HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ゼニゴケの培養細胞と植物体のプラスチド形質転換法
Author(s)	千代田, 将大; 河内, 孝之
Citation	低温科学, 67, 601-606 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39200
Type	bulletin (article)
Note	5章 形質転換 3. ゼニゴケ b
File Information	67-084.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

3．ゼニゴケ
b．ゼニゴケの培養細胞と植物体のプラスチド形質転換法

千代田将大[1)]，河内　孝之[1)]

苔類ゼニゴケは，増殖の盛んな培養細胞や分化初期の葉状体を材料として，容易にプラスチドDNAへの遺伝子導入が可能である．スクロースを除いた選抜培地や直線状化したコンストラクトDNAを用いることによって，プラスチド形質転換体獲得の効率が上昇し，ホモプラストーミックな状態にすることも容易となる．

Plastid transformation system for suspension-culture cells and intact plants of liverwort *Marchantia polymorpha* L.

Shota Chiyoda, Takayuki Kohchi

We describe a simple and efficient plastid transformation method for suspension-culture cells and plants of the liverwort, *Marchantia polymorpha* L.　Selection on a sucrose-free medium improved the recovery rates of plastid transformants.　Homoplastomic transformants were established without the processes of dedifferentiation and regeneration.

3.b.1　序論

苔類ゼニゴケのプラスチドDNA（ptDNA）は，緑色培養細胞系を材料として全塩基配列が解読された[1)]．全長が121,025 bpの環状分子であり，高等植物との間で高度に保存された遺伝子構成を持つ．プラスチドゲノムには，主にptDNA上の遺伝子の転写・翻訳に関わるタンパク質遺伝子や光合成機能に関わるタンパク質遺伝子がコードされている．これらの遺伝子やプロモーターなどの機能配列の解析，さらには，ptDNAの複製や遺伝様式を調べるための直接的な手段として，プラスチド形質転換系は非常に有効である．

プラスチド形質転換の成否を左右する因子としては，形質転換ベクターの設計と導入条件，植物材料の状態，形質転換体の選抜条件，および脱分化・再分化の効率などが考えられる．タバコが葉緑体形質転換でよく利用されるが，これは培養系が確立しており，植物の扱いが容易であることが背景にある．ゼニゴケの場合，DNA導入の材料として，葉緑体に富み独立栄養培養が可能である培養細胞，および，旺盛に生育する分化初期の幼植物体（幼葉状体）を用いることで，高効率なプラスチド形質転換系の構築が可能となった[2,3)]．高等植物ではDNA導入や選抜とホモプラズム化に脱分化と再分化の培養系が利用されているが，ゼニゴケは，本来，分化全能性が高く，増殖が盛んであるために，特別な操作は必要としない（図1）．ゼニゴケは，その生活環のユニークさと進化上の位置付けの重要性から，モデル植物として注目されている（1.4．大和らの頁を参照）．葉緑体遺伝子発現，DNA複製や母性遺伝の研究にも，有望な材料である．ここではパーティクルガンを用いたゼニゴケ培養細胞および植物体のプラスチド形質転換法について解説する．

1）京都大学大学院生命科学研究科遺伝子特性学分野

3.b.2　実験の準備

ここでの実験は，パーティクルガン10ショット分で記載している．通常，プラスチド形質転換体は10株以上得られる．

[植物とプラスミド]

・ゼニゴケ培養細胞

1.4.大和らの頁を参照．継代培養後7-10日目の培養液を70 ml（300 mlフラスコ1本分）．我々が使用する培養細胞系統は，長期間の培養のため，再分化能はない．培養細胞の利点を生かした研究に使用している．

・ゼニゴケ滅菌胞子嚢

1.4.大和らの頁を参照．プラスチド形質転換には滅菌胞子嚢を約10個用いる．機能解析に植物個体を扱う必要がある時に使用している．

・プラスチド形質転換ベクター

ここではpCS31ベクターを使用．pCS31はpBS-

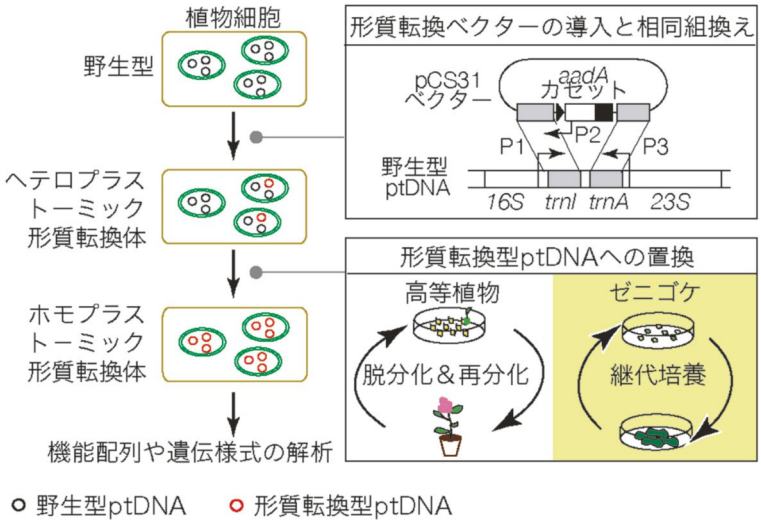

図1：プラスチド形質転換系の概略図．
プラスチド形質転換系は大きく分けて，形質転換ベクターの導入，プラスチド形質転換体の選抜，ホモプラストーミックな形質転換体の獲得の3段階から成る．外来遺伝子は相同組換えによってptDNAに組込まれる．ここではタバコ *rrn* プロモーターと *psbA* 遺伝子3'UTRの制御下にある *aadA* 遺伝子の発現カセットの両脇に約1 kbの *trnI* 及び *trnA* 遺伝子を持たせた形質転換ベクターであるpCS31を示す．図中のpCS31及び野生型ptDNA上の矢印はプラスチド形質転換体の選抜及び，ホモプラストーミックな形質転換体の確認に用いるプライマーを表す．P1, 5'-ACCCATTAAATTATCCTTAGCATG-3', P2, 5'-TGGATCCCTCCCTACAACTG-3', P3, 5'-TGCCTAGGTATCCACCGTAA-3'．形質転換後初期のプラスチド形質転換体では一部のptDNAが組換え型である（ヘテロプラストーミック）．選抜圧下でptDNAが複製・分配されるにつれて，野生型ptDNAが全て形質転換型ptDNAに置換される（ホモプラストーミック）．

SK＋の *Sma*I制限酵素部位に約2 kbのゼニゴケ *trnI*～*trnA* 遺伝子領域をサブクローニングし，*trnI* と *trnA* の遺伝子間領域にタバコ *rrn* プロモーターと *psbA* 遺伝子3'UTRの制御下にあるスペクチノマイシン耐性遺伝子 *aadA* の発現カセットを組込んだもの（図1）．QIAGEN Plasmid Midi Kitで抽出して1 μg/μlに調整する．線状DNA断片を利用する場合は *aadA* カセットと相同配列を含む制限酵素断片をゲル抽出によって調製する．

［機器・器具］

- 吸引濾過器（Nalgene：134 mm x 230 mm，＃300-4050）
  オートクレーブで滅菌しておく．
- 水流アスピレーター
- 円形濾紙　10枚（Whatman：No.1 φ 55 mm）
  培養細胞の場合のみ使用．ガラスシャーレに入れてオートクレーブしておく．
- 円形セロファン　10枚
  植物体の場合のみ使用．プラスチックシャーレの大きさよりも少し小さめに切って，洗浄・オートクレーブしたもの．
- 細胞破砕用ペッスル
  オートクレーブで滅菌しておく
- パーティクルガン（Bio-Rad：PDS-1000/He Particle delivery system）
- 0.6 μm金粒子（Bio-Rad：＃165-2262）
  20 μg/μlの懸濁液を110 μlずつ1.5 mlチューブに入れたもの．−30°C保存可能．
- 900 psi Rupture Disk 10枚（Bio-Rad：＃165-2328）
- Macrocarrier（Bio-Rad，＃165-2335）10枚
- Stopping Screen（Bio-Rad，＃165-2336）10枚
  Ruptur Disk，Macrocarrier，Stopping Screenは使用分だけエタノールにくぐらせて滅菌したあと，クリーンベンチ内で乾燥させて，プラスチックシャーレに入れる．

［試薬・培地］

- 滅菌超純水
- 10 μg/ml RNase A入りTris-HCl（pH 8.0）
- 70％エタノール
- 99％エタノール
- 中性フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール溶液（25：24：1）
- 2.5 M塩化カルシウム（分注して−30°C保存）
- 0.1 Mスペルミジン（分注して−80°C保存）
- スペクチノマイシン二塩酸塩五水和物（SIGMA，＃S9007-5G）

超純水で50 mg/mlに調整してフィルター滅菌，−30°C保存．

・尿素フェノール液
5 M尿素，0.3 M塩化ナトリウム，50 mM Tris-HCl pH 8.0，20 mM EDTA pH 8.0，5%(v/v) フェノール pH 7.0，0.5% SDS．4 °Cで約1ヶ月は保存可能．

・0-M51Cまたは1M51C寒天培地　10枚

・培養細胞の選抜培地　2 l
スクロースを含まない1M51C寒天培地をオートクレーブする．培地が65°C程度まで冷えてから，上記のフィルター滅菌したスペクチノマイシン溶液を終濃度500 μg/mlになるように加える．40 mlずつプレートに流し込んで50枚程度の選抜培地を作製する．

・植物体の選抜培地　2 l
スクロースを含まない0M51C寒天培地をオートクレーブする．培地が65°C程度まで冷えてから上記のフィルター滅菌したスペクチノマイシン溶液を終濃度300 μg/mlになるように加えて，40 mlずつプレートに流し込んで50枚程度の選抜培地を作製する．

3.b.3　実験方法

3.b.3.1　植物の準備

[ゼニゴケ培養細胞]

1．形質転換ベクター導入の前日に，継代培養7日目のゼニゴケ培養細胞を吸引濾過器で濾紙上に1 mmほどの厚みで円形に集める（図2 A）．

2．集めた細胞を濾紙ごと1-M51C寒天培地の中央に置き，翌日まで22°C，連続光下（50-60 μmol photons m^{-2} s^{-1}）に静置する．

[ゼニゴケ植物体]

1．1ショット当たり1つの滅菌胞子嚢を100 μl滅菌水に懸濁し，セロファンを敷いた0M51C寒天培地の中央に100 μl滴下して1週間培養する（図2 B，C）．

2．形質転換ベクター導入の前日に幼植物体まで育った

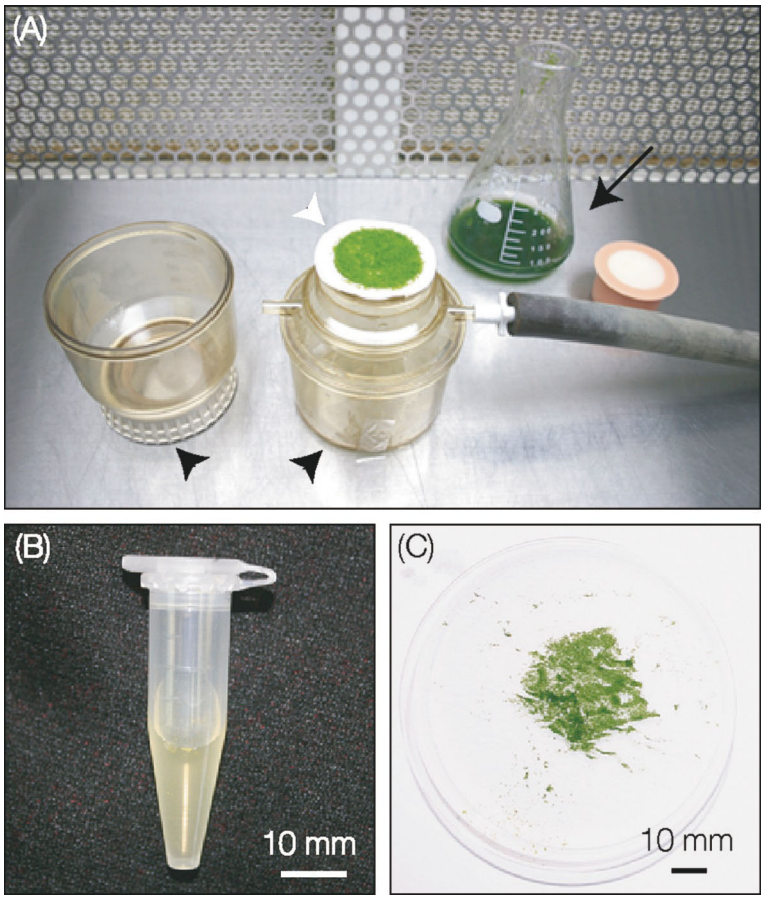

図2：パーティクルガンのターゲットとなる植物の準備．
(A) ゼニゴケ培養細胞の準備．継代培養後7日目の細胞（矢印）を吸引濾過器（黒色矢頭）によって濾紙上に円形に集めた様子（白色矢頭）．(B，C) ゼニゴケ幼植物体の準備．(B) 胞子懸濁液．(C) 胞子から1週間育てたゼニゴケ幼植物体．選抜培地へ移す際に剝がし易くするために培地上にセロハンを敷いている．

ゼニゴケの集団を直径25〜30 mmの円形になるようにピンセットなどで整える．

3.b.3.2　形質転換ベクターの金粒子へのコーティングと導入

1．保存している金粒子懸濁液を遠心分離（6,000× g，1 min）し，上清のエタノールを捨て，1 ml滅菌水を加えてボルテックスでよく懸濁する．
2．遠心分離（2,000× g，3 min）を行い，上清を捨てる．
3．滅菌水を230 μl加えて，金粒子をボルテックスで完全に懸濁させる．
4．2.5 M $CaCl_2$ 250 μl，プラスチド形質転換ベクター（1 μg/μl）25 μl，1 Mスペルミジン50 μlを順番に手早く加えて，ボルテックスで懸濁する．
5．氷上に静置し，1分ごとに10秒間のボルテックスによる懸濁を10回繰り返す．
6．遠心分離（2,000× g，3 min）を行い，上清を捨てる．500 μlエタノールを加えて，ボルテックスで洗浄する．チューブの壁に金粒子が付着する場合は，チップの先でこそぎ取る．これを計2回繰り返す．
7．遠心分離（2,000× g，3 min）を行い，上清を捨てる．60 μlのエタノールを加えてボルテックスで金粒子を懸濁する．ピペsッティングによる懸濁はしないこと．
8．調製した金粒子を懸濁して，フォルダにセットしたMacrocarrierに5.4 μlずつ塗布して乾燥させる（以降は無菌操作）．
9．パーティクルガンを操作して，準備した金粒子をターゲットに打ち込む（ターゲットとの距離は120 mm，28 inHg，900 psi）．

3.b.3.3　スペクチノマイシン耐性株の選抜

1．形質転換ベクター導入後の細胞を翌日まで22℃，連続光下（50-60 μmol photons $m^{-2}s^{-1}$）に静置する．
2．形質転換ベクター導入後のプレート上の細胞を4等分して，滅菌水を数滴垂らした選抜培地上にピンセットで均一に広げる（図3 A，B）．
3．選抜培地上に広げた細胞を3〜4週間培養する（図3 C，D）．
4．緑色のスペクチノマイシン耐性株を20株以上新しい選抜培地に移し，番号をつける．株が混ざらないように注意して1枚の選抜培地に10株程度移してもよい．使用する形質転換ベクターによって異なるが，我々の実験では無作為に選んだスペクチノマイシン耐性株のうち5〜70%程度がプラスチド形質転換体であっ

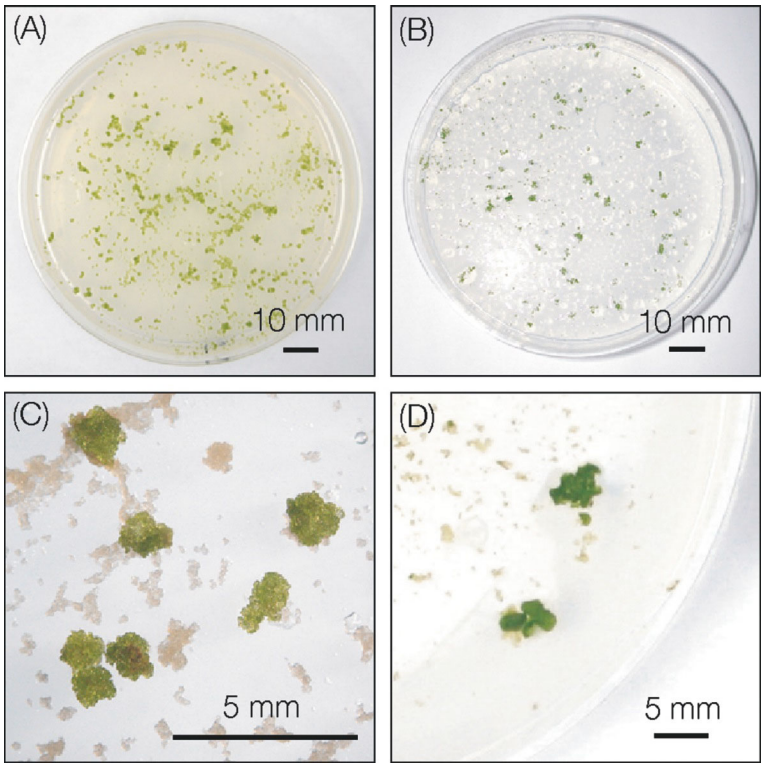

図3：スペクチノマイシン耐性株の選抜．
（A，B）スペクチノマイシン耐性ゼニゴケ培養細胞の選抜．形質転換ベクター導入後の培養細胞（A）または幼植物体（B）を選抜培地上に滅菌水を用いて密集しないように均一に広げた様子．（C，D）スペクチノマイシン耐性株の獲得．選抜開始3〜4週間後に緑色のスペクチノマイシン耐性の培養細胞（C）または植物体（B）が得られる．

た．そのため，20 株以上は新しい選抜培地に移す必要がある．

3.b.3.4 プラスチド形質転換体の選択とホモプラズム化

1．成長したスペクチノマイシン耐性株の一部をサンプリングして 1.5 ml マイクロチューブに移す．10 mg 程度で十分．培養細胞なら 2 mm 程度．植物体はごく小さい段階でも 1 mm 程度の組織をメスなどで切り取って調べることが可能．仮根以外の緑色の組織ならば切り取る場所は問わない．
2．100 μl の尿素フェノール液をチューブに加えて，プラスチックペッスルで細胞を破砕する．
3．破砕液に 400 μl の尿素フェノール液を加えてよく混和してから，フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行う．沈殿に RNase A を終濃度 10 μg/ml で含む Tris-HCl（pH 8.0）を 100〜200 μl 加えてトータル DNA 溶液とする．QIAGEN の DNeasy Plant Mini Kit でも PCR 用の total DNA 抽出は可能である．
4．ベクターに持たせた ptDNA の相同配列の外側に設計したプライマーと（図 1，P 1 プライマー），*aadA* カセットの部分に設計したプライマー（図 1，P 2 プライマー）のセットを用いて PCR を行う．
5．目的の領域に外来遺伝子が挿入されている株を選び，新しい選抜培地へ移植する．
6．得られたプラスチド形質転換株がホモプラストーミックになるまで，株の一部を 2 〜 3 週間ごとにスクロースを含む選抜培地へ植え継ぐ．ホモプラストーミックであることはベクターに持たせた ptDNA の相同配列の外側に設計したプライマーセットを用いた PCR で確認する（図 1，P 1 と P 3 プライマー）．

培養細胞の場合，最初の選抜培地で細胞塊が出現してから，12〜16 週間で野生型のプラスチド DNA が PCR で検出されない程度のホモプラストーミックな株が得られる（図 4 A）．植物体の場合，最初の選抜培地から単離した時点でホモプラストーミックなプラスチド形質転換体も得られる（図 4 B）．ホモプラストーミックなラインが得られない場合は，無性芽を数回選抜培地へ継代培養する．

3.b.4 まとめと考察

相同組み換えに依存するプラスチド形質転換において，遺伝子導入位置の設計は重要である．形質転換ベクター

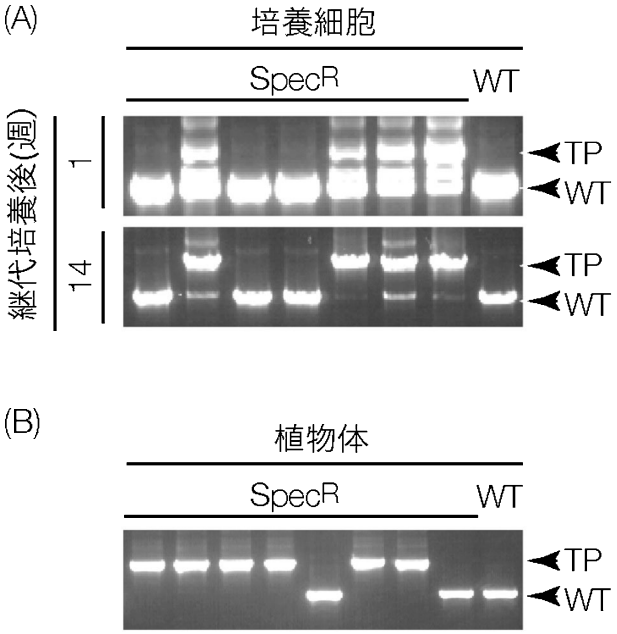

図 4：PCR によるホモプラストーミックなプラスチド形質転換体獲得の確認．
（A，B）ゼニゴケ培養細胞（A）および植物体（B）におけるスペクチノマイシン耐性株の *trnI*〜*trnA* 遺伝子間領域への *aadA* カセットの組込みを図 1 の矢印で示したプライマーセット（P 1 と P 3）を用いた PCR で調べた．増幅断片の長さは野生型 ptDNA 由来（WT）が 2,179 bp，プラスチド形質転換型 ptDNA 由来（TP）が 3,563 bp となる．（A）培養細胞ではホモプラストーミックな形質転換体を得るまでに 12〜16 週間かかる．（B）植物体では選抜直後の段階において，すでに大半の株がホモプラストーミックである．

ターの設計において，*trnI-trnA* 遺伝子間に組込まれた外来遺伝子が高発現すると報告された[4]．ゼニゴケも含めて，現時点の様々な植物におけるプラスチド形質転換法でも *trnI-trnA* 遺伝子間領域が外来遺伝子の挿入部位として広く用いられている[5]．他の領域を標的にして形質転換体は得られているが，遺伝子導入が困難な部位も存在した（千代田，未発表）．

また，ゼニゴケのプラスチド形質転換において重要となるのは，選抜培地からスクロースを除くことである．それに加えて，植物体ではターゲットを胞子から 1 週間育てた幼植物体として，直線状の形質転換ベクターを導入することが重要である．上記の方法で得られるスペクチノマイシン耐性株の数は 1 プレート当たり培養細胞と植物体でおよそそれぞれ 100〜200 株と 10 株である．しかし，選抜培地にスクロースを加えた場合，出現する薬剤耐性株は増加するが，プラスチド形質転換体でない擬陽性の株がスペクチノマイシン耐性株全体の 90%以上を占めてしまう．これらの擬陽性の株は一過的な耐性株もしくは核形質転換体であると思われる．スクロースを

添加せずに光合成に依存して生育させることで葉緑体機能に対する選抜圧があがり，結果的にプラスチド形質転換体が優先的に生き残ることで選抜後にプラスチド形質転換体の割合が増加すると考えられる[2]．著者らの実験では最も効率の良い場合でスペクチノマイシン耐性株の70％程度が設計通りのプラスチド形質転換体であった．一度得られたホモプラストーミックなプラスチド形質転換体は，スペクチノマイシンを含まない培地（植物体の場合はバーミキュライト）に移しても少なくとも半年は安定してホモプラストーミックな状態を維持することを確認している．

参考文献

1）K. Ohyama, H. Fukuzawa, T. Kohchi, H. Shirai, T. Sano, S. Sano, K. Umesono, Y. Shiki, M. Takeuchi, Z. Chang, S. Aota, H. Inokuchi, & H. Ozeki, Nature **322** (1986) P.572.

2）S. Chiyoda, P. J. Linley, K. T. Yamato, H. Fukuzawa, A. Yokota, & T. Kohchi, Transgenic Res. **16** (2007) P.41.

3）S. Chiyoda, K. Ishizaki, H. Kataoka, K. T. Yamato, & T. Kohchi, Plant Cell Rep. **27** (2008) P.1467.

4）B. De Cosa, W. Moar, S. B. Lee, M. Miller, & H. Daniell, Nat. Biotechnol. **19** (2001) P.71.

5）D. Verma, & H. Daniell, Plant Physiol. **145** (2007) P. 1129.