

研 究 主 論 文 抄 録

論文題目 水中パルスストリーマ状放電によるスサビノリ遺伝子の活性化
(Activation of Retrotransposon in Red Alga by Underwater Pulsed Streamer Discharge)

熊本大学大学院自然科学研究科 複合新領域科学専攻 複合新領域科学講座
(主任指導 浪平隆男 准教授)

論文提出者 平山 勝将
(by Katsumasa Hirayama)

主論文要旨

《本文》

パルスパワーとは、ある時間蓄えた電気エネルギーを短時間で狭い空間へ放出することで得られる時間的・空間的に圧縮された超高密度エネルギーである。この様な極限状態では通常では起らない高電界、大電流、衝撃波などを比較的少ない供給エネルギーで発生させることが可能であるため、多くの分野で応用が期待されている。本研究ではパルスパワー応用分野の内、比較的新しい分野であるバイオエレクトリクスに着目した。

バイオエレクトリクスとは、パルス電磁エネルギーで生成される極限状態が及ぼす生体作用およびその応用に関する研究のことをいい、バイオ技術、医療、農業、食品加工など、幅広い分野にわたって応用が期待されている。本研究で取り上げる植物バイオエレクトリクスは、植物体への刺激反応および積極的な細胞活性に注目しており、これまでの菌類や動物細胞を主とした細胞不活性に注目した研究例とは大きく異なる。

本研究ではまず、稼働遺伝子の一種である植物細胞中のレトロトランスポゾンに着目した。レトロトランスポゾンが発現されると他の遺伝子に取り込まれ、その性質に変化を与えることが出来る。この現象は内在する遺伝子によってもたらされるため、これまで広く用いられてきた外的遺伝子を導入する方法に替わる、新たな変異体の作出、遺伝子機能解析方法として注目されている。しかしながら、レトロトランスポゾン的人工的に発現させることは非常に難しいとされてきた。本研究ではパルスパワー技術によってその活性の実現を目的とした。

次に特定の機能を有する遺伝子（以下機能遺伝子）に着目した。機能遺伝子の活性を制御することが出来れば、植物細胞の選択的な機能性向上が可能になると考えられ、本研究では、植物が有する抗酸化防御システムに着目した。植物細胞内では、様々な自然ストレスによって発生した有害な活性酸素を無害化（還元）する還元酵素が存在する。この酵素の一つにスーパーオキシドジスムターゼ（*SOD*）及びブロモペルオキシダーゼ（*BP*）があり、本研究では、これらの積極的な遺伝子活性制御を検証した。

試験体には養殖海苔の代表的な品種であるスサビノリを用いた。スサビノリはその遺伝子構造の解明が比較的進んでいる上にラボ培養期間が約2週間と短いため研究解析対象としても広く使用されている。近年、環境の悪化によって起こるスサビノリの『色落ち』が問題となっている。パルスパワーによってスサビノリ中のレトロトランスポゾンを発現させ変異体を作ることが出来れば、環境の変化に強い新たな品種を開発できる可能性がある。また、機能遺伝子を選択的に発現させることで、環境の変化に強い新たな栽培手法を確立できる可能性がある。

パルスパワーの印加形態は水中ストリーマ状放電とした。水中ストリーマ状放電は高電界、高エネルギー電子、紫外線、ラジカル、及び衝撃波を同時に発生し複合ストレスとして与えることが出来る。そのため、導入モデルとして最適であると考えた。我々はまず、ブルームライン型パルスフォーミングネットワーク (Blumlein Line Pulse Forming Network, 以下 B-PFN) によってパルス高電圧を発生し、針対円筒電極中に水中パルスストリーマ状放電を発生させるシステムを開発した。次に、電極間に置いた水中のスサビノリに対して複合ストレスを与え、その活性誘導効果を検証した。

解析方法は逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) を利用し、これによって目的の遺伝子の特異的に検出した。さらにアガロースゲル電気泳動法によって活性レベルの確認を実施した。

解析対象としたレトロトランスポゾンは *PyRE1*, *PyRE2* 及び *PySN1*, *PySN2* である。これらの内、*PyRE1* の活性に成功した。次に、機能遺伝子である *PyBP*, *PySOD*, *ClpB1*, *ClpP1*, *ClpB2*, *ClpP2* に対して同様の調査を実施し、*ClpP2* を除くすべての機能遺伝子の活性に成功した。この結果より水中ストリーマ状放電はスサビノリにおける新たな変異体作出及び抗酸化防御システム活性の有効な手段となりうるということが分かった。

次に、複合ストレスである水中パルスストリーマ状放電によって発生する様々なストレス要素のうち、レトロトランスポゾンの活性に大きく寄与している要素の特定に取り組んだ。まず、水中ストリーマ放電に含まれる複合ストレスの内、電界及び電流を単一の要素として印加するための新たなパルス発生システムの開発を行った。次に、新たなパルス発生システムを用いて、スサビノリのレトロトランスポゾン活性誘導因子の調査を進め、さらに水中ストリーマ状放電に含まれる紫外線やオゾンについても単一のストレス要素として印加し誘導効果の検証を行った。その結果、どの要素に関してもレトロトランスポゾンの活性誘導効果があることが分かった。そのため、水中パルスストリーマ状放電はこれらを複合ストレスとして作用することで高い活性誘導効果を発揮しているものと結論付けた。