

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19380186

研究課題名 (和文) ホルムアルデヒドとその関連化合物を吸収除去する植物の開発と観葉植物への応用

研究課題名 (英文) Creation of plants that efficiently absorb and remove formaldehyde in air by genetic engineering, and its application to ornamental foliage plants

研究代表者

泉井 桂 (IZUI KATSURA)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：20025414

研究成果の概要 (和文)：メタノール資化性細菌のホルムアルデヒド (HCHO) 固定に関与する 2 種類の酵素の遺伝子をシロイヌナズナ (*At*) およびタバコに導入し、形質転換体を取得した。形質転換体は HCHO の吸収能が増強され、高い耐性を示した。*At* を用いて HCHO に応答して発現量が増加する遺伝子を網羅的に解析し、毒性および組換え体の耐性機構について手がかりを得た。植物において最も強く発現できるように遺伝子を合成し、これを *At* および数種類の観葉植物に導入して、シックハウスガスの低減化に役立つ植物の作出を試みた。

研究成果の概要 (英文) : The two enzymes which are involved in the formaldehyde (HCHO) fixation in a methanol utilizing bacterium were expressed both in *Arabidopsis* (*At*) and tobacco. The obtained transformants showed an augmented capacity of absorbing HCHO and an enhanced tolerance to HCHO. Genome-wide analysis of the genes whose expression were affected in response to HCHO, gave clues to the mechanisms of toxicity of and tolerance to HCHO. The plasmids for the efficient expression of these enzyme genes in plants were constructed, and trials were made to obtain transgenic ornamental plants which will be useful for phytoremediation of HCHO-polluted indoor air.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：ホルムアルデヒド、シックハウスガス、形質転換観葉植物、ファイトレメディエーション、メタノール資化性菌、リブローズモノリン酸経路、コドン最適化合成 DNA、マイクロアレイ解析

## 1. 研究開始当初の背景

ホルムアルデヒド(HCHO)は主要なシックハウスガスの一つであり、建材や家具から微

量ではあるが長期にわたって室内空气中に拡散するため、これを低減する方策が種々試みられてきた。観葉植物の中には、HCHO を吸

収・除去する能力の比較的高いものも見いだされていたが、その能力は限られており、より高い吸収能力をもつ植物を開発する必要があった。2003年にAckerらは、植物が本来持っているHCHOの代謝酵素の一つの遺伝子を植物において過剰発現させることによって、有意にHCHOの分解能力を高めることができたが、成長に障害が出たりして実用化に結びつくものではなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は2000年度の科学研究費(萌芽的研究)の援助により開始されたものである。メタノール(MeOH)資化性菌が、MeOHをHCHOに酸化したのち、これをリブローズ5-リン酸合成酵素によってヘキサコース6-リン酸としたのち、ヘキサコース6-リン酸イソメラーゼによってフルクトース6-リン酸に転換して同化することに注目し、これらの酵素遺伝子、それぞれ*rmpA*および*rmpB*遺伝子を、植物の葉緑体において発現させ、カルビン回路に導入することを試みた。2007年度までに、実験植物のシロイヌナズナおよびタバコを用いて形質転換体を作成することに成功した。得られた形質転換体のHCHOの吸収・除去能は高められ、HCHOに対する耐性も顕著に高くなった。

2007年度からは、

- (1) 形質転換体のHCHO吸収速度を定量的に評価するための実験装置の構築、
- (2) 植物(シロイヌナズナ)に対するHCHOの毒性発現機構の解析、
- (3) 植物において*rmpA*および*rmpB*遺伝子を高発現させるためのベクターの開発、(4) 種々の観葉植物の形質転換行い、HCHOの吸収・除去能を増強した観葉植物を作出することなどを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) HCHO曝露実験装置の構築：アドテック社(株)のADN1-Mix/エア制御・混合ユニットを基本として、一定の湿度・温度条件下で任意の濃度のHCHOをチャンバーに供給できるシステムを構築し、高感度のHCHO計測器(ホルムアルデメータhtV(JMS社))を用いてモニターした。

(2) シロイヌナズナの野生型(WT)および遺伝子組換え体(RC、A+B)の発芽後7-8週の植物体を低濃度(1-2 ppm)および高濃度(15-16 ppm)のHCHOに2.5時間曝露したときにmRNAの発現量に変動する遺伝子をマイクロアレイ法により網羅的に解析する。

(3) 双子葉植物および単子葉植物のコドン使用頻度に合わせて*rmpA*および*rmpB*遺伝子のDNAを合成し、前者での発現にはトマトのRbcS-3Cのプロモーターと葉緑体へのトランスジットペプチドのDNA配列を用いた。単子葉

植物用には、イネの対応する遺伝子を用いた。ベクターの構築は大部分は中川教授(島根大学)のご協力によってGateway systemを用いて行った。また、*rmpA*と*rmpB*を融合させた*rmpAB*も構築した。

(4) 各種観葉植物の*rmpAB*遺伝子導入系の開発。ベゴニア(*Begonia semperflorens*、品種スプリントピンク)の材料として、ポット栽培した個体、または、培養中の無菌の植物体の葉を用いた。ポット栽培した個体の場合は表面殺菌したのち、各々の葉を5mm角に切断し、窒素成分およびカルシウム濃度を半分とした改変MS塩類に、ショ糖30 g/l、チジアズロン1.0 mg/l、ナフタレン酢酸0.3 mg/lを含む培地(カルス誘導用培地)に移植した。次いでホルモンを含まない他は同じ培地(再分化用培地)に移植した。得られた植物体は、パーミキュライトを用いて順化した。

ポトス(*Epipremnum aureum*)は表面殺菌により無菌培養系を作出した。節部を切り、上記カルス誘導用培地に移植した。培養後、やはり上記再分化用培地に移植してさらに培養し、再分化個体を得た。

いずれの培養も24°C、24時間日長で行った。光強度は約50~80 μmol/m<sup>2</sup>/s(蛍光灯)であった。

アグロバクテリウムの形質転換、感染、除菌は常法により行った。ただし、ポトスへの感染時には、培養液にアセトシリンゴンを10 mg/l添加した。除菌には500 mg/lのティメンチンを用いた。

なお、実験にホコシダ(*Pteris ensiformis*)も用いたが、その培養材料および培養方法は雨木ら(東京農業大学)によるものであり、報告もなされている。形質転換を試みたが形質転換が困難であり、進展がなかったため、本報告では省略する。

## 4. 研究成果

(1) HCHOへの曝露装置の構築：下図のような曝露装置を構築し、少なくとも5日間一定の濃度のHCHOを持続的に植物を格納するチャンバーに供給できるようになった。



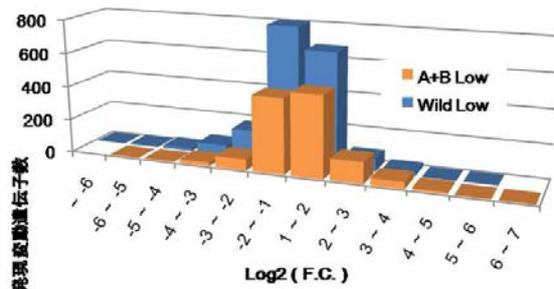
植物がHCHOを0.08ppmのガイドライン値以下にまで低下させるに要する時間を測定することによって、植物のHCHO吸収能を評価するためには閉鎖系において湿度を一定に保つ必要があるが、湿度のフィードバック制御

システムは現在検討中である。本システムの構築にあたっては、近畿大学生物理工学部の中桐紘治教授の協力を得た。

(2) シロイヌナズナに対する HCHO の毒性。1-2 ppm の HCHO に 150 分間曝露しても外観からは障害はみられなかった。14-16 ppm に同時間曝露したときも、障害はみられなかったが、翌日にはややしおれる傾向がみられた。14-16 ppm の HCHO に 4 日間曝露したのちには、下図の左のように葉に白化がおこった。



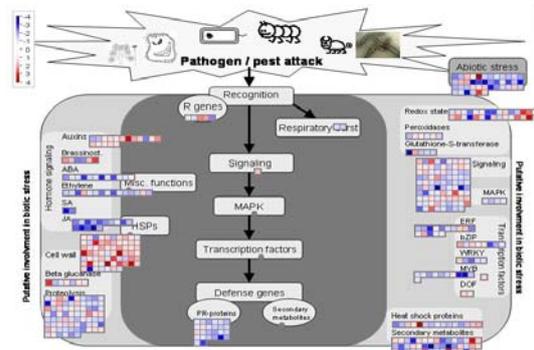
シロイヌナズナ野生株と A+B 株を、低濃度 (1-2 ppm) と高濃度 (14-16 ppm) の HCHO に 150 分間曝露した。曝露サンプルに対して網羅的遺伝子発現解析を行った結果、シロイヌナズナ野生株が 150 分 1-2 ppm という短時間低濃度の HCHO に対して 2000 個近い遺伝子



注：FC=fold change

の発現応答 (2倍以上または0.5倍以下へのレベル変化) を見せ、A+B 株では 1200 個の遺伝子が応答した (上図)。HCHO 濃度が 14-16 ppm では野生株と A+B 株でそれぞれ 4400 および 4600 個近い遺伝子が応答した。低濃度の HCHO に対する応答が A+B 株の方が変動数が減少したのは、導入遺伝子によって HCHO に対するストレスが低減されたためと考えられた。高濃度では変動遺伝子数は約 2 倍に増大したが、野生型と A+B 株では差がみられず、HCHO のストレスが導入遺伝子による軽減効果を上回ったためと推測された。その最大発

現変化量は 2000 倍を超えるものも見られ、植物が HCHO に対して速やかにかつ強力に応答すること示した。下図は野生株において、低濃度の HCHO で mRNA のレベルが変化した遺伝子について、トランスクリプトーム解



析ソフト MapMan を用いて解析した結果の一例を示す。応答遺伝子は様々な経路の混在を示していたが、ストレスに限るならば、高温ストレスおよび酸化/乾燥ストレス関連遺伝子が多くを占めていた。さらにシグナル伝達では、ロイシンリッチリピート (LRR) レセプターキナーゼシグナルおよびカルシウムシグナル関連遺伝子が多くを占めていたが、高濃度の曝露ではそれらに加えて光シグナル関連遺伝子の応答が見られた。野生株と A+B 株の遺伝子発現を比較した場合、低濃度の HCHO に対して、A+B 株の遺伝子発現応答が野生株よりも穏やかな傾向にあった。高濃度の HCHO に対しては、葉緑体関連遺伝子など一部の遺伝子群について、A+B 株の応答が野生株よりも穏やかな傾向にあった。このように A+B 株についてのマイクロアレイ解析によって、少なくとも 1-2 ppm の HCHO に 150 分間曝露されることに応答して、導入遺伝子が有効に働き、植物のストレスを軽減することを遺伝子発現レベルで確認した。本研究における HCHO 応答遺伝子の解析結果から、HCHO ストレスが酸化ストレスに近いことが明らかとなった。

(4) *rmpA* と *rmpB* の融合遺伝子 (*rmpAB*) を植物において高発現させるためのベクターの構築。



使用する遺伝子は細菌由来であり、コドンの使用頻度が植物とは著しく異なっているものがあると考えられる。発現を最適化するために、双子葉 (シロイヌナズナ) および単子葉 (イネ) 植物における最適コドンを選択して融合酵素をコードできるように合成 DNA

を調製（外注）した。これにトマトおよびイネの Rubisco 小サブユニット遺伝子のプロモーターおよびトランシットペプチドの翻訳領域を連結して、翻訳産物が葉緑体に局在化するように設計した（上図）。中川強教授（島根大学）のご協力により、Gateway system を用いて、選択マーカー遺伝子を異にする、合計 4 種類の発現ベクターを構築した。

（５）各種観葉植物に対する融合遺伝子 *rmpAB* 遺伝子導入系の開発

調製した単子葉・双子葉植物用の融合遺伝子 (*rmpAB*) 発現用のベクターを各種観葉植物に導入するための再分化系の構築および遺伝子導入を試みた。

①ベゴニア (学名: *Begonia semperflorens*)

親しみやすいうえ、葉挿しで増殖でき、形質転換の報告も存在する観葉植物であるベゴニアに注目し、その再分化系の構築を試みた。表面殺菌した葉を 5 mm 角に切断しカルス誘導用培地に移植したところ（図 1）、約 3 週間で表面がカルス様の組織を誘導できた（図 2）。

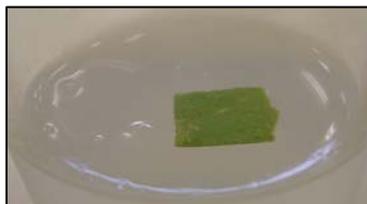


図 1 培養開始直後のベゴニア外植片



図 2 ベゴニア外植片からのカルス誘導

次いでホルモンを含まない他は同じ培地（再分化用培地）に移植したところ、2 週間以内に植物体が誘導され（図 3）、約 1 か月で順化可能な個体に成長させることができ、かつ順化は容易であった（図 4）。このように、葉切片を材料とする再分化系を確立することができた。

また、形質転換操作時の選抜に用いる抗生物質に対する耐性を観察したところ、G418 を 50 mg/l 含む培地が適当と予想された。アグロバクテリウム法によって形質転換する可能性を、GUS 遺伝子の一過的発現によって確認した（図 5）。



図 3 ベゴニアカルスからの植物体分化



図 4 試験管内における植物体の生育（左）と順化後のベゴニア植物体（右）

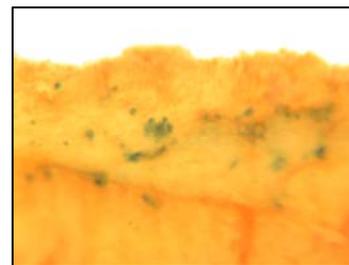


図 5 アグロバクテリウム法により導入した GUS 遺伝子のベゴニアにおける一過的発現（青色発色部）

このように、ベゴニアに対する遺伝子導入が可能であると期待された。しかし、*rmpAB* を導入する際には著しい褐変化がみられ、目的の形質転換体を得るに至っていない。褐変化を回避する方法について今後検討が必要である。

②ポトス

室内の緑化によく用いられるポトスを単子葉植物として選び、培養系の誘導と再分化系の構築を試みた。

ポトス節部からカルス誘導用培地上でカルスが誘導された（図 6）。誘導されたカルスは最小で 0.5 mm 程度の厚さに細断しても、そこから増殖させることができた。カルスを再分化培地に移植し培養すると緑色の部分が明確になり、その部分を切り取ってさらに再分化培地に移植すると、約 50 日で小植物体を得られ（図 7）発根も認められた（図 8）。得られた植物体を順化することも可能であった（図

9)。この方法は、ポトス優良株の急速大量増殖に対しても有用である。

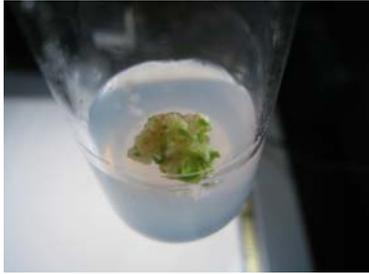


図6 ポトス節部から誘導されたカルス塊すでに緑色部が形成されている。



図7 緑色部のみを再分化培地に移植したときの植物体の誘導



図8 試験管内におけるポトス植物体の生育と発根状況



図9 順化後のポトス植物体

次いで、カルスを材料に rmpAB の導入を試みた。しかし著しい褐変化がみられ(図 10)、目的の形質転換体を得るに至っていない。今後、さらなる検討が必要である。

このほか、理化学研究所 松井 南博士の協力により、シクラメンの rmpAB 遺伝子導入株(カナマイシン耐性により選抜)を得た。この株について rmpAB 遺伝子の発現を確認中で



図10 rmpAB の導入を試みたポトス外植片からのカルス誘導と選抜時の褐変化状況

あるが、生育および外見は野生株と特に差がなかった。

なお、構築した双子葉植物用の発現ベクターが発現するかどうかを確かめるために、シロイヌナズナについても形質転換植物を作成した。柳沢修一准教授(東京大学)のご協力により、T0 世代の種子を調製いただき、これから、薬剤耐性を示す T1 世代の種子を取得し、T2 世代の 6-8 週目の植物体について、DNA の PCR、および RT-PCR により、遺伝子 DNA の導入と転写レベルの発現を確認することができた。しかし、ウェスタンブロットによる融合酵素タンパク質の検出はできなかった。現在その原因を確認中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Chen, L.M., Yurimoto, H., Li, K.Z., Orita, I., Akita, M., Kato, N., Sakai, Y., and Izui, K., Assimilation of formaldehyde in transgenic plants due to the introduction of bacterial ribulose monophosphate pathway genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (3), 627-635, 2010, 査読有。
- ② 泉井桂, 有害なホルムアルデヒドを吸除除去する植物を開発、*科研費NEWS*、第 4 巻、ページ 10、2008、査読無。
- ③ Sawada A., Oyabu T., Chen, L.M., Li, K.Z., Hirai, N., Yurimoto, H., Orita, I., Sakai, Y., Kato, N., and Izui, K., Purification capability of tobacco transformed with enzymes from a methylotrophic bacterium for formaldehyde. *Int. J. Phytoremediation*, 9, 487-496, 2007, 査読有。

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kubo, S., Chen, L.M., Sakakibara, H., Orita, I., Yurimoto, H., Kato, N., Sakai, Y., Akita, M., and Izui, K., Transcription analysis of formaldehyde response in wild-type and formaldehyde-tolerant transformant of *Arabidopsis*. ICAR2010 (International

Congress of Arabidopsis Research) Pacifico, Yokohama, June 6-10, 2010.

- ② Kubo, S., Sakakibara, H., Nakagiri, K., Izui, K., Microarray analysis of the genes expressed upon exposure to formaldehyde in Arabidopsis, The 9th International Plant Molecular Biology Congress, Sain Louis, MO, USA, Oct., 2009.
- ③ 久保森、中桐紘治、須藤恵美、榊原均、泉井桂、ホルムアルデヒド曝露したシロイヌナズナにおける遺伝子発現のマイクロアレイによる解析、第50回日本植物生理学会、名古屋、名古屋大学、2009年3月。
- ④ 久保森、中桐紘治、須藤恵美、榊原均、泉井桂、ホルムアルデヒド曝露実験系の構築とホルムアルデヒドに対するシロイヌナズナの応答のマイクロアレイによる解析、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会、神戸、神戸ポートアイランド、2008年12月。

[その他]

ホームページ等

[http://www.waka.kindai.ac.jp/tea/biotech/labs/cell/cell\\_gaiyo.html](http://www.waka.kindai.ac.jp/tea/biotech/labs/cell/cell_gaiyo.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

泉井 桂 (IZUI KATSURA)  
近畿大学・生物理工学部・教授  
研究者番号：20025414

### (2) 研究分担者

秋田 求 (AKITA MOTOMU)  
近畿大学・生物理工学部・准教授  
研究者番号：80258061

### (3) 連携研究者

なし