

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658007

研究課題名(和文) 個体再生誘導遺伝子を応用した難個体再生作物の形質転換体作成技術の開発

研究課題名(英文) Utilization of regeneration-inducing genes to transform recalcitrant species.

研究代表者

京 正晴 (Kyo, Masaharu)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：70195395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：形態形成に関与することが知られているシロイヌナズナ転写因子の遺伝子を発現誘導型ベクターに搭載し、難個体再生作物およびニコチアナ属植物に導入し、その発現が組織培養において個体再生に及ぼす効果を調査した。cDNAはシロイヌナズナ全RNAからRT-PCRでクローニングしpER8ベクターにクローニングされアグロインフエクション法により各植物に導入を試みた。難個体再生作物では遺伝子導入された不定器官分化とそこから個体再生を期待したがこれまでのところ成功していない。しかし、タバコでは形質転換系統間の交雑個体を用いて、二遺伝子を共発現させた場合、単独よりも個体再生頻度が顕著に高まるという現象を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Using a chemical-induced gene expression system we examined the effect of several transcription factor genes related to morphogenesis or organogenesis in Arabidopsis on the regeneration in in vitro culture of explants of some recalcitrant crops and Nicotiana species. The cDNAs were amplified by RT-PCR using total RNA prepared from seedling or inflorescence of Arabidopsis, integrated into pER8 harboring XVE expression system and transferred to recalcitrant crops and Nicotiana through Agrobacterium infection method. In the recalcitrant species induction of transformants or transgenic organs were not successful so far. However, using hybrid lines of transgenic tobacco, we found that the co-expression of a pair of transgenes caused the regeneration at much higher frequency than single transgene expression did alone. This finding suggests the possibility to develop new transformation-vectors for inducing in vitro regeneration from explants of different species.

研究分野：植物細胞生理学

キーワード：個体再生 形質転換

1. 研究開始当初の背景

世界の食料生産における遺伝子組換え植物の需要は増加の一途でありその農業生産上の重要性は将来的にも揺るがないと考えられる。近い将来、国内においても近年のモデル植物を用いた植物機能の分子レベルの研究成果を種々の作物種の品種改良に活用することが重要課題となると考えられる。そのための基盤技術の進歩を考えたとき、遺伝子操作技術に比べて、形質転換植物育成技術は律速段階となると考えられる。形質転換植物作成技術は、1)細胞核への遺伝子導入技術と2)遺伝子導入を受けた細胞から個体を発生させる技術の2段階からなる。1)は幾通りかの異なる原理があったが、近年はその再現性の高さから *Rhizobium* 属の植物寄生菌の一種を利用したアグロインフェクション法が主流となっている。2)に関して、モデル植物シロイヌナズナでは例外的に花序に接種して得られた種子から形質転換体を選抜するという *in planta* 法が可能である。しかし、他の植物種ではこの方法は適用が困難であり、アグロインフェクション処理を施された組織片の培養を通じて個体再生を誘導し、導入遺伝子を有する個体を抗生物質耐性遺伝子などをマーカーとして選抜するという方法が一般的である。組織片からの個体再生誘導技術の原理は1950年代後半に発見された2つの現象に依っている。一つはタバコの組織片におけるサイトカイニン要求型の不定芽誘導であり、もう一つはニンジンで発見されたオーキシン依存性の不定胚形成能を持つカルス(EC)誘導である。従って、タバコまたはニンジンと同様の培養特性を示し、個体再生を誘導できる植物種だけが再現性のある遺伝子組換え実験を継続的に行うことができる。タバコやニンジンと同様の培養特性を示さない植物種は少なくない。長年、個体再生頻度を高めるべく植物ホルモンの種類や濃度、培地成分、外植片の種類などが研究されており、顕著な改善に至った例もある一方で、なお、個体再生が困難であり、その結果として遺伝子導入/形質転換体育成が困難な植物種(難個体再生作物)も少なくない。多くの作物に適用可能で高効率の遺伝子導入技術の開発は、遺伝子組換え技術を利用した品種改良における極めて重要な課題と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では当初の目的1とその後の実験経緯から目的2(後述)を設定した。目的1)申請者はすでにアラビドプシスの茎頂、根端、初期胚において機能することが知られている、WUSやWOX遺伝子をXVEシステム搭載のpER8ベクター(文献1)を用いてタバコに導入し、誘導的に発現させると実生の根端に不

定芽が発生するという現象を見いだしていた(文献2)。そのメカニズムは不明であるが、オーキシンやサイトカイニン投与では根端に不定芽を発生する例は知られていない。つまり従来から知られている、植物ホルモン(特にサイトカイニン)に依存した個体再生とは異なる原理による現象であると考えられた。本研究では、根端に不定芽発生を誘起する可能性のある遺伝子を組み込んだ誘導型発現ベクターをアグロインフェクション法によって、いくつかの重要作物の実生組織などに導入した後、まず、オーキシンを与えて不定根を誘導する。一般に植物組織培養において不定芽形成が難しい植物種でも、不定根は比較的容易に誘導できる場合が多い。従って、遺伝子導入された形質転換不定根を得ることは十分可能と考えられた。この形質転換した不定根において、導入された遺伝子を誘導的に発現させることによって、不定芽(形質転換個体)を発生させることができれば極めて重要な技術開発となると考えた。つまり個体再生技術が伴っていなかったために効率的な遺伝子組換え実験が困難であった植物種においてそれが可能になるわけである。植物ホルモンによらない新たな原理に基づくこのような個体再生技術(形質転換体育成技術)を開発することを目的1とした。

後述するように、目的1は達成が困難と予想されたので継続はしながらも、目的2を設定した。つまり、異所的発現誘導により個体再生を誘導できる遺伝子を新たに見いだすことを目標とした。そのための検定手段として、まずはモデル植物であるタバコおよび近縁のニコチアナ属を用い、上記と同様の遺伝子発現誘導技術を用いてサイトカイニン非要求性の個体再生を可能にする遺伝子を探索した。

3. 研究の方法

遺伝子cDNAはシロイヌナズナの実生または花序由来のtotal RNAよりRT-PCRによって増幅しクローニングされ、各々pER8のOLexA下流に挿入された。得られたプラスミドのT-DNAは *Agrobacterium* を介してタバコ葉片に導入し hygromycin 耐性形質転換体を得た。各遺伝子ごとに複数の形質転換体を得られたが、誘導物質(β -estradiol)による発現レベルには差が見られたので、最も高い発現レベルを示す個体を育成し自殖種子を得た。また交配によって二種の導入遺伝子を持つ系統も作出した。導入遺伝子の誘導的発現が個体再生誘導活性を持つかどうかを検定する方法として、下記のようなタバコ葉片培養法を開発した。無菌的に栽培した形質転換体から若い成葉を採取し、3-4 mm角に切断し、マルチウェルシャーレを用いて液体培地で培

養した。1st culture として、 $1 \mu\text{M}$ 2,4-D と $0, 1, 10 \mu\text{M}$ の β -estradiol を含む LS 液体培地で 2 週間培養した。2nd culture として、LS 寒天培地に移植し約 3 週間培養後観察した。二種類の遺伝子の共発現の効果を調査するために上記のように交雑システムを作成したが、発現レベルを揃えるために二遺伝子導入用ベクターを In-Fusion system (Clontech) を用いて作成した。

4. 研究成果

近年、アラビドプシスでは種々の転写因子の異所的過剰発現によって個体発生が誘導できることが報告されているが、このような現象を他の植物種、とくに植物ホルモンによる個体再生がこれまできわめて低頻度であるような作物(難個体再生作物)において再現できれば重要な技術開発となるであろう。我々は、*WUS* などを pER8 ベクターを用いて導入したタバコでは導入遺伝子の誘導的発現によって根端に不定芽が誘導されることをすでに報告したが、この現象を上記のような作物に誘導することが当初の目的であった。まず、いくつかの候補植物に関して、アグロインフェクション法による遺伝子導入が可能かどうか調査した。核局在性の緑色蛍光蛋白質をマーカーとして試みたところ、実生切片において部分的に導入できることが確認された(Fig. 1 上段)。

実生外植片にはオーキシン存在下で不定根が誘導できることが確かめられたので、多数の外植片にアグロインフェクション法による *WUS* 遺伝子導入を行った後、不定根の誘導を行った。多数の不定根を伴った外植片に対して遺伝子発現誘導物質(β -エストラジオール)を投与したが根端の形態変化は認められなかった。再度、蛍光蛋白質遺伝子を用いて調査したところ、蛍光を示す不定根は皆無ではないが非常にまれで、それらは必ずキメラ状に蛍光は根の一部に限定されていた。つまり不定根の起源が単一細胞ではないために導入遺伝子のキメラ状態が発生し、タバコの場合のような応答が得られないのではないかと考えた。種々改善を試みたがこれまでに不定根先端部からの不定芽誘導現象は観察できていない。目的 1 の目処が立たない状況において、異所的発現誘導により *WUS* より強力に個体再生を誘導できる遺伝子を新たに見いだすことを第 2 の目的とした。再生誘導効果の検定法として、葉片培養を用いた。当初の研究目的に鑑み、特にサイトカニン非要求性の個体再生法を、まずモデル植物であるタバコで、次いで *Nicotiana* 属の再生頻度の低い種において開発することを目的 2 とした。研究室保存の各種遺伝子導入タバコの葉片を用いて、上記方法に述べた様に 1st culture、2nd culture を実施したが、個体再生を観察できなかった。そこでアラビドプシス胚発生の初期過程で発現する *WOX2*, *WOX8*,

WOX9 について pER8 ベクターによる転写制御下で、形質転換体を示す培養特性について調査し、各遺伝子の葉片上の個体再生誘導作用を調査した。

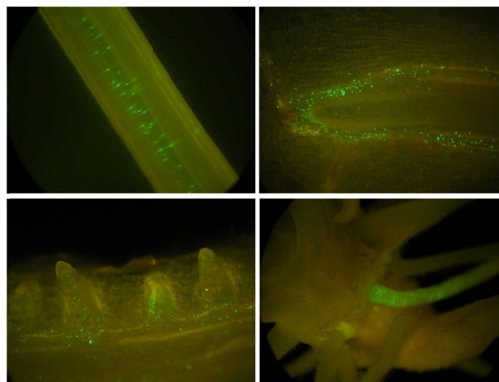


Fig.1 アグロインフェクション法によるマーカー遺伝子導入と発現。上段：実生外植片に観察される緑色蛍光蛋白質によるシグナル。おそらく内鞘組織の細胞の核に蛍光シグナルが観察されている。下段：処理切片から発生した不定根。蛍光を示す核はキメラ様に分布した。

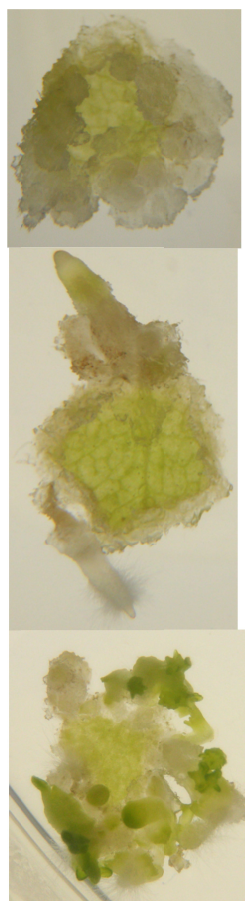


Fig.2 葉片培養による導入遺伝子発現が形態形成へ及ぼす効果。無菌的に栽培した形質転換体から若い成葉を採取し、3-4 mm 角に切断して、 $1 \mu\text{M}$ 2,4-D と $0, 1, 10 \mu\text{M}$ の β -estradiol を含む LS 液体培地で 2 週間培養した。LS 寒天培地に移植し約 3 週間培養後観察した。上段中段：誘導物質なし(コントロール)。カルスや不定根形成が見られる。下段：誘導物質存在下では不定芽様構造が発生した。

WOX2では、低頻度ながら不定様構造の発生が認められたがWOX8およびWOX9にはそのような作用は全く認められなかった。二遺伝子の共発現について交雑系統を育成して調査したところ、興味深いことにWOX2とWOX8およびWOX2とWOX9の組み合わせで共発現させた場合に高い頻度で不定芽様構造が観察された(Fig. 2)。

タバコは組織培養のモデル植物として多く用いられているが葉片からの不定芽誘導にはサイトカイニンを要求性し、今回のようなサイトカイニン非存在下では不定芽は観察されない。以上の知見を基に、両遺伝子を搭載したベクターを作成してアグロインフエクション法によるタバコを含むニコチアナ属植物の葉片への導入を行い、サイトカイニンを含まない条件で形質転換体のスクリーニングを試みたところ、低頻度ながら形質転換体を得る事ができた。得られたタバコ形質転換体では交雑系統と同様、高い頻度で不定芽様構造を誘導することができた。このような個体再生能を賦与する活性のある遺伝子を選抜マーカーとする形質転換用ベクターを用いれば、目的1へ立ち戻り、難個体再生作物へ応用できる可能性があると考えられる。タバコ属以外への応用については今後の課題である。

文献

- 1 Zuo et al. (2000) Plant Journal 24,265-73
- 2 Rashid and Kyo(2007)Plant Cell Reports 26,1449-55

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2件)

米田和納、西岡由貴、岡田知里、京正晴
WOX 遺伝子の誘導的発現による個体再生誘導効果 第 32 回日本植物細胞分子生物学会(盛岡)大会シンポジウム講演要旨集 p140, 2014 年 8 月 21-22 日 岩手県盛岡市アイーナ(いわて県民情報センター)

K. Maida, Y. Nishioka, C. Okada, M. Kyo
Ectopic expression of WOX genes is effective on the morphogenesis in a tobacco leaf segment culture system, 農学先端科学研究フォーラム：ファイトジーン可能性と未来 VII, 2014 年 9 月 31 日 香川県高松市サンポート高松シンボルタワー

6. 研究組織

(1)研究代表者

京 正晴 (KYO, Masaharu)
香川大学・農学部・教授
研究者番号：70195395