

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03750

研究課題名(和文) 葉緑体と大腸菌の双方で自律複製可能なシャトルベクターの開発

研究課題名(英文) Development of a shuttle vector which is autonomously replicable in chloroplast and E. coli

研究代表者

寺地 徹 (TERACHI, Toru)

京都産業大学・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) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、葉緑体の形質転換に使用可能な自律複製型プラスミドベクターの開発を目的とした。そのため、タバコ葉緑体ゲノム全長の96%をカバーする種々の葉緑体DNA断片を大腸菌のプラスミドベクターへクローニングした後、これらのプラスミドをパーティクルボンバードメント法でタバコの葉に撃ち込んだ。その結果、14種類の異なるプラスミドで形質転換体が得られ、これらの葉緑体DNA断片が導入プラスミドに葉緑体内での自律複製能を付与することがわかった。プラスミドの一つを用いて葉緑体へgfp遺伝子の導入を試みたところ、GFPを発現する個体が得られたので、本研究で目的とするプラスミドベクターが作成できたと結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉緑体の遺伝子組換えは、導入遺伝子が母性遺伝するため花粉を通じて環境中へ拡散する恐れがないこと、導入遺伝子のコピー数が多く産物が大量に得られることなど、組換え作物の作出方法として利点がある。しかし通常、葉緑体ゲノムに遺伝子を導入するためには、偶然生じる相同組換えによるため、効率が高いとは言えない。そこで本研究では葉緑体DNA断片を利用して、葉緑体の中で自律複製する新たな形質転換ベクターを開発し、外来遺伝子(gfp)を葉緑体へ導入することに成功した。将来このベクターは、葉緑体の組換え作物を効率良く作出することに貢献する。

研究成果の概要(英文)：This research aims at developing the autonomously-replicating chloroplast transformation vector. Various DNA fragments covering 96% of tobacco chloroplast genome were cloned into E. coli's plasmid vector, and they were delivered into tobacco leaves by particle bombardment method. The 14 different plasmids yielded tobacco transformants, indicating chloroplast DNA fragments cloned in these 14 plasmids gave the autonomous-replicating ability in the chloroplast to a plasmid. The gfp gene could be delivered into chloroplast by one of the plasmids tested. We concluded that autonomously-replicating chloroplast transformation vectors were successfully constructed in a series of experiment.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：葉緑体形質転換 自律複製 タバコ 複製起点 葉緑体ゲノム プラスミド 形質転換ベクター

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

葉緑体の遺伝子組換えにより、ストレスに強い植物を育成することを目的に、タバコをモデル植物としてアスコルビン酸ペルオキシターゼの遺伝子 (*apx*) を葉緑体に導入する実験を行った。目的とする組換え体は3系統得られたが、そのうち2系統に予期せぬ斑入りが観察された。斑入りの原因を探るため、これら斑入り系統の葉緑体ゲノムを次世代シーケンシングなどにより解析したところ、斑入り系統の葉緑体に小さな環状 DNA 分子 (以後ミニサークルと呼ぶ) が存在することが分かった。このミニサークルは、組換え型の葉緑体ゲノムからループアウトにより生じた全長 **22kb** の分子であることが示されるとともに、葉緑体ゲノムと比べてコピー数が多いことから、この分子は葉緑体内で自律複製していることが示唆された。また、ミニサークルに由来する3種類の葉緑体 DNA 断片を、抗生物質 (スペクチノマイシン) 耐性遺伝子 (*aadA*) を持つ大腸菌のプラスミドベクターにクローニングし、パーティクルガン法でタバコの葉に導入したところ、形質転換タバコが複数個体得られた。これらの形質転換タバコから調製した全 DNA を大腸菌に形質転換したところ、コロニーが形成され、これら的大腸菌から植物へ導入されたプラスミドを回収することができた。一連の実験を通じ、ミニサークルに由来する葉緑体 DNA を持つプラスミドは形質転換体の葉緑体内で自律複製し、維持されることがわかっていった。

### 2. 研究の目的

先行研究の結果を受け、本研究では、葉緑体内で自律複製する形質転換ベクターを開発することを第一の目的とした。一方、ミニサークルに由来する3種類の葉緑体 DNA 断片が、いずれも導入プラスミドの自律複製を可能にしたという予想外の結果が得られたことから、本研究ではまず、葉緑体ゲノム上にこのような断片がミニサークルのもの以外にもないか、体系的に調べる実験を行い、最も複製能力の高い葉緑体 DNA 断片を特定しようとした。続いて、特定した葉緑体 DNA 断片を用いて自律複製型のプラスミドベクターを構築し、このベクターで外来遺伝子 (*gfp* 遺伝子) を葉緑体に導入可能か検討した。

### 3. 研究の方法

精製したタバコの葉緑体 DNA を制限酵素処理して得た断片、あるいは PCR 増幅して得た断片を、*aadA* を持つ大腸菌のプラスミドベクター (pBluescriptII) へクローニングした。クローニングに成功したプラスミドの DNA を3種類ずつ混合し、パーティクルガン法を用いてタバコの葉へ撃ち込み、抗生物質耐性を示す個体を選抜した。得られた抗生物質耐性個体から全 DNA を抽出し、導入したプラスミドが植物体内に維持されているか、PCR およびプラスミドレスキューにより調べた。植物内に維持されていたプラスミドについては、それらが持つ葉緑体 DNA 断片の由来をシーケンシングにより特定した。

### 4. 研究成果

1) 本研究では、葉緑体ゲノム全長の96%に相当する配列を持つ、77種類のプラスミドコンストラクトを作製することができた (図1)。

2) これらのコンストラクトの DNA を3種類ずつ混合し、パーティクルガン法でタバコの葉へ導入した。その結果、抗生物質耐性を示すタバコが74個体得られた。

3) これらの個体について、葉から抽出した全 DNA を鋳型に PCR 解析を行い、撃ち込んだプラスミドが維持されているかを調査した。

4) その結果、これらの74個体には、①プラスミドが環状で維持されている個体、②プラスミド由来の *aadA* のみを有する個体、③ *aadA* 及びプラスミドベクターの配列を有する個体、及び④エスケープ個体の4つのクラスが含まれていた。

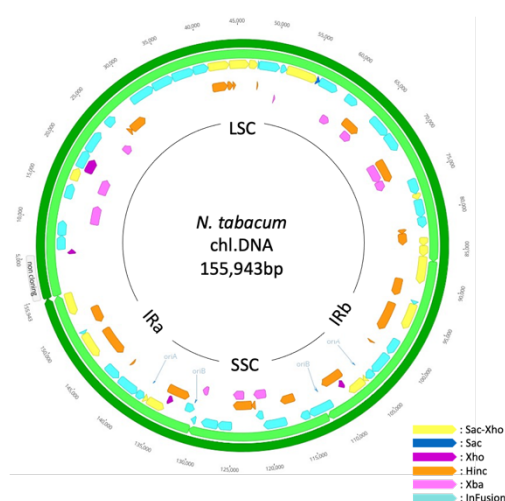


図1. クローニングした葉緑体 DNA 断片の種類とタバコ葉緑体ゲノム上の位置

5) これらの植物から調製した全 DNA を、大腸菌へ形質転換したところ、20 個体の全 DNA でコロニーが形成された。形成されたコロニーからプラスミド DNA を抽出し、シーケンシングによりインサート配列を決定した結果、18 個体について、撃ち込んだプラスミドがそのまま維持されていることが証明された。また、プラスミドの種類は合計 14 種類にのぼることもわかった。これら 14 種類のプラスミドが持つ葉緑体 DNA 断片は、導入されたプラスミドに葉緑体内で自律複製能を与えることが示唆された(図 2、図 3)。

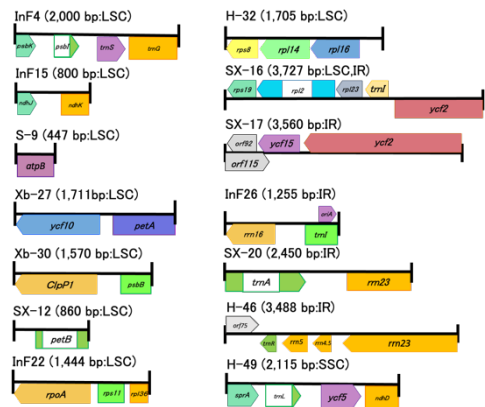


図 2. 導入プラスミドに葉緑体内での自律複製能を与えた 14 種類の葉緑体 DNA 断片

6) 上記 14 種類のコンストラクトが持つ葉緑体 DNA 断片の中から SX20 という断片を選び、これを用いて葉緑体で自律複製する新規形質転換ベクターを作製し、外来遺伝子 (*gfp*) を導入することが可能か検討した。SX20 に、葉緑体で働くプロモーターとターミネーターを連結した *gfp* 遺伝子を組み込み、新しいコンストラクト (pKNShuttle-SX20\_GFP と命名) を作成した。このコンストラクトをタバコの葉に導入した結果、10 個体の抗生物質耐性個体 (a~j) を得ることができた。

7) これらの個体のうち、最も生育の早かった個体、(pKNShuttle-SX20\_GFP)-e について、このコンストラクトが植物に維持されているかを PCR で、また葉緑体へ導入された *gfp* 遺伝子が発現しているかを蛍光顕微鏡で、それぞれ調査した。

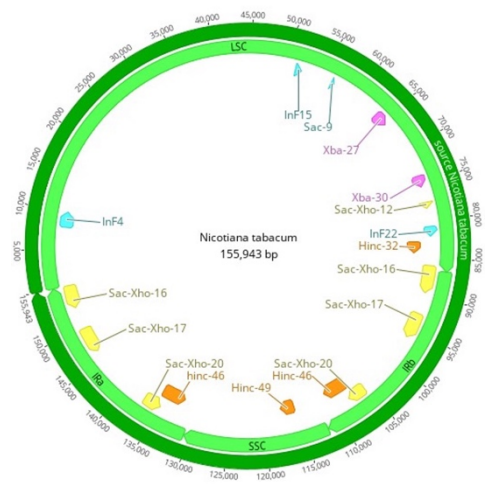


図 3. 14 種類の葉緑体 DNA 断片の葉緑体ゲノム上での位置

8) PCR の結果から、この個体には撃ち込んだコンストラクトがそのまま維持されていることがわかり、蛍光顕微鏡観察から、GFP タンパク質が葉緑体に局在していることがわかった。したがって、本研究では、当初の目的とした葉緑体内で自律複製する形質転換ベクターを開発することに成功したと結論した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 植村香織、寺地 徹
2. 発表標題 自律複製型ベクターによる葉緑体形質転換タバコで観察された白色個体の特徴づけ
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場裕士、中元海里、植村香織、寺地徹
2. 発表標題 タバコの葉緑体における自律複製型プラスミドの構築 I. 異なる葉緑体 DNA 断片を持つプラスミドによる形質転換体の作出
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中元海里、馬場裕士、植村香織、寺地徹
2. 発表標題 タバコの葉緑体における自律複製型プラスミドの構築 II. 形質転換体内で自律複製しているプラスミドが持つ葉緑体 DNA 断片の特定
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中元 海里、馬場 裕士、植村 香織、寺地 徹
2. 発表標題 葉緑体 DNA 断片を用いた自律複製型の葉緑体形質転換ベクターの構築
3. 学会等名 日本育種学会 第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬場 裕士、中元 海里、植村 香織、寺地 徹
2. 発表標題 葉緑体へ導入したプラスミドに自律複製能を付与する葉緑体 DNA 断片の特徴づけ
3. 学会等名 日本育種学会 第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植村 香織、中元 海里、馬場 裕士、児島 和志、寺地 徹
2. 発表標題 プラスミドに自律複製能を付与する葉緑体 DNA 断片探索の過程で得られた予期せぬ形質転換体の解析
3. 学会等名 日本育種学会 第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 児島和志、植村香織、中元海里、寺地徹
2. 発表標題 葉緑体形質転換ベクターに自律複製能を付与する葉緑体DNA断片の探索
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植村香織、高見常明、加藤裕介、坂本亘、寺地徹
2. 発表標題 分割された葉緑体ゲノムを持つ葉緑体形質転換タバコの特徴づけと転写・翻訳物の解析
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaori Uemura, Toru Terachi
2. 発表標題 Characterization of transplastomic tobacco plants generated by a new transformation vector that is autonomously replicable in the chloroplast
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaori Uemura and Toru Terachi
2. 発表標題 Development of new transformation vectors that are autonomously replicable in the organelle
3. 学会等名 10th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 植村香織、児島和志、寺地徹
2. 発表標題 植物の葉緑体ゲノムを分割する方法の開発
3. 学会等名 日本育種学会第132回講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 児島和志、植村香織、寺地徹
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本育種学会第132回講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 植村香織、寺地徹
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本育種学会第133回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中元海里、馬場裕士、植村香織、寺地徹
2. 発表標題 葉緑体 DNA 断片を用いた自律複製型の葉緑体形質転換ベクターの構築
3. 学会等名 日本育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺地徹
2. 発表標題 葉緑体の遺伝子組換えによる作物の鉄含有量増加の試み
3. 学会等名 第43回日本鉄バイオサイエンス学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	山岸 博  (YAMAGISHI Hiroshi)  (10210345)	京都産業大学・生命科学部・教授   (34304)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	木村 成介  (KIMURA Seisuke)  (40339122)	京都産業大学・生命科学部・教授     (34304)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関