

葉緑体工学とその応用

新名 惇彦*・加藤 晃

植物に核外自己増殖器官として存在する葉緑体には、光合成に加えて、窒素・硫黄などを同化する代謝経路が局在している。光合成炭素代謝系は、光エネルギーを利用した無機炭素CO₂と生体物質である有機化合物との接点を触媒するため、葉緑体は植物の独立栄養性を支えるオルガネラと言える。また、地球上のほとんどの有機化合物合成の初発を担っているため、従属栄養生物にとっても非常に重要な小器官である。葉緑体はその内部に50 kb～400 kbからなる独自の環状2本鎖DNAゲノムを多コピー持ち、葉緑体ゲノムコードの遺伝子は、原核生物型様式で転写・翻訳される。高等植物では核ゲノムに対して葉緑体ゲノムのコピー数は場合によっては1万倍となる。¹⁾ また、葉緑体のタンパク質合成能力にも非常に高いものがある。CO₂固定に関わるRuBisCOは、緑葉において全可溶性タンパク質の50%にもものぼるタンパク質を蓄積しているが、その大サブユニットをコードしている遺伝子は葉緑体コードである。²⁾

1988年に、単細胞緑藻クラミドモナス葉緑体ゲノムへ直接外来遺伝子を導入できる技術が開発され、³⁾ その後、高等植物のタバコでも成功し、⁴⁾ 葉緑体を対象とした代謝工学「葉緑体工学」が可能となった。^{5,6)} 現在までに、シロイヌナズナ、⁷⁾ ジャガイモ、⁸⁾ イネ、⁹⁾ トマト¹⁰⁾ などで葉緑体の形質転換が報告されている。葉緑体への遺伝子導入が核ゲノムを対象とした場合と本質的に異なる点は、導入遺伝子が相同組換えでゲノムに取り込まれる点である。したがって形質転換に用いるベクターには、選択マーカーなどの導入したい遺伝子を葉緑体ゲノム配列に挟んだ形で構築する(図1)。葉緑体形質転換では、遺伝子の挿入位置、方向を任意に決めることができ、それにより特定遺伝子の破壊、特定遺伝子への点変異導入も可能となる。

このように、光合成で生み出される豊富な還元力、ゲノムの多コピー数やタンパク質合成能力の高さ、利用できる葉緑体形質転換技術などから、葉緑体は非常に優秀なバイオリクターと考えられる。本稿では、応用研究の進んでいる高等植物を中心に葉緑体工学の現状について概説したい。

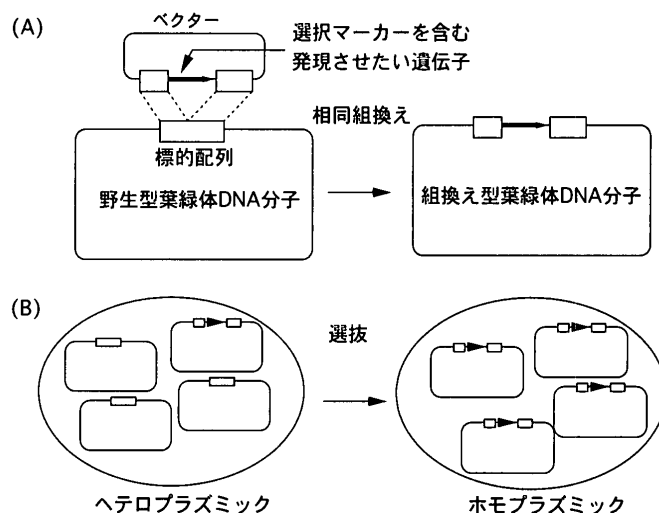


図1. 葉緑体形質転換の手順。葉緑体形質転換に用いるベクターは、導入したい遺伝子(矢印)を標的とする葉緑体配列(ボックス)で挟んだかたちで構築する。葉緑体にベクターが導入されると内在の標的配列との相同組換えが起り、特定の位置に遺伝子が導入される(A)。形質転換の第二ステップは、細胞に多コピー存在する分子をすべて組換え分子に置換する過程である(B)。

葉緑体での異種タンパク質蓄積の試み

現在までに、葉緑体で多くの異種タンパク質の蓄積が試みられている。詳細については、Daniellらの総説¹¹⁾にまとめられているので参照されたい。この中で、代表的な3例について紹介する。

微生物のオペロンの発現 葉緑体での有用組換えタンパク質の蓄積は、*Bacillus thuringiensis* 由来のCry2Aa2タンパク質(Bt toxin)をタバコで発現させたのが最初の例であり、¹²⁾ 葉の全可溶性タンパク質の2～3%の蓄積が認められた。この蓄積量は、核ゲノムへCry2Aa2遺伝子を導入した場合の約30倍高いレベルである。組換え植物体の葉は、実際に対象とする昆虫に対して強い毒性を示し、葉緑体で異種タンパク質を高蓄積できることが実証された。本来、*B. thuringiensis* の中でCry2Aa2遺伝子は、3種の遺伝子よりなるオペロンを形成しているが、導入された遺伝子は1種のみであった。その後、タバコ葉緑体へCry2Aa2遺伝子をそのままオペロンとして導入することが試みられ、¹³⁾ 葉の全可溶性タンパク質の実に40%以上のBt toxinが蓄積し、その安定性も改善された。これは葉緑体ゲノムへ微生物由来のオペロンをそのまま導

* 著者紹介(代表) 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科(教授) 〒630-0101 生駒市高山町8916-5
TEL. 0743-72-5463 FAX. 0743-72-5469 E-mail: shinmyou@bs.aist-nara.ac.jp

入した初めての例であり、オペロンを形成している微生物代謝系を直接葉緑体へ移入することで、葉緑体に新たな代謝経路を創設できる可能性を示している。

活性型ヒト成長ホルモンの生産 タバコ葉緑体では、ヒト由来の成長ホルモンであるソマトトロピン(hST)の発現も報告されている。¹⁴⁾ この場合も目的タンパク質は高蓄積し、葉の全可溶性タンパク質の7%以上の蓄積が認められ、核へ遺伝子を導入した場合と比較して、約300倍高いレベルであった。hSTは、ヒトの疾病治療に用いられる成長ホルモンであり、活性型としてはジスルフィド結合によって架橋された構造が必要である。葉緑体で蓄積したhSTも正しい位置で架橋されており、活性型のhSTであった。導入遺伝子産物が正しく架橋されたことは、今後、同じくジスルフィド結合の形成が必要な抗体生産などに応用が期待できる。

葉緑体での工業原料生産 異種タンパク質やペプチドを蓄積させるに加えて、シロイヌナズナの葉緑体で工業原料である生分解性プラスチック(ホモポリマー: PHB)を生産する試みも行われた。¹⁵⁾ PHBは、アセチルCoAを初発物質として、3段階の酵素反応を経て合成される。この葉緑体での生産は、葉緑体形質転換技術を用いたものではなく、核ゲノムへ反応に関与する3遺伝子をそれぞれ導入し、細胞質から葉緑体へ酵素を移行させる手法で行われた。得られた組換え植物体を解析したところ、乾燥重量の14%にも達するPHBが蓄積していた。これまでに細胞質でもPHBの生産が試みられていたが、葉緑体を用いた場合には、細胞質と比較して100倍以上の生産性があった。これは初発物質であるアセチルCoAの存在量が葉緑体に多いことが主な要因であるようである。商業的な観点からするとホモポリマーであるPHBよりも、その物性に勝るコポリマーのPHVBの方が高価である。このPHVBの生産も葉緑体で試みられた。¹⁶⁾ PHVB合成には、初発物質としてアセチルCoAに加えてプロピニルCoAが必要である。しかしながら、葉緑体にはプロピニルCoA量が少ないため、既存のアミノ酸合成経路から代謝経路を分岐させ、プロピニルCoAの供給が行われた。¹⁶⁾ 残念ながら、得られた組換え植物体において、大量のPHVBを生産させるには至らなかったが、これは新たな代謝経路の創設と既存の代謝経路の分岐という次世代の葉緑体工学の先駆的な研究と言える。

次世代の葉緑体工学につながる技術

葉緑体は、色素体と総称される葉緑体と起源を同一にする一群の細胞内小器官が、光合成組織で示す一つの形

態に過ぎない。各器官において、その機能に応じてさまざまな形態に変換する。たとえば、種子・塊根などの貯蔵組織では、デンプンを蓄積するアミロプラストへ、果実や花卉などでは、多量のカロチノイドを含む有色体へ分化している。また、色素体はすべての形態でそのゲノム構造は等しい。Rufらは、トマトの葉緑体(色素体)で、*aadA* 遺伝子を発現させているが、トマト果実の有色体でも高発現していた。¹⁰⁾ これは葉緑体形質転換技術を用いて、果実で異種タンパク質を蓄積させた初めての例である。今後、葉の葉緑体だけでなく、果実の有色体や塊根のアミロプラストで経口投与を目的としたワクチンなどの有用物質の生産が期待される。

抗生物質耐性遺伝子などの選択マーカーは、遺伝子導入個体を選抜した後は無用のものであり、また、葉緑体形質転換において選択マーカーが限られている現状では、使用した選択マーカーの排除と再利用は重要な課題である。葉緑体の相同組換え能を利用し、自然にマーカー遺伝子が脱落することを期待する方法¹⁷⁾ やCre-loxを用いた選択マーカーの除去システムが報告されている。¹⁸⁾ また、最近、ハウレンソウ由来の*BADH* 遺伝子を選択マーカーとして用いることも報告された。¹⁹⁾ これは、培地中に加えた毒性を持つベタインアルデヒドを*BADH* が無毒なグリシンベタインに変換することを利用している。この選抜法は、遺伝子の由来が農作物であることと、結果的に葉緑体へ蓄積するグリシンベタインが適合溶質として機能することから、農作物などへの利用が期待できる。

葉緑体(色素体)で工業原料などの生産を試みる場合には、葉緑体(色素体)においてもプロモーターや5'UTRの選択は、転写・転写後レベルで導入遺伝子発現を高めるための重要なアプローチである。^{20,21)} また、反応基質や補欠分子の供給・pHや微量金属イオンなどの葉緑体内環境・内在代謝系の阻害や毒性といった副時反応などについても十分考慮する必要がある。

葉緑体でポリシストロンからの翻訳が可能になったことから、今後、微生物由来のオペロンや複数遺伝子をポリシストロン化した遺伝子を葉緑体ゲノムへ直接導入し、葉緑体へ新たな代謝経路を創設することで、葉緑体の豊富な還元力を用いて工業原料・工業材料や医薬品などを生産させることが期待できる。

文 献

- 1) Bendich, A. J.: *BioEssays*, 6, 279 (1987).

- 2) Srere, P. A.: *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 89 (1987).
- 3) Boynton, J. E. *et al.*: *Science*, **240**, 1534 (1988).
- 4) Svab, Z. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8526 (1990).
- 5) Bogorad, L.: *Trends Biotechnol.*, **18**, 257 (2000).
- 6) Heifetz, P. B. *et al.*: *Curr. Opin. Plant Biology*, **4**, 157 (2001).
- 7) Sikdar, S. R. *et al.*: *Plant Cell Rep.*, **18**, 20 (1998).
- 8) Sidorov, V. A. *et al.*: *Plant J.*, **19**, 209 (1999).
- 9) Khan, M. S. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **17**, 910 (1999).
- 10) Ruf, S. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 870 (2001).
- 11) Daniell, H. *et al.*: *Trends Plant Sci.*, **7**, 84 (2002).
- 12) Kota, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1840 (1999).
- 13) de Cosa, B. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 71 (2001).
- 14) Staub, J. M. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **18**, 333 (2000).
- 15) Nawrath, C. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12760 (1994).
- 16) Slater, S. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **17**, 333 (1999).
- 17) Fischer, N. *et al.*: *Mol. Gen. Genet.*, **251**, 373 (1996).
- 18) Hajdukiewicz, P. T. J. *et al.*: *Plant J.*, **27**, 161 (2001).
- 19) Daniell, H. *et al.*: *Curr. Genet.*, **39**, 109 (2001).
- 20) Ye, G.-N. *et al.*: *Plant J.*, **25**, 261 (2001).
- 21) Kuroda, H. *et al.*: *Plant Physiol.*, **125**, 430 (2001).

組換え光合成微生物による物質生産

浅田 泰男

光合成能を有する微生物のうち、緑藻類のクラミドモナスやクロレラ、藍藻類や光合成細菌では遺伝子操作系が開発されている。本稿では他稿との重複を避け、藍藻と光合成細菌の原核生物のみを対象として遺伝子組換え技術を用いた物質生産の例をいくつか紹介する。

遺伝子操作系

藍藻（らんそう、シアノバクテリア）は、藍色細菌ともよばれ、グラム陰性細菌の特徴を持ちつつ高等植物型光合成をおこなう。よって、本グループを宿主とする遺伝子操作系は水を電子供与体とし光エネルギーと炭酸ガスからの物質生産に応用可能である。光合成細菌は電子供与体を必要とするが、逆に有機廃棄物を用いればその処理を兼ねる利点がある。

藍藻や光合成細菌の遺伝子操作系において、他の生物群と比して特記するほどの大きな特徴は少ない。プラスミドベクターおよび広域宿主プラスミドなどを用いた接合伝達のシステムが開発されている。^{1,2)} プラスミドベクターは、藍藻や光合成細菌由来のものに大腸菌由来の薬剤耐性などのマーカーを導入したものが基本であり、ほとんどすべてが大腸菌とのシャトルベクターとされている。藍藻への遺伝子の導入法として、無処理の生細胞をプラスミドとインキュベートするだけでよいという自然形質転換法は特徴のある現象といえる。すべての藍藻がこの性質を有しているわけではないが、*Synechococcus* PCC7942 や PCC7002 (*Agmenellum quadruplicatum* PR-6) では適用できる。^{1,3)} 菌株によってエレクトロポレーションが用いられる場合もある。

また、最近ではゲノム配列解読が急速に進行してお

り、³⁾ 藍藻では *Synechocystis* PCC6803 をはじめ 7 株、光合成細菌では *Rhodospseudomonas palustris* の解読が終了している。これらの情報は代謝転換株や変異株の創製などへの利用が始められている。

物質生産への応用

光合成微生物を宿主とする遺伝子操作系を用いた初期の研究例としては、*Bacillus* の殺虫タンパク質⁴⁾ やヒト由来のスーパーオキシドディスムターゼ⁵⁾ などがある。前者は藍藻の浮遊性を利用してボウフラなどの害虫の幼生を除去しようというおもしろい着想である。

水素 水素は再生可能で、炭酸ガスを発生しないクリーンなエネルギーキャリアーとして注目されている。藍藻や光合成細菌は光合成に依存した水素生産能を持つ。^{6,7)} 水素生産に関与する酵素は、ヒドロゲナーゼとニトロゲナーゼの 2 種類である。前者は分子状水素の生成と取り込みに、後者は本来窒素ガスを還元して関与する酵素であるが、副反応として水素の生成にも関与する。ニトロゲナーゼの水素生成反応は窒素ガス 100% 雰囲気中でも起こり、1 分子の生成につき最低 4 分子の ATP を消費するので、反応は生成側に偏っている。窒素固定能を有する藍藻や光合成細菌は水素生産に利用できるが、これらの多くがニトロゲナーゼによって生成する水素を回収する活性（取り込みヒドロゲナーゼ）を併せ持つことが多く、閉鎖系において水素が蓄積しないこともある。以上のことから、水素生産能を遺伝子工学的に増強するには 2 つの方向がある。すなわち、水素生産能を有する可逆性ヒドロゲナーゼを導入ないし増強してこれによって水素を生産する方向と、ニトロゲナーゼによって水素