

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24年 5月 1日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658025

研究課題名（和文） 葉緑体形質転換に利用するためのアグロバクテリウム菌の改変

研究課題名（英文） Genetic modification of *Agrobacterium tumefaciens* in order to use chloroplast transformation.

研究代表者

野川 優洋（NOGAWA MASAHIRO）

信州大学・繊維学部・准教授

研究者番号：10283037

研究成果の概要（和文）：葉緑体 DNA に外来遺伝子を組込む葉緑体形質転換法は有用タンパク質の高生産に適している。葉緑体形質転換にはパーティクルガンが使用されているが、本研究では一般的な植物の形質転換に使用されている *Agrobacterium tumefaciens* 法で葉緑体形質転換が可能となるように *A. tumefaciens* の T-DNA を植物の核へと輸送する VIRD2, VIRE2 タンパク質を葉緑体へ輸送するように改変した。

研究成果の概要（英文）：Chloroplast transformation to incorporate a transgene into the chloroplast DNA and the transgene expression in chloroplast is suitable for high production of useful proteins in plants. Biolistic transformation with particle gun was used for chloroplast transformation. In this study, VIRD2 and VIRE2 proteins of *Agrobacterium tumefaciens* which transport bacterial T-DNA into plant nucleus were modified to convey the T-DNA into chloroplast. *A. tumefaciens* containing modified VIRD2 and VIRE2 would transform chloroplast of plants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	0	2,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	270,000	3,470,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、応用微生物学

キーワード：微生物遺伝・育種、DNA 伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物の分子育種による有用タンパク質生産の問題点

植物に遺伝子操作を行いワクチンなどの有用タンパク質を発現する株を「分子育種」し、この株を使用して有用物質を生産する「分子

農業」は新しい農業として注目を浴びている。多量の有用タンパク質を生産させるためには有用タンパク質の遺伝子（外来遺伝子）を多コピーで導入することが有効であるが、植物の場合、多コピーの外来遺伝子を導入しても、ジーンサイレンシングが起こり、外来遺伝子の発現を抑制してしまうために、目的タンパク質を大量生産できる形質転換植物を作成することは難しい。

(2) 葉緑体形質転換法の利点

植物細胞は葉緑体を複数含んでおり、また1つの葉緑体は複数コピーの染色体を持つことから、1細胞当たり約10,000コピーの葉緑体染色体をもっている。葉緑体染色体に外来遺伝子を導入できれば容易に外来遺伝子を多コピー化できる。また、葉緑体染色体は細菌型であるので真核生物の持つジーンサイレンシングが働かない。このため多コピー化した外来遺伝子から大量の目的タンパク質を合成できる。

(3) 葉緑体形質転換法

現在葉緑体を形質転換するには、微粒子にDNAをコーティングしたものを植物細胞に射出し、細胞内にDNAを物理的に輸送するパーティクルガンが用いられている。この方法は高価で特殊な装置を必要とするため、葉緑体形質転換は広く用いられる方法とはなっていない。

2. 研究の目的

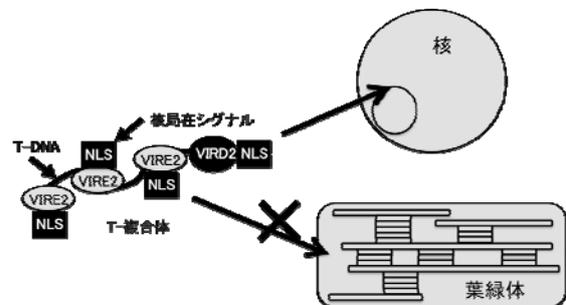
葉緑体は有用タンパク質生産を目的とした植物の遺伝子操作のターゲットとして適した特徴を持っている。葉緑体形質転換法はタバコなどいくつかの植物においてのみ成功しているが、一般的な手法とはなっていない。植物の形質転換に一般的に使用されている *Agrobacterium tumefaciens* をこの葉緑体形質転換法に使用できるように改変し、特別な

機器を必要とせず葉緑体形質転換を可能にすることを本研究の目的とした。

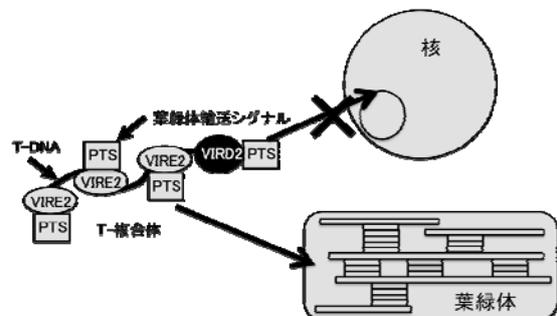
3. 研究の方法

(1) 研究概略

A. tumefaciens は、植物に由来するフェノール性化合物等の誘導物質が存在すると、Ti-プラスミド上のT-DNA領域を切り出す。T-DNAはパイロットタンパク質であるVIRD2とVIRE2と結合したT-複合体を形成し、タイプIV分泌系により植物細胞内へ送り込まれる。VIRD2, VIRE2に存在するNLS(核局在化シグナル)を植物のインポータンタンパク質が認識し、T-複合体を核内に輸送し、T-DNAが植物の染色体DNAに組込まれる。本研究では、*A. tumefaciens*のパイロットタンパク質のVIRD2, VIRE2の遺伝子を操作しVIRD2, VIRE2のNLSを変異導入により不活化し、葉緑体への輸送シグナル(PTS)をN末端に付加する。このことによりVIRD2, VIRE2は核ではなく葉緑体へと輸送されるようになると予想される。これに伴いT-複合体も葉緑体へ輸送されると考えられる。



VIRD2, VIRE2 による T-複合体の核への輸送



葉緑体形質転換体を得られる

改変 VIRD2, VIRE2 による T-複合体の葉緑体への輸送

(2) *virD2*, *virE2* 遺伝子のクローニング

一般的に植物の形質転換実験に使用されている *A. tumefaciens* LBA4404 株 (ゲノム配列不明) C58株 (ゲノム配列解読済み) EHA101 株 (強病原性株由来、*virD2*, *virE2* 遺伝子の配列は既知) から *virD2* 遺伝子と *virE2* 遺伝子を PCR 法でクローニングした。C58株、EHA101株由来の遺伝子は既知なのでその配列から PCR用のプライマーを設計した。LBA4404 株の遺伝子は塩基配列の情報がないので、配列既知の *virD* オペロン、*virE* オペロン配列から、比較的保存性の高い部分を使用して PCR 用プライマーを作成し、*virD2*, *virE2* 遺伝子の 5' 末端部分と 3' 末端部分を含む DNA断片をクローニングした。その塩基配列分析から両遺伝子の末端部分を決定し、新たに両遺伝子単離用のプライマーを設計した。

(3) NLSへの変異導入(*virD2* NLS, *virE2* NLS遺伝子の作成)

VIRD2 では 1カ所、VIRE2 では 2カ所に bipartite type NLS が存在する。NLS 自体は 4 から 7 アミノ酸と小さいので、点突然変異を導入し、NLS の保存配列 K (K or R) X(K or R) の塩基性アミノ酸をアラニン (A) に置換した。

(4) NLS の不活化の確認

VIRD2 NLS, VIRE2 NLS の C 末端側に マーカーである GFP を融合したタンパク質の遺伝子 (*virD2* NLS-*gfp*, *virE2* NLS-*gfp* 遺伝子) を Fusion PCR法で作成した。この融合タンパク質遺伝子を CaMV35S プロモーター制御下で発現するように pBI121バイナリーベクターに組み込み、*A. tumefaciens* LBA4404株に導入した。この *A. tumefaciens* を使用しタバコ BY-2 細胞を形質転換し、VIRD2 NLS-GFPと

VIRE2 NLS-GFPタンパク質で発現させ、その局在性を観察した。

(5) PTS の VIRD2, VIRE2 への融合(*pts-virD2* NLS, *pts-virE2* NLS遺伝子の作成)

サツマイモのポリフェノールオキシダーゼ遺伝子の PTS を VIRD2 ΔNLS, VIRE2 ΔNLS の N 末端側に融合したタンパク質の遺伝子を Fusion PCR 法によって作成した。

(6) *virD2*, *virE2* 遺伝子欠損 *A. tumefaciens* の作成

ゲノム配列の解読されている *A. tumefaciens* C58 株に由来する GV3101 pMB90 株を使用し、*virD* オペロン (*virD1-virD2-virD3*...) 中の *virD2* を取り除きカナマイシン耐性遺伝子 (*nptII*) を付加した (*virD1-virD3-nptII*) コンストラクトを作成し、*A. tumefaciens* 中では複製しないプラスミドベクター-pGPSacB に組み込み *virD2* 遺伝子削除用コンストラクト pGPSacB *virD2* を作成した。同様に *virE2* 削除用コンストラクトを作成した。これらのコンストラクトをエレクトロポレーション法で *A. tumefaciens* GV3101 pMB90 株に導入し、カナマイシン耐性で形質転換体を選抜した。形質転換体の中には相同組換えによって削除用コンストラクトが当該遺伝子オペロンに組み込まれた形質転換体が存在する。これらの形質転換体を選択圧の無い状態 (カナマイシンを含まない培地) で培養後、pGPSacB 中に存在するシュークローズ存在下で働く自殺遺伝子 *SacB* (レバンシュークラゼ) で選択すると、削除用コンストラクトのベクター部分が 2 回目の相同組換えによって取り除かれた、目的の遺伝子削除株が得られる。

4. 研究成果

(1) *virD2*, *virE2* 遺伝子の単離と NLS の解析
本研究でクローニングした LBA4404 株の

融合タンパク質遺伝子を作成し、タバコ BY-2 細胞で発現させる。

pts-virD2- NLS, pts-virE2- NLS 遺伝子の *virD2, virE2* 欠損 *A. tumefaciens* への導入し葉緑体形質転換用 *A. tumefaciens* を作成する。

葉緑体形質転換用のバイナリーベクターの開発。現在使用されている葉緑体形質転換コンストラクトを、バイナリーベクター pBI121 の RB と LB に挟まれた領域に組込む。

葉緑体形質転換用バイナリーベクターを葉緑体形質転換用 *A. tumefaciens* に導入し、タバコ培養細胞 BY-2 の形質転換を行い、葉緑体形質転換できるか検証する。

まだ、道のりは長いが、*A. tumefaciens* を使用しての葉緑体形質転換法が成功すれば、*A. tumefaciens* によって形質転換可能な様々な植物において、植物と *A. tumefaciens* を共培養するという非常に簡単な方法で、葉緑体形質転換法による有用タンパク質の大量生産に道を開くはずである。

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)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

野川 優洋 (NOGAWA MASAHIRO)

信州大学・繊維学部・准教授

研究者番号 : 10283037