

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：34304

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658010

研究課題名(和文) 葉緑体の遺伝子組換えによるストレス耐性パンコムギの育成

研究課題名(英文) Production of stress-tolerant wheat by chloroplast transformation

研究代表者

寺地 徹 (TERACHI, Toru)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90202192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タバコなどのナス科モデル植物で確立された葉緑体の形質転換技術をパンコムギに適用し、葉緑体の遺伝子組換え体を安定的に得る方法を確立すること、ならびにこの技術を用いて、強光や乾燥などの非生物的ストレスに強いパンコムギを育成することを目的に、以下の実験を行った。非生物的ストレスを受けた際、葉緑体内に発生する、有害な活性酸素分子種(ROS)の除去を担う、アスコルビン酸ペルオキシダーゼの遺伝子(apx)をパンコムギ用の葉緑体形質転換ベクターにクローニングし、そのDNAを遺伝子銃で未熟胚由来のカルスに射出して、組換え体を選抜したが、葉緑体ゲノムにapxを持つ組換えコムギは得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Chloroplast transformation technology has been developed for Solanaceae crops such as tobacco. In order to obtain the first transplastomic wheat, we applied this technology to wheat. We tried to produce the transplastomic wheat that is tolerant to abiotic stresses such as strong light and drought. Since the plant often produces harmful reactive oxygen species under abiotic stresses, we wanted to make an over expresser of chloroplast ascorbate peroxidase. Apx gene encoding ascorbate peroxidase was cloned into wheat chloroplast transformation vectors, and vector DNAs were delivered to the immature embryo-derived callus by the particle bombardment system, then recombinants were selected on the plate containing antibiotics. Although about 54,000 immature embryos were prepared and used in the experiment, no transformant was obtained.

研究分野：plant organelle genetics

キーワード：wheat chloroplast transformation apx stress-tolerance

1. 研究開始当初の背景

(1) 一般に、作物の単位面積あたりの収量は、最高値と年ごとの平均値との間に大きな差があり、パンコムギの場合、平均収量は最高値のわずか 13%にしかならない。この収量減少の多くは、強光、高温、干ばつなどの非生物的ストレスに起因すると考えられ、病害虫などの生物的ストレスによる減少が 5%に留まるのに対し、非生物的ストレスによる減少は 82%にも及ぶ (Slater et al. 2003)。この事実や、近年の気候変動に伴う干ばつ、耕作適地の減少を考えると、将来にわたって作物の収量を維持・増加させるためには、作物の非生物的ストレスへの耐性を高める方策を考える必要があった。

(2) 植物は非生物的ストレスを受けた際、葉緑体内に活性酸素分子種 (ROS) を発生し、この ROS が最終的に植物の成長に悪影響を及ぼすことが知られている。本研究は、この有害な ROS の除去効率を高め、植物にストレス耐性を付与することを目指そうとした。この戦略自体は新しいものではないが (Kwon et al. 2002 他文献多数)、その実現のために葉緑体の遺伝子組換えを用いようとするところに、本研究の特色がある。

(3) 高等植物の葉緑体の遺伝子組換えは、今から四半世紀前にタバコで最初に報告されていた (Svab et al. 1990)。2000 年代に入り、作物を改良する (e.g. 害虫抵抗性、Reddy et al. 2002) あるいは物質生産のプラットフォームをめざす (e.g. ヒト血清アルブミン、Millan et al. 2003) など様々な目的を持って、世界各国の研究者が葉緑体の遺伝子組換えに挑戦するようになり、本研究の開始時点でも、ナス科を中心とする 15 に及ぶ植物種で成功例が報告されていた。しかし組換え体を得る効率は、ほとんどの植物種で低く、葉緑体の遺伝子組換えをルーティンで行えるのは、事実上タバコなどごく一部の種にかぎられていた。

(4) 本研究で対象としたパンコムギについては、葉緑体の遺伝子組換えの初めての成功例が報告されていたものの (Cui et al. 2011)、実験に再現性がないとの批判を受け、翌年には同じグループの責任著者により、論文自体が撤回された (He 2012)。したがって、研究開始当初、パンコムギの葉緑体の遺伝子組換え体は、世の中に 1 個体も存在していなかったことになる。

2. 研究の目的

(1) 本研究はタバコなどナス科植物で確立された葉緑体の遺伝子組換え技術を、世界の主要作物であるパンコムギに初めて適用し、活性酸素分子種 (ROS) の除去にかかわるアスコルビン酸ペルオキシダーゼの遺伝子 (apx 遺伝子) を葉緑体内で強発現させることにより、非生物的ストレスに耐性を有するパンコムギを作出することを究極の目的とした。

(2) そのため本研究では、パンコムギで唯一、再分化可能な外植片である「開花後 2 週間の未熟胚」ならびにこの未熟胚に由来するカルスの効率のよい調製システムを構築することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) タバコなどのモデル植物で行われている葉緑体の遺伝子組換えは、

葉緑体ゲノムと相同な領域を持つプラスミドベクター (葉緑体形質転換ベクター) を構築する。

パーティクルボンバードメント法でベクターを葉に撃ち込む。

葉緑体ゲノムとベクターとの相同組換えにより導入されたマーカー遺伝子の働きで、抗生物質耐性を示すようになった組換え体を選抜する。

という一連の操作を経て達成される。しかしコムギの場合、葉片から植物を再分化させることは不可能なので、遺伝子導入の外植片として、未熟胚、あるいはそこから生じた再分化能力を持つカルスを用いる必要がある。

(2) 本研究では実験材料として、培養と再分化に適したパンコムギの品種 アカダルマおよび Bobwhite を用いた。また、3 年目の後半には、核の形質転換実験によく用いられている品種 Fielder も材料に加えた。

(3) 研究開始当初から現在まで、京都産業大学でコムギを栽培する場合、設備の関係で秋蒔きに限られ、未熟胚を得ることができる機会は年 1 回のみである。そこで、1 年を通じて未熟胚を調製可能なシステムを作るため、研究開始当初から、共同利用・共同研究拠点である鳥取大学乾燥地研究センター (受け入れ研究者: 辻本教授) と共同研究を実施し、先方のグロースチャンバーでコムギを栽培することで、季節に依らない材料の調製を目指した。すなわち、京都では 12 月に播種、5 月に未熟胚の単離を行ない、鳥取では 9 月に播種、11 月に未熟胚の単離を行う。

(4) 未熟胚の単離は、

開花後 2 週間の未熟種子を収穫する。

70%エタノールで滅菌する。

滅菌蒸留水で 3 回洗浄する。

という作業の後、クリーンベンチ内で、無菌的に行った。その後、

単離した未熟胚を胚板が上になるように 2,4-D (2mg/L) を含む LS 培地に置床する。

未熟胚を置床したプレートを約 1 ヶ月間、25 °C でインキュベートしてカルスを形成させる。

このカルスへパーティクルボンバードメント法によりベクターを射出する。

グリーンスポットが出現したカルスを、硝酸銀 (10mg/L) を含む培地へ移植する。

植物体の再分化を誘導する。

という一連の作業を行った。図 1. に、硝酸銀含有培地を用いた、カルス上のグリーンスポットからのコムギの再分化の様子を示す。

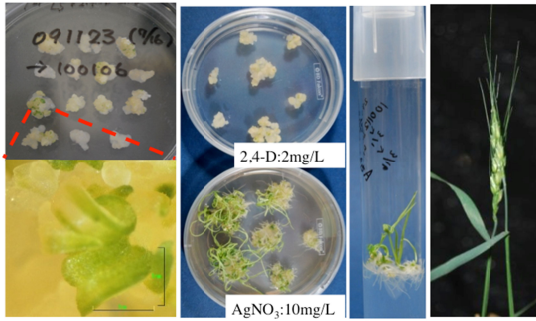


図 1.カルスグリーンスポットからのコムギの再分化

(5) 導入に用いるコムギの *apx* 遺伝子を RT-PCR 法とクローニングにより得た。RT-PCR の鋳型には葉から調製した全 RNA を用い、プライマーの設計は、NBRC コムギデータベースに存在する cDNA クローン (イネ *apx* 配列 AK099201 と相同性を持つ) の塩基配列をもとに行った。

(6) コムギ専用の葉緑体形質転換ベクターを構築するため、コムギの葉緑体ゲノムの全塩基配列 (AB042230) を参考に、相同組換え領域として機能する葉緑体 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。クローニングしたのは、

rbcl-ycf4
23SrRNA-*ndhH*
rps12-16SrRNA

の 3 領域である。

葉緑体形質転換ベクターは、この断片を左右に分割するように、必要な遺伝子を導入して作成した。選抜マーカには、

aadA (ストレプトマイシン耐性遺伝子)
nptII (カナマイシン耐性遺伝子)

の 2 種類の遺伝子を使用し、sGFP 遺伝子を有する合計 6 種類 (3 領域 x2 マーカー) のコンストラクトを作成した (図 2)。

平成 24 年 5~7 月に実施した形質転換には、このベクターを用いた。また、それ以降の実験は、sGFP 遺伝子を *apx* 遺伝子に置換したものをを用いた。

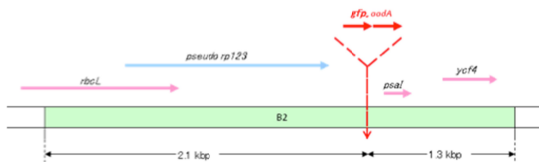


図 2. コムギ葉緑体形質転換ベクターの一例

(7) 大量調製した葉緑体形質転換ベクターの DNA を、直径 0.6 μm の金粒子に附着させ、PDS1000-He システム (BioRad) を用いてカルスに打ち込んだ。1 プレートあたり約 50 個のカルスを置床し、6 種類のベクターと 4 つの撃ち込み条件を組み合わせ、合計 191 プレートに対して遺伝子導入実験を行った。導入後は選抜試薬 (ストレプトマイシンまたはカナマイシン) を添加した培地に移植し、選抜試薬濃度を徐々に上げて再分化を誘導した。

再分化個体および緑色を保持しているカルスの合計 38 個から DNA を回収し、PCR を行った。

4. 研究成果

本研究では、世界で初めて葉緑体の遺伝子組換えパンコムギを作出しようと実験を重ねた。しかしながら今回の実験では、研究の期間中に組換え体を得ることはできなかった。この結果を受けて、葉緑体の遺伝子組換えの成否を決める要因を考察した。まずこの実験を実施するにあたり、再分化可能な外植片を十分量確保できるかどうかは重要であり、実験の成否に大きく影響する。前述のように、コムギの場合、外植片として使用できるのは、開花後 2 週間の未熟胚とそれを培養して得られるカルスに限定される。その観点から本研究では、アカダルマ、Bob white、および Fielder の 3 品種について、未熟胚の単離と培養を行った。表に 2012 年度~2014 年度にわたって単離した未熟胚の数を、品種別に示す。未熟胚からのカルス形成は、我々が用いた培養条件では、アカダルマがもっとも良かったことから、この品種を中心に栽培と未熟胚単離を行ない、合計約 4 万 4 千個の未熟胚を単離して培地に置床した。また Bob white では約 7,600 個、Fielder では約 2,600 個の未熟胚を単離することができ、合計約 5 万 4 千個以上の未熟胚を置床した (表 1)。

なお研究を通じて、未熟胚のカルス化率、カルスからの再分化率はともに良好であり、実験の障害にはならなかったことから、今回の方法で未熟胚数は十分確保できたと考えている。

一方、コムギの葉緑体の遺伝子組換えには、外植片として用いるカルス特有の問題がある。すなわち我々が実験に用いているカルスは白色で、細胞中の色素体はプロプラスチドと呼ばれる未発達な状態で留まっており、射出する直径 0.6 μm の金粒子に比べて「的」として小さい。今後、例えば、葉緑体の転写因子である GLK 遺伝子を核へ導入する方法で、プロプラスチドを葉緑体へと発達させ、再分化の能力を保持した緑色カルスを獲得する努力が必要となるかもしれない。

表 1. コムギ各品種から単離した未熟胚数

年度	場所	アカダルマ	Bob white	Fielder
2012	京産大	2,442	-	-
	柘野	8,400	-	-
	鳥取	4,783	4,900	-
	小計	15,625	4,900	-
2013	京産大	1,828	664	-
	鳥取	11,353	-	-
	小計	13,181	664	-
2014	京産大	8,953	2,120	-
	鳥取	6,619	-	2,653
	小計	15,572	2,120	2,653
	合計	44,378	7,684	2,653

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)

[学会発表](計3件)

辻村真衣、山岸博、辻本壽、寺地徹

葉緑体形質転換に適した緑色カルスを形成するコムギ実験系統の開発

鳥取大学乾燥地研究センター平成26年度共同研究発表会、平成26年12月7日(日)、鳥取大学乾燥地研究センターアリドラボ展示室(鳥取県鳥取市)

寺地徹、山岸博、辻村真衣、辻本壽

葉緑体の形質転換技術を用いたストレス耐性コムギの作出、鳥取大学乾燥地研究センター平成25年度共同研究発表会、平成25年12月8日(日)、鳥取大学乾燥地研究センターアリドラボ展示室(鳥取県鳥取市)

寺地徹、山岸博、辻村真衣、辻本壽

葉緑体の形質転換技術を用いたストレス耐性コムギの作出、鳥取大学乾燥地研究センター平成24年度共同研究発表会、平成24年12月2日(日)、鳥取大学乾燥地研究センターアリドラボ展示室(鳥取県鳥取市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺地 徹 (TERACHI, Toru)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90202192

(2)研究分担者

山岸 博 (YAMAGISHI, Hiroshi)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：10210345