

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580360

研究課題名（和文） 森林資源の供給と有効利用を目指した環境ストレス耐性樹種の創製

研究課題名（英文） Production of transgenic trees that are tolerate to environmental stresses for supply of forest tree resources in the future

研究代表者

荒川 圭太（ARAKAWA KEITA）

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：00241381

研究成果の概要（和文）：本研究では、形質転換可能なモデル樹種の交雑ポプラ（*Populus tremula*×*P. alba*）に、ニホンカラマツ（*Larix kaempferi*）木部由来の冬季誘導性ガラクトキノール合成遺伝子を導入し、ラフィノース合成による凍結ストレス耐性の向上を試みた。当該遺伝子発現によって緑葉、師部、木部の各組織でラフィノース含量が有意に増加したが、師部や木部の凍結抵抗性には明確な差は見られなかったものの、低温馴化した緑葉で凍結ストレス耐性に有意な差が見られた。

研究成果の概要（英文）： In this study, winter-induced galactinol synthase gene in xylem of *Larix kaempferi* driven by cauliflower mosaic virus 35S promoter were introduced into hybrid aspen (*Populus tremula*×*P. alba*) to examine the enhancement of freezing stress tolerance. In transgenic hybrid aspen, levels of raffinose in green leaf, bark and xylem tissues were increased as compared with those of wild type, but freezing tolerance was not increased in these tissues. However, freezing tolerance of leaves after cold acclimation was only increased slightly with increase in levels of raffinose content.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：バイオマス、交雑ポプラ、形質転換、ラフィノース、凍結ストレス耐性

1. 研究開始当初の背景

近年我々が体験する異常気象や気候変動、環境破壊問題等は、植生変化を加速させるのみである。急激な温度変化による霜害や凍害、経済効果優先による乱伐跡地の土壌劣化や乾燥化、塩類集積などの問題は、植物への環境負荷（環境ストレス）を増やすだけである。そのため、森林資源に包括される樹木のスト

レス応答性遺伝子の機能を有効利用し、環境ストレス耐性を強化した樹種を作出することで、将来的に森林機能の保全や樹木の有効利用を推進するための基礎研究に着手した。

2. 研究の目的

北方樹木では、季節的な低温馴化の過程で誘導される遺伝子群（冬季誘導性遺伝子）の

作用により、冬季には著しく高い凍結抵抗性を示す。この遺伝子群の中には、凍結抵抗性の向上に関与するだけでなく、乾燥耐性や耐病性の向上にも有効な遺伝子が数多く含まれる。そこで本研究では、これらの北方樹木由来のストレス耐性遺伝子を導入して環境ストレス耐性樹種の創製を目指す。

また、形質転換体に用いる遺伝子をもとに大腸菌にて発現させたリコンビナントタンパク質を用いてインビトロ実験系などで機能評価も試みる。

3. 研究の方法

(1) 形質転換ポプラ作出の試み

カラマツ木部由来の冬季誘導性遺伝子の中から複数の環境ストレス耐性向上に関与することが期待される遺伝子に着目した。その中のひとつであるガラクトシノール合成酵素遺伝子 (*LkGolS*) は、ラフィノース族オリゴ糖の合成経路にて、ガラクトース骨格を供給する重要な基質であるガラクトシノールを合成する酵素をコードする遺伝子である。この酵素はラフィノース属オリゴ糖の生合成系においてガラクトシノールを供給するため、結果的にラフィノース含量の増加が期待できる。草本植物ではラフィノースの蓄積は乾燥や脱水ストレス、凍結ストレス耐性に相関性があり、実際に草本植物ではこの遺伝子の導入によって凍結ストレス耐性の向上がみられることが報告されている。

そこで、カラマツ木部に由来する標的遺伝子の cDNA を形質転換用ベクター (pBI121) のカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター下流に挿入し、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) 法によってハイブリッドアスペン (*Populus tremula* × *P. alba*) を形質転換して得られたカルスから個体再生した。その後、一次選抜された複数の形質転換株を用いて *LkGolS* 遺伝子の発現状況を RT-PCR で検証し、*LkGolS* 遺伝子の発現量の多い株を選抜した。同時に、緑葉などで糖組成を調べて、ラフィノース族オリゴ糖の蓄積量の結果からガラクトシノール合成酵素の作用を評価した。

(2) 低温応答性遺伝子の機能評価

また、カラマツ木部由来の冬季誘導性遺伝子を用いて大腸菌のタンパク質発現系にて組換えタンパク質の作製を試み、インビトロ実験系などで目的タンパク質の機能評価もおこなった。

4. 研究成果

(1) 形質転換ポプラ創製の試み

抗生物質耐性株の中から *LkGolS* の発現量の多い系統を選抜した。その後、緑葉を用いて HPLC により糖組成を調べ、野生株と形

質転換体とで組成の違いを比較したところ、ラフィノースの蓄積量が野生株より有意に増加した形質転換株が見出されたので、その中のひとつを解析に用いた (図 1)。

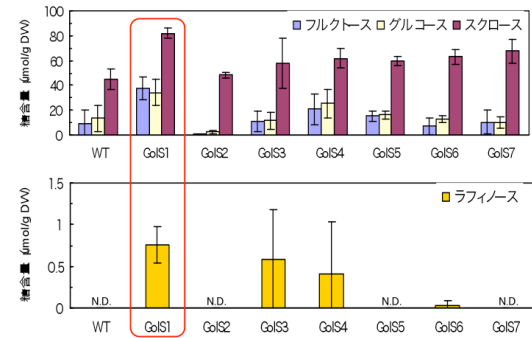


図1. 糖含量による形質転換ポプラの選抜。一次選抜した形質転換体の緑葉の糖組成をHPLC分析し、ラフィノース含量を比較した。

この形質転換体に関しては、各組織における当該遺伝子の発現量を比較したところ、緑葉、師部、木部の各組織でいずれも遺伝子の発現が検出された (図 2)。

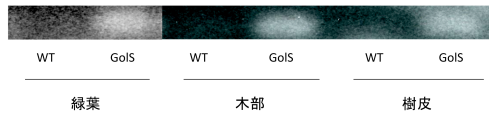


図2. 形質転換ポプラにおける導入遺伝子 (*LkGolS*) の発現。形質転換株 GolS と野生株 WT の各組織での遺伝子発現量を比較した。

次いで、これらの各組織において糖組成を比較したところ、未馴化の状態でもラフィノースやスタキオースの含量が有意に増加したが、師部や木部の凍結ストレス耐性には明確な差は見られなかった。しかし、形質転換体では、低温馴化した緑葉という限られた条件では、ラフィノース含量は野生株よりも有意に高く (図 3)、凍結ストレス耐性も有意な差が見られた (図 4)。

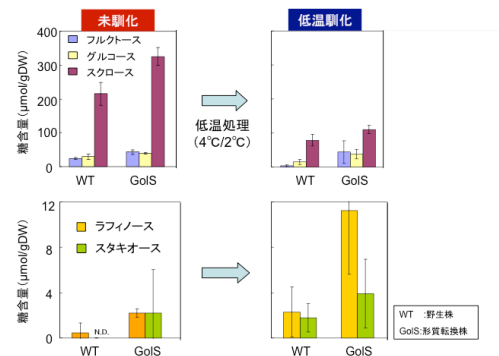


図3. 形質転換ポプラ緑葉における糖組成変化。形質転換株 GolS と野生株 WT を低温馴化し、緑葉での糖組成の変化を調べた。

この結果から、草本植物の結果ほど明確ではないものの、ラフィノース蓄積のストレス耐性への関与が期待された。しかし、電解質漏出法で評価したストレス耐性はおよそ2-3℃程度の向上であったので、低温馴化処理条件の再検討など詳細な検証が必要と判断した。そのため、ラフィノース族オリゴ糖の蓄積によって、細胞外凍結する師部や緑葉と過冷却する木部の双方でどれだけストレス耐性に貢献できるかについて、引き続き研究を継続している。

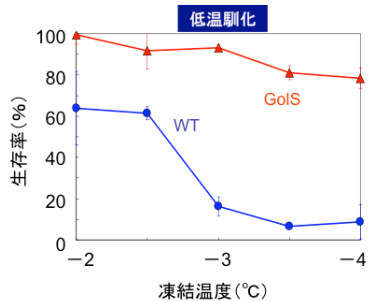


図4. 低温馴化した形質転換ポプラの緑葉における凍結ストレス耐性. 形質転換株GolSと野生株WTを低温馴化し、緑葉での凍結ストレス耐性を電解質漏出法で調べ比較した。

近年、フラボノール配糖体には抗氷核活性（過冷却促進活性）を有するものが存在することが当研究室によって明らかになった。一般的にフラボノール配糖体は抗酸化能を示すものが多いことが知られており、しがって過冷却促進活性を有するフラボノール配糖体の蓄積は、耐寒性と抗酸化能の双方の向上を期待できるため、当該物質の蓄積に因る木部の過冷却能の向上も試みることにした。ただし、過冷却活性を有する特定のフラボノイド配糖体の合成を促すことが難しいため、フラボノイド合成全般を活性化するマメ科植物由来の転写因子MYB12の遺伝子を用いたところ、比較的順調に形質転換体を作成できた。現在、クローン個体を節間培養にて増殖中であるので、個体数が増えた時点で目的遺伝子の発現量やフラボノール配糖体含量の比較によって供試材料を選抜し、以降、環境ストレス耐性の評価を試みる。

また、カラマツ木部の冬季誘導性遺伝子であるデハイドリンなどについても、引き続き、形質転換体作出を試みている。

(2) 低温応答性遺伝子の機能評価

カラマツ木部の冬季誘導性遺伝子であるデハイドリンについては、リコンビナントタンパク質を大腸菌で発現させて凍結ストレス耐性にかかわる機能評価をおこなった

ところ、氷晶成長阻害活性は弱かったが、凍害保護活性は中程度であることが明らかになった。今後は、過冷却促進活性などについても検証したい。

(3) 他の低温応答性遺伝子のクローニング

一方で、耐病性と乾燥・凍結耐性に関与が期待される LkDRP1 のアイソフォームタンパク質をコードする遺伝子の cDNA クローンを単離した。この遺伝子群は、イチヨウ種子の抗菌性タンパク質 Ginkbilibin-2 やカナダトウヒの LEA タンパク質と相関性が高かったが、木部では機能未知である。これについてもまずは大腸菌に組換えタンパク質を作らせ、凍結ストレス耐性や耐病性に関する機能評価を試みてから形質転換体の作出を目指す。

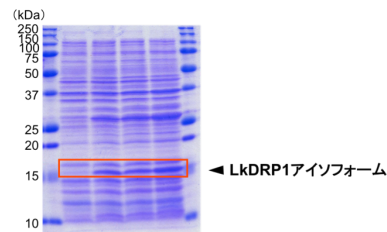


図5. LkDRP1アイソフォーム遺伝子を利用した組換えタンパク質の生産. 新たな導入遺伝子の候補となりうるLkDRP1アイソフォーム遺伝子のcDNAクローンを単離した後、大腸菌のタンパク質発現系に形質転換し、当該遺伝子をもとに組換えタンパク質の合成を試みた。矢頭で示した組換えタンパク質が可溶性タンパク質として回収できたなら、インビトロアッセイによって機能評価を試みる。

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 12 件)

- ① Kasuga, J., Fukushi, Y., Kuwabara, C., Wang, D.H., Nishioka, A., Fujikawa, E., Arakawa K., Fujikawa, S., Analysis of supercooling-facilitating (anti-ice nucleation) activity of flavonol glycosides. *Cryobiology*, 査読有, 60, 240-243, 2010.
- ② Endoh, K., Kasuga, J., Arakawa K., Ito, T., Fujikawa, S.: Cryo-scanning electron microscopic study on freezing behaviors of tissue cells in dormant buds of larch (*Larix kaempferi*). *Cryobiology*, 査読有, 592, 214-222, 2009.
- ③ 藤川清三, 春日純, 荒川圭太: 樹木の凍結抵抗性 -凍らない水-. *低温生物工学会誌*, 査読有, 55, 37-41, 2009.

- ④ Kami D., Kasuga J., Arakawa K., Fujikawa S.: Improved cryopreservation by diluted vitrification solution with supercooling-facilitating flavonol glycoside. *Cryobiology*, 査読有, 57, 242-245, 2008.
- ⑤ Kasuga J., Hashidoko Y., Nishioka A., Yoshiba M., Arakawa K., Fujikawa S.: Deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*) contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity. *Plant, Cell and Environment*, 査読有, 31, 1335-1348, 2008.

[学会発表] (計 20 件)

- ① 能美彩香、森本和成、藤川清三、荒川圭太: 深過冷却するカラマツ木部由来の冬季誘導性タンパク質(LkDRP1、LkDRP2)に関する研究. 第 61 回日本木材学会大会, 2011 年 3 月 18 日, 京都大学農学部, 京都市.
- ② 板羽貴史、砂留光利、上出奈央、佐野雄三、藤川清三、荒川圭太: ハイブリッドアスペンの凍結抵抗性に関する研究. 第 42 回日本木材学会北海道支部研究発表会, 2010 年 11 月 9 日, 札幌コンベンションセンター, 札幌市.
- ③ Kuwabara C., Fukushi Y., Wang D., Kasuga J., Arakawa K., Fujikawa S.: Supercooling-facilitating (anti-ice nucleation) activity of phenolic compounds in solutions containing different types of ice nucleation substances. 47th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, 17-20 July 2010, Bristol, UK.
- ④ Wang D., Kasuga J., Kuwabara C., Fukushi Y., Arakawa K., Fujikawa S.: Identification of Supercooling-facilitating (anti-ice nucleating) hydrolyzable tannins from xylem parenchyma cells in katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*). 47th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, 17-20 July 2010, Bristol, UK.
- ⑤ Endoh K., Arakawa K., Fujikawa S.: Comparison of freezing behaviors between extracellular freezing and extraorgan freezing in dormant buds in trees. 47th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, 17-20 July 2010, Bristol, UK.
- ⑥ 桑原慎子、王東暉、春日純、森若元太、

遠藤圭太、荒川圭太、藤川清三: 過冷却促進(氷核形成阻害)物質の応用についての検討. 第 55 回低温生物工学会大会, 2010 年 6 月 25-26 日, 東京工業大学, 横浜市.

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/woosci/woobio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 圭太 (ARAKAWA KEITA)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 00241381

(2) 研究分担者

該当無し ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

該当無し ()

研究者番号: