

# 木本植物の遺伝子単離

京都大学木質科学研究所

遺伝子発現分野 酒井富久美

## 1. はじめに

地球環境の悪化、石油資源の枯渇を視野に入れることにより、木本植物樹木は利用価値の高い生物資源といえる。それが生きているときは巨大な炭酸ガス固定装置であり、切り倒されるとそれが木質材料として役立つ。次世紀に向けて、新たな特性をさらに付与し、より利用度の高いものへと改良できれば、人類の生活はより豊かなものとなる。生物の形や性質は、基本的には遺伝子によって決められているので、世代の長い樹木とはいえ遺伝子工学的手法を用いることにより、計画的に効率よく短期間で形質の改良を行えるであろう。そのためには、まず樹木の遺伝子がどのようなものかについてももう少し知る必要がある。しかし、これまで果樹以外の木本植物はそれ程形質を改良する必要性が無かったこともあり、個体サイズも大きくて扱いにくい材料であることから遺伝子に関する情報は未だ少ない。

## 2. 樹木の特徴と遺伝子

木本植物も基本的な生命現象に草本植物と大きな違いはない。樹木が作物等の草本植物と異なるところは、木部の形成と窒素を含まない多量の二次代謝物の生合成にある。樹木は地球上で最大かつ最長寿命の生命体として進化を遂げ、全体としては何百年も生き続けるが、葉や僅かな分裂組織などの生きた部分以外の大部分は核の消失した死細胞といえる木部で構成される生物体である。光合成で炭酸固定した物質は、草本植物では糖、デンプン、タンパク質として貯蔵されるが、樹木はこれをセルロースを主成分とする木質に変換する。固定したCO<sub>2</sub>の木質への蓄積・貯蔵量は膨大で、単純計算によると普通の高さ15メートルの天然スギは約640キログラムに相当するCO<sub>2</sub>量になる。また、その他リグニンをはじめ様々なフェニルプロパノイド類の産生も特徴的であり、様々な面で注目を集めている。リグニン生合成の最終反応はペルオキシダーゼによるラジカル重合反応であるが、これは同時に細胞内活性酸素毒性の消去プロセスで、リグニンの形成こそ巨体と長寿命を支える要因ではないかという考えがある。

遺伝子は細胞の葉緑体やミトコンドリアにも含まれているが、大部分は核ゲノムDNAの形で存在している。このゲノムサイズは生物種により異なり、樹木のそれは比較的大きいと推定されている。一般的に被子植物である広葉樹より、裸子植物の針葉樹の方が大きく、アカマツでは  $9.6 \times 10^{10}$  塩基対でヒトの約10倍もあり、ポプラやユリノキはヒトと同じ  $10^9$  塩基対のオーダーを有しているものと算出されている。実際の遺伝子が占める部分はゲノムDNA全体の10%にも満たないとされており、そのサイズが単純に遺伝子情報量を反映するものではないが興味ある点である。

## 3. 樹木遺伝子の単離

遺伝子の単離、即ちクローニングについては、近年手法の急速な進展がある。高等動植

物から得られた遺伝子の数は多数になる。樹木の遺伝子についてみても、80年代の終わり頃から盛んになり、最近の2～3年で数を著しく増したことが塩基配列のデータから予測されている。樹木で登録された遺伝子データ数は500件を越えるが、その内およそ半数は多重遺伝子ファミリーのリボソームRNA遺伝子（rDNA）で、残る200余りが通常の遺伝子である。これまでに、マツの光合成に関与する遺伝子等の樹木の生産性に関連する遺伝子が単離され、また樹木の特徴である二次代謝に関連する酵素遺伝子、ペルオキシダーゼ、O-メチルトランスフェラーゼ、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ、ケイヒ酸アルコール脱水素酵素等フェニルプロパノイド生合成経路の酵素遺伝子が単離されている。この他、レクチンのような貯蔵蛋白質の遺伝子やキチナーゼのような障害・病害誘導性蛋白質の遺伝子が得られている。

遺伝子のクローニングはゲノムライブラリーから、あるいはcDNAライブラリーから行われる。後者の場合、イントロンを含まないのでそのまま原核細胞の宿主・ベクター系を用いて遺伝情報を発現させることができる。これまでに単離された遺伝子の多くはcDNAライブラリーからえられた遺伝子である。逆転写反応系の改良やPCR法の著しい進展等により、比較的容易に遺伝子が得られるようになってきている。

樹木の細胞壁は強固な上にリグニン等種々の二次代謝産物が含まれているため、mRNAの抽出が容易でないが、培養細胞にすれば草本植物と変わりがない。我々はポプラの培養細胞を材料に用いて、セルラーゼ遺伝子をcDNAライブラリーから単離した。まず、酵素蛋白質を精製して、部分アミノ酸配列が決定された（この場合はN末端であった）。決定したアミノ酸配列の適当な部分からPCRのプライマーを推定して合成し、これを用いてPCRにより51bp断片を増幅した。この断片のシーケンスから正確な配列のプライマーを新たに合成し、ベクター3'側の既知配列のプライマーとによりPCRを行い、この遺伝子の5'末端210bpに相当の断片を増幅、さらに大腸菌にクローニングしてプローブを作成した。ポプラ培養細胞から作成したcDNAライブラリーをこのプローブを用いてスクリーニングを行い、1482bpのORFを含むグルカナーゼ遺伝子を得た。ノーザン分析からこの遺伝子は植物ホルモン2,4-Dで誘導発現されることもわかった。

#### 4. 染色体の微細加工と遺伝子単離

先に述べたように、樹木は遺伝子の単離・解析を行う上で他の不利な点を有している。それは細胞一個あたりに含まれる核DNAサイズが比較的大きいことである。以下に述べる遺伝子を直接単離する方法は、ゲノムサイズの大きさを克服できる。真核生物の染色体は細胞分裂の中期の核内において明確に捉えることができる。この染色体を顕微鏡下で微細断片化し、遺伝子の特定領域を含む断片をテンプレートにしてPCRを行えば、遺伝子単離の効率を高めることになる。たとえば、アカマツのゲノムサイズは約 $5 \times 10^{10}$ bpであるが、核一個は12対の染色体で構成されているので、そのうちの1対を選びだせば、 $10^9$ のオーダーまでさげられる。さらに、その1本を10個の微細断片にすれば断片は $10^8$ bpまで小さくなったことになる。このような染色体への微細加工を施すためには、各染色体の識別同定を必要とする。木本植物ではまだ十分にそれが行われていない状況であるが、イネ、ムギ等の草本植物ではすでに識別同定は可能になっている。染色体の微細加工法は従来からのマイクロマニピュレーションにより、極細のガラスメスで切断する方

法と、最近では、小さく集光したレーザー光を用いて微細手術する方法がある。前者が熟練を要するのに対し、後者はレーザー光を発生させ制御する高価で特殊な装置を必要とする。ここでは操作性がよく、より微細な加工が可能となってきたレーザー切断加工について述べる。

染色体数が7対14本と少なく、遺伝子の座位がよく調べられているオオムギの例で見ると、まず、材料は中期細胞分裂体を得られ易い根端細胞を用い、染色体像を倒立顕微鏡下で捉える(図参照)。目的の染色体以外を順次レーザー光で焼却していく。最後に目的の染色体断片のみにする。レーザー光は顕微鏡対物レンズの中心を通過し微細なスポットとして絞りこまれており、顕微鏡あるいはモニターを見ながら試料ステージを自由に動かして切断焼却していくことが可能になった。得られた染色体の微細断片をPCR用マイクロチューブへ移し、PCRを行えば目的遺伝子が増幅されてくる。リボソームRNA遺伝子のように多重コピーのものは1対の染色体断片でPCR増幅が可能であるが、少数あるいはシングルコピーの遺伝子の場合には複数個の染色体断片をテンプレートに用いないと実際にはうまく増幅できない。シーケンスが未知の場合においては、特定部位ゲノムライブラリーの作成となる。これは、染色体微細断片を適当な制限酵素で切断後、プライマー部位が形成されるようにデザインされたプライマー・リンカーを連結することによってPCRを行う。このゲノムライブラリーは遺伝子の単離と同時に染色体上の遺伝子座位の情報が得られる。世代が長く遺伝分析の困難な樹木にとって有効な手法になるものと考えられる。

## 5. おわりに

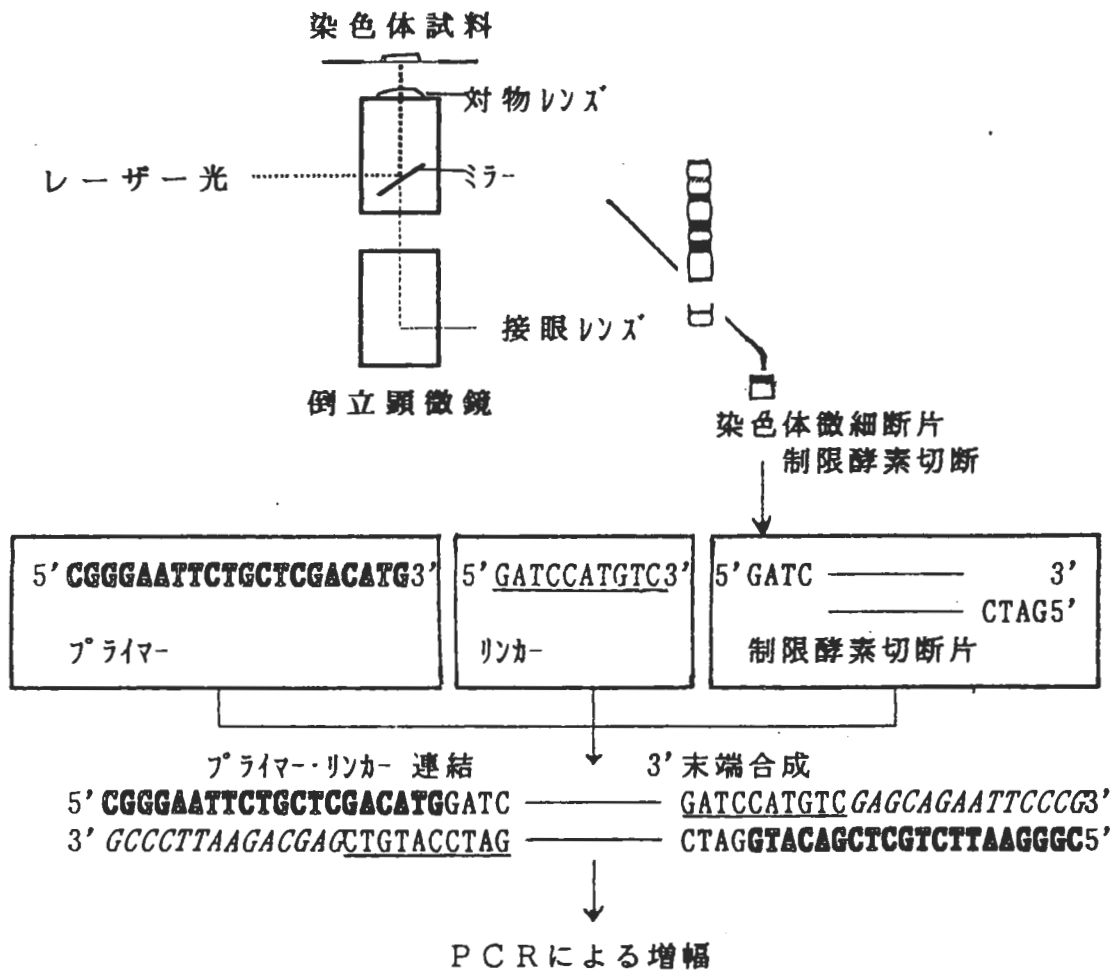
永年にわたる二酸化炭素の固定で形成された木質の約50%を占めるセルロースは、紙として広く利用されているが、製紙工程で支障になるリグニン成分を遺伝子工学的に低減させる試みが国内外で行われている。すでにリグニン生合成経路は明らかにされ、各経路に働く酵素遺伝子がクローニングされている。その単一酵素のアンチセンス遺伝子を利用した方法で作られる形質転換樹木は、何らかのバイパスによる代謝が生じリグニンの量的変化は見られていない。はじめに述べたように、樹木は長寿命かつ巨大生命体である。生と死を兼備した樹木の遺伝子こそ、生命の本質に迫れる鍵を有しているかも知れない。木本植物の遺伝子研究が、次世紀資源としてのみならず生命体としての研究に役立つことを期待したい。また、ゲノムサイズがマツの数百分の一と小さいアラビドプシスについては、近い将来にその全塩基配列が解明されるであろうし、それが樹木の遺伝子単離・解析研究に新たな展開をもたらすことが予想される。

半数体 (n) の細胞一個当りのDNAサイズと染色体数

生物名	塩基対数 (bp)	染色体数
アカマツ <i>Pinus densiflora</i>	4.8 X 10 <sup>10</sup>	12
ホヱラ <i>Populus deltoides</i>	7 X 10 <sup>8</sup>	19
ユリノキ <i>Liriodendron tulipifera</i>	7.8 X 10 <sup>8</sup>	19
イネ <i>Oryza sativa</i>	9.7 X 10 <sup>8</sup>	12
トウモロコシ <i>Zea mays</i>	5 X 10 <sup>8</sup>	10
ヒト human	3.5 X 10 <sup>9</sup>	23
イモイモ newt	5 X 10 <sup>10</sup>	19
イースト <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.4 X 10 <sup>7</sup>	16
大腸菌 <i>Escherichia coli</i>	4.5 X 10 <sup>6</sup>	1
カリフォルニアモザイクウイルス CaMV	8.1 X 10 <sup>3</sup>	1

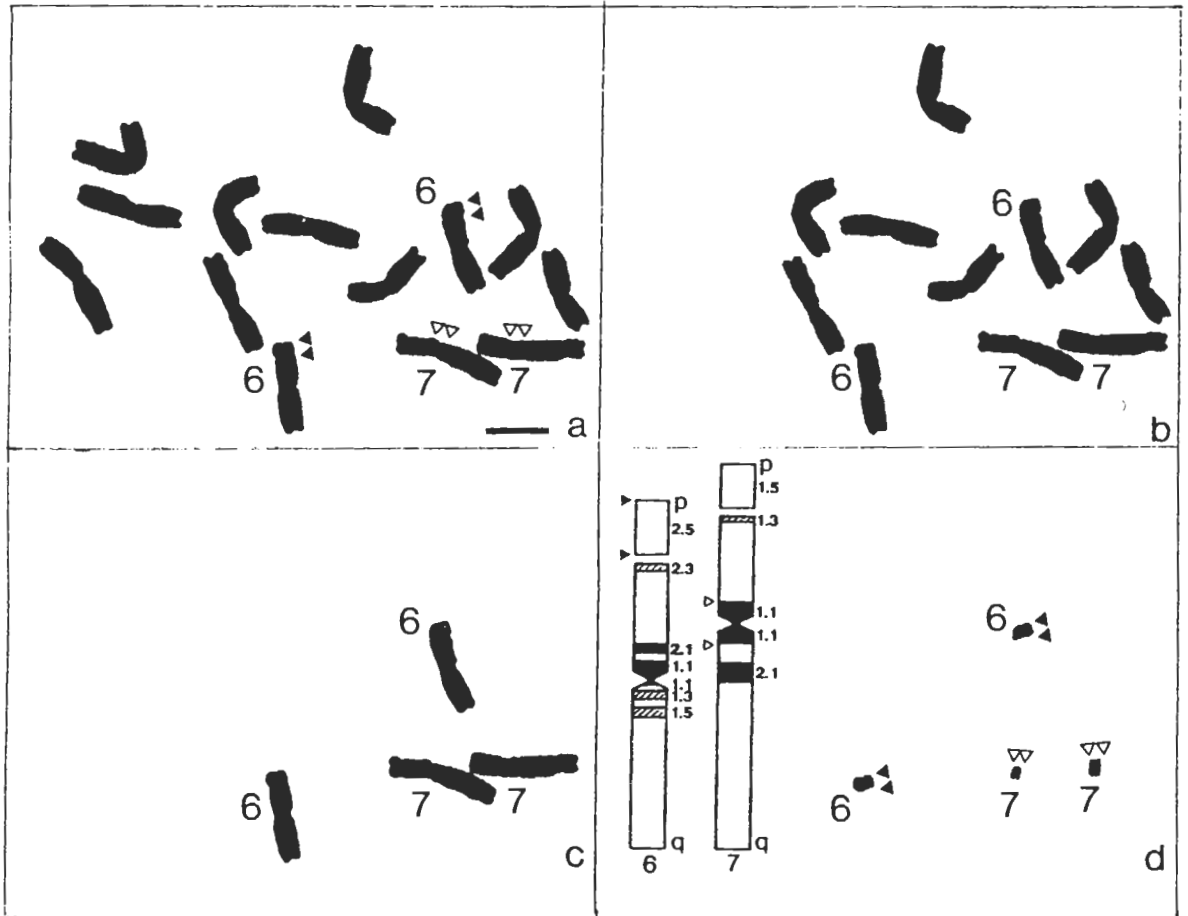
クロロニン化された樹木遺伝子

遺伝子産物	樹木
光合成関連	クロマツ、スコツツマツ
光集性葉緑素	スツツマツ
光集性葉緑素	コゴムツ、マツ
光集性葉緑素	ハラマツ、クロマツ、
リカルボキシ	カハラマツ
(RuBisCo)	クハラマツ、モミ
葉緑素合成関連	ヒマチマツ
リグニン関連	テマツ、ユーカーリ、ドイトウヒ
桂皮アルコール	テマツ、ユーカーリ、ドイトウヒ
フェニチル	テマツ、ユーカーリ、ドイトウヒ
0-メチル	アハラマツ、交雑マツ
酸性パース	交雑マツ、マツ
セルロース	ギンドロ
1,4-β-グルコ	ギンドロ
貯蔵蛋白質	ハラマツ、モミ
ヘパチン	ニセアハラマツ
レクチン	ハラマツ、モミ
ストレス耐性	ハラマツ、モミ
感染特異的蛋白質	雑種ポプラ、スコツツマツ、セイヨウ
ベレン	ハラマツ、モミ
その他	ハラマツ、モミ
アクリン	ハラマツ、モミ
チゴ	ハラマツ、モミ
酸	ハラマツ、モミ
酵素	ハラマツ、モミ



レーザー光切断した染色体微細断片の制限酵素処理と PCRによる特定部位ゲノムライブラリーの作成

参考資料 4



レーザー光による染色体の微細加工  
 a : 加工前、b, c : 焼却による加工  
 d : 加工後に残した標的染色体断片  
 (バーは 5  $\mu$ m)