

核・葉緑体ダブル形質転換体による発現制御の試み

人間環境科学研究科 環境情報学専攻 応用生物学研究室

学籍番号 901633002 岩井 香容

序論

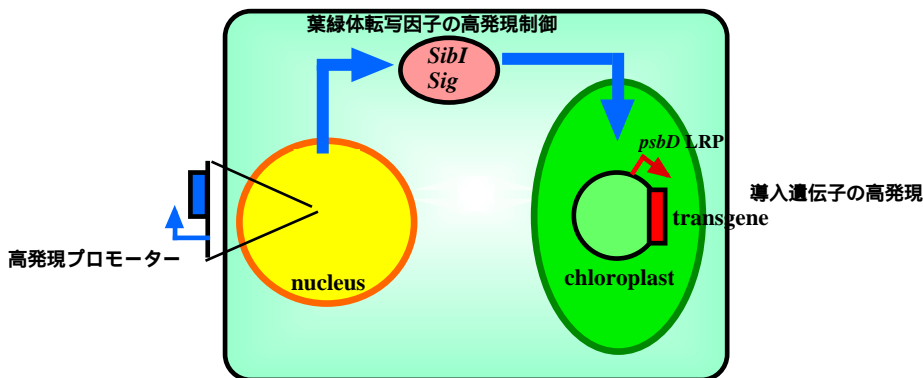
植物細胞には、自己増殖能力を持つオルガネラであるミトコンドリアと葉緑体が存在する。葉緑体は光合成反応の場であり、単細胞性の光合成原核生物であるシアノバクテリア (*cyanobacterium*) の祖先細胞が細胞内共生して進化したオルガネラである。葉緑体は、独自のゲノムと遺伝子発現システムを持ち、葉緑体分化は転写レベルで制御されている。

葉緑体 DNA の転写には、葉緑体コードでバクテリア型の PEP(plastid-encoded plastid RNA polymerase)と核コードでバクテリオファージ型の NEP(nuclear-encoded plastid RNA polymerase)の 2 種類の RNA ポリメラーゼが関与している。PEP のコア酵素は、2 個、' ' サブユニットから構成される。殆どの PEP プロモーターは、*E.coli* の ⁻⁷⁰タイプのプロモーターに似ており、転写開始点の上流 10bp に-10 配列(TATAAT)、35bp に-35 配列(TTGACA)に似た配列を持つ。

大腸菌 RNA ポリメラーゼと同様に、PEP のプロモーター認識には 因子が関わっていると考えられている。シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)では、Sig1、Sig2、Sig3、Sig4、Sig5、Sig6 の 6 つのシグマ因子が見付かっている。更に、因子と相互作用するタンパク質が葉緑体に存在する事が最近明らかになり、Sib1 と名付けられている。興味深い事に、葉緑体の 因子及びシグマ因子結合タンパク質は、全て核ゲノムにコードされており、細胞質で合成された後、葉緑体に輸送されてくる。葉緑体の PEP による転写は、因子やシグマ因子結合タンパク質を介して核によってコントロールされていると考えられている。

多くの光合成遺伝子の転写には、PEP が関係している。成熟した葉緑体中で強く転写されている光化学系反応中心 D2 タンパク質をコードする *psbD* も PEP によって転写される。*psbD* の上流には、青色光によって特異的に活性化されるユニークな光応答プロモーターである *psbD* LRP が存在する。*psbD* LRP は、機能的な-35 配列を持たず、代わりに転写開始点の-64 から-36bp に AAG-box と呼ばれるシス領域が存在する。*psbD* LRP は、葉緑体プロモーターの中で、その制御の分子機構が最も詳しく分かっているプロモーターである。

図1 葉緑体・核ダブル形質転換による葉緑体導入遺伝子の発現制御



psbD LRP の AAG-box とシーケンス特異的に結合する DNA 結合タンパク質として PTF-1 が同定されている。又最近、シグマ因子の 1 つである Sig5 が *psbD* LRP の光スイッチングに関係している可能性が指摘されている。更に、シグマ因子結合

タンパク質である SibI も、*psbD* LRP からの転写に関係している事が指摘されている。

葉緑体形質転換は、従来の核ゲノムへの遺伝子導入法をしのぐ大きな利点を持つ。例えば、多くの実用植物で葉緑体ゲノムは母性遺伝するため、従来の核への遺伝子導入の際たえず問題となる遺伝子の花粉を介した環境への飛散の危険が低減される。又、遺伝子のコピー数が多いために、導入遺伝子の大量発現が可能である。他にも遺伝子導入によるコサプレッションが起こらない、遺伝子ターゲティングによる光合成遺伝子の改変、改良が可能である等多数の特徴を持つ。従って、葉緑体形質転換法は、組換え植物の有力な次世代技術として大いに注目されている。一方、この技術をより実用的なものにするため、葉緑体ゲノムへ導入した遺伝子の発現を更に高め、自在にコントロールする技術の開発が求められている。前述したように葉緑体遺伝子の発現は、核コードの因子によって制御されている。そこで、特定の葉緑体プロモーターの活性化に関わる核コードの転写因子を核のプロモーターを使って発現をコントロールする事で、自在にコントロール出来ると考えられる(図 1)。そこで、本研究では、*psbD* LRP 活性を制御する Sib と Sig5 を用いて、*psbD* LRP から転写される外来の *gfp* 遺伝子を高レベルに発現させたり、恒常的に発現させたりするシステムの開発を目指した。

結果及び考察

タバコ SibI、*sig5* 遺伝子のクローニング

葉緑体の *psbD* 遺伝子は、シロイヌナズナ、タバコ、コムギ等多くの高等植物で青色光に応答して転写される事が知られている。最近シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)において、*psbD* LRP 活性化の分子機構に関する研究が大きく進展し、因子の一つである Sig5、因子結合タンパク質 SibI(sigma factor binding protein)、DNA 結合タンパク質 PTF-1(plastid transcription factor 1)等が関係する事が分かってきた。*psbD* LRP は、シロイヌナズナとタバコ(*Nicotiana tabacum*)の間でほぼ完全に保存されており、タバコにもシロイヌナズナと同じ制御機構が存在する可能性が高い。そこで、まず Sig5 及び SibI のホモログがタバコに存在する可能性について検討した。

Sig5 は、*psbD* LRP の光スイッチングに関連している可能性が指摘されているが、本研究の開始時点では、シロイヌナズナでしかクローニングされていなかった。そこで、シロイヌナズナの Sig1 から Sig6 までの

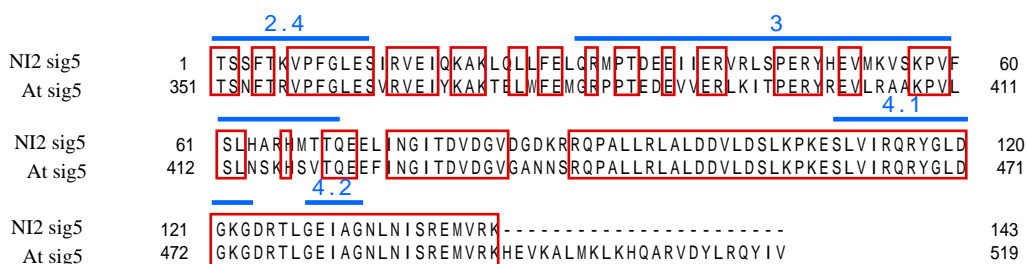


図2 タバコ *sig5* とシロイヌナズナ *sig5* のC末断片の比較

At;シロイヌナズナ、NI2;タバコ

Alignmentの上の数字は、各領域を示す。

構造を比較し、Sig5 に特異的な領域 2.4 と 4.2 の塩基配列を元にデジェネレートプライマーを設計した。光照射下で育てたタバコ展開葉から調整した mRNA を鋳型に逆転写酵素を用いた RT-PCR を行い、cDNA 断片を増幅した。この cDNA 断片の配列を決定したところ、シロイヌナズナの Sig5 と最も良く一致しており、*sig5* 遺伝子がタバコにも存在し、発現している事が分かった。更に、タバコの *sig5* 遺伝子のクローニングを進め、3'断片を得る事が出来た。クローニングした cDNA 断片は、600bp で、⁷⁰型 因子に共通な領域 2.4、3、4.1、4.2 をカバーしている(図 2)。タバコ *sig5* は、シロイヌナズナ *sig5* と、アミノ酸レベルで 75.0%、塩基レベルで 69.7%のホモロジーがあった。特に、プロモーターの-10、-35 配列の認識に関わる領域 2.4 及び 4.2 は高度に保存されていた。又、今回クローニングした領域を元に植物 因子の系統樹を作る事で、Sig5 が独立したグループを作っている事が分かった。この事は、Sig5 が他の 因子と異なる特異的な機能を有している事を、構造的に裏付けるものである。

もう一つの葉緑体転写制御因子 SibI についても、タバコのホモログ遺伝子の取得を進めた。ゲノム DNA を鋳型にする事で PCR 断片が増幅され、タバコも *SibI* 遺伝子を持つ事が明らかになった。しかし、RT-PCR による cDNA 断片の取得は出来なかった。これは、*SibI* 遺伝子の mRNA の発現が低い為であると考えられる。

現在、*sig5* の 5'末端と SibI コード領域のクローニングに取り組んでいる。最終的にはタバコの葉緑体転写制御因子遺伝子を用いたタバコ葉緑体遺伝子の発現制御システムの開発に、これらの遺伝子を利用する予定である。

シロイヌナズナ SibI 過剰発現体の解析

森川らは、SibI が *psbD* 及び *psbA* 転写に関係している事を指摘している。本研究では、シロイヌナズナ SibI 過剰発現体を解析し、SibI が *psbD*、*psbA* 以外の遺伝子の転写制御に関わっている可能性を検討した。16 時間明/8 時間暗条件で育てたシロイヌナズナから調製したトータル RNA を用いて、5 種類の primer セットを用いて、RT-PCR を行った。調べた殆どの葉緑体遺伝子(*psbD*、*rbcL*、*atp1*、*yef2*)の発現レベルは、コントロール植物と SibI 過剰発現体の間で差が見られなかった。しかし、*rpoB* 転写産物の発現が SibI 過剰発現体で低くなっているという結果が得られた。通常の RT-PCR では、定量性に問題が残る場合があるので、更に、ノーザンハイブリダイゼーションによる確認を行った。その結果、RT-PCR の結果とは異なり、シロイヌナズナ SibI 過剰発現体でも *rpoB* は正常に転写されている事が分かった。従って、SibI は NEP によって転写される *rpoB* 転写には影響しないと結論付けられた。

葉緑体・核ダブル形質転換体の作成

psbD LRP からの転写には、核コードの SibI 及び Sig5 が関係すると考えられている。従って、SibI 又は Sig5 を過剰発現させる事で、*psbD* LRP のコントロール下で発現する任意の葉緑体導入遺伝子の発現量を増強及びコントロール出来る可能性が考えられる(図 1)。この可能性を検証するため、既に作成済みの *psbD* LRP から *GFP* 遺伝子を発現する葉緑体形質転換タバコ(NT2)を対象に、*SibI* 又は *Sig5* の高発現カセットを、核ゲノムに導入し、葉緑体・核ダブル形質転換体を作成した。ホストになる NT2 は、転写開始点の-91 から+32 までの *psbD* LRP 領域をプロモーターに、合成 SD 配列から *GFP* 遺伝子を発現するように設計されており、*gfp* 遺伝子の発現が光で誘導される。一方、核ゲノムに導入した発現カセットは、強力な発現プロモーターであ

カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターから *SibI*(488bp)又は *Sig5*(1554bp)を構成的に発現する様に設計されている。発現ベクターは、エレクトロポレーション法で、アグロバクテリウムに導入し、NT2 葉緑体形質転換タバコの葉切片に感染させた。感染後 3 日後に除菌し、抗生物質であるカナマイシンを添加したカルス誘導培地で培養し、形質転換体を選抜した。4 週間後、生じたカルスをシュート誘導培地に移し、耐性カルスに由来する植物体を再生させた。*SibI* 導入植物(*SibI-psbD*)は既に複数クローンを得られているが、*Sig5*(*Sig5-psbD*)導入植物については、現在再分化待ちである。

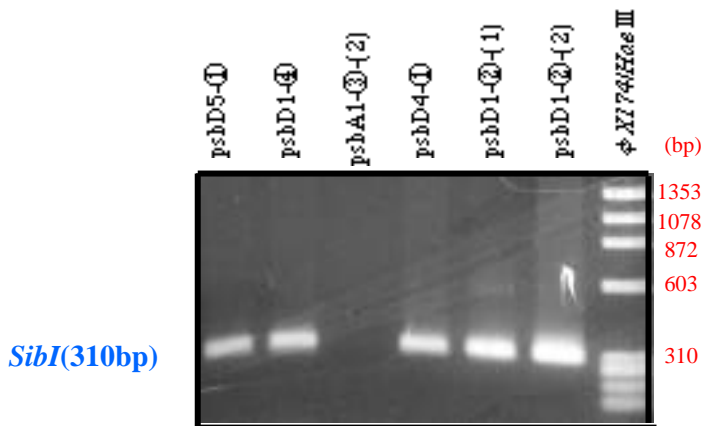


図3 ダブル形質転換体の *SibI*遺伝子の検出例

アグロバクテリウム法を用いて、核に導入した*SibI*遺伝子をPCR法によって検出した。*psbA1*- (2)には*SibI*遺伝子しか組み込まれていない。

再生した形質転換体から DNA を抽出し、*sibI* 特異的な primer を使った PCR によって T-DNA の導入を検討した(図3)。これまでに、30 件以上の形質転換体を得られている。この T₀ クローンを用いて、*SibI* 遺伝子の発現を調べた結果の一例を図4に示す。ラインによって、*sibI* の発現レベルは異なるが、これまでに 12 種のラインで、*sibI* が予想通り過剰発現している

る事を確認している。更に、T₀ 植物において、*psbD* LRP から転写される *gfp* 遺伝子の発現レベルをノーザンハイブリダイゼーションで調べたが、*gfp* 発現が特別に促進されている系統は存在しなかった。孔辺細胞等、特定の細胞でのみ GFP 発現が高まっている可能性を検討するため、レーザー蛍光顕微鏡による GFP 蛍光の観察も行ったが、局所的な効果は見られなかった。NT2 タバコでは *psbD* LRP から転写される *gfp* 遺伝子の発現は、暗所で弱まり、光で誘導される。一部のラインでは、*gfp* 遺伝子が暗所でも発現している傾向が見られた。しかし、十分な

再現性が得られておらず、より詳細な検討が必要である。そこで T₀ 植物体を土に移植し、T₁ 種子を得た。*SibI* は、若いシードリングでは発現せず、成長した葉で発現してくる。そこで、T₁ 世代を使い、若いシードリングが、根における *SibI* 発現と *gfp* 発現の関係を慎重に調べる予定である。

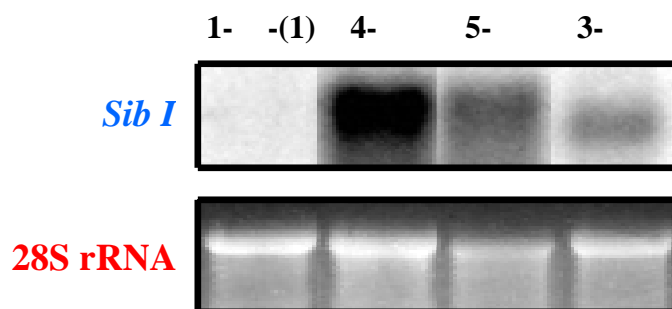


図4 ノーザンハイブリダイゼーションによる過剰発現の検出

3.5 μgのRNAを用い、*SibI*特異的のプロブとハイブリダイズさせた。一部ラインで*SibI*過剰発現している。28S rRNAはローディングコントロール。サンプルとなるRNAは96時間暗処理を行った*SibI-psbD*より抽出した。