

遺伝子組換えタマネギに生分解性プラスチックを 生合成させる試み

神奈川大学理学部生物科学科助手 安積良隆
 神奈川大学理学部生物科学科教授 齋藤光実
 神奈川大学理学部生物科学科4年生 松本佳代
 神奈川県農業総合研究所生物資源部研究員 北 宜裕
 神奈川県農業総合研究所生物資源部研究員 上西愛子
 神奈川県農業総合研究所生物資源部研究員 野村 研

1. 概要

将来的にはタマネギで高発現するアライナーゼ遺伝子を利用して、タマネギ内で生分解性プラスチック (Bio-Degradable Plastic; BDP) 合成に必要な遺伝子を高発現させ、タマネギにBDPを作らせる計画である。本年度はアライナーゼ遺伝子のプロモーター及びカリフラワーモザイクウイルス35SプロモーターとアライナーゼcDNAとレポーター遺伝子であるGFPを新しく開発された遺伝子組み換え技術を利用して連結し、融合遺伝子35S::AlliC::GFPとAlliP::AlliC::GFPを作製した。これを遺伝子銃を用いて、タマネギの鱗茎葉の表皮細胞に導入して、GFP遺伝子の発現レベルを調べ、プロモーターの遺伝子発現能力を調べた。また現在、タマネギ形質転換体での外来遺伝子発現研究のパイロット実験として35S::GFP::GUS融合遺伝子をタマネギ細胞に導入して形質転換体を作製して、その成長過程を調べている。

2. 背景

タマネギは気候や土壌に対する適応性が高く日本各地で栽培されており、今日では欠くことのできない健康食品である。タマネギは常温でもある程度の期間保存できる保存性の高い食品である。単位面積当たりの生産性も高く、狭小な耕作地でも多くの収穫が得られる。神奈川大学・理学部・生物科学科、鈴木研究室では神奈川県農業総合研究所 (農総研) と共同で、このタマネギの特性を生かし、有用物質の生産工場として機能させるために、タマネギに外来の遺伝子を導入し発現させる形質転換系の確立を目指して研究を行ってきた。農総研ではタマネギ形質転換体を作成する技術を確認し、現在、各種遺伝子のタマネギ内でのプロモーター解析を進めている。

神奈川大学・理学部・生物科学科、齋藤研究室では*Ralstonia eutropha*などのバクテリアから生分解性プラスチック (BDP) であるpoly(D-3-hydroxybutyrate) (PHB) を生合成するのに必要な酵素の遺伝子 (*phbA*, *phbB*, *phbC*) がクローニングされている。この遺伝子を利用してタマネギにBDPを低コストで生産できるようになれば、BDPの普

及につながり環境保全に貢献できると考えられる。このためには、タマネギ細胞内で先の細菌のPHB合成酵素遺伝子が高発現するように、プロモーターなどを改変する必要がある。

タマネギの鱗茎葉（食用部分）では辛味成分であるアリシンの生合成に必要な酵素アリイナーゼが高いレベルで発現している。この遺伝子のプロモーターおよび局在化シグナルを利用すればタマネギ内で外来遺伝子を高レベルで発現させることができると考えられる。現在すでにタマネギよりアリイナーゼ遺伝子cDNAとプロモーター領域がクローニングされている。

Gateway Cloning System (GCS) はバクテリオファージDNAが細菌のゲノムに取り込まれる際のインテグラーゼと切り出される際のエクサイナーゼによる配列特異的組み換え反応を利用したもので、目的の遺伝子をPCRによって組み換え反応に必要な配列を付加して増幅すれば、制限酵素処理やライゲーション反応なしにその遺伝子を様々なベクターに組み込むことができる画期的なシステムである。このシステムを利用して様々な融合遺伝子の作製を試みた。

3. 材料と方法

35S::AlliC::GFP融合遺伝子の作製： アリイナーゼ遺伝子のcDNAを含むクローンAlli1A (Accession No. AF124405) のDNAを鋳型として、attB1配列の一部を持つ5'プライマーattB1AllicDNA (AAAAAGCAGGCTCCATGGAGTCTTACCACAAAGTTGGC; 下線部がattB1配列の一部) とattB2配列の一部を持つ3'プライマーattB2AllicDNA (AGAAAGCTGGGT CTAAATGAAAGGACGGC GGGAAATC; 下線部がattB2配列の一部) を用いてPCRを行う。得られたPCR産物を鋳型にしてattB1アダプタープライマー (GGGGACAAGTTGTACAAAAAGCTGGCT; 重複する部分) とattB2アダプタープライマー (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT; 重複する部分) を用いてアリイナーゼORFの両端にattB配列を付加した。Invitrogen社のBPクローナーゼ (インテグラーゼ) によるattB1-アリイナーゼORF-attB2とエントリーベクターpDNOR201 (Invitrogen) が有するattP1-ccdB-CmR-attP2間の配列特異的組み換え反応により、アリイナーゼORFをpDNOR201に組み込みエントリークローンを作製する。エントリークローン中ではattL1-アリイナーゼORF-attL2と変化している。得られたエントリークローンと植物発現ベクターpGWB5 (島根大学の中川強博士より分与して頂いた) 中のattR1-ccdB-CmR-attR2との間でLRクローナーゼ (エクサイナーゼ) (Invitrogen) による配列特異的組み換え反応を起こさせ、attB1-アリイナーゼORF-attB2と変化した発現クローンを得る。このクローンのDNAをアグロバクテリウムC51に導入して、タマネギの形質転換に用いる。

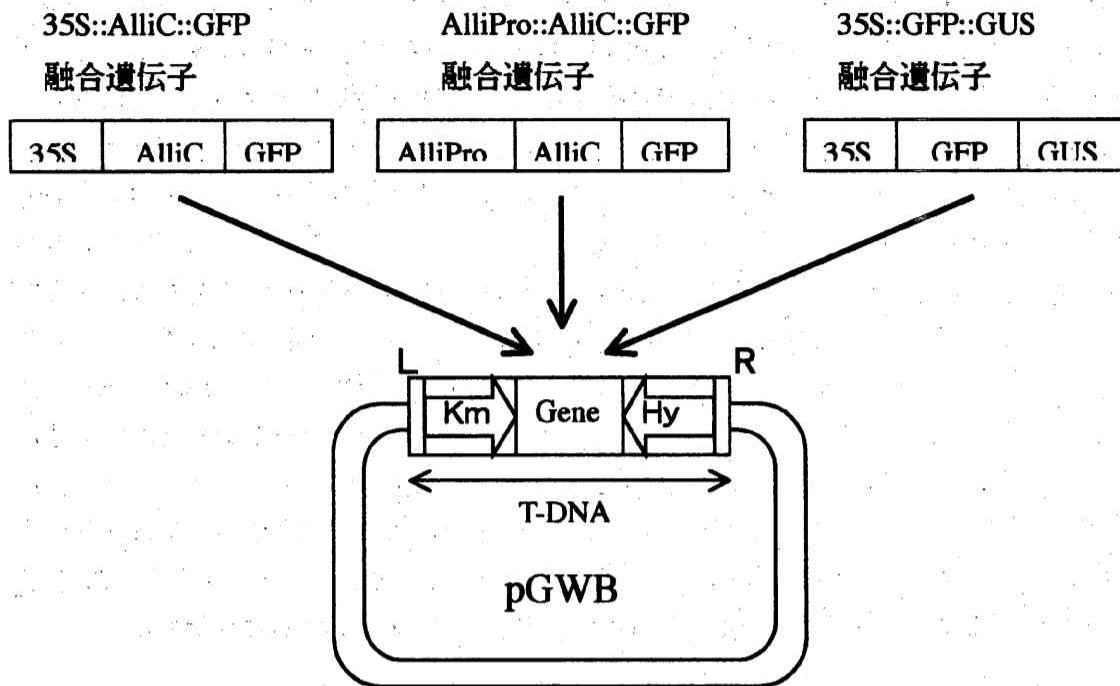


Figure 1 各種融合遺伝子構成体の構造 pGWBのGeneの部分に各種の融合遺伝子が挿入される。T-DNA；植物細胞に導入される領域、L；レフトボーダー、R；ライトボーダー、Km；カナマイシン抵抗性を賦与する遺伝子、Hy；ハイグロマイシン抵抗性を賦与する遺伝子。

AlliPro::AlliC::GFP融合遺伝子の作製： アリイナーゼプロモーター領域を含むクローンpBIE17を鋳型とし、attB1配列の一部を持つ5'側プライマー3種類とcDNAと重複する配列を持つ3'プライマーを用いて、アリイナーゼ上流域約1400塩基対、400塩基対、200塩基対を増幅する。Alli1Aを鋳型とし、プロモーター領域と重複する配列を持つ5'側プライマーとattB2配列の一部を持つ3'側プライマーを用いてアリイナーゼORF領域を増幅する。増幅されたアリイナーゼ上流域とアリイナーゼORF領域を混合し、プライマーを加えずにPCR反応を行い、いわゆるrecombinant PCRを行う。その後アダプタープライマーを用いるPCRによって、両端にattB1配列とattB2配列を付加する。これとエンタリーベクターをBP反応させることによってエンタリークローンを得る。前述の35S::AlliC::GFP融合遺伝子の場合と同様にして、pGWB4（島根大学の中川強博士より分与して頂いた）に組み込み、植物発現クローンを得る。

遺伝子銃によるプロモーター解析； 導入する遺伝子のDNAを金粒子（直径約2nm）と混合し、エタノール沈殿によって金粒子の表面に吸着させる。エタノールに再び懸濁後、ヘリウムガスをを用いる遺伝子銃IDERA（株タナカ、札幌）を用いて、タマネギ鱗茎葉の芯側の表皮に打ち込んだ。24℃暗所で24時間静置後、蛍光顕微鏡（オリンパスBX50）で観察した。

形質転換タマネギの作製； タマネギ (*Allium cepa*) の種子を70%エタノールで1分間、30%過酸化水素で5分間、滅菌水1分間5回洗浄して滅菌する。その種子を2 mg/L 2,4-Dを含むMS培地 (カルス誘導培地) 上で発芽させ、24°Cで4~6週間培養する。胚軸に形成したカルスを種から切り離し、アグロバクテリウム懸濁液中に浸した。アグロバクテリウムは2日間27°Cで50 mg/Lリファンピシリンと50 mg/Lカナマイシンを含むLB培地中で培養した後、懸濁用培地 (0.5 g/L MES、10 mg/L ベンジルアミノプリン、10 mg/L アセトシリニンゴン、0.002% Tween-20を含むMS培地) に懸濁したものをを用いた。5分間カルスをアグロバクテリウム懸濁液中で減圧浸潤 (400 mHg) する。共存培地 (2 mg/L 2,4-D、10 mg/L アセトシリニンゴンを含むMS培地) 上で3日間暗所で培養する。カルスを200 mg/L クラフォランで洗浄後、除菌培地 (10 mg/L 2-ip、200 mg/L クラフォランを含むMS培地) 上で1週間培養する。カルスを再分化培地 (10 mg/L 2-ip、200 mg/L クラフォラン、25 mg/L ハイグロマイシンを含むMS培地) 上でシュートが出るまで培養する。シュートが成長したら、発根培地 (200 mg/L クラフォラン、25 mg/L ハイグロマイシンを含むMS培地) 上で発根するまで培養する。発根したら無菌操作を止め、通常の土壌に移植する。

4. 結果と考察

タマネギは常温で保存性が高い、単位面積当たりの生産性が高いなどの利点があり、外来遺伝子をタマネギに導入して有用物質を生産する生物工場 (バイオファクトリー) として機能することが期待できる。しかしタマネギの形質転換はまだ一般化されておらず、世界的に見てもまだ数例しかない。日本では神奈川県農業総合研究所で成功しているのみである。我々はタマネギのそのような将来の利用に備えて基礎研究を行っている。その初期段階として遺伝子発現のためにカリフラワーモザイクウイルス35S プロモーター (35S) とアライナーゼ遺伝子のプロモーターの発現誘導能力の検定と実際にタマネギ形質転換体を作製し問題点の洗い出しを行うことにした。

4.1 35Sプロモーターの発現誘導能力

アライナーゼcDNAを含むクローンAlli1AのDNAを鋳型としてタンパク質情報コード領域 (ORF) をPCR法によって増幅した。この際、N末側にはattB1配列の一部を、C末側にはattB2配列を付加した。その後、アダプタープライマーを用いたPCRによって完全長のattB1とattB2配列をアライナーゼORFに付加しattB1-アライナーゼORF-attB2を得た。この配列とInvitrogen社の開発したGateway Cloning System (GCS) のエントリーベクターpDONR201中のattP1-ccdB-CmR-attP2の間でBP反応による組み換え反応を起こさせ、エントリークローンを作製した。エントリークローン中ではBP反応の結果、attL1-アライナーゼORF-attL2となっている。このエントリークローンさえ準備できれば、様々な発現ベクターに容易に目的の遺伝子に移し換えることができるのがGCSの特徴である。

アライナーゼORFをLR反応によってエントリークローンより、植物細胞で発現させるた

めの発現ベクターpGWB5に移し換えた。このベクターはTiプラスミドを持つアグロバクテリウム内に導入され、植物に感染した場合に植物細胞内に転移するT-DNA領域を持っている。この領域内の35SプロモーターとGFP (Green Fluorescent Protein ; 励起光を照射されると緑の蛍光を発するタンパク質) 遺伝子の間にattL1配列とattL2配列と組み換える配列attR1とattR2が組み込まれているattL配列とattR配列の間の組み換え反応 (LR反応) により、アライナーゼORFを35SとGFPの間に挿入し、35S::AlliC::GFP融合遺伝子を作製した。この融合遺伝子はT-DNA領域内に共にある植物細胞内で働く形質転換体選抜用遺伝子NPTII (カナマイシン耐性遺伝子)、HYG (ハイグロマイシン耐性遺伝子) といっしょに、アグロバクテリウムの働きによって植物細胞内に形質導入される。

今後、この発現クローンをアグロバクテリウムに導入し、タマネギの形質転換を行う予定であるが、本年度はこのクローンのDNAを遺伝子銃を用いてタマネギの鱗茎葉 (食用部分) の表皮細胞に打ち込んで、実際に発現クローンとして機能するかどうかなどを調べた (Fig. 2)。今回の遺伝子銃実験で用いるカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターは植物細胞内で一般に高発現を誘導する。タマネギの鱗茎葉の表皮細胞でも発現誘導が期待されたが、やはり強い発現誘導能力があることが示された。アライナーゼタンパク質は約500アミノ酸からなるタンパク質であるが、このタンパク質とGFPの融合タンパク質は蛍光タンパク質として正常に機能しているのが解る。アライナーゼタンパク質には液胞に局在させるシグナルが存在する。緑の蛍光シグナルは細胞周辺部の細胞質領域や核では弱く、細胞の大部分を占有している液胞部分に強く観察された。これによって、アライナーゼの液胞局在化シグナルによってアライナーゼ::GFP融合タンパク質は液胞に細胞内輸送されているのが示された。

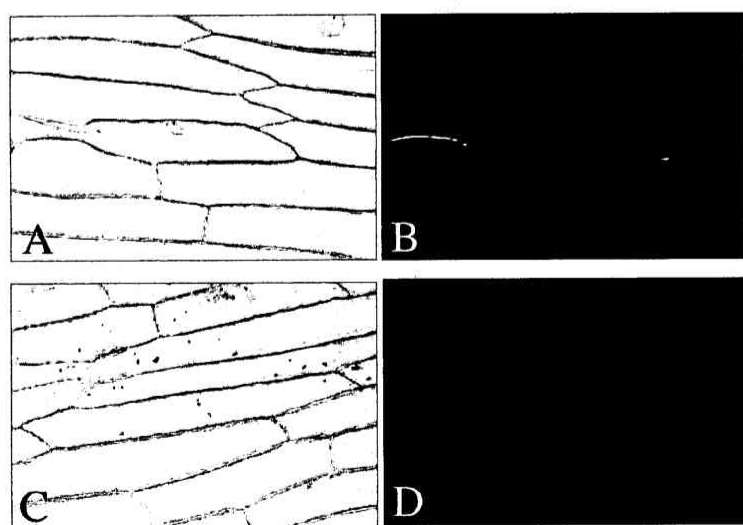


Figure 2. 鱗茎葉表皮細胞での35S::AlliC::GFPの発現。白タマネギ鱗茎葉の芯側の表皮細胞に遺伝子銃を用いて35s::AlliC::GFP DNAを導入した。AとB、CとDは同じ細胞を観たもので、A、Cは明視野で、B、DはGFPからの蛍光を観察したもの。GFPは液胞に蓄積しているのが分かる。

4.2 アリイナーゼプロモーターの発現誘導能力

35Sプロモーターもタマネギ細胞で強力な遺伝子発現誘導能力を有することが解ったが、アリイナーゼはタマネギ細胞中のタンパク質の数%を占め、この遺伝子もタマネギ細胞中で非常に強く発現していることが期待できる。しかし高タンパク質含量は必ずしも遺伝子の高発現を示すものではなく、mRNAやタンパク質の安定性の上昇によって起こる場合も考えられる。それでアリイナーゼ遺伝子のプロモーターをアリイナーゼ遺伝子::GFPに連結し、そのプロモーター活性を調べることにした。アリイナーゼ遺伝子のプロモーター領域を含むクローンpBI17Eより遺伝子上流域約1400塩基対、400塩基対、200塩基対をPCRにより増幅した。これをBP反応によりpDONR201に組み込み、エントリークローンを作製した。現在、発現クローンの準備を行っている。

4.3 35S::GFP::GUS融合遺伝子による形質転換タマネギ

タマネギは育種的に種を蒔いてから花をつけ、次世代を得るのに2年間かかるという問題がある。プロモーターの準備などが終わってから形質転換体の作製にとりかかっていたのでは、もし何かの問題が生じた場合に対処に多くの月日が費やされることになる。それで研究を効率的に進めるために、すでにある遺伝子を用いて形質転換実験を進め、実際に形質転換体を作製した場合にどのような問題が生じるか調べることにした。

現在35S::GFP::GUS融合遺伝子をタマネギに形質転換し、培養中である。カルス誘導培地上で発芽した種子の胚軸にカルスを形成させ、これに切り取りアグロバクテリウムを感染させた。アグロバクテリウム共存培地上で感染したカルスを培養し、形質転換を起こさせた。除菌後、カルスを再分化培地に移し培養している(図2A、B)。十分シュートが大きくなったものは発根培地上に移した(図2C)。この後発根すれば、無菌操作を止め、通常の土壌に移し育てる。その時点で形質転換体(T1世代)が完成する。タバコやシロイヌナズナなどは適当な条件下に置けばすぐに花成が起り、種をつけ、次世代(T2世代)が得られる。これらの植物の場合は形質転換体を作り始めてから、種子が得られるまでの期間は約半年程度である。しかしタマネギの場合、形質転換体を作り始めた時期にも依るが、翌年の夏に花をつけると考えられ、形質転換体(T1世代)が得られてから次世代(T2世代)を得るまでにさらに1年から2年かかる。

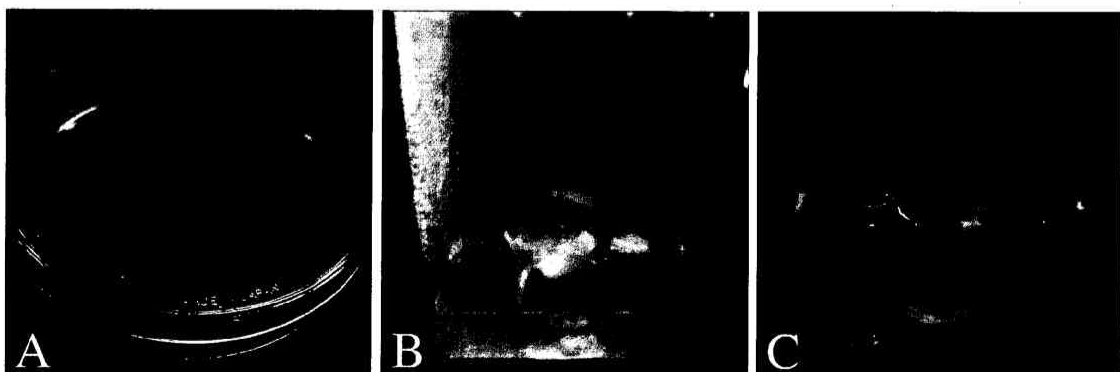


Figure 3. タマネギ形質転換体の成長の様子。35S::GFP::GUS融合遺伝子をアグロバクテリウムを介してタマネギカルス細胞に導入し、カナマイシンとハイグロマイシンを用いて形質転換体の選抜を行っている。Aはカルス。不定根や葉状体が出ているのがわかる。Bはシュートが形成された段階。Cではシュートが伸長し、発根を誘導している段階。A、B、Cは異なる形質転換体。

ハイグロマイシンとカナマイシンによる形質転換体の選抜は有効と考えられるが、選抜されて生き残った細胞全てが植物体に再生するわけではない。タマネギの場合、シュート(苗条。未分化な地上部。これができるると地上部の再生が進む。)の形成は効率よくは起こらない。多くの場合、不定根や葉状体が形成される (Fig. 3A)。希にできるシュートを他の部分からできるだけ切り離し、培養した (Fig. 3B)。得られたシュートをさらに培養して、成長させた (Fig. 3C)。まだ発根に至った植物体は得られていない。

GFP遺伝子の発現を青色の励起光を照射することによって調べてみた。35Sプロモーターはカルスでは強くは働かないが、それでも弱い緑色の蛍光が不定根などの先端部分に観察された (Fig. 4B)。シュート部分でも蛍光と考えられる緑色の蛍光を観察することができた (Fig. 5B)。まだ無菌容器内で培養している段階なので、植物体を容器から取り出したり、取り出したものから切片をつくって詳しく顕微鏡下で調べることができない。しかし現段階でも導入した遺伝子が実際に発現しているのが確かめられた。今後は形質転換体を完成させ、鱗茎における発現の強さを調べたいと考えている。しかし鱗茎が発達するまでには時間がかかり、少なくとも花が咲き、種が得られるまで植物体を生かしておく必要がある。その時点でも鱗茎部分がまだ形を留めていれば、種が採れた後、T1世代の鱗茎部分を切開して導入遺伝子の発現を調べることができる。しかし通常、花が咲き、種ができるころの鱗茎は蓄積していた栄養を生殖のために使い果たし、組織は崩壊し始めている。そのためT2世代の植物が鱗茎を発達させるまで待たなければならないものと考えられる。時間はかかるが多くの種が得られれば、様々な解析に用いることができる。

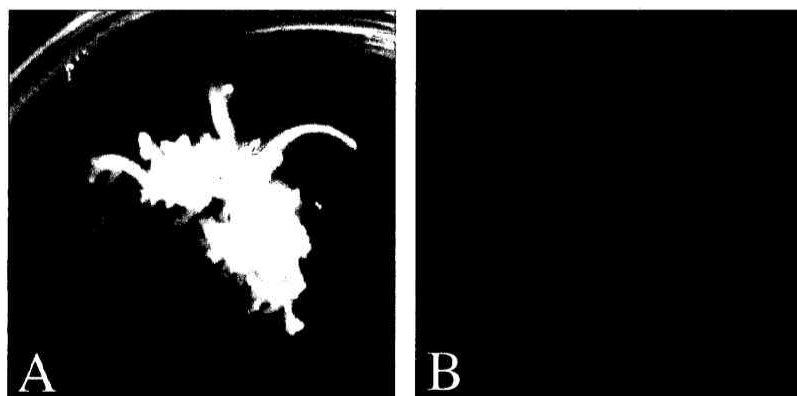


Figure 4. 培養初期のタマネギ形質転換体でのGFPの発現。35S::GFP::GUS融合遺伝子をタマネギ細胞に導入したカルス。カルスから突出して出ているものは不定根と考えられる。Aは白色光下で撮影したものであるが、オレンジのフィルターを通して撮影した。Bは青色光を照射し、GFPを励起して緑色の蛍光を出させたもの。

5. 今後の課題

プロモーターに関しては鱗茎で特異的に発現するアライナーゼのプロモーターが有効ではないかと考えている。35Sプロモーターの様に植物体全体で発現するプロモーターの場合、茎や根などで外来遺伝子を発現させ、その産物が細胞内に蓄積した時に、その部位で何らかの影響が出る可能性が考えられる。そのようなことを考慮に入れると、アライナーゼプロモーターの発現誘導能力の解析結果が待たれる。

最終的にはタマネギに生分解性プラスチック、BDPを合成させたいと考えているが、生分解性プラスチックの合成にはアセチルCoAから出発して、 β -ケトチオラーゼ、アセトアセチルCoA還元酵素、PHB合成酵素による3段階の反応が必要で、タマネギに3つの遺伝子を導入する必要がある。通常このような場合にはそれぞれの遺伝子を別々に導入して、得られた形質転換体同士を掛け合わせることによって、1個体に3つの遺伝子を導入する。しかしタマネギの場合、交配までの時間（世代時間）が長く、目的を達成するのに時間がかかる。一度に多くの遺伝子を導入する方法を検討する必要がある。今回はアライナーゼ遺伝子との融合遺伝子を作製したが、アライナーゼは液胞に輸送されるため融合遺伝子も液胞に分布することになる。BDPの原料となるアセチルCoAの細胞内の分布についても調べる必要がある。

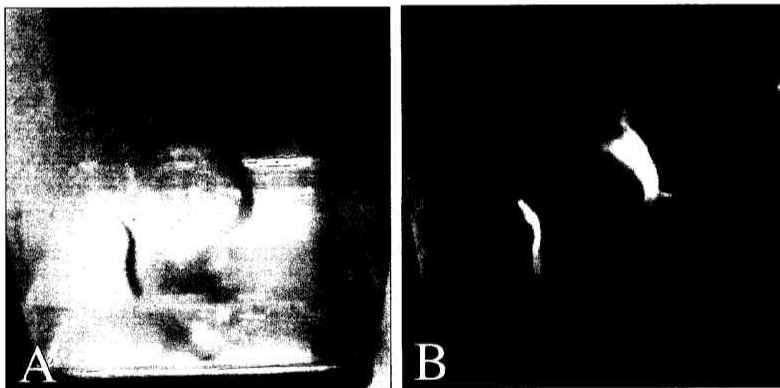


Figure 5. シュート形成期のタマネギ形質転換体でのGFPの発現。Fig. 3と同様にして35S::GFP::GUS融合遺伝子をタマネギ細胞に導入し、植物個体を再生しようとしているもの。シュートの形成が進んだ段階。Aは白色光下で撮影したもの。BはGFPからの緑色の蛍光を撮影したもの。

参考資料

- Invitrogen社のInstruction Manual、Gateway™ Technology (<http://www.invitrogen.com>)
 モデル植物ラボマニュアル 岩淵雅樹、岡田清孝、島本功編集 シュプリンガー・フェア
 ラーク東京 2000年
 新版モデル植物の実験プロトコール 島本功、岡田清孝監修 秀潤社 2001年