

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22432

研究課題名（和文）花粉を介した植物への新しい遺伝子導入法の開発

研究課題名（英文）Development of a pollen-mediated gene transfer method

研究代表者

吉田 聡子（Yoshida, Satoko）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：20450421

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、花粉を介した新しい遺伝子導入法を検討した。従来の遺伝子導入にはアグロバクテリウムを介した方法やパーティクルガンを用いた方法などが知られているが、世代を超える導入遺伝子の継承には、植物種および品種ごとに方法が異なる個体の再分化が必要である。本研究では、生殖細胞である花粉をターゲットとして、アグロバクテリウムを介した遺伝子導入とマグネトフェクションによる遺伝子導入を検討した。ゲノムへの組み込みは確認されなかったものの、マグネトフェクションによる花粉へのDNAの導入が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

増え続ける世界人口や環境変動による農作地の喪失による食料危機に対応するためには、農作物の改変による食料の増産が必要不可欠である。近年、ゲノム解析技術やゲノム編集技術が大きく発展しているが、すべての植物に共通して利用できる、世代継承できる遺伝子導入技術は開発されていない。本研究では、生殖細胞である花粉をターゲットとして、遺伝子導入技術の開発を検討した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigate a pollen-mediated gene transfer method. Conventional methods of gene transfer, such as Agrobacterium-mediated methods and methods using particle guns, need to regenerate plants from callus or cells to establish the transgene-containing individuals. However, the regeneration condition differ depending on plant cultivars, and it takes an enormous amount of time to find the optimal regeneration method. In this study, targeting pollen as the germplasm, gene transfer via Agrobacterium and magnetofection were investigated. Although incorporation into the genome was not confirmed, introduction of DNA into pollen by magnetofection was confirmed.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：遺伝子導入 花粉 マグネトフェクション

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、革新的な植物への遺伝子導入法を開発することである。次世代シーケンサーによるシーケンス技術の革新によって多様な植物種のゲノム決定が比較的容易になり、ゲノム編集技術の出現により、多様な植物種、作物種の遺伝子改変が理論上可能となった。しかし、細胞壁を持つ植物細胞への遺伝子導入は容易ではない。遺伝子導入にはアグロバクテリウムを介した方法やパーティクルガンを用いた方法などが知られているが、いずれも遺伝子を導入した細胞やカルスからの植物個体の再分化が必要である。個体再生の条件が植物種および品種ごとに大きく異なっていることから、最適な方法を見つけるために膨大な時間がかかる上、未だに個体再生方法が見つかっていない作物種も数多くある。そのため、モデル植物以外の多くの植物種における遺伝子改変は非常に困難な状況にあり、多様な植物種に応用できる遺伝子導入技術の開発が望まれる。

本研究では、シソ目ハマウツボ科コシオガマを用いて、フローラルドロップ法と花粉のマグネットフェクション法を検討する。コシオガマは、モデル寄生植物として使用されているが、毛状根形質転換は確立されているものの、種子により次世代に導入遺伝子を維持できる安定的形質転換法が確立されておらず、地上部の表現型を解析することが困難である。アグロバクテリウムを用いたフローラルドロップ法を用いた GUS 遺伝子導入を試みたところ、GUS 染色される花粉が出現しており、フローラルドロップ法による形質転換の可能性が見えてきた。また、近年、ワタの花粉を用いたマグネットフェクション法の成功が報告¹されており、花粉を介した新しい形質転換法として汎用できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、花器官および花粉に着目した非モデル植物における新しい遺伝子導入法の確立を目的とする。アグロバクテリウムを用いたフローラルドロップ法とマグネットフェクション法を用いて花粉への遺伝子導入試験を行い、次世代に継承される形質転換の方法を開発する。

3. 研究の方法

コシオガマの無菌播種と生育条件

コシオガマの種子は 10%(v/v)に薄めたハイター液で 5 分滅菌し、滅菌水で 5 回すすいだ。滅菌したコシオガマ種子は 1/2 MS 培地または GM 培地に播種し、遮光し 4°C で一晩低温処理を行った後、3 日間 25°C 暗条件下に静置し発芽させた。その後、アルミホイルを外し 25°C で 16 時間明所/8 時間暗所の条件で生育させた。

フローラルドロップを用いたコシオガマへの形質転換

液体 LB 培地 (1% Bacto Tryptone、0.5% Bacto Yeast Extract、0.5% NaCl、任意の抗生物質) 50 ml にレポータープラスミドが導入された *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 株を加え、28°C で 2 日間シェイカーにかけ培養した。培養液を 50 ml ファルコンチューブに移し遠心 (5,000 rpm、5 分) し、上清を捨て浸潤液 (pH 5.8、5% Sucrose、0.05% Silwet L77、1/2 x Murashige and Skoog Plant Salt Mixture(和光純薬)) を 2 ml 加え、再懸濁した。*A. tumefaciens* 懸濁液をピペットマンおよび 1 ml シリンジと注射針を用いてコシオガマ蕾もしくはコシオガマ花芽にドロップし、植物体をピニ

ールで覆い 6 時間明所/18 時間暗所の条件で生育した。

Pollen magnetofection 法

プラスミドと Magnet Nano Particle (MNP, PolyMag Neo、OZ BIOSCIENCES) の比率がそれぞれ MNP (μl) : DNA (μg) = 1 : 1, 1 : 2, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 25 となるように混和し、室温で 30 分静置し MNP-DNA 複合体を形成した。MNP-DNA 複合体 4 μl を制限酵素処理 (EcoR V/Hind III) し、アガロースゲルで電気泳動 (100 V、40 分) を行い、MNP-DNA 複合体の形成を確認した。MNP-DNA 複合体を MNP : DNA=1 : 2 の比率で作成し、別の 1.5 ml チューブを用いて Stage II および Stage III のコシオガマ花粉を回収しソニケーション処理した。遠心 (2000 g、10 秒) し上清を除去し 1.5 ml チューブに花粉保存液を加え全量を 150 μl に調整した後、96 ウェルプレートに全量に移した。移した花粉懸濁液へ MNP-DNA 複合体を加え、Super Magnetic Plate (OZ BIOSCIENCES) の上に載せ、30 分静置した。Magnetic Plate から 96 ウェルプレートを下ろし、花粉懸濁液を新しい 1.5 ml チューブへ移し、遠心 (2000 g、10 秒) した後、上清を除去した。さらに花粉保存液で 3 回洗浄した。転倒混和により懸濁させ、花粉懸濁液 50 μl を花粉管誘導固形培地にまきアルミを巻いて 25°C の条件でインキュベートした。使用した、pBI121-Act1NLStdTomato プラスミドは奈良先端大 和田七夕子博士より、*LATp::Venus* プラスミドは名古屋大学 ITbM 水多陽子博士よりご分与いただいた。

Scanning Electron Microscope (SEM) 観察

Formamido acetic acid (FAA) 固定液にサンプルを浸し 2~3 回脱気した後、室温で一晩静置しサンプルの固定を行った。エタノールシリーズを用いてエタノール置換をおこない、次にアセトンに置換した。Leica EM CPD300 (Leica) を用いて、冷却を 5°C、CO₂ とアセトンの置換を 20 サイクル、CO₂ 蒸発を 41°C の設定で臨界点乾燥を行った。臨界点乾燥後、サンプルをアルミニウム試料台に固定した。E-1010 イオンスパッタ (日立ハイテクノロジーズ) を用いて臨界点乾固したサンプルを蒸着した。蒸着したサンプルを電解放出形走査電子顕微鏡 S-4700 (日立ハイテック) を用いて花粉を 3,000 倍および 40,000 倍の倍率で観察し、柱頭を 350 倍の倍率で観察した。

4. 研究成果

コシオガマ花粉へのフローラルドロップ

コシオガマ蕾を材料にアグロバクテリウムを用いたフローラルドロップ法を行うにあたり、花の発達段階を大きさおよび花弁の色に応じて Stage 0 から Stage IV に分類した。DAPI 染色により核染色を行い蛍光顕微鏡で観察したところ、Stage 0 では栄養細胞核 (図 1A) が、Stage I-1 では、栄養細胞核と雄原細胞核 (図 1B)、Stage I-2 では雄原細胞核由来の蛍光が見られた (図 1C)。次に、Stage 0、Stage I-1、Stage I-2 のコシオガマ蕾を用いてフロー

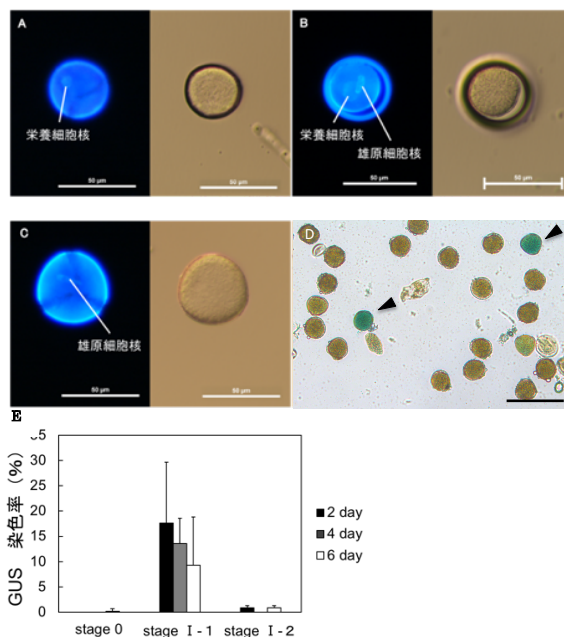


図 1 花粉の観察と GUS 遺伝子の導入 Stage0(A) StageI-1(B), StageI-2(C) の花粉を DAPI 染色して観察した。D, 遺伝子導入後の GUS 染色像。E. GUS 陽性花粉の割合

ラルドロップにより GUS 遺伝子 (35S-GFP/35SPx2-GUS_pBI101) の導入を行った。フローラルドロップ処理後 2、4、6 日目のコシオガマから花粉を回収し GUS 染色を行い、顕微鏡を用いて観察した (図 1 D, E)。Stage 0 において 2、4、6 日目で GUS 染色された花粉の割合は 0-0.2% であったが、Stage I-1 においては 2 日目で 17.7%、4 日目で 13.6%、6 日目で 9.3% の花粉が GUS 染色を示した。Stage I-2 においては 2-6 日目で GUS 染色された花粉の割合は 0-0.8% であった。これらの結果から Stage I-1 における染色率が最も高いことが確認された (図 1 E)。

次に、Stage 0、Stage I-1、Stage I-2 のコシオガマ蕾を用いたフローラルドロップにより、花粉栄養核で発現が確認されている *ACT1* プロモーター下に核局在型 tdTomato をつないだコンストラクトを持つ pBI121-Act1NLSStdTomato プラスミドの導入を試みた (図 2)。プラスミドを導入した *A. tumefaciens* を用いてコシオガマの蕾にフローラルドロ

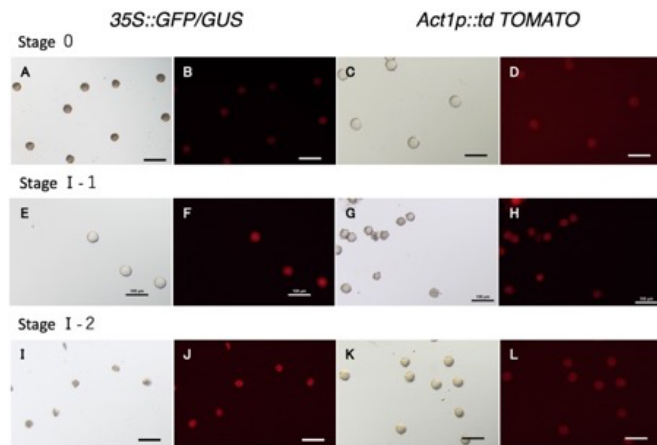


図 2 蛍光レポーター遺伝子の導入
各ステージの花粉に蛍光レポーター遺伝子を導入し、観察した。35S::GFP/GUS はコントロールとして用いた。

ップ処理を行い、処理後 4、5、6 日目のコシオガマから花粉を回収し観察したところ、核局在型の赤色蛍光はいずれのステージにおいても確認されなかった (図 2)。

以上の結果から、コシオガマ花粉へのフローラルドロップによって GUS 染色は確認できるが、蛍光レポータータンパク質由来の蛍光が観察されないことがわかった。GUS 染色は偽陽性もしくは花粉に付着した *A. tumefaciens* の GUS 活性が観察された可能性があり、花粉への遺伝子導入は成功していないと考えられた。

Pollen magnetofection 法の検討

ワタを用いた先行研究では花粉に存在する細胞壁の薄いまたは細胞壁がない領域である発芽口を通して MNP が花粉内に侵入すると報告されている¹。そこで、Stage III のコシオガマ花粉に発芽孔があるのか SEM を用いて観察した (図 3 A-C)。コシオガマ花粉は三溝粒で花粉表面にはエキシンによって構成された細かい網目状のテクタム構造と細長い溝状の発芽口である発芽溝が観察された (図 3 A)。テクタム構造において、ラクナと呼ばれる空隙は 100 nm 前後であるため直径が 200 nm である MNP-DNA 複合体の通過が難しく、拡大すると網目状のテクタム構造の内側にエキシン外層を構成するネキシン外層が広がる二重構造であることが確認された (図 3 B,

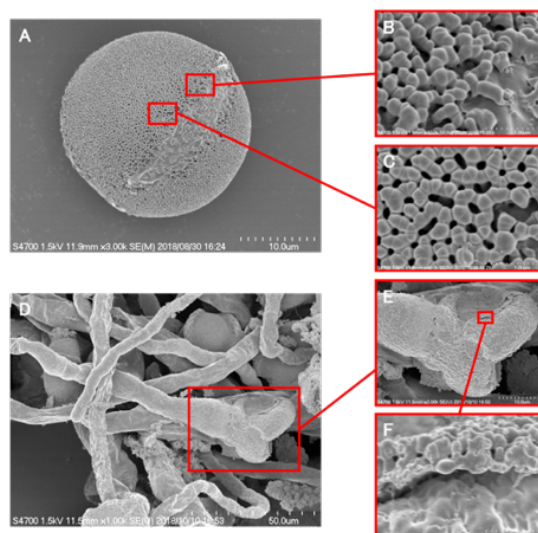


図 3 花粉の SEM 観察像
A, Stage III の花粉、B、C、は A の拡大図。D, 発芽後の花粉。E、F は拡大図。

C)。次に、液体花粉管誘導培地で花粉管誘導を行った花粉を SEM を用いて観察した (図 3 D-F)。花粉管は溝状の領域を突き破って発芽することが確認され、この部分がコシオガマ発芽口にあたることが確認された (図 3 D)。花粉の変形によりテクタム構造が剥がれ、発芽溝で露出する

部分はネキシン外層が薄くなっていると考えられた (図 3 E, F)。しかし、ワタのような穴構造はみられなかったため、ソニケーション処理により壁を薄くすることを検討した。

コシオガマ花粉への Pollen magnetofection 法を検討するにあたり、使用する MNP の吸着限界についての検討を行った¹。MNP に吸着したプラスミド DNA は制限酵素により切断されないことを利用し、MNP-DNA 複合体を作成し制限酵素処理を行い電気泳動にかけて検討した (図 4)。MNP の DNA 吸着限界は DNA : MNP = 2 : 1 であることが示唆された。

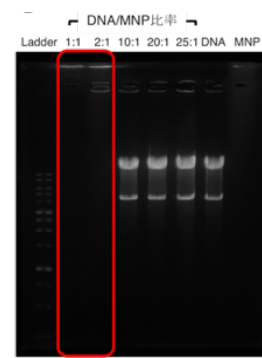


図 4 DNA-MNP 吸着限界の検討

条件検討の結果、コシオガマ花粉 10^5 粒に 0-30 秒ソニケーション処理を施し Pollen magnetofection を行った。また、この条件においては、magnetofection による花粉管発芽率への影響はほとんど見られなかった。

花粉を 0 秒、20 秒、30 秒ソニケーション処理した後、magnetofection を行い、1 日後に花粉管誘導液体培地に 1 時間浸してから蛍光顕微鏡を用いて花粉を観察した。コントロール (CL) として MNP のみを導入した花粉を用い、Cy3-Oligo、35S::GFP/GUS、*LATp::Venus* および 35S::*Venus x3* を吸着させた MNP-DNA 複合体を導入した。Cy3-Oligo nucleotide を導入した花粉において、Cy3 による蛍光が花粉上で観察され (図 5)、MNP-DNA 複合体は花粉内に導入されたと考えられた (図 5 M-O)。しかし、プラスミド DNA を導入した花粉および花粉管からはいずれもコントロール (CL) に対し蛍光に顕著な差は見られなかった。

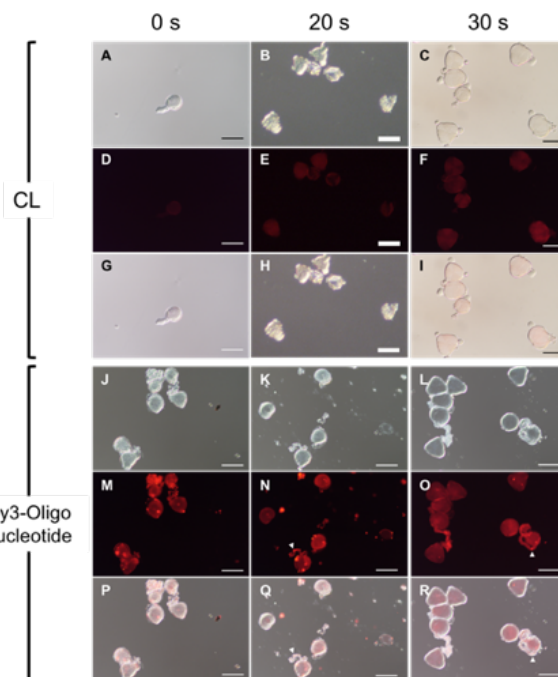


図 5 マグネトフェクションによる oligo-DNA の導入
Cy3 ラベルしたオリゴを magnetofection により花粉に導入した。

以上の結果をまとめると、花粉内への MNP-DNA 複合体導入は可能であるが、プラスミドを吸着させた MNP-DNA 複合体ではプラスミドにコードされた遺伝子がゲノムに挿入されず発現が起こらなかったため蛍光が観察されなかった可能性が示唆された。今後、導入遺伝子をゲノムに組み込む方法の検討が必要と考えられる。

1. Zhao, X. *et al.* Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers. *Nat. Plants* **3**, 956–964 (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Mutuku J. Musembi, Cui Songkui, Yoshida Satoko, Shirasu Ken	4. 巻 230
2. 論文標題 Orobanchaceae parasite-host interactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 46 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Masumoto Natsumi, Suzuki Yuki, Cui Songkui, Wakazaki Mayumi, Sato Mayuko, Kumaishi Kie, Shibata Arisa, Furuta Kaori M, Ichihashi Yasunori, Shirasu Ken, Toyooka Kiminori, Sato Yoshinobu, Yoshida Satoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Three-dimensional reconstructions of haustoria in two parasitic plant species in the Orobanchaceae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiab005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa Satoshi, Wakatake Takanori, Spallek Thomas, Ishida Juliane K, Sano Ryosuke, Kurata Tetsuya, Demura Taku, Yoshida Satoko, Ichihashi Yasunori, Schaller Andreas, Shirasu Ken	4. 巻 -
2. 論文標題 Subtilase activity in intrusive cells mediates haustorium maturation in parasitic plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiab001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Cui Songkui, Kubota Tomoya, Nishiyama Tomoaki, Ishida Juliane K., Shigenobu Shuji, Shibata Tomoko F., Toyoda Atsushi, Hasebe Mitsuyasu, Shirasu Ken, Yoshida Satoko	4. 巻 6
2. 論文標題 Ethylene signaling mediates host invasion by parasitic plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abc2385	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wakatake Takanori, Ogawa Satoshi, Yoshida Satoko, Shirasu Ken	4. 巻 147
2. 論文標題 An auxin transport network underlies xylem bridge formation between the hemi-parasitic plant <i>Phtheirospermum japonicum</i> and host <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.187781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wada, S., Cui, S. and Yoshida, S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Reactive Oxygen Species (ROS) Generation is indispensable for haustorium formation of the root parasitic plant <i>Striga hermonthica</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.00328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Goyet, V., Wada, S., Cui, S., Wakatake, T., Shirasu, K., Montiel, G., Simier, P. and Yoshida S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Haustorium Inducing Factors for Parasitic Orobanchaceae.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 1056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshida, S., Kim, S., Wafula, E. K., Tanskanen, J., Kim, Y.-M., Honaas, L., et al.	4. 巻 29
2. 論文標題 Genome wequence of <i>Striga asiatica</i> provides insight into the evolution of plant parasitism.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr. Biol.	6. 最初と最後の頁 3041-3052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.07.086.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 吉田聡子
2. 発表標題 宿主由来シグナルによって制御される寄生植物の器官発生
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoko Yoshida
2. 発表標題 Cell-cell interaction between parasitic plants and host plants
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田聡子
2. 発表標題 モデル寄生植物の解析からみる植物間相互作用
3. 学会等名 植物科学シンポジウム2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田聡子
2. 発表標題 つながる根：寄生植物と宿主植物のフシギな関係
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相澤みお, Songkui Cui, 古田かおり, 吉田聡子
2. 発表標題 寄生器官を形成しないコシオガマ変異体の解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川井友裕, 伊藤元巳, 吉田聡子
2. 発表標題 ハマウツボ科寄生植物シオガマギクにおけるアーバスキュラー菌根菌感染条件の探索
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田将吾, 清水崇史, ツイソクイ
2. 発表標題 寄生植物ストライガの吸器誘導物質の探索
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mafrikhul MUttagin, Songkui Cui, Satoko Yoshida
2. 発表標題 Feeding behavior of Golden Apple Snail on rice and subsequent rice defense response
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Lei Xiang, Songkui Cui, Satoko Yoshida
2. 発表標題 Characterization of a root parasitic plant <i>Phtheirospermum japonicum</i> mutant that induces haustoria in the absence of host signal
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木夏美, 和田将吾, Songkui Cui, 吉田聡子
2. 発表標題 植物体のDMBQ培養により産生される寄生植物の吸器誘導物質の解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Songkui Cui, Yuri Takeda, Toshiaki Umezawa, Yuki Tobimatsu, Satoko Yoshida
2. 発表標題 Cellular and subcellular localization of haustorium inducing signals in the haustorium of the parasitic plant <i>Striga hermonthica</i>
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田将吾, 小堀俊吾, 熊石妃恵, Songkui Cui, 市橋泰範, 吉田聡子
2. 発表標題 寄生植物ストライガの吸器形成における遺伝子発現解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoko Yoshida
2. 発表標題 Genetic basis for host and parasitic plant communication
3. 学会等名 The 15th World Congress on Parasitic Plants (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoko Yoshida
2. 発表標題 Vascular connection between parasitic plants and host plants
3. 学会等名 Plant Vascular Biology 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Songkui Cui, Tomoya Kubota, Yuko Yoshimura, Ken Shirasu, Satoko Yoshida
2. 発表標題 Ethylene signaling mediates fine-tuning of host infection by parasitic plants
3. 学会等名 Molecular Plant Microbe Interaction (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoko Yoshida
2. 発表標題 Signal exchanges between parasitic plants and host plants to establish plant-plant connection
3. 学会等名 JSP2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷澤美杜里、Songkui Cui、吉田聡子
2. 発表標題 コシオガマにおける花粉を用いた形質転換法の検討
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田 将吾, 清水 崇史, Songkui Cui, 峠 隆之, 吉田 聡子
2. 発表標題 寄生植物ストライガの新規吸器誘導物質の探索
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関