

氏名	西口 満
学位の種類	博士 (生物工学)
学位記番号	博 甲 第 7781 号
学位授与年月日	平成 28年 3月 25日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第2項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	

Poplar as the Woody Plant Model Species for Science and Industrial Applications: Overviews, Problems and Perspectives.

(科学と産業利用に貢献する木本モデル植物としてのポプラ：概要、問題、展望)

主査	筑波大学教授	Ph.D.	渡邊 和男
副査	筑波大学教授	理学博士	中村 幸治
副査	筑波大学准教授	博士(理学)	菊池 彰
副査	筑波大学准教授	博士(理学)	小野 道之

論 文 の 要 旨

ポプラは、木材生産やバイオマス原料、環境保護や環境修復といった産業分野や環境分野で、長い間利用されてきた。ポプラの産業的な重要性和生物学的な特徴が、生理学や生態学、分子生物学、遺伝子工学、林学、化学、木材科学、環境科学など多くの研究を進展させてきた。それゆえ、ポプラは木本植物のモデル生物種として認識されている。モデル生物種としてポプラの科学と応用を進展させるためには、新しい研究分野を開拓すること、およびその研究に必要な技術開発を進めることが重要と考えられた。そのため、放射線による *Populus nigra* (クロポプラ) の生物学的応答の解明と形質転換法の改良を研究の目的とした。

電離放射線ストレスは環境ストレスの一種である。しかし、ポプラにおける電離放射線の影響、および木本植物における放射線ストレスの耐性機構はほとんど分かっていない。そのため、モデル生物種として *P. nigra* に対するガンマ線の生物学的影響とその耐性機構を調べた。*P. nigra* の苗木は、50グレイ (Gy) から100Gyの高線量ガンマ線を急照射しても生き残ることができた。しかし、一部の苗木には、成長の阻害や停止、形態的な異常が生じた。200Gyから300Gyのガンマ線は、ほとんどの *P. nigra* を枯死させた。また、高線量のガンマ線は、シュートや根の形成を阻害した。コメットアッセイ法により、ガンマ線を照射した細胞では細胞核の損傷が生じていることが示された。電離放射線ストレスに対する耐性機構を解明するため、DNA修復系タンパク質の6種の遺伝子、*PnLIG4*、*PnKU70*、*PnXRCC4*、*PnRAD51*、*PnPCNA*、*PnOGG1* の各cDNAを *P. nigra* から単離し、構造を明らかにした。ガンマ線量に依存して、*PnLIG4*、*PnKU70*、*PnXRCC4*、*PnRAD51*、*PnPCNA* の遺伝子発現が増加する一方で、*PnOGG1* の発現は減少することが分かった。*PnLIG4*、*PnKU70*、*PnRAD51* の発現は、DNAの化学的切断処理によっても上昇することから、これらの遺伝子はDNAの切断損傷が引き金となって発現が誘導されると結論された。

上記の放射線ストレスの研究を進めるため、遺伝子工学技術の進展が必要とされた。*P.*

*nigra*の形質転換法を改良するため、新しいベクターの構築、形質転換にかかる期間の短縮、および形質転換効率の上昇を目指した。構築した新しいベクターは、遺伝子クローニングのための11の便利な制限酵素切断部位を有し、選抜薬剤耐性を向上させることができた。この新しいベクターに緑色蛍光タンパク質遺伝子を組み込み、アグロバクテリウム法を用いて*P. nigra*を形質転換した。形質転換の成功は、PCR法、蛍光顕微鏡観察、免疫ブロット法、サザンブロット法、およびカナマイシンとG418に対する耐性で確認した。アグロバクテリウムに感染した茎切片から、直接、遺伝子組換えシュートを再生させることにより、遺伝子組換えに必要な時間は最短で4か月に短縮できた。また、アグロバクテリウム感染時に還元剤であるジチオスレイトールを添加することにより、形質転換効率を約20%に上昇させることができた。

本研究により、*P. nigra*の電離放射線ストレスに対する応答と耐性機構が初めて解明された。また、形質転換法が効率的に改善された。将来的に、これらの結果は有用な遺伝子組換えポプラの作出や、遺伝子機能の研究、環境保全への応用、突然変異育種につなげることができる。さらに、新しい研究分野である放射線ストレス生理学の開拓と遺伝子工学技術の進展は、木本植物のモデル生物の一種として*P. nigra*の価値を高めたと考えられた。ポプラは木本植物の科学と技術のためのモデル生物種として、鍵となる役割を果たすことができる。ポプラの科学と応用が、木本植物の研究や森林資源の供給、地球環境の保全に貢献することが望まれる。

本研究のテーマの対象である植物分子生物学及び遺伝子工学分野に関連して、モデル植物の増加と多様化が望まれている。ポプラに着目し、永年性であり樹木である種での問題点を検討し、放射線生物学での利用やその遺伝子解析での遺伝子工学の要点を試行していることが研究の主体である。

樹木の多機能性を考慮すると本論文でのポプラ研究は、温暖化ガス削減、砂漠化防止、緑化、災害地回復、環境保全などに対応させることのできる基盤研究のよい事例であり、他課題への汎用性もあり、学術価値も高いととえられる。

審 査 の 要 旨

本研究の要旨は、ポプラの形質転換法の改良、新しいベクターの構築、形質転換効率の上昇、遺伝子組換えポプラの作出、放射線ストレスに対する応答と耐性機構の解明、ポプラの科学と応用の進展、木本植物のモデル生物としての価値の向上、環境保全への応用、突然変異育種につなげることができること、ポプラの科学と技術の発展、放射線ストレス生理学の開拓と遺伝子工学技術の進展、木本植物の研究や森林資源の供給、地球環境の保全に貢献することが望まれること、本研究のテーマの対象である植物分子生物学及び遺伝子工学分野に関連して、モデル植物の増加と多様化が望まれていること、ポプラに着目し、永年性であり樹木である種での問題点を検討し、放射線生物学での利用やその遺伝子解析での遺伝子工学の要点を試行していること、樹木の多機能性を考慮すると本論文でのポプラ研究は、温暖化ガス削減、砂漠化防止、緑化、災害地回復、環境保全などに対応させることのできる基盤研究のよい事例であり、他課題への汎用性もあり、学術価値も高いととえられることである。

平成28年1月26日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、格と定された。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。