

令和元年6月11日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07095

研究課題名(和文)油糧作物カメリナを用いた新しい油脂生産強化システムの構築

研究課題名(英文) The effects of genetic disruption of 12S globulin proteins on seed oil contents in *Camelina* and *Arabidopsis*

研究代表者

藤木 友紀 (Fujiki, Yuki)

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：00414011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：油糧作物の種子では貯蔵タンパク質と油脂の蓄積が拮抗関係にあるため、貯蔵タンパク質の削減によって油脂生産の増加が期待される。本研究では、油糧作物のモデル植物カメリナを用い、種子貯蔵タンパク質12Sグロブリンを抑制した遺伝子組み換え体を作成し、次世代のバイオリソースにふさわしい新たな油脂生産システムの構築を試みた。

また、シロイヌナズナを用いた基礎研究では、12Sグロブリン変異体にジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼDGTA1を種子特異的に過剰発現させることで、相乗的に油脂生産が強化されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

油糧種子では貯蔵タンパク質と油脂の蓄積が負の相関関係にあり、貯蔵タンパク質を減らすことによって油脂を増やすことができるか長年に渡って議論されている。しかし、一般に種子貯蔵タンパク質は複数の遺伝子にコードされ、その削減は困難であった。本研究では、種子貯蔵タンパク質12Sグロブリンの遺伝子数が少ないシロイヌナズナに注目し、*cra1 crb crc* 三重変異体が油脂生産のプラットフォームとして有用であることを示した(投稿中)。さらに、油糧作物のモデル植物カメリナでも12Sグロブリンをほぼ欠損した遺伝子組み換え体の作出に成功し、実用作物への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Proteins and oils are two major reserves in oilseeds. Since both proteins and oil bodies occupy a substantial cellular volume, genetic lines lacking storage proteins might provide a better platform for increasing seed oil content. In this study, we have prepared *Camelina* transgenic plants in which 12S globulin proteins were almost completely deleted from seeds. In addition, we created a triple mutant for the major 12S globulin genes *CRA1*, *CRB* and *CRC* in *Arabidopsis*. As expected, oil accumulated more in *cra1 crb crc* seeds than the wild-type seeds. To further improve the seed oil content, *BnDGAT1* encoding *Brassica napus* diacylglycerol acyltransferase was overexpressed in *crc* and *cra1 crb crc* seeds under the control of *NAPIN* promoter. Results suggested that combination of 12S globulin mutants and overexpression of *BnDGAT1* genetically potentiate *Arabidopsis* to increase the maximum seed oil content.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：シロイヌナズナ カメリナ 油脂 種子 種子貯蔵タンパク質 12Sグロブリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 植物油脂(トリアシルグリセロール)は化石燃料を補う再生可能なバイオリソースとして注目されている。しかし、油脂合成関連遺伝子の遺伝子組み換えで得られる油脂増量は2割から3割に止まり、油脂生産力の増強にはこれまでと原理的に全く違うアプローチが求められている。また、複数の遺伝子組み換えを組み合わせることで相乗的な油脂生産の効果を目指すことも、近年盛んに試みられている。
- (2) ナタネやダイズなどの油糧種子では油脂と貯蔵タンパク質の貯蔵スペースが互いに競合している。このため、貯蔵タンパク質の抑制による油脂生産の強化が期待されるが、一般的に貯蔵タンパク質は遺伝子数が多く、貯蔵タンパク質の削減は困難であった。一方、シロイヌナズナでは種子貯蔵タンパク質の遺伝子数が比較的少ない。研究代表者らは、貯蔵タンパク質 12S グロブリンをコードする3つの主要遺伝子 *CRA1*、*CRB*、*CRC* のうち、*CRC* 遺伝子を破壊するだけで、油脂含量が増えるだけでなく、地上部のシンク器官(茎および花)の発達により、種子の収量も増大することを報告している(Fujiki et al. 2013)。
- (3) 本研究では、シロイヌナズナの近縁種でバイオエネルギー生産でも使用実績が上がっているカメリナ(*Camelina sativa*)を用い、種子貯蔵タンパク質 12S グロブリンの抑制(RNA干渉法)による油脂生産強化をめざした。カメリナは、ゲノム塩基配列がシロイヌナズナと近く、アグロバクテリウムを介した形質転換体の作出も比較的容易であり、油糧作物のモデル系として適している。

2. 研究の目的

- (1) 油脂合成酵素遺伝子やその上流の転写因子は、油脂生産強化における最も主要な分子育種の標的である。しかし、油脂合成の基質である炭素資源や油脂の貯蔵スペースが律速となるため、油脂生産増強には限界も指摘されている。種子貯蔵タンパク質の抑制は余剰の炭素資源を生み出すから、本手法を従来の油脂合成関連遺伝子の組み換え体に適用すれば、相乗的な油脂生産の強化が期待される。そこで、本研究ではシロイヌナズナ 12S グロブリン遺伝子の三重破壊株とジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ *DGAT1* 過剰発現株を組み合わせ、これまでに報告されている手法以上の油脂生産増加を実現する。
- (2) シロイヌナズナ 12S グロブリン遺伝子の破壊株を使って油脂生産および種子収量が増大する分子メカニズムを明らかにし、油糧作物におけるバイオマス生産強化への応用に結びつける。
- (3) カメリナ(*Camelina sativa*)を油糧作物のモデル系として用い、種子貯蔵タンパク質の抑制による油脂生産強化の実用性を油糧作物で実証する。

3. 研究の方法

- (1) シロイヌナズナ 12S グロブリン三重変異体 *cra1 crb crc* および *crc* 単独遺伝子破壊株に、

油脂合成関連遺伝子 *DGAT1* を種子特異的に過剰発現させる。種子 500 粒から抽出した脂質を 1 次元 TLC で展開し、油脂(TAG)を回収後、ガスクロマトグラフにより脂肪酸量を測定する。種子の一粒当たり、もしくは種子重量当たりで油脂量(nmol)を計算する。種子収量を計測している場合は、植物個体当たりの油脂総生産量も求める。

- (2) 油脂や脂肪酸合成のマスター転写因子群(*LEC2*, *WR11*, *ABI3* など)のうち、12S グロブリン変異体の種子成熟過程で発現誘導されるものを特定する。また、茎の分枝を制御する植物ホルモンであるストリゴラクトンやサイトカイニンにより制御されるマーカー遺伝子及び分枝の制御に関わる転写因子の発現を調べる。以上により、種子貯蔵タンパク質の抑制株におけるバイオマス(実と種子収量)の増加や油脂蓄積をもたらすメカニズムの解明を目指す。
- (3) カメリナから 12S グロブリンのホモログ遺伝子(*CRU1* および *CRU2*)の cDNA 断片をクローニングし、RNA 干渉用のベクターを作成して形質転換を行う。遺伝子組み換え体が得られたら、種子タンパク質の SDS-PAGE 解析により 12S グロブリンの発現抑制を確認し、後代でホモライン化して油脂解析に供するラインを絞り込む。

4. 研究成果

- (1) シロイヌナズナの 12S グロブリン変異体(*cra1 crb crc* 三重変異体)に油脂合成の鍵酵素遺伝子 *DGAT1* をナピンプロモーター制御下(*NAPpro*)で種子特異的に過剰発現させて、油脂解析を行った。*cra1 crb crc NAPpro-DGAT1* 株では、*cra1 crb crc* 変異体と *DGAT1* 過剰発現株のどちらよりも油脂蓄積レベルが高くなるという結果が得られた(投稿中)。
- (2) ただ、植物の栽培環境の差によって、12S グロブリン変異体と *DGAT1* の過剰発現の組み合わせによる油脂生産強化の効果に違いが見られることも分かってきた。たとえば、植物培養室と日照条件下(温室)の違い、使用する培養土(商品名スーパーミックスとゴールドンピートバン)の違いでも、油脂含量は異なっていた。そこで、様々な実験条件下での種子重量と油脂含量の相関を調べたところ、野生株や 12S グロブリン変異体に比べ、*cra1 crb crc NAPpro-DGAT1* では種子重量と油脂量の相関グラフの傾きが小さくなっていた。すなわち、比較的種子重量が軽い(種子の質が悪い)場合でも、*cra1 crb crc NAPpro-DGAT1* の油脂含量の低下は緩やかであり、その結果、*cra1 crb crc NAPpro-DGAT1* の油脂含量は野生株や 12S グロブリン変異体以上になっていた。一方、種子生産が良好な条件下(種子が重い)では野生株でも油脂レベルが増加しているため、遺伝子組み換えによる油脂生産強化の効果が見えにくくなっているとも言える。
- (3) シロイヌナズナ 12S グロブリンの主要な遺伝子、*CRA1*, *CRB*, *CRC* のうち、*CRC* の単独遺伝子破壊株でも油脂レベルが増加することが分かっていた(2013 年 藤木ら)。そこで、*crc* 変異体に *DGAT1* を過剰発現させても相乗的な油脂生産強化が可能か検証した。*crc* 変異体に種子特異的 *DGAT1* 過剰発現コンストラクトを形質転換したが、これは研究期間内に T2 世代までスクリーニングが進み、油脂解析には至っていない。
一方、*cra1 crb crc NAPpro-DGAT1* と *crc* の掛け合わせは以前から進めており、その後代

で *crc NAPpro-DGAT1* 株が得られた。CRC タンパク質のみが欠損していることは種子タンパク質の SDS-PAGE 解析で確認した。*crc NAPpro-DGAT1* 株およびそのコントロール(野生株、*crc* 単独破壊株、*NAPpro-DGAT1* 株) 植物をピートモス培養土で栽培し、およそ3ヶ月後に種子を回収した。油脂抽出と TLC 展開、GC 解析の結果、*crc* に *DGAT1* を過剰発現させた株では、*crc* 変異体と *DGAT1* 過剰発現株のどちらよりも油脂蓄積レベルが高くなるという期待通りの結果が得られた。

- (4) シロイヌナズナの 12S グロブリン変異体で分枝が促進されるメカニズムを調べるため、分枝が起こる時期の葉や茎(脇芽)を用いて RT-PCR 解析を行った。12S グロブリン変異体では、サイトカニン生合成遺伝子の一部に、転写産物レベルの増加が見られた。一方、ストリゴラクトンやオーキシン関連遺伝子も幾つか調べたが、調べた範囲では野生株と比べて大差がなかった。ただ、このときの実験では、12S グロブリン変異体は野生株より分枝が多い傾向はあったものの、以前観察したときに比べてその表現型の違いが小さくなっている問題も生じた。使用していた植物培養土(ゴールドンピートパン)が販売停止になり、培養土をスーパーミックスに変えたことも理由の一つとして考えられる。
- (5) カメリナの 12S グロブリン遺伝子のうち、*CRU1* と *CRU2* の cDNA 断片をクローニングし、CaMV 35S プロモーターまたはクルシフェリンプロモーターを用いて RNA 干渉用ベクターを作成した。アグロバクテリウムを介した花序浸し法によりカメリナへの形質転換を数度行った。当初、共同研究先のポハン工科大学の温室で植物栽培を行ったが、季節により日照不足や病害などが出て植物の栽培条件が最善ではなかった。その後、埼玉大学で植物の栽培環境は若干改善された。ただ、野外(温室)栽培に比べ日照が足りないのか、植物の生育環境にはまだ改善の余地がある。

最初に作成した RNA 干渉用ベクターは、薬剤耐性(カナマイシンまたはハイグロマイシン)を利用して遺伝子組換え体を選抜するシステムであった。カメリナは種子が大きく、無菌的に大量の種子を寒天培地に蒔いて形質転換体を選抜するのは手間である。このため、大量の種子をスクリーニングすることができず、この方法では形質転換体は得られなかった。
- (6) そこで、より簡便に形質転換体を選抜するため、種子特異的に赤色蛍光(DsRed)を発するプラスミドを入手し、12S グロブリン遺伝子の RNA 干渉用プラスミドを再構築した。このベクターを導入された形質転換体は蛍光実体顕微鏡下で容易に種子をスクリーニングできる。ただ、植物の栽培スペースの問題から形質転換に用いるカメリナの個体数が限られ、花序浸し法によるカメリナ形質転換の効率も高くないことから、最終的に数度の形質転換を通して1ラインしか組み換え体を得られなかった。そこで追加のカメリナ形質転換を実施することとした(下記(7)参照)。なお、ここで得られた1ラインについては、ゲノム遺伝子型を PCR で確認している。その際、カメリナの葉からの簡易ゲノム抽出についても2つの方法を比較検討し、カラム精製(phytopure キット)を必要としない安価、簡便な手法(SDS-Tris系バッファーによる DNA 抽出とエタノール沈殿)でもジェノタイピングが可能であった。
- (7) カメリナの形質転換には状態の良い植物を使用することも大事であるが、最適な栽培環境(温室など)を整備することはできなかった。そこで、カメリナの形質転換の実績が豊富な

ネブラスカ大学リンカーン校の Cahoon 博士に形質転換体の作出を依頼し、*CRU1*, *CRU2* の発現抑制コンストラクトについて、それぞれ多数の形質転換体種子(T1)を得た。それぞれ 20 ライン程度を選んで栽培し、後代種子(T2)で形質導入された DsRed マーカーの有無を蛍光顕微鏡下で確認した。DsRed 蛍光のある種子を選んでタンパク質を抽出、SDS-PAGE 解析を行い、調べたうちのおよそ 7 割 (*CRU1*, *CRU2* それぞれ 15 ライン中 11 系統)でクルシフェリン(12S グロブリン)がほぼ完全に欠損していることを確認した。

予備的な実験では、クルシフェリン変異体種子の重量や発芽率は野生株と大差がなかったが、個体数を増やして統計処理を行う必要がある。クルシフェリンの抑制が見られたラインの種子(T2)を蒔き、次世代でホモライン化を確認した種子の回収を進めている。

<引用文献>

Yuki Fujiki, Kazumasa Kudo, Hirofumi Ono, Masumi Otsuru, Yasuyo Yamaoka, Mutsumi Akita, Ikuo Nishida (2013) Genetic disruption of *CRC* 12S globulin increases seed oil content and seed yield in *Arabidopsis thaliana*. Plant Biotech. 30, 327-333

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

発表者 : Yuki Fujiki, Kazuki Haneishi, Aimi Sato, Asuka Kato, Youngsook Lee, Ikuo Nishida

発表標題 : *crc* and *cra1 crb crc* equally have an additive effect of increasing seed oil content in *Arabidopsis* seeds overexpressing *BnDGAT1*.

The 23rd International Symposium on Plant Lipids 2018 年、横浜

発表者 : Yuki Fujiki, Hiro Inoue, Aimi Sato, Kazumasa Kudo, Asuka Kato, Youngsook Lee, Ikuo Nishida

発表標題 : Combined effects of 12S globulin mutation and overexpression of *DGAT1* on seed oil content in *Arabidopsis thaliana*.

Gordon Research Conference, Plant Lipids 2017 年、Galveston, U.S.A.

[その他]

植物分子生理研究室ホームページ

http://park.saitama-u.ac.jp/~nishida/Nishida_Lab/Home.html

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。