

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19580178  
 研究課題名（和文） 樹木由来の選抜マーカー遺伝子を利用したポプラの遺伝子組換え法の開発  
 研究課題名（英文） Development of transformation system in Lombardy poplar by using a poplar gene as a selective marker gene  
 研究代表者  
 西口 満 (NISHIGUCHI MITSURU)  
 独立行政法人森林総合研究所・生物工学研究領域・主任研究員  
 研究者番号：80353796

研究成果の概要（和文）：遺伝子組換え樹木を作るための選抜マーカー遺伝子として利用するために、ポプラから UDP-*N*-acetylglucosamine:dolichyl-phosphate *N*-acetylglucosaminephosphotransferase (GPT) の遺伝子を単離し、DNA 塩基配列を解読した。GPT 遺伝子は、ポプラの根、茎、葉および芽で発現していた。ポプラの GPT を発現させた酵母はツニカマイシン耐性を示した。GPT を選抜マーカー遺伝子とする植物の遺伝子組換え用ベクターを作製し、ツニカマイシンを選抜薬剤としてポプラの遺伝子組換えを行った結果、GPT を大量に発現する遺伝子組換えポプラが得られた。

研究成果の概要（英文）：To obtain a selective marker gene for generation of transgenic trees, we cloned and sequenced the cDNA of UDP-*N*-acetylglucosamine:dolichyl-phosphate *N*-acetylglucosaminephosphotransferase (GPT) from Lombardy poplar (*Populus nigra* var. *italica*). Overexpression of GPT in budding yeast conferred tunicamycin tolerance. We succeeded in the generation of GPT-introduced transgenic poplars by using tunicamycin and a new binary vector, which contained the cDNA of GPT as a selective marker gene.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・林学・森林工学

キーワード：ポプラ、遺伝子組換え、選抜マーカー遺伝子、ツニカマイシン、GPT、バイナリーベクター、遺伝子発現、出芽酵母

## 1. 研究開始当初の背景

新しい科学技術が一般的に利用されるためには、利便性だけでなく社会的な受容性が極めて重要である。遺伝子組換え技術は、環

境ストレス耐性樹木や高バイオマス生産性樹木などの有用な新しい性質を付与された樹木を作出する可能性を持っているが、遺伝子組換え樹木の野外栽培は、実用的にはほと

んど進んでいない。

遺伝子組換え植物の実用的な野外栽培は、米国、アルゼンチン、ブラジル、カナダ、中国など一部の特定の国々で進められている。一方、日本や西欧では、遺伝子組換え植物の栽培や利用が進んでいない。その理由としては、技術的あるいはコスト的な問題もさることながら、遺伝子組換え植物による人体への危険性や自然環境への悪影響に対する不安感や嫌悪感が強いことが考えられる。

不安感や嫌悪感の原因の一つと考えられるのは、遺伝子組換え植物のゲノム中に、抗生物質耐性遺伝子などの細菌由来の遺伝子が存在するという事実である。遺伝子組換え植物を作り出すためには、遺伝子組換え植物のみを生育させ非組換え植物を殺すための薬剤選抜が必要であり、遺伝子組換え植物の細胞内には薬剤に抵抗するための選抜マーカー遺伝子を導入する必要がある。これまで用いられている選抜マーカー遺伝子の多くは、細菌に由来するものであった(表1)。選抜マーカー遺伝子として、このような細菌由来の遺伝子を使わず、元の植物由来の遺伝子を利用することができれば、遺伝子組換え植物に対する不安感や嫌悪感が減少し、遺伝子組換え植物に対する社会的な受容性もより高まると考えられる。

草本植物由来の選抜マーカー遺伝子については幾つかの報告がある。しかし、樹木ではそのような選抜マーカー遺伝子はこれまで単離されておらず、遺伝子組換え樹木の作出にも利用されていなかった。

UDP-*N*-acetylglucosamine:dolichylphosphate *N*-acetylglucosaminophosphotransferase (GPT) は、タンパク質への糖鎖付加の初期過程に関与する酵素である。ある種のタンパク質への糖鎖付加は、そのタンパク質が機能するために必要な修飾であり、糖鎖が付加されない場合にはタンパク質の正常な機能が発揮されず、生物にとって様々な障害を引き起こす。一方、抗生物質のツニカマイシンはGPTの阻害剤であり、付加されるべき糖鎖の合成を阻害する。その結果、タン

遺伝子名	遺伝子の由来
カナマイシン耐性遺伝子	大腸菌
ハイグロマイシン耐性遺伝子	大腸菌
サイトカイニン合成酵素遺伝子	植物病原性土壌細菌 ( <i>Agrobacterium</i> )
ビアラホス耐性遺伝子	放線菌
ホスホマンノース異性化酵素遺伝子	大腸菌

表1 遺伝子組換え樹木で使われた選抜マーカー遺伝子

パク質への糖鎖付加が起こらず、細胞増殖の抑制、細胞死などを引き起こす。ツニカマイシンは植物細胞に対しても毒性を示すが、遺伝子組換えによってGPT遺伝子をシロイヌナズナで過剰発現させ、GPT酵素活性を上昇させた場合に、ツニカマイシンに対する耐性が生じることが報告されていた。この結果は、植物由来のGPT遺伝子を遺伝子組換えに利用することで、ツニカマイシン耐性の樹木を選抜し、遺伝子組換え樹木を得ることが可能であることを示唆していた。そして、我々のポプラ (*Populus nigra* var. *italica*) 完全長cDNAライブラリーや、ポプラ (*Populus trichocarpa*) ゲノムの解析から、ポプラの中にもGPT遺伝子が存在することが推定された。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、樹木由来の選抜マーカー遺伝子として、ポプラ (*P. nigra* var. *italica*) からGPT遺伝子を単離し、それを用いたポプラの遺伝子組換え法を開発することを目的とする。研究の細目は次のとおりである

- ①ポプラ GPT 遺伝子の cDNA の単離と特性解明
- ②GPT を選抜マーカー遺伝子とする新しい遺伝子組換え用バイナリーベクターの構築
- ③構築したベクターを用いた遺伝子組換えポプラの作出
- ④作出した遺伝子組換えポプラの特性評価

## 3. 研究の方法

### (1) 実験材料

1/10,000 a のワグナーポットにバーミキュライトを詰め、約 15cm のポプラの枝を挿し木した。光および温度条件は、光源として陽光ランプを用い、光合成有効放射を  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明期 16 時間、暗期 8 時間、 $25^\circ\text{C}$  とした。発根後は、Hoagland 水耕液を与えて育成した。

### (2) ポプラ GPT の cDNA の単離と構造解析

遺伝子の相同性検索には、BLAST プログラムを用いた。ポプラ完全長 cDNA ライブラリーの PnFL2-086\_L22 クローンの DNA 塩基配列は、3130x1 DNA シーケンサーで解読した。配列の構造解析には、遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX (Genetyx Corporation) を用いた。

### (3) ゲノム DNA の調製

ポプラの葉を液体窒素で凍結後、粉碎した。DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて、粉碎した試料からゲノム DNA を抽出し、精製した。

#### (4) RNA の調製

ポプラの各器官を液体窒素で凍結後、粉砕した。CTAB 法および塩化リチウム沈殿法を用いて、粉砕した試料から全 RNA を抽出した。全 RNA は、SV Total RNA Isolation System (Promega) を用いて精製した。RNA の定量には、Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit (Invitrogen) を使用した。遺伝子組換えポプラの RNA は、茎頂から数えて 2 枚目または 3 枚目の葉から抽出した。

#### (5) 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析には、定量リアルタイム PCR 法を用いた。RNA は、AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene) により、cDNA へ逆転写された。定量リアルタイム PCR には、GoTaq qPCR Master Mix (Promega) を用い、初期変性 95°C・2 分間の後、95°C・30 秒間、58°C・1 分間、72°C・30 秒間を 40 サイクル行った。GPT 遺伝子の発現量を正規化するために、GPT 遺伝子の発現量をユビキチン遺伝子 (PnUBQ5) の発現量で除した。定量リアルタイム PCR で使用した DNA プライマーは次のとおりである。

GPT-RTPCR-LP3 プライマー

5' -GCCTGAAGCTGGTCAAACA-3'

GPT-RTPCR-RP2 プライマー

5' -AGCCAAAGAGGTTGCCAGTA-3'

PnUBQ5-LP1 プライマー

5' -ACCTACACGAAGCCCAAGAAG-3'

PnUBQ5-RP1 プライマー

5' -CATGAAAGTACCAGCACCACA-3'

増幅された DNA は、電気泳動および DNA 塩基配列の決定により、GPT または PnUBQ5 に由来する DNA であることを確認した

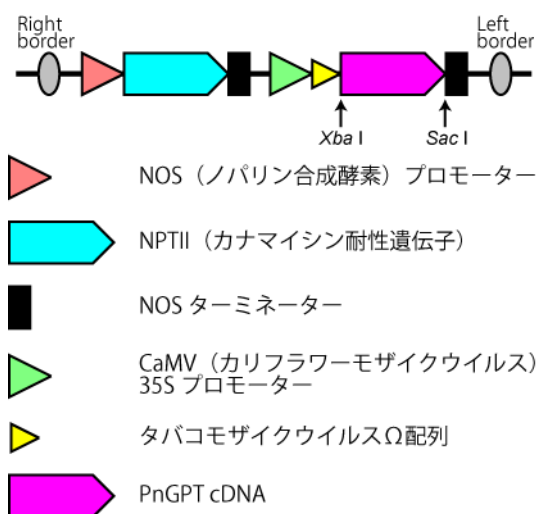


図 1 ポプラの遺伝子組換え用バイナリーベクターの模式図

#### (6) 出芽酵母の形質転換とツニカマイシン耐性試験

GPT の cDNA を鋳型に、PnGPT-YE1 プライマー (5' -GGGTACCATGGCAAGAAAGAGAGCTTC-3'), PnGPT-YE2 プライマー (5' -ATAGTTAGCGGCCGCGCAGAAGCTTGAAGCTCCTGC-3'), および PrimeSTAR HS DNA ポリメラーゼ (Takara) を用いて PCR を行った。増幅された DNA を制限酵素の *Kpn* I と *Not* I で切断し、酵母発現ベクターである pYES3/CT (Invitrogen) の *Kpn* I と *Not* I 切断部位に連結し、プラスミド pYES3/CT::PnGPT を構築した。酢酸リチウム法を用いて、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 株) に pYES3/CT または pYES3/CT::PnGPT を導入し、トリプトファン要求性培地 (SC-Trp) で形質転換酵母を選抜した。ツニカマイシン耐性を調べるため、ツニカマイシン (0.2~5  $\mu$ g/ml) を含むガラクトース培地 (SG-Trp) に形質転換酵母を画線し、25°C で培養した。

#### (7) ポプラ遺伝子組換え用バイナリーベクターの構築

GPT の cDNA を鋳型に、PnGPT-PE1 プライマー (5' -GCTCTAGAATGGCAAGAAAGAGAGCTTC-3'), PnGPT-PE2 プライマー (5' -CGAGCTCTCAATGATGATGATGATGATGAGAAGCTTGAAGCTCCTGC-3') を用いて PCR を行った。増幅された DNA を制限酵素の *Xba* I と *Sac* I で切断後、バイナリーベクター pBF4 の *Xba* I と *Sac* I 切断部位に連結し、ポプラの遺伝子組換え用バイナリーベクターとした (図 1)。

#### (8) ポプラの遺伝子組換え

ポプラの遺伝子組換えは、我々が以前に報告した方法 (Journal of Forest Research 11:175-180 (2006)) を改良して行った。構築したバイナリーベクターはアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株) に遺伝子導入された。このアグロバクテリウムを、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で滅菌したポプラの茎切片 (長さ 1 cm、約 200 本) に感染させた。3 日間の共存培養の後、アグロバクテリウムを殺菌した。その後、茎切片を 3  $\mu$ g/ml ツニカマイシンを含むシュート (茎葉部) 誘導培地で 2 週間ごとに継代培養し、シュートを形成させた。成長したシュートを切断し、1  $\mu$ g/ml ツニカマイシンを含む発根培地に移植して発根させた。一方、カナマイシンを選抜薬剤とした場合には、50~100  $\mu$ g/ml カナマイシンを含むシュート誘導培地および 20  $\mu$ g/ml カナマイシンを含む発根培地を使用した。

#### (9) 遺伝子組換えポプラ中の導入遺伝子の確認

各遺伝子組換えポプラから調製したゲノ

```

PnGPT 1 MA_RKRASEEETTITTTTKPDAIVTSOKETKPPPP-LPREF--
AtGPT 1 MAARKRASS-ISHPNKPD---PSEPNSEAPSEQRMTRKTVS

PnGPT 37 -SNDQ-PVAPPKKGFLFKLSLIIAPVYLLIILHYQIQHD
AtGPT 37 ASGEERLAPPKLVLFVISTLLCSLIIYLLICRHYKVDNE

PnGPT 75 LTKPFLINAGLSLAGFLLVVKMIPVASKYVLRRLDFGMDI
AtGPT 77 LKRSFLINAGLSLVCFEVLKMIPTARYVLRRLMFGFDI

PnGPT 115 NKKGTFPQCTVVKVPESLGIVVAVFVMLTIVECFINAPDS
AtGPT 117 NKRGTFPQGDIIKVPESLGIIVVGIIVLIVAIIEQYFNTEVDS

PnGPT 155 NNLVFYNAAALASICFMILLGFDDVLDVFWRVKLLFSLA
AtGPT 157 NNLVFYNAAALASICFMILLGFDDVLDVFWRVKLLFSLA

PnGPT 195 ALPELLMAYAGHTTIIIPKPLVAVYIGLKVLDLGFIIYKIMW
AtGPT 197 TLPELLMAYAGHTTIVIPKPLVAVYIGLKVLDLGRHYKIMW

PnGPT 235 FLAIFCTNCSINIHAGINGLIACQTVVIAASALLIHNVMQIG
AtGPT 237 LLAVFCTNSINIHAGINGLIICQTVVIAAALLIHNVMQIG

PnGPT 275 ASADPEYQOAHAFSVMLVQPLLATSLLSYNNWYSSVVF
AtGPT 277 ASVDEPYQOAHAFSIIITQPLMATSLLSYNNWYSSVVF

PnGPT 315 GDTVYTFACMTMAVVGILGHFSETLIIFFTAQVNLNELLSV
AtGPT 317 GDTVYTFACMTMAVVGILGHFSETLIIFFTPQVNLNELLSL

PnGPT 355 POLFCFRHCPRHRLPRFDPOTGLLTGTDGTLVNVYLRLE
AtGPT 357 POLACIVKCPRHRLPRFDPOTGLLTGTDGTLVNVYLRLE

PnGPT 395 GRKTEVNSLGVHLLLVGVIIYLFVKFYLSEFTGLWGRGFLP
AtGPT 397 CPNSPKSLCHLLVFGAL-----ACAFK---EIL

PnGPT 435 RRGFGLHVEMLLTLILGPGSTAGPKQEFQAS
AtGPT 423 R-----HF-----L-----AC---WYK--

```

図2 ポプラ GPT (PnGPT) とシロイヌナズナ GPT (AtGPT) のアミノ酸配列の比較。同一のアミノ酸残基は黒の反転で示されている。赤枠は、Glycosyl transferase, family 4 の保存領域である。

ム DNA を鋳型として、バイナリーベクター上にある GPT 領域および NPTII 領域を PCR 法で増幅し、アガロースゲル電気泳動法で確認した。PCR に使用した DNA プライマーは次のとおりである。

```

GPT      omega-LP2 プライマー
          -ATGACGCACAATCCCACTATC-
GPT      omega-RP2 プライマー
          -AGACCACAGCGACGACAATAC-
NPTII-U プライマー
          -GCTATTCGGCTATGACTGG-
NPTII-R プライマー
          -ATAGAAGCGATGCGCTG-

```

#### 4. 研究成果

##### (1) ポプラの GPT 遺伝子の cDNA の単離と構造解析

ポプラ完全長 cDNA ライブラリーに含まれる各 cDNA クローンは、cDNA の およびの部分的な DNA 塩基配列が解読されている。そこで、同ライブラリーの中から、シロイヌナズナの GPT 遺伝子 (AtGPT) に類似するものを BLASTN プログラムにより検索したところ、PnFL2-086\_L22 クローン (DDBJ、アクセッション No. DB889973 および DB907850) が最も AtGPT と相同性が高かった。また、*P. trichocarpa* のゲノム塩基配列から AtGPT に類似する遺伝子を探したところ、eugene3.000604 および eugene3.001603 の 2

遺伝子が見つかり、これらの DNA 塩基配列は、PnFL2-086\_L22 の および の DNA 塩基配列とほぼ一致した。そのため、PnFL2-086\_L22 がポプラの GPT の cDNA と予想して、全 DNA 塩基配列を解読した。

その結果、PnFL2-086\_L22 の cDNA は約 2.5kbp からなり、464 アミノ酸残基のタンパク質の翻訳領域を持っていた。この予想タンパク質はシロイヌナズナの GPT タンパク質と約 70% の相同性を示し、他生物の GPT タンパク質で共通に保存されている Glycosyl transferase, family 4 (InterPro、アクセッション No. IPR000715) と呼ばれる領域を持っていたことから、PnFL2-086\_L22 は、ポプラの GPT 遺伝子 (PnGPT) の cDNA であると結論した (図 2)。

##### (2) ポプラの GPT 遺伝子の性質

GPT 遺伝子が実際にポプラの体内で機能しているかどうかを明らかにするために、ポプラの各器官における GPT 遺伝子の発現を調べた。定量リアルタイム PCR 法で調べたところ、ポプラの根、茎、葉、芽において GPT 遺伝子に由来するメッセンジャー RNA (mRNA) が検出され、調べた器官の中では葉での遺伝子発現量が比較的高かった (図 3)。GPT はタンパク質の糖鎖付加に関与する酵素であり、タンパク質合成は全身の細胞で進行していると考えられる。それゆえ、ポプラのほぼ全身で GPT 遺伝子が発現しているという実験結果は妥当であり、GPT 遺伝子がポプラの生存に必要な機能を果たしていることを示唆している。

また、GPT 遺伝子の cDNA にコードされるタンパク質が、実際に GPT の酵素的な機能を持っているかどうかを明らかにするために、cDNA を出芽酵母に遺伝子導入して発現させた。通常、GPT タンパク質の活性がツニカマイシンにより阻害されると、酵母は生育でき

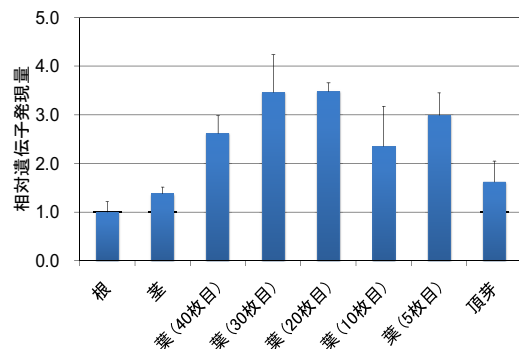


図3 ポプラの各器官における GPT 遺伝子の発現量の比較。根の遺伝子発現量を 1 とした相対量で示されている。試料数は、それぞれ 3 である。



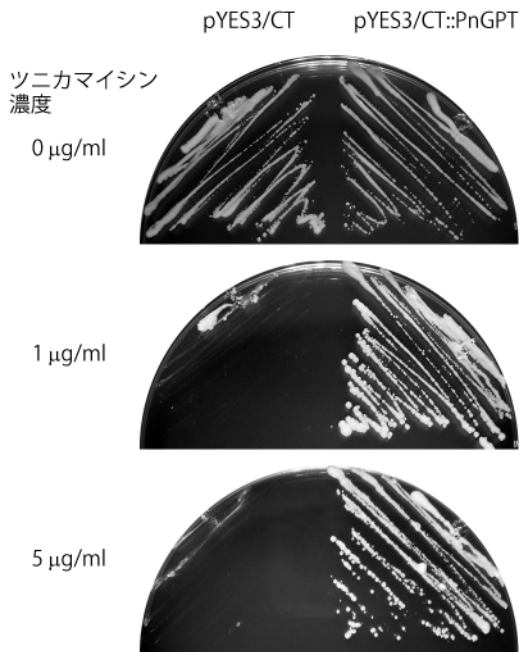


図4 GPT 遺伝子導入酵母のツニカマイシン耐性

なくなる。しかし、酵母内で大量に生産されたポプラのGPTが酵素的な機能を有していれば、ツニカマイシンによる阻害を乗り越えて酵母が生育できると予想した。実際に、ベクターのみのpYES3/CTを持った酵母は1 μg/mlのツニカマイシン存在下では生育できなかった(図4)。しかし、pYES3/CTにポプラのGPT遺伝子のcDNAを挿入したpYES3/CT::PnGPTを導入した酵母では、5 μg/mlのツニカマイシン存在下でも生育可能だった。この結果から、ポプラのGPTを過剰発現することにより、ツニカマイシンに対する耐性が付与されることが示された。

### (3) GPT を選抜マーカー遺伝子として利用した遺伝子組換えポプラの作出

酵母を用いた実験から、ポプラのGPT遺伝子を選抜マーカー遺伝子として用いることにより、ツニカマイシンに対する耐性を指標として、遺伝子組換えポプラを選抜できると考えられた。そこで、GPT遺伝子のcDNAを発現する遺伝子組換え用バイナリーベクター(図1)を構築した。このベクターにはNPTII遺伝子(大腸菌のカナマイシン耐性遺伝子)も存在しているので、同ベクターを使用してカナマイシンで選抜した場合、ツニカマイシン選抜における遺伝子組換えポプラの作出効率と比較することができる。

構築したベクターをアグロバクテリウムに導入し、ポプラの茎切片に感染させた。感染させた茎切片を、3 μg/ml ツニカマイシンを含むシュート誘導培地で継代培養したところ、茎切片からシュートが発生した。0.5

~1 cm程度に成長したシュートを切り取って、1 μg/ml ツニカマイシンを含む発根培地に移植し発根を誘導したところ、発根したシュートと発根せずに枯れてしまうシュートがあった。発根したシュートをツニカマイシン耐性ポプラとした。

得られたツニカマイシン耐性ポプラが本当に遺伝子組換えポプラであるかどうかを検証するために、導入したGPT遺伝子の存在を調べた。その結果、導入したGPT遺伝子は検出されず、いずれも遺伝子組換えポプラではないと判断した。同時に、カナマイシンで選抜していたポプラ(図5、図6、図7のKmRの各系統)では、導入したGPT遺伝子とNPTII遺伝子が確認でき(図5)、その時の遺伝子組換え効率は約8%だった。

ツニカマイシン選抜による遺伝子組換え実験の効率を高めるために、次のような実験条件を、それぞれ独立に2回ずつ試した。

- ①シュート誘導培地中のツニカマイシンの濃度を2倍の6 μg/mlとした。
- ②ツニカマイシンの化学的安定性を高めるために、従来のpH 5.8(20 mM MES-KOH)よりも高いpH 7.0(20 mM MOPS-KOH)の培地を用いて、シュートや根の誘導を行った。
- ③ツニカマイシンの浸透性を高めるために、より小さく柔らかい外植体として、茎切片ではなく葉柄を用い、遺伝子組換え実験を行った。

これらの実験の結果、GPT遺伝子およびNPTII遺伝子を確認できた組換えポプラが1系統(TmR-82-7)存在した(図5)。ツニカマイシンを選抜薬剤とした遺伝子組換え実験の効率は0~0.5%であった。この値は、先に述べたカナマイシン選抜による遺伝子組換えポプラの作出効率に比べて、かなり低い。この効率の違いは、カナマイシンの作用が主

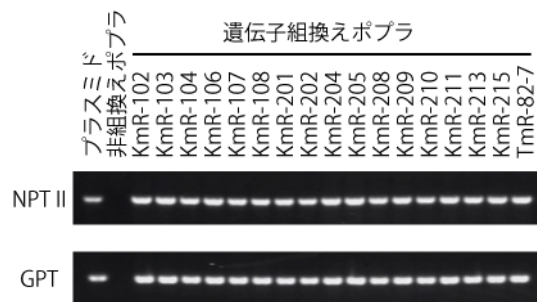


図5 遺伝子組換えポプラの導入遺伝子の確認。プラスミドは、バイナリーベクターのみを鋳型にPCRを行った場合を示している。その他は、全て標記の植物から調製したゲノムDNAを鋳型にPCRを行った。GPTの増幅領域はオメガ配列を含んでいるので、非組換えポプラでは検出されない。

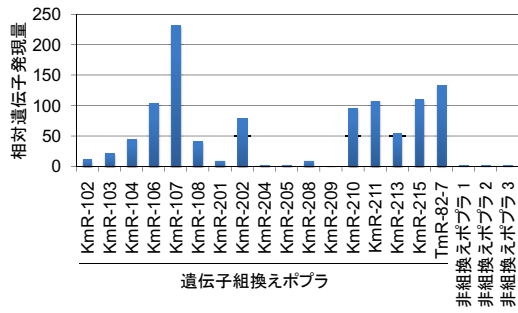


図6 遺伝子組換えポプラに導入したGPT遺伝子の発現量の比較。非組換えポプラ1の遺伝子発現量を1とした相対量で示されている。

に葉緑体やミトコンドリアでのタンパク質合成の障害であるのに対し、ツニカマイシンの作用がタンパク質の糖鎖付加の障害という作用機作の違いによるものと考えられる。

結論としては、GPT 遺伝子とツニカマイシンを用いたポプラの遺伝子組換えに成功したものの、GPT 遺伝子を選抜マーカー遺伝子として広く利用していくためには、さらに遺伝子組換え効率を高めるような実験手法の改良が必要といえる。

(4) 作出した遺伝子組換えポプラの特性評価

作出した遺伝子組換えポプラでは、CaMV35S プロモーターにより GPT が過剰に発現していると予想された。実際に、遺伝子組換えポプラおよび非組換えポプラについて、GPT の mRNA 量を定量リアルタイム PCR 法で調



図7 PnGPT 過剰発現ポプラの外観。樹高の違いは、鉢上げ時期の違いによるものである。

べた。その結果、非組換えポプラの葉での GPT の発現量を1とすると、遺伝子組換えポプラでは、発現量が約 0.6 倍から 230 倍までと非常に幅広い値を示した (図6)。ツニカマイシンで選抜した TmR-82-7 系統においても、非組換えポプラと比較して約 130 倍の過剰発現が確認された。遺伝子組換えにより導入した GPT の発現量の違いが、ポプラのゲノム DNA に組み込まれたバイナリーベクターのコピー数によるものなのか、あるいはゲノム上の位置効果など何らかの発現制御機構によるものなのかどうかは現段階では不明である。

GPT を過剰に発現している遺伝子組換えポプラの形態については、非組換えポプラとの顕著な違いは認められず正常のようであった (図7)。すなわち、GPT の過剰発現によるポプラの形態への悪影響は少なく、選抜マーカー遺伝子として適していると考えられた。しかし、樹高成長やバイオマスへの GPT 遺伝子の影響は、今後の調査課題として残っている。

5. 主な発表論文等  
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西口 満 (NISHIGUCHI MITSURU)  
独立行政法人森林総合研究所・生物学研究領域・主任研究員  
研究者番号：80353796