

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32305

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19278

研究課題名（和文）葉緑体への核酸運搬ペプチドを用いた巨大遺伝子導入法の開発

研究課題名（英文）Development of large DNA delivery into chloroplast using the fusion peptide

研究代表者

吉積 毅（Yoshizumi, Takeshi）

高崎健康福祉大学・農学部・教授

研究者番号：80342872

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではタバコ本研究では、タバコ葉緑体ゲノムに挿入可能な85 kbpの長鎖DNAを作成した。葉緑体局在核酸運搬ペプチド（ペプチド）を用いて、このプラスミドを送達したところ、葉緑体ゲノムの標的領域に一過的な組換えを確認した。一方で、断片化したプラスミドを同じ条件で導入した場合には組換えは確認できなかった。このことは、ペプチドが長鎖DNAを保護し、葉緑体に送達したことを示す。この技術を用いて、このプラスミドを葉緑体に導入した形質転換タバコが再分化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、長鎖DNAの合成や対象生物へ導入する研究が盛んに行われている。長鎖DNAは物理的せん断に対して感受性が高く、一般的な実験で容易に断片化する。葉緑体は物質生産という観点から非常に魅力的な反応場と考えられている。しかし、一般的に葉緑体の組換えに利用されるパーティクルガン法は、物理的せん断を容易に引き起こすことが考えられるため、長鎖DNAを用いた研究は報告されていない。本研究成果は長鎖DNAを保護しつつ葉緑体を組換えることを可能とする画期的な方法となる。この方法を用いることで、複数の遺伝子を格納した長鎖DNA導入により、これまでで生合成できなかった有用物質生産などに応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We developed 85 kbp plasmid containing a selection marker gene and homologous sequences of tobacco chloroplast genome. This plasmid was delivered into tobacco chloroplast by peptide-based DNA carrier which has a chloroplast targeting sequence. PCR analysis revealed that integration of the plasmid in the chloroplast genome transiently. On the other hands, the recombination was not detected with the fragmented plasmid, indicating the peptide protected the plasmid and delivered it into chloroplasts. Antibiotic-resistant tobacco shoots were regenerated from cotyledons treated with the plasmid and the peptide. Finally, 3 T0 transgenic tobaccos were grown on soil.

研究分野：合成生物学

キーワード：葉緑体 形質転換 長鎖DNA ペプチド タバコ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、合成生物学が盛んであり、供与生物由来の複数遺伝子から構成される代謝経路などを最適化し、宿主生物に移植するような研究が行われている。近い将来、代謝経路などを「まるごと」移植するような、巨大な遺伝子導入が必要な研究が頻繁に行われるであろう。長鎖 DNA (本申請では 100 kb を超える DNA と定義する) を構築する技術は国内外で様々な手法が開発されている。また、最近では人工合成による受託サービスもあり、構築に関する技術は、さらに洗練させることは必要ではあるが、概ね開発されていると考えている。一方で、巨大遺伝子を用いる研究を実現させるには根本的な欠点がある。それは、巨大 DNA に特化した遺伝子導入法が開発されていないことである。

葉緑体は物質生産の反応場として、優れた性質を持つ。一般的に葉緑体形質転換は、核の組換えと比較して難しく、長鎖 DNA を導入する技術は開発されていない。

2. 研究の目的

本研究は、核酸運搬ペプチドを用いて植物に巨大遺伝子を導入する技術の開発を目的とする。申請者の開発した核酸運搬ペプチド (以降、ペプチドと呼ぶ) を用いることで、200 kb を超えるような巨大遺伝子を植物に導入することも可能であると推測している。そこで本申請では、タバコ葉緑体ゲノムを標的として、核酸運搬ペプチドが長鎖 DNA を断片化することなく導入できるか検証する。

3. 研究の方法

報告者は、核酸に結合するペプチドを利用して細胞に導入する技術を開発し、植物の細胞質、もしくは核だけでなく、細胞内にある葉緑体とミトコンドリアへ遺伝子導入を行っている。まず、タバコ葉緑体形質転換が可能な枯草菌と大腸菌のシャトルベクター (準巨大プラスミド、85 kbp) を作成する。この巨大プラスミドには、タバコ葉緑体ゲノムへの挿入に必要な相同配列と選抜マーカー遺伝子が組み込まれる。このプラスミドを用いて、核酸運搬ペプチドと複合体の物性を明らかにし、タバコへの導入を検討する。最適条件が得られた場合、葉緑体へ遺伝子を送達したタバコ組織を、薬剤培地上で選抜し、再生個体を得る。

4. 研究成果

1) 葉緑体ゲノムを組み換えるための準巨大プラスミドの作成

枯草菌と大腸菌のシャトルベクターである pLSBAC101' (80 kbp) に、葉緑体ゲノムに組み込むに必要な相同配列と、GFP とスペクチノマイシン耐性遺伝子が融合したレポーター遺伝子を挿入する計画を設定していた。pLSBAC101' はサイズが大きいため、ユニークな制限酵素配列がない。そのため、枯草菌内で相同組換えにより、これら配列を挿入した。平成 30 年度は、上記の配列を組み込むためのコンストラクトを作製した。このコンストラクトを pLSBAC101' を保有する枯草菌に導入し、葉緑体で機能する配列を組み込んだ pLSBAC101'CpSpGFP (約 85 kbp、以降準巨大プラスミドとする) を作成した。

pLSBAC101' とペプチド複合体の物性と試験管内における物理的保護効果について検証を行った。動的光散乱法を用いて、pLSBAC101' とペプチド複合体の粒径を測定すると共に、原子間力顕微鏡による形状を観察した。次に、この複合体に対して、卓上破砕機 (チューブに激しい振動を与える) を用いて物理的剪断処理を与える事で生じるプラスミド断片化の度合いを定量化した。ペプチドとの複合体を形成した場合には、50 % プラスミドが超らせん構造を維持していた。一方、プラスミドのみでは超らせん構造は完全に消失していた。これら結果から、ペプチドは 80 kbp の準巨大 DNA 内包した複合体を形成することで、物理的剪断から保護することが明らかとなった。

2) 準巨大プラスミドのタバコ葉緑体への一過的な導入

準巨大プラスミドをペプチドを用いてタバコ葉緑体に導入した。プラスミド導入後、選抜に必要な薬剤を含まない培地で5日生育させたタバコからゲノムを抽出し、PCRを用いた解析を行った。その結果、葉緑体の標的領域に準巨大プラスミドを挿入することに成功した。コントロールとして制限酵素で切断した準巨大プラスミドを導入したタバコからは、組換えを示すPCR断片は増幅されなかった。これら結果は、ペプチドが準巨大プラスミドを物理的せん断から保護し、葉緑体ゲノムに送達していることを示す。

3) 準巨大プラスミドを導入した葉緑体形質転換タバコの作出

ペプチドを用いて準巨大プラスミドを導入したタバコ子葉片を、薬剤(スペクチノマイシン)を含む培地上で選抜した。処理したタバコ子葉の数は、1,000となる。これら子葉片から3個体のシュートが再生し、ポット上で生育している。これら再生個体は明確なスペクチノマイシン耐性を示しているため、形質転換はされていると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----