

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660008

研究課題名(和文)植物における有用物質生産のための葉緑体遺伝子発現「光スイッチ」

研究課題名(英文)"Light-switch" for higher production of foreign proteins in plant chloroplasts

## 研究代表者

小林 裕和 (Kobayashi, Hirokazu)

静岡県立大学・食品栄養環境科学研究所・教授

研究者番号：80170348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物体生育後、タンパク質性医薬品等の有用物質生産を開始する「光スイッチ」を開発した。加えて、「乾燥スイッチ」も開発も試みた。シロイヌナズナ葉緑体ゲノムにコードされるPSI反応中心タンパク質遺伝子(psaA)の選択的転写抑制を活用した。「光スイッチ」としての最適光波長は、700 nmであることを見いだした。Chroma-Glo Luciferase (Promega)のCBRLuc(赤色)とCBG68Luc(緑色)をレポーター遺伝子として用い、一過性発現によるアッセイ系を構築した。これにより、転写抑制を遺伝子発現促進に置き換えるRNAiの活用を評価した。

研究成果の概要(英文)：Costs for production of therapeutic proteins in animal cells decline down to 1/100 when they are made in plants. However, such exogenous proteins frequently interfere with the growth of plants. Therefore, "light-switch" for turning on the expression of foreign genes is needed after plants have grown. "Drought-switch" was also tried to develop. The selectable suppression of transcription of psaA, Arabidopsis chloroplast genome-encoded gene for photosystem (PS) I reaction center protein, was applied to establishment of "light-switch". The optimal light wavelength was determined at 700 nm. Reporter genes, CBRLuc for red color luminescence and CBG68Luc for green one as provided as Chroma-Glo Luciferase (Promega) were employed. An evaluation protocol on the basis of transient expression was established. A system for turning on the gene expression by light exposure was designed with RNAi, as the psaA regulation was negative.

研究分野：農学

キーワード：有用物質生産 葉緑体工学 遺伝子発現制御 光 転写

## 1. 研究開始当初の背景

本研究代表者が見いだした葉緑体遺伝子発現の「光」制御は、選択的に光化学系 (PS) I 反応中心タンパク質遺伝子 (*psaA*) を支配下に置くものである (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10760-10764, 2010)。昨年、米国農務省 (USDA) は、植物由来のみの遺伝子で作製された除草剤耐性遺伝子組換えシバを遺伝子組換え規制外とする判断を下した (*Nature*, **475**, 265-266, 2011; *Nature*, **475**, 274-275, 2011)。これに先立ち、本研究代表者は、すべて植物由来の遺伝子を用い、フラボノイド類含量が約3倍に増大したシロイヌナズナを作製した (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 936-938, 2009)。また、本課題研究に必要な技術として、植物由来の葉緑体形質転換維持マーカーを確立した (*Plant Physiol.*, **147**, 1976-1983, 2008)。さらに、植物機能性成分増強のための発光ダイオード (LED) 照射技術を開発した (特願 2007-087278, 特願 2008-089093, 特願 2008-089111)。この照射技術も本「光スイッチ」において活用された。

## 2. 研究の目的

医療目的の高付加価値タンパク質あるいは代謝産物は、植物体に産生させることにより、培養や化学合成に比べ大幅にコストを削減できる。しかしながら、この種のタンパク質あるいは代謝産物は、植物にとって異物であり、植物の生育を阻害することが少なくない。したがって、植物体の生育後に、これら外来遺伝子の発現を誘導し、目的物を生産する植物工学の開発が望まれる。そこで、(1) 「光」による外来遺伝子の発現誘導に着目する。本研究代表者は、光を感知した葉緑体遺伝子発現の制御系を見いだしている (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10760-10764, 2010)。一方、通常の栽培植物では、(2) 葉緑体ゲノム上の遺伝子は花粉に取り込まれず、したがって、外来遺伝子の生態系への拡散を回避できる。さらに、(3) 葉緑体は物質蓄積に適した細胞内小器官である。本研究代表者は、葉緑体形質転換系を開発している (*Plant Physiol.*, **147**, 1976-1983, 2008)。これらの実績を活用し、植物遺伝子発現の葉緑体「光スイッチ」系を樹立する。

## 3. 研究の方法

(1) 植物材料：シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) Columbia (Col-0) を用いた。シロイヌナズナ遺伝子欠失変異系統 (knockout, KO) は、*Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) から入手した。ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) を実験に供した。

(2) 電子伝達系阻害剤処理：電子伝達系阻害剤 3-(3',4'-*dichlorophenyl*)-1,1'-*dimethyl urea* (DCMU) あるいは 2,5-*dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone* (DBMIB) への暴露

下、また 700 nm の波長特性を有する発光ダイオード (LED) の照射下における *psaA* 転写産物の変動を定量した。

(3) DNA コンストラクトの作製：葉緑体形質転換ベクター pLD26 の *PpsbA* の制御下にレポーター遺伝子 Chroma-Glo Luciferase (Promega) の *CBRLuc* (赤色発光) あるいは *CBG68luc* (緑色発光) を In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) によりそれぞれ連結した。

(4) パーティクルガン：DNA コンストラクトを Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad) により葉緑体内に導入後、ルシフェラーゼ・アッセイに供した。

(5) アクティベーション・タギング遺伝子探索法：アクティベーション・タギング法 (ゲノム DNA にエンハンサーを含んだ T-DNA をランダムに挿入し、エンハンサー近傍の遺伝子を活性化させた変異体を作製する方法) を用いて、形質転換カルスを作成した。その中から、200 mM (海水の約半分の濃度) の培地でも生育可能な形質転換カルスを選抜した。得られた耐塩性カルスから DNA を抽出し、導入された T-DNA のコピー数をサザン解析によって、さらに、その導入部位を TAIL (thermal asymmetric interlaced)-PCR によって調べた。また、その近傍にある遺伝子をデータベースで検索した。

## 4. 研究成果

(1) 「光スイッチ」としての最適光波長の特定：PS I - PS II 差スペクトルから推定される効果が見込める波長のうち、700-nm 光が最適であることが判明した (図 1)。

(2) 700-nm 光制御遺伝子プロモーター *PpsaA* (PS I 反応中心タンパク質遺伝子プロモーター) の作動評価：葉緑体における遺伝子発現モニター系を開発する目的で、*CBRLuc* (赤色発光) と *CBG68luc* (緑色発光) のそれぞれの酵素タンパク質コード領域を 700-nm 光非制御遺伝子プロモーター *PpsbA* (PS II 反応中心タンパク質遺伝子プロモーター) の制御下に置いた。これらの遺伝子 DNA には、大腸菌中で高頻度に欠失が生じたため、経代を最小限に留めると共に低温で培養した。*PpsaA* の発現の 700-nm 光制御は「抑制」に働くため、*CBG68luc* のアンチセンス DNA を *PpsaA* の制御下に置くコンストラクトを完全化学合成した。これらのコンストラクトをパーティクルガンで植物葉に打ち込み、700-nm 光照射による遺伝子発現を評価した (図 2)。

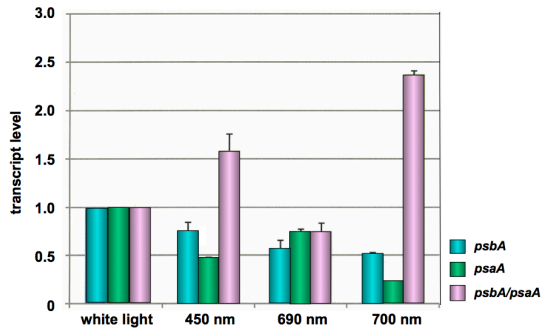


図1 「光スイッチ」に適した光波長  
発芽 10 日目のシロイヌナズナ実生を各種波長の LED 光 ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) にて 2 日間照射した。  
縦軸: 転写産物量  
*psaA*: PS I 反応中心タンパク質遺伝子  
*psbA*: PS II 反応中心タンパク質遺伝子  
*psbA/psaA*: 大ほど最適

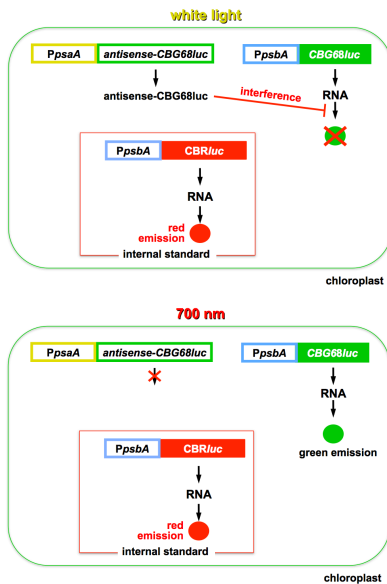
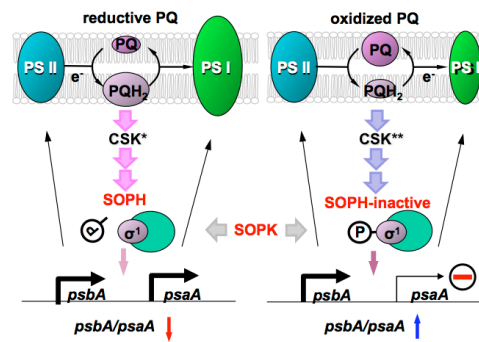


図2 「光スイッチ」の実験デザイン  
白色光下では、*CBG68luc* の発現はアンチセンス-*CBG68luc* RNA により抑制されている。これが 700-nm 光下では解除される。

(2) 「光スイッチ」に介在する機構の解明: 光化学系レドックス環境に影響を与えると考えられる機能タンパク質として、state transition 7 (STN7)、proton gradient regulation 5 (PRG5)、および chloroplast sensor kinase (CSK) に注目し、これらの KO あるいは突然変異系統を実験に供した。阻害剤処理や 700-nm LED 照射によりプラストキノン (PQ) の酸化還元電位を変化させた際の *psaA* 転写産物を定量した。その結果、本制御への CSK の関与が明らかになった (図 3)。



SOPH: SIG1 protein phosphatase (under redox regulation)  
SOPK: SIG1 protein kinase  
CSK: chloroplast sensor kinase (Allen, 2008) CSK\*, CSK\*\*: different status of activation

図3  $\sigma$  因子 SIG1 のリン酸化を介した葉緑体遺伝子の選択的発現制御 (模式図)

(4) 「乾燥スイッチ」の開発: 700-nm 光と同様に、乾燥ストレスは圃場における適用が簡便である。植物にとって乾燥ストレスは、水を吸収しにくいという観点において塩ストレスと類似する。シロイヌナズナを用い網羅的なアクティベーション・タギング遺伝子探索法を構築し、これを塩応答機構に介在する遺伝子の同定に活用した。62,000 の形質転換カルスから、150 mM NaCl に対して耐性を示す 18 の *salt tolerant callus* (*stc*) 変異候補系統を得た。ゲノム中での T-DNA 挿入位置を決定するために、TAIL-PCR (thermal asymmetric interlaced-PCR) 法を行った (図 4)。*stc1* 変異系統については、ミオイノシトール-1-P-生成酵素遺伝子 (*MIPS1*, At4g39800) の近傍に T-DNA が挿入されていた。含塩カルス誘導培地 (CIM) における *stc1* 変異系統 *MIPS1* 遺伝子の発現は、野生系統に対して 260 倍であった。これらの知見を「乾燥スイッチ」に応用する。

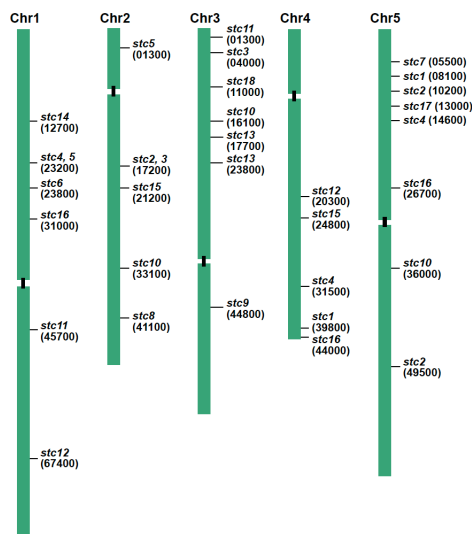


図4 アクティベーション・タギング遺伝子探索法により見いだした *stc* 遺伝子群の遺伝子座

## 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 A. Ahmad, Y. Niwa, S. Goto, T. Ogawa, M. Shimizu, A. Suzuki, K. Kobayashi, and H. Kobayashi: bHLH106 integrates functions of multiple genes through their G-Box to confer salt tolerance on *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, **10**, 2015 (pp. 1-22) DOI:10.1371/journal.pone.0126872 査読有
- ② A. Ahmad, Y. Niwa, S. Goto, K. Kobayashi, M. Shimizu, S. Ito, Y. Usui, T. Nakayama, and H. Kobayashi: Genome-wide screening of salt tolerant genes by activation-tagging using dedifferentiated calli of *Arabidopsis* and its application to finding gene for *myo*-inositol-1-P-synthase. *PLoS ONE*, **10**, 2015 (pp. 1-22) DOI: 10.1371/journal.pone.0115502 査読有
- ③ K. Nakanishi, S. Narimatsu, S. Ichikawa, Y. Tobisawa, K. Kurohane, Y. Niwa, H. Kobayashi, Y. Imai: Production of hybrid-IgG/IgA plantibodies with neutralizing activity against Shiga toxin 1. *PLoS ONE*, **8**, e80712, 2013 (pp. 1-9) 10.1371/journal.pone.0080712 査読有
- ④ S. Kumazawa, S. Kubota, H. Yamamoto, N. Okamura, Y. Sugiyama, H. Kobayashi, M. Nakanishi, and T. Ohta: Antiangiogenic activity of flavonoids from *Melia azedarach*. *Nat. Prod. Commun.*, **8**, 1719-1720, 2013 査読有

[学会発表] (計9件)

招待講演

- ① H. Kobayashi: A gene expression “light switch” in plants: Applications to drug production engineering. The 11th China-Japan International Symposium on Health Sciences, 2014年11月05日, 静岡
- ② 小林裕和: 植物遺伝子発現「光スイッチ」--- 薬生産エンジニアリングへの応用. 中部公立3大学 新技術説明, 2014年10月10日, 東京
- ③ 小林裕和: 光技術の植物への応用 --- 生理機能評価・改良および物質生産光スイッチ. 平成26年度「農業・工業原材料生産と光技術研究会」, 科学技術研究振興財団, 2014年10月02日, 浜松
- ④ H. Kobayashi: Chloroplast biogenesis: Light-induced redox control of gene expression. Special Seminars (hosted by J.J.

Harada, B.B. Buchanan), Univ. California, Davis and Univ. California, Berkeley, 2013年4月18日~22日, Davis and Berkeley, USA

一般講演

- ⑤ 柴田考世, C. Paweena, 清水正則, 小林裕和: 外来性タンパク質を葉緑体で高蓄積させるための「光スイッチ」の機構と応用. 日本農芸化学会 2015年度大会, 2015年03月26日~29日, 岡山
- ⑥ 青木亮裕, 清水正則, 小林京子, 細谷孝博, 熊澤茂則, 小林裕和: シロイヌナズナの緑化を抑制する動物神経系 CRIPT 相同タンパク質の機能. 日本農芸化学会 2015年度大会, 2015年03月26日~29日, 岡山
- ⑦ 望月峰子, 清水正則, 小林裕和: 保存野菜からの PCR 用 DNA の最簡便抽出・検出法 “10-sec Prep. 日本農芸化学会 2014年度大会, 2014年03月28日~30日, 生田
- ⑧ P. Chuenwarin, A. Shimazaki, M. Shimizu, M. Katsumata, H. Kobayashi: A protein phosphatase involved in light-regulated expression of photosynthesis genes in *Arabidopsis* chloroplasts. 第55回 日本植物生理学会年会, 2014年3月18日~20日, 富山
- ⑨ 青木亮裕, 清水正則, 澤崎達也, 小林裕和: 動物神経系 CRIPT と相同なシロイヌナズナ緑化抑制タンパク質. 第55回 日本植物生理学会年会, 2014年3月18日~20日, 富山

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 目的遺伝子を発現させるための光学スイッチ用コンストラクト

発明者: 小林裕和, 山本峻資, 清水正則

権利者: 静岡県立大学法人

種類: 特許

番号: 2013-050728

出願年月日: 2013年3月13日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/pctech/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 裕和 (KOBAYASHI, Hirokazu)

静岡県立大学・大学院食品栄養環境科学研究  
院・教授  
研究者番号：80170348