

## 葉緑体形質転換植物における花粉を介した遺伝子伝達の定量的評価

(応用生物学) 森本里美

## 【緒言】

遺伝子組換え作物の安全性が大きな社会問題となっている。現在、一般に普及している核の形質転換植物の場合、組換え遺伝子が花粉を介して飛散する可能性が高く、近縁の野生種や非組換え作物のゲノムを汚染することで生物多様性に影響を及ぼす遺伝子拡散の危険性が危惧されている。この問題を解決する方法のひとつとして葉緑体形質転換植物が注目されている。

葉緑体は、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細胞小器官で、核とは異なる独自のゲノムと遺伝子発現系を持つ。葉緑体に導入した遺伝子は、安定かつ安易に大量発現させられることから、植物を使った新しい物質生産技術として注目されている。既に、海外では、葉緑体形質転換タバコを利用したヒト成長ホルモンの生産が実用化目前の段階にある。また、多くの作物植物の葉緑体遺伝子は母性遺伝し、花粉を介して次世代に伝達される確率が低いことが知られている。そのため、葉緑体形質転換体を使うことで組換え遺伝子の環境への遺伝子拡散を防止できるとも期待されている。しかし、その定量的な評価は十分には行われていない。特にヒト生理活性を持つような組換えタンパク質を生産するためには、葉緑体に導入した組換え遺伝子の環境や生物多様性への影響を定量的に評価した上で、必要な安全あるいは隔離対策を取る必要がある。

そこで、葉緑体形質転換に広く用いられているタバコにおいて、葉緑体組換え遺伝子が花粉を介して伝播する頻度を定量的に評価する研究に取り組んだ。

## 【実験材料および実験方法】

タバコ (*Nicotina tabacum* cv. Xanti)の野生株、およびスペクチノマイシン耐性遺伝子(aadA)と緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子(gfp)を葉緑体ゲノムに導入した形質転換タバコ(KH6 系統)を研究に用いた。組換え体の交配および育成実験には、京都産業大学工学部の閉鎖系組換え温室を用いた。人工交配は開花前のつぼみから雄ずいを除去した後、成熟させた雌ずいに花粉を交配することで行った。交配種子における組換え遺伝子の検出は、芽生えのスペクチノマイシン耐性、

GFP 蛍光検出、組換え遺伝子の PCR での検出の 3 つの方法で行い、定量化した。スペクチノマイシン耐性は、500 mg $l^{-1}$ のスペクチノマイシン添加培地(RM 培地 + 3%シヨ糖)で無菌的に発芽させた 2 週間後の芽生えで検定した。GFP 蛍光は、落射蛍光顕微鏡(NIKON ECLIPSE E600)を用いて、450 ~ 490 nm の励起光で観察される緑色蛍光を観察した。PCR 検定は、芽生えから抽出したゲノム DNA を鋳型に、gfp 遺伝子の特異的に増幅する T-141540 と EGFP-540 をプライマーに用いて行った。コントロール実験としては、葉緑体の rbcL 遺伝子を増幅させる PCR を行った。

## 【結果および考察】

## スペクチノマイシン耐性試験

野生型タバコ(WT)は、500 mg $l^{-1}$ のスペクチノマイシンを含む培地に播種すると白色の子葉が発芽する(図 1a)。これはスペクチノマイシンによって、葉緑体のタンパク質合成が阻害されるためである。一方、aadA

表 1 タバコの芽生えのスペクチノマイシン耐性

交配	耐性有 (緑色)	耐性無 (白色)	計
WT(自家受粉)	0	313	313
KH6(自家受粉)	803	0	803
WT( ) × KH6( )	2	7895	7897

遺伝子が導入された KH6 系統の場合、*aadA* 遺伝子の働きでスペクチノマイシンを代謝できるため緑色の子葉が発芽する(図 1b)。

花粉を介して *aadA* 遺伝子が伝達される確率を評価するため、野生株を母株に、KH6 株を花粉親にした人工交配により得られた種子をスペクチノマイシン含有培地に播種した。7897 個体中、スペクチノマイシン耐性を示す芽生えが 2 個体存在した(表 1, 図 1d)。残りの種子では白色の子葉が発芽し、母性形質が遺伝していることが確認された(表 1, 図 1c)。従って、花粉親にスペクチノマイシン耐性の葉緑体形質転換タバコを用いた場合、その形質が遺伝する確率は約 4000 分の 1 であることが分かった。一方、緑色個体のスペクチノマイシン耐性は不完全であり、今後 *aadA* 遺伝子の存在を確認する必要がある。

### GFP 蛍光試験

*gfp* 遺伝子が導入されている KH6 系統の葉緑体は GFP を発現し、蛍光顕微鏡で緑色蛍光を観察することができる。そこで、GFP 蛍光を指標に、花粉を介して *gfp* 遺伝子が遺伝する可能性を検討した。交配によって得られた種子 WT( ) × KH6( ) 500 個体について子葉を蛍光顕微鏡観察したが、GFP 蛍光が見られる個体は全くなく、全て母性形質を受け継いでいた。

### PCR 試験

上記の研究から、葉緑体形質転換体の組み換え形質が花粉を介して伝達される可能性は非常に低いと推定された。

一方、葉緑体ゲノムのコピー数は細胞あたり数千から 1 万と非常に高い。従って、形質が発現するまでは至らないが、わずかな組換え遺伝子が花粉を介して伝達されている頻度は、形質の遺伝確率に比べてより高い可能性がある。

そこで 15 個体の芽生えについて、組換え *gfp* 遺伝子の存在を PCR 法で検証した。結果の一部を図 2 に示す。KH6 株の自家受粉個体では 1.9kbp の DNA 断片(*gfp* 遺伝子)が増幅した。検定した 14 の人工交配体では、*gfp* 遺伝子は検出されなかったが、1 個体(WT( ) × KH6( ) #1)でわずかながら *gfp* 遺伝子が検出された。この結果は従来考えられていたよりも高い確率で葉緑体組換え遺伝子が花粉を介して伝達されている可能性を示唆している。最近、葉緑体遺伝子が高頻度に核ゲノムに移行していることが報告されている。今後、組換え遺伝子の花粉を介した伝播機構を含め、慎重な解析を進める必要がある。

今後、大規模かつ定量的な解析を進め、葉緑体組換え遺伝子の花粉を介した伝達率を正確に評価していく予定である。このデータは、葉緑体形質転換タバコを用いた有用物質生産を進めるうえで貴重なデータになると期待される。

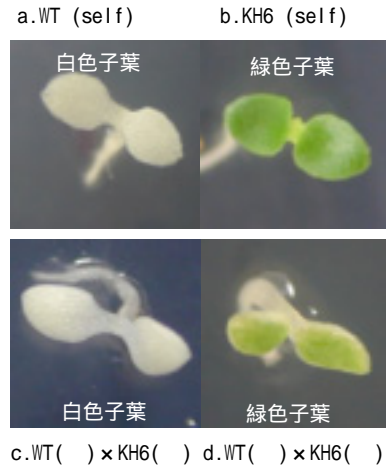


図1 芽生えのスペクチノマイシン耐性。スペクチノマイシン耐性個体は、緑色の子葉を発芽する。

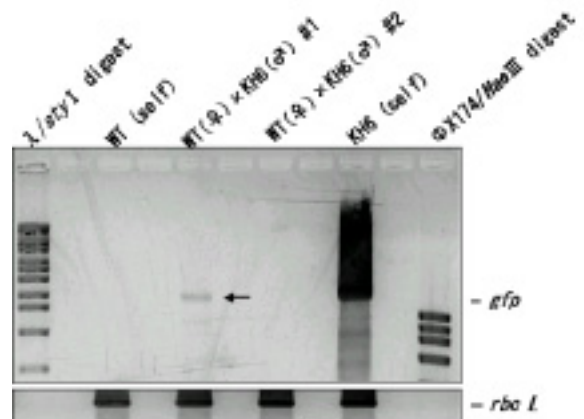


図2 PCR による *gfp* 遺伝子の検出。50  $\mu$ l の PCR 反応液の 15  $\mu$ l を電気泳動に供した。