

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05964

研究課題名（和文）広い植物種への高効率形質転換を可能にする次世代型スーパーアグロバクテリウムの開発

研究課題名（英文）Molecular Breeding of next generation Super-Agrobacterium for broad host range

研究代表者

野中 聡子（Nonaka, Satoko）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：50580825

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、広い植物種での形質転換効率の向上に向けて防御応答誘発物質のサリチル酸に着目し、アグロバクテリウムの改良を試みた。アグロバクテリウム感染後のトマトの子葉外植片でのサリチル酸合成酵素およびサリチル酸応答遺伝子の発現上昇が認められた。シュードモナスからサリチル酸分解酵素遺伝子を単離したが、試験期間中にはアグロバクテリウムで遺伝子を発現させるには至らなかった。メロン不定胚誘導形質転換法で開発済みのアグロバクテリウムの効果を調査したが、形質転換体が得られなかった。アグロバクテリウムによる遺伝子導入は形質転換のうちの重要なステップの一つであるが、再分化系の最適化がより重要である可能性が高い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

形質転換技術は、遺伝資源プールの拡大を可能にする技術であり、育種の幅を広げることを可能にする技術として注目を集めてきた。近年では、CRISPR/Cas9などの人工制限酵素遺伝子の植物ゲノムへの導入技術としても利用されている。しかしながら、形質転換技術は、作物種ごと、品種や系統によっても形質転換効率が大きく異なり、形質転換技術およびゲノム編集技術の育種利用の大きな律速となっている。研究期間内では、形質転換効率を向上させるアグロバクテリウムの作出には至らなかったが、本研究の達成により、広い植物種での形質転換効率が可能となるため、育種分野へ貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to improve Agrobacterium by focusing on salicylic acid, a defense response inducer, in order to increase transformation efficiency in a wide range of plant species. Increased expression of salicylic acid synthase and salicylic acid response genes was observed in tomato cotyledon explants after infection with Agrobacterium. A salicylic acid decomposition enzyme gene was isolated from Pseudomonas, but the gene could not be expressed in Agrobacterium during the test period. We investigated the effect of Agrobacterium, which had been developed for the melon somatic embryo induction transformation method, but no transformants were obtained. Gene introduction using Agrobacterium is one of the important steps in transformation, but optimization of the regeneration system is likely to be even more important.

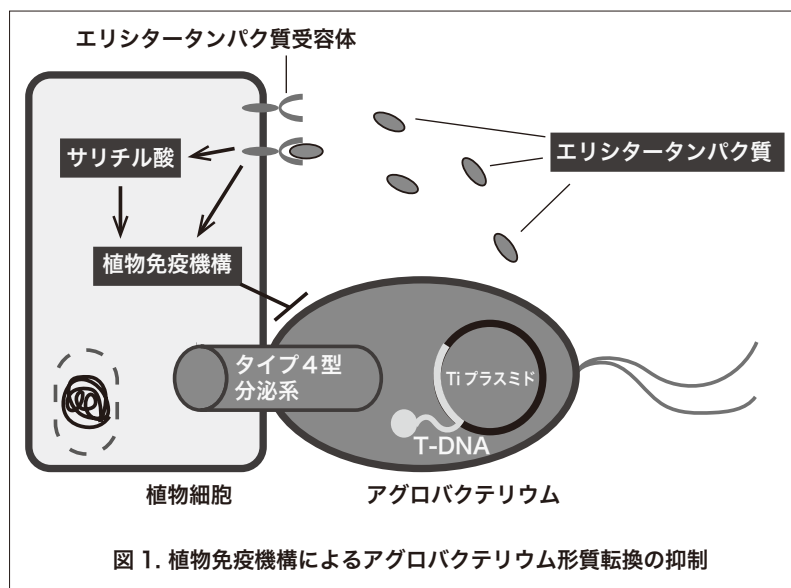
研究分野：植物育種

キーワード：形質転換技術 ゲノム編集技術 アグロバクテリウム

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでにアグロバクテリウムの感染時、植物から発生し、形質転換を阻害する植物ホルモンのエチレンや低分子アミノ酸の γ -アミノ酪酸(GABA)に着目し、その除去能力をアグロバクテリウムへ付与した。その結果、いくつかの難形質転換植物で高効率な形質転換が可能になった。しかしながら、エチレンや GABA の発生量は植物種、作物種、品種・系統により多様であり、十分な効果が得られない場合もあった。作物を含むさらに広範囲な植物種への高効率な形質転換を可能にするためには、広い植物種に共通する形質転換阻害機構に着目してアグロバクテリウムを改良する必要がある。

植物が共通に有する形質転換阻害機構の一つに、植物免疫機構がある。植物は、病原菌由来のタンパク質（エリシター）の受容後、植物ホルモンのサリチル酸を発生させ、植物免疫機構を誘導する。一方で、植物病原菌は、植物免疫機構を打破するタンパク質を植物細胞へ導入し植物への感染を完了させる。最近の研究で、アグロバクテリウムが他の植物病原菌と同様に植物免疫機構を誘導し、形質転換を阻害することが示された(図1)。



エリシター受容体破壊植物や植物病原菌由来の植物免疫機構打破タンパク質の過剰発現植物では、アグロバクテリウム法による形質転換効率が向上した。一方で、アグロバクテリウムからは、植物免疫機構打破タンパク質は見出されていない。このような背景から申請者は、「アグロバクテリウムへの植物免疫機構抑制能力の付与は、多種多様な植物への高効率な形質転換系の構築に有効か？」という問いを立てた。

2. 研究の目的

本研究では、多くの植物種が共通して保持する植物免疫機構に着目し、有用作物を含めた多種多様な植物種への高効率な形質転換を可能にする次世代型スーパーアグロバクテリウムの開発を試みる。

3. 研究の方法

本研究では、有用作物を含む多種多様な植物種への高効率な形質転換系構築するために、植物免疫機構に着目しアグロバクテリウムを改良する。その具体的な戦略は、①アグロバクテリウムの植物免疫機構誘導物質(エリシター)の除去、②植物免疫機構誘導物質(サリチル酸)除去能力のアグロバクテリウムへの付与、③植物免疫打破タンパク質のアグロバクテリウムへの付与である。

① アグロバクテリウムの植物免疫機構誘導物質(エリシター)の除去

アグロバクテリウムのエリシタータンパク質(EF-Tu)は単離されており、遺伝子も同定されている。また、植物が持つ EF-Tu タンパク質受容体(EFR)も単離されている。EFR受容体破壊植物では、アグロバクテリウム法による形質転換効率が向上する。したがって、アグロバクテリウムの EF-Tu の除去は、形質転換効率の向上に有効である。そこで、本研究項目では、アグロバクテリウムの EF-Tu タンパク質をコードする遺伝子の破壊を試みる。アグロバクテリウムをはじめとする細菌では、相同組換えによる遺伝子破壊が容易にできるため、EF-Tu 遺伝子の破壊は、相同組換え法を利用し実施する。

② 植物免疫機構誘導物質(サリチル酸)除去能力のアグロバクテリウムへの付与

アグロバクテリウムの感染により、植物からサリチル酸が発生する。サリチル酸は、植物免疫機構を誘導する。実際に、植物から発生するサリチル酸は、アグロバクテリウム法による形質転換を阻害する(Yuan *et al.*, 2007 PNAS)。本研究項目では、シュードモナス(*Pseudomonas putida*)由来のサリチル酸分解酵素(NahG)活性をアグロバクテリウムへ付与し、形質転換能力の向上を試みる。申請者はこれまでにエチレン前駆物質の 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)を分解する酵素 (acdS) 活性と GABA を分解する酵素 (gabT)活性をアグロバクテリウムへそれぞれ単独で付与し、難形質転換植物への形質転換効率を向上させた。本研究項目では、NahG 活性付与がアグロバクテリウム法による形質転換効率向上に有効であることを確認後、NahG 活性、acdS 活性、gabT 活性をアグロバクテリウムへ同時に付与する。

③ 植物免疫打破タンパク質のアグロバクテリウムへの付与

植物免疫機構は、第一段階と第二段階とからなり、シュードモナス(*P. syringae*)はどちらにも効果のある植物免疫打破タンパク質を有している。一方で、アグロバクテリウムはいずれも有していない。また、植物免疫打破タンパク質過剰発現植物系統では、アグロバクテリウム法による形質転換効率が向上した。そこで、本研究項目では、高効率形質転換系の構築のために、植物免疫機構打破タンパク質 HopAd と AvrPtoB をアグロバクテリウムへ付与する。シュードモナスは、タイプ3型タンパク質分泌系とそのシグナル配列を利用し、植物免疫打破タンパク質を植物細胞へ導入する。一方で、アグロバクテリウムは、タイプ4型タンパク質分泌系とそのシグナル配列を利用する。このため、シュードモナス由来の植物免疫打破タンパク質をアグロバクテリウムへ付与しても、植物細胞へ導入されない可能性がある。そこで、植物免疫打破タンパク質のタイプ3型分泌シグナル配列をタイプ4型分泌シグナル配列とへ置き換えて利用する。植物免疫打破タンパク質の植物細胞への導入確認は、アグロバクテリウムの植物への感染後、タンパク質を抽出しウェスタンブロット法により実施する。そのために、これらのタンパク質の抗体を作成する。植物免疫機構への抑制効果は、植物免疫機構下流の防御応答遺伝子群の発現解析により評価する。

本研究では、シュードモナス由来の *NahG* 遺伝子、*HopAd* 遺伝子、*AvrPtoB* 遺伝子をアグロバクテリウムのコドンユーセージに変換し利用する。それぞれの遺伝子のアグロバクテリウムへの導入は、アグロバクテリウム内で安定的に高コピー数保持される高宿主域ベクター (pBBR1MCS5) を利用する。また、遺伝子駆動には植物への感染時にアグロバクテリウムでもっとも高く発現する遺伝子のプロモーターを利用する。形質転換効率の評価は、申請者が確立した評価法により実施する(Nonaka *et al.*, 2018, Sci. Rep.)。対象植物は、メロン、トマト、トウガラシ、サツマイモである。トウガラシ、サ

ツマイモは、品種多様性が大きく、アジアやアフリカ地域の重要な作物である。なお、これらの作物は、難形質転換作物であり、高効率形質転換系は高い需要が見込まれている。

4. 研究成果

本研究では、形質転換が難しいとされるメロンの形質転換に用いて効果を調査した。メロンの形質転換法には、液体培地を用いる不定胚誘導法と固形培地を用いる不定芽誘導法がある。まずは、不定胚誘導法は、再分化効率が良いと報告がされていたため、まずはこの手法を用いて効果を試みた。4000 以上のメロン外植物片に対し形質転換を試みたが、エチレン発生抑制および GABA 分解阻害を付与したアグロバクテリウムを用いても形質転換体を得ることができなかった。次に、固形培地を用いて不定芽誘導法を用いて形質転換を試みたところ、開発済みのアグロバクテリウムを用いずとも、形質転換体を得ることができた。その効率は 100 メロン外植片から 1 から 2 の形質転換体を得られるほどであった。以上のことから、アグロバクテリウムによる遺伝子導入は形質転換のうちの重要なステップの一つであるが、再分化系の最適化がより重要である可能性が高い。

これまでの研究では、すでに形質転換系が確立し安定して一定の効率を示す植物種では、アグロバクテリウムの改良が遺伝子導入効率を向上させて、最終的な形質転換効率が向上させるが、今回材料に用いたメロンのように形質転換系が確立していないあるいは安定していない植物種については、アグロバクテリウムの改良よりも再分化系や選抜系を見直すことがより重要であると考えられた。

本研究では、形質転換効率を向上させるアグロバクテリウムの作出には至らなかったが、アグロバクテリウムの観戦でも防護応答誘発因子であるサリチル酸の合成が誘発されることが示されたので、今後はアグロバクテリウムにサリチル酸分解酵素活性を付与させることを試みる。既存のアグロバクテリウムがメロンの形質転換に有効であるかを検証する試験では、効果がなかった。再分化系を不定胚誘導系から不定芽誘導系へ変えたところ、形質転換体を得られた。このことから、アグロバクテリウムによる遺伝子導入は形質転換のうちの重要なステップの一つであるが、適切な再分化系を利用することがさらに重要であることがわかった。今後、不定芽誘導法を用いた場合に既存のアグロバクテリウムでさらに形質転換効率を向上させることができるか検証していく必要がある。

形質転換技術は、遺伝資源プールの拡大を可能にする技術であり、育種の幅を広げることが可能にする技術として注目を集めてきた。近年では、CRISPR/Cas9 などの人工制限酵素遺伝子の植物ゲノムへの導入技術としても利用されている。しかしながら、形質転換技術は、作物種ごと、品種や系統によっても形質転換効率が大きく異なり、形質転換技術およびゲノム編集技術の育種利用の大きな律速となっている。研究期間内では、形質転換効率を向上させるアグロバクテリウムの作出には至らなかったが、本研究の達成により、広い植物種での形質転換効率が可能となるため、育種分野へ貢献することができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Nonaka, S., Someya, T., Kadota, Y., Nakamura, K., Ezura, H. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Super-Agrobacterium ver. 4: Improving the transformation frequencies and genetic engineering possibilities for crop plants. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Front Plant Sci. | 6. 最初と最後の頁 1204 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2019.01204. eCollection 2019. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|