

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580013

研究課題名(和文)ヤトロファの耐乾性遺伝子の同定

研究課題名(英文)Analysis of drought tolerance genes from *Jatropha curcas*

研究代表者

多田 雄一 (Tada, Yuichi)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：80409789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：乾燥に強いヤトロファのメタボローム解析を行い、乾燥処理によってプロリンやラフィノース、各種アミノ酸等の適合溶質の含量が有意に増大することを見出した。それらの代謝物のうち、プロリンとラフィノースの生合成系路の鍵遺伝子をクローニングし、シロイヌナズナに導入したが、いずれの組換え系統でも耐乾性の向上は認められなかった。また、シロイヌナズナから組織特異的、ストレス誘導的、あるいは恒常的な発現をするプロモーターをクローニングして、ストレス耐性植物の作出に利用可能な汎用的発現ベクターを構築した。

研究成果の概要(英文)：Metabolomics analysis of drought tolerant plant, *Jatropha curcas*, revealed drought responsive accumulation of osmolytes such as proline, raffinose and amino acids. We cloned key genes for their biosynthesis from *J. curcas*, and introduced them into *Arabidopsis*; however, enhanced drought tolerance in the transformants was not obtained. We also constructed gene expression vectors for production of stress tolerant plants using tissue-specific, stress-inducible, and constitutive promoters from *Arabidopsis*.

研究分野：植物分子育種

キーワード：ヤトロファ 耐乾性 メタボローム解析 組換え体 適合溶質 発現ベクター

## 1. 研究開始当初の背景

近年の世界人口の増加は著しく、2011年には70億人であったのが、2050年には95億人になると予想され、この急激な人口増加に伴い食料需要が大幅に増加すると見込まれている。しかし現状では、多くの優良農耕地が都市化によって消滅し、加えて環境破壊に伴う土壌の荒廃、砂漠化などによって世界の農耕地は減少の一途をたどり続けている。UNEP(国連環境計画)の報告によると、地球上で砂漠化の影響を受けている土地は、陸地のおよそ1/4に相当する約3,600万km<sup>2</sup>で世界人口のおよそ1/6にあたる9億人がその影響を受けていると言われている。

砂漠化の原因は、地球規模で生じている気候変動、長期の干ばつ、降水量の減少などの自然的要因と、家畜の過放牧や木材の過剰伐採、過度の開墾などの人為的要因がある。砂漠化した土地の緑化方法として、砂防・植栽技術、水を有効に活用する水管理技術などがあるが、これらは膨大な労力と多額の費用が必要となる。一方で、遺伝子組換え技術を利用して耐乾燥性植物を創製することが出来れば、砂漠の緑化だけでなく、不良耕地での食糧生産が可能となり、食糧不足の解決にも貢献すると期待されている。

これまでの研究から、適合溶質の蓄積により、耐乾性を強化できることが報告されている。適合溶質とは、親水性に富んだ低分子化合物であり、高濃度に蓄積しても細胞内の代謝を乱さない化合物である。一般に、植物は乾燥ストレスにさらされると植物体内に、糖(ラフィノース属オリゴ糖、スクロース、トレハロース、ソルビトールなど)、糖アルコール(マンニトールなど)、アミノ酸(プロリンなど)、アミン(グリシンベタイン、ポリアミンなど)が適合溶質として蓄積する。適合溶質は細胞の膨圧を維持し、細胞内タンパク質を安定化させる役割がある。

ヤトロファ(*Jatropha curcas*)はトウダイグサ科の中南米原産の落葉低木で熱帯や亜熱帯に広く分布しており、耐乾性が強いことが報告がされている。しかし、乾燥耐性のメカニズムは不明であった。代表者らはヤトロファの切り口から粘性を有する多量の樹液が溢出することから、適合溶質が多量に蓄積している可能性を見出した。そこで、本研究ではメタボローム解析を行い、ヤトロファが生合成する適合溶質をはじめとする耐乾性に寄与する代謝物の同定を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究では、乾燥に強いヤトロファ(*Jatropha curcas*)の耐乾燥性機構を解明するために、特に適合溶質の生合成と蓄積に関する生理学的・分子生物学的解析を行うことを目的とした。さらに、それらの代謝物の生合成に関与する遺伝子の導入が耐乾性に与える影響を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1)植物サンプル

ヤトロファ(インドネシア産 系統名不明)の種子をパーミキュライトに入ったポットに播種し、恒温恒湿室(室温約27℃、湿度約70%、明暗周期12時間)で育成した。育成したヤトロファをポットから引き抜き、根についているパーミキュライトを取り払うことで乾燥処理を行った。乾燥処理を行ってから0、1、3、7日目に茎と根をそれぞれサンプリングし、凍結乾燥後にメタボローム解析を行った。また、サンプリングした茎と根を乾燥機で2日間乾燥させた後、DWを測定した。含水率は以下の計算式を用いて求めた。

$$\text{含水率(\%)} = (\text{FW} - \text{DW}) / \text{FW} \times 100$$

### (2)メタボローム解析

理化学研究所で開発されたワイドターゲットメタボローム分析法を用いて、乾燥処理後0、1、7日後のヤトロファの根と茎の代謝物を解析した。

### (3)プロリン含量の測定

ヤトロファの植物体を茎と根にそれぞれ分け、3%スルホサリチル酸10mlを加えて摩砕した。遠心分離、ろ過した上清みに酢酸とニンヒドリン試薬を加え、100℃で1時間混合物を反応させた。トルエンを4ml加え、トルエン層と水層を分離させ、水層の520nmの波長における吸光度からプロリン含量を測定した。

### (4)RT-PCR

乾燥処理によって増加がみられた代謝物の生合成系路の鍵遺伝子と相同性のある遺伝子配列をはずさDNA研究所のヤトロファゲノムデータベースから抽出し、RT-PCRにより発現解析を行った。

### (5)遺伝子のクローニングと形質転換

プロリン合成の律速酵素P5CS、乾燥処理で発現が誘導されるGol、RSの塩基配列をもとに合成した特異的プライマーを用いて、PCR法でcDNAを増幅し、pENTRベクターにクローニングした。それらのcDNAをCaMV35Sプロモーターに制御された発現ベクター(pGH1)に組換えた。シロイヌナズナの形質転換は花序浸し法を用いて行った。

また、導入遺伝子によっては組織特異的、あるいは誘導的な発現が必要なこと、CaMV35Sプロモーターの多用がgene silencingを引き起こすことが判明したため、ストレス耐性植物の作出に適していると考えられるプロモーターをシロイヌナズナからPCRにより増幅して発現ベクターを構築した。

### (6)浸透圧/乾燥耐性試験

組換えシロイヌナズナと野生型(WT)の芽生えを1/2MS培地に400mM Mannitol または、

Polyethylen Glycol 8000(PEG 8000)を添加した高浸透圧培地に移植し、2週間後に生体重を測定した。

また、播種後2週間の芽生えを、パーミキュライトを入れたポットに植替えた。その後、1/2MS培地を与えながらさらに10日間生育させた。その後、水やりを停止し乾燥処理を行った。数日間乾燥処理を行った後、再灌水を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)メタボローム解析

理化学研究所との共同研究によって乾燥処理したヤトロファのメタボローム解析を行った。調べた代謝物 242 種類のうち 44 種類で乾燥ストレス処理により含有量の有意な上昇が確認された。乾燥処理した根と茎の両方で1、7日後に有意に含量が変化した代謝物は9種、茎のみで変化した代謝物は22種、根のみで変化した代謝物は13種であった。根と茎に共通して変化した代謝物としては、stachyose、raffinose、melezitoseなどのオリゴ糖類の含量が乾燥処理にตอบสนองして増大した。ラフィノース属オリゴ糖の含量は茎で0日目と比較すると、1日目が8.2倍、7日目が9.5倍、根では1日目が8.5倍、7日目が2.2倍となった。他にもphosphocholine、adenineの含量が両者に共通して有意に変化していた。また、茎特異的にadenosine、Methylmalonic acid、-amino-n-butyric acid、phenylalanine、tyrosineなどの含量の増大が認められた。また、根では特にprolineの含量が乾燥処理1日後、7日後にそれぞれ処理前の47倍、124倍に増大した。他にもThreonine、valine、methionine、glutamine、adenine、dihydroxycoumarin、alloisoleucineなどのアミノ酸含量が根で増大した。これらの結果は、ヤトロファの耐乾性機構の一部は、種子の耐乾性に関与しているオリゴ糖類や多くの植物の耐乾性に関与しているproline等のアミノ酸の蓄積によることを示唆している。

プロリンは、塩や乾燥ストレス条件下の植物において最も蓄積する適合溶質の一つである。プロリンは、活性酸素種(ROS)消去剤(スカベンジャー)として機能することが報告されている。また、分子シャペロンとして機能してタンパク質の構造を安定化させたり、細胞基質のpHを緩衝したり、細胞酸化還元条件のバランスを保つためにも機能している。

ラフィノース属オリゴ糖(ラフィノース、スタキオース)は糖アルコールのガラクトシールを基質として合成されるオリゴ糖であり、種子の発達中に蓄積し、種子の耐乾燥性において重要な役割を果たしている。ラフィノース属オリゴ糖は、水分子に代わってリン脂質膜のリン酸と結合することで、膜を脱水から保護すると考えられている。また細胞膜の適合溶質や安定剤としてだけでなく、ROS

除去剤としても作用していることを示す研究もある。ラフィノース合成酵素遺伝子を過剰発現するシロイヌナズナでは耐乾性の向上が報告されている。

##### (2)プロリン含量の定量

メタボローム解析では代謝物の相対的な変化しかわからないため、乾燥ストレス下でのヤトロファのプロリン含量を定量した結果を図1に示した。乾燥処理した茎のプロリン含量は7日目が0日目と比較して有意に高い値を示し、根でのプロリン含量は乾燥処理3日目が0日目と比較して有意に高い値を示した。この結果からプロリンの含有量は根の方が多いことが確認できた。定量値から計算したストレス処理前のヤトロファに対するストレス後の相対的なプロリン含量の変化量は、茎では1日目に約5.3倍、3日目に約6.3倍、7日目に約18.2倍となり、根では0日目と比較して1日目に約14.0倍、3日目に約31.6倍、7日目に約42.1倍に増加した。メタボローム解析の結果と比較すると茎での増加率は高くなったが、根ではメタボローム解析の結果と比較すると低い増加率を示した。絶対的な含量は茎、根とも数 $\mu\text{mol/g}$ 程度であり、他植物と比較して高い含量ではなかった。このことから、ヤトロファの耐乾性におけるプロリンの寄与度は高くないと考えられた。

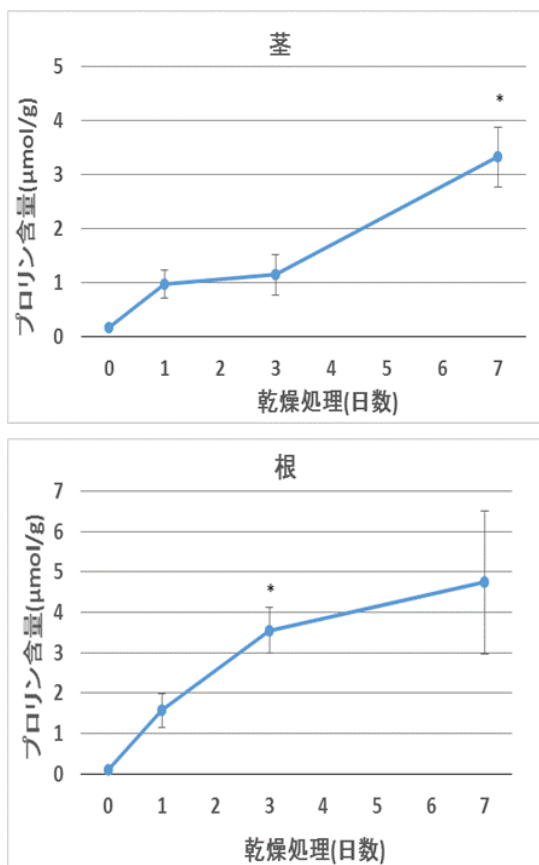


図1 乾燥処理したヤトロファ中のプロリン含量の変化

### (3) RT-PCR

乾燥処理によって増加がみられた代謝物の生合成経路の鍵遺伝子の発現を、RT-PCRにより解析した。具体的には、プロリンの生合成経路において律速段階を担っている P5CS(1-pyrroline-5-carboxylate synthase)と P5CR(pyrroline-5-carboxylate reductase)、分解に関与する PDH、ラフィノース属オリゴ糖の生合成経路において律速段階を担っている Gol(Galactinol synthase)、ガラクトキノールとスクロースよりラフィノースが生合成される反応を触媒する 8 種の RS(raffinose synthase)の乾燥応答性を乾燥処理したヤトロファの茎、葉、根から抽出した RNA を用いて調べた(図 2)。

プロリン合成に関与する P5CS, P5CR, 2 種の PDH では乾燥応答性が認められなかった。一方で、ラフィノース合成に関与する Gol では 1 種(Gol3)の発現が乾燥処理によって大幅に増大していることが示され、他のクローンでも乾燥応答性が認められた。RS では RS2, RS3/6, RS9 で乾燥応答性が認められた。乾燥応答性が認められた遺伝子は発現ベクターを構築するための実験に用いた。

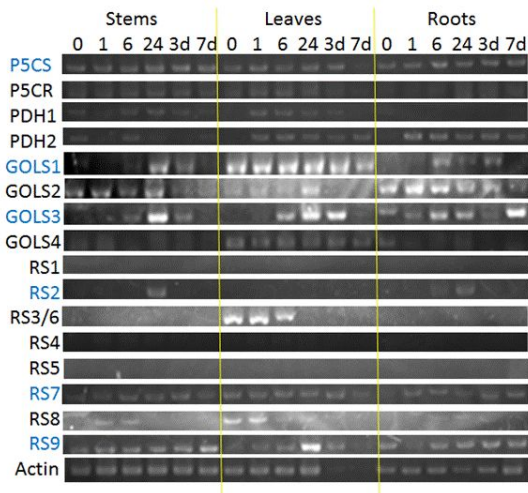


図 2 各種遺伝子の RT-PCR による発現解析

### (3) 乾燥処理したヤトロファの茎と根の含水率の変化

ヤトロファの水分保持能力を調べるために、乾燥処理したヤトロファの茎と根の含水率の変化を調べた(図 3)。乾燥処理後の茎の含水率の低下は、非常に緩やかであり、7 日目でも 80%を保持していた。通常の植物では 1-2 日で 10%程度まで低下することから、ヤトロファは乾燥を防ぐための何らかの特別な機構を有していると考えられた。一方、根においても、茎ほどではないが、含水率の低下が抑えられていたことから、やはり耐乾性機構を有していると考えられた。

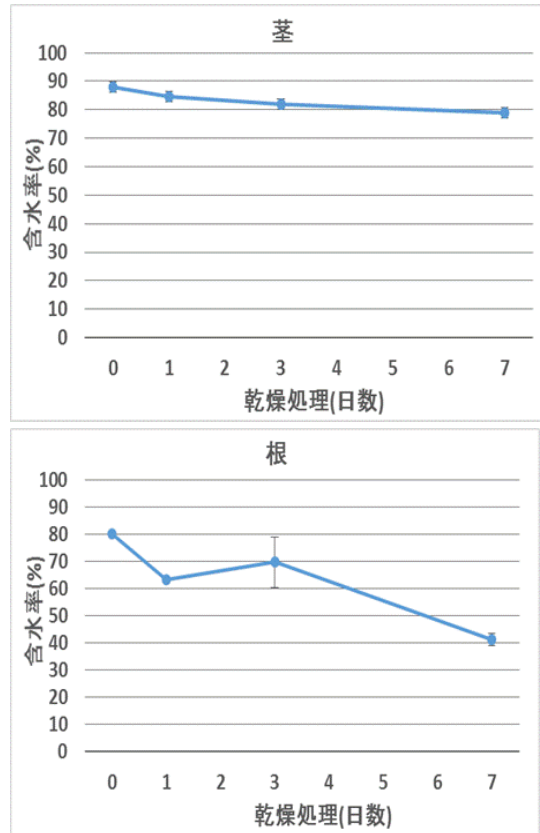


図 3 乾燥処理したヤトロファの含水率

### (4) 適合溶質の生合成遺伝子の導入と浸透圧耐性

ヤトロファの適合溶質合成酵素遺伝子をクローニングしてシロイヌナズナに導入し、耐乾性に果たす役割を検証した。

プロリンは、塩や乾燥ストレス条件下の植物において最も蓄積する適合溶質の一つであり、多くの植物において共通の生理応答である。プロリンは細胞内に高濃度に蓄積されても他のアミノ酸の生合成や、酵素活性を阻害しない唯一のアミノ酸である。プロリンの蓄積のレベルは植物種によって変化し、通常生育条件よりも 100 倍の蓄積量になることもある。

ヤトロファからプロリン合成の律速酵素である P5CS 遺伝子をクローニングし、35S プロモーターに連結してシロイヌナズナに導入した。

組換え体の耐乾性を調べるために、乾燥と同様のストレスである浸透圧ストレスを与えた。すなわち、400 mM マンニトールを含む培地に組換え体と野生型(WT)の芽生えを移植して 2 週間後に生体重を測定した。

P5CS を導入した 16 系統の検定を行ったが、WT と比較して有意に高い生長量を示した系統は確認することが出来なかった。代表的な 3 系統の浸透圧耐性試験の結果の写真を図 4 に示す。生体重についても WT と組換え系統で有意差は認められなかった。



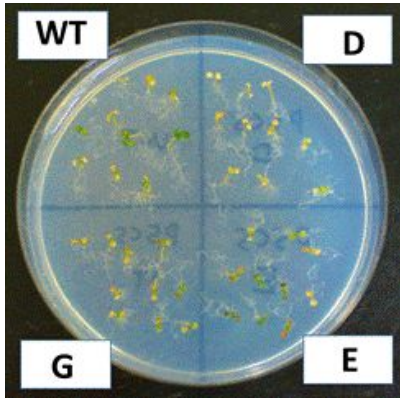


図4 P5CS 導入系統の浸透圧耐性検定  
WT:野生型、D,E,G:組換え系統

同様に、RS2 導入系統では 25 系統、RS9 導入系統では 22 系統、Gol3 導入系統では 27 系統を用いて浸透圧耐性検定を行ったが、WT と比較して有意に高い生長量を示した系統は確認することが出来なかった。他の遺伝子については、Gol4 が発現ベクターの構築、Gol1 と Gol2 がクローニングまで終了したが、組換え体の作成と評価までは研究期間中に至らなかった。

#### (5)耐乾性検定

組換え系統の耐乾性を調べるために、各遺伝子の導入系統から 3 系統を選んで土壌栽培し、成熟期（発芽後 3 週間）に水やりを停止して耐乾燥性検定を行った。具体的には、水やりを停止し、葉が萎れ始めた 5 - 8 日後に再灌水処理を行ない、さらに 1 週間程度のちに生存率を測定した。

図 5 に示すように、P5CS 導入系統はいずれも WT と同様に枯死してしまい、耐乾性の向上は認められなかった。

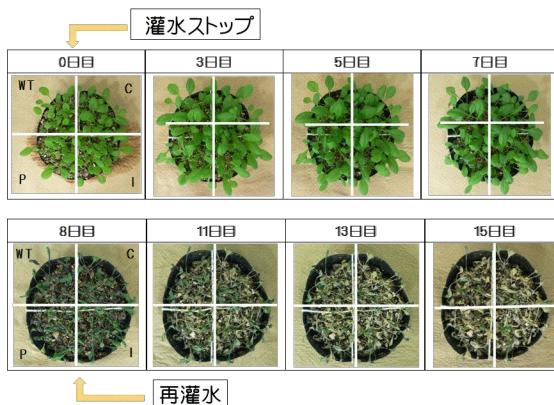


図5 P5CS 導入系統の耐乾性検定

同様に、RS2 導入系統、RS9 導入系統、Gol3 導入系統でも耐乾性検定を行ったが、WT と比較して生存率が高い系統は確認することが出来なかった。

#### (6)導入遺伝子の発現量解析

これらの組換え体で導入遺伝子が発現していることを確認するために、P5CS 導入系統、RS9 導入系統、Gol3 導入系統のそれぞれから 3 系統を選び、播種後 10 日目の芽生えを用いて定量 RT-PCR による発現量解析を行った。その結果、WT ではヤトロファの P5CS、RS9、Gol56 導入遺伝子の発現は確認されず、全ての遺伝子導入系統で導入遺伝子の発現が確認できた（結果省略）。いずれの組換え系統でも、系統によって導入遺伝子の発現量には数倍の差があったが、発現量の高い系統も浸透圧/乾燥耐性に差は見られなかった。

#### (7)ストレス耐性遺伝子の発現に利用可能な発現ベクターの構築

各種ストレス耐性遺伝子の導入では、恒常的発現によって生育阻害が生じることが報告されている。また、本研究の過程で CaMV35S プロモーターの多用が gene silencing を引き起こすことが観察された。そこで、組織特異的、誘導的、あるいは恒常的な発現をするプロモーターをシロイヌナズナから PCR により増幅して、ストレス耐性植物の作出に適していると考えられる発現ベクターの構築を行った。表 1 に構築した発現ベクターと使用しているプロモーターのリストを示した。これらの一部は、Gol 遺伝子の発現ベクターとして使用した。

表1 構築した発現ベクターと発現特性

発現ベクター	LOCUS	期待された発現特性
<i>pACT2/GUS</i>	At3g18780	恒常的・非特異的
<i>pACT8/GUS</i>	At1g49240	恒常的・非特異的
<i>pADH/GUS</i>	At1g77120	誘導的・根特異的
<i>pEXT3/GUS</i>	At1g21310	根特異的
<i>pCAB1/GUS</i>	At2g34430	葉特異的
<i>pRD29A/GUS</i>	At5g52310	塩誘導的

以上のように、ヤトロファのメタボローム解析を行い、乾燥処理により含量が有意に増大する代謝物としてプロリンやラフィノース、各種アミノ酸等の適合溶質を同定した。本研究はヤトロファの代謝物を網羅的に同定した初めての報告である。ただし、プロリンの絶対的含有量は他の植物に比較して多いとは言えない範囲であった。それらの代謝物のうち、プロリンとラフィノースの生合成経路の 5 種（P5CS、Gol3、Gol4、RS2、RS9）の鍵遺伝子の発現ベクターを構築した。そのうちの 4 種をシロイヌナズナに導入したが、いずれの組換え系統でも耐乾性の向上は認められなかった。これらの遺伝子は多重遺伝子族を構成しており、今回導入していない他のメンバーが上記の代謝物の生合成に参与してヤトロファの耐乾性を高めている可能性と今回調べていない他の代謝物の産生が主

要な耐性機構として機能している可能性が考えられる。他の遺伝子メンバーのいくつかについては発現ベクターを構築途中であるが、途中で研究期間が終了した。研究自体は今後も継続する予定である。

また、シロイヌナズナから組織特異的 (Cab, EKT)、誘導的 (ADH, RD29A)、あるいは恒常的 (ACT2, ACT8) な発現をするプロモーターをクローニングして、ストレス耐性植物の作出に利用可能な6種の発現ベクターを構築した。これらについては、今後活用していく予定である。

## 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)

[学会発表](計 5件)

加藤泰裕、来須孝光、多田雄一 (2014) 耐塩性遺伝子の発現に適したプロモーターの評価 第37回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜)神奈川県横浜市西区 2014.11.25-27

加藤泰裕、来須孝光、多田雄一 (2014) ストレス耐性植物の創製に利用可能なプロモーターの発現解析 第32回日本植物細胞分子生物学会大会 岩手県盛岡市 2014.08.21

根本 瞳、来須孝光、多田雄一 (2013) ヤトロファの耐乾燥性機構の解析 第36回日本分子生物学会年会(神戸ポートピア)兵庫県神戸市中央区 2013.12.05

多田雄一、澤田有司 平井優美 (2012) ヤトロファのメタボローム解析による耐乾性機構の解明 第35回日本分子生物学会年会(福岡国際会議場)福岡県福岡市博多区 2012.12.14

Tada Y (2012) Genetic Engineering for salt and drought tolerance in plants. 1st Japanese-Saudi University's Workshop on Biotechnology (Tokyo Univ. of Technol.) 東京都八王子市 2012.07.12

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

多田 雄一 (TADA, Yuichi)  
東京工科大学・応用生物学部・教授  
研究者番号: 80409789