

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 瀧田 英司

2. 養成カリキュラム名：植物利用エネルギー使用合理化工業原料生産技術の研究開発

3. 養成カリキュラムの達成状況

植物に導入した多重遺伝子を安定発現する技術・知見の習得に関しては、多重遺伝子を安定に発現させるためのベクター（改良 TAC ベクター、特許出願済）を開発し、モデル植物であるシロイヌナズナにおいてその効果を確認することにより達成された。

多重遺伝子連結技術・知見の習得に関しては、本プロジェクトで開発された多重遺伝子連結技術をさらに改良し発展させることにより達成された。

植物での導入遺伝子の発現制御技術・知見の習得に関しては、多重遺伝子導入シロイヌナズナを作成し、解析を行うことにより達成された。

実用植物への遺伝子導入技術・知見の習得に関しては、ユーカーリへの遺伝子導入に使用する有用遺伝子を多重連結した植物導入用ベクターを構築し、植物に導入する過程によりほぼ達成された。

6. 成果（A 4 版 3 枚程度）

（1）植物の多重遺伝子導入に適したベクターの開発

導入する多重遺伝子を植物で適正に機能させるためには、すべての遺伝子を確実に導入し、かつ安定に機能させる必要がある。そのために必要となる長鎖 DNA の導入および遺伝子の安定発現を可能にするベクターの開発に従事した。近年開発された transformation-competent artificial chromosome (TAC) ベクターにより植物染色体への長鎖 DNA 導入が可能となったため、複数遺伝子を植物染色体上の1つの部位にまとめて導入できるようになり、後代においても導入遺伝子すべてを保持する個体の獲得が容易になった。しかし、遺伝子導入個体間での導入遺伝子発現のばらつきは TAC ベクターを使用しても生じ、遺伝子導入されているにも関わらず期待される形質を持たない個体が出現するという問題は回避できない。ばらつきの主要原因としては、染色体上に導入された遺伝子の周辺環境の影響（位置効果）と TGS、PTGS といったジーンサイレンシングによる発現抑制が考えられる。そこで、導入遺伝子の周辺環境を一定にすることによる遺伝子導入個体間での発現の安定化を目指し、導入遺伝子の両端に常に一定配列の長鎖（約 32、41 kb）DNA を付加した状態で植物染色体に挿入できるよう TAC ベクターの改良を行った（改良 TAC ベクター）。

改良 TAC ベクターの導入遺伝子発現安定化に関する有効性を評価するため、改良 TAC ベクターによりシロイヌナズナに *GUS* 遺伝子を導入し、*GUS* 遺伝子コピー数の推定および *GUS* 活性の測定を行った。改良 TAC ベクターにより *GUS* 遺伝子を導入された個体は、コントロールである TAC ベクターと比較し導入遺伝子コピー数が低い傾向があり、シングルコピーの *GUS* 遺伝子が導入された個体の割合はコントロールベクターの約 2 倍であった。また、コントロールベクターにより 2 コピー以上の *GUS* 遺伝子が導入された場合、低レベルの *GUS* 活性を示す個体が出現し、4 コピー以上導入された場合、全ての個体が低レベルの *GUS* 活性を示した。一方、改良 TAC ベクターの場合、低レベルの *GUS* 活性を示す個体は少なく、*GUS* 遺伝子が 1 ~ 3 コピー導入された個体では存在しなかった。また、シングルコピーの *GUS* 遺伝子が導入されたシロイヌナズナには、導入に改良 TAC ベクター、コント

ローレベクターのどちらを用いた場合でも、低レベルの活性を示す個体は存在せず、個体間での GUS 活性のばらつきが少なかった。これらの結果より、シロイヌナズナにおいては、位置効果が導入遺伝子発現のばらつきに与える影響は小さいと考えられ、複数遺伝子の導入により発現が低レベルとなった個体の存在がばらつきの主な原因であると考えられた。改良 TAC ベクターは複数遺伝子が導入された個体におけるサイレンシングを抑える効果があると考えられた。複数遺伝子が導入された個体になぜサイレンシングが起こったかを調べるため、コントロールベクターにより GUS 遺伝子を導入されたシロイヌナズナのうち GUS 活性が殆ど無い個体の解析を行った。これらの個体は GUS mRNA 蓄積量レベルが低く、PTGS が起こった際に検出される二本鎖低分子 RNA が検出されたことから、PTGS が起こっていると推察された。

これらの結果を総括すると、改良 TAC ベクターは導入遺伝子両端に長鎖 DNA を付加することにより PTGS を抑制し、導入遺伝子発現を安定化させる効果があると考えられた。よって、導入遺伝子コピー数を低く抑える効果も含め、本ベクターの使用により、植物への多重遺伝子導入を効率的かつ確実に行うことが可能となった。

(2) 多重遺伝子連結技術の開発

本プロジェクトで開発している多重遺伝子連結技術によりこれまでに 10 DNA 断片の連結に成功しているが、さらに本技術をより実用的なものとするために、連結効率の向上を目指し改良を行った。連結に使用する PCR 断片の末端の制限酵素切断が不完全で、両側又は片側の末端が制限酵素切断されていない断片が生じた場合、これらの断片は連結されないもしくは連結されても次に連結されるべき断片が連結されなくなるため連結効率が低下する。そこで 5' 末端をビオチン化したプライマーを用い DNA 断片の PCR を行い、これらを制限酵素切断後ストレプトアビジンとビオチンの結合を利用してビオチンを含む DNA 断片を除去し、両端が制限酵素切断されている断片のみを分離し連結に使用した。また、最後の断片として連結するベクターのうち、連結されなかったものが洗浄操作により完全に洗浄できなかった場合、環状化反応の際にベクターのみが環状化された分子が生成してしまい、目的の連結断片が獲得できる割合が低くなる。そこで連結していないベクターの環状化反応への混入を減少させるために、ベクター連結後の洗浄に使用する洗浄液量を 0.2 ml/30 µl ビーズから 1.5 ml/30 µl ビーズに変更した。これら 2 点の改良の結果、従来法では全断片が連結されているクローンを獲得するために各断片 2 µg 程度が必要であったのに対し、改良法では 0.6 µg で充分であった。また、各断片を 0.6 µg 使用し 6 断片及び 10 断片の連結を行った場合、最終的に獲得されるクローンに占める全断片が連結されているクローンの割合は、改良法ではそれぞれ 80%、40% であったのに対し、従来法ではいずれも全断片が連結されたクローンが獲得できなかった (0%)。以上の結果より本改良法を使用することにより、遺伝子連結効率が飛躍的に向上することが明らかとなった。

さらに、固相連結法により多重化した遺伝子群をバイナリーベクターに導入する系の構築を試みた。TAC ベクターの境界領域内に、出現頻度が極めて低い制限酵素 (I-CeuI、I-SceI、PI-PspI、PI-SceI) 認識配列を挿入し、連結 DNA を複数導入できる系とした。実際に 30 個の約 0.5 kb DNA 断片を作製し、上記の改良を行った固相連結法により 9、10、11 断片を別個に連結後、これら 3 つの連結 DNA を液相法により順次上記 TAC ベクターに導入した。この結果 30 DNA 断片 (約 15 kb) が連結されたクローンが獲得でき、この系の有効性を確認できた。また固相連結法により 12 断片の連結が可能であることがわかった。

遺伝子連結を自動化することにより、連結操作を複数同時進行で行うことが可能となり時間を節約できるとともに、自動運転が可能となり労力を節約できるようになる。そこで、磁性体操作が可能な装置を使用し、多重遺伝子連結の自動化を目指した検討を行った。磁性体の分注、懸濁、分離、温度処理等が複数検体同時にできる多目的汎用装置、SX-8G (プレジジョン・システム・サイエンス株式会社製) を実際に使用し、2 本鎖 DNA のライゲーションを試みた。0.5 kb の DNA 断片のライゲーションを繰り返し 2 回行ったところ、これら 2 断片の連結が確認でき、本装置による固相上での

DNA のライゲーションが可能である事が示された。また、同じ操作を複数同時に行い、同様の結果が得られたことから、多検体同時処理が可能であることも明らかとなった。

(3) 有用遺伝子群を導入したシロイヌナズナの作出

プロジェクト参加企業である王子製紙の複合環境ストレス抵抗性ユーカリの作出に参画し、多重遺伝子連結技術を用いた植物への多重遺伝子導入が可能であることを証明するために、環境ストレス抵抗性遺伝子群を TAC ベクターに組み込んだベクターの構築し、これを用い実用植物およびモデル植物への遺伝子導入を試みた。環境ストレスとしては、a) 酸性土壌における難溶性リン酸形成による低リン酸ストレス、b) 各種ストレスにより発生する活性酸素ストレスを想定した。a) に関しては難溶性リン酸の可給態化に寄与するクエン酸の合成能力の強化を図るために、合成に関与するクエン酸合成酵素 (CS) を過剰発現させ、分解に関与する NADP-特異的イソクエン酸脱水素酵素 (NADP-ICDH) を 2 本鎖 RNA 干渉 (RNAi) により発現抑制させる戦略で、b) に関しては活性酸素の除去が期待できるカタラーゼ (KatE) を過剰発現させる戦略で抵抗性の付与を目指した。

多重遺伝子の導入効果を評価するためには、単独遺伝子導入による効果との比較をする必要がある。上記 3 遺伝子のうち、CS、KatE 遺伝子に関してはシロイヌナズナにおいて単独導入効果が認められている。そこで、RNAi による細胞質型 NADP-ICDH 遺伝子 (*AtcytNADP-ICDH* 遺伝子) 発現抑制用カセットの単独導入での効果を調べるために、同カセットを 1 コピー持つシロイヌナズナのホモ系統を数系統獲得した。本系統の NADP-ICDH mRNA 蓄積量をリアルタイム RT-PCR で定量したところ、RNAi による遺伝子発現抑制のターゲットとしている *AtcytNADP-ICDH* mRNA 蓄積量は野生型と比較して 10%程度であった。葉緑体型 NADP-ICDH mRNA およびペルオキシソーム型 NADP-ICDH mRNA 蓄積量に野生型と差異がなかったこともあわせて、本系統では RNAi により特異的かつ効果的に *AtcytNADP-ICDH* mRNA 発現が抑制されていることが明らかとなった。さらに細胞外へのクエン酸放出量を調べたところ、本系統は野生型と比較し顕著に増加しており、*AtcytNADP-ICDH* 遺伝子発現の抑制はクエン酸放出量増加に効果があることが明らかとなった。

また、a) のストレス抵抗性への効果が期待できるニンジン由来ミトコンドリア型 CS 遺伝子 (*DcmtCS* 遺伝子) および *AtcytNADP-ICDH* 遺伝子 (RNAi) の二重遺伝子導入による相乗効果の有無を調べるために、これら 2 遺伝子カセットをシングルコピー持つ系統の選抜を上記同様に用い、数系統のホモ系統を獲得した。これらについて発現解析を行ったところ、*DcmtCS* mRNA の蓄積および *AtcytNADP-ICDH* mRNA 蓄積量の特異的抑制が認められた。

さらに、*DcmtCS* 遺伝子、*AtcytNADP-ICDH* 遺伝子 (RNAi)、大腸菌由来 *KatE* 遺伝子カセットを本プロジェクトで開発された多重遺伝子導入技術により多重連結することに成功した。これら多重連結された 3 遺伝子カセットを TAC ベクターに組み込み、このベクターをユーカリでの遺伝子導入用に王子製紙に提供した。シロイヌナズナにこのベクターを用い遺伝子導入し、*DcmtCS* 遺伝子、*AtcytNADP-ICDH* 遺伝子 (RNAi)、*katE* 遺伝子カセットをシングルコピー持つ系統の選抜を上記同様に用い、ホモ系統を獲得した。これらについても発現解析を行ったところ、*DcmtCS* mRNA および *KatE* mRNA の蓄積と *AtcytNADP-ICDH* mRNA 蓄積量の特異的抑制が認められた。

以上、遺伝子導入植物において意図した導入遺伝子発現が認められたことから、多重遺伝子連結技術を用いた植物への多重遺伝子導入が可能であることが証明された。

7. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。コピーを添付。)
なし (論文準備中)

(2) 口頭発表 (発表済を対象。予稿集のコピーを添付。)

土肥敬悟、太田勉、山口善紀、佐藤茂、近藤啓子、水野梨絵、河津哲、鈴木雄二、和田巽、
小山博之、小山貴芳、木村哲哉、瀧田英司
省エネルギー型工業原料生産に適した多年生工業原料植物の創成
第20回バイオテクノロジーシンポジウム2002年11月

瀧田英司、紀 美佐、新名惇彦、柴田大輔
両端に長鎖DNAを付加することによる導入遺伝子発現の安定化
第21回植物細胞分子生物学会香川大会・シンポジウム、2003年8月

瀧田英司、紀 美佐、奥山恵里、新名惇彦、柴田大輔
植物への多重遺伝子導入技術の開発
第21回バイオテクノロジーシンポジウム、2003年11月

瀧田英司、紀 美佐、奥山恵里、新名惇彦、柴田大輔
サイレンシングの回避による導入遺伝子発現の安定化
日本植物生理学会2004年度大会、2004年3月

(3) 特許等
1 件