

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14828

研究課題名（和文）イネのプラスチド形質転換法の確立

研究課題名（英文）Developing the method for plastid transformation of rice

研究代表者

堤 伸浩（Tsutsumi, Nobuhiro）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：00202185

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）：イネのプラスチド形質転換法の開発を目的に、その基盤技術である培養法と選抜系について改良と検討を行った。まず、遺伝子導入効率を改善するためにプラスチドの発達した緑色組織の培養系を検討し、幼苗の茎頂近傍組織およびマルチプルシュート誘導培養系を構築した。また、従来法のカルス培養系を用いて新たに開発した亜硝酸選抜法によるプラスチド形質転換を行い、高効率で遺伝子を導入することに成功した。また、導入遺伝子が次世代（T1）個体においても保持されていることを確認した。今後、形質転換個体の詳細解析によりプラスチド形質転換法の確立に向けた改良をさらに進めていく予定である。

研究成果の概要（英文）：For the purpose of developing rice plastid transformation method, we improved and examined cultivation methods and transgene selection systems. First, in order to improve gene transfer efficiency, a culture system of plastid developed green tissue was examined, and the shoot apex with developing leaves and a multiple shoot induction culture system of the seedling were developed. In addition, plastid transformation by the newly developed nitrite selection method using the conventional rice callus was carried out and it succeeded in highly efficient gene introduction. It was also confirmed that the transgene was retained in the next generation (T1). Through the detailed analysis of transformed plants, we will further study the improvement to establish the plastid transformation method in rice.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：プラスチド 形質転換 オルガネラ 選抜マーカー

1. 研究開始当初の背景

植物の細胞小器官プラスチドは物質代謝や光合成機能、ソース・シンク機能の切替えにより様々な環境変化に適応するための重要な働きを担っている。このようなプラスチドの機能を解明する事は作物の環境適応性の向上や有用物質を高生産する作物の開発等に応用することができる。しかしながらそのような研究に有効なプラスチド形質転換法は、一部の双子葉植物種しか利用できない状況にある。

2. 研究の目的

本研究ははまだ有効な方法が開発されていないイネのプラスチド形質転換法を開発することを目的に、その基盤技術である培養法の改良と選抜系の検討を行った。具体的には(1)導入効率の向上が期待される緑色組織への遺伝子導入・再分化系を構築すること、(2)新規選抜法として選抜効果が見出されていた亜硝酸選抜系のイネへの適用性の検証を目的に研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) イネ緑色組織の培養系の構築

多数のプラスチド形質転換の成功例が報告されているタバコでは、発達した大きなプラスチド(葉緑体)を含む緑色葉の培養系によりプラスチド形質転換が行われている。一方、イネでは緑色組織からの植物体の再生が困難であるため種子組織に由来するカルスを用いてプラスチド形質転換が試みられていた。カルス細胞内のプラスチドは未発達でサイズが小さいプラスチド(プロプラスチド)であるため、このことが遺伝子の導入を困難にしている要因の一つと考えた。そこで、よりプラスチドが発達した緑色組織を形質転換材料として利用するためイネ緑色組織の培養系の構築を試みた。供試材料にはイネ幼苗の茎頂分裂組織近傍の緑葉を含む組織、およびカルスからの再分化誘導初期に発生する緑色シュートの集合体(マルチプルシュート)を用いイネ培養で一般的に用いられる脱分化・再分化培地を用いて培養系の構築を検討した。

(2) 亜硝酸選抜法のイネプラスチド形質転換への適用

プラスチド形質転換系の構築には適切な選抜系の利用が不可欠である。タバコのプラスチド形質転換では、スペクチノマイシンとその耐性遺伝子である *aadA* 遺伝子を用いた選抜系により効率的な形質転換系が構築されている。しかしながらイネはスペクチノマイシンに耐性を持つためスペクチノマイシン選抜系を利用することができない。また、その他の有効な選抜系が見いだされていないことが大きな課題となっている。これまでに本研究者らは、イネ科バイオマス植物であるスイッチグラスを用いて亜硝酸選抜系

がプラスチド形質転換に利用可能であることを示していた。そこで、亜硝酸選抜系がイネプラスチド形質転換にも適用可能かどうかを検証するため、イネ由来の亜硝酸還元酵素遺伝子(*NiR*)を選抜遺伝子としたプラスチド形質転換ベクターを作成し、イネカルスへパーティクルガンを用いてプラスチド形質転換を行った。

4. 研究成果

(1) イネ緑色組織の培養系の構築

茎頂分裂組織近傍領域の緑色組織培養無菌的に播種した発芽後1週間のイネ幼苗の根と種子を取り除き根の接続部より5mmの地上部組織を切り出し縦に切断した。切断した茎頂分裂組織近傍領域の組織を脱分化を促す2,4-Dを含む培地に置床し約1~1か月半28 暗所で培養したところ、脱分化カルスの発生、増殖が確認された。生じたカルスはサイトカイニンを含む再分化誘導培地での培養により正常なシュートを多数発生させた。

マルチプルシュート培養系の構築

2,4-Dを含む培地でイネ完熟種子を培養して得られる培養後3-4週間目のカルスをサイトカイニン含有培地に移しシュート再生を促した。その後、シュート再生初期に観察されるマルチプルシュートを2,4-Dを含む脱分化誘導培地に再び置床し、脱分化性とカルス増殖、増殖カルスの再分化性能を確認した(図1)。



図1 .マルチプルシュートの脱分化誘導(左)と脱分化カルスの再分化誘導(右)

以上の通り、発達初期の緑色組織を用いることにより脱分化・再分化系の構築は可能であることが明らかにできた。今後、これら緑色組織をプラスチド形質転換の材料として用い遺伝子導入効率への効果について検証する。

(2) 亜硝酸選抜法のイネプラスチド形質転換への適用

日本晴およびコシヒカリの完熟種子を2,4-Dを含むカルス誘導培地に置床し、約1か月後、増殖したカルスをプラスチド形質転換の材料とした。図2に示したベクターDNAを0.6μm金粒子にコーティングしパーティクルガンを用いてカルスに導入した。

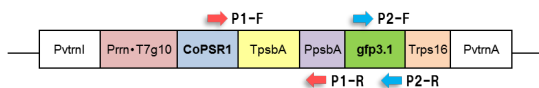


図 2. イネプラスチド形質転換に用いた導入ベクター-pPvCpg

選抜遺伝子およびレポーター遺伝子としてプラスチドゲノムコドンに合わせて改良したイネ由来の *NiR* 遺伝子 (CoPSR1) と緑色蛍光タンパク質遺伝子 (gfp3.1) の発現カセットが含まれており、両端にプラスチドゲノム内の trnI, trnA 領域との相同配列 (PvrtnI, PvrtnA) を持つ。

導入処理後、亜硝酸を含む培地でカルス増殖とシュート再分化を促した。得られた亜硝酸耐性シュートから total DNA を抽出し PCR 法により遺伝子導入確認を行った。PCR の結果の一例を図 3 に、PCR 解析のまとめを表 1 に示す。

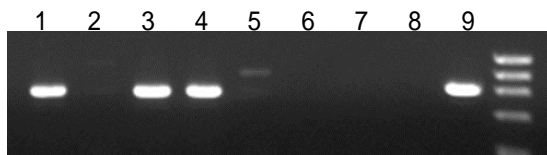


図 3 亜硝酸耐性シュートの PCR による導入ベクター断片の増幅

図 2 で示した P1-F および P1-R プライマーを用いた。No.1, 3, 4, 9 の個体が形質転換体であると示唆された。

表 1 亜硝酸耐性シュートの PCR 解析まとめ

Variety	Total regenerated shoots	PCR primer sets	Transformed shoots	Transformed / regenerated shoots (%)
Nipponbare	108	P1	37	34.26
		P2	5	4.63
		P1 & P2	4	3.70
Koshihikari	77	P1	26	33.77
		P2	36	46.75
		P1 & P2	13	16.88

(プライマーセットは図 2 に図示)

これまでのイネプラスチド形質転換の報告では 100 - 120 プレートへの導入実験で形質転換個体が 2 個体のみ得られた、という非常に低効率な結果であった。それに対し本研究ではわずか 3 プレートへの導入実験で合計 87 個体の形質転換体を得られた。しかしながら、表 1 に示した通り、得られた形質転換体の大部分は 2 つのプライマーセットのうち的一方のみでしか増幅が確認できなかった。そのため、遺伝子導入が確認された個体について、導入 DNA 配列が想定通りの相同組換えにより組み込まれているかどうかを確認するため、導入配列全域にわたる PCR や TAIL-PCR 法による導入位置の特定を試みたが、これらの方法では導入様式の詳細は明らかにできなかった。このことは断片的な組換えや組換え後のゲノムの再編成、核ゲノムへの組換え

等の可能性を示唆している。現在、次世代シーケンサーを用いてこれら形質転換体の全ゲノム配列を解析している。現時点では複数箇所に断片的に導入されていることを示唆するデータが得られている。今後、導入様式を詳細に解析し得られた解析結果を基にさらにベクターの改良や導入・選抜条件の見直しを進める予定である。

また、導入遺伝子の次世代への遺伝について調べるため、次世代 (T_1) 種子が得られた系統について各 5 個体の T_1 個体を栽培し、total DNA を抽出した。 T_0 個体と同様の PCR を行い、導入された DNA 断片の伝搬について解析した。調べた 7 系統全てで 5 個体の T_1 個体のうちの 1 - 3 個体で導入断片が維持されていることが分かった。

本研究により、亜硝酸選抜系がイネのプラスチド形質転換に有効であることが示された。今後、緑色組織の培養系や種子への直接導入等についても検討し、イネプラスチド形質転換法の確立に向けてさらに研究を進める。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

西村明日香、大熊二郎、廣瀬文昭、田部井豊、堤伸浩、近藤康弘

「イネ科植物のプラスチド形質転換」

イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2016
2016年7月4日～5日 名古屋大学 愛知県、名古屋市)

西村明日香、高師知紀、林少揚、山本敏央、芦荻基行、瀧永里子、矢野 憲司、堤 伸浩、松岡 信

「イネカルスの再分化能関連遺伝子の解析」
日本育種学会 2017年3月29日～30日 名古屋大学(愛知県、名古屋市)

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 伸浩 (Nobuhiro TSUTSUMI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：00202185

(2) 研究分担者

西村 明日香 (Asuka NISHIMURA)
東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員

研究者番号：70767342

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()