

葉緑体形質転換法による窒素利用機能増強作物の作成

応用生物学講座 曾我 舞

[緒論]

作物の生産性を高める最も一般的な方法として、窒素肥料の使用が挙げられる。しかしながら、高い生産性のために広範囲にかつ大量に使用されている窒素肥料は、窒素成分が水に可溶であり、また作物の窒素吸収能に限界があるために、その多くは作物に吸収されることなく河川に流出し、富栄養化の一因になっている。

植物の窒素吸収、同化機能を増強するためにグルタミン合成酵素に注目した。植物の窒素吸収・同化系のなかでグルタミン合成酵素 2 (GS2) は葉緑体に局在している。さらに、グルタミンに取り込まれた窒素はグルタミン酸合成酵素(GOGAT)によりグルタミン酸(Glu)に移行し、この Glu, Gln が基本的には総てのアミノ酸及び各塩基・ビタミン等の含有窒素化合物に対する窒素ドナーとなっている。従って、窒素化合物の同化系・アミノ酸の生合成系を増強するためには、葉緑体に局在するグルタミン合成酵素 2 の増強が有効であると思われる。

この研究で形質転換に葉緑体形質転換法を用いたのは、GS2 が葉緑体に局在している酵素である事他に、葉緑体が、外来遺伝子の発現コンパートメントとして以下のような大きな利点があるからである。それらは、葉緑体ゲノムがマルチコピーであり導入遺伝子の高発現が可能なこと、ポジション効果やジーンサイレンシングが見られないこと、原核型葉緑体ゲノムではポリシストロニックな遺伝子発現が可能であり、特定の代謝経路の複数の遺伝子群をまとめて導入することができること、形質転換された植物の花粉が近縁野生種に伝播されないことが挙げられる。また、葉緑体形質転換技術の確立という面もこの研究の一つの大きな目的となっている。

[実験方法]

・形質転換ベクターpSMV1の作成

図 1 a に示されるプロモーター/SD 配列/ターミネーターカセット(pSM1)の配列を構築した。転写を開始させるプロモーター配列には、タバコ由来のリプロース 1,5-二リン酸カルボキシラーゼのラージサブユニットのプロモーターを利用し、タンパク質をリボソームで合成させる SD 配列には、このプロモーターの転写開始点から+124~+180 に存在する翻訳開始シグナルを用いた。まず、プロモーター/SD 配列部分を、タバコ葉緑体 DNA をテンプレートとして PCR 反応を利用して増幅させた。この時 PCR プライマーに制限酵素サイトを付けておき、5'プライマーに Sac サイト、3'プライマーに Hind サイトを持った DNA 断片を増幅させた。これをクローニングベクターである pBluescript SK+の SacI、Hind サイトに導入した。同様に、5'末端に Xba サイト、3'末端に Kpn サイトを持つターミネーター配列を PCR 反応を用いて増幅し、この pBluescript SK+に導入した。続いて目的遺伝子であるグルタミン合成酵素 2 の cDNA を pSMV の Hind サイトと Xba サイト間に挿入した(図 1 .b)。最後にこのプロモーター/SD 配列/GS2/ターミネーターの配列を、葉緑体形質転換ベクターpRV112A(図 1 .c)のマルチクローニングサイトの Sac と Kpn の間に挿入した。

・葉緑体形質転換

パーティクルガン PDS-1000/He(BioRad 社)を使用し、タバコ葉にグルタミン合成酵素 2 遺伝子が導入されているベクター(pKM)を導入した。形質転換ベクターには、グルタミン合成酵素 2 が選抜マーカーとなる *aadA* 遺伝子の後ろに導入されている。グルタミン合成酵素 2 には、あらかじめ葉緑体への移行を示すシグナルペプチドが取り除かれており、翻訳を開始させる SD 配列が挿入されている。

・サザンハイブリダイゼーション

再生シュートに組み換え遺伝子が導入されているか、そのホモプラズミシティーを調べるために、形質転換体からトータル DNA を抽出し、サザンハイブリダイゼーションにより組換え遺伝子の導入を確認した。

[結果と考察]

本研究では、48 回のシューティングを行い、遺伝子導入した形質転換体をスペクチノマイシン抵抗性を用いて選抜した。最終的に 6 個体の再生シュートが得られた。再生シュートは続けて選抜培地で選抜した後、発根培地に移し、個体を再生させた。葉緑体は一つの細胞中に数千から 1 万個存在し、その全ての葉緑体ゲノムコピーが組み換えられているかを確認するために、再生シュートに対してのサザンプロットングによる解析を行った。その結果、再生シュート 6 系統のうち 2 つの系統で全ゲノムコピーが組み換えられたホモプラズミであることが確認された。しかし、残りの 4 系統は野生型ゲノムが残ったヘテロプラズミであった。

今後作成したベクターも同様に形質転換を行い、そのホモプラズミックな系統を得る必要がある。また、この葉緑体転換技術を主要作物であるイネ、トウモロコシ、ダイズ等に適用することで、農業生産技術の大きな変化、耕作可能土地面積の拡大、過剰肥料による環境問題の解消など、広い分野にわたる大きな効果が期待できると思われる。

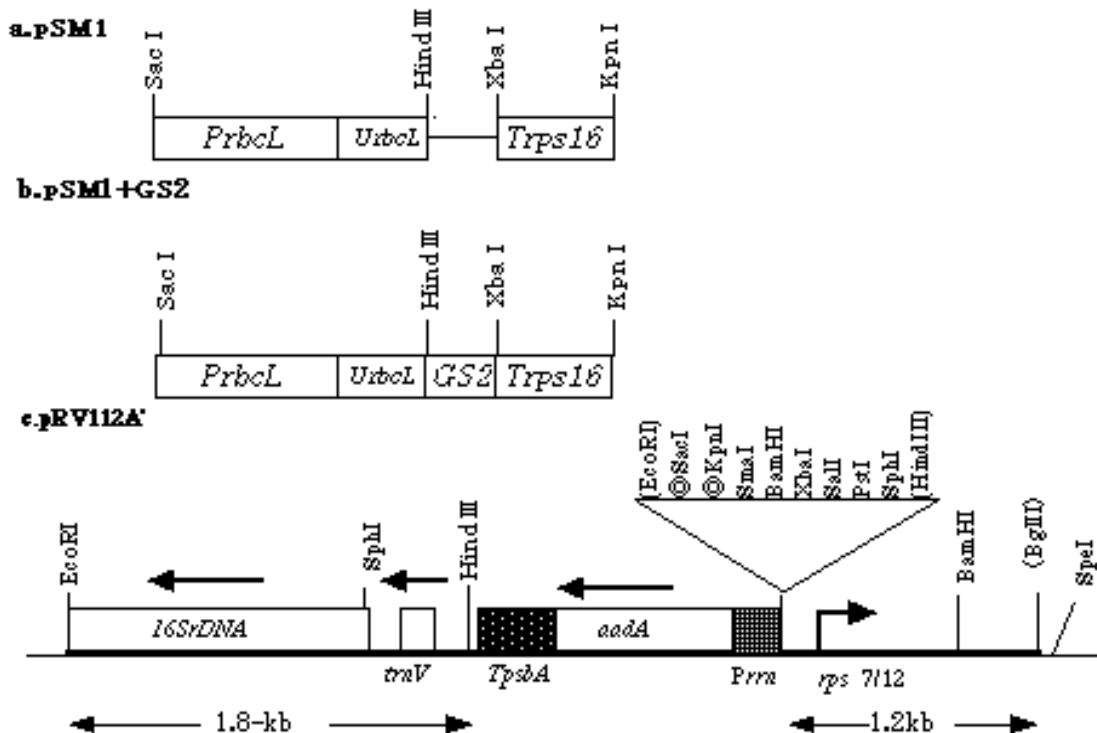


図 1 葉緑体形質転換ベクター pSM1 構築

