

アグロバクテリアを用いた遺伝子導入法の イチゴ属植物への応用

京 正晴, 白井宏枝*

Application of *Agrobacterium*-mediated gene transfer method in *Fragaria*

Masaharu KYO and Hiroe SHIRAI*

Agrobacterium-mediated gene transfer method was attempted in *Fragaria*. Hairy roots were successfully induced from strawberry (*Fragaria* × *ananassa* DUCHESNE) explants infected with *Agrobacterium rhizogenes* A4, suggesting that T-DNA transfer and its expression were possible in *Fragaria*. Transfer of β -glucuronidase (GUS) gene and neomycin phosphotransferase (NPT) gene into tobacco (*Nicotiana tabacum* L. var. Samsun) and Alpine strawberry (*F. vesca* L. var. *semperflorens*) was tried by applying the binary vector system. In tobacco the expression of the two genes and the integration of GUS gene into the plant genome were confirmed, however, in Alpine strawberry neither expression of the two genes was observed.

アグロバクテリアを用いた遺伝子導入法のイチゴ属植物への応用を試みた。*Agrobacterium rhizogenes* A4 を用いてイチゴ (*Fragaria* × *ananassa* DUCHESNE) に毛状根を誘導することができたことからアグロバクテリアによる T-DNA の転移と遺伝子発現はイチゴ属植物において可能であると思われた。 β -グルクロニダーゼ遺伝子およびネオマイシンフォスフォートランスフェラーゼ遺伝子をバイナリーベクター方式によってタバコ (*Nicotiana tabacum* L. var. Samsun) と再生頻度の高かったアルペンイチゴ (*F. vesca* L. var. *semperflorens*) に導入することを試みた。タバコでは両者の発現と前者のゲノム内の存在が確認されたが、アルペンイチゴではいずれの発現も観察されなかった。

緒 言

高等植物への遺伝子導入技術は、主に組織片からの再生頻度が高いナス科植物を中心としてここ数年急速に進歩し、薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子以外にも農業上重要な意味を持つ様々な遺伝子の導入と形質発現が報告されている⁽¹⁾。今後この技術は様々な植物種に応用されて既存の技術と併用されながら育種に利用されて行くと考えられる。現在双子葉植物において最も確実に遺伝子を導入し発現させる方法は、土壌性の植物寄生菌であるアグロ

* 現在、香川県高等学校教員

バクテリアの感染によって Ti プラスミド上の T-DNA 領域が宿主染色体に組み込まれる現象を利用したアグロインフュクション法である。最近開発されたバイナリーベクター方式のアグロインフュクション法^(2, 3)では、本来は Ti プラスミド上に存在する T-DNA 領域を比較的小型のプラスミド上に独立させてあり T-DNA 領域の遺伝子操作が容易である。そして植物細胞内で発現する適切なプロモーター、構造遺伝子、ターミネーターを備えた DNA 断片を T-DNA の左右境界配列の間に挿入すれば任意の遺伝子を双子葉植物に導入し発現させることが可能である。本研究では上述のような遺伝子導入法がイチゴ属植物にも適用可能であるかどうかを調べるために、*Agrobacterium rhizogenes* による毛状根の誘導および *A. tumefaciens* を用いたバイナリーベクター方式によるカナマイシン耐性遺伝子とグルクロニダーゼ遺伝子の導入を試み、問題点と可能性について考察した。

材料及び方法

バクテリア及びプラスミド

Agrobacterium rhizogenes A4 は American Type Culture Collection (Rochville, Maryland)より購入した。T-DNA 領域を欠失した Ti プラスミド (pAL4404) を有する *A. tumefaciens* LBA4404⁽²⁾、およびプラスミド pRK2013⁽⁴⁾、pBI121⁽³⁾ を有する大腸菌 (*Escherichia coli* HB101, C600) は市販品 (Toyobo, Osaka) を用いた。pBI121 は大腸菌、アグロバクテリアいずれでも機能する広宿主域複製開始点を有し、T-DNA の左右境界配列 (LB, RB) の間に図 1 に示したようにプロモーターおよびターミネーターを備えた、選択マーカーとしてのネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子 (NPT, カナマイシン耐性遺伝子) およびレポーター遺伝子としての β -グルクロニダーゼ遺伝子 (GUS) が挿入されている。

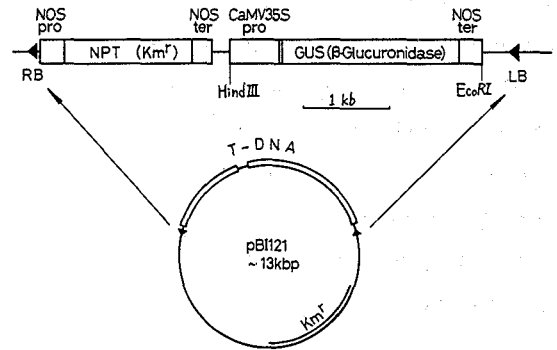


図1 pBI121とその T-DNA 領域の構成
NOS-pro: ノバリン合成酵素遺伝子プロモーター, NOS-ter: ノバリン合成酵素遺伝子ターミネーター, CaMV35S-pro: カリフラワーモザイクウィルス35S プロモーター

トリペアレンタルメティングによる *Agrobacterium* への pBI121 の導入^(2, 3)

pRK2013 を有する大腸菌、pBI121 を有する大腸菌および *A. tumefaciens* LBA4404 の三者を LB 培地上で 25°C 一晚共存培養 (tri-parental mating) した後、バクテリアを 10 mM MgSO₄ で遠心洗浄し沈澱を適宜希釈しカナマイシン 200 ppm を含む minimal 培地⁽⁵⁾ 上で 25°C, 3日培養後、単一コロニーをスクリーニングした。Minimal 培地上での大腸菌の増殖はアグロバクテリアのそれよりも遅く、pBI121 は図 1 に示したように原核生物で発現するカナマイシン耐性遺伝子も有しているので pBI121 を導入されたアグロバクテリアを選抜できる。導入された pBI121 はアルカリ-SDS 法⁽⁵⁾ によって抽出し Hind III, EcoRI で完全分解後、アガロースゲル電気泳動によって確認した。

アグロバクテリアの葉切片への接種と形質転換体の選抜

タバコ (*Nicotiana tabacum* L. var. Samsun) またはアルペンイチゴ (*Fragaria vesca* L. var. *semperflorens*, サカタのタネ, 横浜) の無菌植物は滅菌した種子を 2 倍希釈した Murashige-skoog 培地⁽⁶⁾ (1/2MS) で培養することによって得た。この植物体の葉切片 (0.5 cm 角) を pBI121 を導入した *A. tumefaciens* LBA4404 の 20 hr 培養液 (LB 培地) に 30 秒浸した後、再生に適した植物ホルモン組成を含む 1/2MS 寒天培地 (再生培地) に置

床した (pre-culture). 二日後アグロバクテリアの増殖を抑えるための 100 ppm クラフォラン (Hoechst Japan, Tokyo) と形質転換体選抜のためのカナマイシン (0-100 ppm) を含む再生培地に移植し 25°C 明条件 (10,000 lux) 下で培養を続けた。葉片上に生じた不定芽または幼植物体は同じ組成の培地に移植し除菌をかねて成長させた。除菌が完了したことは植物体の組織を無菌的に潰して LB 培地に塗布し, 数日培養してもバクテリアの増殖がみられないことによって確認した。

毛状根の誘導とオバインの検出

イチゴ (*Fragaria* × *ananassa* DUCH. var. Ai-berry) のランナーを 1/10 希釈のアンチホルミンで滅菌し滅菌水で十分に洗浄後, 約 1 cm の断片として MS 寒天培地に直立させ, その上端に *A. rhizogenes* A4 を塗布し, 明所で培養した。約二ヶ月の後, 生じた毛状根をクラフォラン 100 ppm を含む 1/2MS 寒天培地に置床し暗所にて二度継代した後, 1/2MS 寒天培地で継代した。アグロピン, マンノピンの検出は Tepfer らの方法⁽⁷⁾ によった。

導入された遺伝子の検出

カナマイシン耐性と GUS 活性を示した形質転換体植物の葉組織約 2 g から CTAB 法⁽⁹⁾ によって約 40 μg の DNA を得た。Hind III と EcoRI により完全分解した後アガロースゲル電気泳動により分離し, Southern 法⁽⁵⁾ によりニトロセルロース膜に転写した。低融点アガロース法で精製した pBI121 の Hind III, EcoRI 断片を digoxigenin-dUTP で標識したものをプローブとして, 上述のニトロセルロース膜にハイブリダイズし ELISA 法で, 植物に導入された GUS 遺伝子を検出した。プローブの標識と ELISA 法は市販の “DNA Labeling and Detection Kit” (Boehringer-Mannheim, W. -Germany) のプロトコールによった。

GUS 活性の組織化学的検出

5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-glu) を 2 mM 含むリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) をミリポアで除菌した後プラスチックシャーレにマウントし, 形質転換植物の葉, 茎, 根, 茎頂などの組織切片を浸し 25°C 暗所で一晚インキュベートした後, 顕微鏡観察した。β-グルクロニダーゼの存在部位に於て X-glu は分解を受け最終的にインジゴとなり青色が観察される。葉組織に関してはさらに一晚 70% エタノールに浸してクロロフィルを脱色してから観察した。

イチゴ属の葉切片からの再生条件の検討

茎頂培養で得られたイチゴ (*Fragaria* × *ananassa* L. var. DUCH.) の 3 品種, アイベリー, みよし, とよのかの無菌植物, および滅菌種子から得られたアルペニイチゴの無菌植物を材料としてそれらの葉切片 (0.5 cm 角) をオーキシン (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, 2, 4-D または 1-naphthaleneacetic acid, NAA), およびサイトカイニン (benzyladenine, BA) を含む 1/2MS 寒天培地に置床し 25°C, 10,000 lux 照明下で培養した。

結 果

アグロバクテリアの遺伝子導入能力の確認

Tri-parental mating の後選抜されたアグロバクテリアをタバコ葉切片に感染させ形質転換植物の選抜を試みた。pre-culture の後, 葉片を BA 1 ppm, クラフォラン 100 ppm, カナマイシン 0, 30, または 100 ppm 含む MS 寒天培地に置床した。コントロールとしては葉片を LB 培地に浸したものを同様に培養した。約一ヶ月後の再生状況を表 1 に示す。カナマイシン 0, 30 ppm 存在下ではアグロバクテリア処理区, 無処理区いずれにおいても全ての葉片で多数の再生体の出現がみられたが GUS 活性を示した個体はなかった。カナマイシン 100 ppm 存在下ではアグロバクテリア処理区において再生頻度はやや低いものの, 再生個体の組織片を X-glu 溶液中で一晩インキュ

べートすると通導組織や傷害部位が青く染色された。100 ppm カナマイシン存在下で再生した再生個体の73%において上述のような組織特異的 GUS 活性がみられ、形質転換体であると考えられた。無処理区では再生体の出現はみられなかった。カナマイシン耐性と GUS 活性をともに示した個体のうち1個体について導入遺伝子の検出

表1 タバコ形質転換体の選抜

	カナマイシン (ppm)		
	0	30	100
+Agroinfection			
再生頻度 (%)	100 ¹⁾	100	30
GUS 陽性個体 (%)	0	0	73
Control			
再生頻度 (%)	100	100	0
GUS 陽性個体 (%)	0	0	nd

1) (再生個体のみられた葉片数/培養葉片数) × 100

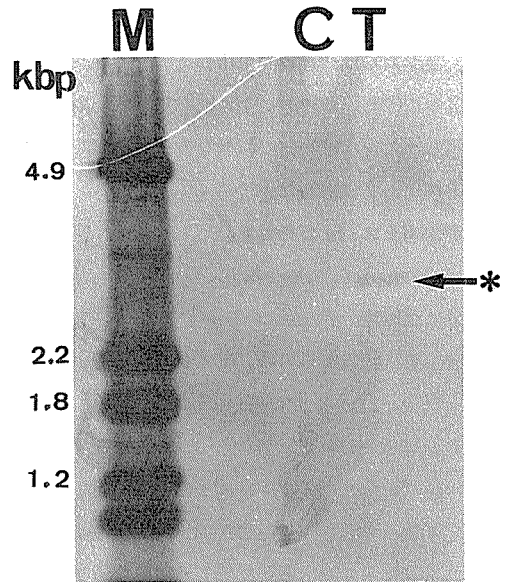


図2 サザンハイブリダイゼーションによるタバコ形質転換体の GUS 遺伝子の検出
M: marker, C: control, 非形質転換体 DNA 20 μg, T: 形質転換体 DNA 20 μg

を試みたところ、pBI121 の Hind III /EcoRI 断片と同じ 3 kbp の位置にバンドを検出することができた (図 2)。Tri-parental mating によって得られた23系統のバクテリアを用いて同様にタバコの形質転換を試みたところ21系統においてはほぼ同程度の頻度で GUS 活性を示すカナマイシン耐性個体が得られ、遺伝子導入能力が認められたが2系統では認められなかった。

イチゴ毛状根の誘導と毛状根からの再生体の試み

アグロバクテリアがイチゴ属植物に感染できるか否かを調べるために、*Agrobacterium rhizogenes* A4 をアイベリーのランナーの切片に感染させたところ約二ヶ月後に鮮紅色の毛状根の出現がみられた (図 3-A)。この毛状根は植物ホルモンを含まない培地上で旺盛に成長し (図 3-B)、アグロピン、マンノピンの存在も確認された (図 3-4) ことから、T-DNA が導入されていると判断された。この毛状根を 1/2MS 培地を基本として BA (0, 0.1,

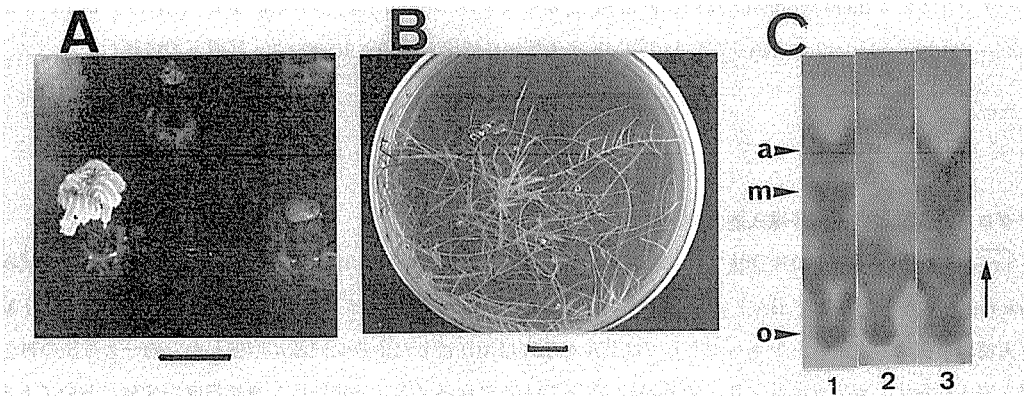


図3 A) イチゴのランナー切片に生じた毛状根, Bar=1cm, B) 寒天培地上での毛状根の増殖, Bar=1cm, C) 濾紙電気泳動と銀染色によるマンノピン(m)とアグロピン(a)の検出, 1) マーカーとしてのトマト毛状根抽出物, 2) イチゴ無菌植物根部抽出物, 3) イチゴ毛状根抽出物. o=origin

0.3, 1 ppm) と NAA または 2, 4-D (0, 0.1, 0.3, 1 ppm) を 28通りの組合せで添加した培地に置床したところ一部で活発なカルスの増殖がみられた。しかしながら再生体の出現はみられなかった。

イチゴ属の葉片からの再生条件の検討

上述の毛状根が良好な成長を示した 1/2MS 培地を基本とし, BA (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 5 ppm) および NAA または 2, 4-D (0, 0.1, 0.3, 1 ppm) を含む 42通りの培地上でイチゴ 3品種の葉片を培養し再生を試みた。1 濃度区当たり供した葉切片数は, アイベリー 20-120切片, とよのか 8-12 切片, みよし 6-42 切片であったが, 前者 2品

表 2 アルペンイチゴ葉片からの再生条件の検討

BA (ppm)	NAA (ppm)				2, 4-D (ppm)		
	0	0.1	0.3	1	0.1	0.3	1
0	—	—	—	—	0/8 ¹⁾	0/8	0/8
0.1	—	—	—	—	0/8	0/8	0/8
0.3	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	—
1	0/22	19/32	11/17	13/16	3/33	9/14	14/23
3	0/6	4/8	0/8	0/8	0/8	0/7	0/7
5	0/9	2/8	3/10	3/8	0/7	0/7	0/8

¹⁾ (再生個体の現れた葉片数) / (置床した葉片数)

種では再生個体はみられず, みよしにおいては BA 1ppm, 2, 4-D 0.1ppm において 1 個体のみ再生した。アルペンイチゴでは BA 1ppm, NAA または 2, 4-D 0.1ppm 存在下において置床した切片の 12-81% に再生体の出現がみられた (表 2)。

アルペンイチゴへの遺伝子導入の試み

上述のように, アルペンイチゴにおいてきわめて高い再生頻度を得られたので基本培地として BA 1 ppm, 2, 4-D 0.1ppm を含む 1/2MS 培地を用いてタバコの場合と同様の方法で遺伝子の導入を試みた。約 3 ヶ月の培養後の結果を表 3 に示す。タバコの場合と異なりカナマイシン存在下では再生体は全く見られなかった (図 4-A)。カナマイシン 0 ppm では, アグロバクテリア処理区及び無処理区において置床した葉片のそれぞれ 20% 及び 71% (図 4-B) において再生体の出現がみられた。アグロバクテリア処理区で得られた再生体約 180 個体を除菌をかねて同じ組成の培地に移植しその葉片を用いて GUS 活性の組織化学的検出を試みたがいずれからも検出されなかった。

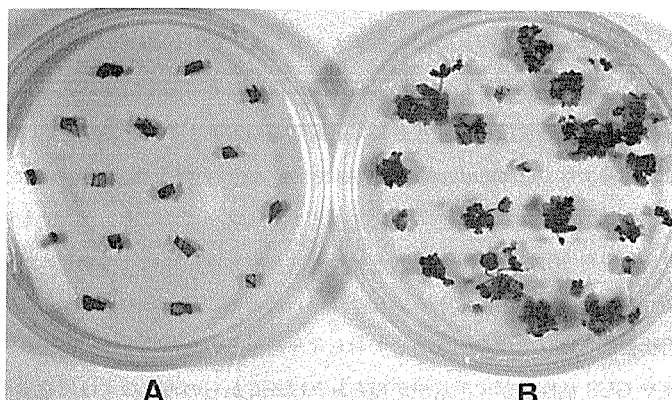


図 4 アルペンイチゴ葉片からの植物体再生
カナマイシン 10 ppm (A), 0 ppm (B) 含有。

表 3 アルペンイチゴ形質転換体の選抜

	カナマイシン (ppm)			
	0	10	30	100
+Agroinfection				
再生頻度 (%)	20 ¹⁾	0	0	0
GUS 陽性個体 (%)	0	nd ²⁾	nd	nd
Control				
再生頻度 (%)	71	0	0	0
GUS 陽性個体 (%)	0	nd	nd	nd

¹⁾ (再生個体のみられた葉片数/培養葉片数) × 100

²⁾ not done

考 察

野生種に近いアルペイチゴは二倍体種 ($2n=14$) であって、栽培種 ($2n=56$) である、とよのか、アイベリー、みよしとは異なり適切なホルモン濃度区においてはタバコに匹敵する再生頻度を示すことが分かった。この極端な相違は遺伝的要因、とくに倍数性の違いによるのではないかと想像される。

Tri-parental mating によって得られたバクテリアの約90%はタバコに対して遺伝子導入能力があると考えられた。遺伝子導入能力を確かめた1系統を用いてアルペイチゴに NPT 遺伝子および GUS 遺伝子の導入を試みたが再生個体中にはいずれの形質を示すものも見られなかった。このことは i) アグロバクテリアの感染が成立しなかったか ii) NPT, GUS 遺伝子のプロモーターとして用いた NOS-プロモーター, CaMV35S-プロモーターが機能しなかった可能性が高い。

A. tumefaciens と *A. rhizogenes* の植物への感染機構は類似していると考えられ、アイベリーにおいて *A. rhizogenes* が感染して形質転換体である毛状根が得られたことは他の品種およびイチゴ属においても *A. rhizogenes* や *A. tumefaciens* の感染が成立しうることを強く示唆するものである。アグロバクテリアの感染に際して働く Ti プラスミド上の Vir 領域に存在する遺伝子群の発現は、フェノール性化合物であるアセトシリシゴンや単糖類によって活性化されることが知られている⁽⁸⁾。アルペイチゴにアグロバクテリアを感染させる場合にそのような物質を培地に添加しておくことは有効かも知れない。また今回の実験では葉切片にアグロバクテリアを接種し、pre-culture の後、タバコと同様にすぐにカナマイシンを含む選択培地に移植したが、イチゴ属ではタバコの場合よりも導入された遺伝子の発現に時間を要することも考えられるので、不定芽の形成がみられる時期まで培養してからカナマイシン培地へ移植した方が形質転換体を得られる可能性は高いと思われる。また導入遺伝子の発現量やカナマイシンに対する感受性なども考慮して選択培地のカナマイシン濃度を下げることも検討する必要がある。

今回の実験では *A. tumefaciens* LBA4404 を GUS, NPT 遺伝子の導入に用いたが毛状根を誘導することのできた *A. rhizogenes* A4 にトリペアレンタルメイティングによって pBI121 を導入すれば、アイベリーなど食用イチゴへの GUS や NPT 遺伝子の導入も可能と考えられる。ただこの場合には形質転換体は毛状根として得られるので育種への応用を将来的に考える場合には得られた毛状根からの再生を必要とする。結果に述べたようにアイベリーの毛状根からの再生は今回成功しておらず今後も高頻度の再生は期待できないと思われる。しかし、カナマイシン耐性や GUS 活性を示す毛状根が得られればそこからの再生体もほぼ確実に両形質の遺伝子を有していると期待されるので再生体の形成頻度の低さはそれほど大きな問題ではない。むしろ *A. rhizogenes* が本来もっている Ri プラスミドの T-DNA 上に存在する毛状根形成を誘導する遺伝子群が再生植物体の形態異常を引き起こすことが懸念される。

謝 辞

アイベリーを御提供いただき多くの御助言を賜った本学農業生産学科園芸学大講座・吉田裕一先生、とよのかを御提供いただいた徳島県立農業試験場・小川純一氏に感謝致します。

引用文献

- (1) UCHIMIYA, H., T. HANDA, D.S.BRAR: *J. Biotechnology*, **12**, 1-20 (1989).
- (2) HOEKEMA, A., P.R.HIRSCH, P.J.J.HOOYKAAS, R.A.SCILPEROORT: *Nature*, **303**, 179-180 (1983).
- (3) JEFFERSON, R. A., T. A. KAVANAGH, M. W. BEVAN: *The EMBO J.*, **6**, 3901-3907 (1987).
- (4) DITTA, G., S. STANFIELD, D. CORRIN, D. R. HELINSKI: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7347-7351 (1980).
- (5) MANIATIS, T., E. F. FRITSCH, J. SAMBROOK (eds): *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
- (6) MURASHIGE, T., F. SKOOG: *Physiol Plant*, **15**, 473-497 (1962).
- (7) TEPPER, D.A., J. TEMPE: *C.R.Acad.Sci.Paris* **292**, Serie III, 153-156 (1981).
- (8) BOLTON, G.W. NESTER, M.P. GORDON: *Science*, **232**, 983-985 (1986).
- (9) ROGERS, S.O., A.J. BENDICH: *Plant Molecular Biology*, **5**, 69-76 (1985).

(1990年5月31日受理)