

令和元年6月10日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19241

研究課題名(和文)微弱電流処理による植物の形質制御システムの開発

研究課題名(英文)Development of characteristic control system of plants by faint electricity

研究代表者

小暮 健太郎(KOGURE, Kentaro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授

研究者番号：70262540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、水耕栽培系においてsiRNAやプラスミドDNA等を水溶液中に共存させることで植物の形質を転換することができるか検証することを目的とし、シロイヌナズナ水耕栽培システムを用い、蛍光標識化オリゴDNAを含有する溶液中で微弱電流処理を行い、根茎細胞内への蛍光標識オリゴDNAの評価に挑戦した。その結果、動物組織と同様に植物組織内にも微弱電流処理により蛍光標識化オリゴDNAが浸透することを世界で初めて見出した。さらに、根でも多く発現しているPHYB等の遺伝子に対するsiRNA存在下で微弱電流処理したところ、期待に反してmRNAの有意な抑制は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、植物の水耕栽培系において、siRNA等の機能性核酸を共存させ、微弱電流処理することによって、根茎組織中に核酸を送達する技術の確立に成功した。今後、細胞内への取り込みの有無を明らかにし、機能性素子と組み合わせsiRNA等を細胞質まで送達できる工夫を開発することで、容易に植物の形質転換を行う技術が確立されれば、効率よく機能性の高い植物食品の開発が可能になるとともに産業の発展に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried the delivery of fluorescent-labeled oligo DNA into rhizome of *Arabidopsis thaliana* by treatment with weak current (WC) to prove whether we can transform plant traits via WC treatment with siRNA or plasmid DNA. We succeeded in the delivery of fluorescent-labeled oligo DNA into rhizome by WC treatment. However, it was difficult to control expression of mRNA in rhizome by WC treatment with siRNA.

研究分野：薬物送達

キーワード：微弱電流 植物 siRNA送達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまで薬学領域においてイオントフォoresis (IP) による皮膚内への薬物送達研究に従事してきた。IP とは、微弱電流 ($0.3 \sim 0.5 \text{mA/cm}^2$) を皮膚表面に印加することで、荷電性物質を皮膚内部に浸透させる技術である。従来は、適用可能な物質は適度な脂溶性を有し、電荷を有する低分子化合物に限定されていたため、分子量 10000 以上の物質には不適であると考えられていた。

しかし、研究代表者は siRNA (分子量 12000 以上) やナノ粒子 (粒子径 400nm 以上のリポソーム等) の IP に成功している。これらの高分子物質・粒子が IP によって皮内に浸透送達可能な機構を検討した結果、微弱電流処理が Gap-junction や Tight-junction 等を壊すことによって皮膚組織細胞間隙を開裂させること、さらに細胞の物質取り込みと細胞質送達を著しく促進することを世界で初めて発見した (J. Biol. Chem. (2014)、J. Control. Release (2016))。この現象は、微弱電流が細胞の膜電位を変化させることで、細胞シグナル系が活性化されて引き起こされることが示唆されている。研究代表者は、特に微弱電流処理 (0.34mA/cm^2 、15 分間) によって細胞のエンドサイトーシスが誘起され、高分子物質やナノ粒子を含む細胞外液が細胞内に多量に取り込まれること (J. Control. Release (2016)、Sci Technol Adv Mater (2016))、さらに取り込まれた物質が微弱電流処理直後、極めて速く (10 分程度) 細胞質に漏出することが見出された点に興味を抱いた。すなわち、微弱電流で細胞を処理することで核酸等の高分子物質を効率よく細胞質まで容易に送達できる点である。

研究代表者は、「この現象を利用すれば、siRNA およびプラスミド DNA (pDNA) 等の核酸を非侵襲的かつ効率的に細胞質へ送達可能であり、ウイルスなどを用いず形質を制御できるのではないか」という仮説を立てるに至った。さらに、動物細胞も植物細胞も、構造に相違はあるものの、その細胞生理には共通点が多いため、微弱電流への応答も、動物細胞同様に植物細胞でも誘起されるのではないかと期待し、本研究において植物細胞に着目することにした。多くの植物は、水耕栽培が可能であるため、水中において根茎部分の微弱電流処理が容易であり、siRNA や pDNA を栽培水に添加することで、容易に根茎細胞質に送達し、遺伝子発現制御および外来タンパク質発現を行うことができるのではないかと発想した。

2. 研究の目的

上記の研究背景に基づき、本研究では「水耕栽培系において siRNA や pDNA 等を含む水溶液中で、植物の根茎部分を微弱電流処理することにより、siRNA 等を植物細胞内に送達することで植物の形質を転換できるか検証すること」を目的とした。具体的には、市販の水耕栽培キットを用い、多くの研究知見があるシロイヌナズナを対象として、核酸含有水槽に電極を設置し、微弱電流処理を施すことにより、根茎内部への核酸の送達、さらには植物の形質転換もしくは機能性タンパク質産生の有無を検討することを目指した。すなわち、葉緑素 (クロロフィル) 合成遺伝子等に対する siRNA 等の機能性核酸を栄養液に共存させて、シロイヌナズナの根茎部の微弱電流処理を経日的に実施することで、外来核酸の根茎部細胞内送達と機能発現制御を検討することを目的とした。これらの研究を実施することで、微弱電流処理による植物の形質制御システムの開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 微弱電流によるシロイヌナズナ細胞への外来核酸の細胞質送達の検証

微弱電流処理による外来核酸の細胞質送達の検証：

シロイヌナズナ水耕栽培システム (Araponics system) を用い、寒天で満たした Seed-holder にシロイヌナズナの種を播き、蛍光標識化オリゴ DNA を含有する栄養溶液槽に浸す。ヒト心電図検査用電極 (Ag/AgCl 電極) シートを栄養溶液槽両端に張り付け、微弱電流 (0.3mA/cm^2) でシロイヌナズナを 15 分間処理する。蛍光標識化オリゴ DNA 共存下でのシロイヌナズナの微弱電流処理後、1 時間後にシロイヌナズナを Seed-holder から回収し、根茎部の切片を作成する。共焦点レーザー顕微鏡により細胞内の蛍光標識オリゴ DNA を観察評価する。

微弱電流処理の最適化：

上記微弱電流処理条件 (0.3mA/cm^2 、15 分間) は、これまでラット・マウスの個体および動物細胞を用いた実験における条件であったため、植物細胞では最適条件が異なる可能性が高い。種々の電流強度、および処理時間において蛍光標識化オリゴ DNA 存在下での微弱電流処理を行い、処理後に回収したシロイヌナズナのホモジネートにおける蛍光強度を定量測定することで、最も多く最も効率よくオリゴ DNA を根茎に送達可能な処理条件を最適化する。

微弱電流処理による植物細胞へのダメージの検証：

微弱電流処理後の根茎を採取し、切片を調製した後、アポトーシス検出キットを用いて、細

胞死の有無を評価する。

(2) HEMA1 遺伝子がコードするグルタミル tRNA 還元酵素 GluTR1 に対する siRNA を微弱電流処理によって導入したシロイヌナズナのクロロフィル合成阻害の検証 (担当: 小暮、田中、三橋)

GluTR1 に対する siRNA 存在下での微弱電流処理による細胞質送達と遺伝子発現抑制効果の検証:

(1) において微弱電流処理による外来核酸オリゴ DNA の細胞質送達が確認された後、同様に微弱電流処理によって GluTR1 に対する siRNA をシロイヌナズナ細胞質に導入する。処理後 24 時間経過時に、シロイヌナズナを Seed-holder から回収し、根茎部について RNA 抽出キットを用いて mRNA を抽出し、Real time PCR 法により GluTR1 の mRNA 量を定量し、siRNA による RNAi 効果を検証する。

GluTR1 に対する siRNA の微弱電流処理による植物の形質転換の検証:

(2) - において微弱電流処理による RNAi 効果が確認されたら、GluTR1 に対する siRNA を添加した栄養溶液中での微弱電流処理を 1 日 1 回行い、1 週間栽培を行う。1 週間後の外観形質を無処理と比較するとともに、クロロフィルを抽出し、定量することで、GluTR1 に対する siRNA の微弱電流処理によるシロイヌナズナの形質転換を検証する。

(3) 微弱電流処理によって GFP コードプラスミド DNA を導入したシロイヌナズナにおける GFP タンパク質産生の検証 (担当: 小暮、田中、石川、三橋)

GFP プラスミド DNA 存在下での微弱電流処理によるシロイヌナズナへのプラスミド DNA 細胞質送達の検証:

siRNA による形質転換が確認された後、より分子量の大きいプラスミド DNA の共存下で微弱電流処理を行い、シロイヌナズナの細胞質への GFP プラスミド DNA の送達を検討する。すなわち、微弱電流処理後の根茎部を回収し、GFP プラスミド DNA に対するプライマーを用いた Real time PCR 法により、GFP プラスミド DNA の送達量を定量する。

GFP プラスミド DNA 存在下での微弱電流処理によるシロイヌナズナ中における GFP mRNA 発現と GFP タンパク質産生の検証:

GFP プラスミド DNA の微弱電流処理 24 時間後に、シロイヌナズナを Seed-holder から回収し、根茎部について RNA 抽出キットを用いて mRNA を抽出し、Real time PCR 法により GFP の mRNA 量を定量し、GFP プラスミド DNA による遺伝子発現を検証する。さらに、GFP プラスミド DNA の微弱電流処理 24 時間後に、根茎部の切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡により GFP の発現の有無を検討する。

4. 研究成果

研究代表者は、本研究において微弱電流処理による動物細胞および動物個体への高分子薬物・微粒子送達に関する実績に基づき、「微弱電流処理による植物細胞の生理機能変化を利用すれば、siRNA およびプラスミド DNA 等の核酸を非侵襲的かつ効率的に細胞質へ送達可能であり、ウイルスなどを用いずとも形質を制御できるのではないか」という仮説を立てた。従って、本研究の目的は、本仮説を検証し、微弱電流処理による植物の成長と形質の制御システムを開発することであった。すなわち、「水耕栽培系において siRNA やプラスミド DNA 等を水溶液中に共存させ、微弱電流処理によって植物細胞内に送達し、植物の形質を転換することができるか検証すること」を本研究の目的としていた。具体的には、シロイヌナズナ水耕栽培システム (Araponics system) を用いシロイヌナズナをある程度まで成長させた後、蛍光標識化オリゴ DNA を含有する溶液中で、ヒト心電図検査用電極シートを用いて根茎部に対して微弱電流処理を行い、根茎部切片を共焦点レーザー顕微鏡により観察することで、根茎細胞内への蛍光標識オリゴ DNA の評価に挑戦した。

平成 29 年度は、シロイヌナズナ自身の自家蛍光のため、蛍光標識化オリゴ DNA の組織内浸透を正確に評価することができていなかったが、種々の条件を検討することで、最適化に成功した。その結果、微弱電流処理によって、動物組織と同様に、植物組織内にも蛍光標識化オリゴ DNA が浸透することを世界で初めて見出した。さらに、根茎部でも多く発現している Phytochrome B (PHYB) 等の遺伝子を標的として、それらに対する siRNA 存在下でシロイヌナズナの根茎部を微弱電流処理したところ、mRNA の減少は観察されたが、siRNA 無しの条件での結果との差が有意ではなく、siRNA が送達されることによるのか判断ができない結果であり、期待に反して mRNA の有意な抑制は認められなかった。今後、微弱電流処理によって根茎組織内部に浸透した核酸が、動物細胞同様に植物細胞内にまで取り込まれているのか、さらには細胞質

まで送達されているのかを明らかにする必要があると考えている。さらに、細胞膜透過性ペプチドとして知られるオリゴアルギニンペプチドや GALA ペプチドに代表される pH 応答性ペプチドなど、機能性素子との組み合わせにより、siRNA 等を植物細胞の細胞質まで送達できる工夫を開発したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 田中 保

ローマ字氏名: (TANAKA, Tamotsu)

所属研究機関名: 徳島大学

部局名: 大学院医歯薬学研究部(薬学域)

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 90258301

研究分担者氏名: 福田 達也

ローマ字氏名: (FUKUTA, Tatsuya)

所属研究機関名: 徳島大学

部局名: 大学院医歯薬学研究部(薬学域)

職名: 助教

研究者番号(8桁): 90805160

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 三橋 亮介

ローマ字氏名:(MITSUHASHI, Ryosuke)

研究協力者氏名:石川 みすず

ローマ字氏名:(ISHIKAWA, Misuzu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。