

植物への有用遺伝子導入（安定高発現を目指して）

山崎将太郎・加藤 晃*

高等植物への各種の外来遺伝子導入技術が開発され、有用遺伝子組換え植物や培養細胞を作出する試みが盛んに行われるようになってきた。それら分子育種の最終ゴールは、植物自身の機能改良（耐病性、各種ストレス耐性、多収性の付与など）、植物機能を利用した環境浄化、植物機能を利用した有用物質生産（生分解性プラスチック、植物性油脂、医療用タンパク質など）と大きく三つに分けることができる。しかし、独立した組換え植物個体間で導入遺伝子発現量に大きな差が認められ、若い組織では目的タンパク質が高蓄積していても分化が進むと蓄積量が減少したり、次世代で劇的に減少したりする。これはサイレンシングと呼ばれる現象で、このため、多くの組換え植物体をスクリーニングする必要があり、加えて、次世代での発現量を調べるために数多くの組換え植物体を維持しなければならず、有用遺伝子組換え植物を実用化する上で大きな障害の一つとなっている。

効率的に良い形質を保持する組換え植物体を取得するためには、これらの現象が起きる分子メカニズムを詳細に理解し、解決していく必要がある。本稿では、外来遺伝子導入技術の中でもアグロバクテリウム法とそこで用いられているバイナリーベクターについて概説し、問題となっているサイレンシングの要因と導入遺伝子を安定に高発現できる「植物発現ベクター」について紹介する。

外来遺伝子導入技術

これまでに植物へ外来遺伝子を導入する種々の方法が開発されているが、直接法とアグロバクテリウムを用いる方法に大別できる。直接法は外来遺伝子を含むDNAを直接植物細胞に導入し、染色体に組込む方法である。植物の細胞壁を取り除いたプロトプラストの貪食作用を利用する方法（polyethyleneglycol: PEG法）や電氣的に膜を反転させ取り込ませる方法（エレクトロポレーション法）、金粒子などととも物理的に打ち込む方法（パーティクルガン法）などがある。この中でプロトプラストを用いる方法は、操作が煩雑で組換え植物体を取得するまでに時間がかかることから、最近はあまり用いられていない。一方、パーティクルガン法で作出した組換え植物体は、後述のアグロバクテリウム法とは異なり、多く

の植物への感染能力を有する組換えバクテリアを用いないことから、特にアメリカにおいて認可審査が非常に簡便である。しかし、アグロバクテリウム法と比較して染色体へ導入した外来遺伝子の挿入パターンがより複雑となるという問題がある。

アグロバクテリウム法およびバイナリーベクター

グラム陰性の土壌細菌であるアグロバクテリウムは植物に感染し増殖する。この感染増殖機構では、まず、アグロバクテリウムが保持するTiプラスミド（図1A）内のT-DNA（transferred-DNA）領域が、同じTiプラスミド内のDNA転移に関わる遺伝子群とアグロバクテリウムや植物染色体に存在する他の遺伝子群の働きによって植物染色体に組込まれる。T-DNAが組み込まれた植物細胞は植物ホルモンを産出するようになり、結果としてクラウンゴール（街路樹などで見かける瘤）とよばれる腫瘍が形成され、アグロバクテリウムはそこで生産される特殊なアミノ酸誘導体を窒素源または炭素源として増殖する。アグロバクテリウム法は、このアグロバクテリウムが持つ自身のDNAを植物細胞へ組込む能力を利用しており、T-DNA領域の左右境界領域（left border: LBとright border: RB）に挟まれた部分を目的遺伝子に置き換えることで植物への外来遺伝子導入が可能となる。当初このTiプラスミドがそのまま遺伝子導入に用いられたが、Tiプラスミド内のDNA転移に関わる遺伝

A. Tiプラスミド



B. 一般的なバイナリーベクター (pBI121)

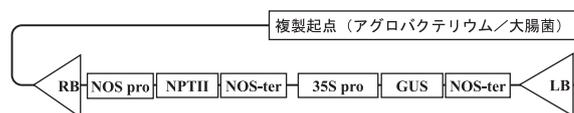


図1. Tiプラスミドとバイナリーベクター。A) Tiプラスミドの構造。B) 一般的なバイナリーベクターの構造。

* 著者紹介 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科（助教） E-mail: kou@bs.naist.jp

子群を別のプラスミドに保持させてもT-DNAが植物染色体に挿入されることが見いだされたことから、遺伝子操作の簡便さを考慮して、大腸菌内でもプラスミドが複製できる複製起点を付加したバイナリーベクターシステムが開発された¹⁾。その後、植物でのレポーターアッセイが容易な β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を搭載したGUS gene fusion system (pBI101, pBI121 など)²⁾が市販され(図1B)、国内外で広く用いられている。その後ベクターサイズの小型化や多種の選択マーカー遺伝子の開発などの改良が行われ、現在までに多くの種類のバイナリーベクターが開発されている。

一般的なアグロバクテリウム法では、まず、大腸菌を用いた遺伝子操作によりT-DNA領域内に目的遺伝子を組込んだバイナリーベクターを構築し、そのベクターをアグロバクテリウムに導入する。バイナリーベクターを保持する組換えアグロバクテリウムを液体培養し、その培養菌体を植物切片に接触させることで感染を成立させる。その後、目的遺伝子および抗生物質耐性などの選択マーカーを含むT-DNA領域が染色体に挿入された植物細胞を、カルスの状態で抗生物質耐性などを指標に選抜し、再分化した組換え植物体を作成する。この導入法はアグロバクテリウムの感染能力に依存することから、当初は通常感染する双子葉植物にのみ適応できる方法とされていたが、アセトシリゴンなどのフェノール性物質の添加により、現在では単子葉植物を含む広い宿主で用いられている。また、より強い感染性を持つ菌株も開発利用されている。

このように、植物への外来遺伝子導入法は技術的には確立しており、植物個体の効率の良い再分化技術があれば、比較的容易に遺伝子組換え植物を作成することができる。

想定されるサイレンシングの要因

しかし、植物へ導入した遺伝子の発現量には、同じく真核生物である酵母、ショウジョウバエ、マウスなどと同様にしばしば個体間で大きな差異が観察される。

真核生物の染色体構造は、ヘテロクロマチン領域とユークロマチン領域に大別される。転写が活発に行われているユークロマチン領域に対してヘテロクロマチン領域は、転写因子などがアクセスしにくい不活性領域であるため、染色体に挿入された導入遺伝子の発現が周辺の染色体構造によって正および負に影響されると考えられている(位置効果)³⁾。植物においてもゲノムへの挿入位置が異なることで、同じ遺伝子であっても発現量に10倍程度差があるという報告がある⁴⁾。また、アグロバク

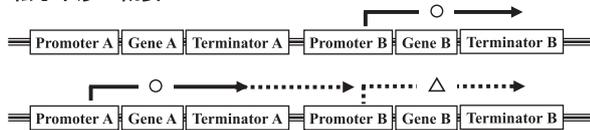
テリウム法やパーティクルガン法では導入される遺伝子コピー数を人為的に制御できず、多くの場合、一つもしくは複数の座に(場合によっては反復や欠失を伴った構造で)挿入されてしまう。このような組換え植物体では、しばしば相同領域依存的なサイレンシング(homology-dependent gene silencing: HDGS)が観察される⁵⁾。たとえば、タバコの*chitinase* 遺伝子では60%以上の相同性があれば導入遺伝子および内在遺伝子がサイレンシングされる⁶⁾。また、すでにカナマイシン耐性のネオマイシンリン酸転移酵素(*NPTII*) 遺伝子がサイレンシングしているタバコ組換え体へ、一過的に*GUS* 遺伝子(ターミネーター領域の239塩基対が*NPTII*のものと同じ)を導入した場合でも*GUS* 遺伝子の発現は抑制される⁷⁾。しかし、いわゆるHDGSは相同性の高い内在遺伝子間では観察されず、相同領域の存在はサイレンシングのターゲットであってトリガーではないと考えられている。

このようにサイレンシングには、位置効果やHDGSなど複数の要因が想定されるが、いったい何が主要因なのであろうか。筆者らは、シロイヌナズナへpBI121(NOS-P:*NPTII*:NOS-T/35S-P:*GUS*:NOS-T)(図1B)を導入し、独立して得られた57個体の組換え植物体について*GUS* 遺伝子の発現量を調べた。すると、確かに個体間で大きな差異が認められた。その後、注意深く遺伝子導入個体を解析した結果、多コピーや反復・欠失構造を持つ個体では概ね低い発現であるが、完全なシングルコピー導入個体では染色体への挿入部位に関わらずほぼ同程度の発現を示し、後代でも安定に発現することを見いだした⁸⁾。同様の結果は、Schubertらによっても報告されている⁹⁾。また、シロイヌナズナでは顕微鏡下で目に見えるヘテロクロマチン構造は認められず¹⁰⁾、ほぼすべての領域から同様に転写されている¹¹⁾。そもそも植物では、位置効果と導入遺伝子サイレンシングの関係について系統立てて調べられた事例はなく、これらのことは、位置効果が導入遺伝子サイレンシングの主要因ではないことを意味しているのではないだろうか。

完全なシングルコピー導入個体でも人為的にコピー数を増加させると後代でサイレンシングする

一方で、上述の57個体から選抜した当代ではサイレンシングの兆候が認められないシングルコピー導入個体を掛け合わせ、コピー数を人為的に増加させると、5コピーまではコピー数に正相関した発現が認められるが、6コピー以上で導入遺伝子が発現しなくなった。このサイレンシングは生育過程で見られ(幼植物体ではコピー数に依存したmRNAの蓄積が認められる)、異なるすべ

A. 転写干渉の概要



B. 一般的な植物の発現ベクターの構造 (pBI121)

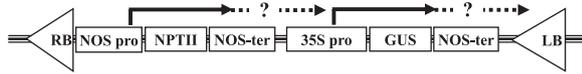


図2. 転写干渉. A) 転写干渉の概念図, B) 一般的な発現ベクターの構造.

での遺伝子座にある導入遺伝子がサイレンシングされることから、何らかの分子、おそらく通常では存在しないRNA（アベラントRNA）の量が閾値を超えサイレンシングを引き起こした可能性が考えられる。発現ベクターの構造は我々のものとは異なるが、4コピー以上で導入遺伝子が発現しなくなるという報告もある⁹⁾。

アベラントRNAの由来

一般的に、独立した転写単位の発現が下流の転写単位の発現に影響する「転写干渉」が知られている（図2A）。「転写干渉」は上流からリードスルーしたRNAポリメラーゼが下流の転写単位への新たなRNAポリメラーゼの接近を阻害することで引き起こされ、下流の転写単位からの発現量の低下をもたらす¹²⁾。この時、上流遺伝子のターミネーターを欠失させるとその影響は増大する。すなわち、上流遺伝子のターミネーターで適切に転写が終結しないことが「転写干渉」の要因となっている。

植物で広く用いられる発現ベクターも、選択遺伝子発現カセットの下流に導入遺伝子発現カセットが位置しており、「転写干渉」が起こりうる構造となっている（図2B）。また、一つの座に複数の遺伝子が挿入された場合も「転写干渉」が起こりうる構造と言える。実際、植物へ導入した遺伝子でも「転写干渉」の報告があり¹³⁾、筆者らも追試を行い確認している。この場合、上流遺伝子のターミネーターとしてノパリン合成酵素遺伝子NOSのものを使用したが、上流遺伝子が転写されると下流遺伝子からの転写が大きく阻害された。このように、アグロバクテリウム由来のNOSターミネーターは広く一般に用いられているが、「転写干渉」を起こしてしまう粗悪なターミネーターと言える。この不適切なターミネーターの利用は、植物へ導入した遺伝子の発現に「転写干渉」を含め以下の三つの大きな悪影響を及ぼしてしまう。

下流遺伝子の発現抑制 上述の「転写干渉」によっ

て下流遺伝子プロモーターからの新規転写が阻害され、結果として下流遺伝子の発現量が低下する。

下流遺伝子のプロモーター領域を転写 上流からリードスルーしたRNAポリメラーゼにより、下流遺伝子プロモーター領域が転写される。この転写されたプロモーターRNAとプロモーターDNAとの相互作用により、メチル化を含むプロモーターの不活化が引き起こされる危険性がある。これはいわゆるHGDSで、相同なプロモーター配列を持つすべての遺伝子に作用する。

自身遺伝子の発現量低下 転写の終結（RNAポリメラーゼのDNAからの解離）と転写されたpre-mRNAのプロセッシング（pre-mRNAの切断とポリA鎖の付加）は協調して行われている¹⁴⁾。植物では不明な点も多く残っているが、ほ乳動物ではプロセッシングに関わる複合体が、pre-mRNA上に存在する2か所のシス配列（切断されポリA鎖が付加される部位の20～30塩基上流にあるAAUAAAエレメントと切断部位のすぐ下流にあるGU-rich配列）を認識し、pre-mRNAを切断してポリA鎖を付加する。また、RNAポリメラーゼはそのCTD（C-terminal domain）を介してプロセッシングに関わる複合体と相互作用しており、pre-mRNAの切断にともなってDNAから解離する。この時、切断されなかったpre-mRNAは核内で速やかに分解される。また、AAUAAAエレメントなどに変異を導入すると自身のプロモーター活性には影響しないが蓄積mRNA量は減少し、下流領域への転写が続行する¹⁵⁾。このことから適切なシス配列を持たない粗悪なターミネーターでは、プロモーターから転写されたpre-mRNAを翻訳可能なmRNAへ効率的に変換できず、プロモーター能力を遺伝子発現量に十分反映できないことになる。

上述の同じT-DNAが異なる遺伝子座に6コピー以上挿入された個体で導入遺伝子が発現しなくなる現象は、NOSターミネーターの欠陥によりリードスルーで転写された35Sプロモーターを含むアベラントRNAの量が閾値を超え、すべての遺伝子座でサイレンシング（HGDS）を引き起こしたものと思われる。また、そもそも多コピーや反復・欠失構造挿入個体では、このようなサイレンシングが増長されていると考えられる。加えて、単純に発現カセットを連結することによる導入遺伝子の多重化の試みも危険である。NOSターミネーターを用いる現在の導入遺伝子発現系ではサイレンシングが起きやすく、かつプロモーターの能力を十分遺伝子発現に生かしていないと言える。

植物で機能する効率的なターミネーター

「転写干渉」とアベラントRNAの生成を防ぎ、また、自身遺伝子の発現量を保障するためには、上流からの転写を正確に遮断すること、言い換えると、それぞれの転写単位を確実に転写終結させることが重要である。植物で導入遺伝子発現に用いられるターミネーターは、NOS, OCS, 35Sなど植物以外に由来するものが多いが、前述したように、植物が持つプロセッシングに関わる複合体が効率よくターミネーター内のシス配列を認識することが転写終結には重要である。たとえば、NOSターミネーター内の配列を調べてみてもほ乳動物で保存されているAAUAAAエレメントを含む明確なシス配列は存在せず、ポリA鎖付加部位（pre-mRNA切断部位）はかなり分散している（収束率20~30%）。そこで筆者らは、NOSに代わる新たなターミネーターをシロイヌナズナから探索し、熱ショックタンパク質18.2 (*HSP18.2*) 遺伝子由来のターミネーターが非常に効率的であることを見いだした¹⁶⁾。このHSPターミネーターを用いた場合は導入遺伝子の発現がNOSと比較して2倍以上増大し（この時蓄積mRNAが2倍以上増加）、単子葉のイネでも効果的であった。加えて、別のプロモーターや遺伝子を用いた場合でも同様に機能する。また、HSPターミネーター内にはほ乳動物と同様の明確なシス配列が存在しており、ポリA鎖付加部位もほぼ収束している（収束率90%）。このHSPターミネーターについて「転写干渉」に関する実験を行ったところ、下流遺伝子の発現に影響は認められなかった（同じ実験をNOSターミネーターで行うと、下流遺伝子の発現量は約半分となる）（図3）。これらのことから、HSPターミネーターは「転写干渉」を低減し、自身遺伝子の発現量を保障する効率的なものとして期待できる。最近筆者らは、このHSPターミネーターをさらに改良したものについても報告している¹⁷⁾。

シングルコピーから高発現が期待できる発現系

植物へ導入した遺伝子をより高発現させるためには、サイレンシングを回避しmRNAを安定に蓄積させることに加えて、シングルコピー導入個体で高発現が期待できる発現系が必要である。アプローチとしては、遺伝情報の変換プロセスの一つである翻訳過程の改善があげられる。植物の翻訳開始機構は、同じ真核生物である動物や酵母と同様にmRNAの5'末端に存在するキャップ構造を介したスキャンニングモデルであり、タンパク質合成の速さ（翻訳効率）は5'非翻訳領域（5'UTR）が仲介する「開始反応」で決まると考えられている。

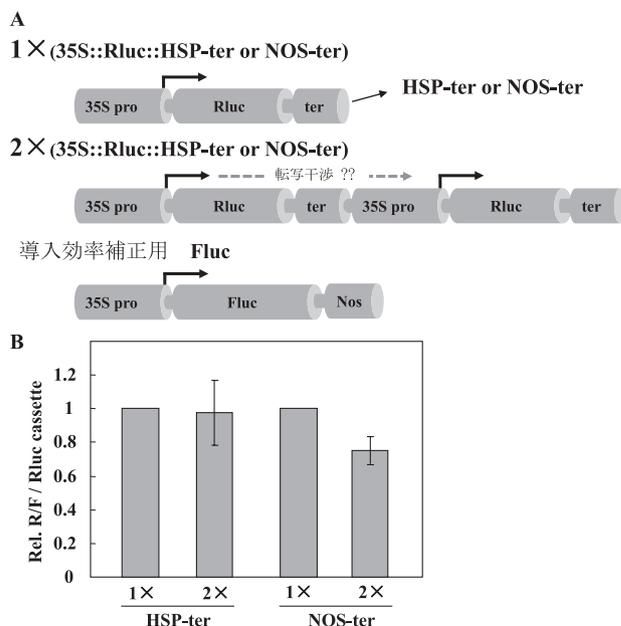


図3. ターミネーターの違いが下流遺伝子の発現量に及ぼす影響。A) 一過性発現実験に用いた構築図。B) 一つの発現カセットあたりのRluc発現量。Nos-terの場合、上流の発現カセットからの発現量が同じとすると、下流からの発現量は半分となる。

これまでに筆者らは、タバコから単離したアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5'UTR (*NtADH-5'UTR*) が翻訳エンハンサーとして機能することを明らかにしている¹⁸⁾。プロトプラストを用いた一過性発現実験による解析から、*NtADH-5'UTR*はレポーター遺伝子の発現を翻訳レベルで100倍程度高め、シロイヌナズナの完全なシングルコピー導入個体において、既存の発現ベクターに対して非常に高い発現を示した（図4）。また、シロイヌナズナ*ADH*遺伝子の5'UTR (*AtADH-5'UTR*) についても翻訳エンハンサー活性を評価したところ、*NtADH-5'UTR*と同等の効果が認められた¹⁹⁾。

開始コドン近傍配列も翻訳効率に影響することが知られている。筆者らは、その中で開始コドン上流3塩基について、シロイヌナズナとイネですべての組合せで（64通り）翻訳効率への影響を調べた結果²⁰⁾、シロイヌナズナではAAGがもっとも効率が良く、もっとも悪いUGCと比較して4倍高い翻訳効率を示した。また、イネではAGCがUAUやUGCと比較して6倍高いものであった。これは、発現ベクターを構築する際に、開始コドン近傍の配列を少し意識するだけで目的タンパク質の発現を数倍高めることができることを意味している。また、翻訳エンハンサーの開始コドン側の3塩基を最適な配列に置換するとその翻訳効率はさらに上昇する²¹⁾。

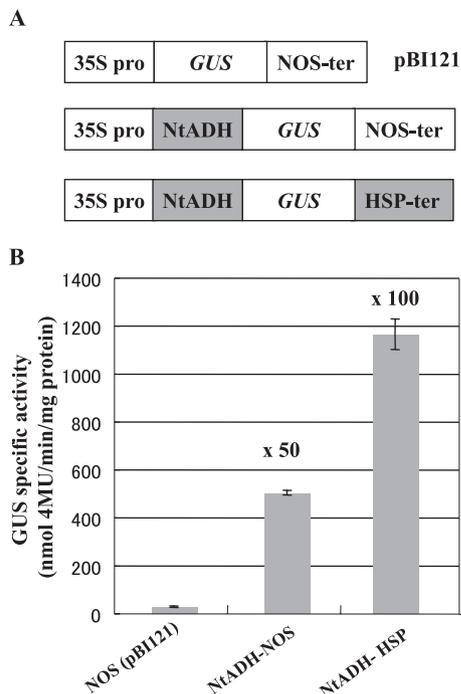


図4. 完全なシングルコピー導入個体での導入遺伝子発現量の比較. A) バイナリーベクターの構築図. B) それぞれの個体におけるGUS比活性.

環境ストレスの影響を回避できる発現系

植物の生育環境にはさまざまな環境ストレス要因(熱, 浸透圧, 乾燥, 塩など)が存在しており, そういった環境ストレスに曝された細胞内では, 大部分のmRNAからの翻訳過程が抑制されることが知られている²²⁾. 現状では, 植物に導入した有用遺伝子もこれら環境ストレスに曝された場合に翻訳過程で発現が抑制されてしまう. しかし, 大部分のmRNAが翻訳抑制を受け一方で, 細胞内の一部mRNAからの翻訳は維持されており, 環境ストレス下でも効率的に翻訳が行なわれている²²⁾. この中には*AtADH* mRNAも含まれている²³⁾. 筆者らは, これまでに環境ストレス下における翻訳状態を規定する要因がmRNAの5'非翻訳領域(5'UTR)であることを明らかにしており²⁴⁾, 翻訳エンハンサーである*AtADH*-5'UTRを導入遺伝子の発現に活用することで, 環境ストレス下においても導入遺伝子が抑制されることなく効率的に翻訳できる発現系を確立している^{25,26)}. 今後, この発現系は我々が制御できない野外の環境ストレス下でも, 導入した有用遺伝子を効率的に発現させるための重要な基盤技術になると期待される.

おわりに

サイレンシングは有用遺伝子組換え植物を実用化する上で大きな障害の一つである. 本稿で紹介したHSPターミネーターを活用することでサイレンシングが起きる可能性を小さくできることが期待できる. また, タカラバイオ社からは選択遺伝子発現カセットが導入遺伝子発現カセットの下流に位置するバイナリーベクターも市販されており, このベクター系には筆者らが取得したHSPターミネーターや翻訳エンハンサーが挿入されたバージョンも存在する. しかし, 良い形質を保持する組換え植物体を取得するためには, やはり作出した組換え植物個体からコピー数を指標に完全なシングルコピー遺伝子導入個体を選別することが肝要である(次世代の分離比が3対1となる個体であっても, 一つの座に複数の遺伝子が挿入された個体では低い発現を示す). 加えて, 35Sプロモーターに代表される高発現プロモーターが植物種によっては機能しない問題もあり, 今後, さらに植物発現ベクターを改良していく必要があると考えられる.

文 献

- 1) Bevan, M.: *Nucleic Acids Res.*, **13**, 8711 (1984).
- 2) Jefferson, R. A.: *Plant Mol. Biol. Rep.*, **5**, 387 (1987).
- 3) Wallrath, L. L.: *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**, 147 (1998).
- 4) Day, C. D. et al.: *Genes Dev.*, **14**, 2869 (2000).
- 5) Kooter, J. M. et al.: *Trends Plant Sci.*, **4**, 340 (1999).
- 6) Kuntz, C. et al.: *Plant J.*, **10**, 437 (1996).
- 7) Houdt, H. V. et al.: *Mol. Genet. Genomics*, **263**, 995 (2000).
- 8) Nagaya, S. et al.: *Plant Cell Physiol.*, **46**, 438 (2005).
- 9) Schubert, D. et al.: *Plant Cell*, **16**, 2561 (2004).
- 10) Fransz, P. F. et al.: *Cell*, **100**, 367 (2000).
- 11) Yamada, K. et al.: *Science*, **302**, 842 (2003).
- 12) Martens, J. A. et al.: *Nature*, **429**, 571 (2004).
- 13) Thompson, A. J. et al.: *Plant Mol. Biol.*, **34**, 687 (1997).
- 14) Proudfoot, N.: *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 272 (2004).
- 15) Greger, I. H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8415 (2000).
- 16) Nagaya, S. et al.: *Plant Cell Physiol.*, **51**, 328 (2010).
- 17) Matsui, T. et al.: *Plant Biotech.*, **31**, 191 (2014).
- 18) Satoh, J. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 1 (2004).
- 19) Sugio, T. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 300 (2008).
- 20) Sugio, T. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 170 (2010).
- 21) Matsui, T. et al.: *Plant Biotech.*, **29**, 319 (2012).
- 22) Bailey-Serres, J.: *Trends Plant Sci.*, **109**, 170 (2010).
- 23) Matsuura, H. et al.: *Plant Cell Physiol.*, **51**, 448 (2010).
- 24) Matsuura, H. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 39 (2008).
- 25) Matsuura, H. et al.: *Plant Cell Physiol.*, **54**, 474 (2013).
- 26) Ueda, K. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 434 (2014).