

# 研究終了報告書

## 「膜融合による植物への長鎖 DNA 導入技術の開発」

研究期間：2018 年 10 月～2022 年 3 月

研究者：栗原 大輔

### 1. 研究のねらい

植物が持つ様々な形質を調査し、持続可能な作物生産の問題を解決する手段として、これまで種々の遺伝子組換え技術が開発されてきた。しかし従来の遺伝子組換え方法では、多くの種ではカルスやプロトプラストを用いて形質転換をおこなうため、植物個体を作成するためには再生過程が必要となり、その再生過程において、多くの染色体構造異常といった培養変異が生じ、種が稔らない個体が多発する上、植物個体を得るまで多くの年月を必要としてきた。また、既存の DNA 導入技術では、付与したい機能の発現を完全に制御できるわけではないため、未だ、遺伝子組換え体植物は実用化に問題があるのが現状である。狙った有用形質だけを発現する植物個体の作出は、学術分野のみならず、医療・農業分野においても渴望されている技術であり、長鎖 DNA 導入による細胞機能の任意制御がそれを可能とすると期待される。その実現のためにも、培養変異といった DNA 導入操作自体の影響を排除し、長鎖 DNA を導入した植物個体を作成する技術は不可欠である。

我々はモデル植物であるシロイヌナズナにおいて *in vitro* 単離胚珠培養系を用いた植物胚発生ライブイメージング系を開発した(Gooh et al., 2015, Dev Cell)。このことから、受精卵あるいは胚に直接長鎖 DNA を導入することができれば、カルスからの再生過程を経ることがないため、培養変異のない植物個体を作成することができるのではないかと着想に至った。また本さきがけ研究領域が研究する長鎖 DNA に関しては、植物への既存の DNA 導入技術では長鎖 DNA が物理的に損傷を受けてしまい、無傷な状態で導入することが不可能であった。しかし、精細胞と卵細胞が膜融合をおこなう受精のように、膜融合による導入であれば、長鎖 DNA も損傷を受けることなく導入することも可能ではないかと考えた。そこで本研究では、長鎖 DNA を植物細胞に導入する技術として、受精卵または胚へ直接 DNA 導入する技術の開発を行い、導入した受精卵・胚から培養変異なく植物個体を作成することを目的とした。本研究により植物受精卵や胚への DNA 導入技術が確立されれば、これまで遺伝子組換えが困難であった植物にも広く応用できることを期待した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究は植物細胞への長鎖 DNA 導入および導入植物個体の獲得を目指し、(A) 胚培養系の開発、(B) DNA 抱埋ビーズの作製、(C) 植物細胞への導入、の 3 つのテーマで研究を進めた。

#### (A) 胚培養系の開発

培養培地の成分を検討したところ、植物 a では 53% (n = 4)、植物 b では 72% (n = 4) という高い効率で、単離胚から稔性を持つ植物個体へと生長させることに成功した。これらの植物

個体は倍数性に変異はみられなかったことより、大規模な異常を誘発しない胚培養系を確立できた。

### (B) DNA 抱埋ビーズの作製

DNA を粒子に抱埋することで、DNA を安定に細胞へ導入できると期待し、アルギン酸ナトリウムビーズとリポソームの二種類を用いて、DNA 抱埋粒子の作製を行った。アルギン酸ナトリウムビーズについては、マイクロ流体デバイスを用いた微小液滴作製法と収縮・ゲル化法により、粒径が数  $\mu\text{m}$  の DNA 抱埋ビーズを得ることに成功した。

### (C) 植物細胞への導入

これまで、植物は細胞壁や高い膨圧のため、インジェクションの際、針を抜いたときに細胞内の原形質が逆流してしまうため、先端径が細い針を使う必要があった。しかし、細い針の場合、中身を押し出すためには高い圧力が必要であり、長鎖 DNA は物理的に剪断される恐れがあった。電気浸透流の場合は強い圧力はかからないために、長鎖 DNA のインジェクションが期待できる。そこで SU-10(横河電機)を用いて細胞壁を持つ植物細胞へインジェクションできるか検討するために、タバコ培養細胞 BY-2 へのインジェクションを試みた。穿刺距離とインジェクション時間をさまざまに検討し、BY-2 細胞へ FITC-デキストラン・プラスミド DNA 混合溶液をインジェクションできるようになった。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「胚培養系の開発」

#### A-1: 培養培地組成の検討

植物の受精卵・胚から植物体へ、培養変異なく正常に発生する培地を探索した。培地成分の検討した結果、ある種の成分を用いた場合、形態異常や生育不良などがみられたが、別の成分では高い培養能を示した(図1)。濃度も含めて検討した結果、植物 a では 53% (n = 4)、植物 b では 72% (n = 4) という高い効率で、単離胚から稔性を持つ植物個体へと生長させることに成功した。

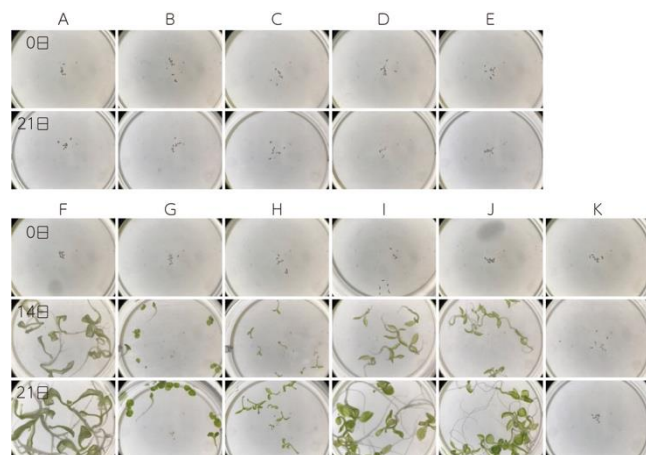


図1：各種培地条件における胚培

#### A-2: 倍数性解析

これら胚培養で生長させた植物個体が培養変異をもつかどうかを調べるために倍数性解析を行った。材料として、各種培地で胚培養し、得られた植物体から種を回収し、その種子を発芽させた実生(胚培養個体の次世代)を用いたが倍数性に変異はみられなかった。この

ように、大規模な異常を誘発しない胚培養系を確立できた。また、これらの培地を用いて、受精卵から初期胚を有する受粉後 72 時間の胚珠を単離して培養したところ、植物体まで育てることに成功した。

## 研究テーマ B「DNA 抱埋ビーズの作製」

### B-1: アルギン酸ビーズ作製

DNA を粒子に抱埋することで、DNA を安定に細胞へ導入できると期待し、DNA 抱埋粒子の作製を試みた。一つ目として、PEG による細胞融合の報告 (Wada et al., 2009, Plant Cell Rep) のあったアルギン酸ビーズを用いた。細胞と融合させても影響が出ないサイズの粒子を作成する必要があると考え、マイクロ流体デバイスを用いた微小液滴作製法を用いることで、粒径 15-20  $\mu\text{m}$  の液滴を作製した。さらに、収縮・ゲル化法 (Hirama et al., 2013, Langmuir) により、2M 塩化カルシウム溶液を用いてゲル化したところ、粒径が数  $\mu\text{m}$  のビーズが得られ、SYBR Green I で染色した DNA の抱埋も確認できた (図2)。

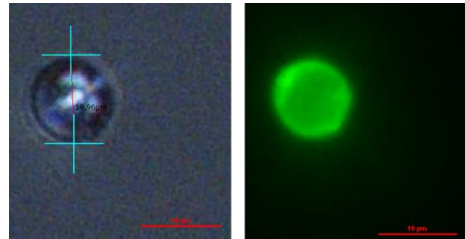


図2：ゲル化後のアルギン酸ナトリウム粒子。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$

### B-2: リポソーム

#### B-2-1: チューブ内でのリポソーム作製

二つ目は、リポソームの作製を試みた。リポソームは脂質二重膜層を形成するため、細胞との融合能が高いことが期待できる。作製法はさきがけ一期生の車愈激博士 (海洋研究開発機構) に教授して頂き、両親媒性のリン脂質であり細胞との親和性が高い PO ホスファチジルコリン (POPC) を用いて作製したところ、蛍光顕微鏡下でリポソーム内に SYBR Green I で染色した DNA の蛍光が確認できる、DNA 封入りポソームが作製できた (図3)。

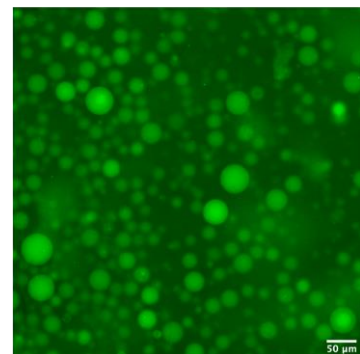


図3：5.3 kb プラスミドを含んだリポソーム (SYBR Green I により染色)

## 研究テーマ C「植物細胞への導入」

### C-1: エレクトロフュージョン

#### C-1-2: リポソームを用いた電気融合

B-2-1 で作製した DNA 抱埋リポソームを用いて、植物細胞との電気融合を試みた。融合条件を検討するために、植物細胞には細胞壁を酵素で消化したタバコ培養細胞 BY-2 のプロトプラストを用いたところ、融合に成功した (図4)。

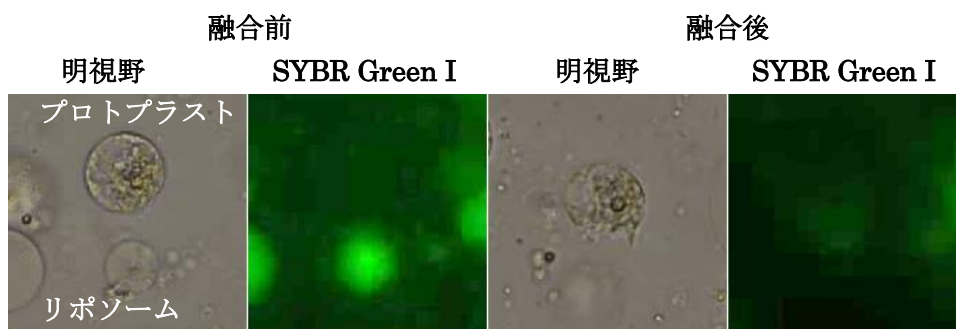


図4：プロトプラストとリポソームの融合

次に、植物 c の受精卵との電圧融合を試みた。しかしながら、リポソームのサイズ、また受精卵と接触する数を制御できていないため、リポソーム同士が融合しやすく、またサイズの大きいリポソームと融合した受精卵は破裂してしまった(図5)。また、植物 b の単離胚と DNA 抱埋リポソームとの電圧融合を試みたが、膜融合は観察できなかった。リポソームのサイズが大きすぎるのが考えられた。

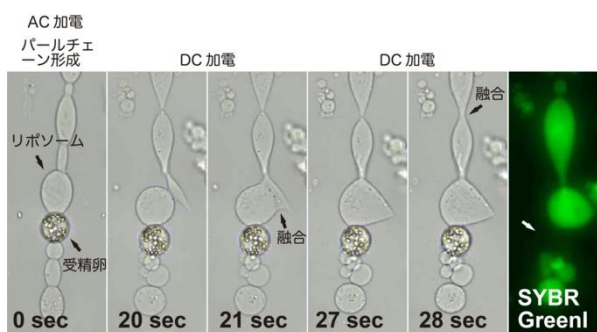


図5：受精卵とリポソームの電圧融合

### C-3: インジェクション

これまで、植物は細胞壁や高い膨圧のため、インジェクションの際、針を抜いたときに細胞内の原形質が逆流してしまうため、先端径が細い針を使う必要があった。しかし、細い針の場合、中身を押し出すためには高い圧力が必要であり、長鎖 DNA は物理的に切断される恐れがあった。電気浸透流の場合は強い圧力はかからないために、長鎖 DNA のインジェクションが期待できる。そこで SU-10(横河電機)を用いて細胞壁を持つ植物細胞へインジェクションできるか検討するために、タバコ培養細胞 BY-2 へのインジェクションを試みた。穿刺距離とインジェクション時間をさまざまに検討し、BY-2 細胞へ FITC-デキストラン・プラスミド DNA 混合溶液をインジェクションできるようになった(図6)。しかしながら、導入 DNA による蛍光タンパク質の発現は確認できなかった。



### 3. 今後の展開

本研究では、植物細胞への長鎖 DNA 導入および導入植物個体の獲得を目指し研究を進め、安定的な植物胚・胚珠の培養系の開発に至った。この培養系を用いることで、植物新品種開発といった育種技術の開発につながると期待できる。有用な新品種開発の際、交雑の組み合わせによっては種子形成の段階で、胚発生や胚乳発生が停止してしまい、次世代の植物個体を得られないことがある。胚救出とよばれる未熟な胚を取り出して、この問題を克服する手法もあるが、その多くは未熟胚から再生過程を経ているため、培養変異が生じる恐れがある。本培養系では培養変異なく未熟胚から植物個体を形成できるため、この問題点を克服できる。また、植物組織深部観察技術により、*in vitro*における初期胚からの発生過程も解析できるため、どの発生時期にどの細胞に異常が生じて発生が停止してしまうのかなど、応用面だけではなく基礎的な研究も促進できる。交雑の組み合わせについては、異種間の他に、倍数性が異なる組み合わせもあり、倍数性が異なる場合、胚乳が萎縮してしまい致死となることが知られている。本培養系では胚乳がなくても胚発生を進行させることができるため、異種間や倍数体間の交雑であっても正常に植物個体を得ることができる技術に繋がると期待できる。

一方、植物細胞への長鎖 DNA 導入は期間内に至らなかった。困難であった点はやはり植物細胞壁の問題と細胞の扱いにくさの問題であった。SU-10 を用いたインジェクションは条件検討がかなり必要ではあるが、細胞壁を持ったままの植物細胞へ試料を注入することが可能であった。しかし、電荷の問題などがあり、現状では植物細胞へプラスミド DNA を注入することは適わなかった。マイクロピペットを穿刺後も植物細胞を培養することは可能と分かったため、今後は SU-10 のインジェクション条件の改良により、植物細胞への DNA の直接導入も可能となるのではと期待できる。

### 4. 自己評価

#### 【研究目的の達成状況】

本研究領域の募集要項に「基礎研究もしくは技術開発において(両面でも可)斬新な発想に基づく挑戦的な提案を採択する方針」とあり、これまで行ったことがない研究領域へチャレンジする良い機会と思い応募をし、私が研究を続けてきた中で開発した一技術を基盤として、植物細胞への DNA 導入という新たなチャレンジを行えたことは大変有り難かった。研究期間内の達成目標はシンプルで、「植物の受精卵・胚へ直接導入することで、長鎖 DNA を安定導

入した植物個体を作成する技術を確立する」であり、DNA 導入は達成に至らなかった。しかし、本研究で改良・開発した胚・胚珠培養技術は今後の展開でも述べたように、育種分野で基礎・応用面で有用であると考えており、今後も研究を促進させていく考えである。

#### 【研究の進め方】

研究実施体制としては学生は参画せず、技術補佐員とともに研究を遂行した。技術補佐員の公募をかけても長く応募がない期間もあったが、参画して頂いた技術補佐員の方々のおかげで研究を進められたことは大変有り難いことであった。研究費執行状況としては技術補佐員雇用の人件費が 41%であった。大型機器購入として、電気融合装置・電動倒立顕微鏡・フローサイトメーター・オープンクリーンベンチ整備が 36%であり、これらの機器により、コンタミネーション少なく、安定して胚培養を行い、倍数性解析や電気融合実験を行うことができた。

#### 【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

本研究で開発を進めた植物胚・胚珠培養技術は農学的な波及効果が期待できる有用な特許に繋がると期待しており、研究者が所属する名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所が主催している、企業とのコンソーシアムでも度々発表をしている。また、バイオビジネスのパートナーリングイベントなどでも発表しており、これらを通じて興味を持った企業との面談を進めているところであり、成果展開が見込める。

#### 【研究者自身として】

私はこれまで植物発生生物学研究で主に顕微鏡技術を駆使してきたが、本さがけ研究を通じてさまざまな技術を取り込む機会を与えて頂き、マイクロ流体デバイスの設計・作製やマイクロインジェクション、電気融合に取り組んだ。植物分野ではあまり異分野の技術や新技術の導入は進んでいないと感じており、これら技術の植物研究への適用性を示せたと評価する。さがけ研究で得た、異分野の研究者との交流や技術の導入により、新しい研究にチャレンジしていく精神により、2020 年度に創発的研究支援事業に採択されたと確信している。今後も失敗を恐れずチャレンジを進めていきたい。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 6件

1. Susaki D, Suzuki T, Maruyama D, Ueda M, Higashiyama T\* (corresponding author), Kurihara D\*(corresponding author). (2021) Dynamics of the cell fate specifications during female gametophyte development in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* (2021) 19: e3001123.2.

さがけ研究で改良を進めている胚珠培養技術を用いて、胚珠の中でシロイヌナズナの卵細胞が作られる様子を生きたままリアルタイムに捉えることに成功した。また、卵細胞や隣接する細胞を単離して、少数の細胞で発現する遺伝子を解析する手法を確立し、卵細胞に隣接する細胞が卵細胞へと細胞運命を変化させる様子を明らかにした。本研究成果は、卵細胞をつくりだし受精を達成する仕組みの解明や、育種・培養技術の開発につながると期待

される。

2. Kurihara D\*(corresponding author), Mizuta Y, Nagahara S, Higashiyama T. ClearSeeAlpha: Advanced optical clearing for whole-plant imaging. *Plant Cell Physiol.* (2021) 62: 1302–1310.

以前開発していた植物を透明化し、複雑な内部構造を解剖することなく1細胞レベルで蛍光観察できる技術、ClearSee (Kurihara et al., 2015, Development)を改良し、より広範な植物種、組織を丸ごと透明化することに成功した。開発したClearSeeAlpha は、ClearSee 処理中に褐変化してしまうベンサミアナタバコやトレンシアのめしべでも、褐変化することなく透明化し、内部構造を蛍光観察することが可能になった。

## (2)特許出願

研究期間累積件数:0 件(特許公開前のもも含む)

## (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### ・学会発表

Kurihara D, Susaki D, Higashiyama T. Live-cell analysis of female gametophyte development in Arabidopsis. Synthetic Morphogenesis: From Gene Circuits to Tissue Architecture. EMBL Heidelberg, Germany. 17 – 20 Mar 2019. ポスター発表(国際)

### ・学会発表

Kurihara D. Live cell analysis and deep imaging for plant development. JSOL2019 (第 16 回日本ナス科コンソーシアム年会). 東北大学青葉山キャンパス. 26 – 27 Sep 2019. 招待講演(国際)

### ・書籍編集

Ueda M, Kurihara D. Plant Embryogenesis. 出版社 MDPI AG. Aug 2021. ISBN: 978-3-0365-1462-8

### ・総説

栗原大輔, 植物生体深部イメージングへの挑戦, 顕微鏡(和文誌)(2020) 55(3): 146–151

### ・プレスリリース

植物の卵細胞かがつくられる様子を生きたまま観察することに成功 ～卵細胞をつくりだし受精を達成する仕組みの解明に期待～ 2021年3月29日

[https://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload\\_images/20210329\\_itbm1.pdf](https://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20210329_itbm1.pdf)