

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：34304

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14629

研究課題名(和文)組換え実験で葉緑体に生じたミニサークルの複製機構の解明とベクターの開発

研究課題名(英文) Studies on the replication mechanism of a mini circle found in transplastomic plants and a vector development

研究代表者

寺地 徹 (TERACHI, Toru)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90202192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体の遺伝子組換え体に見出されたミニサークルの複製機構を明らかにするため、ミニサークルを分割して大腸菌のプラスミドベクターへクローニングし、aadA遺伝子を結合したプラスミドを構築した。このプラスミドをパーティクルボンバードメント法により、タバコの葉へ導入したところ、異なる葉緑体断片を含む3種類のプラスミドのいずれもが、形質転換シュートを形成させた。また、このうちの1種類(#2A)から、3種類の欠失変異体を作製し、タバコの葉へ導入したところ、そのうち2種類のプラスミドから形質転換体を得ることができ、これらのプラスミドが葉緑体内で複製・維持されていることが示された。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the replication mechanism of a "mini circle" found in the chloroplast of transplastomic tobacco plants, plasmids containing a different chloroplast DNA fragment from the mini circle and the antibiotic resistant gene aadA were constructed. Then, the plasmids were introduced into tobacco leaves by particle bombardment experiments. All of three plasmids constructed with a different chloroplast DNA fragment produced antibiotic resistant shoots, showing that these plasmids could replicate in the chloroplast. Deletion mutants from the plasmid #2A also yielded antibiotic resistant shoots, indicating a part of the #2A fragment contained replication origin that were functional in the chloroplast.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：葉緑体 形質転換 タバコ ミニサークル 斑入り apx プラスミド

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 葉緑体で働く活性酸素消去系の酵素のひとつ、APX をコードする遺伝子 (*apx* 遺伝子) を、タバコの葉緑体ゲノムへ導入したところ、斑入りの組換え系統が得られた。次世代シーケンシングで葉緑体ゲノムの解読を行ったところ、斑入り系統には、主ゲノムに相当する大きな (>150kb) 環状 DNA (ラージサークル) の他に、小さな (20kb) 環状 DNA (ミニサークル) が存在することを発見した。

(2) この斑入り系統では、ミニサークルのコピー数が著しく増大し、かつ安定して子孫に伝達されていることが示された。すなわち、この斑入り系統では、葉緑体ゲノムが二分割され、その状態が安定に保持されていることがわかった。

(3) これまで、*in vitro* の複製産物の 2D ゲル電気泳動により、葉緑体 DNA の複製起点として *oriA* と *oriB* という短い配列が IR 内に報告されていた (Kunnimalaiyaan et al. 1997)。しかし、*oriA*、*oriB* とともに今回のミニサークルには含まれていない。また葉緑体 DNA の複製にはローリングサークルモデルなど、いくつかの機構が提唱されているが、その実態は必ずしも明確ではなかった (Nielsen et al. 2010)。

(4) 本研究が成功すれば、葉緑体 DNA の複製機構に新たな知見を加えられると考えた。また葉緑体 DNA の複製機構がわかれば、葉緑体へ外来遺伝子を運ぶベクターを構築することができると考えた。葉緑体ゲノムへ外来遺伝子を組み込むことは当時も可能であったが、ゲノムへの導入に相同組換えを利用する従来の方法では、組換え体を得る効率が高くなかった。もし本研究により、葉緑体の中で自律的に複製するベクターを構築できれば、葉緑体の形質転換法として極めて画期的であると考えた。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究は、斑入りを示す組換えタバコを実験材料に用いて、ア) 葉緑体 DNA の複製に必要な配列を絞り込む、イ) 葉緑体ゲノムの組換え機構を明らかにする、ウ) 葉緑体内で自律複製可能な新しいベクターを作成することを目指す。また、エ) 斑入りの新しい機構を発見することも視野に入れた。

### 3. 研究の方法

(1) 上記の一連の実験のなかで、ア) とウ) は密接に関連しており、ウ) で行う新しいベクターの構築のためには、ア) で明らかにする葉緑体 DNA の複製に関するデータが必要であった。そのため、初年度にア) の実験を行ない、その結果を吟味してから、次年度以降、ウ) にかかわる実験を行うこととした。また、イ) の葉緑体ゲノムにおける組換えを調べる

実験では、複数の組換えタバコを新たに作出する予定であったが、実験の過程で予想以上に多くの形質転換体を得られたことから、旧来の方法で組換え体を作成することはせず、形質転換体当代と、その後代の解析に注力した。なお、エ) については、当時得られていた新知見 (斑入りの温度依存性) を踏まえて実験を計画したが、実施するには至らなかった。

(2) 具体的に、上記ア) の目的を達成するため、ミニサークルの全長、あるいはミニサークルをさらに分割した DNA 断片を、タバコの野生型 (SR1) の葉へ、パーティクルボンバードメント法により導入した。当初の計画では、タバコの葉からプロトプラストを調製し、PEG を用いて DNA 断片を導入する予定であったが、DNA 断片の導入には、当研究室で実績のあるパーティクルボンバードメント法を使用した。

(3) これらの DNA 分子を野生型にそのまま導入したのでは、それらが安定に保持されるという保証はなかった。前述のように、斑入りの組換え系統では、ミニサークルが安定に保持されているが、それはラージサークルから欠失している、植物が正常な生活を営むのに必要な葉緑体の遺伝子 (LSC に存在する *matK* 遺伝子あるいは *psbA* 遺伝子のいずれか、あるいはその両方) が、ミニサークル上に存在しているからであり、*matK* あるいは *psbA* の補償作用が必要ないときには、仮にミニサークルを葉緑体へ上手く導入できたとしても、やがて消失してしまう可能性があると考えた。

(4) そこでミニサークル上にある *apx* 遺伝子を、抗生物質 (スペクチノマイシン) 耐性遺伝子である *aadA* 遺伝子と GFP の遺伝子カセットに置き換えたものを作り、タバコの野生型の葉緑体へ導入しようと考えた。その後、抗生物質で選抜をかけつつ、顕微鏡観察で GFP 蛍光を発するカルスを探すことを計画した。当初、改変ミニサークルの全長 (大きさは 22kb-*apx*+*aadA*+GFP となり約 23kb) を大腸菌のプラスミドベクターに連結し、それを葉緑体へ導入することを試みる予定であったが、ボンバードメント法で導入するにはサイズが大きすぎるなどから、実際には、ミニサークルの全長配列を適当な大きさに分割し、大腸菌のプラスミドベクターへクローニングした後、*aadA* 遺伝子を連結したプラスミドを構築した。その後、葉緑体の中で複製するのに必要かつ十分な配列を決定するため、葉緑体 DNA 断片を欠失させた変異体シリーズを作製し、それらを葉緑体へ導入した。

### 4. 研究成果

(1) 図1に示すように、ミニサークルの配列を制限酵素 *Hind* によって#1、#2及び#3の3つの断片に分割した。

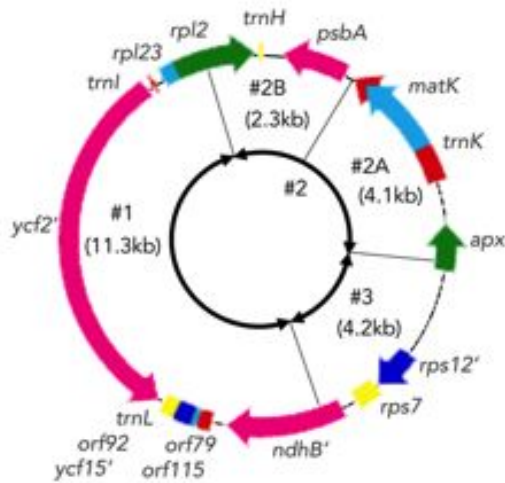


図1 . ミニサークルの物理地図

次に各断片を、大腸菌のプラスミドベクター (pBluescript SK+) の *Hind* サイトへクローニングを試み、11.3kbの断片#1及び4.2kbの断片#3を持つプラスミドを得た。一方、この方法でクローニングできなかった6.4kbの断片#2を4.1kbの#2A及び2.3kbの#2Bの2つに分割し、In-Fusion法によって、再度 pBluescript SK+へクローニングしたところ、断片#2Aについてのみクローニングに成功した。これら3種の断片(#1、#2A及び#3)を持つプラスミドに、葉緑体で働くプロモーター (*Prrn*) 及びターミネーター (*TpsbA*) を連結した *aadA* カセットを連結したプラスミドを作製した。

(2) パーティクルガン法を用いて、これら3種のプラスミドを各24ショット分、タバコの葉へ撃ち込んだ。その後、スペクチノマイシンに抵抗性を示すシュートを選抜したところ、#1からは3個、#2Aからは17個、#3からは3個のシュートを得ることができた(表1)。

表1 . パーティクルガン法によるタバコの葉へのプラスミド導入

Fragment	Date	Shot	Total	Num. shoots obtained	Num. of plants grown in pots
#1	160628	12	24	3	0
	160712	12			
#2A	160628	12	24	17	7
	160712	12			
#2B	-	-	-	-	-
#3	160202	12	24	3	1
	160712	12			

これらのシュートから全DNAを抽出し、大腸菌へトランスフォームしたところ、タバコの#2A系統からは撃ち込んだプラスミド#2Aが、また#1及び#3系統からは、撃ち込んだ

ものよりもサイズの大きなプラスミド(プラスミド#1ins、#3ins)が、それぞれレスキューされた(#3の1個体を除く)。PCR及び部分的シーケンシングによる解析の結果、これらのプラスミド#1ins及び#3insには、相同組換えによって葉緑体ゲノムの一部が移行していることがわかった。

(3) 撃ち込んだプラスミドが、植物内でどれだけ複製しているのかを調べるために、形質転換体の全DNAを鋳型に、TaqManプローブによるリアルタイムPCRを行った。プライマー及びプローブは、プラスミドに連結した *aadA* と、葉緑体ゲノムのSSC領域のそれぞれに特異的なものを設計し(図2)、各系統におけるその存在比を算出した。

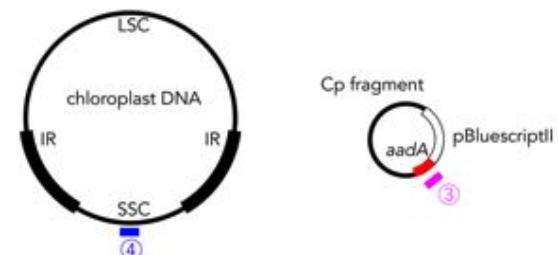


図2 . リアルタイムPCRにより増幅した領域

その結果、プラスミドのコピー数は葉緑体ゲノムに対しタバコの#1系統(1個体)で7.9倍、#2A系統(10個体)で平均1.9倍、#3系統(4個体)で平均6.2倍多くなっており、導入した断片によってコピー数に差が見られたものの、いずれのプラスミドも葉緑体内で複製可能であることが示された(図3)。

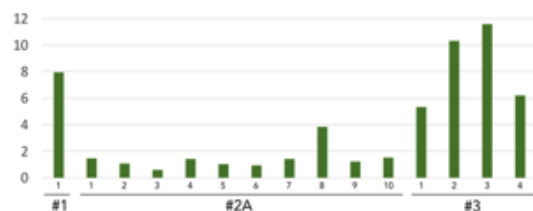


図3 . 葉緑体DNA断片を持つプラスミドのコピー数

一方、プラスミドが持つ葉緑体断片の領域もしくは大きさによって、複製効率が変動することが示唆された。今回の実験では、プラスミド#2Aの導入で最も多くの形質転換体を得ることができたが、#2Aのコピー数は#1や#3のコピー数と比べて少なかった。このことから、植物体の形質転換効率とプラスミドの複製効率が、必ずしも相関していないことが判明した。

(4) 上記のように、プラスミド#2Aが、他の断片を持つものより高頻度で耐性タバコを生じさせること、#2Aが耐性タバコの葉緑体内で複製、維持されていることが明らかになっ

た。そこで、2A断片の内部に存在すると考えられる葉緑体ゲノムの複製起点を特定するため、以下の実験を行った。

まず、#2AのDNAを鋳型にInverse PCR法を行い、2A断片の配列を1kb, 2kb及び3kbと段階的に欠失させたプラスミドのシリーズを構築した。

次に、作成した3種類のプラスミドDNAを各36ショット、タバコの葉へ撃ち込み、耐性個体を選抜した。現在までに、2種類のプラスミド(2kb及び3kbを欠失させたもの)から合計8つの耐性個体が得られている。これらの耐性個体の葉緑体DNAは、いずれも大腸菌を形質転換可能であった。したがって2A断片から3kb欠失させた残りの部分に、葉緑体DNAの複製起点として働く配列があることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 8 件)

植村香織、寺地徹「部分二倍体となった葉緑体ゲノムをもつ形質転換タバコの性状」日本育種学会第133回講演会 2018年

児島和志、植村香織、寺地徹「自律複製する葉緑体形質転換ベクターの複製起点に関する研究」日本育種学会第132回講演会 2017年

植村香織、児島和志、寺地徹「植物の葉緑体ゲノムを分割する方法の開発」日本育種学会第132回講演会 2017年

Kaori Uemura and Toru Terachi  
「Development of new transformation vectors that are autonomously replicable in the organelle」10th International Conference for Plant Mitochondrial Biology(国際学会) 2017年

植村香織、児島和志、寺地徹「葉緑体内で自律複製する新たな形質転換ベクターの開発」日本育種学会第131回講演会 2017年

阿部こころ、井上理恵子、植村香織、寺地徹「ダイズの鉄貯蔵タンパク ferritin を葉緑体ゲノムに導入した形質転換レタスの特徴づけ」日本育種学会第130回講演会 2016年

植村香織、林未来、寺地徹「葉緑体の遺伝子組換えタバコ作出の過程で得られた斑入り系統の解析 IV. ミニサークルを利用した新規葉緑体形質転換ベクターの構築」日本育種学会第130回講演会 2016年

植村 香織、森田 重人、山本 真紀、高見

常明、坂本 亘、寺地 徹「葉緑体の遺伝子組換えタバコ作出の過程で得られた斑入り系統の解析 III. マルチパータイト構造をとる葉緑体ゲノム」日本育種学会 第128回講演会 2015年

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

寺地 徹 (TERACHI, Toru)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90202192

##### (2)研究分担者

木村 成介 (KIMURA, Seisuke)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：40339122

山岸 博 (YAMAGISHI, Hiroshi)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：10210345