

## 樹木におけるラパマイシン標的タンパク質遺伝子の発現様式の解析

吉田和正・西口 満 (森林総研)

要旨：ラパマイシン標的タンパク質 (target of rapamycin, TOR) は、真核生物の細胞の成長制御において中心的な役割を果たしていることが知られている。シロイヌナズナでは、TOR 遺伝子の働きを強めると器官のサイズが大きくなりバイオマスが増加する。しかし、樹木については TOR 遺伝子の単離や TOR の機能解析に関する報告はない。そこで、樹木における TOR の機能とバイオマス生産力増強に関する有効性の解明を目指す。その基礎となる知見を得るため、ポプラ (セイヨウハコヤナギ) から TOR 遺伝子の部分配列を取得するとともに、いくつかの器官での TOR 遺伝子の発現量の差異を調べた。

キーワード：ラパマイシン標的タンパク質, ポプラ, 遺伝子発現

**Abstract:** The target of rapamycin (TOR) protein plays a central role in cell growth of eukaryotes. *Arabidopsis* plants overexpressing the TOR gene showed an increase in organ size and overall biomass. So far, there has been no report on the isolation of TOR genes and the analysis of the function of TOR in woody plants. Thus, we undertook the study to obtain the primary information for the elucidation of the functions of TOR regarding biomass production in trees. Here, we describe the partial sequences of a TOR gene of *Populus nigra* var. *italica* and the pattern of its gene expression in several organs.

**Keywords:** target of rapamycin, poplar, gene expression

## I はじめに

樹木の成長性を改善し生産量を増大させることは、木質系バイオマスの素材・燃料としての利用や、二酸化炭素の吸収・固定を通じた地球温暖化対策に有用である。そのため、樹木の成長性に関わる遺伝子に着目した高生産性遺伝子組換え樹木の作出が進められている。樹木のバイオマス生産量の増大を図るため、植物ホルモン生合成系酵素やそのシグナル伝達に関わるタンパク質、リグニン生合成系酵素、ヘミセルロース分解酵素の各遺伝子および花序形成に関わる遺伝子について、それら遺伝子の発現量を増加あるいは抑制した組換え樹木が作製され、野外試験が行われてきた (5)。しかし、温室内の実験段階では良好な成長性を示しても、野外では非組換え体と変わらないなど、実用に供することのできる組換え樹木はこれまでに得られていない。養分の制限や環境ストレスがある野外で高成長性を発揮させるためには、これまで対象にされていなかった新しい遺伝子に着目する必要がある。

ラパマイシン標的タンパク質 (target of rapamycin, TOR) は、酵母、線虫、ショウジョウバエ、哺乳類などの真核生物から広く見出され、キナーゼドメインなど複数のドメインからなる分子量の大きなタン

パク質 (約 2,500 アミノ酸残基) であることや、他のタンパク質と複合体を形成して機能すること、栄養状態やストレスの状況に応じて細胞の成長を調節する役割を果たしていることが分かっている (9)。

植物についても、シロイヌナズナとトウモロコシから TOR の cDNA が単離され、イネや緑藻のクラミドモナスなどで TOR 遺伝子の存在が確認されている (1, 2, 6)。TOR 遺伝子の発現量を高めたシロイヌナズナでは、葉、根、花序等の器官および個体のサイズが大きくなるとともに、高浸透圧 (高塩濃度) 条件下でも根の伸長量が増加した。一方、TOR 遺伝子の働きを抑制すると葉の老化が早まった (3)。これらの結果は、シロイヌナズナでは、TOR が器官の成長やストレス耐性、光合成器官の維持に関与し、TOR の発現強化が総合的にバイオマス生産量を増大させている可能性を示している。しかし、樹木については、TOR 遺伝子の単離や TOR の機能解析に関する報告はない。そこで、樹木における TOR の機能を解明するうえで必要な知見を得ることを目的として、セイヨウハコヤナギ (*Populus nigra* var. *italica*, 以下ポプラ) で発現している TOR 遺伝子の部分配列を取得し、遺伝子発現様式を解析した。

Kazumasa YOSHIDA, Mitsuru NISHIGUCHI (Forestry and Forest Products Research Institute, 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki 305-8687), Expression analysis of a gene for target of rapamycin (TOR) in *Populus nigra* var. *italica*

## II 材料と方法

1. 材料 人工気象調節施設で挿し木によって増殖したポプラ (*Populus nigra* var. *italica*) から、葉芽、葉、茎および根を採取した。また、森林総研構内に植栽しているポプラから雌花序を採取した。試料は各3点で、採取後すぐに液体窒素中で凍結し、冷凍庫 (-80°C) で保存した。

2. TOR 遺伝子の部分配列の取得 各試料からの RNA の調製と定量および調製した RNA から的一本鎖 DNA の合成は、既報にしたがって行った (7)。葉芽に由来する一本鎖 DNA を鋳型とし、表-1 に示すプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) 法により、TOR の DNA の一部を増幅した。PCR 反応液の組成は次のとおりである。1x 濃度の GoTaq Green Master Mix (Promega), 0.5 μM の順方向および逆方向プライマー, 8 ng の RNA に相当する一本鎖 DNA。PCR は、95°C・90 秒の変性に続き、95°C・30 秒, 56°C・30 秒, 72°C・50 秒を 35 サイクルの条件で行った。反応終了後の溶液を 0.7%アガロースゲルでの電気泳動で分析し、PCR 産物が1種類であることを確認した。PCR 産物は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) によって精製した後、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を使用して塩基配列を決定した。塩基配列の解析は、遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX Ver.10 (ゼネティックス) を用いて行った。

3. TOR 遺伝子の発現様式の解析 TOR 遺伝子の器官別の発現量は、CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories) を用いてリアルタイム PCR 法で定量した。PCR 反応液の組成は次のとおりである。1x 濃度の SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad), 0.3 μM の順方向 (5'-GAGTAATAAACTGACTGGACGTG-3') および逆方向 (TOR\_7R) プライマー, 10 ng の RNA に相当する一本鎖 DNA。リアルタイム PCR の条件は、95°C・2 分の変性に続き、95°C・10 秒, 58°C・15 秒, 72°C・30 秒を 40 サイクルである。反応終了後、融解曲線分析を行い、非特異的な増幅が生じていないことを確認した。内部標準は既報 (7) に準じユビキチン遺伝子を用いた。

## III 結果と考察

1. ポプラで発現している TOR 遺伝子の部分配列の取得 ポプラから TOR 遺伝子の部分配列を取得するために、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*), ブラックコットンウッド (*Populus trichocarpa*) およ

びトウモロコシ (*Zea mays*) の TOR の cDNA 塩基配列を参考にして8組のプライマーを設計した (表-1)。ポプラの葉芽に由来する一本鎖 DNA を鋳型として、上記のプライマーを用いて PCR を行ったところ、全てのプライマーの組で1種類の主要な PCR 産物が増幅された (図-1)。この PCR 産物の塩基配列を決定し、ブラックコットンウッド, シロイヌナズナ, トウモロコシ, ヒト (*Homo sapiens*), ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*), 線虫 (*Caenorhabditis elegans*) および出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の TOR 遺伝子の塩基配列と比較した (表-2)。ポプラから取得した発現遺伝子の部分配列はいずれも、ブラックコットンウッドの TOR 遺伝子の塩基配列と約 90%以上一致し (相同性があり), シロイヌナズナやトウモロコシの TOR 遺伝子ともよく似ていた。さらに、動物や微生物の TOR 遺伝子とも 50%程度の相同性があった。これらのことから、本実験で得た部分配列はポプラの TOR 遺伝子に由来すると推定した。

2. ポプラの各器官での TOR 遺伝子の発現量の比較 部分配列を取得した TOR 遺伝子がポプラのどの部位でどれくらい発現しているかを知るため、葉位の異なる葉、幹、根、葉芽および雌花序における TOR 遺伝子の発現を定量的に調べた (図-2)。どの器官でも遺伝子は発現しており、発現量の平均値について Steel-Dwass 法による多重比較検定を行ったところ、発現量に有意な差は認められなかった。これまでの報告によると、トウモロコシでは、実生の葉や根およびカルスの間で TOR 遺伝子の発現量に違いはなかった (1)。また、シロイヌナズナでは、TOR 遺伝子はほぼ全ての組織で発現していたが、TOR タンパク質は根端分裂組織や茎頂分裂組織、花芽、側根の原基、発生途中の胚などの細胞の分裂や成長の盛んな組織で主として見出された (4, 6)。ポプラの TOR 遺伝子が多くの器官で発現している点は、トウモロコシやシロイヌナズナの TOR 遺伝子と共通している。また、前述のように、ポプラ由来の TOR 遺伝子の部分配列がシロイヌナズナの TOR 遺伝子の塩基配列とよく似ていることと合わせて、両者の TOR 遺伝子は同様の機能を有していると推察した。シロイヌナズナでは遺伝子組換えによって TOR 遺伝子の働きを強めると葉や根の成長量が増えバイオマスが増大する (3)。したがって、ポプラにおいても、TOR 遺伝子の発現量を増すことによ

てバイオマス生産性を向上させる可能性があると考えられる。

#### IV おわりに

世界の木材の消費量は増加し、森林面積は減少している (8)。将来の資源確保と環境保全に備えて、樹木のバイオマス生産力を増強することが重要である。我々は遺伝子組換え技術を用いて、樹木の成長を制御することを目指しており、利用する遺伝子として真核生物で細胞の成長制御に重要な役割を果たすことが知られている TOR に着目した。本研究では、TOR の樹木における機能を解明するうえで必要な知見を得ることを目的として、ポプラの TOR 遺伝子の部分配列を取得し、遺伝子発現様式の一部を明らかにした。今後は、遺伝子組換えに必要な全タンパク質領域を含む発現遺伝子を単離し、TOR 遺伝子の働きを変化させた組換えポプラの作製とそれらの特性の評価を通して TOR のバイオマス生産性に関する機能を明らかにしたいと考えている。

#### V 参考文献

- (1) AGREDANO-MORENO, L.T., DE LA CRUZ, H.R., MARTINEZ-CASTILLA, L.P., DE JIMENEZ, E.S. (2007) Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Mol. Biosyst.* **3**: 794-802
- (2) CRESPO, J.L., DIAZ-TROYA, S., FLORENCIO, F.J. (2005) Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **139**: 1736-1749
- (3) DEPROST, D., YAO, L., SORMANI, R., MOREAU, M., LETERREUX, G., NICOLAÏ, M., BEDU, M., ROBAGLIA, C., MEYER, C. (2007) The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* **8**: 864-870
- (4) DOBRENEL, T., MARCHIVE, C., SORMANI, R., MOREAU, M., MOZZO, M., MONTANÉ, M.-H., MENAND, B., ROBAGLIA, C., MEYER, C. (2011) Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase. *Biochem. Soc. Trans.* **39**: 477-481
- (5) FLADUNG, M. (2006) Modification of cellulose in wood. In: FLADUNG, M., EWALD, D. (Eds) *Tree Transgenesis*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 123-136
- (6) MENAND, B., DESNOS, T., NUSSAUME, L., BERGER, F., BOUCHEZ, D., MEYER, C., ROBAGLIA, C. (2002) Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 6422-6427
- (7) NISHIGUCHI, M., NANJO, T., YOSHIDA, K. (2012) The effects of gamma irradiation on growth and expression of genes encoding DNA repair-related proteins in Lombardy poplar (*Populus nigra* var. *italica*). *J. Environ. Rad.* **109**: 19-28
- (8) 林野庁編 (2012) 平成 24 年版 森林・林業白書, 全国林業改良普及協会, p. 96, pp. 132-136
- (9) WULLSCHLEGER, S., LOEWITH, R., HALL, M.N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471-484

表-1. 実験に用いたプライマーの塩基配列

Table 1. Primers used for the analysis

Name	Sequence (5' - 3')
TOR_0F:	CATTAGCATTGAGAAAACATCTAGAGG
TOR_0R:	CACTTCATCTGCAGTCATTGC
TOR_1F:	CATCGAGATCGACTTGTTCG
TOR_1R:	GCGTGGAGCAATTGCATC
TOR_2F:	GTTTTGATGATTTTCTAGCACAAAGCTG
TOR_2R:	CCGACAGTTACAAGAACTCC
TOR_3F:	CACACGCTTGAAGTGTTCG
TOR_3R:	TATGCCGCAATCGATGCTTC
TOR_4F:	GCAGAGTTCATGGAACATGATG
TOR_4R:	CGTTGCAACTTCTCATACCATG
TOR_5F:	GAAAAGAAGCATTGCTAGGTTGC
TOR_5R:	GTATACTGTGACATCACTGCTG
TOR_6F:	GAGCTTACACAGGCATGG
TOR_6R:	CTCCAGCAGAGTATTCACC
TOR_7F:	GAACACACAAGGATAGTGTATGG
TOR_7R:	CAGATTTTCATGTGATGTGGCTTG

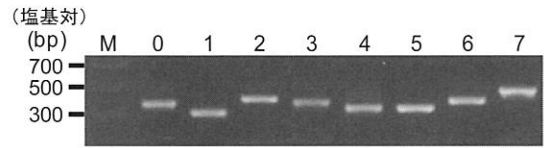


図-1. ポプラから増幅された TOR 遺伝子の各領域  
写真上部の番号は増幅に用いたプライマー (表-1) の番号に対応している。M は DNA サイズマーカーを示す。

Fig. 1. Several regions of a TOR gene amplified from *P. nigra* var. *italica* by PCR

The numbers above the picture correspond to the numbers in the names of primers used for PCR (Table 1). M indicates a DNA size marker.

表-2. ポプラ由来の TOR 発現遺伝子と他生物の TOR 遺伝子の塩基配列の比較

Table 2. Comparison of the sequences of TOR genes between poplar and other organisms

部分配列名	配列長 (塩基対)	相同性 (%)						
		Pt	At	Zm	Hs	Dm	Ce	Sc
PnTOR_0	272	92	69	62	46	40	-	-
PnTOR_1	211	92	80	71	51	44	43	-
PnTOR_2	320	99	77	74	52	50	50	-
PnTOR_3	288	93	79	66	48	45	42	-
PnTOR_4	243	94	79	75	55	52	48	54
PnTOR_5	249	99	67	62	52	53	49	48
PnTOR_6	308	88	75	72	63	57	55	59
PnTOR_7	407	100	70	71	49	46	52	48

Pt: ブラックコットンウッド, At: シロイヌナズナ, Zm: トウモロコシ, Hs: ヒト, Dm: ショウジョウバエ, Ce: 線虫, Sc: 出芽酵母, -: 相同性を示す部分が見当たらないことを示す。

Pt, *Populus trichocarpa*; At, *Arabidopsis thaliana*; Zm, *Zea mays*; Hs, *Homo sapiens*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; -, no homologous region was found

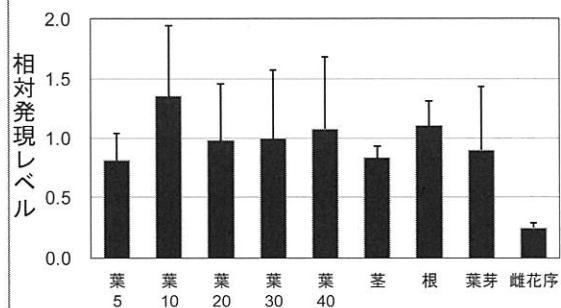


図-2. ポプラの各器官での TOR 遺伝子の発現レベルの比較

3点の試料の平均値と標準偏差を示した。葉の番号は上端から数えた葉位を表す。

Fig. 2. Expression levels of a TOR gene in the various organs of *P. nigra* var. *italica*

The values represent means±SD of three biological replicates. The numeral with leaf shows the position of the leaf counted from the top.