

リーフレタス (*Lactuca sativa* L.) の形質転換系の確立羅 淑萍<sup>1</sup>, 秋田 求<sup>2</sup>, 太田 喜元<sup>2</sup>

## 要旨

リーフレタスのシュート誘導系とそれを利用した遺伝子導入系の開発を試みた。茎頂組織を材料としサイトカイニンとして BA を含む培地により液体回転培養した結果、苗条原基を効率よく誘導することができた。得られた苗条原基からは容易にシュートが誘導でき発根させることができた。また、苗条原基に対して *Agrobacterium tumefaciens* による GUS 遺伝子の導入を試みたところ、選択マーカー (カナマイシンとハイグロマイシン) に耐性を示す個体が得られた。これらの個体から葉を採取し、GUS 活性を測定した結果、強い活性を示した。

## 1. 緒言

ヒト生理活性タンパク質、抗体、ワクチンなど人間の健康な生活にとって有用な種々のタンパク質を遺伝子組換え植物を用いて生産することは、近い将来、重要な技術になると予想されている<sup>(1)</sup>。植物を利用することには、生産に要するエネルギー消費を少なくし、かつ、環境へのインパクトを減らすのに役立つこと、動物細胞に生産させる場合と異なり人間と共通の未知の病原体が含まれる可能性がないことなど、多くの利点がある<sup>(2)(3)</sup>。現在、植物細胞へ外来遺伝子を導入し、発現させることによって、目的物質を効率よく生産させる研究が盛んに行われている。

例えば、生食される植物に医療用のタンパク質を生産させれば、それを食べることで病気予防や治療が可能になる。植物に経口ワクチンを生産させ、その効果を確認した例はすでに明らかになっている (例えば、Gilら<sup>(4)</sup>、Websterら<sup>(5)</sup>)。インシュリン注射の代用として糖尿病患者が利用できる米も開発されている。これらの例は、植物の遺伝子組換え技術が医療分野にも貢献できることを示している。言うまでもなく、食用の遺伝子組換え植物の利用を治療の選択肢に加えることは、患者の経済的、肉体的な負担や危険性を軽減することばかりでなく、患者のQOLを高めるうえでも非常に重要と考えられる。

これまで多くの植物で遺伝子組換えの報告があり、単子葉・双子葉、草本・木本各々について、遺伝子導入法が報告されている。遺伝子導入法のなかで多用されているのは、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) を利用する方法である。アグロバクテリウムは土壤細菌の一種で、植物に感染し、Ti または Ri プラスミド上の DNA の一部の領域を植物のゲノムに挿入することができる。従って、この領域に組み込みたい DNA を挿入しておけば、そのアグロバクテリウムを対象植物に感染させることで遺伝子組換え植物を作出することができる。当

---

1. Department of Biochemistry, Xinjiag Agricultural University, Xinjiag 830052, China

2. Department of Biotechnological Science, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

初, この細菌を利用して遺伝子組換えが可能なのは双子葉植物に限られていたが, 現在では, この問題も解決されているとあってよい. しかしながら, 全ての植物に, アグロバクテリウム法を利用できるとは限らない. すなわち, アグロバクテリウムを感染させることができない植物が存在する. また, アグロバクテリウム法に限らず植物の遺伝子導入法一般に共通することであるが, 遺伝子導入した植物細胞から個体を安定して分化させる技術が, 全ての植物について必ずしも確立されていないという大きな問題がある.

そこで我々は生で利用される植物としてレタスを用い, その遺伝子組換え系を確立することを試みた. レタスの遺伝子組換え法についてはすでに報告があるものの<sup>(6)</sup>, 他の多くの植物に見られるように, 品種ごとに組換え細胞からの分化条件が異なることがあり, 通常は, 利用する品種の各々について分化条件の検討を要する. 結果, リーフレタスの遺伝子組換え法を確立できたので報告する.

## 2. 実験材料および方法

### (1) 供試植物

植物としてリーフレタス (*Lactuca sativa* L.) を用いた. 数十粒の種子を 70% (w/w) エタノールに 1 分間浸し, 直ちに次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度 1%, 界面活性剤として 200 ml あたり数滴の中性洗剤を含む) に 15 分間浸漬した. この間, 種子と溶液が十分に接触するように, マグネチックスターラーを用いて低速で攪拌した. 次いで, クリーンベンチ内で滅菌水 (約 100 ml) を用いて 3 回洗浄した. 無菌播種用の培地として, 1/2 強度の MS 培地<sup>(7)</sup> (シュークロース濃度  $15\text{g l}^{-1}$ , 寒天 (和光純薬) 濃度  $10\text{g l}^{-1}$ , オートクレーブ前 pH5.8) を用いた. 培地は試験管 (直径 2.4cm × 長さ 15cm) に 10ml ずつ分注したのちオートクレーブ殺菌した. 栓にはシリコセン (信越化学) を用いた. 培地に無菌化した種子を一粒ずつ植え,  $25^{\circ}\text{C}$ , 光強度約  $70\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 日長 12 時間の条件で約 2 週間培養し無菌植物体を得た.

### (2) レタスの培養条件

苗条原基誘導の基本培地として MS 培地 (シュークロース濃度  $30\text{g l}^{-1}$ ) を用いた. 培地に BA  $0.1\text{ mg l}^{-1}$  と NAA (0, 0.1,  $1.0\text{ mg l}^{-1}$  の各濃度) を添加したのち, pH 調整 (pH5.8) しオートクレーブ殺菌した. 培地は上記サイズの試験管に 10ml ずつ入れて滅菌した. 栓にはシリコセンを用いた. 無菌植物の茎頂組織約 1mm を無菌的に摘出し, 苗条原基誘導用の培地 (以下液体培地) に移植し, 試験管用の回転培養器 (HSK-RB, 広島設備開発製) で 2.5 rpm にて回転培養した.  $25^{\circ}\text{C}$ , 弱光下で約 40 日間培養した. 誘導された苗条原基は, 同じ培地で約 20 日ごとに継代維持した.

苗条原基からのシュートの誘導には, ホルモンとして各  $0.01\text{mg l}^{-1}$  の BA と NAA を含む 1/2 強度の MS 培地 (シュークロース濃度  $15\text{g l}^{-1}$ , ゲルライト濃度  $2.5\text{g l}^{-1}$ , オートクレーブ前 pH5.8)

を用いた。培地は上記サイズの試験管に 10ml ずつ入れ滅菌した。栓にはシリコセンを用いた。苗条原基をこの培地に移植し、25°C、弱光下、日長 12 時間の条件で培養した。シュートからの発根には、ホルモンフリーの 1/2 強度の MS 培地（シュークロース濃度  $15\text{g l}^{-1}$ 、ゲルライト濃度  $2.5\text{g l}^{-1}$ 、オートクレーブ前 pH 5.8）を用いた。培地は 100ml のエレンマイヤーフラスコに 50 ml ずつ分注、シリコセンを用いで封じ滅菌した。シュートを移植し、25°C、光強度約  $70\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 、日長 12 時間の条件で培養した。

### (3) アグロバクテリウムの培養と感染

アグロバクテリウム用バイナリーベクター pIG121-Hm<sup>(8)</sup> は、名古屋大学大学院生命農学研究科・中村研三教授よりいただいた。プラスミドは *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404 株, Invitrogen) に electroporation によって導入した。導入条件はメーカープロトコルに従った。菌は、15ml ポリプロピレンチューブに 3ml の YEB 培地（カナマイシンとハイグロマイシンを各々  $50\text{mg l}^{-1}$  含む）をいれ、28°C、約 200rpm で一晩振とう培養した。3000rpm、10 分間の遠心分離によって培地と分離し、2. で決定された液体培地 4 ml で 2 回洗浄した。次いで、 $10\ \mu\text{g ml}^{-1}$  のアセトシリンゴンを含む以外は上記と同組成の液体培地 10 ml に懸濁した。約 40 日間培養した苗条原基を軽く砕いてからこの懸濁液に入れ、5 分間の吸引・減圧を行ったのち、苗条原基のみを取り出した。アセトシリンゴン  $10\ \mu\text{g ml}^{-1}$  を含む固形培地（上述のシュート誘導用の培地）に移植して、28°C、暗条件下で 3 日間共存培養した。共存培養後、カルベニシリン  $500\ \text{mg l}^{-1}$  を含む滅菌水で 2 回すすぎ、1500 rpm で 1 分間遠心分離したのち、カナマイシンとハイグロマイシンを各々  $25\text{mg l}^{-1}$ 、カルベニシリンを  $500\ \text{mg l}^{-1}$  含むシュート誘導用固形培地に移植し、25°C、光強度約  $70\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 、日長 12 時間の条件で 1 週間培養した。1 週間後、同じ組成の新しい培地に移植することを 3 回繰り返し、次いで、カルベニシリンを含まない以外は同じ培地で培養してシュートを誘導し発根させた。

### (4) GUS 遺伝子の発現

20mg/ml の X-Gluc（5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide）を  $500\ \mu\text{ l}$ 、12.5mM の  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  を  $400\ \mu\text{ l}$ 、12.5mM の  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  を  $400\ \mu\text{ l}$ 、Triton-X-100 を  $30\ \mu\text{ l}$ 、メタノールを  $200\ \mu\text{ l}$ 、150mM のリン酸バッファー（pH 7.0）6670  $\mu\text{ l}$  を使用直前に混合し、これに試料を入れ、全体が浸るように 37°C の恒温器中で一晩培養した。70% エタノールを入れて反応を停止させ観察した。

## 3. 結果および考察

### (1) リーフレタスのシュート誘導条件

リーフレタスの茎頂組織を、サイトカイニンとして BA を  $0.1\ \text{mg l}^{-1}$  含み、かつオーキシンとして NAA を 0, 0.1,  $1.0\ \text{mg l}^{-1}$  の各濃度で含む液体培地中で 40 日間培養した結果、いずれのホルモン条件でも苗条原基が誘導された。従って、苗条原基は基本的に BA 処理のみによって

誘導できることがわかった。NAAを添加しなかった場合、葉の分化が目立った。また、NAAを $1.0\text{ mg l}^{-1}$ 添加したものでは生育がやや劣った。以上の結果から、BA  $0.1\text{ mg l}^{-1}$ 、NAA  $0.1\text{ mg l}^{-1}$ のホルモン条件が苗条原基誘導には最も適当と考えられた。

得られた苗条原基からのシュートの誘導は、ホルモンとして各 $0.01\text{ mg l}^{-1}$ のBAとNAAを含む1/2強度のMS培地で良好に見られた。シュート形成は、培地変更後1ヶ月以内に認められたが、苗条原基誘導時の培地のホルモン組成によって影響された。最もよく苗条原基が得られたBA  $0.1\text{ mg l}^{-1}$ 、NAA  $0.1\text{ mg l}^{-1}$ のホルモン条件で培養した苗条原基の組織片を約 $50\text{ mg}$ とり培養したところ、6本から21本のシュートが得られた。苗条原基誘導用培地のNAA濃度 $0\text{ mg l}^{-1}$ 、 $1.0\text{ mg l}^{-1}$ の順で、苗条原基の重量あたりに得られるシュート形成数が減少した。図1には、上記の至適条件で培養した苗条原基とシュートの状況を示した。

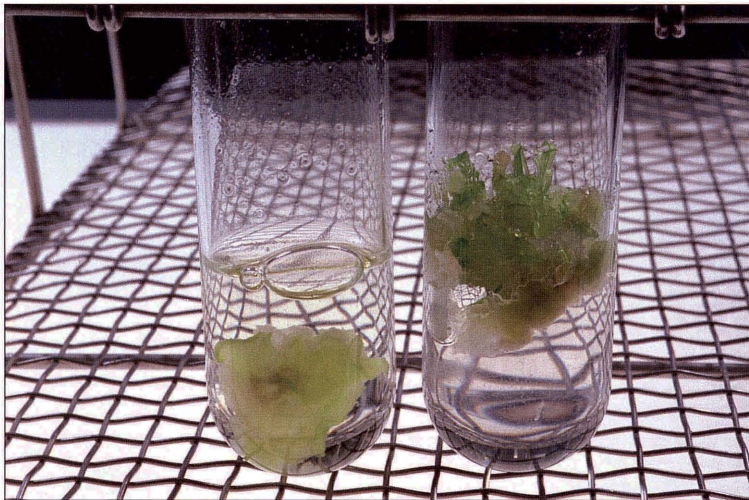


図1 リーフレタスの苗条原基（左）と苗条原基からのシュートの誘導（右）

このようにして得られたシュートを分割し、ホルモンフリーの培地に移植したところ、発根させることが可能であった。発根の状況を図2に示した。発根は、1ヵ月後に約40%、2ヵ月後に約75%のシュートで認められた。

以上の結果から、苗条原基を経由するリーフレタスのシュートの誘導系が確立できた。苗条原基は、多数の分化途中の細胞を表面に分布させている状態と考えられ、従って、苗条原基の状態の細胞塊に対して遺伝子導入を試みれば、多数の形質転換体を得る可能性があるものと予想される。すなわち、本研究によって明らかにされた培養条件は、遺伝子組換え植物の作出に利用できるものと考えられた。しかし、発根までに時間がかかり、今後、発根率をさらに向上させるための条件検討が必要と考えられた。



図2 リーフレタス苗条原基由来シュートからの発根状況

#### (2) *Agrobacterium tumefaciens* による遺伝子組換え

リーフレタスのシュート誘導系を利用して、リーフレタスの形質転換を試みた。BA 0.1 mg l<sup>-1</sup>, NAA 0.1 mg l<sup>-1</sup>のホルモン条件で培養した苗条原基に対しGUS遺伝子の導入を試みた結果、苗条原基に感染させて約20日後に選抜培地上で成長する個体が認められた。さらに2週間培養し、選抜用の抗生物質を含む発根用の培地に移植したところ、良好に発根したシュートが得られた。

これら抗生物質耐性を獲得したと考えられたリーフレタスの葉のGUS活性を測定した結果を図3に示した。明らかに青く染色される組織が見られた。本実験に用いたpIG121-Hmでは、GUS遺伝子の5'上流にイントロンが挿入されているため、これらの発色は、植物細胞内で遺伝子が発現したことを示している<sup>(8)</sup>。従って、GUS遺伝子を導入されたリーフレタス植物が本法によって得られることがわかった。ただし、発色はいずれも葉の細胞の一部に限られており、組換えられた細胞がキメラ状に分布している可能性は否定できない。今後、さらに継代を重ね、あるいは苗条原基を再度経由させて得たシュートを用いてGUS活性を測定し形質転換されたことを確かめる必要がある。

#### 4. 総括

本研究の結果、苗条原基を経由するリーフレタスのシュート誘導系を確立できた。レタスの苗条原基は、基本的にはサイトカイニンを処理した液体培地を用いた回転培養で容易に誘導されるものと考えられる。今後、発根条件などに改善の必要があると思われるものの、この苗条原基に対して *Agrobacterium tumefaciens* を感染させ、形質転換体を得ることが可能と

考えられた。ただし、本実験で得られた抗生物質耐性個体についてはさらに詳細に解析し、安定な形質転換体を得られたことを確認する必要がある。苗条原基の利用は、レタス形質転換体の得られる頻度を高めると期待される。本研究の結果は、今後、遺伝子組換え野菜を利用した保健医療分野などへ応用できるものと考えられる。

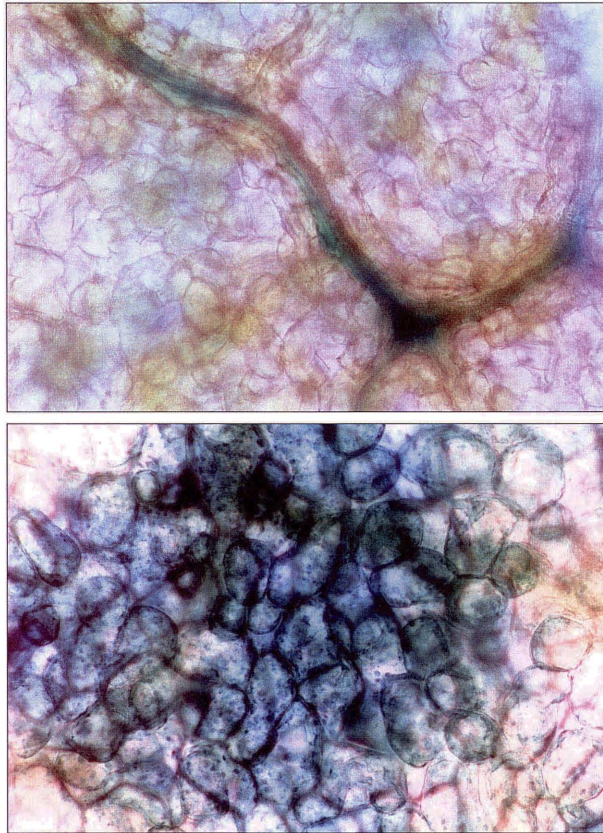


図3 抗生物質耐性リーフレタスの葉の GUS 活性測定結果

上：通導組織で発色が確認されたもの。下：葉肉細胞で発色が確認されたもの。

#### 引用文献

- (1) 太田喜元, 秋田求 (2002) 植物による異種タンパク質生産. 近畿大学生物理工学部紀要, 11, 1-23
- (2) Houdebine, L.M. (2002) Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 625-629
- (3) Hood, E.E., Woodard, S.L. and Horn, M.E. (2002) Monoclonal antibody manufacturing in

- transgenic plants - myths and realities. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 630-635
- (4) Webster D.E., Cooney, M. L., Huang, Z., Drew, D.R., Ramshaw, I.A., Dry, I.B., Strugnell, R.A., Martin, J. L. and Wesselingh, S.L. (2002) Successful booting of a DNA measles immunization with an oral plant-derived measles virus vaccine. *Journal of Virology*, 76, 7910-7912
- (5) Gil, F., Brun, A., Wigdorovitz, A., Catala, R., Martinez-Torrecuadrada, J.L., Casal, I., Salinas, J., Borca, M.V. and Escribano, J.M. (2001) High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. *FEBS Letters*, 488, 13-17
- (6) 高木千明, 君塚祐子 (1990) レタス In: 野菜の組織・細胞培養と増殖, 最新バイオテクノロジー全書 2 (最新バイオテクノロジー全書編集委員会編) pp273-279, 農業図書, 東京
- (7) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497
- (8) Ohta, S., Satou, M., Hattori, T. and Nakamura, K. (1990) Construction and expression in tobacco of a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiology*, 31, 805-813

## 英文抄録

### Development of an efficient method for transformation of leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.)

Luo ShuPing, Motomu Akita and Yoshimoto Ohta

An efficient method for transformation of leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) was developed. Leaf primordia-like tissue was established from the apical meristem under rotation culture using BA containing medium. Adventitious shoots with roots were efficiently induced from the tissue. When *Agrobacterium tumefaciens* harboring GUS gene was infected to the primordia-like tissue, shoots were generated on a selection medium and they clearly showed GUS activity.

