

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14748

研究課題名(和文) 遺伝子組換えによるユーカリの木質改変・アンチ-エイジング技術基盤の構築

研究課題名(英文) Development of technologies on genetic modification of woody biomass and anti-aging in eucalypt.

研究代表者

耳田 直純 (MIMIDA, Naozumi)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40569860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ユーカリを研究対象として高効率遺伝子組換え系の開発を行うと共に木質改変遺伝子や幼若性制御 miR156の導入を試みた。これらの結果、組換え体作出効率は9.5% (最高値) になり、目的の組換え体もそれぞれ20以上得られた。培養条件下で木質改変遺伝子導入個体は旺盛な成育を示したが、miR156導入個体は顕著な形態的变化や成育差は認められなかった。現在、これらを鉢植えして室内で栽培することで樹勢調査を実施している。以上により、ユーカリで遺伝子組換えによる高バイオマス樹木の研究・開発の基盤が構築できた。今後、これらの組換え体を用いて木部構造制御分子機構の理解を深め、将来のバイオマス資源増産に繋げる。

研究成果の概要(英文)：Genetic engineering techniques for eucalypts are still in their developing stages. Here, we attempted to develop efficient method in order to generate transgenic eucalypts by producing plants conferring candidate gene involved in the formation of woody biomass or microRNA (miR156) controlling juvenile phase. Through this research, the efficiency of transgenic plant production increased to 9.5% (maximum), facilitating the introduction of transgenes. Using the mentioned transformation method, over 20 transgenic lines were created for each transgene. Our results imply that while the plants harboring woody modified gene show a vigorous growth, one with miR156 did not show significant morphological changes nor the growth difference in the vitro culture condition was observed. Currently, plants are transferred to soil pods while observation is being carried out. In the future, the assessment on their woody structure modification will be performed.

研究分野：遺伝子組換え

キーワード：遺伝子組換え ユーカリ 樹木 バイオマス

1. 研究開始当初の背景

近年の気候変動や人類活動が森林の喪失を招き、地球温暖化や砂漠化が進行している。世界の森林消失は、年間1,350万 haと算出されている (Lindquist et al., 2012)。ユーカリは世界で最も植林されており、環境植林・バイオマス利活用両面において非常に有望なバイオマス樹木である。さらなる再生可能植林地の拡大、及び単位面積当たりのバイオマス資源の増産を図るには、遺伝子組換え技術により収量増産・加工時に生じるエネルギー削減に繋がる木質改変が必要不可欠である。アメリカ合衆国やブラジルでは、すでに遺伝子組換えユーカリの大規模野外試験を複数地域で実施している (Nature, 2014)。当研究グループも国内企業と共同で遺伝子組換えユーカリの研究・開発を行い、隔離圃場試験を合計8件実施した (J-BCH on the website, 2013)。さらに国外でも遺伝子組換えユーカリ隔離圃場試験を計画している。

2. 研究の目的

気候変動や人類活動による天然資源の枯渇や砂漠化が深刻な問題となりつつある。環境ストレス耐性や高バイオマス遺伝子組換え樹木を開発できれば、環境保全に資する持続可能な森林を増加でき、CO₂の大量固定・バイオマス資源増産ができる。本研究課題では、環境植林やパルプ原料として世界的に最も利用されているユーカリを研究対象とし、木質改変分子基盤を構築する。当研究室は国内唯一成木ユーカリ由来組織に対する遺伝子組換え技術を持つが、組換え効率が低いいため、1) 高効率ユーカリの組換え系の確立を目指す。これと共に 2) 東京大学が同定した新規シロイヌナズナ由来木質改変遺伝子を導入する。さらに幼若性制御 microRNA (miR156) の導入も試みる。miR156 は幼若性制御の microRNA であり、トウモロコシやスイッチグラスで恒常的に発現させることでバイオマスの増産が可能であることが報告されている。本研究では、これをユーカリの前形成層で特異的に発現させ、成育ステージへの影響を調査する。以上により、実際に木本植物で木質改変が可能であること、さらにアンチ・エイジ化が木本植物に及ぼす影響について明らかにし、将来のバイオマス資源増産に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 高効率ユーカリの組換え系の確立

ユーカリの組換え技術の多くは企業が持ち、論文で公開されている方法は胚軸法のみである。胚軸を用いれば、ヘテロ性により個体差が顕著に現れ評価が極めて困難になる。当研究室では、Australian Tree Seed Centre CSIRO Plant Industry より入手した *E. camaldulensis* 種子より組換え効率の優れた選抜系統を得ており、葉を用いて形質転換

が可能である。しかし、組換え効率が低いため、高効率ユーカリの組換え系の確立が望まれる。

本研究では、組換え行程をさらに見直し下記の点を中心に検討して高効率ユーカリの組換え系の開発を目指した。なお、遺伝子導入には、pSMAK343-M2GUS バイナリーベクター (農業生物資源研究所) を基本として *Arabidopsis thaliana tracheary element differentiation4 (AtTED4)* p::GUS、及び 35S::GUS を使用した。また、*AtTED4p::T101 AtTED4p::miR156* も同様に用いた。

高効率組換え精英ユーカリの再選抜

本研究以前に約 1000 個体の *E. camaldulensis* より試験管内で再分化能、増殖、及び発根能に優れた系統 5 系統を選抜を実施した。これらより組換えに適した個体を選抜した。

アグロバクテリウム感染処理の条件検討

アルミニウム処理の検討; 外植体を 0.5 mM AlCl₃・6H₂O (pH 4.0~4.5) で処理を行い、その後アグロ感染を実施した。大部分の Oenotherin B は Al³⁺ と複合体を形成し、フリーの Oenotherin B は減少する (Tahara et al., 2014)。低 pH であるが、ユーカリの成長に影響を及ぼさなかった。

アグロバクテリウム株の検討; LBA4404 と EHA105 を検討した。

エチレン抑制型スーパー・アグロバクテリウムの検討; *acdS* 遺伝子を持つプラスミドを LBA4404 株に導入してこれを用いた。褐変化や枯死が起こしやすいユーカリでは特に有効であると考えられ、これにより高い遺伝子組換え効率が得られることが期待された。

(2) 木質改変遺伝子と miR156 導入個体作出

木質改変遺伝子は既にシロイヌナズナに導入して機能を明らかにしている。miR156 について本研究課題でシロイヌナズナに導入してベクターコンストラクトが正常に機能するか確認した。その後、これらのコンストラクトをユーカリへ導入した。

4. 研究成果

(1) 高効率ユーカリの組換え系の確立

高効率組換え精英ユーカリの再選抜; 本研究課題で組換え効率が非常に高い系統 “UT3” を選抜した。これにより以前に利用していた系統 “UT2” に比べ組換え効率が 10 倍程度高まり、成育も優れていた。以後、UT3 を研究に用いた。

アグロバクテリウム感染処理の条件検討
アルミニウム処理とアグロバクテリウム株の検討: LBA4404 未処理区 12/290 (カナマイシン耐性苗条/外植体)、LBA4404 アルミニウム処理区は 12/300、EHA105 処理区 21/230、22/230 の比率でカナマイシン耐性苗条が得られた。また、類似条件下でも再現性が示された。以上のことから、アグロバクテリウム株の違いやアルミニウム処理は組換え効率に影響を与えないことが明らかとなった。

エチレン抑制型スーパー・アグロバクテリウムの検討: スーパー・アグロバクテリウムを利用すると、多芽体様組織の再分化率が上昇した (図 1 右)。これらが独立した組換え組織であるならば、組換え効率が増加したと考えられる。今後、さらなる検討が必要である。



図1 再分化シュート 葉柄より再分化する。

これらカナマイシン耐性苗条を GUS 染色すると、強い GUS 活性が認められた (図 2)。

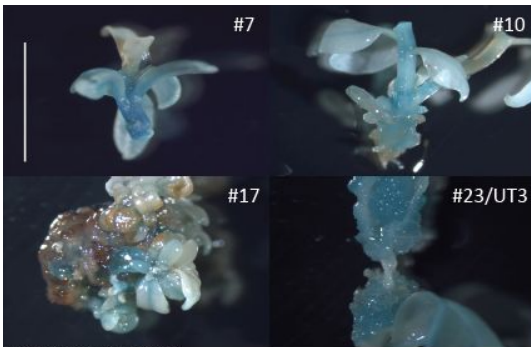


図2 35S::GUS/UT3 再分化シュートをGUS染色した。Scale bar = 5 mm

(2) 木質改変遺伝子と miR156 導入個体作出

木質改変遺伝子導入個体作出: UT3 にシロイヌナズナ由来木質改変候補遺伝子 *AtTED4p::T101* を導入した。30 ライン以上の

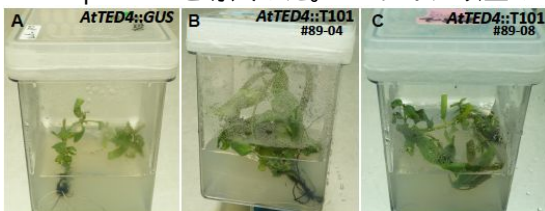


図3 *AtTED4pro::T101/UT3*の再分化シュート
 A) *AtTED4pro::GUS*再分化シュート(コントロール)。
 B, C) *AtTED4pro::T101*再分化シュート。

カナマイシン耐性苗条を得た。その後の更なる選抜により各々良好に成育する 3, 4 ラインを確立した。これらは培養条件下で非組換え体と比べ優れた成育特性を示す (図 3)。現在、鉢挙げて成育を観察している。

miR156 の導入個体作出: *AtTED4p::miR156* のコンストラクトは、データベースより入手したユーカーリ miR156 配列を人工合成することで構築した。初めに、*AtTED4p::miR156* が正常に機能するか確認するため、シロイヌナズナへ導入した。組換え体は 10 ライン以上得られた。非組換え体とこれら組換え体の抽台時期の葉数を比較することで栄養成長相が延長されていることを確認した。

ユーカーリへの導入も試み、15 ライン以上の組換え体を得た。これらの組換え体は、再分化直後で分枝の発達が著しい (図 4)。これは、*AtTED4* プロモーターが再分化直後で高い発現能を持つことに由来していると考えられる。その後、分枝の発達は低下した。さらに選抜を実施し各々良好に成育する 3, 4 ラインを確立したが、*in vitro* 条件下では非組換え体と顕著な違いは認められていない。今後、鉢挙げを行い、成育を観察する予定である。

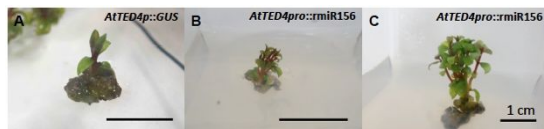


図4 *AtTED4pro::miR156/UT3*の再分化シュート A) *AtTED4pro::GUS*再分化シュート(コントロール)。B) *AtTED4pro::miR156*再分化シュート。分枝の発達が顕著である。C) Bより12日後。

今後は、実際に *AtTED4p::T101/UT3* により木質改変されているか、*AtTED4p::miR156* による前形成層のアンチ・エイジ化が木部形成に与える影響について明らかにし、将来のバイオマス資源増産に繋げる。

5. 主な発表論文等 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

耳田 直純 (MIMIDA, Naozumi)
 筑波大学・生命環境系・助教
 研究者番号: 40569860

(2) 研究分担者

ビダディ ハニエ (BIDADI, Haniyeh)
 筑波大学・生命環境系・助教
 研究者番号: 80749888

渡邊 和男 (WATANABE, Kazuo)
 筑波大学・生命環境系・教授
 研究者番号: 90291806

(3)連携研究者

小口 太一 (OGUCHI, Taichi)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：60527050

菊池 彰 (KIKUCHI, Akira)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：00400648

遠藤 暁詩 (ENDO, Takashi)
東京大学・理学系・助教
研究者番号：00342759