

(様式第9 別紙2：公開版)

## 養成技術者の研究・研修成果等

1．養成技術者氏名：嶋村正樹

2．養成カリキュラム名：葉緑体形質転換技術の活用と宿主領域の拡大

3．養成カリキュラムの達成状況

葉緑体遺伝子組み換えのための基本技術修得だけでなく、葉緑体ゲノムの動態を観察するための新規技術の開発に成功した。宿主領域の大幅な拡大がみこめる新規葉緑体遺伝子組み換え技術開発にも取り組みはじめており、予定以上の達成度と考える。

4．成果（A4版3枚程度）

1) 陸上植物の細胞では一般的に中心体は見られず、細胞分裂装置を形成する微小管は分散型の微小

管形成中心(MTOC)から発達する。細胞内の葉緑体数が少ないコケ植物では、葉緑体表面が、MTOC

として働くことがある。葉緑体表面をMTOCとする微小管形成は、陸上植物の葉緑体の分裂、配分

機構の進化を考える上で鍵となる構造と考えられる。そこで、コケ植物の葉緑体表面に存在する

MTOCについて、細胞内に葉緑体を1つしかもたない状態でおこるケゼニゴケの減数分裂を詳しく

調べた。MTOC構成物質である $\gamma$ -チューブリンは減数分裂前期の葉緑体表面と終期の核膜表面に

存在する。オリザリンを使って微小管を破壊しても、この葉緑体や核表面の $\gamma$ -チューブリンの局

在は影響を受けなかった。次に、減数分裂期の細胞から核と葉緑体を単離し $\gamma$ -チューブリンの局

在を調べた。その結果、単離した葉緑体、核の表面に $\gamma$ -チューブリンが局在することを見つけた。

$\gamma$ -チューブリンの局在がみられる葉緑体、核の数は全体の半分以下であったが、これは葉緑体や

核表面が細胞周期の特定の時期にのみ微小管形成能をもつことを反映した結果と考えられる。ま

た単離した葉緑体表面から牛脳由来のチューブリンからなる微小管を形成させることに成功した。

これらの結果は、微小管形成に関して、葉緑体表面においても中心体と同様の分子メカニズムが

関与していることを示唆する。研究成果は論文として公表した。

2) 細胞内における葉緑体の動態は葉緑体形質転換の効率にも大きな影響を与えていると考えられる。とくに細胞分裂時の葉緑体の分裂や配分についての知見は葉緑体形質転換のための基礎的な情報となる。細胞内の葉緑体数が少ないコケ植物において細胞分裂時における葉緑体の動態を観察し、これまでの研究成果も踏まえて、細胞分裂時の葉緑体の配分に関する総説を著した。1つの葉緑体しかもたない単色素体性の細胞は、下等陸上植物に広くみられ、陸上植物の祖先的な形質と考えられた。そのような細胞が分裂する際には、核の分裂に先立って葉緑体が分裂し、葉緑体の表面から紡錘体が形成される。単色素体性の細胞では、葉緑体のない細胞が生じないような、葉緑体の分裂・配分の機構が備わっていると考えられる。

3) ホウレンソウ、タバコ、ゼニゴケなどについて、葉緑体単一ゲノムを環状の形態を保持したまま可視化する技術を開発した。従来葉緑体の単一ゲノムを観察するためには電子顕微鏡を用いられてきたが、光学顕微鏡を用いて良好な像が得られた。葉緑体ゲノム一分子は、30-40  $\mu\text{m}$ の環状あるいは線状分子で、ゲノム1分子が繋がって2量体以上となったと考えられる長い分子も観察された。葉緑体へ導入した遺伝子を可視化する技術の前段階として、単離した葉緑体核に対して *in situ hybridization* を適用し、単一遺伝子(*rbcL*遺伝子)を検出することに成功した。現在は単一ゲノム上での単一遺伝子の可視化技術の開発に取り組んでいる。これが実用化すればマーカー遺伝子の発現にたよらず、遺伝子導入の有無や位置の確認を視覚的におこなえる。また葉緑体内、細胞内、個体内、集団内での導入遺伝子の動態を視覚的に追跡できる。これらの研究成果は、日本植物生理学会で発表予定である。

4) 遺伝子導入葉緑体の宿主領域を大幅に拡大するための新たな遺伝子導入方法の開発を試みた。そ

の一つとして、遺伝子導入済みの葉緑体を、宿主の細胞に直接導入する方法に取り組んだ。レーザー光を用いて細胞壁に穴を穿ち、マイクロマニピレーターを用いて、形質転換済みのタバコ葉緑体を細胞外に取り出すことに成功した。現在は取り出した葉緑体を宿主の細胞に導入する技術を開発中である。

## 5. 成果の対外的発表等

### ( 1 ) 論文発表 ( 論文掲載済、または査読済を対象。 )

- 1) Shimamura, M., Mineyuki, Y. and Deguchi, H. (2003). A review of the occurrence of monoplastidic meiosis in liverworts. *J. Hattori Bot. Lab.* 94: 179-186.
- 2) Shimamura, M., Brown, R. C., Lemmon, B. E., Akashi, T., Mizuno, K., Nishihara, N., Tomizawa, K.I., Yoshimoto, K., Deguchi, H., Hosoya, H., Horio, T. and Mineyuki, Y. (2004).  $\gamma$ -Tubulin in basal land plants: Characterization, localization and implication in the evolution of acentriolar microtubule organizing centers. *Plant Cell* 16: 45-59.

### ( 2 ) 口頭発表 ( 発表済を対象。 )

- 1) コケ植物の紡錘体形成過程におけるガンマチューブリンの動態 ( 日本細胞生物学会大会 , 2003 年 5 月 15 日 )
- 2) 蛍光顕微鏡による葉緑体ゲノム 1 分子の可視化 ( 日本植物生理学会大会 , 2004 年 3 月 29 日 )

### ( 3 ) 特許等 ( 出願番号を記載 )

該当無し