

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658210

研究課題名(和文)植物でのトランジェント発現法による組換えタンパク質生産法の開発

研究課題名(英文)Development of recombinant protein production system using transient expression in plants

研究代表者

野川 優洋 (NOGAWA, Masahiro)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：10283037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：「閉鎖型植物工場」は外界と隔離されているため、遺伝子組換え植物の栽培に適している。本研究では、植物工場で良く栽培されている植物を宿主植物として、T-DNA中にレポーター遺伝子を持つ *A. tumefaciens* を接種によるトランジェント発現法による外来タンパク質生産を試みた。イチゴ果実やカブの根に *A. tumefaciens* を注射器により接種した場合、目的のレポーター遺伝子(intron-GUS)の発現が観察された。植物工場で良く栽培されている葉物野菜ではバキュームインフィルトレーション法による *A. tumefaciens* の接種を行ったが、intron-GUSの発現量は少なく不安定であった。

研究成果の概要(英文)：Plant factory (closed-plant cultivation system) is suitable for cultivation of transgenic plants, because it is isolated from the outer environment. In this study, I tried to apply transient expression system for strawberry, turnip, lettuce, komatsuna, and chinese cabbage. *A. tumefaciens* harboring pIG121-Hm that contain intron-gus expression cassette in T-DNA was injected into a fruits tissue of strawberry and tuberous root of turnip. Gus reporter gene contained intron sequence was expressed in these plants. Vacuum infiltration method was applied for inoculation of *A. tumefaciens* into leaves of lettuce, turnip, komatsuna and chinese cabbage. In turnip leaf, GUS activity was not detected, although it was observed on tuberous root. GUS activity from gus reporter gene (that is not contain intron sequence) was obtained from komatsuna leaf. Expression of intron-gus gene was reduced compared to the case of gus gene without introns to approximately 1/100.

研究分野：分子生物学(植物・微生物)

キーワード：農業工学 バイオテクノロジー 植物 応用微生物 タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 遺伝子組換え植物を利用する「分子農業」

遺伝子組換え植物を用いて工業原料や医薬品を生産する「分子農業」は、野外で作物を育てるように栽培できれば太陽エネルギーを利用して工業原料や医薬品を生産する事になり、従来の石油を原料とする工業生産よりも、CO<sub>2</sub>の発生が少ないカーボンニュートラルな方法である。しかし、日本では社会的な背景から遺伝子組換え植物を野外の田畑で栽培することは困難である。

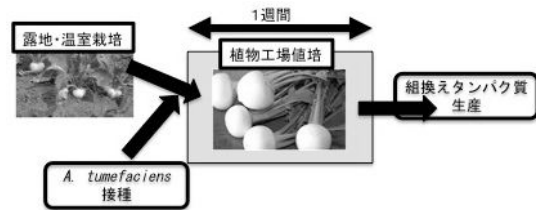
### (2) 植物工場は遺伝子組換え作物の栽培に適している。

最近注目を浴びている「植物工場」は人工光源、エアコンによる温度調節により植物を育てることで天候に左右されない栽培が可能となる。特に「閉鎖型植物工場」は外界から隔離された環境中で植物を育てるために、遺伝子組換え植物の栽培に適している。一方、植物工場での植物の栽培は野外での露地栽培に比較してエネルギーの投入が必要であり栽培コストが問題となる。遺伝子組換え植物による「分子農業」は高付加価値の「組換えタンパク質」を生産できることから、遺伝子組換え作物は植物工場で問題になる生産コストに見合った作物となると考えられる。

### (3) トランジェント法

*Agrobacterium tumefaciens* を接種することで植物内での外来遺伝子を一時的に発現させる「トランジェント発現法」は、植物の遺伝子の機能解析で良く使用される方法である。「トランジェント発現法」は「組換えタンパク質」生産のために時間のかかる遺伝子組換え植物の作出を必要としない。また、植物で発現させる外来遺伝子を変更する場合、新しい外来遺伝子の発現用のパイナリーベクターを作成し *A. tumefaciens* に導入すれば良いので、新たに遺伝子組換え植物を作出するよりも短期間で容易である。さらに、「トランジェント法」を使用する事により、*A.*

*tumefaciens* を接種した後「組換えタンパク質」が発現するまでの期間を閉鎖環境である「完全制御型植物工場」で栽培すればよいので、苗から収穫まで栽培する必要がある「遺伝子組換え植物」の栽培よりも植物工場の使用期間が短く、組換え植物の栽培期間で何度も繰り返し「トランジェント発現法による組換えタンパク質の生産」を行う事ができる。



トランジェント法を利用した  
組換えタンパク質生産

## 2. 研究の目的

「閉鎖型植物工場」は外界と隔離されているため、「遺伝子組換え植物」の栽培に適している。そのため、植物工場での遺伝子組換え作物による有用タンパク質生産が試みられている。本研究では遺伝子組換え植物を作出して植物工場で栽培するのではなく、*Agrobacterium tumefaciens* の接種による一過性の組換えタンパク質発現法「トランジェント法」を応用する事で、植物工場を利用した組換えタンパク質生産の効率化を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 概略

本研究は閉鎖型植物工場で栽培できる植物に、*Agrobacterium tumefaciens* を接種することで一時的に組換えタンパク質を発現させる「トランジェント発現法」を試みた。発現させる組換えタンパク質としては発現を容易に観察できるレポーター遺伝子として - Glucuronidase (GUS) 遺伝子を使用した。宿主植物の栽培条件、接種する *A. tumefaciens* の状態、接種後の栽培環境についてレポーター

遺伝子の発現を比較することで最適化を試みた。

#### (2)使用した植物と *A. tumefaciens*

*A. tumefaciens* の接種には植物、*Brassica rapa* ( サラダカブ、コマツナ、チンゲンサイ )、*Fragaria × ananassa* Duchesne ex Rozie ( イチゴ )、*Lactuca sativa* ( レタス ) 使用した

接種する *A. tumefaciens* は、植物の形質転換実験に良く使用される LBA4404 株を使用した。

LBA4404 株に保持させるバイナリーベクターとしては、植物でのみ *GUS* 遺伝子が発現する *intron-GUS* を保持する pIG121-Hm、また植物においても *GUS* 遺伝子が発現するが、*A. tumefaciens* においてもリーキーに発現してしまう *intron* を持たない *GUS* 遺伝子を保持する pBI121 を使用した。pIG121-Hm を保持する *A. tumefaciens* を用いた接種試験では、植物での「トランジェント発現」の評価に使用し、pBI121 を保持する *A. tumefaciens* を用いた接種試験では植物にどのぐらいの *A. tumefaciens* が付着するかの評価に使用した。*A. tumefaciens* は、植物に付着できないとその後の T-DNA の導入が進まないため、植物への *A. tumefaciens* の付着は重要である。

#### (3)トランジェント発現法

LB 培地で培養した *A. tumefaciens* を T-DNA の輸送システムを作動させる誘導物質である 200 mM のアセトシリンゴンを含む MMA 培地に移し、22 °C で3時間数保持し *vir* 遺伝子を誘導し、植物への T-DNA の輸送能を獲得させた。その後、*A. tumefaciens* を宿主植物に接種した。

*A. tumefaciens* を接種する組織が果実 ( イチゴ ) や塊根 ( サラダカブ ) の場合は、注射器で *A. tumefaciens* 懸濁液を当該組織に接種した。また、塊根など接種する組織が大きい場合は、針で組織表面を複数箇所傷つけ、減圧下で *A. tumefaciens* 懸濁液を浸潤させる「バキュームインフィルトレーション法」を

併用した。*A. tumefaciens* を接種する部位が葉の場合 ( レタス ) はバキュームインフィルトレーション法で行った。*A. tumefaciens* 接種後、植物は3日間20 °C で維持した。

#### (4)GUS活性測定

##### ・GUS組織化学染色

*A. tumefaciens* を接種した植物を切断し50 ml のファルコンチューブに入れ、GUS染色液を植物片が全て浸るように加えた。次いで2分間の減圧を2回行い、植物へのGUS染色液の浸透を促し、37 °C で一晩染色した。その後、染色液を捨て、同量の70%エタノール溶液に浸し、常温で1日間静置し、GUSの反応停止と葉緑素の脱色を行い、染色具合を観察した。

##### ・GUS活性測定

*A. tumefaciens* を接種した試料 0.2 g に対し 3.8 ml の抽出緩衝液を加えよくすり潰し、遠心分離により上清を得た。上清 90 µl に蛍光基質溶液 ( 4 MU-G ) 10 µl を加え攪拌し反応を開始、反応停止は反応停止液 4 ml を加えることで行った。反応温度は 37 °C でとし、各試料につき 0 分、30 分、60 分間反応させた。反応により基質から切り出される 4-メチルウンベリフェロンの蛍光を蛍光分光光度計により測定した ( 励起光 365 nm , 測定光 455 nm )。

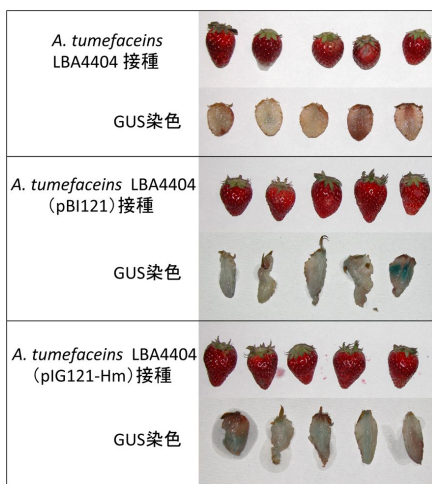
## 4 . 研究成果

### (1)イチゴの果実でのトランジェント発現

イチゴの果実に、バイナリーベクターを持たない *A. tumefaciens*、*intron-GUS* 遺伝子を持つバイナリーベクター (pIG121-Hm) を持つ *A. tumefaciens*、*intron* を持たない *GUS* 遺伝子を持つバイナリーベクター (pBI121) を持つ *A. tumefaciens* の培養液を注射針で接種した。接種した果実を3日間、20 °C で保持し、その後 GUS 組織化学染色によりレポーター遺伝子の発現を確認した。

この結果、植物に T-DNA が導入されて初めて *GUS* 遺伝子が発現する *intron-GUS* 遺伝子を持つ *A. tumefaciens* を接種したところ、

20%程度のサンプルで強いGUS活性を示す青色が観察された。また、intronを持たないGUS遺伝子を持つ*A. tumefaciens*を接種した場合でも、GUS活性を確認できた。一方、ネガティブコントロールであるバイナリーベクターを保持していない*A. tumefaciens*を接種した場合は、GUS活性染色による青色は見られなかった。intron-GUS遺伝子を持つ*A. tumefaciens*の接種で活性が確認できたが、その強さは一様では無く、大きなばらつきが見られた。



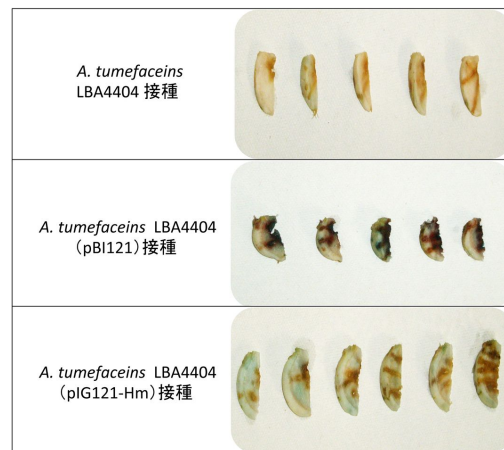
イチゴ果実でのGUSレポーター遺伝子のトランジェント発現

## (2) サラダカブの塊根でのトランジェント発現

イチゴ果実と同じくサラダカブの塊根部分に3種類の*A. tumefaciens*を接種した。

この結果、ネガティブコントロールのレポーター遺伝子を持たない*A. tumefaciens*を接種してもGUS活性は見られなかった。一方、GUS遺伝子またはintron-GUS遺伝子を持つ*A. tumefaciens*を接種したところ、どちらの場合でもGUS活性が確認できた。intronを持たないGUS遺伝子を持つ*A. tumefaciens*は菌そのものが弱くGUS活性を示し、*A. tumefaciens*そのものがGUS染色される。intronを持たないGUS遺伝子を持つ*A. tumefaciens*を接種したときの方が植物で転写翻訳されたときのみGUS活性が見られる

intron-GUS遺伝子を持つ*A. tumefaciens*を接種した実験よりもGUS染色に由来する青色が濃く、これはカブに付着した*A. tumefaciens*に由来するGUS活性がその多くを占めていると考えられた。弱いながらもintron-GUS遺伝子を保持する*A. tumefaciens*を接種したときにGUS活性が見られたことから、トランジェント発現に成功したと考えた。



サラダカブ塊根でのGUSレポーター遺伝子のトランジェント発現

## (3) バキュームインフィルトレーションによるアグロ接種の結果

バキュームインフィルトレーションは、植物を*A. tumefaciens*培養液に浸し、真空になる様にポンプで吸気することで、植物組織(主に葉)から空気を取り除き、そこに*A. tumefaciens*を進入させる方法である。この方法は植物の組織に*A. tumefaciens*を注射するよりも手間をかけずに多くの植物を処理することができる。また、植物工場で栽培されている野菜の多くは葉物野菜であるので、葉に*A. tumefaciens*を接種するには適している方法であると考えられた。

植物工場で良く栽培されているレタスにバキュームインフィルトレーションにより*A. tumefaciens*を接種した。レタスは*A. tumefaciens*を接種しても、その影響で生育が悪くなることはなく、その後も旺盛に生育した。収穫期に近いレタスを使用した場合、

ほとんどトランジェント発現は見られなかった。レタスは *A. tumefaciens* 接種した後も旺盛に生育することから、*A. tumefaciens* に対する耐性が高く、*A. tumefaciens* が感染しにくいことが考えられた。そこで、若いレタスを用いた実験を行ったところ、intron を持たない *GUS* 遺伝子を持つ *A. tumefaciens* を接種したときに高い *GUS* 活性が見られたが、*intron-GUS* 遺伝子を持つ *A. tumefaciens* の接種ではほとんど活性を示さなかった。

塊根への *A. tumefaciens* の接種でレポーター遺伝子のトランジェント発現が観察されたサラダカブであったが、葉へのバキュームインフィルトレーションではレポーター遺伝子の発現は観察できなかった。intron を持たない *GUS* 遺伝子を持つ *A. tumefaciens* を使用した場合でも *GUS* 活性がほとんど確認できなかったことから、実験に用いた条件では *A. tumefaciens* 自身がサラダカブの葉への付着量が少なく、*A. tumefaciens* の付着にひき続いておこる T-DNA の導入が起こりにくい状態であることが考えられた。

サラダカブと同族同種の野菜であるコマツナ、チンゲンサイを使用した実験も行った。チンゲンサイでは、サラダカブの葉での実験と同様に、*GUS* 遺伝子を持つ *A. tumefaciens* を接種しても、*GUS* 活性は観察されなかった。コマツナを使用した実験では、*GUS* 遺伝子を持つ *A. tumefaciens* のバキュームインフィルトレーションにおいて高い *GUS* 活性を示し、*intron-GUS* 遺伝子を使用した場合においても、弱いながらも *GUS* 活性が見られた。

様々な植物でのトランジェント発現

植物	<i>GUS</i>	<i>intron-GUS</i>
イチゴ	++	+
サラダカブ(根)	+++	+
サラダカブ(葉)	-	-
レタス	+	-
コマツナ	++	±
チンゲンサイ	-	-

本研究では、閉鎖型植物工場の有効利用の

一環として、遺伝子組換え植物の作成を必要とせず、*A. tumefaciens* の接種から外来タンパク質発現までの短い期間を閉鎖型植物工場を利用すれば良いという利点が考えられるトランジェント発現法を用いて外来タンパク質の発現系の構築を目指したが、トランジェント発現法での外来遺伝子の不安定な発現を克服することができず、安定した高いレポーター遺伝子の発現は見られなかった。トランジェント法による植物での外来遺伝子の安定的な発現には、*A. tumefaciens* に感受性の高い植物を使用し、効率的な *A. tumefaciens* の接種法の開発が必要と思われる。

#### 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 1件)

野川優洋、高木亜紀代、北澤遥香、中田英典、野末雅之、Vacuum infiltrateon 法を使用した葉物野菜での transient expression による外来タンパク質の発現、日本生物環境工学会、2014年9月2日～9月5日、香川大学幸町キャンパス(香川県)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

野川 優洋 (NOGAWA, Masahiro)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：10283037