

## キノコの発光システムを用いた植物の非破壊的な遺伝子発現解析系確立の試み

重政 恒輔 (筑波大学 生物学類)

指導教員：小野 道之 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景・目的】

植物の動きは動物に比べて静かであるが、その内部では劇的な遺伝子発現の変化があり、それらは概日リズム変動であったり、さまざまな外環境への応答であったりする。これらの遺伝子発現の変化を、植物体をすり潰して RNA を抽出するのではなく、非破壊的に非接触に観察することは理想的であり、これまで多くのシステムが構築されてきた。現状、使われているシステムとしてホタルルシフェラーゼやウミシイタケルシフェラーゼを用いた非破壊的な遺伝子解析システムがある。

しかしながら、そうしたシステムでは均一な基質送達や基質の添加の部分で課題があり改良の余地は大きい。そこで私は発光基質を自身で合成する、自家発光システム系の開発を目指した研究を行った。

先行研究では発光キノコ (*Neonothopanus nambi*) の発光システムを組み込んだ植物が作製されている。この発光システムで用いられる発光基質(3-hydroxy hispidin) は、植物が豊富に含むカフェ酸 (caffeic acid) を初発物質として2段階の酵素反応により合成される。発光酵素 (*luciferase*: *Luz*)はこれを ATP を必要としない反応で酸化して発光し、発光後の代謝物は1段階の酵素反応によりカフェ酸に再生される。そのため外部からの基質投与をせずに光り続けることができる (*Khakhar et al.*, 2020)。しかし、現段階ではこの発光システムによる発光量は非常に少なく、目視では確認できなかった。

そこで本研究では、発光酵素(*Luz*)遺伝子を改変し、酵素改良を行うことによってより強い発光量を示すような植物体の作製を試みる。本研究では、酵素改良を行うためにまず、カフェ酸から発光基質を多量に生産する植物体の作製に取り組んだ。そうした植物体に、改良した酵素遺伝子を導入することで発光量の差異が明らかになり、改良がしやすくなると考えた。酵素遺伝子の導入には、植物-大腸菌のシャトルベクターを用いて、一過性発現による発光の観察と、遺伝子の回収を容易に行うことにした。

## 【材料・方法】

## 1. 発光基質生産植物の作製

植物材料としては、モデル植物であるベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) を用いた。発光基質合成酵素である *hispidin synthase* (*HISPS*) と *hispidin-3-hydroxylase* (*H3H*)、発光基質再生酵素である *caffeoylpyruvate hydrolase* (*CPH*)、*HISPS* の働きを助ける酵素である *4'-phosphopantetheinyl transferase* (*NPGA*) の4遺伝子及び、緑色蛍光タンパク質 (*ZsGreen*) と抗生物質カナマイシン耐性 (*neomycin phosphotransferase II*) の遺伝子を T-DNA 上に組み込んだアグロバクテリウム用のバイナリーベクターを作製した。バイナリーベクターは、Golden Gate 法を用いて、各 DNA 断片を一度に繋ぐ方法により作製した。アグロバクテリウムを用いて、リーフディスク法により、ベンサミアナタバ

コを形質転換した。形質転換植物は、カナマイシン耐性及び、*ZsGreen* の蛍光強度を指標として選抜した。

## 2. 発光酵素の改良

発光酵素の改良を行うために *Luz* の CDS だけを取り出し、CDS の両端に *EcoRI* site、*HindIII* site を導入した。蛍光選抜で発光基質生産が高いことが期待されるベンサミアナタバコ細胞に一過性に導入するために、*Luz* は大腸菌と植物のシャトルベクターである pWI-11 に組み込んだ。この pWI-11-*Luz* をパーティクルガン法などを用いて、発光基質生産をしているベンサミアナタバコに形質転換し、自家発光させる。*Luz* の改良のために、変異 PCR 等を用いた進化分子工学的手法により、より強い発光強度等を示す *Luz* を選抜する。

## 【結果】

報告会にて詳細を報告する。

## 【展望】

将来的には、街路樹などの自家発光に適応できれば、事故防止やSDGsの多くの目標を達成できると考えている。

夜になると暗がりになる学園東大通りをエネルギーを使わずに明るくできると良いと考えており、そのことは事故防止につながると考えている。筑波大学に所属する学生は多数が自転車を使って移動しており、暗い道を自転車移動をしていると木々の枝が顔にぶつかるなどして、重大な事故に繋がりがかねないことを経験したとよく耳にする。そういったことを未然に防ぐためにも、この自律的な発光をする植物を利用することができる。

加えて、街に多く存在する街灯の代わりとなるような存在になることで電気を生み出す際の二酸化炭素量を減らすことができる。そのことは、持続的な社会の実現に向けたSDGsの目標達成に貢献できるのではないだろうか。この研究は社会を変えるような研究のはじめの一歩と言っても過言ではないだろう。

## 【謝辞】

*HISPS*、*H3H*、*CPH*、*NPGA*、*Luz* を含むベクターを提供いただいたミネソタ大学の Daniel F. Voytas 教授、pWI-11 を提供いただいた東京大学の宇垣正志名誉教授に感謝いたします。また、実験等を教示いただいた小野公代博士、小野研究室の皆様にも感謝いたします。本研究の一部は、令和4年度生命環境系科研究費獲得支援金によって実施されました。