

植物再分化系の検討

ー 有用植物体形質転換体の作出をめざして ー

柊亘晃樹¹・廣瀬巧貴¹・高木凜¹・

小川直輝¹・下保環¹・亀山貴裕¹・今村（陣田）綾^{1,2}

¹長浜バイオ大学バイオサイエンス学部フロンティアバイオサイエンス学科

²長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

要旨

植物におけるゲノム編集技術の樹立は標的遺伝子の変異導入や遺伝子組換えを効率よく行うことを可能とした画期的な技術革新である。生物個体レベルのゲノム情報の取得および解析も可能となったいま、個々の植物種、あるいは品種ごとに組換え植物体取得のために植物再分化条件を確立することが必須である。我々は有用植物としてアイヌプラント、ヨモギに着目してゲノム編集植物を設計するとともに、その植物体再分化に必要な植物生理活性物質の濃度・組合せ条件の検討、さらには効率的な組換え体取得方法の確立を目指している。

1. 植物形質転換方法について

植物の形質転換は植物病原菌で土壌細菌であるアグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter*) がよく利用されており、この細菌が T-DNA と呼ばれる DNA 断片を植物染色体に挿入しその DNA 断片にコードされた遺伝子を発現させて腫瘍形成を誘導するしくみが応用されている。この T-DNA に導入したい外来遺伝子および発現系を設計すれば遺伝子組換え植物ゲノムが構築でき、形質転換植物ができる。ここで形質転換植物体確立のポイントとなるのは、アグロバクテリウムによる遺伝子挿入は植物ゲノム中にランダムに起こるため、挿入位置・標的遺伝子を特定できないこと、および、外来遺伝子が次世代に継代される細胞の核ゲノムに挿入されなければ、安定した形質転換植物系統が確立できない点である。前者については、ゲノムの特定位置を切断する人工制限酵素 ZFN や TALEN、あるいは RNA 誘導型ヌクレアーゼ CRISPR/Cas によるゲノム編集技術を用いることで、特定のゲノム位置で塩基の挿入・欠失に伴う突然変異の作出、またはゲノムの特定位置の DNA 二本鎖切断を誘導できるため、この部位での相同組換えを用いた外来遺伝子断片の挿入が可能となった。植物ではこの CRISPR/Cas システムに必要な DNA 配列を T-DNA 領域に設計して標的遺伝子のゲノム編集を行い、そののち野生型品種との交雑により T-DNA は持たず、標的遺伝子の変異のみをもつ系統を確立するという手法が利用されるようになった。一方、後者については、次世代に継代される種子をつける個体であること、つまり個体を形成する全細胞が形質転換された同一ゲノム情報をもっていることが重要である。そこで多くの植物種では組織培養を用いて細胞分裂活性が高い植物細胞を含む組織片を脱分化させ、このタイミングでアグロバクテリウムによる遺伝子組換え処理を行い、導入遺伝子の一つとして構築した抗生物質等の選択マーカー遺伝子を指標に選択培地で選択し、形質転

換された1細胞由来の遺伝子組換え植物個体の再分化を誘導して形質転換体を得る方法が用いられている。一般的に植物細胞の脱分化や再分化は植物ホルモンサイトカイニンとオーキシンによってコントロールできることが示唆されている。しかし、植物種やその品種ごとに用いるサイトカイニンやオーキシンの分子種やその濃度を含む最適条件は異なっているため、この条件を決定できなければ、遺伝子組換え形質転換体を作出できない。生物の塩基配列決定技術やその膨大なデータ解析技術の革新が目覚ましい一方で個々の遺伝子機能を明らかにするためにはその植物ごとに遺伝子組換えの条件設定が不可欠である。

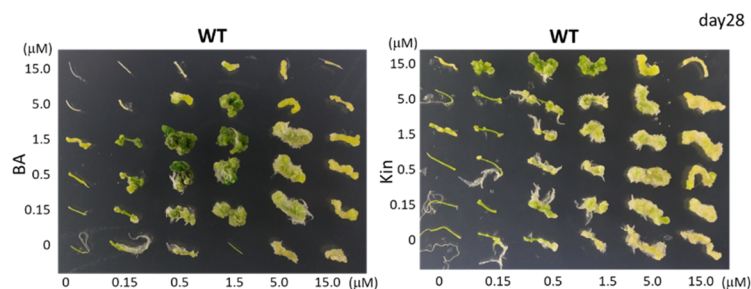


図1. シロイヌナズナColの野生型(WT)の発芽後10日目の黄化芽生え由来の胚軸片をサイトカイニンであるベンジルアデニン(BA)、カイネチン(Kin)およびオーキシンであるナフタレン三酢酸(NAA)を図に示した濃度の培地で28日間培養したものを並べた。

モデル植物シロイヌナズナではサイトカイニンとオーキシンの分子種及び濃度のマトリックスデータが豊富であり、これを利用してサイトカイニンやオーキシンの応答性の変化に着目した解析に用いられることも多い。さらにシロイヌナズナの形質転換では花序浸潤法という、受精するタイミングの花序にアグロバクテリウム感染させ、受精卵のゲノムに外来遺伝子が導入できた遺伝子組換え種子を選抜する方法が用いられている。この方法では、ほとんど無菌操作は不要で回収した種子を選抜する時点で初めて無菌操作を要するという点で簡便である。

2. アイスプラントの形質転換体作出を目指して

アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) はハナミズキ科の植物の一種であり、特徴として耐乾燥や耐塩性を持つ。塩濃度 3.1~3.8%の高い土壌で生育すると表皮に塩囊細胞と呼ばれる細胞が発達し、そこへ塩を蓄積することで塩濃度の高い土壌でも生育することができる。そして乾燥、塩ストレスを与えられると光合成型を大豆やイネ等のC3型からサボテン等のCAM型へ変換し、その時ピントールなどの環境適合物質が生合成される。これらの環境適合物質は乾燥や塩ストレスから生体を防御する働きを持つことが知られているが、一方ヒトの健康や美容を増進してくれる効果があることも知られている。またアイスプラントのゲノムDNAの全塩基配列を決定するための解析が行われようとしており、今後、決定された塩基配列をもとに種々の遺伝子の機能解析や改良個体の作出等を行うに当たっては、他のモデル植物の場合と同様に、アイスプラントにおいてもその形質転換が必須となる。そこで、本研究ではアグロバクテリウムを用いた遺伝子導入法により安定した形質転換アイスプラントを簡便に確立することを目的にしている。この方法を用いたアイスプラント植物細胞の形質転換に関して、そもそもアグロバクテリウム属細菌の感染が、根端細胞や培養細胞に遺伝子を導入および発現を確認した例から可能であることは示唆されたものの、その後の個体への再分化率が極めて低く安定な形質転換体

が得られるまでには至っていなかった⁵⁾。そこで、条件検討を開始した時点ではアイスプラントの形質転換の過程で障壁となっている、外植片からの再分化の条件をさらに検討しその再分化率を上昇させることを目標としていた。

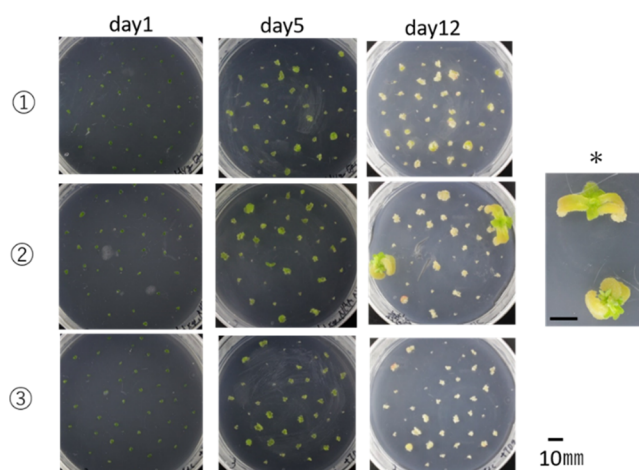


図2 子葉片の再分化条件検討 ①はMS培地 (+0.5mg/L TDZ, 1.0mg/L NAA, 80mM NaCl, 100nM PSK)、②はMS培地 (+0.5mg/L TDZ, 80mM NaCl, 100nM PSK)、③はMS培地 (+1.0 mg/L TDZ, 80mM NaCl, 100nM PSK) に発芽後5日目の子葉片を置床し培養。*は②day12でみられた再分化個体の拡大図

目されているペプチド型植物ホルモンファイトスルフォカイン(PSK)および塩化ナトリウム存在下でより再分化活性が上昇することが報告されたことから、アイスプラントにおいても植物組織片からの再分化条件が確立でき、今後の遺伝子解析および有用物質が高蓄積するアイスプラント作出が可能となった⁴⁾。我々は、さらに簡便に形質転換できるように花序浸潤法を利用したアイスプラント形質転換体取得のために、アグロバクテリウム感染のタイミングを検討している。

3. ヨモギの形質転換体作出を目指して

“艾(もぐさ)”の原料“ヨモギ”は、宿根性多年草植物であり日本国内の至る所に生息しているキク科植物である。ヨモギの品種は世界に250種存在すると言われており、日本国内ではそのうち30種が生育しており、オオヨモギ、ニシヨモギ、ヨモギの3つに大別される。ヨモギは古来より薬草として扱われ、お灸や食品として取り扱われている。日本国内でヨモギを生産する農家は少なく、多くは中国・ネパールなどの国外からの輸入に頼っているのが現状である。とくに艾は、葉裏表面に多く形成される毛状突起(トライコーム)だけを使用するため、ヨモギを刈り取り、葉だけをしごいた後、十分に乾燥させる必要がある。そのため米の生産に比べると3倍程度の労働力が必要となることなどが理由に挙げられる。

その結果、再分化に用いる植物組織の調製に関して、幼植物体の育成日数として発芽後4日目の若い植物体を用いることや、胚軸由来の組織片カルスを用いることで細胞の緑化が起きやすく、植物体地上部(シュート)の再分化には若い植物体の茎由来のカルスが適していることが示唆できた³⁾。さらに、ウレア型サイトカイニンであるチジアズロンとオーキシン、ナフタレン酢酸(NAA)および近年細胞分裂活性を上昇させる生理機能をもつことでも注

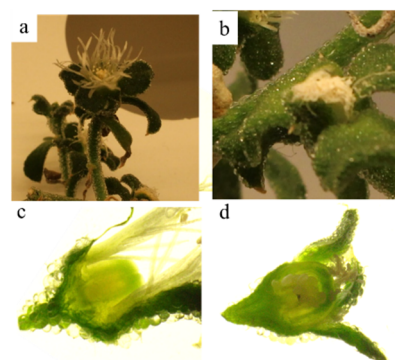


図3. a,c; つぼみ確認から約1週間後の花の様子(a)とその断面図(c)。b,d; つぼみ確認から約1カ月後の花の様子(b)とその断面図(d)。

表皮組織の毛状突起は、これまでにワタでは増産が、ポプラやトマト、大豆では抑制体の作出が試みられるなど人類が注目してきた形質のひとつである。モデル植物シロイヌナズナでは GL2 遺伝子発現により葉や根の表皮細胞が毛状突起を形成する細胞となりトライコームや根毛が形成されるが、この遺伝子の発現を抑制する R3Myb 転写因子の働きにより GL2 の発現が抑制されると毛状突起が形成されないことが明らかになっている。そこで、我々はこの転写因子群の働きに着目し、オオヨモギ (*Artemisia montana*) を用いて毛状突起形成を抑制している転写因子をゲノム編集により遺伝子改変し、葉一枚当たりの毛状突起形成量を増産させることを計画した (株) 山正 長浜市と共同)。そのため、「オオヨモギの毛状突起形成の鍵因子を同定すること」および、「オオヨモギ形質転換体作出のための組織培養条件の確立」で研究を始めた。

3.1 オオヨモギの毛状突起形成の鍵因子の同定

オオヨモギはゲノムデータベースが未だ確立されていない植物であるため、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) で毛状突起形成を制御する因子として報告されている R3Myb 転写因子 *Trichomeless1* (*AtTCL1*) および、ポプラ (*Populus trichocarpa*) の *PtrTCL1* の配列をもとに、PCR を用いてオオヨモギから相同遺伝子を単離することを計画した⁶⁾。現在までに、オオヨモギ由来の *TCL1* 様遺伝子 (*AmTCL1-like*) の部分配列取得に成功しており、今後は全長 *AmTCL1* の取得およびこの配列をもとにしたオオヨモギ R3Myb 転写因子群の遺伝子配列取得を目指す。候補遺伝子の中から毛状突起形成制御に関わる因子を同定するために、シロイヌナズナ *tcl1* 変異体を用いて、その毛状突起形成を相補する遺伝子を同定し、それを標的としたゲノム編集によりオオヨモギの毛状突起過剰発現体の作出につなげたい。

3.2 オオヨモギ形質転換体作出のための組織培養条件の確立

オオヨモギについてもアグロバクテリウムを用いた形質転換方法により *AmTCL1-like* を標的としたゲノム編集を行うため、組織培養の培養条件確立が必要となる。これまでに、オオヨモギ種子が MS 寒天培地で発芽後、生育できることを明らかにし、続いて組織片からの再分化個体の作出培養条件を検討している。その結果、オオヨモギには比較的若い組織由来の茎組織片などに高いシュート形成能があり、その部分を含んでいれば MS 培地でもシュートが形成されることが分かった (図 4)。今後はその部位をさらに特定しその組織片を用いてアグロバクテリウム感染処理を行い、選択培地での再分化誘導および形質転換体選抜を検討する予定である。

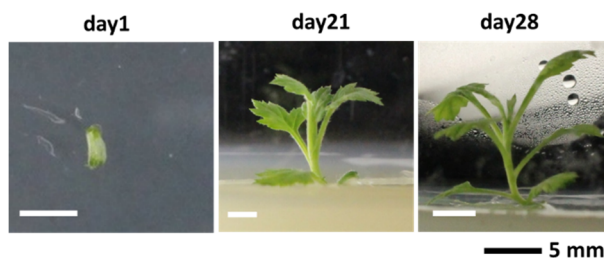


図4. 無菌的に培養した個体の比較的若い茎組織片をMS培地に置床して21日後には再分化した個体を確認できる。

4. 再分化の分子メカニズムについて

我々はこれまで、植物の再分化現象に着目し研究を行ってきた。植物の再分化誘導にはサイトカイニン、オーキシシンといった植物ホルモンの情報伝達を介した経路とこれら植物ホルモンによる調節とクロストークして再分化を調節する傷害ストレス経路の関与が位置づけられている。傷害を受けた組織周辺では、そのストレス情報がサイトカイニンとオーキシシン活性を修復部位の位置情報と連携して微調整し、組織を再分化させたり、分裂活性の高い細胞や幹細胞の形成などを誘導し、新たなしかしもとの組織の性質を回復させる分子メカニズムが明らかにされつつある⁷⁾。その中で、我々はシロイヌナズナ *Secret agent (AtSEC)* について、*sec* 破壊株を用いた表現型解析から野生型と比較してシュート再分化の速さ(もしくは活性)が異なることを見つけた。この因子は *Spindly(Spy)* ジベレリン情報伝達抑制因子とともに機能してサイトカイニン情報伝達を促進すると推定される糖転移酵素であることが示唆されたが我々はさらに *SEC* が傷害ストレス経路に位置づけられる一因子と相互作用することを確認した^{1) 2)}。今後、植物の再分化能を調節するための利用も期待できると考えている。

参考文献

- 1) 亀山貴裕, 修士論文(2018)
- 2) 下保環, 卒業論文(2019)
- 3) 小川直輝, 卒業論文(2019)
- 4) Agarie S, Umemoto M, Sunagawa H, Anai T & Cushman J. C, An agrobacterium-mediated transformation via organogenesis regeneration of a facultative CAM plant, the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum* L, *Plant Production Science*. doi:10.1080/1343943X.2020.1730700, (2020)
- 5) Hwang H.H, Wang C.H, Chen H.H, Ho J.F, Chi S.F, Huang F.C, & Yen H.E, Effective agrobacterium-mediated transformation protocols for callus and roots of halophyte ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*), *Botanical Studies*. 60, doi:10.1186/s40529-018-0249-3, (2019).
- 6) Zhou L, Zheng K, Wang X, Tian H, Wang X & Wang S, Control of trichome formation in *Arabidopsis* by poplar single-repeat R3 MYB transcription factors, *frontiers in Plant Science*, doi:10.3389/fpls.2014.00262, (2014)
- 7) Iwase A, Harashima H, Ikeuchi M, Rymem B, Ohnuma M, Komaki S, Morohashi K, Kurata T, Nakata M, Ohme-Takagi M, Grotewold E, Sugimoto K, WIND1 promotes shoot regeneration through transcriptional activation of *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 29, 54-69, (2017)