

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780153

研究課題名(和文) 樹木の遺伝子組換えに向けた各種プロモーターの発現誘導評価とその利用

研究課題名(英文) Comparative analysis of reporter gene expression regulated by constitutive promoter for woody plant transformation

研究代表者

福元 健志 (FUKUMOTO TAKESHI)

香川大学・農学部・産学官連携研究員

研究者番号：70467835

研究成果の概要(和文)：本研究では、高等植物での有効性がすでに報告されている各種プロモーターを用いて、各種草本系および木本系植物から得た単細胞(プロトプラスト)でのレポーター遺伝子の発現を比較評価する実験系を構築する事により、各植物種と各プロモーター活性の対応を明らかにすることを目指した。本研究では、既にプロトプラスト単離条件を明らかにした草本・木本植物7種類に加えて、新たに *Avicennia* 属、*Sonneratia* 属の4種のマングローブ樹木についてプロトプラスト単離条件を明らかにした。また、カラマツおよびロッカクヒルギのプロトプラストへの一過的遺伝子導入における改変型 35S (E12 Ω) プロモーターやトウモロコシ・ユビキチンプロモーターの有効性を明らかにした。既存プロモーターの転写誘導活性の評価を行うため、qRT-PCR を用いた評価システムの構築を行った。さらに、高発現プロモーターを用いた細胞内小器官を可視化するベクターの構築を行った。

研究成果の概要(英文)：The transient expression of GFP gene, which regulated by known constitutive promoter in plant, was examined with protoplasts in order to compare the promoter activity in each of protoplast derived from several plant tissues. It was aimed to clarify the efficient promoter in woody plant transformation. For the electroporation study, isolation condition of protoplast was newly clarified in four kinds of mangrove including *Avicennia* and *Sonneratia* genus in addition to the previously clarified seven plants. The protoplast of *Larix* (conifer) showed strong GFP expression by modified 35S (E12 Ω) and maize ubiquitin promoter, but not 35S promoter. E12 Ω promoter were also available for *Bruguiera* (mangrove). To compare the promoter activity at the mRNA level, qRT-PCR-based evaluation system was developed, and the plasmid vector for bio-imaging of woody plant was constructed with EL2 Ω promoter.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：植物生理学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：樹木、プロトプラスト、プロモーター評価

1. 研究開始当初の背景

植物の形質転換技術はモデル植物において一般的な技術として認知されている。現在、形質転換植物の多くはカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) から単離された 35S プロモーターを用いて遺伝子発現が行われているが、単子葉植物であるイネを例にとると、 β -グルクロニダーゼ活性を指標としたイネにおける 35S プロモーターの遺伝子誘導活性はタバコのそれと比較して 1/100 以下と非常に低い。これは、遺伝子導入のターゲットとして用いた植物細胞自身の生体活性 (遺伝子発現誘導活性の差) によるものと考えられる。しかしながら、遺伝子導入には、様々な植物種や細胞器官に由来する脱分化細胞 (カルス) をターゲットとするため、常に生体活性の高い細胞を遺伝子導入に使用し続けることは困難であり、遺伝子導入条件の最適化には強力な遺伝子誘導活性を示すプロモーターの利用が重要と考える。

また、樹木の形質転換を例にとると、目的遺伝子上流に 35S プロモーターを 2 つタンデムにつなげた場合や” 35S-目的遺伝子-nosI” の発現カセットを導入ベクター内にタンデムに挿入している場合が多く見られる。その理由としては、樹木細胞では通常の 35S プロモーターでは目的遺伝子の発現誘導が低いことが挙げられる。このように、従来のプロモーターでは目的遺伝子の発現誘導が低いとされる植物種の形質転換を考える際には、複数のプロモーターから目的遺伝子の発現誘導活性の高いものを選抜する必要がある。

このような背景から、さまざまな植物種で強い活性を示すプロモーターの探索とその活性に関する基礎研究情報の集積が重要であると考へ本研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究では、高等植物での有効性がすでに報告されている各種プロモーターを用いて、各種草本系および木本系植物から得た単細胞 (プロトプラスト) でのレポーター遺伝子の発現を比較評価する実験系を構築する事により、各植物種と各プロモーター活性の対応を明らかにすることを目指した。それにより、従来の植物プロモーターでは遺伝子発現誘導活性が低いとされる樹木などの遺伝子導入系開発を成功へ導くための基礎的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

プロモーター活性評価に用いるエレクトロポレーション法には植物の細胞壁を分解したプロトプラストと呼ばれる単細胞が必

要となる。そこで、プロトプラストを効率的に回収する事を目的とし

て、プロトプラスト単離の酵素および浸透圧条件の検討を行った。条件検討には、24 穴の多穴シャーレを用いてハイスルーブットに最適化する方法を利用した。本法により、これまで使用したタバコ、イネ、ポプラ、シラカンバ、カンキツ、カラマツ、ロッカクヒルギに加えて、新たに *Avicennia* 属、*Sonneratia* 属を含む 4 種の植物からのプロトプラスト単離条件を検討した。供試植物材料からの無菌プロトプラスト単離に用いる細胞壁分解酵素には、Cellulase Onozuka RS (Yakult Co.,Ltd.)、Cellulase Onozuka R-10 (Yakult Honsha Co.,Ltd.)、Driselase 20 (Kyowa Chemical Co.,Ltd.)、Pectolyase Y-23 (Kyowa Chemical Co.,Ltd.)、Macerozyme R-10 (Yakult Honsha Co.,Ltd.)、Hemicellulase (H-2125, Sigma Chemical Co.,Ltd.) の 6 種類を組み合わせ、計 24 通りを作成した。すなわち、0.4 M または 0.6 M マンニトールに溶解した。酵素液を図 1 に示したように作成後、図 1 に示すように 100 μ l ずつ分注し、最終的に全量 400 μ l の酵素反応液を作成した。浸透圧条件についても酵素条件の決定後に、24 穴シャーレを用いて検討した。

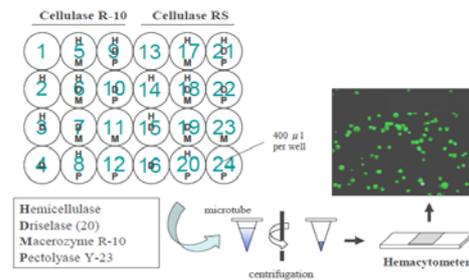


図1. 24穴シャーレを用いたプロトプラスト単離酵素条件サーベイ法の概要。

(A)は、各ウェルに分注した酵素液の組成を示す。
(B)は、本サーベイ法の模式図を示した。

次に、回収したプロトプラストをマンニトール溶液で洗浄後、エレクトロポレーション法による GFP 遺伝子導入条件の検討を行った。GFP 発現の観察は、エレクトロポレーション後、プロトプラストを 96 穴シャーレに移植、培養後 24 時間のプロトプラストを倒立型蛍光顕微鏡により観察した。

さらに、mRNA の転写に特化してプロモーター活性の比較を行うため、内部標準を用いたプロモーター評価系の構築を目指した。すなわち、内部標準となるプロモーター制御下に GFP を連結し、評価対象のプロモーターの制御下で RFP を発現するベクターの構築に取り組んだ。また、これらベクターをプロトプラ

ストへ共導入し、mRNA量の定量的RT-PCRによりプロモーター強度を比較する実験系の構築を行った。

4. 研究成果

(1) 各種高等植物からのプロトプラスト単離条の検討

エレクトロポレーションに供試するプロトプラストを単離するために、既報のタバコ、イネ、ポプラ、シラカンバ、カンキツ、カラマツ、ロッカクヒルギに加えて、新たに検討したマングローブ樹木を含む (*Avicennia*属、*Sonneratia*属を含む4種) のプロトプラスト化の条件について明らかにし、学会発表した (学会発表①、②)。

(2) 樹木プロトプラストを利用した一過的GFP遺伝子発現系による遺伝子導入

これまで、タバコBY-2、イネ、ポプラでのCaMV35Sプロモーター制御下でのGFP遺伝子発現の報告がなされているが、カラマツ不定胚形成細胞由来のプロトプラストでの35Sプロモーターの遺伝子発現誘導活性は非常に低く、蛍光顕微鏡下での検出が困難であった。そこで、改変型35SプロモーターであるE12Ωプロモーターおよびトウモロコシ由来ユビキチンプロモーター制御下にGFP遺伝子を連結したベクターを構築し、エレクトロポレーション法 (図2) によりプロトプラストへ一過的遺伝子導入した。

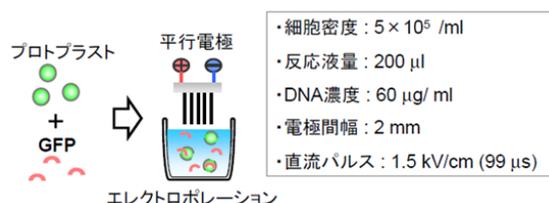


図2. エレクトロポレーションによるカラマツプロトプラストへの一過的遺伝子導入

その結果、通常35Sプロモーターを用いた場合では自家蛍光によりGFP蛍光の検出が困難であったが、E12Ωプロモーターおよびトウモロコシ・ユビキチンプロモーターを用いた場合ではGFP蛍光が明瞭に観察された (図3)。これより、針葉樹の形質転換における高発現プロモーターの有効性が示された。

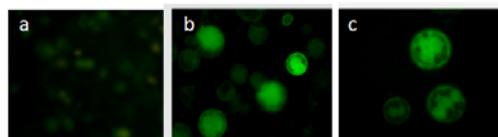


図3. 各種プロモーター制御下におけるカラマツプロトプラストのGFP発現
a) 35Sプロモーター制御、b) トウモロコシユビキチンプロモーター制御
c) 改変35Sプロモーター (E12Ω) 制御

さらに、マングローブ樹木の一種であるロッカクヒルギプロトプラストへのGFP遺伝子導入についても新たに検討した。ロッカクヒルギへのエレクトロポレーションにおいては、プロトプラスト 5×10^5 個当たり60 μ gのプラスミドDNA (E12Ωプロモーター制御下でGFPを発現) を使用し、2mm幅の平行電極を用いた際、2.0kV/cm、99 μ sでGFP発現が蛍光顕微鏡下で観察された。以上の結果より、樹木プロトプラストでの遺伝子発現の効率化に対して、高効率プロモーターの利用が有効であることが明らかにし、学会発表した (学会発表③)。

(3) qRT-PCRを用いたプロモーター評価系の構築

先の実験により、高効率プロモーターの樹木形質転換への有効性が示された。しかしながら、GFPを用いたプロモーター活性評価には課題点も残る。具体的には、GFPの半減期が長いこと、観察される蛍光はタンパク質翻訳量の積算値となるため、実際のGFP mRNAの転写量を測定していない点である。この問題を克服するために、mRNAの転写に特化してプロモーター活性の比較を行う実験系の構築に取り組んだ。すなわち、内部標準となるプロモーター制御下にGFPを連結し、評価対象のプロモーターの制御下でRFPを発現するベクターの構築に取り組んだ。この発現評価ベクターは、単一のベクター内にGFPとRFPを共存させたものと、別々のベクターに分けたものを作成した。本ベクターの有効性について、現在検討を行っている。

当初目標とした草本系・木本系プロトプラストにおける遺伝子発現効率の相対比較は、今回作製したベクターを用いることで可能になると考えられる。本研究については、今後の課題として進める予定である。

(4) 高発現プロモーターを利用した樹木細胞内小器官の可視化に関する検討

樹木細胞においてアクチンおよびチューブリンなどの細胞内構造物やミトコンドリアや色素体などの細胞内小器官を非破壊的に観察する実験系の構築を目指し、細胞内小器官可視化ベクターの構築に取り組んだ。すでに、35Sプロモーター制御下におけるミトコンドリア、アクチン、チューブリン可視化ベクターの構築は終了し、タバコBY-2での導入確認は終了している。本研究において有効性の認められたE12Ωプロモーターを用いた可視化ベクターの構築は進めたが、樹木細胞での遺伝子導入と局在性の確認には至らなかった。本目的の技術的な問題点は全てクリアされており、今後の検証実験もスムーズに実施できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

- ① 小柳朋也、林徳子、栗田麻未、福元健志、笹本浜子．樹木プロトプラストが生産するカロスファイバー形成機構解明：繊維形成部位の微細構造観察 - 単一細胞TEM、新規蛍光染色法 LCSM、GFP 遺伝子導入．日本木材学会、2011年3月18～20日(京都)
- ② 土屋慎平、長谷川愛、福元健志、皆川礼子、笹本浜子．*Sonneratia* 属マングローブにおけるプロトプラスト単離効率化のための条件検討．日本マングローブ学会、2009年11月7～8日(東京)
- ③ 長谷川愛、林晋司、栗田麻未、河合史樹、川名祥史、福元健志、笹本浜子．マングローブ樹木プロトプラストのアブシジン酸内生量と培養促進・阻害効果．日本植物学会大会、2009年9月17～20日(山形)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福元 健志 (FUKUMOTO TAKESHI)
香川大学・農学部・産学官連携研究員
研究者番号：70467835