様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　５　月　３０　日現在

機関番号：１１５０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2016
課題番号：１５Ｋ１４６４６

研究課題名（和文）自家不和合性を利用した、サクラ属果樹における花粉媒介形質転換技術の開発

研究課題名（英文）The study for development of the self incompatibility-assisted pollen-mediated transformation in Prunus fruit trees

研究代表者
松本　大生（MATSUMOTO, Daiki）

山形大学・農学部・助教

研究者番号：３０６３２１２９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、自家不和合性機構を利用した花粉媒介形質転換系がサクラ属果樹における代替形質転換技術になりえるか検証した。自家不和合性花粉側因子の発現を抑制するヘアピン配列を設計し、組換えタバコにおいてそのサイレンシング効果を確かめた。次に、そのヘアピン配列とGUS遺伝子を花粉で発現させる一過性発現組換えベクターを用いて、オウトウ‘佐藤錦’花粉への遺伝子導入を検討したところ、1%程度の形質転換花粉が確認された。しかしながら鉢植え‘佐藤錦’上の500花以上に対しこの形質転換花粉を受粉したものの、自殖後代は得られず、立案した系の有効性については更なる検証が必要なものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, the self incompatibility (SI)-assisted pollen-mediated transformation approach was proposed and tested for the alternative transformation technique for Prunus fruit trees. At first, the hairpin gene construct for silencing the pollen SI determinant gene was designed, and its silencing ability was confirmed by the assay using the genetic transformed tobacco plants. Next, the transient-expression vector was developed which contained the hairpin gene and GUS marker gene under control of the pollen-specific LAT52 promoter. The transformation efficiency of sweet cherry ‘Satonishiki’ pollen by particle bombardment was up to 1 % at the optimized condition. Finally, 500~ flowers on ‘Satonishiki’ potted trees were self-pollinated with bombarded-pollen, but no fruit was set. The further study testing the efficiency of the proposed approach was needed to make a conclusion.

研究分野：果樹園芸

キーワード：自家不和合性　サクラ属果樹　花粉形質転換　パーティクルボンバードメント

１．研究開始当初の背景

サクラ属果樹はモモ、オウトウ、スモモといった主要な温帯果樹種を含み、またいち早くゲノムが解読された果樹でもある。サクラ属果樹の生理・生態に関する遺伝学的知見は年々増加している一方、サクラ属果樹では効率的な形質転換技術が確立しておらず、それら知見の証明や利用は十分に進んでいない現状にある。

植物における主流な安定的形質転換系は、アグロバクテリウム法などにより植物細胞を形質転換し、その後組織培養によって植物体を再生するものである。サクラ属の形質転換体作出を困難なものにしている最大の障壁は、形質転換カルス細胞からの植物体再生過程における効率の低さにあった。幼胚軸や未熟子葉由来のカルス細胞を用いることで形質転換体の獲得効率を改善した報告はあったものの、依然その効率は十分なものではなかった（Gao et al., 2010, *Sci Hort*；ほか）。サクラ属果樹の形質転換には、大量の培養組織の維持と多大な労力が必要であり、広くは普及していない。

組織培養を経ずに形質転換体を作出するアプローチとしては、花粉や雌蕊といった生殖器官に形質転換をおこない、その後代において形質転換体を得るものがある。モデル植物であるシロイヌナズナでは、花器官にアグロバクテリウム培養液を浸漬させる floral-dip 法がスタンダードな形質転換手法として用いられている。またいくつかの植物種では、花粉に形質転換を行うことで後代における形質転換体獲得を狙う花粉媒介形質転換の検討もなされている（Eapen, 2011, *Physiol Mol Biol Plants*）。植物体サイズが大きく、花器官に直接形質転換処理をしづらい果樹のような植物種では花粉媒介形質転換が有用なアプローチとなる可能性があるものの、報告されている花粉媒介形質転換の効率は数%程度かそれよりもはるかに低く、そのままでは果樹に適用しづらいと考えられる。角田・堀川,（2007, ***帯広研報***）は磁性ビーズを用いたパーティクルボンバードメント法によって花粉を形質転換したのちに磁性選抜を行い、形質転換花粉濃度を 10 倍以上に高めることで、結果として形質転換体獲得効率を向上したことを報告している。この手法自身は磁性選抜を行うための設備が必要であるが、形質転換に成功した花粉を選抜することが花粉媒介形質転換の効率改善に有効であることを示した。

サクラ属果樹には自家不和合性とよばれる花粉選択機構がもともと存在する。自家不和合性とは、雌蕊が遺伝的に近縁な個体に由来する花粉を認識し、選択的に拒絶することで近親交配を防ぐ機構である。サクラ属果樹における自家不和合性の遺伝的機構は解明が進んでおり、単一の *S* 遺伝子座に座上する *S haplotype-specific F-box* (*SFB*)遺伝子と *S-RNase* 遺伝子が自己特異性を決定していることが明らかとなっている（Matsumoto・Tao, 2016, *Hort J*）。*SFB* や *S-RNase* の変異に由来する自家和合変異体が複数例報告されていることから、両遺伝子はともに自己花粉の拒絶に機能すると考えられている。

上記の知見に基づけば、サクラ属果樹では *SFB* 発現抑制を選抜マーカーとした花粉媒介形質転換が行える可能性が考えられ、同方法が確立されれば省力的なサクラ属果樹形質転換手法となるものと期待される。

２．研究の目的

本研究では、サクラ属果樹において *SFB* 発現抑制を選抜マーカーとした花粉媒介形質転換が実現可能なものか検証することを最終目的とし、カンカオウトウ（*Prunus avium* L.）を植物材料として一連の試験を行った。本研究を構成する小課題として、①*SFB* 発現抑制配列の構築、②オウトウ花粉の形質転換手法の検討、③*SFB* 発現抑制配列導入花粉の自家和合化調査と自殖試験を行った。

３．研究の方法

１）植物材料

P. avium ‘佐藤錦’（*S* 遺伝子型、$S^3 S^6$）を主な植物材料として用いた。

２）*SFB* 発現抑制配列の構築

PavSFB-S^6 (1129 bp)の 320 bp (nt 739-1058)ならびに pKannibal の PDK イントロンから、ヘアピン配列(*hpPav6*)を構築した。

構築した *hpPav6* が *SFB* サイレンシングに有効な配列か確認すべく，ベンサミアーナタバコを用いた遺伝子発現調査を行った。pRI909 ベクター（Takara Bio, 草津）に *35S::PavSFB-*S^6 と *35S::PavSSK1*（pRI909-*35S::PavSFB-*S^6*&35S::PavSSK1*）、または *35S::hpPav6* をクローニングした(pRI909-*35S::hpPav6*)。これらコンストラクトを有するアグロバクテリウム C58-C1 を培養し、0.1mM アセトシリンゴンを含む MS 培地を用いて OD600=2.0 となるように懸濁した。pRI909-*35S::PavSFB-*S^6*&35S::PavSSK1* を導入したアグロバクテリウム菌液と、pRI909-*35S::hpPav6* を導入したアグロバクテリウム菌液または MS 液体培地を等量混合し，6 葉齢のベンサミアーナタバコの葉に接種した。単一菌株接種、共接種ともにそれぞれ 3 個体を用いた．接種後 5 日の葉から抽出した total RNA から cDNA を合成し，Real-time PCR によって *SFB* の発現量を調査した．内部標準には *SSK1* を用いた。

３）オウトウ‘佐藤錦’花粉の形質転換

pRI909 ベクターから不要な配列を取り除いたうえで、*LAT52 pro::hpPav6*、

LAT52 pro::GUS、*35S::GFP* をクローニングし、一過性花粉形質転換コンストラクト pTRLb-hpPav6 を構築した。

花粉形質転換は PDS-1000/He(Bio-RAD, Helcules）または GIE-III IDERA（タナカ社，札幌）を用いたパーティクルボンバードメントによって行った。PDS-1000/He のボンバードメント条件は、チャンバー内気圧は 28 inchHg（94.8 Kpa），発射口と花粉の距離は 9 cm、撃ち込み圧力は 1100 psi または 1550 psi とした．GIE-III IDERA では，チャンバー内気圧は 93.3 KPa，発射口と花粉の距離は 6 cm，撃ち込み圧力は 100 psi とした。また、金粒子は 0.6μm および 1.0μm のどちらかのサイズを用い、Wang・Liwen Jiang（2011）の方法に従ってプラスミド DNA をコーティングした．一回のボンバードメントあたりには、10mg の花粉、5μg のプラスミド DNA、1.5mg の金粒子を用いた。

あらかじめ室温に戻した 10mg の花粉を 1 mL の液体花粉発芽培地［PGM；50 mM MES バッファー（pH 6.5)，3 mM 硝酸カルシウム，0.8 mM 硫酸マグネシウム，0.1 mM 硝酸カリウム，16 mM ホウ酸，15%PEG_{4000}，50%スクロース；Hiratsuka ら，2001］で十分に懸濁し、吸引濾過を行いながら PGM で湿らせたろ紙上に置床した. 1%寒天シャーレ上に花粉を吸着したろ紙をおき、すぐにボンバードメントを行った。ボンバードメント後、ろ紙を PGM で注ぎ、花粉を回収した。

４）GUS アッセイ

ボンバードメントした花粉を 1.5mL チューブ中の PGM で 20℃にて 6 時間培養した後、PGM を 0.5mg/mL X-gluc 溶液（Johnson ら，2004）に置換し，さらに 37℃で 24 時間インキュベートした．インキュベート後の花粉を顕微鏡で観察した。

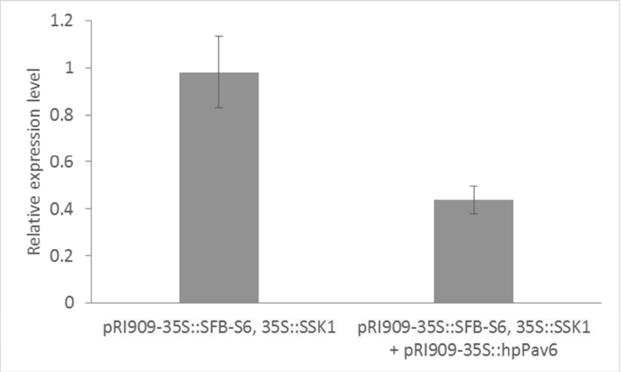
５）受粉試験

ボンバードメントした花粉を 1%寒天に挿したオウトウ雌蕊、または鉢植え‘佐藤錦’に受粉した。受粉した寒天雌蕊は 20℃で 24 時間静置した後，回収し，アニリンブルーによる花粉管伸長観察に供試した。受粉した鉢植え‘オウトウ’は 20℃12 時間明記に設定した人工気象器（LH-241-S，日本医化器械製作所，大阪）内で育成した。

４．研究成果

１）*SFB* 発現抑制配列の構築

PavSFB-*S*³ と塩基配列の一致が少ない PavSFB-*S*⁶ の 320bp からヘアピン配列 *hpPav6* を構築した。ベンサミアーナタバコに対してアグロ共インフィルトレーションによって *35S::* PavSFB-*S*⁶ と *35S::hpPav6* を導入したところ、*35S::hpPav6* の導入は *PavSFB-S*⁶ の発現量を約半分に低下させることが確認された（第１図)。



第 1 図 アグロインフルトレーションを行ったベンサミアーナタバコ葉における、*PavSFB-S*⁶ 発現量への *hpPav6* 共発現の影響（n=3)

２）パーティクルボンバードメント法によるオウトウ‘佐藤錦’花粉の形質転換

幅広い植物で花粉特異的な発現誘導に用いられる *LAT52 promoter* に *GUS* および hpPav6 を連結したコンストラクトを構築し、オウトウ花粉の形質転換試験に用いた．まず PDS-1000/He システムを用いて、オウトウ花粉の形質転換が可能か、また最適な撃ち込み条件を検討した（第 1 表)．いずれの条件においても、GUS 活性染色により青色を呈した花粉が認められた．圧力と金粒子サイズをかえて一回のボンバードメントを行った場合は、1550psi・06μm の条件が最も形質転換効率が高くなった．同条件で 3 回打ち込みを行った場合、有為ではなかったが一回打ち込みよりも形質転換効率が高くなり、また発芽率の低下を招くこともなかった.

第 1 表 PDS-1000/He でパーティクルボンバードメントを行った‘佐藤錦’花粉の発芽率ならびに GUS 発現花粉割合（n=3)

Particle size (μm)	Helium pressure (psi)	Replicates of bombardement (times)	No. of observed pollen grains	Pollen germination rate (%)	GUS-expressing pollen grains (%)
1	1100	1	3474 ± 281	0.759 ± 0.113	0.038 ± 0.008
1	1550	1	4374 ± 234	0.600 ± 0.022	0.287 ± 0.041
0.6	1100	1	4912 ± 206	1.187 ± 0.219	0.171 ± 0.060
0.6	1550	1	3474 ± 361	0.365 ± 0.048	0.809 ± 0.500
0.6	1550	3	4146 ± 678	1.992 ± 0.272	0.924 ± 0.100
—	—	0	910 ± 126	3.454 ± 0.374	—

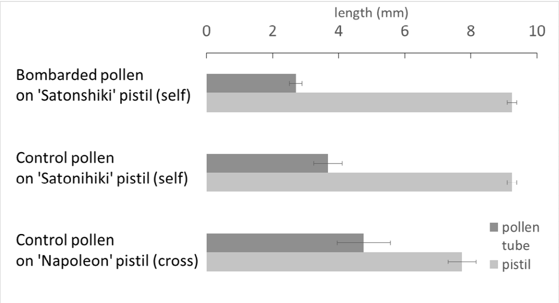
３）*hpPav6* の導入による用いたオウトウ‘佐藤錦’花粉の自家和合化の検証

研究設備の都合により，形質転換花粉の受粉試験では GIE-III IDERA システムを用いてボンバードメントを行った．撃ち込み圧力 100psi・金粒子サイズ 06μm の条件で GIE-III IDERA システムを用いてボンバードメントを行ったところ、‘佐藤錦’花粉の形質転換効率は 1.23 ±0.93 %、発芽率は 4.14 ±2.57 %となった.

この形質転換‘佐藤錦’花粉を用いて寒天挿し自己雌蕊に受粉を行い、24 時間後の

花粉管伸長を観察したが，平均花粉管長は非形質転換花粉を用いた場合よりも長くはならなかった（第 2 図）．ただし形質転換花粉を受粉した自己雌蕊 100 本のうち、2 本においては花柱全体の 80%まで花粉管が伸長していたものも認められた．

鉢植えの‘佐藤錦’523 花に対して、形質転換花粉を受粉したものの、結実に至ったものはみられなかった。よって本研究では *LAT52::hpPav6* の導入によるオウトウ花粉の自家和合化が可能かまでは検証することができなかった。



第２図　受粉後 24 時間における形質転換' 佐藤錦 ' 花粉および非形質転換 ' 佐藤錦 ' 花粉の自己雌蕊中の花粉管伸長(形質転換花粉受粉雌蕊，n=93; 非形質転換花粉受粉 ' 佐藤錦 ' 雌蕊，n=5 ; 非形質転換花粉受粉 ' ナポレオン ' 雌蕊，n=6)

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　０件）

なし

〔学会発表〕（計　１件）

① Daiki Matsumoto, Shouhei Ishizawa, Yuho Sasaki, Shouko Tomura. Transient transformation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) pollen with the hairpin gene construct targeting *S haplotype-specific F-box*, the pollen *S* determinant of *Prunus* self-incompatibility. 2017 年 6 月 5-9 日.山形市.

〔図書〕（計　０件）

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0 件）

なし

○取得状況（計　　件）

なし

〔その他〕

なし

６．研究組織

(1)研究代表者

松本　大生（MATSUMOTO, Daiki）

山形大学・農学部・助教

研究者番号：３０６３２１２９

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし