

【論文】

イソプレン合成酵素遺伝子の樹木への導入

石井 克明<sup>\*1</sup>・丸山 エミリオ 毅<sup>2</sup>・佐々木 佳菜子<sup>3</sup>・矢崎 一史<sup>3</sup>

Introduction of isoprene synthase genes into trees

Katsuaki Ishii<sup>\*1</sup>, Tsuyoshi Emilio Maruyama<sup>2</sup>, Kanako Sasaki<sup>3</sup> and Kazushi Yazaki<sup>3</sup>

**要旨**：ギンドロ由来のイソプレン合成酵素遺伝子を、セイヨウハコヤナギに導入し、再生個体を得た。再生個体は対照と同様の形態や生育を示した。ヒノキ、スギへの遺伝子導入も試み、ヒノキでは不定胚にアグロバクテリウム法で遺伝子組換えしたカルスで選抜マーカー遺伝子の発現が認められた。イソプレン合成遺伝子を導入したヒノキの再生芽生えは、途中で生育が阻害された。

**キーワード**：遺伝子導入、ギンドロ、セイヨウハコヤナギ、ヒノキ、アグロバクテリウム

**Abstract**: Isoprene synthase c-DNA from *Populus alba* was introduced into *Populus nigra* var. *italica*. Regenerated plantlets were morphologically same with the control plantlets and grew similarly. Selection marker gene was expressed in the callus of Hinoki cypress that was introduced with isoprene synthase gene. However, regeneration from Hinoki cypress was not successful.

**Keywords**: gene transfer, *Populus alba*, *Populus nigra* var. *italica*, *Chamaecyparis obtusa*, Agrobacterium

はじめに

イソプレンは、多くの植物、特にユーカリやポプラから放出される炭素数5のテルペノイドである (Sharkey and Yeh 2001)。地球レベルでみた植物からのイソプレン年間総放出量は炭素量換算で5億トンと推計される (Guenther et al. 1995)。イソプレンは、クロロプラストに局在する非メバロン酸経路によって供給され、ジメチルアリル 2 リン酸 (DMAPP) を前駆体として、イソプレン合成酵素により一段階で生合成される (Schwender et al. 1997)。ギンドロ (*Populus alba*) からのイソプレン合成酵素遺伝子 (*IS*) のクローニングとその機能解析によると、プラスチドに局在し、光と高温で特異的に発現上昇がみられている

(Sasaki et al. 2005)。そこで、イソプレンは植物が高温ストレスに対応して、自身を守るために作るという意味もあるとみられている (Sasaki et al. 2007)。また、イソプレンをたくさん放出する植物は広葉樹のポプラ、ユーカリ、ヤナギ等、成長の早いものが多い (Kesselmeier and Staudt 1999)。もし、この遺伝子がスギやヒノキといった針葉樹に導入され発現すれば、高温ストレス耐性や成長促進につながる可能性がある。2100年には、地球温暖化で平均気温が今より4℃上昇すると予想されるので、その対策にもなる。また、植物に導入した場合、普通は暗黒下では発現しない、この遺伝子が35Sプロモーターの影響で、夜にも発現し成長促進や環境ストレス耐性の向上に役に立つ可能性がある。

\* E-mail: katsuaki@ffpri.affrc.go.jp

<sup>1</sup> 森林総合研究所森林バイオ研究センター Forest Bioresearch Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 3809-1 Ishi, Juo, Hitachi, Ibaraki 319-1301, Japan

<sup>2</sup> 森林総合研究所生物工学研究領域 Department of Molecular and Cell Biology, Forestry and Forest Products Research Institute, 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japan

<sup>3</sup> 京都大学生存圏研究 Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University, Gokasyo, Uji, Kyoto 611-0011, Japan

2012年11月13日受付、2013年1月13日受理

## 材料と方法

組織培養中のセイヨウハコヤナギ (*Populus nigra* var. *italica*) (Mohri et al. 1993)、ヒノキ (*Chamaecyparis obtuse*) (Ishii 2002)、スギ (*Cryptomeria japonica*) (Maruyama 2000) を用いた。

セイヨウハコヤナギの茎片、葉柄、葉片にアグロバクテリウム法によりギンドロ由来のイソプレレン合成酵素遺伝子を導入した。ポプライソプレレン合成酵素 cDNA 全長を構成的発現プロモーターでドライブした pGWB2\_PalS (35S-PalS full-length) プラスミド、及び RNAi コンストラクト PalSir13 (*ir-13*) または PalSir23 (*ir-23*) (Sasaki et al. 2007) を含む pGWB80 プラスミド含有のアグロバクテリウム GV3101 (pMP90) を 1 時間感染させ、セフトキシムを 500 mg/L 含有の MSB5S 培地で良く洗浄した後、セフトキシム 500 mg/L、カルベニシリン 500 mg/L、ハイロマイグシン 10 mg/L、2,4-D 0.5 mg/L 含有の選抜培地にて暗下 25°C 恒温で 1 ヶ月培養し、さらにハイグロマイシン 6 mg/L、カルベニシリン 300 mg/L、ゼアチン 2 mg/L、BAP 0.2 mg/L 含有の MSB5S 培地にて  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  蛍光灯 16 時間/日 照明下で培養しシュートを得た。得られたシュートはハイグロマイシン 6 mg/L 含有の 1/2MSB5S 培地で発根させて組換え植物を再生させた。

再生個体の葉より DNA 抽出キット (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) にて全 DNA を抽出し、選抜マーカーの、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hpt*) の導入を PCR 分析により確認した。反応条件は、10 ng テンプレート DNA、0.2 mM dNTPs、0.2 mM プライマー (AAAAGCCTGAACTCAC、TGGACCGATGGCTGTGTAGAAG)、2  $\mu\text{L}$  10 $\times$  PCR バッファー、0.5 unit Taq ポリメラーゼ、25 mM MgCl<sub>2</sub> を 20  $\mu\text{L}$  規模で、94 °C 4 分処理の後、94 °C 45 秒、55 °C 45 秒、72 °C 1 分を 35 回繰り返す、最後に 72 °C で 5 分処理した (サーマルサイクラー-T3000、タカラ)。

ヒノキの苗条原基に、pGWB2\_PalS プラスミドを遺伝子銃法で導入することを試みた。1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  の DNA を 5  $\mu\text{L}$ 、50 mg/mL の金粒子 (直径 1  $\mu\text{m}$ 、徳力社製) 懸濁液 25  $\mu\text{L}$ 、2.5 M の塩化カルシウム溶液 25  $\mu\text{L}$ 、0.1M スペルミジン溶液 10  $\mu\text{L}$  を順番に混ぜた後、10 分間静置した。その上澄み液 25  $\mu\text{L}$  を除去した後、超音波により数秒間攪拌してから、滅菌したナイロン弾の頭部のくぼみに 2.5  $\mu\text{L}$  をのせた。遺伝子銃 (ジーンプラスター1221-007、日本ゼオン社製) により、450 m/秒の速度でヒノキの苗条原基に打ち込んだ (Ishii 2002)。その後、苗条原基は、ハイグロマイシン 20~50 mg/L 含有の CD 培地で培養した。

スギの不定胚への遺伝子銃法による *IS* 遺伝子の導入

(Maruyama et al. 2000) や、ヒノキの不定胚へのアグロバクテリウム法による *IS* 遺伝子の導入も試みた。

## 結果と考察

セイヨウハコヤナギでの、組換えカルス形成率は、*IS* 遺伝子では葉片に接種した場合が、*ir-13* 遺伝子では葉柄、*ir-23* 遺伝子では茎片が最も高かった。これまで茎片が最もカルス形成に適しているとされていたが (Mohri et al. 1996)、導入遺伝子の種類により異なることが判明した (表-1)。

カルスからの分化により独立して得られたシュートの数は、*ir-23* が最も多かった (表-2)。

表-1 セイヨウハコヤナギへのアグロバクテリウム法によるイソプレレン合成遺伝子の導入後の組織片のカルス形成率

組織片	プラスミド		
	<i>IS</i>	<i>ir-13</i>	<i>ir-23</i>
茎片	1/30 (3)	0/30 (0)	13/30 (43)
葉柄	0/30 (0)	17/42 (40)	0/30 (0)
葉片	12/41 (29)	0/30 (0)	14/38 (37)

表-2 セイヨウハコヤナギの組換えシュート及び安定再生植物体数

導入遺伝子	誘導シュート数	獲得再生個体数
<i>IS</i>	7	4
<i>ir-13</i>	5	0
<i>ir-23</i>	21	16

その後の根の分化は全てのプラスミドの種類で可能であったが、安定的に継代培養ができたのは *IS* と *ir-23* であり、*ir-13* は 1 年後に枯死した。これは *ir-13* 遺伝子が発現したためイソプレレン合成遺伝子が何らかの RNAi 干渉を受けて、成長や生存に影響したことが考えられる。

発根培地でシュートから再生された植物体のプラントボックス内での生育や形状には遺伝子組換え体と対照とで差が見られなかった (写真-1)。PCR 分析では、写真-2 に 1 例を示すように、*hpt* 遺伝子の導入が再生個体で確認された。今後イソプレレンの生成や高温耐性の変化があ

るかの検定を行う予定である。



写真-1 イソプレン合成遺伝子を導入し再生した  
セイヨウハコヤナギ  
左：対照、中：*ir-23*、右：*IS*。

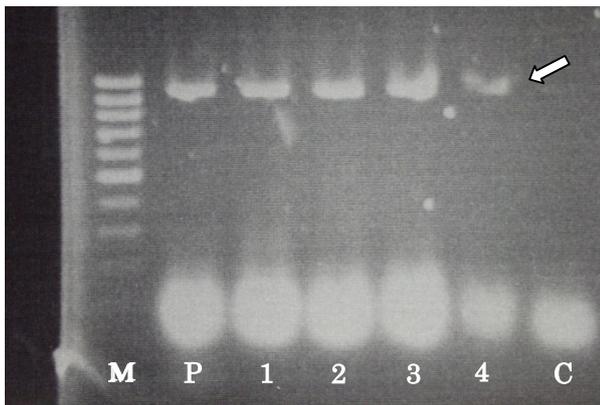


写真-2 イソプレン合成遺伝子を導入したセイヨウ  
ハコヤナギの PCR

M：DNA ラダー (100 bp～1000 bp)、P：プラスミド、  
1～4：組換え体、C：対照。

*hpt* 遺伝子の一部 967 bp 矢印が増幅されている。

ヒノキの苗条原基への遺伝子銃による *IS* プラスミドの導入では、ハイグロマイシン 20 mg/L 含有の CD 培地で3週間後には生存する芽が見られたが、その後継代培養を続けるうちに枯死した。

ヒノキの不定胚にアグロバクテリウムで *IS* 遺伝子を導入した場合、選択培地を生き抜いたカルスの中に *hpt* 遺伝子の存在が PCR 分析により確認された。カルスからの植

物体の分化については、形態異常を示すものが多かった。この理由として、選択抗生物質のハイグロマイシンがヒノキ組織に悪影響を及ぼすことや、導入した *IS* 遺伝子の発現による影響等が考えられる。遺伝子組換えヒノキの芽生えまでの再生に成功したが、長さ 2 cm 程までしか生育せず、移植をすると褐変した。

スギの不定胚に遺伝子銃法で *IS* プラスミドの導入を試みたが、選択培地において、すべて枯死した。

イソプレンは大気中に植物から放散される揮発性有機炭化水素物質の 44% を占めるが (Guenther et al. 1995)、その生理学的な意義は未解明な部分が多い。植物では、光合成に関係した酵素・膜構造の高温での劣化の防止作用や、酸化ストレスの低減作用が知られている (Behnke et al. 2010)。 *Populus × canescens* を RNAi 法で遺伝子発現の制御をし、イソプレンの放散を押さえた場合、フェニルプロパノイドや縮合型タンニン及びアントシアニンの生成に関与する酵素遺伝子の発現が抑制され、ストレス反応に係る過酸化水素の集積が観察され、高温ストレス耐性が低下した (Behnke et al. 2010)。しかし、このイソプレンをほとんど放出しない組換えポプラは、オゾンストレスに対しては、かえって抵抗性を示し、その原因はアスコルビン酸等の抗酸化物質が組換え体に多かったことによるという (Behnke et al. 2012)。また、 *Populus × canescens* では、同じ樹種に由来するイソプレン合成酵素遺伝子を遺伝子導入した場合、イソプレンの放散量の増加は見られなかった (Behnke et al. 2007)。今回、セイヨウハコヤナギで作出された、イソプレン合成遺伝子やその RNAi コンストラクトを導入した組換え体の高温やオゾンストレスに対する反応について今後追跡調査を行う必要がある。また、高温耐性に関する林木の分子育種を考える上で、イソプレンをほとんど放出しない針葉樹 (Sharkey and Yeh 2001) にイソプレン放出種であるポプラの *IS* 遺伝子を導入した場合に、ストレス耐性や成長においてどのような影響が出るかを調査する必要がある。

## 引用文献

- Behnke K, Ehlting B, Teuber M, Bauerfeind M, Louis S, Hansch R, Polle A, Bohlmann J, Schnitzler J-P (2007) Transgenic, non-isoprene emitting poplars don't like it hot. *The Plant Journal* 51: 485-499
- Behnke K, Kaiser A, Zimmer I, Bruggemann N, Janz D, Polle A, Hampf R, Hansch R, Popko J, Schmitt-Kopplin P, Ehlting B, Rennenberg H, Barta C, Loreto F, Schnitzler J-P (2010)

- RNAi-mediated suppression of isoprene emission in poplar transiently impacts phenolic metabolism under high temperature and high light intensities: a transcriptomic and metabolomic analysis. *Plant Molecular Biology* 74: 61-75
- Behnke K, Kleist E, Uerlings R, Wildt J, Rennenberg H, Schnitzler J-P (2012) RNAi-mediated suppression of isoprene biosynthesis in hybrid poplar impacts ozone tolerance. *Tree Physiology* 29: 725-736
- Guenther A, Hewitt CN, Erickson D, Fall R, Geron C, Graedel T (1995) A global model of natural volatile organic compound emission. *Journal of Geophysical Research* 100: 8873-8892
- Ishii K (2002) Liquid culture and transformation of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.). *Journal of Forest Research* 7: 99-104
- Kesselmeiser J, Staudt M (1999) Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology, and ecology. *Journal of Atmospheric Chemistry* 33: 23-88
- Maruyama E, Tanama T, Hosoi Y, Ishii K, Morohoshi N (2000) Embryogenic cell culture, protoplast regeneration, cryopreservation, biolistic gene transfer and plant regeneration in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don). *Plant Biotechnology* 17: 281-298
- Mohri T, Yamamoto N, Shinohara K (1996) Agrobacterium-mediated transformation of Lombardy poplar (*Populus nigra* L. var. *italica* Koehne) using stem segments. *Journal of Forest Research* 1: 13-16
- Sasaki K, Ohara K, Yazaki K (2005) Gene expression and characterization of isoprene synthase from *Populus alba*. *FEBS Letters* 579: 2514-2518
- Sasaki K, Saito T, Lamsa M, Oksman-Caldentey K-M, Suzuki M, Ohyama K, Muranaka T, Ohara K, Yazaki K (2007) Plants utilize isoprene emission as a thermotolerance mechanism. *Plant Cell Physiology* 48: 1254-1262
- Schwender J, Zeidler J, Groner R, Muller C, Focke M, Braun S, Lichtenthaler FW, Lichtenthaler HK (1997) Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. *FEBS Letters* 414: 129-134
- Sharkey TD, Yeh SS (2001) Isoprene emission from plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 407-436