

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011 年度

課題番号：22656192

研究課題名（和文） 植物体への直接遺伝子導入による新規オンサイト形質転換法

研究課題名（英文） Novel Onsite Transformation of Plant by Direct DNA Introduction

研究代表者

塩谷 捨明 (SHIOYA SUTEAKI)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：50026259

研究成果の概要（和文）：

導管ネットワークを通して植物へ直接遺伝子を輸送してオンサイトで形質転換する新しい遺伝子導入法を検討した。植物はタバコを利用した。導管内での物質は分子サイズによらず迅速に輸送されることがわかった。レポーター遺伝子として $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）を持つプラスミド pBI121 を長期間タバコに輸送させたところ、GUS 発現が観察され、形質転換の可能性が示唆された。しかしコントロールも GUS 染色する場合は見られ、染色法の再検討が必要なことがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Availability of newly developed onsite transformation of mature plant by direct DNA introduction into every cell via vessel network was investigated. Firstly, transportation of a variety of materials via the vessel network was examined. Tobacco was used as a model plant in the present research. It was found that the materials in the vessel were rapidly transported independently of their molecular sizes. Introduction of a plasmid pBI121 harboring beta-glucuronidase (GUS) as a reporter gene into the tobacco for long term gave its GUS expression, suggesting the possibility of the formation of the transgenic tobacco. However, GUS expression in the control was occasionally detected, indicating that the analytic method of the GUS expression should be discussed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：オンサイト形質転換、タバコ、導管ネットワーク、成長点

## 1. 研究開始当初の背景

従来のトランスジェニック植物作成は、アグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などの遺伝子導入法を用いて行われている。

アグロバクテリウム法は、土壌細菌アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) の接触した植物の細胞に自分の遺伝子の一部である T-DNA (transferred DNA) 遺伝子を送り込む性質を利用した方法である。アグロ

バクテリウムがもつプラスミドのT-DNA 遺伝子を除去し、そこに発現させたい遺伝子を組込んで導入させている。しかし、アグロバクテリウムは元々双子葉類に感染するウイルスであるため双子葉植物には常法であるが、単子葉植物にはアグロバクテリウムは感染しにくく、その適用は困難である。

エレクトロポレーション法は、目的の植物細胞の外側を囲む細胞壁を酵素で溶かし、細胞壁を取り除いたプロトプラストを利用する。プロトプラストと有用遺伝子を溶液に入れて、直流の電気パルスをかけるとプロトプラストの細胞膜に小さい穴が短時間開き、そこから外液と一緒に有用遺伝子を導入するという原理を用いて細胞に遺伝子を導入する。一度に大量の処理を施すことができ、設備や装置も簡単でありDNAも直接導入が可能である。しかし、DNAの導入効率が低いことや電圧などの条件設定が難しく、プロトプラストからの植物体の再生法が確立されていない種類には利用できないのが欠点である。

パーティクルガン法は、金やタングステンなどの微粒子をDNAでコーティングし、高压ガスを用いて植物組織や細胞に打ち込むことによって遺伝子を細胞に導入する方法である。プロトプラストを経ずに細胞壁を持ったままの細胞にDNAを導入することが出来るが、大がかりな装置が必要である。また再生植物がキメラ化する問題もある。

上述の遺伝子導入法では、目的の遺伝子を細胞レベルで遺伝子導入して形質転換させた後、植物体に形成させるため、数年にわたる時間と労力が必要となる。植物体に直接有用遺伝子を導入し、植物体をそのまま形質転換させる新しい技術の開発が期待されている。植物には導管が存在し、これが根から葉の先端に至る植物の隅々までいきわたる導管ネットワークを形成している。

本研究では、従来の細胞レベルでの遺伝子導入法ではなく、導管を輸送経路として植物体の細胞に有用遺伝子を直接導入して迅速なトランスジェニック植物を作成する新しい形質転換法の可能性を検討した。

## 2. 研究の目的

導管が水を吸い上げ現象（毛細管現象）はよく知られているが、物質を輸送できるかどうかはあまり検討がなされていない。まずは小さい分子の色素分子や大きな分子のタンパクの導管内の輸送を調べ、遺伝子輸送経路としての導管の可能性を検討した。次に、植物体内でのプラスミドの輸送について実験的に検討した。植物には、活発に細胞分裂している成長点（分裂組織）があり、ここでの遺伝子導入・組換えがトランスジェニック植物の創製に重要と考えられる。細胞分裂が活発な成長点では細胞壁が薄く物質の透過性

が大きいと思われる。植物体の成長点への遺伝子輸送実験も行った。細胞内への遺伝子導入と組換えに関しては、レポーター遺伝子であるβ-グルクロニダーゼ（GUS）の配列分析、さらにはその遺伝子産物であるGUS活性を染色法で分析して、トランスジェニック植物創製の可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 植物

実験には、タバコ (*Nicotiana tabacum L.*) の coker 319 を使用した。殺菌処理した種子を培地上で無菌的に発芽・成長させて、得られた無菌植物体を実験に用いた。植物体は適宜継代操作を行った。

培地は、Murashige&Skoog (MS) 培地を利用した。

プラスミドは、レポーター遺伝子であるβ-グルクロニダーゼ (GUS, 1812 bp) をコードする pBI121 (12.8 kb, Fig. 1) を使った。pBI121 をもつ大腸菌を培養した後、市販のプラスミド分離精製キット (キアゲン) を用いてプラスミドを分離し、実験に用いた。輸送させるプラスミド溶液の濃度はMS液体培地で適宜調整した。

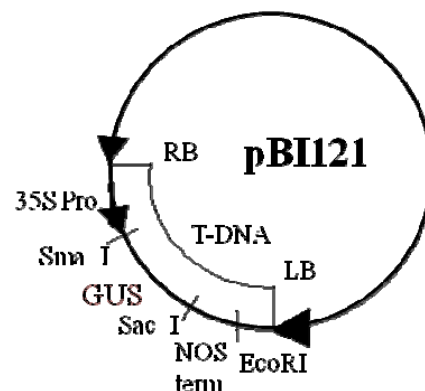


Fig. 1 プラスミド(pBI121)

### (2) 植物体に輸送させる物質

植物体に輸送させる物質として、小さい分子から大きな分子、さらに巨大なプラスミドを検討した。

小さい分子としては赤色色素 102 号（ニュークシン、分子量 604.5）を利用した。

大きな分子としては、分子量 15 万 3 千のタンパクであるグルコースオキシダーゼ (GOD) を利用した。

巨大分子としては、本研究の目的であるトランスジェニック植物の創製に寄与する、レポーター遺伝子としてβ-グルクロニダーゼ (GUS) をコードするプラスミド (pBI121、分子量は約 900 万) を利用した。

植物体の組織への、とりわけ成長点への輸送と遺伝子導入の円滑化を目指して、細胞膜に融合しやすいリポソームを利用する実験も行った。以下には、利用した 3 種のリポソ

ーム（何れも日本油脂製）を示す。

A. 正荷電リポソーム：L- $\alpha$ -ジパルミトイルホスファチジルコリン：コレステロール：ステアリルアミン=52：40：8のモル組成比をもつ。

B. 弱負荷電リポソーム：L- $\alpha$ -ジパルミトイルホスファチジルコリン：コレステロール：L- $\alpha$ -ジパルミトイルホスファチジルグリセロール=54：40：6のモル組成比をもつ。

C. 負荷電リポソーム：L- $\alpha$ -ジパルミトイルホスファチジルコリン：コレステロール：L- $\alpha$ -ジパルミトイルホスファチジルグリセロール=30：40：30のモル組成比をもつ。

何れのリポソームも粒子径は100~300 nm（カタログ値）である。

### (3) 色素輸送実験

色素溶液の色素が葉または成長点に透過しやすいかどうか確認する実験を行った。グリーンベンチ内でタバコの葉（葉柄の長さ：約1.0 cm、葉柄の幅：約0.5 cm、葉の長さ：約4.0 cm、葉の幅：約3.0 cm）または成長点を植物体から切り出し、500 mg/Lの色素溶液を入れた1.5 mL遠沈管に、切り出した植物体の切り口を浸漬させた。なお、葉へは60分間、色素溶液に浸漬し、0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 min後にデジタルカメラで写真を撮影し、葉の染色具合を観察した。成長点に対する色素溶液を透過させる実験を行い、色素の透過状態を経時的に観察した。

### (4) 植物体へのタンパクの輸送実験

大きな分子であるタンパクが導管を通過して葉の先端に到達するかどうか検討した。タンパクとして15万3千の分子量をもつGODを利用した。pH5.0の10 mM酢酸緩衝液を使って1 mg/mL GOD溶液を調整した。GOD溶液に植物体を浸漬した後、10min毎に葉を切断して植物片を採取した。controlには10mM酢酸緩衝液を用いた。植物内のGODは、採取した植物片を磨砕して、GODと特異的に反応する基質を作用させて検出した。

実験には、「色素透過実験」と同様な植物を利用した。

### (5) 植物体へのプラスミド短期透過実験

GUS遺伝子を持つプラスミドが導管を通り葉の先端まで移動するかどうかを検討した。プラスミドはpBI121を使用した。

実験には「色素透過実験」と同様な植物を利用した。

植物体の葉の切り口を濃度0.01, 0.001, 0.005  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のプラスミド溶液に浸漬し、プラスミド透過を試みた。サンプルは浸漬した後、10 min毎に約5mm角の植物片を切断操作で採取し、滅菌水20  $\mu\text{L}$ の入った遠心管に10分間浸漬した。controlは滅菌水に切断した葉を浸漬させたものとした。水相の一部をPCRによってDNAを増幅した後、アガロースゲル電気泳動によってpBI121のGUS配列

のバンドを確認した。

### (6) 植物体へのプラスミド長期透過実験

植物細胞に直接遺伝子導入をする際、細胞壁が細胞への遺伝子導入を制限する可能性が考えられる。細胞分裂が活発な成長点ならば細胞壁が薄くて透過性が大きく、遺伝子が導入の可能性が期待できるので、本実験では、成長する植物体の成長点へのプラスミド透過実験を行った。

植物体を茎から切り取り、その切り口を濃度0.01, 0.001, 0.0005  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のプラスミド溶液に浸漬し、プラスミド透過を観察した。サンプルは浸漬時より成長点が生育する約14日経過後、植物体をX-Gluc溶液に浸漬してGUS発現を検討した。controlは、切断した葉を滅菌水に浸漬させたものとした。

### (7) リポソームを使ったプラスミド導入実験

様々な荷電を帯びた3種のリポソームにプラスミドを包含させることで、遺伝子導入しやすくなるかを調べた。成長する植物体の成長点へリポソームを使ったプラスミド導入実験を行った。

プラスミド含有リポソーム溶液に植物体を浸漬した。プラスミド濃度は0.01 g/Lとした。controlはMS液体培地のみを輸送させたものとした。恒温室で培養して、7日毎に植物片を採取した。滅菌水が20  $\mu\text{L}$ 入った遠心管に10分間、植物片を浸漬した。controlも同様な操作を行った。その溶液をPCRでDNAを増幅させた後、電気泳動を行った。植物片の一部をGUS発現の分析に利用した。

### (8) 分析

植物体内での色素の透過は目視によって確認した。GODの輸送は、基質と特殊な反応試薬を利用して確認し、分光光度計を使って反応量を測定した。プラスミドの検出は、pBI121のGUS配列に作用する次の2種のプライマーを使用した。

通常の実験用：

forward：5' -CTGAAGTGGCAGACTATCC-3'

reverse：5' -CAATACTCCACATCACCAC-3'

PCR産物：820 bp

主にリポソームを使った実験用：

Forward：5' -GTGGAATTGATCAGCGTTGG-3'

Reverse：5' -TCTTCATGACGACCAAAGCC-3'

PCR産物：810 bp

これらのプライマーを適宜使用して遺伝子増幅器で増幅（PCR）した後、そのPCR産物をアガロースゲル電気泳動によってプラスミドの確認を行った。PCRは、既存のプロトコルに従って行った。遺伝子導入・形質転換に伴って生成するGUSの発現は、基質溶液（X-gluc）の染色から判断する組織化学法によって解析した。GUS遺伝子が植物体の細胞内で導入・発現されれば、青く染色されるのである。

#### 4. 研究成果

##### (1) 色素透過実験

植物体の葉への色素透過の写真を図. 2 に示す。これらの経時的な写真撮影から、浸漬後すぐに色素が導管を通過して葉に達し、葉の先端にも透過することが認められた。また成長点への透過も速やかに行われていた。

以上より小さな分子は導管を通して速やかに透過することが明らかとなった。



Fig. 2 色素透過実験

##### (2) 植物体へのタンパク透過実験

GOD の反応性を調べた結果を図. 3 に示す。なお図中の『葉当りの GOD 反応量』は、GOD による発色の度合いを植物片の平均重量で割ったものである。図より、透過開始より 10 分後に GOD が確認され、GOD のような大きい分子も速やかに透過することが認められた。

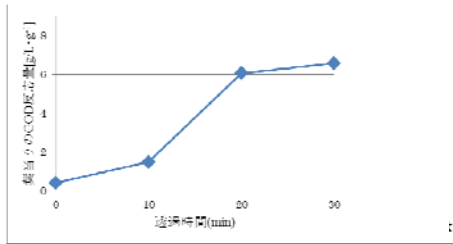


Fig. 3 植物体へのタンパク透過実験

##### (3) 植物体へのプラスミド短期透過実験

植物体の葉にプラスミドを透過させた結果を Figs. 4~7 に示す。0.001  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  の電気泳動写真 (Fig. 6) から、透過後 30 分で GUS が確認され、プラスミドも導管を通して輸送されることが認められた。0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  では明確なバンドが観察されなかったが、これはプラスミド濃度が濃すぎて導管内で詰まったためと考えられる。また、0.0005  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  でもバンドが確認できなかったのはプラスミド濃度が薄かったためと思われる。

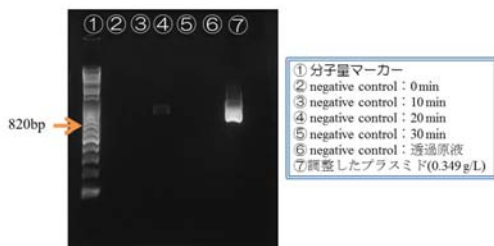


Fig. 4 プラスミドを含まない溶液の短期透過実験

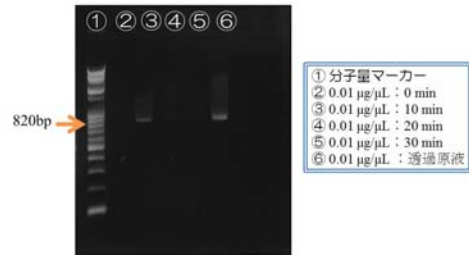


Fig. 5 プラスミド濃度 0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  の短期透過実験

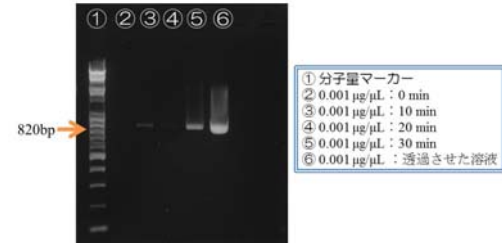


Fig. 6 プラスミド濃度 0.001  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  の短期透過実験

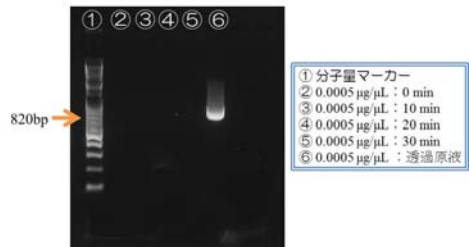


Fig. 7 プラスミド濃度 0.0005  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  の短期透過実験

##### (4) 植物体へのプラスミド長期透過実験

長期にわたって植物体にプラスミドを透過させ、経時的に GUS 染色を行った。その結果を図. 8 (a) ~ (d) に示す。主に導管部分や実験開始時の葉の導管部分に青い染色が見られた。このことから、導管を通した GUS 遺伝子の導入の可能性が示された。特に 0.001  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  のプラスミドを透過した植物体に強い発色が観察され、さらに新たに発生した葉の導管部分にも発色が見られた。

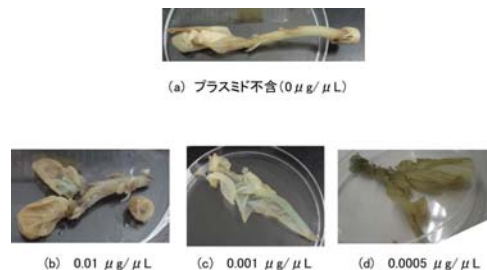


Fig. 8 様々なプラスミド濃度の長期 (14 日間) 透過後の GUS 活性

しかし種から成長させた植物体 (negative control: 継代回数 0 回) や、MS 培地だけに浸漬させた植物体 (control) においても染色が時に観察され、タバコの雑菌汚染や実験の操作条件、使用した試薬の劣化、再現性などを

確認しなければならないことがわかった。ただし浸漬開始時の葉の導管部分の発色は見られなかったことから、この部分へは遺伝子導入の可能性が大きい事が示唆された。

(5) リポソームを用いたプラスミド導入実験

プラスミド含有リポソーム溶液に植物体を浸漬して、GUS 遺伝子と GUS 発現を観察した。GUS 遺伝子を調べる電気泳動結果を Figs. 9~12、GUS 発現の分析結果を Figs. 13~16 に示す。プラスミド含有リポソームを輸送させた葉から GUS の PCR 産物のバンドが確認でき、リポソームを使用した場合においても導管を通してプラスミドを輸送できることが認められた。しかし 28 日間プラスミドを正荷電リポソームと弱負荷電リポソームを輸送させた葉から抽出した溶液のレーンから GUS の PCR 産物のバンドが確認できたが、負荷電リポソームを輸送させた葉からは明確なバンドが確認できなかった (Fig. 12)。これは実験操作上で何らかのミスがあったかもしれないが、負電荷を持つ細胞とプラスミドが反発するために導管内でプラスミドが蓄積している可能性が考えられる。今後、これらを検討する必要がある。Figs. 13~16 に示す GUS 染色から、control も含めた全サンプルで短期の内に GUS 活性を示す青染色が観察された。GUS 発現が植物の細胞膜が負の電荷を持つため、正荷電リポソームもしくは弱負荷電リポソームを用いてプラスミドを輸送させた植物体がより青く染まると予想していたが、各リポソーム間で違いがあまり見られなかった。control が青く染まった原因として、植物のコンタミ、または試薬 (特に X-Gluc) の劣化や不純物の混入、などが挙げられる。今後、新たに種から植物体を誘導し再実験を行い、X-Gluc の反応性についても再検討する必要があることがわかった。

本実験で使用したリポソームにプラスミドが包含されているか確認できていないので、今後検討する必要がある。

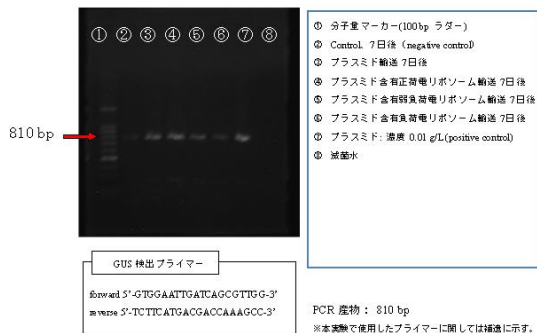


Fig. 9 7 日間、プラスミド含有リポソームを導入したサンプルの電気泳動

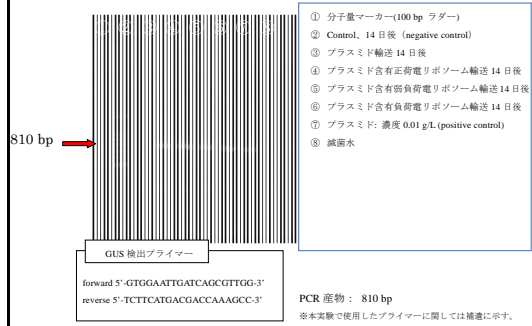


Fig. 10 14 日間、プラスミド含有リポソームを導入したサンプルの電気泳動

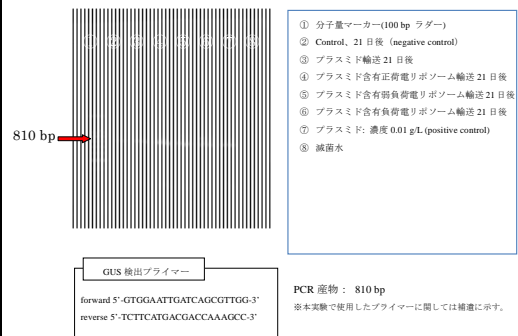


Fig. 11 21 日間、プラスミド含有リポソームを導入したサンプルの電気泳動

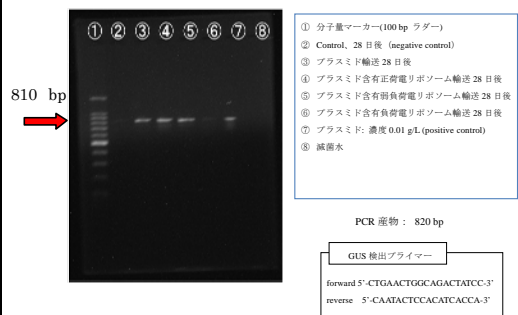


Fig. 12 28 日間、プラスミド含有リポソームを導入したサンプルの電気泳動



Fig. 13 7 日間、プラスミド含有リポソームを導入したサンプルの GUS 発現観察

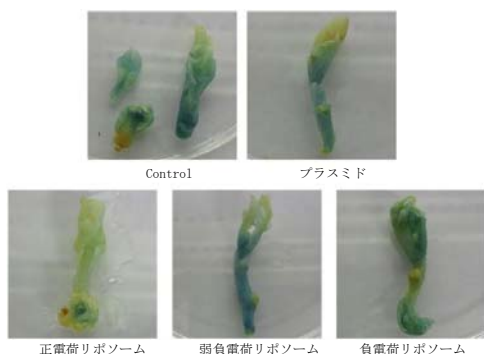


Fig. 14 14 日間、プラスミド含有リポソームを導入したサンプルの GUS 発現観察

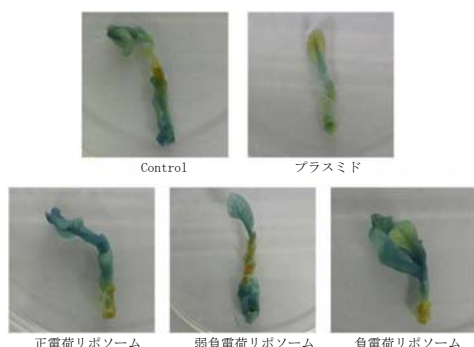


Fig. 15 21 日間、プラスミド含有リポソームを導入したサンプルの GUS 発現観察

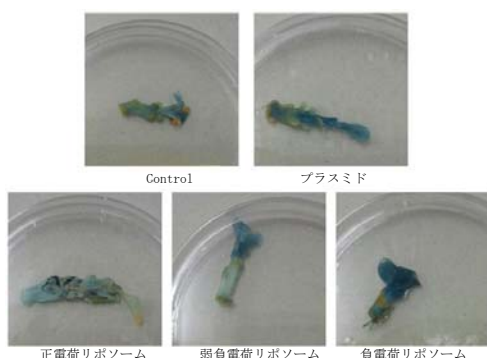


Fig. 16 28 日間、プラスミド含有リポソームを導入したサンプルの GUS 発現観察

#### (6) 結言

植物体の葉柄から葉の先端に存在する導管を通して、小さな分子である色素、大きな分子であるタンパクは 10 分程度で透過することが明らかとなった。また、成長点への色素透過も速やかなことがわかった。さらにプラスミドも速やかに葉の先端に透過することが確認でき、物質輸送として導管ネットワークの有効性が明らかとなった。

茎からプラスミドを透過させて植物体の GUS 遺伝子の導入を試みた結果、プラスミド濃度  $0.001 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  が GUS 発現に有効であった。

リポソームを使ってプラスミドを植物に

透過させる実験も行ったところ、プラスミドの輸送と速やかな GUS 発現が観察され、リポソームの有効性が示された。

GUS 発現に関しては何れの実験においてもコントロールでも発色が観察された。タバコの雑菌汚染や試薬の劣化などが考えられ、今後、新しい無菌植物体を準備し、試薬の反応性に注意しながら再実験を行って詳細なデータを得る必要があることがわかった。さらに GUS 発現に関しては mRNA や DNA の解析を行う必要があり、これは今後の課題として残された。

#### 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)

[学会発表] (計 4 件)

①Kohei Taura, Shinjiro Yamamoto, Sachiko Oriishi, Shuhei Hayashi and Suteaki Shioya Possibility of onsite transformation of plant by direct DNA introduction via vessel network, Asian Congress on Biotechnology 2011, Shanghai, 2011 年 5 月

②田浦耕平、山本進二郎、林修平、塩谷捨明、導管を利用したトランスジェニック植物作成法の検討、H23 年度生物学若手研究者の集い夏のセミナー、石和、2011 年 7 月

③田浦耕平、山本進二郎、居石幸子、林修平、塩谷捨明、導管ネットワークを利用する植物体への遺伝子導入の検討、化学工学会 第 43 回秋季大会、名古屋、2011 年 9 月

④三池美佳、田浦耕平、山本進二郎、林修平、塩谷捨明、導管を利用する植物体への直接遺伝子導入の検討、生物工学会 第 18 回九州支部福岡大会、福岡、2011 年 12 月

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

塩谷 捨明 (SHIOYA SUTEAKI)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：50026259

##### (2) 研究分担者

山本 進二郎 (YAMAMOTO SHINJIRO)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：40262307

林 修平 (HAYASHI SHUHEI)

崇城大学・生物生命学部・助教

研究者番号：30389522