

# 核と細胞質のゲノム情報を活用した 新しいバイオ技術の開発と作物育種への展開

平成 26 年 5 月 23 日受付

寺 地 徹  
植物ゲノム科学研究センター

## 要 旨

植物ゲノム科学研究センターは、平成 25 年 4 月、本学研究機構のもとに、以前の「植物オルガネラゲノム研究センター」を前身として設置された新しい研究センターであり、最先端のバイオテクノロジーを用いて「人類の役に立つ植物を育成する」ことを目標にしている。研究センターでは、この目標を達成するため、植物オルガネラゲノム（葉緑体とミトコンドリアのゲノム）に関連したいくつかの研究を実施している。その中から本年度の報告では、葉緑体の遺伝子組換えレタスを作成する試みについて簡単に述べるとともに、得られた組換え体に関するいくつかのデータを示したい。今回の実験で作出された組換えレタスは、葉緑体ゲノムにダイズのフェリチン遺伝子が導入されていること、その遺伝子が期待通り転写、翻訳されていることが分子的な解析により証明された。また、組換え体の葉の鉄含有量は、野生型と比べて約 2 倍に増加しており、葉緑体の遺伝子組換えが葉物野菜の栄養価を改善するのに役立つ可能性が示された。

キーワード：葉緑体、遺伝子組換え、レタス、鉄含有量、フェリチン

## 1. はじめに

植物ゲノム科学研究センターは、平成 25 年 4 月に、本学研究機構の先端科学技術研究所のもとに設置された新しい研究センターである。このセンターの前身は、文科省私立大学戦略的研究基盤形成事業の研究プロジェクトを実施するため平成 23 年に編成された「植物オルガネラゲノム研究センター」であり、事業の目的であった学内の研究基盤が形成されたことを受けて、研究機構に設置されたものである。新しい研究センターでは、以前からの研究課題を継承するとともに、時代に合わせて、研究内容をさらに深化、発展させようとしており、「人類の役に立つ植物を育成する」という大きな目標にむかって、すでに活動を開始している。

今年度の活動報告では、昨年度に研究センターで行われた複数の研究課題の中から、レタスを用いた葉緑体の遺伝子組換えについて、その概要を述べたい。この研究は、主に本学大学院工学研究科（生物工学専攻）に在籍した井上理恵子氏の修士課程の研究として実施されたものであるが、前センターの時代からタバコで培われてきた葉緑体の遺伝子組換え実験を、初めて「作物」へ応用することに成功したものである。研究センターの目標に照らしあわせて、今後の発展が大いに期待される所であり、以下、実験の概要を述べたい。

## 2. フェリチン遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ遺伝子組換えレタスの作出

### 1) はじめに

葉緑体の遺伝子組換えには、通常行われている核遺伝子を対象とする遺伝子組換えと比べ、様々な利点がある (e. g. Bock 2014)。例えば、母性遺伝する葉緑体ゲノムに遺伝子を導入することで、花粉を通じて環境中へ導入遺伝子が拡散するという懸念を払拭できる。このことは、遺伝子組換え作物の社会的許容に有利に働く。また、目的遺伝子が相同組換えにより、葉緑体ゲノムの狙った場所へ正確に導入されることも、組換え作物としての安心感を与える。もちろん、導入遺伝子産物の強発現が期待できることや、複数の遺伝子をオペロンの形で一度に導入できることなど、葉緑体の遺伝子組換えに固有の特徴も、場合によっては新しい組換え作物の作出の方法として効果的である。こうした中で、葉緑体の遺伝子組換えにより、除草剤、害虫、及び病原体に対する抵抗性や非生物的ストレスへの耐性、光合成能の向上、さらには医薬品に利用し得る成分の産生など、様々な特性を植物に付与した例がすでに報告されている (Daniel *et al.* 1998, De Cosa *et al.* 2001, Kumar & Daniel 2004)。しかし、葉緑体の遺伝子組換えが日常的に行われ、様々な組換え体が得られているのは、事実上タバコに限られており、この技術をレタスやトマト、イネといった主要な作物へ適用した例は未だ多くない (Lelivelt *et al.* 2005, Kanamoto *et al.* 2006, Lu *et al.* 2013)。

遺伝子組換え作物を利用した解決方法が模索されている課題の一つに、栄養障害が挙げられる。鉄欠乏は世界の三大微量栄養素欠乏症の一つとして広く知られており、これに起因する貧血は子供の知能や運動能力の発育遅延、妊産婦の死亡等の原因になっている。世界の人口の約30%がこの栄養障害を抱えているといわれ、効果的な治療法である鉄剤の投与も、コストや社会的な背景等の理由から、途上国において実施することは困難な状況にある。そのため、その打開策として、植物育種及び遺伝子工学の手法を用いて鉄分の豊富な作物を作出する試みがなされている。これまでイネをはじめトウモロコシ、レタスなどの核ゲノムに鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンをコードする遺伝子を導入した例が報告されている (Goto *et al.* 1999, Lucca *et al.* 2002, Drakakaki *et al.* 2005)。

フェリチンは動物、植物、細菌等ほぼ全ての生物種において見られる多量体タンパク質であ

り、24個のサブユニットからなる中空の構造を取る。この内腔に最大4,500個の鉄イオンを貯蔵する事ができ、細胞内の遊離鉄を捕捉することで、細胞を障害する有害分子であるヒドロキシラジカルの発生を抑える作用を持つ。植物のフェリチン遺伝子は核にコードされており、サブユニット前駆体は細胞質で合成される。この前駆体はN末端側にトランジットペプチド (TP) とエクステンションペプチド (EP) を持つ。TPは、前駆体を葉緑体等の色素体へと輸送する過程で除かれるが、EPは色素体中の成熟フェリチンの表面に残り、鉄の出入りに関する重要な役割を担っていることが示唆されている (Yang *et al.* 2010, Li *et al.* 2013)。

我々は前センターで、栽培タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi 及び SR1) を材料に、葉緑体の遺伝子組換えに関する基礎研究を行ってきた。その結果、葉緑体ゲノムにダイズのフェリチン遺伝子が導入された組換えタバコの作出に成功している。その中で、フェリチンを持つ組換え体では、葉の鉄含有量が野生型タバコに比べ約2倍に増加するという研究結果を得た。また、フェリチン遺伝子の全長cDNAを導入した個体に、葉の黄変や褐変が見られたのに対し、TPをコードする部分を除いたcDNA配列 (ferritin/delTP) を導入した個体においては、そのような表現型への悪影響が見られないことも示された (植村ら 2010)。

そこで今回、上記研究の作物への応用として、レタスの葉緑体ゲノムにフェリチン遺伝子を導入し、葉の鉄含有量を増加させたレタスを作成することができないか、実験により検証した。レタスは葉もの野菜の中でも特に植物工場における水耕栽培システムが完成しており、安定した生産が可能である。さらに、比較的生育が早く、収穫できる葉の量も多いため、直接食用とする以外にも、高度に精製された安全なタンパク質を大量に生産させるプラットフォームとして、健康食品や医療分野への利用が期待できる。このような理由から、本研究ではレタスを実験材料とした。

本研究では、パーティクルガン法を用いてダイズのフェリチン遺伝子 (ferritin/delTP) をレタスの葉緑体ゲノムに導入した。実験を進めるのにあたり、ボンバードメント及び培養の条件の検討を行った。次に、抗生物質を含む培地で選抜した個体における導入遺伝子の有無を調査し、得られた組換え体については導入遺伝子の転写・翻訳を種々の分子生物学的方法で解析した。さらにそれらを開花、結実させて後代の種子を得、播種、育成した T<sub>1</sub> 個体については同様の解析に加え、野生型レタスとの表現型の比較解析も行った。それらの結果についても述べたい。

## 2) 材料及び方法

### a) プラスミドコンストラクトの作成

レタスへ導入した ferritin/delTP コンストラクトは、以下の手順で構築された。まず栽培レタス (*Lactuca sativa* cv. Cisco) から抽出した全DNAを鋳型に、葉緑体ゲノムにあるIR領域の *rps7/12* と *trnV*、16SrRNAを含む約3kbpの断片を増幅し、この増幅断片を *in-fusion* ク

ローニングシステム (Takara) を使用して、プラスミドベクター pUC19 にクローニングした。次に、既存の栽培タバコ用コンストラクトである pPRV112A'-fer/delTP を鋳型に、プロモーター及びターミネーターを含むフェリチン遺伝子と選抜マーカーの *aadA* 遺伝子を増幅した後、そのカセットを先にクローニングしたレタスの IR 領域の *rps7/12* と *trnV* の間に再度 *in-fusion* クローニングシステムを使用して挿入した。これを、レタス用の ferritin/delTP コンストラクト (以下、pLs112A'-fer/delTP) と呼ぶ (図 1)。

### 形質転換ベクター (pLs112A' -fer/delTP)

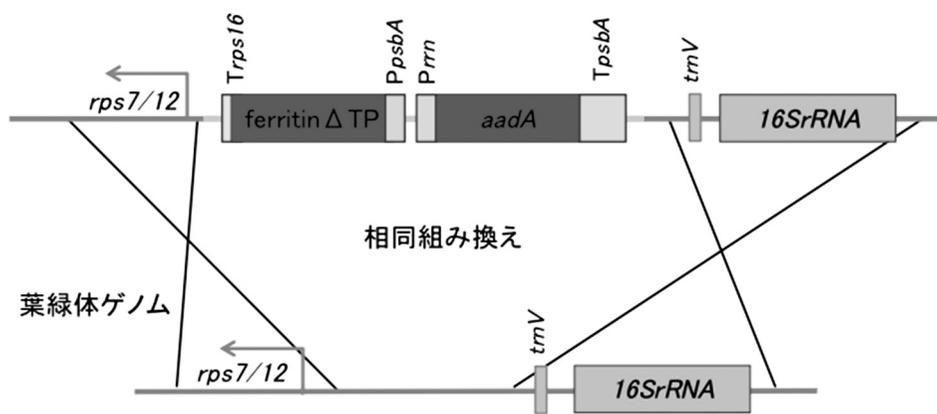


図 1 葉緑体の形質転換実験に用いたプラスミドコンストラクト

図 1 に示すように、フェリチン遺伝子のプロモーターには *PpsbA*、ターミネーターには *Trps16*、*aadA* 遺伝子のプロモーターには *Prrn*、ターミネーターには *TpsbA* をそれぞれ使用した。

#### b) レタス葉緑体の形質転換

遺伝子導入に用いる外植片には、MS (Murashige & Skoog) 培地 (スクロース 30g/L、アガー 8g/L) を含むプラントボックスで無菌的に約 1~2 カ月間生育させたレタスの葉を使用した。なお、生育中の容器の封にはサージカルテープを使用した。まず、クリーンベンチ内で、シャーレ中の前培養培地 (MS-I~IV、0.1mg/L の  $\alpha$ -ナフチル酢酸、1mg/L の 6-ベンジルアミノプリン、30g/L のスクロース、8g/L のアガーをそれぞれ含む) の上に滅菌した濾紙を置き、切り出した葉を、高濃度アガープレート (アガー 25g/L、以下「まな板」) 上に置いた。次に、まな板上の葉からカミソリの刃を用い手早く主脈及び葉縁部を切除した後、葉の部分を大きさに応じて 2 から 4 等分したものを、表面が上になるように、かつ全体が密着するように置床した。その後アルミホイルで遮光し、24°C の植物用インキュベーターで一日間静置した。

25mg の金粒子 ( $\phi 0.6\mu\text{m}$ ) を含む 1.2mL のエタノール懸濁液から、1 回分あたり 110 $\mu\text{L}$  を

取り分け、液中の金粒子をエタノールで洗浄した後、滅菌水 230 $\mu$ L を加え懸濁した。ここに 250 $\mu$ L の塩化カルシウム (2.5M)、25 $\mu$ g のプラスミド DNA、50 $\mu$ L のスペルミジン (0.1M) を加え 10 分間水上で静置し、その間 1 分ごとに 10 秒間ボルテックスミキサーで懸濁することで金粒子に DNA を吸着させた。この金粒子をエタノールで洗浄し、塩を除去した後に 60 $\mu$ L のエタノールに再懸濁した。

パーティクルボンバードメントには PDS-1000/He (Bio-Rad) を使用した。1100psi (当初は 900psi) のラプチャーディスクを用い、金粒子を乗せたマクロキャリアのホルダーを装置の最上段に置き、撃ち込まれるレタスの葉を下から 5 段目に置いた。1 回の実験で 10 ショット行った (レタスの葉 20 枚分に相当)。金粒子が撃ち込まれた葉を遮光した状態で 24 $^{\circ}$ C の植物用インキュベーターに 2 日間静置した後、「まな板」上の葉をカミソリの刃で細かく (4mm 角) 切り分け、シャーレ内の選抜培地 (前培養培地 + スペクチノマイシン 30mg/L) に、葉の表面が下側になるように素早く置床した。培地上に乗せる葉切片はシャーレ 1 枚あたり 15~16 枚とし、封にはサージカルテープを使用した。この葉切片を 24 $^{\circ}$ C の植物用インキュベーター (明期: 16 時間、暗期: 8 時間) で 4~8 週間培養し、組換え体を選抜した。なお、この間 2 週間に一度のペースで葉切片を新しい選抜培地に移植した。また、使用した装置及び器具は、全て Bio-Rad 社製のものであり、操作は装置に付属のマニュアルに従って行った。

#### c) 選抜個体の育成

選抜培地上に静置した葉切片から再分化したシュートを、スペクチノマイシン (30mg/L) を含む MS 培地 (スクロース 30g/L、アガー 8g/L) 入りのプラントボックスに移植し、幼植物へと生育させた (図 2)。

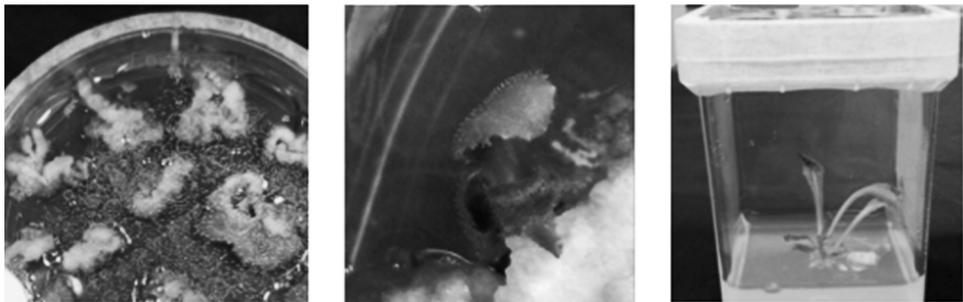


図 2 ボンバードメント後の選抜培地に生じたレタスのシュート

#### d) PCR による導入遺伝子の確認

植物が適当な大きさ (主脈の長さが 3cm 以上の葉が 3 枚程度あり、0.1g のサンプル量が確保できる) になったとき、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用し、葉から全 DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型に、GO Taq DNA polymerase (Promega) を用いてフェリチ

ン遺伝子と選抜マーカー *aadA* に特異的なプライマーペア (*ferritin-aadA*) による PCR を行い、再分化個体における目的遺伝子の有無を調べた。PCR の条件は、反応液量 20 $\mu$ L、94 $^{\circ}$ C 3 分の変性後、変性 94 $^{\circ}$ C 1 分、アニーリング 55 $^{\circ}$ C 1 分、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 1 分のサイクルを 30 回とした。続いて Ex Taq (Takara) を用いて、葉緑体 DNA 配列 (ベクターと葉緑体ゲノムとの相同領域である *rps7/12* の外側に位置する) と、フェリチン遺伝子に特異的なプライマーペア (*rps7/12-ferritin*)、及び同じく葉緑体 DNA 配列 (相同領域 16SrRNA の外側の配列) と、*aadA* に特異的なプライマーペア (*aadA-16SrRNA*) による PCR を行い、目的遺伝子が葉緑体ゲノムの標的部位に導入されているかを調べた。条件は、反応液量 50 $\mu$ L、94 $^{\circ}$ C 3 分の変性後、変性 94 $^{\circ}$ C 30 秒、アニーリング 55 $^{\circ}$ C 30 秒、伸長反応 68 $^{\circ}$ C 3 分のサイクルを 25 回とした。この実験に用いたプライマーペアの結合部位を図 3 に、塩基配列を表 1 にまとめた。

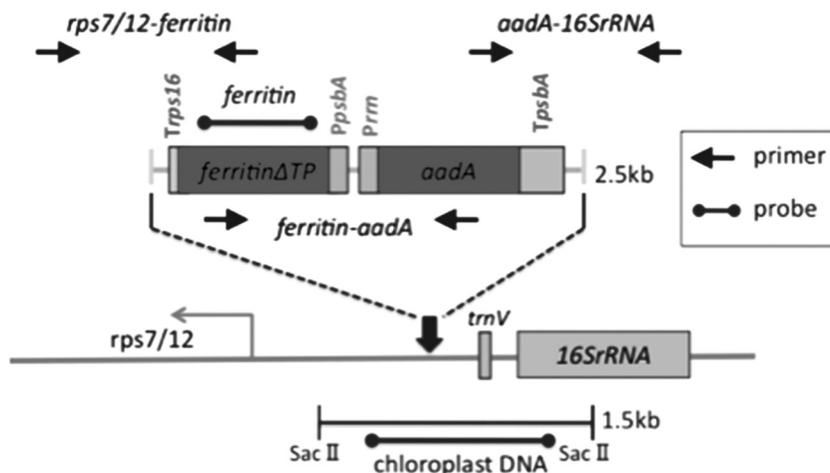


図 3 今回の実験に用いた PCR プライマーの位置およびプローブの領域

表 1 PCR に用いたプライマー

増幅領域	プライマー名	配列 (5'→3')
<i>ferritin-aadA</i>	Fe_R582	GTTGCGATCTGCCACACTGTGC
	aadA_R678	CCAAGATAAGCCTGTCTAGCT
<i>rps7/12-ferritin</i>	Ls_rps12_F1	CTACAACGCACTAGAACGCC
	Fe_F424	GAAAGAGAGCACGCTGAAAAGC
<i>aadA-16SrRNA</i>	aadA/F766	GAGATCACTAAGGTAGTTGGC
	Ls_16SrRNA_R1458	GCTACCTTGTTACGACTTCAC

#### e) Southern 解析

前節の方法で目的遺伝子が葉緑体ゲノムへ導入されていることが確認された個体について、葉緑体ゲノムが組換え型のホモプラスミックであるか、あるいは組換え型と野生型のヘテロプ

ラミックであるかを調べるため、また目的遺伝子が標的部位に正確に導入されているかを確認するため、以下の方法で Southern 解析を行った。育成した組換え体及び野生型レタスの葉から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用して全 DNA を抽出し、その 2 $\mu$ g を *Sac*II (NEB) で処理した後、0.8% のアガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後、DNA をナイロン膜 (Biodyne Plus, Pall) に転写した。プローブは 2 種類の方法で調製した。標的部位に特異的な葉緑体プローブは、野生型レタスの全 DNA を鋳型に PCR を行い、葉緑体ゲノムの標的部位を含む DNA 断片を増幅し、DIG DNA Labeling Kit (Roche) のランダムヘキサマーを用いて標識した。また、導入遺伝子に特異的なプローブは、PCR DIG Labeling Mix (Roche) を用いて標識した。実験に用いたプローブの位置と予想される検出断片のサイズを図 3 に記す。なお、ハイブリダイゼーションは 68 $^{\circ}$ C で一晩行い、アルカリフォスファターゼの基質に CDP-Star (Applied Biosystems) を用いて発光法によりシグナルを検出した。これらハイブリダイゼーション、ポストハイブリダイゼーション及びシグナル検出は、全てマニュアル (DIG application manual for filter hybridization, Roche) 記載の方法で行った。

#### f) Northern 解析

組換え体及び野生型レタスの葉より、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて、添付プロトコールに従い全 RNA を抽出した。このうち 3 $\mu$ g を、5% のホルムアルデヒドを含む 1.25% のアガロースゲルを用いて電気泳動した後、ナイロン膜に転写した。前述のフェリチンプローブを用いて、50 $^{\circ}$ C で一晩ハイブリダイゼーションを行い、CDP-Star (Applied Biosystems) を基質に用いる発光法によりシグナルを検出した。ハイブリダイゼーション、ポストハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は、全てマニュアル (DIG application manual for filter hybridization, Roche) 記載の方法に従った。

#### g) SDS-PAGE 及び Western 解析

組換え体及び野生型レタスの葉 0.1g を氷で冷却した乳鉢に入れ、タンパク質抽出バッファー (20mM Tris-HCl (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、20mM EDTA、1mM 塩化マグネシウム、1% (V/V) 2-メルカプトエタノール、1mM フッ化フェニルメチルスルホニル、0.1% (W/V) 1,10-フェナントロリン) を 1mL 加え、乳棒ですりつぶした。抽出物を 14,000rpm、25 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心後、上清を回収した。タンパク質の定量は BSA をスタンダードに、RC DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) を使用して行った。

抽出したタンパク質を 2 枚の 12.5% ポリアクリルアミドゲルを使用して同時に泳動し、1 枚のゲルは CBB 染色 (Bio Safe, Bio-Rad)、もう 1 枚のゲルは転写にそれぞれ使用した。転写装置はトランスプロット SD (Bio-Rad) を使用し、12V の電圧を 20 分間かけ、ゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜 (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) に転写した。Western

解析のブロッキング及び検出には、ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences) を使用した。フェリチンを検出するため、フェリチンに対する一次抗体 (電力中央研究所より譲渡していただいた) を 2,000 倍に希釈して反応させた。ペルオキシダーゼを結合させた二次抗体 (抗ウサギ IgG、Wako) は 5,000 倍に希釈して使用した。

#### h) 水耕栽培と表現型の調査

組換え体 A 系統、B 系統 (共に  $T_1$ )、及び野生型レタスを、微粉ハイポネックスを 1,000 倍希釈した水溶液を用いて水耕栽培にて育成し、その外観を観察した。

#### i) クロロフィル量の測定

各個体の本葉を切り抜いて作成した直径 1.0cm のリーフディスクを、1mL の N,N-ジメチルホルムアミドに 1 枚ずつ浸し、遮光した状態で、低温 (4°C) で一晩静置し、リーフディスク中のクロロフィルを溶出した。溶出したクロロフィルの吸光度を 647nm、664nm、750nm の 3 つの波長で測定し、この値からクロロフィル含有量を算出した。

#### j) 鉄含有量の測定

各個体の本葉を切り取り、主脈を除いた部分 0.6g を液体窒素中で粉碎、5mL の HCl (0.1M) に懸濁して 10 分間転倒攪拌した後、4°C、8,000rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。この上清 50 $\mu$ L に Tris-HCl(pH8.0) 50 $\mu$ L を加え、pH 試験紙を用いて pH が 2 以上であることを確認し、試料液を調製した。メタロジェニクス鉄測定 LS (ニトロソ PSAP 法) (Metallogenics) を用い、マニュアルに従ってこの試料液中の鉄をタンパク質から解離させ、鉄-Nitroso-PSAP 錯体を形成させた後、吸光度を波長 750nm で測定し、アッセイ検体中の鉄濃度を算出した。

### 3) 結果

#### a) パーティクルボンバードメント

本研究では ferritin/delTP を持つ葉緑体形質転換ベクター、pLs112A'-fer/delTP を、パーティクルボンバードメント法によりレタスの葉に打ち込んだ。結果を表 2 に示した。

#### b) 葉緑体形質転換体

$T_0$  世代において、2 系統の葉緑体形質転換体を得た。これは、条件の改善後に選抜培地上で再分化した 3 つのシュート (シュート 1、2、3) のうち、PCR により導入遺伝子の存在が確認できたシュート 1 を 2 つに切り分け、A 及び B の 2 系統としたものである。また、これらの個体は自殖により次世代 ( $T_1$ ) の種子を得ることができた。本報告では、 $T_0$  世代は A 系統のみを、 $T_1$  世代は A、B の 2 系統のデータを示した。

表2 パーティクルボンバードメントの結果

		改善前	改善後
実験条件	レタス品種	シスコ、オリンピア、ロメイン (コスレタス)	キングクラウン
	ヘリウムガス圧	900psi	1100psi
	選抜培地中の spectinomycin 濃度	50mg/l	30mg/l
	金粒子量	500μg/shot	230μg/shot
	DNA 量	1.67μg/shot	2.50μg/shot
	ラブチャーディスクから葉までの距離	6cm	12cm
	葉切片の作成	前培養培地上	「まな板」上
	葉切片の培養	同一の培地上に静置	2週間毎に新しい培地へ移植
ショット数		144	70
シュート数		3	6
再分化個体の数 (T <sub>0</sub> )		0	1

## c) Southern 解析

組換え体 T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub> 世代及び野生型レタスから抽出した全 DNA を用いて Southern ハイブリダイゼーションを行った。T<sub>1</sub> 世代の実験結果を図4に示す。フェリチン遺伝子に特異的なプローブを使用したハイブリダイゼーションでは、野生型を除く全ての個体に4.0kbのバンドが検出された。葉緑体 DNA プローブを使用したハイブリダイゼーションでは、野生型の個体には、1.5kbのバンドのみが観察されたのに対し、組換え体では全ての個体に、先のフェリチン遺伝子プローブで検出されたものと同じ4.0kbのバンドのみが検出された(図4)。

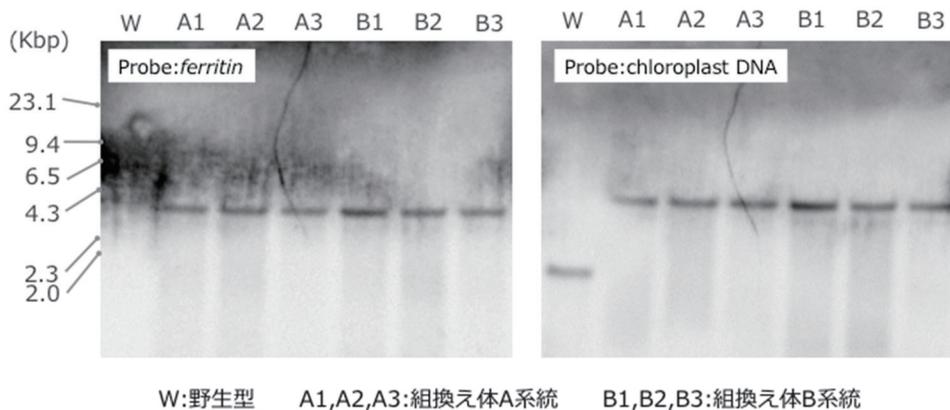


図4 サザンハイブリダイゼーション

## d) Northern 解析

組換え体 T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub> 世代及び野生型レタスから抽出した全 RNA とフェリチン遺伝子プローブを用いて行った Northern ハイブリダイゼーションでは、予想される 760bp の大きさのバンドが、組換え体にも観察された。T<sub>1</sub> 世代の実験結果を図 5 に示す。

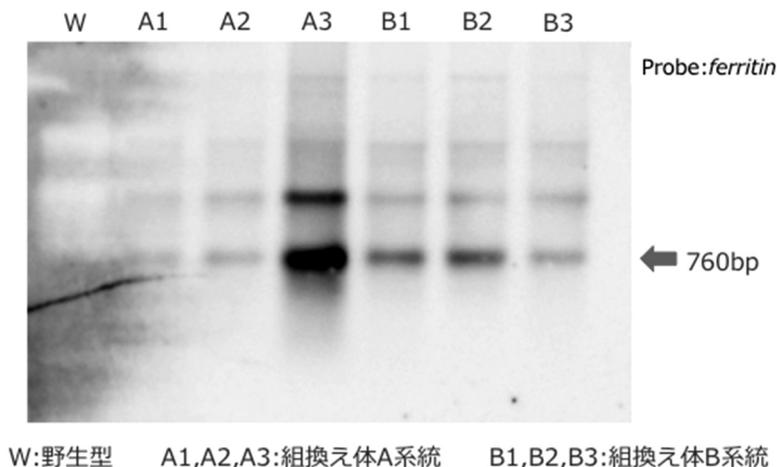


図 5 ノーザンハイブリダイゼーション

## e) SDS-PAGE 及び Western 解析

組換え体及び野生型レタスから調製した全タンパク質を用いて行った SDS-PAGE 後の CBB 染色では、T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub> 世代共に組換え体と野生型レタスの間でバンドパターンに違いは見られなかった。T<sub>1</sub> 世代の実験結果を図 6 に示す。

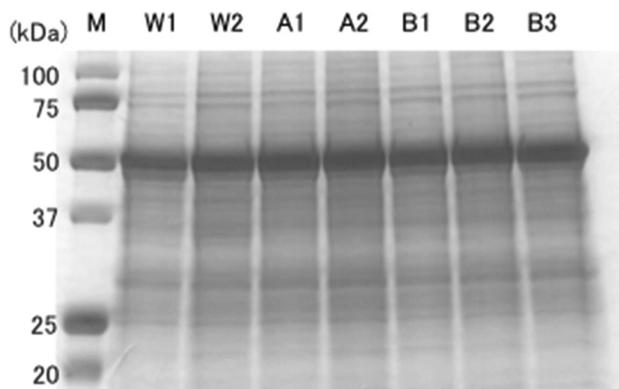


図 6 SDS-PAGE

フェリチン抗体による Western 解析では、T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub> 世代共に、組換え体において 25kDa の位置に ECL の発光シグナルが検出された。また、T<sub>1</sub> 世代を用いた実験では、野生型においても組換え体と同じ 25kDa の位置に、弱いシグナルが検出された (図 7)。

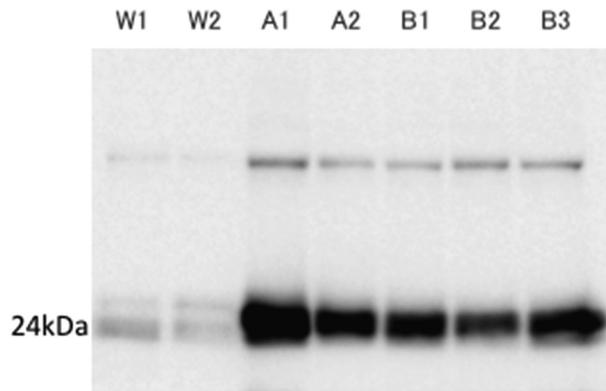
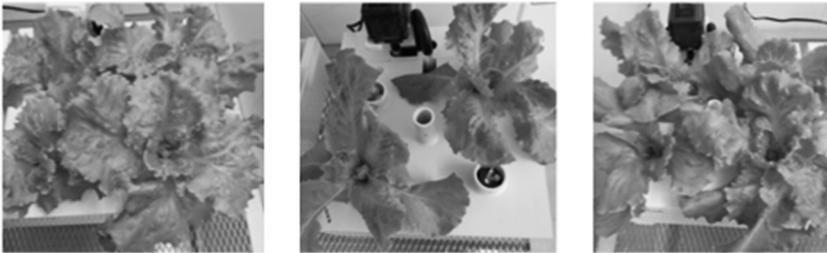


図7 ウェスタン解析

## f) 水耕栽培で育成した植物体の比較

組換え体 T<sub>1</sub> 世代及び野生型レタスを、ハイポネックスを肥料として与えた水耕栽培で4週間育成したときの様子を図8に示す。組換え体 A 系統では4個体のうち2個体が著しい生育不良を示したが、他の2個体については、B 系統や野生型の個体とその生育状態に目立った差は認められなかった。

## 外観



## 本葉

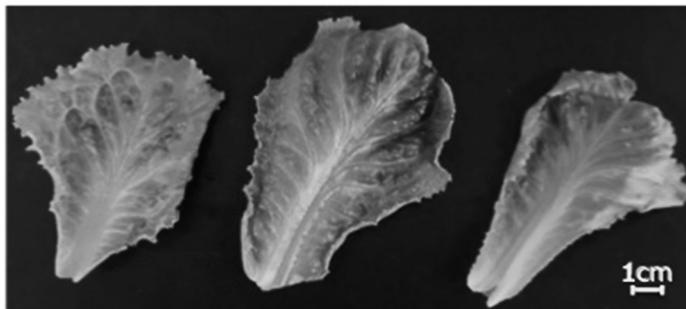


図8 レタスの表現型

## g) クロロフィル量の測定

各個体の本葉から作成したリーフディスクのクロロフィル含有量を測定し、その値を比較した結果、各系統間に有意な差は認められなかった。なお、組換え体のリーフディスクのクロロフィル含有量は野生型レタスを1としたときの相対値で示した（図9）。

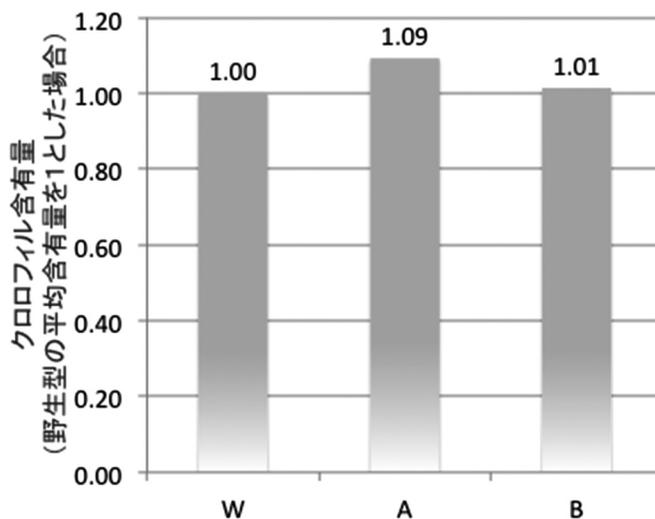


図9 クロロフィル含有量

## h) 葉に含まれる鉄含有量の測定

組換え体T<sub>1</sub>世代及び野生型レタスの本葉中に含まれる鉄量を測定し、系統ごとの平均値を比較した結果、組換え体A系統、B系統共に、野生型に比べ約2倍の鉄含有量を示した（図10）。

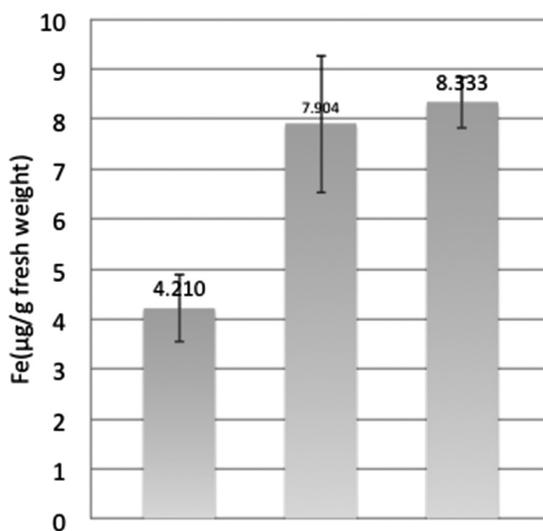


図10 鉄含有量

#### 4) 考察

##### a) レタスの葉緑体形質転換

本研究では、フェリチンをコードする遺伝子をもつ pLs112A'-fer/delTP コンストラクトをレタスの葉緑体に導入するべく、合計 214 回のパーティクルボンバードメントを行った (表 2)。当初、金粒子の調製は栽培タバコの場合と同様に行い、また、ボンバードメントの条件は、レタスの栽培品種の一つであるシスコを材料に葉緑体ゲノムに *aadA* 遺伝子を導入した先行研究 (Kanamoto *et al.* 2006) に倣って実験を行っていたが、シュートを得ることはできなかった。そこで、シスコを含む 17 品種のレタスの葉を 4mm 角に刻み、再分化培地に置床して培養し、最も再分化率の良かった (データ未掲載) キングクラウンに材料を変更した。加えて、パーティクルボンバードメントのショットの圧力や選抜培地中のスペクチノマイシンの濃度などいくつかの条件を検討したが、組換え体は得られなかった (144 ショットで 0 個体)。一方、後に発表されたレタスの葉緑体形質転換プロトコル (蘆田ら 2012) を参考に実験方法を改善したところ、組換え体を得ることができた (70 ショットで 1 個体)。改善前と比較すると、ボンバードメントに使用する金粒子の濃度は約 2 分の 1、DNA の量は 1.5 倍であり、ラプチャーディスクから葉までの距離も 6cm から 12cm に離れた。これにより、レタスの葉への物理的なダメージを軽減しつつ、葉緑体中に効果的に DNA を届けることができたと思われる。加えて、その後の葉の処理を「まな板」上で行ったことと、培養中の葉切片を定期的に新しい培地に移植したことで、乾燥及び二次代謝産物の蓄積を防ぎ再分化への悪影響を避けられたことが、今回組換え体を得られた要因であると考えられる。

##### b) 葉緑体ゲノムにフェリチン遺伝子を持つレタスの特徴づけ

植物のフェリチンタンパク質は葉緑体をはじめとした色素体に局在している。これは、TP の働きによりサブユニットの前駆体が色素体に輸送されるためである (Gaymard *et al.* 1996)。植村ら (2010) によるフェリチンタバコの先行研究では、葉緑体内では不必要と思われる TP の領域をあらかじめ除いたフェリチン遺伝子を葉緑体ゲノムに導入することで、フェリチン遺伝子全長を導入した際に現れる表現型への悪影響を抑えつつ、鉄分の豊富な組換え体を作成することに成功したことが報告されている。本研究においても同様の効果を得ることができた。今回作出した組換えレタスは、図 8 に示したとおり、A 系統の T<sub>1</sub> 2 個体 (A2、A3) を除いては野生型と遜色のない外観を呈し、約 2 倍の鉄含有量を示した。これにより、組換え体の葉緑体中で強発現しているフェリチンは、鉄貯蔵能を有することが示された。しかしながら、図 7 の Western 解析の結果から推察される組換え体のフェリチンの発現量は、明らかに野生型の 2 倍以上であり、フェリチンタンパク質の量と鉄含有量は比例しなかった。また、高濃度の鉄培地で各系統を育成し鉄含有量を測定したが、組換え体の鉄含有量は野生型の 2 倍以上にはならなかった。これらの理由としては、根からの鉄の吸収が鉄含有量を増加させるには十分

ではないことが考えられる。何らかの方法で鉄の吸収を強化できれば、鉄含有量を更に高められるのではと思う。

Gotoら(2000)は、核にフェリチン遺伝子を導入した組換えレタスが、鉄の蓄積に加え、旺盛な生育を示したと報告している。本研究で作出した組換え体と野生型レタスの生育状態に違いがみられるか、興味もたれるところであるが、水耕で育てた組換え体 A1, A2, B1~B4 と野生型には、外見上大きな違いはなかった。一方、前節で触れた、組換え体 A3, A4 (図 8, 上段中央の右下及び左上) は極端な生育不良を生じた。A3 は図 7 で示したノーザン解析で、ひときわ強いシグナルが検出された個体であり、RNA の転写量は他と比べて非常に多いことがわかっている。なぜこのような個体が発生したのか、またなぜ A 系統と B 系統で違いが出たのかについて、現状では明確な理由を提示できない。T<sub>0</sub> 段階での株分けが何らかの影響を与えたかもしれない。

### 5) おわりに

本研究では、フェリチン遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ遺伝子組換えレタスの作出に初めて成功した。また組換え体について、導入遺伝子が正しく転写・翻訳されているかを種々の分子生物学的手法で調査した。さらに、翻訳産物の作用が組換え体の表現型にどのような影響を与えるのかについても分析を行った。その結果、組換え体では、導入遺伝子にコードされているフェリチンが大量に発現し、その働きにより本葉の鉄含有量も増加していることが示された。

しかし、翻訳産物と鉄含有量の増加量には大きな差がみられ、組換え体の鉄含有量は最高でも野生型の 2 倍程度にとどまった。培地中の鉄濃度を上げても同程度の値しか得られなかったことから(データ未掲載)、鉄の根からの吸収自体が律速になっているのではないかと考えた。これに関して、タバコを用いた先行研究の中で、鉄吸収遺伝子(鉄還元酵素及び鉄トランスポーターをコードする遺伝子)の根における発現は、葉の鉄含有量によって調節されることがわかっている。すなわち、葉で鉄欠乏が認識されたとき、根における鉄吸収遺伝子の発現が促進される。残念ながら、その機構は未だ明らかになっていない(Enomoto *et al.* 2007)。葉の鉄含有量が増加すると根からの鉄吸収が抑えられることが事実だとすると、葉の鉄含有量を飛躍的に増加させようとする本研究の目標達成には障害となる。葉から根への鉄に関する情報伝達を阻害するなど、さらなる戦略が必要とされるかもしれない。いずれにせよ、この調節機構の解明が望まれる。

## 3. おわりに

飽食の国、日本では、なかなか実感がわかないが、現在も世界の様々な地域で飢餓が生じている。世界の人口は 2050 年に 91 億に達すると予測されるし、食料から摂取する一人あたりの

エネルギー量（カロリー）も今の水準よりさらに増加すると予想される。現行の農業でこの人口を本当に養うことができるのか、議論のあるところである（[www.nature.com/food](http://www.nature.com/food)）。加えて、将来の気候変動にともなう耕作適地の減少や水不足は回避できそうにない。したがって、乾燥などの非生物学的ストレスに強い作物を育成することの必要性は言を俟たないし、雄性不稔による  $F_1$  雑種化など、作物の収量を飛躍的に増大させる遺伝的システムの開発も不可欠である。

植物ゲノム科学研究センターでは、進展著しい植物ゲノムの研究成果を積極的に取り入れ、作物の遺伝・育種に関する高度な研究を実施する予定である。例えば当センターでは、基盤技術として、葉緑体の遺伝子組換えを実施しているが、本報告で紹介したレタス以外にも、タバコ、ならびに植物分子生物学で用いられるモデル植物のひとつ、ベンサミアナタバコで組換え体を得ることに成功している（田中ら 2012）。当センターでは、主要な作物であるトマトとパンコムギについても葉緑体の遺伝子組換え体を得る努力を続けており、遺伝子導入に用いる外植片の調製を容易にするため、それぞれ筑波大学遺伝子実験センター及び鳥取大学乾燥地研究センターとの共同研究を実施した。

ミトコンドリアゲノムへの遺伝子導入は未着手の課題である。高等植物のミトコンドリアの形質転換は、まだ世界のどこの研究室でも成功しておらず、植物界を見渡しても単細胞緑藻のクラミドモナスで方法が確立しているだけである（Remacle *et al.* 2006）。一方、近年、*msh1* など高等植物のミトコンドリアゲノムの構造に影響をおよぼす核遺伝子が何種類か同定されてきている（Sandhu *et al.* 2007）。この遺伝子の変異を利用してミトコンドリアゲノムを再編することにより、新規雄性不稔など人類に有用な植物を開発することも夢ではなくなっている。そのため、近年、飛躍的に発展したゲノム解読の手法を駆使して、植物ミトコンドリアゲノムの構造を解明するとともに、ミトコンドリアの遺伝子あるいはゲノムと相互作用する核遺伝子の構造と機能を明らかにする必要がある。

なお、当研究センターでは、人工制限酵素を用いたゲノム編集、接ぎ木によるジーンサイレンシング、エピジェネティクスの制御による遺伝子発現の変更など、いわゆる NBT (New Plant Breeding Technique) の導入にも興味を持っている。新しい遺伝子改変技術を、直接的あるいは間接的に植物オルガネラゲノムに適用することを試み、有用植物の作出にむけた研究を加速したいと考えている。

## 謝辞

本報告に用いたデータは、京都産業大学工学研究科井上理恵子氏の実験による。また、京都産業大学植物ゲノム科学研究センター職員植村香織、岡山大学資源植物科学研究所坂本亘教授、同高見常明博士の諸氏には、実験の遂行にあたり様々なご協力を頂いた。ここに深謝の意を表する。

## 参考文献

- Bock, R. (2014). "Genetic engineering of the chloroplast: novel tools and new applications." *Curr Opin Biotechnol* 26: 7-13.
- Daniell, H., R. Datta, *et al.* (1998). "Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome." *Nat Biotechnol* 16(4): 345-348.
- De Cosa, B., W. Moar, *et al.* (2001). "Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals." *Nat Biotechnol* 19(1): 71-74.
- Drakakaki, G., S. Marcel, *et al.* (2005). "Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and *Aspergillus* phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron." *Plant Mol Biol* 59(6): 869-880.
- Enomoto, Y., H. Hodoshima, *et al.* (2007). "Long-distance signals positively regulate the expression of iron uptake genes in tobacco roots." *Planta* 227(1): 81-89.
- Gaymard, F., J. Boucherez, *et al.* (1996). "Characterization of a ferritin mRNA from *Arabidopsis thaliana* accumulated in response to iron through an oxidative pathway independent of abscisic acid." *Biochem J* 318 (Pt 1): 67-73.
- Goto, F., T. Yoshihara, *et al.* (1999). "Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene." *Nat Biotechnol* 17(3): 282-286.
- Kanamoto, H., A. Yamashita, *et al.* (2006). "Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids." *Transgenic Res* 15(2): 205-217.
- Kumar, S. and H. Daniell (2004). "Engineering the chloroplast genome for hyperexpression of human therapeutic proteins and vaccine antigens." *Methods Mol Biol* 267: 365-383.
- Lelivelt, C. L., M. S. McCabe, *et al.* (2005). "Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.)." *Plant Mol Biol* 58(6): 763-774.
- Li, M., S. Yun, *et al.* (2013). "Stability and iron oxidation properties of a novel homopolymeric plant ferritin from adzuki bean seeds: a comparative analysis with recombinant soybean seed H-1 chain ferritin." *Biochim Biophys Acta* 1830(4): 2946-2953.
- Lu, Y., H. Rijzaani, *et al.* (2013). "Efficient metabolic pathway engineering in transgenic tobacco and tomato plastids with synthetic multigene operons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(8): E623-632.
- Lucca, P., R. Hurrell, *et al.* (2002). "Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice." *J Am Coll Nutr* 21(3 Suppl): 184S-190S.
- Remacle, C., P. Cardol, *et al.* (2006). "High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(12): 4771-4776.
- Sandhu, A. P., R. V. Abdelnoor, *et al.* (2007). "Transgenic induction of mitochondrial rearrangements for cytoplasmic male sterility in crop plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(6): 1766-1770.
- 植村香織、郭長虹、寺地徹 (2010). "フェリチンを葉緑体で強発現する3種類の組換えタバコの比較研究" *育種学研究* 12 別 2: 93.
- 田中義行、辻村朋彦、寺地徹 (2012). "ベンサミアナタバコの葉緑体形質転換プロトコール" 田部井豊 (編) 形質転換プロトコール—植物編—、化学同人、京都、pp402-408.
- 蘆田弘樹 (2012). "レタスの葉緑体形質転換プロトコール" 田部井豊 (編) 形質転換プロトコール—植物編—、化学同人、京都、pp383-389.

## Development of new biotechnological methods that exploit the information on nuclear and cytoplasmic genomes and their application to the crop breeding

Toru TERACHI

### Abstract

Plant Organelle Genomics Research Center was newly established in April 2013 under the Research Organization of Kyoto Sangyo University, being succeeded a previous research center (Plant Organellar Genome RC). The aim of this center is to produce useful crops for human beings by advanced biotechnologies. In order to achieve this goal several studies related to plant organelle genome (i. e. chloroplast and mitochondrial genome) have been conducted. In this report, the first trial to produce transplastomic lettuce is briefly documented, and some data on the transplastomic lettuce lines obtained in our experiment are presented. The transplastomic lettuce contained a soybean ferritin gene in the chloroplast genome, and its transcription and translation were proved by molecular methods. Compared with wild-type plants, the iron content in the leaves of the transplastomic plants increased twofold, showing the potential of chloroplast transformation technology to improve nutritional value of leaf vegetables.

**Keywords:** chloroplast, genetic engineering, lettuce, iron content, ferritin