

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22380007

研究課題名（和文）

巨大葉緑体イネ変異体の利用による葉緑体ゲノム改変技術の確立

研究課題名（英文）

Genetic engineering of chloroplast genome using a large-chloroplast mutant in rice

研究代表者

坂本 亘 (Wataru SAKAMOTO)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：20222002

研究成果の概要（和文）：

作物での葉緑体への遺伝子導入は、花粉による遺伝子拡散防止、大量のタンパク質発現、相同組換えによる遺伝子ターゲティングなどに有効な技術であるが、イネなどの主要穀物では効率的な導入法の確立に至っていない。効率的な遺伝子導入へのポイントとしては、ターゲットとなる葉緑体サイズがイネでは小さいことが挙げられる。本研究では、イネで葉緑体形質転換を可能にする方策の1つとして、葉緑体が巨大化する変異体を用いることを試みた。そこでまず、葉緑体が巨大化するイネ変異体を単離してこの変異を詳しく調べるとともに、葉緑体形質転換への利用と効率化のための研究を試みた。

研究成果の概要（英文）：

Genetic engineering of chloroplast genome in higher plants has been attempted since 1980's, and has been successful in tobacco and several species. Chloroplast transformation has advantages over nuclear genome, because i) maternal inheritance of the genome eliminates dispersal of a transgene through pollen, ii) no gene silencing allows transgene to be expressed at high level, and iii) homologous recombination targets a transgene into a desired genomic region. Despite such advantages, efficiency of chloroplast transformation is extremely low in rice and other crops. We reasoned that one obstacle may be a small size of chloroplasts in these species. In this study, we propose to utilize a mutant that has enlarged chloroplasts. Isolation and characterization of a rice mutant showing large chloroplasts, identification of the gene responsible for this mutation, and an attempt to use this line for rice chloroplast transformation, have been conducted.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 9,600,000 | 2,880,000 | 12,480,000 |
| 2011年度 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |
| 2012年度 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |
| 総計 | 14,900,000 | 4,470,000 | 19,370,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生産環境農学・遺伝育種科学

キーワード：葉緑体ゲノム・遺伝育種学・遺伝子導入・イネ・葉緑体分裂装置

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

葉緑体は、今から約 20 億年前にシアノバクテリアが植物の祖先細胞に取り込まれて生まれたオルガネラである。その為、葉緑体は独自のゲノムとタンパク質合成系を持ち、細胞内で分裂しながら増殖し、植物の自律栄養性を維持している。

葉緑体ゲノムに遺伝子を導入する形質転換系は、1980 年代に単細胞緑藻クラミドモナスで初めて報告され、核遺伝子を対象とする通常の組換えに比べて利点の多い技術として 1990 年代から注目されてきた。その利点としてはまず、一般に葉緑体ゲノムは母性遺伝するため、雌性配偶子のみから次世代へ伝わる事が挙げられる。したがって、野外での花粉飛散による遺伝子の拡散と生態系への影響がない。次に、葉緑体遺伝子は **gene silencing** を受けないのでタンパク質を安定かつ大量に発現させることが出来る。さらに、葉緑体の遺伝子導入は相同組換えが起こるので、遺伝子ターゲティングによる葉緑体の遺伝子改変、テイラーメイドな遺伝子の導入が可能である。

このように利点の多い葉緑体形質転換ではあるが、高等植物では、タバコの葉緑体への遺伝子導入がすでにルーチン化されているものの、それ以外はトマト、レタスなどいくつかの野菜で成功例が散見されるのみで、イネ、コムギなど主要穀物の葉緑体への遺伝子導入には、技術的な障壁も多く、ほとんど成功例がないのが現状である。穀物での葉緑体形質転換系を可能にするためには、革新的な手法やリソースを用いた技術の開発が望まれている。

2. 研究の目的

葉緑体への遺伝子導入は、成功例から推察する限り、技術的な方法論は確立されている。まず、葉緑体への物理的な DNA デリバリーの問題では、アグロバクテリウムが使えない代わりに、パーティクルガン（金粒子の銃で細胞に撃ち込む）で可能となった。次に、葉緑体へ導入した DNA を安定して維持させる方法だが、強力なマーカー遺伝子としてバク

テリア由来のスペクチノマイシン耐性遺伝子(*aadA*)がどの植物でも効率よく使われているため、イネでもこれが利用可能である。組織培養による再分化系についても、日本晴等の品種で再分化個体を得る実験系が確立している。葉緑体では相同組換えが頻繁に起こるので、特定のゲノム領域へ外来遺伝子を導入することができる。

これらの技術でイネでも葉緑体形質転換は可能と考えるが、実際には導入効率が低いため成功例がなく、それぞれの方法において技術的な問題を克服して形質転換効率を高めなければならない。葉緑体が初めて報告された緑藻クラミドモナスは大きな葉緑体を 1 つだけ持つので、導入効率が非常に高くホモプラスミックな形質転換体が得られる。葉緑体形質転換高率化のターゲットは、物理的サイズ（大きい葉緑体、小さな DNA キャリア）、や葉緑体分化能の高率化、より選択性の強いマーカーの開発などが考えられる。本研究ではこれらの諸問題のうち、葉緑体サイズを大きくすることで効率を改善できないかと考えた。

そこで本研究では、上述のように利点も多い緑体形質転換をイネ可能にするための基盤研究として、まず、葉緑体が巨大化するイネ変異体の単離と遺伝的解析を行い、さらに、その変異体を用いた葉緑体形質転換による効率改善の研究を進めた。また、申請者がこれまでの研究で行ってきた葉緑体ゲノムや光合成の維持に関わる分子機構の解析についても同時に解析を進めた。

3. 研究の方法

(1) 巨大葉緑体イネ変異体のスクリーニングと単離

本研究では、巨大葉緑体変異体単離の集団として、イネ日本晴再分化個体から得られた粗粒変異体を EMS 処理した M2 系統を用いた。これら材料の利用と育成については、研究協力者の西村秀希技術職員の協力を仰いだ。研究当初、インタクトなイネ葉での葉緑体観察は困難であることが判明したので、自然光の温室で生育させた播種 8 日後の M2 個体を材料に用い、それぞれの幼苗の第 3 葉か

らプロトプラストを調整し、葉緑体を明視野及び蛍光顕微鏡で観察することにした。葉緑体の詳細な観察には、凍結切片法と共焦点レーザー顕微鏡を組み合わせた方法やその他の方法を駆使して行った。

(2) 巨大葉緑体イネ変異体の遺伝解析とマッピング、遺伝子の同定

得られた巨大葉緑体イネ変異体の遺伝解析では、バックグラウンドに粗穂変異(*lax*)を持つため、まず、変異体を日本晴に戻し交雑した F2 から再び巨大葉緑体を持つ個体を選抜し、それを親として Kasalath に交雑した後代の F2 集団をマッピング集団として用いた。このマッピング集団に加え、Kasalath との交雑 F1 個体に変異体に戻し交雑した BC1 集団も同時にマッピングに用いた。

マッピング集団のスクリーニングにより巨大葉緑体を持つ個体を選抜し、これらの個体から DNA を抽出し、MIPS データベースを元に作製したマーカーによりラフマッピング、さらに、ファインマッピングにより変異を染色体領域に特定した。これらの変異領域においてイネの RAP データベースとシロイヌナズナの TIAR ベータデータベースを用いて候補遺伝子を推定し、シーケンスにより突然変異を決定した。

(3) 巨大葉緑体イネ変異体を用いた葉緑体形質転換

得られた変異体を用いた形質転換を行う予定であったが、戻し交雑による変異体の材料育成に時間がかかったため、本研究ではまず、野生型の日本晴を用いて葉緑体形質転換を行った。

4. 研究成果

(1) 巨大葉緑体変異体 *giant chloroplast* (*gic*) の単離

上述した EMS 処理により作製した M2 集団を用い、162 の M1 系統における約 2,100 の M2 個体群をスクリーニングし、野生型と比べて明らかに葉緑体が大きくなる変異体 *giant chloroplast* (*gic*) を分離する 1 系統を単離することができた (図 1)。この変異体における葉緑体を詳しく調べる為、凍結切片法と共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、*gic* 変異体が実際に野生型より大きい葉

緑体を持つことを確認した。

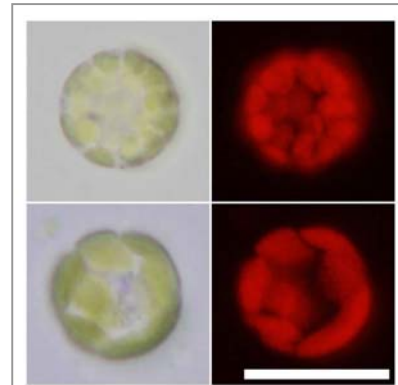


図1 イネ葉緑体分裂変異体 *giant chloroplast* のプロトプラスト(下)。野生型イネ(上)と比べて葉緑体が大きいので、形質転換の効率化が期待できる。左:明視野、右:クロロフィル自家蛍光像、Bar=20 μ m(坂本チーム提供)。

(2) マッピングによる *gic* 変異の原因遺伝子の同定

本変異体を遺伝学的に解析するため、戻し交雑及びマッピング用 F2 集団育成の交雑に用いた。マッピング用の集団は Kasalath との F2 集団であり、これらの集団を用いて葉緑体をプロトプラスト法により観察し、112 個体中 17 個体の巨大葉緑体を得てラフマッピングに用いた。その結果 *gic* が 4 番染色体に座乗することが示唆され、更なる、マッピングを行った。

上記のマッピングを進めている段階で、戻し交雑により得られた *gic* と日本晴の交雑 F2 世代が得られたので、改めて *gic* の分離を調べた。この過程で、チャンパーで生育させたイネ幼苗 10 日後の第 2 葉を直接観察することにより、プロトプラストを経ずに葉緑体の直接観察が可能であることが明らかとなった。そこでこの観察法を用い、2 回の実験で計 100 個体における *gic* 変異の分離を調べたところ、野生型:巨大葉緑体は 73:27 で分離し、劣性 1 遺伝子による変異であることが明らかとなった。これらの結果から、*gic* 変異は葉緑体分裂に異常を示す突然変異によると推察した。

上述した新たな葉緑体観察法を用いてファインマッピングのための集団を選抜し、さらに 110 個体を得て解析を進めた。その結果、4 番染色体の約 600kb の領域に変異を特定することが出来た (図 2)。

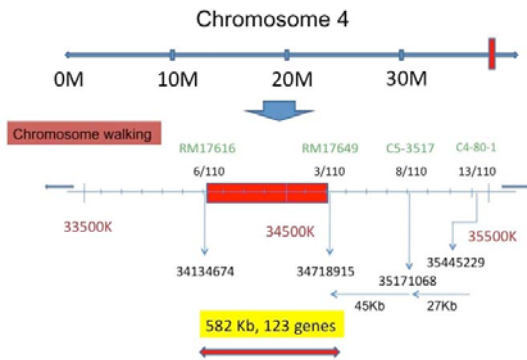


図2. マッピングによる *gic* 変異の特定

変異が特定された染色体領域には、RAP データベースにより 122 の遺伝子が推定されており、この中でコードされるタンパク質の N-末端に葉緑体局在化を持つタンパク質で、かつシロイヌナズナのタンパク質との相同性を指標に候補遺伝子を検索したところ、シロイヌナズナで ARC6 のパラログ(PARC6)としてアノテーションされている遺伝子 (At3g19180) と相同性の高い遺伝子 Os04g0675800 が見つかった。そこで *gic* 変異体においてこの遺伝子の塩基配列を決定したところ、7,030 bp のポジションにおいて A から T の塩基置換を見出した (図3)。

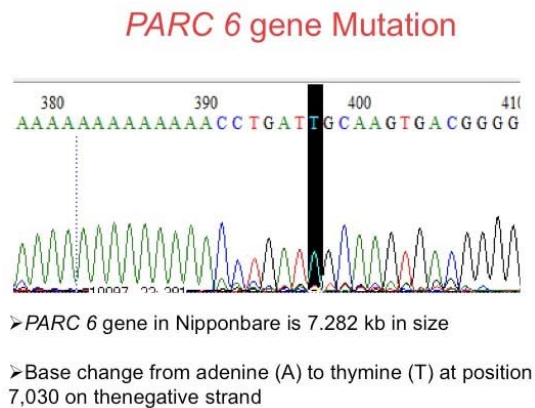


図3. 候補遺伝子に見出された塩基置換

シロイヌナズナにおいて ARC6 は葉緑体の内包膜に局在して外包膜にアンカーされた PDV タンパク質と相互作用し、ストロマ側に形成される FtsZ リングと外包膜側に形成されるダイナミンリングを葉緑体分裂面に誘導すると考えられている。興味深いことに、シロイヌナズナでは PARC6 の変異は葉緑体の巨大化を示さない。従って、シロイヌナズナとイネでは ARC6 の遺伝子重複と機

能分化の違いがあることが示唆された。今後は、OS04g0675800 が *gic* の原因遺伝子であることを証明するために、*gic* 変異と巨大葉緑体の連鎖、遺伝子導入による *gic* 変異の相補実験を進める予定である。

興味深い点として、今回得られたイネの *gic* は、シロイヌナズナの *arc* 変異体などとは異なり、野生型と比べて稈長が低く、稔性が悪く、粒の重さも軽いなど、生育上にも影響を及ぼすようである。今後も *gic* の生理的な解析と遺伝子単離を継続して行う予定である。

(3) 巨大葉緑体イネ変異体を用いた葉緑体形質転換の試み

葉緑体が巨大化する *gic* 変異体は、まだ成功例のないイネの葉緑体遺伝子導入のホストとして有用ではないかと考え、本研究では遺伝子導入のための実験を立ち上げた。研究開始から2年までは、戻し交雑による材料の準備が出来ないため、野生型の日本晴を用いて種子胚由来カルスの組織培養による再分化系と葉緑体遺伝子導入を試みた。遺伝子導入では、イネ葉緑体ゲノムにスペクチノマイシン(Spec)耐性遺伝子を挿入したクローンをドナーに用いた。

日本晴カルスを用いた再分化では、ストレプトマイシン濃度 50 µg/ml、100 µg/ml で阻害が見られず、200 µg/ml でカルスは再分化せず褐変した。また Spec では 200 µg/ml、500 µg/ml、1000 µg/ml いずれの場合も再分化したが、いずれも効率は低かった。液体培養の継代を経た再分化の場合、1回までは効率に変化が無かったが、それ以降は継代を増やすほど効率が低下した。これらのカルスを用いて2度の葉緑体形質転換をパーティクルガンにより行った。それぞれの実験では最低20のガン処理を行った。遺伝子導入実験後、カルスをスペクチノマイシン 500 µg/ml の培地で再分化させ、再分化個体を得ることができたが (図2)、Spec 耐性遺伝子の挿入は確認されなかった。

これらの予備実験をもとに、農業生物資源研究所の田部井豊博士を研究協力者として *gic* を用いた葉緑体形質転換を試みたが、研究機関内で形質転換体を得ることはできなかった。*gic* から誘導したカルスに葉緑体局在型 GFP を発現させてプラスチドを観察したところ、野生型と比べてカルスのプラスチドも巨大化していることが示唆されたので、

*gic*は葉緑体形質転換に好適であると考えられ、今後も得られた材料を用いて形質転換に用いる予定である。

(4) 葉緑体分化とゲノムの維持に関する重要因子の解析

葉緑体分化・維持の分子機構は、葉緑体形質転換に影響を与える素因として重要であると考え、申請者がこれまでに解析を進めている葉緑体分化・維持に関わる因子の解析についても、本研究の一部として研究を行った。葉緑体ゲノムの母性遺伝に関連し、花粉でオルガネラDNAを分解するシステムに関する変異体の解析、その解析により同定されたオルガネラヌクレアーゼDPD1、光合成の光阻害に関する光化学系II修復に関わるプロテアーゼ(FtsH)と葉緑体分化について新たな知見を得た。

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)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Tang, L.Y. and Sakamoto, W. (2011) Tissue-specific organelle DNA degradation mediated by DPD1 exonuclease. *Plant Signaling Behavior*, 6: 1391-1393, 査読有, doi:10.4161/psb.6.9.16595.
- ② Tang, L.Y., Matsushima, R., and Sakamoto, W. (2012) Mutations defective in ribonucleotide reductase activity interfere with pollen plastid DNA degradation mediated by DPD1 exonuclease. *Plant J.*, 70: 637-649, 査読有, doi:10.1111/j.1365-3113.2012.04904.x.
- ③ Kato, Y., Kouso, T., and Sakamoto, W. (2012) Variegated tobacco leaves generated by chloroplast FtsH suppression: implication of FtsH function in the maintenance of thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol.*, 53: 391-404, 査読有, doi: 10.1093/pcp/pcr189.
- ④ Kato, Y., Sun, X., Zhang, L., and Sakamoto, W. (2012) Cooperative D1 degradation in the photosystem II repair mediated by chloroplastic proteases in

Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 159: 1428-1439, 査読有, doi:10.1104/pp.112.199042.

[学会発表] (計11件)

- ① Sakamoto, W. Deradation of organelle DNAs mediated by the DPD1 exonuclease in pollen vegetative cells. *Plant and Animal Genome XIX*. January 12, 2011, San Diego, USA.
- ② 加藤裕介・坂本亘、D1タンパク質分解に関わるプロテアーゼ及び Deg5/Deg8 を欠損する三重変異体における表現型と D1 分解。第52回日本植物生理学会年会、2011年3月20日、仙台。
- ③ Tang, L.Y., Sakamoto, W. Molecular genetic characterization of *dpd2*, a mutant defective in pollen organelle DNA degradation. 第52回日本植物生理学会年会、2011年3月20日、仙台。
- ④ Kato, Y., Sakamoto, W. Cooperative degradation in the PSII repair mediated by FtsH and Deg proteases in *Arabidopsis* chloroplasts. International Workshop in Photosystem II. November 4, 2011, Chengdu, China.
- ⑤ Sakamoto, W. The FtsH heterocomplex in chloroplasts and its role in photosynthesis. 9th International Conference on AAA Proteins. November 8, 2011, Kumamoto.
- ⑥ Sakamoto, W. Tissue-specific organelle DNA degradation mediated by DPD1 exonuclease. *Plant and Animal Genome XX*. January 16, 2012, San Diego, USA.
- ⑦ Tang, L.Y., Sakamoto, W. Ribonucleotide reductase activity controls plastid DNA degradation during pollen development. *Plant and Animal Genome XX*. January 16, 2012, San Diego, USA.
- ⑧ Sakamoto, W. Prokaryotic factors in the biogenesis and continuity of chloroplasts: Focus on DNA, Protein, and Membranes. SEB Annual Main Meeting, July 1, 2012, Salzburg, Austria.
- ⑨ Kato, Y., Sun, X., Zhang, L., Sakamoto, W. Cooperative D1 degradation in the photosystem II repair mediated by chloroplastic proteases in *Arabidopsis*.

Okayama University International Symposium. October 23, 2012, Okayama.

⑩ 高見常明・坂本亘。老化葉におけるオルガネラヌクレアーゼ DPD1 の発現解析。第54回日本植物生理学会年会、2013年3月21日、岡山。

⑪ Sakamoto, W., Kato, Y. Cooperative protein degradation in photosystem II repair. 第54回日本植物生理学会年会シンポジウム、2013年3月23日、岡山。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂本 亘 (Wataru SAKAMOTO)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号: 20222002

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者 ()

中園幹生 (Mikio NAKAZONO)

名古屋大学・大学院・生命農学研究科・教授

研究者番号: 70282697