

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07600

研究課題名(和文) 自発的な胚発生誘導システムを搭載した植物遺伝子組換えベクターの開発

研究課題名(英文) Development of the plant transformation vector harboring an auto-embryogenesis system

研究代表者

井川 智子 (Igawa, Tomoko)

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号：00360488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子組換え植物を作出するためには、細胞へ遺伝子を導入して、その後ゲノムが組み換えられた細胞から再び植物体を再生するプロセスを経る。細胞からの植物体再生には複数の種類の植物ホルモン処理を必要とするが、この処理条件の模索には労力と時間を要し、研究発展の妨げとなっている。本研究では、胚発生遺伝子を目的遺伝子と共に導入する方法を検討した結果、植物ホルモンを添加しなくても組換え細胞が自発的に分化する遺伝子導入ベクターの作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子組換え技術は実用面だけでなく、様々な植物種での遺伝子機能解析を可能にし、有用な遺伝資源を見出すためにも必要な技術である。しかし、遺伝子組換え体作出法が適用できる植物種に限るのが現状であり、それが細胞からの植物体再生法確立の難しさに起因している。本研究では組換え細胞が自発的に体作りを行う能力を目的遺伝子の導入と共に付与するシステムを構築しているため、今後多様な植物種での適用が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：To produce a genetically modified plant, gene transfer processes followed by plant regeneration from the transgenic cells are required. Plant regeneration from somatic cells often requires treatment with multiple types of plant hormones. However, exploring the conditions takes labor and time, hindering the development of plant science. In this study, we developed a vector system where embryogenesis-regulating genes in addition to the gene of interest are located. As a result, we succeeded in producing a gene transfer vector in which transgenic cells spontaneously differentiate without any plant hormone treatment.

研究分野：植物生殖工学

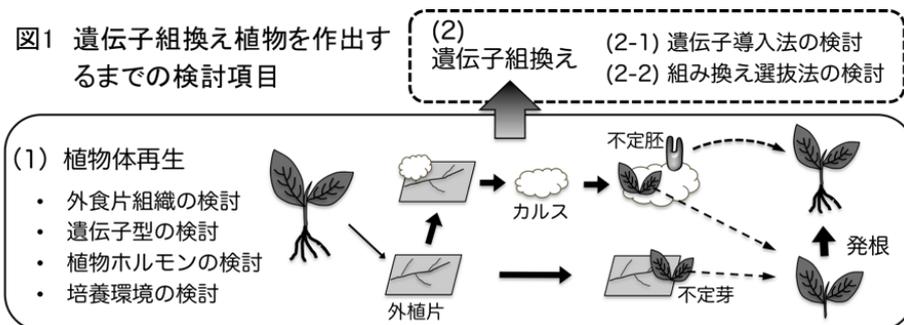
キーワード：植物バイオテクノロジー 遺伝子組換え 分化

### 1. 研究開始当初の背景

植物の遺伝子組換え技術は、基礎研究においては遺伝子機能解析を、応用研究においては新形質の付与を可能とするなど、植物科学研究の発展には極めて重要な技術である。近年、モデル植物に加えて実用植物のゲノム情報も蓄積してきている。また CRISPR/Cas9 によるゲノム編集植物を作出するためには CRISPR 遺伝子群を導入する遺伝子組み換えプロセスを必要とするため、改めて、多様な植物での遺伝子組換えを可能にする技術開発の必要性が認識されていた。

ほとんどの植物種では、体細胞へ遺伝子を導入し、組み換え細胞のみを選抜後に植物体を再生させる必要がある。従って、遺伝子組換え植物を作出するためには前提として細胞からの植物体再生系が確立されている必要がある(図1)。植物体再生条件の設定試験では一般に、様々な種類及び濃度の植物ホルモンの処理実験を行い、適切なバランスの組み合わせ条件を探さなければならない。その他培養環境や、供試材料として用いる植物組織の部位・齢についても考慮する必要がある。しかし、一度設定した培養条件に対する反応は、異なる品種や個体毎の遺伝子型の違いが影響して偏差が生じることも珍しくない。再現性の高い植物体再生条件が設定できるかは運頼みでもあり、膨大な項目の条件を検討しても系の確立に至らないケースも多いのが現実で、植物遺伝子組換え研究の汎用性拡大における障壁の1つとなっている。

有用遺伝子機能について蓄積されている膨大な基礎研究知見は主にモデル植物であるシロイヌナズナを用いた研究によるもので、実用植物での植物機能研究展開例や植物改良例は寡少である。実用植物種を用いた研究展開上の障壁の1つが培養と組み換えの困難さであり、それゆえに着手に至らない、という状況は植物科学研究における大きな課題でもあるため、本研究で課題解決を目指すこととした。



### 2. 研究の目的

多様な植物種での機能解析及び開発研究を促進するためには上述した課題をクリアしなければならない。上述した課題の中でも、本研究では遺伝子組換え実験の前提となる、「細胞からの植物体再生プロセスを確立する」作業を割愛できる遺伝子組換えシステムの構築を最終目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、基盤システム搭載ベクターの構築と多様な植物におけるシステム有効性の評価を計画した。近年 *BBM*、*WUS*、*IPT*、*STM*、*WIND1*、*LEC2*、*GRF* といった転写因子が植物器官の分化や脱分化を制御すると報告されている。これらの殆どはモデル植物で機能が同定されたものだが、非モデル植物を含む異植物種間での機能保存性も報告されてきている。これらの因子を過剰発現させた組換え植物体では、体細胞組織上に不定胚またはカルスが形成され、外生的な植物ホルモンの処理なしに分化状態が維持される表現型を示した例もある。本研究ではシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) から上記転写因子をクローニングし、遺伝子発現ベクターを構築後、アグロバクテリウムによってタバコ (*Nicotiana tabacum*) の葉片 (リーフディスク) 細胞に導入した。接種当代の外植片を培養中に観察される分化反応について調査し、導入遺伝子の種類および発現制御について効果を検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) タバコ外植片からの再分化に及ぼすシロイヌナズナ *BBM* の影響評価

シロイヌナズナ開花後 7 日目の雌ずい由来の cDNA を合成し、*BBM* 遺伝子をクローニングして発現カセットを構築した (図 2a)。これを座乗させたバイナリーベクターを *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 に導入し、タバコリーフディスク ( $\phi 7\text{mm}$ ) に接種して 3 日間の共存培養を行った。その後図 2b に示す植物ホルモン (計 4 区分) をそれぞれ含む MS 培地上で除菌・選抜を行い、培養 4 週間後の発生シュート数をカウントすることで分化反応を調査した。

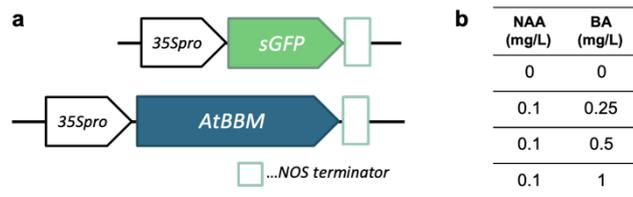


図 2 導入遺伝子の発現コンストラクト (a) と培養に用いた植物ホルモン組成 (b)  
*AtBBM*; *Arabidopsis thaliana* BABYBOOM, 35Spro; CaMV 35S promoter, NAA; Naphthaleneacetic acid, BA; Benzylaminopurine

表 1 タバコリーフディスクからの再分化に及ぼすシロイヌナズナ *BBM* 及び植物ホルモン影響評価

NAA (mg/L)	BA (mg/L)	導入遺伝子	総葉切片数	総シュート数	1葉切片あたりのシュート誘導数平均±SE	再分化頻度 (%)
0	0	35Spro:GFP	62	0	0	0
		35Spro:AtBBM	88	0	0	0
0.1	0.25	35Spro:GFP	47	5	0.1±0.1	10.6
		35Spro:AtBBM	42	16	0.4±0.1	38.1
0.1	0.5	35Spro:GFP	39	8	0.2±0.1	20.5
		35Spro:AtBBM	47	33	0.7±0.1	70.2
0.1	1	35Spro:GFP	42	217	5.2±0.1	516.7
		35Spro:AtBBM	54	111	2.0±0.4	205.6

その結果、植物ホルモンを含まない培地で培養した場合は *GFP* および *BBM* を導入したリーフディスク共に分化反応を示さなかった (表 1)。NAA 0.1 mg/l と BA 0.5 mg/l を添加した培地上では、*BBM* を導入したリーフディスクからの不定シュート再分化頻度が上昇した (有意差あり)。しかし、NAA 0.1 mg/l と BA 1.0 mg/l を添加した培地上ではこの再分化効果が減少したように見られた (ただし、 $P=0.06$  と有意差は検出されなかった)。この結果から、*BBM* はサイトカニンに対する細胞の応答性に影響することが示唆された。しかし *BBM* のみの導入では植物ホルモン処理を伴わない再分化が達成できなかったため、*BBM* と同時に別の胚発生制御遺伝子を導入する方法を検討することとした。

##### (2) タバコ外植片からの再分化に及ぼすシロイヌナズナ *BBM* と *LEC1* の導入効果

シロイヌナズナ *LEC1* は初期胚発生に関与し、シロイヌナズナ過剰発現体での不定胚形成が報告されている。そこで *BBM* との共導入による再分化への影響を検証した。図 3a に示す T-DNA 領域を座乗させたバイナリーベクターを *A. tumefaciens* EHA105 株へ導入して、上述と同様に接種及び培養を行った。比較対象として *BBM* のみを導入した区を設けた。

その結果、植物ホルモンを含む培地においても、*LEC1* を *BBM* と共導入した場合にタバコリーフディスクからの不定シュート形成が著しく抑制された (図 3b)。従って *BBM* を *LEC1* と組み合わせると再分化におけるタバコの内在性ホルモン作用経路に負の効果をもたらすと考えられた。

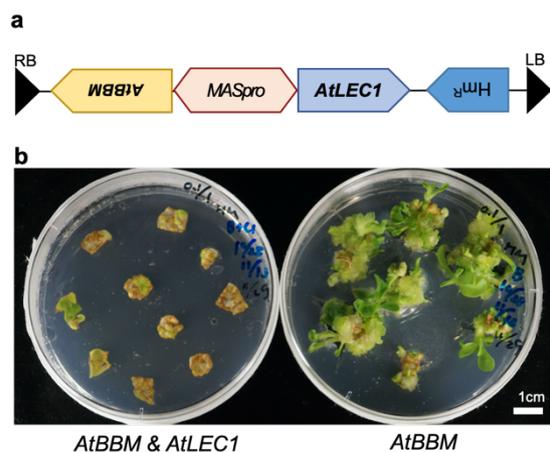


図 3 導入に用いた T-DNA コンストラクト (a) と不定芽誘導における効果 (b)  
 (b)は接種から約 1 ヶ月後の写真。NAA 0.1 mg/l, BA 1.0 mg/l を培地に含む。AtLEC1; *A. thaliana* LEC1, Hm<sup>R</sup>; ハイグロマイシン耐性遺伝子。

### (3) *BBM* と *WUS* の共導入がタバコの形質転換効に及ぼす影響調査

*BBM* と *LEC1* との組合せでは再分化誘導にネガティブな結果が得られたため、*BBM* と *WUS* の組合せを検証することとした。さらに *BBM* の発現レベルをエンハンサー付加によって制御した場合の効果も検証した (図 4a)。この試験においては、サツマイモのアントシアニン合成を制御する *MYB* 転写因子遺伝子 (*IbMYB*) を可視化マーカーとして使用し、赤紫色に呈色した不定シュート数をもとに形質転換効率を評価した。なお、アグロバクテリウム感染後の培養には NAA 0.1 mg/l と BA 1.0 mg/l を添加した培地を用いた。その結果、得られた赤紫色シュート数においては *BBM* を導入した試験区で最も高い形質転換効率を示した。

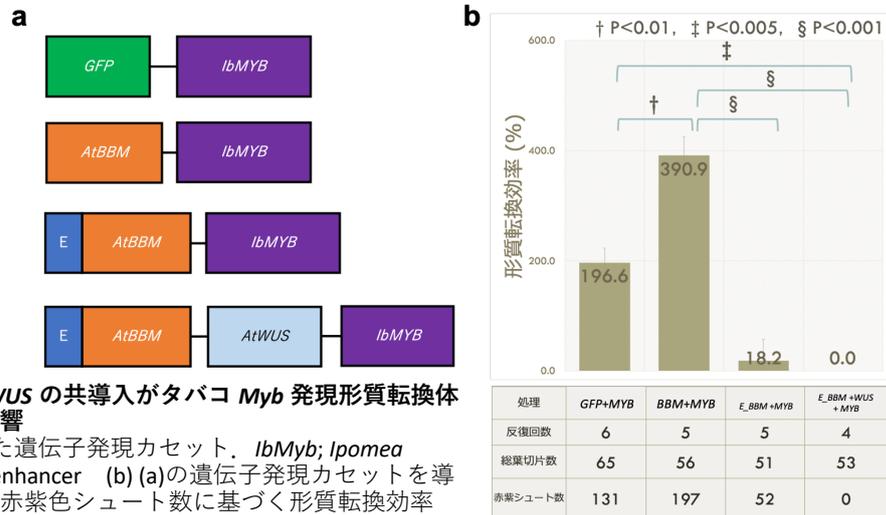


図 4 *BBM* と *WUS* の共導入がタバコ *Myb* 発現形質転換体作出に及ぼす影響

(a) 導入に用いた遺伝子発現カセット. *IbMyb*; *Ipomea batatas Myb*, E; enhancer (b) (a) の遺伝子発現カセットを導入後に発生した赤紫色シュート数に基づく形質転換効率

同様の実験を、培地にホルモンを添加しない植物ホルモンフリー条件でも行った。その結果、*BBM*+*IbMYB* を導入したタバコリーフディスクでは分化反応は観察されず、シュートも形成されなかったが (図 5a)、*E<sub>BBM</sub>*+*WUS*+*IbMYB* を導入したリーフディスクからは、カルスの形成が観察された (図 5b)。このカルスを単離して同様に植物ホルモンフリーの培地上で培養を続けると、緑色の不定芽用の構造が発生した (図 5c)。これらのカルス及び不定芽のゲノム DNA を抽出し PCR で確認したところ、導入遺伝子の増幅産物が検出され、形質転換体が含まれていた。従って、*IbMYB* 遺伝子の発現による赤紫色の呈色が起こらなかったものの、*BBM* と *WUS* を共導入することで培

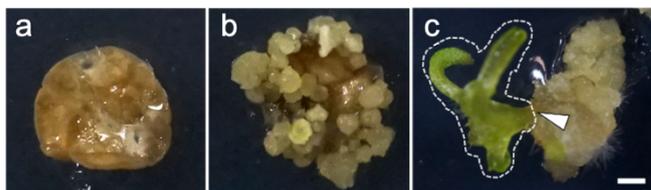


図 5 *AtBBM* 及び *AtWUS* を導入した葉切片における分化反応

アグロバクテリウム感染と共存培養後、植物ホルモンを含まない培地上で培養後の写真. a, *BBM* のみを導入した葉切片. b, *BBM* と *WUS* を導入した葉切片. カルス形成が見られる. c, b から単離したカルスより、植物ホルモンを含まない培地上で再分化した不定芽 (△で示した点線). Bar = 1 mm.

地に植物ホルモンを添加せずに脱分化反応を誘導できることが見出された。直接的な原因は今後追究する必要があるが、*WUS* は *MYB* の機能に抑制的な影響を及ぼすと考えら得る。本解析結果からは、組換え細胞の分化の方向性 (脱分化か再分化か) は導入した *BBM* 及び *WUS* 遺伝子の発現制御法によっても異なることが分かった。今後は *BBM* と *WUS* を共導入する方法を基盤として、組み換え細胞の分化を導く細胞生理の把握と、培養系の確立を不要とする遺伝子組換え法の開発を行う。

察された (図 5b)。このカルスを単離して同様に植物ホルモンフリーの培地上で培養を続けると、緑色の不定芽用の構造が発生した (図 5c)。これらのカルス及び不定芽のゲノム DNA を抽出し PCR で確認したところ、導入遺伝子の増幅産物が検出され、形質転換体が含まれていた。従って、*IbMYB* 遺伝子の発現による赤紫色の呈色が起こらなかったものの、*BBM* と *WUS* を共導入することで培

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 福田真由, 佐藤優加, 井川智子	4. 巻 3
2. 論文標題 植物遺伝子組換え体作出の簡便化を目指したベクターシステムの開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 40-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakiko Hirutani, Kazuki Shimomae, Akira Yaguchi, Dong Poh Chin, Masahiro Mii, Tomoko Igawa	4. 巻 142
2. 論文標題 Efficient plant regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of Begonia semperflorens-cultorum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)	6. 最初と最後の頁 435-440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11240-020-01858-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuka Sato, Tomoko Igawa
2. 発表標題 Control of dedifferentiation and differentiation from transgenic cells
3. 学会等名 26th International Conference of Sexual Plant Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤優加, 井川智子
2. 発表標題 育種への応用を目指した, 胚発生関連遺伝子による全能性コントロール
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 佐藤優加、井川智子
2. 発表標題 植物の形質転換を簡便化する遺伝子導入ベクターの開発および再分化の評価
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 福田真由、井川智子
2. 発表標題 明視野選抜マーカーの誘導的脱落による新規遺伝子組換え法の開発
3. 学会等名 日本育種学会 第135回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤優加、井川智子
2. 発表標題 植物の形質転換の簡便化を目的とした組換えベクターの開発
3. 学会等名 第81回日本植物学会大会
4. 発表年 2017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
---------	---------