

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02961

研究課題名(和文) psbA欠失変異体の相補を利用したマーカーフリーな葉緑体の遺伝子組換え植物の作出

研究課題名(英文) Production of marker-free transplastomic plants using complementation of the psbA-deletion mutant

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、psbAを欠失したアルビノタバコを材料に、psbAを相補することで白色の葉から緑色の形質転換体を作成することが可能か、またこの現象を利用して抗生物質を用いず組換え体を選抜できないかを検討することを目的とした。これまで光化学系IIの活性測定、葉緑体タンパク質の分析、葉緑体の電子顕微鏡観察などアルビノタバコの特徴づけを行った。若い葉はpsbAを欠失しているにもかかわらず緑色であるという観察から、PSII複合体を持たなくてもクロロフィルは合成され得るという新見を得た。また、大腸菌の菌株を工夫することで、相補実験に必須なpsbA全長を持つプラスミドを構築できることもわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究室では、タバコを実験材料に、葉緑体の遺伝子組換えシステムを多数作出してきた。その中に、光合成に必要な葉緑体タンパク質(D1)をコードする、psbA遺伝子を失った系統を見出した。この系統は、葉が白色化し、光合成ができないので、培地上でしか育たない。そこでこの植物に、クローニングしたpsbA遺伝子を外から導入することで、光合成の能力を回復した組換え体を選抜できないか、実験により検討した。もしこの方法で組換え体を得られれば、以前のように、組換え体の選抜に抗生物質を使用しなくても良いので、抗生物質耐性遺伝子を持たないマーカーフリーな植物を作成でき、組換え作物への懸念のひとつを払拭できる。

研究成果の概要(英文)：The objective of this research is to determine whether green transplastomic plants can be produced from albino tobacco plants that lack psbA through its complementation. The research also aims to select transplastomic plants without the use of antibiotics. The albino tobacco plant was characterized through an activity assay for photosystem II, analysis of chloroplast proteins, and observation of chloroplast architecture using an electron microscope. The observation that young leaves lacking psbA are green reveals a new finding that chlorophyll can be synthesized without the PSII complex. It appears that a full-length psbA gene can be cloned in *E. coli* only if a particular strain is used as a host.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：葉緑体 遺伝子組換え psbA アルビノ タバコ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

当研究室では、栽培タバコ(*Nicotiana tabacum* cv. SR1)を用いて葉緑体の組換え系統を多数作出してきた。その中には、自律複製能力のある葉緑体 DNA 断片を持つプラスミドを葉緑体に導入して得た系統があり、#3-2 と呼ぶ系統では、導入したプラスミドよりはるかに大きなプラスミドが葉緑体に保持されていることがわかってきた。また、この系統の自殖第 2 世代は、若い葉は緑色で生えてくるが、葉が発達して古くなるにつれ白色化してアルビノになるという、特徴的な表現型を示した。このアルビノタバコを次世代シーケンシングにより解析したところ、葉緑体ゲノム上にある *psbA* 遺伝子のコード領域が欠失していることが明らかとなった。さらに、この欠失は、#3-2 の葉緑体に存在するプラスミドが、葉緑体ゲノムとの間でイレギュラーな相同組換えを起こした結果、プラスミド側に *psbA* 遺伝子が移行し、その後でプラスミド自体が植物から脱落したことにより生じたと推察されていた。

2. 研究の目的

高等植物で葉緑体の組換え体を得るためには、通常、組換え体を選抜するマーカー遺伝子を用いる。マーカー遺伝子の多くは細菌由来の抗生物質耐性遺伝子であり、葉緑体の組換えを野菜などの作物へ応用する際には、耐性遺伝子に対して消費者が良いイメージを持たず、作出された組換え作物に不安を抱くことが懸念されている。そのため、近年、耐性遺伝子を使わずに組換え体を選抜する「マーカーフリー」な組換え方法の開発が求められており、本研究も応用面では、その延長線上に位置する。すなわち本研究は、上述したアルビノタバコを材料に、*psbA* 遺伝子を相補することで白色の葉から緑色の形質転換体を作成することが可能か、またこの現象を利用して抗生物質を用いず組換え体を選抜できないかを検討することを目的とした。そのため、まず、*psbA* 遺伝子を欠失しているアルビノタバコ(#3-2T2)の特徴づけを行うとともに、アルビノタバコの葉を外植片に用いた葉緑体形質転換に関する基礎実験を行った。また、本研究の学術的な面では、*psbA* 遺伝子の全長配列を葉緑体へ導入することを目標とするので、*psbA* 遺伝子のコード領域に SNP を導入することにより、*psbA* の機能と構造の相関を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プラスミドベクターの構築

本研究ではまず、アルビノタバコの葉を用いた葉緑体形質転換実験に必要とされる、プラスミドベクターの構築を進めた。本研究で使用する *psbA* の遺伝子領域は、大腸菌の系においてクローニングできない領域として以前より知られている。すなわち、*psbA* 遺伝子のプロモーターは、葉緑体のプロモーターであるにもかかわらず、大腸菌の細胞中でも機能することが報告されており、*psbA* 遺伝子のコード領域から作られる D1 タンパク質は、大腸菌の生育を妨げるとされる。事実、我々の当初の実験でも、プロモーターを含む *psbA* 遺伝子の全長は、大腸菌でクローニングできなかった。そこで本研究では、ホストとなる大腸菌の菌株を、通常の実験に用いられる DH5 株から HST16CR 株に変更した。その結果、プロモーターを含めた *psbA* 遺伝子の全長を大腸菌でクローニングすることに初めて成功した。また、HST16CR 株からプラスミド DNA を調製できるようになったので、この DNA を鋳型にインバース PCR を行うことが可能となり、プラスミド内の *psbA* 遺伝子のコード領域に、任意の SNP を導入できるようになった。

(2) アルビノタバコの光化学系 II の解析

MiniPAM による光化学系 II の活性測定、タンパク質の SDS-PAGE、および抗 *psbA* 抗体を用いたウェスタン解析を行った。また、茎頂から数えて 1 枚目の葉と 3 枚目の葉の葉緑体を電子顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) アルビノタバコの特徴づけ

このアルビノタバコの新しく生えてくる若い葉は緑色である。実験を始める前は、若い葉が緑色なのは、残存しているプラスミド上の *psbA* が発現し、PSII が機能しているからだとして予想していた。しかし、MiniPAM による光化学系 II の活性測定、タンパク質の SDS-PAGE および抗 *psbA* 抗体を用いたウェスタン解析を行った結果、この植物では白い葉のみならず若い緑色の葉でも PSII 複合体は形成されていないことが判明した。一方、葉が緑色ということは、ここでクロロフィルの合成が行われていることを示す。この事実から、クロロフィルは PSII 複合体がなくても合成されるという新発見がもたらされた。またこの植物では、クロロフィルで吸収された光エネルギーは、電子伝達系で消費されず、ROS の発生をもたらすと考えられるので、ROS の蓄積が白化の原因であると解釈された。

電子顕微鏡で、茎頂から数えて 1 枚目の葉と 3 枚目の葉の葉緑体を観察した。野生型では、いず

れの葉でもグラナの積み重なりを1つ1つを視認できたが、アルビノタバコの1枚目の緑色の葉では、葉緑体のグラナが潰れて層のようになっていた。また3枚目の白色の葉では、葉緑体にグラナが認められないばかりか、葉緑体そのものも変形していることがわかった。

(2) 葉緑体の形質転換

葉緑体の形質転換に使用する3種類の形質転換ベクターを作製した。アルビノタバコの葉に、これらのベクターを導入したが、今回の実験で得られた植物は、psbA 遺伝子が相補されておらず、もとのアルビノタバコと同様の表現型を示した。後日、実験に用いた形質転換ベクターの設計に不都合な点が発見されたため、相補の可否は結論がでなかった。

一連の実験では、形質転換の外植片として、完全に白化した葉を用いた。しかし電子顕微鏡観察で明らかになったように、白化した葉では葉緑体の内部構造が壊れており、仮に psbA 遺伝子の導入に成功し、D1 タンパク質が供給されたとしても、葉緑体の機能を回復できない可能性がでてきた。幸い、若い緑葉にも光化学系 II は存在しないことがわかり、一方でこの葉の葉緑体は内部構造を保っているように思えることから、形質転換の外植片として若い緑葉を使用すべきとの結論に至った。

作製した自律複製型の形質転換ベクターは、psbA 遺伝子の全長がクローニングされているものの、シーケンシングの結果、プロモーター領域の配列が数十塩基欠けていることが判明した。また、psbA-3000 という psbA 遺伝子のコード領域とその前後 1kb をクローニングした形質転換ベクターを作製した。アルビノタバコの葉緑体ゲノムには、aadA 遺伝子と大腸菌のプラスミド配列が組み込まれていると思われるので、この形質転換ベクターは、相同組換えで葉緑体ゲノムに組み込まれる可能性があった。このベクターによる形質転換実験を継続したが目的とした組換え体を得ることはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okegawa Y, Sakamoto W, Motohashi K.	4. 巻 135
2. 論文標題 Functional division of f-type and m-type thioredoxins to regulate the Calvin cycle and cyclic electron transport around photosystem I.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Plant Res.	6. 最初と最後の頁 543-553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-022-01388-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 花本 将伍、寺地 徹、西本 真理、寺田 遥
2. 発表標題 易変異性純系タバコの戻し交雑後代（BC3）に生じた雄性不稔と花器形態異常に関する研究
3. 学会等名 日本育種学会 第144回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Toru Terachi
2. 発表標題 The unexpected finding of the transplastomic tobacco plant having a bipartite chloroplast genome and the development of a plasmid shuttle vector for chloroplast transformation.
3. 学会等名 理研（ERATO）セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花本将伍、寺地徹
2. 発表標題 易変異性を示した純系タバコの戻し交雑後代（BC3）の花器に観察された形態異常
3. 学会等名 日本育種学会 第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬場裕士, 見田知一, 中元海里, 植村香織, 寺地徹
2. 発表標題 葉緑体内で自律複製する形質転換ベクターの開発
3. 学会等名 日本育種学会 第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺地徹
2. 発表標題 自律複製型の葉緑体形質転換ベクター作製の試み
3. 学会等名 第38回 日本植物バイオテクノロジー学会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺地徹
2. 発表標題 植物生産現場-遺伝子組換え作物とゲノム編集作物に対する取り組み-
3. 学会等名 第20回 日本バイオセーフティ学会総会・学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中本海里, 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 辻村真衣、佐野峯遥香、寺地徹
2. 発表標題 易変異性を示すタバコを用いたド・フリースによる突然変異説の再考
3. 学会等名 日本育種学会 第138回講演会
4. 発表年 2020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	桶川 友季 (Okegawa Yuki) (10582439)	岡山大学・資源植物科学研究所・助教 (15301)	
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)	
研究分担者	山岸 博 (Yamagishi Hiroshi) (10210345)	京都産業大学・生命科学部・名誉教授 (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
---------	---------