

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580091

研究課題名(和文)植物のデンプン貯蔵組織に油脂を蓄積させるための基盤研究

研究課題名(英文)Basic research for accumulating oil in plant vegetative tissues

研究代表者

下嶋 美恵(Shimajima, Mie)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・助教

研究者番号：90401562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：バイオディーゼルの原料となる植物の貯蔵脂質(トリアシルグリセロール、TAG)は、通常、種子に多く含まれており、葉、茎、根にはほとんど含まれていない。そのため、バイオマスが大きい葉や根でTAGを高蓄積できれば、新しい油脂原材料としての実用化が期待できる。研究代表者はこれまでに、リンが欠乏した生育条件下では、植物葉で通常微量である油脂が顕著に蓄積すること、さらにデンプンを蓄積しない変異体ではこの油脂蓄積がより顕著であることを発見した。本研究期間では、まずリン欠乏応答性プロモーターの制御下で主要TAG合成酵素を発現させ、リン欠乏時の根でTAGを蓄積するシロイヌナズナ形質転換体の作出に成功した。

研究成果の概要(英文)：We produced Arabidopsis transgenic plants overexpressing one of the key enzymes in TAG synthesis (diacylglycerol acyltransferase 1, 2 and phospholipid: diacylglycerol acyltransferase 1) during phosphate starvation by utilizing a phosphate-deficiency responsive promoter (AtMGD3 promoter) using wild-type or *pgm-1* as genetic backgrounds for transformation. The produced transgenic plants accumulated large amount of oil in shoots under phosphate-depleted conditions, whereas the effect was different from the results obtained from roots. From these results, it was suggested that the mechanism of oil accumulation during phosphate starvation was different between shoots and roots.

研究分野：植物生理学

キーワード：植物脂質 貯蔵脂質 トリアシルグリセロール リン欠乏

1. 研究開始当初の背景

近年注目されているバイオ燃料のうち、バイオディーゼルの原料は植物種子や藻類の油脂である。藻類の油脂については海外で実用化が進んでいるが、現状では生産コストが高すぎる、藻類培養のための場所の十分な確保が難しいという問題点がある。一方、植物種子については、バイオマスが小さいという問題点をクリアするため、種子当たりの油脂含量を上昇させるための基礎研究が古くから盛んであるが、種子中のTAG含量増加はもはや限界に達しているという見方が植物脂質研究者の間で広まりつつある。

通常、植物の貯蔵脂質(油脂、トリアシルグリセロール、TAG)は種子にのみ蓄積し、葉や根では微量にしか存在しない。葉や根では、同じ一次同化産物であるがことなる貯蔵形態であるデンプンが色素体に蓄積する。ところが、本研究開始前までの申請者らの研究により、栄養欠乏、特にリン欠乏にさらされると、シロイヌナズナの葉や根では通常知られているデンプンの過剰蓄積のみならず、TAGの蓄積も起こることがわかった(図1、特許出願済み)。さらに、デンプンをほとんど蓄積しないシロイヌナズナ変異体 *pgm-1* の葉では、リンが十分存在する通常生育条件下でも、TAGを蓄積することがわかった(図1)。この *pgm-1* 変異体におけるTAGの蓄積は、リン欠乏にさらされるとより顕著になり、通常生育の野生株に含まれるTAGの約10倍にまで上昇し(図1)その葉の電顕観察では多くの油滴が観察された。一方、根から吸収した無機リン酸を葉に輸送することができない変異体 *pho1* では、通常生育でも葉にTAGが蓄積することがわかり、リンの欠乏がTAG蓄積に正の影響を与えていることがわかった。

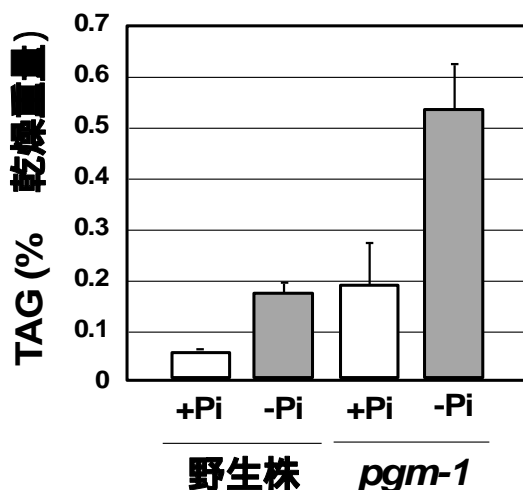


図1 シロイヌナズナ野生株およびデンプン蓄積欠損変異体におけるTAG蓄積量の比較
+Pi, 通常生育; -Pi, リン欠乏生育

2. 研究の目的

本研究は、リン欠乏生育条件下では葉にもTAGが蓄積することを利用して、植物体の種子以外でのTAG蓄積のメカニズムを明らかにする。そして、バイオ燃料としてはバイオエタノールよりもエネルギー効率の高いバイオディーゼルの原材料を、植物の種子だけでなく葉や塊茎・塊根に広げることで植物体全体を利用できるように改変し、国内だけでなく貧栄養地域を含めた世界規模での実用化につなげることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究期間では、モデル植物としてシロイヌナズナを用いた。また、これまでに研究代表者らが明らかにしてきたリン欠乏時のTAG蓄積メカニズムを利用して、根にTAGを蓄積する変異体を作成するために、リン欠乏時の根で高発現する糖脂質合成酵素遺伝子であるMGD2およびMGD3のプロモーターを利用した(Kobayashi et al. 2004)。形質転換する植物体については、野生株とデンプン蓄積欠損変異体である *pgm-1* を用いた。導入遺伝子については、既に種子のTAG蓄積に重要な役割を担っていることがわかっている3つのTAG合成酵素遺伝子を用いた(図2)。アグロバクテリウム法によるシロイヌナズナの警視転換後、リアルタイムPCR法を用いて導入遺伝子の発現量を通常生育条件とリン欠乏生育条件で比較し、リン欠乏時の発現量が最も高いラインについて、油脂含量の解析を行った。油脂含量については、Bligh-Dyer法による全脂質抽出後、中性脂質の分離に適した溶媒組成の薄層クロマトグラフィーによりTAGの分離を行い、得られたTAGをメチル化後、脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーにより定量した。

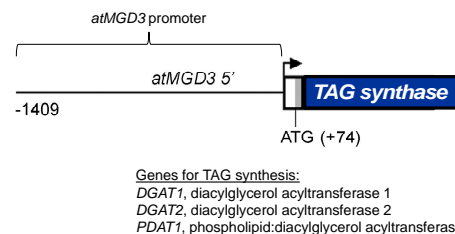


図2 シロイヌナズナ形質転換体作成に用いたプラスミドコンストラクトの略図

4. 研究成果

まず、リン欠乏時の根で油脂 (TAG) を蓄積するシロイヌナズナ形質転換体の作出を行った。具体的には、リン欠乏時に特に根で発現上昇する遺伝子のプロモーターおよび TAG 生合成の 3 つの主要酵素遺伝子を用いて、リン欠乏時の根で TAG を蓄積する変異体を作成した。種子の TAG 生合成において重要であることが知られている 3 つの TAG 合成酵素遺伝子の発現量についてまず解析を行ったところ、通常生育条件とリン欠乏生育条件では、それらの発現量は大きく増加することはないことが確認され、それらの発現量を増大させることで TAG 蓄積量が増大することが予測された。形質転換体作成に使用するプロモーターには、これまでに研究代表者らのグループが解析を行ったリン欠乏応答プロモーターである MGD2 および MGD3 プロモーターを用いた。これらのプロモーターは、リン欠乏時に特に根で強く発現することが過去の研究によりわかっている (Kobayashi et al. 2004)。また発現する TAG 生合成の遺伝子は、シロイヌナズナの種子の TAG 生合成においては主要酵素であることが知られている、シロイヌナズナの DGAT (diacylglycerol acyltransferase) 1, 2, および PDAT (phospholipid: diacylglycerol acyltransferase) 1 の 3 つを用いた。上記 3 つの遺伝子をリン欠乏応答プロモーターの制御下で発現するように構築した、植物形質転換用ベクターを作製し、アグロバクテリウム法を用いてシロイヌナズナ野生株およびデンブ蓄積を欠損した変異体 pgm-1 への形質転換を行った。得られた 6 種類の形質転換体および野生株は、通常生育条件とリン欠乏生育条件で生育させ、それらの地上部 (葉と茎) および根における各導入遺伝子の発現量および油脂含量を比較解析した。その結果、地上部 (葉と茎) では、導入した 3 種類の遺伝子すべての形質転換体において、程度の差こそあったが、リン欠乏時に特に油脂が高蓄積することを確認した (特許出願中)。またその際に、それぞれのバックグラウンドの植物体 (野生株または pgm-1) と比較して、生育への影響は見られなかった。その一方、根については、地上部とは異なる結果が得られた。導入した TAG 合成酵素遺伝子の種類によりその効果が大きく異なり、3 種類の遺伝子のうち 1 種類でのみ顕著な油脂蓄積がみとめられたが、他の 2 種類ではその効果がみられなかった。これらの結果から、リン欠乏時の葉や茎における油脂蓄積と、根における油脂蓄積とでは、そのメカニズムには相違があることが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 2 件)

名称: 融合遺伝子、ベクター、トランスジェニック植物、植物油の製造方法、トランスジェニック植物の作出方法、およびトランスジェニック植物の作出用キット
発明者: 太田啓之、下嶋美恵、円由香
権利者: 東京工業大学
種類: 特許
番号: 2013-177774
出願年月日: 2013 年 8 月 29 日
国内外の別: 国内

名称: 融合遺伝子、ベクター、トランスジェニック植物、植物油の製造方法、トランスジェニック植物の作出方法、およびトランスジェニック植物の作出用キット
発明者: 太田啓之、下嶋美恵、円由香
権利者: 東京工業大学
種類: 特許
番号: PC-18771
出願年月日: 2014 年 8 月 26 日
国内外の別: 外国

取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
下嶋 美恵
東京工業大学 バイオ研究基盤支援総合センター (助教)

研究者番号: 90401562

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者

太田 啓之
東京工業大学 バイオ研究基盤支援総合セ
ンター（教授）

研究者番号： 20233140