

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14912

研究課題名(和文) 完全人工合成された葉緑体ゲノムを有する遺伝子組換え植物の創出

研究課題名(英文) Development of the method for generation of transplastomic plants harboring artificially designed plastid genomes

研究代表者

中平 洋一 (NAKAHIRA, Yoichi)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：40423868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体の機能を合成生物学的に改変することを目指し、本研究では、人工合成した葉緑体ゲノムを高等植物の葉緑体に導入し、野生型ゲノムと完全に置き換え、安定に維持するための要素技術の開発を進めた。具体的には、まず、目的遺伝子の厳密な発現誘導が可能な「人工リボスイッチ」を構築した。さらに、当該発現誘導系を用いて、野生型ゲノムのみを特異的に切断する「人工ヌクレアーゼ」をコントロールすることで、組換え型ゲノム(人工ゲノム)への置換(=ホモプラズミック化)の促進に資するかを検証した。

研究成果の概要(英文)：Towards comprehensive design of chloroplast genomes in higher plants, in this work, we attempted to develop the method for allowing complete replacement of the wild-type plastid genomes with artificially constructed ones. Firstly, we established an engineered riboswitch-based inducible gene expression system for strict regulation of plastid genes. Then, we examined whether a riboswitch-controlled artificial endonuclease, exclusively recognizing specific DNA sequences derived from the wild-type plastid genomes, could help to achieve homoplasmy of transplastomic lines.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：葉緑体 合成生物学 人工ゲノム 遺伝子発現制御 人工リボスイッチ 人工ヌクレアーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

相同組換えを介した葉緑体ゲノムへの遺伝子導入技術(葉緑体形質転換)は、葉緑体 DNA の圧倒的なコピー数を背景とした「有用タンパク質の大量発現 (=大腸菌と同等のレベル)」や、代謝工学による「有用化合物の効率的な生産」等を実現できる技術として注目されている。一例として、研究代表者は、セルロース系バイオマスの酵素糖化に資する複数の耐熱性酵素の大量発現に成功している (Nakahira *et al.* (2013) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 2140-2143)。

近年、巨大 DNA クローニング技術の進展により、葉緑体ゲノム全体を微生物にクローニングし、加工・編集することが可能になった (Itaya *et al.* (2008) *Nat. Methods.* 5: 41-43, O'Neill *et al.* (2012) *Nucleic Acids Res.* 40: 2782-2792)。従って、人工合成された葉緑体ゲノムを宿主植物の葉緑体に導入し、安定に維持することができれば、葉緑体機能の合成生物学的改変に向けた要素技術となることが期待される。しかし、多重コピー存在する葉緑体ゲノムを人工ゲノムと完全に置き換え、安定な形質転換体を取得する方法は確立されていない。

### 2. 研究の目的

(従来の)葉緑体形質転換における律速過程は、1細胞あたり最大 10,000 コピー存在する全ての葉緑体 DNA を組換え型に置き換える“ホモプラスミック化”にある。加えて、完全な形の人工ゲノムを葉緑体に安定導入するには、“相同組換え”を介して人工ゲノムと野生型ゲノムとの間で起こり得る“ハイブリッド・ゲノム形成”を抑制することが必要である。そこで、本研究では、自己(人工ゲノム)は認識しないが、非自己(野生型ゲノム)を特異的に認識する「人工ヌクレアーゼ」を用いることで、野生型ゲノムを効率的に切断・除去し、人工ゲノムへの置換 (=ホモプラスミック化)を促進できる「自己・非自己ゲノム認識システム(図1)」の開発を試みた。

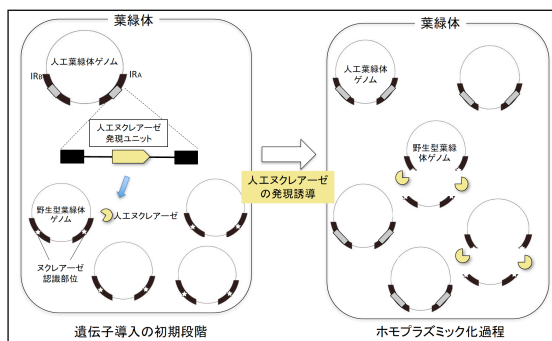


図1. 人工ヌクレアーゼを利用した「自己・非自己ゲノム認識システム」

### 3. 研究の方法

植物細胞に人工葉緑体ゲノムを導入する前提条件として、本研究では、「自己・非自己

ゲノム認識システム」の開発を以下の手順で進めた。

(1) (相同組換えを介した)葉緑体形質転換に、「自己・非自己ゲノム認識システム」を活用する場合には、遺伝子導入の各段階に応じて人工ヌクレアーゼの発現量を厳密に制御することが重要である。具体的には、相同組換えを介した遺伝子導入初期段階では、微量に発現した人工ヌクレアーゼによって野生型ゲノムの標的部位に“部分的”な二本鎖 DNA 切断を生じ、葉緑体形質転換ベクターとの間での“相同組換え”が促進される(図1)。組換え型ゲノム(≡人工葉緑体ゲノム)の増加に併せて人工ヌクレアーゼの発現量を上昇させることで、野生型ゲノムのみが選択的に切断・分解される(図1)。その際、組換え型ゲノムは、(遺伝子挿入により)認識配列が欠失されているため、ヌクレアーゼによる切断を免れて複製される。

以上のように、厳密な遺伝子発現誘導を可能にする技術として、本研究では、「テオフィリン依存型人工リボスイッチ」に着目した(図2)。システムの基盤となる最適リボスイッチ制御配列を選抜するために、発光レポーター株(葉緑体形質転換タバコ)を出し、ルシフェラーゼ・アッセイにより評価した。

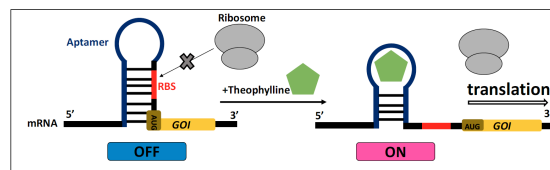


図2. テオフィリン依存型人工リボスイッチを用いた遺伝子発現誘導系

(2)「自己・非自己ゲノム認識システム」の有効性は、以下のようにして検証した。野生型葉緑体ゲノムの逆位反復配列(IR<sub>A</sub>, IR<sub>B</sub>)上の遺伝子間領域に導入部位を定め、当該領域の塩基配列を特異的に認識する人工ヌクレアーゼ(CRISPR-Cas9)を設計した。「実施項目(1)」で選抜された「人工リボスイッチ」によって制御される Cas9 遺伝子を実装した葉緑体形質転換ベクター(図3)を作成し、パーティクル・ガン法によりタバコ葉緑体に遺伝子導入することで、(従来型の形質

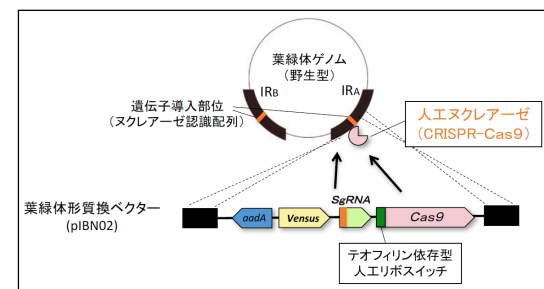


図3. 発現誘導性人工ヌクレアーゼを実装した葉緑体形質転換ベクター (pIBN02)

転換ベクターを使用した場合と比較して) 遺伝子導入効率の向上が認められるかを検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 葉緑体での厳密な遺伝子発現誘導を可能にする人工リボスイッチ制御配列の検討

本研究では、4種類のリボスイッチ制御配列 (RS-D, RS-E, RS-E\*, s.theo-RS) に注目し、当該配列の制御下でホタル・ルシフェラーゼを発現する発光レポーター植物 (タバコ) を作出した。その内、s.theo-RS はタバコ葉緑体での先行報告例 (Verhounig *et al.* (2010) *PNAS* 107: 6204-6209) があるのに対し、残り3種 (RS-D, -E, -E\*) については、研究代表者らがラン藻での有効性を実証し (Nakahira *et al.* (2013) *Plant Cell Physiol.* 54: 1724-1735)、今回初めてタバコ葉緑体に適用したものである。ルシフェラーゼ・アッセイの結果、新たに試した3種類のリボスイッチ (RS-D, -E, -E\*) で10倍以上の発現誘導効率 (スイッチ ON/OFF 比) が認められ、先行研究の配列 (s.theo-RS) の性能を上回った (図4B)。また、当該3種のリボスイッチの発現誘導時の活性は、RS-E >> RS-E\* >> RS-D と異なった (図4A)。以上の結果より、「自己・非自己ゲノム認識システム」に適した制御配列としては、スイッチ ON/OFF 比に優れた RS-E\* か、発現誘導時の活性が最も高い RS-E が有望であると考えられた。

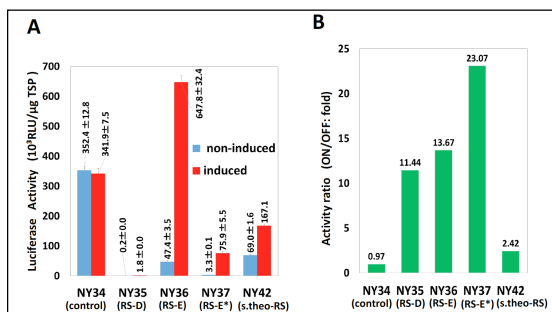


図4. ルシフェラーゼ・アッセイによるテオフィリン依存型人工リボスイッチ制御配列の比較

RS-E を導入したレポーター株の誘導時活性は、リボスイッチを導入していないコントロールシステムよりも高い (図4A: いずれも、プロモーターは大腸菌由来の *P<sub>trc</sub>* を使用)。この結果は、RS-E が、(細胞毒性や代謝負荷を書ける可能性のある) 有用物質の“誘導性”大量生産に活用できる可能性を示唆している。そこで、葉緑体での (恒常的な) タンパク質大量発現に有効な *psbA* 由来のプロモーターおよび 5'-非翻訳領域 (*P<sub>psbA</sub>*) の制御下でホタル・ルシフェラーゼを発現するレポーター株と比較した。その結果、RS-E 導入システムの誘導時の発光レポーター活性は、*P<sub>psbA</sub>* システムの1/100程度であった。従って、RS-E を物質生産に転用するには、誘導時の活性を“増幅”することが不可欠である。一案としては、

RS-E により“T7 RNA ポリメラーゼ”の発現制御し、当該転写装置が認識する T7 プロモーターの下流に目的遺伝子を配置する方法が考えられる (Emadpour *et al.* (2015) *Nucleic Acids Res.* 43: e66)。現在、当該システムの効果を検証中である。

##### (2) 相同組換えを介した葉緑体形質転換における遺伝子導入効率の検証

実施項目 (1) で選抜された人工リボスイッチの内、RS-E\* の制御下で発現誘導される人工ヌクレアーゼ (*Cas9*) を実装した葉緑体形質転換ベクター (pIBN02: 図3参照) を作出し、パーティクル・ガン法によりタバコ葉緑体への遺伝子導入を試みた。しかしながら、(従来型ベクターを使用した場合と比較して) 有意な形質転換効率の向上は認められなかった。この原因としては、1) RS-E\* では誘導時の活性が低く、遺伝子導入初期段階の促進 (= ターゲット領域の効率的な二本鎖 DNA 切断) には繋がらない、2) *Cas9* が長大 (4 kbp 超) なため、コドン使用頻度の違いが発現量の低さに拍車をかけている等、複数の要因が考えられる。

そこで、問題点を明確にするために、(闇雲に試行するのではなく) 葉緑体において目的の人工ヌクレアーゼが機能することを実証できる評価系 (Single-Strand Annealing (SSA) アッセイ系) の構築を進めた。「SSA アッセイ用発光レポーター」では、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ (*Rluc*) の活性を“内部標準”とし、人工ヌクレアーゼによって標的配列が切断されて、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子 (*Fluc*) が“再生”されれば、2種の発光酵素由来の活性が検出される (図5)。本研究期間内には、タバコ葉緑体ゲノムに目的の発光レポーターを導入した形質転換体 (NY49) の作出までしか完了できなかったが、今後は、当該レポーター株において人工ヌクレアーゼを“一過的”に発現させることで SSA アッセイを行い、葉緑体で機能する人工ヌクレアーゼの選抜を進める予定である。

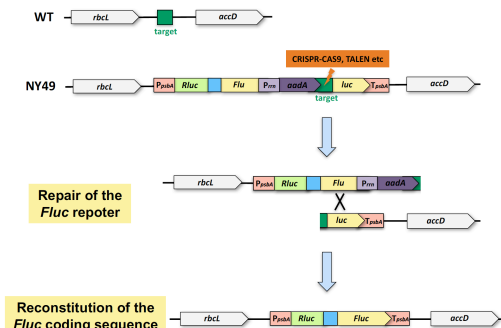


図5. 葉緑体で機能する人工ヌクレアーゼを選抜するための SSA アッセイ用発光レポーター

以上のように、目標とした「自己・非自己ゲノム認識システム」の確立にまでには至らなかったものの、それに近づくための“ツ-

ルボックス”は整備できたと考えている。「自己・非自己ゲノム認識システム」は、本研究で最終目標とした「(完全な形の)人工葉緑体ゲノムを有する組換え植物の創出」に有効であるのみならず、葉緑体形質転換の課題である「宿主植物種の拡大」に資する要素技術としての活用も期待される。システムの確立に向け、今後も開発を継続していきたい。

#### 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 2 件)

- ① Shimmura S, Nozoe M, Kitora S, Kin S, Matsunami S, Ishizaki Y, Nakahira Y, Shiina T. Comparative Analysis of Chloroplast *psbD* Promoters in Terrestrial Plants. *frontiers in Plant Science* (2017) 査読有 doi.org/10.3389/fpls.2017.01186
- ② Hondo S, Takahashi M, Osanai T, Matsuda M, Hasunuma T, Tazuke A, Nakahira Y, Chohnan S, Hasegawa M, Asayama M. Genetic engineering and metabolite profiling for overproduction of polyhydroxybutyrate in cyanobacteria. *J Biosci Bioeng.* 120: 510-517 (2015) 査読有 doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.03.004.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 山根里佳、小川敦司、戸澤譲、椎名隆、中平洋一. 人工リボスイッチを活用した葉緑体遺伝子発現誘導系の評価. 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会. 2017 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ② 金子太樹、福田寛史、武波洋志、朝山宗彦、中平洋一. テオフィリン依存型人工リボスイッチを用いたシアノバクテリアにおけるアルカン増産の試み. 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会. 2017 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ③ 山根里佳、小川敦司、戸澤譲、椎名隆、中平洋一. 人工リボスイッチを活用した葉緑体遺伝子発現制御系の評価. 第 35 回日本植物細胞分子生物学会 (埼玉) 大会. 2017 年 8 月 29 日、大宮ソニックシティ (埼玉県さいたま市)
- ④ Hiroki Kaneko, Hirofumi Fukuda, Munehiko Asayama, Yoichi Nakahira. Metabolic engineering for improved production of drop-in fuels in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. 第 58 回日本植物生理学会年会. 2017 年 3 月 16 日、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県鹿児島市)
- ⑤ Hirofumi Fukuda, Hiroki Kaneko, Munehiko Asayama, Yoichi Nakahira. Utilization of a

theophylline-dependent engineered riboswitch for enhanced alkane production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. 第 58 回日本植物生理学会年会.

2017 年 3 月 16 日、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県鹿児島市)

- ⑥ 金子太樹、山根里佳、櫻井大貴、福田寛史、朝山宗彦、中平洋一. シアノバクテリアにおけるドロップイン燃料生産性強化に向けた遺伝子改変技術の開発. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑦ 福田寛史、中平洋一、長谷川守文、宮口右二、朝山宗彦. シアノバクテリアのアルカンと脂質生産に与える栄養源欠乏培地の影響. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑧ 中平洋一、山根里佳、小川敦司、戸澤譲、椎名隆. 人工リボスイッチを基盤とした葉緑体遺伝子発現誘導系. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑨ 中平洋一、小川敦司、戸澤譲、椎名隆. 人工リボスイッチを用いたタバコ葉緑体遺伝子発現誘導系. 第 34 回日本植物細胞分子生物学会 (上田) 大会. 2016 年 9 月 1 日、信州大学繊維学部 (長野県上田市)
- ⑩ 中平洋一、小川敦司、戸澤譲、椎名隆. Utilization of the theophylline-dependent engineered riboswitches for strict control of plastid gene expression in tobacco. 第 57 回日本植物生理学会年会. 2016 年 3 月 18 日、岩手大学上田キャンパス (岩手県盛岡市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中平 洋一 (NAKAHIRA, Yoichi)  
茨城大学・農学部食生命科学科・准教授  
研究者番号: 40423868