

ヤナギ属植物の環境適応性と雌雄性に関する
分子生物学的研究

二 村 典 宏

目 次

第1章 序論	1
1-1 はじめに	1
1-2 ヤナギ属植物に関する生理学的研究	2
1-3 ヤナギ属植物の雌雄性に関する研究	3
1-4 ヤナギ属植物の分子生物学的研究	5
1-5 本研究の概要	5
第2章 ヤナギ属植物の環境適応性	9
2-1 はじめに	9
2-2 材料及び方法	10
材料	10
成育条件	10
組織構造の解析	10
光合成量と呼吸量の測定	11
2-3 結果	12
シュートの伸長に対する温度の影響	12
バイオマス生産に対する温度の影響	12
葉の光合成速度と呼吸速度に対する温度の影響	13
2-4 考察	14
第3章 ヤナギ属植物の熱ショックタンパク質遺伝子の発現特性	24
3-1 はじめに	24
3-2 材料及び方法	25
材料	25
ストレス処理	25
クローンの単離と精製	25
DNAの塩基配列の解析	26
RNAとDNAの調製	26
DNA・RNAゲルプロット	27
<i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	28
3-3 結果	29
DnaJホモログに相当する3種のcDNAクローンの単離とその特徴	29
Hsp70に相当するcDNA断片の単離とその特徴	30
雄性個体と雌性個体のゲノム中における <i>SGJ1</i> , <i>SGJ3</i> , <i>SGK1</i> 遺伝子の分布	31
<i>SGJ1</i> , <i>SGJ3</i> , <i>SGK1</i> 遺伝子の発現の器官特異性	31
<i>SGJ1</i> , <i>SGJ3</i> , <i>SGK1</i> 遺伝子の生殖器官の発達過程における発現調節	32
<i>SGJ1</i> , <i>SGJ3</i> , <i>SGK1</i> 遺伝子の生殖器官における発現部位	32
熱ストレス及び塩ストレスに対する <i>SGJ1</i> , <i>SGJ3</i> , <i>SGK1</i> 遺伝子の応答	33

3-4 考察	34
第4章 ヤナギ属植物の雄性花序cDNAライブラリーの作製と雄花特異的に発現する遺伝子群の探索	46
4-1 はじめに	46
4-2 材料及び方法	48
材料	48
クローンの単離と精製	48
cDNA塩基配列の解析	48
RNAとDNAの調製	49
DNA・RNAゲルプロット	49
4-3 結果	50
cDNAクローンの単離, 塩基配列の解析と相同性の検索	50
<i>SbARF1</i> 遺伝子の構造と発現の特徴	50
<i>SbSUI1</i> 遺伝子の構造と発現の特徴	51
4-4 考察	53
第5章 ヤナギ属植物の雄花に特異的に発現する多糖類分解酵素遺伝子	63
5-1 はじめに	63
5-2 材料及び方法	64
材料	64
クローンの単離と精製	64
DNAの塩基配列の解析	64
RNAとDNAの調製	65
DNA・RNAゲルプロット	65
<i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	65
5-3 結果	66
ポリガラクトツロナーゼに相当する4つのcDNAクローンの単離とその特徴	66
ペクチンメチルエステラーゼに相当するcDNAクローンの単離とその特徴	66
β -1,3-グルカナーゼに相当するcDNAクローンの単離とその特徴	67
雄性個体と雌性個体のゲノム中における <i>SgPG</i> , <i>SgPME1</i> , <i>SgGN1</i> 遺伝子の分布	68
<i>SgPG</i> , <i>SgPME1</i> , <i>SgGN1</i> 遺伝子の雄花特異的発現	68
<i>SgPG</i> と <i>SgPME1</i> 遺伝子の葯特異的発現	69
5-4 考察	70
第6章 ヤナギ属植物におけるペクテートリアーゼ遺伝子の発現特性	81
6-1 はじめに	81
6-2 材料及び方法	82
材料	82
ストレス処理	82
クローンの単離と精製	82

DNAの塩基配列の解析	82
RNAとDNAの調製	83
DNA・RNAゲルブロット	83
<i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	83
6-3 結果	84
ペクテートリアーゼ (PL) に相当するcDNAクローンの単離とその特徴	84
雄性個体と雌性個体のゲノム中における <i>SgPL1</i> 遺伝子の分布	85
<i>SgPL1</i> 遺伝子の発現の器官特異性	85
<i>SgPL1</i> 遺伝子の発現の組織特異性	86
ストレスによる <i>SgPL1</i> 遺伝子の発現の誘導	86
6-4 考察	87
第7章 総合討論	96
謝辞	100
引用文献	101

略語

ABA	abscisic acid
ARF	ADP-ribosylation factor
ARL	ARF-like protein
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary DNA
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
Da	dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	ethidium bromide
GN	β -1,3-glucanase
IAA	3-indoleacetic acid
JA	jasmonic acid
MeJA	methyl jasmonate
mRNA	messenger RNA
PEG	polyethylene glycol
PG	polygalacturonase
PIPES	piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PL	pectate lyase
PME	pectin methylesterase
PVP	polyvinyl pyrrolidone
SA	salicylic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	standard saline citrate = 3M NaCl, 0.3M Na-Citrate

第1章 序論

1-1 はじめに

ヤナギ科 (Salicaceae) 植物は早生樹で、ヤナギ属 (*Salix*)、ヤマナラシ属 (*Populus*)、ケシヨウヤナギ属 (*Chosenia*)、オオバヤナギ属 (*Toisusu*) の4属からなる。これらの樹木はパルプやボードの材料となるだけでなく、緑化木としても利用されている。また、挿し木による繁殖が容易で、萌芽再生能に優れ、しかも成長が早いため、短伐期の繰り返し生産に適している。

ヤナギ属を定期的に伐採し、料理や暖房の燃料さらには日用品の原料として使用することは古くから行われてきた (Makkonen, 1975)。1970年代の石油危機により化石燃料への過度の依存が国際的な問題となり、様々な代替エネルギーが模索されるなかで、成長の早い木本植物を短期間で伐採し、バイオマスエネルギーとして利用するシステムも注目された。さらに、近年地球温暖化問題への関心が高まる中で、温室効果ガスの削減が求められている。バイオマスエネルギーは、植物が固定したCO₂を利用するので大気中のCO₂を増やさないと考えられる。また、石炭や石油などの化石燃料に比べ、酸性雨の原因となる硫黄分が非常に少ない。このため、環境に負荷を与えないエネルギーとして脚光を浴びている。バイオマスエネルギーの獲得を目的として、低木林を短伐期で利用する林業はエネルギー林業 (energy forestry) といわれる。スウェーデンでは1976年から100万ヘクタール規模のエネルギー林業プロジェクトが開始され、ヤナギ属植物のバイオマスを発電や暖房のためのエネルギーとして利用することの有効性が評価された (Gustafsson, 1987)。そして、現在でも原子力の代替エネルギーとして持続的に利用されている。

日本でも、バイオマス資源としての利用や河畔の生態系保全のための利用が注目されている。ヤナギ科植物は雌雄異株である。一般に、雌雄異株植物では雌性個体は繁殖に投資するエネルギーが大きく、生産性の面だけを考えると雄性個体のほうが有利と考えられる。今後、遺伝子操作技術を用いてバイオマス生産の増大を図るためには、ヤナギ属の生物学的特性、特に環境適応性や雌雄性を十分に把握し、有用形質を付与するための遺伝子情報を蓄積する必要がある。本研究では、日本の河畔に広く分布するカワヤナギ (*Salix gilgiana* Seemen) の環境適応性に関する生理学的及び分子生物学的な解析を進めた。また、雌雄性に関しては雄花で特異的に発現する遺伝子

を単離し、それらのゲノム内での分布や発現特性について調べた。

第1章では、ヤナギ属に関する生理学的研究、雌雄性に関する研究および分子生物学的研究の歴史的背景について概説し、本研究の概要と意義を述べる。

1-2 ヤナギ属植物に関する生理学的研究

ヤナギ属は一般に、陽当たりの良い河畔で優占種となる (Newsholme, 1992)。多くのヤナギ属植物の生息地はよく灌漑された肥沃な土地であり (Christensson, 1987; Ericsson *et al.*, 1992)、生息地を同じくする種と厳しい競争が働く (Niiyama, 1990)。成長の早い種は大きな成育場所を確保し、優占種となると考えられる (Goldberg, 1990)。ヤナギ属植物の成長の早さは、樹冠が比較的小さくて素早く形成されることと関係しているらしい (Hinckley *et al.*, 1992; McDonald, 1984)。優占種となるヤナギ属植物は一般に光合成速度が早く、萌芽による再生の初期成長も良い (Pelkonen, 1984)。分裂組織における分裂活性が高く、細胞伸長が活発で、若いシュートの成長期間が長いこともヤナギ属の成長の早さと考えられている (Berggren, 1984, 1985; Brunkener, 1984; Sennerby-Forsse 1986)。

ヤナギ属植物の伸長と日長との関係については、いくつかの種 (*S. babylonica*, *S. bicolor*, *S. lanata*, *S. repens*) について報告例がある (Nitsch, 1957)。いずれの種でも長日で伸長を持続し、短日になると頂芽の伸長が停止する。頂芽の伸長が停止した後、シュートの先端が脱離する。ただし、樹齢15年以上の古いヤナギ属樹木では、長日条件でもシュート先端が脱離することが知られている (Junttila, 1976)。さらに、異なる緯度の生育地から採取した *S. pentandra* の芽生えを用いた実験から、採種地により伸長停止を起こす日長が異なることが明らかになっている (Junttila, 1980)。また、日長だけではなく温度も頂芽の伸長停止に関係する (Junttila, 1980)。温度が伸長停止に与える影響も採種地によって異なり、高緯度型の *S. pentandra* では24時間日長でも昼/夜の温度差を大きくすることにより伸長停止が起きるが、低緯度型では起きない。窒素条件が良いと伸長停止の時期が遅くなり、春の再伸長が早くなることから、栄養条件もシュートの伸長停止に関係している (Sennerby-Forsse and von Fircks, 1987)。

ヤナギ属植物の季節周期に関しては、他の角度からも研究がなされている。*S. fragilis* の二次節

部 (Lawton, 1976) 、 *S. fragilis* ・ *S. viminalis* ・ *S. dasyclados* の形成層 (Robards and Kidwai, 1969; Parish, 1974; Sennerby-Forsse, 1986; Sennerby-Forsse and von Fircks, 1987) 及び *S. spp* の葉芽

(Berggren, 1984, 1985, 1987) の観察から、季節周期や休眠に伴いこれらの組織の微細構造が変化することが明らかになっている。植物ホルモンと季節周期との関係については、*S. viminalis* の側芽を使って解析されている (Barros and Neill, 1986; Saunders and Barros, 1987) 。*S. viminalis* の側芽は10月頃の3週間から5週間休眠し、発芽しなくなる。しかし、ジベレリンを外から与えることによって休眠期間中でも発芽する (Saunders and Barros, 1987) 。また、無菌培養した側芽の発芽試験によると、短日処理で休眠が誘導されるに伴いアブシジン酸に対する感受性が増大する (Barros and Neill, 1986) 。休眠中の側芽は、アブシジン酸存在下でまったく発芽しなくなるが、ジベレリンもしくは低温処理によって休眠が打破される (Saunders and Barros, 1987) 。さらに、高緯度型の *S. pentandra* の実生で5日間の短日処理をすると伸長の抑制が見られるよりも早く内生GA₁のレベルが50%減少することと、短日から長日に移すと内生GA₁の一時的な上昇とインドール酢酸の穏やかな上昇が見られることが報告されている (Olsen *et al.*, 1995, 1997) 。

伸長停止や休眠などの季節周期には多数の遺伝子が関与しているものと考えられるが、ヤナギ属では遺伝子の発現特性にまで踏み込んだ解析はされていない。

1-3 ヤナギ属植物の雌雄性に関する研究

雌雄異花異株の植物種は高等植物の6%といわれている (Renner and Ricklefs, 1995) 。高等植物中に占める雌雄異株植物の割合が低いにもかかわらず、雌雄異株植物は様々な科に分布しており、被子植物の365の科のうち43%が雌雄異株の種を有している (Cronquist, 1988) 。ヤナギ科

(Salicaceae) は4つの属 (*Populus*, ヤマナラシ属; *Chosenia*, ケショウヤナギ属; *Toisusu*, オオバヤナギ属; *Salix*, ヤナギ属) から成り立っているが、全て雌雄異株植物という点が特徴的である。ヤナギ科植物が性染色体を有しているかという点に関しては、あるという報告 (Blackburn and Harrison, 1924; Meurman, 1925; Harrison, 1926; Blackburn, 1929; Erlanson and Hermann, 1927; Sinotô, 1929; Nakajima, 1942; Suto, 1944) と無いという報告 (Peto, 1938; Håkansson, 1938; Müntzing, 1936; Johnsson, 1940; Wilkinsson, 1944) があり、いまだ決着がついていない。ヤナギ科植物の染色体は

非常に小さいので、性染色体の有無を確認することは困難と考えられる (Westergaard, 1958)。また、性染色体を有する雌雄異株植物でも様々な環境要因によって性の表現様式が変化する例が多数知られている (Korpelainen, 1998)。ヤナギ属においてもダニの食害その他の影響によって性転換した例が知られている (Harrison, 1924)。しかし、後天的な性転換を引き起こす要因は明らかでなく、実験的に再現できたとする報告はない。

野外での観察から、雌雄異株植物の生育地は雄性個体の多い所と雌性個体の多い所に分かれることが知られている (Darwin, 1877; Bierzychudek and Eckhart, 1988)。生殖に必要なエネルギーが異なるために最適な栄養条件等が雌雄の個体間で違うことが、結果的に生育地の違いとなって現れるものと考えられている (Putwain and Harper, 1972)。カナダの極地を生育地とする *S. arctica* は、土壌中の水分や栄養素が多く、土壌温度の低いところに雌性個体が多い (Dawson and Bliss, 1989)。成長に関しても、湿潤な低地では雌性個体の方が良く、乾燥した尾根では雄性個体の方が良い。これは、雄性個体と雌性個体で組織の水分特性や水利用効率に違いがあるためであると推測されている。一般に、雌性個体のほうが有性生殖や防御に多くのエネルギーを投資するため (Putwain and Harper, 1972; Lloyd and Webb, 1977; Palo, 1984; Danell *et al.*, 1985)、雄性個体のほうが栄養生長が大きい雌雄異株植物が多い (Farmer, 1964; Putwain and Harper, 1972; Grant and Mitton, 1979; Gross and Soule, 1981; Hoffman and Alliende, 1984; Jing and Coley, 1990)。しかし、ヤナギ属の成長に関しては、雌雄間で差が見られない (*S. cinerea*: Alliende and Harper, 1989; *S. myrsinifolia-phylicifolia* : Danell *et al.*, 1991) という知見と、水分条件によってどちらが良いかは異なる (*S. arctica* : Dawson and Bliss, 1989) という知見があり、はっきりしていない。また、野外のヤナギ属植物の集団を調べた研究の多くは、性比が雌に偏る傾向を示している (Crawford and Balfour, 1983, 1990; Elmqvist *et al.*, 1988b)。これは、昆虫やネズミによる葉や幹の食害が雄性個体のほうに多く見られることによって、少なくとも一部は説明できるとされている (Alliende, 1989; Boecklen *et al.*, 1990; Danell *et al.*, 1991)。ヤナギ属のいくつかの種では、雄性個体のほうが葉に多くの窒素・リン・カリウムを含み、雌性個体のほうがフェノール化合物などの二次代謝産物を葉や樹皮に多く含むことが示されている (Palo, 1984; Boecklen *et al.*, 1990)。このことが、雌性個体ではネズミや昆虫による食害を受けにくいことと関係しているのかもしれないが、直接の因果関係は証明されていない。他

にも、ヤナギ属植物の雌雄に関しては、花蜜の糖組成の違い (Percival, 1961; 郷右近ら, 1976; Katoh *et al.*, 1985) や花蜜の量の違い (Kay, 1985)、花序あたりの花の数の違い (Kay, 1985; Elmqvist *et al.*, 1988a) が報告されている。花序を訪れる昆虫が雌雄どちらの花序を好むかは、時間帯や昆虫の舌の長さによって異なるらしい (van der Werf *et al.*, 1981; Elmqvist *et al.*, 1988a)。

以上のように、雄性個体と雌性個体の違いは生殖器官にとどまらず様々な形質に及んでいることから、遺伝的要素が働いていることをうかがわせる。近年、ヤナギ属植物の品種やクローンを RAPD や AFLP 等の DNA マーカーを用いて特徴づけることが試みられている (Zsuffa, 1995; Barker *et al.*, 1999)。しかし、雌雄性や形質と連鎖する DNA マーカーを見出すに足る情報は蓄積していない。

1-4 ヤナギ属植物の分子生物学的研究

ヤナギ属に関する分子生物学的研究はきわめて少なく、生理学的研究や雌雄に関する研究を遺伝子レベルにまで掘り下げて解析した事例はほとんど無い。本研究を除けば、ヤナギ属から遺伝子を単離したという報告は、分類学的な目的でヤナギ属の様々な種の葉緑体 *rbcL* 遺伝子を比較した報告 (Azuma *et al.*, 2000) と、*S. viminalis* から傷害によって誘導されるトリプシンインヒビター遺伝子を単離したという報告 (Saarikoski *et al.*, 1996) しかない。分子生物学的な研究を進めるうえで、形質転換体の作出技術は大きな役割を果たす。ヤマナラシ属では、1987年にアグロバクテリウム法によって成功 (Fillatti *et al.*, 1987) して以来、数多くの形質転換体が報告されている (伊ヶ崎・篠原, 2000)。これに対し、ヤナギ属では形質転換体の作成技術が確立していない。ヤナギ属では、アグロバクテリウム法 (Vahala *et al.*, 1989, 1993) やパーティクルガン法 (Devantier *et al.*, 1993) によって遺伝子導入には成功するものの、カルスからの個体再生が非常に困難なためである (Vahala *et al.*, 1993)。現在までのところ、カルスを経由した個体再生の成功例はヤナギ属では一例しかない (Stoeher *et al.*, 1989)。

1-5 本研究の概要

本研究は7章から構成されている。第1章で、これまでのヤナギ属植物に関する研究の歴史と本研究の概要と意義について記述した。

第2章は、日本に広く分布するカワヤナギの環境適応性についてまとめた。自然日長下、20/15℃、25/20℃、30/25℃(昼/夜)の3種類の温度条件で生育させたカワヤナギを解析に用いた。シュートの成長曲線も9ヶ月後の全乾燥重量にも有意差は見られなかった。しかし、高温では葉の乾燥重量は増加するものの、根の乾燥重量は減少した。また、高温では花芽や葉芽の数を増加させたが、これは高温条件下で生育させた個体の多くが分枝したためである。これらの結果は、カワヤナギが幅広い温度環境に適応できることを示唆している。幹の組織構造を解析したところ、高温条件では活発な蒸散を維持するために導管の数が増加させた。さらに、異なる生育温度に順応したカワヤナギの光合成速度と呼吸速度を比較すると、高温で生育させた個体は光合成速度も呼吸速度も高くなる傾向を示した。しかし、低温で育てた個体を高温に移すと、光合成のレベルは大幅に下降した。反対に、高温で育てた個体を低温に移すと、1時間後には光合成速度も呼吸速度も低温に順応させたものと同じレベルになった。このことから、適応可能な温度の範囲内であっても、急激な温度上昇に対してはストレスと捉えているものと推測された。このように、カワヤナギは様々なレベルで温度変化に対する適応戦略を有しているといえる。

第3章は、カワヤナギの高温に対する応答を遺伝子レベルで解析するために、代表的な熱ショックタンパク質遺伝子である*DnaJ*ホモログと*Hsp70*を単離し、それらの発現特性についてまとめた。カワヤナギのcDNAライブラリーから*DnaJ*ホモログの完全長アミノ酸をコードするcDNAクローンを3種類(pSGJ1, pSGJ2, pSGJ3)と*Hsp70*をコードするcDNA断片(pSGK1)を単離した。cDNAの構造から、pSGJ1とpSGJ2は同じ遺伝子(*SGJ1*)に由来する成熟型mRNAと前駆体型mRNAに対応するcDNAクローンであると考えられる。熱ストレスを与えると、*DnaJ*ホモログの一つである*SGJ3*は葉において急速に発現が誘導されたが、*SGJ1*は熱ストレスによる発現の誘導がほとんど見られなかった。この結果から、*SGJ3*は温度変化に対する防御反応として働く熱ショックタンパク質であるが、*SGJ1*は熱ストレスによりあまり誘導されない分子シャペロンであると考えられる。これらの熱ショックタンパク質遺伝子はストレスをかけない通常組織でも発現しており、*SGJ1*の転写産物は雄性花序で多く、*SGJ3*と*SGK1*の転写産物は雌雄の花序と根で多かった。雄花と雌花におけるこれらの遺伝子の発現を詳細に調べたところ、*SGJ1*、*SGJ3*及び*SGK1*の転写産物は共通して、雄花では未成熟な葯中の小孢子とタペタムに、雌花では胚珠の内珠皮および子房中の珠柄表層

に局在していた。*SGJ3*と*SGK1*の転写産物は雄花・雌花の蜜腺でも発現していたが、*SGJ1*の転写産物は蜜腺では検出されなかった。このように、DnaJホモログをコードする遺伝子ファミリーは、ストレス応答や発現部位に関して遺伝子ごとに役割分担していることが明らかになった。この知見は植物界で最初のものである。以上のことから、遺伝子発現のレベルでも温度変化に対する適応戦略を有しているといえる。

第4章は、バッコヤナギ (*Salix bakko* Kimura) の雄性花序のmRNAを用いてのcDNAライブラリーの構築と、得られたcDNAクローンの特徴についてまとめた。ランダムに選抜したcDNAクローンの塩基配列は、さまざまな既知の遺伝子との相同性が認められた。この中には、ハウスキーピング遺伝子と考えられるものの他に、葯や花粉で特異的に発現する遺伝子とされる多糖類分解酵素 (ポリガラクトナーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、ペクテートリアーゼ、 β -1,3-グルカナーゼ) 遺伝子が存在した。

第5章は、雄花に特異的に発現する多糖類分解酵素遺伝子についてまとめた。バッコヤナギから得られたcDNA断片をプローブとして、カワヤナギの雄性花序由来のcDNAライブラリーから多糖類分解酵素をコードするcDNAクローンを単離した。DNAゲルプロットの結果、ゲノム中のこれらの遺伝子のコピー数は、雌雄の個体間に差がないことが明らかになった。さらに、これらの遺伝子がどのような組織で発現するのかを調べた結果、カワヤナギのポリガラクトナーゼ遺伝子 (*SgPG1*, *SgPG2*, *SgPG3*, *SgPG4*) とペクチンメチルエステラーゼ遺伝子 (*SgPME1*) は成熟花粉に特異的に発現することがわかった。これらの遺伝子により合成される酵素は、花粉の内壁や花柱通道組織の細胞壁に存在するペクチンを分解する活性を有すると考えられる。従って、*SgPG*や*SgPME1*は、花粉管の発芽や雌ずい中での花粉管の伸長に機能するのかもしれない。カワヤナギの β -1,3-グルカナーゼ遺伝子 (*SgGNI*) は雄性花序に特異的に発現していたが、発現する組織の特定までには到らなかった。*SgGNI*は雄花の発達過程において*SgPG*や*SgPME1*よりも早い時期に発現することから、花粉の成熟過程でおそらくタペータムに特異的に発現するものと考えられる。以上の結果から、これらの遺伝子は雄性個体の花粉や雌ずいで特異的に発現するものの、遺伝子自体は雌雄ともに保持していることが明らかになった。

第6章は、ペクテートリアーゼ遺伝子の発現特性についてまとめた。カワヤナギの雄性花序の

cDNAライブラリーから単離されたペクチンリアーゼ遺伝子 (*SgPL1*) は、雄性花序のほかに茎でも多く発現していた。*SgPL1* の発現量は、葉や茎の発達段階によってコントロールされていた。*SgPL1* は花粉では発現しておらず、雄ずいの花糸と雌ずいの柱頭で主に発現していることがわかった。また、*SgPL1* は木部柔組織でも発現していた。さらに、この遺伝子の発現は切断傷害や浸透圧ストレスをかけた際に誘導された。このことから、*SgPL1* は細胞の伸長や分化、ストレスに対する応答といった幅広い機能を保有していることが示唆された。ペクチンリアーゼ遺伝子が傷害や浸透圧ストレスにより誘導されるという知見は、植物界で最初のものである。

第7章は、2章から6章までの結果をふまえて総合的な考察を行い、その線上の将来展望について述べた。

本研究を通じて、カワヤナギが幅広い温度環境に適応でき、個体、組織、細胞、遺伝子発現という様々なレベルで温度変化に応じた適応戦略を保持することが明らかになった。また、雄性個体に特異的に発現する遺伝子でも雌雄に関わらずゲノム内に存在することが明らかになった。ストレスに応答する熱ショックタンパク質遺伝子やペクチンリアーゼ遺伝子は、遺伝子組換えによるストレス耐性付与に利用できる。さらに、花粉や雄性花序に特異的に発現するポリガラクトナーゼ遺伝子、ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子、 β -1,3-グルカナーゼ遺伝子は、アンチセンス法を用いることにより、花粉の発達を抑制した組換え体の作出に利用できる。花粉の発達を抑制した樹木は、正常な花粉形成をおこさず花粉を不稔化するため、組換え遺伝子を拡散しないと考えられる。組換え遺伝子の拡散防止は、遺伝子組換え樹木を実用化するうえで非常に重要な問題である。本研究により、遺伝子工学的手法によりエネルギー林業に適する樹木を開発する道を開いたといえる。

第2章 ヤナギ属植物の環境適応性

2-1 はじめに

ヤナギ属植物は初期成長が早く、伐採後萌芽により再生する能力が優れていることから、数年程度の短い伐期で繰り返し生産することが可能である。このため、ヤナギ属植物のバイオマス生産をエネルギー源として利用する試みもなされている。バイオマス生産を目的とする場合、地上部の生長量をなるべく大きくするような植栽条件等を検討する必要がある。そのためには、ヤナギ属の環境適応機構や生理学的特性について知ることが不可欠である。本章では、日本に広く分布するカワヤナギ (*Salix gilgiana* Seemen) をモデルケースとして、生育温度が成長に与える影響について解析した。

自然日長下、20℃/15℃、25℃/20℃、30℃/25℃(昼/夜)の3種類の温度条件で生育させ、シュートの成長曲線と9ヶ月後の全乾燥重量を比較したところ、シュートの初期成長や全乾燥重量に有意差は見られなかった。この結果は、カワヤナギが幅広い温度環境に適応できることを示している。しかし、高温では葉の乾燥重量は増加したものの、根の乾燥重量は減少した。また、高温では花芽や葉芽の数を増加させた。これらは、高温下で生育させた個体の多くが分枝した結果である。幹の組織構造を解析したところ、高温では活発な蒸散を維持するために、導管の数を増加していた。異なる生育温度に順応したカワヤナギの光合成速度と呼吸速度を比較すると、高温で生育させた個体は光合成速度も呼吸速度も高くなる傾向を示した。しかし、低温で育てた個体を短時間高温に移すと、光合成のレベルは大幅に下降した。呼吸速度は高温に順応させたヤナギと同じレベルまで上昇した。反対に、高温で育てた個体を低温に移すと、1時間後には光合成速度も呼吸速度も低温に順応させたものと同じレベルになった。これらの結果は、カワヤナギが急激な温度上昇を強いストレスと感じるものの、5℃程度の温度低下にはすぐさま順応する特性を持つことを示唆している。このように、カワヤナギは様々なレベルで温度変化に対する適応戦略を有している。

2-2 材料及び方法

材料

3月のはじめに、小貝川河畔（北緯33度55分，東経140度6分）に自生していた約20年生のカワヤナギ（*S. gilgiana*）の雌性個体から挿し穂を取得した。この地域には様々な種のヤナギ属植物からなる群落が広く分布しており、カワヤナギはその中の優占種であった。他に、タチヤナギ（*S. subfragilis* Anders），マルバヤナギ（*S. yezoalpina* Koidz），ジャヤナギ（*S. eriocarpa* Franch），コゴメヤナギ（*S. serissaefolia* Kimura）が群落内に見られた。長さ15 cm，太さ1 cmの挿し穂は使用時まで4℃で保存した。

成育条件

4月末に、湿らせたバーミキュライトを入れたワグナーポット（1/10,000 a）に挿し穂を一芽挿しし、温室で3週間生育させた。シュートの高さが約20 cmになった稚樹を、比較湿度 $75 \pm 7\%$ ，温度を30℃/25℃，25℃/20℃，20℃/15℃ [昼/夜：12 h (6:00-18:00)/12 h (18:00-6:00)] に調節した3室の自然光室（生物環境調節室）に移した（Shinohara *et al.*, 1998）。生物環境調節室の設計上、相対湿度により湿度を調節したため蒸気圧を同じレベルにすることはできなかった。自然光室の広さは360×360 cm²，前面部の高さが300 cm，後面部の高さが400 cmであった。自然光室における比較光束密度は、全太陽光の約72%であった。栄養液は長尾（1983）の示した条件にしたがった。3鉢か4鉢乗せたトレイに毎週栄養液を供給し、常に深さ2 cmの液がある状態を保つようにした。5月中旬から翌年の2月中旬まで9ヶ月間にわたって、毎週シュートの伸長の様子を測定した。位置効果を軽減するために稚樹の場所を順番に入れ替えた。9ヶ月間に新たに形成された芽の構造について、シュートについている葉芽と花芽の数を冬季に数えて判定した。葉・茎・根の乾燥重量は、85℃，72時間乾燥後に測定した。3種類の温度条件で生育させたカワヤナギの違いは分散分析法により検定した。

組織構造の解析

3つの異なる温度条件で9ヶ月間生育させたカワヤナギの内部構造を測定するために、シュートの下から1 m及び2 mの高さの幹から、直径約1 cm、長さ約2 cmのブロックをかみそりの刃で切り出した。それぞれのブロックは、100 mMリン酸バッファー (pH 7.0)、4%グルタルアルデヒドの溶液に入れて直ちに固定した。スライディングマイクロトームを用いて固定したブロックから切片を作製し、光学顕微鏡によって解析した (Sugawa and Fujii, 1993)。

光合成量と呼吸量の測定

3種類の温度条件で3ヶ月間生育させたカワヤナギ個体を、光合成量と呼吸量の測定に用いた。ADCポータブルフィールドガス交換システム (LCA-2; Analytical Development) を用い、生物環境調節室内で光合成と呼吸の両活性を測定した。光合成速度は自然光 ($1,467 \pm 39 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 下で測定した。光合成量の測定中、他の葉の影響を受けないようにして光強度をモニターした。呼吸速度は、2, 3枚のアルミホイルでleaf chamberをくるみ、葉に光が当たらないようにして測定した。空気の流動量は 300 ml min^{-1} に調整した。 CO_2 濃度は $345 \pm 2 \text{ ppm}$ (平均値 \pm 標準誤差) であった。短時間の温度適応性を調べるため、異なる温度へ移す前と移した1時間後の成熟葉の光合成速度と呼吸速度を測定した。自然光下での成熟葉での気孔伝導度は 20°C , 25°C , 30°C でそれぞれ 431 ± 19 , 568 ± 58 , $747 \pm 63 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (平均値 \pm 標準誤差) であった。ガス交換速度を測定した後に、面積計 (AMM-7; 林電工) を用いて葉面積を測定した。

2-3 結果

シュートの伸長に対する温度の影響

3種類の温度条件におけるカワヤナギのシュートの成長曲線を図1に示した。6月の初めから7月の末までのシュートの成長速度は、20℃/15℃、25℃/15℃、30℃/25℃でそれぞれ 21.7 ± 0.6 、 22.2 ± 1.3 、 22.5 ± 1.5 cm/週（平均値±標準誤差）であった。成長速度に有意な差がないことから、カワヤナギのシュートの伸長は基本的に温度に依存しないと考えられる。3種類の温度設定における典型的なシュートの伸長を図2に示した。シュートの伸長は、日長が短くなるために9月の初めに停止した。この時点でシュートの高さは約3 mに達した。30℃/25℃で伸長させたシュートにのみ8月中旬に分枝が生じたが、分枝の温度条件についてはクローン間で差があるようだ。大きなポット（1/2,000 a）を使用しても、最終的なシュートの高さはあまり影響を受けなかった。秋に葉が黄色くなったのは20℃/15℃でのみであったが、3つの温度条件すべてで最終的には落葉した。

バイオマス生産に対する温度の影響

9ヶ月間育成させたカワヤナギの乾物生産を表1にまとめた。全乾燥重量と幹の乾燥重量及び幹の太さは、3種類の温度条件で有意差が見られなかった。30℃/25℃の温度条件で、葉の乾燥重量は最も大きく、根の乾燥重量は最も小さくなった。分散分析により、この結果は統計的に有意であることを確認した。高い温度条件でわずかに乾燥重量が小さくなるのは、蒸散と呼吸速度が高まることによって炭水化物が減少することと関係しているのかもしれない（Kramer and Kozlowski, 1979）。

9ヶ月間後の葉芽と花芽の総数を表2にまとめた。分枝が起きたために、葉芽と花芽の総数は30℃/25℃で最も大きくなった。生育温度が高いものほど葉芽に対する花芽の比率が大きくなる傾向が見られた。30℃/25℃で生育させたカワヤナギがつけた花芽のうち主軸上にあったのは19%（115個のうち22個）であった。しかし、冬季を経ないために花芽の発達は不完全であった。

さらに、シュートの基部から1 mの高さの幹における木部の組織構造を比較した（図3）。30℃/25℃、25℃/20℃での導管の数は20℃/15℃に比べ明らかに増加していた。これに対し、導管と木

部繊維の直径や、繊維の細胞壁の厚さには有意な違いが見られなかった（表3）。シュートの基部から2 mの高さについても同様の結果が得られた。

葉の光合成速度と呼吸速度に対する温度の影響

30℃/25℃で生育させたカワヤナギの葉位ごとの光合成速度と呼吸速度をまとめたのが図4である。若い発達中の葉（1番目から13番目）の光合成速度は低く、呼吸速度は高かった。古い葉（85番目から92番目）の光合成速度は、セネッセンスのために減少していた。他の温度条件でも、葉の位置による光合成速度と呼吸速度の違いは似たような傾向が見られた。このように、カワヤナギの光合成速度と呼吸速度は葉の発達段階によって調節されていることが明らかになった。マツでは葉齢によってクロロフィルやチラコイド電子伝達系成分、光合成関連遺伝子の転写産物のレベルが変化することが知られている（Shinohara and Murakami, 1996）。カワヤナギにおいてもこれらの構成要素が発達段階によって変化することが推測される。

光合成速度が高かった20番目から40番目に位置する成熟葉を用いて、異なる温度条件に順応した個体間の光合成速度と呼吸速度を比較した（表4）。光合成速度と呼吸速度は30℃/25℃で最も高かった。生育温度による光合成速度の増加は呼吸速度の増加よりもかなり低く抑えられていた。異なる生育温度に個体を移して1時間経過した後の成熟葉における光合成速度と呼吸速度についても調べた。高い温度から低い温度へ移したときの1時間後の光合成速度と呼吸速度は、低い温度に順応した個体とあまり変わらなかった。これに対し、低い温度から高い温度に移した場合には光合成速度の顕著な低下が見られた。

2-4 考察

植物の生長には多くの温度依存的な生化学的プロセスが関わっている (Kramer and Kozlowski, 1979)。例えば、スギ (*Cryptomeria japonica*) は、25℃/20℃で最も成長が良い (長尾, 1985)。本章では、カワヤナギのバイオマス生産は温度に非依存的であることを明らかにした。生育温度が高いときには、光合成収率を増加させるために多くの葉が作り出され、呼吸によるエネルギー消費を少なくするために根の形成が抑制される (表1, 4)。この現象は高温に対する適応と考えられる。しかしながら、幹の乾燥重量は3つの温度条件で変わらなかった。この結果は、日本の北方地域の河川流域に分布しているヤナギ属植物であるエゾノカワヤナギ (*S. miyabeana*) 及びオノエヤナギ (*S. sachalinensis*) での報告 (Koike *et al.*, 1995) とほぼ一致している。従って、植物個体全体もしくは幹をバイオマス資源として用いる場合には、カワヤナギは広範囲で植栽利用することができる。いくつかの木本植物では、緯度や高度による木部の組織構造の違いが観察されている (Baas, 1982; Noshiro and Suzuki, 1995)。本章では、高温で導管の数が増加し、導管や木部繊維の直径や繊維の細胞壁の厚さは生育温度の影響をあまり受けないことを明らかにした (表3)。これは生育温度と木部組織構造の関係を示した最初の報告である。導管の数の増加は高温における蒸散の増大と関係しているのかもしれない。しかし、導管数の増加は幹の乾燥重量に影響しなかった (表1)。さらに、長期間育成したカワヤナギの木部組織構造を解析することにより、生育温度と木部組織構造の関係が明らかになるであろう。

先駆種は一般に光合成速度、光補償点、光飽和レベルが極相種よりも高い (Bazzaz, 1979; Bazzaz and Carlson, 1982; Küppers, 1984; Koike, 1988)。カワヤナギは成長速度の早い種であり (図1)、光合成速度も早い (表4)。これまでに報告されている他の日本の落葉広葉樹よりもカワヤナギの光合成速度は遙かに大きい (Koike and Sakagami, 1985; Koike, 1988)。また、光合成の特性は土壌中の栄養条件や水分条件に大きく影響を受ける (Schulze, 1982; Medina, 1984; Küppers, 1987)。本章の実験では栄養・水分ともに十分であり、制限要因とはならない。従って、温度に非依存的なバイオマス生産 (表1) はこの種の光合成特性がもたらすものと考えられる。根や幹を含む非光合成組織の呼吸によるエネルギー消費から考えると、この結果は基本的に葉の光合成速度により

説明できる。非光合成組織の呼吸をさらに詳細に測定することによって、温度に非依存的なバイオマス生産が葉の光合成能に由来することがより明確になるものと考えられる。

特定の温度設定に順応したカワヤナギを低い温度から高い温度に移すと、葉が急激な温度変化をストレスとして光合成速度が顕著に低下することが明らかになった。この結果は、短時間（1時間）の順化では葉の光合成速度の回復に十分でないことを示している。また、植物個体が環境変化に順応し、完全に適応するにはかなり時間が必要であることを示している。急激な温度変化に対する応答反応を調べるため、3章では代表的な熱ショックタンパク質遺伝子を単離し、その発現特性を解析した。

表1 生育温度がカワヤナギのバイオマス生産に及ぼす影響

Temperature regime	Stem diameter ^a (mm)	Total dry weight (g)	Terrestrial part		Subterranean part
			Leaf ^b (g)	Stem (g)	Root ^c (g)
20/15℃	10.1 ± 0.4	170 ± 15.0	28.1 ± 2.6	78.7 ± 6.0	63.3 ± 7.3
25/20℃	10.1 ± 0.1	171 ± 3.7	29.6 ± 2.0	78.5 ± 1.6	62.4 ± 3.2
30/25℃	9.8 ± 0.2	160 ± 4.0	40.4 ± 2.1	75.1 ± 3.2	44.3 ± 2.1

4 ～ 6 個体のカワヤナギを3種類の温度条件下で9ヶ月間生育させた後に測定した。値は平均値 ± 標準誤差。^a茎の直径はシュートの基部から50 cmの高さで測定した。有意水準:^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.05$ 。

表2 異なる温度条件で9ヶ月間に形成された葉芽と花芽の数

Temperature regime	Number of buds		
	Total ^a	Leaf	Flower
20/15℃	132 ± 7.8 (100) ^b	91 ± 3.4 (69)	41 ± 7.0 (31)
25/20℃	149 ± 6.1 (100)	79 ± 5.0 (53)	70 ± 7.8 (47)
30/25℃	319 ± 28.0 (100)	128 ± 10.0 (40)	190 ± 19.0 (60)

^a 値は平均値 ± 標準誤差, $N = 5 \sim 6$ 個体。有意水準: $p < 0.01$ 。 ^b 括弧内の値は総芽に対する葉芽と花芽の比率を示している。

表3 カワヤナギの幹の組織構造に及ぼす生育温度の影響

Temperature regime	Vessel ^a		Fiber ^a	
	Number ^b (mm ⁻²)	Diameter (μm)	Diameter (μm)	Double wall thickness (μm)
20/15℃	154 ± 4.33	36.4 ± 1.47	13.0 ± 0.62	2.83 ± 0.12
25/20℃	221 ± 13.10	34.5 ± 0.81	12.8 ± 0.24	2.48 ± 0.13
30/25℃	231 ± 7.00	36.1 ± 1.20	11.9 ± 0.45	2.35 ± 0.04

^a 値は平均値 ± 標準誤差, $N = 3$ 個体。 ^b 有意水準: $p < 0.01$ 。

表4 温度ストレスが成熟葉の光合成速度と呼吸速度に及ぼす影響

Growth temperature	Temperature treatments prior to measurements	Temperatures for measurements	Rate ^a	
			Photosynthesis	Respiration
			(μmol m ⁻² s ⁻¹)	
20°C/15°C	20°C	20°C	14.0 ± 0.4 (100) ^b	1.0 ± 0.1 (100) ^b
	20°C → 25°C	25°C	9.2 ± 1.0 (66)	1.4 ± 0.1 (140)
	20°C → 25°C → 30°C	30°C	8.6 ± 0.4 (61)	1.7 ± 0.1 (170)
25°C/20°C	25°C	25°C	15.3 ± 1.0 (100)	1.3 ± 0.1 (100)
	25°C → 30°C	30°C	7.1 ± 0.6 (46)	1.5 ± 0.0 (66)
	25°C → 30°C → 25°C → 20°C	20°C	13.0 ± 0.4 (85)	0.8 ± 0.1 (61)
30°C/25°C	30°C	30°C	17.2 ± 0.9 (100)	1.9 ± 0.2 (100)
	30°C → 25°C	25°C	14.2 ± 0.7 (83)	1.4 ± 0.1 (74)
	30°C → 25°C → 20°C	20°C	13.9 ± 0.8 (81)	0.9 ± 0.1 (47)

^a 2つの活性は異なる温度に移す前と移した1時間後に測定した。20番目から40番目の成熟葉のうち5枚から7枚を用いたときの平均値 ± 標準誤差。^b 括弧内の値は最初の値を100としたときの両活性の百分率。

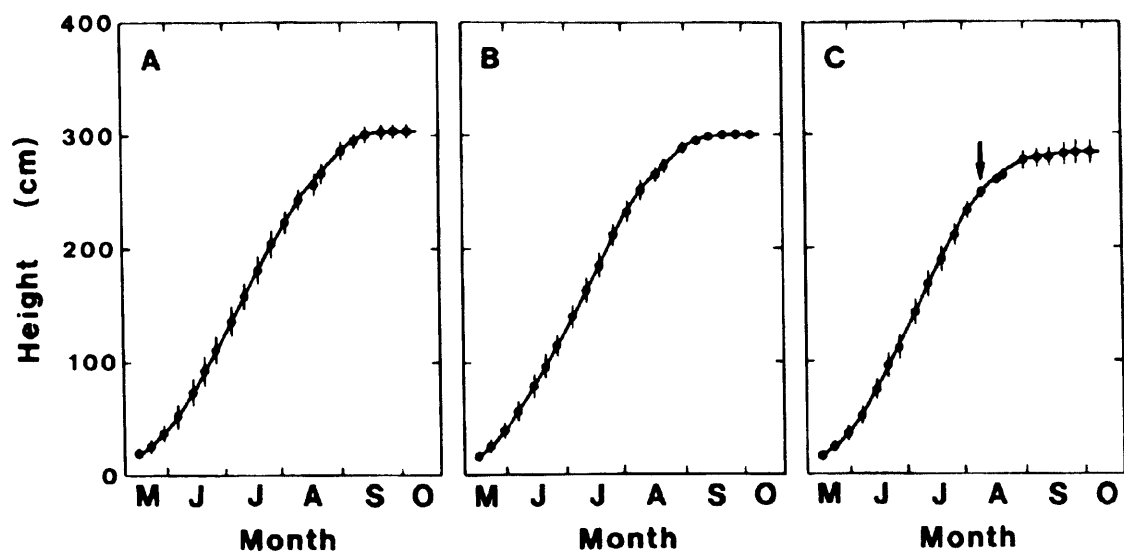


図1 カワヤナギのシュートの成長曲線。

生育温度は、20℃/15℃ (A), 25℃/20℃ (B), 30℃/25℃ (C) [昼/夜: 12h/12h]。矢印は分枝の始まった時期を示している。バーは標準誤差を表す。N=7個体。



図2 カワヤナギの典型的なシュート。

20℃ / 15℃ (A), 25℃ / 20℃ (B), 30℃ / 25℃ (C) [昼 / 夜 : 12h / 12h] で2ヶ月間生育させた。
バーは20 cm。

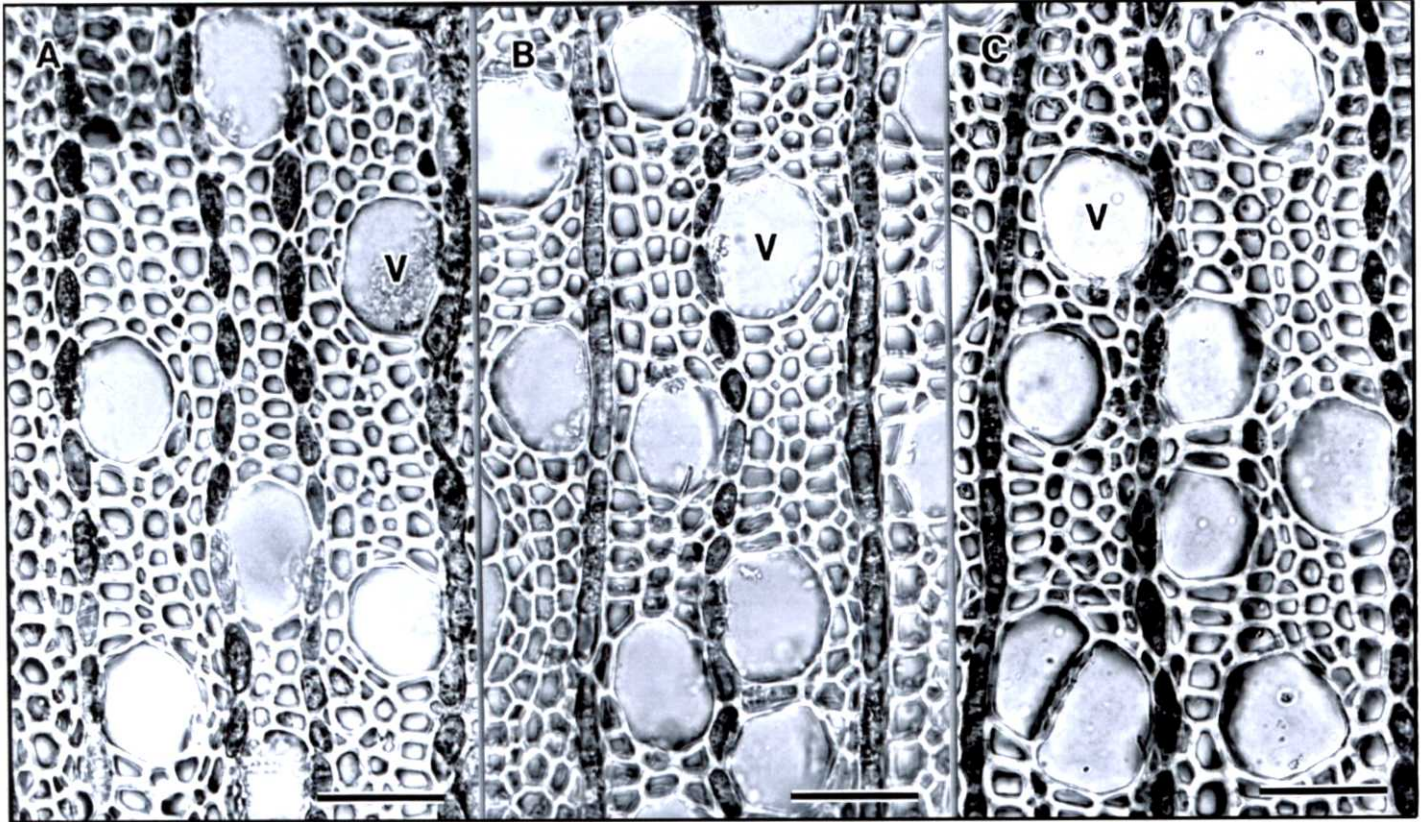


図3 カワヤナギの幹の内部組織構造。

20℃ / 15℃ (A), 25℃ / 20℃ (B), 30℃ / 25℃ (C) [昼 / 夜 : 12h / 12h] で9ヶ月間生育させた。シュートの基部から1 mの高さから得た横断面切片。バーは40 μm。

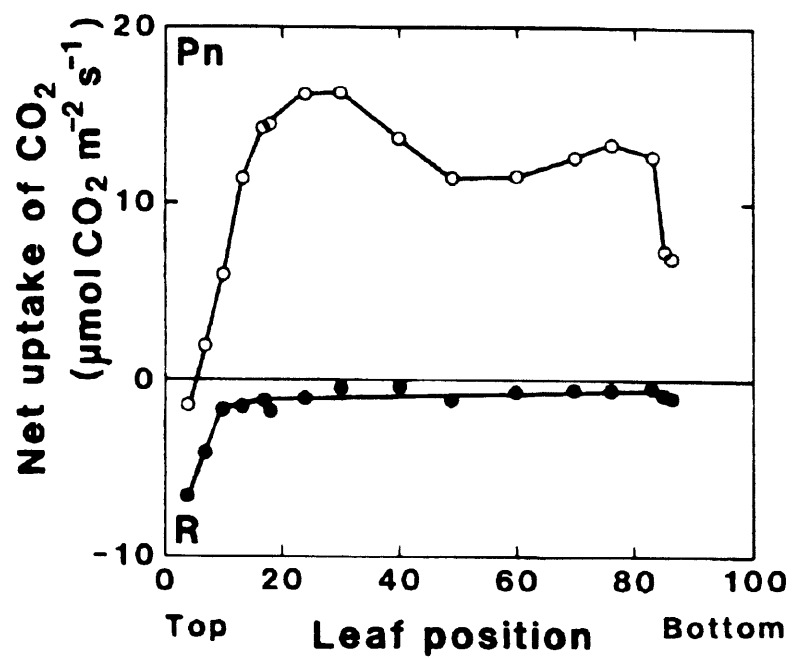


図4 カワヤナギの光合成速度と呼吸速度に及ぼす葉位の影響。

昼間と夜間の温度 30℃と 25℃で 3ヶ月間生育させた植物個体を測定に用いた。92番目から 83番目の葉は 5月に、82番目から 54番目の葉は 6月に、53番目から 19番目の葉は 7月に、18番目から 1番目の葉は 8月に萌芽した。

第3章 ヤナギ属植物の熱ショックタンパク質遺伝子の発現特性

3-1 はじめに

一般に、植物の生育は日射量や温度、大気成分、風速や土壌水分・土壌中に含まれるミネラルといった様々な環境変化の影響を受けるものと考えられる。2章では、カワヤナギの成長に温度がどのような影響を与えるかについて調べた。そのなかで、カワヤナギを低い温度から高い温度に移すと、葉が急激な温度変化をストレスとして光合成速度が顕著に低下することを明らかにした。急激な温度上昇に対する応答反応を調べるため、熱ショックタンパク質遺伝子の単離と発現特性の解析を試みた。

多くの生物種で報告されている熱ショックタンパク質は、熱ストレスに限らず様々なストレスで誘導され、タンパク質の変性を防ぐことにより細胞の機能を維持している。ヤナギ属に関しては、*Salix viminalis*の葉及びカルスに熱ストレスを与えたときに誘導されるタンパク質の特性について調べた報告例がある (Vahala *et al.*, 1990)。しかし、ヤナギ属の環境適応機構を環境ストレスに対する遺伝子の応答といったレベルで解析した報告例はまったくない。

本章では、代表的な熱ショックタンパクであるHsp70 (SGK1) 及びDnaJホモログ (SGJ1, SGJ3) をコードする遺伝子の構造と発現特性についてまとめた。SGJ1は雄性花序で多く、SGJ3とSGK1は雌雄の花序と根で多く発現していた。また、これらの遺伝子は物質輸送に関係する組織で強く発現することを明らかにした。熱ストレスを与えると、DnaJホモログの一つであるSGJ3は葉において急速に発現が誘導されたが、SGJ1は熱ストレスによる発現の誘導がほとんど見られなかった。この結果から、細胞質局在型のDnaJホモログであるSGJ1とSGJ3では機能が異なり、SGJ3は温度変化に対する防御反応として働く熱ショックタンパク質であるが、SGJ1は熱ストレスによりあまり誘導されない分子シャペロンであると考えられる。このように、DnaJホモログをコードする遺伝子ファミリーにも、それぞれの遺伝子により異なる役割を担っていることを明らかにした。

3-2 材料及び方法

材料

カワヤナギの雄性個体と雌性個体の花序は、2月から3月にかけて昼頃森林総合研究所の苗畑に植栽した個体から採取した。カワヤナギの挿し穂は3月のはじめに雌雄の個体から取り、使用時まで4℃で保存した。4月の末に直径1cm、長さ15cmの挿し穂を湿らせたバーミキュライトに挿し、自然日長下25/20℃(昼/夜)、相対湿度75%の生物環境調節室内で4週間稚樹を生育させた。シュートの高さが約15cmとなった稚樹からシュートを切り取り、ストレス処理に用いた。同じ大きさの稚樹から葉・茎・根を取り分け、-80℃で保存した。成木から得た花序も解析するまで-80℃で保存した。

ストレス処理

雄性個体から切り取ったシュートを、素早く40℃にセットしたグロースチャンバー内の水耕液に移すことにより、熱ストレス処理を行った。さらに、鉢植えの雄性個体全体を40℃のグロースチャンバーに移す熱ストレス実験を行った。

塩ストレス処理は、25℃のグロースチャンバーで、100 mMもしくは300 mMの塩化ナトリウムを加えた水耕液に雄性個体から切り取ったシュートをつけることにより処理した。これらのストレス処理は、白色蛍光灯下（光強度 $80\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）で行った。ストレス処理したシュートの葉をRNA抽出に用いた。

クローンの単離と同定

カワヤナギの雄性個体の花序から抽出したpoly(A)⁺mRNA 5 μgをλ ZAPII (Stratagene) に組み込み、約 8.5×10^5 個の組み換えファージから成るcDNAライブラリーを作成した。AmershamのマルチプライムDNAラベリングシステムを用いて [α -³²P] dCTPで標識したSB12 DNA断片 (Shinohara, 1994) をプローブとして、およそ 6×10^5 個のブランクをスクリーニングすることによりcDNAクローンの単離を試みた。ハイブリダイゼーションは 20 mM ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)

(PIPES)-水酸化カリウム (pH 6.5) , 0.8 M 塩化ナトリウム, 50%ホルムアルデヒド, 0.5% SDS, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ サケ精子DNAの溶液を用いて42℃で18 時間行った。ハイブリダイゼーション後、フィルターは2×SSC (1×SSCは、0.15 M 塩化ナトリウム, 15 mMクエン酸ナトリウム) , 0.1% SDSの洗浄液を用いて室温で5分ずつ 3 回、0.1×SSC, 0.1% SDSの洗浄液を用いて55℃で30分ずつ 2 回洗った。組み換えファージのcDNAは、ExAssisit ヘルパーファージの働きによりin vivoでpBluescript SK- (Stratagene) プラスミドに挿入した。得られた16のプラスミドは、制限酵素地図と挿入された塩基配列の長さにより二つのグループ (pSGJ1, pSGJ2) に分けられた。さらに、別のタイプのDnaJホモログを単離するために、pSGJ1のcDNA挿入部分をプローブとしておよそ 8×10^5 個のプラークをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは6×SSC, 5×デンハート液 [1×デンハート液は0.02%フィコール, 0.02% ポリビニルピロリドン (PVP), 0.02%ウシ血清アルブミン] , 30%ホルムアミド, 0.5% SDS, 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ サケ精子DNAの溶液を用いて42℃で18時間行った。ハイブリダイゼーション後、フィルターは2×SSC, 0.1% SDSの洗浄液を用いて室温で5分ずつ 3 回、55℃で30分ずつ 2 回洗った。最終的に別のタイプのcDNAクローン (pSGJ3) を得ることができた。

DNA塩基配列の決定

それぞれのcDNAの塩基配列は+鎖と-鎖の両方をジデオキシチエンターミネーター法により、自動DNAシーケンサー (ABI PRISM 377, Applied Biosystems) とサイクルシーケンスキット (Applied Biosystems) を使って決定した。DNA配列の解析はGENETYXソフトウェア (ソフトウェア開発) によって行った。相同性の検索にはBLASTを用いた。

RNAとDNAの調製

全RNAは臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB)-クロロホルム抽出法 (Chang *et al.*, 1993) の改良法 (Shinohara and Murakami, 1996) により調製した。凍らせた材料を液体窒素下で乳鉢と乳棒で粉末状にし、100 mM トリス-塩酸 (pH 8.0), 25 mM EDTA, 2 M 塩化ナトリウム, 2% (w/v) PVP, 2 % (w/v) β -メルカプトエタノール, 0.5 mg ml^{-1} スペルミジン溶液中でよく混合させた。こ

の溶液を65℃で10分加熱した。その後、等量のクロロホルム：イソアミルアルコール（24：1）を加え、15,000 *g* で10分間遠心して抽出することを3回繰り返した。1/4量の10 M 塩化リチウムを水層に加え、4℃で一晩沈殿し、15,000 *g* で20分間遠心してRNAを回収した。沈殿したRNAを10 mM トリス-塩酸（pH8.0）、1 mM EDTA、0.5 % (w/v) SDSで溶解し、クロロホルム：イソアミルアルコールで抽出した。抽出したRNAをエタノール沈殿した後、滅菌水で溶解し、使用時まで-80℃で保存した。poly(A)⁺ RNAは、オリゴ(dT)セルロースでアフィニティークロマトグラフィにより単離した（Sambrook *et al.*, 1989）。

ゲノミックDNAは、雄性個体と雌性個体の若い葉からCTAB法（Murray and Thompson, 1980）により調製した。

DNA・RNAゲルブロット

0.9 μgのゲノミックDNAを各種制限酵素で切断し、0.7 %のアガロースゲルによる電気泳動で分画した。これをナイロンメンブレン（Biodyne B; Pall）にアルカリトランスファー法（Reed and Mann, 1985）によって転写した。DNAは、FUNA-UV-LINKER（フナコシ）中でUV光を照射してメンブレンに架橋させた。50 mM トリス-塩酸（pH 7.5）、1 M 塩化ナトリウム、50 % ホルムアミド、1 % SDS、10 % デキストラン硫酸、100 μg ml⁻¹ サケ精子DNAの溶液中でナイロンメンブレンを一晩42℃でプレハイブリダイズした。³²Pで標識した各cDNAインサートを直接プレハイブリダイゼーション溶液にいて、42℃で18時間ハイブリダイズした。その後、2×SSC、0.1 % SDSの洗浄液で室温で5分ずつ3回、0.1×SSC、0.1% SDSの洗浄液で55℃で30分ずつ2回、メンブレンを洗浄した。洗浄したメンブレンは、X線フィルム（X-OMAT-AR5; コダック）で露光した。

RNAゲルブロット解析には、トータルRNA 10 μgをホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動により分画し、ナイロンメンブレン（Biodyne A; Pall）上にキャピラリートランスファー

（Sambrook *et al.*, 1989）により転写した。プレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーションは、5×SSPE（1×SSPEは0.15 M 塩化ナトリウム、10 mM リン酸ナトリウム、1 mM EDTA, pH 7.4）、50 % ホルムアミド、0.5×デンハルト液（1×デンハルト液は0.02% フィコール、0.02% PVP, 0.02% BSA）、0.1% SDS、10% デキストラン硫酸、200 μg ml⁻¹ サケ精子DNAの溶液中で行

った。42℃で18時間ハイブリダイズした後、DNAゲルプロットと同じ条件で洗浄し、X線フィルムに露光した。

in situ ハイブリダイゼーション

カワヤナギの雄性花序と雌性花序は、4 % (w/v) パラホルムアルデヒドと0.25 % グルタルアルデヒドを含む0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に浸けて一晩4℃で固定させた後、段階的に希釈したエタノールシリーズで脱水させ、パラプラストプラス (Sherwood Medial) 中に包埋した。前もって100 µg/ml ポリ-L-リシンで前処理したスライドグラス上に、ミクロトームで8 µmの厚さに切った切片を乗せた。スライドグラス上の切片はキシレンで脱パラフィン処理した後に、段階的に希釈したエタノールシリーズに順に浸すことによって再水和した (Kouchi and Hata, 1993) 。*in situ* ハイブリダイゼーションは、ジゴキシゲニンで標識したセンスとアンチセンスのプロープを用いて行った。

3-3 結果

DnaJホモログに相当する3種のcDNAクローンの単離とその特徴

pSGJ1とpSGJ2は505塩基対のcDNA断片であるSB12をプローブとして雄性花序由来のcDNAライブラリーを厳しい条件でスクリーニングすることにより単離した。pSGJ1挿入部分の長さは1610塩基対で、最も長いオープンリーディングフレームは423アミノ酸をコードしていた（図5）。予想されるポリペプチド（SGJ1）は分子量が47.5 kDaで等電点は7.01であった。これに対し、pSGJ2はpSGJ1の完全長の塩基配列に加えて、5'上流の17塩基対及び三つのイントロンと考えられる領域を含んでいた。そのため、pSGJ2の挿入部分の長さは2555塩基対に及んでいた。pSGJ2内の介在配列がSGJ1遺伝子のイントロンだと考えたのは次の3つの理由による。第一に、5'上流の17塩基対と三つの介在配列を除くと、pSGJ2とpSGJ1は同一の塩基配列を持っていた。第二に、pSGJ2の3'側の非翻訳領域はpSGJ1とまったく同じであった。第三に、介在配列の両側の境界にはスプライスジャンクションの5'側と3'側のコンセンサス配列（Shinibaldi and Mettle, 1992）が見られた。pSGJ2がSGJ1のイントロンと考えられる配列を持つことから、pSGJ2のcDNAはSGJ1遺伝子の前駆体mRNAに相当するものであるらしい。

pSGJ1のcDNAをプローブとして緩やかな条件でスクリーニングすることにより、別の種類のDnaJホモログ（pSGJ3）を単離した。pSGJ3の挿入部分は1594塩基対で最長のオープンリーディングフレームは420アミノ酸であった。pSGJ3の塩基配列はpSGJ1と66.7%一致していた。予想されるポリペプチド（SGJ3）は分子量が46.6kDaで等電点が5.98であった。

SGJ1は、ハマアカザ（*Atriplex*）（Zhu *et al.*, 1993b）、キュウリ（Preisig-Müller and Kindl, 1993）、シロイヌナズナ（Zhou *et al.*, 1995）、酵母（Caplan and Douglas, 1991; Atencio and Yaffe, 1992）の細胞質に局在するDnaJホモログとそれぞれ72.1%、74.9%、69.9%、43.7%の相同性を示した（図6A）。また、SGJ1は、エンドウマメの葉緑体DnaJホモログ（Schlicher and Soll, 1997）と19.6%、シロイヌナズナのミトコンドリアDnaホモログ（Kroczyńska *et al.*, 1996）と21.7%、シロイヌナズナのカルモジュリン結合型Dnaホモログと30.0%の相同性を示した。SGJ3は、上に挙げた細胞質局在型のDnaJホモログとそれぞれ86.4%、91.4%、79.5%、43.3%の相同性を示した。このように、SGJ3は

SGJ1よりも植物でこれまでに報告されている細胞質局在型DnaJホモログに高い相同性を示した。DnaJホモログのアミノ酸配列の比較から、SGJ1とSGJ3はいくつかの機能ドメインを含んでいることが分かった。N端にDnaJ特異的な配列であるJ-ドメインがあり、それに続いてアミノ酸残基81番目から109番目までグリシン・フェニルアラニンに富む領域（G/Fリッチ領域）がある（図6Aにおいて矢印で示した部位）。J-ドメインとG/Fリッチ領域はDnaKのATPアーゼ活性を活性化し、バクテリオファージDNAの複製するために必須な領域である（Wall *et al.*, 1994）。また、SGJ1とSGJ3は4つのC-X-X-C-X-G-X-G配列（図6Aにおいて下線で示した部位）を含んでいる。しかも、C-X-X-C-X-G-X-G-(X)₈-C-X-X-C-X-G-X-Gが2回連なった形をしている。最後のグリシンがリシンになっていることも含めて、この繰り返し配列はDnaJホモログに共通してみられるものである。この領域はZnフィンガーモチーフに似ており（Caplan and Douglas, 1991）、変性タンパク質の結合に関わっているという（Szabo *et al.*, 1996）。さらに、C端のアミノ酸配列VQCAQQ（図6Aの破線で示した部位）は、植物の細胞質に局在するDnaJホモログに共通している。高温感受性の酵母突然変異体*mas5*の相補実験から、高温下でDnaJホモログが機能するためにはVQCAQQモチーフ中のシステイン残基のイソプレニル化が必要であることが示されている（Caplan *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1993a）。また、DnaJホモログが膜へ会合するためにもシステイン残基のイソプレニル化が必要である（Zhu *et al.*, 1993a）。

Hsp70に相当するcDNA断片の単離とその特徴

カワヤナギの雄性花序由来のcDNAライブラリーからは、DnaJホモログだけでなくHsp70の一部をコードするcDNA断片（pSGK1）も単離した（登録番号AB012716）。pSGK1の挿入部分は1494塩基対で最長のオープンリーディングフレームは408アミノ酸であった。このオープンリーディングフレームはpSGK1の挿入部分の5'端の塩基から始まっており、予想されるポリペプチド(SGK1)のN端もメチオニン残基ではなかった。このことから、pSGK1はタンパク質の完全長のアミノ酸情報を含まないcDNA断片であるといえる。しかし、完全長ではないものの、SGK1はシロイヌナズナ、セイヨウアブラナ、エンドウの細胞質局在型のHsp70とアミノ酸配列でそれぞれ92%、91%、85%と高い相同性を示した。植物のミトコンドリアや葉緑体局在型や小胞体結合型のHsp70とも相

同性はあるものの、43%から57%とそれほど高くなかった。これは酵母の細胞質局在型のHsp70であるSSA1との相同性（69%）よりも低い値であった。以上のことから、SGK1は細胞質局在型のHsp70である可能性が高いといえる。シロイヌナズナ、エンドウのHsp70との比較から、SGK1はN端の約240アミノ酸残基を欠損していることが予想される（図6B）。

雄性個体と雌性個体のゲノム中におけるSGJ1, SGJ3, SGK1遺伝子の分布

DNAゲルプロットにより、カワヤナギゲノム中のSGJ1, SGJ3, SGK1遺伝子のコピー数を推定した（図7）。ハイブリダイゼーションの結果、SGJ1のシグナルのパターンはSGJ3のものと明らかに異なっていた。SGJ1に相当するバンドが一本か二本であるのに対して、SGJ3に相当するバンドは四本かそれ以上であった。この結果は、ヤナギゲノム中にSGJ1タンパク質が単一かもしくは2個程度の遺伝子によってコードされているのに対し、SGJ3タンパク質は数個の遺伝子によってコードされていることを示している。SGJ1のハイブリダイゼーションの結果は、pSGJ2のcDNAをプローブとしたときの結果と同じであった。また、EcoRVで切断後のヤナギゲノムDNAに対するSGJ1のハイブリダイゼーションのパターンは雄性個体と雌性個体で異なり、制限酵素断片長多型が確認された。しかしながら、この違いは雌雄の違いによるものではなく、野生植物の個体間の違いに由来するクローン変異であるらしい。SGK1に相当するバンドは二本かそれ以上あることから、数個の遺伝子によってコードされていると考えられる。SGK1のハイブリダイゼーションのパターンについても雄性個体と雌性個体で制限酵素断片長多型が確認されたが、これもクローン変異によるものと考えられる。

SGJ1, SGJ3, SGK1遺伝子の発現の器官特異性

ヤナギ植物体の様々な器官から抽出した全RNAを用いてゲルプロット解析を行い、SGJ1, SGJ3, SGK1遺伝子の発現の器官特異性を比較した（図8）。SGJ1転写産物（1.7 kb）は全ての器官で検出されたが、そのレベルは雄性花序で最も多かった。SGJ1の転写産物には長さ2.5 kbのものも検出された。長いタイプの転写産物は雌性個体の葉と茎及び雄性花序で検出された。この転写産物はpSGJ2のcDNA挿入部分の長さと同程度であることから、1.7kbの転写産物の前駆体である可能性

がある。長さ1.7kbの*SGJ3*の転写産物と長さ2.3 kbの*SGK1*の転写産物も全ての器官で検出された。*SGJ3*と*SGK1*の発現量は雌雄両方の個体の根と花序で高かった。オートラジオグラムと露出時間から判断すると、全ての器官において*SGK1*の発現レベルが最も高く、*SGJ1*の発現レベルが最も低かった。3種類の遺伝子はカワヤナギの全ての器官で発現しているものの、発現のレベルは器官により異なるといえる。

SGJ1, *SGJ3*, *SGK1* 遺伝子の生殖器官の発達過程における発現調節

雄花及び雌花の発達過程における*SGJ1*, *SGJ3*, *SGK1*の発現調節を調べた(図9)。雄花と雌花の発達は花序の大きさによって5段階に分類した。これら3遺伝子の発現レベルは、雄花の発達が進むにつれて減少する傾向が見られた。これに対し、雌花の発達過程では発現レベルが一旦減少してから増加した。雄花の発達過程の初期(ステージI)において、他の器官では見られなかった1.1 kbの*SGJ1* mRNAが検出された。また、雄花の発達過程の後期には2.5 kbの*SGJ1* mRNAが検出された。1.7 kbの転写産物は雄花と雌花の全ての発達過程を通じて発現していた。雄花の発達過程で検出された1.1 kb, 2.5 kbの転写産物の役割については不明であるが、特定の発達段階でのみ検出される点が興味深い。ゲノム中の*SGJ1* 遺伝子のコピー数が少ない点から考えると、1.1 kbの転写産物は*SGJ1* 類似の遺伝子由来のものではなく、*SGJ1* mRNAの選択的スプライシングにより生じたものかもしれない。

SGJ1, *SGJ3*, *SGK1* 遺伝子の生殖器官における発現部位

図10では雄花のステージIとステージIIIにおける*SGJ1*, *SGJ3*, *SGK1*の発現部位を示している。未熟な雄花では*SGJ1*, *SGJ3*, *SGK1*の転写産物は小孢子とタペータム細胞で検出された。*SGJ3*と*SGK1*の転写産物はステージIの蜜腺原基とステージIIIの蜜腺で検出されたが、*SGJ1*の転写産物は蜜腺原基や蜜腺で検出されなかった。*SGJ1*, *SGJ3*, *SGK1*の転写産物はステージIIIの成熟花粉でも検出された。

図11では雌花のステージIIIでの*SGJ1*, *SGJ3*, *SGK1*の発現部位を示している。それぞれの遺伝子の転写産物は、胚珠の内珠皮及び珠柄の表層に局在していた。図10の結果と同じく、*SGJ3*と

*SGK1*の転写産物は蜜腺で検出されたが、*SGJ1*の転写産物は蜜腺では検出されなかった。*SGJ1*と*SGJ3*はともに細胞質局在型のDnaJホモログであるが、2つのタンパク質の間には何らかの機能分担があるのかもしれない (Futamura *et al.*, 2000b)。

熱ストレス及び塩ストレスに対する*SGJ1*, *SGJ3*, *SGK1*遺伝子の応答

カワヤナギの雄性個体から切り取ったシュートに40℃の熱ストレスをかけたとき、3種類の遺伝子の発現レベルがどのように変化するかについて調べた (図12A)。個体やシュートに48時間熱ストレスをかけても、枯れることはなく形態的にも実験開始前と変化はなかった。葉における*SGJ1*転写産物のレベルは6時間後に約3倍に増加し、その後徐々に減少した。*SGJ3*と*SGK1*の転写産物のレベルは、熱ストレスの開始1時間後にそれぞれ約10倍と約2倍に増加した。熱ストレスをかけてから発現が誘導されるまでの時間経過を見ると、*SGJ3*と*SGK1*の発現誘導のパターンは*SGJ1*のものと明らかに異なっている。コントロールとして、切り取ったシュートを25℃に移しても*SGJ1*, *GJ3*, *SGK1*遺伝子の発現が大きく誘導されることはなかった (図12B)。鉢植え個体全体に熱ストレスを与えたときにも*SGJ3*の発現は顕著に誘導されたが、*SGJ1*の発現はほとんど誘導されなかった。以上の結果は、*SGJ3*は典型的な熱ショックタンパク質として働いているが、*SGJ1*は熱ストレスにより誘導されることの少ない熱ショックタンパク質コグネート (cognate) であることを示唆している。

塩生植物であるハマアカザ (*Atriplex nummularia*) の培養細胞において、DnaJホモログである*ANJ1*遺伝子は熱ショックばかりでなく、塩化ナトリウム処理によっても誘導される (Zhu *et al.*, 1993b)。そこで、カワヤナギの雄性個体から切り取ったシュートに塩化ナトリウム処理することにより*SGJ1*, *SGJ3*, *SGK1*遺伝子の発現がどのように誘導されるかを調べた (図13)。300 mMの塩化ナトリウムで処理したとき、72時間後にはシュートは深刻なダメージを受け、1週間以内に枯死した。100 mMの塩化ナトリウム処理後24時間で、*SGJ1* mRNAのレベルは実験開始前の6倍に増加した。*SGJ1*の発現レベルは24時間後に最大になった後、徐々に減少した。これに対し、100 mM塩化ナトリウム処理24時間後の*SGJ3*と*SGK1*のmRNAレベルは、2倍程度しか誘導されなかった。

3-4 考察

本章では、DnaJホモログ (SGJ1, SGK3) やHsp70 (SGK1) の構造と対応する遺伝子の発現パターンについて解析した。SGJ1とSGJ3の予測されるアミノ酸配列は、他の植物で報告されている細胞質局在型のDnaJホモログと非常に高い相同性を有しており、且つDnaJホモログの4つの機能ドメインを有していた。4つの機能ドメインとは、N端のJ-ドメイン、それに続くG/Fリッチ領域、4ヶ所のC-X-X-C-X-G-X-Gユニット及びC端のVQCAQQ配列である (図6A)。酵母の温度感受性突然変異体である *mas5* にハマアカザのDnaJホモログである ANJ1 を導入すると相補的に働くことが知られている (Zhu *et al.*, 1993b)。従って、SGJ1とSGJ3もYDJ1/MAS5の機能的なDnaJホモログであり、カワヤナギの細胞質に局在してその機能を発揮するものと考えられる。SGK1はN端が欠けているものの、SGJ1, SGJ3と同じく細胞質局在型のタンパク質であることが既知の植物のHsp70との相同性から示唆された。

酵母では、各種のDnaJホモログがそれぞれ決まったHsp70パートナーと協調して働き、未変性タンパク質への結合パターンを決定しているとされている (Silver and Way, 1993; Cyr and Douglas, 1994; Cyr *et al.*, 1994)。ホウレンソウでは、少なくとも12種類のHsp70が多重遺伝子族を形成しており、全ての主要な細胞内小器官に局在し、機能していることが報告されている (Guy and Li, 1998)。これらのHsp70ファミリーのメンバーは、器官や環境ストレスにより発現誘導のされ方が異なる (Guy and Li, 1998)。植物のDnaJホモログも酵母と同じように多重遺伝子族を形成しているものと考えられる。事実、葉緑体に局在するDnaJホモログ (Schlicher and Soll, 1997) やミトコンドリアに局在するDnaJホモログ (Kroczyńska *et al.*, 1996)、カルモジュリン結合型DnaJホモログ (Lin and Lin, 1997) が植物から単離されている。SGJ1とSGJ3は予想されるアミノ酸配列から細胞質局在型のDnaホモログであると推測される。ゲノミックDNAゲルプロットによる解析から、*SGJ1* は単一か2個程度の遺伝子、*SGJ3* と *SGK1* は数個の遺伝子から構成されるものと考えられる (図7)。RNAゲルプロットによる解析の結果では、*SGJ3* と *SGK1* の転写産物がそれぞれ1.7 kbと2.3 kbサイズのもののしか検出されないのに対して、*SGJ1* の転写産物は2.5 kb, 1.7 kb, 1.1 kbの3種類のサイズのものが検出された (図8, 図9)。ゲノム中の*SGJ1* 遺伝子のコピー数が少ない点からみて、

2.5 kbの転写産物は1.7kbの転写産物の前駆体であり、1.1 kbの転写産物は*SGJ1* mRNAの選択的スプライシングにより生じたものである可能性がある。長さ1.1 kbの*SGJ1*の転写産物は、雄花の発達過程の初期にのみ発現しており、特定の発達段階にのみ機能しているのかもしれない。

SGJ1、*SGJ3*及び*SGK1*遺伝子は全ての器官で発現していたが、発現のレベルは各器官により異なっていた（図8）。*SGJ1*は雄性花序で最も発現レベルが高く、*SGJ3*及び*SGK1*は雌雄の生殖器官と根で発現レベルが高かった。キュウリの芽生えでは、胚軸と根でDnaJホモログの発現レベルが高いことが報告されている（Preisig-Müller and Kindl, 1993）。根での発現レベルが高いという点で、*SGJ3*の発現パターンはキュウリのDnaJホモログと似ている。しかし、*SGJ1*の根での発現は葉や莖と同程度であり、同じDnaJホモログでも*SGJ1*と*SGJ3*はその役割が異なっているのかもしれない。*in situ* ハイブリダイゼーションによる解析結果でも、*SGJ3*と*SGK1*は蜜腺で発現しているものの、蜜腺での*SGJ1*の発現は検出できなかった（図10, 図11）。このように、細胞質局在型のDnaJホモログの発現部位が異なるという知見は植物では初めてのものであり、大変興味深い。

SGJ1、*SGJ3*、*SGK1*は生殖器官の発達過程でmRNAの発現レベルが変化することから、発達段階によって何らかの調節を受けていることが分かった（図9）。これらの遺伝子は共に雄花では未熟な葯中の小胞子に発現し、花粉が成熟するとそれらの発現は検出できない（図10）。この結果は、トマト（Duck and Folk, 1994）とトウモロコシ（Gagliardi *et al.*, 1995）のHsp70が小胞子中で発現して花粉の成熟とともに発現が減少するという過去の知見と一致している。トマトでは、*Hsp70*遺伝子の発現は花粉の発達とともに減少するものの、Hsp70タンパク質は成熟花粉に蓄積する（Duck and Folk, 1994）。花粉の発達過程かもしれない成熟花粉において、今回調べた熱ショックタンパク質が何らかの役割を持っているものと予想される。

Hsp70タンパク質は分泌タンパク質の膜を介した輸送に関わっていることが知られている（Chirico *et al.*, 1988; Dashaies *et al.*, 1988; Miernyk *et al.*, 1992）。*SGJ1*、*SGJ3*、*SGK1*は発達過程のタペータム（図10）と胚珠の内珠皮（図11）で発現していることが分かった。また、*SGJ3*と*SGK1*に関しては雄花と雌花の蜜腺でも発現していた。花粉の発達過程において、タペータム層の細胞は小胞子に栄養素やタンパク質を輸送している（Staiger *et al.*, 1994）。珠皮の胚嚢に最も近い細胞層は、胚嚢や胚に栄養素を供給する内珠皮へと分化する（Kapli and Tiwari 1978, Gasser and

Robinson-Beers 1993)。蜜腺は、糖が主体で微量のゴム様物質・タンパク質・芳香性物質・有機酸などを含む花蜜を分泌する。このように、これら三つの組織は全て分泌や輸送に関わっている。雌ずいの柱頭も分泌に関わる組織である (Cresti *et al.*, 1986) が、雌花の発達段階の初期で *SGJ3* と *SGK1* の柱頭での発現を確認している。また、*SGJ3* と *SGK1* は維管束でも発現していることを雄性花序や雌性花序の横断切片で確認した。これは、篩部細胞での代謝産物輸送機能か、形成層での細胞分裂に関わっているものと考えられる。Duckら (1989) は *Hsp70* の発現部位を調べるためにトマトの様々な器官で *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、輸送に関係ある器官でシグナルを検出しているが、カワヤナギの熱ショックタンパク質も同様に物質輸送に関連している可能性もある。

熱ショックタンパク質には、熱により誘導されるものとされないものがあることが知られている。*SGJ1* の発現は熱ストレスによる影響をそれほど受けず、誘導される転写産物の最高レベルも比較的低いことがシュートを用いた実験で明らかになった (図12)。さらに、個体全体を使った実験では熱処理を加えても *SGJ1* の発現は全く誘導されなかった。これに対し、切り取ったシュートを使った実験でも個体全体を使った実験でも *SGJ3* の発現は熱ストレスにより速やかに誘導された。この結果は、*SGJ1* と *SGJ3* で熱ストレス下での働きに違いのあることを示している。また、*SGJ1* と *SGJ3* は全ての器官で発現していることから、共に分子シャペロンとしてハウスキーピング遺伝子としての役割を担っていると考えられる。しかし、*SGJ3* は蜜腺で発現しているが *SGJ1* は発現していないことや、各器官における発現のレベルが異なることから、組織や発達段階において何らかの機能分担があるらしい。このように、細胞質局在型の *DnaJ* ホモログをコードする遺伝子ファミリーにも、それぞれの遺伝子により異なる役割を担っていることが明らかになった。また、ハウスキーピング遺伝子として働く *DnaJ* ホモログや *Hsp70* は物質輸送に関係した組織で発現することも明らかになった。

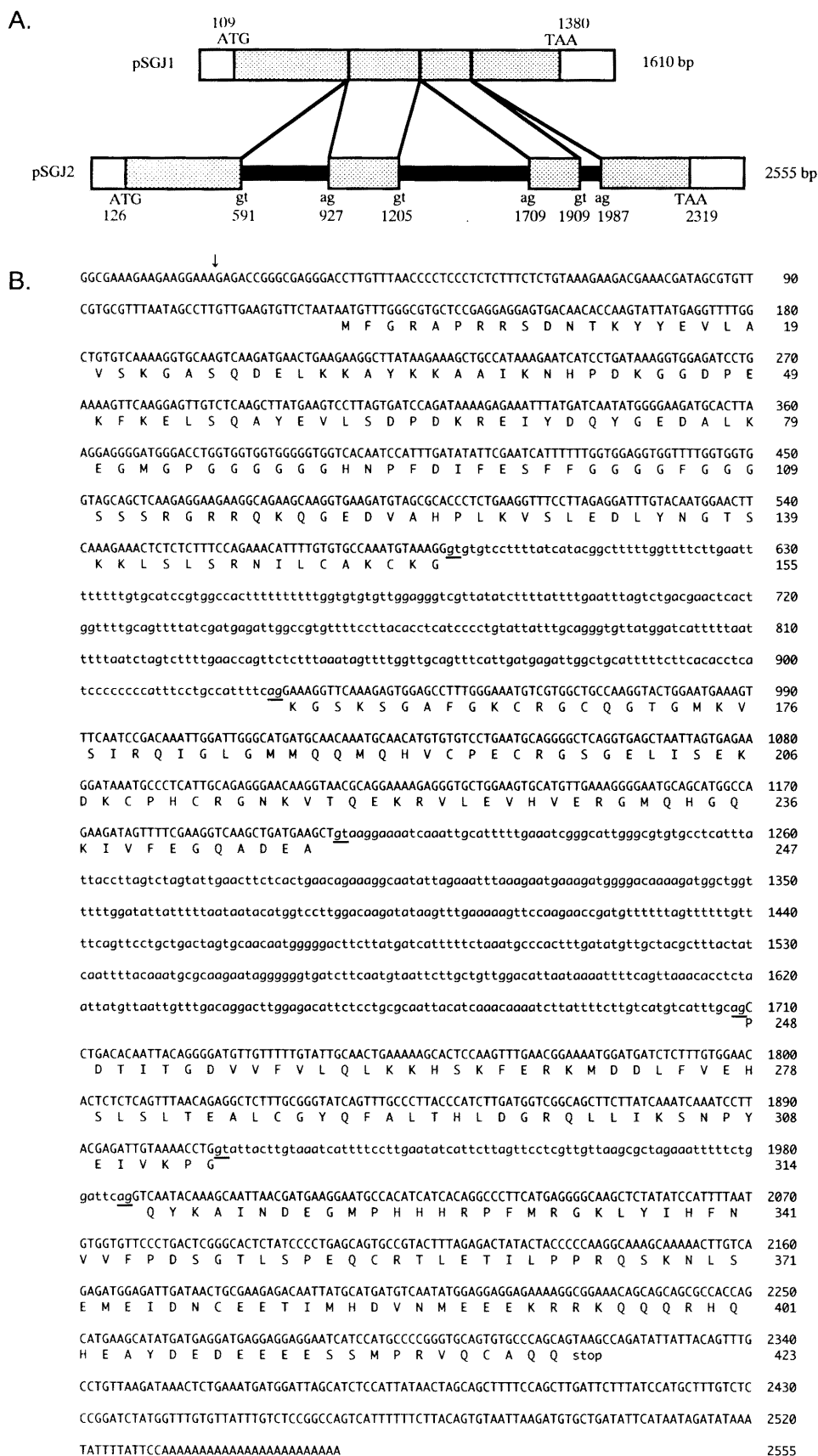


図5 pSGJ1とpSGJ2のcDNAインサートの構造

(A) pSGJ1とpSGJ2のcDNAインサートの構造の概略図。網掛けの部分はSGJ1のコード領域を、黒い太線はイントロン想定される領域を示している。コード領域及びイントロン様配列の最初と最後の塩基の位置を番号で示している。(B) pSGJ2のcDNAインサートの塩基配列及び最長のオープンリーディングフレームから予想されるアミノ酸配列。イントロン様配列は小文字で示している。スプライシングの5'及び3'共通配列に相当する塩基には下線をつけている。pSGJ1のcDNAインサートの開始位置は矢印で示した。pSGJ1のcDNAインサートの塩基配列は、5'上流の17塩基対とイントロン様配列を除いてpSGJ2と同一である。pSGJ1とpSGJ2のcDNAインサートの塩基配列はそれぞれ登録番号AB003137とAB003138でデータベースに記載されている。

SGJ1 1 MFGR-PRRSNTKYVEVLAVSKGASQDELKAYKAAIKNHPDKGGD ---EFKELSQAYEVLSDPKREIYDQYGEDALKEGMGGGGGGGNPFF--DIFESFFGG-GFGGGSSSR 113
 SGJ3 1 MFGR-PKKSNTKYVEVLGVSKASQDELKAYKAAIKNHPDKGGD ---EFKELAQAYEVLSDPKREIYDQYGEDALKEGMGGSGS- GAHDPF--DIFSGFFGGNPFGGGSSR 113
 ANJ1 1 MFGR-PKKSSTRYEILGVPKDASPEDLKAYKAAIKNHPDKGGD ---EFKELAHAYEVLSDPKREIYDQYGEDALKEGMGGGG--GHDPF--DIFSGFFGG-SPFGGVGSSR 111
 CSNAJ1 1 MFRG--PKKSNTKYEILGVSKNASQDDLKAYKAAIKNHPDKGGD ---EFKELAQAYEVLSDPKREIYDQYGEDALKEGMGGGG---GHDPF--DIFSGFFGG-SPFGGGSSSR 109
 ATJ2 1 MFRGRSPRSKNTKPYEILGVPKTAAPEDLKAYKAAIKNHPDKGGD ---EFKELAQAYEVLSDPKREIYDQYGEDALKEGMGGGG---GHDPF--DIFSGFFGS-VGHPFGSHSR 112
 YDJ1 1 -----MVKETKFYDILGVPVTADEIKKAYRKALKYHPDKNPSEAAEFKEASAAYEILSDPEKRIYDQYGEDGLSGAGAGGAGFGPGGFGFGDIFSQFFGA---GG---AQR 106

* * * * *

SGJ1 114 GRROKQGEDVAHPLKVSLEDLYNGTSKKLSLRNII**CAKCKGKGS**SGAFGK**CRGCGT**GMKVSTRIGLGM**QMQHVCPCRC**SGELISEKDK**CPHCRGN**VTQEKRVLEVHVERGMQ 233
 SGJ3 114 GRXQRGQEDVIHPLKVSFEDLYNGTSKKLSLRNVICSKCKGKGSKGASCKAGCGSGGMKVSTRHLGPSMI**QMQHACNE**CKGTGETINDKDRCPQCKGKVVQEKVLVVEVEKGMQ 233
 ANJ1 114 GRROKQGEDVHPLKVSLEDLFTGTTKLSLSRNVICSTCKGKSGASMKSCGCGTGKMSVSTRHLGPSMI**QMQHPCNE**CKGTGETINDKDRCPQCKGKVVQEKVLVVEVEKGMQ 231
 CSNAJ1 110 GRROKQGEDVHPLKVSLEDLYNGTSKKLSLRNVICSKCKGKSGASMKPCGCGSGKMSVSTRHLGPSMI**QMQHPCNE**CKGTGETINDKDRCPQCKGKVVQEKVLVVEVEKGMQ 229
 ATJ2 113 GRROKQGEDVHPLKVSLEDVYLTGTTKLSLSRKALCKCKGKSGKSGALCKCGCGSGMKSTRGFGPMQ**QVQAH**CNDSKGTGETINDRDRCPQCKGKVVSEKKVLVNVVEKGMQ 232
 YDJ1 107 PRGPRQKDKIHEISASLEAYIKYGRATKALNLKQILKCECEGRGKKGAVKCKSCNGG IKFVTRQMP-MIQRFQTECDVCHGTGDIIDPKDRCKSCNGKVENERKILEVHVEPGMK 225

* * * * *

SGJ1 234 HGQKIVFEGQADEAPDVTGDIQVFLQKHHSKFERKMDLLFVHSLSLTEALCGYQFALTHLDGRQLLISKPNYEIVKPGQYKAINDEGMPHHPRFMRGKLYIHFNVPVSGTSLSE 353
 SGJ3 234 NGQKVITFPGEADEAPDVTGDIQVFLQKHHPFKRRKGDDLFEHTLSLTEALCGFQVFLTHLDGRQLLISKPGVEVKPDQFKAINDEGMYPYRPMRGKLYIHFVVEFPDS--LSPD 351
 ANJ1 232 HGQKITFPGEADEAPDVTGDIQVFLQKQHPKRRKGDELFEHTLSLTEALCGFRFVLTHLDGRQLLISKNLGVEVKPDQFKAIDEGMPIYQRPFMKGKMYHFVVEFPDS--LNPD 349
 CSNAJ1 230 NAQKITFPGEADEAPDVTGDIQVFLQKQHPKFKRKGDDLFEHTLSLVEALCGFQFVTHLDGRQLLISKLPGEVVKPDQFKAINDEGMPIYQSPFMKGKLYIHFVVEFPDS--LNPE 347
 ATJ2 233 HNQKITFSGQADEAPDVTGDIQVFLQKQHPKFKRKGDDLFEHTLSLTEALCGFQVFLTHLDGRQLLISKPGVEVKPDYSKASIDEGMPIYQSPFMKGKLYIHFVVEFPDS--LSPD 350
 YDJ1 226 DQQRIVFEGQADQADVPIDGVVFIYSERPHKSKFRKGDDLVEYAEIDLTAIAGGEFALHVSQDWLKVGVPGEVAPGRMPIYEGKGMPYKYG-GYGNLIKFTKFPENHFTSEE 344

* * * * *

SGJ1 354 QCRTELETILPPRQSKNLS-EMEIDNCEETIMHVDVNMEEERKKQQRHQHEAYDED-EEEESMPRVQCAQQ 423
 SGJ3 352 MCKALEAVLPPRPSQSLT-DMELDECEETTLHDVNIEEEMRRKQQQ-QAQEAYDED-DEMPGGAQRVQCAQQ 420
 ANJ1 350 QVKSLEAVLPPRPSQSLT-YMELDECEETTLHDVNIEEEMRRKQTQ-AQAEAYDED-DEPAGG-QRVQCAQQ 417
 CSNAJ1 348 QCKALEGLVPKPTSVQLS-DMELDECEETTLHDVNIEEEMRRKQ---AQEAYDED-EDMHGGAQRVQCAQQ 413
 ATJ2 351 QTKAIEAVLPPRTKAAIS-DMELDDCEETTLHDVNIEEMKRKA-Q-AQREAYDVDEEDHGGAAHRVQCAQQ 419
 YDJ1 345 NLKKLEEILPPRTVPAIPKATVDEC---VLADFPDAPKYNRTRASR--GGANYDSD-EEEQGG-EGVQCASQ 409

* * * * *

SGK1 1:-----
ATHSC70 1:MSGKGEGPAIGIDL GTTYS CVGVWQHDRVEI IANDQGNRTTPSYAFDT SERLIGDAAKNQVAMNPVNTVFD AKRLIGRRFSDSSVQSDM 90
PsHSP71.2 1:MATK-EGKAIGIDL GTTYS CVGVWQNDRVEI IPNDQGNRTTPSYAFDT ERLIGDAAKNQVAMNPQNTVFD AKRLIGRRFSDSVQNDM 89

SGK1 1:-----
ATHSC70 91:KLWPFKIQAGPADKPMIYVEYK GEEKEFAAEEISSMVLKIMREIAEAYLGVTIKNVAVTPAYFND SQRQATKDAGVIA GLNVMRIINEP 180
PsHSP71.2 90:KLWPFKVVPGAEPKPMIYVNYK GEEKFAAEEISSMVLKIMREYAEAF LGQSVKNVAVTPAYFND SQRQATKDAGAI SGLNVLRIINEP 179

SGK1 1:-----NRMVNHVFQEFKRKNKKDISGNPRALRRLR 30
ATHSC70 181:TAAAIAYGLDKKATTVGEKNVL IFDLGGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHVFQEFKRKSKKDITGNPRALRRLR 270
PsHSP71.2 180:TAAAIAYGLDKKASRKEQNVLF DFLGGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFA SEFRKKNKKDISGNARALRRLR 269
***** ** * * * *

SGK1 31:TACERAKRTLSSTAQT TIEIDSLYEGIDFYSTITRARFEEMNDLFRKCMEPVEKCLRD AKMDKSSVHDAVLVGGSGTRIPKVQQLLDQFF 120
ATHSC70 271:TSCERAKRTLSSTAQT TIEIDSLYEGIDFYSTITRARFEELNDLFRKCMEPVEKCLRD AKMDKSTVHDDVLVGGSGTRIPKVQQLLDQFF 360
PsHSP71.2 270:TACERAKRTLSSTAQT TIEIDSLYEGIDFYATITRARFEELNDLFRKCMEPVEKCLRD AKIDKSQVHEVVLVGGSGTRIPKVQQLLDQFF 359
* * * * * *

SGK1 121:NGKELCKSINPDEAVAYGA AVQAAILSGEGNEKVQDLLLLDVTPLSLGLETAGGVMTVIPRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYE 210
ATHSC70 361:NGKELCKSINPDEAVAYGA AVQAAILSGEGNEKVQDLLLLDVTPLSLGLETAGGVMTVIPRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYE 450
PsHSP71.2 360:NGKELCKSINPDEAVAYGA AVQAAILTGEDEKVQDLLLLDVTPLSLGLETAGGVMTVIPRNTTIPTKKEQIFSTYSDNQPGVLIQVFE 449
***** * * * *

SGK1 211:GERTRTRDNNLLGKFELSGIPPA PRGVQPI TVCFDIDANGILNVS AEDKTTGQKNKITITNDKGRLSKEDI EKVMQEA EKYSEDEEHKK 300
ATHSC70 451:GERARTKDNLLGKFELSGIPPA PRGVQPI TVCFDIDANGILNVS AEDKTTGQKNKITITNDKGRLSKEDI EKVMQEA EKYSEDEEHKK 540
PsHSP71.2 450:GERARTKDNLLGKFELTGIPPA PRGVQPVNVCFDIDANGILNVS AEDKTAGVKNKITITNDKGRLSKEEIEKVMQDAE KYKAED EEVK 539
* * * * * *

SGK1 301:KVESKNSL ENYAYNMRTVKDEKISSKL GADKKKIEDAIDQAIQWLSNQLAE ADEFEDKMKLESICNP IIAKMYQGAGADMGG-GM- 388
ATHSC70 541:KVEAKNAL ENYAYNMRTIQDEKIGELPAADKKKIEDSIEQAIQWLEGNQLAE ADEFEDKMKLESICNP IIAKMYQGAGGAGGPAS 630
PsHSP71.2 540:KVEAKNSL ENYAYNMRTIKDDKIGGKLSNDDREKIEKAVEEAIQWLEGNQLGEVEEFEDKQKELGVCNP IIAKMYQG-GAGGDVPMGD 628
* * * * * *

SGK1 389:E-DDAPPSGSGGAGPKIEEVD 408
ATHSC70 631:GMDDAPPASGGAGPKIEEVD 651
PsHSP71.2 629:GMPGGGSGNGS-GPGPKIEEVD 648
* * * * *

図6 SGJ1, SGJ3及びSGK1の予想されるアミノ酸配列と既知のタンパク質との比較

(A) pSGJ1及びpSGJ3のcDNAインサートの塩基配列から予想されるアミノ酸と真核生物の細胞質局在型DnaJホモログとの比較。ANJ1, CSDNAJ1, AJJ2, YDJ1はそれぞれ *Atriplex nummularia* (Zhu *et al.*, 1993b), *Cucumis sativus* (Preisig-Müller and Kindl, 1993), *Arabidopsis thaliana* (Zhou *et al.*, 1995), *Saccharomyces cerevisiae* (Caplan and Douglas, 1991; Atencio and Yaffe 1992) のDnaJホモログである。DnaホモログのJ-ドメイン及びG/Fリッチ領域を矢印で示している。4つのC-X-X-C-X-G-X(G)配列とイソプレニル化のシグナル配列であることが予想されるVQCAQQには、それぞれ実線と破線でアンダラインを引いてある。(B) pSGK1のcDNAインサートの塩基配列から予想されるアミノ酸配列と植物の細胞質局在型Hsp70との比較。ATHSC70, PsHSP71.2はそれぞれ *Arabidopsis thaliana* (Wu *et al.*, 1994), *Pisum sativum* (DeRocher *et al.*, 1995)のHsp70。

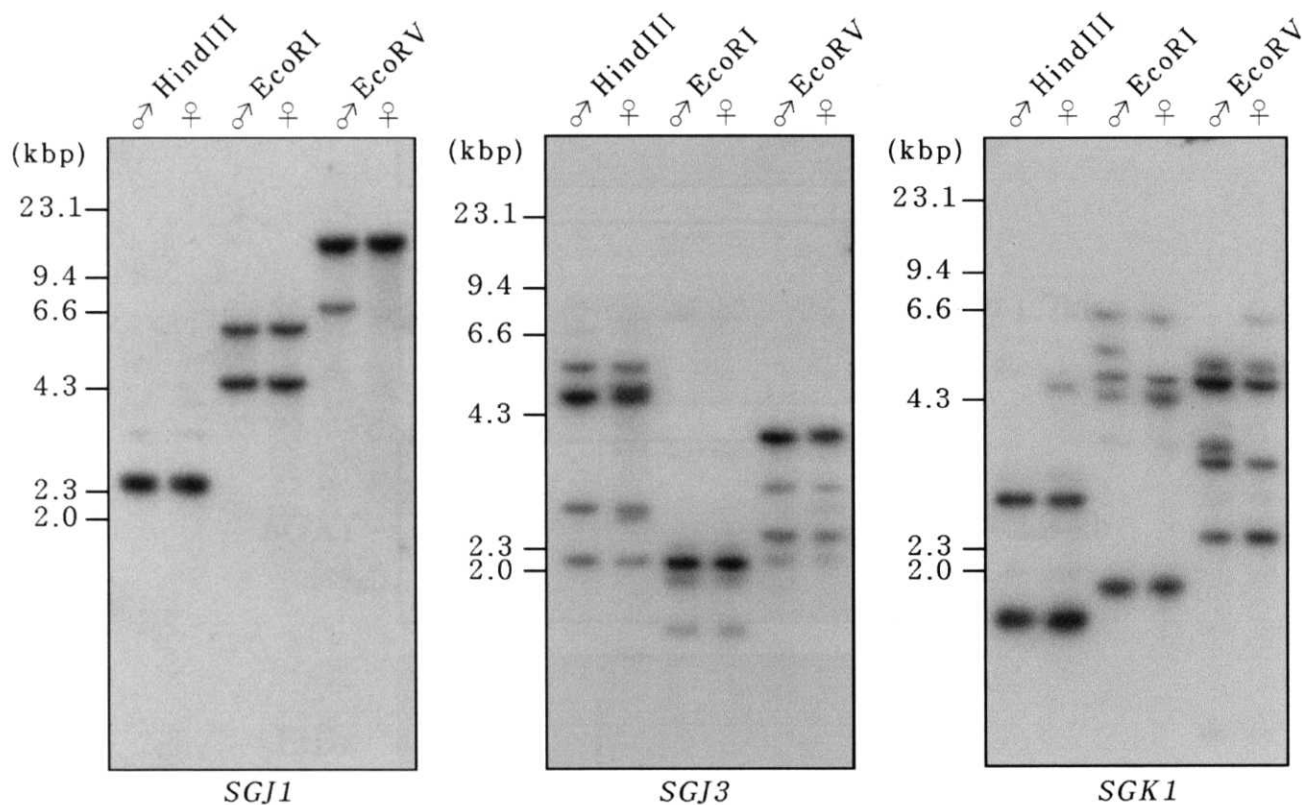


図7 SGJ1, SGJ3及びSGK1遺伝子のDNAゲルブロット解析

カワヤナギの雄性個体と雌性個体から調整したゲノムDNA (0.9 μ g) を *Hind*III, *Eco*RI及び*Eco*RVで別々に制限酵素処理して, 0.7% アガロースゲルで電気泳動した後, ナイロン膜に転写した。 32 Pで標識した pSGJ1, pSGJ2, pSGK1のcDNAインサートをプローブとして用いた。左側にサイズマーカーの位置を示した。

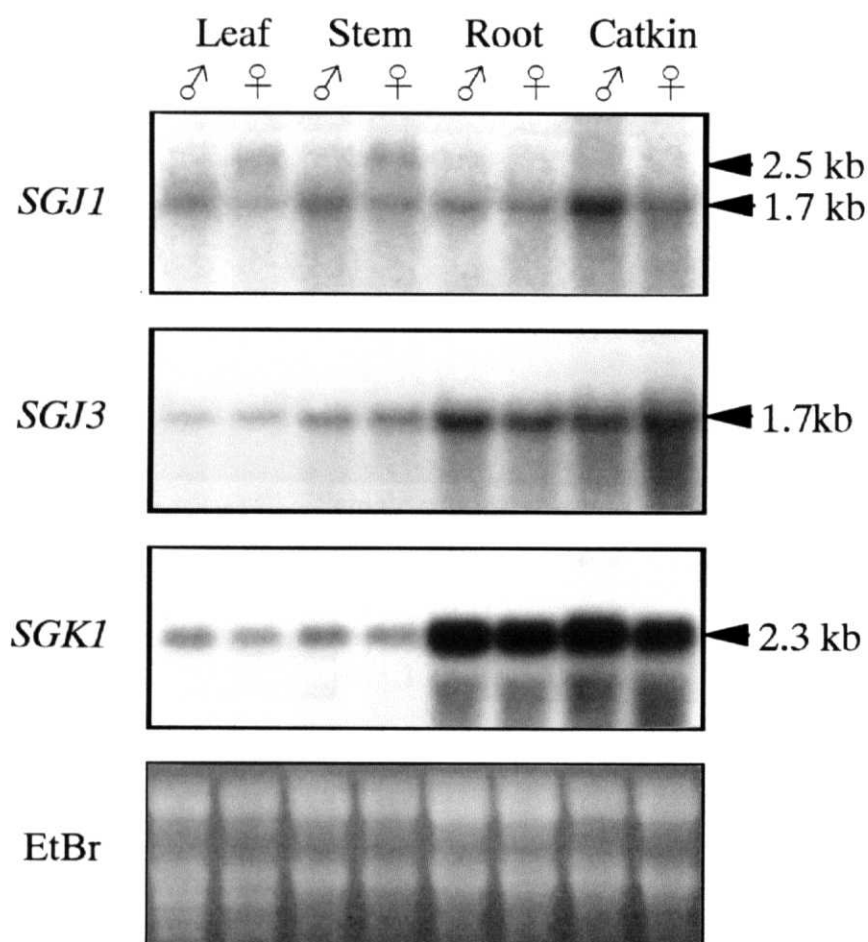


図8 カワヤナギの各器官における *SGJ1*, *SGJ3* 及び *SGK1* 遺伝子の発現

カワヤナギ雄性個体と雌性個体の葉・若い茎・根・花序から RNA を抽出した。雄性花序と雌性花序は発達段階のステージ IV 及び V に相当する。10 μ g の全 RNA をホルムアルデヒドを含む 1.0% アガロースゲルで電気泳動した。臭化エチジウム (EtBr) で染色することにより RNA のバンドを検出した。³²P で標識した pSGJ1, pSGJ2, pSGK1 の cDNA インサートをプローブとして用いた。酵母の 28S・18S rRNA と大腸菌の 23S・16S rRNA の移動度から推定した *SGJ1*, *SGJ3*, *SGK1* mRNA のサイズを右側に示した。

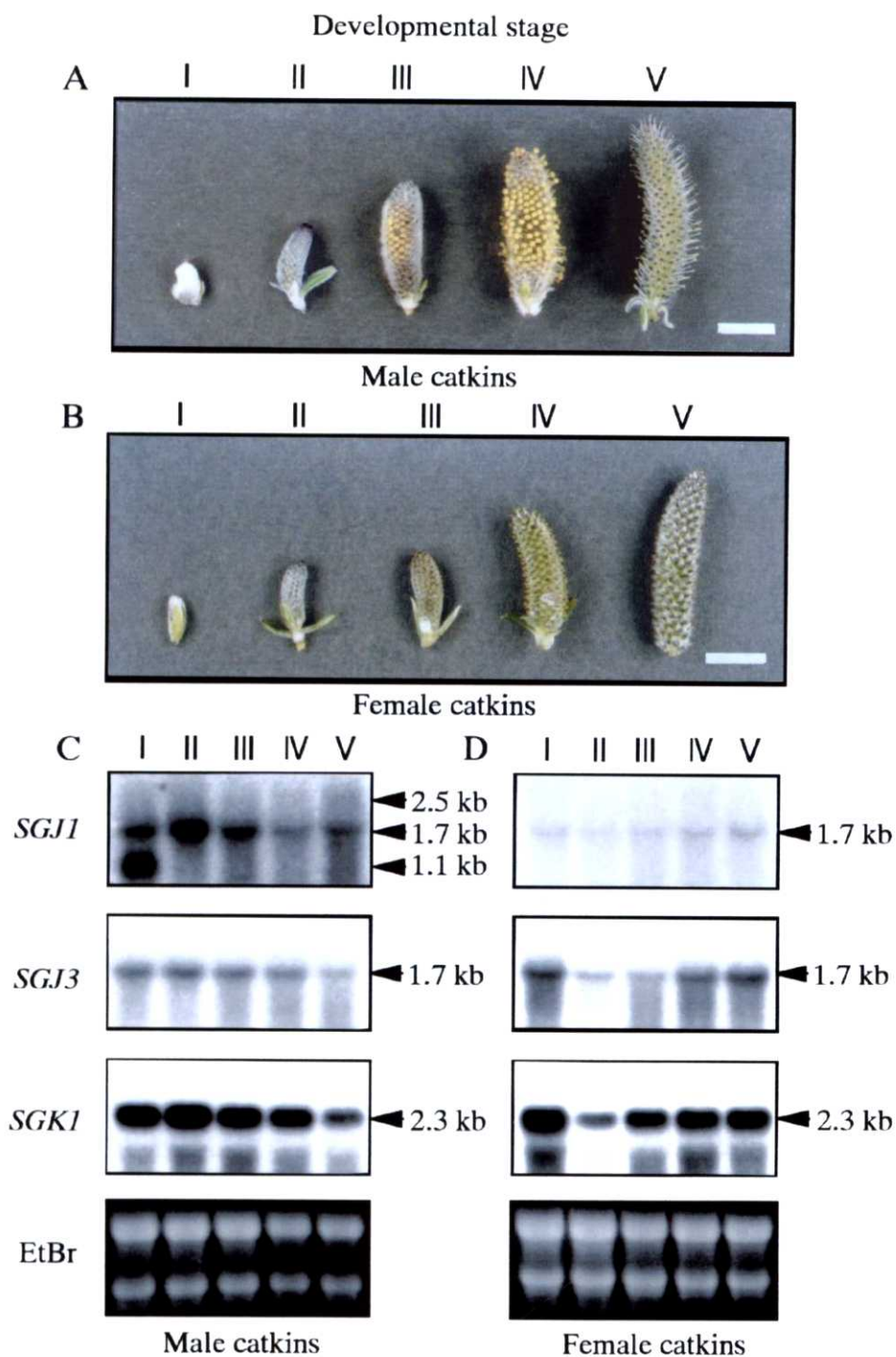


図9 雄花と雌花の発達過程における *SGJ1*, *SGJ3* 及び *SGK1* の発現

(A) 雄性花序の発達。(B) 雌性花序の発達。雄花と雌花の発達過程は花序のサイズによって5つのステージに分類した。(雄性花序, ステージI, 0.5-1 cm; ステージII, 1-2 cm; ステージIII, 2-2.5 cm; ステージIV, 2.5-3 cm; ステージV, > 3 cm; 雌性花序, ステージI, 0.5-1 cm; ステージII, 1-1.5 cm; ステージIII, 1.5-2 cm; ステージIV, 2-2.5 cm; ステージV, > 2.5 cm)。バーは1 cm。ステージIIIで、雄ずいと雌ずいの一部が、それぞれ雄性花序と雌性花序の表面に露出した。ステージIVで、完全に開花した。ステージVでは、花にセネッセンスが見られた。(C) 雄性花序の発達過程における *SGJ1*, *SGJ3*, *SGK1* の転写産物量の変化。(D) 雌性花序の発達過程における *SGJ1*, *SGJ3*, *SGK1* の転写産物量の変化。各発達段階の雄性花序と雌性花序からRNAを抽出し、RNAゲルプロットを行った。

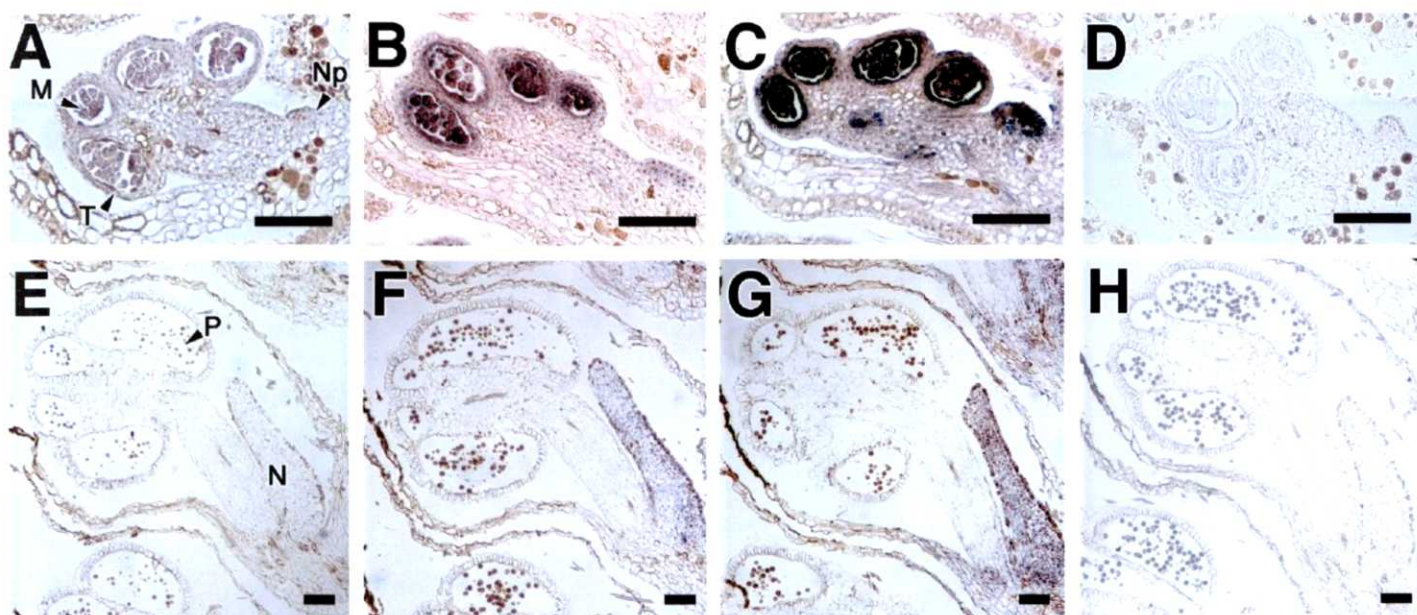


図 10 雄花の発達過程における *SGJ1*、*SGJ3* 及び *SGK1* の転写産物の発現部位

ジゴキシゲニンで標識した RNA プローブを縦断面切片に用いた。(A)、(B) 及び (C) *SGJ1*、*SGJ3*、*SGK1* に対応するアンチセンス RNA プローブを用いたときの雌花ステージ I の切片。(E)、(F) 及び (G) *SGJ1*、*SGJ3*、*SGK1* に対応するアンチセンス RNA プローブを用いたときの雄花ステージ III の切片。(D) 及び (H) *SGJ3* に対応するセンス RNA プローブを用いたときの雄花ステージ I 及び III の切片。N、蜜腺；Np、蜜腺原基；M、小孢子；P、花粉；T、タペータム。バーは 100 μ m。

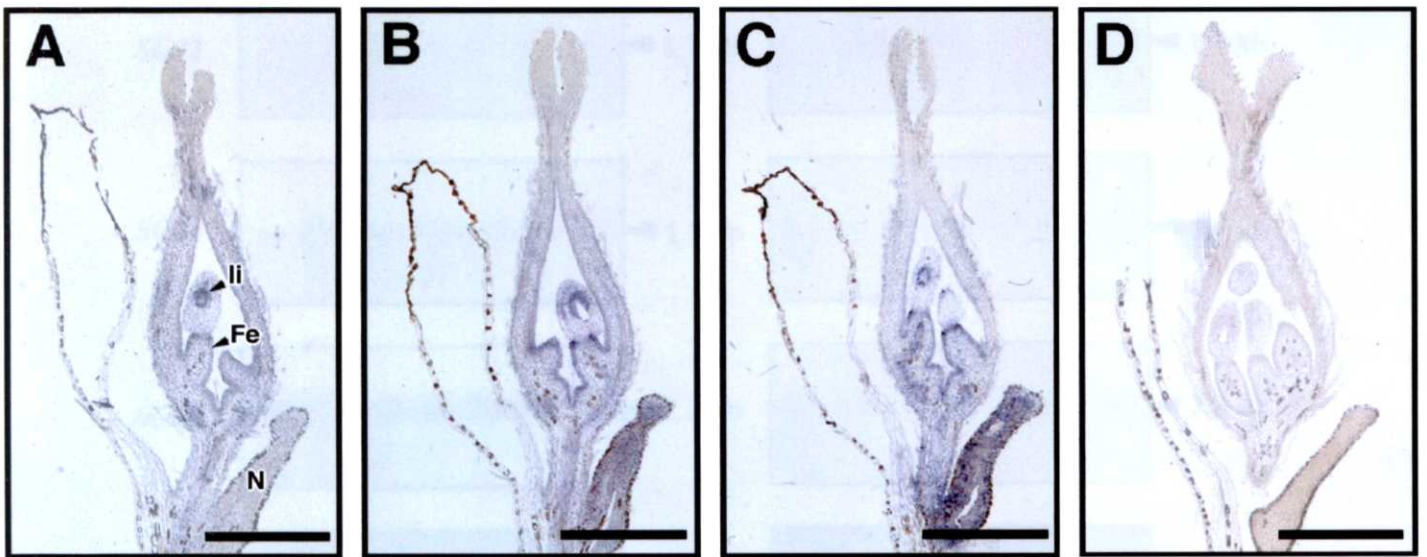


図 11 成熟した雌花における *SGJ1*, *SGJ3* 及び *SGK1* の転写産物の発現部位

ジゴキシゲニンで標識した RNA プローブを縦断面切片に用いた。(A), (B) 及び (C) *SGJ1*, *SGJ3*, *SGK1* に対応するアンチセンス RNA プローブを用いたときの雌花ステージ III の切片。(D) *SGJ3* に対応するセンス RNA プローブを用いたときの雌花ステージ III の切片。Fe, 珠柄表層; li, 内珠皮; N, 蜜腺。バーは 500 μ m。

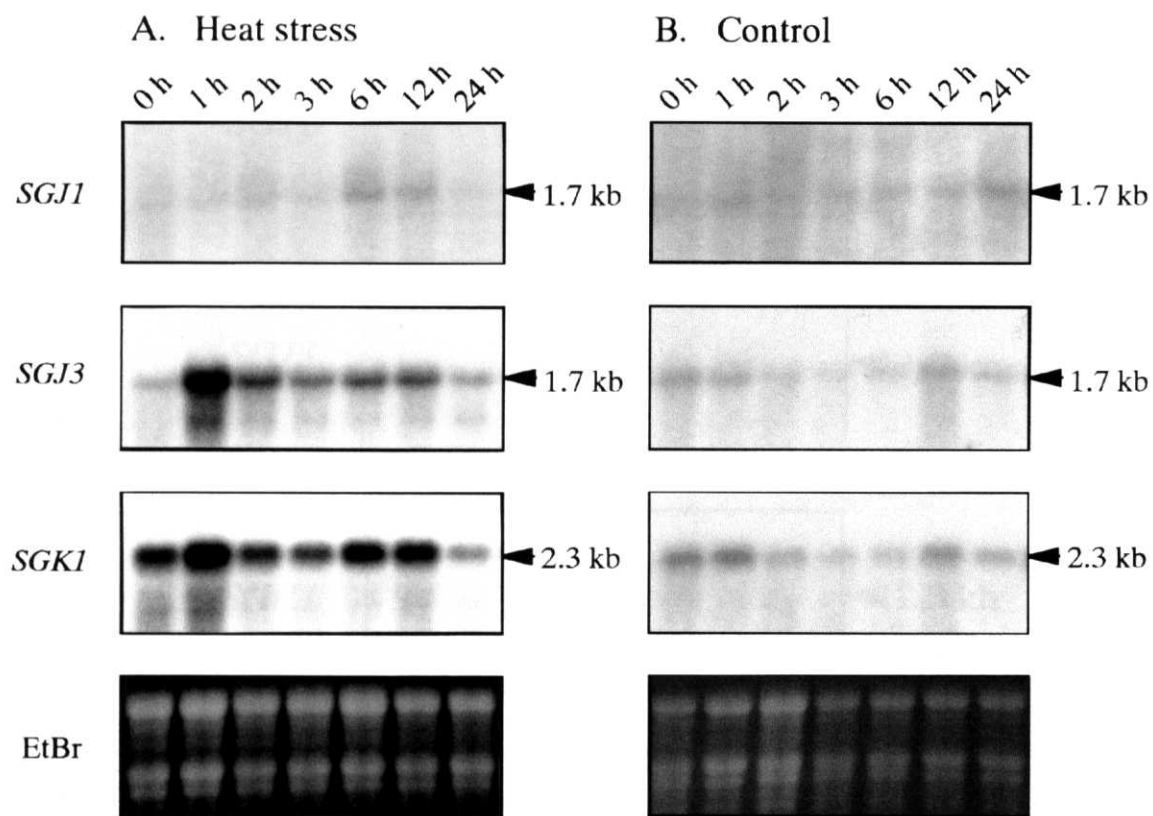


図 12 熱ストレスによる *SGJ1*, *SGJ3* 及び *SGK1* の発現の誘導

(A) 熱ストレスによる *SGJ1*, *SGJ3*, *SGK1* mRNA の誘導。(B) コントロールの葉における *SGJ1*, *SGJ3*, *SGK1* mRNA の変化。雄性個体からシュートを切り取り、40℃の熱ストレスをかけるか或いは25℃に移したときの葉から RNA を抽出した。熱ストレス処理とコントロール実験の開始後の時間を示している。

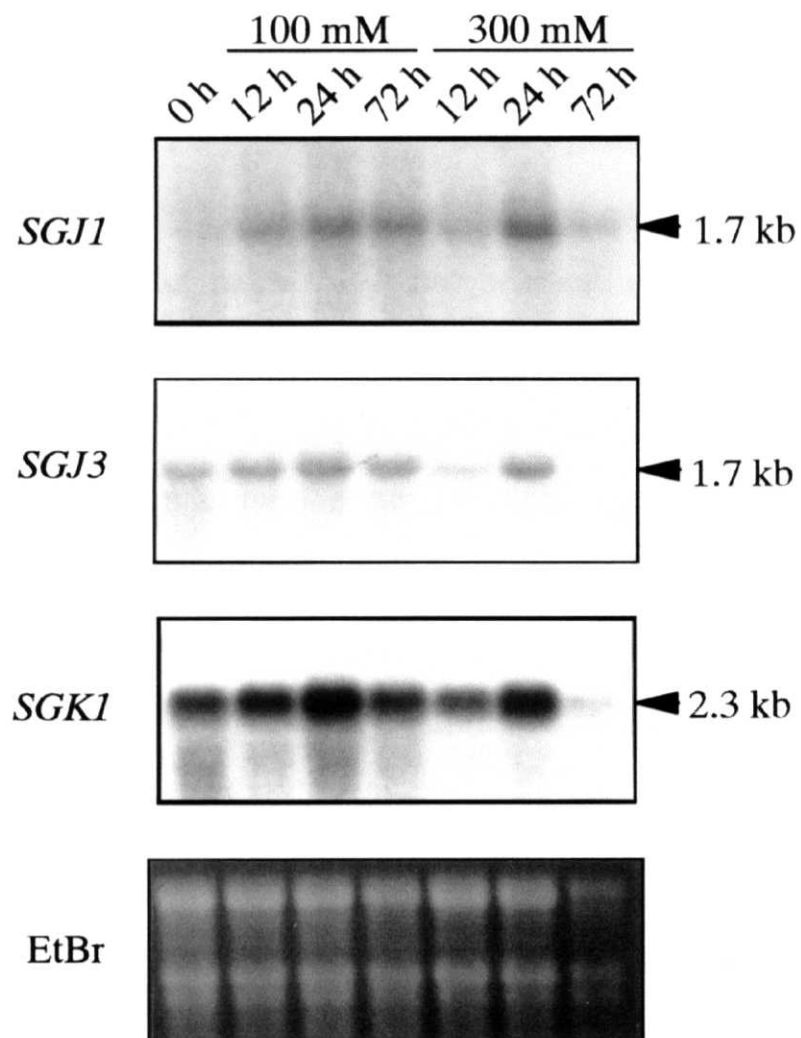


図 13 NaClストレスによる *SGJ1*、*SGJ3*及び *SGK1* の発現の誘導

雄性個体からシュートを切り取り、100 mM もしくは 300 mM の NaCl ストレスをかけたときの葉から RNA を抽出した。NaCl ストレス処理開始後の時間を示している。

第4章 ヤナギ属植物の雄性花序cDNAライブラリーの作製と雄花特異的に発現する遺伝子群の探索

4-1 はじめに

雌雄性はヤナギ科植物を特徴づける顕著な形質である。高等植物において、雌雄異花異株の植物種はわずか6%に過ぎない (Renner and Ricklefs, 1995)。雌雄異株植物のなかで最もよく研究されているのは、ナデシコ科のメランドリウム (*Silene latifolia* = *Melandrium album*) であるが、性決定に関わる分子的メカニズムの解明までにはいたっていない (Hardenack *et al.*, 1994; Matsunaga *et al.*, 1996; Barbacar *et al.*, 1997; Label-Hardenack *et al.*, 1997; Scutt *et al.*, 1997)。

ヤナギ属植物の性差に関しては、花蜜の糖組成の違い (Percival, 1961; 郷右近ら, 1976; Katoh *et al.*, 1985) や花蜜の量の違い (Kay, 1985)、二次代謝産物の違い (Palo, 1984; Boecklen *et al.*, 1990)、水利用効率の違い (Dawson and Bliss, 1989) が報告されている。成長に関しては、雌雄間で差が見られない (*S. cinerea*: Alliende and Harper, 1989; *S. myrsinifolia-phylicifolia*: Danell *et al.*, 1991) という知見と、水分条件によってどちらが良いかは異なる (*S. arctica*: Dawson and Bliss, 1989) という知見がある。ヤナギ属植物の雌雄の分化を決定する遺伝的要素は未解明で、雌雄性に関する分子生物学的なアプローチはまったくなされていない。

本章では、ヤナギ属植物の雌雄性に関する分子生物学的解析の第一段階として、雄花で特異的に発現する遺伝子を単離することを目的とした。そのために、バッコヤナギ (*Salix bakko* Kimura) の雄性花序のmRNAを用いてcDNAライブラリーを作成し、cDNAクローンの塩基配列を解析した。ランダムに選抜した42個のcDNAクローンのうち17個は、植物由来のタンパク質のアミノ酸配列と相同性があった。主なものは、 β -1,3-グルカナーゼ、ペクチンエステラーゼ、ペクテートリアーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、ATP:ピルビン酸-2-O-リン酸転移酵素、ADP-リボシル化因子、翻訳開始因子、ポリペプチド鎖延長因子、dTDP-グルコース-4,6-デヒドラターゼ、膜透過酵素、GAST1、プロテインホスファターゼ、プロテインキナーゼ、late embryogenesis-abundant protein等であった。このうちの最初の4つは過去の文献で葯や花粉に特異的に発現するとの報告があった。また、ADP-リボシル化因子と翻訳開始因子に対するcDNAクローンは、開始コドンを含む全アミノ酸配

列の情報を保持していたので、全塩基配列を決定した。しかし、ADP-リボシル化因子と翻訳開始因子の遺伝子は調べたすべての器官で発現していた。

4-2 材料及び方法

材料

雄性個体と雌性個体の花序は、森林総合研究所の樹木園に植栽されているバッコヤナギより2月から3月にかけて昼頃採取した。カワヤナギの花序についても同時期に森林総合研究所の苗畑に植栽した個体から採取した。3章に示した方法で挿し穂から4週間生育させ、シュートの高さが約15cmとなった稚樹から葉・茎・根を取り分け、 -80°C で保存した。成木から得た花序も解析するまで -80°C で保存した。

クローンの単離と精製

Okayama and Berg (1981) の変法によってcDNAライブラリーを作成した (Mori *et al.*, 1991) 。*Pst* Iで切断したpBluescript SK-の両端にterminal transferaseを用いて約30から80塩基のpoly Tを付加し、*Bam* H Iにより一方のpoly Tを取り除いたものをベクターとして用いた。バッコヤナギの雄性個体の花序から抽出したpoly(A)⁺ RNA 5 μg をベクターにアニーリングし、逆転写酵素、RNA分解酵素、DNAポリメラーゼ、リガーゼを順に使用して環状DNAとしたものをcDNAライブラリーとした。このcDNAライブラリーを大腸菌JM109に導入し、増幅させた。単一のコロニーがとれる程度の密度になるようにプレート上に展開し、550個のコロニーからプラスミドDNAを得た。

cDNA塩基配列の解析

プラスミドDNAを*Sac* Iと*Kpn* Iで制限酵素処理し、インサート配列を切り出した後、アガロースゲル中で電気泳動し、インサートの長さを確認した。550クローンのうち、約700塩基対以上のインサート配列を有するクローンは42個あった。選抜した42個のcDNAインサートの+鎖の塩基配列約350塩基対をジデオキシチェーンターミネーター法により決定した。pSbARF1とpSbSUI1に関しては、インサート配列全長について+鎖と-鎖の両方を解析した。塩基配列読みとりのためのPCR反応にはサイクルシーケンスキット (Applied Biosystems) を用い、電気泳動とデータの取得には自動DNAシーケンサー (ABI PRISM 377, Applied Biosystems) を用いた。DNA配列の解

析はGENETYXソフトウェア（ソフトウェア開発）によって行った。相同性の検索にはBLASTを用いた。

RNAとDNAの調製

3章で示した方法でRNAとDNAの調製を行なった。

DNA・RNAゲルブロット

3章で示した方法でDNA及びRNAゲルブロット行なった。

4-3 結果

cDNAクローンの単離、塩基配列の解析と相同性の検索

バッコヤナギの雄性花序由来のcDNAライブラリーから550個のcDNAクローンをランダムに選抜し、DNAを抽出した。このうち、約700塩基対以上のインサート配列を有するクローン42個について、cDNAインサートの5'末端側から300から400塩基対について塩基配列を解析した。これらのcDNAクローンの塩基配列と予想されるアミノ酸配列について、データベース中に相同性を示すものがあるか検索した（表5）。塩基配列と核酸データベースとの比較にはBLASTN、予想されるアミノ酸配列とタンパク質データベースとの比較にはBLASTXを用いた。42個のcDNAクローンのうち、14個は既知の配列との相同性が認められなかった。残る28クローンのうち、発現部位や機能に関して報告のある遺伝子と相同性を示したのは21クローンあった。このうち4つのcDNAクローンは、ホタテガイ、スルメイカ、黄色ブドウ状球菌、酵母の遺伝子と相同性があり、17クローンは植物由来の遺伝子と相同性があった。

既知の遺伝子と相同性を示したcDNAの大部分は5'末端に非翻訳領域を含まず、予想されるアミノ酸配列のN端がメチオニンではなかった。この結果は、アミノ酸配列の全長をカバーしていないcDNA断片をインサートとして保有していることを示している。アミノ酸配列の全長をカバーしていたcDNAクローンは、トウモロコシのADP-リボシル化因子（ARF）と相同性のあるpSbARF1（ストック番号 I-74）と、シロイヌナズナの翻訳開始因子と相同性のあるpSbSUI1（ストック番号 N-83）の2つであった。この2つのcDNAクローンに関しては、インサート配列全長の塩基配列を決定し、発現の器官特異性について解析した。

SbARF1 遺伝子の構造と発現の特徴

pSbARF1は867塩基対のインサートを持ち、最長のオープンリーディングフレームは181アミノ酸をコードしていた。SbARF1はシロイヌナズナ（Regad *et al.*, 1993）、ヒト（Bobak *et al.*, 1989）、ショウジョウバエ（Murtagh *et al.*, 1993）、酵母（Sewell and Kahn, 1988）のARF1タンパク質のアミノ酸配列とそれぞれ約96.7%、87.8%、86.7%、76.8%相同であった（図14）。ARFはGTP結合タ

ンパク質であり、GTPの結合に関与する3つの保存領域がある (Kazirot *et al.*, 1991)。SbARF1はこの3つの領域 (P領域, G'領域, G領域) を有している。さらに、他のARFにも保存されているミリスチル化されるグリシン残基が2番目に存在する。他のARFとの高い相同性と保存領域の存在から、SbARF1はバッコヤナギのARFであるといえる。また、UPGMA法 (Kumar *et al.*, 1994) で系統樹を作成することにより、ARFとARF類似タンパク質 (ARL) を明確に区別することができた (図15)。この系統樹からも、SbARF1がARLではなくARFに分類されることが確認できた。

バッコヤナギとカワヤナギのゲノム中における*SbARF1* 遺伝子のコピー数をDNAゲルプロットにより推定した (図16)。バンドが複数見られることから、ヒト・ショウジョウバエ・酵母・シロイヌナズナといった生物と同じく*SbARF1*は多重遺伝子族を形成しているものと考えられる (図15参照)。図17ではカワヤナギの様々な器官から抽出した全RNAを用いてRNAゲルプロットによる解析を行った結果を示している。バッコヤナギではなくカワヤナギを用いたのは、挿し穂からの生育が容易なうえに、純度の高い核酸を抽出することができるためである。*SbARF1* 遺伝子は全ての器官で高いレベルの発現を示した。とりわけ雄性花序では、葉・茎・根・雌性花序よりも発現レベルが高かった。*SbARF1* mRNAの長さは、pSbARF1のcDNAインサートにほぼ対応する約900塩基対であった。この結果は、*SbARF1*はあらゆる器官で細胞の生命活動に必須な機能を果たすハウスキーパー遺伝子であるが、雄花もしくは花粉の発達過程においては何らかの重要な役割を果たしている可能性があることを示唆している (Futamura *et al.*, 1998b)。

SbSUI1 遺伝子の構造と発現の特徴

pSbSUI1は764塩基対のインサートを持ち、最長のオープンリーディングフレームは113アミノ酸をコードしていた。SbSUI1は酵母のSUI1 (Yoon and Donahue, 1992) と85.8%, イネ (de Pater *et al.*, 1992) ・シロイヌナズナ (Berthomieu *et al.*, 1995) ・ヒト (Fields and Adams, 1994) ・カ

(Besansky *et al.*, 1994) のSUI1ホモログとそれぞれ90.2%, 85.8%, 56.6%, 50.4%の相同性を示した (図18)。酵母の*sui1*突然変異遺伝子の解析から、SUI1タンパク質のうち83番目のアミノ酸アスパラギン酸と84番目のグルタミンはSUI1の機能に必須であることが示されている (Yoon and Donahue, 1992)。この2つのアミノ酸残基はSbSUI1を含む5つのSUI1ホモログ全てで保存されてい

た。以上のことから、SbSUI1はバッコヤナギの翻訳開始因子SUI1ホモログであるといえる。

図19にバッコヤナギとカワヤナギのゲノムDNAを用いたDNAゲルブロットの結果を示した。3本から9本のバンドが検出されることから、*SbSUI1*も多重遺伝子族を形成しているものと考えられる。カワヤナギの各器官から抽出した全RNAを用いてRNAゲルブロットを行った結果、SbSUI1は全ての器官において高いレベルで発現することが明らかになった（図20）。この結果は、*SbSUI1*があらゆる器官で細胞の生命活動に必須な機能を果たすハウスキーピング遺伝子であることを示している。

4-4 考察

本章では、雌雄異株植物であるバッコヤナギの雄性花序由来のcDNAライブラリーから単離したcDNAクローンの塩基配列を解析し、既知の遺伝子との相同性を調べた。雄ずいの発達の過程では、雄性配偶子形成の各段階に特異的な遺伝子が発現している (Goldberg, 1988; Mascarenhas, 1989; McCormick, 1991; Scott *et al.*, 1991)。現在までに、小孢子形成 (Roberts *et al.*, 1991; Tsuchiya *et al.*, 1992), 減数分裂 (Appels *et al.*, 1982; Bouchard, 1990), 成熟花粉 (Hanson *et al.*, 1989; Wing *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1990; Albani *et al.*, 1991; Baltz *et al.*, 1992; Albani *et al.*, 1992), タペータム (Koltunow *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990; Paul *et al.*, 1992; Nacken *et al.*, 1992) に特異的な遺伝子が単離され、解析されている。バッコヤナギの雄性花序の発達にも、雄性配偶子形成に関わる様々な遺伝子が関与しているはずである。本章で塩基配列を解析したcDNAクローンのなかには、花粉や葯に特異的に発現しているとの報告があるポリガラクトツロナーゼ, ペクチンメチルエステラーゼ, ペクテートリアーゼ, β -1,3-グルカナーゼと相同性のあるものがあった。これらの遺伝子については、全長のcDNAをカワヤナギの雄性花序由来のcDNAライブラリーから新たに単離し、5章及び6章において発現特性を詳細に解析した。

雄性花序で発現している遺伝子のなかには、雄性配偶子形成など雄花の機能に関係する遺伝子の他に、細胞が生命活動するために必要な遺伝子も含まれる。どの細胞でも常に恒常的に発現し、DNA複製、細胞分裂、細胞のエネルギー代謝、物質代謝など細胞の基本的機能を支える多数の遺伝子は、ハウスキーピング遺伝子といわれる。本章で単離したcDNAクローンのなかには、ハウスキーピング遺伝子をコードするものが多く含まれていた。このうち、ADPリボシル化因子と翻訳開始因子をコードするものについては、全長の塩基配列を解読し、それらの発現特性を解析した。ADPリボシル化因子遺伝子 (*SbARF1*) と翻訳開始因子遺伝子 (*SbSUI1*) は生物種を越えてよく保存されていることから、分子進化の速度が遅い機能的に重要な分子であると考えられる。RNAゲルプロットの結果から、どちらの遺伝子も全ての器官で発現するものの、*SbARF1* は雄性花序で多く発現することが明らかになった。この結果は、*SbARF1* が雄花もしくは花粉の発達過程で何らかの役割を果たすことを示唆するものであり、植物で初めての知見である。一方、*SbSUI1* は

全ての器官でほぼ同程度のきわめて高い発現を示した。これは、異なる器官のRNAの量を比較するうえで、pSbSUI1のcDNAインサートは良い指標となることを示す。分子生物学的な知見の少ない林木では、これはポジティブコントロールとして使える数少ないプローブである。

本章で解析した42のcDNAクローンのうち、機能や発現特性が解析されている遺伝子と相同性を示したものは半数に過ぎなかった。本章で解析できなかった機能未知のcDNAクローンのうち、ヤナギの雄性花序の発達に関与するものがあるかどうかは今後の検討課題である。

表5 データベースの配列と相同性を示したバコヤナギ雄性花序由来のcDNAクローン

Stock #	BLASTX search (nucleotide sequence vs. protein database)						BLASTN search (nucleotide sequence vs. nucleotide database)				
	Putative identification	Organism	ID	Similar	Overlap	Score	Putative identification	Organism	ID	Overlap	Score
RO-10	membrane protein	<i>Saccharum sp.</i>	39	51	65	230					
NI-26	40S ribosomal protein S12	<i>Fragaria Ananassa</i>	95	97	97	506					
G-36							clone FAI29	<i>Arabidopsis thaliana</i>	146	202	508
H-11							cDNA clone 110C22T7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	140	192	494
H-99	style development-specific protein 9612	<i>Lycopersicon esculentum</i>	68	73	77	393					
I-74	ADP-ribosylation factor	<i>Zea mays</i>	80	82	86	442	clone FAFN06	<i>Arabidopsis thaliana</i>	220	281	864
N-93	putative dTDP-glucose 4-6-dehydratases	<i>Arabidopsis thaliana</i>	99	103	104	547					
N-3	calmodulin	<i>Patinopecten sp. *</i>	36	54	83	188	cDNA clone 131P20T7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	162	240	508
N-11	permease 1	<i>Zea mays</i>	32	46	63	172	partial sequence (R3385_1A)	<i>Oryza sativa</i>	63	91	203
N-32							spacer region between 25S and 18S rRNA genes	<i>Nicotiana sylvestris</i>	234	270	1054
N-40							cDNA clone pcrs854	<i>Ricinus communis</i>	104	118	464
N-83	protein translation factor SUI1 homolog	<i>Arabidopsis thaliana</i>	61	66	73	327	partial sequence (C1570_1A)	<i>Oryza sativa</i>	121	152	485
O-82	GAST1 protein precursor	<i>Lycopersicon esculentum</i>	32	41	59	187	cDNA clone pcrs133	<i>Ricinus communis</i>	149	199	549
P-10							cDNA clone 118C8T7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	230	370	604
P-17	protein phosphatase 2C	<i>Arabidopsis thaliana</i>	49	59	67	263	clone FAI254	<i>Arabidopsis thaliana</i>	138	221	358
P-43	rhodopsin	<i>Todarodes pacificus *</i>	26	27	28	162	EST F0350	<i>Brassica campestris</i>	59	81	207
P-86	polygalacturonase	<i>Gossypium barbadense</i>	55	83	119	314	polygalacturonase	<i>Gossypium hirsutum</i>	211	339	543
T-3							cDNA clone 113K17T7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	114	158	396
T-94	elongation factor 1-alpha	<i>Nicotiana tabacum</i>	41	41	41	201	elongation factor 1 alpha	<i>Lycopersicon esculentum</i>	112	128	496
V-23							cDNA clone 158O18T7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	86	131	260
V-43	ATP:pyruvate phosphotransferase	<i>Ricinus communis</i>	55	57	58	303					
V-65	21 KD membrane protein precursor	<i>Daucus carota</i>	28	44	66	129					
W-53	Cap1 protein	<i>Staphylococcus aureus *</i>	20	28	40	104	clone VBVA03	<i>Arabidopsis thaliana</i>	106	131	430
X-17	endo-beta-1,3-glucanase A6 precursor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	40	61	82	207					
X-18	late embryogenesis abundant protein 76	<i>Brassica napus</i>	21	25	30	109					
T-91	putative pectinesterase	<i>Medicago sativa</i>	48	62	86	227					
X-34	probable ATP-dependent transportor YFL028C	<i>Saccharomyces cerevisiae *</i>	19	29	34	105	clone VBV23-30792	<i>Arabidopsis thaliana</i>	178	250	604
K-72	NP1 gene	<i>Nicotiana sp.</i>	30	40	52	151	TFIIi-associated transactivator factor p17 mRNA	<i>Mus musculus *</i>	99	164	235

Blastx (cDNAの塩基配列から予想されるアミノ酸配列をタンパク質データベースと比較) についてはスコアが100以上のもの、Blastn (cDNAの塩基配列を核酸データベースと比較) についてはスコアが200以上のものについて示した。BlastxとBlastnの結果が同じであったものは、Blastxの結果のみを示した。Overlap・ID・Similarは、相同性を示した配列全体の長さ (Overlap) のうちの一致した数 (ID) と相同性を示した数 (Similar) を表す。ただし、Blastxはアミノ酸の数、Blastnは塩基の数である。データベース中で最も相同性の高かったものの名前 (putative identification) と由来する生物種名 (Organism) を示した。植物ではない生物種にはアスタリスクをつけた。14クローン (H-90, P-64, H-1, N-27, N-70, N-98, R-44, S-10, S-40, Q-100, W-4, W-52, W-65, X-42) については既知の配列との相同性が認められなかった。

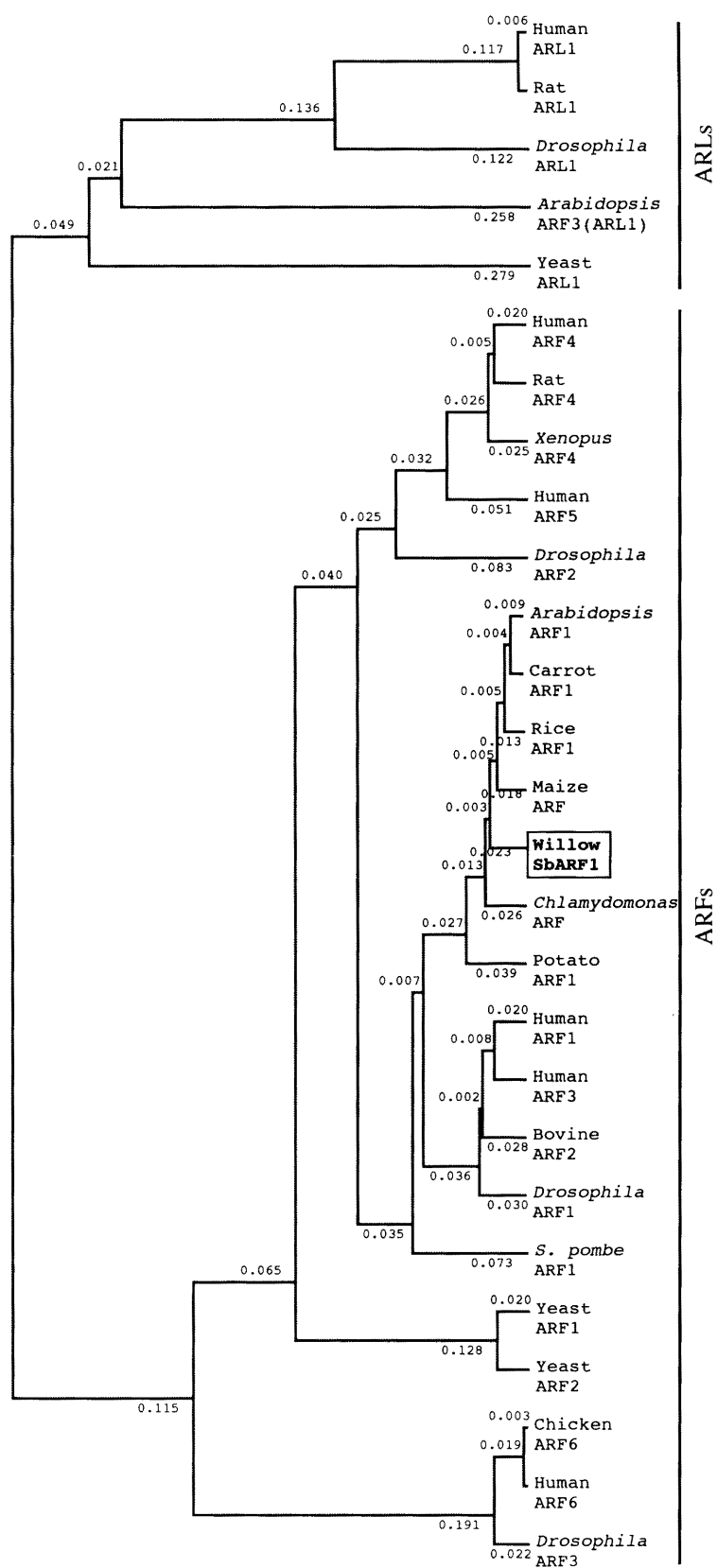


図15 ARFとARF類似タンパク質の系統樹

系統樹はGENETYXソフトウェア（ソフトウェア開発）のUPGMA法によって作成した。

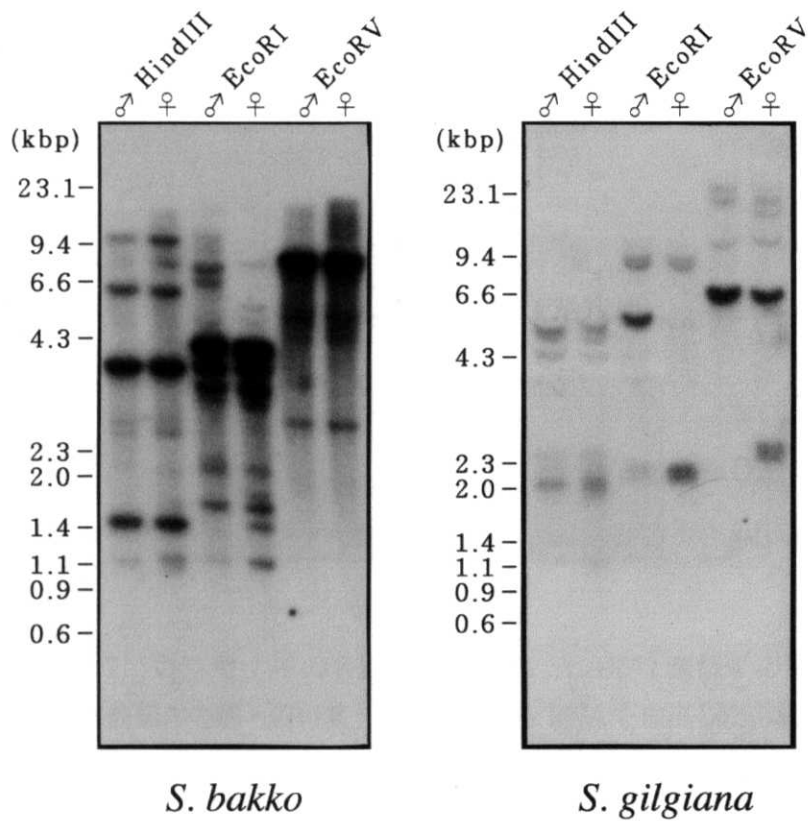


図 16 *SbARF1* 遺伝子の DNA ゲルプロット解析

パッコヤナギとカワヤナギの雄性個体と雌性個体の若い葉からゲノム DNA を調製した。DNA (0.9 μ g) を *Hind*III, *Eco*RI 及び *Eco*RV で別々に制限酵素処理し, 0.7% アガロースゲルで電気泳動した後, ナイロン膜に転写した。³²P で標識した p*SbARF1* の cDNA インサートをプローブとして解析した。左側にサイズマーカーの位置を示した。

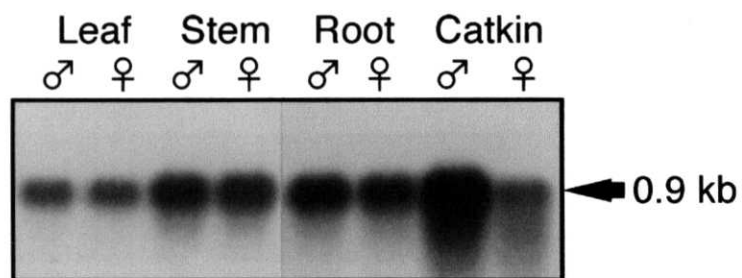


図 17 カワヤナギの各器官における *SbARF1* 遺伝子の発現

カワヤナギ雄性個体と雌性個体の葉・若い茎・根・花序から RNA を抽出した。雄性花序と雌性花序は発達段階のステージ IV に相当する (Futamura *et al.*, 1999)。10 μ g の全 RNA をホルムアルデヒドを含む 1.0% アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロン膜に転写した。 32 P で標識した p*SbARF1* の cDNA インサートをプローブとして解析した。

willow	1	MS	E	F	D	N	A	I	P	T	A	F	D	P	F	A	A	N	A	E	D	S	G	--	A	G	T	K	D	Y	V	H	I	R	V	Q	Q	R	N	G	R	K	S	L	T	T	V	Q	G	L	K	K	D	Y	S	Y	N	K	
Arabidopsis	1	MS	E	L	D	X	Q	V	P	T	A	F	D	P	F	A	D	A	N	A	E	D	S	G	--	A	G	T	K	D	Y	V	H	I	R	X	Q	Q	R	N	G	R	K	S	L	T	T	V	Q	X	L	K	K	E	Y	S	Y	T	K
rice	1	MS	L	D	I	Q	I	P	T	A	F	D	P	F	A	A	N	A	G	D	S	G	A	A	A	G	S	K	D	Y	V	H	I	R	V	Q	Q	R	N	G	R	K	S	L	T	T	V	Q	G	L	K	K	E	Y	S	Y	N	K	
human	1	MS	--	A	I	O	N	L	H	S	F	D	P	F	A	D	A	S	K	G	D	D	L	L	P	A	G	T	E	D	Y	H	I	R	I	Q	Q	R	N	G	R	K	S	L	T	T	V	Q	G	L	A	D	D	Y	D	K	K		
mosquito	1	MS	--	I	O	N	L	N	T	F	D	P	F	A	D	A	I	K	G	A	D	Y	D	V	Q	--	D	G	L	V	H	I	R	I	Q	Q	R	N	G	R	K	S	L	T	T	V	Q	G	L	S	A	E	Y	D	L	K	K		
yeast	1	MS	--	I	E	N	L	K	S	F	D	P	F	A	D	T	--	G	D	E	T	A	T	--	S	N	Y	H	I	R	I	Q	Q	R	N	G	R	K	S	L	T	T	V	Q	G	V	P	E	E	Y	D	L	K	K					

willow	59	I	L	K	D	L	K	K	E	F	C	N	G	T	V	V	Q	D	P	E	L	G	Q	V	I	Q	L	Q	G	D	Q	R	K	N	V	S	S	F	L	V	Q	A	G	I	V	K	K	E	N	I	K	I	H	G	F	
Arabidopsis	59	I	L	K	X	L	K	K	E	F	C	N	G	T	V	V	Q	D	S	E	L	G	Q	V	I	Q	L	Q	G	D	Q	R	K	N	V	S	T	F	L	V	Q	A	G	L	V	K	K	D	N	I	K	I	H	G	F	
rice	61	I	L	K	D	L	K	K	E	F	C	N	G	T	V	V	Q	D	P	E	L	G	Q	V	I	Q	L	Q	G	D	Q	R	K	N	V	S	N	F	L	V	Q	A	G	I	V	K	K	E	H	I	K	I	H	G	F	
human	59	I	V	K	A	F	K	K	K	F	A	C	N	G	T	V	I	E	H	P	E	Y	G	E	V	I	Q	L	Q	G	D	Q	R	K	N	I	C	O	F	L	V	I	G	L	A	K	D	D	Q	L	K	V	H	G	F	
mosquito	56	I	V	R	A	C	K	K	E	F	A	C	N	G	T	V	I	E	H	P	E	Y	G	E	V	I	Q	L	Q	G	D	Q	R	E	N	I	C	Q	N	L	T	K	S	G	L	A	K	P	E	Q	L	K	V	H	G	F
yeast	54	I	L	K	V	L	K	K	D	F	A	C	N	G	N	T	V	K	D	P	E	M	G	E	T	I	Q	L	Q	G	D	Q	R	A	K	V	C	E	F	M	I	S	Q	L	G	I	Q	K	K	N	I	K	I	H	G	F

図18 SbSUI1の予想されるアミノ酸配列とSUI1及びSUI1ホモログとの比較

pSbSUI1のcDNAインサートから予想されるアミノ酸配列をシロイヌナズナ (Berthomieu *et al.*, 1995), イネ (de Pater *et al.*, 1992), ヒト (Fields and Adams, 1994), カ (Besansky *et al.*, 1994) のSUI1ホモログ及び酵母SUI1 (Merrick, 1992) と比較した。シロイヌナズナのSUI1ホモログには未決定のアミノ酸残基が4つあり, Xで示した。3つか4つのタンパク質間で一致しているアミノ酸残基は白文字で示し, 保存されているアミノ酸は網掛けで示した。ダッシュは配列間の相同性を最大化したときに生じるギャップを示している。

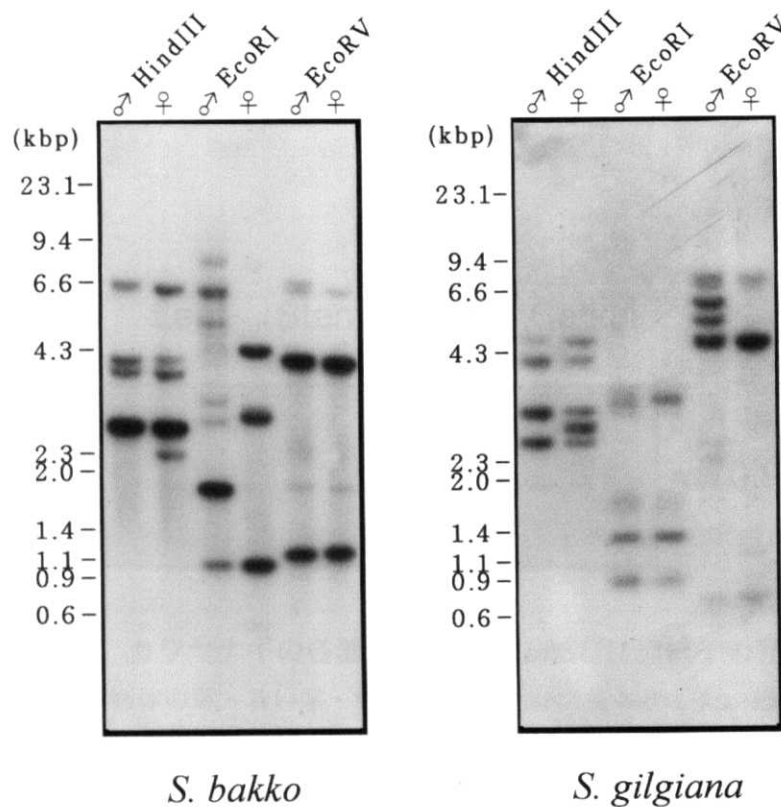


図 19 *SbSUII* 遺伝子の DNA ゲルプロット解析

バッコヤナギとカワヤナギの雄性個体と雌性個体の若い葉からゲノム DNA を調製した。DNA ($0.9 \mu\text{g}$) を *HindIII*, *EcoRI* 及び *EcoRV* で別々に制限酵素処理し、0.7% アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロン膜に転写した。 ^{32}P で標識した p*SbSUII* の cDNA インサートをプローブとして解析した。左側にサイズマーカーの位置を示した。

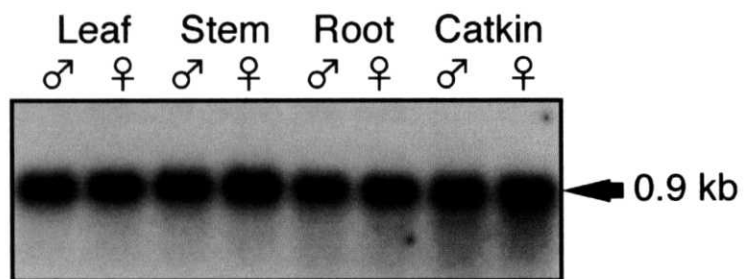


図 20 カワヤナギの各器官における *SbSUI1* 遺伝子の発現

カワヤナギ雄性個体と雌性個体の葉・若い茎・根・花序から RNA を抽出した。雄性花序と雌性花序は発達段階のステージ IV に相当する (Futamura *et al.*, 1999)。10 μ g の全 RNA をホルムアルデヒドを含む 1.0% アガロースゲルで電気泳動した後にナイロン膜に転写した。 32 P で標識した pSbSUI1 の cDNA インサートをプローブとして解析した。

第5章 ヤナギ属植物の雄花に特異的に発現する多糖類分解酵素遺伝子

5-1 はじめに

4章ではバッコヤナギのcDNAライブラリーから得られたcDNA断片についてまとめた。このうち、ポリガラクトナーゼ (PG) , ペクチンメチルエステラーゼ (PME) , ペクテートリアーゼ (PL) , β -1,3-グルカナーゼ (GN) をコードする遺伝子に関しては、葯や花粉で特異的に発現するという報告例がある (Wing *et al.*, 1989; Brown and Crouch, 1990; Albani *et al.*, 1991; Hird *et al.*, 1993) 。 PG, PME, PLはいずれもペクチンの分解に関わる酵素であり、GNはカロースを分解する酵素である。雄性配偶子形成の過程において、カロースは小孢子四分子を取り囲む壁や花粉の内壁に存在する。ペクチンは花粉の内壁や花柱の通道組織に存在する。このことから、GNやペクチン分解酵素は花粉の成熟や花粉管の発芽・伸長に重要な役割を持っていると考えられている。しかし、葯や花粉で特異的に発現する多糖類分解酵素遺伝子に関する知見は両性花に限定されている。

本章では、上記の多糖類分解酵素遺伝子のうち、PG, PME, GNをコードする遺伝子について、遺伝子の構造とカワヤナギ雌雄個体ゲノム中の分布及び発現特性についてまとめた。DNAゲルプロットの結果、ゲノム中のこれらの遺伝子のコピー数は、雌雄の個体間に差がないことが明らかになった。さらに、カワヤナギのPG遺伝子 (*SgPG1*, *SgPG2*, *SgPG3*, *SgPG4*) とPME遺伝子

(*SgPME1*) は成熟花粉に特異的に発現することがわかった。これらの遺伝子がコードする酵素は、花粉管の発芽や雌ずい中での花粉管の伸長に必要なものと考えられる。カワヤナギのGN遺伝子

(*SgGN1*) は雄性花序に特異的に発現していたが、発現する組織の特定までにはいたらなかった。しかし、*SgGN1* は雄花の発達過程において*SgPG*や*SgPME1*よりも早い時期に発現することから、花粉の成熟過程でタペタムに特異的に発現するものと考えられる。以上の結果から、これらの遺伝子は雄性個体の花粉や雄ずいで特異的に発現するものの、遺伝子自体は雌雄ともに保持していることが明らかになった。この知見は、雌雄異株植物では最初のものである。

5-2 材料及び方法

材料

第3章で示した材料を用いた。

クローンの単離と精製

cDNAライブラリーは、カワヤナギの雄性個体の花序から抽出した poly(A)⁺mRNA 5 µg を λ ZAPII (Stratagene) に組み込むことにより作成した。バッコヤナギの cDNA ライブラリーから得られた PG, PME 及び GN に対応する cDNA 断片をプローブとして、カワヤナギの cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより全長の cDNA クローンを得ることを試みた。DNA プローブは、Amersham のマルチプライム DNA ラベリングシステムを用いて [α -³²P] dCTP で放射線標識した。ハイブリダイゼーションは 20 mM ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸) (PIPES) -水酸化カリウム (pH 6.5), 0.8 M 塩化ナトリウム, 50% ホルムアルデヒド, 0.5% SDS, 100 µg ml⁻¹ サケ精子 DNA 溶液を用いて 42°C で 18 時間行った。ハイブリダイゼーション後、フィルターは 2×SSC (1×SSC は、0.15 M 塩化ナトリウム, 15 mM クエン酸ナトリウム) 及び 0.1% SDS を用いて室温で 5 分ずつ 3 回, 0.1×SSC 及び 0.1% SDS を用いて 55°C で 30 分ずつ 2 回洗った。組み換えファージの cDNA は、ExAssist ヘルパーファージの働きにより in vivo で pBluescript SK⁺ (Stratagene) プラスミドに挿入した。

DNA の塩基配列の解析

それぞれの cDNA の塩基配列は +鎖と -鎖の両方をジデオキシチエンターミネーター法により、自動 DNA シークエンサー (ABI PRISM 377, Applied Biosystems) とサイクルシークエンスキット (Applied Biosystems) を使って決定した。DNA 配列の解析は GENETYX ソフトウェア (ソフトウェア開発) によって行った。相同性の検索には BLAST を用いた。予想されるアミノ酸配列の整列化と系統樹解析には Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) を用いた。

RNAとDNAの調製

3章で示した方法でRNAとDNAの調製を行なった。

DNA・RNAゲルプロット

3章で示した方法でDNA及びRNAゲルプロット行なった。オートラジオグラフィーのシグナルの強度はモレキュラーイメージャー（BioRad）によって定量した。

in situ ハイブリダイゼーション

3章で示した方法で*in situ* ハイブリダイゼーションを行なった。

5-3 結果

ポリガラクトナーゼに相当する4つのcDNAクローンの単離とその特徴

PGをコードするバッコヤナギのcDNA断片をプローブとして、カワヤナギの雄性花序のcDNAライブラリーから4種類のcDNAクローン (pSgPG1からpSgPG4) を単離した。pSgPGsの挿入部分の長さは1344から1437塩基対で、最長のオープンリーディングフレームはいずれも393アミノ酸をコードしていた (表6)。4種類のcDNAの挿入部分の塩基配列はお互いに86.8%以上の相同性を示した。予想されるポリペプチド (SgPGs) はお互いに91.9%以上の相同性を示し、等電点は5.97から8.59であった (図21)。von Heijne (1986) の法則を適用すると、各SgPGはN端に25アミノ酸のシグナルペプチドを保持すると考えられる。

予想されるポリペプチド (SgPG1からSgPG4) は、タバコ (Npg1; Tebbutt *et al.*, 1994) , ワタ (John and Peterson, 1994) , モモ (Lester *et al.*, 1994) , トマト (Kalaitzis *et al.*, 1995) のPGとそれぞれおよそ52%, 50%, 37%, 39%相同であった。SgPGは花粉特異的PGと相同性が高く、果実や離層に特異的なPGとはあまり高くなかった。SgPGとタバコNpg1のアミノ酸配列を比較すると、SgPGはいくつかの機能性ドメインを含んでいることが分かった (図21)。アミノ酸残基の235から249番目にあたるグリシンに富む領域、241番目のヒスチジン残基、310番目のチロシン残基はPG活性に関係すると考えられている (Scott-Craig *et al.*, 1990; Caprari *et al.*, 1996; Stratilova *et al.*, 1996)。さらに、全ての花粉特異的PGに共通して見られるシステイン残基が265番目に存在する (Tebbutt *et al.*, 1994)。以上のことから、SgPGは花粉特異的PGの特徴を満たしているといえる。N-グリコシル化され则认为られる部位 (N-X-S/T) は、SgPG2・SgPG3・SgPG4に3ヶ所ずつ、SgPG1には2ヶ所存在していた。SgPG1の2ヶ所のN-グリコシル化部位は、いずれも全てのSgPGに共通するものであった。

ペクチンメチルエステラーゼに相当するcDNAクローンの単離とその特徴

PMEに相当するcDNAクローン (pSgPME1) をカワヤナギの雄性花序由来のcDNAライブラリーから単離した。このcDNAの長さは2098塩基対で、最長のオープンリーディングフレームは596ア

ミノ酸をコードしていた。予想されるポリペプチド (SgPME1) は、分子量が66.1 kDa、等電点が8.85であった。N端にはシグナルペプチドと考えられる配列があった。von Heijne (1986) の法則と疎水性親水性指標 (Kyte and Doolittle, 1982) から、SgPME1のシグナルペプチドは48番目のセリン残基までであることが示唆された。図22に示したように、SgPME1はシロイヌナズナ (Richard *et al.*, 1996) , インゲンマメ (Ebbelaar *et al.*, 1996) , トマト (Graffe *et al.*, 1996) のPMEとそれぞれ約35%, 36%及び36%の相同性を示した。C端のおよそ300アミノ酸に比べ、N端のおよそ260アミノ酸は他のPMEと相同性が低かった。既知の植物のPMEで保存されている4つのシーケンスモチーフはSgPME1にも存在した。

β -1,3-グルカナーゼに相当するcDNAクローンの単離とその特徴

GNに相当するcDNAクローン (pSgGN1) もカワヤナギのcDNAライブラリーから単離した。cDNAの長さは1775塩基対で、最長のオープンリーディングフレームは478アミノ酸から成るポリペプチドをコードしていた。予想されるポリペプチド (SgGN1) はN端にシグナルペプチドと考えられる疎水性の領域を有していた (図23) 。von Heijne (1986) の法則を適用すると、予想される切断部位は38番目のセリンと39番目のグルタミン酸の間となる。SgGN1のN端はメチオニン残基ではなく、シグナルペプチドの一部しか含んでいなかったが、成熟タンパク質の全長をカバーしていた。SgGN1のアミノ酸配列はシロイヌナズナの葯特異的GN (A6) (Hird *et al.*, 1993) と約50%, タバコのクラス1タイプ (Shinshi *et al.*, 1998) , クラス2タイプ (Linthorst *et al.*, 1990), クラス3タイプ (Payne *et al.*, 1990), クラス4タイプ (Ori *et al.*, 1990) のGNとそれぞれ約25%, 19%, 23%, 21%の相同性を示した。さらに、SgGN1とシロイヌナズナのA6のC端には、タバコのGNにはない付加的な配列が含まれていた。SgGN1はGNの触媒活性に関与していると考えられている2ヶ所の保存された領域 (Meins *et al.*, 1991) 、2つのグルタミン酸残基 (Høj *et al.*, 1989; Macgregor and Ballance, 1991; Chen *et al.*, 1993) 及び2つのトリプトファン残基 (Ohno *et al.*, 1989) を有していた。シロイヌナズナの葯特異的GNであるA6とSgGN1の相同性が高いことから、SgGN1はカワヤナギの葯特異的GNであると考えられる。

雄性個体と雌性個体のゲノム中における*SgPG*, *SgPME1*, *SgGN1* 遺伝子の分布

カワヤナギの雄性個体と雌性個体のゲノム中における*SgPG*, *SgPME1* 及び *SgGN1* の分布をゲノムDNAゲルブロット解析によって調べた (図24)。*HindIII*, *EcoRI* 及び *EcoRV* で切断された雄性個体と雌性個体のゲノムDNAは、双方とも*SgPG*, *SgPME1*, *SgGN1* のいずれのcDNAにも強くハイブリした。*SgGN1* のハイブリダイゼーションのパターンは雄性個体と雌性個体のゲノムDNAでまったく同一であった。*HindIII*, *EcoRI* 及び *EcoRV* で切断したゲノムDNAに*SgPG*をハイブリさせたときと、*HindIII* もしくは *EcoRV* で切断したゲノムDNAに*SgPME1* をハイブリさせたときには、雄性個体と雌性個体の間に制限酵素断片長多型が確認できた。しかしながら、この違いは性差によるものではなくクローン間差によるものと考えられる。*SgPG*に相当するバンドはどの制限酵素で切断した場合にも四本以上あったが、*SgPME1* と *SgGN1* に相当するバンドは一本から三本しかなかった。この結果は、*SgPME1* と *SgGN1* は単一か2, 3個の遺伝子でコードされているのに対し、*SgPG*は複数個の遺伝子でコードされていることを示している。*SgPG*の4つの遺伝子は互いに塩基配列の相同性が非常に高いため、厳しい条件でハイブリダイゼーションを行ってもDNAゲルブロットやRNAゲルブロットでそれぞれの*SgPG*を区別することはできなかった。これらのことから、*SgPG*の4つの遺伝子は同一のサブファミリーを構成していると考えられる。

SgPG, *SgPME1*, *SgGN1* 遺伝子の雄花特異的発現

カワヤナギの様々な器官から抽出したRNAを用い、3種類の遺伝子の器官特異的発現について調べた (図25)。*SgPG*, *SgPME1*, *SgGN1* はいずれも雄性花序で高いレベルの発現を示しており、雌性花序や葉・茎・根ではほとんど発現していなかった。*SgPG*, *SgPME1*, *SgGN1* の転写産物の長さはそれぞれ約1.5kb, 2.3kb, 1.5kbであった。オートラジオグラムにおけるバンド強度と露出時間から判断すると、雄性花序での発現は*SgPG*のmRNAのレベルが最も高く、*SgGN1*のmRNAのレベルが最も低かった。酵母の翻訳開始因子SUIのホモログをコードしている*SbSUI1*遺伝子 (Futamura *et al.*, 1998a) は全ての器官で高いレベルで発現していた。

雄花と雌花の発達過程における*SgPG*, *SgPME1*, *SgGN1* の発現調節について調べた (図26)。雄花と雌花の発達過程を花序の大きさによって5段階に分け (Futamura *et al.*, 1999)、それぞれの

発達段階から抽出したRNAを用いてRNAゲルプロットを行った。*SgPG*と*SgPME1*の転写産物はステージIIIとステージIVで最も豊富に存在していた。これに対し、*SgGN1*の転写産物はステージIIIで最も発現レベルが高かった。雄性花序では、ステージIIIで一部の葯が表面に露出し始め、ステージIVで雄花が完全に開花して成熟する。従って、*SgPG*と*SgPME1*は雄性配偶子形成後期の成熟花粉で発現のレベルが高いことが示唆される。一方、雌花の発達過程では*SgPG*、*SgPME1*、*SgGN1*の転写産物は検出できなかった。

*SgPG*と*SgPME1* 遺伝子の葯特異的発現

カワヤナギの雄花における*SgPG*、*SgPME1*、*SgGN1*の発現部位を*in situ* ハイブリダイゼーションによって調べた（図27）。4',6ジアミジノ2フェニルインドール二塩酸（DAPI）で染色した葯の切片の観察から、ステージIIIの花粉は3核の成熟花粉を含み、ステージIとIIは有糸分裂前の小胞子を含んでいる。*SgPG4*と*SgPME1*の転写産物は成熟花粉でのみ特異的に検出され（図27C, D）、ステージIとIIの小胞子には検出されなかった（図27A, B）。また、*SgPG4*と*SgPME1*に対応するセンスRNAプローブを用いたときにはどのステージでもシグナルは検出されなかった（図27E, F）。これらの結果から、*SgPG*と*SgPME1*は雄性配偶子形成の後期における成熟花粉でのみ発現することが示された。雄花での*SgGN1* mRNAの発現はシグナルが弱く、発現部位を同定するにはいかなかった。

5-4 考察

雌雄異株植物であるカワヤナギのPG, PME及びGNの構造的特徴と、これらに相当する遺伝子の雄花特異的発現について調べた。これらの知見は、雌雄異株植物のPG, PME及びGNについて解析した最初のものである。*SgPG*, *SgPME1*, *SgGN1* 遺伝子は雄性個体でのみ発現する(図25)が、ゲノムDNAゲルプロットの結果から、雄性個体及び雌性個体ともにそれぞれの遺伝子を保有している(図24)。この結果は、メランドリウムのMADSボックス遺伝子(Hardnack *et al.*, 1944)やタペータム特異的あるいは花粉特異的遺伝子(Matsunaga *et al.*, 1996, Barbacar *et al.*, 1997, Label-Hardenack *et al.*, 1997, Scutt *et al.*, 1997)に関するこれまでの報告と一致するものである。従って、雌雄異株植物であるヤナギの性決定に*SgPG*, *SgPME1*, *SgGN1* 遺伝子は直接的には関与していないらしい。

*SgPME1*や*SgGN1*が単一かあるいは2, 3個の遺伝子でコードされているのに対し、*SgPG*は4個以上の遺伝子によってコードされる(図4)。*SgPG*の4つの遺伝子は一つの遺伝子ファミリーに属するものと考えられる。これまでに単離された植物由来のPGは、系統樹解析により3つの主要なクレードに分類されている(Hadfield *et al.*, 1998)。クレードAに属するPGはシグナルペプチドを持たず、花粉以外の組織で発現する。クレードBのPGはシグナルペプチドを持っており、果実の登熟に関係するPG遺伝子がこのグループに属する。クレードCは、葯や花粉といったエキソPG活性の高い組織で発現する遺伝子のみから成り立っている。4つの*SgPG*のアミノ酸配列は全てクレードCのメンバーと高い相同性を示していた。さらに、*SgPG*のアミノ酸配列の265番目のシステイン残基は、他の花粉特異的PGにのみ見られる特徴的なアミノ酸残基である(Tebbutt *et al.*, 1994)。クレードCのPGと高い相同性を示したことは、4つの*SgPG*遺伝子が花粉特異的PGをコードしているという仮説を支持するものである。*SgPME1*に関しても既知の植物PMEと系統樹解析を試みたところ、PMEは幾つかのグループに分類されることがわかった。しかしながら、それぞれのグループとPMEの発現部位との間に明確な関連は見いだされなかった。*SgGN1*に関しては、シロイヌナズナの葯特異的GNと相同性が高いことが雄性配偶子の発達過程に関与する遺伝子であることを示している。このように、*SgPG*と*SgGN1*は構造的特徴からも花粉もしくは葯で機能する酵素である

ことが示唆された。

SgPG, *SgPME1*, *SgGN1* 遺伝子は雄性花序で高レベルに発現するが、雌性花序や雄性個体・雌性個体双方の葉・茎・根ではほとんど発現が見られなかった (図25)。また、これらの遺伝子の発現は雄性花序の発達段階でコントロールされていた (図26)。*SgPG*と*SgPME1*の転写産物のレベルは雄性花序のステージIIIとステージIVで最も高かった。これに対し、*SgGN1*はステージIIでもかなりの量の発現が認められ、ステージIIIで最も発現量が大きくなり、ステージIVでは発現量が減少していた。このように、*SgGN1*は*SgPG*や*SgPME1*よりも幾分早い時期に発現している。*PG*や*PL*遺伝子は小胞子の有糸分裂の後にスイッチが入るために"late"遺伝子に分類されている

(Mascarenhas, 1990)。*SgPG*や*SgPME1*の転写産物は成熟花粉に蓄積し、有糸分裂前の小胞子では検出されなかったことから、*SgPG*と*SgPME1*は雌雄異株植物のヤナギにおける"late"遺伝子であると考えられる。*SgPG*と*SgPME1*は、花粉管の伸長促進もしくは花柱への花粉管の侵入に関する活性を持っているのかもしれない。葯で発現するGNは、四分子の分離が起きる直前のタペータムでmRNAが蓄積するということが報告されている (Hird *et al.*, 1993; Bucciaglia and Smith, 1994)。本研究では、雄花の*SgGN1*遺伝子の発現部位を特定するまでにはいならず、タペータム特異的発現を確認することはできなかった。しかしながら、雄花の発達過程における*SgGN1*の発現は、"late"遺伝子である*SgPG*や*SgPME1*よりも先に最大レベルに達することがRNAゲルプロットの結果から明らかになった (図26)。このことは、*SgGN1*が花粉の成熟に何らかの役割を果たしていることを示唆している。花粉四分子を取り囲むカロース壁は、タペータム細胞から分泌されるエンド型及びエキソ型のGN活性を持つ酵素複合体により分解される。(Frankel *et al.*, 1969; Stieglits and Stern, 1973)。カロース壁の分解後、小胞子は葯室内に遊離して成熟花粉へと発達する。*GN*遺伝子のタペータムでの発現とカロース壁の崩壊のタイミングは、小胞子の発達に重要な意味を持っている (Worrall *et al.*, 1992)。*SgGN1*はタペータム由来のGNとして花粉の成熟に機能しているのかもしれない。

本研究では、雌雄異株植物であるカワヤナギにおいて、花粉特異的もしくは葯特異的に発現するPG・PME・GNに対応する遺伝子の存在を示した。両性花をつける植物や雌雄同株植物と同じように、雌雄異株であるヤナギ属においてもこれらの遺伝子が雄性配偶子形成における花粉の発

達に関与していると考えられる。

表6 ポリガラクトナーゼ (PG) に対応するカワヤナギcDNA (pSgPG1からpSgPG4のインサート配列) とタバコ遺伝子 (*Npg1*) のサイズと予想されるアミノ酸配列の主な特徴

Clone	Accession no.	Length of cDNA	Length of ORF	Length of polypeptide	Molecular mass	pI	Predicted features
		<i>bp</i>		<i>amino acids</i>	<i>kD</i>		
pSgPG1	AB029457	1390	1182	393	41.9	8.59	Signal sequence, Gly-rich region, 2 sites of N-glycosylation
pSgPG2	AB029458	1437	1182	393	41.8	8.03	Signal sequence, Gly-rich region, 3 sites of N-glycosylation
pSgPG3	AB029459	1397	1182	393	41.6	5.97	Signal sequence, Gly-rich region, 3 sites of N-glycosylation
pSgPG4	AB029460	1344	1182	393	41.7	6.14	Signal sequence, Gly-rich region, 3 sites of N-glycosylation
Npg1 ^a	X71020		1191	396	42.5	7.02	Signal sequence, Gly-rich region, 8 sites of N-glycosylation

^a Tebbutt *et al.*, 1994

SgPME1	1	.MVFDQFDQLS...ERRRLERQOKLRKKIIIASVSSIAFFVIVGAGVFSLVSNHDISSPG	56
ATPME1	1	MDSVNSFKGYGKVD EAQDLALKKKTRKRLLLLSISVVVLI AVIIAAVVATVVHK.....N	55
PMEU1	1	MTRVEDFFS.....KQIDFCKR.KKKIYLAIVASVLLVAAVIGVVAGVKSHS.....K	47
MPE3	1	MDTIKSF KG YGVN EE LQQA YE KKTRKRLIIIAVSSIVLI AVIIAAVAGVVI HN.....R	55
SgPME1	57	NNGGSPSAATRFAEKAKFISHVARVIKTVCNATTYODTCONTLEKGVLGKDPSSVQPKDL	116
ATPME1	56	KNESTPS....PPPELT PSTSLKAICSVTRFPESCISSTISKLP...SSNTTDPETL	104
PMEU1	48	NSDDHAD...IMAISSSAHA....IVKSACSNTLHP ELCYS ALVNVSD F .SKKVTSQKDV	99
MPE3	56	NS ESS SPS SDSV QTELS PA A....SLKAVCDTTRY PSS CFSSISSLP...ESNTTDP EL L	108
SgPME1	117	LKIAIKAAD E ID....KVIK K ASSFKFDKPREKAAFD DC LELIEDAKEELKNSVDCIGN	172
ATPME1	105	F KLS LKVIID EL DS.ISDLPE K LSKETE.DERIKSALRVCGDLIEDALDRINDTVSAIDD	162
PMEU1	100	I EL SLNITVKAVRRNYAVKELIKTRKGLTPREKVALHDCLE TMD ETLDELHTAVEDLEL	159
MPE3	109	F KLS LRVAID EL S....SFPS K LRANAEQDARLQKAIDV CSS VFGDALDRINDSISALGT	164
SgPME1	173	DIG..KLA.SNAPDLSN WLS AVMSYQOTCIDGFP E GK.....LKSDMEKTFKATR	219
ATPME1	163	EEKKTLSSSKIEDLKT WLS ATVTDHETCFD SL DELKQNKTEYANSTITQNLKSAMSRST	222
PMEU1	160	YPN.KKSLKEHVEDLKT L ISSAITN Q ETCLDGF SH DE.....ADKKVRKVLLKGQKHVE	212
MPE3	165	VAG.RIASSASVSNVET WLS AALTDQDTCLDAVGELN....STAARGALQEIETAMRNST	219
SgPME1	220	ELTSNSLAMVSSLV S ..FLKNFSFSGTLNRRLLAEEQNSPSLDKDGVP GW MSHEDRRILK	277
ATPME1	223	EFTSNSLAIVSKILS....ALSDLGIP I HRRRLMSHH.....QQSVDFEKWARRLLQ	273
PMEU1	213	KMCSNALAMICNMTD T DIANEMKLSAPANNRKLVEDNG.....EWPEWLSAGDRLLQ	265
MPE3	220	E F ASNSLAIVTKILG....LLSRFETPIHRRLLG.....FPEWLGAAERRLLE	264
SgPME1	278	GADKDKPKPNVS VAK DGSGDFKTISEALAAMPAYEGRYVIFVKQGVYDET V TVTKKMAN	337
ATPME1	274	TAG...LKPDVTVAGD G TDVLT VNE AVAKVPK SL KMFVIVKSGTYVENVM DK SKWN	330
PMEU1	266	SST...VTPDVVAADGSGDYKT VSE AVRKAPEKSSKRYVIRIKAGVYRENVDPK KT N	322
MPE3	265	EKNND.STPD AV VAKDGSGQFKTIGEAL KLV KKKSEERFSVYVKEGRYVENIDLDK NT WN	323
△			
SgPME1	338	ITMYGDGSOKTIVTGNKNFADGVQTFRTATFAVLGDGFLCKFMCFRNTAGPEKHQAVAIR	397
ATPME1	331	VMIYGDGK GK TIISGSKNFVDGTP TY ETATFAIQGKGFIMKD IGI INTAGAAKHQAVAFR	390
PMEU1	323	IMFMGDGKSNTIITASRNVQDGSTTFHSATVVRVAGKVLARDITFONTAGASKHQAV ALC	382
MPE3	324	VMIYGDGKDKTFVVGSRNFM DG TPTEATFAVKGKGFIAKDIGFVNNAGASKHQAV ALR	383
I			
SgPME1	398	VOADRAIFLNCRFEGYODTLYAOTHROFYRSCVITGTVD FI FGDATSVFONCLITVRKPL	457
ATPME1	391	SGSDFSVYYQCSFDG F QDTLYPHSNRQFYRDCDVTGTIDFIFGSA AV VFQCKIMPROPL	450
PMEU1	383	VGSDLSAFYRC DM LAYQDTLYVHSNRQF FV QCLVAGTVDFIFGNCA AV FQDCDIHARRPG	442
MPE3	384	SGSDRSVFFRC SF DG F QDTLYAHSNRQFYRDCDITGTIDFIFGNAA V VFQSCKIMPROPL	443
II			
SgPME1	458	ENQONIVTAQGRIDGHETG IV LQSCRIE P DKDLVPVKNKIRS YL GRPWKEFSRTVIMDS	517
ATPME1	451	SNQFNTIT TA QKKDPN QSS GMSIORCTISANG.....NVIAPTYLGRPWKEFSRTVIMET	505
PMEU1	443	SGQKNM VTA QGRTPDNQNTG IV IQKCRIGATSDLRPVQKSFP TY LGRPWKEFSRTVIMQS	502
MPE3	444	P NQ FNTIT TA QKKDPNQNTG II IQKSTITPFGN....NLTAPTYLGRPWK DF STTVIMQS	499
III			
SgPME1	518	TIGDFIH PG WLPWQGD F GLKT.LYVAEYSNKGCGAQT N ARIKWPGYHI IKKE .EAMKFT	575
ATPME1	506	VIGAVVRPSG W MSWVSGVDPPASIVYGEYKNTGPGSDVTQ R VKWAGYKPVMSDAEAAKFT	565
PMEU1	503	SITDVIQ PAG WHEWNGNFALDT.LFYGEYANTGAGAPTSGRVKWK G HKVITSSTEAAQAYT	561
MPE3	500	DIGALLN PV GWMSWVPNVEPPTTIFYA EY QNSGPGADV SQ RVKWAGYKPTITDRNAEFT	559
IV			
SgPME1	576	IENFYQ G .DWISASGSPVH IGL	596
ATPME1	566	VATLLHGADWIPATGVINQLS.	586
PMEU1	562	PGRFIA GGS WLSSTGFPFSL GL	583
MPE3	560	VQSFIO G PEWLPNAAVQFDSTL	581

図22 SgPME1の予想されるアミノ酸配列と他の植物のPMEとの比較

pSgPME1のcDNAインサートから予想されるアミノ酸配列をシロイヌナズナのATPME1 (Richard *et al.*, 1996), トマトのPMEU1 (Gaffe *et al.*, 1996), インゲンマメのMPE3 (Ebbelaar *et al.*, 1996) と比較した。反転文字のアミノ酸は4つのPMEのうち少なくとも3つが一致しているもの、灰色のボックスで囲まれているアミノ酸は相似であるものを示している。予想されるプロセッシング部位を下向きの矢印で示した。4つの保存領域 (Albani *et al.*, 1990) には下線を引き、ローマ数字をつけた。白の矢尻印はトマトから単離されたPME (Markovic and Jornvall, 1986) のN端を示している。白の矢尻印のN端側は保存性が低く、C端側は比較的保存されている。

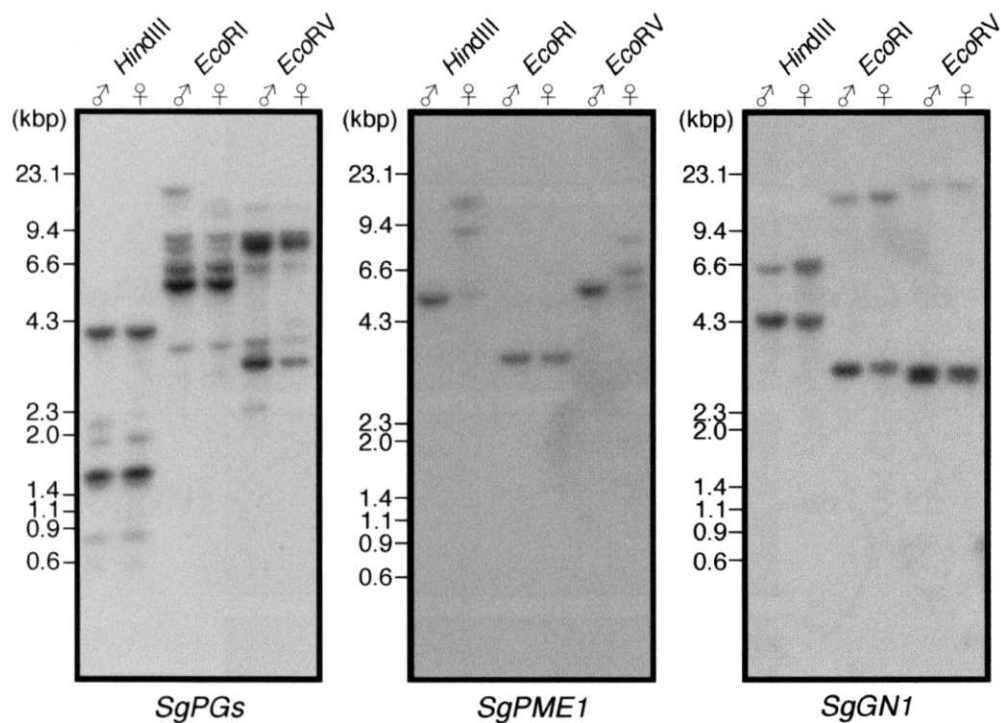


図 24 *SgPG*, *SgPME1* 及び *SgGN1* 遺伝子の DNA ゲルプロット解析

カワヤナギの雄性個体と雌性個体から調整したゲノム DNA ($0.9 \mu\text{g}$) を *Hind*III, *Eco*RI 及び *Eco*RV で別々に制限酵素処理し, 0.7% アガロースゲルで電気泳動した後, ナイロン膜に転写した。 ^{32}P で標識した pSgPG2, pSgPME1, pSgGN1 の cDNA インサートをプローブとして用いた。左側にサイズマーカーの位置を示した。

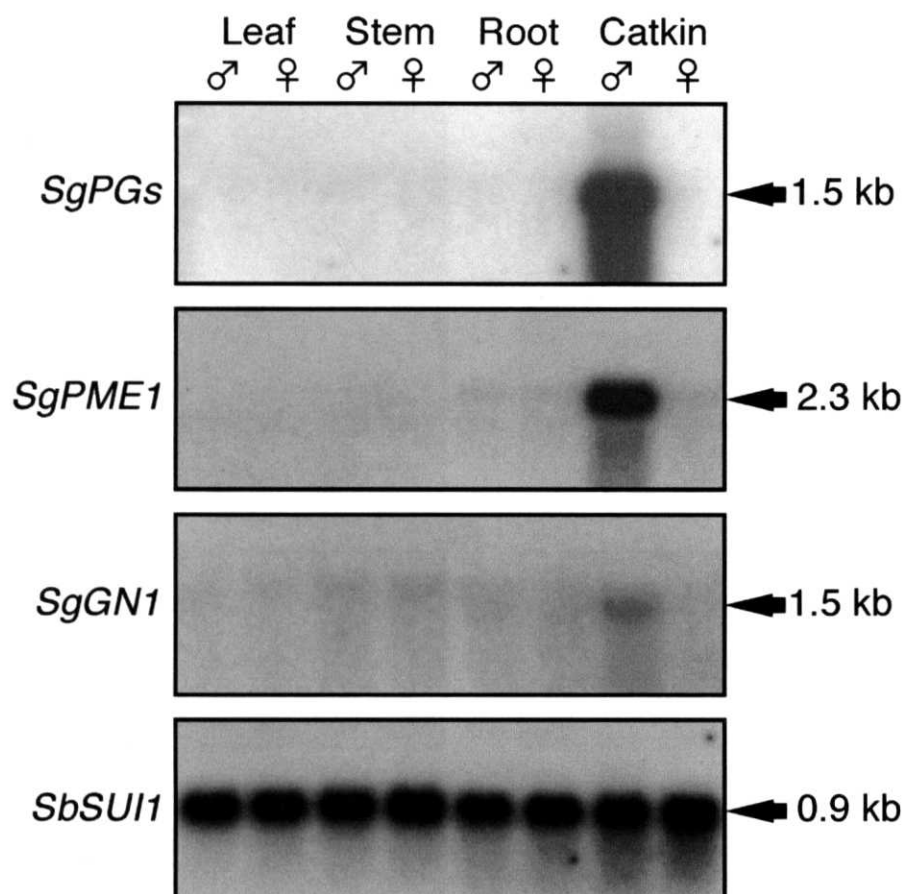


図 25 カワヤナギの各器官における *SgPG*, *SgPME1* 及び *SgGN1* 遺伝子の発現

カワヤナギ雄性個体と雌性個体の葉・若い茎・根・花序から RNA を抽出した。雄性花序と雌性花序は発達段階のステージ IV に相当する。10 μ g の全 RNA をホルムアルデヒドを含む 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、ナイロン膜に転写した。 32 P で標識した pSgPG2, pSgPME1, pSgGN1 の cDNA インサートをプローブとして用いた。酵母の翻訳開始因子 SUI1 のホモログをコードする pSbSUI1 (Futamura *et al.*, 1998a) の cDNA インサートをポジティブコントロールとして用いた。

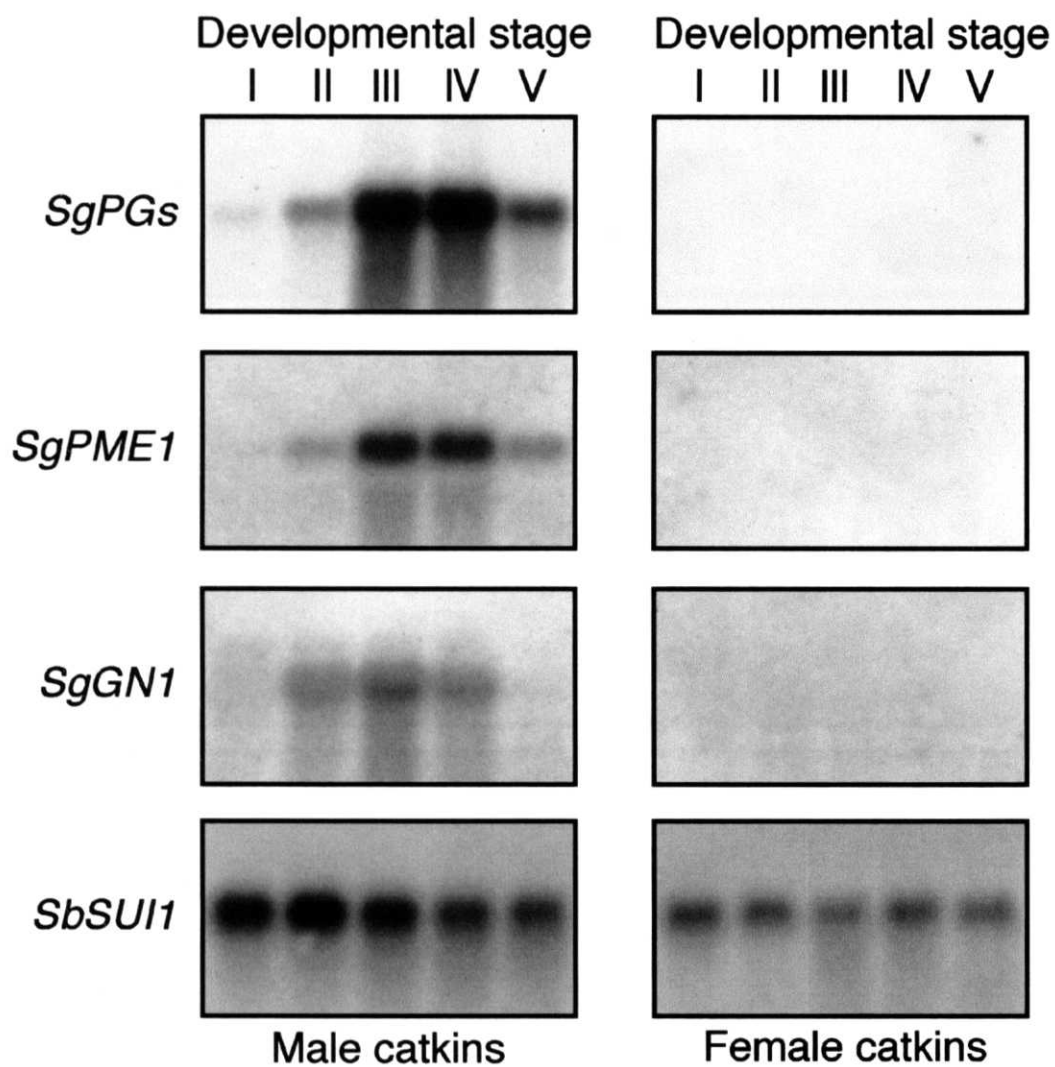


図 26 雄花と雌花の発達過程における *SgPG*，*SgPME1* 及び *SgGN1* の発現

雄花と雌花の発達過程は花序のサイズによって5つのステージに分類した (Futamura *et al.*, 1999)。ステージ III で雄ずいと雌ずいの一部がそれぞれ雄性花序と雌性花序の表面に露出し，ステージ IV で完全に開花した。ステージ V では，花にセネッセンスが見られた。各発達段階の雄性花序と雌性花序から RNA を抽出し，RNA ゲルブロットを行った。

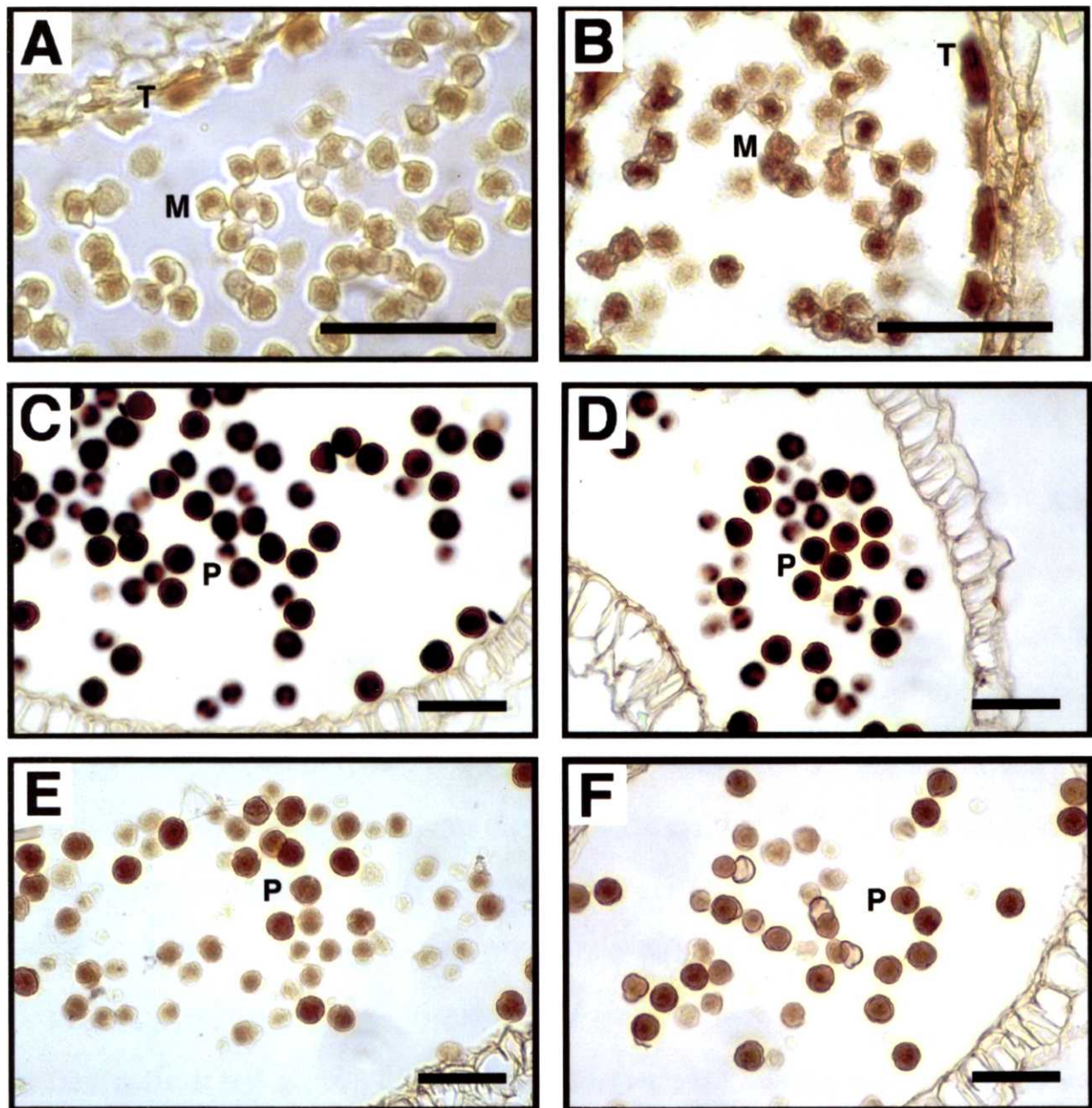


図 27 雄花の葯の発達過程における *SgPG* 及び *SgPME1* の転写産物の発現部位

8μm の厚さの横断面切片に対し、ジゴキシゲニンで標識した RNA プローブを用いた。(A) と (B) *SgPG4* と *SgPME1* に対応するアンチセンス RNA プローブを用いたときの雄花ステージ II の葯切片。(C) と (D) *SgPG4* と *SgPME1* に対応するアンチセンス RNA プローブを用いたときの雄花ステージ III の葯切片。(E) と (F) ネガティブコントロールとして、*SgPG4* と *SgPME1* に対応するセンス RNA プローブを用いたときの雄花ステージ III の葯切片。M, 小孢子; P, 花粉; T, タペータム。バーは 50μm。

第6章 ヤナギ属植物におけるペクチンリアーゼ遺伝子の発現特性

6-1 はじめに

ペクチンリアーゼ (PL) は、ペクチン酸の分解を触媒する酵素である。病原菌のPLは菌体外酵素として働き、植物体への感染の際に植物体の細胞壁を分解する (Collmer and Keen, 1986)。

一方、植物のPL遺伝子は、いくつかの種の成熟花粉から単離されている (Wing *et al.*, 1989; Rafnar *et al.*, 1991; Rogers *et al.*, 1992; Turcich *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1994; Sone *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996; Midoro-Horiuti *et al.*, 1999)。成熟花粉に蓄積したPLは、花粉管の発芽や花柱への侵入に必要であると考えられている (Mascarenhas, 1990)。花粉で発現するPL遺伝子の他に、花柱の通道組織に特異的なPL遺伝子 (Budelier *et al.*, 1990)、登熟果実に特異的なPL遺伝子

(Domínguez-Puigjaner *et al.*, 1997; Medina-Escobar *et al.*, 1997)、オーキシンで誘導されるPL遺伝子 (Domingo *et al.*, 1998) も植物から単離されている。

4章で解析したバッコヤナギの雄性花序由来のcDNA断片のうちの一つに、花粉特異的なPL遺伝子と相同性を示したものがあった。このcDNA断片をプローブとして、カワヤナギの雄性花序由来のcDNAライブラリーからPLタンパク質全長をカバーするcDNAクローン (pSgPL1) を単離した。このPL遺伝子 (*SgPL1*) は、雄性花序のほかに茎でも多く発現していた。当初の予想とは異なり、*SgPL1*は花粉では発現しておらず、雄ずいの花糸と雌ずいの柱頭で主に発現していることがわかった。また、*SgPL1*は木部柔組織でも発現していた。さらに、この遺伝子は葉を切り取ったときに、1時間後をピークとする一過性の発現の誘導を受けることも明らかになった。このことから、*SgPL1*は細胞の伸長や分化、ストレスに対する応答といった幅広い機能を有していることが示唆された。PL遺伝子がストレスにより誘導されるという知見は、植物界で最初のものである。

6-2 材料及び方法

材料

3章に示した方法で4週間挿し穂から生育させたシュートから、葉・茎・根を取り分けて -80°C で保存した。雄性個体のシュート（高さ23 cm）を根元から19.5 cm, 13 cm, 6.5 cmのところで切断し、葉と茎の発達段階の実験に用いた。未成熟葉と茎頂分裂組織を含む一番上部をシュート先端、その下の若い茎を上部の茎、さらにその下を中間の茎、最も下の部分を基部の茎とした。基部の茎でのみ木化が始まっていた。若い発達中の葉（長さ4 cm, 1番目の葉）は上部の茎から、成熟葉（長さ8 cm, 5番目）は中間の茎から、老齡葉（長さ1-2 cm, 13番目と14番目）は基部の茎から採取した。雄性個体と雌性個体の花序は、3章と同じく森林総合研究所の苗畑に植栽したカワヤナギより採取した。

ストレス処理

葉柄の根元をはさみで切断し、すぐさま葉を脱イオン水の上に浮かべ、ストレス処理を開始した。24時間後、化学物質の入った水に置き換えた。ジャスモン酸、メチルジャスモン酸、アブジン酸、サリチル酸、インドール酢酸はエタノールに溶解した。適切な時間に回収したサンプルはすぐに液体窒素につけて -80°C で保存した。

クローンの単離と同定

PLに対応するバッコヤナギのcDNA断片をプローブとして、カワヤナギの雄性花序由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることによりアミノ酸全長をカバーするcDNAクローンを得た。用いたcDNAライブラリー、ハイブリダイゼーションの条件及び単離したクローンcDNAのプラスミドへの切り出しについては5章で示した。

DNA塩基配列の決定

cDNAの塩基配列は+鎖と-鎖の両方をジデオキシチエンターミネーター法により、自動DNA

シーケンサー（ABI PRISM 377, Applied Biosystems）とサイクルシーケンスキット（Applied Biosystems）を使って決定した。相同性の検索にはゲノムネット BLAST2サーバー（<http://blast.genome.ad.jp>）を用いた。アミノ酸配列の比較と系統樹の作成にはClustal W（Thompson *et al.*, 1994）を用いた。

RNAとDNAの調製

3章で示した方法でRNAとDNAの調製を行なった。

DNA・RNAゲルプロット

3章で示した方法でDNA及びRNAゲルプロット行なった。

in situ ハイブリダイゼーション

3章で示した方法で*in situ* ハイブリダイゼーションを行なった。

6-3 結果

ペクテートリアーゼ (PL) に相当するcDNAクローンの単離とその特徴

PLをコードするバッコヤナギのcDNA断片をプローブとして、カワヤナギの雄性花序のcDNAライブラリーからPLに相当するcDNAクローン (pSgPL1) を単離した。pSgPL1の挿入部分の長さは1476塩基対で、最長のオープンリーディングフレームは409アミノ酸をコードしていた (図28)。予想されるポリペプチド (SgPL1) の分子量は44.7 kDa、等電点は7.85であった。N端には小胞体への移行するためのシグナルペプチドと考えられる疎水性の領域が存在した。von Heijne (1986) の法則を適用すると、28番目のシステインと29番目のセリンとの間で切断されると考えられる。

SgPL1は他の植物及び植物病原菌のPLで確認されている4つの保存領域 (Heffron *et al.*, 1995) を保持していた (図29)。特に、植物病原菌*Erwinia chrysanthemi*のPLタンパク質における予想活性部位はよく保存されていた。SgPL1の282番目のグルタミン酸と293番目のヒスチジン残基は、花粉以外の組織で発現するPLに共通しているが、花粉特異的PLや植物病原菌のPLの対応する部位にこれら2つのアミノ酸残基は見られなかった。また、SgPL1の46番目のアミノ酸残基にはN-グリコシル化の共通配列 (Asn-X-Ser/Thr) が存在した (図28)。

SgPL1は、ヒャクニチソウ (ZePel; Domínguez-Puigjaner *et al.*, 1997) , トマト (9612; Budelier *et al.*, 1990) , イチゴ (Medina-Escobar *et al.*, 1997) の非花粉特異的PLとそれぞれおよそ73%, 72%, 57% 相同であった。また、SgPL1はトマト (LAT59; Wing *et al.*, 1989) , トウモロコシ (Zm58.2; Turcich *et al.*, 1993) , シロイヌナズナ (At59; Kulikauskas *et al.*, 1997) , アルファアルファ (PO149; Wu *et al.*, 1996) , タバコ (G10; Rogers *et al.*, 1992) , ブタクサ (Amb a I , Amb a II アレルゲン; Rafnar *et al.*, 1991, Rogers *et al.*, 1991) , スギ (Cry j 1 アレルゲン; Sone *et al.*, 1994) , ヒノキ (Cha o 1 アレルゲン; Suzuki *et al.*, 1996) , ヒノキ科*Juniperus ashei* (Jun a 1 アレルゲン; Midoro-Horiuti *et al.*, 1999) , トマト (LAT56; Wing *et al.*, 1989) の花粉特異的PLとそれぞれ49%, 47%, 46%, 45%, 43%, 42-44%, 41%, 39%, 39%, 39%相同であった。このように、SgPL1は非花粉特異的PLと相同性が高く、花粉に特異的なPLとの相同性はあまり高くなかった。SgPL1は植物病原菌*E. chrysanthemi* のPLと低いけれども意味のある相同性 (pelA及びpelEと18%, pelCと15%) を有していた。SgPL1はシ

ロイヌナズナのゲノム中に存在する推定上のPLとも相同性を示した。タンパク質データベースにある全ての植物PLと、*E. chrysanthemi* のpelAをClustal W (Thompson *et al.*, 1994) によって比較し、近隣結合法 (Saitou and Nei, 1983) で系統樹を作成した (図30)。系統樹による分析から、SgPL1は花柱・果実・体細胞で発現するPLとグループを形成し、花粉特異的なPLと区別できることが明らかになった。

雄性個体と雌性個体のゲノム中におけるSgPL1遺伝子の分布

カワヤナギの雄性個体と雌性個体のゲノム中におけるSgPL1の分布をゲノムDNAゲルブロット解析によって調べた (図31)。pSgPL1のcDNAインサート中にはHindIIIの制限酵素部位が一つあるが、EcoRI及びEcoRVによって切断される部位はない。HindIII、EcoRI及びEcoRVで切断した雄性個体と雌性個体のゲノムDNAは、双方ともSgPL1のcDNAプローブに強くハイブリした。EcoRVで切断後のゲノムDNAに対するSgPL1のハイブリダイゼーションのパターンは雄性個体と雌性個体で異なり、制限酵素断片長多型が確認された。しかしながら、この違いは性差によるものではなくクローン間差によるものと考えられる。SgPL1に相当するバンドはどの制限酵素で切断した場合にも二本以上あることから、SgPL1は2, 3個の遺伝子でコードされていると考えられる。

SgPL1遺伝子の発現の器官特異性

ヤナギ植物体の様々な器官から抽出した全RNAを用いてRNAゲルブロット解析を行い、SgPL1遺伝子の発現の器官特異性を解析した (図32)。長さ1.5 kbのSgPL1転写産物は全ての器官で検出されたが、転写産物の量は茎と雄性花序で多く、根ではきわめて少なく、葉と雌性花序ではその中程度であった。また、SgPL1の発現は葉と茎の発達段階によって調節されていた (図32C)。茎頂分裂組織を含むシュート先端ではSgPL1の転写産物の量はあまり多くなく、急速に伸長する若い葉や上部の茎で発現量が増加した。エイジングの進んだ組織である成熟葉や基部の茎では発現量が再び少なくなった。さらに、雄花と雌花の発達過程におけるSgPL1の発現調節についても解析した (図32E)。SgPL1の転写産物は雄花と雌花の全ての発達段階で検出されたが、雄花のセネッセンスが始まっているステージVの雄性花序での発現レベルはきわめて低かった。コントロー

ルとして使用したSbSUI1遺伝子は、全ての器官で高い発現を示した (Futamura *et al.*, 1998a)。

*SgPL1*遺伝子の発現の組織特異性

生殖器官での*SgPL1*の発現部位を詳しく解析するために、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った (図33)。雄ずいでは、急速な伸長成長を示すステージIIIの花糸で*SgPL1*の転写産物が見られた (図33A)。花粉特異的ポリガラクトツロナーゼである*SgPG4*の転写産物が検出される条件

(Futamura *et al.*, 2000a) でも、*SgPL1*の転写産物は花粉粒で検出されなかった (図33B, C)。雌ずいでは、柱頭、花柱の誘導組織及び子房室の表皮で*SgPL1*の転写産物が見られた (図33D, E, F)。成熟した雌ずいでは、*SgPL1*の転写産物は柱頭の分泌組織に局在していた。この結果は、花粉管の伸長経路に沿って存在する分泌組織 (Cheung, 1996) で*SgPL1*が発現することを示している。

*SgPL1*の転写産物は雄性花序と雌性花序の木部柔組織でも検出された (図33G)。ステージIとIIの雄ずい及び雌ずいでは*SgPL1*の転写産物を検出できなかったが、RNAゲルブロットで検出された発達段階初期の*SgPL1*の発現 (図32E) は花序の木部柔組織での発現を反映しているのかもしれない。

ストレスによる*SgPL1*遺伝子の発現の誘導

葉をシュートから切断して水に浸けるというストレス処理を行うと、処理後1時間に*SgPL1*の発現が大きく誘導された (図34)。処理後24時間経過した葉は、実験開始前と形態的に変わらなかった。一過性の誘導が見られた後の24時間後に、マンニトールやポリエチレングリコールを添加することにより浸透圧ストレスをかけると、再び*SgPL1*が速やかに誘導された。ジャスモン酸、メチルジャスモン酸、アブシジン酸、サリチル酸、オーキシンは、いずれの物質も*SgPL1*の発現の誘導に影響を及ぼさなかった。

6-4 考察

本章では、カワヤナギのPL遺伝子である*SgPL1*の構造と組織特異的発現及びストレスによる発現誘導について述べた。*SgPL1*タンパク質は既知のPLで保存されている構造的特徴を有していた(図29)。これまでに、*E. chrysanthemi*のpelCの部位特異的突然変異誘発や三次元構造解析、PLスーパーファミリーの構造に基づいた配列の比較によって、触媒活性に関係すると思われるアミノ酸残基が同定されている(Pickersgill *et al.*, 1994, Yoder and Jurnak 1995, Henrissat *et al.*, 1995, Kita *et al.*, 1996, Lietzke *et al.*, 1996, Scavetta *et al.*, 1999)。酵素活性に関係すると思われるアミノ酸残基やCa²⁺と配位すると考えられるアミノ酸残基に関しては、*SgPL1*は*E. chrysanthemi*のPLと同一か極性の似たアミノ酸残基を有していた(図29)。植物のPLの系統樹解析を行うと、非花粉特異的PLは一つのグループのまとめられ、花粉特異的PLと区別することができた(図30)。さらに、*SgPL1*の282番目のアミノ酸残基グルタミン酸と293番目のアミノ酸残基ヒスチジンは非花粉特異的PLに共通してみられるが、花粉に特異的なPLには見られなかった(図29)。植物のPLの系統樹解析や非花粉特異的PLにのみ見られるアミノ酸残基の同定は、初めての知見である。

花粉以外の組織で発現する植物のPLは、遺伝子の発現の場から3つのタイプに分類される。一つは、イチゴやバナナの果実のcDNAライブラリーから単離された果実特異的PLである

(Domínguez-Puigjaner *et al.*, 1997, Medina-Escobar *et al.*, 1997)。このタイプのPLは果実の登熟に際し、細胞壁のペクチンを分解する役割を担うものと考えられている。2番目のタイプに属するのは、トマト雌ずいの花柱に特異的に発現する9612遺伝子である。9612遺伝子は、成熟した雌ずい以外の器官での発現レベルがきわめて低い。3番目は、オーキシンで誘導されるPLで、ヒャクニチソウから単離された*ZePel*がこれに相当する。*ZePel*の転写産物は根で最も豊富に存在し、茎や花では少ない。これに対し、*SgPL1*の転写産物のレベルは若い茎と花序で高く、根では低い(図31)。*SgPL1*の発現パターンは、上に挙げた3つのタイプのPLのいずれとも異なっている。従って、*SgPL1*はこれまでに知られていない新しいタイプの植物PLであるらしい。

in situ ハイブリダイゼーションの結果からは、*SgPL1*は上記の2番目と3番目のタイプのPLの性質を併せ持っているようである。雌ずいにおいて、*SgPL1*は柱頭の分泌組織、花柱の誘導組織及び

子房室の表皮で発現していた。この発現パターンは、トマトの9612遺伝子の発現様式と一部一致している。9612遺伝子の主な発現は、花柱の上3分の1から3分の2の位置の誘導組織に限定されていた。これに対し、雌ずいでの*SgPL1*の発現は花粉管の伸長経路 (Cheung, 1996) に沿って広い範囲の組織で発現していた。これらの組織は、心皮原基の同じ細胞層に由来し、花粉管の伸長に関して似たような働きをしていると考えられている (Satina, 1944)。花柱から分泌し、花粉管の細胞壁の合成に使われると考えられているペクチン分解産物の生成 (Kroh *et al.*, 1970) に*SgPL1*が関わっているのかもしれない。さらに、急速な伸長成長を示す雄ずいの花糸と、木部への分化が進行している組織にも*SgPL1*の転写産物の局在が見られた (図33)。この結果は、木部分化やオーキシンによる伸長成長で発現が誘導されるヒャクニチソウ*ZePel*と一致する部分がある。分化や伸長に必要な新たな細胞壁を形成するために、既に存在するペクチンマトリックスを除去したり修飾したりすることに*SgPL1*は関わっているのかもしれない。

*SgPL1*は、切断葉や浸透圧ストレスでも発現が誘導された。菌のPLは病原性に関与することが知られているが、植物のPLが防御機構に関わっているという報告はない。ペクチンを分解する酵素の一つポリガラクトナーゼに関しては、エリターとして作用するシステミン、オリゴ糖や傷害によって誘導されるという報告がトマトである (Bergy *et al.*, 1999)。病虫害や傷害、塩ストレスに関わっている化学的シグナルとして、サリチル酸やジャスモン酸、アブシジン酸といったものが挙げられるが、これらは*SgPL1*の発現に影響を及ぼさなかった。植物では、オリゴ糖がシグナルとして働く例が知られていることから (Tran Thanh Van *et al.*, 1985; Albersheim *et al.*, 1992)、ペクテトリアーゼによるペクチン分解産物が*SgPL1*の発現誘導に関わっているのかもしれない。あるいは、様々な環境応答に関与するCa²⁺ (Knight, 2000) やMAPキナーゼカスケード (Meskiene and Hirt, 2000) がシグナル伝達系として働いていることも考えられる。化学的シグナルではなく、膨圧の変化 (Malone, 1992) または細胞電位の変化 (Wilton *et al.*, 1992) による物理的シグナルが、*SgPL1*の発現を誘導するシグナル因子として働いている可能性もある。

本研究から、*SgPL1*は細胞の伸長や木部への分化、分泌組織の発達や花粉管の誘導、ストレスに対する応答と行った幅広い機能を有することが示唆された。

```

AATCCTTCCATATGAACAAAGAGAGCAATGACAATTCACCTTTCTCTTTGATCCTTCTGCTGCTTATTTTAGCTCCAAATTCATTT 90
      M N K E R A M T I P L S L S I L L L I L A P N F I S 27

CCTGTTCCGCAGTTCAAGATCCTGAAGTGGTAGTGGAAGAAGTACACAGGAGCATCAATGCCTCCAGAAGAAAAGTGGGTTTCCTTTTCAT 180
      C S P V Q D P E V V V E E V H R S I N A S R R K L G F L S C 57
      ↑

GTGGAACCGGCAATCCGATAGACGATTGCTGGAGATGTGACCCCAAATGGGGGGAGAATCGGCAGAGATTAGCAGATTGTGCAATCGGGT 270
      G T G N P I D D C W R C D P K W G E N R Q R L A D C A I G F 87

TCGGCAAGCACGCTATCGGCGGCAGGGATGGCAAGATATATGCAGTGACAGACTCCGGCGACGATGACCCTGTGAATCCCAAGCCAGGCA 360
      G K H A I G G R D G K I Y A V T D S G D D D P V N P K P G T 117
      I

CTCTTAGGTATGCTGTTATACAGGACGAGCCTCTGTGGATCGTTTTGCTCGGACATGGTGATCAAGCTCAGGGAAGAGCTGATCATGA 450
      L R Y A V I Q D E P L W I V F A R D M V I K L R E E L I M N 147

ACTCTTTCAAGACGATCGATGGAAGAGGAGCCAGCGTGCACATTGCTGGTGGTCCATGCATCACTATACAGTATGTGACCAACATTATAA 540
      S F K T I D G R G A S V H I A G G P C I T I Q Y V T N I I I 177

TCCATGGTGTAATATTCATGACTGCAAGCGAGGAGGGAATGCTCATGTGAGGGATTGCGCGAGTCATTATGGATGGCGGACTGTTTCGG 630
      H G V N I H D C K R G G N A H V R D S P S H Y G W R T V S D 207

ACGGAGATGGGGTGTCGATATTCGGAGGCAGCCATGTTTGGGTGGATCATTGCTCTCTATCCAAGTCAATGATGGGTTGATCGACGCGA 720
      G D G V S I F G G S H V W V D H C S L S N C N D G L I D A I 237
      II

TTCATGGATCCACGGCGATAACAATCTCAAACAATTACCTGACCCATCACAACAAGGTCATGCTCCTGGGTCACAGTGATAGCTATAAAC 810
      H G S T A I T I S N N Y L T H H N K V M L L G H S D S Y K Q 267
      III

AGGACAAGAACATGCAAGTCACCATTCGCTTCAACCACTTTGGTGAAGGACTTGTGCAGAGAATGCCAAGGTGCAGACATGGATATTTTC 900
      D K N M Q V T I A F N H F G E G L V Q R M P R C R H G Y F H 297
      IV

ACGTGGTGAATAATGACTACACGCATTGGAAAATGTATGCAATTGGCGGCAGTGCTGACCCTACAATTAATAGCCAAGGCAATAGATTTTC 990
      V V N N D Y T H W K M Y A I G G S A D P T I N S Q G N R F L 327

TTGCTCCCAATGATAGGTTTAATAAAGAGGTGACTAAACACGAGGATGCACCGCAGAGTGCTTGAAGGGGTGGAAGTGGAGGTCTGAAG 1080
      A P N D R F N K E V T K H E D A P Q S A W K G W N W R S E G 357

GGGATTTGCTGCTGAACGGAGCATTCTTACGGCATCCGGTGCCGGAGCTTCTTCTAGCTACGCCAAGGCGTCAAGCTTAGGTGCAAGAT 1170
      D L L L N G A F F T A S G A G A S S S Y A K A S S L G A R S 387

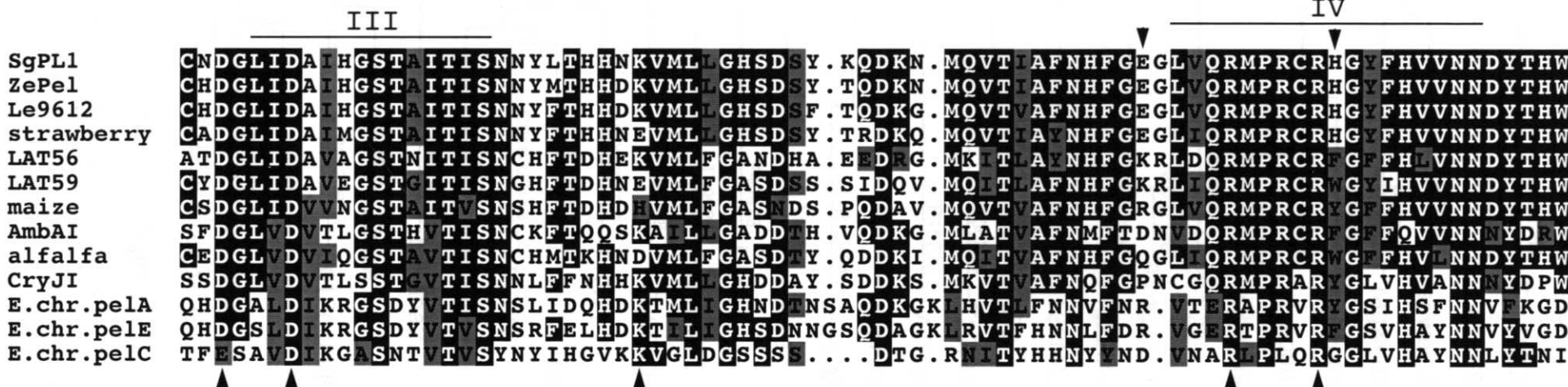
CGTCTTCCTTGGTTAGCTCCATCACGGCAGGAGCAGGCTCACTCGTTTGCAAGAAGGGTTCCCGGTGCTGATAACTGGCTCTGCACAACA 1260
      S S L V S S I T A G A G S L V C K K G S R C 409

CCCCATCAACTGTATAATTCAAGTAATGATCGAAGGTTTGAGAAATGAAAGGAAGTTAATAAAGGCAACTGTAATTATTACAAGGAGTTA 1350
      GCTGGCTCAATCGGACTCGACTATCTCCCTGTACACTATACTAATCTGTCAGCTTTTCTGTGGCAAGAGCTGCCTCTTTCCATGAAACCC 1440
      GCCACCCATCAGAATCCTGATGGAGCAAAAAAAAAA 1476

```

図28 *SgPL1* cDNAの塩基配列と予想されるアミノ酸配列

アミノ酸配列を塩基配列の下に示した。仮想されるシグナルペプチドの切断部位を上向きの矢印で示した。N-グリコシル化されることが予想される部位に下線を引いた。*SgPL1*アミノ酸配列内の保存領域 (I-IV) を四角で囲った。塩基配列とアミノ酸配列は登録番号AB048260でデータベースに記載されている。



SgPL1のアミノ酸配列と9つの植物PL及び *Erwinia chrysanthemi* (E. chr.) pelA, pelC, pelEを比較した。反転文字のアミノ酸は13個のPLのうち少なくとも7つが一致しているもの、灰色のボックスで囲まれているアミノ酸は相似であるものを示している。図中にある点は配列間の相同性を最大化したときに生じるギャップを表している。基質との結合, Ca²⁺との結合, プロトン輸送に関わっていると考えられているアミノ酸残基 (Pickersgill *et al.*, 1994; Yoder and Jurnak 1995; Henrissat *et al.*, 1995; Kita *et al.*, 1996; Lietzke *et al.*, 1996; Scavetta *et al.*, 1999) は上向きの矢尻印で示した。非花粉特異的なPLでのみ保存されているアミノ酸残基は下向きの矢尻印で示した。

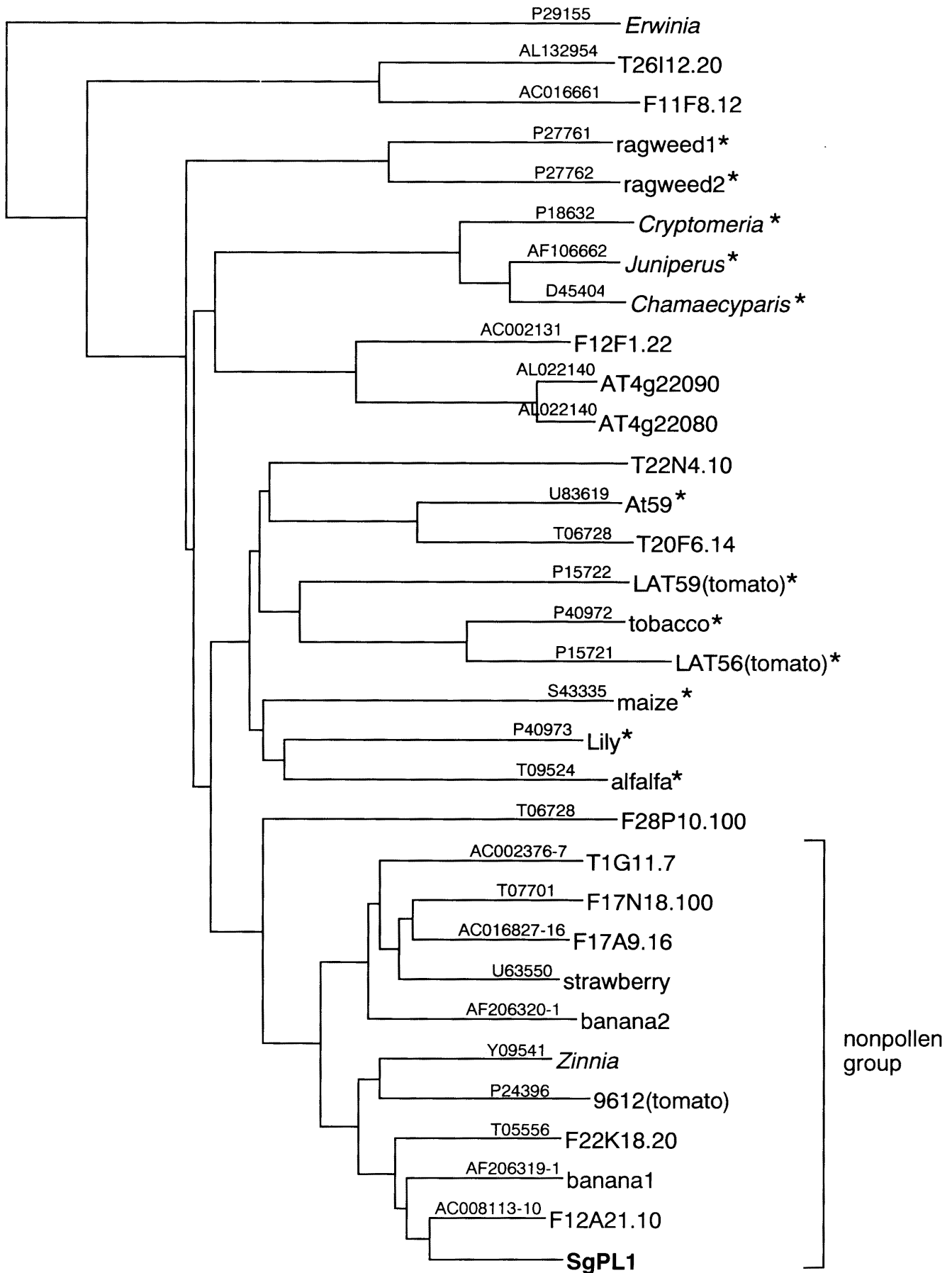


図30 植物のPLと*Erwinia pelA*の系統樹

Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) を用いて無根系統樹を作成した。PIRかSwiss Prot, もしくはGenBankに記載されている登録番号を図中に示した。植物の通称か属名を記していないものは、シロイヌナズナ由来のポリペプチドである。花粉特異的発現が報告されているものや花粉由来のcDNAライブラリーから単離されたものにはアスタリスクをつけた。

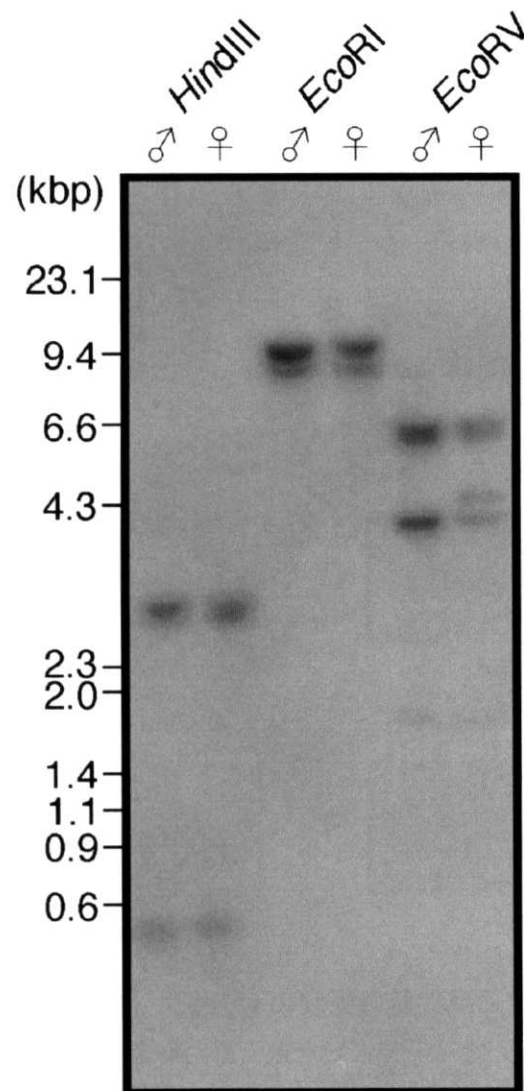


図 31 *SgPL1* 遺伝子の DNA ゲルブロット解析

バッコヤナギとカワヤナギの雄性個体と雌性個体の若い葉からゲノム DNA を調整した。DNA ($0.9 \mu\text{g}$) を *HindIII*, *EcoRI* 及び *EcoRV* で別々に制限酵素処理し、0.7% アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロン膜に転写した。 ^{32}P で標識した pSgPL1 の cDNA インサートをプローブとして解析した。左側にサイズマーカーの位置を示した。

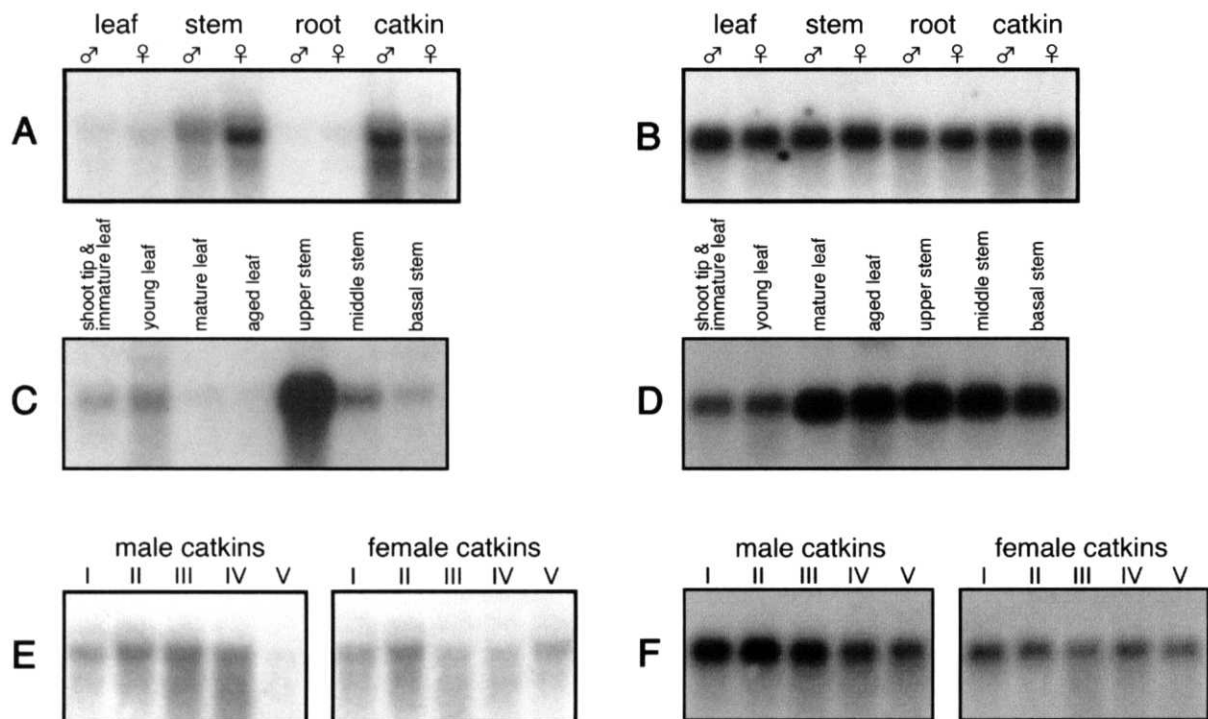


図 32 *SgPL1* の発現の器官特異性

(A) と (B) は雄性個体と雌性個体の葉、茎、根及びステージ IV の花序から、(C) と (D) は雄性個体の未成熟葉を含むシュート先端、若い葉・成熟葉・老齡葉、上部・中間・基部の茎から、(E) と (F) はサイズによって 5 つのステージに分類した花序 (Futamura *et al.*, 1999) から、RNA を調製した。10 μ g (A, B, E, F) もしくは 5 μ g (C, D) の全 RNA をホルムアルデヒドを含む 1.0% アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロン膜に転写した。 32 P で標識した pSgPL1 の cDNA インサートをプローブとして解析した (A, C, E)。酵母の翻訳開始因子 SUI1 のホモログをコードする pSbSUI1 の cDNA インサート (Futamura *et al.*, 1998a) をポジティブコントロールとして用いた (B, D, E)。

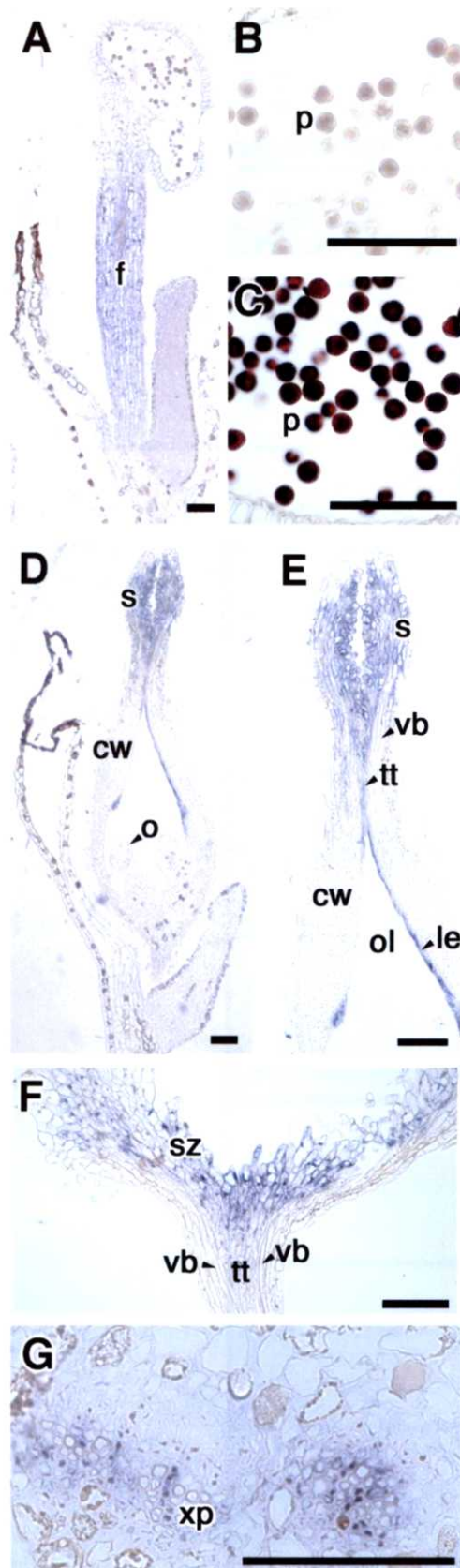


図 33 *SgPL1* の発現部位の *in situ* ハイブリダイゼーションによる解析

8 μ m の厚さの切片にジゴキシゲニンで標識した RNA プローブを用いて解析した。(A) *SgPL1* に対応するアンチセンス RNA プローブを用いたときの雄花ステージ III の縦断面切片。(B) と (C) *SgPL1* と *SgPG4* (Futamura *et al.*, 2000a) に対応するアンチセンス RNA プローブを用いたときの雄花ステージ III の葯切片。(D) と (E) *SgPL1* に対応するアンチセンス RNA プローブを用いたときの雌花ステージ III の縦断面切片。(F) *SgPL1* に対応するアンチセンス RNA プローブを用いたときのステージ IV の雌ずい先端の縦断面切片。(G) *SgPL1* に対応するアンチセンス RNA プローブを用いたときの雄性花序ステージ II の横断面切片。cw, 心皮壁; f, 花糸; le, 室の表皮; o, 子房; ol, 子房室; p, 花粉; s, 柱頭; sz, 柱頭の分泌領域; tt, 誘導組織; vb, 維管束; xp, 木部柔組織。バーは 100 μ m。

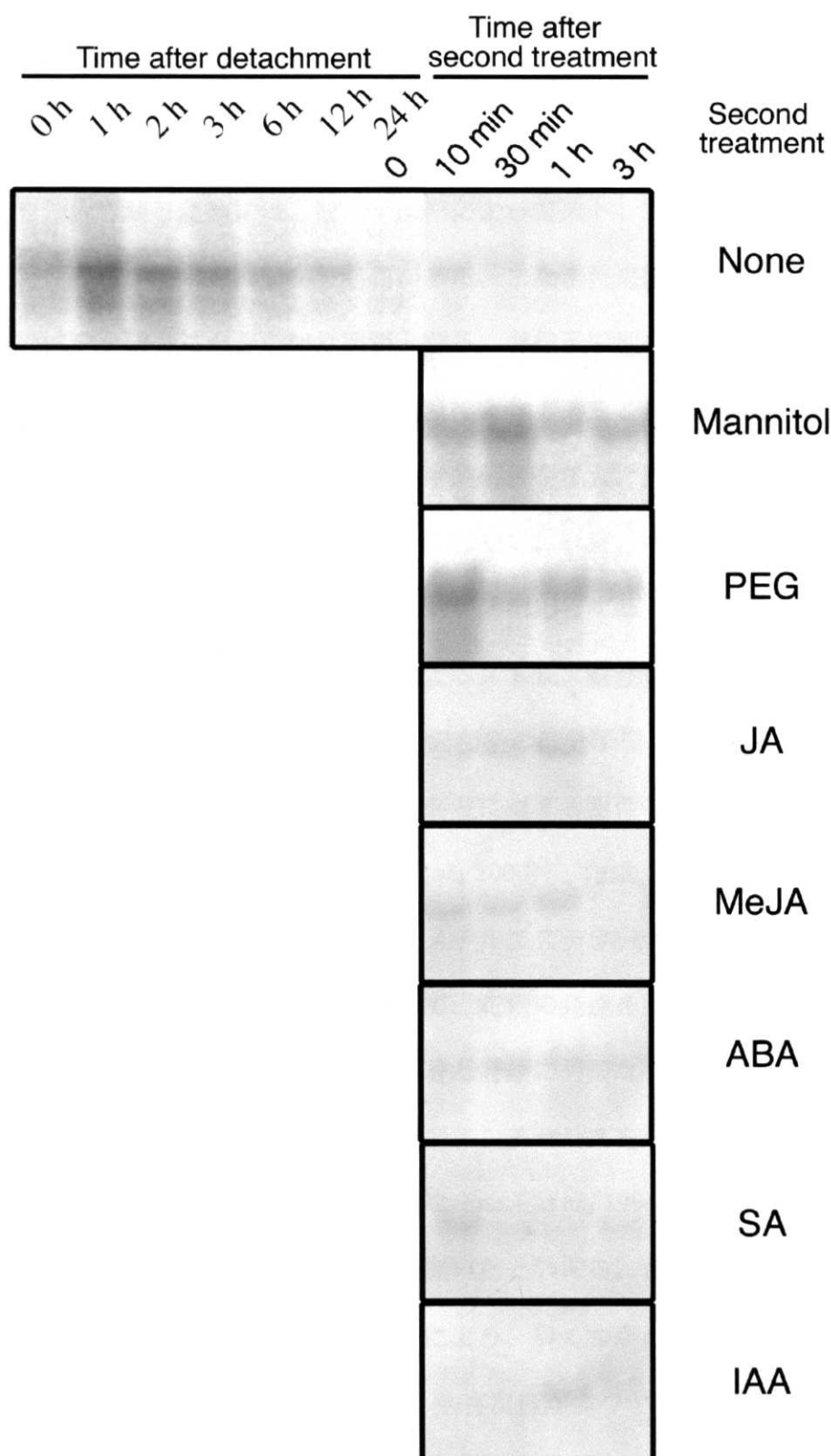


図 34 *SgPL1* の発現に及ぼす化学物質の影響

健全な葉を葉柄の根元から切り取り、脱イオン水の上に浮かべた。切断から 24 時間後に、100mM マンニトール (Mannitol)、20% ポリエチレングリコール (PEG)、10 μ M ジャスモン酸 (JA)、10 μ M メチルジャスモン酸 (MeJA)、10 μ M アブシジン酸 (ABA)、10 μ M サリチル酸 (SA)、10 μ M インドール酢酸 (IAA) をそれぞれ含む液に葉を移し替えた。無処理の葉 (None) をコントロールとした。切断後の時間と二次処理後の時間を示している。それぞれの時間で回収した葉から RNA を抽出した。

第7章 総合討論

ヤナギ属植物は、エネルギー林業に最も適した樹木であるといえる。今後、ヤナギ属植物のバイオマス生産を増大させるためには、遺伝子操作によってストレスに対する抵抗性や栄養生長の増大といった特性をもつ樹木を開発する必要がある。また、将来組換え体を実用化するには、組換え遺伝子の拡散を防ぐことが重要な課題となる。遺伝子の拡散を防止するためには、花粉を飛散させないもしくは不稔性の花粉を生産する組換え体であることが望ましい。本研究では、ヤナギ属の環境適応性と雌雄性に関して分子生物学的解析を加え、雄性生殖器官に特異的に発現する遺伝子やストレス応答に関わる遺伝子を明らかにした。単離した遺伝子は、将来のヤナギ属植物の遺伝子操作に利用可能な遺伝子である。ストレスに応答する熱ショックタンパク質遺伝子やペクチンリアーゼ遺伝子は、遺伝子組換えによるストレス耐性付与に利用できる。草本植物では、ストレスにより誘導されるHsp101や葉緑体局在型の低分子量熱ショックタンパク質、あるいはグリシンベタインを高発現させることにより高温に対する耐性を付与した例が知られている

(Alia *et al.*, 1998; Harndahl *et al.*, 1999; Queitsch *et al.*, 2000)。また、花粉や雄性花序に特異的に発現するポリガラクトツロナーゼ遺伝子、ペクチンメチルエステラーゼ遺伝子、 β -1,3-グルカナーゼ遺伝子は、アンチセンス法を用いることによって、花粉の発達を抑制した組換え体の作出に利用できるであろう。草本植物では、花粉の色素沈着と発達に必要なフラボノイド合成に関係する酵素の遺伝子や、花の形態形成に関与する遺伝子のアンチセンスを導入することによって、不稔化することに成功している (van der Meer *et al.*, 1992; Pnueli *et al.*, 1994)。本研究により、エネルギー林業に適する新たなヤナギ属を開発する道を開いたといえる。さらに、環境適応性に関する生理学的解析や単離した遺伝子の発現特性の解析により、いくつかの重要な知見を明らかにした。

環境適応性に関しては、第2章において異なる生育温度がカワヤナギの成長に与える影響について解析した。自然日長下、20℃/15℃、25℃/20℃、30℃/25℃(昼/夜)の3種類の温度条件で生育させ、シュートの成長曲線と9ヶ月後の全乾燥重量を比較したところ、シュートの初期成長や全乾燥重量に有意差は見られなかった(図1, 表1)。この結果は、カワヤナギが幅広い温度環境に適応できることを示している。しかし、低温で育てた個体を高温に移すと光合成のレベルは大幅に

下降する（表4）ことから、カワヤナギが急激な温度上昇を強いストレスと感知することが明らかになった。このように、カワヤナギは短時間の温度上昇をストレスとして対応するシステムと、長時間高温にさらされることによって獲得する順応システムの両方を兼ね備えている。第2章の解析結果から、高温環境に順応するシステムとして、①光合成速度と呼吸速度が高くなること（表4）、②活発な蒸散を維持するために幹の導管の数を増加させること（表3）、③シンク・ソース比を変化させて、光合成器官に多く根に少なく同化産物を分配すること（表1）が明らかになった。

短時間の温度上昇に対するストレス応答に関しては、分子生物学的あるいは生化学的アプローチが必要となる。第3章では、カワヤナギのcDNAライブラリーから代表的な熱ショックタンパクであるDnaJホモログをコードするcDNAクローンを3種類（pSGJ1, pSGJ2, pSGJ3）とHsp70をコードするcDNA断片（pSGK1）を単離し、発現特性について解析した。cDNAの構造から、pSGJ1とpSGJ2は同じ遺伝子（*SGJ1*）に由来する成熟型mRNAと前駆体型mRNAに対応するcDNAクローンであることが明らかになった。それぞれのcDNAクローンに対応する遺伝子の熱ストレスによる発現誘導を調べた結果、*SGJ3*は葉において発現が誘導されたが、*SGJ1*は熱ストレスによる発現の誘導がほとんど見られなかった（図12A）。この結果から、*SGJ3*は温度変化に対して防御的に働く典型的な熱ショックタンパク質であるが、*SGJ1*は熱ストレスにより誘導されることの少ない熱ショックタンパク質コグネート（cognate）であることが明らかになった。また、*SGJ1*と*SGJ3*は熱ストレスを与えない通常組織でも発現していたが、各器官や組織における発現特性はそれぞれの遺伝子により大きく異なっていた（図8, 図10, 図11）。このように、DnaJホモログをコードする遺伝子ファミリーにも、それぞれの遺伝子により異なる役割を担っていることが明らかになった。植物のHsp70ファミリーに関しては、遺伝子によって器官や環境ストレスによる発現特性が異なることが報告されている（Guy and Li, 1998）。しかし、DnaJホモログに関しては多重遺伝子族を構成するメンバーがいくつか単離されてはいたものの（Zhu *et al.*, 1998b; Preisig-Müller and Kindl, 1993; Zhou *et al.*, 1995; Schlicher and Soll, 1997; Kroczyńska *et al.*, 199; Lin and Lin, 1997）、発現特性を比較した解析は全くなかった。植物のDnaJホモログファミリーの構成遺伝子の役割の違いは、本研究により初めて明らかにされた。本研究では、ヤナギ属植物のDnaJホモログ及びHsp70ファミリーの一部について解析した。DnaJホモログ及びHsp70のコピー数と各々の役割についてはさ

らなる解析が必要である。植物も酵母と同じように各種のDnaJホモログがそれぞれ決まったHsp70パートナーと協調して働き、未変性タンパク質への結合パターンを決定していると推測される (Silver and Way, 1993; Cyr and Douglas, 1994; Cyr *et al.*, 1994) が、詳しい解析はなされていない。植物におけるDnaJホモログとHsp70の協調関係については、今後の研究の進展が期待される。

さらに、温度変化以外のストレス応答に関係している遺伝子として、第6章でペクテトリアーゼ遺伝子を解析した。葉をシュートから切断して水に浸けるというストレス処理を行うと、カワヤナギのペクテトリアーゼ遺伝子 (*SgPL1*) は処理後1時間に発現が大きく誘導された (図34)。また、浸透圧ストレスによっても発現が誘導された (図34)。植物のPLがストレスに応答するという報告は、本研究が世界で最初のものである。*SgPL1*は雄ずいの花糸や雌ずいの柱頭、形成層の木部側でも発現していることから、細胞の伸長や分化、ストレスに対する応答といった幅広い機能を有していることが示唆された。*SgPL1*の発現をコントロールする化学的シグナルを同定するために、サリチル酸、ジャスモン酸、アブシジン酸、インドール酢酸を作用させたが、これらは*SgPL1*の発現に影響を及ぼさなかった (図34)。植物では、オリゴ糖がシグナルとして働く例が知られていることから (Tran Thanh Van *et al.*, 1985; Albersheim *et al.*, 1992)、ペクテトリアーゼによるペクチン分解産物が*SgPL1*の発現誘導に働いている可能性もある。細胞の伸長・分化とストレス応答という様々な機能を持つ*SgPL1*の発現制御にかかわる因子を明らかにすることにより、これらの生理機能に共通するシグナル伝達系が解明されることが期待される。

ヤナギ科植物は雌雄異株であるが、雌雄分化の機構は全く不明である。雌雄異株のモデル植物としてよく利用されているメランドリウム (*Silene latifolia* = *Melandrium album*) でも、雄花特異的発現を示す遺伝子や性染色体に特異的な塩基配列が見つかったものの、雌雄分化の分子機構の解明までにはいたっていない (Hardenack *et al.*, 1994; Donnison *et al.*, 1996; Matsunaga *et al.*, 1996; Barbacar *et al.*, 1997; Label-Hardenack *et al.*, 1997; Scutt *et al.*, 1997)。雌雄異株植物の雌雄の分化は、Y染色体によって決定されるもの (*Melandrium album*: van Nigtevecht, 1966)、X染色体と常染色体との比によって決定されるもの (*Rumex acetosa*, *Humulus lupulus*: Parker and Clark, 1991)、性染色体を持たずに遺伝子の組み合わせによって決定されるもの (*Mercurialis annua*: Louis, 1989; Durand and Durand, 1991) と様々である。植物における雌雄分化の機構はきわめて多様であり、共通の機

構は存在しそうにない (Ainsworth *et al.*, 1998)。ヤナギ科植物に関しては、性染色体の存在も未確定であり、何によって雌雄の分化が決定されるのか全く明らかになっていない。本研究では、雌雄分化の分子メカニズムを解析するための第一段階として、バッコヤナギ雄性花序由来のcDNAの塩基配列を解析した (表5)。さらに、得られたcDNA断片をプローブとして、花粉特異的に発現するポリガラクトナーゼ遺伝子とペクチンメチルエステラーゼ遺伝子 (図27) をカワヤナギから単離した。タペータムで発現すると考えられる β -1,3-グルカナーゼ遺伝子も単離した。これらの遺伝子はいずれも雄性花序に特異的に発現する (図25) もの、雌雄いずれの個体にも同じコピー数の遺伝子を有していた (図24)。このことから、雄性個体でのみ発現し、花粉の発達や花粉管の伸長に寄与すると考えられる遺伝子でも、遺伝子自体は雌雄ともに保持していることが明らかになった。RAPD法によるカワヤナギの雌雄判別マーカーの開発を試みた実験では、個体識別に使用可能なマーカーは得られたものの、性判別に使用できるマーカーは得られなかった (伊ヶ崎ら, 2000)。他のヤナギ属植物においても、RAPDやAFLPを用いて遺伝的多様性を評価することが試みられているものの、雌雄性と結びつけられるDNAマーカーは見いだされていない (Zsuffa, 1995; Barker *et al.*, 1999)。今後、雄性個体にのみ存在する遺伝子を探索するには、雌雄のゲノミックDNAのサブトラクションや、いまだ存在が未確定の性染色体の分離といったことが必要となるであろう。このような試みにより性決定に関わる遺伝子を単離することができるかもしれない。性特異的なDNAマーカーは、開花以前の雌雄判別にも利用することができる。一方、植物ホルモンが雌雄の分化に重要な役割を果たすことも知られている。例えば、雌雄異株植物である *Mercurialis annua* では、オーキシンによって雄花が誘導され (Dauphin-Guerin *et al.*, 1980; Hamdi *et al.*, 1987)、サイトカイニンによって雌花が誘導される (Durand and Durand, 1991)。ヤナギ属植物においても植物ホルモンが雌雄分化にどのような影響を与えるか検討する必要がある。

本研究では、ヤナギ属植物の環境適応性と雌雄性に関して分子生物学的解析を行い、雄性生殖器官に特異的に発現する遺伝子群やストレス応答に関わる遺伝子の発現特性を明らかにした。これらの遺伝子のほとんどは林木で初めて単離されたものである。単離した遺伝子が、遺伝子操作技術による樹木の生殖器官の発達や樹木の成長の制御に利用されることを期待する。

謝辞

本論文のとりまとめにあたり、東京大学アジア生物資源環境研究センター教授 宝月岱造博士、助教授 小島克己博士、助教授 高野哲夫博士、東京大学農学部教授 鈴木和夫博士、教授 井出雄二博士には貴重なご指導とご鞭撻を賜りました。心よりお礼を申し上げます。

本研究は、農林水産省森林総合研究所遺伝子発現研究室で行われたものです。その遂行にあたり、森林総合研究所遺伝子発現室長 篠原健司博士に終始ご指導をいただきました。厚くお礼を申し上げます。共同研究者の森林総合研究所 長尾精文博士、名古屋大学農学部助教授 森仁志博士、南（石井）尚子博士、信州大学遺伝子実験施設助教授 林田信明博士、農林生物資源研究所窒素固定研究室長 河内宏博士に心より感謝の意を表します。また、ヤナギ属植物の形態について御教授下さいました森林総合研究所群落生態研究室長 新山馨博士に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行並びに成果のとりまとめには多数の上司並びに同僚の御指導と御協力によるところが大きく、これらの御高配を賜った各位に感謝の意を表します。

引用文献

- Ainsworth C, Parker J, Buchanan-Wollaston V** (1998) Sex determination in plants. *Curr. Top. Dev. Biol.* **38**: 167-223
- Albani D, Altosaar I, Arnison PG, Fabijanski, F** (1991) A gene showing sequence similarity to pectin esterase is specifically expressed in developing pollen of *Brassica napus*. Sequences in its 5' flanking region are conserved in other pollen-specific promoters. *Plant Mol. Biol.* **16**: 501-513
- Albani D, Sardana R, Robert LS, Altosaar I, Arnison PG, Fabijanski SF** (1992) A *Brassica napus* gene family which shows sequence similarity to ascorbate oxidase is expressed in developing pollen. Molecular characterization and analysis of promoter activity in transgenic tobacco plants. *Plant J.* **2**: 331-342
- Albersheim P, Darvill A, Augur C, Cheong J-J, Eberhard S, Hahn MG, Marfà V, Mohnen D, O'Neill MA, Spiro MD, York WS** (1992) Oligosaccharins: Oligosaccharide regulatory molecules. *Acc. Chem. Res.* **25**: 77-83
- Alia, Hayashi H, Sakamoto A, Murata N** (1998) Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. *Plant J.* **16**: 155-161
- Alliende MC** (1989) Demographic studies of a dioecious tree. II. The distribution of leaf predation within and between trees. *J. Ecol.* **77**: 1048-1058
- Alliende MC, Harper JL** (1989) Demographic studies of a dioecious tree. I. Colonization, sex and age structure of a population of *Salix cinerea*. *J. Ecol.* **77**: 1029-1047
- Appels R, Bouchard RA, Stern H** (1982) cDNA cloned from meiosis-specific poly(A)+ RNA in *Lilium* homology with sequences in wheat, rye, and maize. *Chromosoma* **81**: 349-363
- Azuma T, Kajita T, Yokoyama J, Ohashi H** (2000) Phylogenetic relationships of *Salix* (Salicaceae) based on *rbcL* sequence data. *Am. J. Bot.* **87**: 67-75
- Baas P** (1982) Systematic, phylogenetic, and ecological wood anatomy-history and perspectives. In Baas P (ed), *New perspectives in wood anatomy*. pp23-58. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ., The Hague
- Baltz R, Domon C, Pillay DTN, Steinmetz A** (1992) Characterization of a pollen-specific cDNA from sunflower encoding a zinc finger protein. *Plant J.* **2**: 713-721
- Barbacar N, Hinnisdaels S, Farbos I, Monéger F, Lardon A, Delichere C, Mouras A, Negrutiu I** (1997) Isolation of early genes expressed in reproductive organs of the dioecious white campion (*Silene latifolia*) by subtraction cloning using an asexual mutant. *Plant J.* **12**: 805-817
- Barker JHA, Matthes M, Arnold GM, Edwards KJ, Åhman I, Larsson S, Karp A** (1999) Characterisation of genetic diversity in potential biomass willows (*Salix* spp.) by RAPD and AFLP analyses. *Genome* **42**, 173-183
- Barros RS, Neill SJ** (1986) Periodicity of response to abscisic acid in lateral buds of willow (*Salix viminalis* L.). *Planta* **168**: 530-535
- Bazzaz FA** (1979) The physiological ecology of plant succession. *Annu. Rev. Eco. Syst.* **10**: 351-371
- Bazzaz FA, Carlson RW** (1982) Photosynthetic acclimation to variability in the light environment of early and late successional plants. *Oecologia* **53**: 313-316
- Bergey DR, Orozco-Cardenas M, De Moura DS, Ryan CA** (1999) A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1756-1760
- Berggren B** (1984) Ultrastructure of the histological zones in growing vegetative buds of *Salix* spp. *Nord. J. Bot.* **4**: 771-789

- Berggren B** (1985) Ultrastructure of dormant buds of willow (*Salix* spp) in early winter. Nord. J. Bot. **5**: 475-488
- Berggren B** (1987) Structure and cytochemistry of the procambium in *Salix* buds during dormancy and dormancy breaking. Nord. J. Bot. **7**: 153-167
- Berthomieu P, Guerrier D, Giraudat J** (1995) EMBL accession number Z26457 (unpublished)
- Besansky NJ, Hamm DM, Collins FH** (1994) An *Anopheles gambiae* cDNA predicts a protein similar to a yeast Sui1 translation factor. Gene **141**: 299-300
- Bierzzychudek P, Eckhart V** (1988) Spatial segregation of the sexes of dioecious plants. Am. Nat. **132**: 34-43
- Blackburn KB, Harrison JWH** (1924) A preliminary account of the chromosomes and chromosome behaviour in Salicaceae. Ann. Botan. **38**: 361-378
- Blackburn KB** (1929) On the occurrence of sex chromosomes in flowering plants with some suggestions as to their origin. Proc. Intern. Congr. Plant. Sci. **1**: 299-306
- Bobak DA, Nightingale MS, Murtagh JJ, Price SR, Moss J, Vaughan M** (1989) Molecular cloning, characterization, and expression of human ADP-ribosylation factors: two guanine nucleotide-dependent activators of cholera toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 6101-6105
- Boecklen WJ, Price PW, Mopper S** (1990) Sex and drugs and herbivores: sex-biased herbivory in arroyo willow (*Salix lasiolepis*). Ecology **71**: 581-588
- Bouchard RA** (1990) Characterization of expressed meiotic prophase repeat transcript clones of *Lilium*: meiosis-specific expression, relatedness, and affinities to small heat shock proteins genes. Genome **33**: 68-79
- Brown SM, Crouch ML** (1990) Characterization of a gene family abundantly expressed in *Oenothera organensis* pollen that shows sequence similarity to polygalacturonase. Plant Cell **2**: 263-274
- Brunkener L** (1984) Gross morphology and anatomy of current shoots of *Salix*. Swed. Univ. Agric. Sci., Energy For. Proj. Rep. no. 34. 52pp
- Bucciaglia PA, Smith AG** (1994) Cloning and characterization of *Tag 1*, a tobacco anther β -1,3-glucanase expressed during tetrad dissolution. Plant Mol. Biol. **24**: 903-914
- Budelier KA, Smith AG, Gasser CS** (1990) Regulation of a stylar transmitting tissue-specific gene in wild-type and transgenic tomato and tobacco. Mol. Gen. Gent. **224**: 183-192
- Caplan AJ, Douglas MG** (1991) Characterization of YDJ1: a yeast homologue of the bacterial dnaJ protein. J. Cell Biol. **114**: 609-621
- Caplan AJ, Tsai J, Casey PJ, Douglas MG** (1992) Farnesylation of YDJ1p is required for function at elevated growth temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **267**: 18890-18895
- Caprari C, Mattei B, Basile ML, Salvi G, Crescenzi V, De Lorenzo G, Cervone F** (1996) Mutagenesis of endopolygalacturonase from *Fusarium moniliforme*: histidine residue 234 is critical for enzymatic and macerating activities and not for binding to polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP). Mol. Plant-Microbe. Interact. **9**: 617-624
- Chen L, Fincher GB, Høj PB** (1993) Evolution of polysaccharide hydrolase substrate specificity. J. Biol. Chem. **268**: 13318-13326
- Cheung AY** (1996) The pollen tube growth pathway: its molecular and biochemical contributions and response to pollination. Sex. Plant Reprod. **9**: 330-336

- Chirico WJ, Waters MG, Blobel G** (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332**: 805-810
- Christeresson L** (1987) Biomass production by irrigated and fertilized *Salix* clones. *Biomass* **12**: 83-95
- Collmer A, Keen NT** (1986) The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**: 383-409
- Crawford RMM, Balfour J** (1983) Female predominant sex ratios and physiological differentiation in arctic willows. *J. Ecol.* **71**: 149-160
- Crawford RMM, Balfour J** (1990) Female-biased sex ratios and differential growth in arctic willows. *Flora* **184**: 291-302
- Cresti M, Keijzer CJ, Trezzi A** (1986) Stigma of *Nicotiana*: ultrastructural and biochemical studies. *Am. J. Bot.* **73**: 1713-1722
- Cronquist A** (1988) *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. New York Botanical Gardens, Bronx, NY.
- Cyr DM, Douglas MG** (1994) Differential regulation of Hsp70 subfamilies by the eukaryotic DnaJ homologue YDJ1. *J. Biol. Chem.* **269**: 9798-9804
- Cyr DM, Langer T, Douglas MG** (1994) DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 176-181
- Danell K, Elmqvist T, Ericson L, Salomonson A** (1985) Sexuality in willows and preference by bark-eating voles: defense or not? *Oikos* **44**: 82-90
- Danell K, Hjältén J, Ericson L, Elmqvist T** (1991) Vole feeding on male and female willow shoots along a gradient of plant productivity. *Oikos* **62**: 145-152
- Darwin CR** (1877) *The different forms of flowers on plants of the same species*. 352pp. John Murray, London
- Dauphin-Guerin B, Teller G, Durand B** (1980) Different endogenous cytokinins between male and female *Mercurialis annua* L. *Planta* **148**: 124-129
- Dawson TE, Bliss LC** (1989) Patterns of water use and the tissue water relations in the dioecious shrub, *Salix arctica*: the physiological basis for habitat partitioning between the sexes. *Oecologia* **79**: 332-343
- de Pater BS, van der Mark F, Rueb S, Katagiri F, Chua N-H, Schilperoort RA, Hensgens LAM** (1992) The promoter of the rice gene *GOS2* is active in various different monocot tissues and binds rice nuclear factor ASF-1. *Plant J.* **2**: 837-844
- DeRocher A, Vierling E** (1995) Cytoplasmic HSP70 homologues of pea: differential expression in vegetative and embryonic organs. *Plant Mol. Biol.* **27**: 441-456
- Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, Scheckman R** (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* **332**: 800-805
- Devantier YA, Moffatt B, Jones C, Charest PJ** (1993) Microprojectile-mediated DNA delivery to the Salicaceae family. *Can. J. Bot.* **71**: 1458-1466
- Domingo C, Roberts K, Stacey NJ, Connerton I, Ruíz-Teran F, McCann MC** (1998) A pectate lyase from *Zinnia elegans* is auxin inducible. *Plant J.* **13**: 17-28
- Domínguez-Puigjaner E, Llop I, Vendrell M, Prat S** (1997) A cDNA clone highly expressed in ripe banana fruit shows homology to pectate lyases. *Plant Physiol.* **114**: 1071-1076

- Donnison IS, Siroky J, Vyskot B, Saedler H, Grant SR** (1996) Isolation of *Y* chromosome-specific sequences from *Silene latifolia* and mapping of male sex-determining genes using representational difference analysis. *Genetics* **144**: 1893-1901
- Duck N, McCormick S, Winter J** (1989) Heat shock protein hsp70 cognate gene expression in vegetative and reproductive organs of *Lycopersicon esculentum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3674-3678
- Duck NB, Folk WR** (1994) Hsp70 heat shock protein cognate is expressed and stored in developing tomato pollen. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1031-1039
- Durand B, Durand R** (1991) Sex determination and reproductive organ differentiation in *Mercurialis*. *Plant Sci.* **80**: 49-65
- Ebbelaar MEM, Tucker GA, Laats MM, van Dijk C** (1996) Characterization of pectinases and pectin methylesterase cDNAs in pods of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol. Biol.* **31**: 1141-1151
- Elmqvist T, Ågren J, Tunlid A** (1988a) Sexual dimorphism and between-year variation in flowering, fruit set and pollinator behaviour in a boreal willow. *Oikos* **53**: 58-66
- Elmqvist T, Ericson L, Danell K, Salomonson A** (1988b) Latitudinal sex ratio variation in willows, *Salix* spp., and gradients in vole herbivory. *Oikos* **51**: 259-266
- Ericsson T, Rytter L, Linder S** (1992) Nutritional dynamics and requirements of short rotation forests. In Mitchell CP, Ford-Robertson JB, Hinckley T, Sennerby-Forsse L (eds), *Ecophysiology of Short Rotation Forest Crops*. 35-65. Elsevier Appl. Sci., London
- Erlanson EW, Hermann FJ** (1927) The morphology and cytology of perfect flowers in *Populus tremuloides* Michx. *Papers Mich. Acad. Sci.* **8**: 97-110
- Farmer RE** (1964) Sex ratio and sex-related characteristics in Eastern Cottonwood. *Silvae Genet.* **13**: 116-118
- Ficker M, Wemmer T, Thompson RD** (1997) A promoter directing high level expression in pistils of transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **35**: 425-431
- Fields C, Adams MD** (1994) Expressed sequence tags identify a human isolog of the *SUII* translation initiation factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**: 288-291
- Fillatti JJ, Sellmer J, McCown B, Haissig B, Comai L** (1987) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 192-199
- Frankel R, Izhar S, Nitsan J** (1969) Timing of callase activity and cytoplasmic male sterility in *Petunia*. *Biochem. Genet.* **3**: 451-455
- Futamura N, Mori H, Shinohara K** (1998a) Molecular cloning of a cDNA (accession no. AB003378) encoding a homolog of the yeast translation initiation factor SUI1 from the Japanese willow (*Salix bakko* Kimura) (PGR 98-011). *Plant Physiol.* **116**: 446
- Futamura N, Mori H and Shinohara K** (1998b) Isolation and characterization of a cDNA (accession no. AB003377) encoding an ADP-ribosylation factor from the Japanese willow (*Salix bakko* Kimura) (PGR 98-012). *Plant Physiol.* **116**: 446
- Futamura N, Ishii-Minami N, Hayashida N, Shinohara K** (1999) Expression of *DnaJ* homologs and *Hsp70* in the Japanese willow (*Salix gilgiana* Seemen). *Plant Cell Physiol.* **40**: 524-531
- Futamura N, Mori H, Kouchi H, Shinohara K** (2000a) Male flower-specific expression of genes for polygalacturonase, pectin methylesterase and β -1,3-glucanase in a dioecious willow (*Salix gilgiana* Seemen). *Plant Cell Physiol.* **41**: 16-26
- Futamura N, Kouchi H, Shinohara K** (2000b) Sites of expression of *DnaJ* homologs and *Hsp70* in male

and female flowers of the Japanese willow *Salix gilgiana* Seemen. Biosci. Biotechnol. Biochem. **64**: 2232-2235

Gaffe J, Tiznado, ME, Handa AK (1996) Cloning and nucleotide sequence of a pectin methylesterase cDNA homolog (accession no. U49330) from tomato leaves (PGR 96-017). Plant Physiol. **110**: 1436

Gagliardi D, Breton C, Chaboud A, Vergne P, Dumas C (1995) Expression of heat shock factor and heat shock protein 70 genes during maize pollen development. Plant Mol. Biol. **29**: 841-856

Gasser CS, Robinson-Beers K (1993) Pistil development. Plant Cell **5**: 1231-1239

郷右近勝夫・長谷部公子・清水芳孝 (1976) ヤナギ類の花蜜と蜜腺. 採集と飼育 **38**: 111-116

Goldberg D (1990) Components of resource competition in plant communities. In Grace JB, Tilman D (eds), Perspectives on Plant Competition. 27-49. Academic Press, San Diego

Goldberg RB (1988) Plants: novel developmental process. Science **240**: 1460-1467

Grant MC, Mitton JB (1979) Elevational gradients in adult sex ratios and sexual differentiation in vegetative growth rates of *Populus tremuloides* Michx. Evolution **33**: 914-918

Gross KL, Soule JD (1981) Differences in biomass allocation to reproductive and vegetative structures of male and female plants of a dioecious, perennial herb, *Silene alba* (Miller) Krause. Am. J. Bot. **68**: 801-807

Gustafsson L (1987) Plant conservation aspects of energy forestry - a new type of land use in Sweden. For. Ecol. Manage. **21**: 141-161

Guy C L, Li Q-B (1998) The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. Plant Cell **10**: 539-556

Hadfield KA, Rose JKC, Yaver DS, Berka RM, Bennett AB (1998) Polygalacturonase gene expression in ripe melon fruit supports a role for polygalacturonase in ripening-associated pectin disassembly. Plant Physiol. **117**: 363-373

Håkansson A (1938) Zytologische Studien an *Salix*-Bastarden. Hereditas **24**: 1-32

Hamdi S, Teller G, Louis J-P (1987) Master regulatory genes, auxin levels, and sexual organogenesis in the dioecious plant *Mercurialis annua*. Plant Physiol. **85**: 393-399

Hanson DD, Hamilton DA, Travis JL, Bashe DM, Mascarenhas JP (1989) Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Zea mays* and its expression. Plant Cell **1**: 173-179

Harndahl U, Hall RB, Osteryoung KW, Vierling E, Bornman JF, Sundby C (1999) The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. Cell stress Chaperones **4**: 129-138

Hardenack S, Ye D, Saedler H, Gant S (1994) Comparison of MADS-box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion. Plant Cell **6**: 1775-1787

Harrison JWH (1924) Sex in the Salicaceae and its modification by eriophyid mites and other influences. Brit. J. Exp. Biol. **1**: 445-472

Harrison JWH (1926) Heterochromosomes and polyploidy. Nature **117**: 50

Henrissat B, Heffron SE, Yoder MD, Lietzke SE, Journak F (1995) Functional implications of structure-based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily. Plant Physiol. **107**: 963-976

Heffron S, Henrissat B, Yoder MD, Lietzke S, Journak F (1995) Structure-based multiple alignment of extracellular pectate lyase sequences. Mol. Plant. Microb. Int. **8**: 331-334

- Hinckley TM, Braatne J, Ceulemans R, Clum P, Dunlap J, Newman D, Smit B, Scarasca-Mugnozza G, Van Volkenburgh E** (1992) Growth dynamics and canopy structure. In Mitchell CP, Ford-Robertson JB, Hinckley T, Sennerby-Forsse L (eds), *Ecophysiology of Short Rotation Forest Crops*. 1-34. Elsevier Appl. Sci., London
- Hird DL, Worrall D, Hodge R, Smartt S, Paul W, Scott R** (1993) The anther-specific protein encoded by the *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* A6 gene displays similarity to β -1,3-glucanases. *Plant J.* **4**: 1023-1033
- Hoffmann AJ, Alliende MC** (1984) Interactions in the patterns of vegetative growth and reproduction in woody dioecious plants. *Oecologia (Berlin)* **61**: 109-114
- Høj PB, Rodriguez EB, Stick RV, Stone BA** (1989) Differences in active site structure in a family of β -glucan endohydrolases deduced from the kinetics of inactivation by epoxyalkyl β -oligoglucosidases. *J. Biol. Chem.* **264**: 4939-4947
- 伊ヶ崎知弘, 篠原健司 (2000) 林木の遺伝子操作：環境問題への新たな取り組み. *APAST* **37**: 5-9
- 伊ヶ崎知弘, 二村典宏, 篠原健司 (2000) RAPDによるヤナギ科植物雌雄判別マーカーの開発. 第111回日林学術講 p.428
- Jing SW, Coley PD** (1990) Dioecy and herbivory: the effect of growth rate on plant defense in *Acer negundo*. *Oikos* **58**: 369-377
- John ME, Peterson MW** (1994) Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) pollen-specific polygalacturonase mRNA: tissue and temporal specificity of its promoter in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1989-1993
- Johnsson H** (1940) Cytological studies of diploid and triploid *Populus tremula* and of crosses between them. *Hereditas* **26**: 321-352
- Junttila O** (1976) Apical growth cessation and shoot tip abscission in *Salix*. *Physiol. Plant.* **38**: 278-286
- Junttila O** (1980) Effect of photoperiod and temperature on apical growth cessation in two ecotypes of *Salix* and *Betula*. *Physiol. Plant.* **48**: 347-352
- Kalaitzis P, Koehler SM, Tucker ML** (1995) Cloning of a tomato polygalacturonase expressed in abscission. *Plant Mol. Biol.* **28**: 647-656
- Kapil RN, Tiwari SC** (1978) The integumentary tapetum. *Bot. Rev.* **44**: 457-490
- Kato N, Gotô N, Iizumi S** (1985) Sugar composition of nectar in flowers of *Salix* species. *Sci. Rep. Tohoku Univ. 4th ser. (Biology)* **39**: 45-52
- Kay QON** (1985) Nectar from willow catkins as a food source for Blue Tits. *Bird Study* **32**: 40-44
- Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T** (1991) Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 349-400
- Kim S-R, Finkel D, Chung Y-Y, An G** (1994) Abundance patterns of lily pollen cDNAs: characterization of three pollen-preferential cDNA clones. *Sex. Plant Reprod.* **7**: 76-86
- Kita N, Boyd CM, Garrett MR, Jurnak F, Keen NT** (1996) Differential effect of site-directed mutations in pelC on pectate lyase activity, plant tissue maceration, and elicitor activity. *J. Biol. Chem.* **271**: 26529-26535
- Knight H** (2000) Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cytol.* **195**: 269-324
- Koike T** (1988) Leaf structure and photosynthetic performance as related to the forest succession of deciduous broad-leaves trees. *Plant Species Biol.* **3**: 77-87

- Koike T, Kohda H, Mori S, Takahashi K, Inoue MT, Lei TT** (1995) Growth responses of the cutting of two willow species to elevated CO₂ and temperature. *Plant Species Biol.* **10**: 95-101
- Koike T, Sakagami Y** (1985) Comparison of the photosynthetic responses to temperature and light of *Betula maximowicziana* and *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Can. J. For. Res.* **15**: 631-635
- Koltunow AM, Truetter J, Cox KH, Wallroth M, Goldberg RB** (1990) Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* **2**: 1201-1224
- Korpelainen H** (1998) Labile sex expression in plants. *Biol. Rev.* **73**: 157-180
- Kouchi H, Hata S** (1993) Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol. Gen. Genet.* **238**: 106-119
- Kramer PJ, Kozłowski TT** (1979) *Physiology of Woody Plants*. 811pp, Academic Press, New York
- Kroczyńska B, Zhou R, Wood C, Miernyk JA** (1996) AtJ1, a mitochondrial homologue of the *Escherichia coli* DnaJ protein. *Plant Mol. Biol.* **31**: 619-629
- Kroh M, Miki-Horosige H, Rosen W, Loewus F** (1970) Incorporation of label into pollen tube walls from myoinositol-labeled *Lilium longiflorum* pistils. *Plant Physiol.* **45**: 92-94
- Kuboyama T** (1998) A novel thaumatin-like protein gene of tobacco is specifically expressed in the transmitting tissue of stigma and style. *Sex. Plant Reprod.* **11**: 251-256
- Kulikauskas R, McCormick S** (1997) Identification of the tobacco and *Arabidopsis* homologues of the pollen-expressed LAT59 gene of tomato. *Plant Mol. Biol.* **34**: 809-814
- Kumar S, Tamura K, Nei M** (1994) MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Computer Applications Biosci.* **10**: 181-190
- Küppers M** (1984) Carbon relations and competition between woody species in a Central European hedgerow. 1. Photosynthetic characteristics. *Oecologia* **64**: 332-352
- Küppers, M** (1987) Hecken, Ein Modellfall für die Partnerschaft von Physiologie und Morphologie bei der Pflanzen Produktion in Konkurrenzsituationen. *Naturwissenschaften* **74**: 536-547
- Kyte J, Doolittle RF** (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132
- Label-Hardenack S, Ye D, Koutnikova H, Saedler H, Grant SR** (1997) Conserved expression of a *TASSELSEED2* homolog in the tapetum of the dioecious *Silene latifolia* and *Arabidopsis*. *Plant J.* **12**: 515-526
- Lawton JR** (1976) Seasonal variation in the secondary phloem from the main trunks of willow and sycamore trees. *New Phytol.* **77**: 761-771
- Lester, DR, Speirs J, Orr G, Brady CJ** (1994) Peach (*Prunus persica*) endopolygalacturonase cDNA isolation and mRNA analysis in melting and nonmelting peach cultivars. *Plant Physiol.* **105**: 225-231
- Lietzke SE, Scavetta RD, Yoder MD, Jurnak F** (1996) The refined three-dimensional structure of pectate lyase E from *Erwinia chrysanthemi* at 2.2 Å resolution. *Plant Physiol.* **111**: 73-92
- Lin W, Lin B-L** (1997) AtJ10, an *Arabidopsis thaliana* dnaJ homologue resembling calmodulin-binding CAJ1 in yeast (accession no. Y11969). *Plant Physiol.* **115**: 863
- Linthorst HJ, Melchers LS, Mayer A, van Roekel JS, Cornelissen BJ, Bol JF** (1990) Analysis of gene families encoding acidic and basic β -1,3-glucanases of tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8756-8760

- Lloyd DG, Webb CJ** (1977) Secondary sex characters in plants. *Bot. Rev.* **43**: 177-216
- Louis JP** (1989) Genes for the regulation of sex differentiation and male fertility in *Mercurialis annua* L. *J. Hered.* **89**: 104-111
- Macgregor EA, Ballance GM** (1991) Possible secondary structure in plant and yeast β -glucanase. *Biochem. J.* **274**: 41-43
- Makkonen O** (1975) Early history of short-rotation forestry. *Silva Fenn.* **9**: 233-240
- Malone M** (1992) Kinetics of wound-induced hydraulic signals and variation potentials in wheat seedlings. *Planta* **187**: 505-510
- Markovic O, Jornvall H** (1986) Pectinesterase. The primary structure of the tomato enzyme. *Eur. J. Biochem.* **158**: 455-462
- Mascarenhas JP** (1989) The male gametophyte of flowering plants. *Plant Cell* **1**: 657-664
- Mascarenhas JP** (1990) Gene activity during pollen development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**: 317-338
- Matsunaga S, Kawano S, Takano H, Uchida H, Sakai A, Kuroiwa T** (1996) Isolation and developmental expression of male reproductive organ-specific genes in a dioecious campion, *Melandrium album* (*Silene latifolia*). *Plant J.* **10**: 679-689
- McCormick S** (1991) Molecular analysis of male gametogenesis in plants. *Trends Genet.* **7**: 298-303
- McDonald J** (1984) A summary criticism of photosynthetic studies and stemwood production. *Swed. Univ. Agric. Sci., Dept. Ecol. Environ. Res. Res. Notes* **15**: 167-178
- Medina E** (1984) Nutrient balance and physiological processes at the leaf level. *In* Medina E, Mooney HA, Vazques-Yanes C (eds), *Physiological Ecology of Plants of the Wet Tropics*. pp123-133. Dr. W. Junk Publ., The Hague
- Meins FJr, Neuhaus J-M, Sperisin C, Ryals J** (1991) The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes. *In* *Genes Involved in Plant Defence*. (eds) Boller T, Meins FJr, pp245-282. Springer Verlag, New York,
- Medina-Escobar N, Cárdenas J, Moyano E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J** (1997) Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Mol. Biol.* **34**: 867-877
- Meskiene I, Hirt H** (2000) MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol. Biol.* **42**: 791-806
- Meurman O** (1925) The chromosome behaviour of some dioecious plants and their relatives with special reference to the sex chromosomes. *Soc. Sci. Fennica, Commentationes Biol.* **2**: 1-104
- Midoro-Horiuti T, Goldblum RM, Kurosky A, Wood TG, Schein CH, Brooks EG** (1999) Molecular cloning of the mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen major allergen, Jun a 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**: 613-617
- Miernyk JA, Duck NB, Shatters, RGJr, Folk WR** (1992) The 70-kilodalton heat shock cognate can act as a molecular chaperone during the membrane translocation of a plant secretory protein precursor. *Plant Cell* **4**: 821-829
- Mori H, Takeda-Yoshikawa Y, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (1991) Pumpkin malate synthase: cloning and sequencing of the cDNA and Northern blot analysis. *Eur. J. Biochem.* **197**: 331-336
- Müntzing A** (1936) The chromosome of a giant *Populus tremula*. *Hereditas* **21**: 383-393

- Murray MG, Thompson WF** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**: 4321-4325
- Murtagh, JJr, Lee FJ, Deak P, Hall LM, Monaco L, Lee CM, Stevens LA, Moss J, Vaughan M** (1993) Molecular characterization of a conserved, guanine nucleotide-dependent ADP-ribosylation factor in *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry* **32**: 6011-6018
- Nacken WKF, Huijse P, Saedler H, Sommer H** (1992) Molecular analysis of *tap2*, an anther-specific gene from *Antirrhinum majus*. *FEBS Lett.* **280**: 155-158
- Nakajima G** (1942) Cytological studies in some flowering plants, with special reference to the sex chromosomes. *Cytologia* **12**: 262-270
- Newsholme C** (1992) Willows: the genus *Salix*. 224 pp. Timber Press, Portland
- 長尾精文 (1983) 種々の変温条件下におけるスギの花芽分化の違い. *日林誌* **65**: 335-338
- 長尾精文 (1985) スギの花成反応におよぼすジベレリン濃度と温度条件. *日林誌* **67**: 414-417
- Niiyama K** (1990) The role of seed dispersal and seedling traits in colonization and coexistence of *Salix* species in a seasonally flooded habitat. *Ecol. Res.* **5**: 317-331
- Nitsch JP** (1957) Photoperiodism in woody plants. *Am. Soc. Hortic. Sci.* **70**: 526-544
- Noshiro S, Suzuki M** (1995) Ecological wood anatomy of Nepalese *Rhododendron* (Ericaceae). 2. Intraspecific variation. *J. Plant Res.* **108**: 217-233
- Ohno N, Nono I, Yadomae T** (1989) Enzymatic and physiochemical properties of an exo-(1-3)- β -D-glucanase from *Rhizoctonia solani*. *Carbohydrate Res.* **158**: 217-226
- Okayama H, Berg P** (1982) High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cel. Biol.* **2**: 161-170
- Olsen JE, Junttila O, Moritz T** (1995) A localised decrease of GA₁ in shoot tips of *Salix pentandra* seedlings precedes cessation of shoot elongation under short photoperiod. *Physiol. Plant.* **95**: 627-632
- Olsen JE, Junttila O, Moritz T** (1997) Long-day induced bud break in *Salix pentandra* is associated with transiently elevated levels of GA₁ and gradual increase in indole-3-acetic acid. *Plant Cell Physiol.* **38**: 536-540
- Ori N, Sessa G, Lotan T, Himmelhoch S, Fluhr R** (1990) A major stylar matrix polypeptide (sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass. *EMBO J.* **9**: 3429-3436
- Palo RT** (1984) Distribution of birch (*Betula* spp.), willow (*Salix* spp.), and poplar (*Populus* spp.) secondary metabolites and their potential role as chemical defense against herbivores. *J. Chem. Ecol.* **10**: 499-520.
- Parish GR** (1974) Seasonal variation in the membrane structure of differentiating shoot cambial-zone cells demonstrated by freeze-etching. *Cytobiologie* **9**: 131-143
- Parker JS, Clark MS** (1991) Dosage sex-chromosome systems in plants. *Plant Sci.* **80**: 79-92
- Paul W, Hodge R, Smartt S, Draper J, Scott R** (1992) The isolation and characterization of the tapetum-specific *Arabidopsis thaliana* A9 gene. *Plant Mol. Biol.* **19**: 611-622
- Payne G, Ward E, Gaffney T, Goy PA, Moyer M, Harper A, Meins F Jr, Ryals J** (1990) Evidence for a third structural class of β -1,3-glucanase in tobacco. *Plant Mol. Biol.* **15**: 797-808
- Pelkonen P** (1984) Carbon dioxide exchange in willow clones. *In Ecology and Management of Forest Biomass Production System*. Dept. of Ecol. Environ. Swed. Univ. Agr. Sci. Rep. **15**: 187-196

- Percival MS** (1961) Types of nectar in angiosperms. *New Phytol.* **60**: 235-281.
- Peto FH** (1938) Cytology of poplar species and natural hybrids. *Can. J. Research* **16**: 445-455
- Pickersgill R, Jenkins J, Harris G, Nasser W, Robert-Baudouy J** (1994) The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium. *Nature Struct. Biol.* **1**: 717-723
- Pnueli L, Hareven D, Rounsley AD, Yanofsky MF** (1994) Isolation of the tomato *Agamous* gene *TAG1* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell* **6**: 163-173
- Putwain PD, Harper JL** (1972) Studies in the dynamics of plant populations. V. Mechanisms governing the sex ratio in *Rumex acetosa* and *R. acetosella*. *J. Ecol.* **60**: 113-129
- Preisig-Müller R, Kindl H** (1993) Plant dnaJ homologue: molecular cloning, bacterial expression, and expression analysis in tissues of cucumber seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**: 30-37
- Qiu X, Erickson L** (1995) A pollen-specific cDNA (p65, GenBank accession number U28148) encoding a putative pectin esterase in alfalfa. (PGR 95-094). *Plant Physiol.* **109**: 1127
- Queitsch C, Hong S-W, Vierling E, Lindquist S** (2000) Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 479-492
- Rafnar T, Griffith IJ, Kuo M-c, Bond JF, Rogers BL, Klapper DG** (1991) Cloning of *Amb a I* (antigen E), the major allergen family of short ragweed pollen. *J. Biol. Chem.* **266**: 1229-1236
- Reed KC, Mann DA** (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucl. Acids Res.* **13**: 7207-7211
- Regad F, Bardet C, Tremousaygue D, Moisan A, Lescure B, Axelos M** (1993) cDNA cloning and expression of an *Arabidopsis* GTP-binding protein of the ARF family. *FEBS Lett.* **316**: 133-136
- Renner SS, Ricklefs RE** (1995) Dioecy and its correlates in the flowering plants. *Am. J. Bot.* **82**: 596-606
- Richard L, Qin L-X, Goldberg R** (1996) Clustered genes within the genome of *Arabidopsis thaliana* encoding pectin methylesterase-like enzyme. *Gene* **170**: 207-211
- Robards AW, Kidwai P** (1969) A comparative study of the ultrastructure of resting and active cambium of *Salix fragilis* L. *Planta* **84**: 239-249
- Roberts MR, Robson F, Foster GD, Draper J, Scott RJ** (1991) A *Brassica napus* mRNA expressed specifically in developing microspores. *Plant Mol. Biol.* **17**: 295-299
- Rogers BL, Morgenstern JP, Griffith IJ, Yu X-B, Counsell CM, Brauer AW, King TP, Garman RD, Kuo M-c** (1991) Complete sequence of the allergen *Amb a II*. *J. Immunol.* **147**: 2547-2552
- Rogers HJ, Harvey A, Lonsdale DM** (1992) Isolation and characterization of a tobacco gene with homology to pectate lyase which is specifically expressed during microsporogenesis. *Plant Mol. Biol.* **20**: 493-502
- Saarikoski P, Clapham D, von Arnold S** (1996) A wound-inducible gene from *Salix viminalis* coding for a trypsin inhibitor. *Plant Mol. Biol.* **31**: 465-478
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-25
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Satina S** (1944) Periclinal chimeras in datura in relation to development and structure (A) of the style and stigma (B) of calyx and corolla. *Am. J. Bot.* **31**: 493-502

- Saunders PF, Barros RS** (1987) Periodicity of bud bursting in willow (*Salix viminalis*) as affected by growth regulators. *Physiol. Plant.* **69**: 535-540
- Scavetta RD, Herron SR, Hotchkiss AT, Kita N, Keen NT, Bensen JAE, Kester HCM, Visser J, Jurnak F** (1999) Structure of a plant cell wall fragment complexed to pectate lyase C. *Plant Cell* **11**: 1081-1092
- Schlicher T, Soll J** (1997) Chloroplastic isoforms of DnaJ and GrpE in pea. *Plant Mol. Biol.* **33**: 181-185
- Schulze ED** (1982) Plant life forms and their carbon, water and nutrient relations. In Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Zieger H (eds), *Ency. Plant Physiol.* Vol. 12B, pp615-676. Berlin
- Scott R, Hodge R, Paul W, Draper J** (1991) The molecular biology of anther differentiation. *Plant Sci.* **80**: 167-191
- Scott-Craig JS, Panaccione DG, Cervone F, Walton JD** (1990) Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *Plant Cell* **2**: 1191-1200
- Scutt CP, Li Y, Robertson SE, Willis ME, Gilmartin PM** (1997) Sex determination in dioecious *Silene latifolia*. Effects of the Y chromosome and the parasitic smut fungus (*Ustilago violacea*) on gene expression during flower development. *Plant Physiol.* **114**: 969-979
- Sennerby-Forsse L** (1986) Seasonal variation in the ultrastructure of the cambium in young stems of willow (*Salix viminalis*) in relation to phenology. *Physiol. Plant.* **67**: 529-537
- Sennerby-Forsse L, von Fircks HA** (1987) Ultrastructure of cells in the cambial region during winter hardening and spring dehardening in *Salix dasyclados* Wim. grown at two nutrient levels. *Trees* **1**: 151-163
- Sewell JL, Kahn RA** (1988) Sequences of the bovine and yeast ADP-ribosylation factor and comparison to other GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4620-4624
- Shinibaldi RM, Mettle IJ** (1992) Intron splicing and intron-mediated enhanced expression in monocots. *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* **42**: 229-257
- Shinohara K** (1994) Human SRY-related sequences and their expression in dioecious willow plants. *Plant Cell Physiol.* **35** Supplement: s121
- Shinohara K, Murakami A** (1996) Changes in levels of thylakoid components in chloroplasts of pine needles of different ages. *Plant Cell Physiol.* **37**: 1102-1107
- Shinohara K, Futamura N., Nagao A** (1998) Responses of a Japanese willow to high temperatures. In Garab G (ed), *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Vol. IV, pp2477-2480. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Shinotô Y** (1929) Chromosome studies in some dioecious plants, with special reference to the allosomes. *Cytologia* **1**: 109-191
- Shinshi H, Wenzler H, Neuhaus JM, Felix G, Hofsteenge J, Meins Jr F** (1988) Evidence for N- and C-terminal processing of a plant defence-related enzyme: the primary structure of tobacco prepro- β -1,3-glucanase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5541-5545
- Silver PA, Way JC** (1993) Eukaryotic DnaJ homologs and the specificity of Hsp70 activity. *Cell* **74**: 5-6
- Smith AG, Gasser CS, Budelier KA, Fraley RT** (1990) Identification and characterization of stamen- and tapetum-specific genes from tomato. *Mol. Gen. Genet.* **222**: 9-16
- Sone T, Komiyma N, Shimizu K, Kusakabe T, Morikubo K, Kino K** (1994) Cloning and sequencing of cDNA coding for *Cry jI*, a major allergen of Japanese cedar pollen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **199**: 619-625

- Staiger D, Kappeler S, Müller M, Apel K** (1994) The proteins encoded by two tapetum-specific transcripts, Satap35 and Satap44, from *Sinapis alba* L. are localized in the exine cell wall layer of developing microspores. *Planta* **192**: 221–231
- Stieglitz H, Stern H** (1973) Regulation of β -1,3-glucanase activity in developing anthers of *Lilium*. *Devel. Biol.* **34**: 169–173
- Stoehr MU, Cai M, Zsuffa L** (1989) *In vitro* plant regeneration via callus culture of mature *Salix exigua*. *Can. J. For. Res.* **19**: 1634–1638
- Stratilova E, Dzurova M, Markovic O, Jornvall H** (1996) An essential tyrosine residue of *Aspergillus* polygalacturonase. *FEBS Lett.* **382**: 164–166
- Sugawa T, Fujii T** (1993) Aggrigate rays of *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* (*Cupressaceae*). *IAWA J.* **14**: 315–323
- Suto T** (1944) Meiotic chromosome behaviour in *Populus nigra* L. and *Toisusu cardiophylla* Kimura. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ.* **5**: 249–262
- Suzuki M, Komiyama N, Itoh M, Itoh H, Sone T, Kino K, Takagi I, Ohta N** (1996) Purification, characterization and molecular cloning of Cha o 1, a major allergen of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) pollen. *Mol. Immunol.* **33**: 451–460
- Szabo A, Korszun R, Hartl FU, Flanagan J** (1996) A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J.* **15**: 408–417
- Tebbutt SJ, Rogers HJ, Lonsdale DM** (1994) Characterization of a tobacco gene encoding a pollen-specific polygalacturonase. *Plant Mol. Biol.* **25**: 283–297
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–4680
- Tran Thanh Van K, Toubart P, Cousson A** (1985) Manipulation of the morphogenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharins. *Nature* **314**: 615–617
- Tsuchiya T, Toriyama K, Nasrallah ME, Eiji S** (1992) Isolation of genes abundantly expressed in rice anthers at the microspore stage. *Plant Mol. Biol.* **20**: 1189–1193
- Turcich MP, Hamilton DA, Mascarenhas JP** (1993) Isolation and characterization of pollen-specific maize genes with sequence homology to ragweed allergens and pectate lyases. *Plant Mol. Biol.* **23**: 1061–1065
- Vahala T, Stabel P, Eriksson T** (1989) Genetic transformation of willow (*Salix* spp.) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* **8**: 55–58
- Vahala T, Eriksson T, Engström P** (1990) Heat shock proteins in willow (*Salix viminalis*). *Physiol. Plant.* **80**: 301–306
- Vahala T, Eriksson T, Tillberg E, Nicander B** (1993) Expression of a cytokinin synthesis gene from *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in basket willow (*Salix viminalis*). *Physiol. Plant.* **88**: 439–445
- van der Meer IM, Stam ME, van Tunen AJ, Mol JNM, Stuitje AR** (1992) Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell* **4**: 253–262
- van der Werf F, Cappellato R, Meeuse ADJ** (1981) Entomophily in *Salix*. Efficacy and flower constancy of insects visiting some willows and sallows. *Beitr. Biol. Pflanzen* **56**: 105–116
- van Nigtevecht G** (1966) Genetic studies in dioecious *Melandrium*. I. Sex-linked and sex-influenced

inheritance in *Melandrium album* and *Melandrium diocium*. *Genetica* **37**: 281-306

von Heijne G (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* **14**: 4683-4690

Wall D, Zylicz M, Georgopoulos C (1994) The NH₂-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for λ replication. *J. Biol. Chem.* **269**: 5446-5451

Westergaard M (1958) The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *Adv. Genet.* **9**: 217-281

Wildon DC, Thain JF, Minchin PEH, Gubb IR, Reilly AJ, Skipper YD, Doherty HM, O'Donnell PJ, Bowles DJ (1992) Electrical signalling and systemic protease inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* **360**: 62-65

Wilkinson J (1944) The cytology of *Salix* in relation to its taxonomy. *Ann. Botany [N.S.]* **8**: 269-284

Wing RA, Yamaguchi J, Larabell SK, Ursin VM, McCormick S (1989) Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Mol. Biol.* **14**: 17-28

Worrall D, Hird DL, Hodge R, Paul W, Draper J, Scott R (1992) Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* **7**: 759-771

Wu SH, Wang C, Chen J, Lin BL (1994) Isolation of a cDNA encoding a 70 kDa heat-shock cognate protein expressed in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **25**: 577-583

Wu Y, Qiu X, Du S, Erickson L (1996) PO149, a new member of pollen pectate lyase-like gene family from alfalfa. *Plant Mol. Biol.* **32**: 1037-1042

Yoder MD, Journak F (1995) The refined three-dimensional structure of pectate lyase C from *Erwinia chrysanthemi* at 2.2 Ångstrom resolution. *Plant Physiol.* **107**: 349-364

Yoon H, Donahue TF (1992) The *suil* suppressor locus in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a translation factor that functions during tRNA^{Met} recognition of the start codon. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 248-260

Zhou R, Kroczyńska B, Hayman GT, Miernyk JA (1995) AtJ2, an *Arabidopsis* homolog of *Escherichia coli* dnaJ. *Plant Physiol.* **108**: 821-822

Zhu J-K, Bressan RA, Hasegawa PM (1993a) Isoprenylation of the plant molecular chaperone ANJ1 facilitates membrane association and function at high temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8557-8561

Zhu J-K, Shi J, Bressan RA, Hasegawa PM (1993b) Expression of an *Atriplex nummularia* gene encoding a protein homologous to the bacterial molecular chaperone DnaJ. *Plant Cell* **5**: 341-349

Zsuffa L (1995) Characterisation of poplar and willow clones and cultivars. *Biomass and Bioenergy* **9**: 53-68