

プロジェクト 2

平成12年～平成16年 文部科学省私立大学学術研究高度化推進事業
バイオベンチャー研究開発拠点整備事業研究成果報告書

高等植物のオルガネラゲノム工学

平成17年4月 京都産業大学



バイオ・ベンチャー プロジェクト2

「高等植物のオルガネラゲノム工学」

平成12年度～平成16年度私立大学学術研究高度化推進事業

「バイオ・ベンチャー研究開発拠点整備事業」研究成果報告書

平成17年4月

学校法人 京都産業大学

京 都 産 業 大 学

工学研究科（生物系）

寺地 徹（京都産業大学工学部教授）

【 目 次 】

◇ 研究成果報告書の発刊にあたって	1
◇ 研究組織	2
◇ 研究成果概要	
研究成果要約	3
研究活動状況	23
◇ 学術論文・著書・総説など	33
◇ 外部評価	339

研究成果報告書の発刊にあたって

京都産業大学工学部生物工学科教授
寺地 徹（プロジェクト2 代表）

京都産業大学工学部生物工学科の教員を母体とした研究プロジェクト、「高等植物のオルガネラゲノム工学」が、文部科学省の私立大学学術研究高度化推進事業のひとつである「バイオ・ベンチャー開発拠点整備事業」（バイオ・ベンチャープロジェクト）に選定されてから早5年が経過しました。この研究プロジェクトは、高等植物の細胞が持つオルガネラゲノム、すなわち葉緑体とミトコンドリアのDNAに存在する遺伝情報を改良し、人類の役にたつ植物を育成しようという、高邁な目標を掲げたものでした。また、特に「葉緑体の形質転換技術」を積極的に利用し、様々な遺伝子組換え植物を創出しようとするきわめてユニークな試みでもありました。この葉緑体の形質転換技術は、プロジェクトの立案当時、日本ではまだほとんど広まっていなかったものでしたが、この方法で作出される遺伝子組換え植物は、導入遺伝子のコピー数が通常の遺伝子組換え植物と比べて圧倒的に多い、導入遺伝子が花粉からは子孫に伝達しないなどの特性を持ち、前者は導入遺伝子産物の大量発現、後者は環境への遺伝子拡散の防止という大きなメリットをもたらすことが期待されます。

実際に研究にとりかかると、葉緑体の形質転換は、机上で考えるほど易しい実験ではありませんでした。しかし幸い、タバコでは、このプロジェクトの期間内に、葉緑体の遺伝子組換え植物をコンスタントに作成し得る実験系を確立することができました。その成果は、ラットの糖鎖合成酵素、ヒルの血液凝固阻害因子、ダイズの鉄結合タンパク質、シロイヌナズナの脂肪酸不飽和化酵素の各遺伝子を、それぞれ葉緑体に持つタバコの系統として具体的に現れています。現時点では、これら世界に2つとないユニークな植物が、期待通りのパフォーマンス（例えばタンパク質の大量発現や発現タンパク質による植物自身の機能向上）を示すか否か、詳細には検討できていませんが、少なくとも方法論的には、高等植物の葉緑体ゲノムを工学的に改変可能であることを示すことができました。

京都産業大学でこのような実験系の大型プロジェクトを実施するのは、事実上初めてのことであり、学内における研究支援体制の整備、閉鎖系温室の建設、その他実験設備の整備拡充などなすべきことが多岐に及びました。課題をひとつひとつクリアして、ゼロの状態から現状までできたことは、評価に値すると自負しています。また、このプロジェクトを契機に、植物オルガネラゲノムを軸とする周辺課題の研究や、導入遺伝子自体のより精密な研究も活性化し、本報告書の後半にまとめた業績へとつながったことも意義深いことです。

最後になりましたが、プロジェクト遂行に尽力された関係各位に、研究メンバーを代表して感謝を申し上げます。

研究組織

京都産業大学・工学部・教授 (プロジェクト2 代表)	寺地 徹
京都産業大学・工学部・教授	山岸 博
京都産業大学・工学部・教授	黒坂 光

学外共同研究者

京都府立大学・人間環境学部・教授	椎名 隆
(財)岩手生物工学センター・主任研究員	寺内 良平
(株)植物工学研究所・研究員	酒井 隆子
(現 協和種苗(株)・長南農場実験室長)	
(株)植物工学研究所・研究員	藤本 英也
(現 三菱化学ビーシーエル・研究開発部・遺伝子研究グループ)	

ポストドクター(PD)

京都産業大学・工学部 ('01-'04)	郭 長虹
(現 ハルビン師範大学・生物学部・遺伝学研究室・教師)	
京都産業大学・工学部 ('01-'02)	大迫 敬義
(現 京都府立大学大学院・農学研究科・農業生態学研究室・講師)	
京都産業大学・工学部 ('01-'03)	小堂 直彦

リサーチアシスタント(RA)

京都産業大学・工学研究科・博士課程 ('01)	清水 昭男
(現 Children's Hospital Boston, PD)	
京都産業大学・工学研究科・博士課程 ('01-'03)	天野 麻理
(現 Dept. Cellular and Molecular Medicine, UC San Diego, PD)	
京都産業大学・工学研究科・博士課程 ('01-'04)	今井 雄大
(現 京都大学・農学研究科・栽培植物起原学分野・PD)	
京都産業大学・工学研究科・博士課程 ('02-'04)	中村 直介
(現 京都産業大学・工学部・PD)	
京都産業大学・工学研究科・博士課程 ('03-'04)	佐伯 明樹

【プロジェクト2】「高等植物のオルガネラゲノム工学」 外部評価（1）

総評

本プロジェクトは「オルガネラゲノム工学」のテーマで、葉緑体とミトコンドリアのゲノム情報を基に、物質生産への工学的利用を目標とした基盤的研究である。

葉緑体形質転換技術は、(1)花粉を介した組み換え遺伝子の拡散をほぼ完全に予防できること、(2)従来の形質転換法に比較し10倍から100倍に達する高レベル蛋白質発現が容易であることから、植物の新しい遺伝子組み換え技術として注目されている。特に期待されているのは、ワクチンなどの高付加価値医療用蛋白質生産へのアプリケーションである。しかし、形質転換効率が低いなどの技術的問題から、特に我が国においては、その革新的な可能性に正面から取り組む研究は殆ど行われてこなかった。従って、葉緑体を使った医療用蛋白質生産の研究に集中的に取り組んだ本研究は、非常に意欲的なプロジェクトである。本研究ではその成果として、(1)技術的に非常に困難な葉緑体形質転換技術の確立と、(2)ヒルジンを初めとする医療用蛋白質を高生産する葉緑体形質転換植物の開発、に成功している。これは、評価委員の知る限り、国内で葉緑体形質転換技術を使って医療用蛋白質を生産した最初の例である。今回確立した技術を基礎に、このプロジェクト研究は今後大いに発展していく可能性が高く、その成果は非常に高く評価されるものである。本研究の成果を受けて、我が国における葉緑体形質転換技術を使った実用研究がより広範囲に展開されることが期待される。これらの成果からみても、研究目的、研究組織および研究方法等の設定が適切であったことが判断される。以下、個別研究ごとの評価を記す。

高付加価値蛋白質を生産する葉緑体形質転換タバコの開発：国内で葉緑体形質転換技術を確立している研究機関は4-5カ所にすぎない。本研究では、独自の技術改良を加え、高効率の葉緑体形質転換技術を確立した。その独自性は高く評価できる。また、葉緑体で医療用蛋白質を初めとする様々な有用蛋白質を発現させられることを、国内で初めて実証した。この研究の意義は非常に大きく、医療、薬学、工学関係の研究者からも注目される技術開発である。今後も、より付加価値の高い蛋白質を発現させる技術開発を進め、実用化に向けた研究をより積極的に展開することが期待される。この研究の意義は非常に大きく、わが国における葉緑体形質転換研究の拠点としての京都産業大学の役割に大いに期待したい。

タバコ以外の作物における葉緑体形質転換技術の開発：本研究では、パンコムギ、ケールなどの葉緑体形質転換技術の開発に取り組み、高効率培養再生系の開発に成功した。葉緑体形質転換を開発するためには、高い効率の再生系の開発が不可欠であり、その実現に一歩踏み出したと言える。一方、植物種に適した遺伝子導入法、葉緑体における相同組み換え効率の向上などの検討も必要となる。今後のより積極的な研究展開を期待したい。

ミトコンドリアのゲノム工学：ミトコンドリアでは形質転換まで至っていないが、パンコムギのミトコンドリアゲノム構造の解明への寄与、ならびにダイコンのミトコンドリア雄性不稔遺伝子と稔性回復遺伝子の相互作用に関する研究や、ダイコンのミトコンドリア雄性不稔遺伝子の核ゲノムへの形質転換（ミトコンドリアへのターゲティング）など、基礎的な面で研究の進展が認められる。

【プロジェクト2】 「高等植物のオルガネラゲノム工学 外部評価（2）」

研究全体についてのコメント

（1）研究目標設定：

本研究プロジェクトの目標は、高等植物のオルガネラゲノム（葉緑体とミトコンドリアに存在する核外 DNA）の効率的な形質転換技術を開発し、オルガネラゲノムの改変を軸とした有用遺伝子組換え植物を育成することであった。オルガネラゲノムは母性遺伝すること（したがって、花粉を通じた環境への飛散が回避できる）、遺伝子コピー数が多く高い転写・翻訳活性が見込めることなど、これを改変した形質転換植物の利用は育種的な意義が大きい。

オルガネラゲノムの形質転換を実現するため、京都産業大学工学部（研究代表者：寺地徹教授、共同研究者：山岸博教授と黒坂光教授）と3共同研究機関（京都府立大学人間環境学部教授椎名隆、岩手生物工学研究センター主席研究員寺内良平、植物工学研究所研究員酒井隆子、同藤本英也ら）による協力体制を整えて研究計画が遂行された。特に、タバコをモデルに、医療用タンパク質や機能性ペプチドなどを安価・大量に生産するシステムの開発を試み、技術の適用範囲をパンコムギ、ケールなどの作物に拡大し、病害抵抗性や除草剤耐性など有用形質の付加を目指した。さらに、ダイコンなどの雄性不稔遺伝子の導入を目的に、ミトコンドリアゲノムの形質転換技術の新規開拓を目的とした課題の解決を試みた。

以上のように、葉緑体ゲノム形質転換技術の汎用性の向上とミトコンドリアゲノム形質転換技術の新規開発は、安全でかつ高発現な有用遺伝子組換え植物の作成を可能とする作物遺伝・育種における重要目標であり、目標設定は的確であったと考える。

（2）達成度：

（2-1）葉緑体の形質転換

葉緑体ゲノムの形質転換は、タバコなど一部のナス科植物では実用化されているが、他作物に応用できる汎用性の高い技術は未開発である。技術開発のポイントは、植物組織培養・植物体再生技術の開発、遺伝子導入ベクターの構築、導入遺伝子の発現解析や形質転換体の特性評価技術の開発にあると考えられる。

本プロジェクトでは、1) 外来遺伝子を葉緑体で安定して高発現する組換えタバコの作出、2) ホモプラズミックな（全ての細胞で導入遺伝子が発現する状態を実現した）形質転換体を効率よく作製する方法の開発、3) 葉緑体形質転換技術を広くタバコ以外の作物に応用する手法の開発、の3つを目標に種々の実験を行なった。その結果、1)、2) の2目標については所期の成果を得た。すなわちタバコでは、ラットの糖鎖合成酵素遺伝子、ヒルの血液凝固阻害タンパク質遺伝子（ヒルジン）、ダイズの鉄結合タンパク質遺伝子（フェリチン）、シロイヌナズナの脂肪酸不飽和化酵素遺伝子など、それぞれ導入目的は違うものの、他の生物種由来の外来遺伝子をタバコの葉緑体ゲノムに組み込み、発現させることに成功した。これらの組換え植物については、本研究プロジェクト経費で建設した閉鎖系温室で育成し開花させ、自殖により後代を得るに至っている。一方、目標3) については、パンコムギ、ケール（キャベツの仲間）などを材料に、種々改良を加えた大規模な実験を実施した。しかしながら、タバコに比べて培養が難しいとされるこれらの植物種については、効率的な培養再生系を確立することはできたが、葉緑体の形質転換体を得るには至らなかった。

以上のように、葉緑体の形質転換については、当初の目標であった特性解析や安全性の検討には至らなかったが、応分の成果を上げたと判定できる。

（2-2）ミトコンドリアの形質転換

ミトコンドリアゲノムの形質転換は、未だ実現を見ていないチャレンジングな目標であり、越えなければならない障壁が山積する課題であった。従って、達成された内容は、その前段階であるプロトプラスト培養系・植物体再生系の開発、雄性不稔遺伝子の構造・機能解析などが主であり、残念ながら形質転換系の開発には至らなかったが、ダイコンのミトコンドリア雄性不稔遺伝子を葉緑体ゲノムに導入したユニークなタバコ形質転換体を作成している。さらに、一連の実験を通じて、ダイコン・ミトコンドリア DNA 由来の雄性不稔遺伝子の改変産物が大腸菌を溶解することを見いだした。遺伝子工学的なタンパク質

調製に向けて、この現象およびタンパク質自体を利用できると考え、現在、特許申請を準備している。

(3) 今後の展望

本プロジェクトの結果、種々の葉緑体組換えタバコが育成された。なかでも、フェリチン遺伝子を葉緑体で発現させたタバコ形質転換体は鉄耐性の表現型を示し、植物の重金属耐性機構を理解するモデルとしてだけでなく、現在、技術開発が望まれているファイトレメディエーションの研究素材として利用できる。この他にも、低温耐性が付与されたと予測されるタバコなど、育種学的に興味深い植物が作出されており、閉鎖系温室などのよく整備された設備を有効利用して後代のより精密な解析を行なう必要がある。

ミトコンドリアの形質転換については、植物ミトコンドリアゲノムがもつ相同組換え機構の解明など、今後は基礎的な解析に取り組む必要がある。

尚、本プロジェクトの遂行に当たっては、共同研究体制を整備することに加えて、学術講演会、一般公開シンポジウムやゼミを開催するなど、情報や意見の収集・交換の面でも一定の成果を上げたと考えられる。



KYOTO SANGYO UNIVERSITY