

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780245

研究課題名 (和文) 高生産性植物創出へ向けたラン色細菌遺伝子の葉緑体包膜へのターゲット技術の確立

研究課題名 (英文) Establishment of target technology to chloroplast envelope of cyanobacterial gene aimed at high productivity plant creation

研究代表者

大河 浩 (OHKAWA HIROSHI)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：70436012

研究成果の概要：

植物におけるラン色細菌の膜タンパク質の効果的な発現について、膜へのターゲット技術を確立できれば、相補解析や代謝などの改変へ向けた基礎となることが期待される。葉緑体包膜に存在する遺伝子と相同性の高い遺伝子として明らかにされている遺伝子などを植物に導入した形質転換体の作製を試みいくつかの形質転換体を得ることができ、またタンパク質レベルでの解析のために、膜から露出した領域を発現させる条件を検討した結果、十分な抗原を得、それを元に良好なポリクローナル抗体を得ることができ更なる進展が可能となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：植物、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

優良植物開発への遺伝子改変による形質転換植物創出が現在までに世界中で数多く試みられている。その中でも炭素代謝関連遺伝子操作で植物生産性を上げた形質転換体植物についての報告もあるがその数は多くはない。例えば、フルクトースビスホスファターゼ/セドヘプチュロースビスホスファターゼ遺伝子過剰発現 (Nature

Biotech., 19: 965-969, 2001)、*ictB* 遺伝子過剰発現 (Plant Biotech. J, 1: 43-50, 2001)、トレハロースリン酸フォスファターゼ (Plant Biotech. J, 2: 71-82, 2004)、ミトコンドリア型 MDH 発現抑制 (Plant Physiology, 135: 611-622, 2005)等が上げられる。これらのうち、最初の二つがラン色細菌由来の遺伝子を導入した報告例である。ラ

ラン色細菌は、 HCO_3^- 輸送や CO_2 輸送によって細胞内に高濃度の無機炭素を濃縮する無機炭素濃縮機構をもっている。この機構は、1) 無機炭素輸送体、2) 輸送体へのエネルギー供給系、3) Rubisco が局在化するカルボキシゾームによる固定系から構成されている。これまでに申請者は2) および1) の関連遺伝子の同定とその機能の解明を行い、同分野の発展に寄与してきた。申請者は、変異株を用いて CO_2 輸送活性のみが特異的に阻害される条件を初めて明らかにした。ラン色細菌の無機炭素濃縮機構の一端を解明する共に、これにより新たな無機炭素輸送体の単離へのこれまではない独創的なアプローチを可能にし、新規の炭酸輸送体をコードする *sbtA* 遺伝子を明らかにした。現在のところ、*Synechocystis* PCC6803 において、細胞内への無機炭素の取り込み経路は4つ存在していることが証明されている。

炭素固定を増強するための一つのアプローチとして、ラン色細菌の無機炭素濃縮機構の植物への導入が考えられる。ラン色細菌の無機炭素濃縮機構のどの経路をどのように選択し、植物へ導入をするのかを検討しなければならない。 CO_2 輸送経路に関与する NAD(P)H デヒドロゲナーゼは、その反応の詳細な解明に至っておらず、また複数遺伝子を導入する必要性が出てくる。一方、炭酸輸送経路では、BCT1(*cmp* オペロンによりコードされる)と SbtA の二つの炭酸輸送体が上げられる。ところが、BCT1 を高等植物葉緑体で発現させる上での二つの問題点がある。*cmpA* 遺伝子はリポ蛋白をコードしており、期待される機能を発揮させるためにはラン色細菌の脂質合成系も導入しなければならない可能性と、複数遺伝子の導入が必要である点である。以上の問題点を回避できるのが SbtA であり、有力な候補であると考えられる。また、

ラン色細菌において、最初は CO_2 取り込み能欠損変異株として単離され、その原因遺伝子である *pxcA* 遺伝子は、 Na^+ 依存性のプロトン放出活性に必須であることが証明されている。しかしながら、クラミドモナスにおいて、同遺伝子を不活化すると葉緑体の無機炭素輸送が減少することが報告されている (EMBO J., 16: 6713-6726, 1997) ため、植物において、同遺伝子を高発現したときに無機炭素輸送を活性化するものと期待でき、もう一つの候補と考える。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ラン色細菌の遺伝子、特に膜タンパク質コード遺伝子を植物で発現させ、さらに膜への導入技術の確立を目指すことを目的とする。更にこれらの技術を元にして、ラン色細菌の無機炭素濃縮機構に関わる遺伝子を高等植物に導入した“ CO_2 ポンプ導入高生産性植物”の開発への基礎技術開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ラン色細菌膜タンパク質遺伝子導入用バイナリーベクターコンストラクト構築及びシロイヌナズナへの形質転換

葉緑体内包膜に存在する *cemA* 遺伝子と相同性の高い *Synechocystis* PCC6803 の *pxcA* 遺伝子および炭酸輸送体をコードする *sbtA* 遺伝子のそれぞれ両遺伝子を細胞質膜および葉緑体内包膜へ導入することを試みる。プロモーターは CaMV 35S とし、トランジットペプチドを目的遺伝子上流に融合させたものコンストラクトも作製する。トランジットペプチドは Rubisco 小サブユニットのものを用いる。また、より簡易にその局在性を明らかにするためと同時に膜タンパク質を対象とするため良好な特異的抗体が作製できない場合も想定して、His タグを付加するも

のと、付加しない両方を設計する。バイナリーベクターに上記のように設計した遺伝子をクローニングした (図 1)。シーケンサーで配列を確認後、アグロバクテリウムを形質転換した。バイナリーベクターの保持を確認したアグロバクテリウムを介してシロイヌナズナを floral dip 法により形質転換した。

(2) 形質転換体候補における導入遺伝子の mRNA 発現解析

RNA の抽出および RT-PCR: スクリーニングで得られた T0 世代の個体において導入遺伝子が RNA レベルで発現しているか、また系統間でその発現量の違いがあるかどうかを解析した。それぞれの形質転換体ロゼット葉から RNA をホットフェノール法で抽出し、逆転写酵素により cDNA を作成後、それを鋳型に PCR を行う RT-PCR 法により、その遺伝子発現を解析した。PCR は、それぞれの導入遺伝子に特異的なプライマーを用いて行った。

(3) 特異的抗体の作製

① コンストラクト作成

過剰発現形質転換体のタンパク質レベルでの発現量および発現した膜タンパク質の局在性を調べるために、SbtA タンパク質に対する特異的抗体を作製した。最初にそれぞれの遺伝子をタンパク質発現ベクターに以下のようにクローニングした。PCR で増幅したターゲット配列を制限酵素 Nco I と Xho I で処理した。同様に発現ベクター pET32a も制限酵素処理した後、アルカリフォスファターゼで脱リン酸化処理を行った。ライゲーション、形質転換した後、プラスミドを抽出し、シーケンサーにより塩基配列が正しいことを確認した。

② リコンビナントタンパク質の誘導

作製したコンストラクトを用いてリコ

ンビナントタンパク質発現用大腸菌 BL21 を形質転換した。この形質転換体を用いて十分なリコンビナントタンパク質を得られる条件を検討した。その後、タンパク質を大量精製するためにスケールアップした。発現用大腸菌を OD₆₀₀ 0.5~0.8 まで培養し、IPTG の添加により発現誘導をかけた。発現誘導後、遠心分離により大腸菌を集菌した。リゾチームを添加した Equilibration/wash Buffer で大腸菌を懸濁後、破壊し遠心分離により上澄み液を得た。アフィニティーレジジンにより目的タンパク質を結合させた後に、溶出液により結合タンパク質を溶出させ、フラクションごとにサンプリングした (E1~E5)。タンパク質量 (Protein Assay, Bio-Rad Inc.) および SDS-PAGE (Laemmli の方法) 後のゲルを CBB 染色により、タンパク質量やサイズ精製度を確認した後に、得られたリコンビナントタンパク質を抗原として、ポリクローナル抗体を作製した。

③ ウェスタンブロット解析

それぞれのタンパク質試料と SDS サンプル緩衝液を混合し、100°C で 3 分間加熱後、Laemmli の方法に従い SDS-PAGE を行った。電気泳動後のゲルを、転写用緩衝液に浸透させ平衡化させた後に、セミドライブロッキング装置 (BIO-RAD) により、タンパク質を PVDF メンブレンに転写した。転写後の膜は、ブロッキングした後、作製した一次抗体、次に二次抗体として HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体と反応させた。シグナルの検出には Chemi-Lumi One (Nacal Tesque) を用いて、X 線フィルムに露光させた。

4. 研究成果

(1) コンストラクトの作成と形質転換体の作成

SYN 遺伝子過剰発現形質転換体を作製するために、各種コンストラクトを作製した(図1)。できたコンストラクトにより、アグロバクテリウムを形質転換した。

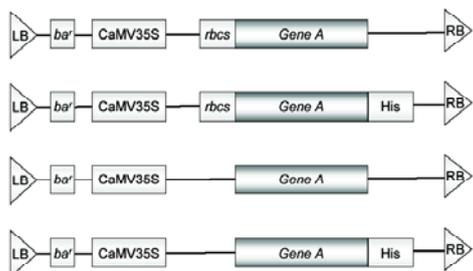


図1 形質転換用バイナリーベクター

PCR 法によりアグロバクテリウムが上記バイナリーベクターを保持していることを確認し、形質転換アグロバクテリウムを floral dip 法によりシロイヌナズナに感染させた(図2)。



図2 アグロバクテリウムをfloral dip法で感染させたシロイヌナズナ

アグロバクテリウムを感染させたシロイヌナズナより得られた種子を播種して薬剤耐性による形質転換体候補のスクリーニングを行ったが形質転換体は得られなかった。そこで検体数を増やすなど再度条件を検討

した結果、いくつかの形質転換体シロイヌナズナの候補を得ることができた。これらの形質転換体候補の明確な形態的異常は観察されなかった。

(2) 形質転換体における導入遺伝子の発現解析

得られた T0 形質転換体候補について、それぞれの導入遺伝子発現が mRNA レベルで発現しているか、またそれぞれの系統間での発現量の違いがあるかどうかを確認するために、それぞれの候補系統のロゼット葉から全 RNA をホットフェノール法により抽出し、DNase 処理した RNA を鋳型にして逆転写酵素により cDNA を作成した。それを鋳型に PCR を行う RT-PCR 法により遺伝子発現を解析した。

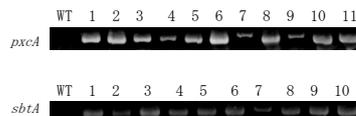


図3 SYN遺伝子過剰発現形質転換体 (T0) における導入遺伝子の発現

その結果、いずれの SYN 遺伝子過剰発現形質転換体においても発現を確認できる系統を得ることができた。pxcA 過剰発現形質転換体においては、検討した系統全てにおいて mRNA 発現が確認でき(図3)、系統 no. 4、no. 7、no. 9 のように発現量が低い系統から、系統 no. 1、no. 2、no. 6 のように非常に発現量が多い系統まで、発現量が異なる系統が複数得られた。複数系統必須であるホモ系統の選抜に十分な系統を得るためにさらに系統数を増やすことが可能であると思われる。また、SbtA 過剰発現形質転換体においては、発現を検出できない系統もいくつか存在したが、pxcA 過剰発現形質転換体と同様に発現量の異なる系統を得られることができた。しかし

ながら pxcA 過剰発現形質転換体と比べて、その遺伝子発現量が低い系統が多い傾向が見られた。更に今後これらの系統から、T1 世代のホモ選抜を行うことが可能となった。

(3) 特異的抗体の作製

過剰発現形質転換体のタンパク質レベルでの発現量および発現した膜タンパク質の局在性を調べるために、SbtA タンパク質に対する特異的抗体を作製することを試みた。最初にそれぞれの遺伝子をタンパク質発現ベクターにクローニングし、シーケンサーにより塩基配列が正しいことを確認した。リコンビナントタンパク質発現用大腸菌 BL21 を作製したプラスミドによって形質転換し、リコンビナントタンパク質を得られる条件を検討した結果、十分量のリコンビナントタンパク質が誘導される条件を得ることができた。しかしながら、pxcA リコンビナントタンパク質発現用形質転換大腸菌では十分な発現誘導、精製ができなかったため、今後更なる検討が必要であろう。

発現させたタンパク質が水溶性画分にあるか、不溶性画分（インクルージョンボディ）にあるかを確認した結果、水溶性画分に多く存在していることを確認したので、その画分を用いてアフィニティーレジンによりリコンビナントタンパク質の精製を行った。

その結果、精製度の高いリコンビナントタンパク質が精製できていることが確認できた（図 4）。特に溶出フラクション E2 で、十分量のタンパク質が確認でき、タンパク量の多かったフラクションを回収し、ポリクローナル抗体作成用の抗原とした。

できた抗体の特異性を調べるために、段階的に異なる濃度の sbtA リコンビナントタンパク質とのウェスタン解析を行った。その結果、約 26 kDa のサイズの位置にバンドが検

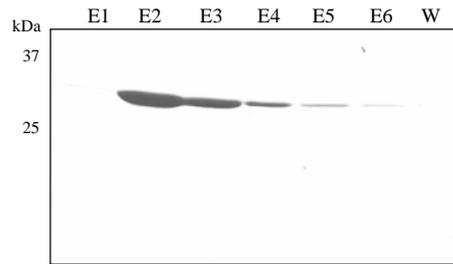


図4 リコンビナントタンパク質の精製

発現誘導後の大腸菌を粉碎後の上澄み液をHis-tagを用いたアフィニティークロマトグラフィーに結合後、溶出した。溶出液および洗浄液のフラクションを15% SDS-PAGEにかけたゲルの写真を示している。E1~E6:溶出フラクション1~6。W:洗浄後溶液。

出され、濃度依存的にバンドの強度が強くなっていた。これは、予測される発現精製したリコンビナントタンパク質と一致したサイズであった（図 5）。同時に明確な非特異的バンドは検出されなかった。そのため作成した抗原に反応する特異的抗体が作成できていることが確認された。また抗原タンパク質 10 ng においても弱いながらバンドが検出できていることから、同一次抗体は少なくとも同レベル量のタンパク質を検出可能であること示している。

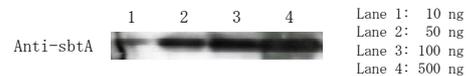


図5 SbtA抗原に対する作製polyclonal抗体の反応性

本研究においてラン色細菌の膜タンパク質コード遺伝子導入植物形質転換体候補が得ることができ、mRNA レベルで十分に発現することは確認できた。また、1 種類については、良好な特異的抗体を作製することができ、タンパク質レベルでの発現解析などの可能性が広がった。しかしながら、まだ F0 世代での解析であり、今後、自殖後代よりホモ系統を選抜していき、タンパク質発現レベルやその局在性など更なる解析が必要となるだろう。また、選抜したホモ世代の系統を用い

ることにより生理学的、代謝生理学的解析などの更に詳細な解析も行っていく必要もあると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河 浩(OHKAWA HIROSHI)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：70436012

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし