

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 3 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658075

研究課題名（和文）ハイパースペクトルカメラによる遺伝子組み換え成功判別法の開発

研究課題名（英文）Development of Hyperspectral Imaging System to Detect Gene Recombinant Callus

研究代表者

伊藤 博通 (ITOHI HIROMICHI)

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：00258063

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、ハイパースペクトルカメラを用いて遺伝子組換え体の選抜システムを開発することである。本研究では、薬剤耐性マーカー遺伝子が生態系に悪影響を与える問題に着目し、植物由来である硝酸還元酵素遺伝子（NR 遺伝子）の使用を提案する。NR 遺伝子をマーカー遺伝子として使用した場合、野生株よりも硝酸イオン濃度が低くなると予想される。この硝酸イオン濃度差を捉えるため、ハイパースペクトルカメラを用いたカルスの硝酸イオン濃度推定システムを開発し、遺伝子組換え成功株の判別精度を評価した。解析の結果、カルスの硝酸イオン濃度を推定する検量線の推定精度は、評価用データ相関係数 0.7363 となった。パーティクルガンによる遺伝子組換え体の作出を試みたが、遺伝子組換えの条件が適切ではなかったため NR 遺伝子導入株を作出することはできなかった。そこで、硝酸イオン濃度の低濃度サンプル（961.0 mg/L 以下）と高濃度サンプル（961.0 mg/L 以上）の判別精度を評価した結果、検量線によるイオン濃度推定値を用いた判別では 85.0%、PLS-DA (Partial Least Square - Discriminant Analysis) による判別では 87.4%の精度で判別することができた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research is to develop a hyperspectral imaging system to detect gene recombinant plant cells. Since drug tolerance genes have the potential to negatively affect ecosystems, this research plans to use genes that express the nitrate reductase (NR) as marker genes. If the NR genes are introduced into a cell with a transgene, the recombined genes would show higher potential to reduce nitrate concentration than that of a wild type. Therefore, non-destructive methods for measurements of nitrate concentration in callus were developed to detect the gene recombinant calluses. As for accuracy of developed mathematical model to estimate the nitrate concentration of callus from the near-infrared spectrum, correlation coefficient between measured and estimated nitrate concentration became 0.7363. Though we tried to introduce the NR gene to spinach cells by using the particle gun method, gene recombinant calluses could not be produced because of inappropriate conditions for the recombination. Then possibilities to discriminate calluses containing high nitrate concentration (more than 961.0 mg/L) from low concentration calluses (less than 961.0 mg/L) by processing the near-infrared spectra were examined. Accuracy rate became 85 % that was obtained from the mathematical model to predict the nitrate concentration and 87.4 % that was derived from PLS-DA (Partial Least Square - Discriminant Analysis) method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,800,000	0	2,800,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,300,000	150,000	3,450,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：生物生産システム、遺伝子組換え

1. 研究開始当初の背景

近年、植物工場を用いた遺伝子組換え作物の生産技術が注目されている¹⁾。植物工場の利用により組換え遺伝子拡散の問題は回避されるが、組換え遺伝子拡散の問題の他にも多くの問題が残されている。したがって、遺伝子組換え作物の問題に対する研究を進めていくことは必要不可欠である。

本研究では、遺伝子組換え作物に関する問題のひとつである、薬剤耐性マーカー遺伝子の使用が環境に与える影響について着目した。遺伝子組換え株の判別のために組み込まれたマーカー遺伝子によって、抗生物質耐性菌などが繁殖する可能性があり、遺伝子組換え作物の危険性を高めている²⁾。そこで本研究では、遺伝子組換えの際に用いるマーカー遺伝子として、植物由来の遺伝子である硝酸還元酵素遺伝子 (NR 遺伝子) を用いることを提案する。

2. 研究の目的

本研究は組換え遺伝子導入の成功判別を安全かつ低コスト・高速で行う手法を構築する。最近では図1に示すように導入する目的遺伝子と共に薬剤耐性遺伝子を同時に導入し、薬剤耐性を発現する細胞を抽出することで組換え成功判別の効率を向上させている。しかし薬剤耐性遺伝子が生態系に影響することが懸念されている。そこで遺伝子マーカーとして生態系に影響が少ないと考えられる硝酸還元酵素(NR)遺伝子を使用し、細胞内の硝酸濃度をハイパースペクトルカメラにより計測して安全かつ低コスト・高速で遺伝子導入の成功判別を行う手法を構築する。

本研究では薬剤耐性遺伝子に代わる組換え体遺伝子マーカーとして硝酸還元酵素(Nitrate Reductase, NR)遺伝子を使用する。NRは菌類、植物などに存在し、硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元する働きを有する。NR 遺伝子マーカーが導入されれば硝酸還元能が向上して細胞内の硝酸濃度が通常よりも低下す

るはずである。そこで図2のように細胞を硝酸イオンに浸し、ハイパースペクトルカメラで各細胞の硝酸イオン濃度を計測することにより NR 遺伝子マーカーが導入された細胞を非破壊かつ高速に抽出することができると考えられる。研究代表・分担者らは近赤外線分光法及びハイパースペクトルカメラを使用した野菜葉内硝酸イオン濃度分布計測法を開発している³⁾。今回開発する手法は薬剤耐性遺伝子をマーカーに使用する場合に比べて生態系に影響が少なく、低コスト・高速な遺伝子導入の成功判別法となる。

そこで本研究の目的は次の通りである。
○ハイパースペクトルカメラを使用した分光画像処理システムを構築し、カルス(クローン細胞の塊)の硝酸濃度分布画像を合成する

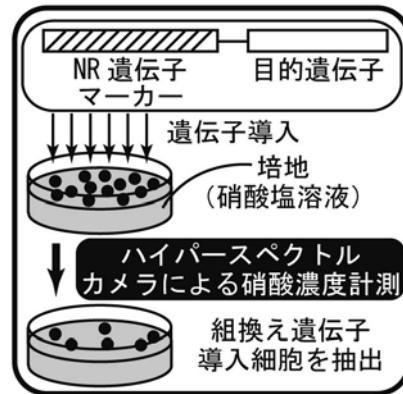


図2 NR 遺伝子を使用した遺伝子導入細胞の抽出

アルゴリズムを開発すること。○硝酸濃度分布画像を使用して組換え遺伝子導入の成功判別アルゴリズムを開発すること。

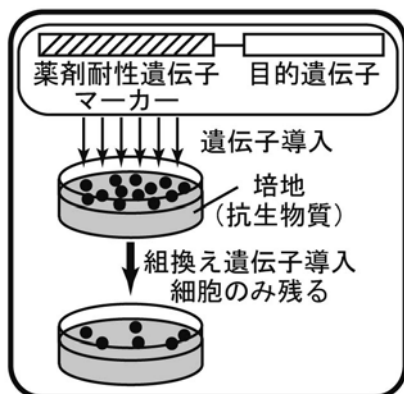


図1 薬剤耐性遺伝子を使用した遺伝子導入細胞の抽出

3. 研究の方法

(1) 供試サンプル

本研究で使用したホウレンソウ培養細胞は、ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L., cv. Orai) の下胚軸から誘導された野生株の培養細胞である。サンプルは、24 時間連続照射で温度は 25℃、光量子束密度はおよそ $220 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の条件に保ったグロースチャンバー (グロースチャンバー MLR-350、Sanyo 株式会社) 内で培養した (図 3)。培養には MS (Murashige-Skoog) 寒天培地を用いた。

(2) カルスの硝酸イオン濃度推定システム

ハイパースペクトルカメラで得られるデータは空間情報(x,y)に加え、波長方向(λ)の 3 次元データで取得される。このため、空間画像の画素毎に近赤外線分光スペクトルを計測することが可能であり、ハイパースペクトルカメラは果実や野菜の内部物質の分布を可視化できるとして注目されている³⁾。本研究で使用したカメラは V10 (デルフトハイテック社製) である。このカメラの仕様は、波長分解能 9 nm、測定波長域は 400 nm から 1000 nm、ダイナミックレンジ 8 bit である。レンズは単焦点レンズ (COSMICAR 製、焦点距離 8 mm、f 値 1.4) を使用した。ハイパースペクトルイメージングシステムは、ハイパースペクトルカメラと光源装置 (Newport Stratford 社製、Oriol quartz tungsten halogen research sources 66499、250 W QTH lamp 6334)、単軸ロボット (T4、ヤマハ発動機社製) で構成されている (図 4)。

(3) NR 遺伝子の導入

NR 遺伝子の導入には、パーティクルガン (Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio Rad)) を用いた。パーティクルガンによる遺伝子導入の 2 日後、ハイグロマイシン添加 (50、100 \cdot g/ \cdot l) 培地において、遺伝子導入細胞の選抜を行った。

4. 研究成果

(1) 硝酸イオン濃度推定システム作成

硝酸イオン濃度を 10 段階に設定 (496 mg/L から 4960 mg/L) した MS 培地を用意し、それぞれの培地に継代してから、2 週間から 3 週



図 3 カルスサンプル

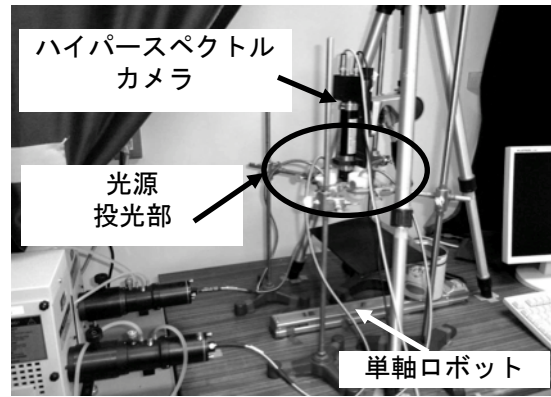


図 4 ハイパースペクトルイメージングシステム

間培養したカルスをサンプルとして用いた。培地から取り出したサンプルは黒色ろ紙の上に置き、5 秒間の吸引ろ過、10 秒間の吸引ろ過をしながらの洗浄処理、最後に 20 秒間の吸引ろ過を施してから、ハイパースペクトルカメラでの撮影を行った。撮影後に硝酸イオン濃度実測値を RQ-flex 法を用いて測定した。得られた吸光スペクトルと硝酸イオン濃度から硝酸イオン濃度推定の検量線を作成した。

サンプルの濃度レンジ、ハイパースペクトル画像に対する画像処理方法、スペクトルの前処理などを検討した結果、取得したハイパースペクトル画像にビンニング処理を施して取得された 526 nm から 877 nm の波長の吸光スペクトルに対し、前処理として MSC を適用し、PLS (Partial least squares) 法によって導出された検量線の硝酸イオン濃度推定精度が最高 (評価用データ相関係数が 0.7363) となった。

(2) 遺伝子組換え体判別精度評価

作成された硝酸イオン濃度推定システムを用いた遺伝子組換え成功判別システムの精度評価を行った。パーティクルガンを用いて、NR 遺伝子発現株の作出を試みたが、パーティクルガンの遺伝子撃ち込み条件の検討不足などの理由から、NR 遺伝子発現株を作出することが出来なかった。

そこで、検量線作成に用いたサンプルを低濃度サンプルと高濃度サンプルに 2 分割 (境界濃度: 961.0 mg/L) し、検量線による硝酸イオン濃度推定値、PLS-DA (Partial Least Square-Discriminant Analysis)、主成分分析のスコア値を使用したマハラノビスの距離による判別、標準化スペクトルの 490 nm の吸光度による判別の検討を行い、構築したシステムによる判別精度を評価した。

その結果、比較的高い精度で判別できた手法は、検量線による硝酸イオン濃度推定値による判別 (判別精度: 85.0%)、PLS-DA による判別 (判別精度: 87.4%) であった。つまり、野生株の硝酸イオン濃度が 961.0 mg/L 以上と

なる培地上において NR 遺伝子導入株の硝酸イオン濃度が 961.0 mg/L 以下であれば、本研究で開発したシステムを用いることで、約 80%の精度で遺伝子組換え体を判別することが出来るといえる。

(3) 結言

作成したハウレンソウカルの硝酸イオン濃度推定システムを用いて、遺伝子組換え成功判別を行うことができる可能性が示された。しかしながら、NR 遺伝子導入株を用いた判別精度の評価を行うことが出来なかったため、実際に NR 遺伝子導入株を用いて本研究で構築された遺伝子組換え成功判別システムの精度評価を行う必要がある。また、検量線の精度を更に向上させるためには、カルの培養環境や撮影環境を厳密に制御した下で実験を行う必要があると考える。

構築されたシステムを用いて組換え体と野生株を判別することができれば、NR 遺伝子をマーカー遺伝子として遺伝子組換えの選抜に利用し、作成された検量線や、低濃度と高濃度サンプルの判別法を用いて、遺伝子組換え体を判別することができる。NR 遺伝子の導入による遺伝子組換え成功判別システムの確立は、遺伝子組換え技術の発展に貢献できると考えられる。

(4) 参考文献

- 1) 高山眞策：遺伝子組換え植物と植物工場、計測と制御、37 (10)、pp. 708-715、1998
- 2) 日本農学会編：シリーズ 21 世紀の農学 遺伝子組換え作物の研究、養賢堂、pp. 100-232、2006
- 3) H. Itoh, S. Kanda, H. Matsuura, N. Shiraishi, K. Sakai, A. Sasao : Measurement of Nitrate Concentration Distribution in Vegetables by Near-Infrared Hyperspectral Imaging、Environment Control in Biology 48 (2)、pp. 37-49、2010

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 2 件)

- ① Tomoda, S., Itoh, H., Ogino, N., Shiraishi, N., Uno, Y. (2011): Development of Hyperspectral Imaging System to Detect Gene Recombinant Callus, Proceedings CD of CIGR2011 (7 頁), 査読有.
- ② 伊藤博通, 友田 小百合, 荻野伸祐, 白石齊聖, 宇野雄一 (2011): ハイパースペクトルカメラによる遺伝子組み換え成功判別法の開発-ハウレンソウカルの硝酸イ

オン濃度非破壊計測法開発-, 農業機械学会関西支部報, 110, 48, 査読無.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 伊藤博通, 白石齊聖, 宇野雄一, 友田小百合, 八田朋子 (2012. 3. 5): ハイパースペクトルカメラによる遺伝子組換え成功判別法の開発、農業機械学会関西支部第 127 回例会、京都
- ② 伊藤博通, 白石齊聖, 宇野雄一, 友田小百合, 濱田佳代, 荻野伸祐, 綾田晃士, 北秋広徳, 野村耕太, 藤田裕子 (2011. 12. 25): 近赤外線分光法による植物体内硝酸イオン濃度非破壊計測法開発、第 12 回 計測自動制御学会 システムインテグレーション部門 講演会 S I 2 0 1 1、京都
- ③ Tomoda, S., Itoh, H., Ogino, N., Shiraishi, N., Uno, Y. (2011. 9. 20): Development of Hyperspectral Imaging System to Detect Gene Recombinant Callus, The 2011 CIGR International Symposium, Tokyo
- ④ 友田小百合, 伊藤博通, 八田朋子, 白石齊聖, 宇野雄一, 荻野伸祐 (2011. 9. 8): ハイパースペクトルカメラを用いた遺伝子組換え成功判別法の開発、日本生物環境工学会 2010 年北海道大会, 札幌
- ⑤ 伊藤博通, 友田 小百合, 荻野伸祐, 白石齊聖, 宇野雄一 (2011. 3. 2): ハイパースペクトルカメラによる遺伝子組み換え成功判別法の開発-ハウレンソウカルの硝酸イオン濃度非破壊計測法開発-, 農業機械学会関西支部第 125 回例会, 堺

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 博通 (ITOHIHIROMICHI)
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：00258063

(2) 研究分担者

白石 齊聖 (SHIRAISHI NAOMASA)
神戸大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：00304121

宇野 雄一 (UNO YUICHI)
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：90304120