

環境ストレス耐性の向上を目的とした遺伝子組換えポプラの作製

田原 恒・毛利 武・西口 満・古川原聡・横田 智・掛川弘一・楠城時彦(森林総研)

要旨:ラフィノースファミリーオリゴ糖(RFO)とアブシジン酸(ABA)は、乾燥などの環境ストレスによって合成・蓄積され、植物の環境ストレス耐性に寄与している。RFO 合成にはガラクトキノールシンターゼが、ABA 合成には 9-*cis*-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼが、それぞれ重要な役割を果たしている。本研究では、環境ストレス耐性を向上させた樹木の開発、および樹木の環境ストレス下における RFO と ABA の機能解明を目指し、これらの酵素遺伝子を過剰発現させた組換えポプラ(*Populus nigra* var. *italica*)を作製することを目的とする。カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターにポプラから単離した酵素遺伝子を結合し、アグロバクテリウム法によりポプラに導入した。形質転換操作後の再分化個体において、導入遺伝子の有無を調べ組換え体を選抜した。さらに、選抜した組換え体において導入遺伝子が過剰発現していることを定量 RT-PCR 法で確認した。

キーワード:ラフィノースファミリーオリゴ糖, アブシジン酸, ストレス耐性, 遺伝子組換え樹木

Abstract: Higher plants synthesize and accumulate raffinose family oligosaccharides (RFO) and abscisic acid (ABA) in response to abiotic environmental stresses such as drought, high salinity and low temperature. Since RFO and ABA play pivotal roles in plant stress tolerance, the biosynthetic pathways of these compounds have been well studied. Galactinol synthase (GolS) and 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) act as a rate-limiting enzyme that catalyzes the biosynthesis of RFO and ABA, respectively. To elucidate the function of RFO and ABA under environmental stresses in tree species, and also develop trees capable of tolerating environmental stress by genetic modification, we overexpressed Lombardy poplar (*Populus nigra* var. *italica*) genes encoding *GolS* and *NCED* in Lombardy poplar by agrobacterium-mediated transformation. Here, we report on the current results to analyze the expression of transgenes using reverse transcription quantitative real-time PCR, based on which the establishment of the transformants should be evaluated at transcriptional level.

Keywords: raffinose family oligosaccharide (RFO), abscisic acid (ABA), stress tolerance, transgenic tree

I はじめに

植物は、乾燥などの環境ストレスに応答して耐性を発揮するため様々な機能を発達させている(4)。乾燥によって、ストレス応答シグナルとして機能する植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)が合成され、気孔の閉鎖等を引き起こす。さらに糖類、糖アルコール、アミノ酸、ベタインなどの適合溶質を蓄積し細胞を乾燥から保護している。適合溶質は、浸透圧調節のほか、膜やタンパク質に結合して脱水による高次構造の変性を防ぎ、細胞を脱水による障害から守っていると考えられている。

草本植物のシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)では、オリゴ糖の一種であるラフィノースファミリーオリゴ糖(RFO)が、RFOの前駆体で糖アルコールのガラクトキノールと共に、乾燥や高塩濃度、低温といった環境ストレスに応答して適合溶質として細胞内に蓄積し、ストレス耐性の向上に寄与することが示されている(5)(図-1)。この RFO の蓄積には、ガ

ラクチノールシンターゼ(*GolS*)が重要な役割を果たしている。一方、乾燥に応答した ABA 合成の制御には、9-*cis*-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ(*NCED*)が重要な役割をはたしている(1)(図-2)。

樹木のポプラ(セイヨウハコヤナギ, *Populus nigra* var. *italica*)においても、*GolS* 遺伝子が6種類、*NCED* 遺伝子が2種類単離され、乾燥や高塩濃度、低温等に応答して発現量が増加することが明らかになっている(3)。また、乾燥によってポプラの葉でガラクトキノールと RFO が蓄積することも示されている(2)。これらの結果は、ポプラにおいても RFO と ABA が環境ストレスに対する耐性に関わっていることを示唆している。

本研究では、環境ストレス耐性を向上させた樹木の開発、および樹木の環境ストレス下での RFO と ABA の機能解明を目指して、*GolS* と *NCED* 遺伝子をそれぞれ恒常的に過剰発現させた組換えポプラを作製することを目的とする。

Ko TAHARA, Takeshi MOHRI, Mitsuru NISHIGUCHI, Satoshi KOGAWARA, Satoru YOKOTA, Koichi KAKEGAWA, Tokihiko NANJO, (Department of Molecular and Cell Biology, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI), 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki 305-8687 JAPAN), Development of transgenic poplar to enhance tolerance to environmental stresses.

II 材料と方法

1. 材料およびポプラの形質転換 ポプラの無菌培養クローン苗雌株 50 本を供試体として用いた。ポプラ苗木の新条を寒天培地入りのプラスチック製ポットに移植し、25°C一定、相対湿度 60%，16 時間明期/8時間暗期の人工光下で無菌培養した。バイナリーベクターpBE2113SF を用い、アグロバクテリウム法によってポプラから単離した *GolS* 遺伝子2種（遺伝子番号:PnFL1-047_C08, PnFL2-032_B04）と *NCED* 遺伝子1種(PnFL2-034_G22)をそれぞれ野生型ポプラに導入した(図-3)。形質転換操作後の再分化個体の本葉から、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いてゲノム DNA を調製した。バイナリーベクター上の *NPTII* 遺伝子に特異的なプライマーセットを用いて、得られたゲノム DNA を鋳型として PCR を行い導入遺伝子の有無を調べた。

2. RNA の抽出 無菌培養したポプラ苗の本葉約 200 mg を採取し、200 mg のガラスビーズ(直径1mm)とともに2mL のマイクロチューブに入れて液体窒素で凍結した。マイクロチューブを振とう装置(CapMix, 3M ESPE)で振とうし、凍結試料を完全に粉砕した。粉砕試料から、以下のようにトータル RNA を調製した。2% (w/v) 臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB), 100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% (v/v)メルカプトエタノールを含む溶液を1mL 加え混合したのち、65°Cで 10 分間保温した。混合液にクロロホルムを加えてから遠心し、上清を 0.6 倍量(v/v)の6M LiClと混合し、-20°Cで一晩保存した。遠心後、沈殿した RNA を SV RNA Isolation System (Promega)を用いて精製した。

3. 導入遺伝子の発現解析 *GolS* および *NCED* 遺伝子の発現量を定量 RT-PCR 法により以下のように測定した。調製した RNA から iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad) を使って一本鎖 cDNA を合成した。SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad) と各遺伝子に特異的なプライマーセット、CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) を用いて、合成した cDNA を定量した。内部標準としてユビキチン遺伝子を用いた。

III 結果と考察

形質転換操作後のカルスから再分化した個体において、導入したマーカー遺伝子 *NPTII* の有無を PCR 法により調べ、PnFL1-047_C08 (*GolS*) で 3 系統 (#66, 140, 141), PnFL2-032_B04 (*GolS*) で 4 系統 (#129, 154, 171, 173), PnFL2-034_G22 (*NCED*) で 1 系統 (#135) が組換え体として選抜された(図-4)。また、対照として *GolS* と *NCED* 遺伝子を含まないベクターを導入した個体も 1 系統選抜した。

次に、選抜された組換え体において導入遺伝子の発現を

それぞれ測定し、野生型と比較した(図-4)。PnFL1-047_C08 (*GolS*) が導入された 3 系統では、いずれも野生型の 20~30 万倍、同遺伝子が強く発現していた。PnFL2-032_B04 (*GolS*) が導入された 4 系統では、野生型の 500~1,000 倍の発現量だった。一方、PnFL2-034_G22 (*NCED*) が導入された 1 系統では、野生型より高い発現は確認できなかった。

以上の結果から、*GolS* 遺伝子 PnFL1-047_C08 と PnFL2-032_B04 が恒常的に過剰発現した遺伝子組換え体をそれぞれ 3 系統と 4 系統得たことを転写レベルで確認した。

IV おわりに

今後、本研究で得られた *GolS* 遺伝子が過剰発現した組換え体において、代謝産物であるガラクトキノールと RFO の含有量が野生型と比較して増加しているか調べる予定である。ガラクトキノールと RFO の含有量が増大した組換え体では、乾燥、高塩濃度、低温等の環境ストレスに対して耐性が向上していることが期待される。

引用文献

- (1) IUCHI S, KOBAYASHI M, TAJI T, NARAMOTO M, SEKI M, KATO T, TABATA S, KAKUBARI Y, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*: **27**, pp.325-333
- (2) 掛川弘一・楠城時彦・西口満・古川原聡・毛利武・田原恒・横田智(2013)ポプラのラフィノースファミリーオリゴ糖の環境ストレス条件下での消長. 関東森林研究: **64**, pp.69-72
- (3) 西口満・古川原聡・横田智・毛利武・田原恒・掛川弘一・楠城時彦(2012) 遺伝子組換え樹木の創出のためのポプラ環境ストレス耐性遺伝子の探索. 日林学術講: **123**, Pb194
- (4) 篠崎一雄・篠崎和子(2001) 乾燥ストレス応答の分子機構. 朝倉植物生理学講座5環境応答(寺島一朗編). 朝倉書店, 東京, pp.106-114
- (5) TAJI T, OHSUMI C, IUCHI S, SEKI M, KASUGA M, KOBAYASHI M, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* : **29**, pp. 417-426

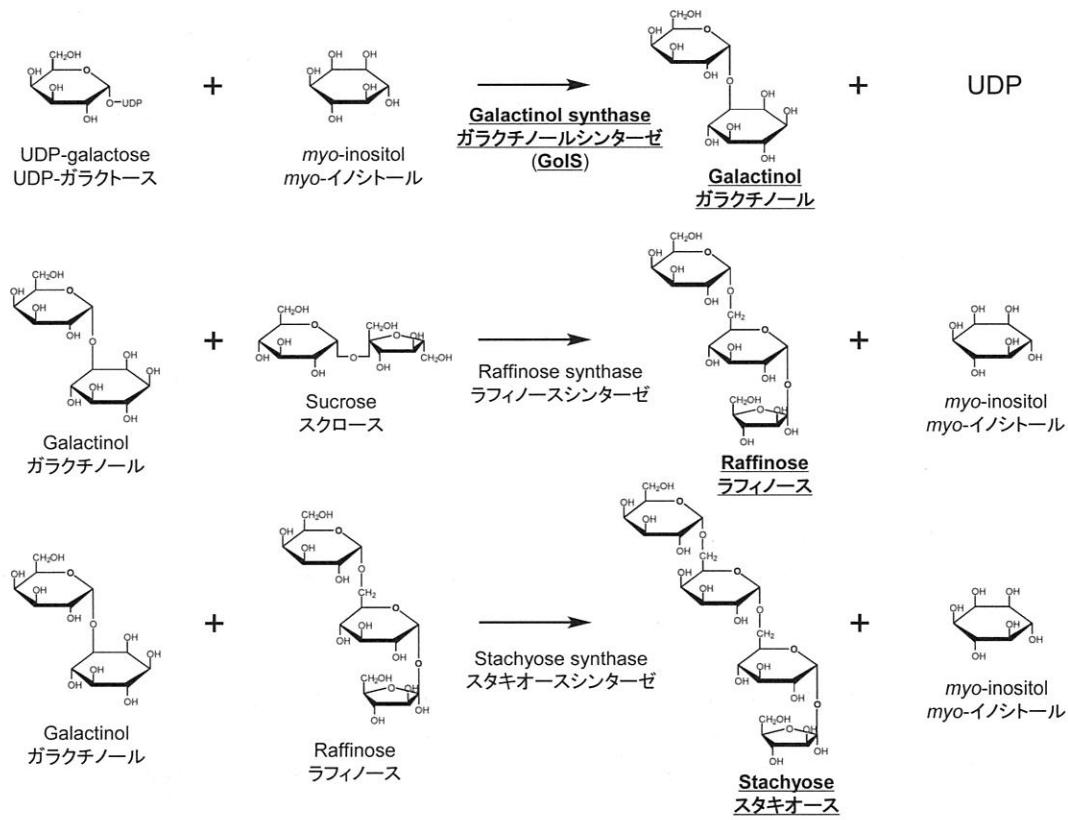


図-1. 高等植物におけるガラクチノールおよびRFO(ラフィノースとスタキオース)の代謝経路

Fig. 1 Metabolic pathway of galactinol and RFO (raffinose and stachyose) in higher plants.

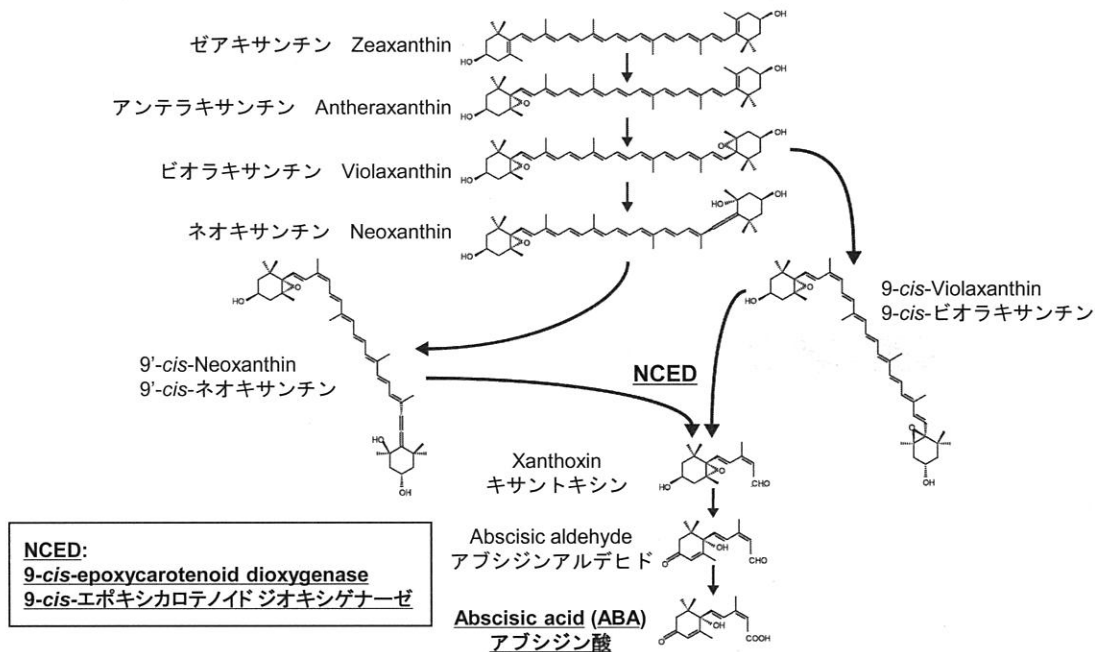


図-2. 高等植物におけるABAの代謝経路

Fig. 2 Metabolic pathway of ABA in higher plants.

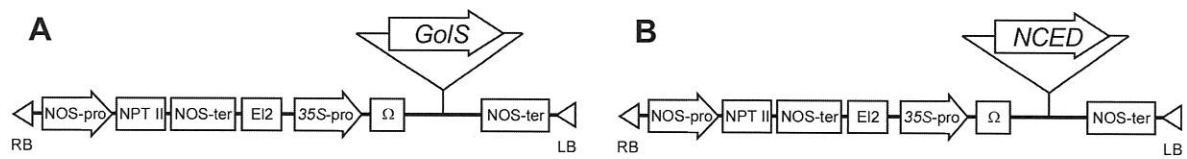


図-3. 組換えポプラ作製に用いたバイナリーベクターの構造の概要

アグロバクテリウム法によるポプラの遺伝子組換えに使用したバイナリーベクターpBE2113SF上のT-DNA左右境界配列間の構造を示す。A: *GolS* 遺伝子を挿入したコンストラクト, B: *NCED* 遺伝子を挿入したコンストラクト。RB: 右側境界配列, LB: 左側境界配列, NOS-pro: ノパリンシンターゼ遺伝子プロモーター, NPT II: カナマイシン耐性遺伝子, NOS-ter: ノパリンシンターゼ遺伝子ターミネーター, EI2: エンハンサー, 35S-pro: カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター, Ω: オメガ配列(翻訳時エンハンサー)。

Fig. 3 Schematic diagram of constructs of the CaMV 35S-promoter::cDNA fusion genes.

A binary vector pBE2113SF was used to introduce genes into the poplar by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. A: construct of the CaMV 35S-promoter::*GolS* cDNA, B: construct of the CaMV 35S-promoter::*NCED* cDNA. RB: right border, LB: left border, NOS-pro: nopaline synthase promoter, NPT II: kanamycin resistance gene, NOS-ter: nopaline synthase terminator, EI2: enhancer, 35S-pro: CaMV 35S-promoter, Ω: translational enhancer.

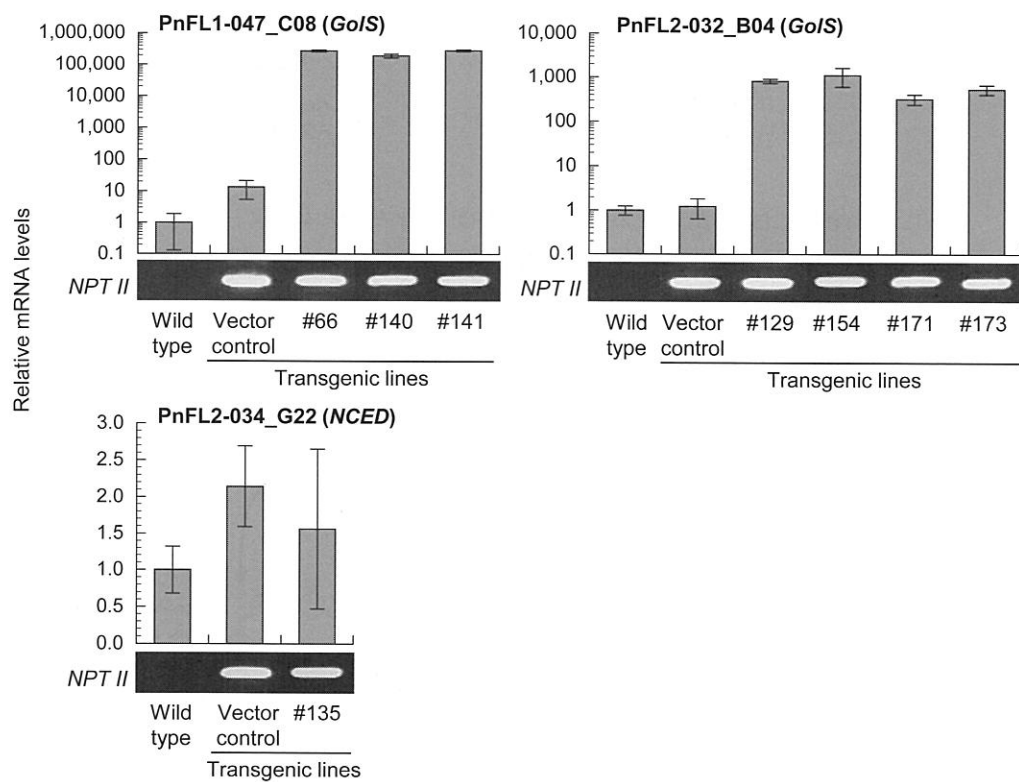


図-4. 組換えポプラにおける遺伝子導入の確認および *GolS* と *NCED* 遺伝子の発現

PCR 増幅産物を電気泳動し, *NPT II* 遺伝子の挿入を確認した結果を各グラフの下に示す。ポプラ無菌培養苗の葉における *GolS* と *NCED* 遺伝子の発現を定量 RT-PCR 法により測定した。野生型の発現に対する相対値で示している。値と誤差棒は、平均 ± 標準偏差を表す ($n=3$)。

Fig. 4 Confirmation of genetic transformation and expression of *GolS* and *NCED* genes in transgenic poplar.

Results of the electrophoresis to check a *NPT II* insertion are shown underneath each graph. Expression of *GolS* and *NCED* in leaves of poplars grown under aseptic conditions were measured by reverse transcription quantitative real-time PCR. Gene expression in wild type was set to 1. Values and error bars are mean ± SE ($n=3$).