

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658282

研究課題名(和文) 遺伝子改変による産業用オイル・スクアレンを蓄積するユーフォルビア及びトマトの作出

研究課題名(英文) Production of Euphorbia and tomato plants, which accumulate squalene

研究代表者

三浦 謙治 (Miura, Kenji)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00507949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：植物体内の乳液とよばれる部分にステロール類を多く蓄積するEuphorbia tirucalliの組織培養系を整備した。カルスの誘導、不定芽の誘導に成功した。また、スクアレン合成系をトマトへ移植を行ったが、発現量の高いトマトが得られなかった。

乳液組織に発現するタンパク質を二次元電気泳動により展開したところ、約70種類のスポットが得られた。このうち10ヶについてLC-MS/MSによる同定を行ったところ、分泌型タンパク質といったタンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：The methods for plant tissue culture of Euphorbia tirucalli was established. The callus and adventitious buds were induced. Squalene synthesis pathway in Euphorbia tirucalli was transferred into tomatoes, but tomatoes with high expression of squalene synthase were not obtained.

Total proteins in latex tissue of Euphorbia tirucalli were obtained and 2-D electrophoresis was performed. About 70 spots were obtained. Among them, 5 were identified by LC-MS/MS. Epidermis-specific secreted protein was included.

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：遺伝子 バイオテクノロジー 植物

1. 研究開始当初の背景

Euphorbia tirucalli は乳管とよばれる組織から分泌される乳液にステロール類を約50%蓄積する植物である。しかも、このステロール類は茎を切断することで容易に採取可能であることから、資源植物の1つとして考えられている。そのため、これまでも *E. tirucalli* を用いて可燃性化合物生産を目指した研究が行われてきた。しかし、遺伝子の同定等もほとんど行われておらず、遺伝子工学的改変技術も確立されていなかった。また、ステロール類という様々な種類の混合物であることから、精製困難で工業的に使用しにくい点から実用化には至っていない。このことから、ある種類のステロールを多く蓄積する植物を作出することは、精製の面からも有用と考えられてきた。

2. 研究の目的

本研究では、ステロール類合成系の出発物質であるスクアレンを蓄積させる植物を作出することを目的とした。これには、*E. tirucalli* のほか、トマトへのスクアレン合成系の移植も行った。また、*E. tirucalli* における乳液の機能を明らかにすることを目的として、乳液内に存在するタンパク質を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *E. tirucalli* におけるスクアレン合成系に関わる遺伝子の特定及び形質転換法の確立。ステロール類の出発材料であるスクアレンはスクアレン合成酵素(SS)によって合成され、スクアレンエポキシダーゼ(SE)によりスクアレンからステロール類が生合成され始める。そこで、スクアレン過剰発現にはSSの過剰発現とともにSEの活性抑制を行う必要がある。SS過剰発現及びSEのRNAiを行うベクターを作出し、形質転換を行う必要がある。上記ベクターを構築し、形質転換系の確立を目指した。

(2) *E. tirucalli* の乳液に存在するタンパク質の特定。乳液内には液体中の約50%がステロール類と考えられている。このことから、

乳液内に存在するタンパク質がステロール生成等に係っている可能性が考えられる。そこで、この乳液内に存在するタンパク質を二次元電気泳動し、得られたスポットをLC-MS/MSにかけることで、乳液内に存在するタンパク質の同定を行った。

(3) スクアレンを蓄積するトマトの作出

E. tirucalli では形質転換系が確立していないことから、*E. tirucalli* に存在するスクアレン合成系を他の植物に移植することで、スクアレンを大量に蓄積する植物をつくることを行った。具体的にはカロテノイド類を多く蓄積するトマトを用いた。カロテノイド類の出発材料であるファルネシルピリン酸はスクアレンの前駆物質でもある。そこでトマトに *E. tirucalli* 由来の EtSS を過剰発現させ、トマト内在性の SISE を RNAi するベクターを作出し、これをトマトに導入する。こうしてスクアレンをより蓄積するトマトの作出を行う。

4. 研究成果

(1) *E. tirucalli* におけるスクアレン合成系に関わる遺伝子の特定及び形質転換系の確立を目標に研究を行った。EtSS および EtSE の遺伝子を単離し、EtSS の過剰発現及び EtSE の RNAi を行うためのベクターを作出した。*E. tirucalli* への形質転換系であるが、カルスへの感染及び再分化による植物体の再生、または不定芽の誘導とその不定芽への感染を行った。まずカルスの構築であるが、2mg/L



図1. カルス化した *E. tirucalli*。

NAA, 1mg/L 2,4-D, 0.22mg/L BAP(benzyl amino purine)によってカルスを誘導することに成功した(図1)。カルスへの感染の前に再分化が上手くいかないと植物個体へ再

生できないので、再分化を試みた。再分化に関してはTDZ(thidiazuron)やBAPといったサイトカニンやオーキシン量を変化させて検討したが、再分化には至らなかった。



図2 . *E.tirucalli* における不定芽の誘導。
1cmの茎の部分から約0.5cmの不定芽が見られた。

そこで不定芽の誘導を行った。TDZ, BAP, NAA量を変化させて *E. tirucalli* からの不定芽の誘導を行った。0.5mg/L TDZ, 0.5mg/L BAPを用いた場合、不定芽が見られた(図2)。この不定芽から植物体を再生させるため、TDZ, BAP量を変化させたが、このまま枯死してしまい、再分化には至らなかった。*E. tirucalli* では形質転換系の確立の前に再分化系の確立が重要であることが示された。由来が異なる植物種も含めて再分化系のしやすさを検討する必要がある。

(2)*E. tirucalli* 乳液中に存在するタンパク質の抽出を行い、二次元電気泳動によりタンパク質を展開した。乳液内に存在するタンパク質は種類が少なく、はっきりとスポットが見られたものは70種類であった。このスポットの強度を比較し、濃いスポット(発現量が多い)から10ヶをLC-MS/MSにより、タンパク質の同定を行った。その結果、5ヶのタンパク質の同定に成功し、epidermis-specific secreted glycoprotein, pentatricopeptide, hypothetical protein, peroxidase, ricin-agglutininといったタンパク質が乳液内に存在することが明らかになった。これらのタンパク質はステロール類生成というよりも病原菌からの防御応答などに関わっていることが考えられる。これらのタンパク質の実際の機能に関してはシロイヌナズナ等、他の植物への形質転換等を行うことで検証する必要がある。

(3)スクアレンを蓄積するトマトの作出のため、*EtSS*を過剰発現させ、*SISE*をRNAiによって抑制するためのベクターを作製した。このベクターをトマトの形質転換を行い、16個体の形質転換植物が得られた。ただし、このうち半分のみしか種をつけなかったことから、導入した遺伝子が何らかの影響を及ぼしている可能性も考えられる。得られた8個体を野生型と比較したところ、植物体の大きさや葉の大きさ、果実の大きさ等、ほとんど変化がなかった。これらの8個体からRNAを調製し、RT-PCRを行ったところ、*EtSS*の発現量はわずかであった。発現量の少ないことから、野生型と形質転換植物に大きさ等の差が見られなかったものと考えられる。現在、新たに形質転換を行って、発現量の高い個体を選抜する予定である。

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)

[雑誌論文](計2件)

Miura K, Tada Y (2014) Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers Plant Sci.* 5(4), 1-12、査読無

Doi: 10.3389/fpls.2014.00004

Miura K (2013) Nitrogen and phosphorus nutrition under salinity stress. In "Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress", 425-441 査読無

Doi:10.1007/978-1-4614-47474_16

[学会発表](計2件)

三浦謙治 「基礎から応用へのつなぎとして ~筑波大学遺伝子実験センター共同研究拠点における研究状況」生物系3共同研究拠点合同シンポジウム、2014/2/21、岡山大学資源植物研究所

三浦謙治 「植物における一過的タンパク質発現系とその利用」第31回日本植物

細胞分子生物学会(札幌)大会、2013/9/12、
北海道大学

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gene.tsukuba.ac.jp/~kmiura/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三浦 謙治 (MIURA KENJI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00507949

(2)研究分担者

野中 聡子 (NONAKA SATOKO)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：50580825