

## ジベレリン 20 酸化酵素遺伝子を過剰に発現する組換えポプラの特性

伊ヶ崎知弘・辻井伊久美・細井佳久・橋田光 (森林総研)・小嶋美紀子 (理研)・  
吉田和正・二村典宏 (森林総研)・榊原均 (理研)・篠原健司 (森林総研)

**要旨:** ジベレリン (GA) は、高等植物の発芽や伸長成長、開花時期の制御等を行う植物ホルモンである。主要な活性型 GA の生合成経路はすでに解明されており、我々はこの経路上の酵素量を組換え技術を用いて制御することで、高バイオマス生産性樹木が作出できると考えている。タバコ (*Nicotiana tabacum*) 及びポプラ (*Populus nigra* var. *italica*) から単離した GA20 酸化酵素遺伝子それぞれについて、過剰に発現するように構築したベクターを用いてポプラに導入した。その結果、複数の系統の組換え体が得られ、それら組換え体では茎の伸長速度が速まり、内生ホルモンの分析においても活性型 GA の前駆体である GA<sub>20</sub> や GA<sub>9</sub> の蓄積が観察されるなど、予測された特性を強く示す系統が存在した。また、材の成分分析では、野生型と比較して顕著な差は観察されなかった。

**キーワード:** 遺伝子組換え、ポプラ、植物ホルモン、ジベレリン

**Abstract:** Gibberellins (GAs) are essential endogenous regulators of growth and various developmental processes throughout the life cycle of higher plants, including germination, stem elongation and flowering. The biosynthetic pathway of bioactive GAs in higher plants has been elucidated. We are interested in genetic engineering of the biosynthesis of GAs to control the growth and the biomass production of woody plants. Transgenic Lombardy poplars (*Populus nigra* var. *italica*) overexpressing the genes for GA 20-oxidase showed an increase in height growth, and we could detect precursor of bioactive GAs in the shoot apex. There was no significant difference in chemical composition (cellulose, hemicellulose and lignin contents) of wood between the transgenic and wild-type poplars.

**Keywords:** transformation, poplar, *Populus nigra*, phytohormone, gibberellin

## I はじめに

地球温暖化の主要な要因は、産業活動により排出された温室効果ガスの増加であることがほぼ確実になっている(1)。温暖化の影響として、海面上昇による海岸線の浸食、洪水、干ばつ、酷暑、ハリケーンなどの異常気象の増加、生物種の大規模な絶滅が懸念されている(1)。地球温暖化緩和策として、エネルギー供給、省エネルギー、再利用及び炭素固定が注目されており、炭素固定分野では、森林の保全や植林が高く評価されている。そこで、植林する樹木が成長量やバイオマス生産量が大いものであれば、より効率的に炭素固定ができ、資源としても利用可能であると考えられる。そのため、我々は、遺伝子組換え技術を利用した高バイオマス生産樹木の開発が可能かどうかを検討した。

植物の成長を変化させるということで我々が着目したのが、高等植物の伸長成長の制御等を行うことが知られている植物ホルモン、ジベレリン(GA)である(5)。す

で主要な活性型 GA の生合成経路は解明されており、その経路上の酵素遺伝子は、多くの植物種から単離されている(5)。主要な活性型 GA である GA<sub>1</sub> や GA<sub>4</sub> は、GA20 酸化酵素で形成された GA<sub>20</sub> や GA<sub>9</sub> の 3 位が水酸化されることによって形成する(5)。GA20 酸化酵素遺伝子の発現を抑制した組換えタバコ (*Nicotiana tabacum*) では、GA<sub>20</sub> や GA<sub>1</sub> の量が顕著に減少することから(4)、本酵素は活性型 GA の生合成の鍵酵素であると言える(4)。

今回、機能が既に確認されているタバコの GA20 酸化酵素遺伝子及びポプラ (*Populus nigra* var. *italica*) から新たに単離した GA20 酸化酵素に分類される遺伝子をポプラに導入して過剰に発現させ、その成長、バイオマス生産、材成分や内生植物ホルモン等を観察した。

## II 実験方法

1. 材料 人工気象調節施設で挿し木によって増殖した当年性ポプラから、形成後 1 週間程度で太さが約 5

Tomohiro IGASAKI · Ikumi TSUJII · Yoshihisa HOSOI · Koh HASHIDA (FFPRI, Tsukuba 305-8687, Japan) · Mikiko KOJIMA (RIKEN, Yokohama 230-0045, Japan) · Kazumasa YOSHIDA · Norihiro FUTAMURA (FFPRI) · Hitoshi SAKAKIBARA (RIKEN) · Kenji SHINOHARA (FFPRI) Characteristics of transgenic poplar overexpressing gibberellin 20-oxidase gene

mmの茎を採取し、長さ1cm程度に切り分けた切片約750個を作成し、遺伝子組換え実験の材料とした。

**2. ポプラの遺伝子組換え** 遺伝子組換え実験は、既存の実験方法(3)に従い、アグロバクテリウム法で行った。ただし、再分化した芽を得る時の抗生物質の濃度は、カナマイシン25 mg/lを用いた。また、得られた組換えポプラの芽を、抗生物質を含まない発根培地に置くことで根を誘導した。

**3. RT-PCR** 組換えポプラの候補個体の葉からRNAを抽出し、各導入遺伝子の配列に特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行い、導入遺伝子の発現の有無を確認した。

**4. 成長測定** 組換えポプラは、馴化後、パーミキュライトに植栽し、人工光(約 $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )下で5週間育成し、7日ごとに樹高、地上部境界面付近の茎の直径、節の数等を観察した。5週間育成後、根、茎、葉、葉柄を分取し、生重を測定後、70°Cで4日程度乾燥させ、乾重を測定した。他の分析に試料を使う場合は、必要量を切り取り、その生重を測定した後、乾重を測定し、生重の量比から全体の乾重を算出した。

**5. 植物ホルモン定量** 5週間育成した組換えポプラ頂芽部分の植物ホルモン量を、既存の実験方法(2)で確認した。

**6. 材の成分分析** 5週間育成した組換えポプラの材のセルロース量、ヘミセルロース量、リグニン量等の組成を、既存の実験方法(6)で確認した。

### III 結果と考察

**1. 組換えポプラの作出** pSMA系のバイナリーベクターにカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター下流にタバコまたはポプラから単離したGA20酸化酵素遺伝子を連結し、組換え実験を行い、選抜薬剤カナマイシンに耐性を示す組換えポプラを得ることに成功した。得られた組換え体については、発根後、フラスコ内で育成し、生育した植物体の葉からRNAを抽出し、導入した遺伝子が発現しているかを確認した(図-1)。この結果は、遺伝子組換え操作が適切に行われ、組換えポプラが作出できたことを示している。

**2. 組換えポプラの成長測定** 組換えポプラの成長を観察するため、フラスコ苗を馴化し、人工光(約 $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )下で5週間生育させた。タバコ由来のGA20酸化酵素遺伝子を過剰に発現する組換えポプラ系統7は顕著に生育が早く、樹高伸長量で約2倍であった(図-2)。この系統の組換えポプラについて、地上部の乾重を測定してみたところ、茎の重量が顕著に増加していることが分かった(図-3)。しかし、葉の乾重はあま

り増加していなかった(図-3)。茎の乾重が顕著に増加していたので、樹皮を取り除いた茎の部分(材)の成分分析を行った。分析サンプルが野生型と組換えポプラそれぞれ2個体で、1回の分析であるが、成分の比率には2%以下の差しかなく、現時点ではGA20酸化酵素遺伝子の導入はバイオマス生産量を増加させると考えて良いと思われる。

**3. 組換えポプラの内生ホルモン分析** 茎の成長量が顕著に増加した組換えポプラの系統について、その表現形質が導入した遺伝子の効果であることを確認するため、頂芽部分の内生ホルモンの定量を行った。すると、導入した遺伝子の産物であるGA20酸化酵素の反応産物であるGA<sub>9</sub>及びGA<sub>20</sub>が顕著に蓄積していることが判明した(図-4)。

### IV おわりに

今回の結果から、GA20酸化酵素遺伝子の導入によりバイオマス生産を増加させることができる可能性が強くなった。しかし、自然条件で適切に生育できるのかなどの疑問点もある。そこで、この組換えポプラを特定網室などで中長期間育成した場合や、他の木本植物に、GA20酸化酵素遺伝子を導入した場合の成長の増加がどの程度見込めるのかなどについて今後調べていきたい。また、同じように組換えたポプラ由来のGA20酸化酵素遺伝子を過剰に発現する組換えポプラ4系統とタバコ由来のGA20酸化酵素遺伝子を過剰に発現する組換えポプラ2系統では顕著な生育の促進を示していない。導入遺伝子が発現していることから、GA合成系に対してフィードバック阻害が起きていると考えられる。したがって、導入した遺伝子により、他のGA合成系酵素遺伝子やGA不活性化遺伝子がどのように働いているかをリアルタイムRT-PCRなどで確認していきたい。

### V 謝辞

本研究に用いたタバコGA20酸化酵素遺伝子を供与頂いた名古屋大学生物機能開発利用研究センターの松岡信教授に謝意を表す。また、本研究は森林総合研究所交付金プロジェクト「高バイオマス生産性と高ストレス耐性を付与した組換え樹木の開発」による援助を受けた。

### 引用文献

- (1) 環境省 (2007) IPCC 第4次評価報告書統合報告書 概要 日本語訳. 環境省, 東京, 90pp.
- (2) KUDO, T., MAKITA, N., KOJIMA, M., TOKUNAGA, H. and SAKAKIBARA, H. (2012) Cytokinin activity of

cis-zeatin and phenotypic alterations induced by over-expression of putative cis-zeatin-O-glucosyltransferase in rice. *Plant Physiol.* :**160**, pp.319-331

- (3) NISHIGUCHI, M., YOSHIDA, K., MOHRI, T., IGASAKI, T. and SHINOHARA, K. (2006) An improved transformation system for Lombardy poplar (*Populus nigra* var. *italica*). *J For Res* : **11**, pp.175-180
- (4) TANAKA-UEGUCHI, M., ITOH, H., OYAMA, N., KOSHIOKA, M. and MATSUOKA, M. (1998) Over-expression of a tobacco homeobox gene, NTH15, decreases the expression of a gibberellin biosynthetic gene encoding GA 20-oxidase. *Plant J.*: **15**, pp.391-400
- (5) YAMAGUCHI, S. (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.*: **59**, pp.225-251
- (6) YOKOYAMA, T., KADLA, J.F. and CHANG, H.M. (2002) Microanalytical method for the characterization of fiber components and morphology of woody plants. *J. Agric Food Chem.*: **50**, pp.1040-1044

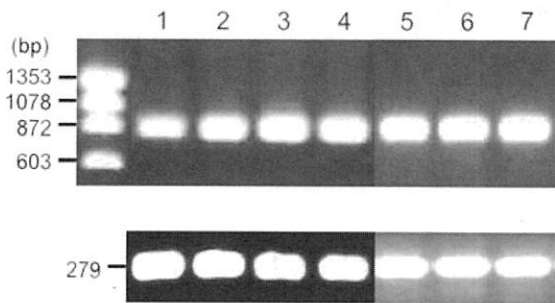


図 - 1. 組換えポプラにおける導入遺伝子発現の確認  
 Fig. 1. Detection by RT-PCR of the transgenes of transgenic poplar.

上段 1-4 はポプラ由来の GA20 酸化酵素遺伝子, 5-7 はタバコ由来の GA20 酸化酵素遺伝子. 下段はハウスキーピング遺伝子 *PnUB1*.  
 1-4, Transgene of the GA20-oxidase from poplar; 5-7, Transgene of the GA20-oxidase from tobacco.

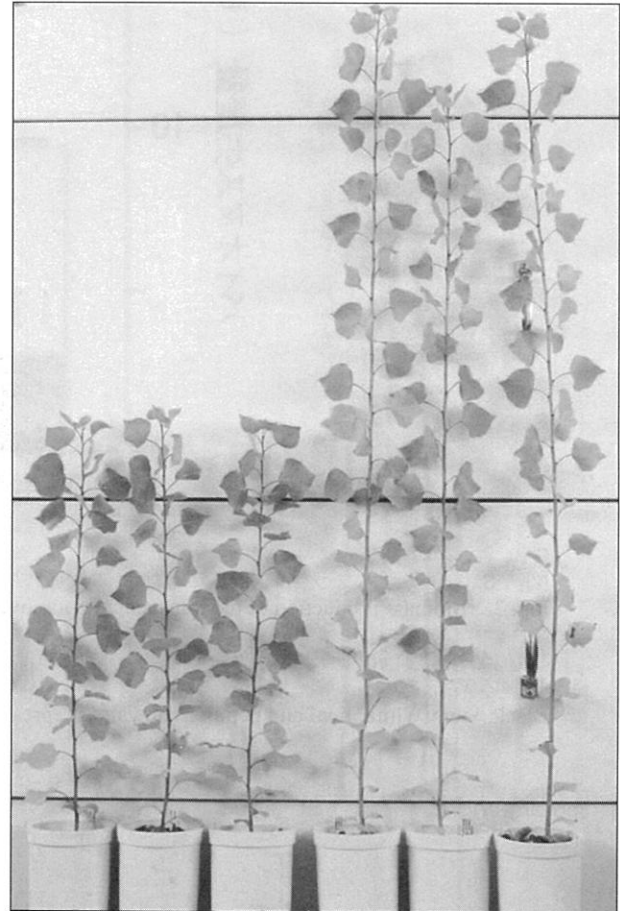


図 - 2. GA20 酸化酵素遺伝子を用いたポプラの成長促進  
 Fig. 2. Growth of the transgenic poplar overexpressing the gene for GA 20-oxidase.

左 3 個体は野生型. 右 3 個体は GA20 酸化酵素遺伝子が強く働く組換えポプラ系統 7. 本系統は図 - 1 のレーン 7 に相当する系統である。  
 Left three plants, Wild type poplar; Right three plants, transgenic poplar line 7 overexpressing the gene for GA 20-oxidase.

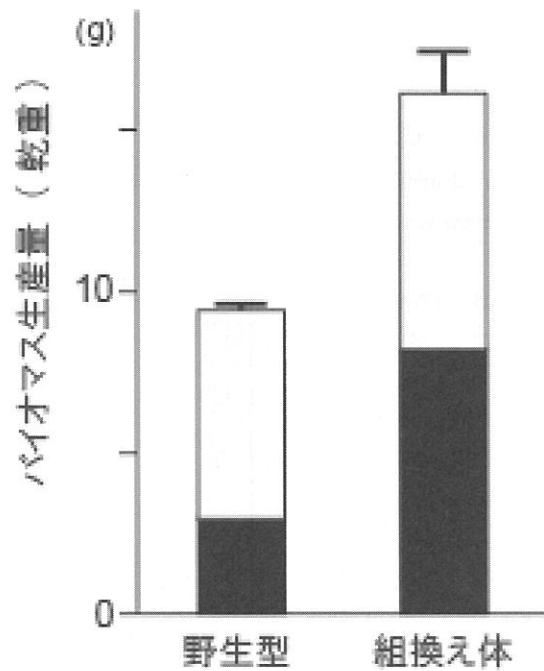


図 - 3. 組換えポプラ系統 7 のバイオマス生産

Fig. 3 Biomass production of the transgenic poplar overexpressing the gene for GA 20-oxidase.

黒色は茎, 白色は葉及び葉柄. 値は平均値 (n = 5), 誤差棒は標準誤差. 本系統は図 - 1 のレーン 7 に相当する系統である.

Black, Stem; White, Leaf and petiole. The values represent means+S.E. (n=5).

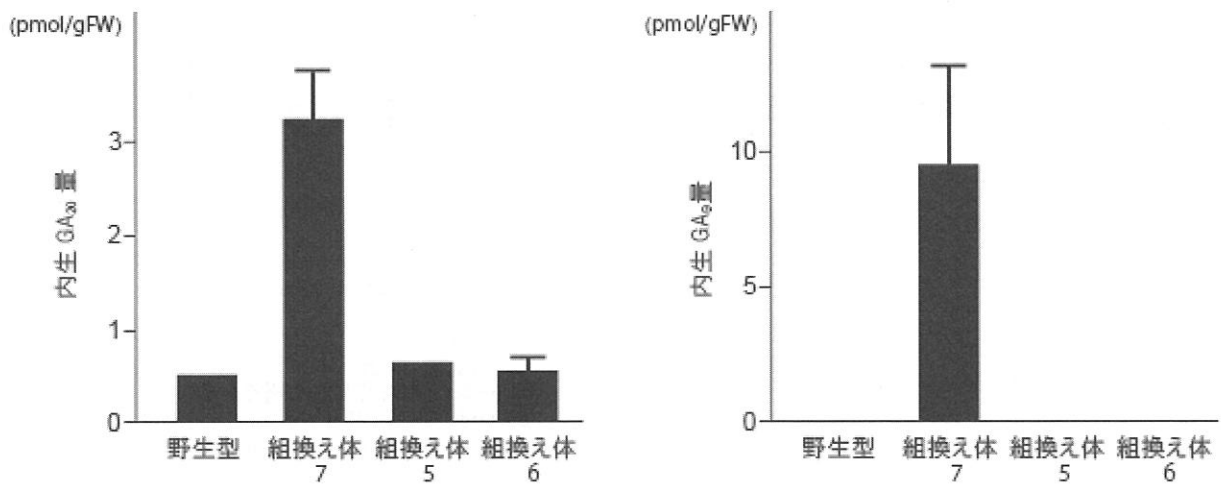


図 - 4. 組換えポプラ系統 7 の内生 GA 量

Fig. 4 Endogenous GA in the transgenic poplar line 7 overexpressing the gene for GA 20-oxidase.

左は GA<sub>20</sub>, 右は GA<sub>9</sub>. 値は平均値 (n = 3), 誤差棒は標準誤差. 組換え体 5, 6 及び 7 は図 - 1 のレーン 5, 6 及び 7 に相当する系統である.

Left, GA<sub>20</sub>; Right, GA<sub>9</sub>. The values represent means (n=3).