

# イネ葉緑体形質転換の試みと新規マーカー遺伝子の検討

(応用生物) 加藤潤一

## 《緒言》

葉緑体は独自の DNA を持ち、核の DNA と同様、遺伝子組換えによって形質転換体を作成することが可能である。葉緑体の形質転換は相同組換えで遺伝子を取り込まれるため、遺伝子の挿入位置、方向を任意に決めることができる。従って、特定の遺伝子を破壊したり、遺伝子に任意の変異を導入することが容易である。又、葉緑体は豊富な還元力と強力なタンパク質合成能力を持っているので、それを生かした様々な物質生産が可能となる。葉緑体形質転換植物で、医薬品の生産をしたり、特定のアミノ酸を増強して栄養価の高い作物を作り出していくことが期待されている。

しかし、葉緑体形質転換技術はまだ発展途上の技術であり、葉緑体形質転換が可能な高等植物はタバコに限られるなど幾つかの解決すべき技術的問題が残されている。本研究では、そのうち2つの課題に取り組んだ。

1つ目は新しいマーカー遺伝子の研究である。従来、タバコの葉緑体形質転換マーカー遺伝子として使われてきたのは、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子のみである。葉緑体を二重に形質転換したり、タバコ以外の高等植物で葉緑体形質転換を確立するには、新規のマーカー遺伝子の開発が不可欠である。本研究ではグリシンベタイン合成酵素(BADH)の選択マーカーとしての可能性について研究した。

2つ目の研究としてイネの葉緑体形質転換に取り組んだ。人類にとって必要不可欠な作物であるイネでは、核の形質転換は行われているが、葉緑体形質転換はまだ確立していない。イネの培養系と再分化系を確立し、抗生物質ハイグロマイシン耐性遺伝子をマーカーとして葉緑体形質転換を行った。

## 《結果と考察》

### 研究 グリシンベタイン合成酵素(BADH)のタバコ葉緑体形質転換マーカーとしての適用

葉緑体は1つの細胞の中に約100個存在し、葉緑体1つの中に葉緑体DNAが約100個存在する。全てのゲノムに遺伝子を同時に導入するのは不可能なため、目的遺伝子と共に選択マーカー遺伝子を導入して、目的遺伝子が組み込まれた葉緑体のみを選抜する。これまで、葉緑体形質転換の選択マーカーとして用いられてきたのは、抗生物質スペクチノマイシン耐性遺伝子(aadA)である。他にも様々な選択マーカーが試みられてが、確実に利用できるものは見つかっていない。一方 Daniel らは、タバコでグリシンベタイン合成酵素(BADH)遺伝子を選択マーカーとして用いて、形質転換体を選抜することに成功、スペクチノマイシンに代わる選択マーカーへの可能性を示した(2001)。BADH 遺伝子を用いた場合、aadA 遺伝子に比べ20倍以上の形質転換効率を示し、シュートの再分化に要する日数も3分の1以下になると報告されている。又、全ての葉緑体ゲノムを組み換えたホモプラズミック系列も容易に確率できる。

本研究では、ハウレンソウ由来のBADH 遺伝子を選択マーカーとした形質転換ベクターの開発を目指した。

#### 野生型タバコのベタインアルデヒド(BA)への耐性実験

グリシンベタインは適合溶質の一つとして、植物の塩や浸透圧ストレスへの耐性獲得に関係することが知られている。BADH は葉緑体内で、有毒な代謝中間産物ベタインアルデヒド(BA)からグリシンベタインへの酸化反応を触媒する。従ってBA感受性の植物にBADHを導入することでBA耐性を付与することができる。

まずタバコ、シロイヌナズナ、イネについてBA感受性を比較した。BAを0.5,10,20 mM 含んだ培地にそれぞれの種子を播き、発芽試験を行った。タバコの場合、約2週間後に観察すると、20 mM BAで発芽はほぼ完全に抑制されていた。また5,10 mM BAではシュートの生育が強く阻害された。又、実際に遺伝子導入を行う葉切片のBA感受性も調べた。タバコの葉を約1cm四方の切片にしてBA添加RMOP培地で培養した。10日後、BAを含まない培地では、葉は厚みを増して大きくしなり、シュートを発生していたが、BA濃度が高まるにつれ葉の脱色が強まり、20 mMでは、ほぼ全ての葉切片で枯死が始まっていた。一方、シロイヌナズナでは濃度が高くなるにつれ、発芽は減少したが、20mM BAでも完全に発芽を抑えることはできなかった。イネの場合、正常に発生した芽が生長しカルスまで誘導された。

これらの結果よりタバコはBAに感受性が高く、20 mM BAが選抜に最適であることがわかった。一方シロイヌナズナやイネはベタインアルデヒドへの耐性が高く、BADHをマーカー遺伝子として使用するの難しいことがわかった。

#### BADHベクターの構築

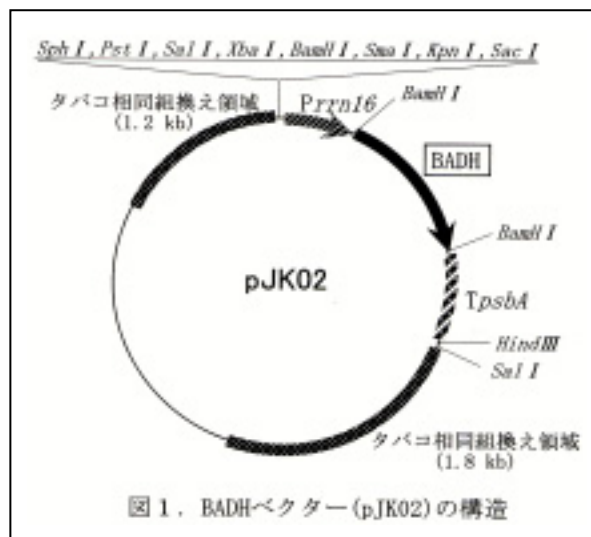
名古屋大学生命農学研究所から分与して頂いたハウレンソウのBADHcDNAを使ってタバコ葉緑体形質転換用ベクターを作成した。Daniel らは、aadAとBADH遺伝子をタンデムにつないだ試験用ベクターを作成したが、本研究では、BADHを単独で発現させるカセットを持ち、任意の遺伝子を葉緑体へ導入できる実用ベクターを設計した。

BADHは葉緑体で働くタンパク質であるが、N末端に明確なトランジットシグナルを持たない。そこでcDNAの全長を発現ベクターへ導入することにした。BADH発現カセットは上流にrrn16プロモーターと翻訳シグナルであるSD配列、下流にpsbAのターミネーターを持ち、葉緑体内で強力に発現するように設計した。実際にBADH発現カセットを持つプラスミドpJK01を作成し、この発現カセットの全長シーケンスを調べて変異が生じていな

いことを確認した。続いて BADH 発現カセットを汎用葉緑体形質転換ベクターpRV112A'の aadA カセットと入れ換え、BADH ベクター(pJK02 図1)を構築した。pJK02の相同組換え領域は逆方向反復配列の rps7/12 と trnV の間でゲノムに2コピーの遺伝子を導入できる。又、BADH 発現カセットの上流にあるユニークな制限酵素サイトを利用して任意の遺伝子の導入が可能である。

BADH ベクターの使用により、形質転換効率が向上し多数の組換え体が作成し易くなると期待される。又、スペクチノマイシン耐性マーカーと組み合わせ、葉緑体を二重に組換えることができ、応用面での利用が期待される。

現在、構築した pJK02 の構造チェックを行っている。



## 研究 イネの葉緑体形質転換法の確立

イネを初めとする穀物類は、一般にスペクチノマイシン耐性が高い。又、研究の結果からイネはBA耐性も高いことがわかった。そこでイネの核形質転換で一般に用いられているマーカー遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子(htp)を葉緑体形質転換に用いる可能性を検討した。htpをマーカーとするイネ形質転換ベクターは共同研究者が作成し、本研究では培養条件の検討と実際の遺伝子導入を行った。htp発現カセットはプロモーターにrrn16、ターミネーターにpsbAの3'配列を使用している。現在、カルス誘導培地にのせて1週間後に形質転換を行ったカルスの再生と再分化シュートを観察している(図2)。イネの種子、カルスを再分化培地で培養して1週間の状態での葉緑体形質転換も試みる予定である。

### イネの培養・再分化系の確立

ホスト植物としては、ゲノム解析の進んでいる Japonica 種のイネ(日本晴)を選び、所属研究室における培養・再分化系の条件を最適化した。

### イネのハイグロマイシンへの耐性実験

ハイグロマイシンを0,10,20,30,40,50,60,70mg/L含んだN6CL培地へイネの種子を播種し、10日後に観察した。10mg/Lからカルスの誘導が抑えられ、50mg/L以上では芽の生長も抑えられ、わずかに芽生えた後、褐変化した。この結果より形質転換後のイネの選抜にはハイグロマイシン濃度50mg/LのN6CL培地を用いることにした。

### パーティクルガンによるイネの葉緑体形質転換

核の形質転換では種子をカルス誘導培地において1週間後の完熟胚を用いて、高い形質転換効率が得られている。そこで、葉緑体形質転換でも同じステージの胚を用いることにした。まず、 $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子をパーティクルガンで導入し、遺伝子の導入効率を最適化した。1000PSIの条件で多数のGUS活性を確認できた。この結果より、葉緑体形質転換の時期は、種子をカルス誘導培地で培養して1週間後に行うことにした。

続いて図3に示す手順に従い形質転換ベクターを導入した。



図2. ハイグロマイシン含有N6CL培地に植えて9日目のカルス(1月24日現在)

