

# 葉緑体形質転換における新技術と今後の展望

奥崎 文子・田部井 豊\*

植物に必須な代謝物質の化学工場として機能する細胞小器官であるプラスチドは、未分化な細胞中ではプロプラスチド、緑色組織では葉緑体として存在する。プラスチドには独自に複製するプラスチドDNA (ptDNA) があり、外来遺伝子を導入可能であることがクラミドモナスにおいて最初に報告された<sup>1)</sup>。その後、高等植物においてもタバコを用いて葉緑体へ遺伝子導入をする基本技術が確立され<sup>2)</sup>、これまでに18種類の植物において葉緑体形質転換体が作出されてきた(表1)<sup>3,4)</sup>。多くの応用研究がモデル植物のタバコを材料にして進められているなか、実用的な作物ではレタスやトマトでわずかに再現性が示された報告があるものの、それ以外の植物種については遺伝子導入技術の安定化・効率化、さらにはヘテロプラズミック性の解消といった応用研究へ向けての技術的課題が残されているのが現状である<sup>5,6)</sup>。本稿では、筆者らが行ってきた葉緑体形質転換効率の向上へ向けた技術改良やブレイクスルー技術の開発について紹介するとともに、近年報告された新技術についてまとめ、葉緑体形質転換技術の展望について考察した。

## 葉緑体形質転換技術の特徴

葉の柔組織において、1細胞中に100個程度ある葉緑体それぞれに約100コピーのptDNAがあり、1細胞中には合計10,000コピーものptDNAが存在する。これにより、葉緑体形質転換体では核形質転換体と比べて数十から数百倍の外来タンパク質を蓄積することが可能である<sup>5)</sup>。ptDNAは約150 kbの環状二本鎖であり、内生の相同組換え機構によって狙った部位へ外来遺伝子を挿入することができる。そのため、形質転換ベクター構築の際には、導入遺伝子の両側にそれぞれ約1.5–2.0 kbのptDNA由来の相同領域(trnI-trnA近傍領域など)を連結する。一般的には、形質転換ベクターをパーティクルガン法によって外植体へ導入し、その後、スペクチノマイシン耐性の*aadA* 遺伝子を指標に選抜を行う<sup>7)</sup>。そのようにして得られた葉緑体形質転換体におけるメリットとデメリットを以下にまとめる。

### (1) メリット

- ・タンパク質が高蓄積(可用性タンパク質中に20–30%)
- ・細胞質では有害なタンパク質も葉緑体内には蓄積可能
- ・サイレンシングがなく、後代でも遺伝子発現が安定

- ・母性遺伝のため外来遺伝子の拡散リスクがきわめて低い
- ### (2) デメリット
- ・タンパク質の糖鎖修飾を付加できない
  - ・ヘテロプラズミック性の解消が困難な植物種がある

上記のメリットを活かし、葉緑体を機能性タンパク質の工場として、ワクチンタンパク質や、セルロース分解酵素を生産させる研究が盛んである<sup>5,6)</sup>。また、植物への耐虫性、除草剤耐性の付与も可能であり、さらに光合成機能の向上も試みられている<sup>8)</sup>。デメリットとしてあげた糖鎖の付加については、原核型のタンパク質を発現させる場合には問題にならない。一方、ヘテロプラズミック性の解消ができない場合には、目的遺伝子の発現量が不十分となることや後代への遺伝子が安定しないという問題が生じるため、解決策が求められている。

## 外植体調整の最適化

一般に、形質転換体の作出においては、形質転換過程の各ステップにおける効率(遺伝子導入効率、選抜率、

表1. 植物葉緑体形質転換体の作出報告のある植物種

植物名	引用文献**	備考
<b>双子葉</b>		
タバコ	Svab <i>et al.</i> (1990) <sup>2)</sup>	その他多数の報告あり
シロイヌナズナ	Sikdar <i>et al.</i> (1998) <sup>9)</sup>	不稔
ジャガイモ	Sidorov <i>et al.</i> (1999) <sup>10)</sup>	
トマト	Ruf <i>et al.</i> (2001) <sup>11)</sup>	
ナタネ	Huo <i>et al.</i> (2003) <sup>12)</sup>	ヘテロプラズミック
レスケレーラ	Skarjinskaia <i>et al.</i> (2003) <sup>13)</sup>	
ワタ	Kumar <i>et al.</i> (2004a) <sup>14)</sup>	
ニンジン	Kumar <i>et al.</i> (2004b) <sup>15)</sup>	
ペチュニア	Zubkot <i>et al.</i> (2004) <sup>16)</sup>	
ダイズ	Dufourmantel <i>et al.</i> (2004) <sup>17)</sup>	
レタス	Lelivelt <i>et al.</i> (2005) <sup>18)</sup>	
ポプラ	Okumura <i>et al.</i> (2006) <sup>19)</sup>	
カリフラワー	Nugenta <i>et al.</i> (2006) <sup>20)</sup>	
キャベツ	Liu <i>et al.</i> (2007) <sup>21)</sup>	
テンサイ	DeMarchis <i>et al.</i> (2009) <sup>22)</sup>	
ナス	Singh <i>et al.</i> (2010) <sup>23)</sup>	
アルファルファ	Wei <i>et al.</i> (2011) <sup>24)</sup>	
<b>単子葉</b>		
イネ	Khan and Maliga, (1999) <sup>25)</sup>	ヘテロプラズミック

\*\*各植物の最初の研究報告を示した。

\* 著者紹介 農業生物資源研究所 遺伝子組換え研究推進室(室長) E-mail: tabei@affrc.go.jp

再分化効率などを掛け合わせるにより最終的な形質転換率が決まる。葉緑体形質転換効率へ影響する主要なステップとしては、パーティクルガン法による打込み条件（金粒子サイズ、導入圧力など）と選抜条件があげられ、条件の最適化が試みられてきた<sup>26)</sup>。しかしながら、基本的な葉緑体形質転換技術が確立されているタバコでさえも、実施者により形質転換効率が異なるのが実情であり、その原因として外植体の取り扱いや遺伝子導入技術の習熟程度の差が影響しているものと考えられた。そこで、筆者らは遺伝子導入前後の外植体の取り扱いの方法を変更し、タバコの葉緑体形質転換系をより安定的・効率的にすることを試みた。比較した従来法と改良法（下部が重要と推測している）の概要は次の通りである。

**従来法<sup>7)</sup>**：タバコ葉に遺伝子導入を行い、ろ紙を置いた無選抜培地上に葉を置き、2日後に葉を切片化して選抜培養を開始。

**改良法<sup>27,28)</sup>**：最初にタバコ葉を切片化し、固形培地上で一晩前培養を行う。遺伝子導入後に葉切片を無選抜培地に密着するように並べ、3日後から選抜培養を開始。

従来法では遺伝子導入後に葉を切片化することにより、遺伝子が導入された細胞に物理的ダメージを与える可能性があったが、改良法においては、遺伝子導入前後に葉切片が受ける物理的ダメージを減らす工夫をした。その結果、従来よりも安定的・効率的に形質転換体を作出することができた<sup>27,28)</sup>。当たり前のようにあるが、外植体をより適切に扱うことにより形質転換効率の向上が図られたことは、他の植物種の形質転換系を確立する上でも有用な情報になると考えている。

### 金粒子サイズの最適化

タバコの葉緑体の平均直径は約6  $\mu\text{m}$ である。一方、イネにおいて遺伝子導入に用いる培養細胞であるカルスに存在する未発達なプロプラスチドの平均直径は約1.5  $\mu\text{m}$ と小さい。一般に、遺伝子導入には直径0.6  $\mu\text{m}$ の金粒子を用いるため、プロプラスチドへ遺伝子導入する場合は物理的ダメージが大きいと推測される（図1）。したがって、葉以外の組織を用いた際には金粒子のサイズが初期の遺伝子導入効率を決める重要な要素となる。これまで葉緑体形質転換に用いられた最小の金粒子は直径0.4  $\mu\text{m}$ であったが<sup>26)</sup>、筆者らはさらに微小な0.3  $\mu\text{m}$ 以下の金粒子（平均直径がそれぞれ0.07, 0.08, 0.1, 0.2 および0.3  $\mu\text{m}$ ）が葉緑体形質転換系に利用可能であるかを検討した。その結果、用いた0.3  $\mu\text{m}$ 以下の金粒子すべてにおいてタバコ葉緑体形質転換体の作出に成功し、形質転換効率は0.6  $\mu\text{m}$ の金粒子と同程度もしくははやや上回った<sup>29)</sup>。これより、発達した葉緑体を持つタバコの

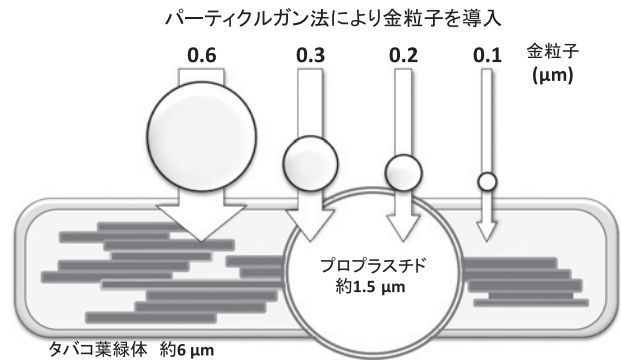


図1. プラスチドに金粒子を導入する際のサイズ比較イメージ

葉を外植体にした場合でも、遺伝子導入に用いる金粒子のサイズを最適化することにより、効率的に葉緑体形質転換体を作出できることが示された。したがって、葉緑体よりも小さい未分化なプロプラスチドを含む組織を外植体とする植物種において、従来よりも微小な金粒子を利用することにより、遺伝子導入効率の向上が図られることが期待される。

### ホモプラズミック化を促進するブレイクスルー技術

通常、選抜初期に得られる葉緑体形質転換体は、野生型葉緑体と組換え型葉緑体が混在するヘテロプラズミックな状態であることが多いため、2～3回の選抜培養を繰り返すことにより組換え型葉緑体のみが存在するホモプラズミック個体を作出する<sup>7)</sup>。表1に示すように、ナタネやイネにおいてはホモプラズミック個体の作出に成功していない。そこで、筆者らは従来の選抜法とは異なる、ホモプラズミック化を促進するようなシステムが必要と考えた。そこで、野生型の葉緑体のみを葉剤誘導的に積極的に消去することを目的とし、ホモプラズミック化促進システムを考案した<sup>30,31)</sup>。システムは次の4ステップからなる（図2）。

(a) 葉緑体移行性の致死遺伝子バルナーゼ (*Bacillus amyloliquefaciens* 由来のRNA分解酵素) を核に導入。

(b) バルナーゼを阻害するバルスター遺伝子を葉緑体に導入。

(c) 葉剤誘導によりバルナーゼの発現をオンにすると野生型の葉緑体のみがバルナーゼにより消去され、組換え型の葉緑体はバルスターの阻害作用で残る。

(d) 最終的に組換え型葉緑体のみホモプラズミック個体が作出される。

このシステムを評価した結果、タバコのモデル実験系において、ヘテロプラズミック性の葉片からのホモプラズミック個体の作出効率が5～10倍向上した<sup>30,31)</sup>。この

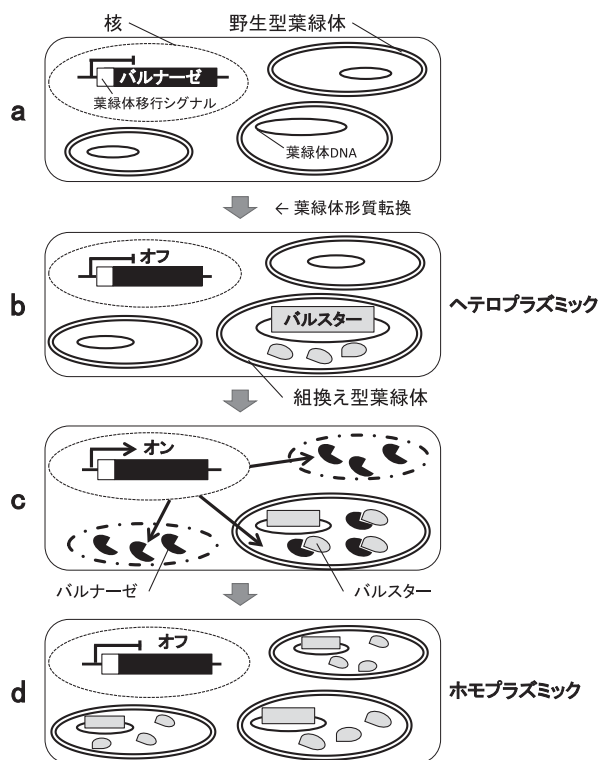


図2. ホモプラズミック化促進システムのモデル

ホモプラズミック化促進システムは、単子葉植物においても効果が期待でき、ブレイクスルー技術になると考えている。

### 実用化に向けた新技術

目的遺伝子をさらに高発現させるためのベクター構造の改良、遺伝子誘導発現技術、マーカー遺伝子除去技術といった新技術について紹介する。

**遺伝子発現カセットの最適化** 目的遺伝子の mRNA の安定化のため、導入遺伝子に連結する 5' 非翻訳領域や 3' 非翻訳領域の比較検討、翻訳効率の向上のための Shine-Dalgarno 配列やペプチド配列の付加といった研究がなされてきた<sup>5,6)</sup>。発現カセットの改良により、外来タンパク質の蓄積が最大で可溶性タンパク質中に 70% となる例も報告された<sup>32)</sup>。しかしながら、いずれの方法もすべての目的遺伝子に対して一様に効果的であるとは限らないため、葉緑体におけるタンパク質翻訳・蓄積の基本的な仕組みの解明も望まれている。

**複数遺伝子の連結導入** 葉緑体遺伝子は原核型の発現様式であるため、導入遺伝子にプロモーター配列を連結せず、内生遺伝子の転写開始点から複数遺伝子をポリシストロニックに発現させることが可能である<sup>33)</sup>。これにより、複数遺伝子を導入する際でも形質転換ベクター

を比較的コンパクトにすることができる。ただし、後半に連結した遺伝子の発現が低い場合もあるため、遺伝子の連結順にも留意する必要があるだろう。

**誘導的な遺伝子発現** 葉緑体に目的タンパク質を過剰に蓄積させることにより植物の初期生育や稔性に影響を及ぼす場合もあることがわかってきた。そこで、必要な時にだけ目的タンパク質を蓄積させるための誘導的な遺伝子発現システムが報告されている<sup>4,6)</sup>。その一つとして、アルコール誘導性プロモーター下に連結した葉緑体移行性の T7RNA ポリメラーゼを核に組み込み、アルコール処理をした時にのみ葉緑体に組み込んだ目的遺伝子を発現させる方法がある<sup>34)</sup>。その他、リボスイッチと呼ばれる RNA 分子による遺伝子発現誘導システムが葉緑体においても利用できることが示された<sup>35)</sup>。今後、このような遺伝子発現誘導システムを利用することで、タンパク質の発現時期を調整可能となるばかりではなく、遺伝子破壊により致死性となる葉緑体コードの必須遺伝子の機能解析への利用も期待できる。

**マーカー遺伝子除去** 形質転換体の選抜にはマーカー遺伝子は必須であるが、いったんホモプラズミック個体となればその後は必要なくなる。選抜マーカーとしてもっとも利用されている *aadA* 遺伝子は抗生物質耐性であるため、経口ワクチンを蓄積する場合などでは、最終的に除去することが望ましい<sup>3)</sup>。また、マーカー遺伝子を除去することで再びそのマーカー遺伝子を利用して他の目的遺伝子を導入することも可能となる。上記のような理由から、葉緑体形質転換技術においてもマーカー遺伝子除去技術が研究されてきた。その一例として、選抜マーカーの両側にリコンビナーゼ (Cre または Int) が認識する配列を付加しておき、葉緑体形質転換体を作成後に核において葉緑体移行性のリコンビナーゼを発現させ、選抜マーカーを除去する方法がある<sup>3,4)</sup>。さらに、選抜マーカーが除去された組織のみを色判別できる可視化マーカーと組み合わせた方法も開発されている<sup>36)</sup>。組換え酵素はアグロバクテリウム法もしくは交配により核に導入することが可能であり、葉緑体からマーカー除去した後は後代の遺伝分離により除くことができる。その他、マーカー遺伝子の両側に 400 bp 以上のリピート配列を付加しておき、プラスチドの内在性の組換え酵素による相同組換えの作用によりマーカー遺伝子領域をループアウトにより除去することも可能であり、核形質転換を組合せる必要がない点では利用しやすい手法である<sup>3)</sup>。

### 単子葉植物における葉緑体形質転換系

野生型のイネはスペクチノマイシン耐性を持つため、

最初に試みられたイネの葉緑体形質転換系においては、選抜マーカー *aadA* 遺伝子に対する選抜剤としてストレプトマイシンが用いられたが<sup>25)</sup>、ヘテロプラズミック性の再分化個体しか得られなかった<sup>25)</sup>。同様に、Lee *et al.* (2006)<sup>37)</sup>によりストレプトマイシン選抜により100～120シャーレから2個体の葉緑体形質転換体が作出されたが、組換え当代および次世代においてもヘテロプラズミック性は解消されなかった。その後、除草剤耐性遺伝子 *bar* を選抜マーカーとしたイネ葉緑体形質転換体の作出報告がなされたが、すべての個体がヘテロプラズミック性であった<sup>38)</sup>。そのような状況で、コムギにおいてホモプラズミック性の形質転換体の作出が報告された<sup>39)</sup>。しかし、翌年には、再現性の確認がとれるまでは論文を一時取り下げると報告された<sup>40)</sup>。コムギにおける報告の経緯からも、いまだに単子葉植物における葉緑体形質転換技術が容易でないこと、特にホモプラズミック植物を得ることが課題であることがわかる。単子葉植物については、プロプラスチドに遺伝子導入を行う点、選抜剤の効果やプラスチドの分裂や分化の様式が双子葉植物と異なるといった根本的な違いも考慮すべきことである<sup>4)</sup>。今後、それらの壁を乗り越えて効率的な葉緑体形質転換系の開発に成功することが望まれる。

#### 実用化へ向けた展望

葉緑体形質転換体の商業栽培はいまだ世界的にも行われていない。しかしながら、葉緑体形質転換技術ならではの優れた特徴を活かした機能性作物を開発・実用化していくことへの期待は高まっている。核へ遺伝子導入した遺伝子組換え農作物の商業栽培においては、非遺伝子組換え農作物への遺伝子流動や抗生物質耐性マーカー遺伝子などの経口摂取に対する懸念があり、遺伝子操作の痕跡をできるだけ残さないようにする New Plant Breeding Technology (NBT) 技術の開発が注目されている。近年、ptDNAが核へ断片的にわずかに流入すること<sup>41)</sup>、組換え型のptDNAが花粉を介してきわめて低頻度ではあるが交配種子に遺伝することが示されたことから、葉緑体形質転換体の取扱いについても慎重に検討する必要があると考えられるもの<sup>42)</sup>、マーカー遺伝子除去技術の見も蓄積されてきたことから利用目的や各国の規制の状況に応じて実用化に適する葉緑体形質転換体の作出戦略をたてることができると考えられる。今後、葉緑体形質転換体の実用化に向けた議論が活発になり、国内においても葉緑体形質転換技術を利用した研究の裾野がさらに広がることで技術的な課題が解決されていくことが期待される。

#### 文献

- 1) Boynton *et al.*: *Science*, **240**, 1534 (1988).
- 2) Svab *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8526 (1990).
- 3) Day, A. and Goldschmidt-Clermont, M.: *Plant Biotechnol. J.*, **9**, 540 (2011).
- 4) Khan, M. S.: *Mol Plant Breed.*, **3**, 91 (2012).
- 5) Daniell, H. *et al.*: *Trends Plant Sci.*, **14**, 669 (2009).
- 6) Maliga, P. and Bock, R.: *Plant Physiol.*, **155**, 1501 (2011).
- 7) Svab, Z. and Maliga, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 913 (1993).
- 8) Hanson *et al.*: *J. Exp. Bot.*, **64**, 3, 731 (2013).
- 9) Sikdar *et al.*: *Plant Cell Rep.*, **18**, 20 (1998).
- 10) Sidorov *et al.*: *Plant J.*, **19**, 209 (1999).
- 11) Ruf, S. *et al.*: *Nature biotechnol.*, **19**, 870 (2001).
- 12) Hou *et al.*: *Transgenic Res.*, **12**, 111 (2003).
- 13) Skarjinskaia *et al.*: *Transgenic Res.*, **12**, 115 (2003).
- 14) Kumar, S. *et al.*: *Plant Physiol.*, **136**, 2843 (2004).
- 15) Kumar, S. *et al.*: *Plant Mol. Biol.*, **56**, 203 (2004).
- 16) Zubko, M. K. *et al.*: *Transgenic Res.*, **13**, 523 (2004).
- 17) Dufourmantel *et al.*: *Plant Mol. Biol.*, **55**, 479 (2004).
- 18) Lelivelt *et al.*: *Plant Mol. Biol.*, **58**, 763 (2005).
- 19) Okumura *et al.*: *Transgenic Res.*, **15**, 637 (2006).
- 20) Nugenta *et al.*: *Plant Sci.*, **170**, 135 (2006).
- 21) Liu *et al.*: *Plant Cell Rep.*, **26**, 1733 (2007).
- 22) De Marchis *et al.*: *Transgenic Res.*, **18**, 17 (2009).
- 23) Singh, A. K. *et al.*: *Transgenic Res.*, **19**, 113 (2010).
- 24) Wei, Z. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **33**, 2487 (2011).
- 25) Khan, M. S. and Maliga, P.: *Nat. Biotechnol.*, **17**, 910 (1999).
- 26) Langbecker, CL. *et al.*: *Plant Physiol.*, **135**, 39 (2004).
- 27) Okuzaki, A. and Tabei, Y.: *Plant Biotechnol.*, **29**, 307 (2012).
- 28) 奥崎文子, 田部井豊: 形質転換プロトコール植物編, p. 390, 化学同人 (2012).
- 29) Okuzaki, A. *et al.*: *Plant Biotechnol.*, **30**, 65 (2013).
- 30) 田部井豊, 奥崎文子: (特願2011-258107)
- 31) 奥崎文子ら: 育種学研究, 14 (別1), p. 140 (2012).
- 32) Oey, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 6579 (2009).
- 33) Ziegelhoffer, T. *et al.*: *Plant Biotechnol. J.*, **7**, 527 (2009).
- 34) Lössl, A. *et al.*: *Plant Physiol.*, **46**, 1462 (2007).
- 35) Verhoungh A. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 14, 6204 (2010).
- 36) Tungschat-Huang, T., Maliga, P.: *Plant J.*, **70**, 4, 717 (2012).
- 37) Lee *et al.*: *Mol. Cells*, **21**, 401 (2006).
- 38) Li, Y. *et al.*: *Agricultural Sciences in China*, **8**, 6, 643 (2009).
- 39) Cui, C. *et al.*: *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **43**, 284 (2011).
- 40) He, G. *et al.*: *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **44**, 373, (2012).
- 41) Lloyd, A. H. and Timmis, J. N.: *Mobile Genet. Elements*, **1**, 216 (2011).
- 42) Ruf, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 6998 (2007).