

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660122

研究課題名(和文) タンパク質直接導入によるタケ類の開花技術の開発

研究課題名(英文) Development of bamboo flowering technology by direct protein transfer

## 研究代表者

坂本 正弘 (Sakamoto, Masahiro)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40303870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：開花したチュウゴクザサからクローニングした開花遺伝子であるSvFT1遺伝子をタンパク質発現用ベクターに組み込み、大腸菌内で大量に生産し、精製したのちタケ類に直接このタンパク質を導入して開花させることを目的として実験をおこなった。大腸菌の培養、タンパク質の回収はおおむね順調に進んだ。クマザサを用いて精製したタンパク質を稈に直接注射針を挿入し、導入を試みたが、挿入部分で壊死をおこし、開花までには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：This study's object is the bamboo flowering by direct protein transfer. Introduced protein is FT, of which gene was already cloned from flowering dwarf bamboo (sasa) by me. cDNA of SvFT1 gene was introduced into the expression vector pGEX-6P-1, and its protein was produced in vitro. After production and purification of FT protein, this purified protein was introduced to dwarf bamboo through needle stabbed to the culm of dwarf bamboo. However, the culm area inserted needle resulted to necrosis, it did not lead to the flowering.

研究分野：樹木分子生物学

キーワード：開花遺伝子 タケ類 タンパク質生産

## 1. 研究開始当初の背景

(1) タケ・ササ類は開花周期が非常に長いことで知られている。多くの種で数十年にわたり、種によっては100年以上にもなると考えられるものもある。また、一斉開花した後に地下茎でつながるジェネットは枯死するため、タケノコ栽培の農家にとっては死活問題となることもある。タケ類と言っても種によってその性質は異なり、それぞれ特徴を有している。例えば、剣道の竹刀や茶道具の茶筌にはモウソウチクは適さない。材として有効な品種を作り出そうとしても、このようなタケ類の開花特性から、交配による品種改良は事実上不可能であり、このことがタケ類の資源としての有効利用の可能性を狭めている。しかしながら、タケノコの伸長成長の速度は著しく、資源量としても相当量蓄積があり、バイオマス生産に適した植物であると考えられており、近年では繊維原料やバイオ燃料としての利用開発も進んでいる。今後、さまざまな利用分野において最適な品種が求められることが予想されるが、残念ながらタケ類では目的に合致した品種を生み出すための方策が存在しない。また近年、植物の品種改良の現場で有効に利用される細胞培養の技術もタケ類においては確立されていない。もちろん、遺伝子導入技術も未だ確立されておらず、これらの植物工学的的手法による改良も望めない。

(2) 近年、分子生物学的研究から植物の花を形成する花成ホルモンの正体がFT遺伝子の産物 (FTタンパク質) であることが明らかとなった。シロイヌナズナやイネの研究例から、FT遺伝子は葉において日長に感応した遺伝子 (COなど) によって発現誘導され、転写・翻訳されたFTタンパク質は師管を転流し茎頂分裂組織に到達して、14-3-3タンパク質を介してFDタンパク質と複合体を形成し、花芽形成のスイッチとなることが明らかとなった。

研究代表者である坂本は2007年に京都市北部で一斉開花したチュウゴクザサからFT遺伝子のホモログ (*SvFT1*) をクローニングし、これをイネに導入し過剰発現させたところ、イネにきわめて極端な早期開花を示し、時には培養細胞から再分化させる段階で花芽の形成が起こることを確認した。このことから、タケ類においてもFT遺伝子の機能は有効であり、開花の際にはFT遺伝子が働いていることを見出した。

(3) 従来、放置された竹林を枯らす目的で薬剤をタケの切り株に染み込ませる方法がとられている。この方法にならって、分子量が小さいタンパク質であれば切り株から浸透させることが可能となるのではないかと思いついた。実際、FTタンパク質は分子量が約21kDaと比較的小さく、この方法が有効であることが期待された。タケ類においてもFT遺伝子の機能が確認されたことから、FTタンパク質を直接導入することによって切り口

から通導組織内に浸透させ、転流されることによって開花を誘導することが可能となるのではないかと考えた。このように、タンパク質を直接導入する技術によって開花誘導が可能となるならば、細胞培養技術が確立されていなくても、また組換え体の作成ができなくても開花誘導することが可能となることが期待される。タケ類にタンパク質を直接導入しており、遺伝子組換えの技術を用いている訳ではないので、組換え体には相当しない。このことは、野外で生育する大型のタケ類においては有効な技術となる。したがって、タンパク質の直接導入によって形質を変換する技術として野外で生育する植物には最適の技術となると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、タケ・ササ類にタンパク質を直接導入し、自在に花を咲かせる技術を確立することにある。タケ・ササ類の開花周期は非常に長く、数十年から100年以上に及ぶと言われ、このためタケ・ササ類においては従来の交配による育種による品種改良は事実上不可能である。本研究は、近年明らかとなった開花遺伝子のタンパク質をタケ・ササ類に直接導入して自在に開花させる技術を構築し、優良品種開発のための基盤技術を構築することを目的としている。

(2) また、現在、タケ・ササ類の細胞培養系 (細胞培養から再分化植物までの一連の培養技術) は確立されておらず、したがって従来のアグロバクテリウムによる遺伝子導入系もタケ・ササ類には適用できない。タンパク質を直接導入し、その形質を一過性であれ、変換することが可能となれば、遺伝子を導入して組換え体を作る代わりに擬似組換え体として利用できる。また、タケ・ササ類のように野外で比較的大型に生育する植物にとって、将来的に本技術の確立が遺伝子組換え技術の代替となることが期待できる。開花制御技術の開発とあわせてタンパク質直接導入による形質転換技術としての確立を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) モデルタンパク質としてのGFPタンパク質の生産: FTタンパク質の実験に先立ってモデルタンパク質としてGFPタンパク質を選定した。GFPは蛍光を発するタンパク質であり、視覚的にも導入されたことが確認しやすいこと、またその分子量も約27kDaと比較的小さいこと等の理由によりGFPをモデルタンパク質として選定した。GFPタンパク質の遺伝子配列を基に、大腸菌内でタンパク質を作らせるための発現ベクターであるpGEX-4T-1に導入するため、制限酵素サイトである*SaII*と*EcoRI*を導入したPCR用のプライマーを作成した。GFP遺伝子を鋳型とし、作成した2種類のプライマーによりPCR反応をおこない、

制限酵素サイトを付加したGFP遺伝子断片を得た。このGFP遺伝子断片をpGEX-4T-1の制限酵素サイトに合わせて導入し、発現ベクターを構築した。

(2) チュウゴクザサFTタンパク質の生産：チュウゴクザサのFT遺伝子ホモログであるSvFT1遺伝子のcDNAを基にGFP遺伝子と同様の手法によって制限酵素サイトSalIとEcoRIを導入したPCR用プライマーを作成した。SvFT1遺伝子のcDNAを鋳型とし、この2種のプライマーを用いてPCRをおこない、制限酵素サイトを付加したSvFT1遺伝子のcDNAを得た。増幅したSvFT1遺伝子の断片を大腸菌用の発現ベクターであるpGEX-4T-1の制限酵素SalI-EcoRIサイトに導入した。また、後の実験から異なる発現ベクターであるpGEX-6P-1を用いて発現ベクターを構築したが、手法としてはpGEX-4Tと同様におこなった。

(3) 大腸菌におけるタンパク質生産と精製：コンストラクトが完成した発現ベクターを大腸菌に導入し、培養をおこなった。タンパク質生産のために前培養した大腸菌を800mL(あるいは1L)のLB培地に植菌し、18°Cで終夜培養をおこなった。培養終了後、培養液を遠心して菌体を回収したのち、リゾチームを含む酵素溶液に懸濁し、溶菌したのち、菌体内で生産されたタンパク質の回収をおこなった。菌体を溶菌したのちに、酵素処理液を遠心し、上澄みを回収した。

回収した液をグルタチオンセファロースカラムに通し、カラムを洗浄して余分なタンパク質やきょう雑物を除去した。発現ベクターから転写・翻訳されて作られたタンパク質にはタグが付いているので、カラムに回収したタンパク質が吸着している状態でタグの切断をおこなった。すなわち、pGEX-4T-1の場合にはトロンビンプロテアーゼで、またpGEX-6P-1の場合にはPreScission配列を認識する酵素(今回はTurbo3C Proteaseを使用)によってカラム内に吸着しているタンパク質を切断し、タグを除去した。最終的に還元型グルタチオンを含む溶出バッファーでタンパク質を溶出・回収し、菌体内で生産された目的タンパク質の回収をおこなった。

(4) ササへのタンパク質導入実験：大型のタケで実験をおこなう前に、実験室内で実験可能な小型のササ(クマザサ)を用いてタンパク質直接導入実験をおこなった。大腸菌によって*in vitro*で生産し、タグを除去して精製したタンパク質約70 $\mu$ gをPBS溶液200 $\mu$ Lに溶解し、最終濃度を約17 $\mu$ Mとした。クマザサの稈にメスで切れ込みを入れ、細い注射針を刺して固定した。この針を通して溶解したタンパク質溶液を導入した。

#### 4. 研究成果

(1) モデルタンパク質であるGFPタンパク

質の生産：GFPタンパク質の生産のために大腸菌発現用ベクターであるpGEX-4T-1のクローニングサイトにGFPを組み込んだ。ベクターのクローニングサイトにあわせて制限酵素サイトであるSalIとEcoRIを導入したPCR用プライマーを合成し、GFP遺伝子を鋳型として2種類のプライマーを用いてPCRをおこないGFP遺伝子を増幅した。このGFP遺伝子をpGEX-4T-1のクローニングサイトに組み込み、大腸菌へ導入した。導入を確認した後、発現ベクターを導入した大腸菌のクローンを800mLのLB培地で18°C、終夜培養した。しかしながら、タンパク質の生産量がきわめて低く、複数回の培養でも期待される生産量が得られなかった。原因については詳細な検討はおこなっていないが、フレームがずれていた可能性が考えられた。

(2) チュウゴクザサFTタンパク質の生産：GFPタンパク質と同様の手法でチュウゴクザサのFT遺伝子であるSvFT1を発現ベクターpGEX-4T-1に導入した。発現ベクターを導入した大腸菌を1LのLB培地で培養し、菌体回収、溶菌した後にタンパク質を回収した。発現ベクターにはタグが付いているため、これを除去する必要がある。pGEX-4Tシリーズの場合はトロンビンでおこなった。しかしながら、今回おこなったFTタンパク質ではトロンビンを作用させて切断することができず、タグを取り除くことができなかった。

そこで、異なるプロテアーゼによってタグを切断するものとしてベクターのpGEX-6P-1を用いて再びFT遺伝子の配列を導入し、発現ベクターの構築をおこなった。pGEX-4Tの場合と同様に、pGEX-6P-1の制限酵素サイトであるSalI-EcoRI部位にプライマーを付加したFT遺伝子のcDNAを導入した。得られた発現ベクターは大腸菌に導入し、前培養ののち、1LのLB培地で18°C、終夜培養し、タンパク質の回収をおこなった。pGEX-6T-1に導入したFT遺伝子の場合には、Turbo3Cプロテアーゼによってタグも切断でき、1Lの培養からFTタンパク質が280 $\mu$ g得られた。

(3) ササへのFTタンパク質の導入：*in vitro*で合成できたFTタンパク質約70 $\mu$ gをPBS溶液200 $\mu$ Lに溶解し、最終濃度を約17 $\mu$ Mとしてタンパク質導入実験に用いた。

クマザサの稈の部分にメスで切れ込みを入れ、これに細い注射針(ゲージサイズ18G)を刺し、動かないように固定した。シリンジを用いて溶解したFTタンパク質溶液を全量静かに注射針から稈の中へ注入した(図1)。

しかしながら、複数回クマザサへのFTタンパク質の導入を試みたが、注射針を刺した稈の部分から壊死がおり、開花誘導の前に注入したクマザサの稈が枯れてしまった。今回は稈の径が小さいクマザサを用いておこなったために、注射針のサイズが最も小さいものを用いたとしても稈に対する負担が大

きく, FT タンパク質を注入する以前に組織を破壊してしまった可能性が高いと考えられる。また, 今回生産した FT タンパク質の量も決して多くはなかったため, 小型のクマザサで試したが, さらに大量生産することで大型のタケを用いて FT タンパク質の導入を試みたいと考えている。

また, タンパク質を直接導入するときに保護的に働く他のタンパク質を混ぜる等, 導入に際してのタンパク質側の形態と, タケ側の注入部位の選定も重要な課題となることがわかった。大型のタケを用いて導入実験をおこなうにあたっては通導組織(タケの場合には散在している)に吸収されるような投与方法の考案も必要であろう。



図1 クマザサへFTタンパク質を導入している様子

#### 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)

(1) T.Inoue, A.Yoshinaga, K.Takabe,

T.Yoshida, K.Ogawa, M.Sakamoto, J.Azuma, Y.Honda, In situ Detection and Identification of Heperidin Crystals in Satsuma Mandarin (*Citrus unshuu*) Peel Cells. *Phytochemical Analysis*誌, 査読有, 2巻, 2014, 105-110

DOI10.1002/pca.2541

(2) X.Lao, J.Azuma, M.Sakamoto, Two cytosolic aldolase show different expression pattern during shoot elongation of Moso Bamboo. *Physiologia Plantarum*誌, 査読有, 149巻, 2013, 422-431

DOI:10.1111/pp1.12052

[学会発表] (計13件)

- ① 武田ゆり, 小柴太一, 飛松裕基, 山村正臣, 服部武文, 坂本正弘, 高野俊幸, 鈴木史朗, 梅澤俊明, フェルラ酸 5-ヒドロキシラーゼ OsF5H の発現抑制によるイネリグニンの構造改変, 第 60 回リグニン討論会, 2015 年 11 月 5 日~6 日, つくば・筑波大学
- ② 武田ゆり, 小柴太一, 飛松裕基, 山村正臣, 服部武文, 坂本正弘, 高野俊幸, 鈴木史朗, 梅澤俊明, OsF5H 発現抑制によるイネリグニンの芳香核組成改変, 第 33 回日本植物細胞分子生物学会, 2015 年 8 月 10 日~12 日, 東京都文京区・東京大学
- ③ 長田充洋, 中沢威人, 本田与一, 坂本正弘, チュウゴクザサの FD タンパク質は花芽分裂組織決定遺伝子のプロモーター領域に結合する, 第 33 回日本植物細胞分子生物学会, 2015 年 8 月 10 日~12 日, 東京都文京区・東京大学
- ④ 本田貴大, 奥田沙都里, 坂本正弘, タケの類の葯特異的ミトコンドリア ATP 合成酵素  $\beta$  サブユニット遺伝子の発現様式の解析, 第 33 回日本植物細胞分子生物学会, 2015 年 8 月 10 日~12 日, 東京都文京区・東京大学
- ⑤ 下村知沙, 加藤あすか, 中沢威人, 本田与一, 山村正臣, 梅澤俊明, 坂本正弘, UDP-グルクロン酸脱炭酸酵素 (UXS) 遺伝子の発現抑制による細胞壁成分の変化, 第 65 回日本木材学会, 2015 年 3 月 13 日~15 日, 東京・タワーホール船堀
- ⑥ 小柴太一, 向井まい, 服部武文, 鈴木史朗, 坂本正弘, 梅澤俊明, リグノセルロース酵素糖化に及ぼす試料加熱前処理の効果, 第 59 回リグニン討論会, 2014 年 9 月 11 日~12 日, 福井・福井工業大学
- ⑦ 長田充洋, 中沢威人, 本田与一, 坂本正弘, チュウゴクザサ FD ホモログのイネにおける異種発現及び組換えタンパク質の生産, 第 32 回日本植物細胞分子生物学会, 2014 年 8 月 21 日~22 日, 盛岡・いわて県民情報交流センター
- ⑧ 安井奈々子, 中沢威人, 本田与一, 坂本正弘, チュウゴクザサ花成制御遺伝子 CO ホモログの解析, 第 32 回日本植物細胞分子生物学会, 2014 年 8 月 21 日~22 日, 盛岡・いわて県民情報交流センター
- ⑨ 加藤あすか, 本田与一, 坂本正弘, UDP-グルクロン酸脱炭酸酵素遺伝子の抑制による細胞壁成分の変動, 第 64 回日本木材学会, 2014 年 3 月 13 日~15 日, 松山・愛媛大学
- ⑩ 小柴太一, 村上真也, 向井まい, 服部武文, 宮尾安藝雄, 廣近洋彦, 鈴木史朗, 坂本正弘, 梅澤俊明, イネ brown-midrib 変異体の解析, 第 58 回リグニン討論会, 2013 年 11 月 12 日~13 日, 高松・サンポートホール高松

- ⑪ 長田充洋, 坂本正弘, チュウゴクザサにおける FD ホモログの機能解析, 第 31 回日本植物細胞分子生物学会, 2013 年 9 月 10 日～12 日, 札幌・北海道大学
- ⑫ 加藤あすか, 本田与一, 坂本正弘, UDP-グルクロン酸脱炭酸酵素遺伝子の抑制による細胞壁成分の変化, 第 31 回日本植物細胞分子生物学会, 2013 年 9 月 10 日～12 日, 札幌・北海道大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.biomass.kais.kyoto-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂本 正弘 (SAKAMOTO MASAHIRO)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：40303870