

植物の遺伝子操作による有用物質生産の基礎

(発酵と工業 Vol. 43 No. 9 ('85) 814~820 頁)

大山 莞爾*・山田 康之*

はじめに

植物の新育種法の1つとして、遺伝子操作が脚光をあびている。植物に感染する土壌菌 *Agrobacterium tumefaciens* のもつ Ti プラスミドを利用し、植物細胞に外来遺伝子を導入する方法が開発された¹⁻⁴⁾。この系を用い、有用物質の生産に直接結びつく成果はまだでていないが、いずれ実現するだけの基礎的基盤ができた。本稿では、葉緑体に関与する遺伝子群を応用し、どれだけ有用物質生産に結びつけられるか考えてみたい。

そもそも葉緑体は光の助けをかり、水と炭酸ガスを固定する唯一の機能をもつ。当然のことながら、この能力を遺伝子操作により取り出し、有用物質の生産、植物の新品種の作成に応用することが考えられる。また、光合成以外の重要な機能も葉緑体に存在することも考えられる。いかにして、これら遺伝子をみつけ、利用するか、これからの重要な研究課題である。

葉緑体の DNA は、細胞質に存在するいわゆる核外遺伝子で細胞当りの数もきわめて多い。このことは、外来遺伝子を取り込んだ際、その遺伝子情報の発現量は大変高いことが推察される。有用物質生産にとり好都合である。さらに、有用物質生産のためのエネルギーを光合成により獲得することができる点でも優れている。これを実現可能にするために、葉緑体 DNA を植物宿主ベクターに改変する研究が生れる。

有用物質生産工場となるべき葉緑体、その遺伝情報発現の基本的機能は、原核細胞型であり、大腸菌で用いられている数々の技術をそのまま活用することも可能である。葉緑体の生化学的、生理学的研究は従来から進んでおり、いくつかの重要な酵素の単離精製もされている。葉緑体遺伝子のタローニングは、これらの基礎的研究にも役立つ。さらに、葉緑体遺伝情報発現機構は、核の遺

伝情報発現機構とお互に制御していることも明らかであり、将来、この分野の研究が遺伝子組換え技術を駆使し進展することは間違いないだろう。このような核・核外遺伝子の相互作用の機構が明らかになれば、それは有用物質の生産制御に役立つだろう。

1. ゼニゴケ葉緑体 DNA の遺伝子構成

葉緑体は独自の遺伝子の情報発現機構をもつ。これは葉緑体 DNA には、その遺伝子情報発現に最小限の必要な遺伝子が存在することを意味する。最近、種々の光合成に関与する遺伝子の他に、葉緑体独自のリボソーム RNA, tRNA 遺伝子の座位およびその塩基配列も決定されている。このように葉緑体 DNA 上にどのような遺伝子群が存在しているか、その構成を知ることは、遺伝情報の発現機構の解明に重要である。

1.1 ゼニゴケ葉緑体 DNA の制限酵素切断物理地図

ゼニゴケ葉緑体 DNA は、およそ 120 kbp からなる閉環状分子であり、1組の大きな逆向き繰り返し構造 (IR, およそ 10 kbp) をもつ (図 1)⁵⁾。このように、葉緑体 DNA は大きな分子であるから、植物細胞を宿主とするベクターに改変するためには、ベクターとしての機能 (DNA 複製能、強力プロモータ機能) を残し、不必要な部分を除去する必要がある。このような目的で、種々の制限酵素による制限酵素切断地図の作成がされた。これまでのところ、いくつかの葉緑体遺伝子 (Ru-bis Co-LS, P 32, ATPase- β) の座位も決定されている。当然のことながら、これら制限酵素による切断片の大腸菌プラスミド (pBR 322, pKC7, pUC8, pUC18, pMC1403 など) へのクローニングがなされている。さらに、これらのクローンより葉緑体 DNA を取り、種々の遺伝子の塩基配列が決定されている⁶⁻⁹⁾。下等植物ゼニゴケ葉緑体遺伝子の塩基配列は、高等植物タバコ、トウモロコシ、ハウレンソウなどの塩基配列と比較検討することにより、これら葉緑体遺伝子の分子進化を論ずる

* 京都大学農学部 細胞実験センター,
Kanji Ohyama, Yasuyuki Yamada

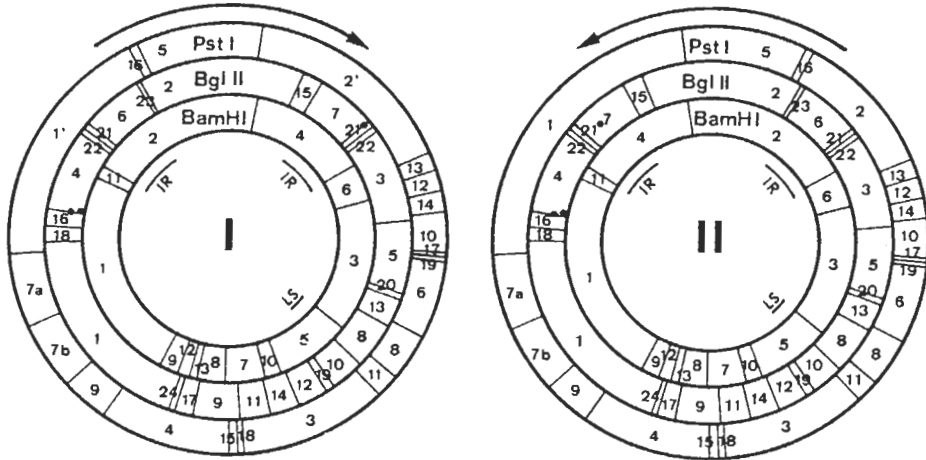


図1 ゼニゴケ葉緑体 DNA の物理地図, IR は逆向き繰返し構造, LS は Rubis CO の LS 遺伝子。外側の大きな矢印はお互にミラー像になりアイソマー I および II の存在を示す

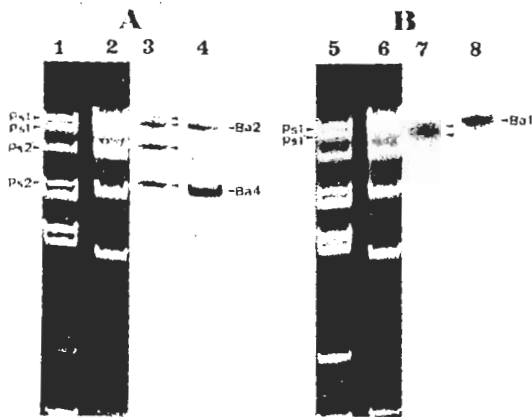


図2 サザンハイブリダイゼーション
A) IR 領域の DNA 断片をブルーブ, B) SC 領域の DNA 断片をブルーブに用いた。lane 1, 5 は Pst 切断, lane 2, 6 は BamHI 切断電気泳動図。ためにも用いられている。

1.2 ゼニゴケ葉緑体 DNA のアイソマーの存在

葉緑体 DNA にアイソマーが存在することが報告された⁹⁾。アイソマーの存在メカニズムも報告された。アイソマーの存在は、後述の逆向き繰返し構造 (IR) の存在と関連している。すなわち、IR 領域を切断しない

制限酵素で葉緑体 DNA を切断することにより発見された。ゼニゴケ葉緑体に DNA アイソマーが存在することは、制限酵素 *pst I* で IR 領域を切断しないことによりみつけられた (図2)¹⁰⁾。アイソマーが分子間あるいは分子内変換により生じているのかは、まだ直接の証拠はないが、少なくとも両分子は同時にその複製が起きている¹¹⁾。

1.3 逆向き繰返し構造 (IR) とリボソーム RNA オペロン

ゼニゴケ葉緑体 DNA には、約 10 kbp の IR が存在している。リボソーム RNA オペロンはこの IR 領域に存在する。したがって、葉緑体 DNA には、2組のリボソーム RNA オペロンが存在する。ゼニゴケ葉緑体 DNA の IR は、他の高等植物の葉緑体 DNA の IR と比べ、かなり小さい (表1)。これはゼニゴケ葉緑体 DNA の IR は、たとえばタバコに存在している IR 領域内のいくつかの遺伝子が欠除していることを示唆する。さらに、興味あることは、ゼニゴケ葉緑体 DNA のアイソマーの存在を考慮すると、リボソーム RNA オペロンを中心にして、4組の遺伝子構成が考えられる

表1 葉緑体 DNA の構造¹²⁻¹⁵⁾

葉 緑 体	Total length (KB)	IR (KB)	SSC (KB)	LSC (KB)
<i>M. polymorpha</i> (ゼニゴケ)	121	10.0	19.1	81.9
<i>N. tabacum</i> (タバコ)	146	24	13	99
<i>Z. mays</i> (トウモロコシ)	136	22.5	13	77
<i>S. oleracea</i> (ホウレンソウ)	145	24	19.2	83.2

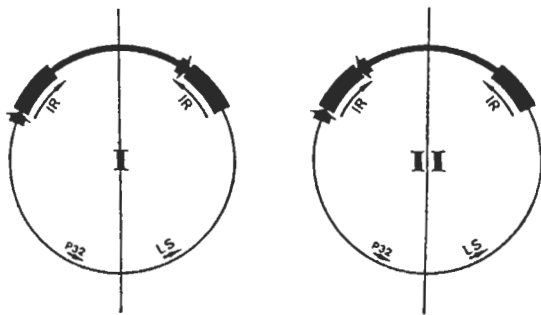


図3 アイソマーにおけるリボソーム RNA オペロン。リボソーム RNA オペロンを中心にし、4組の遺伝子構成がみられる。

(図3)。これら各々のリボソーム RNA オペロンの発現とその近傍の遺伝子の発現とがお互に制御しているならば、大変意味があり、今後の研究が期待される。

2. 葉緑体 DNA のベクター化

前述したように、葉緑体 DNA をベクターに改変することは、外来遺伝子の情報発現量の大きさ、光合成によるエネルギーの利用など、有用物質生産にとりきわめて有利である。解決すべき問題は如何にして葉緑体にまで外来遺伝子を導入するかである。これには、葉緑体 DNA をベクターに改変することが最も近道と考えられる。

2.1 葉緑体プロモータのクローニング

外来遺伝子を葉緑体で発現させるためには、葉緑体

DNA のプロモータを利用することが望ましい。幸いに、葉緑体遺伝子の発現機構は、原核細胞型であり、特に大腸菌のそれとわけて類似している。このことは、大腸菌で用いられている有用なプロモータブルーベクターを利用できる。その一つにカサダンプラスミドがある¹⁶⁾。このプラスミドを用い、ゼニゴケ葉緑体 DNA の Eco RI 断片をショットガンクローニングし、強力プロモータを得た(図4)¹⁷⁾。また、同様にして、いくつかの葉緑体遺伝子のプロモータ領域を含むクローンを得て、各々の発現量の強さを、 β -ガラクトシダーゼ活性を用いて測定した(表2)。その中で、最も強力なプロモータ活性をもつ葉緑体 DNA 断片の塩基配列を決定した(図5)。また、実際に大腸菌でも葉緑体でも、このプロモータにより、mRNA の合成が行なわれていることを S1 マッピング法により決定した(図6)。

最近、全く同じ技法でタバコ葉緑体 DNA 由来のプロモータをガラクトース発現ベクター pKO1 にクローニングされている¹⁸⁾。また、すでに同定されている葉緑体遺伝子のプロモータのクローニングも報告されている。これは微生物由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(クロラムフェニコール耐性遺伝子)に、葉緑体の P 32 K ダルトン蛋白質遺伝子のプロモータを連結し、光合成細菌や大腸菌で形質発現させることに成功している¹⁹⁾。このことは、葉緑体 DNA 由来のプロモータは大腸菌での遺伝情報発現に利用でき、

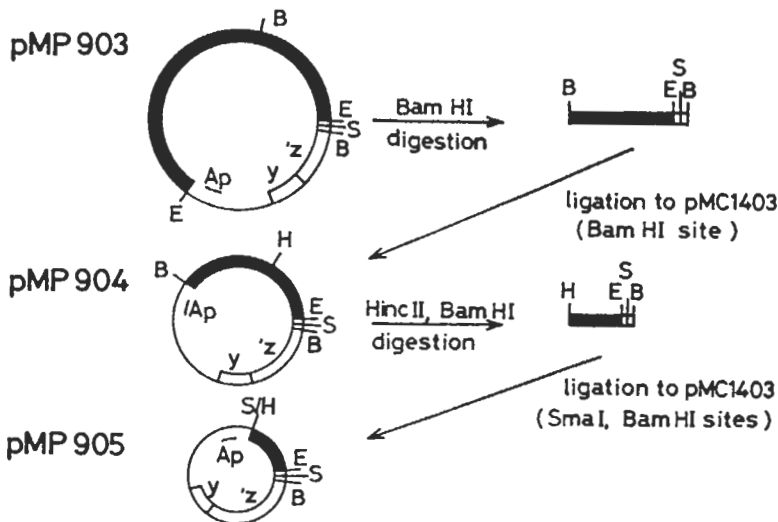


図4 カサダンプラスミドを用いたプロモータのクローニング

表 2 強力プロモータ活性の測定¹⁷⁾

宿主	プラスミド	β -ガラクトシダーゼ活性 ^{*1}	コピー数 ^{*2}
W3110 (-IPTG)	—	<11	—
W3110 (+IPTG)	—	344 ± 8	—
MC1061	—	<5	—
MC1061	pMC1403	<6	1.0
MC1061	pMP901	361 ± 20	0.9 ± 0.1
	pMP902	328 ± 7	0.9 ± 0.1
	pMP903	360 ± 23	0.9 ± 0.1
	pMP904 ^{*3}	408 ± 39	1.0 ± 0.1
	pMP905 ^{*3}	365 ± 20	0.9 ± 0.1
	pMP906 ^{*3}	308 ± 33	1.0 ± 0.1
MC1061	pMP954 ^{*4}	200 ± 14	1.0 ± 0.1
	pMP955 ^{*4}	267 ± 11	0.9 ± 0.1
	pMP956 ^{*4}	233 ± 24	0.8 ± 0.2
	pMP921	253 ± 20	1.1 ± 0.1
MC1061	pMP953 ^{*5}	49 ± 7	0.7 ± 0.2
	pMP910	17 ± 3	0.9 ± 0.1
	pMP911	73 ± 8	0.9 ± 0.1
	pMP912	56 ± 11	1.0 ± 0.1

*¹ mgたん白質当りの β -ガラクトシダーゼ活性

*² 細胞当りのコピー数

*³ pMP903由来 (図4参照)

*⁴ Rubis COのLS遺伝子のプロモータ

*⁵ ATaseの β サブユニット遺伝子のプロモータ

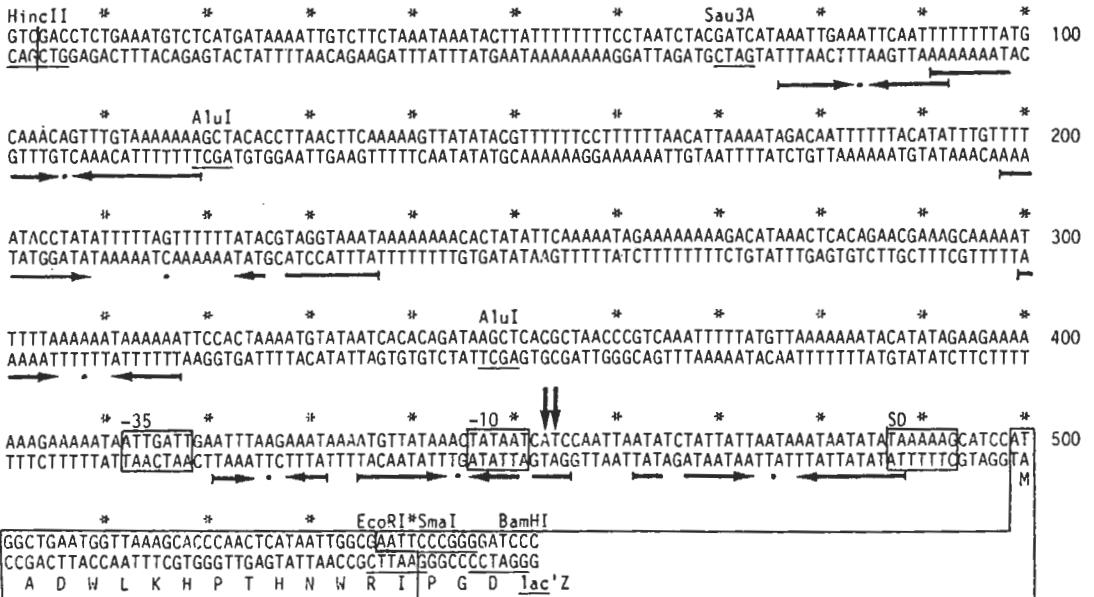


図 5 組換え体 pMP905 プラスミドのプロモータ部位の塩基配列。-35, -10, SD はプロモータ部位を示す。タテの矢印は mRNA 合成開始部位 (図6参照)

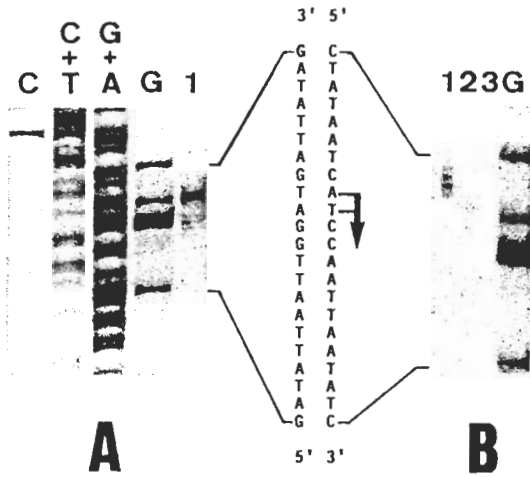


図 6 pMP905 のプロモータにより転写部位の S1 マッピング。A) 大腸菌における mRNA B) ゼニゴケ葉緑体における mRNA 合成。

大腸菌における遺伝子工学に応用できることを示唆している。

2.2 葉緑体 DNA 複製開始領域のクローニング

葉緑体 DNA が核とは独立して、DNA 複製している事実は、葉緑体 DNA に複製開始に必要な領域が存在することを示唆する。葉緑体 DNA をベクターに改変するには、ベクターが独立して複製することにより、そのコピー数が増大し、遺伝情報発現量は大きくなる。そのため、葉緑体 DNA の複製開始領域のクローニングは必要である。ゼニゴケ葉緑体 DNA の複製開始領域のクローニングについては、すでに述べている（発酵と工業 41 巻 1983）²⁰⁾。ゼニゴケ葉緑体 DNA は複数の複製開始領域が存在する。

2.3 葉緑体 DNA ベクターの作成

前述したゼニゴケ葉緑体 DNA 由来のプロモータ領域をもつクローンと、葉緑体 DNA 複製開始領域をもつクローンとの組換え DNA を作成することができる（図 7）。強力プロモータを含む組換えプラスミド pMP906 よりプロモータ領域のみを大腸菌プラスミド pKC7 のカナマイシン耐性遺伝子のプロモータ領域と取り変えた組換えプラスミド pMP1800 を作成した。これに、ゼニゴケ葉緑体 DNA の Bam HI 断片（Ba6, 図 1 参照）を導入し、pMP2000 を作成した。プラスミド pMP2000 は大腸菌で強いカナマイシン耐性を示したが、ゼニゴケ培養細胞で発現するか日々下検討中であ

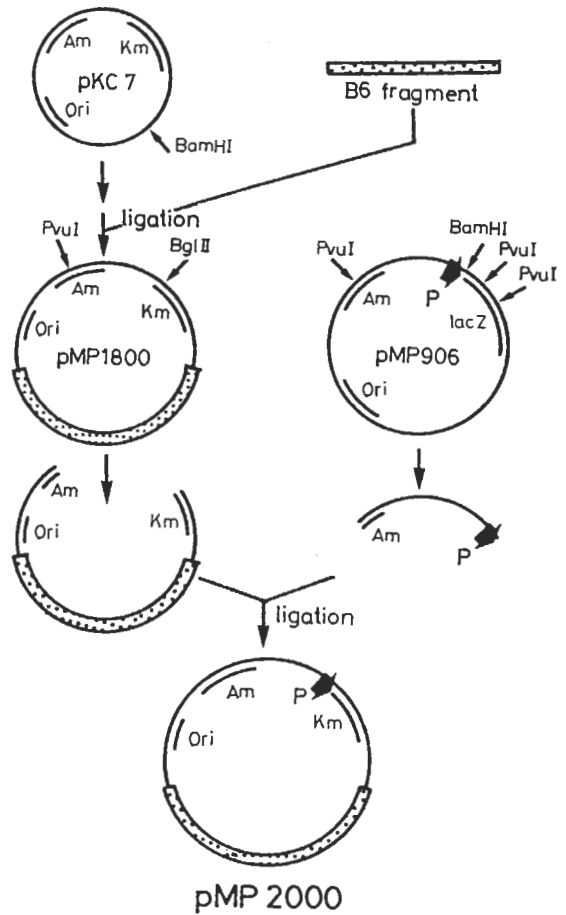


図 7 ゼニゴケ葉緑体 DNA のベクター化。プロモータは pMP906 (pMP905 由来) 由来をカナマイシン耐性遺伝子に連結した。DNA 複製開始部位は Ba6 断片 (図 1 参照) 由来を pKC7 に連結した

る。

Ti プラスミドを用い、バクテリアと植物細胞の共存培養法による形質転換系が確立されているが、最近、Direct transformation 系の開発が行なわれている。これは、Ti プラスミドのようにベクターを用いない方法である²¹⁾。しかし、その外来遺伝子の情報発現が transient である場合と、核ゲノムに組込まれ安定に遺伝情報が発現される場合がある。後者の場合、遺伝子は安定に保持される反面、発現量が小さい。現在のところこの形質転換系の効率率は低い、直接組換え DNA を植物細胞に導入することに成功した。この事実は組換え DNA 自身が複製することなく、核ゲノムに組まれ、植物細胞に形質転換したことを意味する。

葉緑体 DNA をベクターに改変した場合にも、上述のような核ゲノムに組込まれることも考えられる。しかし、有用物質生産、葉緑体の機能増加を考える場合、組換え DNA が葉緑体 DNA に組込まれることが望ましい。最近、外来 DNA が葉緑体 (DNA) に直接取り込まれたと聞く。

3. 形質転換に用いられた遺伝子発現プロモータ

Ti プラスミドによる形質転換系では Ti プラスミド由来のオクタピン合成酵素のプロモータを、大腸菌由来のカナマイシン耐性遺伝子やクロラムフェニコール耐性遺伝子の発現に活用された。最近、Ti プラスミド以外のプロモータが用いられはじめた。その最も顕著な例は、光合成酵素系 Rubis Co 酵素の小サブユニット遺伝子 (核ゲノムにコードされ、光により誘導される) のプロモータである。植物系における形質転換による発現を考える時、植物体のどの部分 (組織)、どの時期に、外来遺伝子の情報が発現されるか、させるか、今後の最も重要な研究課題である。

3.1 Ti プラスミドプロモータによる外来遺伝子の発現

Ti プラスミドによる形質転換は、Ti プラスミドの T-領域 (植物細胞に組込まれる DNA 断片) にあるオクタピン合成酵素 (クラウンゴール特有の酵素でアルギニンをオクタピンに変換する) のプロモータを外来遺伝子 (カナマイシン耐性遺伝子) に連結して行なわれた。このオクタピン合成酵素の遺伝子は、Ti プラスミドの宿主である *Agrobacterium tumefaciens* では発現してないが、形質転換体である植物細胞で発現している。

3.2 光誘導プロモータによる外来遺伝子の発現

前述した Rubis カルボキシラーゼ (小サブユニット) 遺伝子の発現は光誘導である。このプロモータを取り出し Ti プラスミドによる形質転換実験に用いられた²¹⁾。確かに、導入された外来遺伝子 (カナマイシン耐性、クロラムフェニコール耐性) は、光誘導されることが証明された。

4. 除草剤耐性遺伝子の探索

有用植物に特定の除草剤耐性遺伝子が導入されれば、

きわめて有効である。現在まで種々の除草剤が開発され実用に供されている。しかし、多くの除草剤は特定の植物には効かないという特異性がなく、大半の植物に影響をおよぼす。最近、植物の除草剤耐性遺伝子の探索、クローニングの研究が進められている。

4.1 アトラジン耐性遺伝子

多くの除草剤は光合成阻害剤である。トリアジン系除草剤は、葉緑体チラコイド膜に特異的に結合し、電子伝達を阻害する。この膜たん白質は葉緑体 DNA にコードされ、代謝回転の速い 32 K ダルトン (P32 ペプチド) ペプチドである。この系統の除草剤が多く用いられて以来、この薬剤に耐性の雑草が存在するようになった。また、その遺伝子は細胞質遺伝することが明らかにされた²³⁾。

最近、この p32 ペプチドの遺伝子がタローニングされ、その塩基配列が決定された。アトラジン耐性植物と感受性植物のその塩基配列を比較すると、3個所で塩基の置換が生じ、その中の1つの塩基アデニンがグアニンに変わり、その結果、1個のアミノ酸セリンがグリシンに置換されていた。このアミノ酸の変換が、アトラジン除草剤の結合部位に位置し、あるいは、P32 ペプチド高次構造に変化を及ぼしたものと考えられている。

このように、除草剤に対する活性部位を、DNA の塩基レベルでの人工改変により、さらに強力な耐性遺伝子に作り変え、他の植物に形質転換することも可能である。

4.2 バラコート耐性メカニズム

強力除草剤バラコートの結合部位も、葉緑体の光合成系 P400 ペプチドと考えられている。バラコートはこのペプチドと結合し、電子伝達を阻害し、細胞内にスーパーオキシドを蓄積し、細胞を死に至らしめる。これに対し、細胞は2つの耐性メカニズムをもつことが推察される。1つは、上述のトリアジン系除草剤のように、バラコートが結合する p430 ペプチドのアミノ酸置換が考えられる。現在、この P430 ペプチドが、葉緑体 DNA にコードされているのか不明である。核ゲノムの遺伝子バンクを作成し、葉緑体 DNA とともに検索、クローニングする必要がある。他の1つのメカニズムは、スーパーオキシドを除去する酵素 (スーパーオキシドムターゼ) による。この遺伝子のクローニングは、動

物細胞を用いて行なわれた。植物には、元来、2種のスーパーオキシドムターゼが存在し、その1つは葉緑体に特異的に存在することが知られている。最近、パラコート耐性のタバコ植物の作成が組織培養により行われ、確かに、スーパーオキシドムターゼ活性の高いことが示された。このように、より強力な酵素（微生物由来でもよい）をクローニングし、植物に導入することにより、パラコート耐性植物を作成することは不可能ではない。

4.3 その他の薬剤耐性メカニズム

商品名ラウンドアップとして市販されている除草剤も、特異性がなく、多くの植物にきわめて効く。この薬剤耐性メカニズムとして、グルタチオンSトランスフェラーゼによる不活化がある。この転移酵素は、微生物にも存在し、研究が進んでいる。この遺伝子をクローニングし、植物に導入することにより、植物はこの除草剤に対し、耐性を示すようになる。この種の解毒作用は、除草剤に限らないので、今後、有用な酵素遺伝子となるだろう。

おわりに

微生物を用いた遺伝子操作による有用物質の生産は、着々と進んでいる。一方、植物の有用物質の生産は、培養細胞レベルでの選抜が主体である。培養技術の改良、有用な細胞体の獲得が進み、組換え DNA 技術を利用し、有用物質生産に結びつくのもそう遠くないものと思われる。しかし、植物の生産する有用物質（アルカロイドなど非たん白質性）を考えると、その生合成は、きわめて複雑で、多くの酵素が関与している。また、先に述べたが植物体を考える時、導入した外来遺伝子を、より適当な場所、適当な時期に発現させなくては、植物の遺伝子操作は実用化されない。

最後に、植物のもつ最大の機能といえる光合成を十二分に活用しなくてはならない。光合成に関与する遺伝子、葉緑体ゲノムあるいは核ゲノムのいずれにコードさ

れているにせよ、この遺伝子操作が可能となって、微生物ではできない有用物質の生産、さらに進んで有用植物の育種につながる。

文 献

- 1) F. A. Krens *et al.*: *Nature*, **296**, 5852 (1982)
- 2) R. T. Fraley *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4803 (1983)
- 3) M. D. Block *et al.*: *EMBO, J.*, **3**, 1681 (1984)
- 4) G. M. S. Hooykaas-Van Slogteren *et al.*: *Nature*, **311**, 763 (1984)
- 5) H. Fukuzawa *et al.*: 投稿準備中
- 6) Y. Yamano *et al.*: *Nucl. Acids Res.*, **12**, 4621 (1984)
- 7) Y. Yamano *et al.*: *FEBS*, **185**, 203 (1985)
- 8) K. Umezono *et al.*: *Nucl. Acids Res.*, **12**, 9551 (1984)
- 9) J. D. Palmer: *Nature*, **301**, 92 (1983)
- 10) H. Fukuzawa *et al.*: 投稿準備中
- 11) H. Fukuzawa *et al.*: 未発表
- 12) K. Ohyama *et al.*: *Mol. Gen. Genet.*, **189**, 1 (1983)
- 13) J. E. Jurgenson, *et al.*: *Nucl. Acids Res.*, **8**, 3505 (1980)
- 14) A. J. Driesel, *et al.*: *Gene*, **6**, 285 (1979)
- 15) J. R. Bedbrook, *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1169 (1976)
- 16) M. J. Casadavan, *et al.*: *J. Bacteriol.*, **143**, 971 (1980)
- 17) H. Fukuzawa *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2725 (1985)
- 18) X. F. Kong *et al.*: *Gene*, **31**, 23 (1984)
- 19) V. A. Dzelzkalns *et al.*: *Nucl. Acids Res.*, **12**, 8917 (1984)
- 20) 大山莞爾: 発酵と工業, **41**, 828 (1983)
- 21) J. Paszkowski *et al.*: *EMBO, J.*, **3**, 2717 (1984)
- 22) D. Facciotti *et al.*: *Biotechnology*, **3**, 241 (1985)
- 23) J. Hirschberg *et al.*: *Science*, **222**, 1346 (1983)

(昭和60年8月8日受領)