

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：34419	
研究種目：基盤研究（B）	
研究期間：2010～2013	
課題番号：22380182	
研究課題名（和文）	代謝工学による環境浄化植物の開発：ホルムアルデヒドやメタノールの除去能の増強
研究課題名（英文）	Production of plants for phytoremediation by metabolic engineering: Enhancement of an ability to remove environmental formaldehyde and methanol
研究代表者	
	泉井 桂（IZUI KATSURA）
	近畿大学・先端技術総合研究所・客員教授
	研究者番号：20025414

研究成果の概要（和文）：環境中のホルムアルデヒド（HCHO）を吸収・同化する能力を植物に付与することにすでに成功しているが、本研究では実用化をめざして、この能力のさらなる増強のための導入遺伝子の改良を行い、HCHOの毒性発現機構の一部を解明し、シロイヌナズナ、タバコに加えてイネにもこの能力を付与することに成功した。将来メタンの資化能を植物に付与するための次のステップとしてメタノールの資化能を付与する試みを行った。

研究成果の概要（英文）：Previously we succeeded in conferring an ability of absorbing and assimilating formaldehyde to plants by genetic engineering. In order to put this invention to practical use, (1) the improvements were made on the gene constructs to be expressed, (2) the molecular mechanism of toxicity of formaldehyde was partly elucidated, and (3) the applicability of this invention to a horticultural plant and a monocot plant, rice, was also demonstrated. As a step toward development of plants with an ability to assimilate methane, further introduction of the gene for methanol oxidase was also initiated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2012年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境浄化

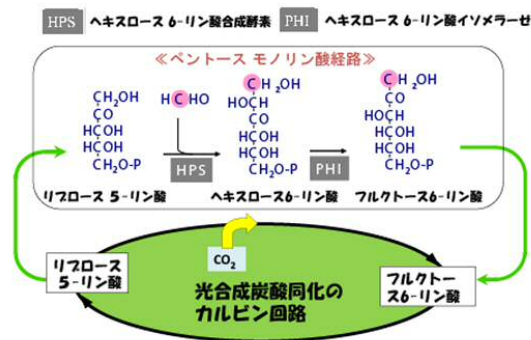
キーワード：ホルムアルデヒド・メタノール・シックハウスガス・リブローズモノリン酸経路・酵素遺伝子導入植物・マイクロレイ解析・アラビドプシス・イネ

1. 研究開始当初の背景

先に我々はシックハウス症候群の代表的な原因物であるホルムアルデヒド(HCHO)を吸収・同化する植物を作出することに成功し、このような植物はHCHOによって汚染され

た室内空気の浄化に役立つ可能性を示した。本研究のもともとのねらいは、大部分の植物においては光合成的炭酸同化はリブローズビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RubisCO)によって行われるが、この

酵素の効率がよくないため、この酵素による反応段階をバイパスさせるための代謝経路を導入して光合成能を増強することであった。下図は導入した酵素系を示す。これら



の酵素の遺伝子（それぞれ *rmpA* および *rmpB*）はメタノール資化性細菌から単離されたものである。

さらに、HCHO の植物に対する毒性発揮の機構は明らかではないため、一定の湿度を保ちつつ一定濃度の HCHO に植物を曝露するための装置を作製し、HCHO への曝露によってその発現が変動する遺伝子の網羅的解析研究に着手した。これらの研究はわれわれ独自のものである。

2. 研究の目的

本研究において目指すことを以下に記す。

- (1) すでに始めていた遺伝子の網羅的解析をさらに詳細にすすめ、HCHO の野生型および組換え体植物への影響を明らかにするとともにその作用機構について手がかりを得る。
- (2) 将来メタン資化能をイネや牧草に付与することによって強力な地球温暖化ガスであるメタンを低減させることを目標に、そのプラットフォームとなる HCHO 資化能を付与したイネの作出をおこなう。
- (3) 観葉植物に遺伝子を導入して室内空気の浄化に役立てることを目指す。
- (4) 植物の HCHO に対する応答をより詳しく解析するために、*Arabidopsis* の培養細胞株の T87 を用いて、形質転換株を作出し、野生株とともに HCHO 処理を行い、酸化ストレスによる ROS (Reactive Oxygen Species) の発生の有無を調べる。
- (5) (2)に引き続きメタノール (MeOH) を HCHO に酸化するためにメタノールオキシダーゼの遺伝子をさらに導入し、MeOH 資化能を付与したイネを作出する。

3. 研究の方法

- (1) 以前に作出した *Arabidopsis thaliana* の組換え体 (*rmpA* および *rmpB* 遺伝

子をそれぞれトマトの *RbcS* 遺伝子のプロモーターと葉緑体へのトランシットペプチドの下流につないだものを導入) と野生株を、HCHO 濃度を 1-2 ppm および 15-16 ppm に保ったチャンバー内で 2.5 時間曝露し、曝露後 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ法によって mRNA の網羅的解析をおこない、解析を行った (理化学研究所の榊原教授のご協力による)。

- (2) イネにおける高発現を実現するため、ベクターの改良を行う。イネの *RbcS* 遺伝子プロモーターとトランシットペプチドの下流に 2 種類の酵素の融合体を合成させるための融合遺伝子 (*RmpAB*) をつないで高活性酵素の導入を一度の形質転換で達成する。さらにコドンにイネに最適化するため、融合遺伝子は完全に合成 DNA を調製して用いた。
- (3) 双子葉植物での発現に最適化した融合遺伝子を用い、さらに市販の高発現ベクター (pRI 101-AN DNA タカラバイオ) に導入したものをを用いて、シクラメンに導入した (北興化学の寺川輝彦氏の協力を得て形質転換をおこなった)
- (4) T87 細胞を③のプラスミドで形質転換し、HCHO の資化能および HCHO 耐性を確認したのち、細胞懸濁液を用いて、HCHO 添加による ROS の発生の有無を化学発光試薬である MCLA をもちいてルミノメーターにより測定した (測定器は東京理科大学の朽津教授のお世話になった)。
- (5) MeOH オキシダーゼ遺伝子は、*Candida boidini* 由来のものを京都大学阪井教授より供給していただき、これにカボチャのグリオキシソーム局在化シグナル配列を C 末端側に付加したものを pRI101-AN ベクターに導入し、さらにこのベクターに *RmpAB* 遺伝子の転写単位を導入したものを構築し、イネへの導入を行った。

4. 研究成果

- (1) HCHO への曝露によってその発現レベルが変動する遺伝子数。2.5 時間の曝露によって非常に多数の遺伝子の mRNA のレベルが変動した。4 倍以上または 4 分の 1 以下になったものの数は下表に示す。
1 ppm の低濃度では、抑制された遺伝子の数は形質転換株では野生株の 38% に低下し、遺伝子導入によって HCHO によるストレスが緩和されたことが示唆された。これに対して誘導された遺伝子の数は、逆に 1.9 倍に増加した。これは防衛的に誘導される遺伝子の発現が

HCHO による障害を受ける程度が減少したためと考えられる。

HCHO の曝露濃度	試供植物	応答した遺伝子数	
		4 倍以上の誘導	1/4 以下の抑制
Low (1ppm)	野生株	96	248
	形質転換株	181	95
High (15ppm)	野生株	759	669
	形質転換株	993	698

高濃度の HCHO に曝露したときには、野生株と形質転換株の間での違いはほとんどなく、導入遺伝子によるストレス緩和の能力を超えているためと推測された。

葉酸の関与する HCHO の代謝系酵素の発現は glutathione S-transferase 以外はほとんど変化しなかった。

Gene Ontology 解析では、biotic および abiotic stress 関連の遺伝子の発現が顕著に変化した。とくに種々の熱ショックタンパク質 (HSP) の変動が著しかった。データが膨大であるためここでは割愛するが、MapMan 解析などで、光合成電子伝達系やタンパク合成系の遺伝子などで顕著な変化をみせたものが数あり、これらは、HCHO が酸化ストレスを惹き起こしていることを示唆するものであった。

- (2) イネへの RmpAB 遺伝子の導入に成功した。Gateway system を用いて構築されたプラスミドであったが、翻訳開始直前の Kozak 配列の部位にくる AttB1 配列を除去することによって一層高レベルの発現を得ることができた。

組換え体イネは HCHO 吸収能を示し、HCHO に対する耐性も増強されていた。

下図は 0.2 mM の HCHO に浸漬し照射下 11 日振とう後の葉の様子を示す。

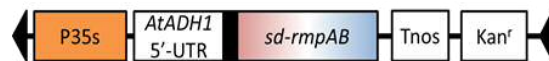
左が野生型、右が組換え体イネの葉を示す。



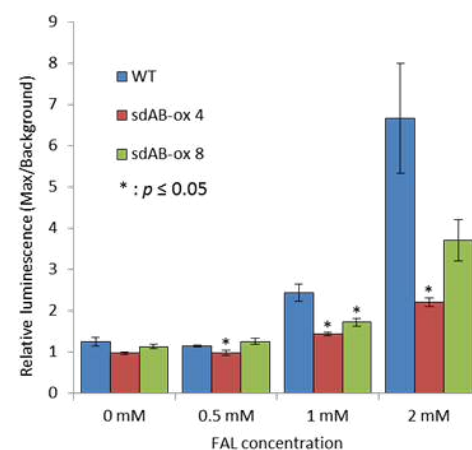
- (3) 観葉植物や室内花卉植物へ RmpAB 遺伝子を導入し、室内空気の浄化に役立てることを数年にわたって試みてきたがポトスやベゴニアについて形質転換ができなかった。24 年度には、北興化学の寺川氏の協力を得て、シクラメンの形質転換に成功した。現在、得られた植物体の HCHO の吸収・固定能を測定中である。



- (4) T87 細胞株に RmpAB 遺伝子を導入することに成功し、強力な発現が得られるようになった。用いたプラスミドのコンストラクトは下図のとおりである。



この組み換え体を用いて、HCHO の添加によって酸化ストレスが生じて ROS の発生がおこるか否かを検討した。その結果、下図の結果が得られ、HCHO (FAL と記載) が 1 mM 以上で ROS の発生がみられ、2 mM では顕著に ROS 発生量が増大するが、組換え体では有意に抑制されることが明らかとなった。この知見は HCHO によるストレスが ROS 発生を介して伝達されることを強く示唆するものである。



- (5) イネに HCHO の固定・同化能を付与し、らにメタノールを HCHO に転換する酵素を導入する試み。プラスミドを構築しイネの形質転換を行っているが、問題が

生じて研究の進行が遅れている。現在検討中である。

まとめ

研究はおおむね予定通り進行し、HCHOの植物に対する毒性発揮機構について手がかりを得ることができた。

またイネについても同様の性質を付与することに成功し、将来メタン資化能を付与するための基礎ができた。

シクラメンにHCHO除去能を付与することができたことと思われるので、今後実用化への可能性が高まった。このシクラメンは花粉やメシベを欠損させるように作成されたものであり、組換え体の遺伝子の環境への拡散がおこらないようにしたものであるため、実用化への障害は低いと考えられる。

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4件)

(1) 泉井桂、環境中のホルムアルデヒドを吸収・同化する遺伝子組換え植物の開発、*環境と健康*、査読あり、Vol. 26、No. 1、2013、pp. 43-52.

(2) Furumoto T, Yamaguchi T, Ohshima Y, Nakamura M, Tsuchida Y, Shimamura M, Ohnishi J, Hata S, Gowik U, Westhoff P, Brautigam A, Weber APM, Izui K. A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter, *Nature*, 査読あり, Vol. 476, No. 7361, 2011, pp. 472-475.
doi: 10.1038/nature10250

(3) Song Z, Orita I, Yin F, Yurimoto H, Kato N, Sakai Y, Izui K, Li K, Chen L. Overexpression of an HPS/PHI fusion enzyme from *Mycobacterium gastris* in chloroplasts of geranium enhances its ability to assimilate and phytoremediate formaldehyde. *Biotechnol Lett.* 査読あり, 2010, 32(10), pp. 1541-1548.

(4) Chen LM, Yurimoto H, Li KZ, Orita I, Akita M, Kato N, Sakai, Y, Izui K. Assimilation of formaldehyde in transgenic plants due to the introduction of the bacterial ribulose monophosphate pathway genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読あり, 2010; 74(3): pp. 627-635.

日本農芸化学会 2010 年度 BBB 論文賞を受賞

[学会発表] (計16件)

(1) 泉井桂、明渡絵里朱、蘆田弘樹、橋詰恵丞、横田明穂、秋田求、陀安一郎、光合成における¹³C/¹²Cの同位体分別の測定による

“C4化”植物の性格づけ、第54回日本植物生理学会年会、2013年3月22日、岡山大学津島キャンパス。

(2) 林功貴、明渡絵里朱、橋詰恵丞、高木祐子、中川強、谷口光隆、松倉千昭、江面浩、秋田求、泉井桂、C4ミニサイクルのC3植物(トマト)への導入による光合成能の増強を目指して(ポスター発表)、第54回日本植物生理学会年会、2013年3月22日、岡山大学津島キャンパス。

(3) 久保森、明渡絵里朱、中川強、石原健二、小西美穂子、柳沢修一、笠岡昌美、藪田由布子、豊田哲郎、由里本博也、阪井康能、秋田求、泉井桂、*Arabidopsis thaliana*培養細胞によるC1資化植物作出モデル系の構築—ホルムアルデヒド固定のための遺伝子コンストラクトの検討—、第30回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム、2012年8月5日、奈良先端科学技術大学院大学、生駒市。

(4) 原田大士朗、平田樹、佐藤茜、大和勝幸、泉井桂、秋田求、次世代シーケンサーによるC3-C4光合成相互転換植物 *Eleocharis vivipara* のトランスクリプトーム解析、第30回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム、2012年8月5日、奈良先端科学技術大学院大学、生駒市。

(5) 泉井桂 (シンポジウム招待講演)、C4ミニサイクルのC3植物(トマト)への導入による光合成能の増強を目指して、第30回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム、2012年8月3日、奈良先端科学技術大学院大学、生駒市。

(6) 泉井桂 (招待)、シックハウスガス(ホルムアルデヒド)を吸収・除去する植物の開発、第41回いのちの科学例会、2012年4月21日、パストゥールビル(京都市)。

(7) 久保森、明渡絵里朱、榊原均、来須孝光、朽津和幸、由里本博也、阪井康能、秋田求、大和勝幸、泉井桂、(2aF01)シロイヌナズナのホルムアルデヒドストレス応答と活性酸素種(ROS)の関与に関する解析、第53回日本植物生理学会大会、2012年3月16日—18日、京都産業大学、京都市。

(8) 泉井桂、蘆田弘樹、橋詰恵丞、有川慶大、濱口祐子、横正健剛、横田明穂、秋田求、(1pA01)葉緑体においてPEPカルボキシラーゼとPEPカルボキシキナーゼを過剰発現させることによるタバコ(C3植物)の高CO₂条件下での水利用効率の向上、第53回日本植物生理学会大会、2012年3月16日—18日、京都産業大学、京都市。

(9) 明渡絵里朱、鈴木詩織、福井崇人、中川強、榊原均、由里本博也、阪井康能、

大和勝幸、秋田求、泉井桂、(2P-0223) イネとタバコへのホルムアルデヒド固定能の付与：C1 微生物のリブローズモノリン酸経路 (RuMP) の 2 つの酵素の葉緑体における高発現にむけて、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21 日—9 月 24 日、京都国際会議場、京都市。

(10) 原田大士朗、近藤知栄、米原亮、大和勝幸、秋田求、泉井桂、(2P-0254) C3/C4 光合成の相互転換植物、カヤツリグサ科の *Eleocharis vivipara* の cDNA ライブラリーの作成と C4 型 PEPC のゲノム DNA 塩基配列の決定、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21 日—9 月 24 日、京都国際会議場、京都市。

(11) 鈴木詩織、明渡絵里朱、中川強、榊原均、由里本博也、阪井康能、大和勝幸、秋田求、泉井桂、(2Cp-02) イネへのホルムアルデヒドの同化代謝系 (リブローズモノリン酸経路) の導入、第 29 回日本植物細胞分子生物学会大会、2011 年 9 月 6 日—8 日、九州大学、福岡。

(12) Izui K, Kubo S, Suzuki S, Akedo-E, Yamato K, Akita M, (W,Th, E-13) Feasibility of CO₂ assimilation via formaldehyde in plants, Gordon Research Conference “CO₂ Assimilation in Plants: Genome to Biome”, 2011 年 5 月 29 日—6 月 3 日, Les Diablerets Conference Center, Switzerland.

(13) 久保、陳、榊原、由里本、加藤、阪井、秋田、泉井、シロイヌナズナを用いたホルムアルデヒド応答のトランスクリプトーム解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学、京都市。

(14) 鈴木、明渡、中川、榊原、阪井、由里本、大和、秋田、泉井、ホルムアルデヒドを固定し、同化する代謝酵素の合成遺伝子を導入したイネの作成と解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学、京都市。

(15) 泉井桂、(招待講演) 植物の遺伝子導入による代謝工学を目指して：C3 光合成能の増強と植物による空气中ホルムアルデヒドの吸収除去、日本生物環境工学会、2010 年 9 月 10 日、京都大学、京都市。

(16) Kubo S, Chen L-M, Sakakibara H, Orita I, Kato N, Sakai Y, Akita M, Izui K, Transcriptome analysis of formaldehyde response in Arabidopsis wild-type and formaldehyde assimilative transformant, International Conference on Arabidopsis Research 2010, 2010 年 6 月 6 日—10 日、パシフィコ横浜、横浜市。

〔図書〕 (計 1 件)

泉井桂 (約 40 項目分担執筆)、岩波書店、

岩波 生物学辞典、第 5 版、2013 年 2 月、2171 ページ。

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

本研究は、理化学研究所 豊田哲朗教授によって主催された「国際ゲノムデザインコンテスト」の課題として用いられた。そのサイト (URL) は下記の通り。

<http://scinets.org/item/cria303s3ria303s6i>

このテーマの先行研究として泉井が紹介した YouTube の URL は、以下の通り。

<http://www.youtube.com/watch?v=Ekf0f3d-mI>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉井 桂 (IZUI KATSURA)

近畿大学・先端技術総合研究所・客員教授
研究者番号：20025414

(2) 研究分担者

秋田 求 (AKITA MOTOMU)

近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号：80258061

(3) 連携研究者

なし