

ガラクトシノール合成酵素遺伝子によるポプラの耐塩性の向上

A galactinol Synthase gene confers salt tolerance on transgenic poplar

横田智*¹・田原恒*¹・西口満*¹・毛利武*¹・掛川弘一*¹・楠城時彦*²

Satoru YOKOTA*¹, Ko TAHARA*¹, Mitsuru NISHIGUCHI*¹, Takeshi MOHRI*¹, Koichi KAKEGAWA*¹ and Tokihiko NANJYO*²

* 1 森林総合研究所

Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba, 305-8687

* 2 森林総合研究所林木育種センター

Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, Taketomi-cho, 907-1432

要旨： ガラクチノール合成酵素 (GolS) はガラクトシノールを合成する酵素である。ガラクトシノールはラフィノース属オリゴ糖 (RFO) の前駆体となり、RFO は植物の環境ストレス耐性に関与すると考えられている。私たちは樹木の耐塩性向上のため、GolS 遺伝子に着目して遺伝子組換えポプラを作出した。GolS 遺伝子を過剰に発現する組換えポプラでは、ガラクトシノールの蓄積量が非組換えポプラの 5.5 倍に増加した。この GolS 組換えポプラを 50 mM NaCl を含む肥料液で 4 週間水耕栽培したところ、非組換えポプラに比べて 1.5 倍の苗高成長量を示した。

キーワード： ガラクチノール合成酵素, ラフィノース属オリゴ糖, 遺伝子組換え, 耐塩性, クロポプラ

I はじめに

ラフィノース族オリゴ糖 (RFO) は登熟種子中に蓄積しているのが見つかると、浸透圧調節物質として乾燥耐性に関与していると考えられた (1, 2)。さらに、高塩、乾燥、低温のような環境ストレスを受けた植物においても RFO やその前駆体のガラクトシノールが蓄積するのが観察された (3, 6, 7)。

RFO 合成では最初に、前駆体となるガラクトシノールがガラクトシノール合成酵素 (GolS) によって UDP-グルコースと *myo*-イノシトールから合成される。我々の研究グループは、クロポプラ (*Populus nigra*, 以後ポプラと表記) に 6 種類の GolS 遺伝子があり、乾燥や高塩によって発現量が増加することを明らかにした (5)。さらに、環境ストレス耐性樹木の開発と環境ストレス下での RFO の機能解明のため、GolS 遺伝子を過剰発現する組換えポプラを作製した (8)。

本研究では、GolS 組換えポプラの耐塩性を評価して、GolS 遺伝子による組換えの効果を検証することが目的である。

II 材料と方法

1. 植物材料と生葉の調製

ポプラの GolS 組換え体と非組換え体の栽培は人工光型の育成チャンバー (日長 16 時間, 光量子束密度 280 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 温度 25/20°C (明期/暗期), 相対湿度 75 \pm 7%) で育成した。これらの腋芽から伸長したシュートを切り

取り、約 13 cm の長さの挿穂を調製して水挿した。2 週間後、発根が確認された苗を 2000 倍に希釈したハイポネックス肥料液を入れたワグネルポット (1/10000 アール) で水耕栽培した。水耕栽培は上述した育成チャンバーの同じ環境条件下で行い。肥料液は 1 週間に 2 回交換した。

2. オリゴ糖の定量分析

GolS 組換えポプラ、非組換えポプラから成熟葉 (約 1 g) を 3 枚ずつ採取しオリゴ糖を定量した。オリゴ糖の定量は前報 (4) に記した方法にしたがった。

3. 塩処理栽培実験

発根から 5 週間後、苗高が 20 cm 程度になった時点で NaCl 処理を開始し、4 週間継続した。NaCl 処理として、肥料液に 50 mM NaCl を添加した。実験には、GolS 組換えポプラと非組換えポプラを各 5 本使用した。

III 結果と考察

1. オリゴ糖類の葉内蓄積量

GolS 組換えポプラ、および非組換えポプラの葉内に含まれるラフィノース族オリゴ糖類の量を図-1 に示す。非組換えポプラのガラクトシノール量が 0.04 mg/g FW なのに対して、GolS 組換えポプラは 0.22 mg/g FW であり 5.5 倍になっていた。

ラフィノースとスタキオースについては、GolS 組換えポプラと非組換えポプラで蓄積量に違いは認められな

った。しかしながら、非組換えポプラでは検出されなかったスタキオースが *GolS* 組換えポプラでは検出された。

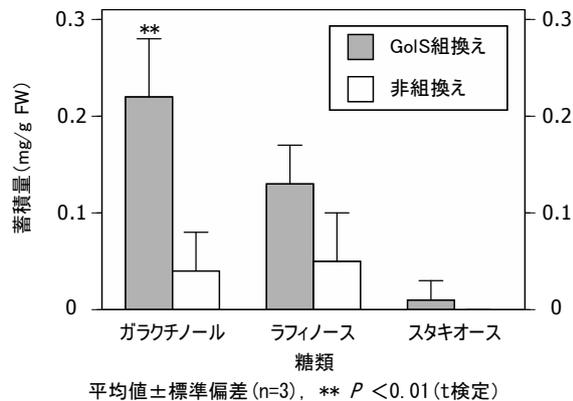


図-1. *GolS* 組換えポプラのオリゴ糖類の含有量

Fig. 1 Oligosaccharides content of the *GolS* transgenic poplar

2. 塩処理下の苗高成長量の違い

50 mM NaCl 存在下の苗高成長量について、*GolS* 組換えポプラと非組換えポプラで比較した (図-2)。塩処理を開始してから2週間は、*GolS* 組換えポプラと非組換えポプラの苗高成長量に違いは見られないが、3週目以降に違いが見られるようになった。4週間の塩処理期間の苗高成長量は、*GolS* 組換えポプラが 33.8 cm、非組換えポプラが 22.3 cm で、*GolS* 組換えポプラの苗高成長量は非組換えポプラの約 1.5 倍であった。

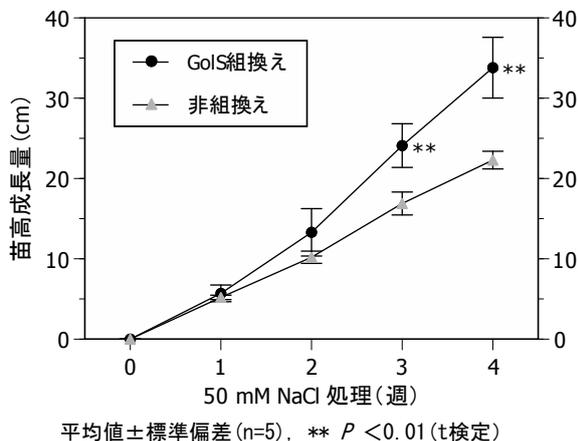


図-2. 塩処理が組換えポプラの苗高成長に及ぼす影響

Fig. 2 Effect of salinity on tree height of transgenic poplars

シロイヌナズナでは、*GolS* 遺伝子の過剰発現によって耐乾燥性が向上したとしている (9)。ポプラの *GolS* 遺伝子の中で遺伝子番号 PnFL1-047-C08 は、塩処理によって強く発現が誘導された (5)。この遺伝子を使って作製した *GolS* 組換えポプラは、50 mM NaCl 存在下で非組

換えポプラよりも良好な苗高成長を示した。この結果から、*GolS* 遺伝子を過剰発現する遺伝子組換えは、ポプラの耐塩性向上においても有効であると考えられた。

引用文献

- (1) BLACK, M., CORBINEAU, F., GRZESIK, M., GUY, P. and COME, D. (1996) Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. *J Exp Bot* **47** : 161-169
- (2) BRENAC, P., HORBOWICZ, M., DOWNER, S.M., DICKERMAN, A.M., SMITH, M.E. and OBENDORF, R.L. (1997) Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed development and maturation. *J Plant Physiol* **150** : 481-488
- (3) GILBERT, G.A., WILSON, C. and MADORE, M.A. (1997) Root-zone salinity alters raffinose oligosaccharide metabolism and transport in coleus. *Plant Physiol* **115** : 1267-1276
- (4) 掛川弘一・楠城時彦・西口満・古川原聡・毛利武・田原恒・横田智 (2013) ポプラのラフィノース族オリゴ糖の環境ストレス条件下での消長. 関東森林研究 **64** : 69-72
- (5) 西口満・古川原聡・横田智・毛利武・田原恒・掛川弘一・楠城時彦 (2012) 遺伝子組換え樹木の創出のためのポプラ環境ストレス耐性遺伝子の探索. 日輪学術講 **123** : pb194
- (6) PATTANAGUL, W. and MADORE, M.A. (1999) Water deficit effects on raffinose family oligosaccharide metabolism in coleus. *Plant Physiol* **121** : 987-993
- (7) PETERS, S. and KELLER, F. (2009) Frost tolerance in excised leaves of the common bugle (*Ajuga reptans* L.) correlates positively with the concentrations of raffinose family oligosaccharides (RFOs). *Plant, Cell and Environment* **32** : 1099-1107
- (8) 田原恒・毛利武・西口満・古川原聡・横田智・掛川弘一・楠城時彦 (2014) 環境ストレス耐性の向上を目的とした遺伝子組換えポプラの作製. 関東森林研究 **65** : 57-60
- (9) TAJI, T., OHSUMI, C., IUCHI, S., SEKI, M., KASUGA, M., KOBAYAH, M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. and SHINOZAKI, K. (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **29** : 417-426