

## 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 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780298

研究課題名（和文） パラゴムノキのラテックス特異的な遺伝子発現制御システムの構築

研究課題名（英文） Establishment of a laticifer-specific gene expression system in *Hevea brasiliensis*

研究代表者

高橋 征司 (Takahashi Seiji)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：90343061

研究成果の概要（和文）：

パラゴムノキのラテックスより生産される天然ゴムは、合成ゴムでは未だに到達できない優れた物性を示しタイヤ等のゴム工業製品に不可欠な天然材料である。遺伝子工学的手法による天然ゴム生合成能の増強のためには、ラテックス内遺伝子発現システムの構築が必須である。本研究では、ラテックス特異的高発現遺伝子の発現調節に関わるプロモーター領域の遺伝子配列を単離するとともに、ラテックス特異的に発現する転写調節因子タンパク質を単離することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Natural rubber obtained from latex in *Hevea brasiliensis* has the excellent physical properties, especially required for tire manufacturing. To meet the continuously increasing demand for natural rubber, metabolic engineering of *H. brasiliensis* is required to improve natural rubber production, achieved by a latex-specific overexpression of genes involved in the natural rubber biosynthesis. In this study, we have succeeded in discovering of latex-specific genes and cloning of 5'-upstream regions of these latex specific genes. Furthermore, we also identified several latex-specific transcription factors, expected to participate in the regulation of the latex-specific gene expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：発現制御，天然ゴム

## 1. 研究開始当初の背景

現在、産業的に生産されている天然ゴムの大部分は、熱帯地域で栽培されるパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) のラテックスか

ら生産されている。ラテックスは、樹皮付近の乳管細胞と呼ばれる細胞に由来する細胞質成分であり、パラゴムノキラテックスには約 30%の天然ゴムが含まれる。天然ゴムは、

タイヤをはじめとするゴム工業製品に不可欠な天然材料である。天然ゴムの需要が年々伸び続けている一方で、その生産は熱帯諸国のプランテーションによる伝統的農法に依存しているのが現状であるため、遺伝子工学的手法を用いた天然ゴム生合成能の増強が期待されている。これを達成するためには、(A)天然ゴム生合成酵素の解明と、(B)ラテックス内における効率的な遺伝子発現制御系の開発が必須である。

上記(A)に関して申請者らは、世界に先駆け、天然ゴムの炭素骨格生合成における鍵酵素であるシス型プレニル鎖延長酵素 HRT2 を同定することに成功した。天然ゴムは、イソペンテニルニリン酸 (IPP) の重合体を基本骨格とするイソプレノイドの一種であるが、パラゴムノキラテックスの遠心分離画分を用いた *in vitro* の反応系に HRT2 を加えたところ、IPP を基質として天然ゴムに相当する分子サイズのポリイソプレンが生合成された。パラゴムノキにおける HRT2 発現レベルの増強により天然ゴムの生産性向上が期待できるが、IPP を基本単位として生合成される他のイソプレノイドには、カロテノイド、クロロフィル、植物ホルモンなど、植物の生理応答に重要な役割を担うものが多いため、HRT2 の全身的過剰発現は植物の生育に悪影響を及ぼす可能性が高い。そこで上記 (B) の開発が重要となるが、これまでにラテックス特異的な遺伝子発現制御機構の解明に成功した例はなかった。そこで申請者らは、まず、ラテックスという特殊な環境下における遺伝子発現を俯瞰するため、パラゴムノキのラテックス中で発現する約 5,000 遺伝子を網羅的に解析し EST 化した。興味深いことに、ラテックス発現遺伝子には大きな偏りがみられ、Rubber Elongation Factor (REF) や Small Rubber Particle Protein (SRPP) (いずれも機能未知) などの重複数の多い 10 種の遺伝子で、全解析遺伝子の約 30% を占めることがわかった。また、REF の発現レベルは HRT2 に比べ約 80 倍高いことも明らかとなった。以上の研究より申請者は、ラテックス内における高発現が予想される遺伝子群の発現組織特異性を詳細に解析し、それらの遺伝子のプロモーター領域より発現制御に関与するシス配列を同定することで、HRT2 などの天然ゴム生合成関連遺伝子をラテックス特異的に高発現させるシステムを構築できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究課題においては、パラゴムノキのラテックス特異的な遺伝子発現制御機構の解明と、それを用いた発現システム構築を目的とし、大きく分けて以下の 3 項目について明らかにすることを旨とする；

- (1) ラテックス特異的高発現遺伝子の同定
- (2) ラテックス特異的高発現遺伝子のプロモーター領域の単離
- (3) ラテックス特異的発現に関与する転写調節タンパク質の同定

## 3. 研究の方法

### (1) ラテックス特異的高発現遺伝子の同定

パラゴムノキ EST 解析において、特に重複数の多かった 10 種の遺伝子をラテックス内高発現遺伝子の候補とする。これらの実際の発現レベル及び組織別発現特異性を明らかにするため、パラゴムノキの各組織における各遺伝子の発現量を Real-Time PCR 法により解析し、その発現パターンを比較する。

### (2)-① ラテックス特異的高発現遺伝子の 5' 上流配列の単離

計画(1)で絞り込んだ遺伝子群の 5' 上流領域を、パラゴムノキのゲノムを鋳型にした DNA-Walking 法または Inverse-PCR 法により増幅し、その配列を解析する。

### (2)-② ラテックス特異的高発現に関与するシス配列候補の探索

計画(2)-1で同定されたラテックス特異的高発現遺伝子群の 5' 上流配列に共通に見出される配列モチーフを、オンライン予測アルゴリズムで検索する。

### (2)-③ シス配列候補のレポーターアッセイ

計画(2)-②で絞り込まれた配列モチーフ候補に対し、実際の遺伝子発現制御機構に対する関与を明らかにするため、β-グルクロニダーゼ遺伝子 (GUS) を用いたレポーターアッセイを行う。ラテックスが乳管細胞由来する細胞内成分であり、実際にラテックスから RNA が調製可能であることから、ラテックスには基本的な転写のコンポーネントが含まれている。従って、ラテックスを用いた簡便な一過的遺伝子発現系を構築可能である。具体的には、新鮮ラテックスより天然ゴムなどを除いた遠心分離画分に、GUS 遺伝子を連結させた候補遺伝子の 5' 上流領域配列を加え、レポーターの強度からその転写調節活性を測定する。連結させる 5' 上流領域配列は、シス配列候補などを欠損あるいは塩基置換させたシリーズを作製し、転写活性に重要な配列を絞り込む。

### (3) シス配列に結合する転写調節タンパク質の単離

ラテックスの mRNA より酵母 One-hybrid Screening 用のライブラリーを作製し、計画(2)-③で同定されたシス配列に結合し得る転写調節タンパク質を探索する。また、ラテックス EST 解析において単離された転写調節タンパク質候補の発現パターンを計画(1)と同様に解析し、ラテックス特異的な発現パターンを示すものを探索するとともに、計画(2)-2で予測された、配列モチーフと結合が

予想される転写調節タンパク質のファミリーとの関連から、解析候補を絞り込む。この転写調節タンパク質候補と配列モチーフとの相互作用を酵母 One-hybrid System で解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ラテックス特異的高発現遺伝子の同定

ラテックスで組織特異的に高発現している遺伝子を同定するために、EST 数が多い Unigene 配列上位 5 種類に (*Rubber Elongation Factor (REF)*、*Small Rubber Particle Protein (SRPP)*、*Protease Inhibitor Protein (PI)*、*Unknown Protein 1 (UPI)*、*Unknown Protein 2 (UP2)*) について、パラゴムノキのラテックス、葉、茎 (葉柄) における発現レベルを定量 PCR 法により解析した。その結果、いずれの遺伝子も、ラテックスにおける発現レベルが、葉における発現レベルと比べて 100~2000 倍、茎 (葉柄) における発現レベルと比べて 10~80 倍高いことが明らかとなった (図 1)。したがって、これらの遺伝子をラテックス特異的高発現遺伝子とした。また、天然ゴムの基本骨格合成に関与することが推定されている 2 種類のシス型プレニル鎖延長酵素遺伝子 *HRT1*、*HRT2* についても同様に組織別の発現レベルを調べた。その結果、いずれの遺伝子もラテックス特異的に高発現していることが明らかとなった。特に、*HRT1* はラテ

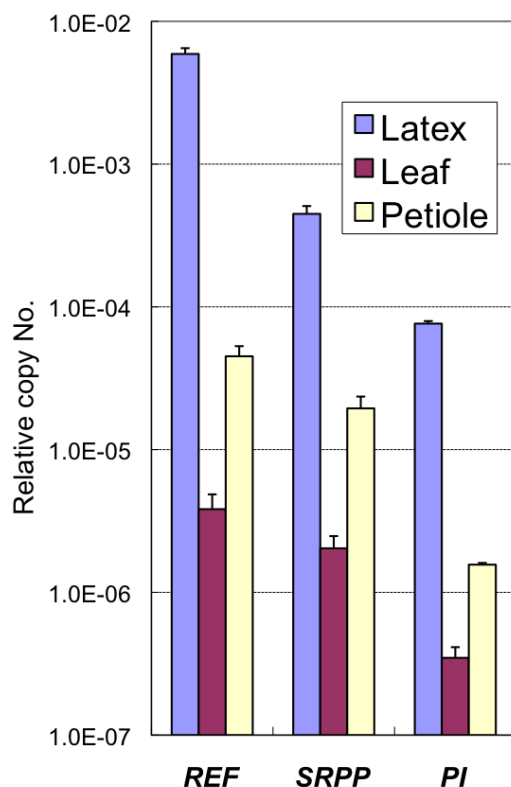


図 1 ラテックス高発現遺伝子の組織別発現レベル

ックス以外の組織での発現が確認されなかった。ラテックス特異的高発現遺伝子と *HRT1*、*HRT2* のラテックスにおける発現レベルを比較した結果、ラテックス特異的高発現遺伝子の方が高発現している (REF については約 80 倍) ことがわかった。したがって、REF に代表されるラテックス特異的高発現遺伝子のプロモーターの制御下で *HRT1* や *HRT2* を過剰発現させることで、ラテックス特異的な天然ゴム生合成反応の増強が期待できる。

##### (2)-① ラテックス特異的高発現遺伝子の 5' 上流配列の単離

ラテックス特異的な遺伝子高発現を実現するプロモーターとして利用するために、REF、SRPP、PI、*HRT1* のプロモーター領域を Inverse-PCR により単離した。REF は 3292 bp、SRPP は 2129 bp、PI は 924 bp、*HRT1* は 1087 bp のプロモーター領域 (翻訳開始点より 5' 側の領域をプロモーター領域と定義) を取得することができた。

##### (2)-② ラテックス特異的高発現に関与するシス配列候補の探索

4 種類のプロモーター領域に共通して存在する配列を探索したところ、エチレンに制御される遺伝子発現、アブシジン酸に制御される遺伝子発現、病原菌感染に応答した遺伝子発現などに関連する既知の *cis*-element と配列類似性が高い複数のモチーフが見出された。さらに、ラテックスにおける発現レベルが特に高い REF・SRPP・PI の 3 種類の遺伝子のプロモーター領域のみに共通して存在するモチーフとして、維管束組織特異的な遺伝子発現、ジャスモン酸に制御される遺伝子発現、オーキシンに制御される遺伝子発現、細胞内スクロース濃度に制御される遺伝子発現などに関連する既知 *cis*-element と配列類似性が高いものが見出された。

##### (2)-③ シス配列候補のレポーターアッセイ

*H. brasiliensis* のラテックスを採取し、遠心分離することで得られた C-serum を回収し、REF、PI のプロモーター領域を GUS に連結したコンストラクトを加えることで *in vitro* 転写・翻訳反応を行った。その後、遠心分離を行うことでゴム画分および沈殿画分を分離した後、可溶性画分を 4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド (4-MUG) を基質とした β-グルクロニダーゼアッセイに供し、生成した 4-MU の蛍光を蛍光分光器により検出した。その結果、いずれのサンプルにおいてもポジティブコントロールとネガティブコントロールで有意な GUS 活性の差を検出することができなかつたため、本手法においては更なる条件検討が必要であることが分かった。

##### (3) シス配列に結合する転写調節タンパク質の単離

計画 (2)-③において有効なアッセイ方法

が確立出来なかったため、EST に含まれる転写因子候補の組織別発現特性を解析した。その結果、EST において重複して単離された転写因子候補のいずれもラテックスにおける発現レベルがほかの組織における発現レベルよりも高いことが明らかとなった。特に、シロイヌナズナの MYB 型転写因子である AtMYB17 と配列類似性が高い遺伝子は高いラテックス特異性を示した。ラテックス特異的遺伝子群のプロモーターのモチーフ解析で見出されたものの中には、MYB 型転写因子が結合して維管束組織特異的な遺伝子発現を制御するシスエレメントと配列類似性の高いモチーフが存在することから、AtMYB17 相同タンパク質がラテックス特異的な遺伝子発現を制御する転写因子として機能している可能性が考えられる。

#### 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 11 件)

- (1) Yoo, D., Hara, T., Fujita, N., Waki, T., Noguchi, A., Takahashi, S. and Nakayama, T. (2013) Transcription analyses of GmICHG, a gene coding for a  $\beta$ -glucosidase that catalyzes the specific hydrolysis of isoflavone conjugates in *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Science* 208: 10-19. (査読有り), DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.006>
- (2) Nair, A., Kuwahara, A., Nagase, A., Yamaguchi, H., Yamazaki, T., Hosoya, M., Omura, A., Kiyomoto, K., Yamaguchi, M.A., Shimoyama, T., Takahashi, S., and Nakayama, T. (2013). Purification, Gene Cloning, and Biochemical Characterization of a beta-Glucosidase Capable of Hydrolyzing Sesaminol Triglucoiside from *Paenibacillus* sp. KB0549. *PLoS One* 8, e60538. (10.1371/journal.pone.0060538) (査読有り), DOI: 10.1371/journal.pone.0060538
- (3) Seiji Takahashi, Hye-Jin Lee, Satoshi Yamashita, Tanetoshi Koyama (2012) Characterization of *cis*-prenyltransferases from the rubber producing plant *Hevea brasiliensis* heterologously expressed in yeast and plant cells. *Plant Biotechnology*, 29: 1-7. (査読有り), DOI: 10.5511/Plantbiotechnology.12.0625a
- (4) Kota Kera, Seiji Takahashi, Tsuyoshi Sutoh, Tanetoshi Koyama and Toru Nakayama (2012) Identification and characterization of a *cis,trans*-mixed heptaprenyl diphosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal*, 279: 3813-3827. (査読有り), DOI: 10.1111/J.1742-4658.2012.08742.X
- (5) 中山 亨、兪 東燦、高橋 征司 (2012) メタボロン・・・植物二次代謝工学におけるインパクト、*生物工学会誌*、90 : 576-581. (査読なし), ISSN: 0919-3758
- (6) 高橋征司、古山種俊、中山亨 (2011) 包括的転写制御による植物イソプレノイドの代謝工学、*生物工学*、89 : 649-652. (査読なし), ISSN : 09193758
- (7) Eiichiro Ono, Yu Homma, Manabu Horikawa, Satoshi Kunikane-Doi, Haruna Imai, Seiji Takahashi, Yosuke Kawai, Masaji Ishiguro, Yuko Fukui and Toru Nakayama (2010) Functional Differentiation of the Glycosyltransferases That Contribute to the Chemical Diversity of Bioactive Flavonol Glycosides in Grapevines (*Vitis vinifera*). *Plant Cell*, 22: 2856-2871. (査読有り), 10.1105/Tpc.110.074625
- (8) Porntip Rojruthai, Jitladda Tangpakdee Sakdapipanich, Seiji Takahashi, Lee Hyegin, Motoyoshi Noike, Tanetoshi Koyama and Yasuyuki Tanaka (2010) *In vitro* synthesis of high molecular weight rubber by *Hevea* small rubber particles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109: 107-114. (査読有り), DOI: 10.1016/J.Jbiosc.2009.08.009
- (9) Hatayama, M., Unno, H., Kusunoki, M., Takahashi, S., Nishino, T., and Nakayama, T. (2010). Production of tetraketide lactones by mutated *Antirrhinum majus* chalcone synthases (AmCHS1). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110, 158-164. (査読有り), DOI: 10.1016/J.Jbiosc.2010.02.010

[学会発表] (計 5 件)

- (1) Seiji Takahashi, Enzymatic Characterization of *cis*-Prenyltransferases from the Natural Rubber Producing Plant *Hevea brasiliensis*, 10th International Congress on Plant Molecular Biology, 2012 年 10 月 21 日～2012 年 10 月 26 日、Jeju, Korea
- (2) 高橋征司、パラゴムノキ由来ラテックスに含まれる天然ゴム生合成酵素の機能解析、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 08 月 03 日～2012 年 08 月 06 日、京都
- (3) 高橋征司、高等植物のオーキシンを介した形態形成に対するシス型プレニルトランスフェラーゼの寄与、第 21 回ドリコールおよびイソプレノイド研究会、2011 年 11 月 03 日～2011 年 11 月 03 日、松江
- (4) 高橋征司、葉緑体内イソプレノイド代謝制御における Phytochrome-interacting factors の寄与、第 29 回 日本植物細胞分子生物

- 学会大会、2011年09月06日~2011年09月08日、福岡
- (5) 高橋征司、代謝経路を包括的に制御する転写因子による植物イソプレノイドの代謝工学、第62回日本生物工学会大会、2010年10月28日、宮崎

〔図書〕(計1件)

- (1) 中山亨、高橋征司 (2011) 酵素タンパク質の一次構造に基づく遺伝子の単離同定 (執筆担当部分 第3章)、植物の分子育種学、講談社サイエンティフィック、pp. 22-32. ISBN: 978-4-06-153735-4

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~seika/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 征司 (Takahashi Seiji)  
東北大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：90343061