

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32661

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660297

研究課題名(和文)セイロンベンケイの不定芽形成を利用した遺伝子導入法の開発と不定芽形成機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism of asexual reproduction of Kalanchoe pinnata and development of its transformation method

研究代表者

高橋 秀典 (TAKAHASHI, Hidenori)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：70318210

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)：sGFP-tubulin遺伝子がクローニングされたベクターを持つアグロバクテリウムを作製した。形質転換能力確認のために行ったシロイヌナズナへの遺伝子導入は成功したので、セイロンベンケイへの導入を行った。カルスを経由する手法では遺伝子導入に成功したが、葉上不定芽形成を利用した方法では様々な条件を試してもうまくいかなかった。

不定芽形成機構の解明のため、サイトカイニンの分解と合成に関わる遺伝子(順にAt-CKXとAt-IPT遺伝子)を単離した。それぞれがクローニングされたベクターを持つアグロバクテリウムを作製し、遺伝子導入により、IPT遺伝子の導入候補を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Agrobacterium was transformed by a vector in which sGFP-tubulin gene was subcloned. After its transformation ability was confirmed by using Arabidopsis, transformation of Kalanchoe pinnata was performed. Although transformation with tissue culturing process was succeeded, transformation using asexual reproduction failed. In order to clarify the mechanism of asexual reproduction of K. pinnata, genes for degradation and synthesis of cytokinin (At-CKX and At-IPT genes, respectively) were isolated. These genes were used for the transformation of K. pinnata, and candidates for IPT gene transformant were obtained.

研究分野：植物生理学

キーワード：セイロンベンケイ 細胞・組織工学 遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

本研究の研究材料は、多肉植物のセイロンベンケイである。セイロンベンケイの葉を枝から切り離して水に浸しておく、一般的な植物とは異なり、種子を経ないでも、約4日で葉の周囲から葉上不定芽と呼ばれる芽が生じる。この葉上不定芽は発生を続け、やがて大人の植物体へと成長する。このような特異な増殖様式をとることから、セイロンベンケイは「ハカラメ(葉から芽)」という別名をもっている。セイロンベンケイの近縁植物も含めて、葉上不定芽形成に関する研究は古く、既に100年以上も前にGoebel(1900)が葉上不定芽発生時の形態変化について報告している。

葉上不定芽形成を制御する植物ホルモンを特定するために、著者らはセイロンベンケイの葉の外部から様々な植物ホルモン、あるいはその阻害剤を投与する実験を行った。その結果、サイトカニンが不定芽形成制御因子の有力な候補として考えられた。しかし、葉が多肉で植物ホルモンやその阻害剤が透過しにくいいためか、データのばらつきが大きく、確信を持つに足るような明瞭な結果は得られなかった。そこで、外部から植物ホルモン処理を行う代わりに、遺伝子操作により植物体内のホルモン量を直接変化させることで、葉上不定芽形成を制御する植物ホルモンを特定しようと考えたのが、本研究のきっかけである。

2. 研究の目的

(1)第一の目的

本研究の第一の目的は、葉を枝から切り離すと約4日で葉上不定芽が発生するというセイロンベンケイの特徴を生かし、葉上不定芽の元となる細胞(または細胞集団)にアグロバクテリウムを介して遺伝子導入することで、短時間で遺伝子組換え植物を得る手法を開発することである。この手法が確立できれば、セイロンベンケイは任意の遺伝子の機能解析に適した、新たなモデル植物となりうるものとして期待される。

(2)第二の目的

さらに本研究では、上記(1)で確立する遺伝子導入系を利用して、葉上不定芽形成の分子生理学的仕組みを明らかにすることを第二の目的とした。具体的には、植物ホルモンの中でも不定芽形成の制御因子と考えられるサイトカイニンの内生量を増加もしくは減少させた個体を作成し、それが表現型に与える影響の調査を通して、葉上不定芽形成がサイトカニンによりどのように制御されているかを解明する。

なお、上記(1)で目指す葉上不定芽形成を利用した迅速な遺伝子導入法の確立がうまくいかない場合は、代替りの方法として、形質転換体を得るまでに時間はかかるが、カルスを経由して形質転換体を得る手法を確立

する。そしてこの手法により、サイトカイニンの内生量を増加もしくは減少させた個体の作出を行う。

3. 研究の方法

(1)植物材料

本研究では、セイロンベンケイ(*Kalanchoe pinnata*)とシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* Columbia株)を用いた。これらの植物体は、25℃に保たれた室内において、連続明期条件下で栽培した。

(2)シロイヌナズナの形質転換と薬剤選抜

花序浸し法(大門、他、2005)に従い、形質転換を行った。その後、それらの植物体からF₁種子を採取し、カナマイシン入りのMS寒天培地に播種して、遺伝子導入候補の薬剤選抜を行った。

(3)蛍光顕微鏡観察

遺伝子導入を行ったセイロンベンケイ、またはシロイヌナズナの葉を採取し、オリンパス株式会社の共焦点レーザー顕微鏡AX70を使って観察した。

(4)ゲノムPCR

セイロンベンケイの葉の一部を採取し、ゲノムDNAの粗抽出を行った。その後、東洋紡株式会社のKOD FX Neoを用いて、*sGFP-tubulin* 遺伝子、*At-IPT* 遺伝子、*nptII* 遺伝子、*virG* 遺伝子のそれぞれに特異的なDNAプライマーと共に、ゲノムDNA粗抽出液に対するPCRを行った。

(5)シロイヌナズナの*At-CKX*と*At-IPT*遺伝子の単離とクローニング

株式会社ニッポンジーンのISOGENを用いて、シロイヌナズナの全RNAの抽出を行った。その後、タカラバイオ株式会社のPrimeScript High Fidelity RT-PCR Kitを用いて、*At-CKX*と*At-IPT*遺伝子に特異的なプライマーを使ってRT-PCRを行い、両遺伝子のタンパク質コード領域全長を増幅した。ライフテックノロジーズジャパン株式会社のpCR4Blunt-TOPOベクターへのクローニングを経て、最終的には、タカラバイオ株式会社のpRI 101-ANにそれぞれをクローニングした。シーケンシングによる塩基配列の確認は、受託サービスを利用した。

(6)カルスを経由したセイロンベンケイへの遺伝子導入

sGFP-tubulin 遺伝子、*At-CKX* 遺伝子、*At-IPT* 遺伝子がそれぞれクローニングされたベクターを持つアグロバクテリウムとセイロンベンケイの葉片を、25℃の暗所においたMS寒天培地上で7日間共存培養した。その後、カナマイシンを含むMS寒天培地に葉片を移植し、25℃での16時間明期/8時間暗期条件下でカルスの誘導と選抜を行った。そして、

25 での 16 時間明期 / 8 時間暗期条件下で、カルスからの植物体の再生を行った。

4. 研究成果

(1) *sGFP-tubulin* 遺伝子がクローニングされたベクターを持つアグロバクテリウムの作製と形質転換能力の確認

セイロンベンケイの遺伝子導入系を開発する際、遺伝子導入の成否を迅速かつ容易に判断できる遺伝子を使うことが望ましい。そこで、遺伝子導入体候補が得られた場合、ゲノム PCR や RT-PCR などを行わずに、その植物体の一部を採取して蛍光顕微鏡観察を行うだけで遺伝子導入の成否を判断できる、*sGFP* とチューブリンの融合遺伝子 (*sGFP-tubulin* 遺伝子) に注目した。

まず、植物細胞内での過剰発現を可能とするカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの下流に *sGFP-tubulin* 遺伝子がクローニングされたベクターを持つ、アグロバクテリウムを作製した。シーケンシングにより、塩基の取り込み間違いが無いことを確認した後、花序浸し法 (大門、他、2005) に従ってシロイヌナズナへの遺伝子導入を行った。ここから採取した T₁ 種子に対して、カナマイシンによる薬剤選抜を行ったところ、遺伝子導入体候補と思われる緑色の芽生えが得られた。この候補体の葉を採取し、蛍光顕微鏡で観察したところ、*sGFP-tubulin* の特徴を示す緑色の繊維状構造が見られた (図 1)。

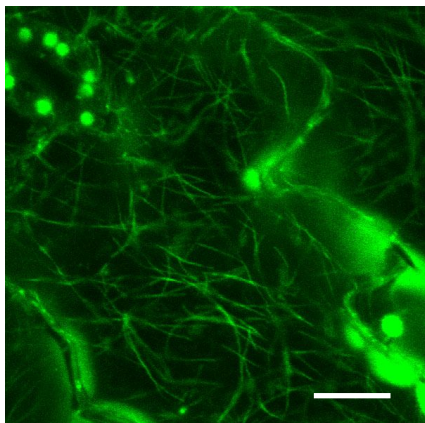


図1 *sGFP-tubulin* 遺伝子の導入を行ったシロイヌナズナの葉の共焦点レーザー顕微鏡写真。バーは 20 μm を示す。

このことから、本研究での *sGFP-tubulin* 遺伝子を持つベクターの調製と、このベクターを有するアグロバクテリウム株の両者は、今後セイロンベンケイへの遺伝子導入を行う上で問題なく機能するであろうことが確認された。

(2) セイロンベンケイへの *sGFP-tubulin* 遺伝子の導入

そこで、このベクターとアグロバクテリウム株を用いて、セイロンベンケイの形質転換を行った。アグロバクテリウムを感染させる

際の前処理として、無処理の葉片の他、超音波処理、針による穿孔処理、紙やすりやメスによる傷害処理など、様々な物理的処理を行った葉片をそれぞれ用意した。また、アグロバクテリウムを感染させる際に、葉片と共に減圧浸潤処理 (大門、他、2005) を行う手法も試みた。

カナマイシンによる薬剤選抜を行ったところ、いずれの場合も葉上不定芽が発生せず、あるいは、葉上不定芽が発生しても白色化または枯死してしまい、遺伝子導入体候補と思われる緑色の葉上不定芽は得られなかった。

アグロバクテリウム懸濁液の菌体濃度や、共存培養時の条件、抗生物質濃度なども様々に変えてみたが、遺伝子導入体候補を得ることはできなかった。

一方、葉片をアグロバクテリウムと共存培養させた後、カルスを經由して植物体を再生させる手法では、カナマイシンによる薬剤選抜をかけた後でも、遺伝子導入体候補と思われる緑色を維持した植物体が生き残った。そこで、この候補からゲノム DNA を抽出して PCR を行ったところ、*sGFP-tubulin* 遺伝子の増幅が見られた。さらに、共焦点レーザー顕微鏡で遺伝子導入体候補の葉を観察したところ、*sGFP-tubulin* に起因すると思われる緑色の繊維状構造を観察することができた (図 2)。

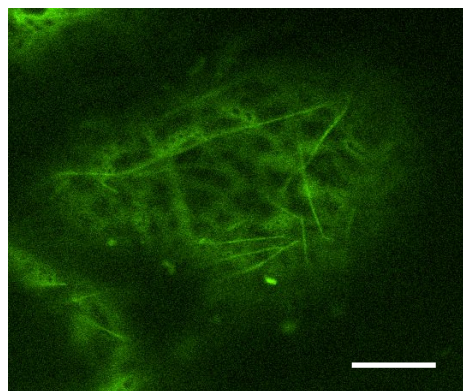


図2 *sGFP-tubulin* 遺伝子の導入を行ったセイロンベンケイの葉の共焦点レーザー顕微鏡写真。バーは 10 μm を示す。

従って、カルスを經由する方法では、遺伝子導入する条件を確立できたと判断した。

(3) *At-CKX* と *At-IPT* 遺伝子を過剰発現させたセイロンベンケイの作出

上記で確立したカルスを經由する遺伝子導入法により、内生サイトカイン量を変化させるべく、サイトカニンの分解と合成に関わる遺伝子 (順に *CKX* と *IPT* 遺伝子) の単離を行った。セイロンベンケイ自身の *CKX* と *IPT* 遺伝子を使って、セイロンベンケイの植物体内でこれらの遺伝子を過剰発現させることが望ましいが、セイロンベンケイ自身の *CKX* と *IPT* 遺伝子は単離されておらず、その塩基配列は不明である。本研究で単離をすることも検討し

たが、単離で思わぬ苦労をすることも考えられた。一方、シロイヌナズナの遺伝子(*At-CKX*と*At-IPT*遺伝子)は塩基配列情報が既にわかっているため、単離も容易である。そこで、ヘテロな系にはなるが、シロイヌナズナから*At-CKX*と*At-IPT*遺伝子を単離して、セイロンベンケイの植物体内で過剰発現させることにした。

*At-CKX*と*At-IPT*遺伝子のタンパク質コード領域全長をRT-PCRで増幅後、それぞれが35Sプロモーターの下流にクローニングされたベクターを持つアグロバクテリウムを作製した。シーケンシングにより、塩基の取り込み間違いが無いことを確認した。前項(2)で確立した、カルスを経由する手法でこれらの遺伝子導入を行ったところ、カナマイシン選抜下でも生存する緑色の遺伝子導入候補体が得られた(図3)。

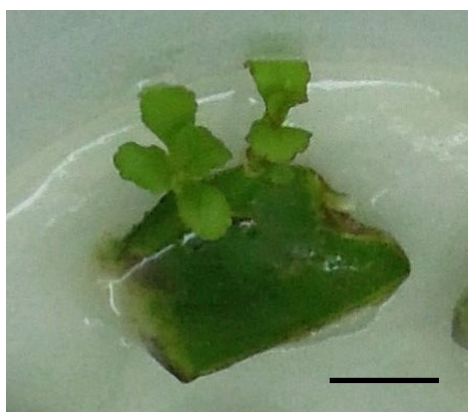


図3 *At-IPT*遺伝子の導入を行ったセイロンベンケイの葉片と再生してきた植物体。バーは1 cmを示す。

そこで、これらの候補体からゲノムDNAを抽出してPCRを行ったところ、導入を行った*At-IPT*遺伝子の他に、遺伝子導入時に一緒に導入されるカナマイシン耐性遺伝子(*nptII*遺伝子)の増幅が見られた。しかし同時に、植物ゲノム中には導入されないが、アグロバクテリウムが有する*virG*遺伝子の増幅も見られた(図4)。

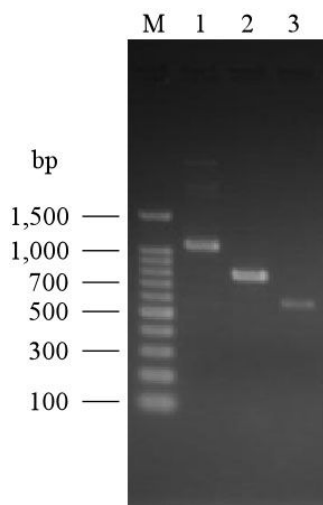


図4 *IPT*遺伝子の導入を行ったセイロンベンケイの葉片から再生してきた植物体に対して行ったゲノムPCRの結果(一例)

レーンM: DNAマーカー
 レーン1: *At-IPT*遺伝子の増幅
 レーン2: *nptII*遺伝子の増幅
 レーン3: *virG*遺伝子の増幅

このゲノムPCRの結果の解釈では、2つのケースが考えられる。すなわち、アグロバクテリウムが残存しているが、*At-IPT*遺伝子の導入は成功している、アグロバクテリウムが残存しているだけで、*At-IPT*遺伝子は導入されていない、というものである。

しかし、ゲノムPCRの結果だけでは、この2つの解釈のうちのどちらが正しいかを判断することができない。そこで現在、これらの遺伝子導入候補体に対してRT-PCRを行い、*At-IPT*遺伝子のmRNAの存在を確認することを通して、遺伝子導入とその発現の成否を確認中である。

一方、*At-CKX*遺伝子の遺伝子導入に関しては、残念ながら現在までのところ遺伝子導入候補は得られていないため、再度遺伝子導入を行っているところである。

<引用文献>

- Goebel, K. (1900) Organography of plants. I: 42. Oxford.
 大門靖史、阿部光知、荒木 崇 (2005) 減圧浸潤法および花序浸し法によるシロイヌナズナの形質転換。『改訂3版 モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ編』(植物細胞工学シリーズ 21)。島本功、岡田清孝、田畑哲之(編)。秀潤社、pp. 149-154.

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 秀典 (TAKAHASHI, Hidenori)
 東邦大学・理学部・准教授
 研究者番号: 70318210

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし

(4) 研究協力者

小野寺 瞳 (ONODERA, Hitomi)
 森田 祐一 (MORITA, Yuuichi)