

## 審査の結果の要旨

氏名 明石英雄

タバコ BY-2 培養細胞は、非常に均一な細胞集団を形成することが知られている。また、植物培養細胞の中では比類の見ないほど増殖が速く、1 週間で 100 倍程度に増殖する。さらに一過的、安定的な形質転換方法の両方が確立され、植物のバイオテクノロジーにおいても重要な存在となっており、古くからモデル植物として用いられてきた。植物において遺伝子発現を制御することは、二次代謝系の研究、遺伝子組換え作物の創出など、様々な局面で重要である。BY-2 培養細胞は、非常によく用いられているとはいえ、完全にその遺伝子制御方法についてのツールが揃っているというわけではない。タバコ BY-2 培養細胞を普遍的な植物研究のためのモデルとして用いるためには、一通りの遺伝子制御法が揃っている必要がある。本論文では、以上のような背景のもと、主にタバコ BY-2 培養細胞を用いて、植物の遺伝子発現の安定・増幅制御、抑制制御に関して、応用性のあるツールとして用いることができる手法の開発を試みたものであり、全 5 章より構成されている。

第 1 章では序論として、植物における遺伝子工学・遺伝子解析、植物培養細胞、またタバコ BY-2 培養細胞を用いて研究することの工学的・理学的意義を概観し、本研究の背景と目的を述べている。

第 2 章で、BY-2 培養細胞において、遺伝子工学的な操作をする上で最も根本的な問題の一つである、外来遺伝子を安定的に保持する系の構築について述べている。まず、二つのプロモーターを近傍に逆向きに配置させたプラスミドにより、遺伝子発現がリンクすることを明らかにした。次に、同様にして抗生物質ハイグロマイシン B (Hm) 耐性遺伝子とレポーター遺伝子 *GUS* をリンクさせたプラスミドを構築した。そして、このプラスミドを持つ、遺伝学的に不均一な BY-2 培養細胞集団に高レベルの Hm の選択圧をかけると、*GUS* 活性の高い細胞集団が選択的に形成されることを示した。また、高レベルの選択圧だけでは活性の高い細胞集団を選抜できず、二つの遺伝子の発現がリンクしている状態で選択圧をかける必要があることが示唆された。これまで高発現細胞を得るために、選抜できる遺伝子と選抜できない遺伝子の発現におけるリンク、およびそれらの遺伝子発現の定量的関係という観点から行なわれた研究は、類例がなく、さらには、1 年半という長期培養におい

て発現を詳細に追ったものもない。植物培養細胞において外来遺伝子を安定的に保つことは非常に難しく、本研究は培養細胞の育種について重要な知見を与える。また、本章で構築したシステムは、第 3 章および第 4 章で述べる遺伝子のノックダウン法に応用することにより、安定なノックダウン形質転換体を得られる可能性を示した。

第 3 章で RNAi による、目的遺伝子発現の一過的発現系における特異的ノックダウンの研究について述べている。BY-2 培養細胞において、BY-2 培養細胞の一過的発現系において、二種類のルシフェラーゼ遺伝子を用い、mRNA の量を鋭敏に反映する系を構築した。ルシフェラーゼアッセイ系を用い、従来法であるセンス RNA、アンチセンス RNA による抑制方法と比較して、二重鎖 RNA を用いる方法が極めて有効であることを定量的に示した。また、その抑制効果は、300 bp の二重鎖 RNA で十分であることを明らかにした。本章のシステムは、植物培養細胞のより理学的な解析を可能にするものであり、特に BY-2 培養細胞の特性を生かした、細胞周期、あるいは細胞骨格などの研究に対する応用の可能性を示したものとして価値の高いものであると言える。

第 4 章では、リボザイムの切断効果の向上を目的として、櫛型カチオン性ポリマー  $\alpha$ PLL-g-Dex また RNA ヘリカーゼの、リボザイムの切断活性に対する効果を検討した。 $\alpha$ PLL-g-Dex を用いることにより、通常のリボザイムでは効果が見られにくい二重鎖 RNA 基質に対して、切断効果が促進されたことを示した。この促進効果は単鎖 RNA 基質に対しても見られ、ポリマーによってリボザイム-基質 RNA 間の会合速度が速くなっていることが示唆された。また、RNA ヘリカーゼと複合体を組んだリボザイムについては、二重鎖 RNA 基質の高次構造を解き、その結果切断活性を向上させていることを明らかにした。植物における同様な方法での、細胞内カチオン性化合物あるいはヘリカーゼを誘導することによってリボザイム活性を向上させるモチーフの探索、切断効果の高いリボザイムの開発に用いることができると考えられる。これらの試みは、リボザイムの効果が見られにくいと言われている植物におけるリボザイムの開発に、非常に有用なアプローチを示したものである。

第 5 章では、第 2 章から第 4 章までの研究について総括し、今後の研究の展望を述べている。植物におけるリボザイム開発の可能性、および本論文の成果を応用した、植物の総合的な遺伝子解析方法の提案を行っている。

以上のように、本論文では、植物培養細胞において、遺伝子の発現制御に応用できる系の構築を行った。特定の遺伝子を安定的に保つ系、また約 90%抑制する系を構築した。また、植物において効果的なりボザイムを開発するための方法論を論じた。これらの成果は、BY-2 培養細胞を用いた遺伝子工学・遺伝子解析を行う上で必要不可欠であり、今後の植物研究において極めて有用な知見である。

よって、本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。