

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～1020

課題番号：20510076

研究課題名（和文） 多環芳香族炭化水素分解能をもつ林木の分子育種

研究課題名（英文） Molecular breeding of transgenic tree for phytoremediation of aromatic compounds

研究代表者

木村 哲哉 （ KIMURA TETSUYA ）

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：00281080

研究成果の概要（和文）：難分解性の芳香族化合物を分解できることが知られている白色不朽菌ヒラタケのマンガンペルオキシダーゼ Mnp2 の遺伝子を葉や根で特異的に発現するプロモーターをそれぞれ用いて *mnp2* 遺伝子をシロイヌナズナで発現させた。これらの組換え植物からビスフェノール A を分解をする株が得られた。さらに、土壌細菌 *Ralstonia eutropha* NH9 の塩化安息香酸分解遺伝子を CaMV35S プロモーターにつないでポプラに導入し、この遺伝子を発現するポプラの育種に成功した。

研究成果の概要（英文）：Many white-rod fungi produce many lignin peroxidases. Among them, Mnp2 of *Pleurotus ostreatus* was reported to degrade recalcitrant polyaromatic compounds because of its strong peroxidase activity. We introduced a fusion gene encoding poplar cellulase signal sequence and *mnp2* mature region under the control of leaf specific or root specific promoter into *Arabidopsis thaliana*. Several transgenic plants showed the ability to degrade BisphenolA. This suggests the possibility of molecular breeding of transgenic tree which can express the *mnp2* gene. We also introduced a chlorocatechol dioxygenase gene of a soil bacterium *Ralstonia eutropha* NH9 under the control of CaMV35S promoter into poplar plant (hybrid aspen) and this gene was successfully expressed in the transgenic poplar plant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：遺伝子工学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：白色不朽菌、マンガンペルオキシダーゼ、ヒラタケ、シロイヌナズナ、ビスフェノール A、ポプラ、塩化安息香酸

1. 研究開始当初の背景
近年、環境意識の高まりにより環境汚染

物質除去の努力が払われつつあるが、主に

汚染物質を環境中から抽出し分解する工学処理が中心である。この方法はエネルギーを消費して炭酸ガス発生を増加させるのみならず、広大な土地への応用はコスト的に問題がある。そこで、多様な微生物の代謝機能を利用する試みが注目を浴びてきたが、広大な土地に寿命の短い微生物を定着し機能を維持することは困難であり、微生物のみに頼ることは現実的ではない。一方、植物は太陽エネルギーによって持続的に生育する。申請者はこの特徴を生かして環境問題に貢献するため、特に環境中で長期間にわたって持続的に生育する林木に注目し、微生物の環境汚染物質分解能を付与する研究を行ってきた。植物は「カーボンニュートラル」な原料として注目を浴びており、植物が合成するバイオマスの10%を使えば現在の人類が消費するエネルギーをまかなえると計算されている。環境浄化を終えた落葉や植物体から嫌気性微生物を利用して、水素ガスや工業原料となる有機酸を生産する研究も同時に行っており、これらの技術を組み合わせた究極の循環型環境浄化技術を目指している。

2. 研究の目的

すでに我々は有害な塩素化芳香族を分解する微生物の遺伝子をイネに導入し発現させることに成功している(Shimizu et al., *Appl. Environm. Microbiol.* 2002)。しかし、これらが分解できる化合物は限られていた。そこでより広範な汚染物質を分解可能な白色不朽菌の能力に着目し、この遺伝子を植物に導入することを企てた。本研究でターゲットとしているのは、さまざまな化学工業製品や化石燃料などの燃焼過程で非意図的に生成され、人や動物などにも暴露量が多いと推定される芳香族炭化水素類とした。導入する植物は、欧米、中国で広範囲に植林されパルプ原料として利用されているポプラ(ヤマナラシ; hybrid aspen)を最終ターゲットとして、まずはモデル植物であるシロイヌナズナを用いた。導入する遺伝子は、内分泌攪乱作用や発ガン性が指摘されている多環芳香族炭化水素類を分解することが示されているヒラタケのリグニン分解遺伝子を用いた。以前の研究で、リグニン分解酵素遺伝子を全組織で高発現するカリフラワーモザイクウイルスCaMV35Sプロモーターで発現させると植物にとって毒性が高いことが示されており、組織特異的な発現が重要であることが示唆されていたので、このことについても改良

を加えることとした。

3. 研究の方法

(1) プラスミドの構築 ヒラタケのマンガンペルオキシダーゼ遺伝子 *mnp2* は京都大学生存圏研究所の渡辺隆司教授・本多与一准教授の研究グループより分与していただいた。この遺伝子の成熟体タンパク質部分をコードする領域と、ポプラのセルラーゼ遺伝子 *cex* の分泌シグナル(林木育種センター大宮泰典博士より分与)を融合させた遺伝子をリコンビナントPCR法で作成した。植物導入用のベクターには島根大学総合科学支援センター中川強教授との共同開発で作成したゲートウェイ対応型バイナリーベクターを利用した。*cex-mnp2* 融合遺伝子はD-TOPO エントリーベクター(Invitrogen)へTOPO反応を利用して導入し、塩基配列を確認した。本研究では、まずCaMV35Sプロモーターを利用するベクターpGWB2と、組織特異的に発現するプロモーターL15(*Arabidopsis thaliana* Rubisco activase プロモーター; 葉で高発現)とR10(hydroxyproline rich protein 遺伝子プロモーター; 根で高発現)を用いる方法を考えた。そのためにPCRで増幅したL15とR10をプロモーター変換Gateway binary vector用のエントリークローンへ導入した。その後、L15とR10はR4pGWBベクター(研究成果報文②参照)へそれぞれLR反応を用いて導入した(図1)。クロロカテコール分解酵素遺伝子 *cbnA* については、通常の方法で発現ベクターpBI-H1を構築した。

(2) 植物への形質転換 上記のTiバイナリーベクターを電気穿孔法でアグロバクテリウムGV3101へ導入し、フローラルディップ法でシロイヌナズナへ導入した。また、ポプラへの形質転換も同様にアグロバクテリウムを用いて行ったが、アグロバクテリウムはEHA101株を用いた。ポプラへの形質転換はSwedenの研究グループの方法を用いた。詳細は下記研究成果報文④に記述したとおりである。

(3) 形質転換植物の選抜と栽培 収穫した種子は2週間程度乾燥させた後、消毒のために0.02%のTriton X-100を含む5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に入れて1分間激しく攪拌し、5分静置させてからスピンドウンして種子を沈殿させた。以下の操作はクリーンベンチ内で行った。スピンドウンした懸濁液の上清を取り除き、滅菌水を加え、1分間激しく攪拌し、スピンドウンするという操作を4回繰り返した。水を適量に取り除き4℃にて2日間の低温処理を行った。滅菌した0.1% Agarose S(Wako)水溶液に懸濁し、ハイグロマイシンB12.5mg/lを含むKNO₃培地に広げ、

乾燥させてから 22°C、長日条件下で培養した。約 1 週間後、形質転換体が同定できたらその植物体を、ハイグロマイシン B12.5mg/l を含む 1/2×MS 寒天培地に移した。さらにまた 1 週間後、水耕液で浸したバーミキュライト 100%の土が入った土に形質転換体を移し、3~4 日間水飽和状態においたのち、通常の生育を行い種子を回収した。また、葉をサンプルとして利用した。一方、ポプラの形質転換体植物は、培養瓶の中で、1/2MS 培地を用いて継代栽培を行った。

(4) Remazol Brilliant Blue を用いた Mnp2 活性の測定 培養前に RBBR を加えた 1/2MS 液体培地を用いて試験を行った。*cexmnp2* 遺伝子の導入が確認できた各形質転換体の種子を表面殺菌し低温処理した後、それぞれ 20ml の 1/2MS 液体培地を入れた三角フラスコに播種し、RBBR(終濃度 200mg/l)、MnSO₄(終濃度 1mM)を加えて 23°C、長日条件下(明期 16 時間、暗期 8 時間)で回転培養した。サンプルは分光光度計で、595nm の波長を測定し、各サンプルの RBBR の濃度を測定した。なお、アッセイに使用した植物体はすべて T₂ 世代を用いた。

(5) ビスフェノール A の分解試験 選抜した 5 ラインの形質転換体を用いて、環境ホルモンとして疑いを持たれているビスフェノール A の分解を試みた。まず 20 ml の 1/2 MS 液体培地を入れた三角フラスコに、表面殺菌した種子を加え 23°C、長日条件下(明期 16 時間、暗期 8 時間)で 2 週間培養した。2 週間後に、ビスフェノール A (終濃度 300 mg/l) と MnSO₄ (終濃度 1 mM) を加え、3 日後にサンプリングした。ビスフェノール A の定量は HPLC を用いて行った。サンプリング溶液は 0.20 μm フィルターでろ過したものを HPLC 分析に用いた。流速 0.2ml/min、温度 35°C、波長 278 nm、solvent 50 mMNaClO₄ H₃PO₄ (pH 2.6) :アセトニトリル=60:40、injection 20 μl の条件のもとで、Inertsil ODS-3 5 μm particle size colum (4.6×250 mm、GL sciences Inc.) を用いて HPLC (GL sciences Inc.) によって分析をおこなった。検量線の作成には 1/2MS 液体培地(MnSO₄ 1mM)にそれぞれビスフェノール A を 1mM、0.5mM、0.1mM になるよう溶かしたものをを用いた。

(6) ポプラによるクロロカテコール分解試験 ポプラの茎よりカルスを誘導し、このカルスを用いて実験を行った。カルス 100mg とクロロカテコール (1mM) をまぜて試験管中で反応を行った。HPLC によってクロロカテコールの分析を行った。詳細は報文④に記述したとおりである。

4. 研究成果

(1) プラスミドの構築 pGWB2-*cexmnp2*, R4pGWB501::L15-*cexmnp2*, R4pGWB501::R10-*cexmnp2* をそれぞれ構築した(図 1)。R4pGWB501::L15-*cexmnp2* は L15 プロモーターと nos ターミネーターの間に *cexmnp2* をもつバイナリーベクターである。L15 プロモーターはシロイヌナズナの Rubisco activase のプロモーターであり、これを用いることで、*cexmnp2* を葉特異的に発現できると期待された。一方、R4pGWB501::R10-*cexmnp2* は R10 プロモーターと nos ターミネーターの間に *cexmnp2* を持ち、根特異的に *cexmnp2* の発現を期待された。従来のバイナリーベクターに比べてプロモーターを簡単に交換可能な R4pGWB ベクターを開発し、短時間で発現バイナリーベクターを構築できた。

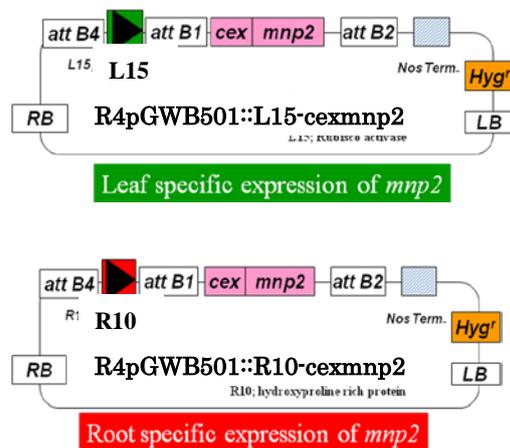


図 1 形質転換に利用したバイナリーベクター

(2) 形質転換植物の解析 リグニンは植物体にとってセルロース、ヘミセルロースと並び構造維持に関わる重要な物質であり、リグニン分解遺伝子の導入及びその発現によって植物体の生育に悪影響が出ることが考えられる。CaMV35S プロモーターを用いた実験では、得られる形質転換体の数も少なく、種子形成の不能や、茎や葉の形態や大きさが非形質転換体 (WT) と大きく異なるといった生育異常が見られた。一方、シロイヌナズナ由来の組織特異的プロモーター L15 と R10 を用いて発現をさせると多くの形質転換体を得られた。葉特異的プロモーター L15 を用いた場合で 14 個体、根特異的プロモーター R10 を用いた場で 13 個体の独立した形質転換体の種子を回収することに成功した。抗生物質で選別した個体は全て生育し形質異常などはなく種子を回収することに成功した。一方

CaMV35S プロモーターを用いた場合は 4 個体の種子しか回収できなかった。これは組織特異的プロモーターを用いることで、その発現量や発現のタイミングが CaMV35S プロモーターを用いた場合より影響が少なくできたのではないかと考えられた。

得られた形質転換体がマンガンペルオキシダーゼ活性を有するかどうか判別するために RBBR によるスクリーニングを行った。RBBR 添加後 24 時間毎にサンプリングを行い、WT より脱色が強く確認できた形質転換体を L15(LM 系), R10(RM 系)それぞれ 5 ラインずつを選別した。これらについて葉と根を切り分け total RNA を抽出し RT-PCR を行って *mnp2* 遺伝子の発現を調べた。その結果、LM では形質転換体すべてのラインで葉と根から、RM では根で *mnp2* の発現が確認できた。葉特異的プロモーターを用いた LM において根でも *mnp2* 遺伝子の発現が確認できた。

(3)ビスフェノール A の分解 ビスフェノール A は代表的なフェノール性の環境ホルモン様物質である。そこで *mnp2* 遺伝子を導入した形質転換植物体でビスフェノール A の分解試験を行った。ビスフェノール A を加えてから 3 日後の残量を HPLC で比した結果、LM すべてのラインで減少していたが (図 2)、RM のラインでは有意な差は見られなかった。このことから、L15 プロモーターでの *mnp2* 遺伝子の発現によるビスフェノール A の分解が示唆された。LM と RM を比べて RBBR 脱色試験の結果では RM の方が脱色活性が高かったが、ビスフェノール A の分解試験では LM の方が分解活性が高く、湿重量測定による生育差においても WT より大きく成長していたのは LM の方であった。ビスフェノール A を加えると葉の緑色が失われる傾向にあることから植物体に悪影響を与えると考えられた。LM は葉特異的プロモーターを用いたため、ビスフェノール A の毒性を RM より回避できたと示唆された。

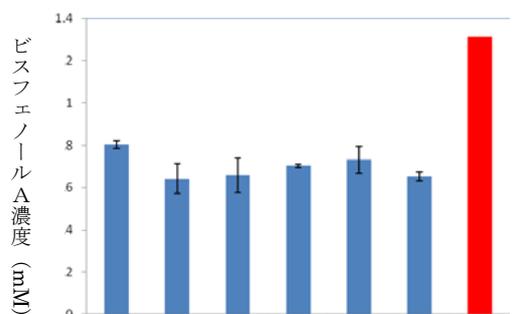


図 2 LM 形質転換体によるビスフェノール A

の分解

(4) クロロカテコール分解遺伝子を導入したポプラの解析 クロロカテコールは PCB など多環芳香族塩素化合物分解過程で生じる中間代謝物であり、この分解がひとつの律速となる。今回、この遺伝子をポプラに導入し分解活性を調べた。形質転換により全部で 27 個の形質転換体が得られた。これらのうち、16 ラインがクロロカテコール分解活性を示した。これらのうち 2 つのラインについて詳細に分析したところ、経時的にクロロカテコールがクロムコン酸に分解されていることが確認された。このことは、林木に芳香族化合物を分解する遺伝子を導入することでこれらの汚染物質を分解除去できることを示唆している。

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 5 件)

- ① T. Kimura, T. Mizutani, J.L. Sun, T. Kawazu, S. Karita, M. Sakka, Y. Kobayashi, K. Ohmiya, K. Sakka, Stable production of thermotolerant xylanaseB of *Clostridium stercorarium* in transgenic tobacco and rice. Biosci. Biotechnol. Biochem., 74(3), 2010, 954-960 (原著 査読有)
- ② 木村哲哉、中川強、Gateway 対応バイナリーベクターの開発と植物分子生物学への応用 三重大学大学院生物資源学研究所紀要 36, 2010, 1-12 (総説 査読有)
- ③ S. Nakamura, A. Nakao, M. Kawamukai, T. Kimura, S. Ishiguro, T. Nakagawa, Development of Gateway binary vectors, R4L1 pGWBs, for promoter analysis in higher plants. Biosci. Biotechnol. Biochem., 73(11), 2009, 2556-2559 (原著 査読有)
- ④ Y. Ohmiya, T. Ono, T. Taniguchi, N. Itahana, N. Ogawa, K. Miyashita, K. Ohmiya, K. Sakka, T. Kimura, Stable expression of the chlorocatechol dioxygenase gene from *Ralstonia eutropha* NH9 in hybrid poplar cells, Biosci. Biotechnol. Biochem., 73(6) 2009 1425-1428 (原著 査読有)
- ⑤ T. Nakagawa, S. Ishiguro, T. Kimura, Gateway vectors for plant transformation, Plant Biotechnol. J., 26, 2009, 275-284 (総説 査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 白色不朽菌リグニン分解酵素遺伝子の導入とその解析 領木智哉、木村哲哉、他

9 名 日本分子生物学会第 33 回大会
2010 12.8 神戸市

- ② Stabele expression of the *mnp3* gene of a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* in *Arabidopsis thaliana* by Gateway Binary Vector T. Kimura, Mie Bioforum 2008 9/1 Shima-Isobe Japan
- ③ Detoxification of chlorocatechol by transgenic plant expressing the chlorocatechol dioxygenase and chloromuconate cycloisomerase genes of *Ralstonia eutropha* NH9 T. Kimura, Mie Bioforum 2008 9/1 Shima-Isobe Japan

[図書] (計 1 件)

- ①産業酵素の応用技術と動向、井上國世監修
有機塩素化合物（環境汚染物質の分解）
p329-333 木村哲哉、栗冠和郎 2009
ISBN978-4-7813-0108-2C3045 エムシー出版

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.mie-u.ac.jp/junkan/kohga/ku/lab4/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 哲哉 (KIMURA TETSUYA)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：00281080