

## Δ9 desaturase 遺伝子導入ユーカリの隔離圃場における

### 不飽和脂肪酸産生量と耐冷性の相関性の検証

林 奈々美 (筑波大学 生物学類)

小口 太一 (筑波大学 生命環境系)

#### 【背景・目的】

産業革命以降、産業活動に伴う二酸化炭素排出の増加による大気中の二酸化炭素濃度の増加は、地球温暖化の一因となっている。そこで地球温暖化の解決策の一つとして、世界中で植林が行われている。植林される林木の中で特に注目されているのが、ユーカリである。ユーカリは、他の林木よりも成長が早く、非生物ストレスに耐性が高い。しかし、ユーカリの最適生育温度が 25 度のため、植林地帯が低緯度地域に限られているため、植林地帯拡大のためには、耐冷性の付与が必要である。

当研究室では、ラン藻 *Anacystis nidulans* から単離された Δ9 desaturase 遺伝子 (*des9*)<sup>1)</sup> をユーカリ (*Eucalyptus globulus*) に導入することで、形質転換ユーカリを作出した。*des9* 遺伝子から誘導される、脂肪酸不飽和化酵素はパルミチン酸を融点が高いパルミトレン酸に変換することで、低温状況下での生体膜の流動性が維持できると考えられる。

この形質転換ユーカリを隔離圃場に植林、萌芽更新させ、2016 年 11 月から 2017 年 3 月において、葉緑体の自家蛍光を指標に低温障害を測定することで、耐冷性評価を行った。また、形質転換体における、耐冷性と脂肪酸の関係を明確にするために、導入遺伝子数の分析、*des9* 遺伝子の発現量解析、脂肪酸分析を行った。

#### 【植物材料】

*des9* 導入形質転換ユーカリ 2 系統 (144-13 : 4 個体、204-10 : 6 個体) と非組換え 3 系統 (No.1 : 10 個体、Au1 : 3 個体、L047 : 3 個体) を実験材料とした。各植物は、2013 年 11 月に遺伝子実験センターの模擬的環境試験圃場 II (隔離ほ場 II) に植栽した後、2016 年 4 月に地面から約 50 cm で伐採し、今年度新たに生じた萌芽を評価対象とした。

#### 【実験方法】

##### 1) 導入遺伝子数の確認

隔離ほ場試験に供した遺伝子組換え体 2 系統及び非組換え体対照系統よりそれぞれランダムに選んだ各 3 個体から採取した葉よりゲノム DNA を抽出、qPCR 解析により推定した。

##### 2) 発現量解析

隔離ほ場試験に供した遺伝子組換え体 2 系統及び非組換え体対照系統よりそれぞれランダムに選んだ各 3 個体から採取した葉より RNA を抽出、qRT-PCR 解析により *des9* 遺伝子の相対発現量を分析した。

##### 3) 脂肪酸分析

2016 年 4 月から隔離圃場で萌芽更新したユーカリから 1 枚ずつ葉を採取、1 日凍結乾燥処理させた後、各系統からランダムに 3 個体を選択、脂肪酸抽出し、ガスクロマトグラフィー解析により分析した。

##### 4) 低温障害の測定、評価

遺伝子実験センターの隔離ほ場 II で、屋外における葉の QY の変動をモニタリングすることで低温障害を定量評価した。QY 測定は、樹冠から 1 m 以内及び樹冠から 1 m~2 m の範囲の枝の先端から 4 枚の葉について、FluorPen-FP100 を

用いて各 3 スポットの測定値の平均値として得た。

#### 【結果】

##### 1) 導入遺伝子のコピー数

形質転換体 204-10 系統は、導入遺伝子が約 12 コピー存在し、144-13 系統は、約 3 コピー存在することが推察された。

##### 2) 発現量解析

形質転換体でのみ、*des9* 遺伝子の発現が確認された。また、204-10 系統と 144-13 系統の発現量を比較すると、204-10 系統の方が約 1.3 倍程度発現量が高かった。

##### 3) 脂肪酸分析

形質転換体からのみ、パルミトレン酸 (C16:1) が特異的に検出された。また、204-10 系統と 144-13 系統のパルミトレン酸含有量を比較すると、204-10 系統の方が約 2 倍程度高蓄積していた。一方で、他の脂肪酸組成は、形質転換体と非組換え体の間で違いはなかった。

##### 4) 低温障害の測定

これまでの測定の結果、気温の低下とともに、全ての系統において、QY が低下する傾向を確認しているが、現時点では、形質転換体と非組換え体の間に、低温障害において大きな差は確認できていない。ただし、先行研究では、形質転換体と非組換え体の低温障害の差は、1 月以降に観察されていることから、その後も測定を継続している。

#### 【考察】

GC 解析の結果、形質転換体では、非組換え体では検出されないパルミトレン酸が検出された。パルミトレン酸は、パルミチン酸 (C16:0) の Δ9 位に一価の不飽和化が導入された脂肪酸であり、*des9* の導入によって生成されたものと考察される。また、*des9* の発現量とパルミトレン酸含量に正の相関がみられたことから、本考察は強く支持される。

一方で、他の脂肪酸組成には有意な影響がみられなかったことから、導入した *des9* がパルミチン酸に特異的であることが考察された。タバコでは、本酵素は、非特異的に飽和脂肪酸の不飽和化に関与することが報告されており<sup>1)</sup>、ユーカリとタバコでは、脂肪酸不飽和化の機構に相違があることが推察される。

一方で、導入遺伝子数と導入遺伝子の発現量の間には、相関が認められなかった。これは、導入遺伝子の発現は、導入数よりも導入したゲノム上の部位による影響が大きいためと考察される。

今後は、低温障害の測定により、冬季のほ場におけるユーカリの低温障害を定量的に評価することで、低温耐性と *des9* 遺伝子発現量・パルミトレン酸含量の関係を明らかとし、*des9* 遺伝子導入によるユーカリの耐冷性育種の有効性を示したいと考えている。

#### 【参考文献】

<sup>1)</sup> Ishizaki-Nishizawa, O., *et al* (1996) Low-temperature resistance of higher plant is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. *Nature Biotech.* **14**: 1003-1006