 1)

また、この *NpGUT1* 遺伝子が、植物のペクチン合成に直接関係する遺伝子であり、頂端分裂組織で特にその発現が強く、植物の必須微量元素であるホウ素の作用に必須であることもわかっている (Iwai et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002) (図1, 2)。

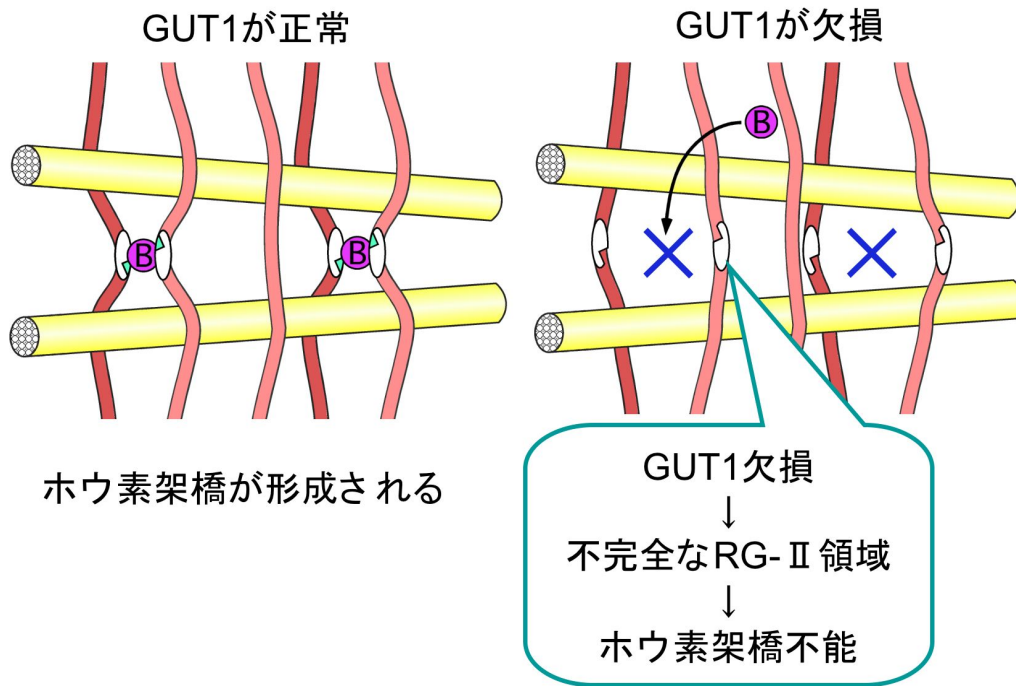


図2 *NpGUT1*とペクチン-ホウ素架橋の関係

さらに、*NpGUT1*遺伝子が、頂端分裂組織以外にも葯のタペート組織及び花粉管の先端、花柱の伝達組織などの花器官で発現していることを新たに見出し（図3）、さらに、当該*NpGUT1*遺伝子の発現を抑制して、その表現形質を確認する研究を鋭意行った。

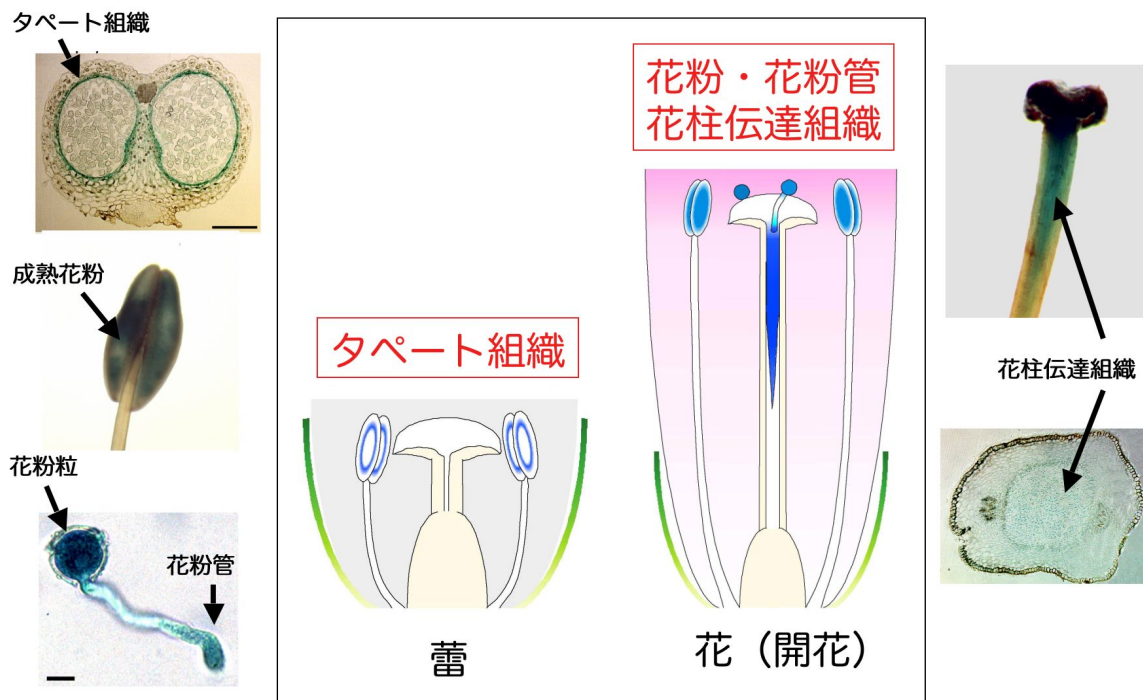


図3 *NpGUT1*の生殖器官における発現

NpGUT1のcDNAを、DEX誘導性発現ベクター (pTA7002) のプロモーターの下流に、逆向き (アンチセンス) に組み込み、アグロバクテリウムを介してタバコ (*Nicotiana tabacum*) の葉切片に接種し、カナマイシンを含むムラシゲスクーク寒天培地において形質転換体を選抜・育成した。選抜された形質転換体を自家受粉し、得られた種子を、カナマイシンを含むムラシゲスクーク寒天培地において滅菌播種した。実生まで育てた後、鉢出しして培養土で花が咲くステージまで育てた。おのおの実験は、独立した3つのラインを用いて行った。DEXは、30 mMの濃度で、Tween 20を0.01%の濃度で与えた。コントロールには、Tween 20を0.01%の濃度含む蒸留水を与えた。

Control植物 (対照区植物)、及びDEX誘導プロモーターによってアンチセンスNpGUT1を発現させたNpGUT1アンチセンス誘導植物 (以下「GUT1A植物」) の各々の、花冠長約2センチの時期の蕾の葯に対しマイクロピペットを用いて、30 mM DEXを20 μ L与え、約24 h後花を観察した。開花した花のうちすべてのもので花粉が形成されなかった (図4)。これら、花粉が形成されないものはすべて、不稔となった。一方、コントロールでは、正常に花粉が形成され、稔性は維持されていた (図4)。

Control植物およびGUT1A植物の開花した花から採取したそれぞれの花粉を、30 mM DEXを含む花粉管伸長培地で発芽させたところ、上記GUT1A植物の花粉では、澱粉粒などを出すなどがあつたが、全く発芽しなかった。コントロールでは、発芽した。

また、DEXを与えないで発芽させて50分経過した発芽花粉を、30 mM DEXを含む花粉管伸長培地 (スライドガラス上) に移して、さらに1時間観察したところ、GUT1Aの花粉管は一度分岐した後停止し、その伸長成長が阻害されていた (図4)。一方、コントロールでは、正常に伸び続けた (図4)。

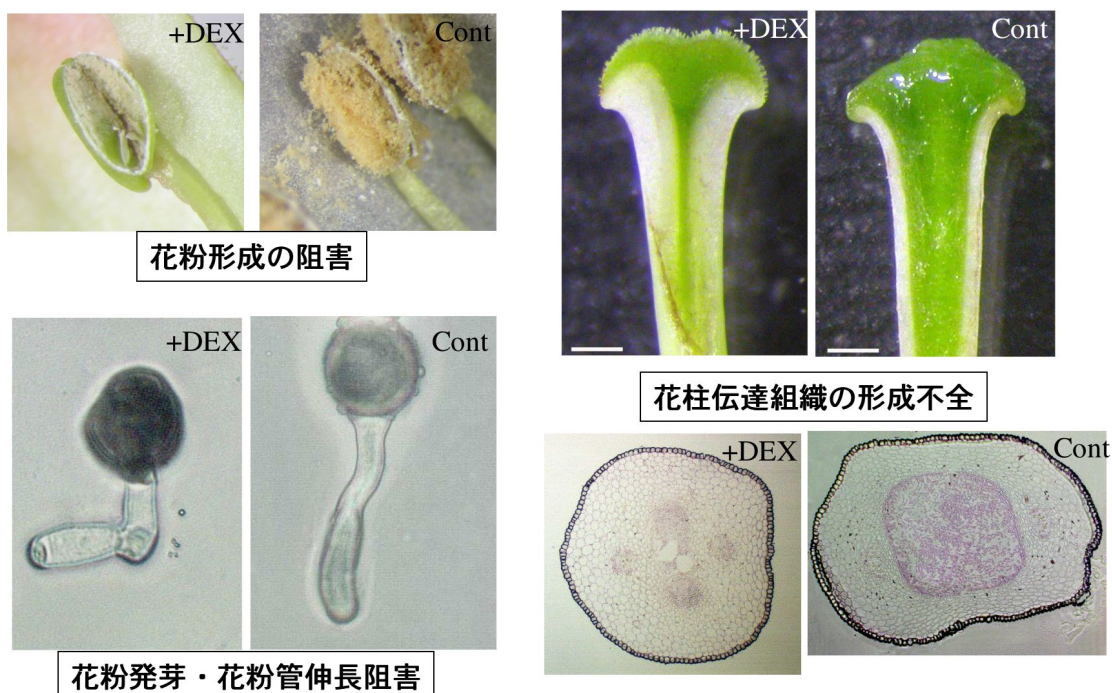


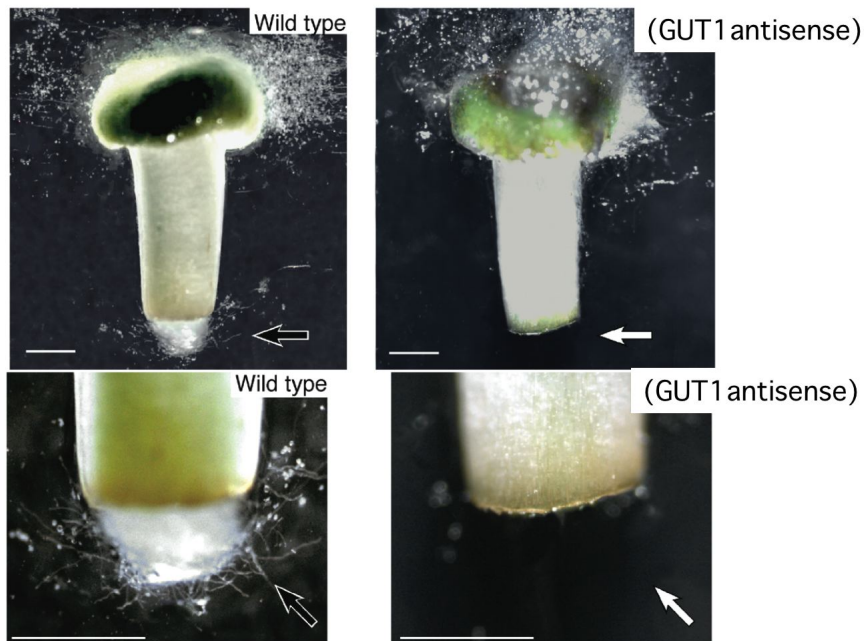
図4 生殖器官の組織形成に対するDEX誘導性アンチセンスNpGUT1発現の効果

花冠長約2センチの時期の蕾に対し、30 mM DEXを処理した結果、雌しべの伝達組織（花粉管の通り道）の組織形成が未熟なままで発達しなかった。これらはすべて不稔となった（図4）。コントロールでは、正常な発達を示した（図4）。

前記した未発達の雌しべを、柱頭先端から5 mmで切断し、正常な花粉を柱頭に与えて、16 h後観察した。その結果、DEX処理した雌しべでは、切断面から花粉管がでてこなかった（図5）。このことから、DEX処理した雌しべは、花粉管の通り道として機能できていないことが示された。一方、コントロールでは、切断面から花粉管が出てきた（図5）。

以上から、ペクチン・グルクロン酸転移酵素の遺伝子NpGUT1は、植物の生殖器官において、花粉の発生、発芽、花粉管伸長、花柱における伝達組織の形成に係わっていることが明らかになり、植物の不稔形質の発現に深く関与していることが明らかになった。

これは、植物に存在するペクチン・グルクロン酸転移酵素遺伝子GUT1が、不稔形質の発現に深く関与することを明確に示している。



GUT1を発現抑制すると花粉管が雌しべを通れない

図5 受精ガイダンスに対するDEX誘導性アンチセンスNpGUT1発現の効果

[今後]

植物の雄性不稔形質は、農業又は園芸産業等における品種の保護、交雑育種における交配作業の効率化、遺伝子組換え植物の花粉飛散の防止などの理由から重要な形質であり、一方の雌性不稔形質は、花卉の日保ちの改善などに有効であることが知られている。このため、不稔形質を、遺伝子操作等の人為的に植物に導入する技術の開発が進みつつある。

本研究は、植物の不稔形質に係わる新規な遺伝子、特に、アンチセンス法により発現抑制を行って植物に不稔形質が確実に表現される遺伝子を見出すとともに、NpGUT1遺伝子を用いた不稔形質導入技術を提供できるものであると考えられる。

研究の結果、雄しべでは花粉が形成されず、花粉の発芽や花粉管伸長も著しく阻害されて不稔となり、また、雌しべでは、花粉管が通過する花柱の伝達組織が形成されず、すべて不稔となることを全く新規に突き止めた。即ち、*Nicotiana plumbaginifolia*のペクチン・グルクロン酸転移酵素遺伝子NpGUT1が、該植物の不稔形質の発現に関わる遺伝子であることを突き止めた。これは、ペクチン・グルクロン酸転移酵素遺伝子であるGUT1が、植物においては、不稔形質の発現に深く関与することを明確に示すものである。

なお、このGUT1遺伝子は、植物種間での相同性が極めて高く、植物種間で同様の機能を有するのは明らかであるから、今般新規に見出したNpGUT1遺伝子の不稔形質発現に関わる機能からGUT1遺伝子の同機能を推定できる。

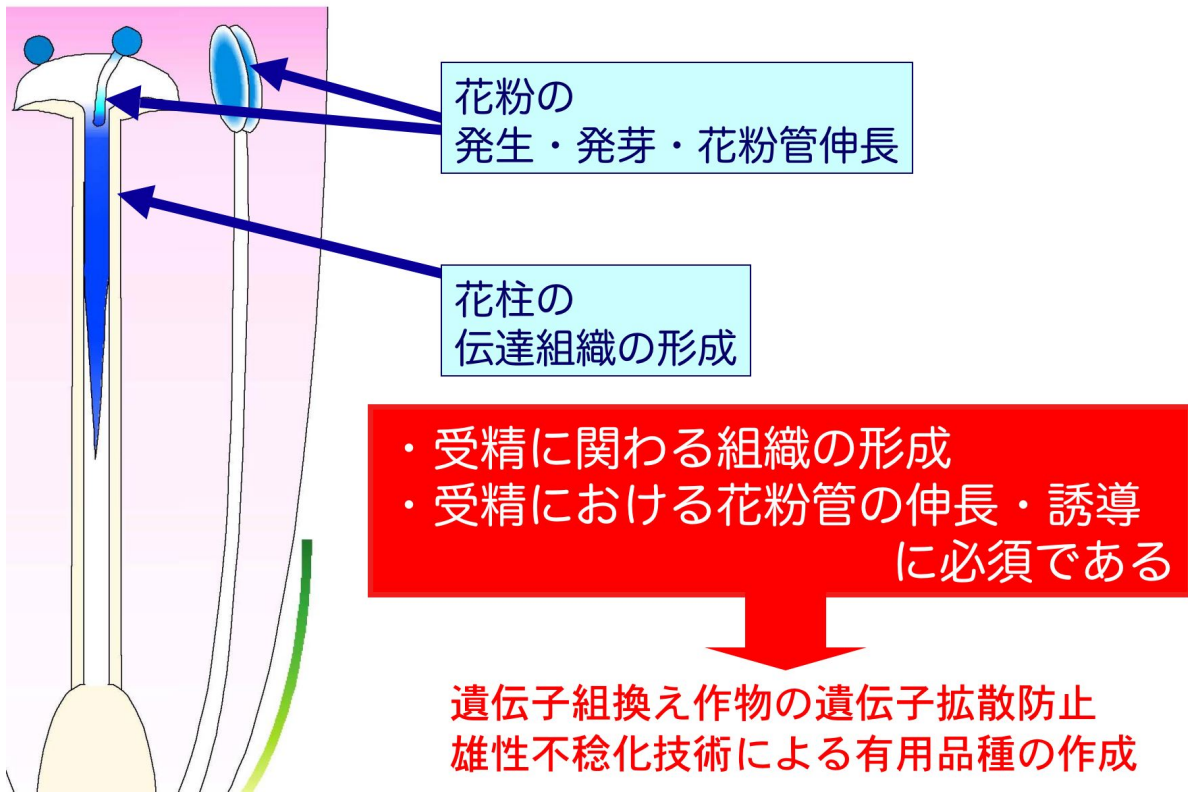
現在、アンチセンス法による遺伝子発現抑制技術では、アンチセンスで特定の遺伝子の発現を抑制できたとしても、その遺伝子の表現型を代替するような別の遺伝子が存在することが多く、期待した発現抑制効果を得ることが通常難しい。しかし、本研究のように、GUT1遺伝子（例えば、NpGUT1遺伝子）をアンチセンス化して、該GUT1遺伝子の発現を抑制する方法では、植物へ不稔形質を確実に導入することができる。これは、従来のアンチセンス法による不稔形質導入（不稔形質発現）技術には見られない顕著な効果である。その意味では、該GUT1遺伝子のアンチセンス法による発現抑制による不稔形質の導入及び発現は例外的であり、これは該GUT1遺伝子の特性に起因している可能性が高いと考えられる。従って、これらの方法を用いて、雄性不稔の植物、あるいは雌性不稔の植物を作出が可能となる。

本研究では、ペクチン・グルクロン酸転移酵素遺伝子GUT1の発現を抑制する遺伝子操作によって、植物に不稔形質を確実に導入することができる。GUT1遺伝子（例えば、NpGUT1遺伝子）をアンチセンス化して、該GUT1遺伝子の発現を抑制する方法を採用すると、植物へ不稔形質を確実に導入及び発現させることができる。しかも、GUT1遺伝子の発現抑制によって、雄性不稔と雌性不稔のいずれの不稔植物を作出することができるという利点がある。

植物への不稔形質導入技術あるいは不稔植物作出技術として有用である本研究は、農業又は園芸産業等における品種の保護、交雑育種における交配作業の効率化、遺伝子組換え植物の花粉飛散の防止、花卉の日保ちの改善などに有用である。

特に、遺伝子組み換えの花粉飛散が大きな社会問題になりつつあるが、本研究を利用することにより、花粉の生産や受精を抑制できるので、本問題の解決に役立てることができる。

NpGUT1の生殖器官における役割



[用語の解説]

・DEX誘導プロモーター

「DEX誘導プロモーター」とは、ほ乳類のステロイドホルモン受容体の遺伝子を利用して、ステロイドホルモンの一種であるデキサメタゾン (DEX) を外部から添加した場合にのみ遺伝子発現が生じるプロモーターを意味する。植物においても、DEXを与えることにより、限られた部位において、あるタイミングで遺伝子発現を誘導できる。本実験の場合、このDEX誘導プロモーターの下流にNpGUT1の逆向き配列を連結し、タバコ (*Nicotiana tabacum*) に導入している。DEXを外部から添加すると、NpGUT1のアンチセンスRNAが転写産生され、本来のNpGUT1の遺伝子発現が抑制される。

・アンチセンス法

「アンチセンス法」とは、目的の遺伝子 (本研究ではNpGUT1などのGUT1遺伝子) から転写されたmRNAと相補的なアンチセンスRNAを細胞内で発現させて、該アンチセン

スRNAを目的の遺伝子と相補的に結合させ、目的遺伝子の転写を妨げ、その結果として該遺伝子の発現を抑制する方法である。植物で実際に行う場合は、あるプロモーター（通常はなるべく強力で発現量の多いものを用いる。）の下流に、本来の遺伝子を逆向きにつないで植物に導入すると、本来のmRNAと相補的なRNA（アンチセンスRNA）が産生され、本来の遺伝子発現が抑制される。しかし、問題点としては、遺伝子発現を完全には阻害することができないため、今回のGUT1の様に形質がでない場合が多い。

・植物の不稔性

植物の不稔性は、次代の植物として発達し得る種子を生じないことであり、生殖細胞の形成から受精が行われる生殖器官の機能・形態・位置などに原因があつて起こる。

[本件問い合わせ先]

国立大学法人 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生命共存科学専攻

〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1

講師 岩井宏暁

hiroiwai@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

Tel : 029(853)7260, 携帯 : 090(6123)2131, nolac-h18@ezweb.ne.jp

教授 佐藤忍

satohshi@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

Tel : 029(853)4672, 携帯 : 090(9017)4627

*岩井、佐藤ともに10/12出張中のため連絡は携帯にお願いします。

[プレス発表・取材に関する窓口]

国立大学法人 筑波大学 総務・企画部 広報課 広報・報道

〒305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1

課長補佐 大毛

専門職員 和田

Tel:029(853)2040, Fax : 029(853)2014